



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0045935

(43) 공개일자 2015년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/074 (2010.01) *A61K 35/12* (2015.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7032963

(22) 출원일자(국제) 2013년04월24일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년11월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/037996

(87) 국제공개번호 WO 2013/163296

국제공개일자 2013년10월31일

(30) 우선권주장

61/637,631 2012년04월24일 미국(US)

61/779,533 2013년03월13일 미국(US)

(71) 출원인

더 브리검 앤드 우먼즈 하스피탈, 인크.

미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75

리첸

일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1

(72) 발명자

바칸티 찰스 에이.

미국 01569 메사추세츠주 어즈브리지 폰드 스트리트 355

바칸티 마틴 피.

미국 66502 캔자스주 맨하탄 몬티첼로 디알. #2 1441

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

문두현, 문기상

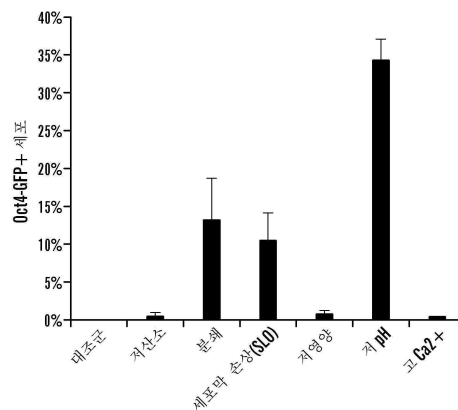
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **다능성 세포를 다시 생성하는 방법**

(57) 요약

본원에 기재된 기술은 세포가 예를 들어 외부 유전 물질의 도입 없이 더욱 다능성 상태가 되게 하는 것과 관련되는 방법, 분석법, 및 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5a



도 5A

(72) 발명자

고지마 고지

미국 02446 메사추세츠주 브루클라인 50 롱우드 애
비뉴 #414

오보카타 하루코

일본국 사이타마켄 와코시 히로사와 2-1 리켄 내

와카야마 데루히코

일본국 사이타마켄 와코시 히로사와 2-1 리켄 내

사사이 요시키

일본국 사이타마켄 와코시 히로사와 2-1 리켄 내

야마토 마사유키

일본국 도쿄도 신주쿠구 가와다초 8-1 도쿄 우먼스
메디컬 유니버시티 내

명세서

청구범위

청구항 1

세포에 스트레스를 가하는 단계를 포함하는, 다능성 세포의 생성 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 다능성 세포는 외인성 유전자, 전사물, 단백질, 핵성분 또는 세포질의 도입 없이, 또는 세포 융합 없이 생성되는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 조직의 일부로서 존재하지 않는 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 체세포, 줄기 세포, 전구 세포 또는 배아 세포인 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 분리된 세포인 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 세포의 이중 개체군에 존재하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 세포의 동종 개체군에 존재하는 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계는 줄기 세포 마커를 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 줄기 세포 마커는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법:

Oct4; Nanog; E-cadherin, 및 SSEA4.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계는 부착되지 않은 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트레스는 조직 또는 세포 배양에서의 비생리적 스트레스를 포함하는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트레스는 세포의 하기로부터 선택되는 하나 이상의 환경적 자극에의 노출을 포함하는 방법: 외상, 기계적 자극, 화학적 노출, 조음파 자극, 산소-부족, 방사선, 극한 온도에서의 노출, 분리, 분쇄, 신체적 스트레스, 고삼투압, 저삼투압, 막 손상, 독소, 극한 이온 농도, 활성 산소, UV 노출, 강한 가시광선, 필수 영양분의 부족, 또는 비생리적 산성 환경.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트레스는 세포의 약 3.0 내지 약 6.8의 pH에의 노출을 포함하는 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트레스는 세포의 약 4.5 내지 약 6.0의 pH에의 노출을 포함하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 스트레스는 세포의 약 5.4 내지 약 5.8의 pH에의 노출을 포함하는 방법.

청구항 17

제 12 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 2-3일간 노출되는 방법.

청구항 18

제 12 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 1 일 이하 동안 노출되는 방법.

청구항 19

제 12 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 1 시간 이하 동안 노출되는 방법.

청구항 20

제 12 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 약 30 분간 노출되는 방법.

청구항 21

제 13 항에 있어서,

상기 극한 온도에서의 노출은 35 ℃ 미만 또는 42 ℃ 초과 온도에서 세포를 노출시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 극한 온도에서의 노출은 어느점 이하의 온도에서 세포를 노출시키는 것 또는 세포의 약 85 ℃ 이상의 온도에서의 노출을 포함하는 방법.

청구항 23

제 13 항에 있어서,

상기 기계적 자극은 세포를 전단 응력 또는/및 고압에 노출시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 기계적 자극은 세포의 크기보다 더 작은 구멍을 갖는 하나 이상의 장치에 세포를 통과시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 25

제 23 항에 있어서,

상기 기계적 자극은 점진적으로 더 작은 구멍을 갖는 다수의 장치에 세포를 통과시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 26

제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 세포의 증식이 가능하도록 상기 다능성 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제 1 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 세포는 줄기 세포 마커를 발현하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

상기 줄기 세포 마커는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법:

Oct4; Nanog; E-cadherin, 및 SSEA4.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 포유동물 세포인 방법.

청구항 30

제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 인간 세포인 방법.

청구항 31

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 성체 세포, 신생아 세포, 태아 세포, 양막 세포, 또는 제대혈 세포인 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서,
생체외에서 상기 다능성 세포를 유지하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포의 후성유전적 상태는 배아 줄기 세포의 후성유전적 상태와 보다 근사하도록 개조되는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서,
상기 후성유전적 상태는 메틸화 패턴을 포함하는 방법.

청구항 35

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스트레스는 세포로부터 약 40% 이상의 세포질을 제거하는 것을 포함하는 방법.

청구항 36

제 35 항에 있어서,
약 50% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,
약 60% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.

청구항 38

제 37 항에 있어서,
약 60-80%의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.

청구항 39

제 37 항에 있어서,
약 80% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.

청구항 40

제 39 항에 있어서,
약 90% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.

청구항 41

제 1 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스트레스는 세포로부터 약 40% 이상의 미토콘드리아를 제거하는 것을 포함하는 방법.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

세포질의 일부의 제거는 세포질로부터 약 50% 이상의 미토콘드리아를 제거하는 방법.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

세포질 또는 미토콘드리아의 제거는 세포질로부터 약 50%-90%의 미토콘드리아를 제거하는 방법.

청구항 44

제 42 항에 있어서,

세포질 또는 미토콘드리아의 제거는 세포질로부터 90% 초과 미토콘드리아를 제거하는 방법.

청구항 45

제 1 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트레스는 스트레스에 노출된 세포들 중 약 10% 이상의 세포막을 파괴하기에 충분한 방법.

청구항 46

제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 다능성 세포를 후보 물질과 접촉시키는 단계를 포함하는 분석법.

청구항 47

제 46 항에 있어서,

상기 다능성 세포의 생존력, 분화도, 증식력 중 어느 하나 이상에 영향을 주는 물질을 확인하기 위해 사용되는 분석법.

청구항 48

대상체에 대한 세포 치료의 방법에서의 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 다능성 세포의 용도.

청구항 49

하기를 포함하는, 대상체에 투여되는 세포 치료에 적합한 세포 또는 조직의 제조 방법:

제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따라 세포로부터 다능성 세포를 생성하는 단계;

상기 세포는 자가 세포 또는 HLA-매칭된 동종이형 세포임.

청구항 50

제 49 항에 있어서,

상기 대상체에 상기 세포 또는 조직을 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 상기 다능성 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 51

제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 세포로부터 생성되는 다능성 세포를 포함하는 조성물.

청구항 52

부신피질자극 호르몬 (ACTH), 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 다능성 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 53

제 52 항에 있어서,
상기 세포는 ACTH를 포함하는 LIF 배지에서 배양되는 방법.

청구항 54

제 52 항 또는 제 53 항에 있어서,
상기 ACTH는 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M의 농도로 존재하는 방법.

청구항 55

제 52 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생성된 세포인 방법.

청구항 56

제 52 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 전능성 세포인 방법.

청구항 57

제 52 항 내지 제 56 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 3 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.

청구항 58

제 52 항 내지 제 57 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 5 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.

청구항 59

제 52 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 7 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.

청구항 60

제 52 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 배양 단계 이후, 상기 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 검출 가능한 수준의 줄기 세포 마커를 발현하는 방법:

Oct3/4; Nanog; Rex1; Klf4; Sox2; Klf2; Esrr-beta; Tbx3; 및 Klf5.

청구항 61

부신피질자극 호르몬 (ACTH), 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 다능성 세포의 자기재생력을 증가시키는 방법.

청구항 62

제 61 항에 있어서,
상기 세포는 ACTH를 포함하는 LIF 배지에서 배양되는 방법.

청구항 63

제 61 항 또는 제 62 항에 있어서,

상기 ACTH는 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M의 농도로 존재하는 방법.

청구항 64

제 61 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생성된 세포인 방법.

청구항 65

제 61 항 내지 제 64 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 전능성 세포인 방법.

청구항 66

제 61 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 3 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.

청구항 67

제 61 항 내지 제 66 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 5 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.

청구항 68

제 61 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 7 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.

청구항 69

제 61 항 내지 제 68 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 단계 이후, 상기 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 검출 가능한 수준의 줄기 세포 마커를 발현하는 방법:

Oct3/4; Nanog; Rex1; Klf4; Sox2; Klf2; Esrr-beta; Tbx3; 및 Klf5.

청구항 70

하기를 포함하는, 세포 치료를 필요로 하는 대상체에서의 자가 세포 치료 방법,

a. 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 따라 세포로부터 다능성 세포를 생성하는 단계, 상기 세포는 상기 대상체로부터 수득됨, 및

b. 상기 대상체에 상기 다능성 세포 또는 그 분화된 자손을 포함하는 조성물을 투여하는 단계.

청구항 71

제 70 항에 있어서,

상기 대상체에 상기 조성물을 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 다능성 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 72

FGF4의 존재 하에 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 다능성 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 태반 세포로 분화될 수 있는 다능성 세포의 제조 방법.

청구항 73

제 72 항에 있어서,

FGF4의 농도는 1 nM 내지 1 μ M인 방법.

청구항 74

제 72 항 또는 제 73 항에 있어서,

상기 다능성 세포는 배아 줄기 세포로 분화될 수 있는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원의 상호-참조

[0002]

본 출원은 2012년 4월 24일에 출원된 미국 가출원 제61/637,631호 및 2013년 3월 13일에 출원된 제61/779,533호의 35 U.S. C. § 119(e) 하의 이익을 주장하며, 그것의 내용은 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함된다.

[0003]

기술 분야

[0004]

본원에 기재된 기술은 다능성 세포의 생성에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

다능성 세포를 얻기 위한 현재의 방법은 주로 가용성(availability)이 제한된 조직 (예를 들어, 배조직 또는 제대혈) 또는 리프로그래밍 인자(reprogramming factor)의 첨가에 의존하고 (Hanna, J. et al. Cell 2008 133, 250-264; Hockemeyer, D. et al. Cell stem cell 2008 3, 346-353; Kim, D. et al. Cell stem cell 2009 4, 472-476; Kim, J. B. Nature 2009 461, 649-643; Okabe, M. et al. Blood 2009 114, 1764-1767), 이는 외인성 핵산(exogenous nucleic acid)의 도입과 관련된다. 외인성 리프로그래밍 인자의 첨가에 의해 도입된 합병증 없이, 줄기 세포, 특히 자가 줄기 세포를 용이하게 생성하는 방법은 세포 분화에 대한 연구 및 줄기-세포에 기초한 치료의 발달을 가속화할 것이다. 자극물, 예컨대 화학, 화학적 손상, 외상 및 방사선에 대한 노출의 결과로서의 세포의 손상은 정상 체세포를 암세포로 바꿀 수 있다고 가정되나, 건강한 성체 체세포는 리프로그래밍 인자의 특정 조작 없이 다른 상태로 전환된다는 직접적인 증거는 없다.

[0006]

이전에, 연구자들은 성체 조직에서의 "성체 줄기 세포" 발견을 보고한 바 있다 (Reynolds, B. A. & Weiss, S. Science 1992 255, 1707-1710; Megeney, L. A. et al. Genes & development 1996 10, 1173-1183; Caplan, A. I. Journal of orthopaedic research 1991 9, 641-650; Lavker, R. M. & Sun, T. T. The Journal of investigative dermatology 1983 81, 121s-127s). 이러한 보고는 논란이 되고 있다. 예를 들어, 줄기 세포 마커 Oct4를 발현하는 세포를 찾는 연구자들은 정상적인 항상성을 갖는 성체 골수에서 Oct4-발현 세포를 발견하는데 실패하였고 (Lengner, C. J. et al. Cell Cycle 2008 7, 725-728; Berg, J. S. & Goodell, M. A. Cell stem cell 2007 1, 359-360), 한편 다른 연구자들은 상이한 성체 조직들로부터의 Oct4-발현 세포를 분리하는 능력을 보고하고 있다 (Jiang, Y. et al. Nature 2010 418, 41-49; D'Ippolito, G. et al. Journal of cell science 2004 117, 2971-2981; Johnson, J. et al. Cell 2005 122, 303-315; Kucia, M. et al. Leukemia 2006 20, 857-869; Kuroda, Y. et al. PNAS 2011 107, 8639-8643; Obokata, H. et al. Tissue engineering. 2011 Part A 17, 607-615; Rahnama-Azar, A. et al. Cytotherapy 2011 13, 179-192; Huang, Y. et al. Transplantation 2010 89, 677-685; Zuba-Surma, E. K. et al. Journal of cellular and molecular medicine 2011 15, 1319-1328; Paczkowska, E. et al. Annals of transplantation 2011 16, 59-71). 이러한 세포는 성체 줄기 세포의 개체군(population)을 나타내거나 단순히 사용된 기술에 의해 야기된 인공산물(artifact)이라고 가정되고 있다. 어느 경우든, 이는 드문 것으로 남아 있고 연구 및 치료적 목적을 위한 다능성 세포의 적합한 공급원을 나타내지 않는다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0007]

요약

[0008]

예를 들어, 분화된 또는 성체 세포로부터 다능성 세포를 다시 생성하거나 제조하는 방법이 본원에 기술되어 있다. 본원에 기술된 상기 방법은 또한 세포의 다능성을 증가시키는 것 (또는, 예를 들어 세포의 성숙을 감소시

키는 것), 예를 들어 다분화능 세포(multipotent cell)가 다능성(pluripotent)이 되게 하는 것과 관련될 수 있다. 다능성 세포의 생산과 관련되는 본원에 기재된 기술의 양태(aspect)는 환경 스트레스가 세포를 더욱 다능성 표현형을 띠게 유도할 수 있다는 발명자의 인식에 기초한다.

[0009]

하나의 양태에 있어서, 세포에 스트레스를 가하는 단계를 포함하는, 다능성 세포를 생성하는 방법이 본원에 기술된다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 방법은 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 조직의 일부로서 존재하지 않는다. 일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 세포로부터 약 40% 이상의 세포질을 제거하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 세포로부터 약 40% 이상의 미토콘드리아를 제거하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 스트레스에 노출된 세포들 중 10% 이상의 세포막을 파괴하기에 충분한 것이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 체세포, 줄기 세포, 전구 세포(progenitor cell) 또는 배아 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 분리된 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 세포의 이종 개체군에 존재한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 세포의 동종 개체군에 존재한다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계는 Oct4 또는 Nanog를 발현하는 세포, 또는 Oct4 및 Nanog를 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계는 부착되지 않은 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0010]

일부 실시형태에 있어서, 약 50% 이상의 세포질이 세포로부터 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 약 60% 이상의 세포질이 세포로부터 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 60-80%의 세포질이 세포로부터 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 약 80% 이상의 세포질이 세포로부터 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 약 90% 이상의 세포질이 세포로부터 제거된다.

[0011]

일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 하기로부터 선택되는 하나 이상의 환경 자극에 대한 세포의 노출을 포함한다: 외상, 기계적 자극, 화학적 노출, 조음과 자극, 산소-부족, 방사선, 및 극한 온도에서의 노출. 일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 약 4.5 내지 약 6.0의 pH에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 약 5.4 내지 약 5.8의 pH에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1 일 이하로 노출된다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1 시간 이하로 노출된다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 30 분간 노출된다.

[0012]

일부 실시형태에 있어서, 극한 온도에서의 노출은 세포를 35 °C 미만 또는 42 °C 초과 온도에 노출하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 극한 온도에서의 노출은 어느점 이하의 온도에 세포를 노출시키는 것 또는 약 85 °C 이상의 온도에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 기계적 자극은 세포의 크기보다 작은 구멍을 갖는 하나 이상의 장치에 세포를 통과시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 기계적 자극은 점차적으로 더 작은 구멍을 갖는 다수의 장치에 세포를 통과시키는 것을 포함한다.

[0013]

일부 실시형태에 있어서, 세포질의 일부의 제거는 세포질로부터 약 50% 이상의 미토콘드리아를 제거한다. 일부 실시형태에 있어서, 세포질 또는 미토콘드리아의 제거는 세포질로부터 약 50%-90%의 미토콘드리아를 제거한다. 일부 실시형태에 있어서, 세포질 또는 미토콘드리아의 제거는 세포질로부터 90% 초과 미토콘드리아를 제거한다.

[0014]

일부 실시형태에 있어서, 상기 방법은 다능성 세포의 증식을 가능하게 하기 위해 상기 다능성 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포는 Oct4 및 Nanog로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 다능성 줄기 세포 마커를 발현한다.

[0015]

일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 성체 세포 또는 신생아 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 방법은 생체외에서 상기 다능성 세포를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포의 후성유전적 상태는 배아 줄기 세포의 후성유전적 상태와 보다 근사하도록 변경된다. 일부 실시형태에 있어서, 후성유전적 상태는 메틸화 패턴을 포함한다.

[0016]

하나의 양태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 다능성 세포를 후보 물질과 접촉하는 단계를 포함하는 분석법(assay)이 본원에 기술된다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 분석법은 다능성 세포의 생존력, 분화, 증식 중 하나 이상에 영향을 주는 물질을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0017]

하나의 양태에 있어서, 대상체에 대한 세포 치료의 방법에서의 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 다능성 세포의 용도가 본원에 기술된다.

- [0018] 하나의 양태에 있어서, 대상체로부터 얻은 세포로부터 본원에 기술된 방법에 따라 다능성 세포를 생성하는 단계, 및 상기 다능성 세포 또는 그 분화된 자손(progeny)을 포함하는 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 세포 치료를 필요로 하는 대상체에서의 자가 세포 치료(autologous cell therapy)의 방법이 본원에 기술된다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에 상기 조성물을 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 상기 다능성 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 하나의 양태에 있어서, 다능성 세포를 포함하는 조성물이 본원에 기술되어 있고, 상기 다능성 세포는 본원에 기술된 방법에 의해 세포로부터 생성된다.
- [0020] 하나의 양태에 있어서, 다능성 세포의 자기재생력(self-renewal ability)을 증가시키는 방법이 본원에 기술되어 있고, 상기 방법은 부신피질자극 호르몬 (ACTH) 또는 3i 배지(medium)의 존재 하에 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 ACTH를 포함하는 LIF 배지에서 배양된다. 일부 실시형태에 있어서, ACTH는 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 전능성 세포(totipotent cell)이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 3 일 이상 동안 ACTH 또는 3i 배지의 존재 하에 배양된다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 5 일 이상 동안 ACTH 또는 3i 배지의 존재 하에 배양된다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 7 일 이상 동안 ACTH 또는 3i 배지의 존재 하에 배양된다. 일부 실시형태에 있어서, 배양 단계 이후, 상기 세포는 Oct3/4; Nanog; Rex1; Klf4; Sox2; Klf2; Esrr-beta; Tbx3; 및 Klf5로 이루어지는 군에서 선택되는 검출 가능한 수준의 줄기 세포 마커를 발현한다.
- [0021] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에서 사용되는 세포는 생체내에 있다. 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에서 사용되는 세포는 생체외에 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1A-1D는 CD45 양성 체세포로부터의 Oct4 발현 세포 생성을 도시한다. 도 1A는 스트레스 처리된 세포의 Oct4-GFP 발현을 도시한다. 스트레스-처리된 세포는 Oct4-GFP를 발현하고, 한편 비처리된 대조군은 그렇지 아니하였다. Oct4-발현 군체(colony)의 확대도는 스트레스-처리된 군에서 오른쪽 상부에 나타내었다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다. 도 1B는 스트레스-처리된 세포 및 비-스트레스 처리된 대조군의 개체군 분석을 도시한다. GFP 발현 세포 개체군은 5 일째의 스트레스 처리된 군에서만 관찰된다. 도 1C는 스트레스 처리 전과 처리 후 7 일째의 CD 45 양성 세포의 세포-크기 분석을 도시한다. 도 1D는 스트레스 처리 후 CD45 양성 세포의 경시 변화를 도시한다.
- 도 2A-2B는 동물 칼루스 세포 (ACC)의 특성을 도시한다. 도 2A는 다능성 마커 유전자의 시기적 유전자 발현 변화를 도시한다. 전령 RNA 수준은 GAPDH에 대하여 표준화하였다 (n=3, 평균+표준편차). 도 2B는 Oct4 및 Nanog 프로모터 유전자의 메틸화 분석을 도시한다.
- 도 3A-3D는 스트레스 처리 후 세포 변형을 도시한다. 도 3A는 ACC 생성 단계 동안 스트레스 방어 유전자의 상대적 유전자 발현을 도시한다. 샘플은 3 일 및 7 일째 수집되었고 CD45 양성 세포와 비교하였다. (n=3, 평균+표준편차) 도 3B는 총 세포 ATP 측정값을 도시한다. (n=3, 평균+표준편차) 도 3C는 ROS 측정값을 도시한다. 에러 바는 표준편차를 나타낸다. 도 3D는 mtDNA 복제 인자의 상대적 유전자 발현을 도시한다. (n=3, 평균+표준편차)
- 도 4A-4B는 ACC로부터의 키메라 마우스 생성을 도시한다. 도 4A는 키메라 마우스 생성의 개략도를 도시한다. 패널 (i)는 AC가 트립신으로 단일 세포로 분리되었고 또는 패널 (ii) AC가 작은 조각으로 절단된 후 배반포로 주입되었음을 입증하고 있다. 도 4B는 키메라 기여도 분석을 도시한다. 9 마리의 새끼로부터의 조직을 FACS에 의해 분석하였다.
- 도 5A-5C ACC-생성 조건으로의 실험. 도 5A는 CD45 양성 세포가 다양한 스트레스에 노출되고 Oct4-GFP 발현이 FACS에 의해 분석된 것을 나타낸다. 스트레스 처리 후 생존된 세포에서의 Oct4-GFP 발현 세포의 백분율. (n=3, 평균+표준편차) 도 5B는 pH 조건의 측정값을 도시한다. CD45 양성 세포를 상이한 pH 용액에 노출시켰다. 스트레스 처리 후 3 일째, Oct4-GFP 발현을 FACS에 의해 분석하였다. 도 5C는 배양 조건의 측정값을 도시한다. 스트레스 처리된 세포를 다양한 배지에서 배양하였다. GFP-발현 AC의 수를 14 일째 계수하였다. (n=3, 평균+표준편차)
- 도 6A-6B는 ICR 마우스로부터 유래된 CD45 양성 세포로부터의 ACC 생성을 도시한다. 도 6A는 스트레스 처리 후

CD45 양성 세포의 경시 변화를 도시한다. E-cadherin 및 SSEA-1의 발현을 FACS에 의해 분석하였다. 도 6B는 E-Cadherin/SSEA1 이중 양성 세포의 Oct4 유전자 발현이 RT-PCR에 의해 확인되었음을 입증한다. (n=3, 평균+표준편차)

도 7A-7B는 GOF 마우스로부터 유래된 다양한 조직으로부터의 ACC 생성을 도시한다. 도 7A는 스트레스 처리 후 Oct4-GFP 발현 세포의 비율을 도시한다. 체세포를 다양한 조직으로부터 분리하였고 다양한 스트레스에 노출시켰다. Oct4-GFP 발현을 FACS에 의해 분석하였다. 도 7B는 다양한 조직으로부터 유래된 ACC의 배아 유전자 발현을 도시한다. 유전자 발현은 GAPDH에 대하여 표준화하였다. (n=3, 평균+표준편차)

도 8은 첫 7 일간 스트레스 방어 유전자의 상대적 유전자 발현을 도시한다. 스트레스 처리 후, 세포를 1, 3 및 7 일째에 수집하였고 유전자 발현을 정상 CD45 양성 세포와 비교하였다. 청색 그래프는 열충격 단백질의 유전자 발현을 나타낸다. 녹색 그래프는 DNA 복구 유전자 발현을 나타낸다. 적색 그래프는 산화환원 유전자(redox gene)의 유전자 발현을 나타낸다. Y-축은 발현의 상대적 배수를 나타낸다.

도 9는 ACC의 분화를 도시한다. 그래프는 키메라 기여도 분석을 도시한다. 다양한 체세포로부터 유래된 ACC로 생성된 키메라 태아를 FACS에 의해 분석하였다. 그래프를 E13.5 내지 15.5에서 5 개의 키메라 태아의 평균을 나타내고 있다.

도 10은 간엽-상피 전이(Mesenchymal-Epithelial Transition) (MET)를 통해 스트레스 처리가 체세포에 대해 리프로그래밍을 야기하는 것을 입증하고 있다. MET-관련 유전자의 발현은 정상 세포에서, 그리고 스트레스 처리의 시작 후 3 및 7 일째 세포에서 나타났다. y-축은, 그 유전자에 대한 발현 수준에 의한, 샘플 내의 수준에 대하여 표준화한, % 발현을 나타내고 있다.

도 11은 스트레스 전과 후의 세포 개체군의 FACS 분석을 도시한다. GFP 발현이 명백하였고, 이는 각각의 시험된 조직 유형으로부터 스트레스 처리 후의 세포 개체군에서 다능성 세포의 생성을 나타낸다.

도 12A-12E는 저-pH 처리가 수임 체세포(committed somatic cell)에서 운명(fate) 전환을 유도하였음을 입증한다. 도 12A는 개략적 실험 프로토콜을 도시한다. 도 12B는 유세포 분석법(flow cytometry analysis)을 도시한다 (상부열: $oct3/4::GFP^{+}/CD4^{5-}$; 하부열: 비-처리된 $CD4^{5+}$ 세포). y 축은 Oct3/4:GFP 세포의 수이고, X 축은 CD45+ 세포의 수이다. 두 축은 0, 100, 1000, 및 10,000의 주요 단위로 표시되었다. 도 12C는 배양시 시간에 따른 생존가능한 $oct3/4::GFP^{+}$ 및 $oct3/4::GFP^{-}$ 세포의 그래프를 도시한다. 도 12D는 $oct3/4::GFP^{+}$ 세포 (좌측 피크) 및 CD45+ 세포 (우측 피크)의 세포 크기의 그래프를 도시한다. 도 12E는 계층 PCR에 의한 분리된 $oct3/4::GFP^{+}$ 구체에서의 $tcr\beta$ 의 계층 재배열의 분석의 결과를 도시한다.

도 13A-13B는 저-pH-유도된 Oct3/4⁺ 세포가 다능성을 갖는 것을 입증한다. 도 13A는 CD45+ 세포와 비교한, d7에서의 저-pH-유도된 $oct3/4::GFP^{+}$ 세포에서의 qPCR에 의한 유전자 발현 분석의 그래프를 도시한다 (일련의 것을 나타냄, 좌측부터 우측으로, $oct3/4$, $nanog$, $sox2$, $ecat1$, $esgl$, $dax1$ 및 $klf4$ 발현). 샘플을 3 일 및 7 일째 수집하였고 CD45 양성 세포와 비교하였다. (n=3, 평균+표준편차) 도 13B는 바이설파이트 시퀀싱(bisulphite sequencing)의 결과가, $oct3/4$ 및 $nanog$ 프로모터의 것이었음을 도시한다. 추가적인 배양을 하거나 하지 않은 CD45⁺ 세포는 두 프로모터에서 다량으로 메틸화된 패턴을 나타내었다.

도 14A-14B는 STAP 세포가 다른 조직 공급원으로부터 얻어질 수 있다는 것을 입증한다. 도 14A는 다수의 조직에 대해 d7 배양에서의 $oct3/4::GFP^{+}$ 세포의 제조의 비율의 그래프를 도시한다 (일련의 것을 나타냄, 좌측부터 우측으로, CD45+ 세포, 골수, 뇌, 폐, 근육, 지방, 섬유아세포, 간, 및 연골세포). 도 14B는 $oct3/4::GFP^{+}$ 세포 클러스터에서의 유전자 발현 분석의 그래프를 도시한다 (일련의 것을 나타냄, 좌측부터 우측으로, Oct3/4, Nanog, Sox2, Klf4, 및 Rex1의 발현).

도 15A-15B는 다능성 세포로서 STAP 세포의 특징을 도시한다. 도 15A는 STAP 세포에서의 ES 세포 마커의 유전자 발현의 그래프를 도시한다 (일련의 것을 나타냄, 좌측부터 우측으로, ES, EpiSC, STAP, 및 CD45). 도 15B는 STAP 세포에서의 X-염색체 불활성화의 %의 그래프를 도시한다.

도 16A는 다양한 스트레스에 노출된 CD45 양성 세포에서 FACS에 의해 분석된 Oct4-GFP 발현의 그래프를 도시한다. 스트레스 처리 후 생존된 세포에서의 Oct4-GFP 발현 세포의 백분율. (n=3, 평균+표준편차) 도 16B는 pH 조건의 측정값의 그래프를 도시한다. CD45 양성 세포를 상이한 pH 용액에 노출시켰다. 스트레스 처리 후 3 일

제, Oct4-GFP 발현을 FACS에 의해 분석하였다. (n=3, 평균+표준편차) 도 16C는 배양 조건의 측정값의 그래프를 도시한다. 스트레스 처리된 세포를 다양한 배지에서 배양하였다. GFP-발현 스트레스 개조(altered) 세포의 수를 14 일째 계수하였다. (n=3, 평균+표준편차)

도 17A-17B는 ICR 마우스로부터 유래된 CD45 양성 세포로부터의 SAC 생성을 도시한다. 도 17A는 스트레스 처리 후 CD45 양성 세포의 경시 변화를 도시한다. E-cadherin 및 SSEA-1의 발현을 FACS에 의해 분석하였다. 도 17B는 RT-PCR에 의해 확인된 E-Cadherin/SSEA1 이중 양성 세포의 Oct4 유전자 발현의 그래프를 도시한다. (n=3, 평균+표준편차)

도 18A-18B는 GOF 마우스로부터 유래된 다양한 조직으로부터의 SAC 생성을 도시한다. 도 18A는 스트레스 처리 후 Oct4-GFP 발현 세포의 비율의 그래프를 도시한다. 체세포는 다양한 조직으로부터 분리되고, 다양한 스트레스에 노출되었다. Oct4-GFP 발현을 FACS에 의해 분석하였다. 좌측부터 우측으로 BM, 뇌, 폐, 근육, 지방, 섬유아세포, 및 간을 나타낸다. 도 18B는 다양한 조직으로부터 유래된 SAC의 배아 유전자 발현의 그래프를 도시한다. 유전자 발현을 GAPDH에 의해 표준화하였다. (n=3, 평균+표준편차) 좌측부터 우측으로 Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, 및 Ecatl을 나타낸다.

도 19는 첫 7 일간의 스트레스 방어 유전자의 상대적 유전자 발현의 그래프를 도시한다. 스트레스 처리 후, 세포를 1, 3 및 7 일째 수집하였고, 유전자 발현을 정상 CD45 양성 세포와 비교하였다. Y-축은 발현의 상대적 배수를 나타낸다.

도 20은 CD45+ 세포로부터의 SAC로부터 유래된 키메라 마우스 및 SAC의 TCR β 사슬 재배열 분석을 도시한다. 2N 키메라 마우스 #1, #2, #3, #5, #6, #7, #8 및 #9는 재배열 DNA를 발현하였다.

도 21은 4N 키메라 마우스의 유전형질 분석을 도시한다. 129/Sv \times B6GFP F1으로부터 유래된 SAC 및 ICR로부터 유래된 4N 배반포에 의해 생성된 4N 키메라 마우스가 SACs(129/Sv \times B6GFP) 특이적 유전자를 발현한 것을 입증하기 위해 유전형질 분석을 수행하였다.

도 22는 STAP 세포가 생체내에서 배아 및 태반 조직 모두에 기여하는 것을 입증한다. 그래프는 주입된 세포가 배아 부분에만 기여한 태아와 태반 및 난황낭 조직에도 기여한 태아의 비율을 도시한다.

도 23A-23C는 FGF4 처리가 STAP 세포에서 일부 영양막-계통(trophoblast-lineage) 특징을 유도하는 것을 입증한다. 도 23A는 STAP 세포로부터 TS-유사 (F4I) 세포를 유도하기 위한 FGF4-처리의 개략도를 도시한다. 도 23B는 마커 발현의 qPCR 분석의 그래프를 도시한다. 도 23C는 FACS 분석에 의한 태반 기여의 정량화 그래프를 도시한다. F4I 세포와 달리, ES 세포는 검출 가능한 수준으로 태반 조직에 대해 기여하지 않았다.

도 24A-24D는 ES 세포-유사 줄기 세포는 STAP 세포로부터 유래될 수 있음을 입증하고 있다. 도 24A는 STAP 세포로부터 줄기 세포주의 유도의 개략도를 도시한다. 도 24B는 120 일에 걸쳐 유지 배양액에서의 STAP-S 세포의 왕성한 성장을 입증하는 그래프를 도시한다. 유사한 결과를 16 개의 독립적인 주들(lines)에서 얻었다. 반면에, 부모(parental) STAP 세포는 수에 있어서 급속하게 감소되었다. 도 24C는 마커 유전자 발현의 qPCR 분석의 그래프를 도시한다. ES 및 STAP-S 세포는 CD45⁺ 세포에서 발현되지 않은 다능성-관련 유전자를 발현하였다. 도 24D는 바이설페이트 시퀀싱에 의한 DNA 메틸화 연구의 개략도를 도시한다.

도 25A-25B는 STAP 줄기 세포가 다능성이고 생식선 전이(germline transmission) 및 사배체 상보(tetraploid complementation)에 부합하는 것을 입증한다. 도 25A는 배반포 주입 분석법 (2N)에서 키메라 마우스에서 다양한 조직에 대한 STAP 세포의 기여도의 그래프를 도시한다. 도 25B는 태반 조직에 대한 기여도의 그래프를 도시한다. 부모 STAP 세포 및 TS 세포와 달리, STAP 세포는 더 이상 태반 기여에 대한 능력을 보유하지 않았다. 3 개의 독립적 주들이 시험되었고 이들 모두는 배아 부분에 대한 실질적 기여를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본원에 기재된 기술의 양태는 세포로부터 다능성 세포의 제조 또는 생성과 관련된다. 본원에 기재된 기술의 양태는, 스트레스가, 세포로 외인성 유전자, 전사물, 단백질, 핵 성분 또는 세포질을 도입할 필요 없이, 또는 세포 융합의 필요 없이, 세포로부터 다능성 줄기 세포의 제조를 유도할 수 있다는 발명자의 발견에 기초한다. 일부 실시양태에 있어서, 스트레스는 세포에서의 세포질 및/또는 미토콘드리아의 양에 있어서의 감소를 유도하고; 이는 탈분화 과정을 야기하고 다능성 세포를 초래한다. 일부 실시양태에 있어서, 스트레스는 예를 들어, 스트레스에 노출된 세포들 중 10% 이상에서 세포막의 파괴를 야기한다. 이러한 다능성 세포는 (생체의 및/또는 생

체내에서) 각각의 3 개의 배엽(three germ layers)으로 분화하는 능력, 생체내에서의 테라토마-유사 세포 매스의 생성, 및 생존가능한 배아 및/또는 키메라 마우스를 생성시키는 능력 중 하나 이상을 특징으로 한다.

[0024] 이에 제한되지 않지만, 세포에서의 세포질 및/또는 미토콘드리아의 양을 감소시키는 스트레스를 포함하는, 특정 환경 스트레스에 의한 세포의 처리는, 미토콘드리아 활성을 감소시키고, 탈분화와 관련된 계능의 영역을 탈메틸 화시키고, 세포가 알려진 탈분화 경로의 마커를 나타내도록 야기할 수 있다는 것을 입증하는 실험이 본원에 기술되어 있다. 따라서, 일부 실시형태에 있어서, 세포로부터 다능성 세포를 생성하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 세포로부터의 약 40% 이상의 세포질 및/또는 미토콘드리아를 감소시키는 단계, 및 다능성 또는 다능성 마커를 나타내는 세포를 선택하는 단계를 포함하고, 상기 세포는 조직에 존재하지 않는다. 또한 세포로부터 다능성 세포를 생성할 수 있는 다른 스트레스 처리가 본원에 기술되어 있다.

[0025] 편의를 위해, 상세한 설명, 실시예 및 첨부된 특허청구범위에서 본원에서 이용되는 특정 용어를 여기에 모아둔다. 달리 언급되거나, 문맥으로부터 시사되지 않는 한, 하기 용어 및 문구는 하기 제공되는 의미를 포함한다. 명백하게 달리 언급되거나, 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 아래의 용어 및 문구는 상기 용어 또는 문구가 그것이 속한 기술분야에서 얻은 의미를 제외하지 않는다. 상기 정의는 특정 실시형태를 기술하는데 보조하기 위해 제공되고, 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해서만 제한되기 때문에 이는 청구된 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자 중 일인에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "포함함" 또는 "포함하다"는, 방법 또는 조성물에 필수적이거나, 필수적이든 그렇지 않든 불특정 요소의 개입의 여지가 있는 조성물, 방법, 및 그것의 각각의 구성요소(들)과 관련하여 사용된다.

[0027] 본원에서 사용되는 용어 "필수적으로 이루어진"은 특정 실시형태에 대해 요구되는 이 요소들을 지칭한다. 상기 용어는 이 실시형태의 기본적인고 신규하거나 기능적인 특징(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 요소의 존재를 허용한다.

[0028] 용어 "이루어진"은 실시형태의 설명에 인용되지 않은 임의의 요소를 제외하는, 본원에 기술된 조성물, 방법, 및 그것의 각각의 구성요소를 지칭한다.

[0029] 본 명세서의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥이 분명하게 다르게 지시하지 않는 한 복수 어구를 포함한다. 따라서 예를 들어, "방법"에 대한 참조는 본원에 기술되고/되거나 본 개시물 등을 읽는 경우 통상의 기술자에게 자명할 것인 하나 이상의 방법들, 및/또는 이 유형의 단계들을 포함한다. 마찬가지로, 단어 "또는"은 문맥이 분명하게 다르게 표시하지 않는 한 "및"을 포함하는 것으로 의도된다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 개시물의 실시 또는 시험에 사용될 수 있음에도 불구하고, 적합한 방법 및 물질은 후에 기술된다. 약어 "예(e.g.)"는 라틴어 *exempli gratia*로부터 유래된 것이고, 비제한적인 예를 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 따라서, 약어 "예(e.g.)"는 용어 "예를 들어"와 동의어이다.

[0030] 세포 생물학 및 분자 생물학에서의 일반 용어의 정의는 문헌 ["The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 19th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter et al. (eds.), and The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]에서 찾을 수 있다. 분자 생물학에서의 일반 용어의 정의는 문헌 [Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10:0763766321); Kendrew et al. (eds.), , Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) and Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds]에서 찾을 수 있다.

[0031] 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2001); Davis et al, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995); Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)]에 기술된 표준 과정을 사용하여 수행되었고, 이는 본원에서 그 전문이 참조로 모두 포함된다.

- [0032] 용어 "줄어들다", "감소하다", "감소된", 및 "감소"는 모두 참조와 관련하여 통계적으로 유의미한 양으로의 감소를 의미하도록 본원에서 사용된다. 그러나, 불확실성을 피하기 위해, "감소하다", "감소", 또는 "줄어들다"는 통상적으로 특정 처리의 부재와 비교하여 10% 이상까지의 감소를 의미하고, 예를 들어 특정 처리의 부재와 비교하여 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 소정 독립체(entity) 또는 파라미터의 완전한 부재를 포함하는 것까지의 감소, 또는 소정 처리의 부재와 비교하여 10-99% 사이의 임의의 감소를 포함할 수 있다.
- [0033] 용어 "증가된", "증가하다, 또는 "높이다"는 모두 일반적으로 통계학적으로 유의미한 양까지의 증가를 의미하기 위해 사용되고; 임의의 불확실성을 피하기 위해, 용어 "증가된", "증가하다", 또는 "높이다"는 참조 수준과 비교하여 약 10% 이상의 증가, 예를 들어 참조 수준과 비교하여 약 20% 이상, 또는 약 30% 이상, 또는 약 40% 이상, 또는 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상, 또는 약 70% 이상, 또는 약 80% 이상, 또는 약 90% 이상, 100% 증가를 포함하는 것까지의 증가 또는 10-100% 사이의 임의의 증가, 또는 참조 수준과 비교하여 약 2배 이상, 또는 약 3배 이상, 또는 약 4배 이상, 또는 약 5배 이상, 또는 약 10배 이상 증가, 또는 2배 내지 10배 사이의 임의의 증가 또는 그 이상을 의미한다.
- [0034] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 질환(disease), 장애(disorder) 또는 의학적 상태(medical condition)와 관련하여 사용되는 경우의 "치료하다", "치료", "치료함", 또는 "개선"은 상태에 대한 치료적 처리를 지칭하고, 그 목적은 증상 또는 상태의 진전 또는 심각성을 반전, 완화, 개선, 억제, 지연 또는 중단하는 것이다. 용어 "치료함"은 상태의 하나 이상의 역효과 또는 증상을 감소시키거나 완화시키는 것을 포함한다. 치료는 일반적으로 하나 이상의 증상 또는 임상적 마커가 감소되는 경우 "유효하다". 대안적으로, 치료는 상태의 진전이 감소되거나 중단되는 경우 "유효하다". 즉, "치료"는 증상 또는 마커의 개선뿐만 아니라 치료의 부재시 예상될 수 있는 증상의 진전 또는 악화의 중지 또는 적어도 늦춤을 포함한다. 유익하거나 바람직한 임상적 결과는, 이에 제한되지 않지만, 하나 이상의 증상(들)의 완화, 상기 장애의 정도의 감소, 건강의 안정된 (즉, 악화되지 않은) 상태, 질환 진전의 지연 또는 늦춤, 및 증상의 개선 또는 경감을 포함한다. 치료는 또한 사망이 통계적으로 예상되는 경우를 넘어 생존한 대상체를 포함할 수 있다.
- [0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "투여함"은 원하는 위치에서의 세포의 적어도 부분적인 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 다능성 세포 및/또는 이러한 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 대상체로의 배치를 지칭한다. 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 다능성 세포 및/또는 이러한 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손을 포함하는 약학적 조성물은 대상체에서 유효한 치료를 초래하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0036] 본원에서 사용되는 "대상체(subject)"는 인간 또는 동물을 의미한다. 일반적으로 동물은 영장류, 설치류, 가축 동물 또는 사냥감 동물과 같은 척추동물이다. 영장류는, 예를 들어 침팬지, 시노몰로구스 원숭이, 거미원숭이, 및 마카크, 예를 들어 붉은털원숭이를 포함한다. 설치류는 마우스, 래트, 우드칩, 페럿, 토끼 및 햄스터를 포함한다. 가축 및 사냥감 동물은 소, 말, 돼지, 사슴, 들소, 버팔로, 고양이와 중, 예를 들어 집고양이, 개과 중, 예를 들어 개, 여우, 늑대, 조류 중, 예를 들어 닭, 앵무, 타조, 및 어류, 예를 들어, 송어, 메기 및 연어를 포함한다. 환자 또는 대상체는 상기의 것, 예를 들어 상기 모든 것의 임의의 하위그룹을 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 상기 대상체는 포유동물, 예를 들어 영장류, 예를 들어, 인간이다.
- [0037] 바람직하게는, 대상체는 포유동물이다. 포유동물은 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말, 또는 소일 수 있으나, 이러한 예에 제한되지 않는다. 인간 이외의 포유동물은 유리하게는 소정 세포 또는 조직의 결함, 기능불량, 및/또는 부전 또는 줄기 세포 분획의 결함, 기능불량, 또는 부전과 관련된 질환의 동물 모델을 나타내는 대상체로서 사용될 수 있다. 또한, 본원에 기술된 방법은 가축 동물 및/또는 애완동물을 치료하는데 사용될 수 있다. 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 대상체는 세포 유형, 조직, 또는 줄기 세포 분획의 결함, 기능불량, 및/또는 부전 또는 이러한 상태와 관련된 하나 이상의 질환 또는 상태를 앓고 있거나, 가진 것으로 전에 진단되거나 확인된 자일 수 있고, 경우에 따라, 이러한 상태에 대한 치료를 이미 받은 자일 수도 있지만 그것이 필수적인 것은 아니다. 대상체는 또한 세포 유형, 조직, 또는 줄기 세포 구획(compartment)의 결함(deficiency), 기능불량(malfunction), 및/또는 부전(failure)을 포함하는 상태를 앓고 있는 것으로 진단되거나 확인되었으나, 이러한 상태에 대한 하나 이상의 치료를 받은 결과로서 알려진 위험 요소에 있어서 개선을 나타내는 자일 수 있다. 대안적으로, 대상체는 또한 이러한 상태를 갖는 것으로 이전에 진단되지 않은 자일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 이러한 상태에 대한 하나 이상의 위험 요소를 나타내는 자 또는 이러한 상태에 대

한 위험 요소를 나타내지 않는 대상체일 수 있다.

- [0038] 본원에서 사용되는, 세포 또는 세포의 개체군에 대해 사용되는 용어 "선택하다"는 원하는 특징을 갖는 하나 이상의 세포를 고르고, 분리하고, 분별하고, 및/또는 선택적으로 증식시키는 것을 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "선택하다"는, 원하는 특징을 가지지 않는 세포는 제공된 조건에서 증식할 수 없음을 반드시 의미하는 것은 아니다.
- [0039] 본원에서 사용되는, "유지하다(maintain)"는 세포 또는 세포의 개체군의 생존력을 지속시키는 것을 지칭한다. 유지된 개체군은 다수의 대사적으로 활성인 세포를 가질 수 있다. 이러한 세포의 수는 1 일 이상의 기간에 걸쳐 대략 안정적일 수 있거나 성장할 수 있다.
- [0040] 본원에서 사용되는 "검출 가능한 수준"은 물질 또는 활성의 양이 참조 수준, 예를 들어 스트레스에 노출되지 않은 세포에서의 물질 또는 활성의 수준으로부터 구분될 수 있는 샘플에서의 물질 또는 활성의 수준을 지칭한다. 일부 실시형태에 있어서, 검출 가능한 수준은 참조 수준 보다 10% 이상, 예를 들어 10% 이상, 20% 이상, 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 또는 300% 이상 큰 수준일 수 있다.
- [0041] 용어 "통계적으로 유의미한" 또는 "유의미한"은 통계적 유의도를 지칭하고, 일반적으로 참조, 예를 들어 마커, 예를 들어 줄기 세포 마커 또는 분화 마커의 농도 또는 존재비보다, 2표준 편차(2SD) 차이만큼 초과 또는 미만을 의미한다. 상기 용어는 차이가 있다는 통계적 증거를 가리킨다. 이는 귀무가설(null hypothesis)이 실제로 사실인 때 귀무가설을 거부하는 결정을 내릴 가능성으로서 정의된다. 상기 결정은 대개 p-값(p-value)을 사용하여 이루어진다.
- [0042] 작동 실시예, 또는 다르게 나타내는 경우 이외, 본원에서 사용되는 성분의 양 또는 반응 조건을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에서 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 백분율과 관련하여 사용되는 경우에서 용어 "약"은 $\pm 1\%$ 를 의미할 수 있다.
- [0043] 다른 용어는 본원에 기재된 기술의 다양한 양태의 설명 내에서 본원에 정의된다.
- [0044] 본원에 기재된 기술의 양태는 세포로부터 다능성 세포의 생성 방법뿐만 아니라 이 다능성 세포의 용도 및 사용 방법과 관련된다. 예를 들어 하나 이상의 리프로그래밍 인자 (예를 들어 Oct4)를 암호화하는 핵산 구조체 (construct)를 도입함으로써 리프로그래밍 인자의 발현을 증가시키는 것에 의존하는 다능성 세포 (즉, 유도 다능성 줄기 세포 또는 iPS 세포)의 현존하는 생성 방법과 대조적으로, 본원에 기술된 방법은 세포에 스트레스를 가하지만 외래의(foreign) 리프로그래밍 인자의 도입을 필요로 하지 않는다.
- [0045] 일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 세포의 세포질의 파괴 및/또는 세포의 미토콘드리아의 수를 감소시킨다. 세포의 세포질의 파괴 또는 세포의 미토콘드리아의 수의 감소는 세포가 적어도 다능성 능력을 얻는 동안 스트레스 반응을 유도한다. 하나의 양태에 있어서, 세포로부터 약 40% 이상의 세포질을 제거하는 단계, 및 다능성을 나타내는 세포 (상기 세포는 조직에 존재하지 않음)를 선택하는 단계를 포함하는 다능성 세포의 생성 방법이 본원에 기술되어 있다. 하나의 양태에 있어서, 본원에 기술된 발명은 세포로부터 약 40% 이상의 미토콘드리아를 제거하는 단계, 및 다능성을 나타내는 세포 (상기 세포는 조직에 존재하지 않음)를 선택하는 단계를 포함하는 다능성 세포의 생성 방법에 관한 것이다.
- [0046] 본원에 기술된 방법, 분석법, 및 조성물에 사용되는 세포는 임의의 유형의 세포, 예를 들어 성체 세포, 배아 세포, 분화 세포, 줄기 세포, 전구 세포, 및/또는 체세포일 수 있다. 세포는 상기 기술된 용어들의 조합으로 기술될 수 있고, 예를 들어 세포는 배아 줄기 세포 또는 분화된 체세포일 수 있다. 본원에 기술된 방법, 분석법, 및 조성물에 사용되는 세포는 대상체로부터 얻을 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 성체 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 태아의 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 양막 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포는 제대혈 세포이다.
- [0047] "성체"는 출생 후 임의의 시점에서 동물 대상체로부터 유래되는 또는 그 대상체 내부의 조직 및 세포를 지칭한다. "배아"는 출생 전 임의의 시점에서 동물 대상체로부터 유래되는 또는 그 대상체 내부의 조직 및 세포를 지칭한다.
- [0048] 본원에서 사용되는, 용어 "체세포"는 생식 세포, 착상전 배아에 존재하거나 이로부터 얻은 세포, 또는 생체외에서의 이러한 세포의 증식으로부터 유래된 세포가 아닌 임의의 세포를 지칭한다. 다른 방식으로 언급하자면, 체세포는 생식 세포와 반대되는 생물체의 신체를 형성하는 임의의 세포를 지칭한다. 포유동물에서, 생식 세포

(또한 "생식세포(gametes)"로 알려짐)는 그로부터 전체 포유동물 배아가 발달되는, 접합자(zygote)로 지칭되는 세포를 생성하기 위해 수정 과정에서 융합하는 정자 및 난자이다. 포유동물 신체에서의 모든 다른 세포 유형 - 정자 및 난자, 그들이 만들어지는 세포(생식모세포) 및 미분화된 줄기 세포 외 - 은 체세포이다: 내부 기관, 피부, 뼈, 혈액, 및 결합 조직은 모두 체세포로 구성된다. 일부 실시형태에 있어서, 체세포는 "비-배아 체세포"이고, 이는 배아에 존재하거나 이로부터 얻지 않고 생체외에서의 이러한 세포의 증식으로부터 유래되지 않은 체세포를 의미한다. 일부 실시형태에 있어서, 체세포는 "성체 체세포"이고, 이는 배아 또는 태아가 아닌 생물체 내에 존재하는 세포, 또는 생체외에서 이러한 세포의 증식으로부터 초래된 세포를 의미한다. 성체 및 신생아 또는 배아세포는 구조적 차이, 예를 들어 후성유전적 구조(organization) 예컨대 메틸화 패턴에 의해 구분될 수 있는 것으로 알려져 있다. 일부 실시형태에 있어서, 체세포는 포유동물 체세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 체세포는 인간 체세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 체세포는 성체 체세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 체세포는 신생아 체세포이다.

[0049]

본원에서 사용되는, "분화된 세포(differentiated cell)"는 그것의 발달에 있어서 이전 시점에서보다 그것의 운명 또는 기능에 있어서 더욱 특이화된 세포를 지칭하며, 종말(terminally) 분화된 세포 및 종말 분화되지는 않았지만 그것의 발달에 있어서의 이전 시점에서보다 더욱 특이화된 세포 모두를 포함한다. 미수입 세포(uncommitted cell) (예를 들어, 줄기 세포)로부터, 특정 분화된 세포 유형으로의 증가된 구속도(commitment)를 갖는 세포, 및 종말 분화된 세포로의 세포의 발달은, 점진적 분화 또는 점진적 구속으로서 알려져 있다. 세포 발생학(cell ontogeny)의 맥락에서, 형용사 "분화된", 또는 "분화되는"은 상대적인 용어이다. "분화된 세포"는 이와 비교되는 세포보다 더 아래(down)의 발달 경로가 진행되고 있는 세포이다. 따라서, 줄기 세포는 계통-한정된 전구체 세포(lineage-restricted precursor cell) (예컨대 중배엽 줄기 세포)로 분화될 수 있고, 이는 순차적으로 더 아래의 경로의 다른 유형의 전구체 세포 (예컨대 심근세포 전구체)로, 그리고 특정 조직 유형에서 특징적 역할을 하고 추가로 증식될 수 있는 능력을 보유하거나 보유하지 않을 수 있는 최종-단계(end-stage) 분화된 세포로 분화될 수 있다.

[0050]

본원에서 사용되는, 용어 "줄기 세포(stem cell)"는 자기재생(self-renewal)의 특성을 가지고 발달 잠재력과 관련된 특성의 함축된 의미(즉, 전능성(totipotent), 다능성(pluripotent), 다분화성(multipotent) 등)을 갖지 않는, 보다 분화된 세포 유형으로 자연 분화되는 발달 잠재력을 갖는 미분화되거나 부분적으로 분화된 상태의 세포를 지칭한다. 자기재생은 줄기 세포가 증식하여 보다 많은 이러한 줄기 세포를 발생시키는 한편 그 발달 잠재력을 유지할 수 있는 것을 의미한다. 따라서, 용어 "줄기 세포"는 특정 환경 하에서 실질적 분화없이 증식할 수 있는 능력을 보유한, 보다 특이화되거나 분화된 표현형으로 분화되는 특정 환경 하에서의 발달 잠재력을 가진 세포의 임의의 하위그룹을 지칭한다. 용어 "체세포 줄기 세포"는 태아, 유형(juvenile), 및 성체 조직을 포함하는 비-배아 조직으로부터 유래된 임의의 줄기 세포를 지칭하기 위해 사용된다. 정상 체세포 줄기 세포는 혈액, 골수, 뇌, 후각상피, 피부, 췌장, 골격근, 및 심근을 포함하는 매우 다양한 성체 조직으로부터 분리되었다. 예시적인 자연 발생 체세포 줄기 세포는, 이에 제한되지 않지만, 중간엽 줄기 세포 및 조혈모 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 줄기 또는 전구 세포는 배아 줄기 세포일 수 있다. 본원에서 사용되는 "배아 줄기 세포"는 임신 과정의 임의의 시점, 통상적으로 필수적이지 않지만 대략 10-12주 임신 이전에 취해진 전(pre)-배아 조직 (예컨대, 예를 들어 배반포(blastocyst)), 배아 조직, 또는 태아 조직을 포함하는, 수정 이후 그러나 임신 종료 전에 형성된 조직으로부터 유래된 줄기 세포를 지칭한다. 가장 빈번하게는, 배아 줄기 세포는 초기 배아 또는 배반포로부터 유래된 전능성 세포이다. 배아 줄기 세포는 이에 제한되지 않지만, 인간 조직을 포함하는 적합한 조직으로부터, 또는 수립된 배아 세포주로부터 직접 얻을 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 배아 줄기 세포는 문헌 [Thomson et al. (U.S. Pat. Nos. 5,843,780 and 6,200,806; Science 282: 1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38: 133 ff, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995, 이는 본원에서 그 전문이 참조로 모두 포함됨)]에 기술된 바에 따라 수득된다.

[0051]

예시적인 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 간 줄기 세포, 근육 줄기 세포, 근육 전구체 줄기 세포, 내피 전구 세포, 골수 줄기 세포, 연골 줄기 세포, 림프계 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모 줄기 세포, 중추신경계 줄기 세포, 말초신경계 줄기 세포 등을 포함한다. 이를 분리하고 배양하는 방법을 포함하는 줄기 세포의 설명은 특히 문헌 [Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols, Turksen, ed., Humana Press, 2002; Weisman et al, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17:387 403; Pittinger et al, Science, 284: 143 47, 1999; Animal Cell Culture, Masters, ed., Oxford University Press, 2000; Jackson et al, PNAS 96(25): 14482 86, 1999; Zuk et al, Tissue Engineering, 7:211 228, 2001 ("Zuk et al."); Atala et al, particularly Chapters 33 41; and U.S. Pat. Nos. 5,559,022, 5,672,346 and 5,827,735]에서 찾을 수 있다. 이들을 분리하는 방법을 포함하는 간질 세포(stromal cell)의 설명은 특히

문헌 [Prockop, Science, 276:71 74, 1997; Theise et al, Hepatology, 31:235 40, 2000; Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino et al, eds., John Wiley & Sons, 2000 (including updates through March, 2002); and U.S. Pat. No. 4,963,489]에서 찾을 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 "전구 세포(progenitor cell)"는 발달 잠재력 (즉, 전능성, 다능성, 다분화능 등)과 관련된 특정 함축된 의미를 가지지 않는, 하나 이상의 분화된 표현형으로 분화되는 발달 잠재력을 갖고, 자기재생의 특성을 가지지 않는 미분화되거나 부분적으로 분화된 상태의 세포를 지칭한다. 따라서, 용어 "전구 세포"는 보다 특이화되거나 분화된 표현형으로 분화되는, 특정 환경 하에서, 발달 잠재력을 갖는 세포의 임의의 하위그룹을 지칭한다. 일부 실시형태에 있어서, 줄기 또는 전구 세포는 다능성 줄기 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 줄기 또는 전구 세포는 전능성 줄기 세포이다.

[0053] 용어 "전능성(totipotent)"은 신체의 임의의 조직 또는 세포 유형을 발생시킬 수 있는 줄기 세포를 지칭한다. "다능성" 줄기 세포는 생식 계열 세포를 제외하고 신체내 세포의 임의의 유형을 발생시킬 수 있다. 더 소수의 또는 제한된 수의 상이한 세포 유형을 발생시킬 수 있는 줄기 세포는 일반적으로 "다분화능(multipotent)"으로 명명된다. 따라서, 전능성 세포는 태아 발달에 필요한 전부는 아니지만 대부분의 조직을 발생시킬 수 있는 다능성 세포로 분화된다. 다능성 세포는 특정 기능을 갖는 세포를 발생시키도록 구속되는 다분화능 세포로 추가 분화가 진행된다. 예를 들어, 다분화능 조혈모 줄기 세포는 혈액에서 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 발생시킬 수 있다.

[0054] 본원에서 사용되는 용어 "다능성(pluripotent)"은 상이한 조건 하에서 모든 세 개의 배엽 (즉, 내배엽(예를 들어 장 조직(gut tissue)), 중배엽 (예를 들어, 혈액, 근육, 및 혈관), 및 외배엽 (예를 들어, 피부 및 신경)) 특징의 세포 유형으로 분화되는 능력을 갖는 세포를 지칭한다. 다능성 세포는 주로 예를 들어 누드마우스 테라토마 형성 분석법을 사용하여 모든 세 개의 배엽으로 분화되는 이들의 능력을 특징으로 한다. 다능성에 대한 바람직한 시험은 각각의 세 개의 배엽의 세포로 분화되는 능력의 실증이지만, 다능성은 배아 줄기 (ES) 세포 마커의 발현에 의해서도 입증될 수 있다.

[0055] 본원의 실시예에서 기술되는 "ACC" 및 "STAP" 세포는 다능성 세포의 비제한적인 예이다. "STAP 줄기 세포"는 다능성 줄기 세포의 비제한적인 예이다. 용어 다능성 세포 및 용어 다능성 줄기 세포는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있고, 이는 두 세포는 본 발명의 목적에 적합하게 사용될 수 있기 때문이다.

[0056] 본원에서 사용되는 용어 "다능성(pluripotency)" 또는 "다능성 상태(pluripotent state)"는 모든 세 개의 배아 배엽으로 분화되는 능력을 갖는 세포를 지칭한다: 내배엽(장 조직), 중배엽(혈액, 근육, 및 혈관을 포함함), 및 외배엽 (예컨대 피부 및 신경).

[0057] "다분화능 세포(multipotent cell)"와 관련하여 사용되는 경우의 용어 "다분화능(multipotent)"은 모든 세 개의 배엽으로부터 유래되는 세포의 전부는 아닌 일부로 분화될 수 있는 세포를 지칭한다. 따라서, 다분화능 세포는 부분적으로 분화된 세포이다. 다분화능 세포는 본 기술분야에 잘 알려져 있고, 다분화능 세포의 비제한적인 예는 성체 줄기 세포, 예컨대 조혈모 줄기 세포 및 신경 줄기 세포를 포함할 수 있다. 다분화능은 줄기 세포가 다른 계통의 세포가 아닌 소정 계통에서의 다수 유형의 세포를 형성할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 다분화능 혈액 줄기 세포는 다수의 상이한 유형의 혈액 세포 (적혈구, 백혈구, 혈소판 등)를 형성할 수 있으나, 이는 뉴런을 형성할 수 없다. 용어 "다분화성(multipotency)"은 전능성 및 다능성보다 더 작은 발달 다양성의 정도를 가진 세포를 지칭한다.

[0058] 용어 "전능성(totipotency)"은 성체 신체뿐만 아니라 태반을 포함하는 배외 조직(extra-embryonic tissues)에서의 모든 세포를 만들 수 있는 능력을 기술하는 분화 정도를 가진 세포를 지칭한다. 수정란 (접합자)은 초기에 분리된 세포 (난할구)와 같이 전능성이다.

[0059] 본원에서 기술된 방법에서 사용되는 세포는 조직에 존재하지 않는 세포일 수 있다. 본원에서 사용되는 "조직(tissue)"은 하나 이상의 특정 기능의 수행에 있어서 통합된, 유사하게 특이화된 세포의 구조화된 생체물질 (예를 들어, 군, 층, 또는 응집체)을 지칭한다. 세포가 구조화된 상부구조로부터 제거되고, 또는 그렇지 않으면 생체내 존재하는 구조화된 상부구조로부터 분리되는 경우, 이들은 더이상 조직에 존재하지 않는다. 예를 들어, 혈액 샘플이 2 이상의 비-동일 분획으로 분리되거나, 지라가 잘게 잘라지거나 파스퇴르 피펫(Pasteur pipette)으로 기계적으로 분리되는 경우, 상기 세포는 더이상 조직에 존재하지 않는다. 일부 실시형태에 있어서, 조직에 존재하지 않는 세포는 분리된 세포이다. 세포와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "분리된(isolated)"은 일반적으로 생체내에서 연관되는 다른 그룹의 세포로부터 기계적 또는 물리적으로 분리된 세포를 지칭한다. 다른

그룹의 세포로부터 하나 이상의 세포를 분리하는 방법은 본 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques (3rd edition), 1994, R. I. Freshney (ed.), Wiley-Liss, Inc.; Cells: a laboratory manual (vol. 1), 1998, D. L. Spector, R. D. Goldman, L. A. Leinwand (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Animal Cells: culture and media, 1994, D. C. Darling, S. J. Morgan, John Wiley and Sons, Ltd.]을 참조한다. 임의로, 분리된 세포는 다른 세포의 존재 하에 예를 들어 생체외에서 배양된다.

[0060]

일부 실시형태에 있어서, 조직에 존재하지 않는 세포는 세포의 개체군에 존재한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 세포의 개체군은 하나의 세포의 개체군이다. 본원에서 사용되는 "세포의 개체군(population of cells)"은 2 이상 세포, 예를 들어, 2 개의 세포, 3 개의 세포, 4 개의 세포, 10 개의 세포, 100 개의 세포, 1000 개의 세포, 10,000 개의 세포, 100,000 개의 세포 또는 이들 사이의 임의의 값, 또는 그 이상의 세포들의 군(group)을 지칭한다. 임의로, 세포의 개체군은 공통 기원을 가진 세포일 수 있고, 예를 들어 이들은 동일 부모 세포로부터 유래될 수 있고, 이들은 클론일 수 있고, 이들은 동일 조직으로부터 분리된 세포로부터 분리되거나 유래될 수 있고, 또는 이들은 동일한 조직 샘플로부터 분리된 세포로부터 분리되거나 유래될 수 있다. 세포의 개체군은 1 개 이상의 세포 유형, 예를 들어 1 개의 세포 유형, 2 개의 세포 유형, 3 개의 세포 유형, 4 개의 세포 유형 또는 그 이상의 세포 유형을 포함할 수 있다. 세포의 개체군은 이종 또는 동종일 수 있다. 만약 이들이 90% 이상의 동일 세포 유형을 포함하는 경우, 예를 들어 90%, 92%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 세포가 동일 유형인 경우, 세포의 개체군은 실질적으로 동종일 수 있다. 만약 개체군에 존재하는 세포의 90% 미만이 동일 세포 유형인 경우, 세포의 개체군은 이종일 수 있다.

[0061]

일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법은 비-다능성 세포 (예를 들어, 분화된 세포)를 다능성 표현형을 띠게 하는 것과 관련될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포의 생성은 더욱 다능성(more pluripotent)의 표현형의 세포를 생성하는 것, 즉 세포가 보다 넓은 분화 잠재력을 가지는 표현형을 띠게 야기하는 것을 포함한다. 비제한적인 예로서, 매우 작은 배아-유사 세포 (very small embryonic-like cell, VSEL) 세포는 다능성 대신 단분화능(unipotent)일 수 있고/있거나 특정 분화된 세포 유형으로 분화되는 이들의 능력에 있어서 제한될 수 있다(아마도 배아 줄기 세포보다는 분화된 세포에 더 근사한 VSEL의 후성유전적 상태에 기인 하여). 본원에 기술된 방법에 따라, 단분화능 세포 및/또는 제한된 분화 능력을 가진 세포는 더욱 다능성의 표현형을 띠게 할 수 있다. 더욱 다능성의 표현형은, 더 많은 수의 분화된 세포 유형으로 분화될 수 있는 표현형일 수 있고, 예를 들면, 2 개의 단분화능 세포 중에서 그 계통이 더욱 다능성인 더 많은 수의 분화된 세포 유형으로 분화할 수 있는 1 개를 말하고/말하거나 다능성 세포는 단분화능 세포보다 더욱 다능성이다.

[0062]

본원에 기술된 다능성 세포 (또는 더욱 다능성의 세포)의 생성 방법은 예를 들어, 세포로부터 세포질의 일부를 제거하는 단계 및/또는 세포로부터 미토콘드리아를 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포로부터의 세포질 또는 미토콘드리아의 일부의 제거는 세포의 일부 후성유전적 제어를 제거한다. 일부 실시형태에 있어서, 세포질의 약 40% 이상이 제거되고, 예를 들어 세포의 세포질의 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 그 이상이 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 세포의 세포질의 60% 내지 80%가 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 미토콘드리아의 약 40% 이상이 제거되고, 예를 들어 세포의 미토콘드리아의 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 그 이상이 제거된다. 일부 실시형태에 있어서, 세포의 미토콘드리아의 50% 내지 90%가 제거된다.

[0063]

세포에 스트레스를 가하고/가하거나 세포로부터 세포질 또는 미토콘드리아의 일부를 제거하는 방법은 치사(lethality)의 문턱값(threshold value) 미만으로 세포의 막에 구멍(pore) 및/또는 파열(rupture)을 야기할 수 있는 임의의 환경적 자극일 수 있다. 스트레스는 조직 또는 세포 배양액에서의 비생리적인 스트레스를 포함할 수 있다. 적합한 환경적 자극의 비제한적인 예는 외상, 기계적 자극, 화학적 노출, 초음파 자극, 산소-부족, 영양-부족, 방사선, 극한 온도에서의 노출, 분리(dissociation), 분쇄(trituration), 신체적 스트레스, 고삼투압, 저삼투압, 막 손상, 독소, 극한 이온 농도, 활성 산소, UV 노출, 강한 가시광선, 필수 영양분의 부족, 또는 비생리적 산성 환경을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 하나의 환경적 자극이 세포에 가해질 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다수의 환경 자극이 세포에 가해질 수 있고, 예를 들어 2 개의 자극, 3 개의 자극, 4 개의 자극 또는 그 이상의 자극이 가해질 수 있다. 다수의 환경 자극은 동시에 또는 별도로 가해질 수 있다.

[0064]

일부 실시형태에 있어서, 스트레스는 스트레스에 노출된 세포들 중 10% 이상에서 막 파괴를 야기하는 스트레스일 수 있다. 본원에서 사용되는 "막 파괴(membrane disruption)"는 이에 제한되지 않지만 미토콘드리아 및 DNA를 포함하는, 검출 가능한 양의 세포 기관 및/또는 세포 물질을 세포의 환경으로 방출하기에 충분한 구멍(pore) 또는 간극(gap)을 형성하도록 막을 위협하게 하고(compromising), 파열하고(rupturing), 또는 파괴하는

(disrupting) 것을 지칭한다. 세포 물질, 예를 들어 미토콘드리아의 방출을 검출하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있고 본원에 기술되어 있다. 방출된 세포 물질은 유리되어 있거나 막에 의해 캡슐화되거나 둘러싸여 있다.

[0065] 스트레스는 스트레스에 노출된 세포의 10% 이상, 예를 들어, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상에서 막 파괴를 야기할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 스트레스에 노출된 세포는 본원에 기술된 더욱 다능성으로 제조된 세포와 동일 유형 및 특징의 세포일 수 있고, 예를 들어 하나의 유형의 세포에 대해 적합한 스트레스가 다른 유형의 세포에는 적합하지 않을 수 있다.

[0066] 세포가 스트레스에 노출되는 시간의 길이는 사용되는 자극에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법에 따라 세포에 스트레스를 주기 위해 저영양 조건을 사용하는 경우, 세포는 1 주 이상, 예를 들어 1 주, 2 주, 또는 3 주 또는 그보다 길게 저영양 조건 하에 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 3 주 동안 저영양 조건 하에 배양된다. 다른 비제한적인 예에서, 본원에 기술된 방법에 따라 저 pH 또는 저산소 조건에 노출되는 세포는 수분 또는 수시간 이상을 포함하는 오랫동안, 예를 들어 2분 이상 동안, 5 분 이상 동안, 20 분 이상 동안, 1 시간 이상 동안, 2 시간 이상 동안, 6 시간 이상 동안 또는 그 이상으로 노출될 수 있다.

[0067] 다능성 세포의 생성을 유도하는 기계적 자극은 막의 온전성을 기계적으로 파괴할 수 있는, 물질 또는 표면과 세포막과의 임의의 형태의 접촉을 포함할 수 있다. 기계적 자극은 전단 응력 및/또는 고압에 세포를 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 기계적 자극의 예시적 형태는 분쇄이다. 분쇄는 마찰을 통해 입자의 표면을 갈고/갈거나 연마하는 공정이다. 세포의 분쇄를 위한 공정의 비제한적인 예는 세포를 세포의 크기보다 작은 구멍을 갖는 장치에 통과시키는 것이다. 예를 들어, 세포를 진공 압력 및/또는 유체의 흐름에 의해, 피펫의 내부 공간의 적어도 일부가 세포의 직경보다 작은 직경을 갖는 피펫에 통과시킬 수 있다. 일부 실시형태에 있어서는, 세포를 세포의 크기보다 더 작은 구멍을 갖는 하나 이상의 장치에 통과시킨다. 일부 실시형태에 있어서, 세포를 점진적으로 더 작은 구멍을 갖는 다수의 장치에 통과시킨다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 5 분 이상, 예를 들어 5분, 10 분, 20 분, 30 분, 또는 60 분간 분쇄될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 50 μ m의 내부 직경을 갖는 파스퇴르 피펫을 통과시킴으로써 분쇄될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 20 분간 50 μ m의 내부 직경을 갖는 파스퇴르 피펫을 통과시킴으로써 분쇄될 수 있다.

[0068] 다능성 세포를 생성하기 위해 세포를 유도하는데 필요한 스트레스를 가하기 위한 다른 방법은 예를 들어, 특성의 화학적, 또는 물리-화학적 조건 (예를 들어, 높거나 낮은 pH, 삼투압 충격, 극한 온도, 산소 부족 등)에의 노출을 포함한다. 다능성 세포의 생성을 유도하는 이러한 종류 및 다른 것의 처리는 후에 추가로 논의된다. 화학적 노출은 예를 들어, pH, 삼투압, 및/또는 세포막의 완전성을 파괴하거나 위태롭게 하는 기공-형성 화합물의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 세포는 비생리적인 산성 환경 또는 저 pH, 스트렙토리신 0, 또는 증류수 (즉, 삼투압 충격)에 노출될 수 있다.

[0069] 저 pH는 6.8 미만 예를 들어 6.7, 6.5, 6.3, 6.0, 5.8, 5.4, 5.0, 4.5, 4.0 또는 그보다 저 pH를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 3.0 내지 약 6.0이다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 4.5 내지 약 6.0이다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 5.4 내지 약 5.8이다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 5.4 내지 약 5.6이다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 5.6이다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 5.7이다. 일부 실시형태에 있어서, 저 pH는 약 5.5이다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 수일까지 동안, 예를 들어, 6 일 이하 동안, 4 일 이하 동안, 3 일 이하 동안, 2 일 이하 동안, 1 일 이하 동안, 12 시간 이하 동안, 6 시간 이하 동안, 3 시간 이하 동안, 2 시간 이하 동안, 1 시간 이하 동안, 30 분 이하 동안, 20 분 이하 동안, 10 분 미만 동안 저 pH 조건에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 3 일 이하 동안 5.4 내지 5.6 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 3 일 이하 동안 약 5.6 내지 6.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1 시간 이하 동안 약 5.6 내지 6.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 30 분간 약 5.6 내지 6.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 20 분간 약 5.6 내지 6.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 3 일 이하 동안 약 5.6 내지 5.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1 시간 이하 동안 약 5.6 내지 5.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 30 분간 약 5.6 내지 5.8 사이의 pH에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 20 분간 약 5.6 내지 5.8 사이의 pH에 노출될 수 있다.

[0070] 일부 실시형태에 있어서, 세포는 다능성 세포의 생성을 유도하기 위해 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 20 μ M 내지 약 200 mM의 농도로 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는

약 200 μ M 내지 약 20 mM의 농도로 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 2.4 mM의 농도로 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 HBSS에 희석된 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1분 이상, 예를 들어 1분 이상, 2분 이상, 5분 이상, 15분 이상, 30분 이상, 45분 이상, 1시간 이상 동안 또는 그보다 더 오랫동안 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 5분 내지 약 30분간 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 15분간 ATP에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 15분간 약 2.4 mM의 ATP에 노출될 수 있다.

[0071]

일부 실시형태에 있어서, 세포는 다능성 세포의 생성을 유도하기 위해 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 20 μ M 내지 약 200 mM의 농도로 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 200 μ M 내지 약 20 mM의 농도로 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 2 mM의 농도로 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 HBSS에 희석된 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1일 이상, 예를 들어 1일 이상, 2일 이상, 1주 이상, 2주 이상, 3주 이상 동안 또는 그보다 더 오랫동안 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 1주 내지 3주 동안 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 2주 동안 CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 2주 동안 약 2 mM CaCl_2 에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 1주 동안 약 2 mM CaCl_2 에 노출될 수 있다.

[0072]

기공-형성 화합물의 예는 스트렙톨리신(streptolysin) O (SLO), 사포닌(saponin), 디지토닌(digitonin), 필리핀(filipin), Ae I, 말미잘의 시톨리신(cytolysin), 에어로리신(aerolysin), 아마톡신(amatoxin), 아마바포어(amoebapore), 엔타메바 디스파로부터의 아마바포어 동족체(amoebapore homolog from *Entamoeba dispar*), 브레비닌-1E(brevinin-1E), 브레비닌-2E(brevinin-2E), 바르바톨리신(barbatolysin), 엔테로코쿠스 파에칼리스의 시톨리신(cytolysin of *Enterococcus faecalis*), 델타 헤몰리신(delta hemolysin), 디프테리아독소(diphtheria toxin), 콜레라균의 El Tor 시톨리신, 에퀴나톡신(equinatoxin), 에어로모나스 하이드로필라의 엔테로톡신(enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*), 에스쿨렌틴(esculentin), 그레눌리신(granulysin), 장염비브리오균의 헤몰리신(haemolysin), 스트렙토코쿠스 인테메딘의 인터메딜리신(intermedilysin of *Streptococcus intermedius*), 렌티바이러스 리틱 펩티드(lentivirus lytic peptide), 악티노바실루스 악티노마이세테미코미탄스의 류코톡신(leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 마가이닌(magainin), 멜리틴(melittin), 막-연관 림포톡신(membrane-associated lymphotoxin), 메트-엔케팔린(Met-enkephalin), 네오코토르핀(neokyotorphin), 네오코토르핀 절편 1, 네오코토르핀 절편 2, 네오코토르핀 절편 3, 네오코토르핀 절편 4, NK리신(NKlysin), 파라다신(paradaxin), 황색포도구균의 알파 시톨리신(alpha cytolysin of *Staphylococcus aureus*), 악성부종균의 알파 시톨리신(alpha cytolysin of *Clostridium septicum*), 바실러스 튜링겐시스 독소(*Bacillus thuringiensis* toxin), 콜리신(colicin), 보체(complement), 디펜신(defensin), 히스톨리신(histolysin), 리스테리올리신(listeriolysin), 마가이닌(magainin), 멜리틴(melittin), 뉴몰리신(pneumolysin), 이스트 킬러 독소(yeast killer toxin), 발리노마이신(valinomycin), 피터슨의 크라운 에테르(Peterson's crown ether), 퍼포린(perforin), 퍼프링고리신 O(perfringolysin O), 가스괴저균의 테타-톡신(theta-toxin of *Clostridium perfringens*), 팔롤리신(phallolysin), 팔로톡신(phallotoxin), 및 다른 분자, 예컨대 문헌 [Regen et al. Biochem Biophys Res Commun 1989 159:566-571]에 기술된 것을 포함하고, 이는 본원에서 그 전문이 참조로 모두 포함된다. 기공-형성 화합물의 정제 또는 합성 방법은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 또한, 기공-형성 화합물, 예를 들어 스트렙톨리신 O (Cat No. S5265; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)는 시판된다. 비제한적인 예로서, 세포는 약 5분 이상, 예를 들어 5분 이상, 10분 이상, 20분 이상, 30분 이상, 45분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 또는 그 이상 동안 SLO에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 30분 내지 2시간 동안 SLO에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 50분간 SLO에 노출될 수 있다. 비제한적인 예로서, 세포는 약 10 ng/mL 내지 1 mg/mL의 농도로 SLO에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 1 μ g/mL 내지 100 μ g/mL의 농도로 SLO에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 10 μ g/mL로 SLO에 노출될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 50분간 약 10 μ g/mL로 SLO에 노출될 수 있다.

[0073]

다능성 세포의 생성을 유도하는 산소-부족 조건은 감소된 산소 조건 하에 세포를 배양하는 것, 예를 들어 10% 이하의 산소에서 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 5% 이하의 산소 하에 배양된다. 감소된 산소 조건 하에서의 배양하는 기간은 1시간 이상, 예를 들어 1시간, 12시간, 1일, 2일, 1

주, 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월 또는 그 이상일 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1 주 내지 1 개월 동안 감소된 산소 조건 하에 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 3 주 동안 감소된 산소 조건 하에 배양될 수 있다.

[0074] 다능성 세포의 생성을 유도하는 영양-부족 조건(nutrient-deprivation condition)은 세포 성장에 유리한 임의의 인자 또는 영양의 결핍을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 영양-부족 조건은 기초 배지, 예를 들어 추가 보충물, 예컨대 FBS 또는 성장 인자가 없는 F12 또는 DMEM에서 세포를 배양하는 것을 포함한다. 영양-부족 조건에서의 배양 기간은 1 시간 이상, 예를 들어 1 시간, 12 시간, 1 일, 2 일, 1 주, 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월 또는 그 이상일 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 1 주 내지 1 개월 동안 영양-부족 조건 하에 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 2 주 동안 영양-부족 조건 하에 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 약 3 주 동안 영양-부족 조건 하에 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 영양-부족 조건은 성장 인자가 없는 조건 또는 소정 세포 유형에 대한 하나 이상의 성장 인자의 표준 농도의 50% 미만의 조건을 포함한다.

[0075] 다능성 세포의 생성을 유도하는 극한 온도에서의 노출은 저온 또는 고온에서의 노출을 포함할 수 있다. 포유동물 세포에 대해, 극저온은 35 °C 미만, 예를 들어 34 °C, 33 °C, 32 °C, 31 °C 또는 그보다 낮은 온도일 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 극저온은 어느점 미만의 온도일 수 있다. 세포의 동결은 얼음 결정에 의해 막 천공을 야기하여 세포질 제거를 위한 길을 제공할 수 있다. 포유동물 세포에 대해, 극고온은 42 °C 초과, 예를 들어 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 또는 그 이상의 온도일 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 극고온은 약 85 °C 이상의 온도일 수 있다. 극한 온도 하에서의 배양 기간은 20 분 이상, 예를 들어 20 분, 30 분, 1 시간, 12 시간, 1 일, 2 일, 1 주, 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월 또는 그 이상일 수 있다. 분명한 것은, 온도가 높을수록, 다능성 세포의 생성을 가능하게 하기 위해 견딜 노출이 더 짧아질 것이다.

[0076] 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있는 스트레스의 추가의 예는, 이에 제한되지 않지만, 초음파 자극 및 방사선 처리를 포함한다.

[0077] 일부 실시형태에 있어서, 스트레스에 노출된 후, 세포는 하기 본원에 기술된 방법에 따라 선택 전에 배양될 수 있다. 세포는 선택 전 1 시간 이상 동안 배양될 수 있고, 예를 들어 스트레스 자극이 제거되고 본원에 기술된 선택 전에 세포가 1 시간 이상, 2 시간 이상, 6 시간 이상, 12 시간 이상, 1 일 이상, 2 일 이상, 7 일 이상 동안 배양된다. 비제한적인 예로서, 세포는 약 50 분간 SLO에 노출되고 이후 선택 전에 약 7 일간 SLO 없는 배지에서 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 선택 전에 세포를 배양하는데 사용되는 배지는 분화 인자를 함유하거나 분화를 촉진하지 않는다. 일부 실시형태에 있어서, 배지는 줄기 세포 및/또는 다능성 세포의 배양에 적합한 것이다. 이러한 배지의 예는 본원에서 이하에 기술되어 있다.

[0078] 일부 실시형태에 있어서, 세포에서의 세포질의 양이 감소된다. 세포에서의 세포질의 감소는 세포의 크기를 모니터링함으로써 측정될 수 있다. 세포 크기를 측정하는 방법은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있고 비제한적인 예로서 세포형광측정 분석법(cytofluorimetric analysis)을 포함한다. 간단하게는, 단일 세포는 프로피디움 요오드화물로 착색되고 여과된 후 예를 들어 FLOMAX™ 소프트웨어를 사용하는 DAKO GALAXY™ (DAKO) 분석기에서 측정된다. 세포형광측정 분석법이 이후 세포 크기를 규명하기 위해 수행될 수 있다. 미리 정해진 크기의 마이크로비드를 등장 인산 식염수(isotonic phosphate saline) (pH 7.2)에 재-현탁시키고 세포형광측정 분석을 사용하여 구체에 함유된 세포의 크기를 비교하기 위한 표준으로서 사용한다. 세포 및 비드 모두는 동일한 장비 세팅 (세포 및 비드 크기를 나타내는 전방 스캐터(forward scatter) 및 세포 입도(cellular granularity)를 나타내는 측면 스캐터(side scatter))를 사용하여 분석된다. 세포 크기를 비드 크기를 x-축으로 하고 전방 스캐터 값을 y-축으로 하는 커브에서 계산할 수 있다.

[0079] 일부 실시형태에 있어서, 세포에서의 미토콘드리아의 양이 감소된다. 세포에서의 미토콘드리아의 수의 측정 방법은 본 기술 분야에서의 통상의 기술자 중 일인에게 잘 알려져 있고, 미토콘드리아-특이적 염료로 착색하는 단계 및 현미경으로 관찰시 세포 당 가시되는 미토콘드리아의 수를 계수하는 단계를 포함한다. 미토콘드리아-특이적 염료, 예를 들어 MITOTRACKER™ (Cat No M7512 Invitrogen; Grand Island, NY)는 시판된다. 일부 실시형태에 있어서, 미토콘드리아의 수 또는 미토콘드리아-특이적 염료로부터의 신호의 강도는 본원에 기술된 방법으로 처리 후 40% 이상까지 감소될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 본원에서 상기 기술된 방법으로 처리 후 미토콘드리아의 수 또는 미토콘드리아-특이적 염료로부터의 신호의 강도가 40% 이상까지 감소되는 세포를 선택한다.

[0080] 미토콘드리아의 양 및/또는 막 파괴는 또한 세포의 환경에서의 산화환원 활성을 측정함으로써 검출될 수 있다.

미토콘드리아가 본원에 기술된 스트레스에 의해 세포의 환경으로 방출됨에 따라, 세포의 환경에서의 ROS의 수준이 증가되어 주어진 스트레스의 효과를 측정하는데 사용될 수 있다.

[0081] 본원에 기술된 양태의 일부 실시형태에 있어서, 세포는 LIF (백혈병 억제 인자)의 존재 하에 스트레스가 가해질 수 있다.

[0082] 일부 양태에 있어서, 세포의 세포질 및/또는 미토콘드리아의 일부를 제거하는 단계 후, 상기 방법은 또한 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계를 더 포함한다. 다능성 세포는 다능성 세포의 마커, 표현형, 또는 기능을 나타내는 세포를 선택함으로써 선택될 수 있다. 세포를 선택하는 단계는 원하는 특징을 나타내는 세포를 분리하고 증식시키는 단계 또는 원하는 특징(들)을 가진 세포가 원하는 특징(들)을 갖지 않은 세포들보다 높은 비율로 생존하고/하거나 증식할 수 있는 조건 하에 미지의 특징을 가진 세포의 개체군을 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 다능성 세포의 마커 및 특징의 비제한적인 예는 본 명세서에서 후술된다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성과 관련하여 세포를 선택하는 단계는, 적어도 부분적으로, Oct4를 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성과 관련하여 세포를 선택하는 단계는 적어도 부분적으로, Nanog를 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성과 관련하여 세포를 선택하는 단계는 적어도 부분적으로, Oct4, Nanog, E-cadherin, 및/또는 SSEA를 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포는 이들 마커 및 FACS에 대해 특이적인 항체를 사용하여 SSEA-1 및 E-cadherin을 발현하는 세포를 선택함으로써 선택될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 FACS 또는 본 기술분야에 알려지고/알려지거나 본원에 기술된 다른 세포 분류 장치를 사용하여 크기에 기초하여 선택될 수 있다. 세포는 또한 배양 용기에의 부착불능성에 의해 선택될 수 있다.

[0083] 세포는 또한 스트레스를 가한 후의 더 작은 크기에 기초하여 선택될 수 있다. 즉, 다능성이 진전되는 스트레스 받은 세포는 그것의 비-다능성 체세포 전구체보다 더 작다. 일부 실시형태에 있어서, 8 μm 보다 작은 직경을 갖는 세포, 예를 들어 8 μm 이하, 7 μm 이하, 6 μm 이하, 5 μm 이하, 또는 그 이하의 직경을 갖는 세포가 선택된다. 세포는 짧은 기간 (예를 들어, 수분 내지 수일) 동안 배양한 후 또는 스트레스 처리하고나서 휴지시킨 후 크기에 기초하여 선택될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 세포는 스트레스 처리 후 즉시 크기에 기초하여 선택될 수 있다. 세포는 본 기술분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어 필터의 사용 또는 FACS에 의해 크기에 기초하여 선택될 수 있다.

[0084] 본원에 기술된 방법의 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포는 다능성 세포의 증식(즉, 줄기 세포의 증식)이 가능하도록 배양될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포는 세포외에서 유지될 수 있다. 하나의 양태에 있어서, 본원에 기재된 기술은 다능성 세포 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 그것의 자손을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 그것의 자손은 세포외에서 예를 들어 세포주(cell line)로서 유지될 수 있다. 세포주는 시험 후보 물질, 예를 들어 소정 질환에 대한 치료제 및/또는 본원에 이하에 기술된 줄기 세포를 조절하는 물질을 스크리닝 및/또는 시험하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 그것의 자손은 질환, 예를 들어 자연 발생 세포 또는 조직 유형 또는 자연 발생 다능성 및/또는 다분화능 세포 (본원에 이하에 기술됨)의 부전과 관련된 질환, 및/또는 유전적 돌연변이를 포함하는 세포와 관련된 질환, 예를 들어 암을 가진 대상체로부터 얻은 세포로부터 유래될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 예를 들어, 질환 모델링, 약물 발견, 진단, 및 개별화된 치료에서 사용될 수 있다.

[0085] 줄기 및/또는 다능성 세포의 증식 및/또는 유지에 적합한 조건은 본 기술분야에 알려져 있다. 줄기 세포의 증식은 분화를 실질적으로 유도하거나 허용함 없이 세포 수의 팽창(expansion)을 가능하게 한다. 비제한적인 예로서, 다능성 세포의 증식에 적합한 조건은 2% B27, 20 ng/mL 기본 섬유아세포 성장 인자, 및 10 ng/mL 상피 성장 인자가 보충된 F12/DMEM (1 : 1, v/v)에 1×10^6 세포/ cm^2 로 세포를 플레이팅(plating)하는 것을 포함한다. 배지의 약 50%는 배양 기간 동안 2-3일마다 교체될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 줄기 및/또는 다능성 세포의 증식에 적합한 조건은 본원에서 그 전문이 참조로 모두 포함되는 문헌 [Hitoshi, S. et al. Genes & development 2004 18, 1806-1811]에 기술된 B27-LIF (즉, LIF (1×10^3 units/mL, Chemicort; Cat No: ESG1107 EMD Millipore, Billerica, MA) 및 B27 보충물 (Cat No: 0080085-SA; Invitrogen; Grand Island, NY)를 함유하는 무-혈청 배지)에서 세포를 배양하는 것을 포함한다. 본원에 기술된 세포를 배양하기에 적합한 다른 배지, 예를 들어 ES 수립 배지, 2i, 3i 및 ACTH, ES 배지, ES-LIF, 배아 신경 줄기 세포 배양 조건, 및 EpiSCs 배양 조건은 본원에서의 실시예에 기술되어 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포의 증식 또는 유지를 위한 조건은 LIF (백혈병 억제 인자)의 존재 하에 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다.

- [0086] 증식 과정에서, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포는 동일한 다능성 줄기 세포 마커(들)를 발현하는 것을 지속할 것이다. 다능성 줄기 세포 마커의 비제한적인 예는 SSEA-1, SSEA-2, SSEA-3, SSEA-4 (본 명세서에서 SSEA로 통칭됨), AP, E-cadherin 항원, Oct4, Nanog, Ecat1, Rex1, Zfp296, GDF3, Dppa3, Dppa4, Dppa5, Sox2, Esrrb, Dnmt3b, Dnmt3l, Utl1, Tc11, Bat1, Fgf4, Neo, Cripto, Cdx2, 및 Slc2a3를 포함한다. 세포가 다능성 줄기 세포 마커를 발현하는지를 결정하는 방법은 본 기술분야의 통상의 기술자 중 일인에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 RT-PCR, 리포터 유전자 구조체의 사용 (예를 들어 FACS 또는 형광 현미경과 결합되는 본원에 기술된 Oct4-GFP 구조체의 발현), 및 FACS 또는 관심 대상의 세포 표면 마커에 대해 특이적인 항체를 사용하는 형광 현미경법을 포함한다.
- [0087] 다능성 세포 마커는 또한 세포와 비교되는 연장된 텔로미어를 포함한다. 텔로미어 길이는 예를 들어 게놈 DNA를 분리하고 HinfI 및 RsaI와 같은 제한 효소로 gDNA를 소화(digestion)하고, 텔로미어 길이 분석 시약으로 텔로미어를 검출함으로써 측정될 수 있다. 이러한 시약은 본 기술분야에 알려져 있고 예를 들어 TELOTAGG™ TELOMERE LENGTH ASSAY 키트 (Cat No. 12209136001 Roche; Indianapolis, IN)로 시판된다.
- [0088] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 처리되는 세포는, 본 개시된 방법에 따라 처리되기 전보다 배아 줄기 세포의 후성유전적 상태(epigenetic state)에 보다 근사하도록 개조될 수 있다. 세포의 후성유전적 상태는 게놈의 뉴클레오타이드 서열에서의 변화가 아니라, 게놈의 화학적 마크(mark)를 가리킨다. 후성유전적 마크는 DNA 메틸화 (임프린트)뿐만 아니라 DNA와 관련된 단백질, 예컨대 히스톤의 메틸화 및 아세틸화를 포함할 수 있다. 용어 "DNA 메틸화"는 DNA에 특정 염기(예의 메틸(CH₃))의 부가를 지칭한다. 포유동물에서, 메틸화는 거의 오로지, 뒤에 구아닌이 따를 때의 시토신(CpG)의 5 위치에서 발생한다. 일부 실시형태에 있어서, 후성유전적 상태는 후성유전적 메틸화 패턴, 예를 들어 DNA 메틸화 패턴을 포함할 수 있다. 후성유전적 표지의 존재 및 위치를 결정하기 위한 분석법은 본 기술분야에 알려져 있고 본원의 실시예 2에 기술된 바이설파이트 시퀀싱(bisulfite sequencing)을 포함할 수 있다. 간단하게는, DNA는 CpGenome™ DNA Modification 키트 (Chemicon, Temecula, CA.)로 처리되고 관심 대상의 영역 (예를 들어 Nanog 및 Oct4 유전자)은 증폭되고 시퀀싱된다.
- [0089] 본원에 기재된 기술의 일부 양태는 본원에 기술된 방법에 의해 생성되는 다능성 줄기 세포를 사용하는 분석법에 관한 것이다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법에 의해 제조되는 다능성 줄기 세포는 다능성 줄기 세포의 생존력, 분화도, 또는 증식력을 조절하는 물질을 스크리닝하고/하거나 확인하는데 사용될 수 있다. 이러한 분석법은 본원에 기술된 방법에 따라 제조되는 다능성 세포를 후보 물질과 접촉시키는 단계 및 상기 후보 물질과 접촉된 상기 다능성 세포의 생존력, 분화도 및/또는 증식력이 상기 후보 물질과 접촉되지 않은 상기 다능성 세포의 생존력, 분화도 및/또는 증식력과 달라졌는지를 측정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 물질은 다능성 줄기 세포의 생존력, 분화도 및/또는 증식력을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 물질은 다능성 줄기 세포의 생존력, 분화도 및/또는 증식력을 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 줄기 세포는 예를 들어 시너지 또는 길항 효과를 측정하기 위해 또는 모집단(pool)에서 후보 물질을 스크리닝하기 위해 다수의 후보 물질과 접촉될 수 있다.
- [0090] 후보 물질은, 부존재하에 비해 후보 물질의 존재하에 생존 가능한 즉 살아있는 다능성 세포의 수가 더 많거나 적은 경우에, 제조된 다능성 세포의 생존력을 조절하는 물질로서 확인된다. 세포의 생존력을 측정하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있고, 비제한적인 예로서, 살아 있는 세포 마커로부터의 신호의 강도, 또는 살아 있는 세포 마커에 의해 착색된 세포의 수 또는 비율을 검출함으로써 둘 이상의 시점에서 생존가능한 세포의 수를 측정하는 단계를 포함한다. 살아 있는 세포 마커는, 예를 들어 PRESTO BLUE™ (Cat No A-13261; Life Technologies; Grand Island, NY)로 시판된다. 후보 물질은 다능성 세포의 증식율이 변경되는 경우 즉, 주어진 시간에서 제조된 자손 세포의 수가 후보 물질의 존재 하에서 더 많거나 더 적은 경우, 제조된 다능성 세포의 증식을 조절하는 물질로서 확인된다. 세포의 증식율을 측정하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있고 비제한적인 예로서 시간에 따라 살아 있는 세포 수의 증가를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0091] 후보 물질은 다능성 세포의 분화의 속도 또는 특징이 후보 물질의 존재 하에 더 많거나 적을 경우 다능성 세포의 분화를 조절하는 물질로서 확인된다. 세포의 분화의 속도 또는 특징을 측정하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있고, 비제한적인 예로서, 특정 계통의 마커 또는 모폴로지를 검출하는 단계, 및 후보 물질과 접촉된 개체군에서의 그러한 마커 또는 모폴로지를 갖는 세포의 수 및/또는 세포의 출현 속도를 그 후보 물질과 접촉하지 않은 개체군과 비교하는 단계를 포함한다. 다양한 세포 운명 계통(cell fate lineage) 및 성숙한 세포 유형의 마커 및 모폴로지적 특징은 본 기술분야에 알려져 있다. 비제한적인 예로서, 중배엽 세포는 액틴, 미오신, 및 테스민의 발현에 의해 다능성 세포로부터 구분된다. 연골세포는 사프라닌-O 및/또는 FASTGREEN™ 염료 (Fisher;

Pittsburg, PA; F99)로 착색시킴으로써 그것의 전구체 세포 유형과 구분될 수 있다. 골세포는 Alizarin Red S (Sigma; St. Louis, MO: Cat No A5533)로 착색시킴으로써 그것의 전구체 세포 유형과 구분될 수 있다.

[0092] 일부 실시형태에 있어서, 후보 물질은 종양 줄기 세포의 잠재적 억제제일 수 있고, 예를 들어 본원에 기술된 방법은 성숙한 종양 세포로부터 다능성 세포를 제조하는데 사용되고, 종양 세포의 제조 및/또는 생존력을 억제하는 물질을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법은 또한 종양 줄기 세포의 발달 및/또는 생존을 촉진하지 않는, 성숙한 종양 세포를 죽이는 물질을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다.

[0093] 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포는 하나 이상의 후보 물질과 접촉되고 특정 세포 계통 또는 성숙한 세포 유형으로의 분화를 촉진하는 조건 하에 배양된다. 분화에 적합한 조건은 본 기술분야에 알려져 있다. 비제한적인 예로서, 중배엽 계통으로의 분화에 적합한 조건은 3일마다 교환되는 배지와 함께 20% 우태 혈청(FCS)으로 보충된 DMEM을 포함한다. 추가적인 비제한적인 예로서, 신경 계통으로의 분화에 적합한 조건은 2% B27, 10% FCS, 10 ng/mL bFGF, 및 20 ng/mL LIF가 보충된 F12/DMEM (1 : 1, v/v)에서의 오르니틴-코팅된 챔버 슬라이드에 세포를 플레이팅하는 단계를 포함한다. 배지는 3일마다 교환될 수 있다.

[0094] 본원에서 사용되는, "후보 물질"은 통상 존재하지 않거나 세포, 조직 또는 대상체에 투여되는 수준으로 존재하지 않는 임의의 독립체(entity)를 지칭한다. 후보 물질은 하기 군으로부터 선택될 수 있다: 화학물질; 작은 유기 또는 무기 분자; 핵산 서열; 핵산 유사체; 단백질; 펩티드; 압타머; 펩티도미메틱, 펩티드 유도체, 펩티드 유사체, 항체; 인트라바디(intrabodies); 생물 거대분자; 박테리아, 식물, 편자이, 또는 동물 세포 또는 조직과 같은 생물 물질로부터의 추출물; 자연 발생 또는 합성 조성물 또는 그것의 기능성 절편. 일부 실시형태에 있어서, 후보 물질은 제한 없이 합성 및 자연-발생 비단백질 독립체를 포함하는 임의의 화학적 독립체(entity) 또는 모이어티(moiety)이다. 특정 실시형태에 있어서, 후보 물질은 화학적 모이어티를 갖는 소분자이다. 예를 들어, 화학적 모이어티는 매크로라이드, 펩타이드 및 관련 천연 생성물 또는 그것의 유사체를 포함하는 비치환된 또는 치환된 알킬, 방향족, 또는 헤테로시클릭 모이어티를 포함한다. 후보 물질은 바람직한 활성 및/또는 특성을 가지는 것을 알려져 있을 수 있고, 또는 다양한 화합물의 라이브러리로부터 선택될 수 있다.

[0095] 후보 물질은 다능성 세포의 생존력, 증식력, 및/또는 분화도를 조절하는 그것의 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 후보 물질은 상기 및 본원의 실시예에 기술된 생존력, 분화도, 및/또는 증식력에 대한 분석법을 사용하여 스크리닝된다.

[0096] 일반적으로, 화합물은 적절한 기간에 걸쳐 대조군에 대해 세포 기능, 유전자 발현 또는 단백질 활성을 조절할 수 있는 임의의 농도에서 시험될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 화합물은 약 0.1 nM 내지 약 1000 mM 범위의 농도에서 시험된다. 한 실시형태에 있어서, 화합물은 약 0.1 μ M 내지 약 20 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 10 μ M, 또는 약 0.1 μ M 내지 약 5 μ M 범위에서 시험된다.

[0097] 실시되는 특정 실시형태에 따라, 후보 또는 시험 물질은 용액에서 유리되어 제공될 수 있고, 또는 담체, 또는 고체 지지체, 예를 들어 비드에 부착될 수 있다. 다수의 적합한 고체 지지체가 시험 물질의 고정화를 위해 이용될 수 있다. 적합한 고체 지지체의 예는 한천, 셀룰로오스, 텍스트란 (예를 들어, Sephadex, Sepharose로 시판됨) 카르복시메틸 셀룰로오스, 폴리스티렌, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 여과 종이, 니트로셀룰로오스, 이온 교환 수지, 플라스틱 필름, 폴리아민메틸비닐에테르 말레산 공중합체, 유리 비드, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 실크 등을 포함한다. 추가적으로, 본원에 기술된 방법을 위해, 시험 물질은 개별적으로, 또는 그룹으로 또는 모집단(pool)으로 스크리닝될 수 있다. 소정 그룹에 대하여 양성의 결과가 하나보다 더 기대되지 않을 정도로 유효 시험 물질에 대한 히트율(hit rate)이 낮을 것으로 예상되는 경우 그룹 스크리닝이 특히 유용하다.

[0098] 소분자, 중합체 및 게놈 기반 라이브러리를 개발하는 방법은 예를 들어, 문헌 [Ding, et al. J Am. Chem. Soc. 124: 1594-1596 (2002) and Lynn, et al., J. Am. Chem. Soc. 123: 8155-8156 (2001)]에 기술되어 있다. 시판되는 화합물 라이브러리는, 예를 들어 ArQule (Woburn, MA), Invitrogen (Carlsbad, CA), Ryan Scientific (Mt. Pleasant, SC), 및 Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY)로부터 얻을 수 있다. 이들 라이브러리는 다능성 줄기 세포의 생존력, 증식력, 및/또는 분화도를 조절하는 구성원의 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 후보 물질은 자연 발생 단백질 또는 그것의 절편일 수 있다. 이러한 후보 물질은 천연 공급원, 예를 들어, 세포 또는 조직 용해물로부터 얻을 수 있다. 폴리펩티드 물질의 라이브러리는 또한 예를 들어 시판되거나 일반 방법으로 생성되는 cDNA 라이브러리로부터 제조될 수 있다. 후보 물질은 또한 펩티드, 예를 들어 약 5 내지 약 30 개의 아미노산, 바람직하게는 약 5 내지 약 20 개의 아미노산, 특히 바람직하게는 약 7 내지 약 15 개의 아미노산의 펩티드일 수 있다. 펩티드는 자연 발생된 단백질의 소화물, 랜덤 펩티드, 또는 "편향된(biased)" 랜덤 펩티드

드릴 수 있다. 일부 방법에 있어서, 후보 물질은 폴리펩티드 또는 단백질이다. 펩티드 라이브러리, 예를 들어 펩티드 또는 다른 화합물의 조합 라이브러리는 임의의 지점에서의 서열 선호도(sequence preference) 또는 컨스턴트(constant) 없이 완전히 무작위적일 수 있다. 대안적으로, 라이브러리는 편향될(biased) 수 있고, 즉 서열 내의 일부 위치가 일정하게 고정되거나, 제한된 수의 가능한 것으로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 경우에 있어서, 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기는 예를 들어 소수성 아미노산, 친수성 잔기, 입체적으로 편향된 (작거나 큰) 잔기, 가교를 위해, 시스테인의 생성 방향으로, SH-3 도메인을 위해 프롤린, 인산화 부위를 위해 세린, 트레오닌, 티로신 또는 히스티딘, 또는 퓨린을 위한, 의 한정된 클래스 내에서 무작위화된다.

[0099] 후보 물질은 또한 핵산일 수 있다. 핵산 후보 물질은 자연 발생 핵산, 랜덤 핵산, 또는 "편향된" 랜덤 핵산일 수 있다. 예를 들어, 원핵 또는 진핵 계통의 소화물은 단백질에 대해 상기 기술된 바와 유사하게 사용될 수 있다.

[0100] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 다능성 세포의 생존력, 증식력 및/또는 분화도를 조절하는 것으로 스크리닝되고 확인된 후보 물질은 비처리된 대조군과 관련하여 5% 이상, 바람직하게는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1-배, 1.1-배, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 50-배, 100-배 또는 그 이상으로 다능성 세포의 생존력, 증식력 및/또는 분화도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 다능성 세포의 생존력, 증식력 및/또는 분화도를 조절하는 것으로 스크리닝되고 확인된 후보 물질은 비처리된 대조군과 관련하여 5% 이상, 바람직하게는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상까지, 완전한 제거(즉, 제로 생존력, 성장, 증식력, 또는 분화도)까지 포함하여 다능성 세포의 생존력, 증식력 및/또는 분화도를 감소시킬 수 있다.

[0101] 일부 실시형태에 있어서, 후보 물질은 투여되는 형태로 직접적으로 기능한다. 대안적으로, 후보 물질은 원하는 활성, 예를 들어 세포로의 핵산 서열의 도입 및 세포에서의 유전자 발현 또는 단백질 활성의 억제제 또는 활성제의 생성을 초래하는 그것의 전사를 조절하는 형태를 생성하기 위해 세포 내에서 변형되거나(modified) 활용될 수 있다.

[0102] 본원에 기술된 방법 및 조성물은 예를 들어 암 백신의 개발에서 사용될 수 있다고 여겨진다. 본원에 기술된 바와 같이 (예를 들어, 본원에 기술된 방법에 따라 성숙한 종양 세포를 처리함으로써) 얻어지는 다능성 종양 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 생성은 보다 효험있는 APC (항원 제시 세포)에 기초한 암 백신의 개발을 가능하게 할 수 있는 다양하고 변화되는 항원 프로파일을 제공할 수 있다.

[0103] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법은 세포의 형질전환 효율을 증가시키는 것과 관련된다. 세포에 스트레스를 가하는 것, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 다능성을 유도하는 것은 이에 제한되지 않지만 전이유전자 삽입, 바이러스 벡터, 및/또는 징크 핑거 엔도뉴클레아제를 포함하는 유전적 변형 방법에 보다 수용적인 세포를 제조할 수 있다. 본원에 기술된 방법은, 네이키드 DNA(naked DNA)가 생성된 다능성 세포를 형질전환시키기 위해 사용될 수 있도록, 세포가 유전적으로 수용가능 상태로 변형될 수 있게 한다고 여겨진다.

[0104] 본원에 기재된 기술의 일부 양태는 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 다능성 세포, 또는 이러한 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손을 세포 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 세포 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 또는 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 치료적 유효량이 마련된다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 그것의 자손은 자가(autologous)이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 그것의 자손은 동종이형(allogeneic)이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 그것의 자손은 자가이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 그것의 자손은 HLA-매칭된 동종이형(HLA-matched allogeneic)이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 그것의 자손은 동계(syngeneic)이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 그것의 자손은 이종발생(xenogenic)이다. 일부 실시형태에 있어서, 세포 치료는 자가유래 치료(autologous therapy)일 수 있고, 예를 들어 대상체로부터의 세포는 본원에 기술된 방법에 따른 다능성 세포를 제조하는데 사용될 수 있고 그 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손은 그 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에 사용되는, "세포 치료를 필요로 하는 대상체"는 자연 발생 세포 또는 조직 유형 또는 자연 발생 다능성 및/또는 다분화능 세포 (예를 들어, 줄기 세포)의 부전과 관련된 질환을 갖거나, 이를 갖거나 발병될 위험이 있는 것으로 진단되는 대상체를 지칭한다.

[0105] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법은 예를 들어, 본원에 기술된 바에 따라 얻어지는 동종이형 다능성 세포 및/또는 그것의 자손을 투여함으로써 유전적 장애, 예를 들어 테이-삭스병(Tay-Sachs) 또는 혈우병을 치료하는데 사용될 수 있다.

- [0106] 하나의 양태에 있어서, 하기를 포함하는, 대상체에 투여되는 세포 치료에 적합한 세포 또는 조직의 제조 방법이 기술된다: 본원에 기술된 방법에 따라 세포로부터 다능성 세포(또는 더욱 다능성의 세포)를 생성하는 단계, 여기서 세포는 자가 세포 또는 HLA-매칭된 동종이형 세포이다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포(또는 더욱 다능성의 세포)는 대상으로 그 세포 또는 조직을 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 분화될 수 있다.
- [0107] 다능성 세포, 예를 들어 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 줄기 세포는 암 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 골수 조혈계를 재생하기 위한 조혈모 줄기 세포 이식 플러스 고용량 화학요법은 본원에 기술된 바와 같이 생성된 다능성 세포의 사용의 혜택을 향유할 수 있다.
- [0108] 자연 발생 세포 또는 조직 유형 또는 자연 발생 다능성 및/또는 다분화능 세포의 부전과 관련된 질환의 비제한적인 예는 재생불량성 빈혈, 판코니 빈혈, 및 발작성 야간헐색소증 (PNH)을 포함한다. 다른 것은 예를 들어 하기를 포함한다: 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 이종표현형 백혈병 및 급성 미분화 백혈병을 포함하는 급성 백혈병; 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소아형 만성 골수성 백혈병 (JMML) 및 소아형 골수단백구형 백혈병 (JMML)을 포함하는 만성 백혈병; 급성 골수성백혈증, 혈관생성 골수화생 (골수성백혈증), 진성다혈구증 및 본태성 혈소판 증가증을 포함하는 골수증식성 질환; 뮤코다당증 (MPS), 혈러 증후군 (MPS-IH), 샤이 증후군 (MPS-IS), 헌터 증후군 (MPS-II), 산필립프 증후군 (MPS-III), 모르크우 증후군 (MPS-IV), 마로토-라미 증후군 (MPS-VI), 슬라이 증후군, 베타-글루쿠로니다아제 결핍 (MPS-VII), 부신백질이영양증, 뮤코리피드증 II (I-세포 질환), 크라베병, 고세병, 니먼-픽 질환, 윌만병 및 본태성 혈소판증가증을 포함하는 리소좀 축적 질환; 가족성 적혈구탐식성 림프조직구 증식증, 히스티오사이토시스-X 및 혈구포식증후군을 포함하는 조직구 장애; 체디아크 히가시 증후군, 만성 육아종, 중성구 액틴 결핍증 및 세망이생성증을 포함하는 식세포 질환; 거대핵세포증가증/선천성 혈소판감소증을 포함하는 유전성 혈소판 이상증; 다발성 골수종, 형질 세포성 백혈병, 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증을 포함하는 형질 세포 질환. 줄기 세포 요법으로 치료될 수 있는 다른 악성종양은 이에 제한되지 않지만 유방암, 유잉육종, 신경모세포종 및 신세포암종 등을 포함한다. 또한 줄기 세포 요법으로 치료가 가능한 것은 하기와 같다: COPD 및 기관지 천식을 포함하는 폐 질환; 모세혈관확장성운동실조증, 코스트만 증후군, 백혈구 부착 결핍증, 디조지 증후군, 베어 림프 증후군, 오펜 증후군, 중증 복합형 면역 부전증 (SCID), 아데노신탈아미노화효소 결핍증을 갖는 SCID, T & B 세포 SCID의 결여증(absence of T & B cells SCID), T 세포 결여증(absence of T cells), 정상 B 세포 SCID, 공통가변성 면역결핍증, 및 X-연관성 림프세포증식성 질환을 포함하는 선천성 면역 질환; 레쉬-니한 증후군, 연골-모발 발육부전, 글란즈만 혈소판무력증 및 골석화증을 포함하는 다른 유전성 질환; 급성 및 만성 뇌졸중, 외상성 뇌손상, 뇌성마비, 다발성 경화증, 근위축측삭경화증 및 간질을 포함하는 신경성 상태; 죽상동맥경화증, 울혈심부전 및 심근경색증을 포함하는 심장 상태; 당뇨병을 포함하는 대사 장애; 및 황반변성 및 시신경위축을 포함하는 안구 장애. 이러한 질환 또는 장애는 원하는 분화를 촉진하는 물질의 투여와 함께 또는 투여 없이 원하는 세포 유형으로의 생체내 분화를 가능하게 하는 다능성 세포 자체를 투여함으로써, 및/또는 생체외에서 원하는 세포 유형으로 분화되는 또는 적어도 부분적으로 분화되는 다능성 세포를 투여함으로써 치료될 수 있다. 이러한 상태의 진단 방법은 본 기술분야의 통상의 기술을 가진 의사에게 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에 있어서, 대상체는 방사선 요법 또는 세포 또는 줄기 세포의 개체군을 파괴하는 다른 요법으로 치료된 사람일 수 있고, 예를 들어 대상체는 골수가 방사선 요법으로 파괴된 암을 가진 대상체일 수 있다.
- [0109] 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포는 대상체에 투여된다. 일부 실시형태에 있어서, 적어도 부분적으로 분화된 세포는 대상체에 투여된다. 일부 실시형태에 있어서, 세포 치료의 방법은 세포를 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 상기 다능성 세포를 분화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 원하는 세포 계통에 따라 줄기 세포를 분화시키는 방법은 본 기술분야에 알려져 있고 예가 본원에 기술된다.
- [0110] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 얻어진 다능성 세포, 또는 상기 다능성 세포의 자손인 적어도 부분적으로 분화된 세포를 포함하는 조성물은 대상체에 투여된다.
- [0111] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법에 따라 얻어진 다능성 세포, 또는 상기 다능성 세포의 자손인 적어도 부분적으로 분화된 세포를 포함하는 조성물은, 임의로 G-CSF, GM-CSF 및/또는 M-CSF를 추가로 포함할 수 있고/있거나 별도의 조성물로 G-CSF, GM-CSF 및/또는 M-CSF를 투여되었거나 투여될 것인 대상으로 투여될 수 있다. G-CSF, GM-CSF 및/또는 M-CSF의 투여는 예를 들어 장기 재생에 바람직한 염증의 상태 및 조직 잔해, 폐물 및 구성물의 제거를 유도할 수 있다.
- [0112] 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 자손의 투여는 본원에 기술된 방법에 따라 배양액에서 다능성 세포의 생성 이후 상대적으로 짧은 기간 (예를 들어, 생성 후 1, 2, 5, 10, 24 또는 48

시간) 내에 일어날 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 적어도 부분적으로 분화된 자손의 투여는 본원에 기술된 방법에 따라 배양액에서 다능성 세포의 분화 이후 상대적으로 짧은 기간 (예를 들어, 생성 후 1, 2, 5, 10, 24 또는 48 시간) 내에 일어날 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 다능성 세포 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 자손은 투여 이전에 극저온으로 보존될 수 있다.

[0113] 일부 양태에 있어서, 본원에 기재된 기술은 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포 및/또는 상기 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손을 포함하는 조성물과 관련된다. 일부 실시형태에 있어서, 약학적 조성물은 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포 및/또는 상기 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손, 및 임의로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 상기 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0114] 약학적 조성물은 적합한 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있고, 예를 들어 용액, 현탁액, 겔, 또는 에멀전일 수 있다. 통상적으로, 조성물은 담체와 함께 세포 약 0.01 내지 99%, 바람직하게는 약 5 내지 95%를 함유할 것이다. 상기 세포는, 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제와 조합되는 경우, 비경구적으로, 피하로, 이식 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 대부분의 치료적 목적을 위해, 상기 세포는 액체 형태의 용액 또는 현탁액으로서 주사를 통해 투여될 수 있다. 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포 및/또는 상기 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 투여를 위한 담체를 지칭한다. 이러한 담체는, 이에 제한되지 않지만, 식염수, 완충 식염수, 텍스트로오스, 물, 글리세롤, 및 이들의 조합을 포함한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분에 적합한 의미에서 "허용가능함(acceptable)"이어야 하고, 예를 들어 담체는 대상체에 대한 물질의 영향을 감소시키지 않는다. 다시 말해서, 담체는 약학적으로 불활성이고 살아있는 세포에 적합하다.

[0115] 적합한 제형은 또한 항-산화제, 완충액, 세균발육억제제, 살균 항생물질 및 그 제형을 의도된 수용자의 체액과 등장성이 될 수 있게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사액을 포함한다. 수성 및 비-수성 멸균 현탁액은 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있다. 제형은 단위-복용 또는 다중-복용 용기에 보존될 수 있다.

[0116] 비경구 복용 형태의 예는, 이에 제한되지 않지만, 주사에 용이한 용액, 주사에 용이한 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 비경구 복용 형태는, 예를 들어 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포 및/또는 상기 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손을 유지하는 생분해성 스캐폴드재를 사용하여 제조될 수 있다.

[0117] 용어 "후성유전적 변형(epigenetic modification)"은 게놈의 화학적 마킹(chemical marking)을 지칭한다. 후성유전적 마크는 DNA 메틸화 (임프린트) 뿐만 아니라 히스톤과 같은 DNA와 관련된 단백질의 메틸화 및 아세틸화를 포함할 수 있다. 원부모-특이적 유전자 발현(parent-of-origin-specific gene expression) (모계 또는 부계 염색체)은 종종 포유동물에서 관찰되고 후성유전적 변형에 기인한다. 부모 생식계열에서, 후성유전적 변형은 안정적인 유전자 침묵화(gene silencing) 또는 활성화를 초래할 수 있다.

[0118] 본원에서 사용되는, 용어 "투여하다" 또는 "이식하다"는 원하는 효과가 발생하는 원하는 위치에서 세포의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 대상체로의 세포의 배치를 지칭한다.

[0119] 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손은 임상의가 적절하다고 판단한 임의의 방법으로 투여될 수 있고, 예를 들어 세포의 현탁액의 주사에 의해, 또는 예를 들어 이식가능한 스캐폴드 또는 지지체 상이나 내부에 퇴적되거나(deposited) 성장된 세포의 준비된 것을 이식함에 의한 국소 투여를 포함할 수 있다. 이식가능한 스캐폴드는 특히 다수의 분해가능하거나 흡수가능한 중합체, 또는 예를 들어 실크 스캐폴드 등 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손을 포함하는 약학적 조성물의 투여를 위한 적합한 경로는 이에 제한되지 않지만 국소 투여, 예를 들어 복강내주사, 비경구, 강내 또는 피하 투여를 포함한다. 본원에서 사용되는 문구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"은 일반적으로 주사에 의한 경장(enteral) 및 국소(topical) 투여 외의 투여 방식을 지칭하고 제한된 없이 복강내주사, 피내주사, 피하 주사 및 정맥주입을 포함한다. 투여는 주사에 적합한 바늘, 카테터 및 주사기, 또는 외과적 이식의 사용과 관련될 수 있다. 전달 수단 및 전달 위치의 조합의 사용이 원하는 의료적 효과를 달성하기 위해 고려된다.

[0120] 용어 "후성유전적 변형"은 게놈의 화학적 마킹(chemical marking)을 지칭한다. 후성유전적 마크는 DNA 메틸화 (임프린트) 뿐만 아니라 히스톤과 같은 DNA와 관련된 단백질의 메틸화 및 아세틸화를 포함할 수 있다. 원부모-특이적 유전자 발현 (모계 또는 부계 염색체)은 종종 포유동물에서 관찰되고 후성유전적 변형에 기인한다. 부모 생식계열에서, 후성유전적 변형은 안정적인 유전자 침묵화 또는 활성화를 초래할 수 있다.

- [0121] 하나의 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 치료적 유효량이 대상체에 투여된다. "치료적 유효량"은 치료될 증상 또는 상태의 마커에 있어서의 측정가능한 개선을 낳기에 충분한, 본원에 기술된 다능성 줄기 세포 및/또는 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 양이다. 치료 조성물에서의 세포의 실제 복용 수준은 특정 대상체에 대한 원하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 세포의 양을 투여하기 위해 변화될 수 있다. 선택된 복용 수준은 이에 제한되지 않지만 치료적 조성물, 제형, 투여 경로, 다른 약물 또는 치료와의 조합, 치료되는 상태의 심각성, 대상체의 신체적 조건, 치료되는 대상체의 이전 의료 이력 및 요법을 투여하는 의료인 또는 의사의 경험 및 판단을 포함하는 다양한 인자들에 좌우될 것이다. 일반적으로, 계획된 복용량 및 투여법은 상태의 진전을 늦추고, 바람직하게는 억제하고, 또한 바람직하게는 상태의 하나 이상의 증상 또는 마커의 감소를 야기하기 위해 충분하여야 한다. 치료적 유효량의 결정 및 판단뿐만 아니라 이러한 판단의 시기 및 방법의 평가는 의약 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다.
- [0122] 본원에 기술된 방법에 따라 투여되는 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 복용량은 필요에 따라 치료의 관찰된 효과에 적합하도록 의사에 의해 결정 및 조정될 수 있다. 치료의 기간 및 빈도와 관련하여, 치료가 치료적 이익을 제공하는 시기를 결정하고, 다른 복용량의 세포를 투여할지 여부, 복용량을 증가하거나 감소시키는 여부, 치료의 중단 여부, 치료의 재개 여부, 또는 치료 요법에 다른 변경을 가할지 여부를 결정하기 위해 대상체를 모니터링하는 것은 숙달된 의료인에게 통상적인 것이다. 투여된 세포가 장기간으로 배지에 이식되어 생존할 것으로 예상되는 경우, 반복 복용량이 필요할 수 있다. 그러나, 투여는 대상체에게 필요한 만큼 그리고 견딜 수 있는 만큼 반복될 수 있다. 복용량은 실질적 부작용을 야기할 정도로 많아서 안된다. 복용량은 또한 임의의 합병증이 발생하는 경우 담당 의사에 의해 조절될 수 있다. 그러나, 통상적으로, 복용량은 성인 인간에 대하여 100 내지 1×10^9 개의 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 그것의 부분적으로 분화된 자손, 예를 들어 100 내지 10,000 개의 세포, 1,000 내지 100,000 개의 세포, 10,000 내지 1,000,000 개의 세포, 또는 1,000,000 내지 1×10^9 개의 세포 범위일 수 있다. 효과적인 복용량은 예를 들어 동물 모델 시험 검정 또는 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 추론될 수 있다.
- [0123] 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 본원에 기술된 바에 따라 제조되는 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손을 포함하는 치료 조성물은 본 기술분야에 알려진 방법에 따라 효험을 확인하고, 이식된 세포의 생체내 성장을 평가하고, 복용량을 산출하기 위해 SCID 마우스 모델과 같은, 하나 이상의 적절한 생체의 및/또는 생체내 동물 모델에서 임의로 시험된다. 특히, 복용량은 관련 분석법에서의 치료 대 비-치료 (예를 들어 치료된 것 대 비치료된 동물 모델의 비교)의 활성, 안정성 또는 다른 적합한 측정수치에 의해 초기에 결정될 수 있다. 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 자손의 유효량을 결정함에 있어, 의사는 기준들 중에서도, 이식된 세포의 성장 및 부피와 치료되는 상태의 진전을 평가한다. 복용량은 이용되는 복용 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 변화될 수 있다.
- [0124] 본원에 기술된 치료 방법과 관련하여, 본원에 기술된 다능성 줄기 세포, 및/또는 그것의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 투여는 투여의 특정 방식, 복용량, 또는 복용 빈도에 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 근육내, 정맥내, 복강내, 소낭내(intravesicular), 관절내, 병변내, 피하, 또는 치료되는 상태를 치료하기에 충분한 복용량을 제공하기에 충분한 임의의 다른 경로를 포함하는 투여의 모든 방식이 고려된다.
- [0125] 일부 실시형태에 있어서, 본원에 기술된 방법은 생체내에서 다능성 세포를 생성하는데 사용될 수 있고, 예를 들어 대상체에 존재하는 세포는 다능성 표현형을 얻도록 본원에 기술된 바에 따라 스트레스가 가하여질 수 있다. 생체내 세포에 본원에 기술된 스트레스를 가하는 방법은 간단 명백하며, 예를 들어 약산(mild acid) 용액이 주사 및/또는 직접 도포를 통해 조직에 도입될 수 있고, 온도는 주변 조직을 가열하거나 냉각할 수 있는 프로브에 의해 또는 비-침습적 방법, 예를 들어 포커스 빔 방사(focus beam radiation)의 사용을 통해 변경될 수 있다. 다능성의 생체내 조절은 예를 들어 조직 재생 또는 상처 치유를 증가시키는데 사용될 수 있다. 비제한적인 예는 무릎 관절 세포 (예를 들어, 활액(synovial) 또는 연골 세포)가 다능성 표현형을 띠게 하고 새로운 조직을 재생하게 하는, 관절염이 있는 무릎 관절로의 약산의 주입을 포함할 수 있다. 추가의 비제한적인 예는 뇌졸중 또는 중추 신경계 손상 (예를 들어 척수 손상)을 가진 대상체의 치료를 포함할 수 있다. 염증이 해소된 후, 손상된 영역에 인접한 세포를 본원에 기술된 바와 같이 스트레스로 치료하여, 손상된 조직을 복원시키고/복원시키거나 손상된 조직을 재생하거나 고칠 수 있다.
- [0126] 추가적인 비제한적인 예에서, 후성유전적 상태의 변화 (예를 들어, 탈메틸효소에 의한 치료에 의함)는 비-인슐린 분비 세포 (예를 들어 췌장의 알파 글루카곤 세포)를 인슐린-분비 세포 (예를 들어 베타 세포)로 전환시킬 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 방법에 따라 비-인슐린 분비 세포 (예를 들어, 췌장의 알파 글루카곤 세포)를

처리하는 것은 생체내 또는 생체외에서 세포가 인슐린-분비 세포, 예를 들어 베타-유사 세포가 되는 것을 초래할 수 있다.

[0127] 또한, 본원에 기술된 다능성 세포는 다른 세포 (즉, "수용 세포(recipient cell)"), 예를 들어 본원에 기술된 방법에 따라 처리되지 않은 세포, 비-다능성 세포, 성숙 세포, 악성 세포, 및/또는 손상된 세포와 융합될 수 있다. 세포의 융합은 융합 이전과 비교하여 수용 세포에서의 세포의 복구 효소 발현 및/또는 활성의 증가된 수준을 초래할 수 있다. 이는 예를 들어 수용 세포의 세포 손상, 돌연변이, 및/또는 후성유전적 상태의 변형의 복구를 증가시킴으로써 수용 세포의 건강 및/또는 기능을 증가시킬 수 있다.

[0128] 일부 실시형태에 있어서, 생체내 세포의 다능성을 증가시킴으로써, 이러한 세포의 후성유전적 마커 (예를 들어, DNA 메틸화, 탈메틸화, 및/또는 히드록시메틸화 상태)가 조절될 수 있다. 후성유전적 마커의 조절은 예를 들어 악성종양, 관절염, 자가면역 질환, 노화 등과 연루되어 왔으며, 본원에 기술된 방법에 따라 이러한 후성유전-연관 상태의 치료가 고려된다.

[0129] 일부 실시형태에 있어서, 다수의 조직은 동시에 생체내에서 치료될 수 있고, 광범위한 손상 또는 노화를 치료하기 위해, 예를 들어 악산성 상태가 다수의 기관에서, 예를 들어 연속적이거나 동시에 (예를 들어, 뇌, 심장, 간, 폐, 및/또는 갑상선)에서 유도될 수 있다.

[0130] 본원에 기술된 바와 같은 세포의 생체내 치료는 본원에 기술된 바에 따라 제조된 다능성 세포 및/또는 적어도 부분적으로 분화된 그것의 자손의 투여와 조합될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0131] 본원에 기술된 방법이 예를 들어 자궁 내 태아 또는 배아를 치료하기 위해 사용될 수 있음이 본원에서 고려된다.

[0132] 치료의 효과는 본원에 기술된 바와 같이 치료되는 상태의 예를 들어 마커, 지표, 증상 또는 발생 정도 또는 임의의 측정가능한 적절한 파라미터, 예를 들어 다능성 세포 자손의 수를 측정함으로써 평가될 수 있다. 이러한 파라미터 중 임의의 하나, 또는 파라미터의 임의의 조합을 측정함으로써 치료 또는 예방의 효과를 모니터링하는 것은 본 기술분야의 통상의 기술자의 능력 범위 내에서 가능하다.

[0133] 효과적인 치료는 하나 이상의 마커, 지표, 또는 치료되는 상태의 증상에서의 통계적으로 유의미한 개선이 있거나 또는 그 치료가 없다면 예상되는 증상의 악화 또는 발전의 불이행(failure)에 의해 입증된다. 예로서, 상태의 측정가능한 파라미터에서의 약 10% 이상, 바람직하게는 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50% 이상 또는 그 이상의 바람직한 변화는 효과적인 치료의 지표일 수 있다. 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 다능성 세포 및/또는 상기 다능성 세포의 적어도 부분적으로 분화된 자손의 효능은 또한 본원에 기술된 상태에 대한 본 기술분야에서 알려진 실험 동물 모델을 사용하여 판단될 수 있다. 실험 동물 모델을 사용하는 경우, 마커에서의, 예를 들어 골수 제거 및 본원에 기술된 다능성 세포를 사용한 치료 후 마우스에 존재하는 조혈모 세포의 수에서의, 통계적으로 유의미한 변화가 관찰되는 경우 치료의 효능이 입증된다.

[0134] 하나의 양태에 있어서, 태반 세포로 분화가 가능한 다능성 세포의 제조 방법이 본원에 기술되어 있고, 상기 방법은 FGF4의 존재 하에 본원에 기술된 방법에 따라 얻은 다능성 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 다능성 세포는 배아 줄기 세포로 분화될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, FGF4의 농도는 약 1 nM 내지 약 1 μ M이다. 일부 실시형태에 있어서, FGF4의 농도는 1 nM 내지 1 μ M이다. 일부 실시형태에 있어서, FGF4의 농도는 약 5 nM 내지 약 500 nM이다. 일부 실시형태에 있어서, FGF4의 농도는 약 10 nM 내지 약 100 nM이다.

[0135] 일부 양태에 있어서, 본원에 기재된 기술은 세포로부터 다능성 세포를 생성하기 위한 시스템에 관한 것이고, 이는 세포로부터 세포질 및/또는 미토콘드리아의 일부를 제거하는 것을 포함한다.

[0136] 본원에 기술된 방법에 따라, 세포로부터 다능성 세포를 생성하기 위한 시스템은 세포에 스트레스가 가해지는 컨테이너를 포함한다. 예를 들어 본원에 기술된 방법에 따라 세포질 및/또는 미토콘드리아의 양을 감소시키기 위해 저산소 조건 하에서 세포를 수일 또는 그 이상 동안 배양하는 경우, 상기 컨테이너는 체세포 및/또는 다능성 세포의 배양에 적합한 것일 수 있다. 대안적으로, 상기 컨테이너는 세포가 제한된 기간, 예를 들어 1 시간 미만 동안 좁은 구멍을 갖는 장치에서 분쇄되는 경우 세포의 배양에 적합하지 않으나 세포에 스트레스를 가하는데 적합한 것일 수 있다. 컨테이너는 예를 들어 용기(vessel), 튜브, 마이크로유체소자, 피펫, 생물반응기, 또는 세포 배양 디쉬일 수 있다. 컨테이너는 체세포 및/또는 다능성 세포의 배양에 적합한 조건을 제공하는 환경(예를 들어 인큐베이터에 담긴 것) 또는 세포에 환경적 스트레스를 야기하는 조건을 제공하는 환경(예를 들어 저산소 함량 환경을 제공하는 인큐베이터에 함유된 것)에서 유지될 수 있다. 컨테이너는 본원에 기술된 1 개 이상

의 환경적 스트레스, 예를 들어 1 개의 스트레스, 2 개의 스트레스, 3 개의 스트레스, 또는 그 이상을 제공하도록 구성될 수 있다. 체세포 및/또는 다능성 세포를 취급하고/하거나 배양하기에 적합한 컨테이너는 본 기술분야에서 통상의 기술자 중 일인에게 잘 알려져 있고 시판된다 (예를 들어 Cat No CLS430597 Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). 일부 실시형태에 있어서, 컨테이너는 마이크로유체소자이다. 일부 실시형태에 있어서, 컨테이너는 세포 배양 접시, 플라스크, 또는 플레이트이다.

[0137] 일부 실시형태에 있어서, 시스템은 다능성 세포를 선택하는 수단을 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어 시스템은 다능성 마커 (예를 들어 Oct4-GFP)를 발현하는 세포를 선택하거나 상기 본원에 기술된 바와 같이 크기로 선택할 수 있는 FACS 시스템을 포함할 수 있다. 세포의 선택을 위한 방법 및 장치는 본 기술분야의 통상의 기술자 중 일인에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ에 의해 제조된 BD LSRII™ 및 BD FACSDIVA™ 소프트웨어가 결합된 BD FACSARIA SORP™ (Cat No. 643629)로 시판된다.

[0138] 일부 실시형태에 있어서, 조직에 존재하지 않는 세포가 상기 시스템에 제공된다. 일부 실시형태에 있어서, 조직이 상기 시스템에 제공되고 상기 시스템은 하나 이상의 유형의 세포를 분리하는 수단을 추가로 포함한다. 비제한적인 예로서, 상기 시스템은 조직 균질화기(tissue homogenizer)를 포함할 수 있다. 조직 균질화기 및 그것의 사용 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있고 시판된다 (예를 들어 FASTH21™, Cat No. 21-82041 Omni International; Kennesaw, GA). 대안적으로, 상기 시스템은 혈액 또는 체액 샘플을 가공하는 원심분리기를 포함할 수 있다.

[0139] 일부 실시형태에 있어서, 상기 시스템은 자동화될 수 있다. 세포 분리, 세포 배양, 및 선택 장치를 자동화하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있고 예를 들어, FASTH21™ Tissue Homogenizer (Cat No. 21-82041 Omni International; Kennesaw, GA) 및 BD FACSARIA SORP™로 시판된다.

[0140] 일부 실시형태에 있어서, 상기 시스템은 살균될 수 있고, 예를 들어 살균 환경에서 작동될 수 있거나 상기 시스템은 폐쇄된 살균 시스템으로서 작동될 수 있다.

[0141] 하나의 양태에 있어서, 다능성 세포의 자기재생력을 증가시키는 방법이 본원에 기술되어 있고, 상기 방법은 부신피질자극호르몬 (ACTH), 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 본원에 사용되는, "자기재생력"은 세포가 생체외에서 배양되고 패시징될 수 있는 시간의 길이, 예를 들어 생존가능한 세포를 제조하기 위해 세포 및 그것의 자손에게 행해지고 지속될 수 있는 패시지(passage)의 수를 지칭한다. 본원에 기술된 방법에 따라 증가된 자기재생력을 갖게 되는 세포는 예를 들어 전능성 세포 및/또는 본원의 다른 곳에 기술된 바에 따라 스트레스에 노출됨으로서 생성된 세포일 수 있다.

[0142] 일부 실시형태에 있어서, ACTH의 존재 하에 배양하는 것은 약 0.1 μ M 내지 약 1,000 μ M, 예를 들어 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 10 μ M, 또는 약 10 μ M을 포함하는 세포 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, ACTH의 존재 하에 세포를 배양하는 것은 ACTH를 포함하는 LIF 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. LIF, ACTH, 2i 및 3i는 시판되고 본 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 ACTH는 Sigma-Aldrich (Cat No. A0673; St. Louis, MO)로부터 구입될 수 있고 LIF 배지는 Millipore (예를 들어 CatNos ESG1107; Billerica, MA)로부터 구입될 수 있고, 3i는 Stem Cells Inc. (예를 들어 "iSTEM Stem Cell Culture Medium, Cat No. SCS-SF-ES-01; Newark, CA)로부터 구입될 수 있다.

[0143] 일부 실시형태에 있어서, 배양 단계는 3 일 이상, 예를 들어 3 일 이상, 4 일 이상, 5 일 이상, 6 일 이상, 7 일 이상, 또는 그 이상 동안 진행될 수 있다. 배양 단계 후, 세포는 본원의 다른 곳에 기술된 바에 따라 다능성 세포를 유지하기에 적합한 조건 하에 유지될 수 있다.

[0144] 일부 실시형태에 있어서, 배양 단계 후, 세포는 검출 가능하고/하거나 증가된 수준의 줄기 세포 마커를 발현할 수 있다. 줄기 세포 마커 및 이를 검출하는 방법은 본원의 다른 곳에 기술되어 있다. 일부 실시형태에 있어서, 줄기 세포 마커는 Oct3/4; Nanog; Rex1; Klf4; Sox2; Klf2; Esrr-beta; Tbx3; 및 Klf5로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0145] 본 개시물의 실시형태의 설명은 망라적이거나 또는 개시된 정확한 형태로 본 개시물을 제한하려는 것으로 의도되지 않는다. 개시물의 특정 실시형태, 이에 대한 실시예가 예시적 목적을 위해 본원에 기술되어 있으나, 다양한 등가의 변형이 개시물의 범위 내에서 가능하고, 이는 관련 기술의 통상의 기술자에게 인식될 수 있다. 예를 들어, 방법 단계들 또는 기능들은 주어진 순서로 나타내지만, 대안적인 실시형태는 다른 순서로 기능들을 수행할 수 있고, 또는 기능들은 실질적으로 동시에 수행될 수 있다. 본원에 제공된 개시물의 교시는 적합한 다른 과정 또는 방법에 적용될 수 있다. 본원에 기술된 다양한 실시형태는 추가의 실시형태를 제공하기 위해 조합될

수 있다. 개시물의 양태는, 필요한 경우, 본 개시물의 추가 실시형태를 제공하기 위해 참조 문헌들의 조성물, 기능 및 개념을 이용하도록 수정될 수 있다. 상세한 설명을 고려하여 본 개시물에 대해 이러한 및 다른 변화가 이루어질 수 있다.

- [0146] 상기 실시형태 중 임의의 것의 특정 구성요소는 다른 실시형태의 구성요소와 조합되거나 대체될 수 있다. 또한, 본 개시물의 특정 실시형태와 관련된 장점이 이러한 실시형태의 문맥에 기술되었지만, 다른 실시형태가 또한 이러한 장점을 나타낼 수 있고, 모든 실시형태가 본 개시물의 범위 내에 포함되는 이러한 장점을 필수적으로 나타내야 하는 것도 아니다.
- [0147] 여기 밝힌 모든 특허 및 다른 공개물은, 예를 들어 본 발명과 연관되어 사용될 수 있는 이러한 공개물에 기술된 방법론을, 기재 및 개시하려는 목적을 위해, 참조로 본원에 명확하게 포함된다. 이러한 공개물은 오직 본 출원의 출원일 이전에서의 그것의 공개 때문에 제공된다. 이와 관련하여 어느 것도 본 발명자가 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 이러한 개시물에 선행하지 않는 것을 인정한 것으로 해석되어서는 안된다. 이러한 문헌의 내용에 대한 날짜 및 표현에 관한 모든 언급은 출원인이 이용가능한 정보에 기초하며, 이러한 문헌의 날짜 또는 내용의 정확도에 관하여 인정하는 것은 전혀 아니다.
- [0148] 본 발명은 제한 해석되어서는 안되는 하기 실시예에 의해 추가로 설명된다.
- [0149] 본원에 기재된 기술의 일부 실시형태는 하기 번호가 붙여진 문단 중 임의의 것에 따라 정의된다.
- [0150] 1. 세포에 스트레스를 가하는 단계를 포함하는, 다능성 세포의 생성 방법.
- [0151] 2. 문단 1에 있어서, 상기 다능성 세포는 외인성 유전자, 전사물, 단백질, 핵성분 또는 세포질의 도입 없이, 또는 세포 융합 없이 생성되는 방법.
- [0152] 3. 문단 1-2 중 어느 하나에 있어서, 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0153] 4. 문단 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 조직의 일부로서 존재하지 않는 방법.
- [0154] 5. 문단 1-4 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 체세포, 줄기 세포, 전구 세포 또는 배아 세포인 방법.
- [0155] 6. 문단 1-5 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 분리된 세포인 방법.
- [0156] 7. 문단 1-6 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 세포의 이중 개체군에 존재하는 방법.
- [0157] 8. 문단 1-7 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 세포의 동종 개체군에 존재하는 방법.
- [0158] 9. 문단 1-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계는 줄기 세포 마커를 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법.
- [0159] 10. 문단 9에 있어서, 상기 줄기 세포 마커는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법:
- [0160] Oct4; Nanog; E-cadherin, 및 SSEA4.
- [0161] 11. 문단 1-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 다능성을 나타내는 세포를 선택하는 단계는 부착되지 않은 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법.
- [0162] 12. 문단 1-11 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 조직 또는 세포 배양에서의 비생리적 스트레스를 포함하는 방법.
- [0163] 13. 문단 1-12 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 세포의 하기로부터 선택되는 하나 이상의 환경적 자극에의 노출을 포함하는 방법: 외상, 기계적 자극, 화학적 노출, 초음파 자극, 산소-부족, 방사선, 극한 온도에서의 노출, 분리, 분쇄, 신체적 스트레스, 고삼투압, 저삼투압, 막 손상, 독소, 극한 이온 농도, 활성 산소, UV 노출, 강한 가시광선, 필수 영양분의 부족, 또는 비생리적 산성 환경.
- [0164] 14. 문단 1-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 세포의 약 3.0 내지 약 6.8의 pH에의 노출을 포함하는 방법.
- [0165] 15. 문단 1-14 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 세포의 약 4.5 내지 약 6.0의 pH에의 노출을 포함하는 방법.
- [0166] 16. 문단 15에 있어서, 상기 스트레스는 세포의 약 5.4 내지 약 5.8의 pH에의 노출을 포함하는 방법.

- [0167] 17. 문단 12-16 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 2-3일간 노출되는 방법.
- [0168] 18. 문단 12-17 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 1 일 이하 동안 노출되는 방법.
- [0169] 19. 문단 12-18 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 1 시간 이하 동안 노출되는 방법.
- [0170] 20. 문단 12-19 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 약 30 분간 노출되는 방법.
- [0171] 21. 문단 13에 있어서, 상기 극한 온도에서의 노출은 35 ℃ 미만 또는 42 ℃ 초과 온도에서 세포를 노출시키는 것을 포함하는 방법.
- [0172] 22. 문단 21에 있어서, 상기 극한 온도에서의 노출은 어느점 이하의 온도에서 세포를 노출시키는 것 또는 세포의 약 85 ℃ 이상의 온도에서의 노출을 포함하는 방법.
- [0173] 23. 문단 13에 있어서, 상기 기계적 자극은 세포를 전단 응력 및/또는 고압에 노출시키는 것을 포함하는 방법.
- [0174] 24. 문단 23에 있어서, 상기 기계적 자극은 세포의 크기보다 더 작은 구멍을 갖는 하나 이상의 장치에 세포를 통과시키는 것을 포함하는 방법.
- [0175] 25. 문단 23에 있어서, 상기 기계적 자극은 점진적으로 더 작은 구멍을 갖는 다수의 장치에 세포를 통과시키는 것을 포함하는 방법.
- [0176] 26. 문단 1-25 중 어느 하나에 있어서, 상기 다능성 세포의 증식이 가능하도록 상기 다능성 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0177] 27. 문단 1-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 다능성 세포는 줄기 세포 마커를 발현하는 방법.
- [0178] 28. 문단 27에 있어서, 상기 줄기 세포 마커는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법:
[0179] Oct4; Nanog; E-cadherin, 및 SSEA4
- [0180] 29. 문단 1-28 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인 방법.
- [0181] 30. 문단 1-29 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인 방법.
- [0182] 31. 문단 1-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 성체 세포, 신생아 세포, 태아 세포, 양막 세포, 또는 제대혈 세포인 방법.
- [0183] 32. 문단 1-31 중 어느 하나에 있어서, 생체외에서 상기 다능성 세포를 유지하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0184] 33. 문단 1-32 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 후성유전적 상태는 배아 줄기 세포의 후성유전적 상태와 배아 줄기 세포의 후성유전적 상태와 보다 근사하도록 개조되는 방법.
- [0185] 34. 문단 33에 있어서, 상기 후성유전적 상태는 메틸화 패턴을 포함하는 방법.
- [0186] 35. 문단 1-34 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 세포로부터 약 40% 이상의 세포질을 제거하는 것을 포함하는 방법.
- [0187] 36. 문단 35에 있어서, 약 50% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.
- [0188] 37. 문단 36에 있어서, 약 60% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.
- [0189] 38. 문단 37에 있어서, 약 60-80%의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.
- [0190] 39. 문단 37에 있어서, 약 80% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.
- [0191] 40. 문단 39에 있어서, 약 90% 이상의 세포질이 세포로부터 제거되는 방법.
- [0192] 41. 문단 1-40 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 세포로부터 약 40% 이상의 미토콘드리아를 제거하는 것을 포함하는 방법.
- [0193] 42. 문단 41에 있어서, 세포질의 일부의 제거는 세포질로부터 약 50% 이상의 미토콘드리아를 제거하는 방법.
- [0194] 43. 문단 42에 있어서, 세포질 또는 미토콘드리아의 제거는 세포질로부터 약 50%-90%의 미토콘드리아를 제거하는 방법.

- [0195] 44. 문단 42에 있어서, 세포질 또는 미토콘드리아의 제거는 세포질로부터 90% 초과 미토콘드리아를 제거하는 방법.
- [0196] 45. 문단 1-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 스트레스는 스트레스에 노출된 세포들 중 약 10% 이상의 세포막을 파괴하기에 충분한 방법.
- [0197] 46. 문단 1 내지 45 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 제조된 다능성 세포를 후보 물질에 접촉시키는 단계를 포함하는 분석법.
- [0198] 47. 문단 46에 있어서, 상기 다능성 세포의 생존력, 분화도, 증식력 중 어느 하나 이상에 영향을 주는 물질을 확인하기 위해 사용되는 분석법.
- [0199] 48. 대상체에 대한 세포 치료의 방법에서의 문단 1 내지 45 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 제조된 다능성 세포의 용도.
- [0200] 49. 하기를 포함하는, 대상체에 투여되는 세포 치료에 적합한 세포 또는 조직의 제조 방법:
- [0201] 문단 1 내지 45 중 어느 하나에 따라 세포로부터 다능성 세포를 생성하는 단계;
- [0202] 상기 세포는 자가 세포 또는 HLA-매칭된 동종이형 세포임.
- [0203] 50. 문단 49에 있어서, 상기 대상체에 상기 세포 또는 조직을 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 상기 다능성 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0204] 51. 문단 1 내지 45 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 세포로부터 생성되는 다능성 세포를 포함하는 조성물.
- [0205] 52. 부신피질자극 호르몬 (ACTH), 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 다능성 줄기 세포의 제조 방법.
- [0206] 53. 문단 52에 있어서, 상기 세포는 ACTH를 포함하는 LIF 배지에서 배양되는 방법.
- [0207] 54. 문단 52 또는 53에 있어서, 상기 ACTH는 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M의 농도로 존재하는 방법.
- [0208] 55. 문단 52-54 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 문단 1-45 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포인 방법.
- [0209] 56. 문단 52-55 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 전능성 세포인 방법.
- [0210] 57. 문단 52-56 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 3 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.
- [0211] 58. 문단 52-57 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 5 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.
- [0212] 59. 문단 52-58 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 7 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.
- [0213] 60. 문단 52-59 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 단계 이후, 상기 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 검출 가능한 수준의 줄기 세포 마커를 발현하는 방법:
- [0214] Oct3/4; Nanog; Rex1; Klf4; Sox2; Klf2; Esrr-beta; Tbx3; 및 Klf5.
- [0215] 61. 부신피질자극 호르몬 (ACTH), 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 다능성 세포의 자기재생력을 증가시키는 방법.
- [0216] 62. 문단 61에 있어서, 상기 세포는 ACTH를 포함하는 LIF 배지에서 배양되는 방법.
- [0217] 63. 문단 61-62 중 어느 하나에 있어서, 상기 ACTH는 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M의 농도로 존재하는 방법.
- [0218] 64. 문단 61-63 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 문단 1-45 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포인 방법.
- [0219] 65. 문단 61-64 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 전능성 세포인 방법.
- [0220] 66. 문단 61-65 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 3 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양

되는 방법.

- [0221] 67. 문단 61-66 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 5 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.
- [0222] 68. 문단 61-68 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 7 일 이상 동안 ACTH, 2i 또는 3i 배지의 존재 하에 배양되는 방법.
- [0223] 69. 문단 61-68 중 어느 하나에 있어서, 배양 단계 이후, 상기 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 검출 가능한 수준의 줄기 세포 마커를 발현하는 방법:
- [0224] Oct3/4; Nanog; Rex1; Klf4; Sox2; Klf2; Esrr-beta; Tbx3; 및 Klf5.
- [0225] 70. 하기를 포함하는, 세포 치료를 필요로 하는 대상체에서의 자가 세포 치료의 방법
- [0226] a. 문단 1 내지 45 중 어느 하나에 따라 세포로부터 다능성 세포를 생성하는 단계, 상기 세포는 상기 대상체로부터 수득됨, 및
- [0227] b. 상기 대상체에 상기 다능성 세포 또는 그 분화된 자손을 포함하는 조성물을 투여하는 단계.
- [0228] 71. 문단 70에 있어서, 상기 대상체에 상기 조성물을 투여하기 전에 미리 정해진 세포 계통에 따라 상기 다능성 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0229] 72. FGF4의 존재 하에 문단 1-45 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 다능성 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 태반 세포로 분화될 수 있는 다능성 세포의 제조 방법.
- [0230] 73. 문단 72에 있어서, FGF4의 농도는 1 nM 내지 1 μ M인 방법.
- [0231] 74. 문단 72 또는 73에 있어서, 상기 다능성 세포는 배아 줄기 세포로 분화될 수 있는 방법.

실시예

실시예 1

- [0234] 모든 생물체는 원초적인 생존 본능을 가진다. 식물이 유의미한 외부 스트레스를 받은 경우, 이들은 세포의 탈분화를 야기하고 손상된 부분 또는 전체 생물체의 재생을 가능하게 하는 생존 메커니즘을 활성화시킨다. 이러한 메커니즘은 극한 환경 변화를 견디기 위해 더 하등 생물체에 필요로 되는 것이나, 포유동물에서는 아직 문서로 뒷받침되지 않았다.
- [0235] 본 발명자들은 식물 및 더 하등 생물체에서 보이는 것과 유사하게, 신체적 스트레스가 성숙한 포유동물 세포를 줄기 세포 상태로 복귀시킬 수 있다는 것을 가정하였다. 이러한 가설을 조사하기 위해, 7 개의 성체 체세포 조직으로부터 얻은 성숙한 세포를 연구하였다. 우선 어떤 신체적 스트레스가 성숙한 세포를 덜 성숙한 상태로 변경하는 데에 가장 효과적인지에 초점을 두고, Oct4-GFP 마우스로부터 얻은 CD45 양성 림프구를 연구하였다. 이들 마우스로부터의 세포는 줄기세포 특이적 Oct4 프로모터가 활성화될 때 줄기 세포 표현형으로의 복귀(reversion)의 관독(readout)을 제공한다. 성숙한, 완전하게 분화된 세포를 다수의 유의미한 외부 자극에 노출시켰다.
- [0236] 예를 들어, 강한 화학적 스트레스를 제공하기 위해 CD45 양성 림프구를 저 pH 용액에 노출시켰다. 노출 3 일 내에, GFP 발현 세포가 관찰되었고, 5 일 이내에, GFP 발현 세포로 이루어진 구형의 군체가 관찰되었다. 이러한 방법으로 생성된 세포는 본 실시예에서 스트레스 개조된 줄기 세포(Stress Altered Stem Cell) (SASC 또는 SAC)로 지칭된다. SAC는 또한 회춘(rejuvenated) 줄기 세포 (RSC) 또는 동물 칼루스 세포(animal callus cell) (ACC)로 지칭될 수 있다. SAC는 일반적으로 배아 줄기 세포와 연관된 몇몇 마커들을 발현하였다. SAC는 ES 세포와 동등한 분화 잠재력을 나타내었고, 키메라 마우스의 생성에 기여하였으며, 4N 배반포에 주입되는 경우 온전한 태아를 생성할 수 있었다. 이러한 방식으로 생성된 세포는 초기에 낮은 미토콘드리아 활성 및 손상 방어 메커니즘에 기초한 세포의 유도와 일반적으로 관련된 다른 조건들을 보여주었다. 이들은 이후 Oct4 및 Nanog 유전자 프로모터의 탈메틸화를 나타내었다. 스트레스 개조된 세포의 리프로그래밍은 간엽-상피 전이(mesenchymal-epithelial transition)를 통해 유도되는 것으로 나타났다. 상기 발견은 손상 (외부 자극)에 대응하는 식물 칼루스에 함유된 세포의 설명과 일치한다. 식물 칼루스는, 세포의, 클론체를 형성할 수 있는, 다능성 식물 줄기 세포로의 스트레스 유도 전환으로부터 형성된다. 유의미한 외부 자극에 대응하여 성숙한 완전히 분화된 체세포 포유동물 세포로부터 생성된, 이러한 구형 군체(spherical colony)는 본원에서 동물 칼루스

(Animal Callus)로 지칭되며, 이러한 군체 또는 칼루스에 함유된 스트레스 개조 세포는 "동물 칼루스 세포"(ACC) 또는 SAC로 지칭된다.

[0237] 이와 같이, 유의미한 물리적 및 화학적 스트레스는 정상인 성숙한 성체 세포가 배발생(embryogenesis)을 가능하게 하는 다능성 줄기 세포로 리프로그래밍되도록 야기하였다. 이론에 구속됨 없이, 리프로그래밍의 메카니즘은 손상에 대한 대응에서 일반적으로 나타나는 세포 생존 및 복구 과정의 유도를 포함하는 것으로 나타난다. 포유동물 세포는 유의미한 스트레스 외부 자극에 대응하여 리프로그래밍된 상태로 복귀되는, 식물의 것과 매우 유사한 생존 메카니즘을 가짐이 본원에 의해 입증된다.

[0238] 보고된 바에 따르면 다양한 유형의 세포가 특정 유전자의 유도 또는 강제 발현을 통해 다능성 줄기 세포 상태로 리프로그래밍되었다고 한다¹⁻⁵. 또한 화상, 화학적 손상, 외상 및 방사선과 같은 자극물에 대한 노출의 결과로서 세포에 대한 손상은 정상 세포를 암 세포가 되도록 개조할 수 있다고 여겨진다.

[0239] **서론**

[0240] 모든 생물체는 그들 자신을 환경에 대해 적응시켜 그들의 신체를 재생시킴으로써 스트레스 자극과 관련된 손상에 견디는 공통된 본능을 가지는 것으로 나타난다. 식물의 경우, 개체발생(ontogenesis)이 접합자뿐만 아니라 종말(terminally)분화된 세포 및 미성숙 화분에서도 관찰된다. 척추동물의 경우, 영원류(newts)는 이들의 팔을 포함하여 몇몇의 해부학적 구조 및 기관을 재생시킬 수 있다¹. 식물 및 영원류 모두에서 보이는 현저한 재생 능력은, 전에 완전하게 분화된 체세포의 세포 탈분화를 야기하는, 외부 자극에 의해 유도된다는 점이 특히 주목된다. 생명의 초기 형태로부터 수십억년이 지나고 상이한 생명체들이 독특한 방식으로 진화되는 동안, 이러한 생존 본능은 근대 생물체의 동일 조상으로부터 유전될 수 있다. 종말 분화된 포유동물 세포는 일반적으로 분화 과정을 반전시킬 수 없는 것으로 여겨짐에도, 포유동물은 급격한 환경 변화에 대응하여 죽음을 피하기 위한, 이전에 인정받지 못한 프로그램을 보유할 수 있다.

[0241] 식물 칼루스, 증식 세포 매스는 식물 호르몬²에 의해 배양시 자극될 수 있는, 상처(wounding)와 같은 외부 자극에 대응하여 형성되었다. 칼루스는, 칼루스 세포로 지칭되는 리프로그래밍된 체세포를 함유하고, 그것의 각각은 완전체를 복제에 의해 재생할 수 있다. 칼루스 세포는 식물에 내재되어 있지 않으나, 외부 자극에 대응하여 체세포로부터 생성된다. 최근의 연구는 포유동물 체세포가 유전자 유도와 같은 외인성 과정에 의해 리프로그래밍될 수 있음을 입증하였음에도 불구하고³⁻⁷, 식물과 유사한 방식으로, 외부 물리적 및 또는 화학적 자극에 대응한 포유동물 체세포의 리프로그래밍은 보고된 바가 없다. 흥미롭게도, 화상, 화학적 손상, 외상 및 방사선을 포함하는, 자극물체의 노출과 같은 극한 외부 자극은 정상 체세포를 암세포가 되도록 변경할 수 있다고 여겨진다. 이러한 시험은 외부 자극이 포유동물 세포 변화를 초래함을 나타내는 것으로 보인다.

[0242] 본 연구에서, 포유동물 세포는 식물과 동일한 방식으로, 유의미한 외부 스트레스에의 노출에 견디는 메카니즘을 보유하는 것으로 가정하였다. 이 보고는 유의미한 물리적 및 화학적 자극을 가함, 다양한 조직으로부터 구한, 성숙한 완전하게 분화된 포유동물 체세포의 리프로그래밍을 야기할 수 있고, 이러한 스트레스 개조된 세포는 클론체를 재생할 수 있는, "동물 칼루스 세포"를 함유하는 동물 칼루스를 형성할 수 있다는 증거를 제시한다.

[0243] **결과**

[0244] *유의미한 물리적 및 화학적 자극을 성숙한 체세포에 가하였다.* 배아 전사 인자 Oct4가 세포의 다능성 상태의 조절(regulation)에 중요한 것으로 여겨지기 때문에, 초기 전략은 어떤 외부 자극이 가장 성숙한 세포를 Oct4를 발현하도록 리프로그래밍시키는지를 확인하는 것이었다. CD45 양성 조혈모 계통 세포가 미분화된 세포로 오염되는 것을 피하기 위해 우선 연구되었다. Oct4-GFP (GOF) 마우스⁸로부터 얻은 지라로부터 채취한 CD45 양성 세포를 다양한 유의미한 물리적 및 화학적 자극에 노출시켰다. 상기 노출은 하기의 것을 포함한다: 삼투압 처리, 유의미한 기계적 분쇄에 의한 처리, 저 pH에의 노출, 스트렙톨리신 O (SLO)를 사용한 세포막 손상을 가하는 것, 저영양에의 노출 및 저산소증 및 고 Ca 농도에의 노출. 다음으로, GFP 발현 세포를 확인하고, 분류하고, FACS를 사용하여 수집하였다. Oct4의 유전자 발현은 R-T PCR에 의해 확인되었다. 가해진 자극 각각에의 노출은 성숙한 세포가 어느 정도로 GFP를 발현하도록 리프로그래밍되는 것을 초래하였다 (도 5A). 성숙한 세포의 저 pH의 화학적 스트레스 및 유의미한 기계적 분쇄의 물리적 스트레스에 대한 노출은 성숙한 세포가 Oct4를 발현하도록 개조하는데 가장 효과적인 처리임을 나타내었다. Oct4 발현 세포로의 전환을 유도하기 위한 최적 pH를 결정하기 위해, CD45 양성 세포를 pH 4.0 내지 pH 6.8로 산도가 변화하는 용액에 노출시켰다. 산성 용액에의 노출

후 3일째에, 세포의 GFP 발현을 FACS를 사용하여 분석하였다. pH 5.4-5.6의 산성 용액이 세포를 GFP를 발현하도록 가장 유효하게 개조하였다 (도 5B). 그 결과, 나머지 연구를 위한 스트레스 처리의 선택은 저 pH에의 노출에 초점을 두었다.

[0245] 스트레스 개조 Oct4 발현 세포를 유지하기 위한 최적 배양 조건을 이후 결정하였다. ES 수립 배지, 3i⁹ 및 ACTH¹⁰, ES 배양 조건, ES-LIF¹¹, 배아 신경 줄기 세포 배양 조건, B27-LIF¹², 및 EpiSC 배양 조건¹³을 포함하는 몇몇의 이전에 기술된 배지가 연구되었다.

[0246] 세포를 각각의 배지에 플레이팅하고, GFP 발현 군체를 계수하였다 (도 5C). 배지 B27-LIF는 GFP 발현 군체를 생성하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 B27-LIF 배지를 처리된 세포의 배양을 위해 이용하였다.

[0247] 스트레스 처리된 CD45 양성 세포를 B27-LIF 배지에서 배양하고, 5일 내에, GFP 발현 군체를 관찰하였으나, 비처리된 대조군에서는 어떠한 GFP 발현 군체도 발견되지 않았다 (도 1A). 군형 군체는 처음 7 일간 직경에 있어서 대략 70 μ m로 성장하였고, 군형 군체는 이 배양 조건에서 추가 7 일간 유지될 수 있었다. 군체의 형태는 약간 찌그러졌고(baroque), 구형군체보다 식물학에서 보이는 칼루스에 대한 형태와 보다 유사하게 나타났다. 스트레스 처리에 의해 생성된 세포 군체를 이에 따라 동물 칼루스 (AC)라고 지칭하였다. 배양된 세포를 분리하였고 개체군 분석을 이후 FACS를 사용하여 수행하였다. 상기 분석은 특정의 유의미한 자극을 가하는 것이, CD45 양성 세포 개체군에서, 이전에 존재하지 않았던, 이제 동물 칼루스 세포 (ACC)로 지칭되는 스트레스 개조된 세포의 생성을 초래하는 것을 나타내었다 (도 1B). 스트레스 처리 결과로서 CD45 양성 세포의 표현형 변화가 단일 세포 수준에서 관찰되었다. CD45 양성 세포는 GFP를 발현하지 않은 반면, ACC는 CD45의 감소된 발현과 연관되는 GFP를 발현하였다 (데이터를 나타내지 않음). 단일 세포의 조사는 처리된 세포의 세포 크기가 비처리된 세포보다 작음을 나타내었다. 따라서, ACC 개체군의 세포 크기를 FACS로 분석하였다. ACC의 세포 크기는 상당히 작았고, 세포의 80%는 직경에 있어서 8 μ m 보다 작았다 (도 1C).

[0248] CD45 감소 및 Oct4 발현과 관련된 경시적 표현형 변화를 조사하기 위해, 스트레스 처리된 CD45 양성 세포를 1 일, 3 일 및 7 일째에서 분석하였다. 1 일째, 대부분의 세포가 여전히 Oct4가 아니라 CD45를 발현하였다. 3 일째, 마커 발현은 CD45 음성 세포 또는 CD45 음성/Oct4양성 (dim) 세포를 나타내는 것으로 변화하였다. 7 일째, CD45 발현은 사라졌고, Oct4 발현 세포가 관찰되었다 (도 1D). 특히, 배양 첫 7 일간, PI 양성 세포 (사멸 세포)의 수는 점차적으로 증가하였고 (데이터를 나타내지 않음), 이는 스트레스 처리 및 배양 조건이 세포의 특성을 점차적으로 변화시켰으며 Oct4를 발현한 성공적으로 개조된 세포에 대해 선택된 것을 시사한다.

[0249] ACC의 특징 규명. 외부 자극에의 노출의 결과로서 체세포의 리프로그래밍을 확인하기 위해, ACC의 초기 배발생 마커 유전자 발현을 조사하였다. 초기 배발생의 양성 대조군으로서, ES 세포를 이후 실험에서 이용하였다. 마커 발현 및 DNA 메틸화는 하기와 같이 특징지어졌다: 7 일째에서의 면역형광 염색은 ACC를 함유하는 군형 군체가 다능성 세포 마커, E-cadherin 항원, Nanog, SSEA-1, PCAM-1, 및 AP를 균일하게 발현하고, Oct4-GFP에 대해 양성인 것을 나타내었다 (데이터를 나타내지 않음). 유전자 발현 분석은 1차 CD45 양성 세포가 아니라 ACC 및 ES 세포가 비교가능한 수준의 Oct4, Nanog, Sox2, Ecat1, Esg1, Dax1, Fgf5, Klf4 및 Rex1 유전자를 발현한 것을 나타내었다 (도 2A). ACC에서의 ES 특이적 유전자의 유전자 발현은 7 일째 피크에 도달하였다 (도 2A). 바이설파이트 시퀀싱(Bisulfite sequencing)을 ACC에서의 Oct4 및 Nanog 유전자 프로모터의 메틸화 상태를 결정하기 위해 수행하였다. 네이티브 림프구(Native lymphocyte) 및 배양된 림프구 대조군 샘플은 두 프로모터에서 폭넓은 메틸화를 나타내었고, 반면 ACC는 ES 세포에서 보이는 것과 유사하게 이러한 구간의 넓은 탈메틸화를 나타내었다 (도 2B). 따라서, 포유동물 체세포가 외부 스트레스에 의해 리프로그래밍된다는 것이 입증되었다.

[0250] 상기 Oct4 유전자 발현이 GOF 마우스에서 뿐만 아니라 야생형 마우스에서의 성숙한 세포의 스트레스 처리에 기인하였다는 것을 확인하기 위하여, CD45 양성 림프구를 ICR 마우스로부터 얻은 지라로부터 채취하였다. 림프구를 이후 스트레스 처리에 노출시켰고 FACS를 사용하여 7 일째까지 시간에 따라 분석하였다. SSEA-1 양성/E-cadherin 양성 세포 개체군은 스트레스 처리된 군집에서 나타났고, 한편 SSEA-1 /E-cadherin 발현은 비-스트레스 처리된 대조군에서 관찰되지 않았다 (도 6A). 이 이중 양성 세포는 Oct4 유전자 발현을 발현시켰고, 이는 R-T PCR에 의해 확인되었다 (도 6B). 이러한 결과는 스트레스 처리의 결과로서, ACC, Oct4 양성 및 다능성 마커 발현 세포가 마우스 종에 관계없이 CD45 양성 세포로부터 생성되었음을 입증한다.

[0251] 이러한 결과는 성숙한 완전하게 분화된 성체 체세포가 스트레스 처리의 결과로서 "줄기세포성(stemness)"으로 전환되는 것을 의미한다.

- [0252] ACC의 줄기세포성을 평가하기 위해, 그것의 자기재생력 및 그것의 분화력을 조사하였다. 그것의 자기재생력을 연구하기 위해, 이전에 성숙한 CD45 양성 림프구로부터 유래된 ACC 군체를 단일 세포로 분리하고, 복제에 의해 유래된 개체군을 생성하기 위해 96 웰에 웰당 1세포로 플레이팅했다. 플레이팅 후 10 일째에, 구형 군체가 96 웰 중 4 개에서 나타났다. ACC의 분할 시간(dividing time)은 웰 간에 상이하였다. 일부는 12-16h에서 분할되었고 나머지는 30-34h에서 분할되었다. ACC를 5 회 이상 패시지시켰고, Cct4의 계속 발현이 관찰되었다. 결과적으로, ACC는 자기재생에 대한 잠재력, 및 생체외에서 모든 세 개의 배엽으로부터의 세포로 분화되는 잠재력을 입증하였다.
- [0253] 성숙한 GOF 림프구로부터 유래된 AC를 다시 단일 세포로 분리하였고, GFP가 발현된 세포의 개체군만을 함유하도록 분류하고, 이후 분화 배지에서 배양하였다. 플레이팅 후 14-21 일째에서, 세포는 외배엽 마커, β III-튜불린 및 GFAP, 중배엽 마커, α -평활근 액틴, 및 내배엽 마커, α -태아단백질 및 시토허라틴 7을 발현하였다 (데이터를 나타내지 않음). 이와 같이, ACC는 생체외에서 세 개의 배엽을 나타내는 세포로 분화되었다.
- [0254] 다양한 성체 조직으로부터 얻은 성숙한 체세포의 스트레스 개조. ACC가 성숙한 림프구뿐만 아니라 다른 유형의 체세포를 생성할 수 있는지를 조사하기 위해, 뇌, 피부, 근육, 지방, 골수, 폐 및 간을 Oct4-GFP (GOF) 마우스⁸로부터 채취하였다. 세포를 조직 샘플로부터 분리하고, 단일 세포로 분리하고, 상이한 물리적 및/또는 화학적 스트레스 조건으로 처리하였다. 세포를 개조하는 공정의 효능은 세포의 공급원 및 세포가 노출되었던 스트레스 조건(들) 모두의 함수에 따라 상이하였다 (도 7A). 성숙한 세포가 Oct4를 발현하도록 개조하는 스트레스의 능력은 세포의 유래(derivation of cell)에 따라 상이하였지만, 스트레스는 세포가 모든 세 개의 배엽으로부터 유래된 성숙한 세포에서 어느 정도로 Oct4를 발현하도록 개조할 수 있었다 (도 7A). 임의의 성숙한 조직으로부터 유래된 ACC 군체는 다능성 마커, E-cadherin, Nanog, PCAM-1 및 AP (데이터를 나타내지 않음), 및 ES 특이적 마커 유전자를 발현하였다 (도 7B). 조직의 공급원 및 배엽의 유래에도 불구하고, 유의미한 물리적 및 화학적 스트레스는 성숙한 체세포를 줄기 세포 상태로 되돌아가도록 개조하였다.
- [0255] ACC 생성의 초기 단계에서의 세포 변형. 이러한 결과는 강한 물리적 및 화학적 자극이 체세포의 리프로그래밍을 초래한다는 것을 입증한다. 스트레스 처리된 림프구는 5 일 이내에 AC를 형성하는 것으로 관찰되었다. 분자 이벤트(molecular event)의 급격한 변화가 스트레스 노출의 결과로서 발생된다는 것을 가정하였다. 따라서 연구는 자극에의 노출 후 첫 7 일간인 리프로그래밍의 초기 단계에 초점을 두었다.
- [0256] ACC는 유의미한 스트레스 노출 이후 생존하였기 때문에, 세포 손상을 복구하도록 통상 가동되는 생존 메커니즘이 ACC 생성 과정에서 유도된 것으로 추측하였다. 우선 스트레스에 대한 세포 반응과 DNA 복구에 관련된 다수의 후보 유전자의 발현¹⁴을 1 일, 3 일 및 7 일째 네이티브 CD45 양성 세포 및 스트레스-처리된 CD45 양성 세포에서 비교하였다. 세포 반응 유전자 발현은 1 일째 이미 관찰되었고, 이러한 유전자는 ACC 생성 세포 및 다른 세포의 혼합물이 분석되었을 때 7 일에 걸쳐 상향-조절되었다(up-regulated) (도 8). 세포 반응 유전자의 상향-조절은 ACC 생성과 상관되기 때문에, 3 일 및 7 일째에서 ACC를 분류하였고, 유전자 발현을 분석하였다. Hif3a를 제외하고, 모든 후보 유전자가 ACC 생성 과정에서 다양한 정도로 상향-조절되었다 (도 3A). 4 개의 열충격 유전자(heat shock genes) 및 하나의 DNA 복구 유전자가 ACC 생성 과정에서 상향-조절되는 것으로 발견되었다. 또한, 7 개의 상향-조절 유전자가 세포 산화환원 상태(cellular redox state)의 조절에 직접 관련되는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 자기-복구 또는 자기-방어 능력이 ACC 생성 과정에서 유도되었음을 시사한다.
- [0257] ACC가 세포 산화환원 관련 유전자의 상향-조절을 나타내기 때문에, ACC의 미토콘드리아의 기능을 이후 조사하였다. 미토콘드리아는 진핵 세포에서 산소를 사용하여 산화환원 반응을 통한 대다수의 ATP의 생성을 책임지는 세포 기관이다. ACC 구형 군체의 GFP 발현은, 군체가 패시지 없이 배양된 경우, 7 일 이후 주변에 위치한 세포로부터 점차적으로 감소되었다. ACC는 10 일째에 GFP 발현 중심 세포 및 비-GFP 분화 주변 세포를 함유하였다 (데이터를 나타내지 않음). 미토콘드리아 모폴로지를 미토콘드리아-특이적 염료, MitoTracker Red로 염색시켜 ACC 및 분화된 세포에서 평가하였다. ACC 미토콘드리아는 반점이 있고 구형인 핵-주위 클러스터로서 관찰되었고, 한편 분화된 세포는 필라멘트 형태이고 세포질에 넓게 퍼진 다수의 미토콘드리아를 함유하고 있었다. ACC의 ATP 생성은 네이티브 CD45 양성 세포에서의 것보다 더 적었다 (도 3B). 또한, ACC의 반응성 산소종 (ROS) 생성은 네이티브 CD45 양성 세포에서의 것보다 더 적었다 (도 3C). 마지막으로 mtDNA 복제와 관련된 핵심 인자를 평가하였고; 이는 미토콘드리아성 전사 인자 A (Tfam), 미토콘드리아-특이적 DNA 폴리머라아제 감마 (Polg) 및 그것의 부속 유닛 (Polg2)이었다. ACC에서의 Tfam, Polg, 및 Polg2의 유전자 발현은 분화된 세포에서의 것보다 더 낮았다 (도 3D). 결과적으로, ACC는 소수의 미토콘드리아를 함유하고, ACC의 미토콘드리아 활성화는 분

화된 세포의 것보다 낮았다. 이러한 결과는 ACC가 심한 스트레스 반응 후 생존하기 위해 분화된 세포와 구별되는 대사 시스템을 얻은 것을 의미한다.

[0258] **ACC의 발달 잠재력.** 마지막으로, ACC가 식물 칼루스 세포의 것과 유사한 발달 잠재력(developmental potential)을 가지는지를 평가하였다. 발달 잠재력에 대한 초기 시험으로서, 면역결핍(SCID) 마우스에 피하로 이식된 ACC를 연구하였다. 이식 후 6 주째에, ACC가 모든 세 개의 배엽을 나타내는 조직을 생성하였다(데이터를 나타내지 않음).

[0259] ACC는 생체내 및 생체외 모든 세 개의 배엽을 나타내는 세포로 분화되었다. 따라서, ACC의 키메라 기여 잠재력(chimera contribution potency)을 평가하였다. 키메라 생성 연구에 사용하기 위한 ACC를 F1 GFP (C57BL/6GFP × DBA/2 또는 129/SvGFP × C57BL/6GFP) 또는 GOF로부터 유래된 CD45 양성 세포를 사용하여 제조하였다. 유전자 발현 분석은 7 일째, ACC가 최고 수준의 다능성 마커 유전자를 발현한 것을 나타내었기 때문에, 7 일째 ACC를 키메라 마우스 생성 연구에 이용하였다. 초기에, 키메라 생성에 대한 종래의 방법을 이용하였다. AC를 트립신 처리를 통해 단일 세포로 분리하였다. ACC를 이후 배반포에 주입하였다(도 4A). 이러한 방법을 사용하여, 분리된 ACC의 키메라 기여도는 상당히 낮았다(표 1). 이와 같이, 세포 손상¹⁵을 종종 야기하는, 선행된 트립신 처리가 없는 ACC를 배반포에 주입하였다. 현미경 하에서 마이크로나이프를 사용하여 AC를 작은 클러스터로 절단하였다. AC의 작은 클러스터를 이후 배반포에 주입하였다(도 4A). 이러한 방법을 사용하여, ACC의 키메라 기여도는 급격하게 증가하였다(데이터를 나타내지 않음). ACC로 생성된 키메라 마우스는 건강하게 성장하였고(데이터를 나타내지 않음) 생식선 전이가 관찰되었다. 각각의 조직의 키메라 기여율을 FACS에 의해 분석하였다. 상기 결과는 림프구로부터 유래된 ACC는 모든 조직에 기여하는 것을 나타내었다(도 4B).

[0260] 상기에서 입증된 바와 같이, ACC는 모든 세 개의 배엽으로부터 유래된 다양한 세포로부터 생성될 수 있다(도 7A-7B). 다양한 조직으로부터 유래된 ACC가 상이한 분화 경향을 가지는지를 조사하기 위해, ACC를 F1GFP 마우스로부터 유래된 다양한 조직으로부터 생성하였고, ICR 배반포에 주입하였다. 이후, FACS를 사용하여, 생성된 키메라 마우스에서의 각각의 조직의 기여율을 분석하였다. 임의의 조직으로부터 유래된 ACC는 키메라 마우스 생성에 기여하는 것을 발견하였다(도 9). 또한, 피부, 뇌, 근육, 지방, 간 및 폐에 대한 기여율을 다양한 조직으로부터 유래된 ACC를 사용하여 생성된 키메라 마우스에서 분석하였다. 임의의 조직으로부터 유래된 ACC는 모든 세 개의 배엽을 대표하는 조직을 생성하는데 기여하였고, 어떠한 분화 경향도 관찰되지 않았다(도 9).

[0261] 4N 호스트 배반포에 다능성 세포의 주입과 관련된, 4배체 상보성(tetraploid complementation)에 의한 마우스의 생성은 발달 잠재력에 대한 가장 철저한 시험을 나타내는데, 이는 생성된 배아가 단지 주입된 도너 세포로부터만 유래되기 때문이다¹⁶. ACC를 DBA × B6GFP F1 마우스 또는 129/SvGFP × B6GFP F1으로부터 유래된 림프구로부터 생성하였다. ACC는 4N 배반포에 주입 후(중간) 말기-재태(mid) late-gastration) '모든 ACC 배아(all ACC embryos)'의 생성을 초래하였다. 유전자형 분석은 '모든 ACC 배아'가 ACC를 생성하는데 이용되는 종(strain)의 특이적 유전자를 가진 것을 입증하였다. 따라서, ACC는 식물 칼루스 세포처럼 클론체를 생성하는 잠재력을 가졌다.

[0262] **논의**

[0263] 포유동물 체세포는 식물과 매우 유사한 경향으로, 유의미한 외부 자극에의 노출의 결과로서 동물 칼루스(AC) 형성에 대한 능력을 나타낸다. 이들 칼루스(동물 칼루스 세포, ACC)에 함유된 세포는 키메라 마우스를 생성하고 ACC로부터 생성된 세포만으로 이루어진 신생 배아를 생성하는 능력을 가진다. 상기 기술된 결과는 포유동물 체세포가 외부 자극에 의해 세 개의 배엽 중 임의의 것으로 분화되는 능력을 회복하는 것을 입증한다. 이는 체세포가 이전에 믿어지고 있던 것보다 더 큰 가소성(plasticity)을 가지는 것을 의미한다. 또한, 본 연구는 유전자 유도 또는 외래 단백질의 도입 없이 리프로그래밍되는 체세포의 잠재력을 증명하고, 성체 줄기 세포의 잠재력에 대한 새로운 이해를 제공하며; 이는 줄기 세포 생물학의 해석에서의 중요한 사건을 나타낸다.

[0264] **물질 및 방법**

[0265] **조직 채취 및 세포 배양.** 성숙한 림프구 분리를 위해, GOF 마우스 또는 ICR 마우스로부터 유래된 지라를 가위로 잘게 자르고 파스퇴르 피펫으로 기계적으로 분리하였다. 분리된 지라를 세포 스트레이너(BD Biosciences, San Jose)를 통해 물기를 걸렀다(strained). 수집된 세포를 DMEM 배지에 재-현탁시키고 동일 부피의 림포라이트(CEDARLANE®, Ontario, Canada)를 첨가하고, 이후 15 분간 1000g에서 원심분리하였다. 림프구 층을 수거하고 CD45 항체(ab25603, abcam, Cambridge, MA)를 얻었다. CD45 양성 세포를 FACS Aria(BD Biosciences)로 분류하였다. 이후, CD45 양성 세포를 스트레스 처리(15 분간 pH5.5 용액)로 처리하고 1000U LIF(Sigma) 및

10 ng/ml FGF 2 (Sigma)가 보충된 B27 배지에 플레이트했다.

- [0266] **외부 자극 - 스트레스 처리에의 노출.** 성숙한 세포에 기계적 스트레스를 주기 위해, 파스퇴르 피펫을 가열하고 이후 직경에 있어 대략 50 마이크론의 루멘을 생성하기 위해 잡아당긴 후 부러뜨렸다. 이후 성숙한 체세포를 이 피펫을 통해 20 분간 분쇄하였고, 7 일간 배양하였다. 성숙한 세포에 저산소 자극을 제공하기 위해, 세포를 5% 산소 인큐베이터에서 3 주 동안 배양하였다. 3 주 동안 기초 배지에서 세포를 배양시킴으로써 저영양 자극을 성숙한 세포에 제공하였다. 성숙한 세포를 생리적 스트레스에 노출시키기 위해, 이들을 저 pH (pH5.5) 용액으로 처리하고, 7 일간 배양하였다. 또한, 세포에 보다 심한 손상을 주었다. 성숙한 세포막에 구멍을 형성하기 위해, 세포를 SLO (Streptolysin O)로 처리하였다.
- [0267] SLO-처리 세포는, 37 °C에서 50 분간 10 µg/mL SLO를 함유하는 HBSS에서 배양시킨 후 7 일간 SLO 없는 배지에서 배양하였다. 저-영양 스트레스에 노출된 세포는, 기본 배지에서 2 내지 3 주 동안 배양하였다. "ATP" 스트레스에 노출된 세포는, 37 °C에서 15 분간 2.4 mM ATP를 함유하는 HBSS에서 배양시킨 후 7 일간 배지에서 배양하였다. "Ca" 스트레스에 노출된 세포는, 2 주 동안 2 mM CaCl₂를 함유한 배지에서 배양하였다.
- [0268] **바이설퍼이트 시퀀스 (Bisulfite sequence).** GOF 마우스로부터 얻은 세포를 단일 세포로 분리하였다. GFP 양성 세포를 FACS Aria를 사용하여 수집하였다. 게놈 DNA를 ACC로부터 추출하여 연구하였다. DNA의 바이설퍼이트 처리를 제조사의 지시에 따라 CpGenome DNA Modification 키트 (Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>)를 사용하여 수행하였다. 생성된 변형 DNA를 2 개의 정방향 (F) 프라이머 및 1 개의 역방향 (R) 프라이머를 사용하여 네스티드 증합효소 연쇄 반응 PCR에 의해 증폭시켰다: Oct4 (F1, GTTGTTTGTGTTTGGTTTGGATAT (서열번호1 ; F2, ATGGGTTGAAATATGGGTTTATTTA (서열번호2); R, CCACCTCTAACCTTAACCTCTAAC (서열번호3)). 및 Nanog (F1, GAGGATGTTTTTAAGTTTTTTTT (서열번호4); F2, AATGTTTATGGTGGATTTTGTAGGT (서열번호5); R, CCCACCTCATATCAATATAATAAC (서열번호6)). PCR을 TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (RR030A)을 사용하여 수행하였다. DNA 시퀀싱을 GRAS (The Genome Resource and Analysis Unit)로 보조하여 M13 프라이머를 사용하여 수행하였다.
- [0274] **면역조직화학.** 배양된 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 1% BSA 용액 (Life Technology, Tokyo, Japan)으로 차단하기 이전에 0.1% Triton X-100/PBS로 투과화(permeabilized)했다. 2차 항체는 Alexa-488 또는 -594 (Invitrogen)가 결합된 염소 항-마우스(goat anti-mouse) 또는 -토끼였다. 세포핵을 DAPI (Sigma)로 가시화했다. 슬라이드에 SlowFade Gold antifade 시약 (Invitrogen)을 배치했다.
- [0275] **형광-활성화 세포 분류 및 유세포 분류.** 세포를 표준 프로토콜에 따라 제조하고 FACS에 앞서 얼음 상에서 0.1% BSA/PBS에 현탁시켰다. PI (BD Biosciences)를 사용하여 사멸된 세포를 배제시켰다. 세포를 BD FACS Aria SORP 상에서 분류하고 BD FACSDiva Software에 의해 BD LSRII(BD Biosciences)로 분석하였다.
- [0276] **RNA 제조 및 RT-PCR 분석.** RNA를 RNeasy Micro 키트 (QIAGEN)로 분리하였다. 역전사를 SupesACript III First Strand Synthesis 키트 (Invitrogen)로 수행하였다. 증폭을 위해 SYBR Green Mix I (Roche Diagnostics)를 사용하고, 샘플을 Lightcycler-II Instrument (Roche Diagnostics) 상에서 실시하였다.
- [0277] **동물 연구.** 종양 유전자 연구를 위해, 100 ml PBS에 현탁시킨 세포를 연령-일치시킨 면역결핍 SCID 마우스의 측부에 피하 주입하였다. 6주 후 마우스를 도살하고 해부하였다.
- [0278] **ATP 및 ROS 분석.** 세포간 ATP 수준을 공급자의 프로토콜에 따라 ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche)에 의해 측정하였다. 발광 강도를 Gelomax 96 Microplate Luminometer (Promega, Madison, WI)를 사용하여 측정하고 발광 관독(luminescence reading)을 세포 계수에 의해 표준화했다(nomalized). ROS 수준의 측정을 위해, 세포를 37 °C에서 15 분간 암실에서 2 µM 디히드로에티뮴 (Molecular Probes)를 함유한 배지에서 배양하였다. 세포를 이후 PBS로 세정하고 0.5% BSA를 함유한 PBS에 현탁시켰다. 30000 세포의 형광 강도를 BD Biosciences LSR II (BD Bioscience, Spark, MD)로 보조하여 기록하였다.
- [0279] **키메라 마우스 생성 및 분석.** 이배체 및 사배체 키메라의 제조. 이배체 배아를 ICR 수컷과 교배시킨 ICR종 암컷으로부터 얻었고 사배체 배아를 BDF1 수컷과 교배시킨 BDF1종 암컷으로부터 얻었다. 사배체 배아를 2-세포

배아¹⁷의 전기융합에 의해 제조하였다. 본 연구에서는, 트립신 처리가 낮은 키메라성(chimerism)을 야기하기 때문에, ACC 구형 군체를 현미경 하에 마이크로나이프를 사용하여 작은 조각으로 잘랐고, 이후 ACC의 작은 클러스터를 큰 피펫에 의해 4.5 일 배반포에 주입하였다. 다음 날, 키메라 배반포를 2.5 일 가임신 암컷 내로 트랜스퍼했다.

[0280] 참조

- [0281] 1. Brockes, J. P. & Kumar, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 566-574, doi:10.1038/nrm881 (2002).
- [0282] 2. Sinnott, J. J. & Burklund, C. W. The treatment of carotid insufficiency. *The Nebraska state medical journal* 45, 357-359 (1960).
- [0283] 3. Hanna, J. et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264, doi:10.1016/j.cell.2008.03.028 (2008).
- [0284] 4. Hockemeyer, D. et al. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell* 3, 346-353, doi:10.1016/j.stem.2008.08.014 (2008).
- [0285] 5. Kim, D. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4, 472-476, doi:10.1016/j.stem.2009.05.005 (2009).
- [0286] 6. Kim, J. B. et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643, doi:10.1038/nature08436 (2009).
- [0287] 7. Okabe, M. et al. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114, 1764-1767, doi:10.1182/blood-2009-02-203695 (2009).
- [0288] 8. Ohbo, K. et al. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Developmental biology* 258, 209-225 (2003).
- [0289] 9. Ying, Q. L. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).
- [0290] 10. Ogawa, K., Matsui, H., Ohtsuka, S. & Niwa, H. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9, 471-477, doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x (2004).
- [0291] 11. Gough, N. M. et al. LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reproduction, fertility, and development* 1, 281-288 (1989).
- [0292] 12. Hitoshi, S. et al. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes & development* 18, 1806-1811, doi:10.1101/gad.1208404 (2004).
- [0293] 13. Tesar, P. J. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199, doi:10.1038/nature05972 (2007).
- [0294] 14. Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M. & von Zglinicki, T. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells* 22, 962-971, doi:10.1634/stemcells.22-6-962 (2004).
- [0295] 15. Mitalipova, M. M. et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 23, 19-20, doi:10.1038/nbt0105-19 (2005).
- [0296] 16. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8424-8428 (1993).
- [0297] 17. Nagy, A. et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110, 815-821 (1990).

[0298]

표 1: ACC로부터의 키메라 마우스의 생성

마우스 종	주입을 위한 세포제조	SAC의 배양 기간	주입된 수정된 배아의 수	새끼수	얻은 키메라 마우스의 수	
					총합	높은 기여도**
BDF1	단일	7 일	40	32	1	0
BDF1	클러스터	7 일	58	48*	16	4
129B6F1	클러스터	7 일	98	64	20	6
GOF	클러스터	7 일	73	35	24	2
GOF	클러스터	10 일	35	20	4	0

[0299]

[0300]

* 모든 태아를 13.5 dpc 내지 15.5 dpc에서 수집하였고 각각의 기관(organ)으로의 ACC의 기여율을 FACS에 의해 조사함

[0301]

** 각각의 키메라로의 SAC의 기여도는 높게 기록되었음 (GFP 발현의 모색(coat color)의 >50%)

[0302]

표 2: 프라이머 시퀀스. 중간열은 상부에서 하부까지, 서열 번호7-39를 포함하고, 오른쪽 열은 상부에서 하부까지, 서열 번호40-72를 포함함.

유전자	5' 프라이머	3' 프라이머
Txni	gtcatccttgatcgccct	gagacgacctgctacacctg
Bmi1	ggtaactacgatgccagca	tccctacctgactgcttacg
Prdx2	ccctgaatatccctctgct	tatgtctgctcgtaacctt
Hspb1	agatggctacatctctcggt	tcagacctcggttcatttc
Hif3a	cactctggactggagatgc	ctggaccttcgaaggacga
Hspa1b	ctgtcgttgatgggga	tcaaagcgcagaccacctcg
Hspa9a	gttgagcagttaatatggc	gcattgctccgcagtaact
Ercc4	agatgagaccaacctggacc	tcgacttcgtctgttcggt
Hpas1a	aggtagagatcatcgccaac	tctacctgttcgcgcttag
Gapdh	cgtgaattgcccgtgagtg	tggtagaggtcggtggaac
Gpx2	attgccaaagtcgtctacga	gttagacagaaacggatgga
Sod2	aggctgctacagattgctg	gtgtcgatcgttcctact
Tgr	gtctcttagaaaagtgtga	attgcagctgcaaatccctg
Gsta	tacagctttctcctggcca	tacgattcacggaccgtgcc
Pdha2	atgtcagcctgttgaaatt	aacgataactgatccctggg
Gpx3	gtctgacagaccaataccat	cagttctacctgtaggacag
Gpx4	aacggctgcgtggtgaagcg	cctccttcagggtctcggga
Polg	ggacctcccttagagaggga	agcatgccagccagagtcact
Pol2	acagtgccttcaggttagtc	actccaatctgagcaagacc
Tfam	gcatacaagaagctgtgag	gttatatgtgaacgaggtc
Oct4	tcttccaccaggcccccggct	tgcgggcggacatgggagatcc
Ecat1	tgtggggccctgaaaggcgagctgagat	atgggcccacatagcagcgcctcaact
Esg1	gaagtctggttcctggcaggatg	actcgatactggccttagc
Nanoq	caggtgttgaggtagctc	cggttcatcatggtacagtc
ERas	actgccctcatcagactgtact	cactgcctgtactcgggtagctg
Gdf3	gttccaacctgtgcctcgcgtctt	agcaggcatggagagagcggagcag
Fgf4	cgtggtgagcatcttcggagtgg	ccttctggtccgcccgttcta
Rex1	acgagtgccagtttctctggga	tatgactcacttcagggggcact
Cripto	atggagcgaactgtgaacatgatgtcgca	cttgaggtcctggtccatcacgtgacct
Dax1	tgtctggctcaggccatcaagag	gggcactgttcagtcagcggatc
Sox2	tagagctagactcgggcatga	ttgccttaacaagaccacgaaa
Klf4	gcgaactcacacaggcgagaaacc	tcgcttctcttctccgacaca
Fgf5	gctgtgtcaggggattgt	cactctcgccctgtcttctc

[0303]

[0304] 표 3 - 스트레스 처리 1 주 후 다능성 표현형을 나타내는 세포의 백분율.

[0305] 처리는 제 1 열에 나타내었고 체세포의 유래의 조직은 제 2 열에 나타내었다. 수는 백분율이다.

	1 주-생					
	골수	뇌	폐	근육	지방	섬유아세포
대조군	0	0	0	0	0	0
저산소	2	3	3.2	2.8	1.6	1.2
분쇄	19.5	20.5	19.8	20.6	18.4	9.5
SLO	13.2	10.3	18.4	20.5	32.8	15.2
저영양	2	3.4	1.8	4.5	2.4	1.5
ATP	12.3	15.4	9.8	68.4	79.6	25.10
Ca	1.2	0.8	1.3	1.5	2.7	3.5

[0306]

[0307]

실시예 2: 다능성으로의 체세포의 자극-야기 운명 전환

[0308]

핵 초기화(nuclear initialization), '자극-야기 획득 다능성'(STAP)에 대한 현상이 본원에 기술되어 있고, 여기서는 강한 외부 자극이 핵 트랜스퍼 및 전사 인자의 도입 없이 포유동물 체세포를 다능성 세포로 충분하게 리프로그래밍한다. LIF의 존재 하에, 일시적인 저-pH 스트레스는 CD45⁺ 조혈모 세포를 Oct3/4와 같은 다능성 세포 마커를 발현하고 세 개의 배엽 분화의 기능을 갖는 세포로의 탈분화를 야기한다. 이러한 STAP 세포에서는, ES 세포와 같이 실질적 탈메틸화는 *oct3/4* 및 *nanog* 프로모터 영역에서 나타난다. 조혈모 세포-유래 STAP 세포는 T 세포 수용체에서의 유전자 재배열을 수반하고, 이는 수입된 체세포(committed somatic cell)가 계통 전환에 의해 STAP 세포를 발생시키는 것을 나타낸다. 배반포 주입은 STAP 세포가 심지어 사배체 상보성 분석에서도 키메라에 그리고 생식선 전이를 통해 새끼에게도 효과적으로 기여한다는 것을 나타낸다. 따라서, 운명 결정의 후성유전적 상태는 강한 환경적 신호에 의해 맥락-의존적 방식(context-dependent manner)으로 급진적으로 초기화될 수 있다.

[0309]

와딩턴의 후성유전적 랜드스케이프(Waddington's epigenetic landscape)의 캐널리제이션 관점(canalization review)에 있어서, 체세포의 운명은 세포 분화가 아래로 감(go downhill)에 따라 점진적으로 결정된다. 일반적으로, 분화된 세포 상태를 돌이키는 것은 핵 트랜스퍼¹ 및 복수의 전사 인자 도입과 같은 그것의 핵 기능의 인공적, 물리적 또는 유전적 조작을 요구한다고 여겨진다. 체세포가 이러한 직접적인 핵 조작 없이 외부 야기자에 반응하여 간단하게 그것의 핵 프로그램의 초기화를 진행할 수 있는지에 대해서는 답변되지 않은 채로 남아있다. 이러한 상황은 식물에서 발생하는 것으로 알려져 있고; 배양 환경에서의 급격한 변화가 성숙한 체세포의 운명을 전환할 수 있다, 예를 들어 분리된 당근 세포의 운명을 줄기 및 뿌리를 포함하는 전체 식물 구조가 옥신의 존재 하에 발달되는, 미성숙 아체 세포(blastema cell)로 전환시킬 수 있다. 도전적인 질문은 동물 체세포가 적어도 특정 조건 하에 발생하는 유사한 잠재력을 가질 수 있는지 여부이다. 지난 수십년에 걸쳐, 성체 조직에서의 다능성 세포 (또는 밀접하게 관련된 세포 유형)의 존재는 이에 대해 다양한 그룹에 의해 상충적인 결론이 보고되어 온, 논쟁 사안이었다. 그러나, 이들 중 어느 것도 이러한 다능성 세포가 분화된 체세포로부터 발생될 수 있음을 입증하지 못했다.

[0310]

CD45 (백혈구 공통 항원)에 대해 양성인 조혈모 세포는 iPS 세포의 유도화와 같은 리프로그래밍 연구에 대한 출발 세포 유형으로 종종 사용되는 전형적인 계통-수입 체세포(lineage-committed somatic cell)이다. 이들은 리프로그래밍되지 않는 한 다능성-관련 마커 예컨대 Oct3/4를 발현하지 않는다. 특히, 지라 조직으로부터의 대부분의 CD45⁺ 세포는 비-줄기 백혈구 개체군(성숙한 세포 또는 전구체)인 것으로 고려되고, T 세포 수용체 β 사슬(*tcr β*) 유전자의 유전적 재배열을 수반하는 림프구로부터의 iPS 세포 전환은 수입 체세포로부터의 리프로그래밍을 위한 진정한 특징으로서 간주된다. 본 발명자는 따라서 지라 CD45⁺ 세포들이 간단한 화학적 충격에 의해 야기되는 것과 같은 외부 환경의 급격한 변화에 의해 다능성을 획득하도록 전환될 것인지에 대한 질문에 호기심을 갖게 되었다.

[0311]

결과

[0312]

수임 체세포에서의 저-pH 처리 유도 운명 전환. *oct3/4::gfp* B6 마우스¹⁵로부터 얻은 성체 지라로부터 채취한 CD45⁺ 세포를 물리적 및 화학적인 것을 포함하는 다양한 유형의 강한 일시적 자극에 노출시켰고, 수일간 LIF-함유 B27 배지를 사용하여 현탁액에서 배양한 후 *oct3/4* 프로모터의 활성화에 대해 조사하였다. 이들 다양한 교란(perturbation) 중, 저-pH 교란에 초점을 두었다. 하기에 나타난 바와 같이, 이러한 유형의 교란은 *oct3/4* 유도에 있어 가장 효과적인 것으로 나타났다.

[0313]

자극에의 노출 없이는, CD45로 분류된 어떠한 세포도, 분류된 세포의 생존을 가능하게 하는 LIF-함유 배지에서 배양 기간에 관계 없이 *oct3/4::GFP*를 발현하지 않았다. 그에 반해서, 저-pH 배지 (pH4.5-6.0; 도 12A)에 의한 지라 CD45⁺ 세포의 30분간 처리는 7일 (d7)간 배양에서 상당수의 *oct3/4::GFP*⁺ 세포의 출현을 야기하였다 (도 12B; 가장 효과적인 범위는 pH5.4-5.8임; 도 16B). 이들 세포는 적어도 추가 7 일 (총 14 일)간 패시징 없이 계속 *oct3/4::GFP*를 발현하였다. 이러한 비-부착 배양(non-adhesion culture)의 d 7에서, 저-pH 유도 *oct3/4::GFP*⁺ 세포는 구형 (또는 약간 찌그러진) 클러스터 (데이터를 나타내지 않음; 수 개 내지 수십 개의 세포로 구성됨)를 형성하였고, 이는 더 이상 CD45를 발현하지 않았다 (도 12C). 흥미롭게도, 저-pH 유도 *oct3/4::GFP*⁺ 세포의 세포 크기는 비-처리된 CD45⁺ 세포의 것보다 실질적으로 더 작았고(단일 세포에서의 *oct3/4::GFP* 및 CD45의 면역염색을 참조; 도 12C); 전자의 세포의 80%는 직경에 있어서 8 μ m 미만이고, 한편 대조군 CD45⁺ 세포의 것은 8 내지 10 μ m 범위이었다 (도 12D (좌측 피크는 *oct3/4::GFP*⁺ 세포를 나타내고 우측 피크는 CD45⁺ 세포를 나타냄)는 FACS에서 전방 산란 분석법에 의해 측정됨). 이러한 관찰은 2 개의 마커의 발현에 있어서의 차이점을 상회하는 *oct3/4::GFP*⁺ 및 CD45⁺ 개체군 사이에서의 급격한 변화를 시사한다.

[0314]

시간적 추이 분석 (도 12C)는 d1-d3 동안의 세포 개체군의 급격한 변화를 나타내었다. d1에서의 생존 세포의 대부분 (생존 세포 수는 d0 개체군의 ~85%에 해당함)은 여전히 CD45⁺ 및 *oct3/4::GFP*⁻이었다. d2 및 d3에서, 총 생존 세포의 상당수의 개체군 (21% 및 34%, 각각)은 *oct3/4::GFP*⁺가 되었고 CD45에 대해서는 약해졌다 (도 12C; 플레이팅된 세포의 ~50-60%가 그때까지 손실됨). d7에서, 상당한 수의 *oct3/4::GFP*⁺/CD45⁻ 세포 (54%의 총 생존 세포)는 *oct3/4::GFP*⁻/CD45⁻ 와 별도의 개체군을 구성하였다 (도 12B, 상부; d7에서의 총 세포 수는 d3의 것과 유사함). *oct3/4::GFP*⁺/CD45⁻ 개체군의 분명한 생성이 비-처리된 CD45⁺ 세포의 배양에서는 나타나지 않았다 (도 12B, 하부). 따라서, 저-pH-처리 군에서의 *oct3/4::GFP*⁺/CD45⁻ 개체군의 수는 꽤 상당하였고 d7에서의 총 생존 세포의 약 절반에 해당하였다. 사실상, *oct3/4::GFP* 신호가 d2에 처음 나타났을 때, GFP⁺세포의 수는 초기 플레이팅된 CD45⁺ 세포의 ~8%에 해당하였다. 따라서, 매우 소수의 개체군 (예를 들어, 오염된 CD45⁻ 세포)이 빨리 성장하여 저-pH 처리 후 첫 2 일에 걸쳐 이러한 실질적 *oct3/4::GFP*⁺ 개체군을 형성한 것 같지는 않았다.

[0315]

라이브 이미징 분석 (데이터를 나타내지 않음)에서, 비처리된 세포가 아니라, 저-pH-처리된 CD45⁺ 세포는, 작은 클러스터를 형성하는 경향이 있었고, 이는 첫 수일에 걸쳐 점차 GFP 신호를 턴 온(turn on)하였다. 이후, 이러한 작은 *oct3/4::GFP*⁺ 클러스터는 빈번하게 융합되어 d5까지 더 큰 구형을 형성하였고, 상기 클러스터는 다중-클론(multi-clonal)인 것을 나타내었다. 흥미롭게도, 이들 GFP⁺ 클러스터 (GFP⁻ 세포는 아님)는 매우 유동적이고 종종 세포 돌기를 돌출하였다 (데이터를 나타내지 않음).

[0316]

계통-수임 지라 CD45⁺ 세포, 특히 T 세포 개체군이 *oct3/4::GFP*⁺ 세포에 기여하는지를 시험하기 위해, *tcr β* 의 계통 재배열을 계통 PCR에 의해 분리된 *oct3/4::GFP*⁺ 구체에서 조사하였고 각각의 구체가 *tcr β* 유전자 재배열을 가진 세포를 함유하는 것을 발견하였다 (데이터를 도시하지 않음). *oct3/4::GFP*⁻/CD45⁺ 세포를 오염하는데 있어서의 재배열의 검출 가능성을 배제하기 위해서, *oct3/4::GFP*⁺/CD45⁻ 세포를 d7에 FACS에 의해 분류하였고 *tcr β* 유전자 재배열 분석을 하였다. 이 경우에서도, *tcr β* 유전자 재배열이 분명하게 관찰되었다 (도 12E). 이러한 발견은 지라 세포 (적어도 T 세포)에서의 수임 체세포 개체군이 그것의 운명을 CD45⁺에서 *oct3/4::GFP*⁺로

전환시킴으로써 *oct3/4::GFP⁺* 세포에 기여한 것을 입증한다.

- [0317] 저-pH 유도된 *Oct3/4⁺* 세포는 다능성을 갖는다. 다음으로, 자극-유도된 세포에서의 *oct3/4::GFP⁺* 발현이 이들 세포의 다능성 상태를 나타냈는지 또는 단지 다능성의 획득 없이 유전자 발현 패턴 (이 경우, *oct3/4* 및 *cd45*) 에서의 특이적 개조를 나타내는지를 조사하였다. 면역염색은 d7 *oct3/4::GFP⁺* 구체가 다능성-관련 마커 예컨대 *Oct3/4*, *SSEA-1*, *Nanog*, *E-cadherin* 및 *AP*를 발현하는 것을 나타내었다 (데이터를 도시하지 않음). qPCR에 의한 유전자 발현 분석은 *CD45⁺* 세포와 달리 d7에서의 저-pH-유도된 *oct3/4::GFP⁺* 세포가 ES 세포에서의 그것에 필적하는 수준의 *oct3/4*, *nanog*, *sox2*, *ecatl*, *esgl*, *daxl* 및 *klf4* 유전자를 발현한 것을 나타내었고 (도 13A (일련의 것을 나타냄, 좌측으로부터 오른쪽으로 *oct3/4*, *nanog*, *sox2*, *ecatl*, *esgl*, *daxl* 및 *klf4* 발현); 이들 마커는 이미 d3에 양성이었음), 이는 저-pH-유도된 *oct3/4::GFP⁺* 세포는 *CD45⁺* 세포에서는 절대 발현되지 않는, 다능성 특유의 진정한 마커 유전자 세트를 발현한다는 것을 나타내었다.
- [0318] 다음에, 유전자 발현 패턴에서의 이러한 급격한 개조에 다능성-관련 유전자의 후성유전적 변형에서의 변화가 동반되었는지를 시험하였다. 이를 위해서, 바이설페이트 시퀀싱을 *oct3/4* 및 *nanog* 프로모터 영역의 메틸화 상태를 조사하기 위해 수행하였다. 추가 배양을 한 또는 하지 않은 *CD45⁺* 세포는 두 프로모터 간에서 대량으로 메틸화된 패턴을 나타내었다. 이와 대조적으로, 저-pH-유도된 *oct3/4::GFP⁺* 세포는 ES 세포와 같이, 이러한 영역에서의 대규모 탈메틸화를 나타내었고 (도 13B), 이는 세포가 다능성에 대한 핵심 유전자에서의 후성유전적 상태의 실질적 리프로그래밍을 진행하였다는 것을 입증한다.
- [0319] 다음으로, 저-pH-유도된 세포가 다능성 특성에 대한 일반 기준인, 세 개의 배엽 유도체를 생성하기 위한 역량을 가지는지를 조사하였다. 생체외에서 분화 분석법 (데이터를 나타내지 않음) 및 테라토마-형성 시험 (데이터를 나타내지 않음) 모두는 이들 세포가 외배엽 (예를 들어, β -튜불린 III⁺), 중배엽 (예를 들어, 평활근 액틴⁺), 및 내배엽 (예를 들어, 알파 페토프로테인⁺) 세포를 발생시키는 것을 입증하였다.
- [0320] 총괄적으로, 이러한 발견은 수입 체세포 계통의 분화 상태가 외적으로 주어진 강한 자극에 의해 다능성의 세포 상태로 전환될 수 있음을 입증한다. 이하에서, 강한 외부 자극 예컨대 저 pH에 의한 체세포로부터 다능성 세포로의 운명 전환은 "자극-야기 획득 다능성" (stimulus-triggered acquired pluripotency, STAP)으로, 그리고 생성된 세포는 "STAP 세포"로 지칭한다.
- [0321] 다른 조직 공급원으로부터의 STAP 세포. STAP 세포에 대한 다른 중요한 질문은 저-pH-야기 전환의 현상이 *CD45⁺* 백혈구에 제한되는지의 여부이다. 이러한 질문을 다루기 위해, 유사한 전환 실험을 *oct3/4::gfp* 마우스의 뇌, 피부, 근육, 지방, 골수, 폐 및 간 조직으로부터 채취한 체세포로 수행하였다.
- [0322] 조직 샘플로부터의 세포를 단일 세포로 분리하였고, 일시적인 저-pH 노출을 가하고 LIF-함유 배지에서 배양하였다. 전환 효율이 그것들이 유래한 조직에 따라 다르긴 했지만, *oct3/4::GFP⁺* 세포는 d7 배양액에서 제한적으로 관찰되었다 (도 14A (일련의 것을 나타냄, 좌측으로부터 우측으로 *CD45⁺* 세포, 골수, 뇌, 폐, 근육, 지방, 섬유아세포, 간, 및 연골세포). 현저하게는, STAP 세포는 *CD45⁺* 세포가 드문 지방 조직의 간엽 세포 및 연골세포의 1차 배양 세포로부터 효과적으로 유도되었고 (데이터를 도시하지 않음), 이는 비-*CD45⁺* 세포 개체군이 STAP 세포를 발생시킬 수 있음을 나타낸다. 이들 *oct3/4::GFP⁺* 세포 클러스터는 또한 다능성-관련 마커 (도 14B (일련의 것을 나타냄, 좌측으로부터 우측으로, *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4*, 및 *Rex1*의 발현) 및 도 18B 데이터를 나타내지 않음), 및 ES-세포 특이적 마커 유전자 (도 14B 및 도 18B)를 발현하였다.
- [0323] 다능성 세포로서의 STAP 세포의 특징. STAP 세포는 ES 세포-특이적 유전자를 발현하고 *oct3/4* 및 *nanog* 유전자에서 유사한 메틸화 패턴을 나타낸다. 또한, STAP 세포는 마우스 ES 세포에 대한 배지, 예컨대 LIF-함유 배지에서 수렴될 수 있었으나 마우스 EpiSC 배지에서는 그렇지 않았다 (데이터를 도시되지 않음).
- [0324] 그러나, STAP 세포가 마우스 ES 세포에 대한 실질적 유사성을 나타내었음에도 불구하고, 몇몇의 구별되는 특징도 발견되었다. 예를 들어, STAP 세포는 제한된 자기재생 능력을 나타내었다. 마우스 ES 세포 (데이터를 나타내지 않음)와 달리, STAP 세포 구체가 96-웰 플레이트의 각각의 웰에서 클론 배양을 위해 단일 세포로 효소적으로 분리될 때, 어떠한 군체(*AP⁺* 또는 *oct3/4::GFP⁺*)도 부착 또는 비-부착 조건 하에 LIF-함유 배지 (G-MEM- 또

는 B27- 계)에서 추가 10-일 배양 이후 형성되지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). 구형 군체(spherical colony) 형성이 드물게 보이는 반면 (전형적으로 96 웰 중 2-4 웰), 이들 군체는 모두 AP^- 및 $oct3/4::GFP^-$ 이었다. 심지어 STAP 세포 군체가 부분적으로 분리되고 높은 세포-밀도 조건 하에 배양되는 경우에도 (데이터가 도시되지 않음; 아마도 자기재생을 더 지지함), 세포 수는 2 패시지(passage) 후 감소하기 시작하였고 $oct3/4::GFP^+$ 세포는 5 패시지를 초과하여 유지될 수 없었다. 성장 및 유지에 대한 이러한 특징은 STAP 세포가 마우스 ES 및 iPS 세포와 부분적으로 구별되는 특징을 갖는 다능성 세포 개체군을 나타내는 것을 시사한다.

[0325]

마우스 EpiSC는 다능성 줄기 세포의 다른 범주이고, 이는 분화 단계에서 약간 더 발달된 것으로 여겨진다. STAP 세포는 몇몇 면에서 EpiSC 세포와 별개로 거동하는 것으로 나타났다. 부착 배양에서, 마우스 ES 세포와 같이, $oct3/4::GFP^+$ 세포는 마우스 EpiSC에 대해 보이는 단일층 플랫 군체(mono-layered flat colonies)와 달리 적층(piling up)에 의해 반-구체형 군체를 형성하였다. STAP 세포는 EpiSC 배지에 유지될 수 없었으며, 이는 그들이 EpiSC와 유사하지 않음을 시사한다(데이터를 나타내지 않음). 또한, EpiSC(ref; Ohgushi)의 단일-세포 패시지를 개선하는 ROCK 억제제를 사용한 처리는 분리된 STAP 세포로부터 군체 형성을 촉진하지 않았다 (데이터를 나타내지 않음).

[0326]

면역염색은 STAP 세포는 EpiSC 마커 Claudin 7 및 ZO-1에 대해 음성적이고 Klf2/4에 대해 양성적인 것을 나타내었다 (데이터를 도시하지 않음). ES 세포, STAP 세포 및 EpiSC 사이의 분류는 간단하지 않을 수 있으며, 이는 ES 세포 마커 $Esrr\beta$ 의 발현이 STAP 세포 및 EpiSC 모두에서 낮았고, 한편 $eIf5$ 발현은 STAP 세포에서 특히 낮기 때문이다 (도 15A (일련의 것을 나타냄, 좌측으로부터 우측으로 EpiSC, STAP, 및 CD45)). 전 게놈 전사체(genome-wide transcriptome)의 클러스터 분석에 있어서, STAP 세포는 ES 세포와 가장 밀접하고 RNA 발현에서 배반포와 실질적 유사성을 갖는 한편, 부모 CD45⁺ 세포와 가장 구별된다 (데이터를 나타내지 않음). STAP 세포에서의 X-염색체의 불활성화의 상황은 흥미로웠다; 암컷 STAP 세포의 ~40% (d7)는 불활성화된 염색체를 나타내었고, 한편 X-염색체 불활성화는 나머지 것(~60%)에서 취소되었다 (도 15B).

[0327]

이러한 발견은 STAP 세포의 분화 상태가 ES 세포의 그것과 밀접하게 연관되지만 분명히 구별되는 신규한 준안정 다능성 상태를 나타낼 수 있는 가능성을 제시한다.

[0328]

마우스에서의 키메라 형성 및 생식선 전이. 마지막으로, STAP 세포의 키메라-형성 능력을 배반포 주입 분석에 의해 평가하였다. ES 세포와 달리, STAP 세포 (B6-백그라운드)가 단일 세포로 분리되어 ICR 배반포로 주입되는 경우, 어두운 모색(coat color)을 수반하는 키메라 마우스는 태어나지 않았다 (표 4). 단일 STAP 세포는 생체 외에서는 거의 유지될 수 없기 때문에, 세포 분리는 어떻게든 그 능력을 변경한 것으로 추론되었다. 따라서, STAP 세포 클러스터를 현미경 하에 마이크로나이프를 사용하여 작은 조각으로 수동으로 절단하였고, 배반포로 일괄 주입하였다 (데이터를 나타내지 않음). 이러한 조각으로, 키메라 마우스가 상당한 비율로 태어났고 모두 정상적으로 발달되었다 (데이터를 나타내지 않음). 다음으로, GFP를 구성적으로 발현하는 마우스 (C57BL/6GFP의 F1과 DBA/2 또는 129/Sv가 교배됨)의 CD45⁺ 세포로부터 생성된, 주입된 STAP 세포의 조직 기여도를 조사하였다. STAP 세포 클러스터가 주입된 키메라 배아에서 GFP-발현 세포의 높은 또는 중간 기여도가 나타났다 (데이터를 나타내지 않음).

[0329]

각 조직에서의 GFP⁺ 세포의 기여율을 FACS에 의해 이들의 키메라 배아에서 분석하였다. CD45⁺ 세포-유도된 STAP 세포는 조사된 모든 조직에 기여하였다 (데이터를 나타내지 않음). 또한, STAP 세포로부터 유래된 새끼(offspring)는 키메라 마우스로 태어났다 (표 5). 생식선 전이는 다능성뿐만 아니라 유전적 및 후성유전적 정상상태²²의 엄격한 기준으로서 간주되기 때문에, STAP 세포의 이러한 잠재력은 중요하고 이들 다능성 세포의 진정성을 입증한다. 다음에 4N 배반포에 세포들을 주입함으로써 사배체 (4N) 상보성 분석을 수행하였는데, 이는 생성된 배아가 이러한 공여체 세포²³로부터만 유도되기 때문에 주입된 세포의 발달 잠재력에 대한 가장 엄격한 시험으로 간주된다 (데이터를 나타내지 않음). 4N 배반포로의 주입시, CD45⁺ 세포-유도된 STAP 세포 ($DBA \times B6GFP$ 또는 $129/Sv \times B6GFP$ F1 마우스로부터의 것)는 E10.5에서 "모두 GFP⁺ 배아"를 생성하였고 (데이터를 나타내지 않음), 이는 STAP 세포 단독으로 완전한 배아 구조를 구성하기에 충분하다는 것을 입증하였다.

[0330]

종합하면, 이들 발견은 STAP 세포가 배아 환경의 맥락에서 모든 체세포 및 생식선 계통으로 분화되는 발달 능력을 가진 것을 명백하게 나타낸다.

- [0331] **논의**
- [0332] 본원에 기술된 데이터는 체세포가 잠재적으로 가지는 놀라운 유연한 가소성을 나타내었다. 심지어 다능성 세포로 전환시키는 이러한 동적 가소성은 세포가 이들의 생활 환경에서 일반적으로 경험하지 못하는 강한 자극에 일시적으로 노출되는 경우 나타난다.
- [0333] CD45⁺ 세포로부터 STAP 세포로의 전환은 적어도 HDAC 억제제 (예를 들어, Tricostatin A) 또는 5-아자-시티딘으로 처리함으로써 실질적으로 영향을 받지 않았다.
- [0334] 본원에서 저-pH 처리가 배양액에서 세포의 수를 실질적으로 감소시킨다는 것을 입증하였다. 그러나, 사실상, 첫 24 시간 동안 생존 세포의 감소는 미미하였고, 이는 이러한 처리가 대다수의 세포에 극심한 치명적 효과를 줄 것 같지 않음을 시사한다. 대신, 지연된 세포 손실이 d2-d5 동안 점차 발생하였다. 이와 일치되게, 데이터는 스트레스 및 DNA 복구²¹에 대한 세포 반응과 관련된 다수의 유전자가 d3에서의 저-pH-경험 *oct3/4*:GFP⁺ 세포에서 강하게 유도되었으나, 동일한 배지에서 배양된 대조군 세포에서는 그러하지 않았음을 입증하였고, 이는 세포가 생명-위협, 또는 아치사(sublethal) 스트레스로서의 자극에 반응한 것을 시사한다. 흥미롭게도, 이들의 유전자 발현 수준은 d7에서 심지어 더 높았고; 따라서, 향후 세포 생존에 대한 스트레스-유도 유전자의 역할뿐만 아니라 리프로그래밍 과정에서의 이것의 가능한 관련성을 향후 탐구하는 것은 흥미로운 것이다.
- [0335] 다른 미결 문제는 세포 리프로그래밍이 특히 저-pH 처리에 의해 또는 또한 다른 유형의 아치사 스트레스 예컨대 물리적 손상, 플라스마 막 천공, 삼투압 충격, 성장-인자 부족, 저산소 및 고 Ca²⁺ 배지 노출에 의해서도 개시될 수 있는지 여부이다. 특히, 이들 중 일부, 특별하게는 혹독한 분쇄에 의한 물리적 손상 및 스트랩툴리신 0에 의한 막 천공은 CD45⁺ 세포로부터의 *oct3/4*:GFP⁺ 세포의 생성을 유도했다 (도 18A). 이러한 발견은, 이러한 멀리 관련된 아치사 스트레스의 다운스트림에 놓인, 특정의 공통 조절 모듈이, 분화의 단단히 잠긴 후성유전적 상태로부터 체세포를 해방시키는데 핵심 역할을 하여, 후성유전적 조절에서의 전체적 변화를 초래할 가능성을 제시한다. 일부 *oct3/4*:GFP⁺ 세포가 d2까지 나타난 것을 고려하면, 이러한 리프로그래밍 메커니즘은 첫번째 2 일 이내 기능할 수 있다.
- [0336] **참조**
- [0337] 1 Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. & Yanagimachi, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374, doi:10.1038/28615 (1998).
- [0338] 2 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- [0339] 3 Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49, doi:10.1038/nature00870 (2002).
- [0340] 4 D'Ippolito, G. *et al.* Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of cell science* 117, 2971-2981, doi:10.1242/jcs.01103 (2004).
- [0341] 5 Johnson, J. *et al.* Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122, 303-315, doi:10.1016/j.cell.2005.06.031 (2005).
- [0342] 6 Kucia, M. *et al.* A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 20, 857-869, doi:10.1038/sj.leu.2404171 (2006).
- [0343] 7 Kuroda, Y. *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8639-8643, doi:10.1073/pnas.0911647107 (2010).
- [0344] 8 Obokata, H. *et al.* The potential of stem cells in adult tissues representative of the three germ layers. *Tissue engineering. Part A* 17, 607-615, doi:10.1089/ten.TEA.2010.0385 (2011).

- [0345] 9 Rahnama-Azar, A. *et al.* Human marrow-isolated adult multilineage-inducible (MIAMI) cells protect against peripheral vascular ischemia in a mouse model. *Cytotherapy* 13, 179-192, doi:10.3109/14653249.2010.515579 (2011).
- [0346] 10 Huang, Y. *et al.* Bone marrow transplantation temporarily improves pancreatic function in streptozotocin-induced diabetes: potential involvement of very small embryonic-like cells. *Transplantation* 89, 677-685, doi:10.1097/TP.0b013e3181c9dc7d (2010).
- [0347] 11 Zuba-Surma, E. K. *et al.* Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodelling after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 1319-1328, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01126.x (2011).
- [0348] 12 Paczkowska, E. *et al.* Aldehyde dehydrogenase (ALDH) - a promising new candidate for use in preclinical and clinical selection of pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSEL SCs) of high long-term repopulating hematopoietic potential. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society* 16, 59-71 (2011).
- [0349] 13 Lengner, C. J., Welstead, G. G. & Jaenisch, R. The pluripotency regulator Oct4: a role in somatic stem cells? *Cell Cycle* 7, 725-728 (2008).
- [0350] 14 Berg, J. S. & Goodell, M. A. An argument against a role for Oct4 in somatic stem cells. *Cell stem cell* 1, 359-360, doi:10.1016/j.stem.2007.09.007 (2007).
- [0351] 15 Ohbo, K. *et al.* Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Developmental biology* 258, 209-225 (2003).
- [0352] 16 Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).
- [0353] 17 Ogawa, K., Matsui, H., Ohtsuka, S. & Niwa, H. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9, 471-477, doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x (2004).
- [0354] 18 Gough, N. M. *et al.* LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reproduction, fertility, and development* 1, 281-288 (1989).
- [0355] 19 Hitoshi, S. *et al.* Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes & development* 18, 1806-1811, doi:10.1101/gad.1208404 (2004).
- [0356] 20 Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199, doi:10.1038/nature05972 (2007).
- [0357] 21 Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M. & von Zglinicki, T. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells* 22, 962-971, doi:10.1634/stemcells.22-6-962 (2004).
- [0358] 22 Surani, M. A. & Barton, S. C. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222, 1034-1036 (1983).
- [0359] 23 Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8424-8428 (1993).
- [0360] 24 A. P. Dyban, V. S. B. Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development. *Oxford Univ. Press, New York* (1987).
- [0361] 25 Gropp, A., Winking, H., Herbst, E. W. & Claussen, C. P. Murine trisomy: developmental profiles of the embryo, and isolation of trisomic cellular systems. *The Journal of experimental zoology* 228, 253-269, doi:10.1002/jez.1402280210 (1983).

[0362]

물질 및 방법

[0363]

조직 채취 및 세포 배양. 성숙한 림프구를 분리하기 위해서, 1주-생 GOF 마우스 또는 ICR 마우스로부터 유래된 지라를 가위로 잘게 자르고 파스퇴르 피펫으로 기계적으로 분리하였다. 분리된 지라를 세포 스트레이너(cell strainer)(BD Biosciences, San Jose)를 통해 물기를 걸렀다. 수집된 세포를 DMEM 배지에 재-현탁시키고 동일한 부피의 림포라이트(lympholyte)(CEDARLANE®, Ontario, Canada)를 첨가하고, 이후 15 분간 1000g에서 원심 분리하였다. 림프구 층을 취하여 CD45 항체 (ab25603, abcam, Cambridge, MA)를 얻었다. CD45 양성 세포를 FACS Aria (BD Biosciences)로 분류하였다. 이후, CD45 양성 세포를 스트레스 처리(15분 동안 pH5.5 용액)로 처리하고 1000U LIF (Sigma)를 보충한 B27 배지에 플레이팅했다.

[0364]

외부 자극-스트레스 처리에의 노출. 성숙한 세포에 기계적 스트레스를 주기 위해, 파스퇴르 피펫을 가열하고 이후 직경에 있어 대략 50 미크론의 루멘을 생성하기 위해 잡아당긴 후 부러뜨렸다. 성숙한 체세포를 이후 이 피펫을 통해 20 분간 분쇄하였고, 7 일간 배양하였다. 성숙한 세포에 저산소 자극을 제공하기 위해, 세포를 5% 산소 인큐베이터에서 3 주 동안 배양하였다. 2 mM CaCl₂를 함유한 배지에서 세포를 7 일간 배양시킴으로써 고 Ca 배양 농도를 성숙한 세포에 제공하였다. 성숙한 세포를 생리적 스트레스에 노출시키기 위해, 이들을 저 pH (pH5.5) 용액으로 처리하고, 7 일간 배양하였다. 또한, 세포에 보다 심한 손상을 주었다. 성숙한 세포막에 구멍을 형성하기 위해, 세포를 2 시간 동안 230 ng/ml SLO (Streptolysin O) (S5265, Sigma)로 처리하고 이후 7 일간 배양하였다.

[0365]

바이설파이트 시퀀스 (Bisulfite sequence). GOF 마우스로부터 얻은 세포를 단일 세포로 분리하였다. GFP 양성 세포를 FACS Aria™를 사용하여 수집하였다. 게놈 DNA를 SAC로부터 추출하여 연구하였다. DNA의 바이설파이트 처리를 제조자의 지시에 따라 CpGenome™ DNA Modification 키트 (Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>)를 사용하여 수행하였다.

[0366]

생성된 변형된 DNA를 2 개의 정방향 (F) 프라이머 및 1 개의 역방향 (R) 프라이머를 사용하여 네스티드 증합효소 연쇄 반응 PCR에 의해 증폭시켰다: Oct4 (F1, GTTGTGTTTGTGTTTGGATAT;F2,ATGGGTTGAAATATTGGGTTTATTTA;R,CCACCCTCTAACCTTAACCTCTAAC). 및 Nanog (F1,GAGGATGTTTTTAAGTTTTTTT;F2,AATGTTTATGGTGGATTGTTAGGT;R,CCCACACTCATATCAATATAATAAC). PCR를 TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (RR030A)를 사용하여 수행하였다. DNA 시퀀싱을 GRAS (The Genome Resource and Analysis Unit)로 보조하여 M13 프라이머를 사용하여 수행하였다.

[0367]

면역 조직 화학. 배양된 세포를 배양된 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정하고 1% BSA 용액 (Life Technology, Tokyo, Japan)으로 차단하기 이전에 0.1% Triton X-100/PBS로 투과화(permeabilized)했다. 2차 항체는 Alexa-488 또는 -594 (Invitrogen)가 결합된 염소 항-마우스(goat anti-mouse) 또는 -토끼였다. 세포 핵을 DAPI (Sigma)로 가시화했다. 슬라이드에 SlowFade Gold antifade 시약 (Invitrogen)을 배치했다.

[0368]

형광-활성화 세포 분류(Fluorescence-Activated Cell Sorting) 및 유세포 분류(Flow Cytometry). 세포를 표준 프로토콜에 따라 제조하고 FACS에 앞서 얼음 상에서 0.1% BSA/PBS에 현탁시켰다. PI™ (BD Biosciences)를 사용하여 사멸한 세포를 배제하였다. 음성 대조군에서, 1차 항체를 특이성을 보장하기 위해 동일 아이소형의 IgG 음성 대조군으로 대체하였다. 세포를 BD FACSAria SORP™ 상에서 분류하고 BD FACSDiva™ Software에 의해 BD LSRII™(BD Biosciences)로 분석하였다.

[0369]

RNA 제조 및 RT-PCR 분석. RNA를 RNeasy™ Micro 키트 (QIAGEN)로 분리하였다. 역전사를 SupesACript III First Strand Synthesis 키트 (Invitrogen)로 수행하였다. 증폭을 위해 SYBR Green™ Mix I (Roche Diagnostics)를 사용하고, 샘플을 Lightcycler-II™ Instrument (Roche Diagnostics) 상에서 실시하였다.

[0370]

동물 연구. 종양 유전자 연구를 위해, 100 ml PBS에 현탁시킨 세포를 연령-일치시킨 면역결핍 SCID 마우스의 측부에 피하로 주입하였다. 6주후 마우스를 도살하고 해부하였다.

[0371]

ATP 및 ROS 분석. 세포간 ATP 수준을 공급자의 프로토콜에 따라 ATP Bioluminescence Assay Kit HS II™ (Roche)에 의해 측정하였다. 발광 강도를 Gelomax™ 96 Microplate Luminometer (Promega, Madison, WI)를 사용함으로써 측정하고 발광 판독(luminescence reading)을 세포 계수에 의해 표준화했다. ROS 수준의 측정을 위해, 세포를 37 °C에서 15 분간 암실에서 2 μM 디히드로에티움 (Molecular Probes)를 함유한 배지에서 배양하였다. 세포를 이후 PBS로 세정하고 0.5% BSA를 함유한 PBS에 현탁시켰다. 30000 세포의 형광 강도를 BD Biosciences LSR II (BD Bioscience, Spark, MD)로 보조하여 기록하였다.

- [0372] *키메라 마우스 생성 및 분석.*
- [0373] *이배체 및 사배체 키메라의 제조.* 이배체 배아를 ICR 수컷과 교배시킨 ICR 중 암컷으로부터 얻고 사배체 배아를 BDF1 수컷과 교배시킨 BDF1중 암컷으로부터 얻었다. 사배체 배아를 2-세포 배아의 전기융합에 의해 제조하였다. 본 연구에서, 트립신 처리가 낮은 키메라성을 야기하기 때문에, SAC 구형 군체를 현미경 하에 마이크로 나이프를 사용하여 작은 조각으로 자르고, 이후 SAC의 작은 클러스터를 큰 피펫에 의해 4.5 일 배반포에 주입하였다. 다음 날, 그 키메라 배반포를 2.5 일 가임신 암컷 내로 트랜스퍼했다.
- [0374] *생체의 분화 분석.*
- [0375] *중배엽 계통 분화 분석법(Mesoderm lineage differentiation assay).* 스트레스 개조 세포 매스(stress altered cell masses)를 7 일째 수집하여 단일 세포로 분리하고, 이후 세포 분류기에 의해 Oct4-GFP 양성 세포만을 수집하였다. 수집된 세포는 20% FCS가 보충된 DMEM이었다. 배지를 3일마다 교체하였다. 7-14 일 이후, 근육 세포를 항- α -평활근 액틴 항체 (N1584, DAKO)로 염색시켰다. 음성 대조군에서, 1차 항체를 특이성을 보장하기 위해 동일 아이소형의 IgG 음성 대조군으로 대체하였다.
- [0376] *신경 계통 분화 분석법(Neural lineage differentiation assay).* 스트레스 개조 세포 매스를 7 일째 수집하여 단일 세포로 분리하고, 이후 세포 분류기에 의해 Oct4-GFP 양성 세포만을 수집하였다. 수집된 세포를 2% B27 (Invitrogen), 10% FCS, 10ng/ml bFGF (R&D Systems) 및 20ng/ml EGF (R&D Systems)가 보충된 F12/DMEM (1 : 1, v/v)에서 오르니틴-코팅된 챔버 슬라이드 (Nalge Nunc International)상에 플레이팅했다. 배지를 3일마다 교체하였다. 이후 10-14 일 이후, 세포를 4 °C에서 30 분간 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 실온에서 15 분간 0.2% Triton X-100를 함유한 PBS로 세정하고, 비-특이적 반응을 차단하기 위해서 20분간 2% FCS를 함유한 PBS로 배양시키고, 항- β III 튜불린 마우스 단일클론 항체 (G7121, Promega) 및 항-GFAP 마우스 단일클론 항체 (AB5804, CHEMICON)로 배양하였다. 음성 대조군에서, 1차 항체를 특이성을 보장하기 위해 동일 아이소형의 IgG 음성 대조군으로 대체하였다.
- [0377] *간 분화 분석법(Hepatic differentiation assay).* 스트레스 개조 세포 매스를 7 일째 수집하여 단일 세포로 분리하고, 이후 세포 분류기에 의해 Oct4-GFP 양성 세포만을 수집하였다. 수집된 세포를 10% FCS, 1% 페니실린 /스트렙토마이신 (Sigma)이 보충된, 500 mL 간세포 기본 배지 (Lonza, Wuppertal, Germany), 0.5 mL 아스코르브산, 10 mLBSA-FAF (지방산 없음), 0.5mL 히드로코르티손, 0.5 mL 트랜스페린, 0.5 mL 인슐린, 0.5 mL EGF, 및 0.5 mL 겐타마이신-암포테리신(GA-1000; all from Lonza)으로 구성된 간세포 배지에서 챔버 2 웰 슬라이드 글라스 (Nalge Nunc International)에 플레이팅했다. 분화된 세포를 하기 항체를 사용하는 면역조직화학에 의해 검출하였다: 항- α -페토프로테인 마우스 단일클론 항체 (MAB1368, R&D System) 및 항-시토크라틴 7 마우스 단일클론 항체 (ab668, abcam). 음성 대조군에서, 특이성을 보장하기 위해 1차 항체를 동일 아이소형의 IgG 음성 대조군으로 대체하였다.
- [0378] *생체내 분화 분석법:* 스트레스 개조 세포 매스를 7 일째 수집하여 단일 세포로 분리하고, 이후 세포 분류기에 의해 Oct4-GFP 양성 세포만을 수집하였다. 수집된 세포를 10% FBS를 가진 50 μ l의 DMEM에 재-현탁시켰다. 이 용액을 200 마이크로 직경인, 폴리글리콜산 섬유 부직 메쉬로 구성된 시트 3 x 3 x 1 mm에 씨딩(seeding) 하고, 4 주생 NOD/SCID 마우스의 등부분 측부에 피하 이식했다. 4 주후, 이식체를 수거하고, 면역조직화화법을 사용하여 분석했다. 이식물을 10% 포름알데히드로 고정시키고, 파라핀에 포매시키고, 4 μ m 두께로 일반적으로 가공하였다. 절단면을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 내배엽 조직을 내배엽 마커 항- α -페토프로테인 마우스 단일클론 항체 (MAB1368, R&D System)로 확인하였다. 외배엽 조직을 항- β III 튜불린 마우스 단일클론 항체 (G7121, Promega)로 확인하였다. 중배엽 조직을 항-평활근 액틴 항체 (N1584, DAKO)로 확인하였다. 음성 대조군에서, 특이성을 보장하기 위해 1차 항체를 동일 아이소형의 IgG 음성 대조군으로 대체하였다.
- [0379] *TCR β 사슬 재배열 분석법.* gDNA를 SAC 및 CD45 양성 세포로부터 유도된 SAC로 생성된 키메라 마우스의 꼬리 말단으로부터 추출하였다. PCR를 하기 프라이머를 사용하여 50 ng gDNA로 수행하였다.
- [0380] (5'-GCACCTGTGGGAAGAACT-3' 및
- [0381] 5'-TGAGAGCTGTCTCTACTATCGATT-3') 증폭된 DNA를 1.5% 아가로오스 겔을 사용하여 전기영동시켰다.
- [0382] *키메라 마우스의 유전형질분석.* gDNA를 4N 키메라 마우스의 꼬리 말단으로부터 추출하였다. 유전형질분석을 하기 프라이머를 사용하여 수행하였다. (GFP:
- [0383] F-AGAACTGGGACCACTCCAGTG 및 R-TTCACCTCTCCACTGACAGATCT. IL-2: F-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT 및 R-

GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC)

[0384] 스트레스 개조 Oct4 발현 세포를 유지하기 위한 최적 배양 조건을 이후 결정하였다. ES 수립 배지, 3i¹⁶ 및 ACTH¹⁷, ES 배양 조건, ES-LIF¹⁸, Oct4-발현 원시 신경 줄기 세포 배양 조건, B27-LIF¹⁹, 및 EpiSC 배양 조건²⁰을 포함하는 이전에 기술된 몇몇 배지가 조사되었다. 세포를 각각의 배지에 플레이트팅하고, GFP 발현된 군체를 계수하였다 (도 S1C). 배지 B27-LIF가 GFP 발현 구형 군체를 생성하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 처리된 세포의 배양을 위해 B27-LIF를 이용하였다.

[0385] 다양한 조직으로부터 얻은 세포로부터 생성된 SAC가 상이한 분화 경향을 가지는지를 조사하기 위하여, SAC를 F1 GFP 마우스로부터 유래된 다양한 조직으로부터 생성하고, ICR 배반포에 이를 주입하였다. 이후, FACS를 사용하여, 생성된 키메라 마우스에서의 각각의 조직의 기여율을 분석하였다. 임의의 조직으로부터 유래된 SAC가 키메라 마우스 생성에 기여한다는 것을 발견하였다 (데이터를 나타내지 않음). 또한, 피부, 뇌, 근육, 지방, 간 및 폐에 대한 기여도를 다양한 조직으로부터 유래된 SAC를 사용하여 생성된 키메라 마우스에서 분석하였다. 임의의 조직으로부터 유래된 SAC가 모든 세 개의 배엽을 대표하는 조직을 생성하는데 기여하였으며 어떠한 분화 경향도 관찰되지 않았다 (데이터를 나타내지 않음).

[0386] 표 4. SAC로부터의 키메라 마우스의 생성

마우스 종	주입을 위한 세포제조	SAC의 배양기간	주입된 수정된		얻은 키메라 마우스의 수	
			배아의 수	새끼수	총합	높은 기여도**
BDF1	클러스터	7 day	58	48*	16	4
129B6F1	클러스터	7 day	98	64	20	6
GOF	클러스터	7 day	73	35	24	2
GOF	클러스터	10 day	35	20	4	0

[0387]

[0388] * 모든 태아는 13.5 dpc 내지 15.5 dpc에서 수집하고 각 기관으로의 SAC의 기여율을 FACS에 의해 조사했음

[0389] ** 각각의 키메라로의 SAC의 기여도는 높게 기록되었음 (GFP 발현의 모색 >50%)

[0390] 표 5 키메라 마우스의 생식선 전이를 통한 SAC로부터의 새끼의 생산

커플(Pair) ID	키메라 신체에서의 SAC의 기여도		호스트 배반포의 마우스종	총 자식의 수	GFP 또는 검은눈을 가진 새끼의 수(%)
	수컷	암컷			
No. 1	높음	중간	ICR	9	5 (56)
No. 2	높음	비 카메라	ICR	11	4 (36)
				14	4 (29)
No. 3	중간	낮음	ICR	9	0
				10	0
				13	0
No. 4	중간	중간	ICR	4	2 (50)
				10	6 (60)
				11	7 (64)
No. 5	중간	중간	BALB/c	9	4 (44)
				5	3 (60)

[0391]

[0392]

실시예 3

[0393]

이론에 구속됨 없이, 본원에 기술된 방법은 아포토시스(apoptosis), 또는 제어된 세포 사멸과 관련된 프로세스를 활성화시킨다고 여겨진다. 세포에 대한 가벼운 손상은 복구 유전자의 활성화를 유도할 수 있다. 세포에 대한 심한 손상은 이전에 정의되지 않은 생존 메커니즘을 활성화할 수 있다. 세포가 유의미한 스트레스, 예컨대 본원에 기술된 스트레스에 노출되는 경우, 세포 성분 (예를 들어 미토콘드리아, 소낭, 핵, 리보솜, 소포체, 엑소좀, 엔도솜, 세포막, 미토콘드리아, 리소솜, ATP, 단백질, 효소, 탄수화물, 지질 등)이 손상된 세포로부터 "cellieu"로 방출된다고 여겨진다. 본원에 기술된 데이터는 이 "cellieu"는 세포의 생존을 재구성하고/하거나 촉진할 수 있다는 것을 나타낸다. 이론에 구속됨 없이, 미토콘드리아 (및 다른 세포 기관)는 세포의 재구성을 지시할 수 있다고도 여겨진다. 작은 크기, 단순성, 세포 분화를 지시하는 능력, 및 원핵세포-유사 특성 때문에, 미토콘드리아는 부모세포에 치명적인 것으로 입증되는 스트레스를 견딜 수 있다. 미토콘드리아는 세포로부터 자유롭게 방출, 막에 캡슐화, 및/또는 다른 세포 성분에 결합될 수 있다.

[0394]

대안적으로, 이론에 구속됨 없이, 핵은 온전하게 유지되고, 일부 미토콘드리아를 포함할 수 있는 세포막에 캡슐화될 수 있다. 핵의 후성유전적 제어를 잃은, 매우 적은 세포질 및 매우 소수의 세포 기관을 갖는 이러한 손상된 세포는 상호작용하여 가능하게는 밀려나온(extruded) 세포 기관과 융합될 수 있다. 이는 세포에 성장 및 복제에 필요한 서브셀룰러 성분(subcellular components)을 제공하지만 상기 세포는 후성유전적 제어를 잃었고, 따라서 보다 원시적인 (예를 들어 보다 강한 다능성) 상태가 유도된다.

[0395]

실시예 4: 배아에 대한 발달 잠재력 및 획득한 다능성을 갖는 리프로그래밍된 세포에서의 태반 계통

[0396]

일반적으로, 출생 후 체세포의 운명은 고정되고 이들은 핵 트랜스퍼^{1,2} 또는 핵심 전사 인자³에 의한 유전적 조작이 이루어지지 않는 한 변화되지 않는다. 본원에서 입증된 바와 같이, 본 발명자들은 다능성의 자극-야기 획득(STAP)⁴으로 지칭되는 아치사 자극에 의해 다능성 세포로 리프로그래밍되는 체세포의 예상치 못한 현상을 발견하였다. 또한 리프로그래밍된 STAP 세포는 ES 세포와 구별되는 독특한 분화 능력을 나타낸다는 증거가 본원에 기술되어 있다. STAP 세포는 배반포 주입 분석에서 보이는 바와 같이 배아 조직뿐만 아니라 태반계(placental system)에도 기여할 수 있다. 태반 기여에 대한 이들의 효능은 FGF4를 사용한 배양에 의해 추가로 강화되었다. 반대로, ES 세포 유지 배지에서 추가적인 패시지를 위해 배양하는 경우, 본래는 제한된 자기재생력을 나타내는 STAP 세포는, 영양막-유사(trophoblast-like)가 아닌 ES 세포-유사 특징을 나타내는 왕성하게 증식하는 세포주

를 생성한다. 이러한 개조된 STAP 세포 (STAP 줄기 세포)는 사배체 상보성 분석⁵에서 마우스를 발생시켰으나, 더 이상 태반 조직에 기여하지 않았다. 따라서, iPS 세포와 달리 STAP 세포는 ES 세포의 그것과 차별화되는 다능성⁶의 신규한 준안정 상태를 나타낼 수 있다. STAP 줄기 세포 기술은 신세대 재생 의학의 다용도의, 강력한 자원을 제공할 수 있다.

[0397] 세포 운명 전환의 흥미로운 현상이 본원에 기술되어 있다: 체세포는 아치사 자극, 예컨대 저-pH 노출⁴을 겪은 후 다능성을 회복한다. 지라 CD45⁺ 세포 (수입된 T 세포를 포함함)가 30분 동안 pH5.7에 노출되고 후속하여 LIF의 존재 하에 배양되는 경우, 생존 세포의 상당 부분이 2 일째 (d2) 다능성 세포 마커 Oct3/4를 발현하기 시작한다. d7까지, 다능성 세포 클러스터는 진정한 다능성 마커 프로파일 및 세 개의 배엽 분화에 대한 기능을 형성한다 (예를 들어 테라토마 형성에 의해 나타난 바와 같음). 이러한 STAP 세포는 또한 효율적으로 키메라 마우스에 기여하고 배반포 주입 분석에서 생식선 전이를 진행할 수 있다. 이러한 특징은 ES 세포의 것과 유사한 한편, STAP 세포는 적어도 그것의 자기재생에 대한 제한된 능력 (통상적으로 최대 3-5 패시지) 및 분리 배양⁴에 대한 그것의 취약성에 있어서 ES 세포와 상이한 것으로 나타난다.

[0398] 본 실시예에서, 본 발명자는 배반포⁷⁻⁹에서의 세포의 2 개의 주요 카테고리로서의 그것의 분화 잠재력에 초점을 두어 STAP 세포의 독특한 특징을 추가로 탐구하였다: 배반포 주입 분석 후 내부 세포 매스-유형 (또는 ES 세포-유사) 세포 및 영양막/태반-계통 세포는 예상외의 발견을 보여주었다. 일반적으로 주입된 ES 세포의 자손은 키메라의 배아 부분에서, 드물게는 태반 부분⁷에서 발견된다 (데이터를 나타내지 않음). 놀랍게도, 주입된 STAP 세포는 배아뿐만 아니라 태반 및 배외막에도 기여한다 (도 22). 이러한 이중-계통 기여는 대략 키메라 배아의 60%에서 관찰되었다.

[0399] 이러한 발견은 STAP 세포의 영양막 분화 능력의 조사를 촉진시켰다. 영양막 세포주 (영양막 줄기 세포; TS 세포)^{8,9}는 FGF4의 존재 하에 배반포의 연장된 부착 배양에서 유래될 수 있다. STAP 세포 클러스터가 동일한 조건 (도 23A; 96-웰 플레이트에서 웰 당 하나의 클러스터) 하에 배양되는 경우, 회전타원체형 STAP 세포 클러스터는 점진적으로 사라졌고, STAP 세포와 구별되는 평평한 외관을 가진 세포가 성장하여 d7-d10까지 군체를 형성하였다 (데이터를 나타내지 않음). 높은 수준의 *oct3/4*:GFP 발현을 가지는 STAP 세포와 달리, 이러한 평평한 세포 (플레이트 바닥에 부착됨)는 FGF4를 사용한 배양의 7 일째 보통의(moderate) GFP 신호를 나타내었다 (데이터를 나타내지 않음). 면역염색은 FGF4-유도 (F4I) 세포가 보통 수준의 *oct3/4*:GFP뿐만 아니라 영양막 마커¹⁰⁻¹² 인 테그린 알파 7 및 에오메소터민(Eomesodermin) (데이터를 나타내지 않음)을 강하게 발현하는 것을 나타내었다. Nanog의 발현은 검출 가능하나 상당히 적었다 (데이터를 나타내지 않음). 이와 부합하여, qPCR 분석은 F4I 세포가 상당한 수준의 영양막-계통 마커 유전자 (예를 들어 *cdx2*)를 발현하고, 한편 *oct3/4* 및 *nanog*의 발현은 부모 STAP 세포에서 보이는 것보다 낮음을 나타내었다 (도 23B). 이러한 F4I 세포는 3일마다 트립신 소화 (trypsin digestion)로 패시징함으로써 효과적으로 팽창될 수 있었고, 이는 FGF4 (그것의 부재시, 이들은 증식을 중지함)의 존재 하에 30 번 초과 패시지에 대해 안정하게 유지되었다. 한편 이러한 수립 및 팽창이 MEF 세포 및 젤라틴-코팅 바닥 모두 상에서 이루어질 수 있었고, MEF 피더(feeder) 상에서 배양된 것들은 보다 투명한 상피 외관을 나타내는 경향을 나타냈다 (데이터를 나타내지 않음).

[0400] 배반포 주입 분석법에서, F4I 세포의 태반 기여가 빈번하게 관찰되었다 (50-60%) (데이터를 나타내지 않음). 키메라 태반에서, F4I 세포는 통상적으로 총 태반 세포의 ~10%에 기여하였다 (도 23C, 레인 1-3; 대조군 ES 세포는 실질적 태반 기여를 하지 않음을 주목, 레인 4-6). 이러한 발견은 STAP 세포가 적어도 영양막 마커 발현 및 태반 기여에 비추어 FGF4 처리를 통해 TS-유사 세포를 생성하는 기능을 가지는 것을 시사한다. TS-유사 세포로의 이러한 유형의 유도가 (유전적 조작을 하지 않는 한)¹¹ ES 세포에서 일반적인 것이 아니기 때문에, 이러한 기능은 ES 세포와 구별되는 STAP 세포의 다른 특징을 나타낼 수 있다.

[0401] 반면, STAP 세포로부터 유래된 F4I 세포는 배반포-유래 TS 세포와 상이한 특징을 가질 수도 있다. 우선, 종래의 TS 세포¹³와 달리, F4I 세포는 보통 수준의 *oct3/4*를 발현했다 (데이터를 나타내지 않음). 또한, TS 세포와 달리, 배반포-주입된 F4I 세포는 또한 기여의 정도는 대체로 낮았지만(데이터를 나타내지 않음) 배아 부분에도 기여했다 (키메라 태반이 관련된 모든 경우에서).

[0402] 총괄적으로, 이러한 관찰은 STAP 세포 개체군이 태반 분화에 대한 그것의 기능과 관련하여 ES 세포와 정성적으

로 다름을 나타낸다.

[0403]

이를 염두에 두고, 배아 계통, 배반포에 존재하는 다른 세포 유형으로의 분화를 조사하였다. ES 세포와 달리, STAP 세포는 제한된 자기재생 능력을 가지고 단일 세포로부터 확장될 수 없다. STAP 세포는 종래의 LIF-함유 배지 (STAP 세포 수립에 사용되는 B27+LIF 배지를 포함함)에서 5 초과의 패시지 (심지어 클러스터의 부분적 분리 배양을 함)에 대해 유지될 수 없었다. 그러나, LIF¹⁵를 가진 ACTH-함유 배지 (이하 ACTH 배지)는 STAP 세포 군체의 성장 속도에 상대적으로 양호한 지지 효과를 가졌다 (데이터를 나타내지 않음). MEF 피더 상의 이러한 배지에서 또는 ACTH 배지에서의 젤라틴(gelatin)에서 배양되는 경우 (도 24A), STAP 세포 클러스터의 일부분 (96-웰 플레이트를 사용하는 단일 클러스터 배양에서 웰의 20-50%에서 통상적으로 발견됨)은 성장을 지속하였다 (데이터를 나타내지 않음). 이러한 성장하는 군체는 마우스 ES 세포의 그것과 유사하였고 높은 수준의 *oct3/4::GFP*를 발현하였다. 부모 STAP 세포와 달리, 7 일간 이 배지에서 배양된 후, 이러한 확장된 군체에서의 세포는, 분리에 내성으로 되고 단일 세포로서 패시지될 수 있었다 (데이터를 나타내지 않음). STAP 세포와 대조적으로, 이러한 개조된 세포는 ES 세포와 같이, 배양의 120 일 이상까지 기하급수적으로 팽창할 수 있었다(도 24B). 멀티-컬러 FISH 분석¹⁶에 의해 나타난 바와 같이, 이러한 향상된 팽창성(expandability)은 염색체 이상을 동반하지 않았다. 7-일 팽창 이후, 세포는 성장하였고 시험된 ES 세포 배지 중 임의의 것에서 유지될 수 있었고, 한편 이러한 초기 7-일 팽창은 ACTH 배지에서 가장 효율적으로 이루어졌다 (예를 들어, 군체는 3i 배지¹⁷에서 천천히 덜 빈번하게 형성되었다; 데이터를 나타내지 않음).

[0404]

이하에서, STAP 세포로부터 유래된 증식하는 세포는 STAP 줄기 세포로 지칭한다. STAP 세포와 달리, STAP 줄기 세포는 FGF4를 갖는 배양액에서 TS-유사 세포를 생성하지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). 면역염색을 통해, 암컷 STAP 세포 (ref)의 상당한 비율에서 발견된 X-염색체 불활성화¹⁸가 STAP 줄기 세포에서는 더 이상 관찰되지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). STAP 줄기 세포는 다양한 RNA (도 24C) 및 ES 세포에 대한 단백질 (데이터를 나타내지 않음) 마커를 발현하였다. CD45⁺에서 STAP 세포로의 전환시 탈메틸화되는, *oct3/4* 및 *nanog* 위치에서의 DNA 메틸화 수준은 낮게 유지되었다 (도 24D). 분화 배양액¹⁹⁻²¹에서 STAP 줄기 세포는 외배엽, 중배엽 및 내배엽 유도체를 생성하였다 (데이터를 나타내지 않음). 이러한 발견은 STAP 줄기 세포가 ES 세포와 구별되지 않는 특징을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0405]

이와 부합하여, STAP 줄기 세포는 심지어 다수의 패시지 후에도 테라토마를 형성할 수 있고 (데이터를 나타내지 않음), 배반포 주입에 의해, 키메라 마우스에 효과적으로 기여한다 (데이터를 나타내지 않음). 그것의 배아 기여도에 있어서의 STAP 줄기 세포의 현저한 효능은 사배체 상보성 분석⁵에서 이들 세포가 성체로 성장하고 심지어 새끼를 생성할 수 있는 마우스를 발생시킬 수 있다는 사실에 의해 명백하게 입증되었다. STAP 줄기 세포의 여덟 개의 독립적인 주(line)가 재현적으로 이러한 능력을 나타내었음을 고려할 때 (이러한 완전한 상보성은 대개 일반적으로 사용되는 ES 세포주로는 곤란하다는 것을 주목), 본 발명자는 성체 체세포로부터 유래되는 STAP 세포가 이러한 면에서 배반포 그 자체와 동등하게 (또는 아마도 더 우수하게) 다능성 줄기 세포주의 유도에 대해 매력적인 공급원일 수 있다고 추론한다.

[0406]

중요하게는, STAP 및 F4I 세포와 달리, STAP 줄기 세포는 태반 조직에 기여하는 그것의 능력을 잃어버린 것으로 보이는 (데이터를 나타내지 않음) 반면, 키메라에서는 다양한 조직을 발생시켰다 (도 25A-25B). 따라서, STAP 세포 및 STAP 줄기 세포 사이의 상이점은 단순히 자기재생 활성으로 제한되지 않으며, 태반 계통으로 분화하는 기능의 상실과도 관련된다.

[0407]

이러한 발견은 STAP 세포의 독특한 다능성 상태를 나타낸다. 단일 세포로부터 STAP 세포로의 복제 불능은(전술한) 단일-세포 수준에서 수임도 분석(commitment analysis)을 방해하는 한편, STAP 과정은 체세포를 배아 및 태반 계통 모두에 대한 기능을 갖는 다능성 세포 개체군으로 전환할 수 있다는 것은 주목할 가치가 있다. STAP 세포의 분화 상태의 상세한 이해는 미래 연구의 중요한 주제이다. 특별하게는, 상실기에서의 배아 세포와 유사한, 태반 계통에 대한 그것의 기능에 의해 시사되는 바와 같이, STAP 세포가 ES 세포보다 더 미성숙한 상태를 나타내는지를 조사하는 것은 흥미로운 것이다. 최근의 연구는 종래 ES 세포 배양액이 또한 초조기 단계 배아²²의 특징과 유사한 뚜렷한 특징을 가진 Oct3/4⁺ 세포의 매우 소수의 개체군을 함유한다고 보고한 바 있다. STAP 세포는 이중-기능 능력(dual-competence capacity)을 가능하게 하는 유사한 준안정 상태(metastable state)를 가질 수 있지만, ES 세포와는 달리, 이것은 대다수의 세포 개체군에서 발견된다.

- [0408] STAP 세포는 ES-유사 다능성 줄기 세포주로의 형질전환에 대한 능력을 가짐은 본원에서 입증된다. (암컷 마우스로부터의) STAP 세포는 X-염색체 불활성화에 있어서 다소 모자이크적이고; 불활성화는 STAP 세포의 ~40%에서 사라지는⁴ 한편 나머지는 그것을 유지한다. ES 세포에서, 대조적으로 두 X-염색체는 재현적으로 활성화된다. 흥미롭게도, 유도 후, STAP '줄기' 세포는, ES 세포와 같이, X-염색체 불활성화를 나타내지 않으며, 이는 부모 STAP 세포에서의 후성유전적 제어가 이러한 의미에서도 마우스 ES 세포의 그것과 동일하지는 않으나 유사함을 시사한다.
- [0409] 본 결과는 아치사(sublethal) 자극에의 노출시 미성숙 세포(naive cell)로 이들 자신의 운명을 리프로그래밍하는 수입된 체세포의 예상치 못한 '자발적 전환 능력'을 입증한다. 이는 상기 기술된 것을 포함하는 다수의 흥미롭고 심오한 생물학적 질문을 제시한다. 이들 외에, 이러한 새롭게 발견된 STAP 현상은 줄기 세포 의약에서의 방법론을 변혁시킬 수 있다. 다양한 유형의 조직의 생성이 유전자 트랜스퍼 (암성 형질전환의 위험을 증가시킬 수 있음) 없이 체세포로부터 유래되는, STAP 세포, 또는 STAP 줄기 세포로부터의 이끌어진 분화에 의해 가능할 수 있다고 여겨진다. 또한, iPS 세포 전환과 달리, STAP 전환은 상당히 높은 빈도로 발생되고 강한 자극 예컨대 저-pH 노출에 의해 야기되는 특정 내재적 프로그램(endogenous program)에 의해 진행된다. ES 세포와 같이 STAP 줄기 세포는 용이하게 팽창가능하고 복제될 수 있기 때문에, 이는 엄격한 품질 제어 하에 의약적으로 유용한 조직의 대량 생산에 대해 STAP 세포보다 더 적합할 것이다. 본 발명자의 예비적 연구에 있어서, 본 발명자는 망막 전구(retinal progenitor), 피질 전구(cortical progenitor) 및 박동 심장근세포²⁵(beating cardiomyocyte)로의 STAP 줄기 세포의 효과적인 분화를 입증하는데 성공하였다 (데이터를 나타내지 않음).
- [0410] **방법**
- [0411] **세포 배양.** STAP 세포를 저-pH 용액에의 일시적인 노출 후 B27 + LIF 배지에서 배양에 의해 CD45⁺ 세포로부터 생성하였다 (Obokata et al, 2013; co-submitted). F4I 세포주 수립을 위해, STAP 세포 클러스터를 96-웰 플레이트 내 MEF 피더 셀(MEF feeder cell) 상의 FGF4-함유 TS 배지에 트랜스퍼했다. 상기 세포를 종래의 트립신 방법을 사용하여 d7-d10 동안 첫번째 패시지를 하였다. STAP 줄기 (STAP) 세포주의 수립을 위해, STAP 구체를 MEF 피더 또는 젤라틴-코팅 디쉬 상의 ACTH-함유 배지에 트랜스퍼했다. 4 내지 7 일 이후, 세포를 종래의 트립신 방법을 사용하여 첫번째 패시지를 하였고, 현탁시킨 세포를 5% FCS 및 1% KSR을 함유하는 ES 유지 배지에 플레이트팅했다.
- [0412] **키메라 마우스 생성 및 분석.** STAP 줄기 세포, F4I 세포 및 ES 세포의 주입을 위해, 종래의 배반포 주입법을 사용하였다. STAP 세포 주입을 위해, 트립신 처리는 낮은 키메라성을 야기하기 때문에 STAP 세포 클러스터를 일괄 주입하였다. STAP 구형 군체를 현미경 하에 마이크로나이프를 사용하여 작은 조각으로 자르고, 이후 STAP 군체의 작은 클러스터를 큰 피펫에 의해 4.5-일 배반포로 주입하였다. 다음 날, 키메라 배반포를 2.5-일 가임 싹 암컷 내로 트랜스퍼했다. 사배체 배아를 2-세포 배아의 전기융합에 의해 생성하였다.
- [0413] **생체의 및 생체내 분화 분석법:** 테라토마 형성을 STAP 세포의 1×10^5 세포를 4 주생 NOD/SCID 마우스의 등부위 측부로 피하 주입함으로써 조사하였다. 생체의 신경 분화를 SDIA and SFEBq 방법^{24,26}에 의해 유도하였다. 생체의 내배엽성중배엽(endomesodermal) 분화²⁵를 성장 인자 (Activin) 또는 10% FCS를 가진 STAP 세포 응집체를 배양시킴으로써 유도하였다.
- [0414] **핵형 분석(karyotype analysis).** 충만상태의 STAP 세포(Subconfluent STAP cell)를 콜세미드(colcemid)에 의해 중기에서 정지시키고 멀티컬러 FISH 분석 (M-FISH)을 수행하였다. 마우스 염색체-특이적 페인팅 프로브를 7 개의 상이한 형광색소를 사용하여 조합하여 라벨링하고 이전에 기술된 바와 같이 혼성화(hybridized)하였다 (Jentsch et al, 2003).
- [0415] **세포 배양.** STAP 세포를 CD45⁺ 세포로부터 생성하고, 이전에 기술된 바와 같이 (Obokata et al, 2013; co-submitted), 7 일간 B27 + LIF에서 배양하였다. F4I 세포주 수립을 위해, STAP 세포 클러스터를 96-웰 플레이트 내의 MEF 피더 셀 상의 FGF4-함유 TS 배지에 트랜스퍼했다. 세포를 종래의 트립신 방법을 사용하여 d7-d10 동안 첫 패시지를 시켰다. 후속 패시지는 3일마다 수행하였다.
- [0416] STAP 줄기 (STAP) 세포주 수립을 위해, STAP 구체를 MEF 피더 셀 상의 ACTH-함유 배지로 트랜스퍼했다. 4 내

지 7 일 후, 세포를 종래의 트립신 방법을 사용하여 첫 패시지를 시켰고, 현탁된 세포를 5%FCS 및 1%KSR를 함유하는 ES 유지 배지에 플레이팅했다. 후속 패시징을 2일마다 수행하였다.

[0417] *키메라 마우스 생성 및 분석.* 이배체 및 사배체 키메라의 생성을 위해, 이배체 배아를 ICR종 수컷과 교배된 ICR종 암컷으로부터 얻었고 사배체 배아를 BDF1 수컷과 교배한 BDF1종 암컷으로부터 얻었다. 사배체 배아를 2-세포 배아의 전기융합에 의해 생성하였다. STAP 줄기 세포, F4I 세포 및 ES 세포의 주입을 위해, 종래의 배반포 주입 방법을 사용하였다. STAP 줄기 세포 주입을 위해, 트립신 처리가 낮은 키메라성을 야기하기 때문에 STAP 세포 클러스터를 일괄 주입하였다. STAP 구형 군체를 현미경 하에서 마이크로나이프를 사용하여 작은 조각으로 절단하였고, 이후 STAP 군체의 작은 클러스터를 큰 피펫에 의해 4.5-일 배반포에 주입하였다. 다음 날, 키메라 배반포를 2.5-일 가임신 암컷 내로 트랜스퍼했다.

[0418] *생체의 및 생체내 분화 분석:* STAP-S 세포의 1×10^5 세포를 4주생 NOD/SCID 마우스의 등부위 측부로 피하 주입하였다. 6주 후, 이식체를 채취하고, 조직학적으로 분석하였다. 이식체를 10% 포르말데히드로 고정시키고, 파라핀에 포매시키고, 4- μ m 두께로 일반적으로 처리하였다. 절단면을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

[0419] 생체의 신경 분화를 SDIA 및 SFEBq 방법에 의해 유도하였다. 생체의 내배엽 분화를 성장 인자 (Activin) 또는 10% FCS를 갖는 STAPS 세포 응집체를 배양시킴으로써 유도하였다.

[0420] *면역염색.* 세포를 15 분간 4% PFA로 고정시키고 0.5% Triton X-100으로 투과화한 후, 1차 항체로 배양하였다: 항 H3K27me3 (Millipore; 1 :300), 항-Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology; 1 :300), 항-Nanog (eBioscience; 1 :300), 항-KLF2/4 (R&D System; 1:300), 및 항-Esrr β (R&D System; 1:300). 하룻밤 배양시킨 후, 결합된 항체들을 Alexa546 (Molecular Probes)에 컨쥬게이션된 2차 항체로 가시화시켰다. 핵을 DAPI (Molecular Probes)로 염색시켰다.

[0421] *RNA 제조 및 RT-PCR 분석.* RNA를 RNeasy™ Mini kit (QIAGEN)로 분리하였다. 역전사를 SupesACript III First Strand Synthesis kit (Invitrogen)로 수행하였다. Power SYBR™ Green Mix (Roche Diagnostics)를 PCR 증폭을 위해 사용하고, 샘플을 Lightcycler-II™ Instrument (Roche Diagnostics) 상에서 수행하였다.

[0422] *핵형 분석.* 핵형 분석을 Multicolor FISH analysis (M-FISH)에 의해 수행하였다. 중만상태의 STAPS 세포를, 5% CO₂ 37 °C 2.5 시간 동안의 배지로의 콜세미드(최종 농도 0.270 μ g/ml)에 의해 증기에서 정지시켰다. 세포를 PBS로 세정하고, 트립신/에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)으로 처리하고, 세포 배지에 재현탁시키고 1200 rpm으로 5 분간 원심분리하였다. 3 ml의 PBS 내의 세포 펠렛에 대해, 7 ml의 예비가온된 저장성(hypotonic) 0.0375 M KC1 용액을 첨가하였다. 세포를 37 °C에서 20 분간 배양하였다. 세포를 1200 rpm으로 5 분간 원심분리하고 펠렛을 3-5 ml의 0.0375 M KC1 용액에 재현탁시켰다. 세포를 부드러운 피펫팅(gently pipetting)에 의해 메탄올/아세트산 (3: 1; vol/vol)으로 고정하였다. 고정을 글라스 슬라이드에 세포를 살포하기에 앞서 4 회 수행하였다. FISH 과정을 위해, 마우스 염색체-특이적 페인팅 프로브를 7 개의 상이한 형광색소를 사용하여 조합하여 라벨링하고 이전에 기술된 바와 같이 혼성화시켰다 (Jentsch et al, 2003). 각각의 세포주에 대해, 9-15 중기 스프레드(metaphase spread)를 Sensys CCD camera (Photometries, Tucson, AZ)가 구비된 Leica DM RXA RF8 epifluorescence microscope (Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim, Germany)를 사용하여 얻었다. 카메라와 현미경은 Leica Q-FISH 소프트웨어 (Leica Microsystems hanging solutions, Cambridge, United Kingdom)에 의해 제어하였다. 중기 스프레드를 Leica MCK 소프트웨어에 기초하여 처리하고 다색 염색체도(multicolor karyogram)로서 나타내었다.

[0423] *바이설플라이트 시퀀싱.*

[0424] 게놈 DNA를 STAPS 세포로부터 추출하였다. DNA의 바이설플라이트 처리를 제조자의 교시에 따라 CpGenome DNA Modification 키트 (Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>)를 사용하여 수행하였다.

[0425] 생성된 변형된 DNA를 2 개의 정방향 (F) 프라이머 및 하나의 역방향 (R) 프라이머를 사용하여 네스티드 중합효소 연쇄 반응 PCR에 의해 증폭시켰다: *oct3/4* (F1, GTTGTTTGTGTTTGGTTTGGATAT (서열번호:

[0426] 73) ;F2,ATGGGTTGAAATATTGGGTTTATTTA (서열번호

[0427] 74) ;R,CCACCCTCTAACCTTAACCTCTAAC (서열번호75)). 및 *nanog*

[0428] (F1,GAGGATGTTTTTAAGTTTTTTTT (서열번호76);

- [0429] F2,AATGTTTATGGTGGATTTGTAGGT (서열번호77);
- [0430] R,CCCACACTCATATCAATATAATAAC (서열번호78)). PCR을 TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (RR030A)를 사용하여 실시하였다. DNA 시퀀싱을 Genome Resource and Analysis Unit, RIKEN CDB에서 M13 프라이머를 사용하여 수행하였다.
- [0431] **참조**
- [0432] 1. Gurdon, JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol.* **10**, 622-640 (1962)
- [0433] 2. Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. & Yanagimachi, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**, 369-374 (1998).
- [0434] 3. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
- [0435] 4. Obokata et al, Stimulus-Triggered Fate Conversion of Somatic Cells into Pluripotency. *Co-submitted to this manuscript.*
- [0436] 5. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Nation Acad Sci USA* **90**, 8424-8428 (1993).
- [0437] 6. Ohgushi, M. and Sasai, Y. Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states. *Trends in Cell Biology* **21**, 274-282 (2011).
- [0438] 7. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* **134**, 635-646 (2007)
- [0439] 8. Quinn J, Kunath T, Rossant J. Mouse trophoblast stem cells. *Methods Mol Med.* **121**, 125-148 (2006).
- [0440] 9. Rossant J. Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reprod Fertil Dev.* **19**, 111-8 (2007)
- [0441] 10. Tanaka TS, Kunath T, Kimber WL, Jaradat SA, Stagg CA, Usuda M, Yokota T, Niwa H, Rossant J, Ko M S. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.***12**, 1921-1928 (2002)
- [0442] 11. Klaffky E, Williams R, Yao CC, Ziober B, Kramer R, Sutherland A. Trophoblast-specific expression and function of the integrin alpha 7 subunit in the peri-implantation mouse embryo. *Dev Biol.* **239**, 161-175 (2001).
- [0443] 12. Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* **404**, 95-99 (2000).
- [0444] 13. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* **123**, 917-929 (2005)
- [0445] 14. Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, Takahashi K, Niwa H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* **135**, 909-918 (2008).
- [0446] 15. Ogawa, K., Matsui, H., Ohtsuka, S. & Niwa, H. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to cells* **9**, 471-477 (2004).
- [0447] 16. Jentsch I, Geigl J, Klein CA, Speicher MR. Seven-fluorochrome mouse M-FISH for high-resolution analysis of interchromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res.* **103**, 84-88 (2003),
- [0448] 17. Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523 (2008).

- [0449] 18. Murakami K, Araki K, Ohtsuka S, Wakayama T, Niwa H. Choice of random rather than imprinted X inactivation in female embryonic stem cell-derived extra-embryonic cells. *Development* **138**, 197-202 (2011).
- [0450] 19. Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Mizuseki, K., Watanabe, Y., and Sasai, Y. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nature Neurosci.* **8**, 288-296
- [0451] 20. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.-I. and Sasai, Y. (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *Neuron* **28**, 31-40.
- [0452] 21. Gouon-Evans V, Boussemart L, Gadue P, Nierhoff D, Koehler CI, Kubo A, Shafritz DA, Keller G. (2006) BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* **24**, 1402-1411.
- [0453] 22. Macfarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, Lettieri K, Rowe HM, Bonanomi D, Firth A, Singer O, Trono D, Pfaff SL. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* **487**, 57-63 (2012).
- [0454] 23. Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T. and Sasai, Y. (2011) Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* **472**, 51-56.
- [0455] 24. Eiraku, M, Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K. and Sasai, Y. (2008) Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ES cells and its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* **3**, 519-532
- [0456] 25. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* **91**, 189-201 (2002).
- [0457] 26. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.-I. and Sasai, Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *Neuron* **28**, 31-40 (2000)

[0458] 표 6: STAP로부터의 다능성 세포주의 수립

마우스 종	사용된 웰의 수*	수립된 세포주의 수 (%)	다능성 시험 (키메라 형성)
C57BL/6(GOF)	29	29 (100)	있음
129B6F1(GFP)	16	12 (75)	있음
129/Sv (GFP)	2	2 (100)	있음

[0459]

[0460]

* 각각의 웰은 1-4 개의 STAP를 함유함.

[0461]

표 7: 사배체 상보법에 의한 FLS 세포주로부터 STAPS 마우스의 제조

세포주 명	키메라 배아의 수	칼루스 마우스의 수	생존된 것의 수	성체의 수	생식선 전이
FLS-1	31	7	7	4	있음
FLS-2	29	3	2	2	있음
FLS-3	46	8	8	4	있음
FLS-4	46	9	8	2	있음
FLS-5	21	10	9	5	있음
FLS-6	12	4	4	4	있음
FLS-7	21	6	3	3	있음
FLS-8	22	5	2	2	있음
총합	228	52 (22.8)	43 (82.7)	26 (60.5)	
Cont-1	8	5	5	4	있음
Cont-2	21	5	5	4	있음
Cont-3	21	3	1	0	-
총합	50	13 (26.0)	11 (84.6)	8 (72.7)	

[0462]

[0463]

*: 새끼들은 섞여서 충분한 수의 포유모의 부족으로 인해 동일한 모체에서 양육됨

[0464]

표 8: 이배체 배아를 사용한 FLS 세포주로부터 키메라 마우스의 제조

세포주 명	키메라 배아의 수	새끼의 수	키메라의 수				생식선 전이
			총합	매우 높음	높음	낮음	
FLS-1	16	7	6	2	3	1	있음
FLS-2	17	13	9	2	2	5	있음
FLS-3	32	16	12	6	4	2	있음
FLS-4	20	5	4	1	1	2	있음
FLS-5	21	5	4	3	0	1	있음
FLS-6	21	13	7	3	3	1	있음
FLS-7	32	14	11	5	5	1	있음
FLS-8	32	12	8	3	2	3	있음
총합	191	84	62 (73.8)				
Cont-1	16	9	9	6	2	1	있음
Cont-2	18	12	8	3	2	3	있음
Cont-3	18	11	4	0	1	3	있음
총합	52	32	21 (65.6)				

[0465]

[0466]

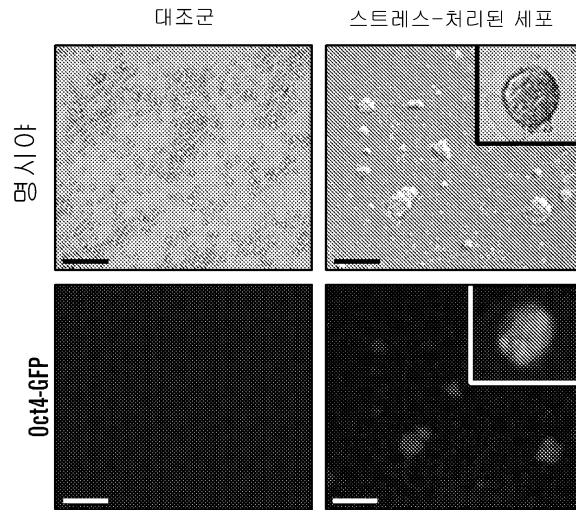
표 9: 세포 특성

	ES	STAP	STAPS
자기-재생	비제한됨	제한됨	비제한됨
키메라 기여도	태아	태아 태반 난황낭	태아
분리 내성	내성 있음	내성 없음	내성 있음

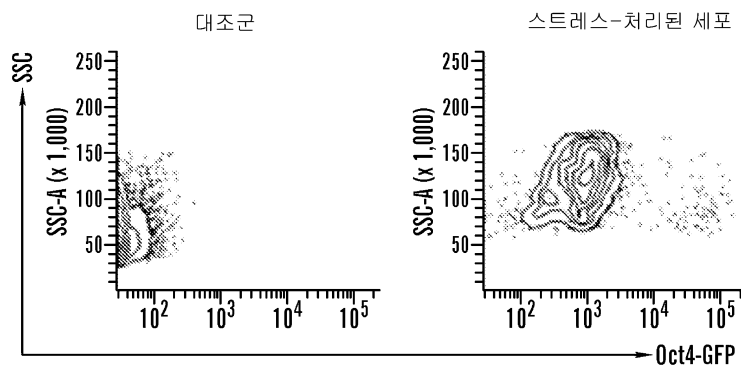
[0467]

도면

도면1a

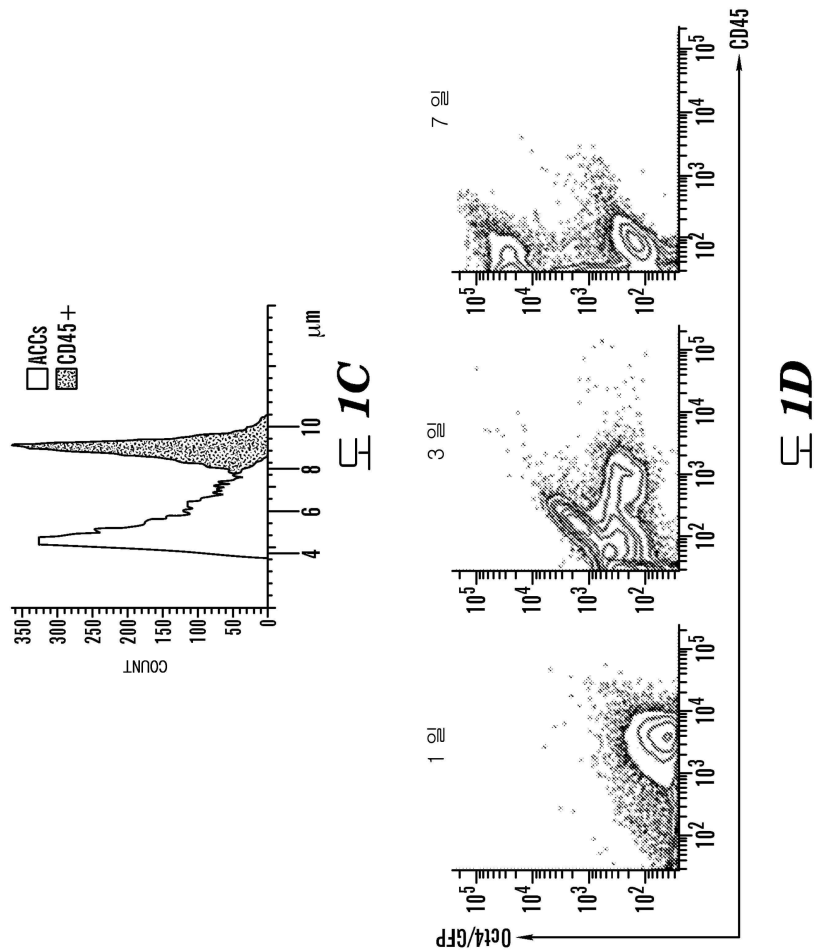


도 1A

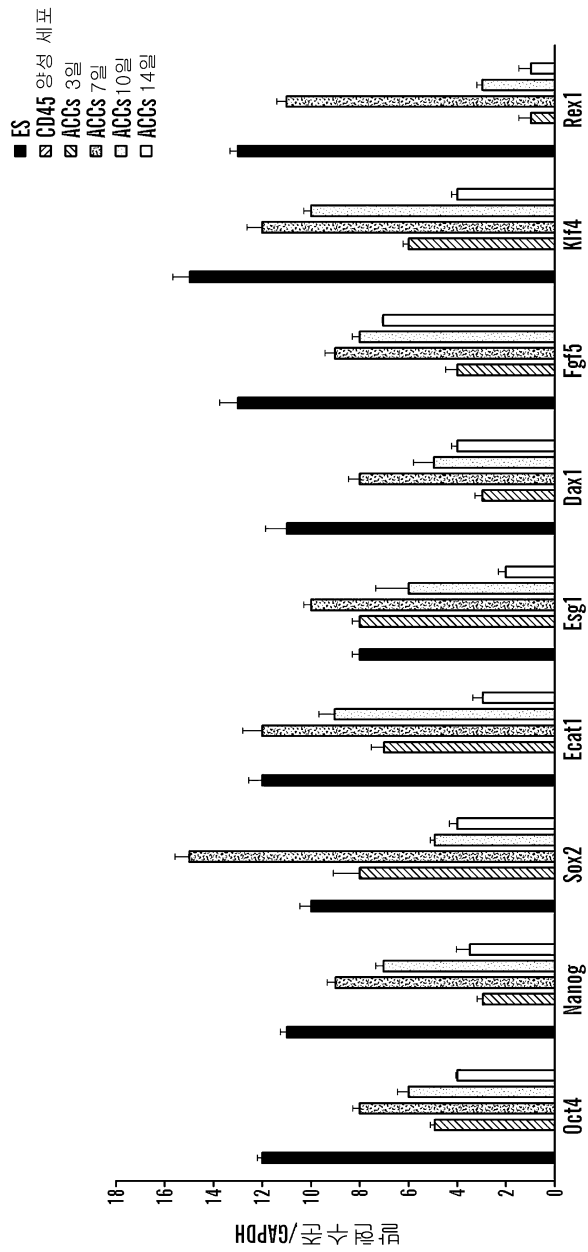


도 1B

도면1c

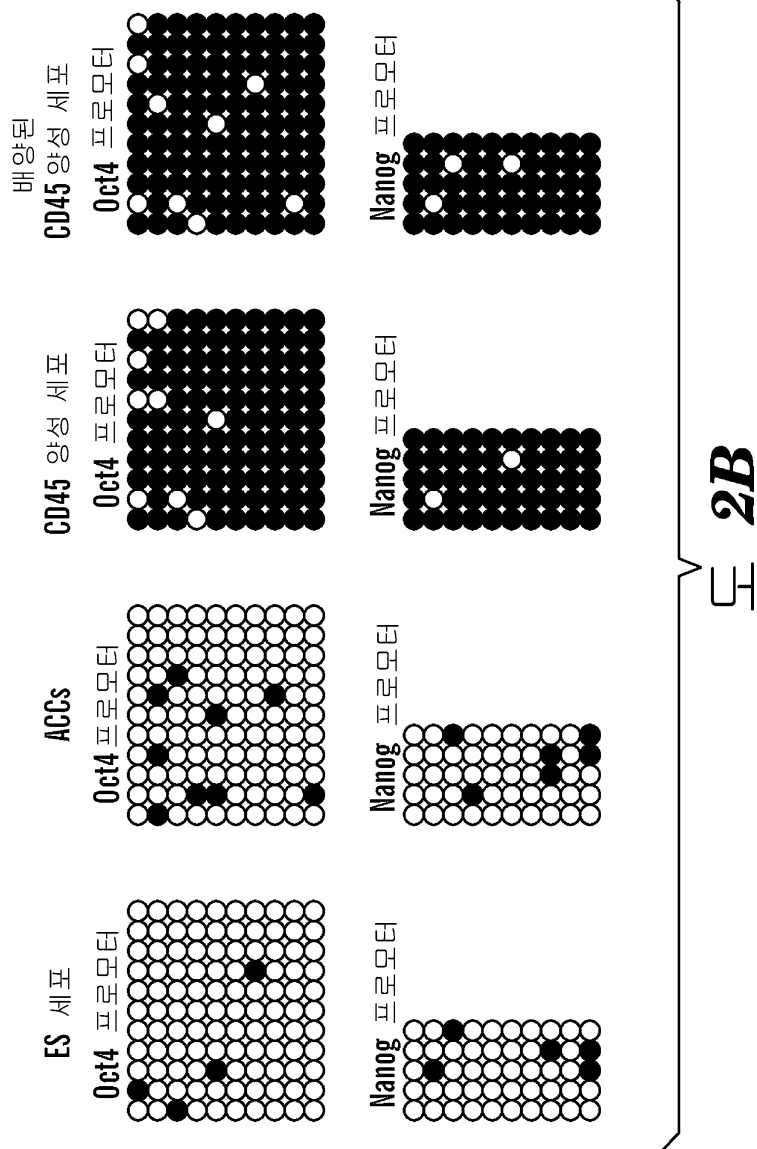


도면2a

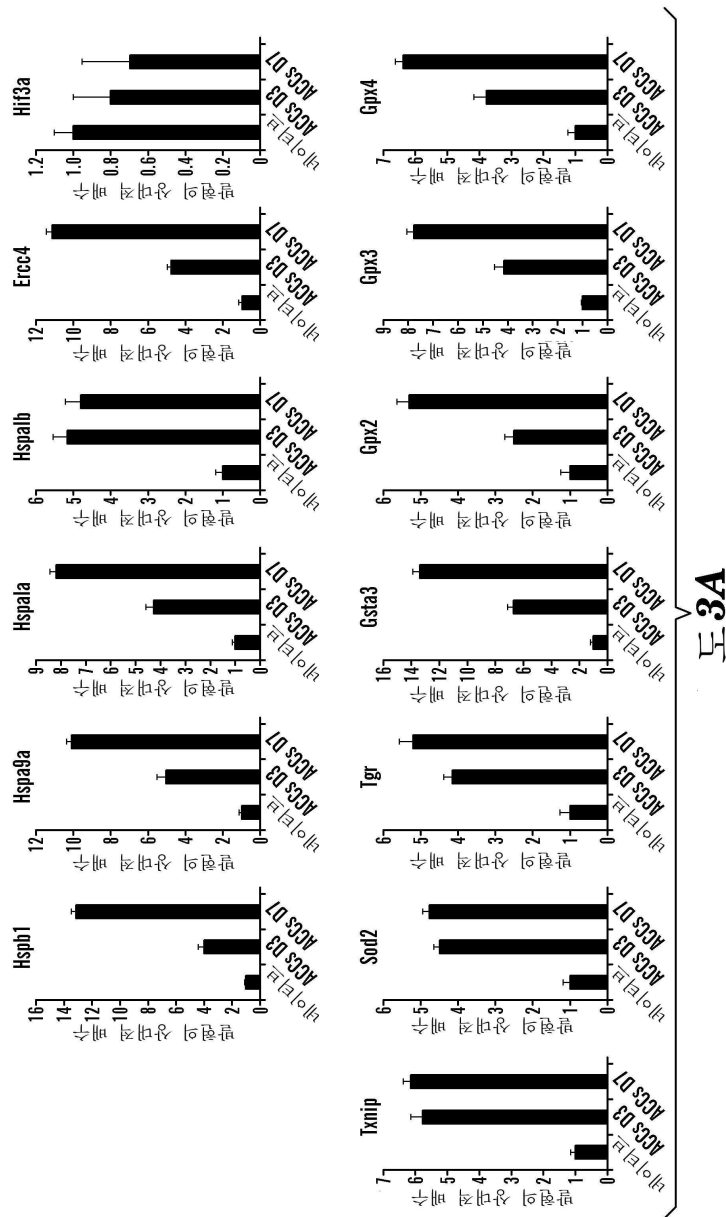


도 2A

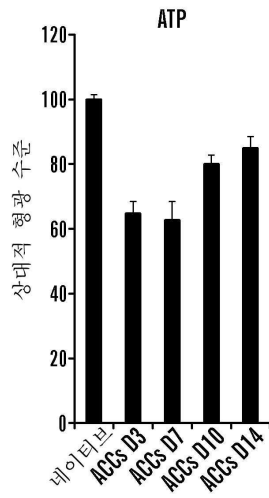
도면2b



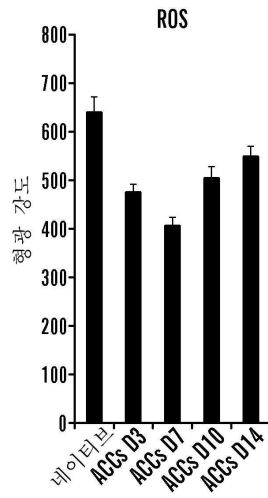
도면3a



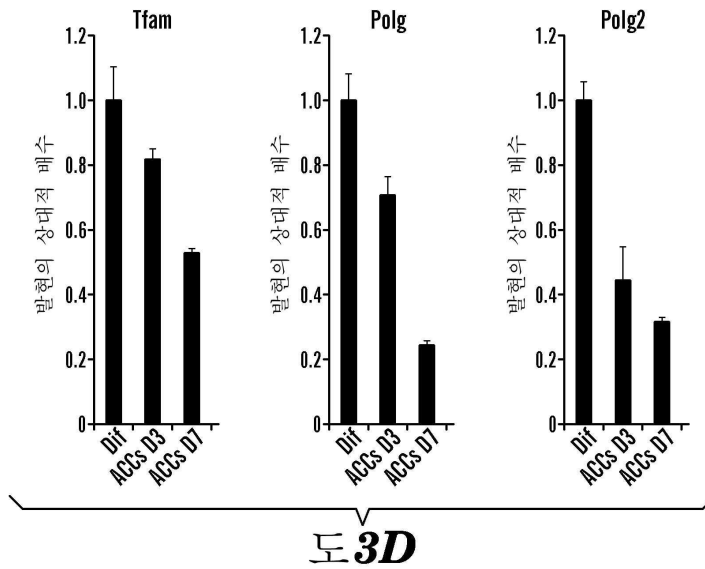
도면3b



도 3B

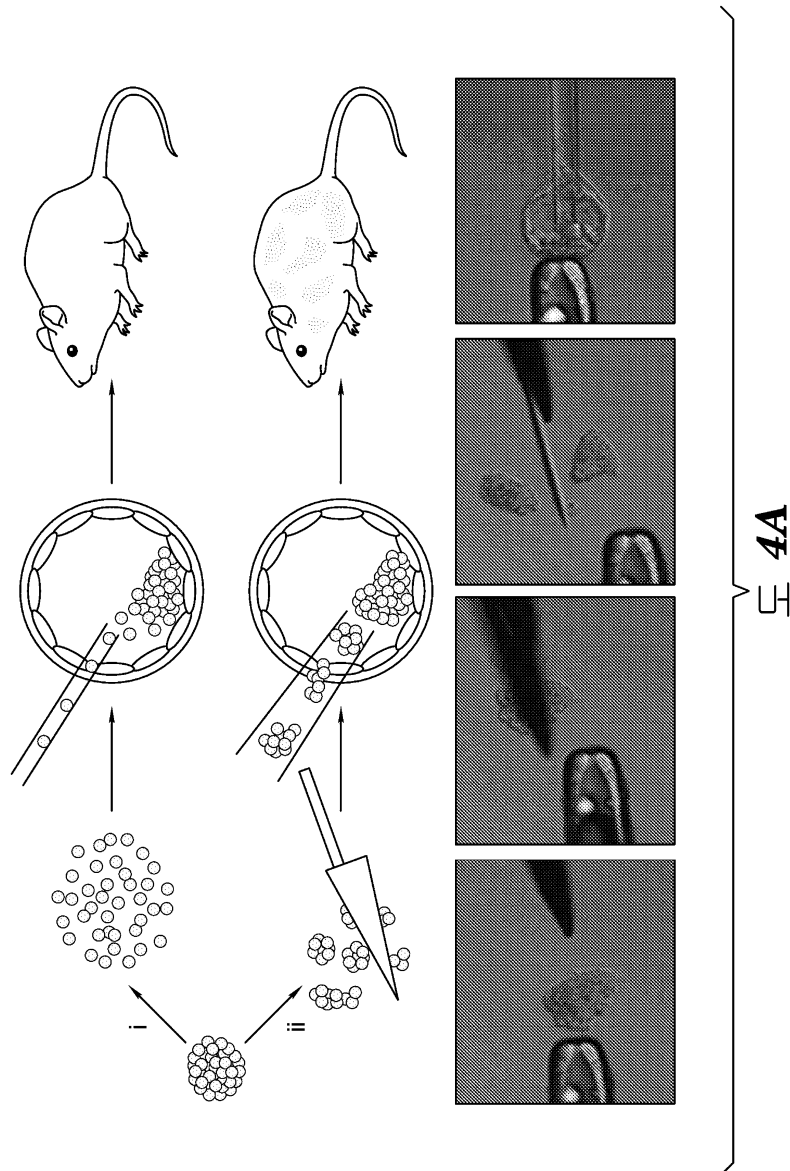


도 3C

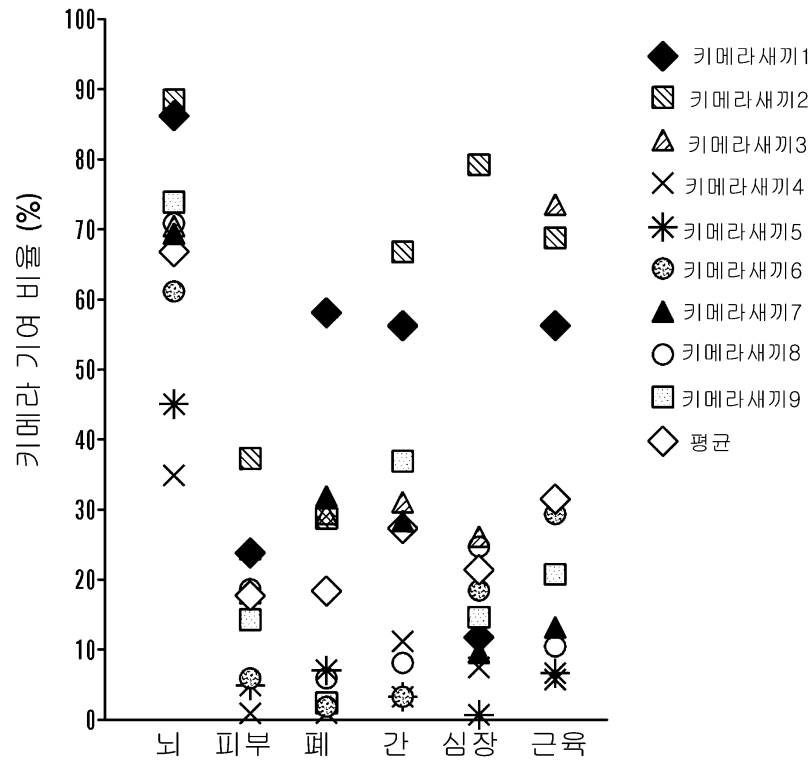


도 3D

도면4a

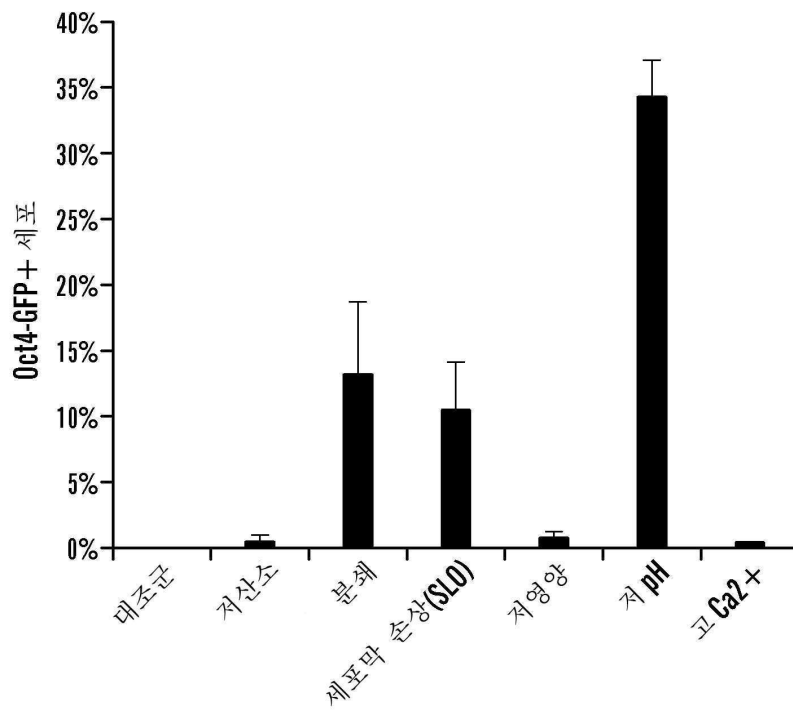


도면4b



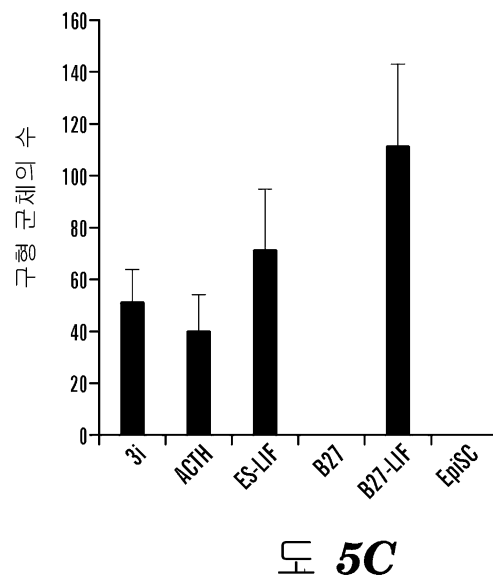
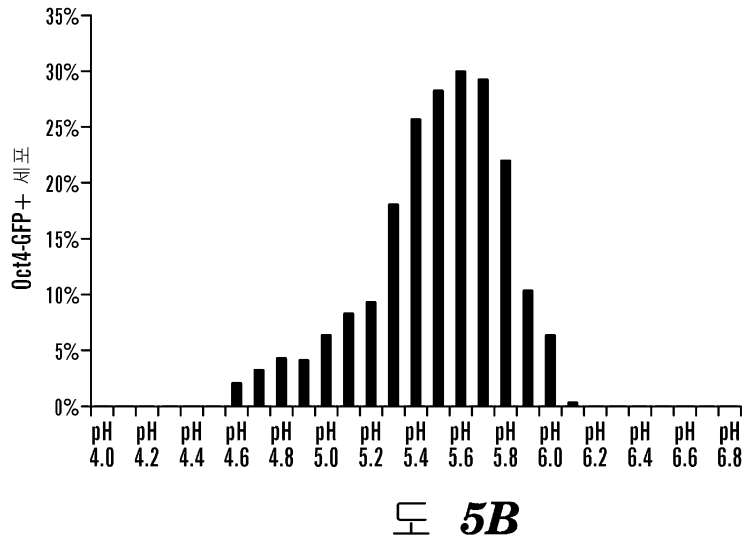
도 4B

도면5a

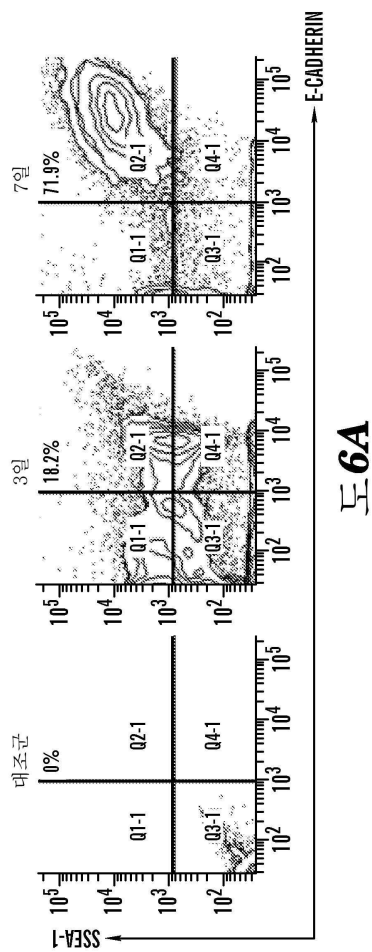


도 5A

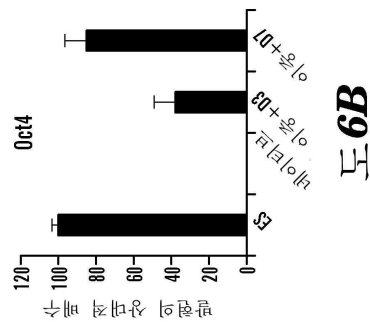
도면5b



도면6a

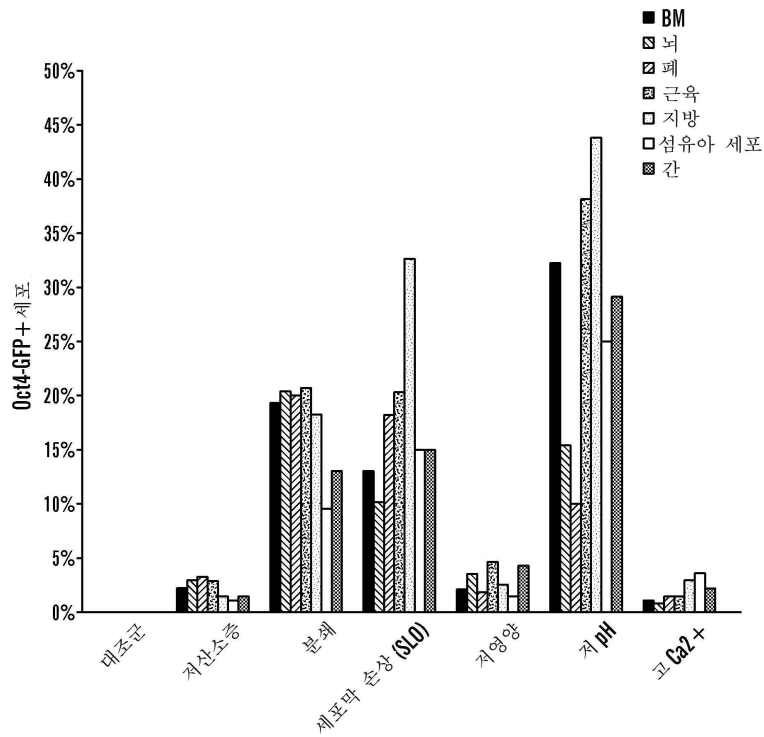


도 6A



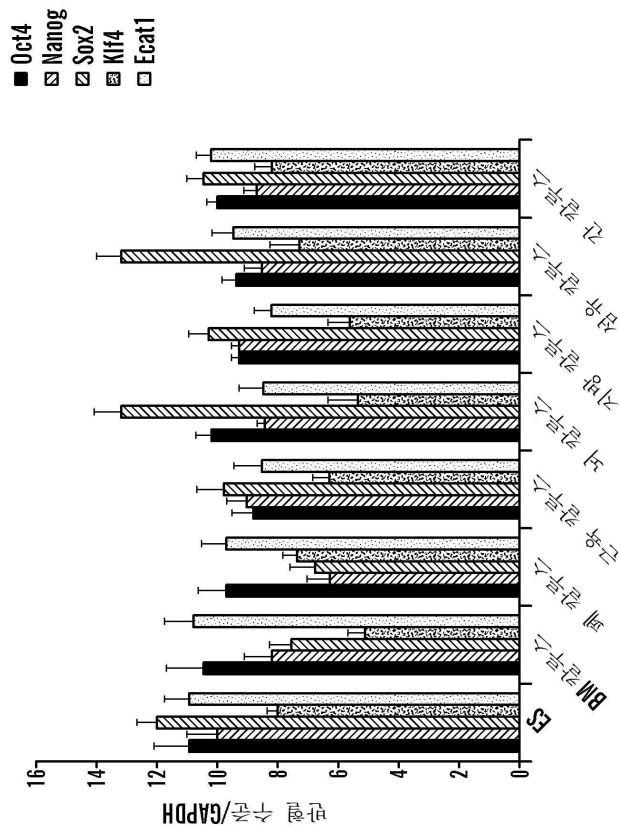
도 6B

도면7a



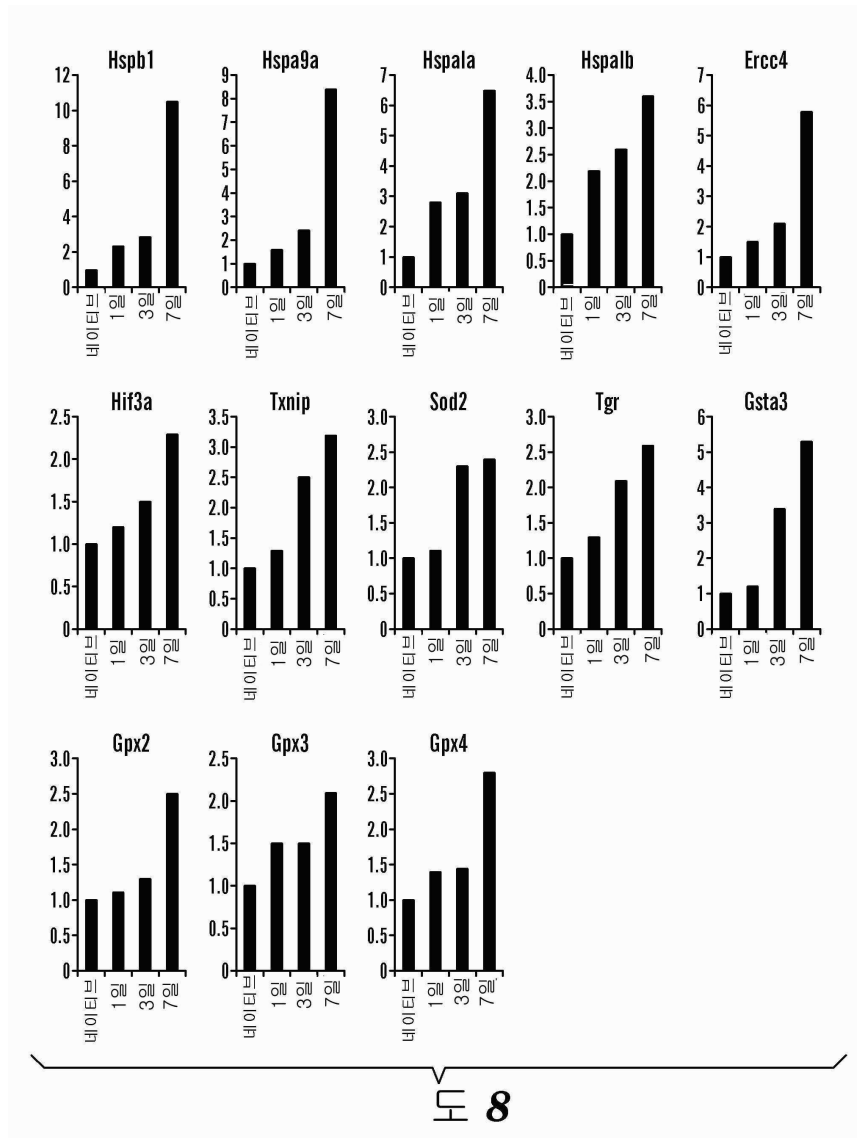
도 7A

도면7b

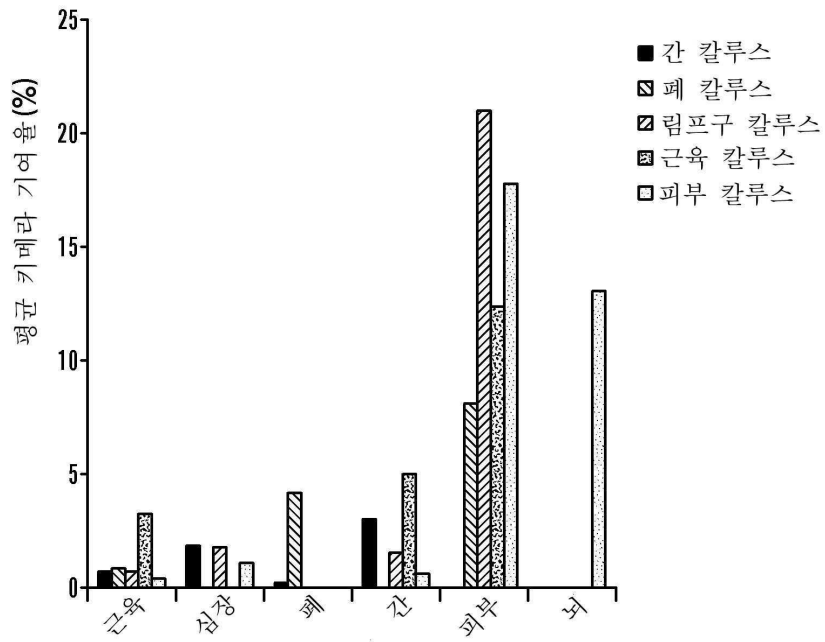


7B

도면8

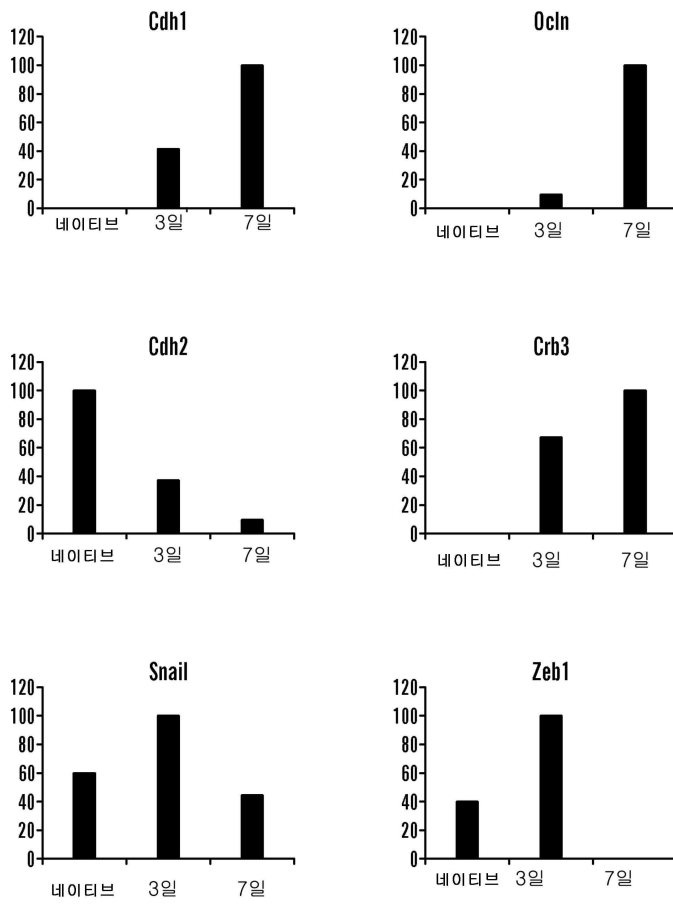


도면9



도9

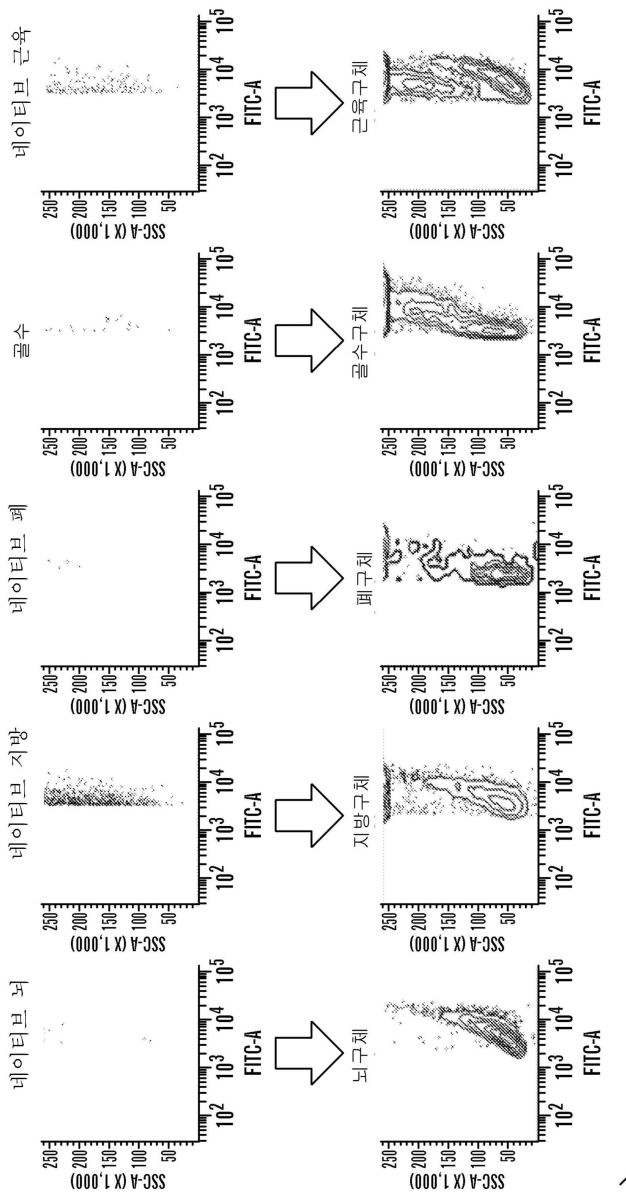
도면10



도 10

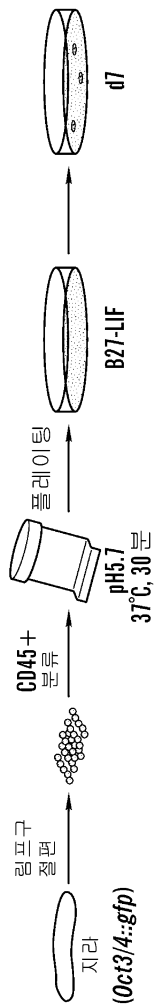
도면11

GFP 발현을 X축에 측면 스케터를 Y축에 플로팅

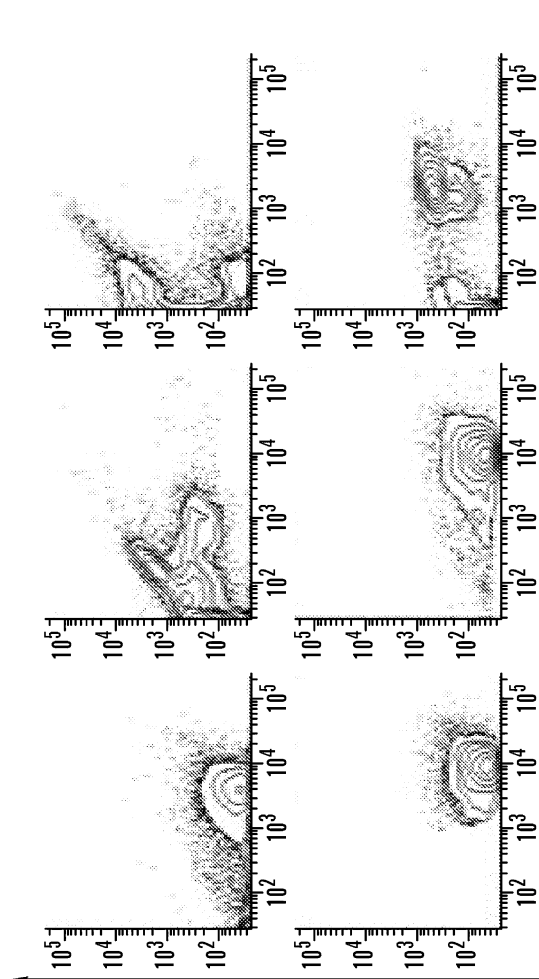


도 11

도면12a

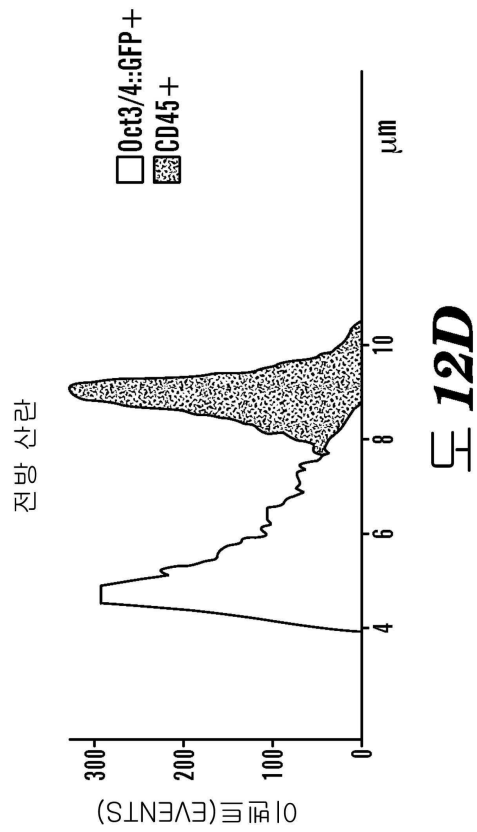
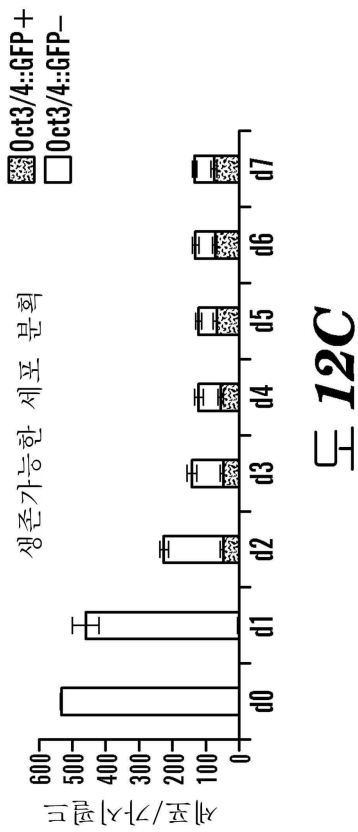


도 12A

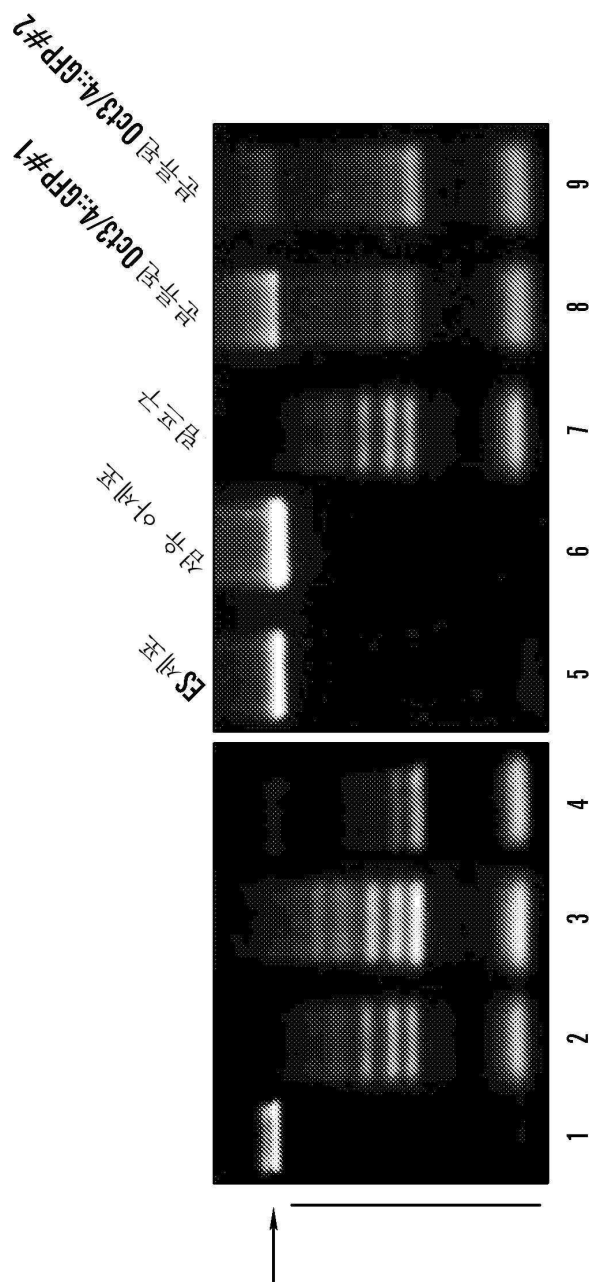


도 12B

도면12c

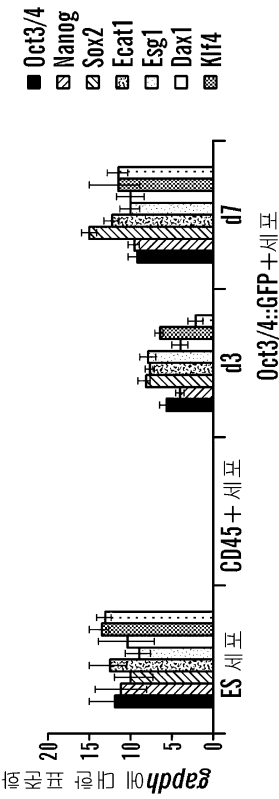


도면12e

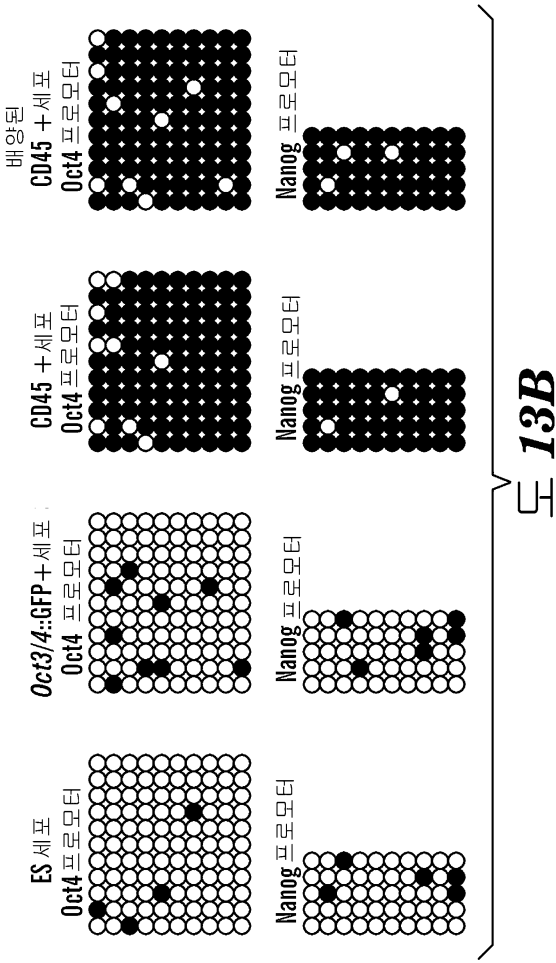


도 12E

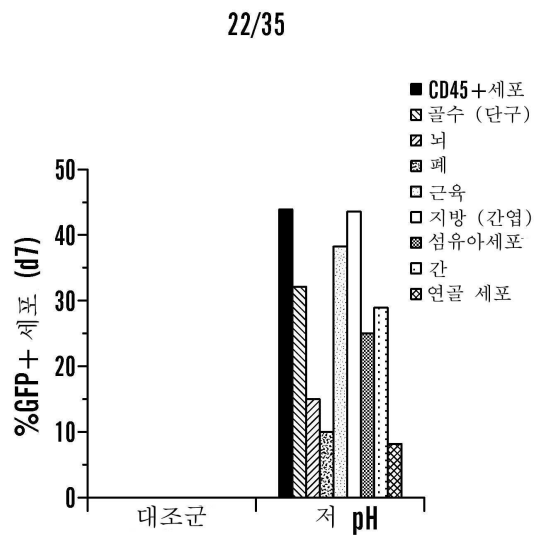
도면13a



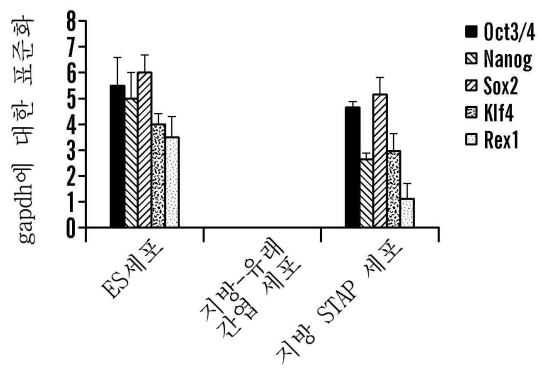
도 13A



도면14a

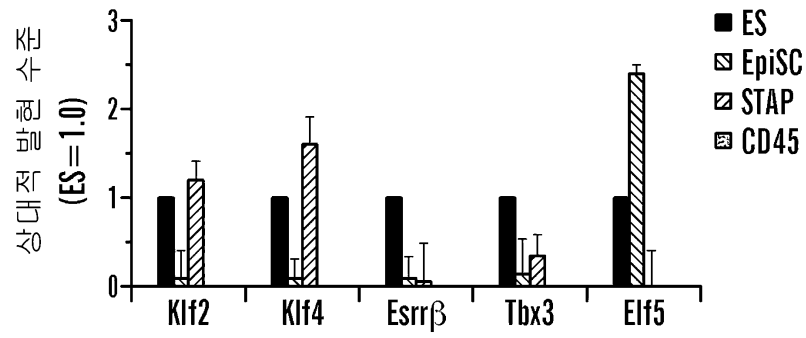


도14A

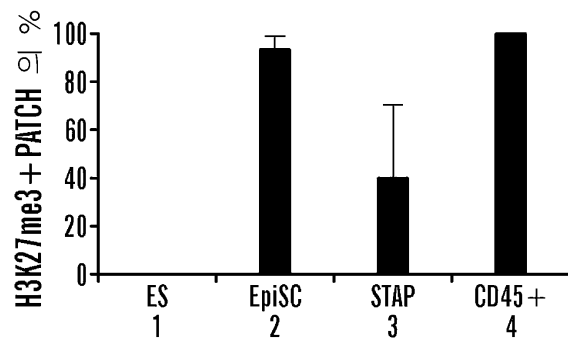


도14B

도면15a

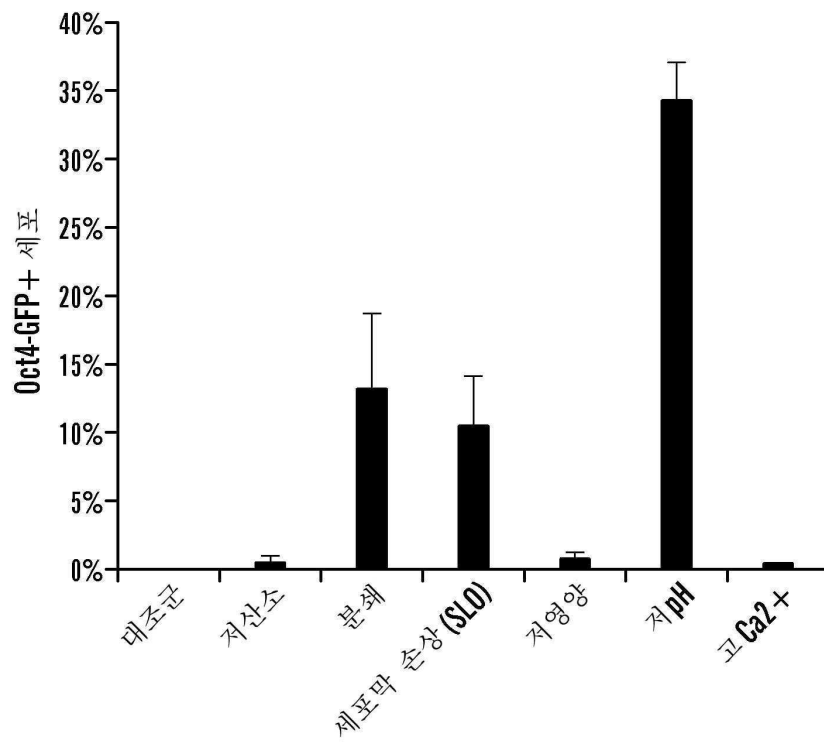


도 15A



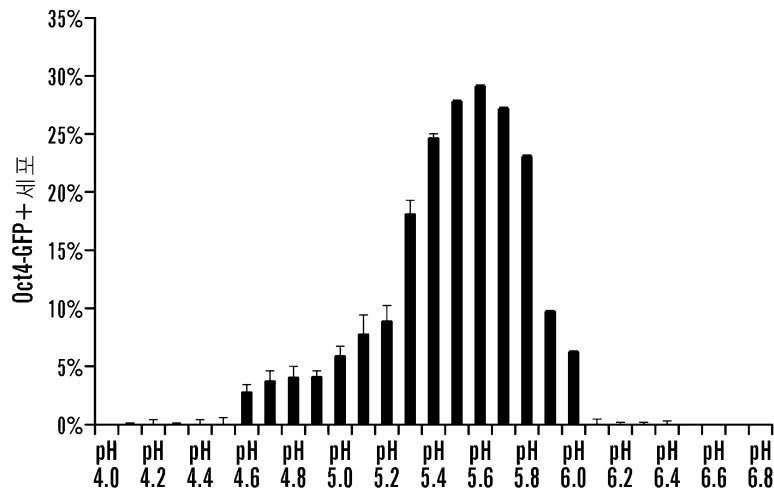
도 15B

도면16a

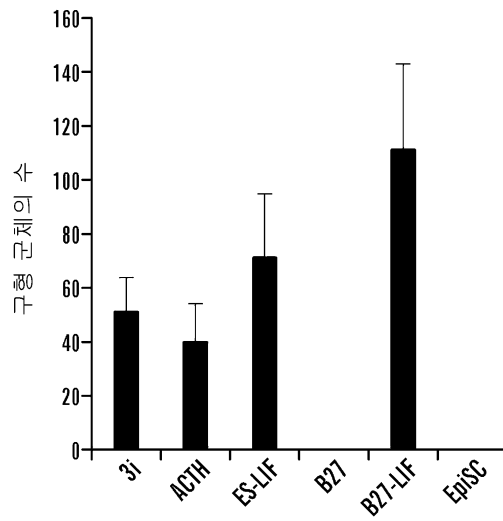


도 16A

도면16b

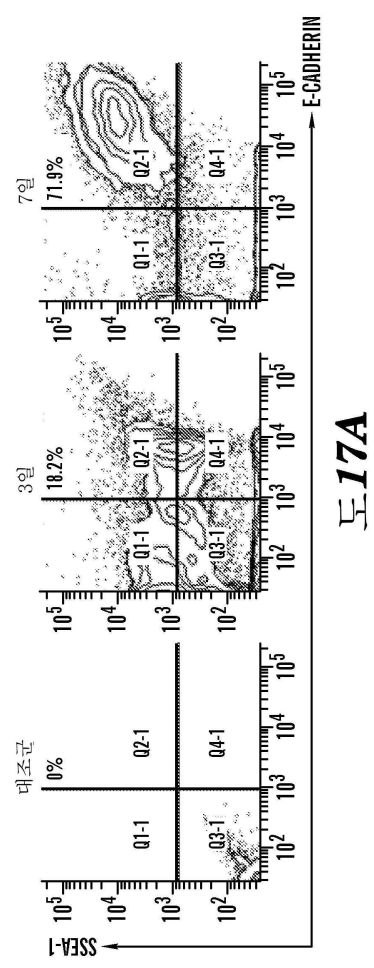


도 16B

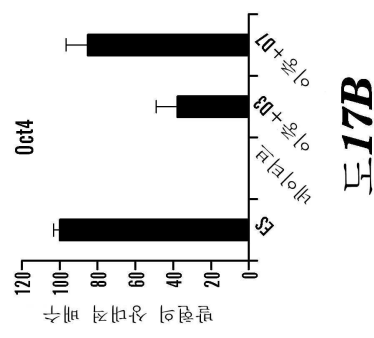


도 16C

도면17a

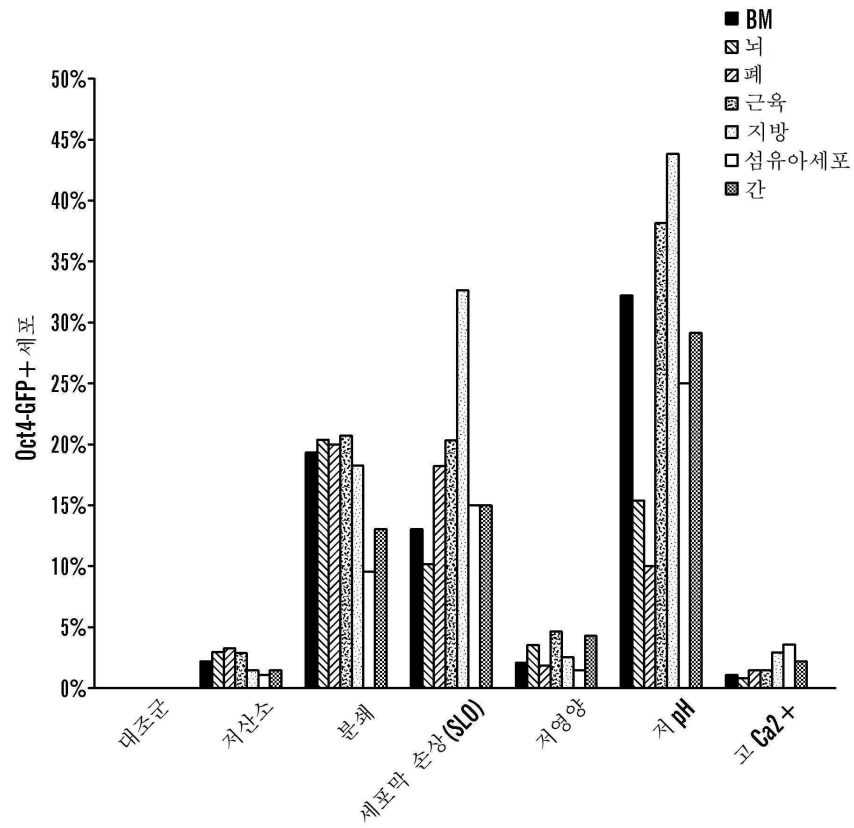


도17A



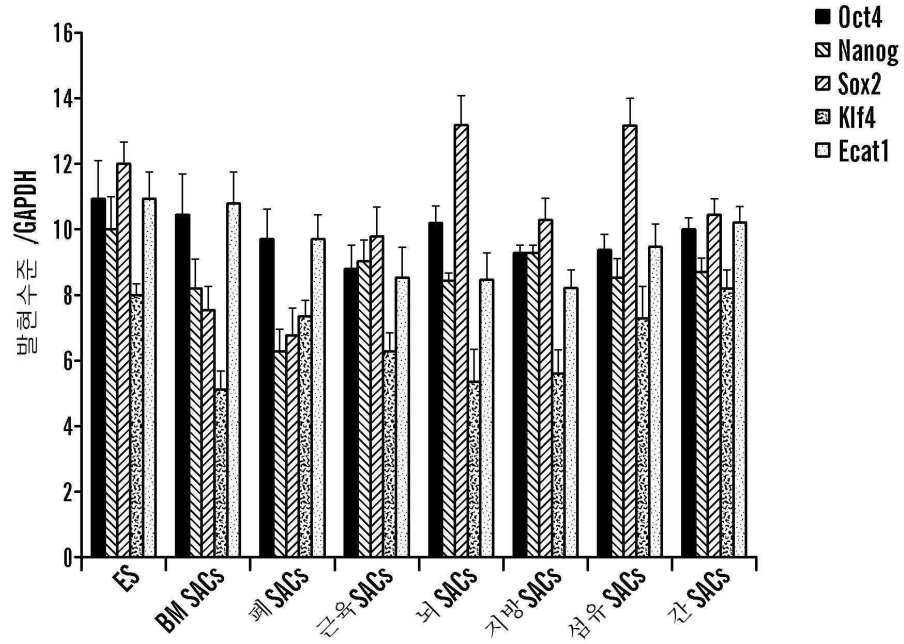
도17B

도면18a



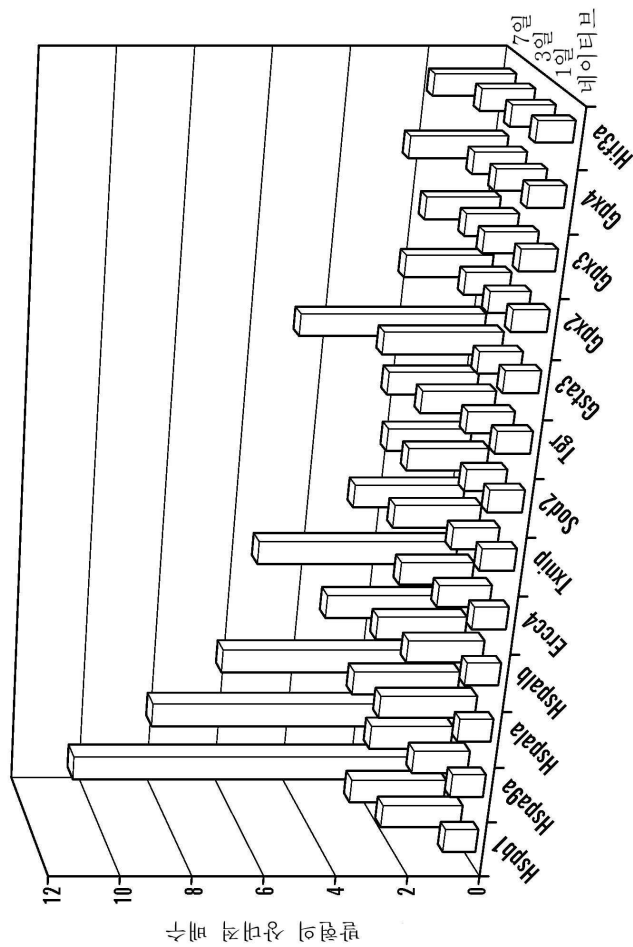
도 18A

도면18b



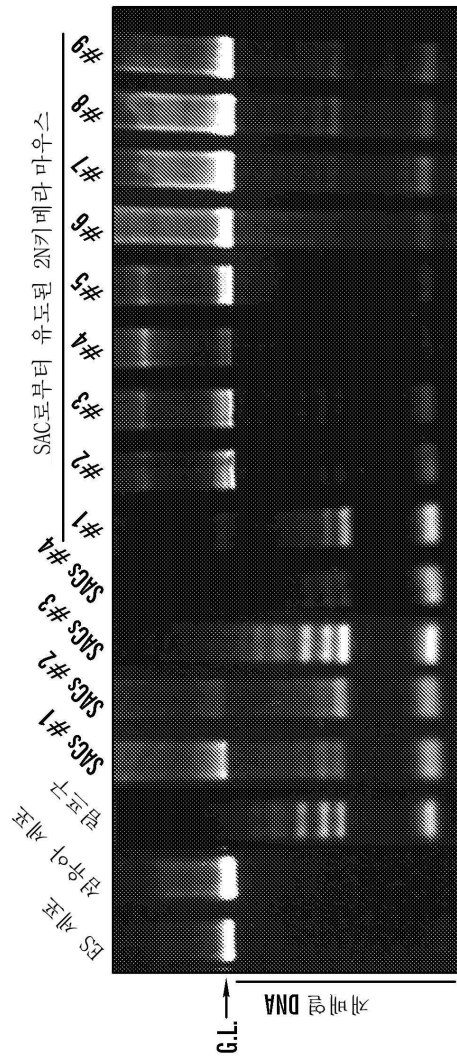
도 18B

도면19



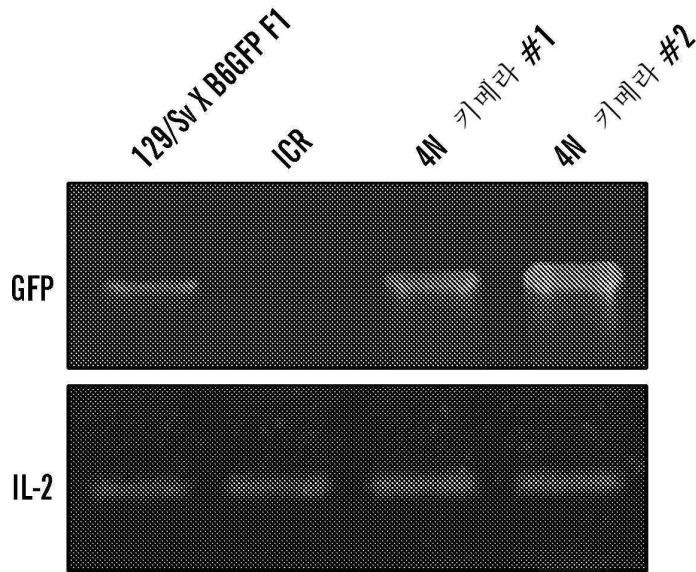
도면19

도면20



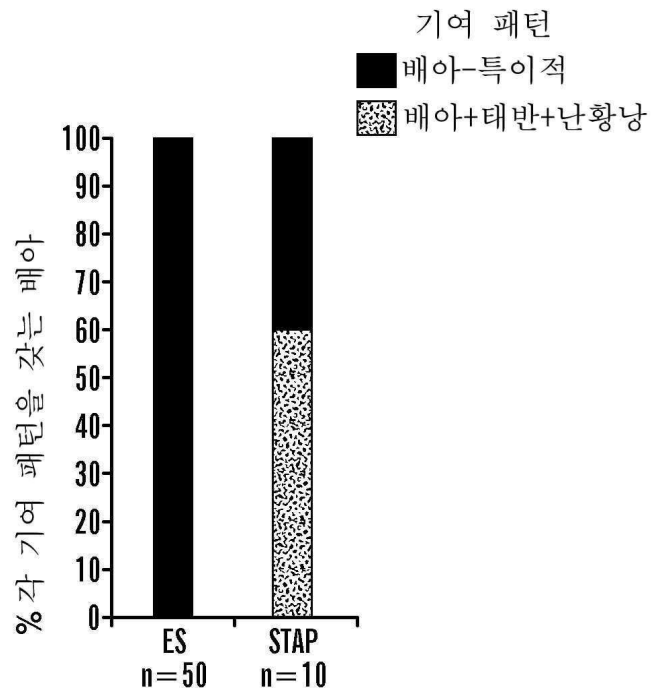
도 20

도면21



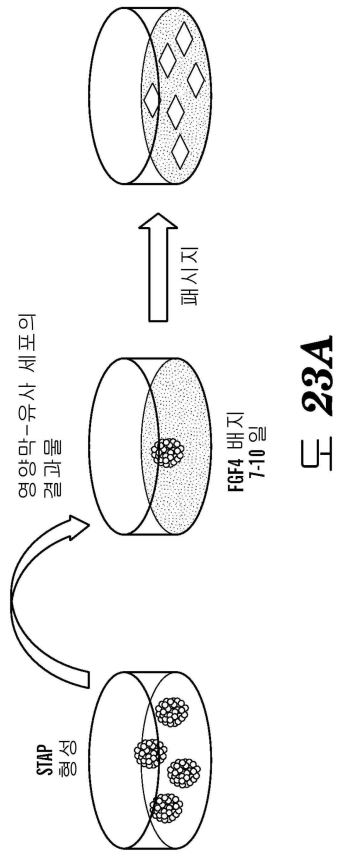
도 21

도면22

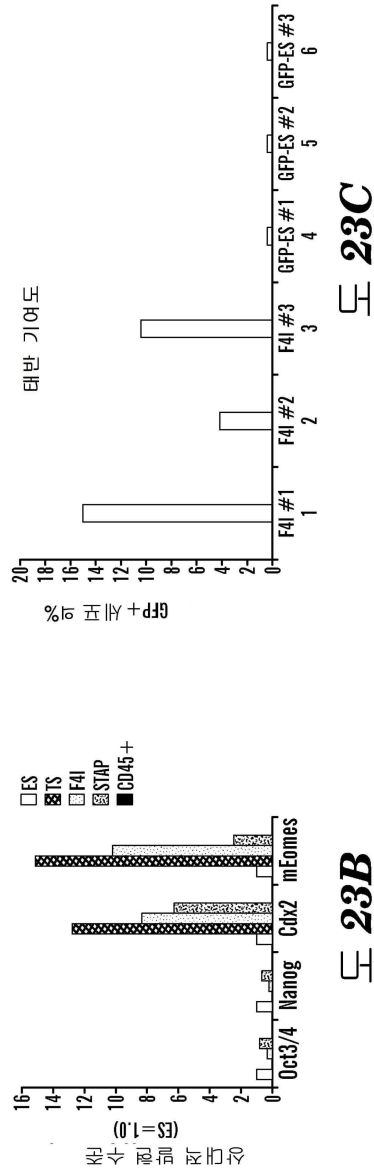


도 22

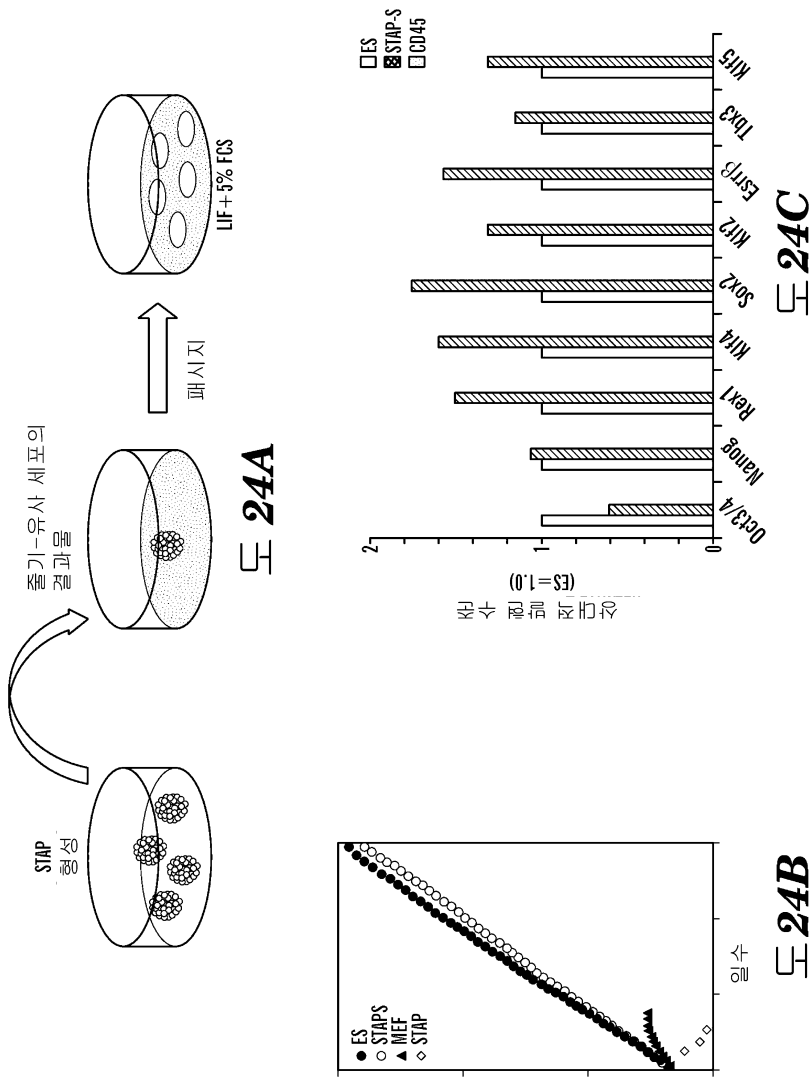
도면23a



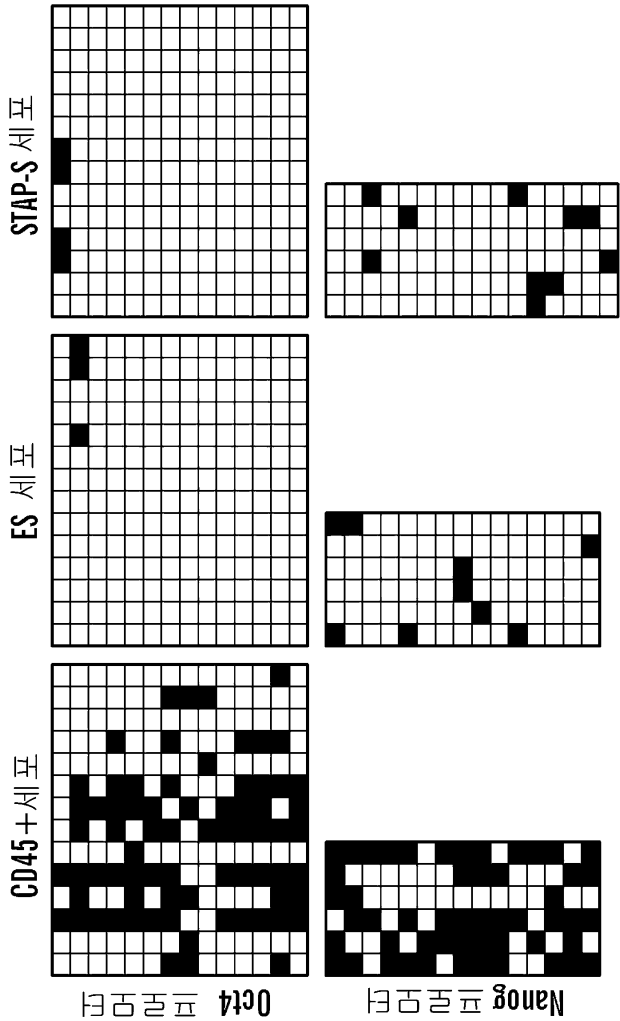
도 23A



도면24a

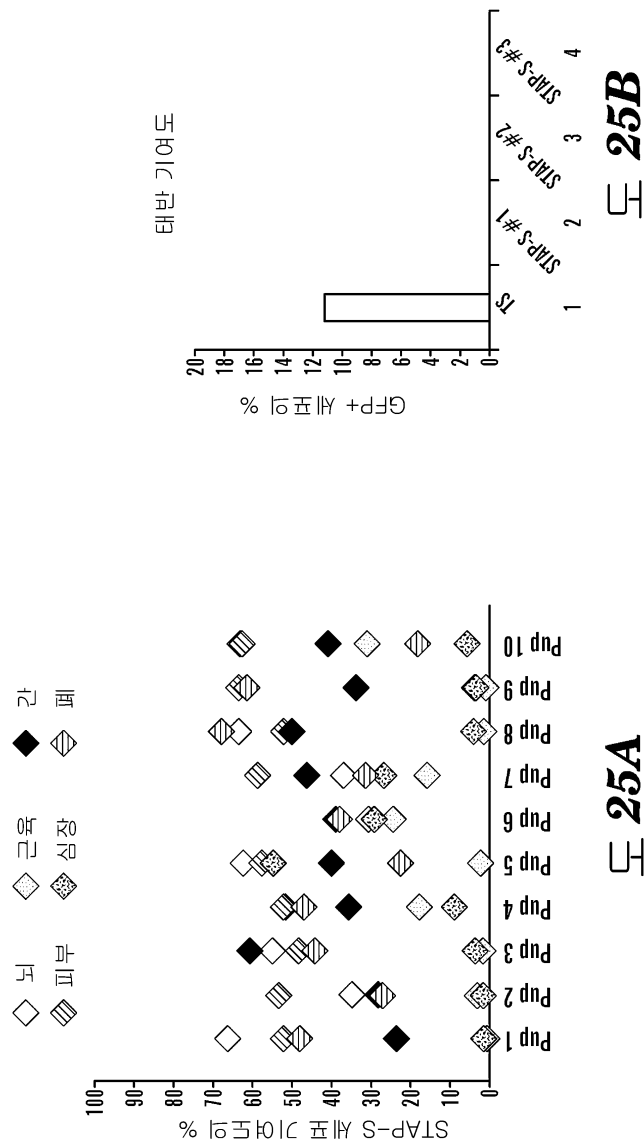


도면24d

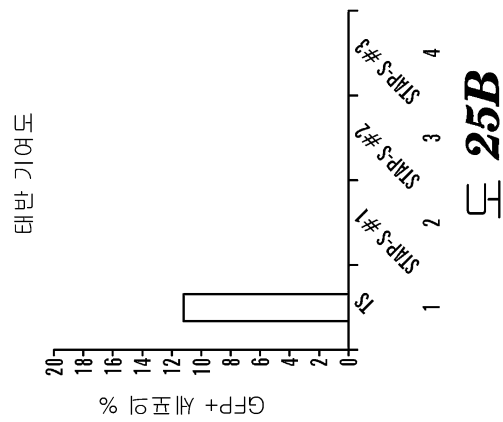


도 24D

도면25a



도 25A



도 25B

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.

RIKEN

TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY

<120> GENERATING PLURIPOTENT CELLS DE NOVO

<130> 043214-071768-KR

<140><141><150> PCT/US13/37996

<151> 2013-04-24

<150> 61/779,533

<151> 2013-03-13

<150> 61/637,631

<151> 2012-04-24

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 1

gttggtttgt tttggttttg gatat

25

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 2

atgggttgaa atattgggtt tattta

26

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 3

ccacctcta acctaacct ctaac

25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

gaggatgttt ttttaagtttt tttt

24

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 5

aatgtttatg gtggattttg taggt

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 6

cccacactca tatcaatata ataac

25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 7

gtcatccttg atctgccct

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400

> 8

ggtacttacg atgccagca 20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

ccctgaatat ccctctgct 19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

agatggctac atctctcgt 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 11

cactctggac ttgagatgc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

cttgtcgttg gtgatggtga	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220	
><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 13	
gttgaagcag ttaatatggc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 14	
agatgagacc aacctggacc	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 15	
aggtggagat catcgccaac	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 16	
cgttgaattt gccgtgagtg	20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 17
 attgccaaagt cgttctacga 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 18
 aggtcgctta cagattgctg 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 19
 gtctcttttag aaaagtgtga 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 20
 tacagctttc ttctggcca 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 21

atgtcagcct tgtggaaatt 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 22

gtctgacaga ccaataccat 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 23

aacggctgcg tgggaagcg 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 24

ggacctccct tagagagga 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 25
 acagtgcctt caggttagtc 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 26
 gcatacaaag aagctgtgag 20
 <210> 27
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 27
 tctttccacc aggccccgg ct 22
 <210> 28
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 28
 tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat 28
 <210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 29

gaagtctggg tccttggcag gatg

24

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 30

caggtgtttg aggtagctc

20

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 31

actgccctc atcagactgc tact

24

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 32

gttccaacct gtgcctcgcg tctt

24

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 33
 cgtggtgagc atcttcggag tgg 23
 <210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 34
 acgagtggca gttcttctt ggga 24
 <210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 35
 atggacgcaa ctgtgaacat gatgttcgca 30
 <210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 36
 tgctgcggtc caggccatca agag 24
 <210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 37
tagagctaga ctccgggcga tga 23

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 38
gcgaactcac acaggcgaga aacc 24

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 39
gctgtgtctc aggggattgt 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 40
gagacgacct gctacacctg 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 41

tcctacacg actgcttacg	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 42	
tatgtctgct cgtacccctt	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 43	
tcagacctcg gttcatcttc	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 44	
cttggacatt cgaaggacga	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 45	
tcaaagcgca gaccacctcg	20

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 46
 gcatgtcgtc cgcagtaact 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 47
 tcgacttcgt cttgttcggt 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 48
 tctacctgtt ccgctctag 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 49
 tgggaaggt cgggtgaac 20
 <210> 50
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 50

gtaggacaga aacggatgga 20

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 51

gtgtcgatcg ttcttcact 19

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 52

attgcagctg caaatccctg 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 53

tacgattcac ggaccgtgcc 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 54

aacgataact gatccctggg

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 55

cagttctacc tgtaggacag

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 56

cctccttcca ggtctccgga

20

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 57

agcatgccag ccagagtcac t

21

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 58

actccaatct gagcaagacc

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 59

gttatatgct gaacgaggtc

20

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 60

tgcgggcgga catggggaga tcc

23

<210> 61

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 61

atgggcccgc atacgacgac gctcaact

28

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 62

actcgataca ctggcctagc 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 63

cggttcatca tggtagtc 20

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 64

cactgccttg tactcgggta gctg 24

<210> 65

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 65

agcgaggcat ggagagagcg gagcag 26

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 66

ccttcttggt ccgcccgttc tta

23

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 67

tatgactcac ttccaggggg cact

24

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 68

ctttgaggtc ctggtccatc acgtgacat

30

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 69

gggcactgtt cagttcagcg gatc

24

<210> 70

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 70

ttgccttaaa caagaccacg aaa

23

<210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 71
 tcgtttcttc ttcctccgac aca 23

<210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 72
 cactctcggc ctgtcttttc 20

<210> 73
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 73
 gttgttttgt tttggttttg gatat 25

<210> 74
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 74
 atgggttgaa atattgggtt tattta 26

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 75

ccaccctcta accttaacct ctaac 25

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 76

gaggatgttt ttttaagtttt tttt 24

<210> 77

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 77

aatgtttatg gtggattttg taggt 25

<210> 78

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 78

cccacactca tatcaatata ataac 25

<210> 79

<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 79
 gttgttttgt ttgttttg gatat 25
 <210> 80
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 80
 atgggttgaa atatgggtt tattta 26
 <210> 81
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 81
 ccacctcta acctaacct ctaac 25
 <210> 82
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 82
 gaggatgttt ttttaagtttt tttt 24
 <210> 83
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 83

aatgtttatg gtggattttg taggt

25

<210> 84

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 84

cccacactca tatcaatata ataac

25

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 85

gcacctgtgg ggaagaaact

20

<210> 86

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 86

tgagagctgt ctctactat cgatt

25

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 87
 agaactggga ccactccagt g 21

<210> 88
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 88
 ttcaccctct ccactgacag atct 24

<210> 89
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 89
 ctaggccaca gaattgaaag atct 24

<210> 90
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 90
 gtaggtggaa attctagcat catcc 25