(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월21일
(11) 등록번호 10-2316007
(24) 등록일자 2021년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/36* (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0625 (2013.01)
A61K 35/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7032087
(22) 출원일자(국제) 2015년04월20일
심사청구일자 2019년12월16일
(85) 번역문제출일자 2016년11월17일
(65) 공개번호 10-2016-0145170
(43) 공개일자 2016년12월19일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2015/002156
(87) 국제공개번호 WO 2015/162908
국제공개일자 2015년10월29일
(30) 우선권주장
JP-P-2014-087247 2014년04월21일 일본(JP)
JP-P-2014-260434 2014년12월24일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2010539914 A
WO2001003743 A1
WO2007035843 A2
WO2010011352 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
카오카부시키가이샤
일본국도꾜도쥬오쿠니혼바시가야바쵸1쵸메14반10고
(72) 발명자
나카기리 요리코
일본 도치기켄 하가군 이치카이마치 아카바네 2606 카오카부시키가이샤 겡큐쇼 나이
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **피부 유래 전구 세포의 제작 방법**

(57) 요 약

인간 유래 다능성 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양하여, 상기 다능성 줄기세포를 피부 유래 전구세포로 분화시키는, 피부 유래 전구세포의 제작 방법; 인간 유래 다능성 줄기세포를 피부 유래 전구세포로 분화시키기 위한 분화 유도 배지로서, 분화 유도 촉진제로서 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는, 분화 유도 배지; 및 Wnt 시그널의 작용제를 유효성분으로 함유하는, 인간 유래 다능성 줄기세포를 피부 유래 전구세포로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제.

(52) CPC특허분류
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 유래 다능성 줄기세포를, CHIR99021 (상품명), 비스-인돌로(인디루빈) 화합물, NSC693868 (상품명), SB216763 (상품명), SB415286 (상품명) 및 TWS119 (상품명) 로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양하여, 다능성 줄기세포를, 네스틴 및 피브로넥틴을 모두 발현하는 피부 유래 전구 세포 (Skin-Derived Precursor cells) 로 분화시키는 것을 포함하는, 피부 유래 전구 세포의 제작 방법으로서,

분화 유도 배지의 기초 배지가 D-MEM/Ham's F12 배지이고,

분화 유도 배지가 B-27 보충제, 및 표피 성장 인자 및 염기성 섬유아세포 성장 인자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 영양 인자를 추가로 함유하는, 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 다능성 줄기세포가 유도된 다능성 줄기세포인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 다능성 줄기세포가 다능성 줄기세포 유래 신경능선 줄기세포인, 방법.

청구항 4

인간 유래 신경능선 줄기세포를, CHIR99021 (상품명), 비스-인돌로(인디루빈) 화합물, NSC693868 (상품명), SB216763 (상품명), SB415286 (상품명) 및 TWS119 (상품명) 로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양하여, 신경능선 줄기세포를, 네스틴 및 피브로넥틴을 모두 발현하는 피부 유래 전구 세포 (Skin-Derived Precursor cells) 로 분화시키는 것을 포함하는, 피부 유래 전구 세포의 제작 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 분화 유도 배지를 이용해 분화시킨 피부 유래 전구 세포에 대해서 1회 또는 2회 이상의 계대 배양을 하는, 방법.

청구항 6

인간 유래 다능성 줄기세포를, 네스틴 및 피브로넥틴을 모두 발현하는 피부 유래 전구 세포 (Skin-Derived Precursor cells) 로 분화시키기 위한 분화 유도 배지로서, 분화 유도 촉진제로서, CHIR99021 (상품명), 비스-인돌로(인디루빈) 화합물, NSC693868 (상품명), SB216763 (상품명), SB415286 (상품명) 및 TWS119 (상품명) 로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는, 분화 유도 배지.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 분화 유도 배지의 기초 배지가 D-MEM/Ham's F12 배지인, 분화 유도 배지.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서, B27 보충제, 및 표피 성장 인자 및 염기성 섬유아세포 성장 인자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 영양 인자를 추가로 함유하는, 분화 유도 배지.

청구항 9

CHIR99021 (상품명), 비스-인돌로(인디루빈) 화합물, NSC693868 (상품명), SB216763 (상품명), SB415286 (상품명) 및 TWS119 (상품명) 로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 Wnt 시그널의 작용제를 유효성분으로 함유하는, 인간 유래 다능성 줄기세포를, 네스틴 및 피브로넥틴을 모두 발현하는 피부 유래 전구 세포 (Skin-

Derived Precursor cells) 로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부 유래 전구 세포의 제작 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재, 병이나 사고 등에 의해 없어진 세포, 조직, 기관의 재생이나 기능을 회복시키는 재생 의료가 주목을 받고 있다. 그리고 재생 의료의 현장에서는 외과적 치료나 뜻하지 않은 사고 등에서 없어진 세포, 조직, 기관의 재생 등에 인공적으로 배양한 세포나 조직을 이용하는 치료가 여러 가지 시도되고 있다. 또한 모낭을 재생하는 기술은 외관면(사회적 측면), 건강면 등에서 사람들의 퀄리티 오브 라이프(QOL)의 향상에 중요한 의미를 가진다.

[0003] 세포나 조직의 인공적인 배양에 이용하는 세포원의 1종으로서 피부 유래 전구 세포(이하, 본 명세서에 있어서 "SKPs"로도 말한다)가 알려져 있다. SKPs는 모유두에 존재해, 신경세포, 신경교 세포(신경교세포), 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 진피 섬유아세포, 모유두 세포 등으로 분화하는 것이 가능한 세포이다. 그리고 SKPs는 진피 환경의 유지, 조직 수복, 모낭 형성 등에 중요한 기능을 이루는 세포이다(비특허문헌 1 및 2 참조).

[0004] 따라서 재생 의료의 현장에서는 외과적 치료나 뜻하지 않은 사고 등에서 없어진 세포, 조직, 기관의 재생을 위해서 SKPs를 효율적으로 대량으로 입수하는 방법의 개발이 요구되고 있다. 또한 QOL의 향상에 이바지하는 모낭의 재생을 위해서도 SKPs를 효율적으로 대량으로 입수하는 방법이 요구되고 있다.

[0005] 지금까지 보고되어 있는 SKPs의 입수방법으로서는 사람 또는 사람 이외의 동물 조직에서 부유 세포괴로서 채취 배양하는 방법이나(예를 들면 비특허문헌 1 참조) 사람 또는 사람 이외의 동물 조직에서 접착 배양한 세포로부터 제작하는 방법(예를 들면 비특허문헌 3 참조)이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) [비특허문헌1] Jean G. Toma, et al., Nature Cell Biology, vol. 3, p. 778-784 (2001)

(비특허문헌 0002) [비특허문헌2] J. Biemaskie, et al., Cell Stem Cell, vol. 5, p. 610-623 (2009)

(비특허문헌 0003) [비특허문헌3] Rebecca P. Hill, et al., PLoS One., vol. 7(11), p. e50742 (2012)

발명의 내용

[0007] 본 발명은 인간 유래의 다능성 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양하여, 상기 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키는, SKPs의 제작 방법에 관한 것이다.

[0008] 또한 본 발명은 인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 배지로서, 분화 유도 촉진제로서 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는, 분화 유도 배지에 관한 것이다.

[0009] 또한 본 발명은 Wnt 시그널의 작용제를 유효성분으로 함유하는, 인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 기타 추가 특색 및 이점은 첨부된 도면을 적절히 참조하여 하기 설명으로부터 보다 완전할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] [도1]도 1(A)은 사람 유도된 다능성 줄기세포(이하, "iPS 세포"로도 말한다)의 현미경 사진을 나타내며, 도 1(B)은 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포의 현미경 사진을 나타내며, 도 1(C)은 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양함으로써 얻어진 SKPs의 현미경 사진

을 나타내며, 도 1(D)은 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양함으로써 얻어진 SKPs를 계대 배양해 얻어진 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[도2]분화 유도를 할 때의 Wnt 시그널의 작용제의 농도를 바꾸어 배양해, 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포에서 분화한 SKPs의 현미경 사진을 나타내는 도이다. 도 2(A)는 작용제 무첨가(0μM)의 배지에서 배양한 경우, 도 2(B)는 작용제를 0.1μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우, 도 2(C)는 작용제를 0.5μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우, 도 2(D)는 작용제를 3μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우, 도 2(E)는 작용제를 5μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우에 얻어진 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 여기서 "P0"는 계대 배양 전의 세포의 현미경 사진을 나타내며 "P1"는 계대 배양 후의 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[도3]도 3(A)은 SKPs로의 분화 유도 전후의 사람 iPS 세포의 미분화 시에 발현하는 유전자군의 발현을 비교한 전기 영동 사진을 나타내며, 도 3(B)은 SKPs로의 분화 유도 후의 SKPs에 있어서의 특유의 인자의 발현을 비교한 전기 영동 사진을 나타낸다.

[도4]도 4(A)는 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs에 있어서의 네스틴의 발현을 나타내는 형광 현미경 사진이며, 도 4(B)는 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs에 있어서의 피브로넥틴의 발현을 나타내는 형광 현미경 사진이며, 도 4(C)는 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs에 있어서의 α-평활근 액틴(α-SMA)의 발현을 나타내는 형광 현미경 사진이다.

[도5]도 5는 iPS 세포에서 분화 유도한 SKPs에 대해서 유세포 분석기 해석을 한 결과를 나타내는 도이다. 도 5(A)는 각각의 세포의 측방 산란광(SSC)과 전방 산란광(FSC)에서 iPS 세포 유래 SKPs의 세포 집단을 검출해, 해석하는 세포 집단(생 세포군)을 선택한 도를 나타낸다. 도 5(B)는 도 5(A)로 선택한 세포군에 대해 항피브로넥틴 항체 및 항네스틴 항체로 염색한 경우의 형광 강도와 세포수와의 관계를 나타낸 도이다.

[도6]도 6(A)은 사람 iPS 세포에서 유도한 SKPs를 또한 지방세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, Oil Red O 염색을 한 지방세포의 현미경 사진을 나타내며, 도 6(B)은 사람 iPS 세포에서 유도한 SKPs를 또한 골세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, 알칼리 포스파타제 염색을 한 골세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[도7]사람 iPS 세포에서 제작한 SKPs의 모낭 유도능을 나타낸 현미경 사진이다. 도 7(A)은 표피 세포만을 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색한 형광 현미경 사진을 나타낸다. 도 7(B)은 표피 세포와 섬유아세포를 혼합해 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 도 7(C)은 표피 세포와 모유두 세포를 혼합해 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 도 7(D)은 표피 세포와 iPS 세포 유래 SKPs를 혼합해 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 덧붙여 도 중의 화살표는 트리코히알린의 발현을 나타낸다.

[도8]도 8(A)은 사람 iPS 세포에서 유도한 SKPs를 또한 슈반 세포로 3주간 분화 유도한 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 8(B)은 도 8(A)의 세포에 대해 항S100β항체를 이용해 염색한 세포의 형광 현미경 사진을 나타낸다.

[도9]도 9(A)는 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs의 현미경 사진을 나타낸다. 도 9(B)는 도 9(A)에 나타내는 SKPs의 일부를 동결 보존 후, 융해해 1 일간 배양 후의 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 9(C)는 도 9(B)에 나타내는 세포를 추가로 3일간 증식 배양한 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[도10]도 10(A)은 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 또한 지방세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, Oil Red O염색을 한 지방세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 10(B)은 동결 융해 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 배양해, 또한 지방세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, Oil Red O염색을 한 지방세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[도11]도 11(A)은 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 또한 골세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, 알칼리 포스파타제 염색을 한 골세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 11(B)은 동결 융해 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 배양해, 또한 골세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, 알칼리 포스파타제 염색을 한 골세포의 현미경 사진을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] **구현예의 설명**

[0013] 상술한 것과 같이 SKPs는 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 모유두 세포 등으로 분화 가능한 세포이다. 그러므로 SKPs는 재생 의료 등에 있어서 유용한 세포이다. 비특허문헌 1 및 3에 기재된 방법에 의해 상기의 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 모유두 세포 등으로 분화 가능한 SKPs를 제작하는 것이 가능해졌다. 그러나 비특허문헌 1 및 3에 기재된 방법에서는 SKPs의 제작 효율이 아직 충분한 것이라고는 할 수 없었다.

[0014] 거기서 본 발명은 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 모유두 세포 등으로 분화 가능한 SKPs를 효율적으로 제작하는 방법의 제공을 과제로 한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 방법에 적합하게 이용할 수 있는, 분화 유도 배지 및 분화 유도 촉진제의 제공을 과제로 한다.

[0016] 본 발명자들은 상기 과제를 감안해 열심히 검토를 했다. 그 결과, 인간 유래의 다능성 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양함으로써, SKPs를 효율적으로 제작할 수 있는 것을 발견했다. 본 발명은 이 지견에 기초하여 완성하는데 이르렀다.

[0017] 본 발명의 SKPs의 제작 방법은 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 모유두 세포 등으로 분화 가능한 SKPs를 효율적으로 제작할 수 있다.

[0018] 또한 본 발명의 분화 유도 배지 및 분화 유도 촉진제는 상기 방법에 적합하게 이용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 SKPs의 제작 방법에서는 다능성 줄기세포의 배양을 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지를 이용해 수행한다. 이것에 의해 다능성 줄기세포의 SKPs로의 분화 유도를 한다. Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 다능성 줄기세포를 배양함으로써 다능성 줄기세포의 분화 효율이 향상되어, SKPs를 효율적으로 제작할 수 있다.

[0020] 이하, 본 발명의 바람직한 실시형태에 기초하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 이것에 제한하는 것이 아니다.

[0021] 본 명세서에 있어서 "피부 유래 전구 세포(SKPs)"란 자기 복제능을 가지는 미분화 세포이며 신경세포, 신경교 세포(예를 들면 마이크로글리어, 아스트로 사이트, 올리고덴드로사이트, 상의 세포, 슈반 세포, 위성 세포 등), 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 진피 섬유아세포, 모유두 세포 등으로 분화하는 능력을 가지는 세포를 말한다.

[0022] 본 명세서에 있어서 "다능성 줄기세포"란, 성체를 구성하는 다양한 조직으로 분화할 수 있는 다능성과 자기 복제능을 가지는 미분화 세포를 가리킨다. 본 발명으로 이용하는 다능성 줄기세포는 적절히 선택할 수 있다. 다능성 줄기세포의 구체적인 예로서는 배아줄기세포(이하, "ES세포"로도 말한다), 배아성 종양 세포(이하 "EC세포"로도 말한다), 배아성 생식 줄기세포(이하, "EG세포"로도 말한다), iPS 세포를 들 수 있다. 이들의 세포는 일상적 방법에 의해 제조해도 괜찮다. 대안적으로는, 시판의 세포를 이용해도 괜찮다.

[0023] 본 발명으로 이용하는 인간 유래의 다능성 줄기세포는 ES세포 또는 iPS 세포가 바람직하고 iPS 세포가 더욱 바람직하다.

[0024] 본 발명으로 바람직하게 이용할 수 있는 인간 유래의 다능성 줄기세포의 구체적인 예로서는 착상 이전의 초기배아를 배양함으로써 수립한 사람 ES세포; 체세포의 핵을 핵이식함으로써 제작된 초기배아를 배양함으로써 수립한 사람 ES세포; Oct3/4 유전자, Klf4 유전자, C-Myc 유전자 및 Sox2 유전자 등의 미분화 상태의 유지, 유도에 필요한 인자를 피부 세포 등의 체세포에 도입해 얻어진 사람 iPS 세포, 특정 화합물로 피부 세포 등의 체세포를 처리함으로써 얻어진 사람 iPS 세포 등 다양한 방법으로 수립된 사람 iPS 세포를 들 수 있다.

[0025] 다능성 줄기세포의 배양 방법에 대해서 설명한다.

[0026] 본 발명에서는 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지를 이용해 다능성 줄기세포를 배양한다. 여기서 "Wnt 시그널"이란, β-카테닌의 핵이행을 촉진해, 전사 인자로서의 기능을 발휘하는 일련의 작용을 말한다. 여기서 말하는 Wnt 시그널에는 세포 간 상호작용으로 인해 예를 들면 어느 세포에서 분비된 Wnt3A라고 하는 단백질이 또한 다른 세포에 작용해, 세포 내의 β-카테닌이 핵이행해, 전사 인자로서 작용하는 일련의 흐름도 포함된다. 이 일련의 흐름은 표피 간엽 상호작용을 예로 하는 기관 구축의 최초의 현상을 일으킨다. Wnt 시그널은 β-카테닌 경로, PCP 경로 및 Ca^{2+} 경로의 3개의 경로를 활성화함으로써, 세포의 증식이나 분화, 기관 형성이나 초기 발생 시의 세포 운동 등 각종 세포 기능을 제어하는 것이 알려진다.

[0027] 본 발명에서는 시판의 Wnt 시그널의 작용제를 이용해도 괜찮다. 대안적으로는, 일상적 방법에 따라 제조한 Wnt 시그널의 작용제를 이용해도 괜찮다. Wnt 시그널의 작용제로서는 아미노피리미딘 화합물(예를 들면 CHIR99021(상품명)), 비스-인돌로(인디루빈) 화합물(이하, "BIO"로도 말한다)(예를 들면 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심), BIO의 아세톡심 화합물(이하, "BIO-아세톡심"로도 말한다)(예를 들면 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-아세톡심), 티아디아졸리딘(TDZD) 화합물(예를 들면 4-벤질-2-메틸-1,2,4-티아디아졸리딘-3,5-디온), 옥소티아디아졸리딘-3-티온 화합물(예를 들면 2,4-디벤질-5-옥소티아디아졸리딘-3-티온), 티에닐 α-클로로메틸 케톤 화합물(예를 들면 2-클로로-1-(4,4-디브로모-티오펜-2-일)-에타논), 페닐 α 브로모메틸 케톤 화합물(예를 들면 α-4-디브로모 아세토페논), 티아졸 함유 요소 화합물(예를 들면 N-(4-메톡시벤질)-N'-(5-니트로-1,3-티아졸-2-일) 유레아), GSK-3β 펩타이드 저해제(예를 들면 H-KEAPPAPPQSpP-NH_2) 등을 들 수 있다. 본 발명으로 이용하는 Wnt 시그널의 작용제로서는 CHIR99021, BIO, NSC693868(상품명), SB216763(상품명), SB415286(상품명), TWS119(상품명) 등에서 선택되는 적어도 1종이 바람직하고 CHIR99021가 또한 바람직하다.

[0028] 분화 유도 배지에 포함되는 Wnt 시그널의 작용제의 함유량은 배양 조건, 사용하는 다능성 줄기세포의 종류, 사용하는 Wnt 시그널의 작용제의 종류 등에 따라 Wnt 시그널이 활성화되고 또한 세포 증식이 정지하지 않는 범위에서 적당히 설정할 수 있다. 예를 들면 Wnt 시그널의 작용제로서 CHIR99021를 이용할 경우, 배지 중의 Wnt 시그널의 작용제의 농도는 0.5μM 이상이 바람직하고, 2μM 이상이 더욱 바람직하고, 그리고 5μM 이하가 바람직하고, 4μM 이하가 더욱 바람직하다. 또한 Wnt 시그널의 작용제의 농도 범위는 0.5~5μM가 바람직하고, 2μM~4μM가 더욱 바람직하다. 또한 Wnt 시그널의 작용제의 농도는 3μM로 하는 것이 특히 바람직하다.

[0029] 다능성 줄기세포의 배양에 이용하는 분화 유도 배지는 줄기세포를 배양하는데 통상 이용되는 배지에 소정량의 Wnt 시그널의 작용제를 함유시킴으로써 조제할 수 있다.

[0030] 분화 유도 배지의 기초 배지는 줄기세포를 배양하는데 통상 이용되는 배지에서 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면 MEM 배지(Minimum Essential Medium), BME 배지(Basal Medium Eagle), IMDM 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), D-MEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 햄 배지, RPMI 배지(Roswell Park Memorial Institute medium), Fischer's 배지 및 이들의 혼합 배지를 들 수 있다. 이 중, D-MEM/Ham's F12 배지(이하, 단지 "D-MEM/F12"로도 말한다)가 바람직하다.

[0031] 본 발명으로 이용하는 분화 유도 배지는 혈청 함유 배양지라도 좋고 무혈청배지라도 좋고 혈청 대체물을 함유하는 배지라도 좋다. 본 발명으로 이용할 수 있는 혈청 대체물로서는 알부민, 트랜스페린, 지방산, 콜라겐 전구체, 미량 원소(예를 들면 아연, 셀렌 등), 영양 인자(EGF(표피 성장 인자), bFGF(염기성 섬유아세포 성장 인자) 등), B-27 보충제, N2 보충제, 녹크아우트시럼리프레이스먼트,2-머캡토에탄올을 들 수 있다. 본 발명으로 이용하는 분화 유도 배지는 B-27 보충제 및 EGF 및 bFGF로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 영양 인자를 함유하는 배지인 것이 바람직하고, B27 보충제, EGF 및 bFGF를 함유하는 배지인 것이 더욱 바람직하다.

[0032] 또한 필요에 따라 피더 세포, 비타민, 완충제, 무기 염류, 항생 물질(예를 들면 페니실린, 카나마이신, 스트렙토마이신) 등 줄기세포의 배지에 통상 이용되는 성분을 분화 유도 배지에 함유시켜도 괜찮다.

[0033] 다능성 줄기세포에서 SKPs로의 분화 유도는 사용하는 다능성 줄기세포의 배양에 적합한 배양 온도에서 SKPs로 분화 유도하는데 충분한 기간 동안 배양함으로써 실시된다. 예를 들면 다능성 줄기세포로서 iPS 세포를 이용할 경우에는 바람직하게는 1~20일간 배양한다.

[0034] 본 발명에서는 다능성 줄기세포에서 직접 SKPs로 분화 유도해도 괜찮다. 대안적으로는, 미리 다능성 줄기세포를 신경능선 줄기세포 또는 중배엽(바람직하게는 신경능선 줄기세포)으로 분화시키고, 분화한 신경능선 줄기세포 또는 중배엽(바람직하게는 신경능선 줄기세포)을 SKPs로 분화시켜도 괜찮다. 신경능선 줄기세포 등을 거쳐 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시킴으로써, 한층 더 효율적으로 SKPs를 제작할 수 있다. 신경능선 줄기세포에서 SKPs로 분화시킬 때의 배양 조건은 적당히 설정할 수 있다. 예를 들면 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 바람직하게는 3~5일간, 보다 바람직하게는 4일간, 신경능선 줄기세포를 배양함으로써, 효율적으로 SKPs로 분화시킬 수 있다.

[0035] 여기서 "신경능선 줄기세포"란, 자기 복제능과 다분화능을 가지는 다능성 줄기세포이며 척추동물의 발생 과정에서는 신경관의 배 측에서 체내로 이동해 다양한 조직의 형성에 기여하는 세포를 말한다. 덧붙여 다능성 줄기세포에서 신경능선 줄기세포로의 분화 유도 및 신경능선 줄기세포로의 분화의 확인은 일상적 방법에 따라 실시할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서 상기 분화 유도 배지를 이용해 분화시킨 SKPs에 대해서 1회 또는 2회 이상의 계대 배양을 하

는 것이 바람직하다. 계대 배양을 함으로써, 순도가 높은 세포 집단으로서 SKPs를 얻을 수 있다.

[0037] 상기 다능성 줄기세포 및 SKPs의 계대 방법 및 계대 횟수는 세포의 종류, 배양 방법 등에 따라 통상의 계대 방법에서 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면 접착 배양계 세포에 대해서는 효소 등에 의한 세포의 박리 후, 희석 배양에 의해 계대를 하고, 부유 배양계 세포에 대해서는 희석 배양에 의해 계대를 한다.

[0038] 본 발명은 접착 배양 및 부유 배양의 어느 방법에 의해 계대를 실시할 수 있지만, 접착 배양의 조건 하에서 계대를 수행하는 것이 바람직하다.

[0039] 본 발명의 SKPs의 제작 방법에 의하면 분리 회수가 불필요한 레벨의 비율로 SKPs로 분화한 세포를 제작할 수 있다. 대안적으로는, 일상적 방법에 의해 SKPs로 분화한 세포의 분리 회수를 해도 괜찮다. SKPs로 분화한 세포의 분리 회수 방법으로서는 예를 들면 세포분별장치(cell sorter)를 이용한 방법, 자기 비즈를 이용한 방법 등을 들 수 있다.

[0040] 다능성 줄기세포 또는 신경능선 줄기세포에서 SKPs로 분화 유도된 것의 확인은 이들의 세포로서의 기능을 발휘하기 위한 단백질이나 그 단백질을 코드하는 유전자(이하, 이들을 단지 "마커"로도 말한다)의 발현의 유무나 현미경 관찰에 의한 세포 형태 등을 평가함으로써 수행할 수 있다. 예를 들면 단백질의 발현은 항원 항체 반응을 이용한 방법 등에 의해 확인할 수 있고 유전자의 발현은 노던법, 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR) 등을 이용한 방법 등에 의해 확인할 수 있다.

[0041] 특정 유전자의 발현의 유무에 의해 SKPs로의 분화 유도를 확인할 경우, 마커 유전자로서는 Oct-4 유전자, Nanog 유전자, Nestin 유전자, Snail 유전자, Slug 유전자, Dermo-1 유전자, Sox9 유전자, BMP-4 유전자, Wnt-5a 유전자, Versican 유전자, CD133 유전자 등을 이용할 수 있다.

[0042] 상기 유전자 중 분화 전의 iPS 세포에서 발현해, 다른 세포로 분화함에 따라 발현이 감소하는 유전자로서 Oct-4 유전자, Nanog 유전자를 들 수 있다. 이들의 유전자의 발현량의 감소를 확인함으로써, iPS 세포가 SKPs로 분화한 것을 확인할 수 있다. 또한 SKPs에 발현하는 것이 보고되어 있는 인자로서 Nestin 유전자, Snail 유전자, Slug 유전자, Dermo-1 유전자, Sox9 유전자, BMP-4 유전자, Wnt-5a 유전자, Versican 유전자를 들 수 있다. 이들의 유전자의 발현을 확인하는 것으로도, iPS 세포가 SKPs로 분화한 것을 확인할 수 있다. 또한 신경능선 유래 및 간엽계 유래의 모유두 세포 중 어느 것에서도 발현이 보고되어 있는 인자로서 CD133 유전자를 들 수 있다.

[0043] 특정 단백질의 발현의 유무에 의해 SKPs로의 분화 유도를 확인할 경우, 마커 단백질로서는 네스틴, α-SMA, 피브로넥틴, 등을 이용할 수 있다. 이들은 SKPs에서의 발현이 보고되어 있는 단백질이므로 이들의 마커 단백질에 대한 항체를 이용한 면역 형광 염색을 함으로써 SKPs로의 분화 유도의 확인을 할 수 있다.

[0044] 후술한 실시예로 나타낸 바와 같이, Wnt 시그널의 작용제가 다능성 줄기세포(바람직하게는 신경능선 세포)의 SKPs로의 분화 유도를 촉진해, 다능성 줄기세포의 분화 효율을 향상시키는 작용을 나타낸다. 이 발견에 기초하여 본 발명은 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제로서 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지 및 Wnt 시그널의 작용제를 유효성분으로 함유하고 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제도 제공한다.

[0045] 또한 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 비치료적인 분화 유도 방법을 위해서 Wnt 시그널의 작용제를 사용할 수 있다. 본 명세서에 있어서 " 비치료적"이란, 의료 행위, 즉 치료에 의한 인체로의 치료 행위를 포함하지 않는 개념이다.

[0046] 상기 분화 유도 배지 및 분화 유도 촉진제의 Wnt 시그널의 작용제의 함유량은 다능성 줄기세포의 배양 조건 등 이들의 사용 형태에 따라 적당히 설정할 수 있다.

[0047] 본 발명의 SKPs의 제작 방법에 의하면 SKPs를 효율적으로 제작할 수 있다. 그리고 본 발명의 SKPs의 제작 방법에 의해 얻어진 SKPs를 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 진피 섬유아세포, 또는 모유두 세포 등 목적의 세포로 분화 유도함으로써, 이들의 세포를 효율적으로 제작할 수 있다.

[0048] SKPs를 목적의 세포로 분화 유도시킬 때의 배양 방법, 배지의 조성, 분화 유도 방법, 계대 방법은 일상적 방법에 따라 적당히 설정할 수 있다.

[0049] 또한 목적의 세포로의 분화의 확인도 일상적 방법에 따라 수행할 수 있다. 예를 들면 지방세포로 분화시킨 경우, Oil Red O염색법에 의해 세포 내 지질을 염색해, 염색의 유무를 확인함으로써 지방세포로의 분화를 확인

할 수 있다. 또한 골세포로 분화시킨 경우, 알칼리 포스파타제 염색법에 의해 염색해, 염색의 유무를 확인함으로써 골세포로의 분화를 확인할 수 있다. 또한 모유두 세포로 분화시킨 경우, 트리코히알린 등의 마커 단백질의 발현의 유무를 면역 조직 형광 염색법에 의해 평가함으로써, 표피 세포와의 상호작용에 의해 표피 세포의 모낭형의 각화를 유도할 수 있는 능력, 즉 모유두 세포로서의 기능을 확인할 수 있다. 또한 신경교 세포의 1종인 슈반 세포로 분화시킨 경우, 항S100β항체를 이용해 세포를 염색해, 염색의 유무를 확인함으로써 슈반 세포로의 분화를 확인할 수 있다.

[0050] SKPs에서 추가로 분화한 세포는 각각의 세포의 종류에 따라 일상적 방법에 따라 분리 회수할 수 있다.

[0051] 본 발명에 의해 얻어진, 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 진피 섬유아세포, 모유두 세포 등의 SKPs에서 분화시킨 목적의 세포는 외과적 치료나 뜻하지 않은 사고 등에서 없어진 세포, 조직, 기관의 재생이나 모낭의 재생 등에 적합하게 이용할 수 있다.

[0052] 상술한 실시 형태에 관한 것으로 본 발명은 또한 이하의 세포의 제작 방법, 분화 유도 배지, 분화 유도 촉진제, 사용 및 방법을 개시한다.

[0053] <1>인간 유래의 다능성 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양하고, 상기 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키는, SKPs의 제작 방법.

[0054] <2>상기 다능성 줄기세포가 ES세포 또는 iPS 세포, 바람직하게는 iPS 세포인 상기<1>항에 기재된 제작 방법.

[0055] <3>상기 다능성 줄기세포가 다능성 줄기세포 유래 신경능선 줄기세포인 상기<1>또는<2>항에 기재된 제작 방법.

[0056] <4>상기 분화 유도 배지에서 3~5일간, 바람직하게는 4일간, 상기 다능성 줄기세포 유래 신경능선 줄기세포를 배양해 SKPs로 분화시키는, 상기<3>항에 기재된 제작 방법.

[0057] <5>상기 Wnt 시그널의 작용제가 CHIR99021, BIO, NSC693868, SB216763, SB415286 및 TWS119로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종, 바람직하게는 CHIR99021 인, 상기<1>~<4>중 1항에 기재된 제작 방법.

[0058] <6>상기 분화 유도 배지 중의 CHIR99021의 함유량이 바람직하게는 0.5μM 이상, 보다 바람직하게는 2μM 이상이며, 바람직하게는 5μM이하, 보다 바람직하게는 4μM이하이며, 혹은 바람직하게는 0.5~5μM, 보다 바람직하게는 2μM~4μM이며 특히 바람직하게는 3μM 인, 상기<5>항에 기재된 제작 방법.

[0059] <7>상기 분화 유도 배지의 기초 배지가 D-MEM/F12 배지인 상기<1>~<6>중 1항에 기재된 제작 방법.

[0060] <8>상기 분화 유도 배지가 B-27 보충제 및 EGF 및 bFGF로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 영양 인자, 바람직하게는 B27 보충제, EGF 및 bFGF를 추가로 함유하는, 상기<1>~<7>중 1항에 기재된 제작 방법.

[0061] <9>SKPs로의 분화를 접착 배양의 조건 하에서 수행하는, 상기<1>~<8>중 1항에 기재된 제작 방법.

[0062] <10>상기 분화 유도 배지를 이용해 분화시킨 SKPs에 대해서 1회 또는 2회 이상의 계대 배양을 하는, 상기<1>~<9>중 1항에 기재된 제작 방법.

[0063] <11>세포분별장치(cell sorter)를 이용한 방법, 자기 비즈를 이용한 방법 등, 일상적 방법에 의해 SKPs로 분화한 세포를 분리 회수하는, 상기<1>~<10>중 1항에 기재된 제작 방법.

[0064] <12>목적의 세포를 제작하는 방법으로서, 상기<1>~<11>중 1항에 기재된 제작 방법에 의해 제작한 SKPs를 목적의 세포로 또한 분화시키는, 목적의 세포를 제작하는 방법.

[0065] <13>상기 목적의 세포가 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 진피 섬유아세포 및 모유두 세포로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 세포, 바람직하게는 지방세포, 골세포, 신경교 세포 및 모유두 세포로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 세포인, 상기<12>항에 기재된 방법.

[0066] <14>인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 배지로서, 분화 유도 촉진제로서 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는, 분화 유도 배지.

[0067] <15>상기 Wnt 시그널의 작용제가 CHIR99021, BIO, NSC693868, SB216763, SB415286 및 TWS119로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종, 바람직하게는 CHIR99021 인, 상기<14>에 기재된 분화 유도 배지.

[0068] <16>상기 분화 유도 배지의 기초 배지가 D-MEM/F12 배지인 상기<14>또는<15>항에 기재된 분화 유도 배지.

[0069] <17>B-27 보충제 및 EGF 및 bFGF로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 영양 인자, 바람직하게는 B27 보

충제, EGF 및 bFGF를 추가로 함유하는, 상기<14>~<16>중 1항에 기재된 분화 유도 배지.

[0070] <18>항생 물질, 바람직하게는 페니실린, 카나마이신 및 스트렙토마이신 적어도 1종의 항생 물질, 보다 바람직하게는 페니실린 및 스트렙토마이신를 추가로 함유하는, 상기<14>~<17>중 1항에 기재된 분화 유도 배지.

[0071] <19>Wnt 시그널의 작용제를 유효성분으로 함유하는, 인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제.

[0072] <20>인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제로서의, Wnt 시그널의 작용제의 사용.

[0073] <21>인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제의 제조를 위한 Wnt 시그널의 작용제의 사용.

[0074] <22>Wnt 시그널의 작용제를 인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 촉진제로 사용하는 방법.

[0075] <23>인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 분화 유도 방법을 위해서 이용하는, Wnt 시그널의 작용제.

[0076] <24>인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화시키기 위한 비치료적인 분화 유도 방법을 위한 Wnt 시그널의 작용제의 사용.

[0077] <25>Wnt 시그널의 작용제를 사용하는, 인간 유래의 다능성 줄기세포를 SKPs로 분화 유도하는 방법.

[0078] <26>상기 Wnt 시그널의 작용제가 CHIR99021, BIO, NSC693868, SB216763, SB415286 및 TWS119로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종, 바람직하게는 CHIR99021 인, 상기<19>~<25>중 1항에 기재된 사용 또는 방법.

[0079] <27>상기 다능성 줄기세포가 ES세포 또는 iPS 세포, 바람직하게는 iPS 세포, 인 상기<19>~<26>중 1항에 기재된 사용 또는 방법.

[0080] 이하, 본 발명을 실시예에 기초해 또한 상세하게 설명하겠지만, 본 발명은 이것으로 한정되는 것이 아니다.

[0081] **실시예**

[0082] 시험예 1 iPS 세포의 계대 배양

[0083] (1) 사람 iPS 세포

[0084] 다능성 줄기세포로서 인간 유래의 iPS 세포(상품명:클론 201 B7, 계대수:24, iPS 학구생활 재팬사부터 구입)를 이용했다. 덧붙여 상기 iPS 세포는 레트로바이러스 벡터를 이용해 4종의 유전자(Oct3/4 유전자, Sox2 유전자, Klf4 유전자, c-Myc 유전자)를 인간 피부 섬유아세포에 도입해 얻어진 iPS 세포이다.

[0085] (2) 피더 세포의 제작

[0086] 상기 iPS 세포의 배양에 이용하는 피더 세포로서 하기 방법에 의해 제작한 SNL76/7 세포(마우스배아 유래 섬유아세포주, CELL BIOLABS 사제)를 이용했다.

[0087] 7 질량%소 태아 혈청(HyClone 사제, 카탈로그 번호:SH30070.03E), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 50 U, 50μg/mL)을 포함한 D-MEM 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:11965-092)에서 SNL76/7 세포를 배양했다. 그 후 컨플루언트의 세포를 미토마이신 C(상품명, 쿄와 발효기린 사제, 농도:0.012mg/mL)로 2시간 처리해, 0.25%트립신/이디티에이로 회수했다. 0.1%젤라틴(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:G1890)으로 코팅한 세포 배양 디쉬 상에 1×10^{6}cells/100mm dish가 되도록 회수한 세포를 파종했다. 24시간 후, 세포 배양접시에 접착한 세포를 피더 세포로 사용했다.

[0088] (3) 사람 iPS 세포의 배양

[0089] 사람 iPS 세포용 배지(hES 배지)로서 혈청 대체물(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:10828-028, 20 질량%), L-글루타민(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:25030-081, 2mM), 비필수 아미노산(SIGMA 사제, 카탈로그 번호:M7145, 0.1mM),2-머캡토에탄올(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:21985-023, 0.1mM), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 50 U, 50μg/mL), bFGF(Wako 사제, 카탈로그 번호:064-04541, 4ng/mL)를 포함한 D-MEM/F12 배지(SIGMA 사제 :D6421)를 조제했다. 이 배지를 이

용하여 37℃, 5%CO_2의 인큐베이터로 Cell, 131, p. 861-872 (2007)에 기재된 방법에 따라 사람 iPS 세포를 배양했다. 덧붙여 배지 교환은 매일 실시했다.

[0090] 80~90% 컨플루언트의 iPS 세포를 박리 효소(리프로 셀 사제, 카탈로그 번호:RCHETP002)로 처리해, iPS 세포 콜로니를 회수했다. 회수한 콜로니는 피펫팅에 의해 적절한 사이즈로 부수어, 미토마이신 C로 처리한 상기 SNL 피더 세포를 사전에 준비한 배양 용기에 파종해, 37℃, 5%CO_2의 인큐베이터로 iPS 세포를 배양했다. 덧붙여 배지 교환은 매일 실시했다.

[0091] 시험예 2 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포에서 SKPs로의 분화의 유도

[0092] (1) 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포의 조제

[0093] Nature protocols, 5 , p. 688-701 (2010)(이)나 Cell reports, 3, p. 1140-1152 (2013)에 기재된 방법에 기초하여 시험예 1로 계대 배양한 iPS 세포를 noggin(RD systems 사제, 카탈로그 번호:6057-NG-100/CF, 500ng/mL) 및/또는 SB431542(TOCRIS 사제, 카탈로그 번호:1614, 10μM)를 hES 배지(-) bFGF에 첨가해 조제한 배지에서 5일간~2주간 배양함으로써, 사람 iPS 세포에서 신경능선 줄기세포로의 분화를 유도했다.

[0094] (2) 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포에서 SKPs로의 분화의 유도

[0095] B-27 보충제(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:17504-044, 2 질량%), EGF(RD systems 사제, 카탈로그 번호:336-EG-200, 20ng/mL), bFGF(Wako 사제, 카탈로그 번호:064-04541, 40ng/mL), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 50 U, 50μg/mL) 및 CHIR99021(cayman 사제, 카탈로그 번호:13122)를 0~5μM의 농도로 포함한 D-MEM/F12 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:10565-018)에서 상기 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포를 배양했다. 3~5일간 배양해 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포에서 SKPs로의 분화를 유도해, SKPs로 분화한 세포를 배양 세포 분리 효소(상품명:Accutase, BD Biosciences 사제, 카탈로그 번호:561527)를 이용해 계대 배양해, B27 보충제(2 질량%), EGF(20ng/mL), bFGF(40ng/mL), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 50 U, 50μg/mL)을 포함한 D-MEM/F12 배지에서 추가로 배양했다.

[0096] 이와 같이 배양해 얻어진 SKPs에 대해서 SKPs로 분화시키기 전의 사람 iPS 세포에서 SKPs로의 분화의 상황을 나타내는 현미경 사진을 도 1에 나타낸다. 덧붙여 도 1(A)은 사람 iPS 세포의 현미경 사진을 나타내며, 도 1(B)은 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포의 현미경 사진을 나타내며, 도 1(C)은 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제(CHIR99021)를 3μM로 함유하는 분화 유도 배지에서 배양함으로써 얻어진 SKPs의 현미경 사진을 나타내며, 도 1(D)은 사람 iPS 유래 신경능선 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제(CHIR99021)를 3μM로 함유하는 분화 유도 배지에서 배양함으로써 얻어진 SKPs를 계대 배양해 얻어진 세포의 현미경 사진을 나타낸다(모두 배율:40배).

[0097] 도 1(A)에 나타난 바와 같이, 사람 iPS 세포는 콜로니형으로 증식해, 핵의 존재 비율이 높고 세포질이 작다. 이것에 대해, 도 1(D)에 나타난 바와 같이, 계대 배양 후의 SKPs는 콜로니형이 아니고 개별의 세포 상태에서 배양되고 명료한 세포질의 존재가 인정된다. 따라서, 상기 방법에 의해 SKPs로 분화한 세포를 계대 배양함으로써, SKPs가 증식했던 것이 확인되었다.

[0098] 다음으로 분화 유도를 할 때의 Wnt 시그널의 작용제(CHIR99021)의 농도를 바꾸어 배양해, 사람 iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포에서 분화한 SKPs의 현미경 사진을 도 2에 나타낸다. 덧붙여 도 2(A)는 CHIR99021 무첨가(0μM)의 배지에서 배양한 경우, 도 2(B)는 CHIR99021를 0.1μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우, 도 2(C)는 CHIR99021를 0.5μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우, 도 2(D)는 CHIR99021를 3μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우, 도 2(E)는 CHIR99021를 5μM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 경우에 얻어진 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 여기서 "P0"는 계대 배양 전의 세포의 현미경 사진을 나타내며 "P1"는 계대 배양 후의 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[0099] 도 2에 나타난 바와 같이, 계대 배양 전이라도, CHIR99021를 0.5~5μM농도로 첨가한 경우에는 콜로니의 가장자리부에 SKPs로 분화한 세포가 더욱 많이 유주하고 있는 상황이 관찰되었다.

[0100] 덧붙여 계대 배양 전의 단계에서는 아직도 SKPs로 유도된 세포 이외의 세포도 포함되어 있다. 거기서 SKPs의 계대 배양을 선택적으로 수행했는데, CHIR99021를 0.5~5μM농도로 첨가한 경우에 SKPs로 분화한 세포가 선택적으로 보다 많이 증식하고 있는 상황이 관찰되었다.

[0101] 따라서, 다능성 줄기세포를 Wnt 시그널의 작용제를 함유하는 분화 유도 배지에서 배양함으로써, SKPs를 효율적으로 대량으로 제작할 수 있는 것이 확인되었다.

[0102] 시험예 3 iPS 세포 유래 SKPs의 동정(1)

[0103] 상기 시험예 2로 얻어진 분화 유도 전의 iPS 세포(이하, "iPS"로도 말한다), iPS 세포 유래 신경능선 줄기세포(이하, "iPS-NC"로도 말한다), 계대 배양 전의 iPS 세포 유래 SKPs(이하, "iPS-SKPs-P0"로도 말한다) 및 계대 배양 후의 iPS 세포 유래 SKPs(이하, "iPS-SKPs-P1"로도 말한다)에 대해서 하기 표 1에 나타내는 유전자의 발현 상황을 하기 표 1에 나타내는 염기 서열의 프라이머를 이용해 RT-PCR법에 따라 하기 방법에 의해 해석해, 얻어진 SKPs의 동정을 했다.

[0104] 표 1

유전자	센스 프라이머 (5'-3')	안티-센스 프라이머 (5'-3')
GAPDH	cggagtcaacggatttggtcg (SEQ ID NO: 1)	agccttctccatggtggtgaa (SEQ ID NO: 2)
Oct-4	cgaaagagaaagcgaaccag (SEQ ID NO: 3)	gtgaagtgagggctcccata (SEQ ID NO: 4)
Nanog	cagaaggcctcagcacctac (SEQ ID NO: 5)	gcctccaagtcactggcag (SEQ ID NO: 6)
네스틴	cagcgttggaacagaggttg (SEQ ID NO: 7)	gctggcacaggtgtctcaag (SEQ ID NO: 8)
Snail	accgcctcgctgccaatgct (SEQ ID NO: 9)	gtgcatcttgagggcaccca (SEQ ID NO: 10)
Slug	catctttggggcgagtgagtcc (SEQ ID NO: 11)	cccgtgtgagttctaatgtgtc (SEQ ID NO: 12)
Dermo-1	gcaagaagtcgagcgaagatg (SEQ ID NO: 13)	ggcaatggcagcatcattcag (SEQ ID NO: 14)
Sox9	gtcagccaggtgctcaaagg (SEQ ID NO: 15)	acttgtaatccgggtggtcc (SEQ ID NO: 16)
BMP-4	ttctgcagatgtttgggctgc (SEQ ID NO: 17)	agagccgaagctctgcagag (SEQ ID NO: 18)
Wnt-5a	ggatggctggaagtgcaatg (SEQ ID NO: 19)	acacaaactggtccacgatc (SEQ ID NO: 20)
Versican	acgatgcctactttgccacc (SEQ ID NO: 21)	tagtgaaacacaaccccatcc (SEQ ID NO: 22)
CD133	atggccctcgtactcggctc (SEQ ID NO: 23)	Cacgcggctgtaccacatag (SEQ ID NO: 24)

[0105]

[0106] 각 샘플에서 RNeasy Mini kit(QIAGEN 사제, 카탈로그 번호:74104)를 이용해 RNA를 추출했다. 추출한 각 총 RNA의 농도를 측정해, 일정량의 총 RNA 및 고용량 RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems 사제, 카탈로그 번호:4387406)를 이용하고 역전사 반응을 했다. 컨트롤로서 태아 뇌 총 RNA(Clontech 사제, 카탈로그 번호:636526)를 이용해 같은 조작을 했다.

[0107] 이와 같이 하여 얻어진 cDNA 샘플 1μL를 주형으로 하고, 상기 프라이머를 이용해 50μL계로 PCR 반응을 했다. 여기서 사용한 효소는 KOD-Plus-Ver.2(TOYOBO 사제, 카탈로그 번호:KOD-211)이며 94℃, 2 min(98℃, 10초;63℃, 30초;68℃, 30초)를 1 사이클로 한 공정을 25~35사이클로 하는 반응 프로토콜로 실시했다. 또한 PCR 반응의 포지티브 컨트롤로서 사람 태아 뇌 유래 RNA(Clontech 사제, 카탈로그 번호:636526)를 주형으로 이용해 똑같이 PCR를 했다.

[0108] 그 후 반응액 5μL에 대해서 1.5%아가로스 겔(다카라 바이오 사제, 카탈로그 번호:50071)/TBE 버퍼(칸토 화학 사제, 카탈로그 번호:46510-78)를 이용해 100 V로 전기 영동했다. GAPDH는 실험 전체의 컨트롤로 이용했다.

[0109] 전기 영동 결과를 도 3(A) 및 (B)에 나타낸다. 여기서 도 3(A)은 사람 iPS 세포의 미분화 상태의 유지에 중요한 인자의 발현 변동을 나타내며, 도 3(B)은 SKPs 에 특유의 인자의 발현을 나타낸다.

[0110] 도 3(A)에 나타난 바와 같이, SKPs로의 분화 유도에 수반해, SKPs로 분화하고 있지 않는 미분화의 세포에서 발현하는 마커의 발현이 감소했다. 또한 도 3(B)에 나타난 바와 같이, SKPs로의 분화 유도에 의해 SKPs에 특유한 인자의 발현이 검출되었다. 따라서, 상기 방법에 의해 분화 유도한 세포가 SKPs인 것이 확인되었다.

또한 iPS-SKPs-P0와 iPS-SKPs-P1 사이에서 SKPs에 특유한 인자의 발현을 비교했는데, Snail 유전자, Slug 유전자, Dermo-1 유전자, Sox9 유전자 및 CD133 유전자에 대해서 iPS-SKPs-P0보다 iPS-SKPs-P1에서 발현이 높은 경향이 발견되었다(도 3(B) 참조). 여기서 도 3(B)에 나타난 바와 같이, 내부 표준인 GAPDH 유전자의 발현은 iPS-SKPs-P0와 iPS-SKPs-P1 사이에서 일정한 것에서, SKPs로 분화한 세포에 대해서 계대 배양을 함으로써, SKPs에 특유한 인자를 발현하는 세포의 비율이 증가해, 보다 순도가 높은 세포 집단으로서 SKPs를 얻을 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0111] 시험예 4 사람 iPS 세포 유래 SKPs의 동정(2)

[0112] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs에 대해서 하기 표 2에 나타내는 항체를 이용해 면역 조직 형광 염색을 하고, 네스틴, αSMA 및 피브로넥틴의 발현 상황을 해석해, 얻어진 SKPs의 동정을 했다.

[0113] 표 2

	표적 단백질	제조사	세부사항
일차 항체	네스틴	Millipore	MAB5326
	α-SMA	Sigma Aldrich	A2547
	피브로넥틴	Sigma Aldrich	F3648
이차 항체	Alexa Fluor 488 염소 항-마우스 IgG (H+L)	Life technologies	A11029
	Alexa Fluor 555 당나귀 항-토끼 IgG (H+L)	Life technologies	A31572

[0114]

[0115] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 D-PBS(-)로 세정해, 4% 파라포름알데하이드로 15분간 계대 배양 후의 SKPs를 고정했다. 고정한 세포를 D-PBS(-)로 세정 후, Triton X-100의 PBS 용액(농도:0.5 질량%)로 5 분간 처리해, 다시 D-PBS(-)로 세정 후, 10% 염소 혈청(니치레이 사제, 카탈로그 번호:426041)에서 실온에서 1시간 블로킹했다. 그 후 상기 표 2에 나타내는 1 차 항체(실온, 2시간) 및 2 차 항체(실온, 1시간)로 처리해, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, DOJINDO 사제, 카탈로그 번호:FK045)로 핵을 염색 후, 포매했다. SKPs에 특유한 마커 단백질(네스틴, 피브로넥틴, α-SMA)의 발현을 형광 현미경 하에서 관찰했다.

[0116] 그 결과를 도 4에 나타낸다. 여기서 도 4(A)는 네스틴의 발현을 나타내는 형광 현미경 사진이며, 도 4(B)는 피브로넥틴의 발현을 나타내는 형광 현미경 사진이며, 도 4(C)는 α-SMA의 발현을 나타내는 형광 현미경 사진이다(배율:400배).

[0117] 도 4에 나타난 바와 같이, 거의 모든 세포로 SKPs에 특유한 마커 단백질의 발현이 발견되었다. 이들 결과에서 상기 시험예 2로 얻어진 세포가 SKPs인 것이 확인되었다.

[0118] 시험예 5 사람 iPS 세포 유래 SKPs의 동정(3)

[0119] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs에 대해서 유세포 분석기 해석을 했다. 그 결과를 도 5에 나타낸다.

[0120] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 D-PBS(-)로 세정한 후, 배양 세포 분리 효소(상품명:Accutase, BD Biosciences 사제, 카탈로그 번호:561527)로 회수했다. 회수한 세포를 1×10^6 cells/100μL의 샘플 버퍼(상품명 :BD Cytofix Buffer, BD Biosciences 사제, 카탈로그 번호:554655)로 실온에서 20분 고정했다. 세포 침투 세정 용액(상품명 :BD Phosflow Perm/Wash buffer I, BD Biosciences 사제, 카탈로그 번호:557885)으로 세정 후, 동일한 버퍼로 실온에서 10분간 세포를 처리했다. 그 후 항네스틴 항체(BD Pharmingen 사제, 카탈로그 번호:561231), 항피브로넥틴 항체(BD Pharmingen 사제, 카탈로그 번호:563100) 및 아이소타이프 컨트롤(BD Biosciences 사제, 카탈로그 번호:347202, 카탈로그 번호:557782)을 1:20의 비율로 첨가해, 실온에서 30 분간 반응시켰다. 세포 침투 세정 용액으로 2 회 세정하고, 500μL의 PBS로 현탁하고, 현탁액의 유세포 분석기 해석을 BD FACSVerse(BD Biosciences 사제)를 이용해 수행했다.

[0121] 도 5(A)는 각각의 세포의 SSC와 FSC에서 인간 iPS 세포 유래 SKPs의 세포 집단을 검출해, 해석하는 세포 집단

(생 세포군)을 선택한 도를 나타낸다. 도 5(B)는 도 5(A)로 선택한 세포 집단에 대해서 항네스틴 항체 및 항피브로넥틴 항체로 염색한 결과를 나타낸다. 세로축은 네스틴의 발현 강도(형광 염색한 형광 강도)를 나타내며 횡축은 피브로넥틴의 발현 강도(형광 염색한 형광 강도)를 나타낸다.

[0122] 도 5(B)에 나타내는 결과에서 도 5(B)의 유세포 분석기 해석에 이용한 전세포수(도 5(A)의 선택 영역의 세포수)에 대한 네스틴 및 피브로넥틴을 모두 발현하는 세포수의 비율을 산출했다. 그 결과, 98.46%의 세포가 네스틴 및 피브로넥틴을 발현하는(네스틴, 피브로넥틴 공양성) 세포인 것이 확인되었다.

[0123] 따라서, 상기 방법에 의해 분화 유도한 세포 중 거의 모든 세포가 네스틴 및 피브로넥틴을 발현하는 SKPs인 것이 확인되었다. 또한 상기 방법에 의해 얻어진 세포의 계대 배양을 함으로써, 순도가 높은 세포 집단으로서 SKPs를 얻을 수 있는 것이 확인되었다.

[0124] 시험예 6 사람 iPS 세포 유래 SKPs에서 지방세포로의 분화의 유도

[0125] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 3×10^5cells/35mm dish로 파종했다. 24시간 배양 후, 3-이소부틸-1-메틸 크산틴(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:I7018, 0.45nM), 인슐린(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:I3536, 2.07μM), 덱사메타손(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:D4902, 100nM), 토끼 혈청(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:R4505,15%), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 100 U, 100μg/mL)을 포함한 MEM 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:42360-032)에서 2 주간 배양했다.

[0126] 그 후 Oil Red O staining Kit(ScienCell research laboratories 사제, 카탈로그 번호:0843)를 이용해 첨부의 프로토콜에 따라 얻어진 세포의 Oil Red O염색을 했다. 그 결과를 도 6(A)에 나타낸다(배율:200배).

[0127] 도 6(A)에 나타난 바와 같이, 지질이 적색으로 염색되고 사람 iPS 세포 유래 SKPs가 지방세포로 분화했던 것이 확인될 수 있었다. 따라서, 상기 시험예 2로 얻어진 세포가 지방세포로 분화 가능한 SKPs인 것이 확인되었다.

[0128] 시험예 7 사람 iPS 세포 유래 SKPs에서 골세포로의 분화의 유도

[0129] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 3×10^5cells/35mm dish로 파종했다. 24시간 배양 후, 덱사메타손(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:D4902, 100nM), β-글리세로포스페이트(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:G9422, 10mM), L-아스코르브산-2-포스페이트(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:A8960, 50μM), 소 혈청(Hyclone 사제, 카탈로그 번호:SH30070.03, 10 질량%), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 100 U, 100μg/mL)을 포함한 MEM 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:42360-032)에서 2 주간 배양했다.

[0130] 그 후 Blue Alkaline Phosphatase substrate Kit(Vector laboratories 사제, 카탈로그 번호:SK5300)를 이용해 첨부의 프로토콜에 따라 얻어진 세포의 알칼리 포스파타제 염색을 했다. 그 결과를 도 6(B)에 나타낸다(배율:200배).

[0131] 도 6(B)에 나타난 바와 같이, 알칼리 포스파타제 양성 세포가 인정되어 사람 iPS 세포 유래 SKPs가 골세포로 분화했던 것이 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 시험예 2로 얻어진 세포가 골세포로 분화 가능한 SKPs인 것이 확인되었다.

[0132] 시험예 8 스페이로이드 배양에 의한 사람 iPS 세포 유래 SKPs의 모낭 유도능의 검토

[0133] 시판의 정상 사람 표피 세포(NHEK)(Life technologies 사제)를 EpiLife(상품명, Life technologies 사제)에서, 시판의 정상 사람 모유두 세포(Cell Applications 사제)를 모유두 증식 배지(TOYOBO 사제)에서 37℃, 5%CO_2 조건 하에서 계대 배양했다. 또한 시판의 정상 사람 성인 피부 섬유아세포(KURABO 사제)를 5 질량%소 태아 혈청(HyClone 사제, 카탈로그 번호:SH30070.03E), 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122, 50 U, 50μg/mL)을 포함한 D-MEM 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:11965-092)에서 계대 배양했다. 또한 SKPs로서는 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs(iPS-SKPs-P1)를 이용했다.

[0134] 각종 세포를 계대 배양한 후, 표피 세포, 섬유아세포, 모유두 세포, 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 각각 4×10^4cells씩 혼합하고, 96 well 비접착 라운드 보텀 플레이트(Cell Seed 사제)에서 AmnioMAX C-100 배지(상품명,

Life technologies 사제)를 이용해 배양했다. 7 일간 배양 후, 얻어진 스페이로이드를 동결 조직포매제(상품명:OCT 컴파운드, 사쿠라 파인 텍 사제)로 포매해, 6㎛두께의 동결 절편을 제작했다.

[0135] 제작한 동결 절편을 4% 파라포름알데하이드로 15분간 세포를 고정해, D-PBS(-)로 세정 후, 10% 염소 혈청(니치레이 사제, 카탈로그 번호:426041)에서 실온에서 1시간 블로킹했다. 그 후 얻어진 절편을 항트리코히알린 항체(Santa cruz 사제 카탈로그 번호:sc-80607)로 실온에서 2시간 처리하고, D-PBS(-)로 세정 후, 2 차 항체(Alexa Fluor 488 염소 항-마우스 IgG(H+L), Life technologies 사제, 카탈로그 번호:A11029)로 실온에서 1시간 처리했다. D-PBS(-)로 세정 후, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, DOJINDO 사제, 카탈로그 번호:FK045)로 핵을 염색 후, 포매해, 트리코히알린의 염색성을 형광 현미경 하에서 관찰했다.

[0136] 그 결과를 도 7에 나타낸다. 여기서 도 7(A)은 표피 세포만을 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 도 7(B)은 표피 세포와 섬유아세포를 혼합해 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 도 7(C)은 표피 세포와 모유두 세포를 혼합해 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 도 7(D)은 표피 세포와 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 혼합해 스페이로이드 배양한 세포괴를 항트리코히알린 항체로 면역 형광 염색했을 때의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 덧붙여 도 중의 화살표는 트리코히알린의 발현을 나타낸다.

[0137] 도 7(A) 및 (B)에 나타난 바와 같이, 표피 세포만의 배양에서 또는 표피 세포와 섬유아세포의 혼합 배양에서는 트리코히알린의 발현은 유도되지 않는다. 이것에 대해, 도 7(C) 및 (D)에 나타난 바와 같이, 표피 세포와 모유두 세포 또는 사람 iPS 세포 유래 SKPs와의 혼합 배양에서는 트리코히알린의 발현이 유도되었던 것이 확인되었다.

[0138] 따라서, 상기 시험예 2로 얻어진 세포는 모유두 세포와 같이 모낭 유도능을 가지는 것이 확인되었다.

[0139] 시험예 9 사람 iPS 세포 유래 SKPs에서 신경교 세포로의 분화의 유도

[0140] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 SKPs를 SKPs 배양용 배지(2% B27 보충제(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:17504-044), 20ng/mL EGF(RD systems 사제, 카탈로그 번호:336-EG-200), 40ng/mL bFGF(Wako 사제, 카탈로그 번호:064-04541), 50U 페니실린, 50㎍/mL 스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122)을 포함한 DMEM/F12 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:10565-018))를 이용하여 사전에 25 배 희석 Laminin(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:P4707) 및 0.1mg/mL 폴리-L-라이신(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:L4544)으로 코팅한 배양접시에 4.8×10^{4}cells/35mm dish로 파종했다. 24시간 배양 후, 5㎛M 포르스콜린(Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:F3917), 50ng/mL 헤레귤린-1β(Peprotech 사제, 카탈로그 번호:100-03), 2% N2 보충제(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:17502-048), 1% 소 혈청(Hyclone 사제, 카탈로그 번호:SH30070.03E)을 포함한 DMEM:F12 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:10565-018)에서 2~3주간 배양했다. 덧붙여 배지 교환은 2~3날에 1회 수행했다.

[0141] 얻어진 세포를 D-PBS(-)로 세정해, 4% 파라포름알데하이드로 15분간 고정했다. 고정한 세포를 D-PBS(-)로 세정 후, 0.5% Triton X-100의 PBS 용액으로 5 분간 처리해, 다시 D-PBS(-)로 세정 후,10% 염소 혈청(니치레이 사제, 카탈로그 번호:426041)에서 실온에서 1시간 블로킹했다. 그 후 얻어진 세포를 1 차 항체(항S100β항체, Sigma Aldrich 사제, 카탈로그 번호:S2532, 실온, 2시간) 및 2 차 항체(Alexa Fluor 488 염소 항-마우스 IgG(H+L), Life technologies 사제, 카탈로그 번호:A11029, 실온, 1시간) 로 처리했다. 그 후 DAPI(DOJINDO 사제, 카탈로그 번호:FK045)로 핵을 염색 후, 포매해, 슈반 세포에 특유한 마커 단백질(S100β)의 발현을 형광 현미경 하에서 관찰했다.

[0142] 그 결과를 도 8에 나타낸다. 여기서 도 8(A)은 사람 iPS 세포에서 유도한 SKPs를 또한 슈반 세포로 3주간 분화 유도한 세포의 현미경 사진을 나타내며, 도 8(B)은 도 8(A)의 세포에 대해 항S100β항체를 이용해 염색한 세포의 형광 현미경 사진을 나타낸다.

[0143] 도 8에 나타난 바와 같이, S100β양성 세포가 인정되어 사람 iPS 세포 유래 SKPs가 슈반 세포로 분화했던 것이 확인될 수 있었다. 따라서, 상기 시험예 2로 얻어진 세포가 슈반 세포 등의 신경교 세포로 분화 가능한 SKPs인 것이 확인되었다.

[0144] 상기 시험예3~9에 나타난 바와 같이, 상기 시험예 2로 얻어진 세포가 SKPs인 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 의하면 신경세포, 신경교 세포, 평활근 세포, 지방세포, 골세포, 모유두 세포 등으로 분화 가능한 SKPs

를 효율적으로 대량으로 제작할 수 있다.

[0145] 시험예 10 본 발명에 의해 얻어진 사람 iPS 세포 유래 SKPs의 동결 보존

[0146] 상기 시험예 2로 얻어진 계대 배양 후의 SKPs 1×10^{6}cells를 셀 뱅커 I(LSI 메디엔스 사제, 카탈로그 번호:248085) 1 mL에 현탁해, -80℃로 동결했다. 2~3일 경과 후, 동결한 세포를 액체질소 중에 저장했다.

[0147] 저장한 세포를 융해해, 사람 iPS 세포 유래 SKPs 배양용 배지(2% B27 보충제(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:17504-044), 20ng/mL EGF(RD systems 사제, 카탈로그 번호:336-EG-200), 40ng/mL bFGF(Wako 사제, 카탈로그 번호:064-04541), 50U 페니실린, 50㎍/mL 스트렙토마이신(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:15140-122)을 포함한 DMEM/F12 배지(Life technologies 사제, 카탈로그 번호:10565-018))에서 배양했다.

[0148] 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs 및 융해 후의 SKPs의 현미경 사진을 도 9에 나타낸다. 덧붙여 도 9(A)는 동결 보존 전의 SKPs의 현미경 사진을 나타내며, 도 9(B)는 도 9(A)에 나타내는 SKPs의 일부를 동결 보존 후, 융해해 1 일간 배양 후의 세포의 현미경 사진을 나타내며, 도 9(C)는 도 9(B)에 나타내는 세포를 추가로 3일간 증식 배양한 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[0149] 도 9에 나타난 바와 같이, 사람 iPS 세포 유래 SKPs는 동결 융해를 해도, 세포 증식해, 배양을 계속할 수 있는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명으로 얻어진 사람 iPS 세포 유래 SKPs는 동결 보존 및 계대 배양이 가능한 것으로 밝혀졌다.

[0150] 시험예 11 동결 융해 후의 iPS 세포 유래 SKPs의 지방세포로의 분화의 유도

[0151] 시험예 10으로 얻어진, 도 9(A)에 나타내는 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs 및 도 9(C)에 나타내는 동결 융해 후의 iPS 세포 유래 SKPs 각각에 대해서 시험예 6과 같은 방법으로 지방세포로의 분화의 유도를 했다. 그 결과를 도 10에 나타낸다. 여기서 도 10(A)은 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 또한 지방세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, Oil Red O염색을 한 지방세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 10(B)은 동결 융해 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 배양해, 또한 지방세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, Oil Red O염색을 한 지방세포의 현미경 사진을 나타낸다.

[0152] 도 10에 나타난 바와 같이, 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs와 같이 동결 융해 증식 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs도 지질이 적색으로 염색되고, 사람 iPS 세포 유래 SKPs가 지방세포로 분화했던 것이 확인될 수 있었다. 따라서, 상기 시험예 2로 얻어진 세포는 계대, 동결 보존을 해도 지방세포로의 분화 유도능을 유지하고 있는 것으로 밝혀졌다.

[0153] 시험예 12 동결 융해 후의 iPS 세포 유래 SKPs의 골세포로의 분화의 유도

[0154] 시험예 10으로 얻어진, 도 9(A)에 나타내는 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs 및 도 9(C)에 나타내는 동결 융해 후의 iPS 세포 유래 SKPs 각각에 대해서 시험예 7과 같은 방법으로 골세포로의 분화의 유도를 했다. 그 결과를 도 11에 나타낸다. 여기서 도 11(A)은 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 또한 골세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, 알칼리 포스파타제 염색을 한 골세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 11(B)은 동결 융해 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs를 배양해, 또한 골세포로 2주간 분화 유도한 세포에 대해, 알칼리 포스파타제 염색을 한 골세포의 현미경 사진을 나타낸다.

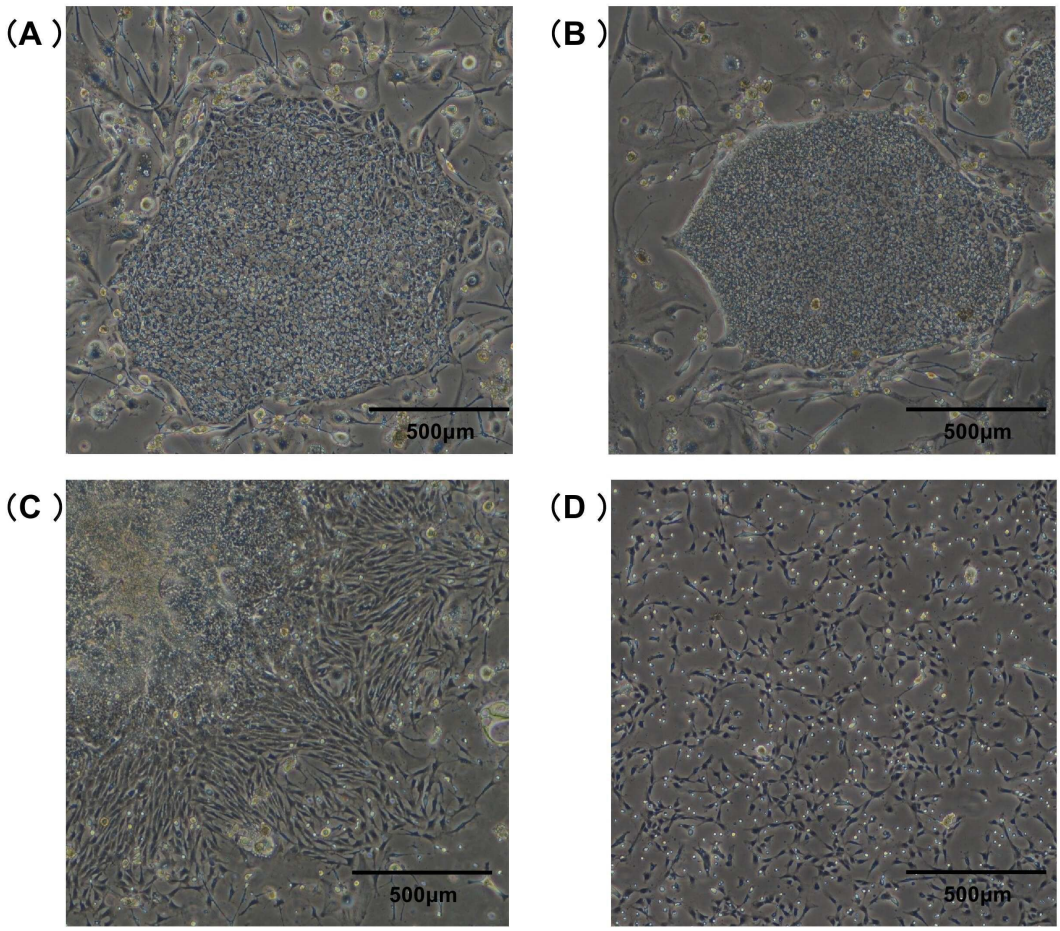
[0155] 도 11에 나타난 바와 같이, 동결 보존 전의 사람 iPS 세포 유래 SKPs와 같이 동결 융해 증식 배양 후의 사람 iPS 세포 유래 SKPs도 알칼리 포스파타제 양성 세포로 인정되어, 사람 iPS 세포 유래 SKPs가 골세포로 분화했던 것이 확인될 수 있었다. 따라서, 상기 시험예 2로 얻어진 세포는 계대, 동결 보존을 해도 골세포로의 분화 유도능을 유지하고 있는 것으로 밝혀졌다.

[0156] 우리의 발명을 본 구현예와 관련하여 기재했으며, 다르게 명시되지 않는 한, 발명이 명세서의 세부사항 중 어느 것에 의해서도 한정되지 않고, 대신에 첨부된 청구항에 제시된 주제 및 범위 내에서 광범위하게 구성된다는 것의 우리의 의도이다.

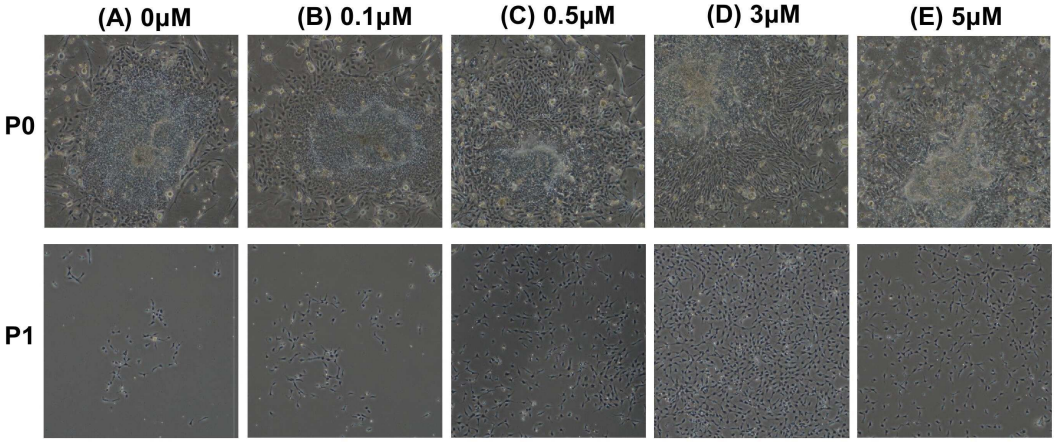
[0157] 이 출원은 2014년 4월 21일자에 일본에서 출원된 특허 출원 제2014-087247호, 및 2014년 12월 24일자에 일본에서 출원된 특허 출원 제2014-260434에 대해 우선권을 주장하며, 이들 출원은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

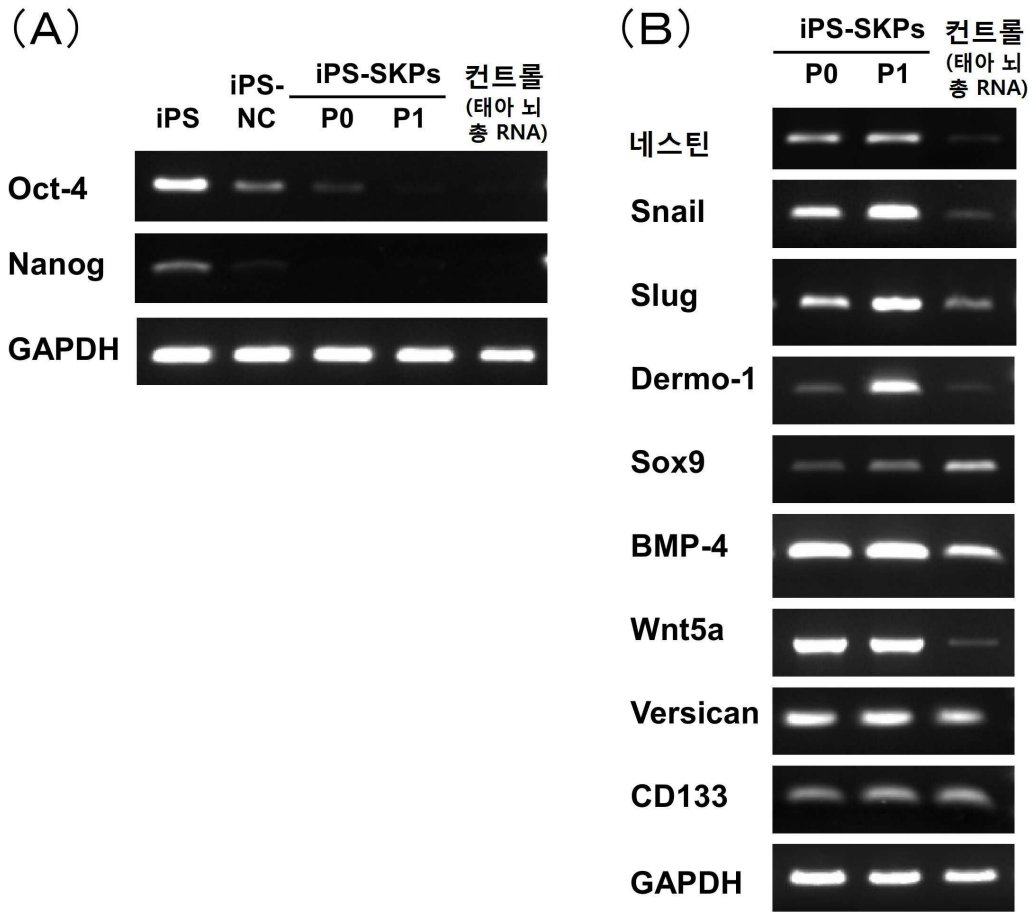
도면1


(A)
500μm
(B)
500μm
(C)
500μm
(D)
500μm

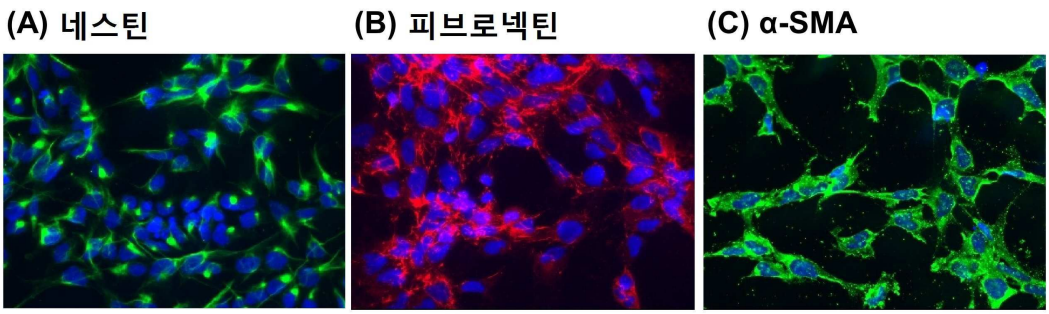
도면2


(A) 0μM
(B) 0.1μM
(C) 0.5μM
(D) 3μM
(E) 5μM
P0
P1

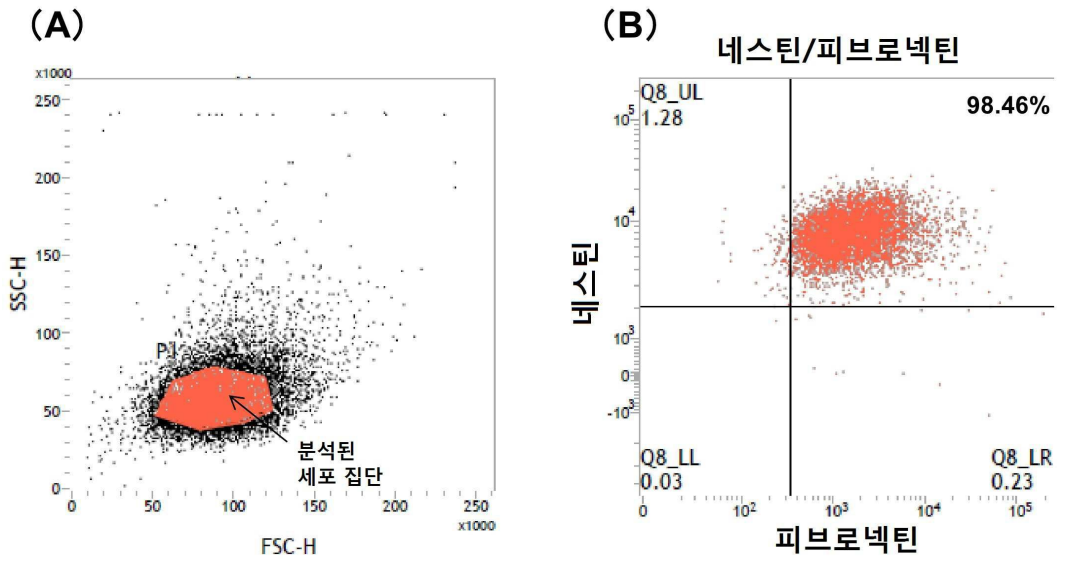
도면3


(A)
iPS
iPS-NC
iPS-SKPs
P0
P1
컨트롤
(태아 뇌 총 RNA)
Oct-4
Nanog
GAPDH
(B)
iPS-SKPs
P0
P1
컨트롤
(태아 뇌 총 RNA)
네스틴
Snail
Slug
Dermo-1
Sox9
BMP-4
Wnt5a
Versican
CD133
GAPDH

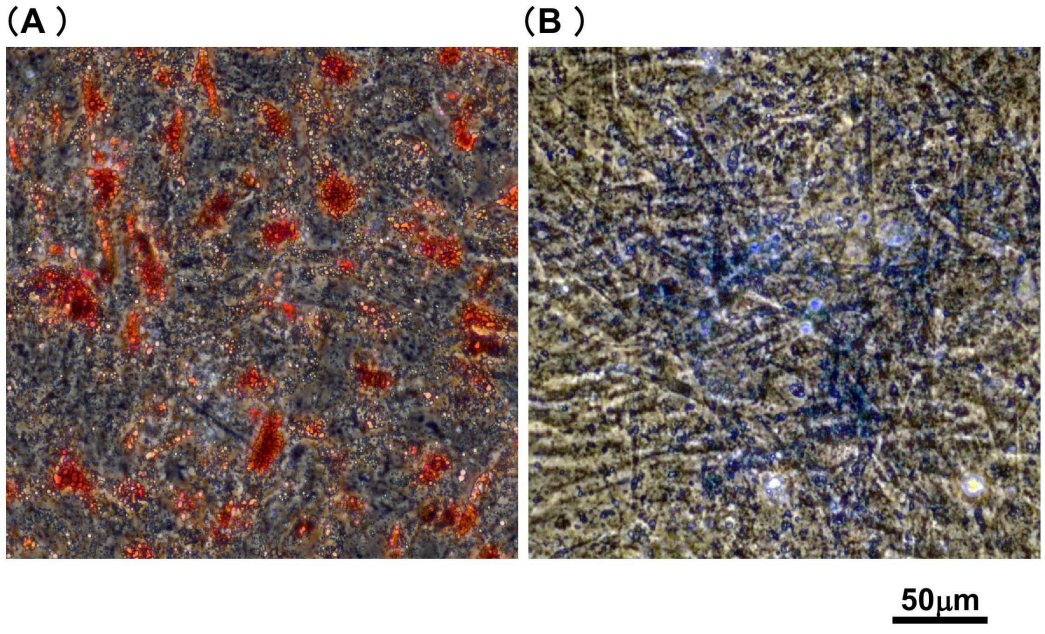
도면4


(A) 네스틴
(B) 피브로넥틴
(C) α-SMA

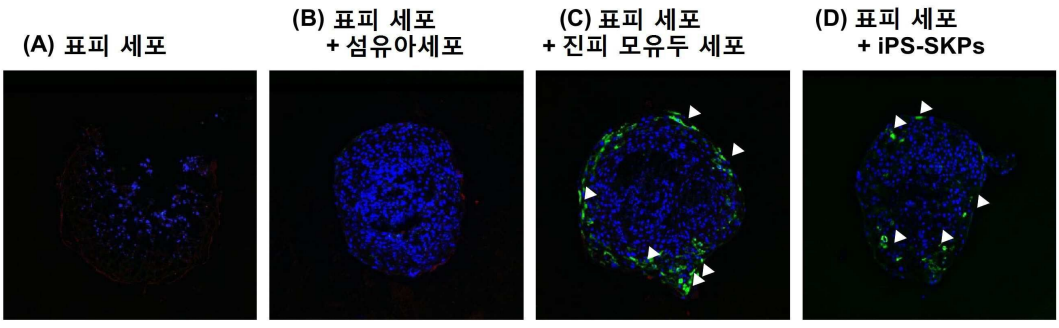
도면5


(A)
x1000
250
200
150
100
50
0
SSC-H
P1
분석된
세포 집단
0
50
100
150
200
250
x1000
FSC-H
(B)
네스틴/피브로넥틴
Q8_UL
1.28
98.46%
네스틴
Q8_LL
0.03
Q8_LR
0.23
피브로넥틴

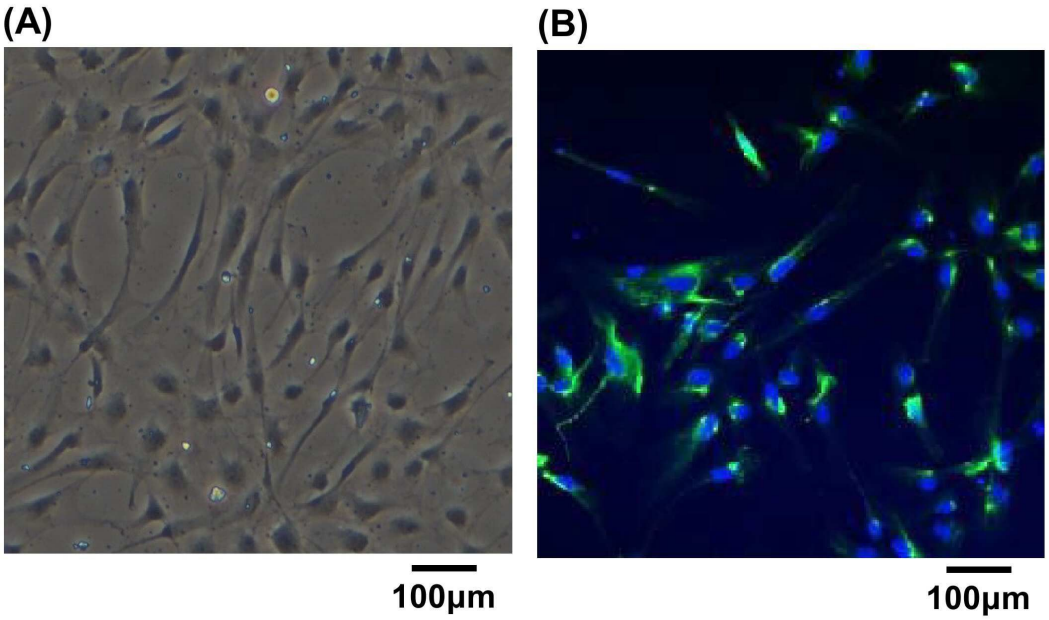
도면6


(A)
(B)
50μm

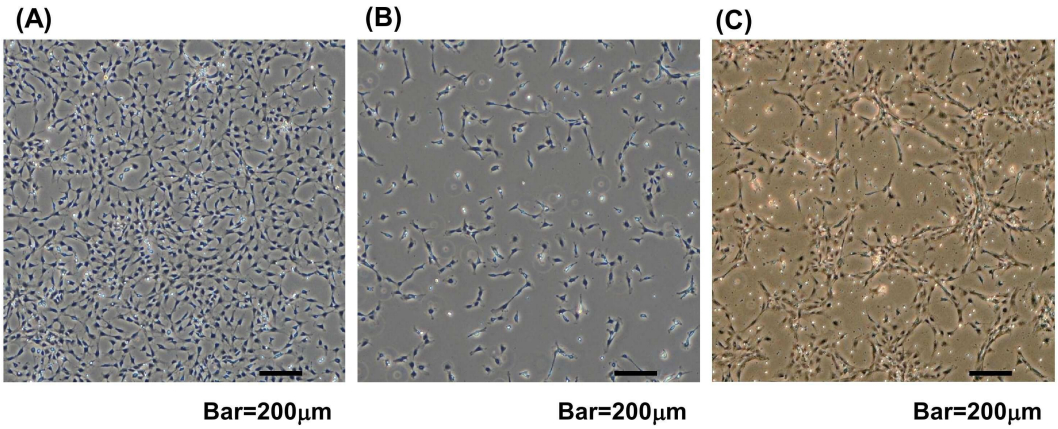
도면7


(A) 표피 세포
(B) 표피 세포
+ 섬유아세포
(C) 표피 세포
+ 진피 모유두 세포
(D) 표피 세포
+ iPS-SKPs

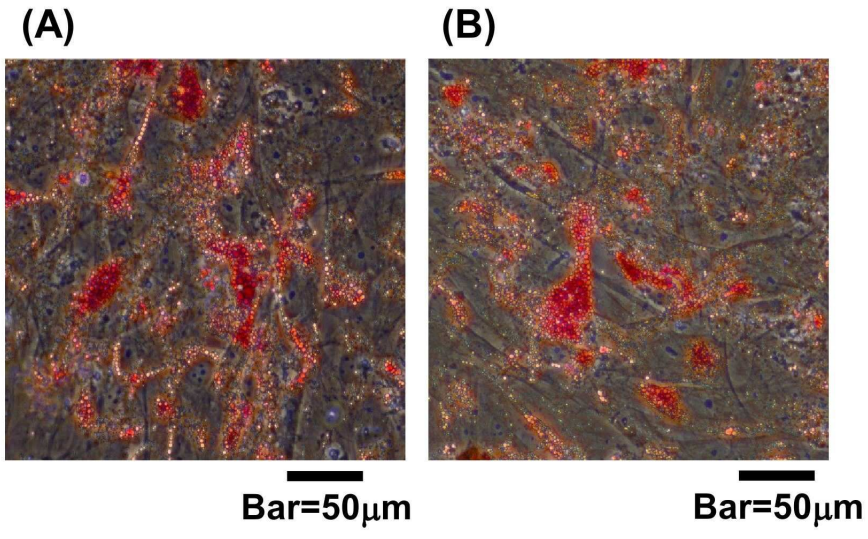
도면8


(A)
(B)
100μm
100μm

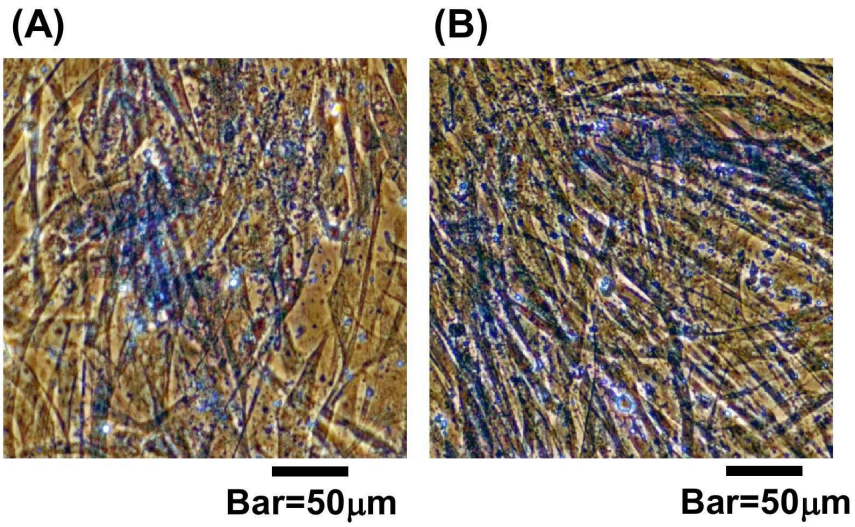
도면9


(A)
(B)
(C)
Bar=200μm
Bar=200μm
Bar=200μm

도면10


(A)
(B)
Bar=50μm
Bar=50μm

도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Method of producing skin-derived precursor cells

<130> P14-0862WO00

<150> JP 2014-087247

<151> 2014-04-21

<150> JP 2014-260434

<151> 2014-12-24

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of GAPDH gene

<400> 1

cggagtcaac ggatttggtc g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of GAPDH gene

<400> 2

agccttctcc atggtggtga a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Oct-4 gene

<400> 3

cgaaagagaa agcgaaccag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Oct-4 gene

<400> 4

gtgaagtgag ggctcccata 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Nanog gene

<400> 5

cagaaggcct cagcacctac 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Nanog gene

<400> 6

gcctccaagt cactggcag 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Nestin gene

<400> 7

cagcgttgga acagaggttg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Nestin gene

<400> 8

gctggcacag gtgtctcaag 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Snail gene

<400> 9

accgcctcgc tgccaatgct 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Snail gene

<400> 10

gtgcatcttg agggcaccca 20

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Slug gene

<400> 11

catctttggg gcgagtgagt cc 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Slug gene

<400> 12

cccgtgtgag ttctaatgtg tc 22

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Dermo-1 gene

<400> 13

gcaagaagtc gagcgaagat g 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Dermo-1

gene

<400> 14

ggcaatggca gcatcattca g 21

<210> 15

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Sox9

gene

<400> 15

gtcagccagg tgctcaaagg 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Sox9

gene

<400> 16

acttgtaatc cgggtggtcc 20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of BMP-4

gene

<400> 17

ttctgcagat gtttgggctg c 21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of BMP-4

gene

<400> 18

agagccgaag ctctgcagag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Wnt-5a gene

<400> 19

ggatggctgg aagtgcaatg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Wnt-5a gene

<400> 20

acacaaactg gtccacgatc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Versican gene

<400> 21

acgatgccta ctttgccacc 20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of Versican gene

<400> 22

tagtgaaaca caaccccatc c 21

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of CD133 gene

<400> 23

atggccctcg tactcggctc 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide for amplifying the nucleotide sequence of CD133 gene

<400> 24

cacgcggctg taccacatag 20