(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 11 월 3 일 (03.11.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/175618 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/867 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/44* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004557

(22) 국제출원일: 2016 년 4 월 29 일 (29.04.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0060259 2015 년 4 월 29 일 (29.04.2015) KR
10-2016-0053144 2016 년 4 월 29 일 (29.04.2016) KR

(71) 출원인: **가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).

(72) 발명자: **조영애 (JOE, Young-Ae)**; 06355 서울시 강남구 광평로 19 길 15, 106-1204 호, Seoul (KR). **푸렙자르갈나이단수렝 (PUREVJARGAL, Naidansuren)**; 02499 서울시 동대문구 망우로 16 길 31-3, 204 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **위병갑 (WIE, Byoung-Gap)**; 06141 서울시 강남구 테헤란로 33 길 7, 대영빌딩 7 층, Seoul (KR).

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

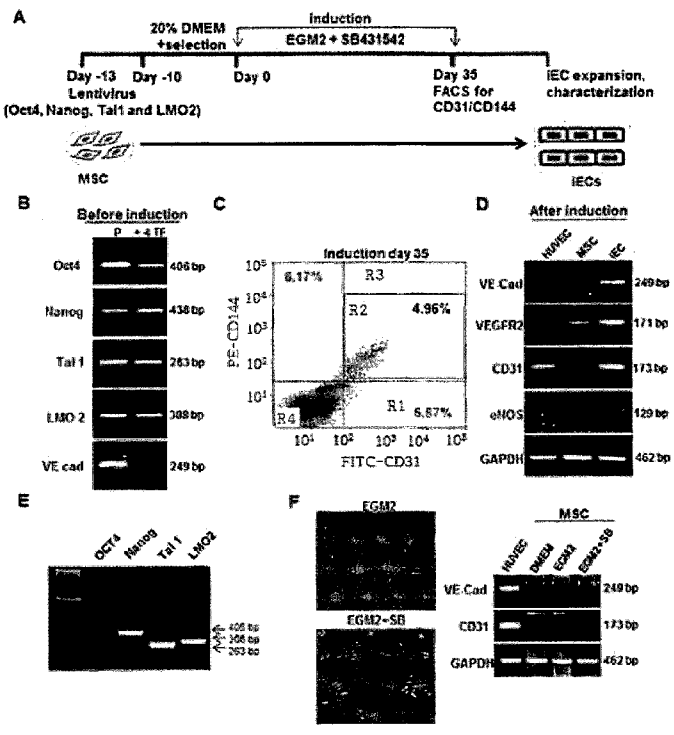
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: METHOD FOR CONVERTING MESENCHYMAL STEM CELLS INTO ENDOTHELIAL CELLS BY USING SPECIFIC TRANSCRIPTION FACTORS

(54) **발명의 명칭** : 특정 전사인자를 이용한 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법

[Fig. 1]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for converting mesenchymal stem cells into endothelial cells by using specific transcription factors and, more specifically, a method for converting mesenchymal stem cells into endothelial cells by using Oct4, Nanog, Tal1, and LMO2, which are specific transcription factors. According to the present invention, the method for converting adult cells or mesenchymal stem cells, which are adult stem cells, into endothelial cells was developed by selecting two types of genes, which are less directly related to cancer induction, among cell reprogramming factors and two types of transcription factors, which are not expressed or expressed at a low level in mesenchymal stem cells, among transcription factors related to vascular development, and combining all four. The method can be applied in the production of endothelial cells for forming regenerative tissue in tissue engineering and ischemic disease therapy.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/175618 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 특정 전사인자를 이용한 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 특정 전사인자인 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 를 이용하여 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 세포의 리프로그래밍 인자 중 암 유발과 직접적인 관련이 적은 유전자 2 종과 혈관 발달에 관련한 전사인자 인자 중에서 중간엽 줄기세포에서 발현이 되지 않거나 낮은 수준을 발현되는 전사인자 2 종을 선별하여, 이들 4 개를 조합함으로써 성체세포나 성체줄기세포인 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법을 개발하였고, 이는 조직 공학과 허혈성 질환의 치료에서 재생 조직을 구성하기 위한 내피세포의 생성에 적용될 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 특정 전사인자를 이용한 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 특정 전사인자를 이용한 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 특정 전사인자인 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2를 이용하여 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포 등 pluripotent stem cell로부터 내피세포의 생성은 혈관 생성을 필요로 하는 허혈질환 치료에 있어 적용할 수 있어 중요하다. 또한 간 조직과 같은 재생조직 분야에서도 내피세포는 중요한 혈관망을 제공할 수 있어 필수적이다. 배아줄기세포나 유도만능 줄기세포로부터 내피세포로 분화유도하는 연구들이 많이 진행되었지만, 이들 세포로부터 만든 세포의 경우 암 유발 가능성과 분화가 완전하지 않을 수 있는 점이 우려되므로, 섬유아세포에서와 같은 성숙한 somatic 세포의 부분적 reprogramming에 의해 내피세포로 transdifferentiation시키는 방법이 대안이 될 수 있다 [Graf, T. et al., Nature., 2009].

[4] 실제로, MyoD 유전자를 mouse embryonic fibroblast에 MyoD 유전자와 5-azacytidine 처리로 근육세포로 성공적으로 전환시킨 바가 있고 [Davis, R.L., et al Cell, 1987], pancreatic exocrine cell에 Ngn3, Pdx1 and Mafa 유전자를 도입시켜 인슐린을 분비하는 beta cell-like cell로 전화시킨 바가 있다 [Zhou, Q., et al., Nature, 2008].

[5] 내피세포의 경우에도 2012년에 Ginsberg 등이 처음으로 human midgestation c-Kit- linease-committed amniotic cells에 ETS transcription factors ETV2, FLI1, ERG1를 도입시키고, TGF beta 저해제 존재 하에 EGM2 배지에서 유도 배양하여 내피세포 특성을 나타내는 세포로 전환시킬 수 있음을 보고하였다 [Ginsberg, M., et al., Cell, 2012]. 이들 세포는 Matrigel plug과 재생 간 조직에서 안정된 혈관을 형성하는 것으로 관찰되었다. 이 후, 인간 피부 fibroblast에 ETV2 유전자 하나만 도입하여 정맥내피세포 특성을 나타내는 세포로 전환시킬 수 있음이 보고되었다 [Morita, R., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2015].

[6] 이외에도 toll-like receptor 3 (TLR3) agonist를 사용하여 innate immunity를 자극함으로서 fibroblast를 내피세포 특성을 나타내는 세포로 전화시키거나 [Sayed, N., et al., Circulation, 2015], Oct4 와 Klf4 두 유전자를 도입하여 내피세포 특성을 나타내는 세포로 전환시키기도 하였다 [Li, J., et al., Arterioscler Thromb

Vasc Biol, 2013].

[7] 이외에 Yamanaka factor 4개 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc을 도입하되 iPS 생성단계까지 유도하지 않고 부분 reprogramming을 시켜 내피세포로 전환시키는 시도도 이루어졌다 [Margariti, A., et al., Proc Natl Acad Sci 2012]. 본 발명에서는 reprogramming 인자 중에 암 유발과 직접적으로 관련이 적은 유전자 2종과 혈관 development에 관련한 전사인자 인자 중에서 제대 유래 중간엽 줄기세포에서 발현이 되지 않거나 낮은 수준을 발현되는 전사인자 2 종을 선별하여, 이들 4개를 조합하여 adult somatic cell이나 성체줄기세포인 중간엽 줄기세포 (MSC)를 내피세포로 전환시키는 방법을 개발하고자 하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 신규한 방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키기 위한 신규한 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 조직재생용 조성물을 제공한다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 치료를 위한 세포치료제 조성물을 제공한다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자 또는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질을 중간엽 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법을 제공한다.

[15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 중간엽 줄기세포에 형질도입하는 것일 수 있다.

[16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Oct4 유전자는 서열번호 1로 표시된 것이고, Nanog 유전자는 서열번호 2로 표시된 것이고, Tal1 유전자는 서열번호 3으로 표시된 것이고, LMO2 유전자는 서열번호 4로 표시된 것일 수 있다.

[17] 또한 본 발명은 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자 또는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질을 포함하는 중간엽 줄기세포의 내피세포로의 분화유도용 조성물을 제공한다.

[18] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 조직재생용 조성물을 제공한다.

[19] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 치료를 위한 세포치료제 조성물을 제공한다.

[20]

발명의 효과

[21] 본 발명에 따르면, 세포의 리프로그래밍 인자 중 암 유발과 직접적으로 관련이 적은 유전자 2종과 혈관 발달에 관련한 전사인자 인자 중에서 중간엽 줄기세포(MSC)에서 발현이 되지 않거나 낮은 수준을 발현되는 전사인자 2 종을 선별하여, 이들 4개를 조합함으로써 성체세포나 성체줄기세포인 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법을 개발하였고, 이는 조직 공학과 허혈성 질환의 치료에서 재생 조직을 구성하기 위한 내피세포의 생성에 적용될 수 있는 효과가 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 유전자 도입에 의한 내피세포로(EC)의 전환에 관한 것으로, (A)는 MSC의 내피세포로의 유도에 관한 모식도이고, (B)는 제대 유래 MSC의 내피세포로의 유도를 위해 렌티바이러스로 형질전환하기 위한 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 유전자 도입을 한 후 유전자 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이며, (C)는 내피세포로의 유도 후 내피세포 표지자인 CD31/CD144에 대해 양성인 세포 (iEC)를 FACS 분석한 결과이고, (D)는 내피세포로의 유도된 iEC를 계대 배양하여 증폭한(expansion) 후 내피세포 마커 발현 양상을 RT-PCR로 분석한 결과이고, (E)는 iEC를 expansion한 후에 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 유전자 발현 양상을 RT-PCR로 조사한 결과이고, (F)는 MSC를 유전자 도입 없이 EGM2와 내피세포 유도 배지 (EGM2+ 10uM SB431542)에서 배양하였을 때, 내피세포로 전환되지 않음을 나타내는 결과이다.

[24] 도 2는 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2에 의한 MSC의 EC로의 전환에 있어서 배양시간을 변화시켜 반복실험하며, CD31/CD144 양성 세포의 생성 재현성과 전환율을 확인한 결과이다.

[25] 도 3은 Expansion된 iEC의 전환 후, VE-cadherin 발현을 면역형광법으로 조사하고, ac-LDL의 흡수 및 맥관형성을 조사한 결과이다.

[26] 도 4는 WJ-MSC로부터 내피세포로의 전환에 필요한 유전자 조합의 최적 조합을 확인한 것이며(4A), 4B는 반복실험 결과를 나타낸 것이다. 도면에서 ONTL은 Oct4, Nanog, Tal1 4, LMO2의 유전자 조합을 사용한 군이고, OTL은 Oct4, Tal1 4, LMO2의 유전자 조합을, NTL은 Nanog, Tal1 4, LMO2의 유전자 조합을, ONL은 Oct4, Nanog, LMO2의 유전자 조합을 나타낸 것이다.

[27]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] Tal1과 LMO2는 조혈 및 내피 세포의 전사에 주요 조절자로 알려져 있다. 인간 제대유래 중간엽줄기세포에 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2의 cDNA를 운반할 수 있는 재조합 렌티바이러스를 이용하여 형질도입하고(도 1A), 블라스티시딘 (350

ng/ml),퓨로마이신(350 ng/ml)을 포함하는 배지에서 10일간 배양함으로써 형질도입된 세포만을 선별하였다. 총 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시하여, 이들 4 가지 유전자가 선별된 세포에서 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(도 1B). 이 후, 이들 세포를 35일간 TGF 저해제인 SB431542 (10 uM)를 포함하는 EGM2에서 배양하여 내피세포로의 전환을 유도하였다. 이들 세포를 FACS 분석하였을 때, 4.96%의 CD31+VE-cadherin+ 세포를 포함하는 유도된 세포 집단을 확인할 수 있었다(도 1C). 이들 CD31+VE-cadherin+ 세포를 FACS로 sorting하고 같은 배지에서 배양하였다. 이들 배양된 세포(iEC)를 PCR 분석을 통해 VE-cadherin, VEGFR2, CD31, 및 eNOS의 내피 유전자 분석을 진행해 본 결과, 배양된 iEC 세포에서 VE-caderin, VEGFR2, CD31 및 eNOS가 HUVEC에서와 같이 발현되었다(도 1D). 배양된 iEC에서 Oct 4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자 발현을 분석해 본 결과, Oct 4를 제외한 Nanog, Tal1 및 LMO2의 발현이 관찰되었다(도 1E). 이와 대조적으로, 같은 유도 배지에서 이들 4개의 전사 인자의 형질도입 없는 MSC의 배양은 EC 세포로의 전환을 유도하지 못하는 것으로 나타났다(도 1F). 이러한 4개 인자에 의한 MSC의 EC로의 직접적 전환을 반복 실험으로 확인할 수 있었는데, 11일째 유도에서 조차 EC 세포로의 전환이 일어났으며(도 2), CD31과 CD144 양성 세포는 1.4~7% 범위로 확인되었다.

[29] iEC의 특성을 좀 더 자세히 분석해 보고자, 이들 세포를 면역형광 분석해 보았는데, 그 결과, HUVEC에서와 같이 세포 주변에 VE-Cadherin이 발현되는 것을 알 수 있었고, 이들 세포는 MSC와는 대조적으로 Dil-표지된 ac-LDL을 흡수할 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 확인되어 내피세포의 특성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[30] 마지막으로, 본 발명자들은 이들 유도된 세포들이 튜브-유사 구조를 형성할 수 있는지 확인해 보았는데, 도 3에서 볼 수 있듯이 이들 세포는 MSC와는 대조적으로 HUVEC에서와 같이 20시간에서 마트리겔 상에서 튜브-유사 구조를 형성하는 것을 알 수 있었다.

[31] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 MSC와 성체세포가 내피 세포로 리프로그래밍되는 것이 Oct4, nanog, Tal1 및 LMO2에 의해 이루어질 수 있음을 확인하였다.

[32] 또한 본 발명자들은 상기와 같이, Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 4가지 유전자 모두를 사용할 경우만이 MSC와 성체세포가 내피세포로 효율적으로 전환될 수 있음을 확인하였는데, 본 발명의 일실시예에 의하면 Oct4, Tal1, LMO2, Nanog, Tal1, LMO2(NTL) 6가지 유전자를 도입한 군과, Oct4, Nanog, LMO2 (ONL) 3가지 유전자를 도입한 군 및 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 4가지 유전자를 도입한 군을 대상으로 유전자 조합에 따른 내피세포 전환 정도를 분석하였다.

[33] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 Oct4, Nanog, LMO2, Tal1 4 가지 유전자를 도입한 군의 경우에는 CD31/CD144 양성 세포로의 전환이 일어난 것을 확인할 수 있었으나, Oct4, Tal1, LMO2 (OTL), Nanog, Tal1, LMO2 (NTL) 또는 Oct4,

Nanog, LMO2 (ONL)의 3개 유전자로 이루어진 조합으로 도입한 경우에는 CD31/CD144 양성 세포로의 전환이 일어나지 않음을 확인하였다.

[34] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명에서는 MSC와 성체세포가 내피세포로 완벽하게 전환하기 위해서는 Oct4, Nanog, LMO2, Tal1 4 가지의 특별한 유전자를 모두 도입해야 함을 알 수 있었다.

[35] 본 발명에서 내피세포 전환을 위해 도입한 상기 Oct4, Nanog, LMO2, Tal1 4 의 유전자는 바람직하게 서열번호 1로 표시된 Oct4 유전자, 서열번호 2로 표시된 Nanog 유전자, 서열번호 3으로 표시된 LMO2 유전자, 서열번호 4로 표시된 Tal1 4을 사용할 수 있다.

[36] 또한 상기 유전자들의 세포내로의 도입은 당업계에 공지된 유전자 도입 기술이라면 모두 사용할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 렌티바이러스 벡터를 이용하였다.

[37] 상기와 같은 방법으로 수득된 내피세포는 조직 공학과 허혈성 질환의 치료에서 재생 조직을 구성하기 위한 내피세포(EC)의 생성에 적용될 수 있음을 알 수 있었다.

[38] 따라서 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 조직재생용 조성물을 제공할 수 있고, 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 치료를 위한 세포치료제 조성물을 제공할 수 있다.

[39] 본 발명에 의해 줄기세포에서부터 전환된 내피세포는 조직재생 또는 허혈성 질환의 치료를 위한 세포치료제로서 사용 가능한데, 조직재생의 경우, 조직 구조 측면에서 내피세포에 해당하는 부분을 본 발명에서 전환된 내피세포를 사용할 수 있다.

[40]

발명의 실시를 위한 형태

[41] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[42]

[43] <실시예 1>

[44] **Oct4**, Nanog, Tal1, LMO2 유전자 도입에 의한 내피세포로의 전환

[45]

[46] 1-1. 세포배양 및 시약 준비

[47] HUVEC(Human umbilical vein endothelial cells) 세포는 Jaffe, E.A의 논문에 개시된 방법에 따라 인간 혈관에서 분리하였다. HUVEC 세포는 20% FBS(Invitrogen), 30㎍/ml의 내피 세포 성장 보조제(ECGS, BD Biosciences), 90㎍/ml의 헤파린, 1% 항생제를 포함하는 M199 배지에서 배양하였다. iEC는 10

μM SB431542(Sigma)가 첨가된 EGM2 배지(Lonza)에서 배양하였고, 제대 유래 중간엽줄기세포(MSC)는 20% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM(Invitrogen)배지에서 배양하였다. 인간 탯줄 샘플은 가톨릭대학교 임상시험 심사위원회의 승인된 절차에 따라 분리되었다(과제번호 MC13TISI0078, MC12TISI0094).

[48]

[49] 1-2. 렌티바이러스 벡터 및 형질도입

[50] Nanog, Tal1 및 LMO2를 운반하는 렌티바이러스 벡터는 GeneCopoeia(USA)에서 구입하였고, Oct4 벡터는 아주대학교 서원희 교수로부터 수득하였다. 트랜스펙션 전날 10cm 티슈 배양 플레이트에 293FT 세포를 분주하고 트랜스딕션 당일 플레이트의 90~95% 밀도가 되도록 하였다. 렌티바이러스를 생산하기 위하여, 목적하는 벡터 플라스미드인 psi-EF1-Bls-hOct4, psi-EF1-Puro-hNanog, psi-EF1-Puro-hTaL1 및 psi-EF1-Puro-hLMO2 (Genecopoeia; 3 for each plasmid) 를 9㎍의 ViraPowerPackaging Mix와 12㎍의 Lipofectamine2000 복합체와 혼합한 후, 293FT 세포에 첨가하였다. 37℃, 5% CO_2 조건에서 밤새 배양한 후, 배지를 항생제를 포함하지 않는 293FT 배지로 교체하였다. 배지 교체 후 48시간이 지나 배양 상청액을 수집하였다. 바이러스 상청액은 0.45㎛ PVDF 필터로 필터링하여 세포를 제거하였고, 바이러스 stock은 -80℃에 보관하였다. MSC(5×10^4/well)를 24시간 동안 플레이팅하고 8㎍/ml 폴리브린(polybrene, Sigma-Aldrich)를 포함하는 10% FBS-DMEM 배지에서 5 MOI로 감염시켰다. 24시간 후, 바이러스를 포함하는 배지를 20% FBS와 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 신선한 DMEM 배지로 교환하여 2일간 배양하였다. 이후 세포를 블라스티시딘(350 ng/ml), 퓨로마이신(350ng/ml)이 있는 배지에서 10일간 배양하고 형질도입된 세포를 선별하였다(도 1A 참조).

[51]

[52] 1-3. 렌티바이러스가 형질도입된 MSC의 내피세포로의 유도

[53] 렌티바이러스가 형질도입된 MSC 세포를 내피 세포 성장 배지 EGM2와 10μM SB431542를 포함하는 젤라틴 코팅된 접시에서 배양하여 내피세포로의 변환을 유도하였다. 배지는 2일마다 교체하였고, 3~5일 후에 세포가 90% 밀도가 되면 1:2로 스플릿하였다. 세포를 11~35일간 배양한 후, iEC를 FACS로 분리하였다.

[54]

[55] 1-4. RNA 추출 및 RT-PCR

[56] 총 RNA를 Trizol 시약(Invitrogen)을 이용하여 배양된 세포에서 추출하였다. RT-PCR을 위한 cDNA 합성은 제조자의 지시에 따라 SuperScript 합성 시스템(Enzynomics)을 이용하여 수행하였다. 각 유전자는 표 1에 개시된 프라이머 세트를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 반응한 PCR 조건은 하기와 같다: 95℃ 7분(최초 변성), 95℃ 1 분(변성) - 54℃~60℃

1분(어닐링) - 72℃ 1분 연장 과정을 총 30 사이클, 72℃ 10분(최후 연장). PCR 산물은 1.0% 아가로오즈-겔 전기영동으로 분석하였고, DNA 밴드는 SYBR safe DNA 겔 염색(Invitrogen)으로 가시화하였다.

[57]

[58] [Table 1]

Name	Forward	Reserve	Accession no.
Oct4	AGGAGATATGCAAAGCAGAA	AGAGTGGTGACGGAGACAG	NM_002701
Nanog	ATCCAGCTTGTCCCCAAAG	ATTTCATTCTCTGGTTCTGG	NM_024865.2
Tal1	TCACCACCAACAATCGAGTGAAGAGG	CTCCTCCTGGTCATTGAGCAGCTTGG	NM_003189.2
LMO2	TCCCCAATGTCCTCGGCCAT	ATCCGCTTGTCACAGGAT	NM_005574.3
CD31	ATGATGCCCAGTTTGAGGTC	GACGTCTTCAGTGGGGTTGT	NM_000442.4
VE-ead	CCCTACCAGCCCAAAGTGTG	CGACTTGGCATCCCATTGTC	NM_001795.3
VEGFR2	GCGATGGCCTCTTCTGTAAG	ACACGACTCCATGTTGGTCA	EU826563.1
eNOS	TGATGGCGAAGCGAGTGAA	ACTCATCCATACACAGGACCCG	NM_000603.4

[59] 상기와 같은 RT-PCR을 이용하여 우선, 렌티바이러스로 형질도입한 후 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 가 발현되는지 조사하였을 때, 이들 유전자들이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(도 1B). 한편, 이들 세포를 내피세포로 분화 유도시킨 후 FACS sorting하여 분리하고, 분리한 iEC를 계대 배양하여 증폭시킨 후 내피세포 마커 발현 양상을 상기와 같은 RT-PCR로 살펴본 결과, HUVEC과

유사하게 VE-cadherin, VEGFR2, CD31, eNOS가 발현됨을 확인할 수 있었고(도 1D), Nanog, Tal1, LMO2가 발현되는 것을 RT-PCR로 확인할 수 있었다(도 1E).

[60]

[61] 1-5. FACS 분석

[62] 내피세포로 분화 유도한 후 FACS 분석을 통해 내피세포 표지자인 CD31/CD144 양성 세포를 확인해 보고자 하였다.

[63] 이를 위해 세포를 수집하고 PE-접합된 VE-cadherin 항체(1:400; BD Biosciences) 또는 FITC-접합된 CD31 항체(1:400; BD Biosciences)로 아이스에서 30분간 염색하였다. 샘플을 FACSAriaIII cell analyzer(BD Biosciences)로 분석하였다. 데이터는 BD CellQuest Pro software(version 5.2.1)로 분석하였다. CD31+/CD144+ 세포를 확인하기 위하여, 바이러스 형질도입 후 내피세포 분화 유도 배지에서 35일간 배양한 후 세포를 수집하고 FACS Beckman coulter cell sorter(BD Biosciences)로 분석하였다. 데이터는 FACS summit software(version 6.1.3)로 분석하였다. CD31+/CD144+ iECs는 FACS로 분리 후 1% 젤라틴이 코팅된 플레이트를 이용하여 10μM SB431542를 포함하는 EGM2에서 계속해서 배양하였다.

[64] 그 결과, 도 1C에서 볼 수 있듯이 내피세포 표지자인 CD31/CD144에 대해 양성인 세포(iEC)가 4.96% 존재함을 확인할 수 있었다.

[65]

[66] <실시예 2>

[67] **Oct4**, Nanog, Tal1, LMO2에 의한 MSC의 EC로의 전환에 있어서 재현성 및 전환율 검토

[68] 실시예 1에서와 같은 실험방법으로 4 가지 유전자를 도입시키고, 내피세포를 분화 유도시키되, 내피세포 유도배지에서의 배양시간을 변화시켜 가며 반복실험하여 CD31/CD144 양성세포가 재현성 있게 생성되는지 여부와 전환율을 확인해 보았다.

[69] CD31+/CD144+ 세포를 확인하기 위하여, 바이러스 형질도입 후 내피세포 분화 유도 배지에서 11~35일간 배양한 후 세포를 수집하고 FACS Beckman coulter cell sorter(BD Biosciences)로 분석하였다. 데이터는 FACS summit software(version 6.1.3)로 분석하였다. CD31+/CD144+ iECs는 FACS로 분리 후 1% 젤라틴이 코팅된 플레이트를 이용하여 10μM SB431542를 포함하는 EGM2에서 배양하였다.

[70] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, CD31/CD144 양성세포가 재현성 있게 생성되었고, 약 1.4~7% 비율로 생성되었음을 확인할 수 있었다.

[71]

[72] <실시예 3>

[73] 계대 배양을 통해 증폭(expansion)된 iEC의 특성 조사

[74] FACS를 통해 sorting된 CD31/CD144 양성 세포 (iEC)를 expansion한 후에,

VE-cadherin 발현을 면역형광법으로 조사하였고, ac-LDL 흡수 및 맥관형성을 조사하였다.

[75]

[76] 3-1. 면역형광염색법을 통한 VE-cadherin 발현 조사

[77] 세포를 100% 메탄올로 5분간 고정하고 0.1% Triton X-100으로 3분간 투과화하였다. 비특이적 단백질 결합 부위를 5% BSA로 1시간동안 블락킹하였고, 세포를 VE-cadherin (1:100, cell signaling) 1차 항체로 반응시킨후 PBS로 3번 세척하고, Cy 3 (Millipore)가 접합된 2차 항체로 2시간 동안 반응하였다. 마지막으로, 모든 슬라이드를 1㎍/ml DAPI (Sigma)로 대조염색하였다. 이미지는 공초점 현미경(Zeiss LSM 510 Meta with LSM image examiner software, Germany)으로 얻을 수 있었다.

[78]

[79] 3-2. 시험관 내(In vitro) 내피세포 기능 분석

[80] 내피세포 계열의 주요한 특징 중 하나로 알려진 부착 세포에 의한 ac-LDL의 흡수를 측정해 보았다(Murohara et al., J. Clin. Invest., 2000). 24시간 동안 젤라틴 코팅된 챔버 슬라이드에서 배양한 세포를, 15㎍/ml Dil-라벨된 아세틸-저밀도 리포프로테인(Dil-ac-LDL, Molecular Probes, Eugene, OR)을 포함하는 배지에서 37℃, 4시간 동안 반응시켰다. 세척 후, 샘플을 형광 현미경 및 역 위상차 현미경으로 관찰하고, 세 개의 필드를 임의로 선정하여 촬영하였다.

[81]

[82] 3-3. 튜브(맥관) 형성 분석

[83] 냉장된 마트리겔(150㎕, BD Bioscience)을 예냉된 48-웰 플레이트에 넣고 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. HUVECs, MSC 및 iEC를 고형화된 마트리겔 위에 분주하고(2×10^4 cells/well), EGM에서 배양 20시간 후에 튜브 형성을 촬영하였다.

[84]

[85] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, expansion된 iEC에서 MSC와 전혀 다르지만 HUVEC 세포와는 유사하게, VE-cadherin이 세포 경계면에서 발현되고, Dil-표지된 ac-LDL을 흡수할 수 있었으며, 맥관 형성 능력도 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.

[86]

[87] <실시예 4> Wharton's jelly mesenchymal stem cells(WJ-MSC)로부터 내피세포로의 전환에 필요한 최적 유전자 조합 조사

[88] 본 발명자들은 상기 실시예의 결과로 확인된 중간엽 줄기세포의 내피세포로의 전환을 위해 필요한 최적 유전자를 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 상기 실시예에서 사용한 4가지 유전자인 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2을 도입한 군; Oct4, Tal1, LMO2 (OTL)의 3가지 유전자를 도입한 군; Nanog, Tal1, LMO2 (NTL)의 3가지 유전자를 도입한 군; 및 Oct4, Nanog, LMO2 (ONL)의 3가지

유전자를 도입한 군을 대상으로 내피세포 분화능을 조사하였다. 구체적으로 상기 실시예1에서와 동일한 실험 방법으로 Oct4, Tal1, LMO2 (OTL), Nanog, Tal1, LMO2 (NTL) 혹은 Oct4, Nanog, LMO2 (ONL)의 3가지 유전자로 이루어진 조합으로 유전자를 세포내에 도입시키고 24 시간 후 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 신선한 DMEM 배지로 교환하여 2일간 배양한 다음, 10일간 세포선별(selection) 하여 형질 도입된 세포를 선별하였다. 이후 내피세포 성장 배지 EGM2에 10 uM SB431542를 포함하여 젤라틴 코팅된 접시에서 배양하였고 2일 마다 배지를 교체하면서 21일간 배양한 다음 FACS 분석을 실시하였다.

[89]

[90] 분석결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, Oct4, Nanog, Tal1, LMO2 4 가지 유전자를 도입시킨 것은 CD31/CD144 양성 세포로의 전환이 일어났지만 3가지 유전자로 이루어진 조합들을 도입한 경우에는 CD31/CD144 양성인 세포를 얻을 수 없었다(도 4 A 참조). 추가적인 반복실험을 실시하여 조사한 경우에도 4 가지 유전자를 동시에 도입한 경우 CD31/CD144 양성세포가 높은 효율(~5%)로 얻어진 반면, Nanog, Tal1, LMO2 3가지 유전자로 이루어진 조합을 도입한 경우에는 CD31/CD144 양성세포가 거의 나타나지 않음을 확인하였다(도 4B 참조).

[91] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 실험의 분화 배양 조건에서는 MSC가 내피세포로 효율적으로 전환되기 위해서는 4개의 전사인자인 Oct4, Nanog, Tal1, LMO2가 모두 필요함을 확인 할 수 있었고, 이 중 1개의 유전자가 없는 경우 내피세포로의 전환이 이루어지지 않음을 알 수 있었다.

[92]

[93] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자 또는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질을 중간엽 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 중간엽 줄기세포에 형질도입하는 것을 특징으로 하는, 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 Oct4 유전자는 서열번호 1로 표시된 것이고, Nanog 유전자는 서열번호 2로 표시된 것이고, Tal1 유전자는 서열번호 3으로 표시된 것이고, LMO2 유전자는 서열번호 4로 표시된 것을 특징으로 하는, 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법.

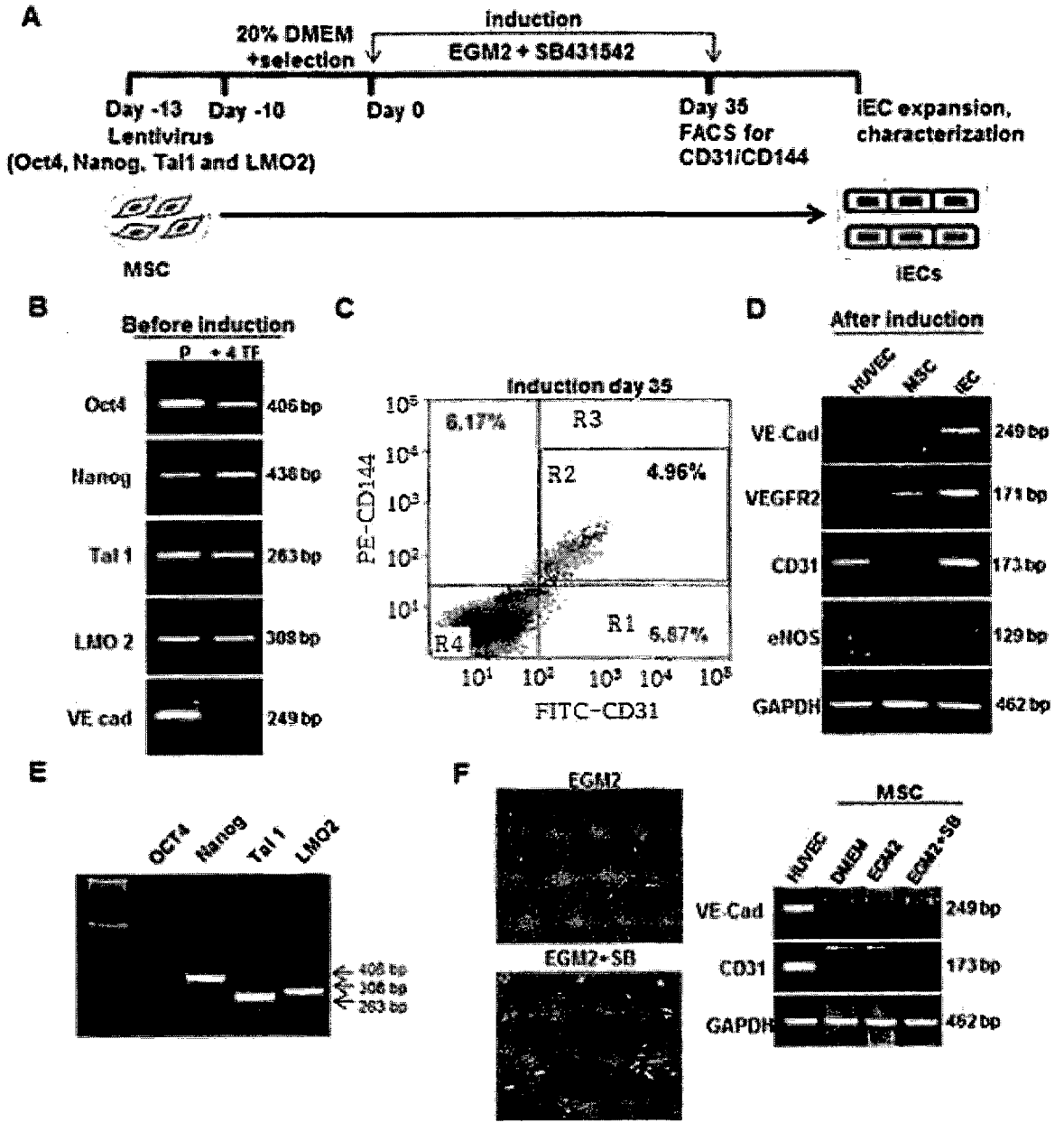
[청구항 4] 제1항에 있어서,
Oct4 단백질은 서열번호 5로 표시된 것이고, Nanog 단백질은 서열번호 6으로 표시된 것이고, Tal1 단백질은 서열번호 7로 표시된 것이고, LMO2 단백질은 서열번호 8로 표시된 것을 특징으로 하는, 중간엽 줄기세포를 내피세포로 전환시키는 방법.

[청구항 5] Oct4, Nanog, Tal1 및 LMO2 유전자 또는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질을 포함하는 중간엽 줄기세포의 내피세포로의 분화유도용 조성물.

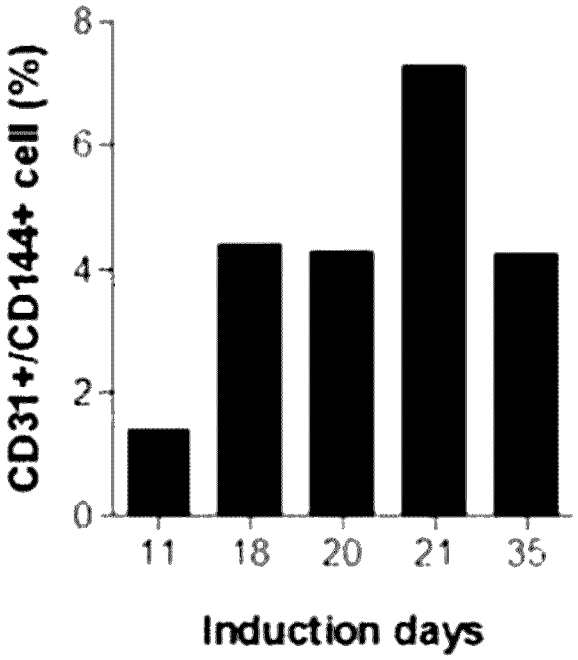
[청구항 6] 제1항의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 조직재생용 조성물.

[청구항 7] 제1항의 방법으로 수득한 내피세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 치료를 위한 세포치료제 조성물.

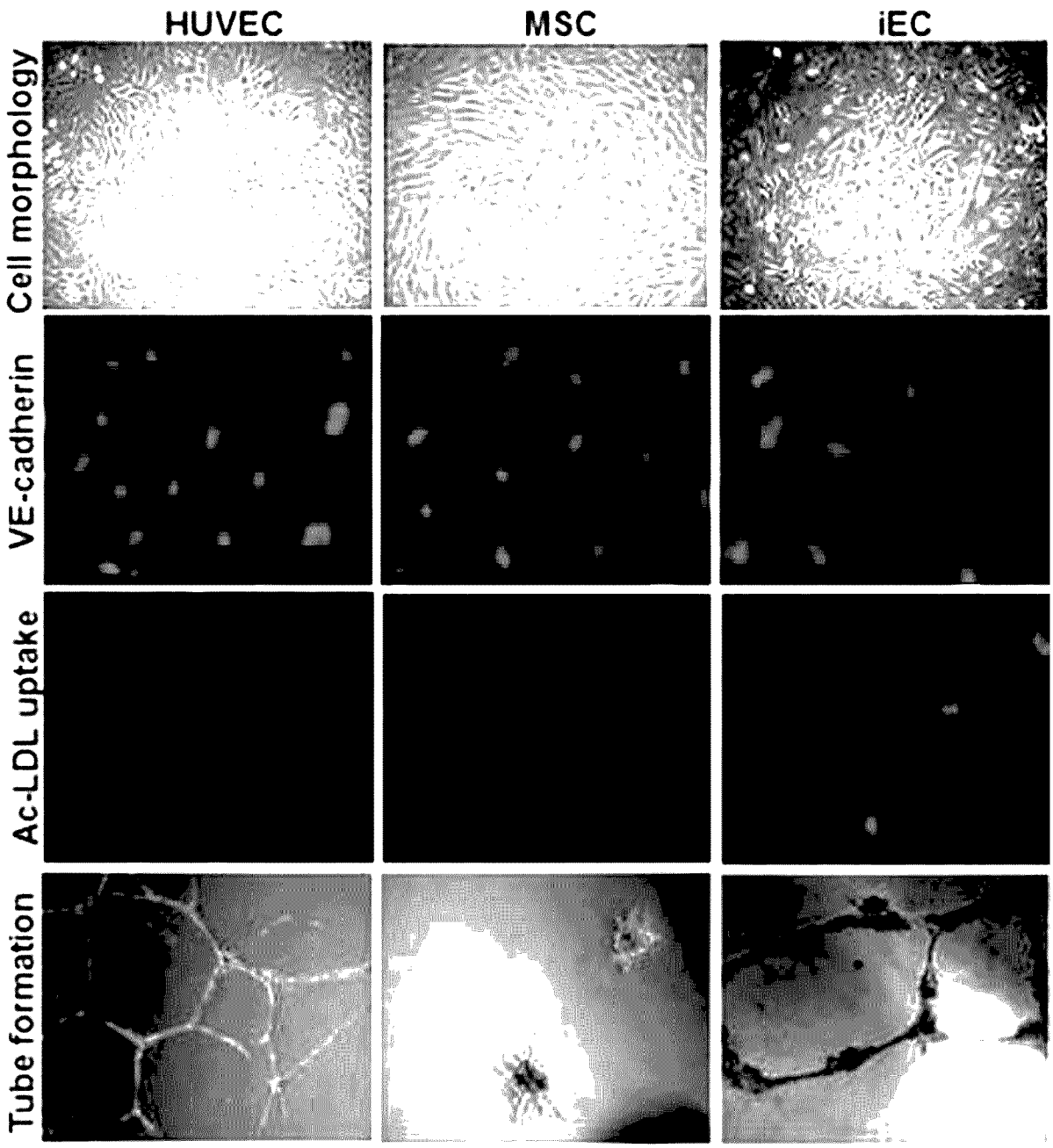
[Fig. 1]


A
20% DMEM
+selection
induction
EGM2 + SB431542
Day -13
Lentivirus
(Oct4, Nanog, Tal1 and LMO2)
Day -10
Day 0
Day 35
FACS for
CD31/CD144
iEC expansion,
characterization
MSC
iECs
B
Before induction
P +4 TF
Oct4
406 bp
Nanog
438 bp
Tal 1
263 bp
LMO 2
308 bp
VE cad
249 bp
C
Induction day 35
6.17%
R3
R2
4.96%
R1
6.87%
R4
PE-CD144
FITC-CD31
D
After induction
HUVEC
MSC
iEC
VE-Cad
249 bp
VEGFR2
171 bp
CD31
173 bp
eNOS
129 bp
GAPDH
462 bp
E
OCT4
Nanog
Tal 1
LMO2
406 bp
308 bp
263 bp
F
EGM2
EGM2+SB
MSC
HUVEC
DMEM
EGM2
EGM2+SB
VE-Cad
249 bp
CD31
173 bp
GAPDH
462 bp

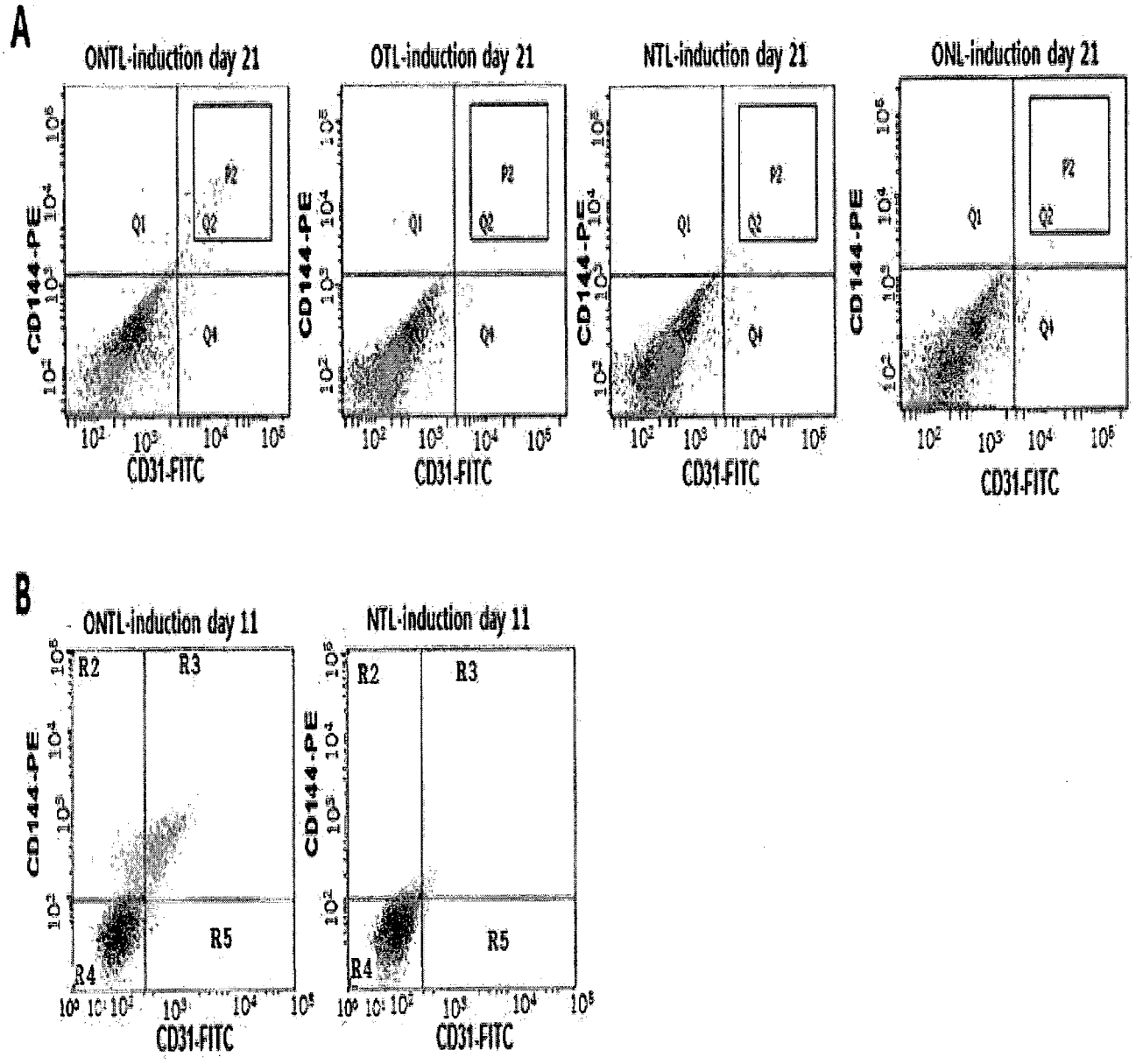
[Fig. 2]



[Fig. 3]


HUVEC
MSC
iEC
Cell morphology
VE-cadherin
Ac-LDL uptake
Tube formation

[Fig. 4]


A
ONTL-induction day 21
OTL-induction day 21
NTL-induction day 21
ONL-induction day 21
CD144-PE
CD31-FITC
Q1
Q2
Q4
B
ONTL-induction day 11
NTL-induction day 11
R2
R3
R4
R5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/004557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/867(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C07K 14/47(2006.01)i, A61K 35/44(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/867; C12N 5/071; A61K 35/44; C12N 5/08; C12N 15/85; C07K 14/47

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Oct4, Nanog, Tal1, LMO2, mesenchymal stem cell, endothelial cell, vector

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAN, Jung - Kyu et al., "Direct Conversion of Adult Skin Fibroblasts to Endothelial Cells by Defined Factors", Circulation, 2014, vol. 130, no. 14, pages 1168-1178 See abstract; pages 1168-1169, 1173-1174; and figures 1, 6A-6C.	1-7
A	OSWALD, Joachim et al., "Mesenchymal Stem Cells can be differentiated into Endothelial Cells in Vitro", Stem Cells, 2004, vol. 22, no. 3, pages 377-384 See abstract; and pages 378-379.	1-7
A	CN 1546656 A (FENG, Bin) 17 November 2004 See the entire document.	1-7
A	US 2014-0349398 A1 (CELLULAR DYNAMICS INTERNATIONAL, INC.) 27 November 2014 See the entire document.	1-7
A	CN 102776150 A (SHANGHAI NINTH PEOPLE'S HOSPITAL AFFILIATED TO SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY SCHCOL OF MEDICINE) 14 November 2012 See the entire document.	1-7

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 AUGUST 2016 (08.08.2016)	**08 AUGUST 2016 (08.08.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/004557

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 1546656 A	17/11/2004	NONE	
US 2014-0349398 A1	27/11/2014	CA 2804595 A1	12/01/2012
		EP 2591093 A2	15/05/2013
		EP 2591093 A4	08/01/2014
		JP 2013-535186 A	12/09/2013
		JP 5897002 B2	13/04/2016
		US 2012-0009618 A1	12/01/2012
		US 8785192 B2	22/07/2014
		WO 2012-006440 A2	12/01/2012
		WO 2012-006440 A3	05/04/2012
CN 102776150 A	14/11/2012	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/004557

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/867(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C07K 14/47(2006.01)i, A61K 35/44(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/867; C12N 5/071; A61K 35/44; C12N 5/08; C12N 15/85; C07K 14/47

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

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Oct4, Nanog, Tal1, LMO2, 중간엽 줄기세포, 내피세포, 벡터

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HAN, JUNG-KYU 등, 'Direct conversion of adult skin fibroblasts to endothelial cells by defined factors', Circulation, 2014, 130권, 14호, 페이지 1168-1178 요약; 페이지 1168-1169, 1173-1174; 및 도면 1, 6A-6C 참조.	1-7
A	OSWALD, JOACHIM 등, 'Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro', Stem Cells, 2004, 22권, 3호, 페이지 377-384 요약; 및 페이지 378-379 참조.	1-7
A	CN 1546656 A (FENG, BIN) 2004.11.17 전체 문헌 참조.	1-7
A	US 2014-0349398 A1 (CELLULAR DYNAMICS INTERNATIONAL, INC.) 2014.11.27 전체 문헌 참조.	1-7
A	CN 102776150 A (SHANGHAI NINTH PEOPLE`S HOSPITAL AFFILIATED TO SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 2012.11.14 전체 문헌 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 08월 08일 (08.08.2016)	2016년 08월 08일 (08.08.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
조기윤
전화번호 +82-42-481-5655

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/004557

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 1546656 A	2004/11/17	없음	
US 2014-0349398 A1	2014/11/27	CA 2804595 A1	2012/01/12
		EP 2591093 A2	2013/05/15
		EP 2591093 A4	2014/01/08
		JP 2013-535186 A	2013/09/12
		JP 5897002 B2	2016/04/13
		US 2012-0009618 A1	2012/01/12
		US 8785192 B2	2014/07/22
		WO 2012-006440 A2	2012/01/12
		WO 2012-006440 A3	2012/04/05
CN 102776150 A	2012/11/14	없음	