



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0036131
(43) 공개일자 2018년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 5/0735 (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 5/0606 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0126322
(22) 출원일자 2016년09월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김준기
경기도 의정부시 추동로108번길 109, 101동 1804호(신곡동, 신명스카이뷰 APT)
주명수
서울특별시 강남구 선릉로 120, 9동 701호(개포우성1차 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

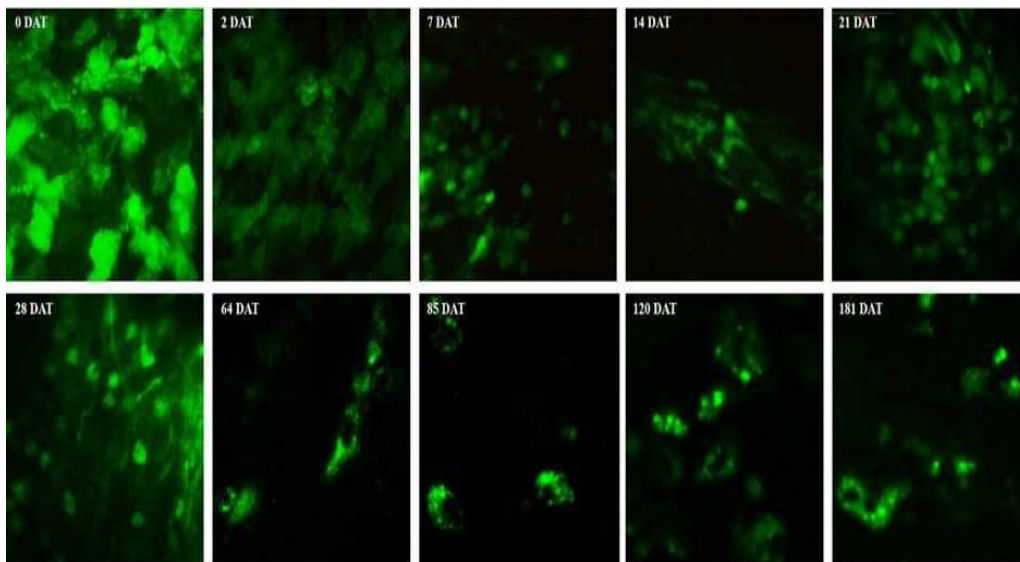
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체는, 줄기세포 치료제에 대한 효능을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 벡터 구조체를 사용할 경우, 줄기세포 치료제가 생체 내에 주입된 후 상기 줄기세포의 분화 계통을 모니터링함에 있어, 보다 고해상도의 생체 내 영상을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 주입된 줄기세포 치료제의 효능 분석 및 치료를 원하는 질환에 대한 보다 정확한 진단 및 치료가 가능하며, 약동학적 연구(pharmacokinetics, PK) 및 약력학적 연구(pharmacodynamics, PD)에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

G01N 33/5005 (2013.01)

(72) 발명자

신동명

서울특별시 강동구 고덕로 131, 139동 602호

김아람

서울특별시 성동구 마조로16길 31, 나동 302호(명성빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3365

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발사업

연구과제명 방광기능이상 질환 줄기세포 치료법의 전임상 효능 모니터링 기법개발

기 여 율 1/2

주관기관 서울아산병원

연구기간 2014.12.01 ~ 2018.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF2014R1A1A2057773

부처명 이공분야기초연구사업 (교육부)

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 한국 연구재단 일반 연구자 지원 사업

연구과제명 실험 동물용 초미세 내시경 개발 (Ultra thin microendoscope development for live small animal)

기 여 율 1/2

주관기관 서울 아산병원

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터는 Uroplakin II (UPII) promoter, VEGFR2(Flk-1) promoter, Tie 2 promoter, S100A4 promoter, α -Myosin heavy chain(α -MHC), villin promoter, MX promoter, Osteocalcin promoter, $\alpha 1(I)$ collagen promoter, $\alpha P2$ promoter, Loricrin promoter, C3(1) promoter, ARR2PB promoter, Fatty acid binding protein(FABP) promoter, Mox2 promoter, Nestin promoter, Calcium/Camodulin-dependent Kinase II (CaMKII) promoter 및 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) promoter로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein), 근적외선 형광 단백질(near-infrared fluorescent protein; iRFP) 및 tdTomato 형광 단백질(tdTomato fluorescent protein)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스계 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체.

청구항 5

제 1 항에 따른 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포를 유효 성분으로 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 줄기세포는 hESC(human embryonic stem cell) 유래인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물.

청구항 8

줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 재조합 리포터 벡터 구조체를 이용하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법은,

상기 재조합 리포터 백터 구조체로 형질전환된 세포를 모니터링하는 단계를 추가적으로 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 모니터링하는 단계는 세포단위 해상도를 지니는 광학 현미경 내시경 프로브를 사용하여 관찰하는 방식으로 수행하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 모니터링하는 단계는 상기 세포의 형광 신호 및 세포의 종류에 따라 구별가능한 서로 다른 형태를 영상화하여 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 모니터링하는 단계는 세포의 생체내에서의 이동 경로, 생존, 생착, 자가재생, 분화, 조직재생 및 증식 속도로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 모니터링하여 수행되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 프로모터 및 리포터 유전자가 생체내에서 조직 특이적으로 반응하여 형광을 나타내는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 14

제 9 항에 있어서, 상기 재조합 리포터 백터 구조체로 형질전환된 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 줄기세포는 hESC(human embryonic stem cell) 유래인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 백터 구조체를 포함하는 줄기세포 분화 계통 측정용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 백터 구조체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)란, 한 개의 세포가 여러 종류의 다른 세포를 생산할 수 있는 특이한 능력(다중분화능)을 가진 세포로서, 손상받은 신체 부위의 세포들을 재생할 수 있다. 줄기세포(stem cell)는 기원한다는 뜻의 ‘stem’에서 유래하며, 일본에서는 원기세포 또는 뿌리에서 나오는 줄기라 하여 간세포라고도 일컫는다.

[0003] 이러한 줄기세포의 종류로는 성체줄기세포(adult stem cell), 배아줄기세포(embryonic stem cell), 역분화줄기세포(induced pluripotent stem cell)가 대표적이다.

[0004] 성체줄기세포는, 우리 몸의 다양한 장기에 존재하면서 신체가 손상되었을 때 재생작용을 하는 세포로서, 대표적으로 골수, 털줄 등에 있는 조혈줄기세포, 중간엽기질세포 등이 있다. 이외에도 우리 몸의 거의 모든 장기에는 줄기세포가 존재하는데 이들을 통틀어 성체줄기세포라고 하며, 분화의 방향성이 거의 정해져 있지만 비교적 안전한 세포로 알려져 다양한 임상시험에 사용되고 있는 실정이다.

- [0005] 배아줄기세포는, 정자와 난자가 수정된 배아조직 중 배반포라는 조직에서 얻어지는 줄기세포로서, 신체를 구성하는 거의 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 가지고 있지만, 다른 사람의 수정란에서 얻어지기 때문에 세포 치료에 사용하려면 핵치환(세포의 핵 안에 들어있는 유전자를 교체하는 과정, 배아복제라고도 함) 과정을 거치게 되는 것이 특징이다.
- [0006] 역분화줄기세포(또는 "유도만능줄기세포"라고도 함)는 성인의 피부나 혈액 등 이미 어른이 된 자기 자신의 세포를 거꾸로 되돌려 미분화 상태의 세포로 역분화 시켜서 배아줄기세포와 거의 동등한 전분화능을 가지게 된 세포이다. 이 경우 타인의 난자를 사용하는 데 따른 윤리적인 문제도 없고, 체세포로부터 복제과정을 거치지 않고도 환자의 유전자와 일치하는 전분화능을 얻을 수 있어 세계적으로 활발하게 연구되는 세포이고, 2012년도에는 이러한 역분화 기술에 노벨 의학상이 수여되기도 하였다.
- [0007] 최근까지 이러한 줄기세포는 마땅한 의학적 수단이 없는 퇴행성 질환이나 심한 외상으로 인한 질병을 치료할 수 있는 새로운 대안으로 부상되어 왔다. 특히, 장기의 기능이 떨어진 질병에 대한 새로운 의학적 접근법으로서 주목받고 있다. 즉, 전술한 줄기세포들은 환자 치료에 바로 사용될 수 있는지에 대해서는 종류에 따라 약간의 차이가 있다.
- [0008] 성체줄기세포는 체외에서 다른 조작을 가하지 않고 환자 몸 안에 존재하는 세포를 얻기 때문에 상대적으로 안전해서 다양한 질환에서 가장 활발하게 임상시험이 이루어지고 있다. 특히, 백혈병 치료에서 알려진 조혈줄기세포는 이미 환자 치료에 이용되고 있지만, 그 외의 성체줄기세포의 치료 효과와 안전성에 대해서는 아직 연구가 진행 중이다.
- [0009] 배아줄기세포의 경우, 이를 얻는 과정에서 환자와 일치하는 유전자를 가진 세포를 얻기가 어려워 발생하는 면역 거부 반응을 극복해야 하는 문제점이 있다.
- [0010] 역분화줄기세포는 환자의 체세포를 역분화시켜 이런 면역거부반응을 해결할 수 있지만, 배아줄기세포와 마찬가지로 기형종과 같은 종양을 일으킬 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 문제점이 있다. 최근 일본 등지에서 역분화줄기세포를 환자의 임상치료에 적용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 아직은 대부분이 안전성과 효과를 측정하는 연구 단계에 불과하다는 보고가 있다.
- [0011] 이러한 줄기세포에 대한 연구와 함께, 생명과학 분야에서는 다양한 분야의 유전체 연구 사업들이 진행되면서 각종 질병의 병인으로 작용하는 유전자들에 대한 보고가 되고 있다. 그러나, 이러한 연구 결과들을 임상적인 치료나 예방효과로 연결짓기 위해서는 기능이 소실되거나 변형된 유전자를 교정하는 유전자를 체내에 도입하여 기능을 정상화시키거나 치료기능을 활성화 시켜주는 유전자 전달 기술에 대한 연구, 즉 유전자 치료 분야의 연구가 병행되어야 한다.
- [0012] 이러한 유전자 치료 분야의 연구 중에는 줄기세포를 주입하여 조직 특이적으로 발현되는 유전자를 포함하는 벡터 구조체에 대한 연구의 관심도 증대되고 있다.
- [0013] 그러나, 현재까지 여러 가지 바이러스 벡터들을 이용한 다양한 세포 내의 유전자 도입한 줄기세포 치료제와 관련된 기술이 실시되는 사정이 있으나, 바이러스 벡터를 이용한 유전자 도입의 효율성 측면에서 문제가 지적되었으며, 실제 임상 적용에 있어서는 여전히 만족스럽지 못하다. 따라서, 유전자 도입의 효율을 더욱 증가시키는 것이 요구되며, 임상 적용을 위한 시도가 꾸준히 늘어나고 있는 추세이다. 다만, 임상 적용을 위해 임상 적용 전 전임상적 효능 분석이 필요하다.
- [0014] 따라서, 최근 수년간 이 분야에 대한 관심 및 연구 결과들이 급증하고 있으며, 특히 최근 이러한 벡터 구조체를 이용한 줄기세포 치료를 위한 줄기세포의 효능 분석을 전제로 생체 내 주입된 줄기세포의 분리 및 분화에 대한 연구가 축적됨에 따라 치료 유전자가 도입된 줄기세포 치료 분야의 연구도 흥미있는 결과들도 보고되고 있다.
- [0015] 상기 결과들 중 줄기세포 분리 및 분화에 대한 분석 기술들이 제안되기도 하였다(특허문헌 1 및 2).
- [0016] 특허문헌 1에 제안된 기술은, (a) 제I형 TGF- β 수용체를 코딩하는 유전자로 지방-유래 중간엽 줄기세포를 형질 전환하거나 혹은 제I형 TGF- β 수용체를 코딩하는 유전자 및 제II형 TGF- β 수용체를 코딩하는 유전자로 지방-유래 중간엽 줄기세포를 형질전환하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 형질전환된 중간엽 줄기세포를 TGF- β 를 포함하는 연골세포 분화용 배지 중에서 배양하는 단계를 포함하는, 지방-유래 중간엽 줄기세포의 연골 세포로의 분화방법에 대한 것이고, 특허문헌 2에 제안된 기술은, 돼지 nanog 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 돼지 줄기세포의 전분화능(pluripotency) 분석용 조성물로서, 각각 TGF- β 를 포함하는 연골세포 분화용 배지 중에서 배양하는 단계 및 nanog 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를

포함하여야 하는 제한이 있으며, 실시간으로 주입된 줄기세포에 대한 분리 및 분화에 대한 분석을 모니터링할 수 없는 단점이 존재하였다.

- [0017] 상기 줄기세포 치료제의 임상 효능을 향상시키기 위하여, 이식한 줄기세포의 생존(survival)과 생착(engraftment) 능력의 향상이 가장 중요하다고 할 수 있으며, 따라서 적합한 미세 환경(microenvironment termed "niche")으로의 안정적인 줄기세포 생착은 그들의 생존, 자가재생능력, 분화능력/조직재생능력, 증식속도를 직-간접적으로 조절하기 때문에, 줄기세포 이식 후 이러한 줄기세포들의 분화를 포함한 특성을 생체 내에서도 모니터링을 실시간으로 정확히 파악할 수 있는 기술 개발이 무엇보다 절실하다.
- [0018] 한편, 줄기세포를 통한 치료 가능한 질환들 중 방광기능 이상 관련 질환에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 대해서는 본 발명자들은 종전 간질성 방광염(interstitial-cystitis/bladder pain syndrome, IC/BPS) 또는 케타민 유도 방광염(ketamine-induced cystitis, KC) 동물 모델에서 제대혈 유래의 간엽줄기세포를 이용한 방광 통증 증후군의 치료 가능성을 제시한 바 있다(비특허문헌 8, 9)
- [0019] 방광기능 이상 관련 질환 중 대표적인 것으로 간질성 방광염이 있다. 간질성 방광염은 구상화 및 Hunner 궤양과 같은 특징적인 방광경 소견과 비만세포 군집의 조직학적 소견을 가진 방광 통증 증후군(painful bladder syndrome; PBS) 질환으로서, 심각한 방광 염증 반응과 요로상피 기능 장애가 특징인 질환이다. 간질성 방광염 환자들은 심각한 치부 통증과 빈뇨(20-50번/일) 증상 때문에 정상적인 일상생활을 할 수 없는 정도에까지 이르지만 아직까지 만족할 만한 치료성과를 제시하는 대안이 없고, 아직까지 명확한 매커니즘이 밝혀지지 않아, 확실한 치료법이 없는 난치성 질환이다.
- [0020] 이러한 간질성 방광염 질환의 치료를 위해 지금까지 약물치료, 방광내 약물 주입법, 방광 수압 확장술, 보툴리누스 독소주사, 경요도 방광소작술 등 여러 치료들이 시행되고 있지만, 그 효능이 저조하고 다양한 치료방법에도 계속 통증이 심화되는 경향이 있었다. 때문에, 최근 줄기세포를 활용한 방광 기능 이상 질환들의 치료법 개발 연구들이 보고되면서 줄기세포를 이용한 방광 기능 이상 질환의 치료 가능성에 대한 관심이 고조되고 있다.
- [0021] 그러나, 방광 기능 이상 질환 동물 모델에서의 기존 줄기세포 치료 연구들은 방광기능의 개선을 보였으나, 기존 치료법과 비교하여 객관적인 치료 효능 증진을 비교한 연구와 이에 대한 정확한 기전 연구가 아직까지 부족하고, 생체 이식 후 체내 생존율과 생착률에 대한 기전 연구 및 관련 기술 개발이 부족하며, 장기 추적 기술에 대한 연구가 없어 안정성에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0022] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허공보 제10-1287861호
(특허문헌 0002) 2. 한국등록특허공보 제10-1230873호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0023] 본 발명의 목적은 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체를 제공하는데 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포를 유효 성분으로 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 재조합 리포터 벡터 구조체를 이용하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법을 제공하는데 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 목적은 상기 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체를 포함하는 줄기세포 분화 계통 측정용 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0027] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로모터는 Uroplakin II (UPII) promoter, VEGFR2(Flk-1) promoter, Tie 2 promoter, S100A4 promoter, a-Myosin heavy chain(a-MHC), villin promoter, MX promoter, Osteocalcin promoter, a1(I) collagen promoter, aP2 promoter, Loricrin promoter, C3(1) promoter, ARR2PB promoter, Fatty acid binding protein(FABP) promoter, Mox2 promoter, Nestin promoter, Calcium/Camodulin-dependent Kinase II (CaMKII) promoter 및 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) promoter로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 벡터 구조체는 하나의 벡터 구조체 내에 2 이상의 조직 특이적 프로모터를 포함할 수 있고, 상기 2 이상의 조직 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자 각각은 서로 다른 리포터 유전자일 수 있다. 더욱 상세하게는, 상기 조직 특이적 프로모터는 목적 분화 조직 특이적으로 발현되는 프로모터 또는 줄기세포의 분화계통이 무엇인지에 따라 특이적으로 발현될 수 있는 프로모터일 수 있으며, 이때, 상기 각 프로모터들은 서로 다른 리포터 유전자, 더 상세하게는 서로 다른 형광 단백질을 코딩하는 유전자에 각각에 서로 작동가능하게 연결되어 줄기세포의 위치 또는 줄기세포가 목적 분화조직으로 발현되었는지를 각기 다른 리포터 유전자의 발현 또는 각기 다른 형광 단백질 발현으로 확인할 수 있다.
- [0030] 또한, 본원 발명의 다른 일실시예로서, 예를들어 방광 내로 이식될 줄기세포가 방광 내 특정 조직 이동 또는 분화계통을 실시간으로 확인하기 위하여, 요로상피세포 특이적 프로모터, 내피세포 특이적 프로모터, 근육세포 특이적 프로모터, 기질세포 특이적 프로모터에 각각 다른 형광색을 갖는 리포터 유전자를 작동가능하게 연결하여, 이를 이용하여 실시간으로 줄기세포의 이동 및 분화계통을 확인할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 2 이상의 조직 특이적 프로모터는 하나의 벡터 구조체가 아닌 각기 다른 벡터 구조체에 포함될 수 있고, 이에 본 발명의 줄기세포는 2 이상의 벡터 구조체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2 이상의 조직 특이적 프로모터는 각각 서로 다른 리포터 유전자에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스계 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포를 유효 성분으로 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포는 줄기세포일 수 있고, 이 경우 상기 줄기세포는 M-MSC일 수 있으며, 상기 M-MSC는 hESC(human embryonic stem cell) 유래인 것일 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 재조합 리포터 벡터 구조체를 이용하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법은, 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포를 모니터링하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 모니터링하는 단계는 세포단위 해상도를 지니는 광학 현미경 내시경 프로브를 사용하여 관찰하는 방식으로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 모니터링하는 단계는 상기 주입된 세포의 형광 신호 및 세포의 종류에 따라 구별가능한 서로 다른 형태를 영상화하여 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 모니터링하는 단계는 주입된 세포의 생체내에서의 이동 경로, 생존, 생착, 자가재생, 분화, 조직재생 및 증식 속도로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 모니터링하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로모터 및 리포터 유전자가 생체내에서 조직 특이적으로 반응하여 형광을

나타내는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포는 줄기세포일 수 있으며, 상기 줄기세포는 예를 들어 hESC(human embryonic stem cell)에서 유래된 M-MSC(multipotent-mesenchymal stem cell)인 것일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체를 포함하는 줄기세포 분화 계통 측정용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0043] 본 발명에 따른 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체는, 줄기세포 치료제에 대한 효능을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 벡터 구조체를 사용할 경우, 줄기세포 치료제가 생체 내에 주입된 후 상기 줄기세포의 분화 계통을 모니터링함에 있어, 보다 고해상도의 생체 내 영상을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 주입된 줄기세포 치료제의 효능 분석 및 치료를 원하는 질환에 대한 보다 정확한 진단 및 치료가 가능하며, 약동학적 연구(pharmacokinetics, PK) 및 약력학적 연구(pharmacodynamics, PD)에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은, 본 발명에 따른 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체를 제조하는 과정을 모식적으로 나타낸 도이다.

도 2는, 간질성 방광염의 질환을 가진 백서 모델의 방광 기능을 평가하기 위해 살아있는 백서 모델에 요역동학기를 설치한 모습을 나타낸 사진이다.

도 3은, 본 발명의 일 실시예로써, 도 2를 통하여 케타민의 투입 용량[대조군(Sham, 0mg), 1mg, 5mg, 10mg, 25mg, 50mg]에 따라 유발된 질환 중 케타민 유도 방광염에 대한 백서 모델의 방광 기능 평가를 그래프 및 도표로 나타내어 방광 기능의 이상을 확인한 도이다.

도 4는, 상기 도 3에서의 방광 기능의 이상이 섬유화의 증가에 의한 것임을 확인한 도이다.

도 5는, 본 발명의 일 실시예로써, HCl로 유도된 간질성 방광염 백서 모델에서 0.1M HCl 투여 후의 (A) 염증 변화(H&E 염색), (B) 비만세포 활성화(톨루이딘 블루 염색)를 확인한 도이다.

도 6은, 본 발명의 일 실시예로써, 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델을 활용하여 UCB-MSC 성체줄기세포에 대한 전임상 효능 평가를, 방광 기능 검사(conscious cystometry), 조직병리 검사, 줄기세포 생체 내 분포 및 분화 검사 등의 평가 항목을 통하여 완료한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은, 본 발명의 일 실시예로써, 방광 출구 폐색 유도 과민성 방광염 질환을 가진 백서 모델에서 사람 지방 조직 유래 중간배엽줄기세포의 치료 효능 입증한 도이고(왼쪽), 파라크라인(paracrine) 효과에 대한 새로운 기전을 입증한 도이다(자체 Oct4+ 줄기세포 활성화와 줄기세포 이동성 증가, 오른쪽).

도 8은, 본 발명의 일 실시예로써, KARL STORZ사의 TELE PACK VET X miniature straight-forward semi-flexible telescope(초점거리 14-28mm, 직경 0.8mm)를 이용하여 HCl 유도 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델의 방광 내부를 관찰하기 위한 실험 프로세스를 보여주는 사진이다.

도 9는, 상기 도 8의 실험 프로세스를 통하여 HCl 유도 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델의 방광 내부를 관찰한 결과 정상군에 비해 과도한 혈관 증식을 관찰하였음을 나타낸 도이다.

도 10은, 본 발명에 따른 일 실시예로써, 백서 모델 방광 주위에 이식한 줄기 세포를 시간의 흐름(2일 후 및 22일 후)에 따라 비침습적으로 관찰한 도이다.

도 11은, 본 발명의 일 실시예에서 사용될 수 있는 미세 내시경의 구조를 모식적으로 나타낸 도이다.

도 12는, 본 발명의 일 실시예에서 사용될 수 있는, 공초점 현미경 시스템에 탈착 가능한 소형 동물용 내시경 시스템을 나타낸 도이다((i) 정면(좌) 및 측면(우) 조영형 내시경 (직경 1.2mm); (ii-iii) 홀더; (iv) 직진구동계; (v-viii) 회전구동계).

도 13은, 본 발명의 일 실시예에 따라 정면 조영형 마이크로 경성 내시경을 이용하여 얻은 실험용 백서의 내부 장기 형광 이미지를 나타낸 도이다((a-f) MHC-class II GFP+ 백서의 대식세포 이미지; (a) 소장, (b) 비장, (c) 신장, (d) 간, (e) 방광, (f) 요도; (g-h) Tie2 GFP+ 백서의 내피세포 이미지; (g) 신장, (h) 간; 기준자: 100 μ m).

도 14는, 본 발명의 일 실시예에 따라 정면 조영형 마이크로 경성 내시경을 이용하여 HC1 유도 백서 간질성 방광염 모델에 GFP 발현 M-MSC 줄기세포 이식 후 6달 동안 살아 있는 백서의 방광조직에서 요로 상피세포층에 생착된 세포에서 나오는 형광 이미지를 나타낸 도이다[(A) 생체 장기 이미징 실험 사진, (B) 줄기세포 이식 후 0, 2, 7, 14, 21, 28일간 각각 요로 상피층에 생착된 세포 이미지, DAT: day after transplantation, (C) 이식 전 세포의 GFP 형광 발현 이미지].

도 15는, 본 발명의 일 실시예에 따라 현미경 렌즈를 이용하여 HC1 유도 백서 간질성 방광염 모델에 GFP 발현 M-MSC 줄기세포 이식 후 6달 동안 살아 있는 백서의 방광 조직에서 외피층 부분에 생착된 세포에서 나오는 형광 이미지를 나타낸 도이다[(A) 생체 장기 이미징 실험 사진, (B) 줄기세포 이식하지 않은 개체의 방광 내 생체 이미지, (C) 줄기세포 이식 후 0, 2, 7, 14, 21, 28, 64, 85, 120, 181일간 각각 방광 외벽층에 생착된 세포 이미지 (40 배율), DAT: day after transplantation].

도 16은, 도 15의 결과에 대한 100배율 이미지를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 하기, 본 명세서에서 사용한 용어를 정의한다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 "백터"는 발현백터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동 가능하게 연결된 관심의 폴리펩타이드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 종로암호 서열을 포함한다. 상기 백터가 발현된, 즉 "발현 백터"는 하나 이상의 하나 이상의 선택 마커, 증폭제(enhancer), 폴리아데닐화 신호, 기타 등을 또한 포함한다. 발현백터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 "작동 가능하게 연결된"은 단편은 배열되어서 일체화 그들의 의도한 목적, 예를 들면, 전사는 프로모터에서 개시하고 암호화 단편을 통해 종로 암호로 진행하는데 작용하는 것을 나타낸다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형질전환(transfection)"은 플라스미드 형태의 DNA를 세포에 물리화학적으로 직접 도입하거나 바이러스를 숙주세포에 감염시켜 외래 유전자를 발현시키는 것을 의미한다.
- [0049] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 방광 기능 이상), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0050] 본 발명은 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 백터 구조체에 관한 것이다.
- [0051] 보다 구체적으로, 본 발명은 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 백터 구조체에 관한 것이다.
- [0052] 도 1은, 본 발명에 따른 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 백터 구조체를 제조하는 과정을 모식적으로 나타낸 도이다.
- [0053] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 백터 구조체는 프로모터 및 리포터 유전자를 포함한다.
- [0054] 예를 들어, 도 1 중 "2"는 프로모터일 수 있고, "3"은 리포터 유전자일 수 있으며, "4"는 재조합 리포터 백터 구조체를 플라스미드, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스로 구현할 수 있게 하는 전달 백터(delivery vector)일 수 있으나, 순서 및 위치는 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 프로모터는 조직에 특이적으로 발현되는 프로모터라면 사용될 수 있고, 예를 들어 Uroplakin II (UPII) promoter, VEGFR2(Flk-1) promoter, Tie 2 promoter, S100A4 promoter, α -Myosin heavy chain(α -MHC), villin

promoter, MX promoter, Osteocalcin promoter, $\alpha 1(I)$ collagen promoter, $\alpha P2$ promoter, Loricrin promoter, C3(1) promoter, ARR2PB promoter, Fatty acid binding protein(FABP) promoter, Mox2 promoter, Nestin promoter, Calcium/Camodulin-dependent Kinase II (CaMKII) promoter 및 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) promoter로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0056] 상기 리포터 유전자는 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein), 근적외선 형광 단백질(near-infrared fluorescent protein; iRFP) 및 tdTomato 형광 단백질(tdTomato fluorescent protein)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 필요한 경우, 상기 벡터 구조체는 제한효소를 사용하여 절단하는 과정을 포함하여 제조될 수 있으며, 이 경우 전술한 리포터 유전자에 제한효소의 절단부위가 존재할 때에는 부위특이적 돌연변이 등을 유발시켜 인식부위를 변형시키는 것이 바람직하다.
- [0058] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스계 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명은 또한, 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물에 관한 것이다.
- [0060] 보다 구체적으로, 본 발명은 전술한 본 발명의 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포를 유효 성분으로 포함하는 줄기세포 분화 계통 모니터링용 조성물에 관한 것이다.
- [0061] 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포는 줄기세포일 수 있고, 상기 줄기세포는 M-
MSC(multipotent-mesenchymal stem cell)일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 상기 M-
MSC는 hESC(human embryonic stem cell) 유래인 것일 수 있으며, 이 경우 상기 M-
MSC는 하기 실시예에 기재된 방법을 통하여 배양될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 상기 조성물의 구체적인 성분이나 성분간 비율은 본 발명의 효과 구현에 장애가 되지 않는 이상, 제한없이 선택되어 포함될 수 있다.
- [0064] 본 발명은 또한, 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법에 관한 것이다.
- [0065] 보다 구체적으로, 본 발명은 줄기세포의 위치 및 분화 계통을 확인할 수 있도록 리포터 유전자를 조직 특이적으로 발현시키는 프로모터; 및 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 재조합 리포터 벡터 구조체를 이용하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법에 관한 것이다.
- [0066] 상기 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법은, 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포를 모니터링하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 모니터링하는 단계는 세포단위 해상도를 지니는 광학 현미경 내시경 프로브를 사용하여 관찰하는 방식으로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0068] 상기 광학 현미경 내시경 프로브는 영상을 제공할 수 있는 장치라면 특별히 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 비침습 영상이 가능한 직경이 1.0mm 이내의 미세 내시경 프로브를 이용한 내시현미경 (Endo-microscope) 형태를 가질 수 있다.
- [0069] 일례로, 상기 미세 내시경 제작에 있어서, 경성형 GRIN (Gradient index) 렌즈를 사용할 수 있으며, 상기 GRIN 렌즈 사용시에는 생체 시료와의 접촉면이 편평하여도 영상획득이 용이하도록 설계 할 수 있으나, 일반적인 렌즈를 사용할 경우, 곡면을 가지고 있어 생체 시료와 내시경이 만나는 접합부가 완벽하게 밀착되기 어렵다는 점을 고려하여 적절하게 선택되어 사용될 수 있다.
- [0070] 상기 GRIN 렌즈는 굴절률이 반지름 방향으로 점차 변화를 하는 분포를 갖도록 제작된 굴절률 분포형 렌즈로 그 직경과 길이, 분포 굴절률 및 제작 공법 등 다양한 파라미터 변화를 통해 초점거리나 개구수 등 원하는 렌즈의 특성을 결정할 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 광학 현미경 내시경 프로브는, 3중 GRIN 렌즈 결합, 다중 렌즈 광학계 조합일 수 있고, 고해상도를 얻을 수 있는 영상 시스템과 결합되어 사용될 수 있으며, 비침습적으로 다양한 직경을 갖는 생체 내부를 볼 수 있는 내시경을 접목하여 실시간으로 in-vivo 뿐만 아니라 in vitro, ex vivo 상의 세포 단위 해상도로 병리 조직 소견과 약물동학 분석이 가능하도록 제작될 수 있다.

- [0072] 따라서, 상기 모니터링하는 단계는, 상기 주입된 세포를 고해상도 광학 프로브를 사용하여 비침습적인 방법으로 장기간 실시간 관찰하는 방식으로 모니터링하는 단계일 수 있다. 본 발명에 따른 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법은 주입된 세포를 세포단위 해상도를 지니는 광학 현미경 내시경 프로브를 사용하여 관찰하는 방식으로 모니터링하는 단계를 포함함으로써, 세포단위의 고해상도 이미징 결상이 가능한 구조로 설계되어 세포의 형태 인식이 가능하고, 1.0mm 이내의 가는 내시경 직경을 사용하여 살아있는 시편의 생체내 영상을 비침습적으로 실시간 관찰할 수 있다.
- [0073] 상기 모니터링하는 단계는 세포의 형광 신호 및 세포의 종류에 따라 구별가능한 서로 다른 형태를 영상화하여 측정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 상기 모니터링하는 단계는, 세포의 생체내에서의 이동 경로, 생존, 생착, 자가재생, 분화, 조직재생 및 증식 속도로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 모니터링하여 수행되는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 상기 프로모터 및 리포터 유전자가 생체내에서 조직 특이적으로 반응하여 형광을 나타내는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 상기 재조합 리포터 벡터 구조체로 형질전환된 세포는 줄기세포일 수 있고, 상기 줄기세포는 M-MSC(multipotent-mesenchymal stem cell)일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 상기 M-MSC는 hESC(human embryonic stem cell) 유래인 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명은 또한, 줄기세포 분화 계통 측정용 키트에 관한 것이다.
- [0079] 보다 구체적으로, 본 발명의 줄기세포 분화 계통 모니터링용 재조합 리포터 벡터 구조체를 포함하는 줄기세포 분화 계통 측정용 키트에 관한 것이다.
- [0080] 상기 키트는 줄기세포 분화 계통을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0081] 본 발명의 키트는 특정 질환을 가지는 환자에게 주입된 줄기세포 치료제가 상기 질환의 원인이 되는 조직에 생착하여 해당 조직 세포로 분화되었는지 아닌지를 구별하여 의사 등 진료 행위자가 줄기세포 치료제의 효능을 판단하여 추가적인 치료 방향을 결정하는 것을 가능하게 할 뿐 아니라, 환자에 대한 줄기세포 치료제의 효능을 실시간으로 모니터링하여 그 결과에 따라 치료 방향을 변경하는 것을 가능하게 한다.
- [0082] 상기 질환은 줄기세포 치료제를 사용하여 치료가 가능한 질환을 모두 포함할 수 있으나, 본 발명에서는 바람직하게 간질성 방광염 질환일 수 있다.
- [0083] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0084] **실시예 1. 재료 및 방법**
- [0085] **1-1. 인간배아줄기세포(human embryonic stem cells; hESCs) 유래 중간배엽줄기세포(multipotent mesenchymal stem cells; M-MSC)의 배양**
- [0086] 미분화된 H9-hESC의 유지 및 M-MSC로의 분화는 기존에 기재된 바대로 수행하여 준비하였다(Kim, J.M., *et al.* Perivascular Progenitor Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells Exhibit Functional Characteristics of Pericytes and Improve the Retinal Vasculature in a Rodent Model of Diabetic Retinopathy. *Stem Cells Translational Medicine* (2016) 및 Hong, K.-S., *et al.* A Porous Membrane-Mediated Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 322-329 (2014)).
- [0087] 준비된 중간배엽줄기세포(M-MSCs)는 랫트 꼬리의 콜라겐 타입 I(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 코팅된 플레이트에서 EGM2-MV 배양액(Lonza, San Diego, CA)을 사용하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 모든 중간배엽줄기세포(M-MSCs)는 분화능력(multipotency)을 유지하기 위하여 10passage 이하의 세포를 사용하였다.
- [0088] **1-2. 간질성 방광염 유발 동물 모델**
- [0089] 모든 동물 실험은 울산대학교 의과대학의 실험 동물 운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 진행되었다(IACUC-2014-14-167).

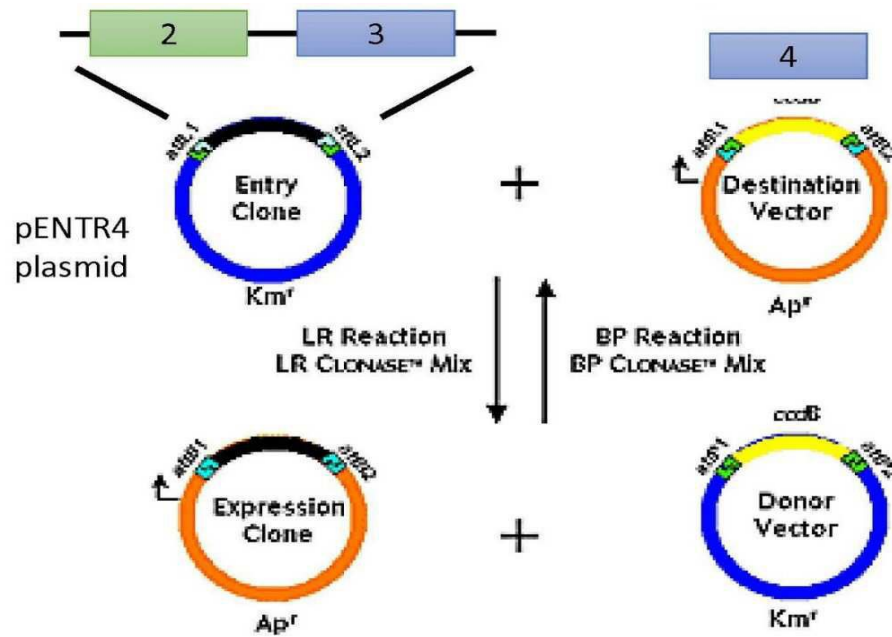
- [0090] 도 2 내지 4는 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델의 방광 기능을 평가하기 위한 과정 및 평가 결과를 나타낸 도이다.
- [0091] 보다 구체적으로 도 2는, 간질성 방광염의 질환을 가진 백서 모델의 방광 기능을 평가하기 위해 살아있는 백서 모델에 요역동학기기를 설치한 모습을 나타낸 사진이다. 또한, 도 3은, 본 발명의 일 실시예로써, 도 2를 통하여 케타민의 투입 용량[대조군(Sham, 0mg), 1mg, 5mg, 10mg, 25mg, 50mg]에 따라 유발된 질환 중 케타민 유도 방광염에 대한 백서 모델의 방광 기능 평가를 그래프 및 도표로 나타내어 방광 기능의 이상을 확인한 도이다. 또한, 도 4는, 상기 도 3에서의 방광 기능의 이상이 섬유화의 증가에 의한 것임을 확인한 도이다.
- [0092] 도 2 내지 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 간질성 방광염 질환은 방광 기능의 이상이 케타민과 관계가 있으며, 이는 케타민 양에 따른 섬유화와 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.
- [0093] **1-2-A. HCl 유발 간질성 방광염 동물 모델**
- [0094] 20마리의 10주령 암컷 Sprague-Dawley 백서(Orient Bio, 가평, 경기도)의 방광에 26-게이지 혈관 카테터를 이용하여 요도를 통해 10분 동안 0.1M HCl을 주입한 후 중화시켰고 식염수로 세척하였다. 대조군으로 PBS(phosphate-buffered saline)을 HCl과 동일한 방법으로 주입하였다.
- [0095] 도 5는, 본 발명의 일 실시예로써, HCl로 유도된 간질성 방광염 백서 모델에서 0.1M HCl 투여 후의 (A) 염증 변화(H&E 염색), (B) 비만세포 활성화(톨루이딘 블루 염색)를 확인한 도이다.
- [0096] **1-2-B. LPS 점적주사로 유발된 간질성 방광염 동물 모델**
- [0097] 10주령 암컷 Sprague-Dawley 백서(Orient Bio, 가평, 경기도)의 방광에 26-게이지 혈관 카테터를 이용하여 요도를 통해 프로타민 황산염(protamine sulfate; PS)를 점적주사하여 요로상피의 노출(denudation)을 일으켰다. 45분 후 방광이 비워지면 PBS(phosphate-buffered saline) 용액으로 세척한 후 30분 동안 LPS(lipopolysaccharide, 525 mg/rat, Sigma-Aldrich)로 처리하여 염증반응을 유도하였다. 5주 이상 매주 프로타민 황산염/LPS의 점적주사를 통해 요로상피의 만성적 상처를 유도하였다.
- [0098] **1-2-C. 케타민 정맥주사로 유발된 간질성 방광염 동물 모델**
- [0099] 10주령 암컷 Sprague-Dawley 백서(Orient Bio, 가평, 경기도)에 25 mg/kg 케타민 하이드로클로라이드(ketamine hydrochloride, EK1352-11; Huones, 성남, 경기도)를 5일 동안 매일 정맥내 주사로 투여한 후 2일 동안 쉬는 사이클을 2회 반복하였다. 대조군으로 PBS(phosphate-buffered saline)를 케타민과 동일한 방법으로 주입하였다.
- [0100] **실시예 2. 조직 특이적 발현 벡터 구조체 제작**
- [0101] 조직 특이적 프로모터와 형광 단백질을 각각 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증합하여 DNA를 확보한 후, EcoRI, BamHI, XhoI 제한 효소와 반응하여, pENTR4 중간체 플라스미드에 삽입하였다. 확립한 조직 특이적 프로모터와 형광단백질 발현 구조체를 레트로 바이러스나 렌티바이러스 형태의 벡터 구조체로 변환 하기 위하여, ccdB 자살 유전자가 포함되어 있는 해당 바이러스 특이적 벡터와 Invitrogen사의 LR Clonase 키트를 사용하여 Gateway 클로닝을 실시하였다(도 1 참조).
- [0102] **실시예 3. 조직 특이적 발현 벡터 구조체를 생체 내 도입**
- [0103] 조직 특이적 프로모터와 형광 단백질 구조체를 발현하는 레트로 바이러스나 렌티바이러스 플라스미드를 Invitrogen의 Virapower Lentiviral Packaging system 키트를 활용하여 해당 바이러스 파티클 (particle)을 제조하였다. 제조된 레트로 및 렌티바이러스는 5×10^5 M-MSC 줄기세포에 10 multiplicity of infection (MOI) 농도로 감염시켜서 조직 특이적 형광단백질 발현 구조체를 안정적으로 발현하는 M-MSC 줄기세포를 하였다.
- [0104] **실시예 4. 생체 내 도입된 줄기세포의 분화 계통에 대한 분석**
- [0105] 세포단위의 고해상도 이미징 결상이 가능하고, 1.0mm 이내의 가는 내시경 직경을 갖는 미세 내시경을 제작하였다. 제작된 고해상도 미세 내시경과 고해상도 형광 현미경 시스템 집적화 기술 (전술한 현미경 내시경 프로브)을 통하여, 줄기세포 이식 후 생착물 및 분화 계통을 분석하였다.
- [0106] 도 6 내지 16은, 본 발명에 따른 벡터 구조체 및 이를 사용한 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법이 전임상적으로 줄기세포 치료제 분야에서 유용하게 사용될 수 있음을 확인한 것이다.

[0107] 보다 구체적으로, 도 6은, 본 발명의 일 실시예로써, 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델을 활용하여 UCB-MSC 성체줄기세포에 대한 전임상 효능 평가를, 방광 기능 검사(conscious cystometry), 조직병리 검사, 줄기세포 생체 내 분포 및 분화 검사 등의 평가 항목을 통하여 완료한 결과를 나타낸 도이다. 도 7은, 본 발명의 일 실시예로써, 방광 출구 폐색 유도 과민성 방광염 질환을 가진 백서 모델에서 사람 지방 조직 유래 중간배엽줄기세포의 치료 효능 입증한 도이고(왼쪽), 파라크라인(paracrine) 효과에 대한 새로운 기전을 입증한 도이다(자체 Oct4+ 줄기세포 활성화와 줄기세포 이동성 증가, 오른쪽). 도 8은, 본 발명의 일 실시예로써, KARL STORZ사의 TELE PACK VET X miniature straight-forward semi-flexible telescope(초점거리 14-28mm, 직경 0.8mm)를 이용하여 HCI 유도 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델의 방광 내부를 관찰하기 위한 실험 프로세스를 보여주는 사진이다. 도 9는, 상기 도 8의 실험 프로세스를 통하여 HCI 유도 간질성 방광염 질환을 가진 백서 모델의 방광 내부를 관찰한 결과 정상군에 비해 과도한 혈관 증식을 관찰하였음을 나타낸 도이다. 도 10은, 본 발명에 따른 일 실시예로써, 백서 모델 방광 주위에 이식한 줄기 세포를 시간의 흐름(2일 후 및 22일 후)에 따라 비침습적으로 관찰한 도이다. 도 11은, 본 발명의 일 실시예에서 사용될 수 있는 미세내시경의 구조를 모식적으로 나타낸 도이다. 도 12는, 본 발명의 일 실시예에서 사용될 수 있는, 공초점 현미경 시스템에 탈착 가능한 소형 동물용 내시경 시스템을 나타낸 도이다((i) 정면(좌) 및 측면(우) 조영형 내시경 (직경 1.2mm); (ii-iii) 홀더; (iv) 직진구동계; (v-viii) 회전구동계). 도 13은, 본 발명의 일 실시예에 따라 정면 조영형 마이크로 경성 내시경을 이용하여 얻은 실험용 백서의 내부 장기 형광 이미지를 나타낸 도이다((a-f) MHC-class II GFP+ 백서의 대식세포 이미지; (a) 소장, (b) 비장, (c) 신장, (d) 간, (e) 방광, (f) 요도; (g-h) Tie2 GFP+ 백서의 내피세포 이미지; (g) 신장, (h) 간; 기준자: 100 μ m). 도 14는, 본 발명의 일 실시예에 따라 정면 조영형 마이크로 경성 내시경을 이용하여 HCI 유도 백서 간질성 방광염 모델에 GFP 발현 M-MSC 줄기세포 이식 후 6달 동안 살아 있는 백서의 방광조직에서 요로 상피세포층에 생착된 세포에서 나오는 형광 이미지를 나타낸 도이다[(A) 생체 장기 이미징 실험 사진, (B) 줄기세포 이식 후 0, 2, 7, 14, 21, 28일간 각각 요로 상피층에 생착된 세포 이미지, DAT: day after transplantation, (C) 이식 전 세포의 GFP 형광 발현 이미지]. 도 15는, 본 발명의 일 실시예에 따라 현미경 렌즈를 이용하여 HCI 유도 백서 간질성 방광염 모델에 GFP 발현 M-MSC 줄기세포 이식 후 6달 동안 살아 있는 백서의 방광 조직에서 외피층 부분에 생착된 세포에서 나오는 형광 이미지를 나타낸 도이다[(A) 생체 장기 이미징 실험 사진, (B) 줄기세포 이식하지 않은 개체의 방광 내 생체 이미지, (C) 줄기세포 이식 후 0, 2, 7, 14, 21, 28, 64, 85, 120, 181일간 각각 방광 외벽층에 생착된 세포 이미지 (40 배율), DAT: day after transplantation]. 도 16은, 도 15의 결과에 대한 100배율 이미지를 나타낸 도이다.

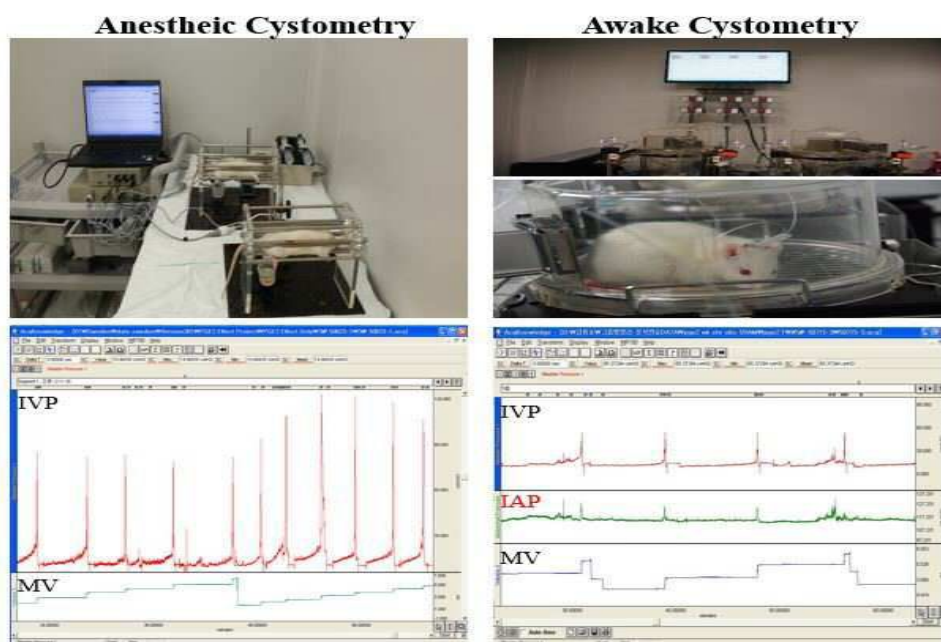
[0108] 도 6 내지 16에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 백서 구조체 및 이를 사용하는 줄기세포 분화 계통 모니터링 방법의 경우, 보다 고해상도의 영상을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 주입된 줄기세포 치료제의 효능 분석 및 치료를 원하는 질환에 대한 보다 정확한 진단 및 치료가 가능하며, 약동학적 연구(pharmacokinetics, PK) 및 약력학적 연구(pharmacodynamics, PD)에 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

도면

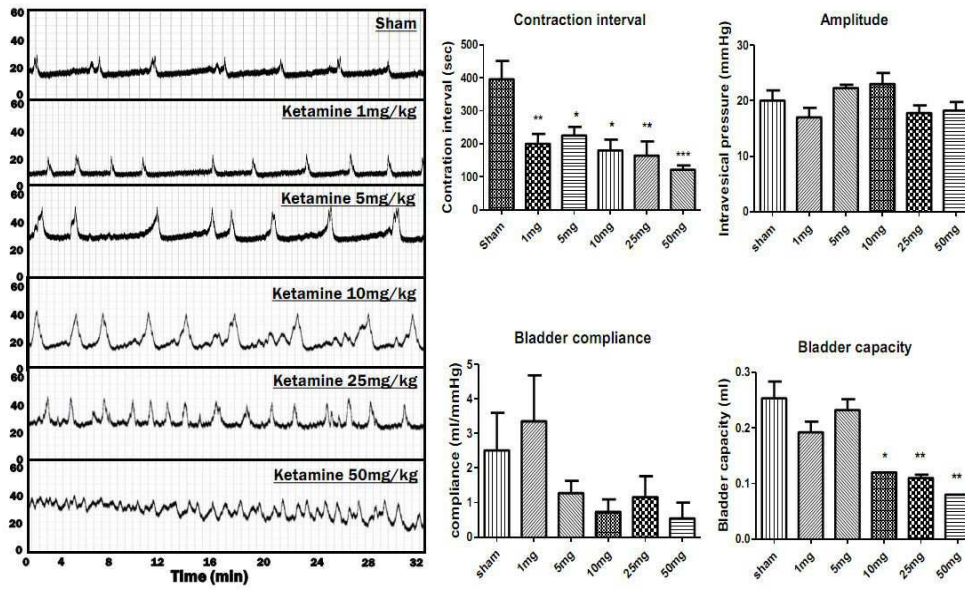
도면1



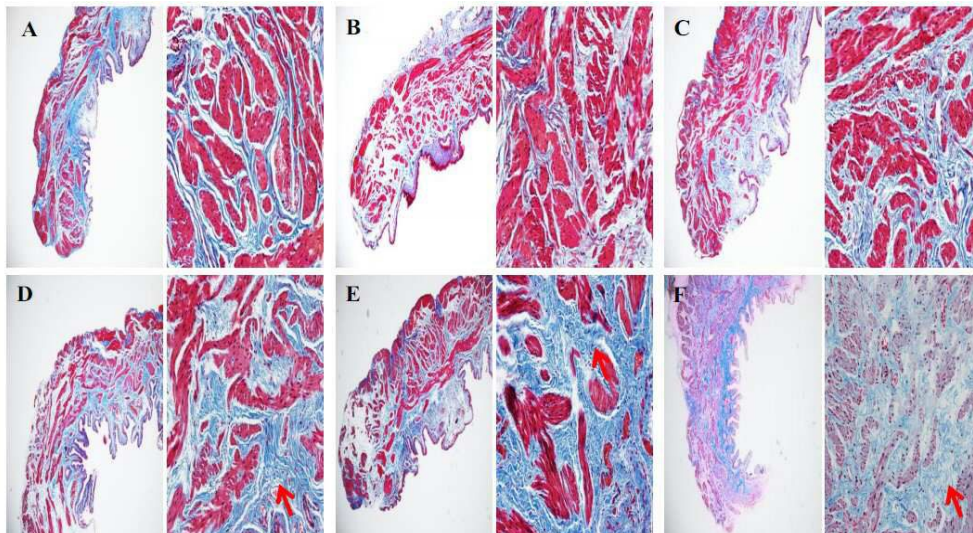
도면2



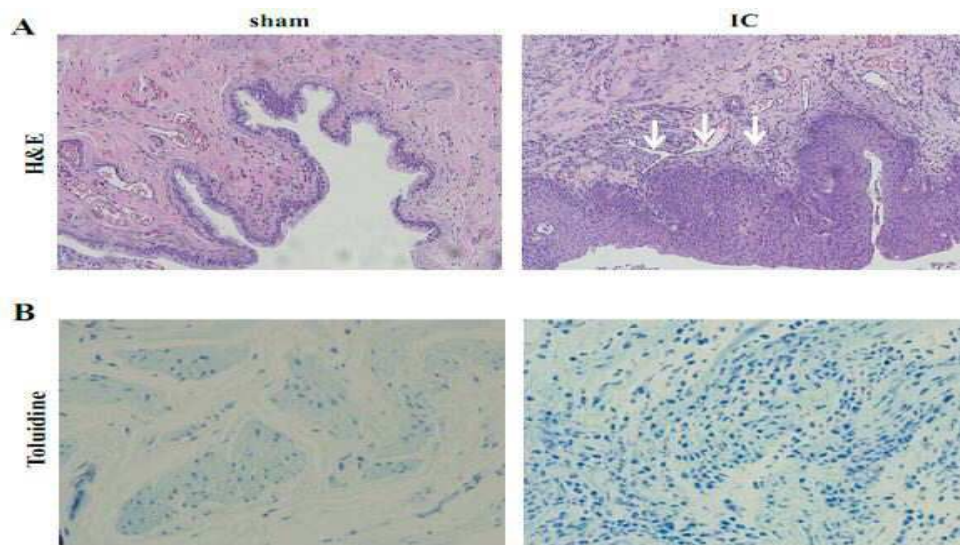
도면3



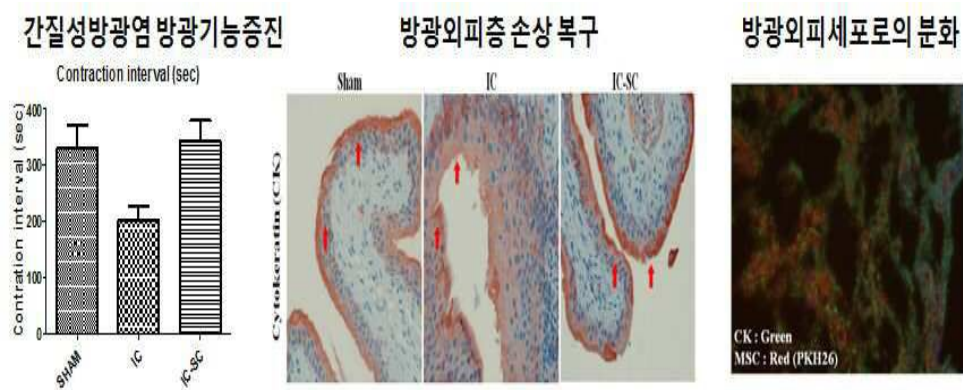
도면4



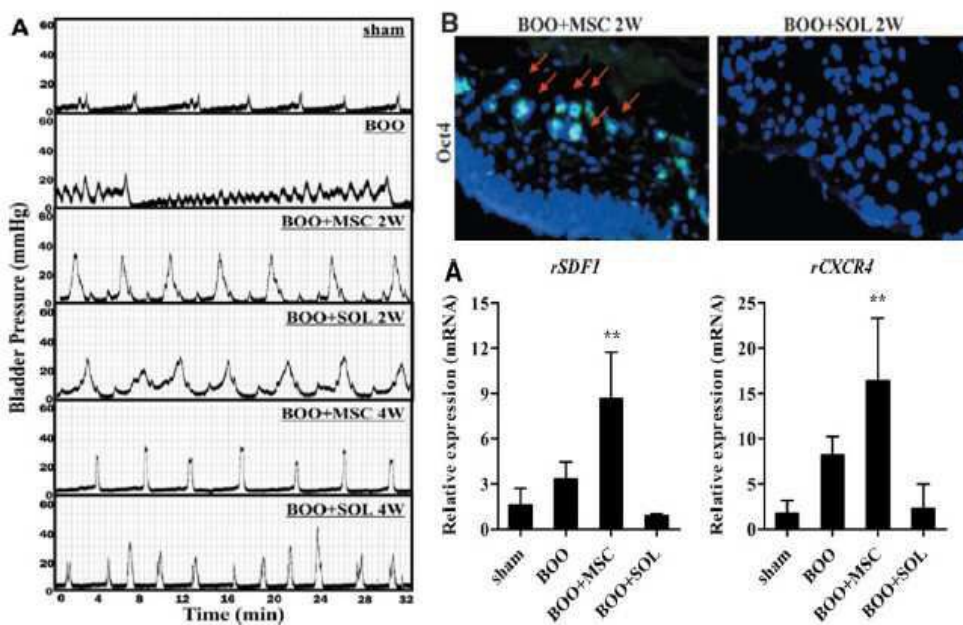
도면5



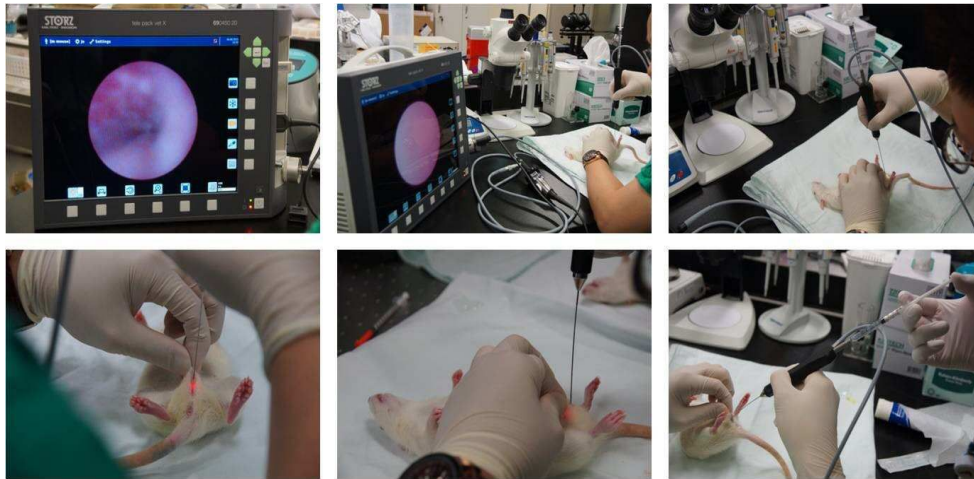
도면6



도면7



도면8



도면9

Sham



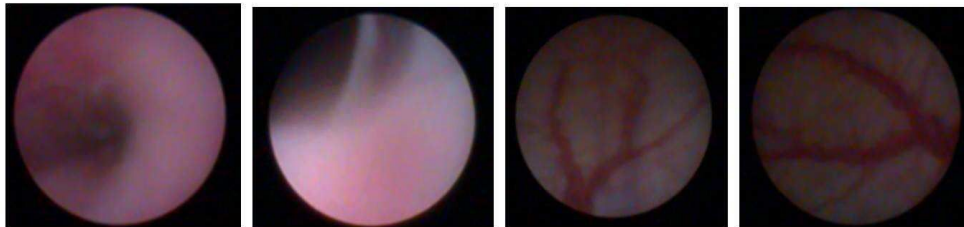
Bladder neck 위치 확인

Bladder neck 으로 접근

Normal mucosa finding

Normal vascular finding

IC (HCl-instillation induced)



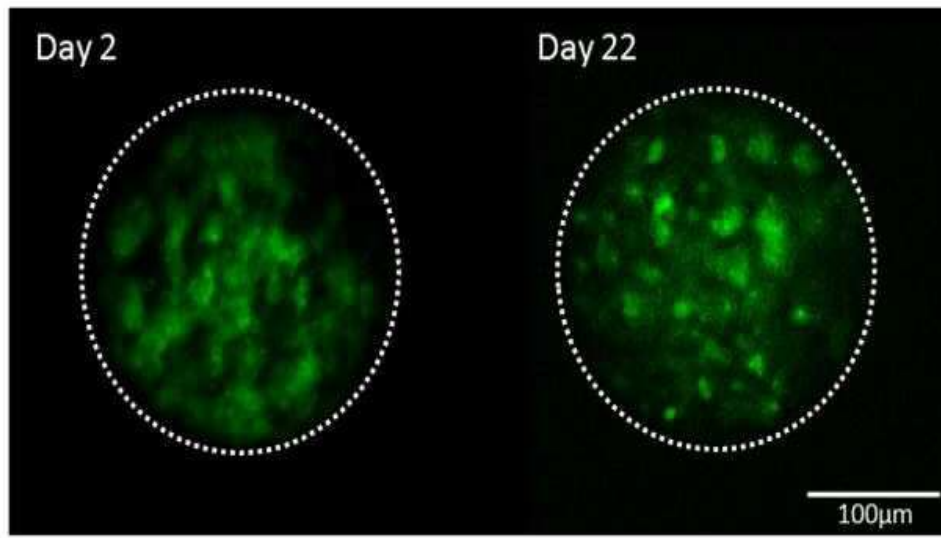
Bladder neck 위치 확인

Bladder neck 으로 접근

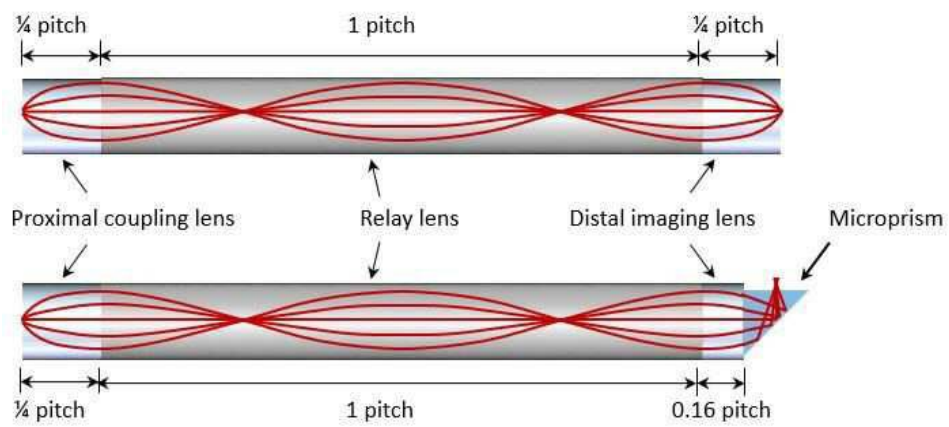
Abnormal vascular growth

Abnormal vascular growth

도면10

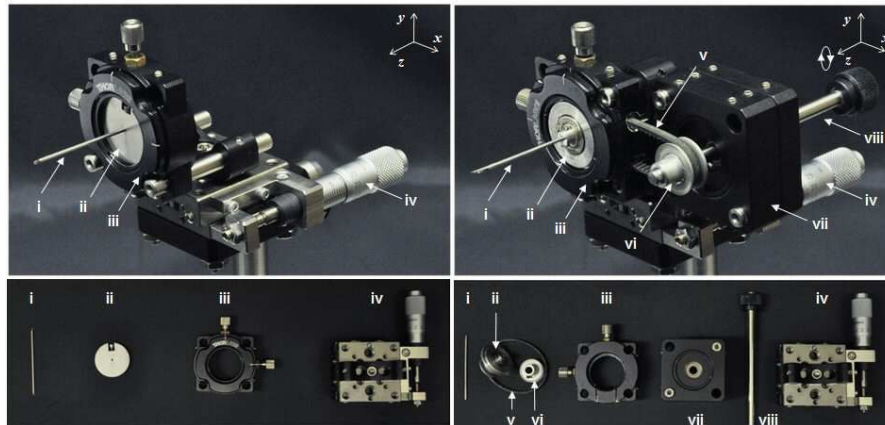


도면11



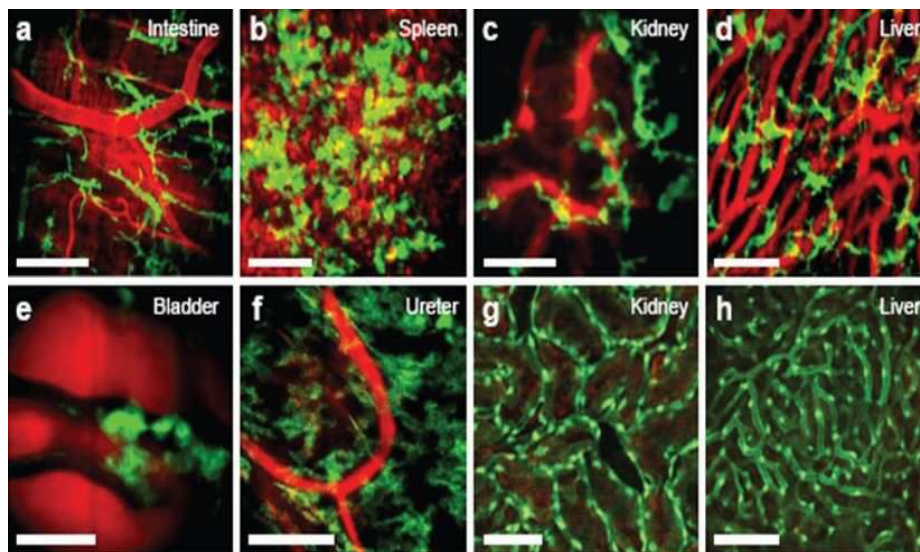
도면12

Integration with conventionalLSCM / MLSM

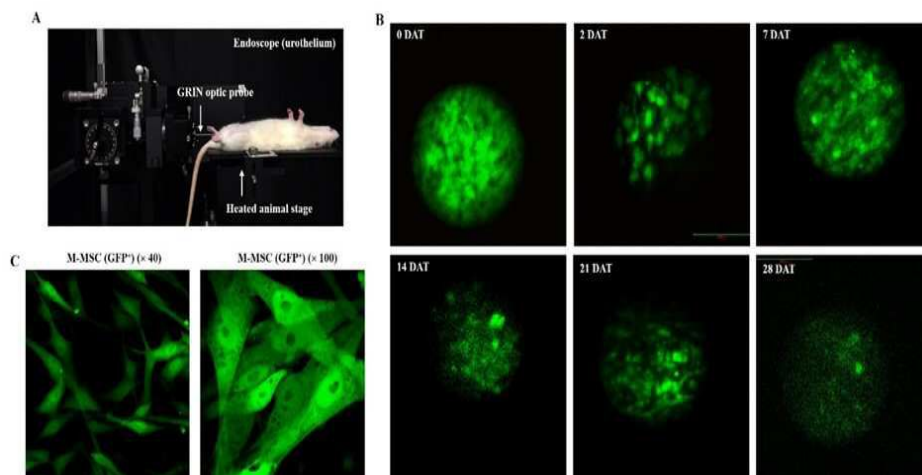


- ❖ Cost effectiveness due to **Home-built system**
- ❖ **Compatibility with Optical devices**
- ❖ Possibility of **precise alignment and easy access**

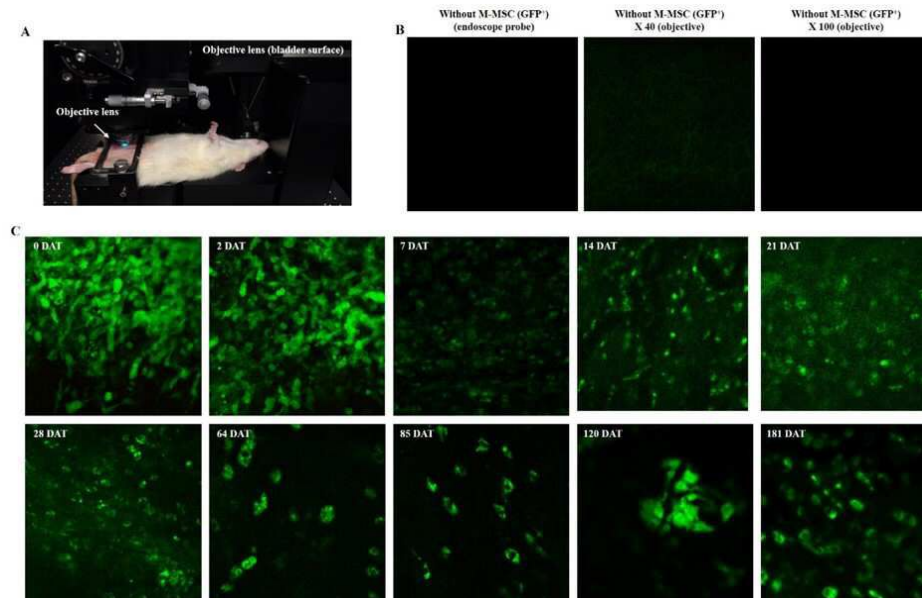
도면13



도면14



도면15



도면16

