(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0101557
(43) 공개일자 2013년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7013739
(22) 출원일자(국제) 2011년10월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년05월29일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/075041
(87) 국제공개번호 WO 2012/060315
국제공개일자 2012년05월10일
(30) 우선권주장
JP-P-2010-246161 2010년11월02일 일본(JP)

(71) 출원인
고꾸리쯔다이가꾸호오진 구마모또 다이가꾸
일본 구마모토켄 구마모토시 쥬오쿠 구로카미 2쵸메 39방 1고
엘에스아이피 환도 운에이고우도우가이샤
일본 도쿄도 지요다쿠 마루노우치 1쵸메 7방 12고
(72) 발명자
구메 쇼엔
일본 구마모토켄 구마모토시 혼조 2쵸메 2방 1고 고꾸리쯔다이가꾸호오진 구마모또 다이가꾸 나이
오가키 소이치로
일본 구마모토켄 구마모토시 혼조 2쵸메 2방 1고 고꾸리쯔다이가꾸호오진 구마모또 다이가꾸 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

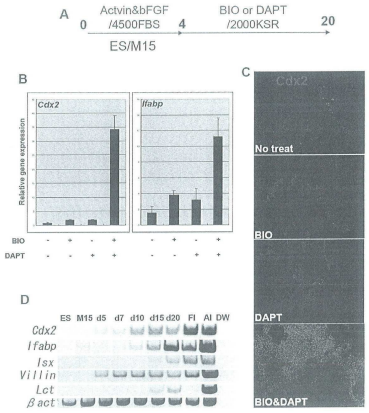
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **장세포의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명의 목적은 다능성 줄기세포를 출발 재료로 한 장세포를 제조하는 방법을 제공하는 것에 있다. 본 발명에 따르면, 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 공정 (A); 및 상기 배성 내배엽을 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심 (BIO) 및 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-Ala-2-페닐-L-Gly-tert-부틸-OH (DAPT) 의 존재하에서 배양함으로써, 상기 배성 내배엽으로부터 장세포를 분화 유도하는 공정 (B) 를 포함하는 장세포의 제조 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

시라키 노부아키

일본 구마모토켄 구마모토시 혼조 2쵸메 2방 1고 고꾸리쯔다이가꾸호오진 구마모또 다이가꾸 나이

구메 가즈히코

일본 구마모토켄 구마모토시 혼조 2쵸메 2방 1고 고꾸리쯔다이가꾸호오진 구마모또 다이가꾸 나이

특허청구의 범위

청구항 1

다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 공정 (A); 및 상기 배성 내배엽을 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심 (BIO) 및 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-Ala-2-페닐-L-Gly-tert-부틸-OH (DAPT) 의 존재하에서 배양함으로써, 상기 배성 내배엽으로부터 장세포를 분화 유도하는 공정 (B) 를 포함하는 장세포의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

E-카데린 (ECD) 및 CXCR4 에 대한 형광 표지 항체를 사용한 플로우 사이토메트리에 의해 공정 (A) 에서 얻어진 세포 배양물로부터 배성 내배엽 세포를 분리하고, 공정 (B) 에서 그 분리된 배성 내배엽 세포를 사용하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

공정 (A) 에 있어서, 지지 세포의 존재하, 또한 액티빈 및/또는 bFGF 의 존재하에서 상기 다능성 줄기세포를 배양함으로써, 그 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

지지 세포가 중배엽에서 유래되는 세포인 방법.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서,

지지 세포가 M15 세포, MEF 세포 또는 ST2 세포인 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

공정 (B) 에 있어서, 상기 배성 내배엽을 M15 세포 또는 MEF 세포의 존재하에서 배양하는 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기세포가 배성 줄기세포 또는 인공 다능성 줄기세포인 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다능성 줄기세포가 인간 배성 줄기세포 또는 마우스 배성 줄기세포인 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 얻어지는 다능성 줄기세포로부터 분화 유도된 장세포.

청구항 10

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 다능성 줄기세포로부터 장세포로 분화 유도할 때에, 피험 물질의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양하고, 피험 물질의 비존재하에서 다능성 줄기세포를 배양한 경

우에 있어서의 장세포로의 분화 유도의 정도와, 피험 물질의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양한 경우에 있어서의 장세포로의 분화 유도의 정도를 비교하는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포로부터 장세포로 분화 유도를 촉진 또는 저해시키는 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

피험 물질이 성장 인자 또는 저분자 화합물인 스크리닝 방법.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서,

장세포에서 발현되는 마커 전사 산물의 양 또는 단백량, 또는 그 양방을 지표로 하여 장세포로 분화 유도의 정도를 측정하는 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 장세포의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 다능성 줄기세포를 출발 재료로 하여 장세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 배성 줄기세포 (ES 세포) 나 인공 다능성 줄기세포 (유도 다능성 줄기세포) (induced pluripotent stem cell ; iPS 세포) 등의 다능성 줄기세포는 여러가지 세포로 분화되는 능력을 갖는 세포로서, 거의 무한하게 증식하는 능력을 갖는다. 최근, 특히 재생 의료 분야에 있어서, 이와 같은 다능성 줄기세포를 출발 재료로 하여 위, 췌장, 간장, 장 등의 각종 장기에 적용할 수 있는 조직 및 세포의 제조 방법의 개발이 요구되고 있다. 보다 구체적으로는, 신생아 의료의 진전에 따라 미숙아의 구명률이 급속하게 향상되고 있지만, 선천성 소화관 저형성증을 갖는 소아에 대해 유효한 재생 의료 기술의 필요성이 높아지고 있다. 또, 소화기계 악성 종양, 그 질환의 수술 후의 협착이나 섬유화, 역류성 식도염, 궤양성 대장염이나 크론병과 같은 만성 염증성 장 질환에 수반되는 조직 파괴에 따른 소화관 기능 부전에 있어서도, 장상피화생이나 소화관 점막의 불가역적인 구조 변화가 발생하기 때문에, 재생 의료에 의한 치료의 필요성이 요구되고 있다. 이러한 소화기계 질환에 대한 재생 의료에 의한 치료를 가능하게 하기 위해, 다능성 줄기세포를 출발 재료로 한 장관 세포의 효율적인 제조 방법의 개발이 급선무가 되었다.

[0003] 예를 들어, 배성 줄기세포로부터 내배엽계 세포로 분화 유도하는 방법으로서 중배엽에서 유래되는 세포를 지지 세포로서 사용하고, 그 지지 세포의 존재하에서 배성 줄기세포를 배양함으로써, 내배엽계 세포로 분화 유도하는 방법이 알려져 있다 (특허문헌 1 참조). 특허문헌 1 에는, 간장, 폐, 소장 등의 내배엽 유래 기관의 성숙 세포로 분화 유도하는 것이 기재되어 있기는 하지만, 개시된 방법에 의해 성숙된 각종 장세포를 효율적으로 분화 유도하는 것은 불가능하다.

[0004] 또, 인·비보에서의 초기 배 (胚) 의 유도를 모방하듯이, 인·비트로에 있어서, M15 세포의 단층 상에서 ES 세포를 배양함으로써, ES 세포를, 중내 배엽, 배성 내배엽, 그리고, 최종적으로는 영역 특이적인 배성 내배엽에서 유래되는 각종 기관으로 연속적으로 유도하는 기술이 확립되어 있다 (비특허문헌 1 및 2 참조). 이들 기술에서는, 간장세포, 폐세포, 췌장세포 등의 분화 유도에 성공했음이 확인되었다. 특히, 비특허문헌 2 에는, 간장세포, 폐세포, 췌장세포에 추가하여, Cdx2 를 발현시키는 장 전구세포도 발생했음이 기재되어 있다. 그러나, 이들 종래 기술에 의해 더 성숙된 각종 장세포를 대량으로 효율적으로 제조하기는 곤란하다.

[0005] 상기와 같이 다능성 줄기세포로부터 각종 성숙형 장세포를 대량으로 효율적으로 분화 유도하는 기술의 개발은 여전히 진행되지 않아, 다능성 줄기세포를 출발 재료로 한 장세포의 효율적인 제조 방법은 존재하지 않는 게 현 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국제 공개공보 WO2006/126574호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K. and Kume, S. (2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. Genes Cells 13, 731-46.

(비특허문헌 0002) Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa, A., Higuchi, Y., Goto, H., Kume, K. and Kume, S. (2008b). Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. Stem Cells 26, 874-85.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 과제는 다능성 줄기세포를 출발 재료로 한 장세포를 제조하는 방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토한 결과, 다능성 줄기세포인 배성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도한 후에, 그 배성 내배엽을 BIO ((2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심) 및 DAPT (N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-Ala-2-페닐-L-Gly-tert-부틸-OH) 의 존재하에서 배양함으로써, 성숙된 각종 장세포를 분화 유도할 수 있음을 알아냈다. 본 발명은 이러한 지견에 의해 완성된 것이다.

[0010] 즉, 본 발명은 이하에 관한 것이다.

[0011] (1) 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 공정 (A); 및 상기 배성 내배엽을 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심 (BIO) 및 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-Ala-2-페닐-L-Gly-tert-부틸-OH (DAPT) 의 존재하에서 배양함으로써, 상기 배성 내배엽으로부터 장세포를 분화 유도하는 공정 (B) 를 포함하는 장세포의 제조 방법.

[0012] (2) E-카데린 (ECD) 및 CXCR4 에 대한 형광 표지 항체를 사용한 플로우 사이토메트리에 의해 공정 (A) 에서 얻어진 세포 배양물로부터 배성 내배엽 세포를 분리하고, 공정 (B) 에서 그 분리된 배성 내배엽 세포를 사용하는 (1) 에 기재된 방법.

[0013] (3) 공정 (A) 에 있어서, 지지 세포의 존재하, 또한 액티빈 및/또는 bFGF 의 존재하에서 상기 다능성 줄기세포를 배양함으로써, 그 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 (1) 또는 (2) 에 기재된 방법.

[0014] (4) 지지 세포가 중배엽에서 유래되는 세포인 (3) 에 기재된 방법.

[0015] (5) 지지 세포가 M15 세포, MEF 세포 또는 ST2 세포인 (3) 또는 (4) 에 기재된 방법.

[0016] (6) 공정 (B) 에 있어서, 상기 배성 내배엽을 M15 세포 또는 MEF 세포의 존재하에서 배양하는 (1) ~ (5) 중 어느 1 항에 기재된 방법.

[0017] (7) 상기 다능성 줄기세포가 배성 줄기세포 또는 인공 다능성 줄기세포인 (1) ~ (6) 중 어느 1 항에 기재된 방법.

[0018] (8) 상기 다능성 줄기세포가 인간 배성 줄기세포 또는 마우스 배성 줄기세포인 (1) ~ (7) 중 어느 1 항에 기재된 방법.

[0019] (9) (1) 내지 (8) 중 어느 1 항에 기재된 방법에 의해 얻어지는 다능성 줄기세포로부터 분화 유도된 장세포.

[0020] (10) (1) 내지 (8) 중 어느 1 항에 기재된 방법에 의해 다능성 줄기세포로부터 장세포로 분화 유도할 때에, 피험 물질의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양하고, 피험 물질의 비존재하에서 다능성 줄기세포를 배양한 경우에 있어서의 장세포로의 분화 유도의 정도와, 피험 물질의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양한 경우에 있어서

의 장세포로의 분화 유도의 정도를 비교하는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포로부터 장세포로 분화 유도를 촉진 또는 저해시키는 물질을 스크리닝하는 방법.

[0021] (11) 피험 물질이 성장 인자 또는 저분자 화합물인 (10) 에 기재된 스크리닝 방법.

[0022] (12) 장세포에서 발현되는 마커 전사 산물의 양 또는 단백량, 또는 그 양방을 지표로 하여 장세포로 분화 유도의 정도를 측정하는 (10) 또는 (11) 에 기재된 스크리닝 방법.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 제조 방법에 따르면, 다능성 줄기세포로부터 장의 흡수 장세포, 파네트 세포, 배세포, 장내 분비 세포 등의 각종 성숙형 장세포를 대량으로 효율적으로 제조할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기와 같이 각종 성숙형 장세포를 제조할 수 있고, 그들 장세포는 재생 의료 분야에 있어서 실천적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] [도 1] 도 1A 는 실험계의 모식도이다. 최초로 ES 세포를, M15 상에서 액티빈 및 bFGF 의 존재하에서, 다음으로 분화의 20 일째까지 BIO 및 DAPT 로 전환하여 배양함으로써, 배성 내배엽로의 분화를 유도하였다. 도 1B 는 M15 세포 상에서 BIO 및 DAPT 를 각종 조합으로 추가하여 분화시킨 ES 세포 (분화 12 일째) 에 관해 리얼타임 PCR 분석의 결과를 나타낸다. BIO 및 DAPT 의 조합에 의해 장 전구세포 마커 Cdx2 및 Ifabp 의 발현이 동시에 증강된다. 도 1C 는 항Cdx2 항체를 사용하여 면역 염색한, 분화된 12 일째의 ES 세포의 사진이다. M15 세포 상에서 배양된 경우, BIO 및 DAPT 의 존재하에서, 높은 비율의 ES 세포가 Cdx2 발현 세포로 변화하는 것이 나타내어져 있다. 도 1D 는 M15 세포 상에서 BIO 및 DAPT 의 존재하에서 배양된 ES 세포에 관해 각종 장 마커의 타임·코스에 의한 발현을 RT-PCR 에 의해 해석한 결과를 나타낸다. FI, 태자 장 ; AI, 성체 장. DW, cDNA 없는 네거티브 컨트롤. 장 마커인 Cdx2 및 빌린 (Villin) ; 그리고 장세포 마커인 Ifabp, Isx 및 락타아제가, BIO 및 DAPT 의 존재하에서, 또한 M15 세포 상에서 분화시킨 ES 세포에서 유도되었다.

[도 2] 도 2A 는 M15 세포 상에서 BIO 및 DAPT 의 존재하에서 배양한 ES 세포로부터, 4 일째에 배성 내배엽 (Cxcr4+/ECD+) 세포 (사각) 를, 플로우 사이토메트리를 사용하여 선별한 결과를 나타낸다. 도 2B 는 배성 내배엽 세포를 M15 세포 상에서 재배양하고, 11 일간의 재배양 후 (15 일째의 세포와 동등하다) 의 세포에 관해 Cdx2 및 빌린 (Villin) 의 발현을 해석한 결과를 나타낸다. 이들 세포는 Cdx2 발현 세포 (왼쪽) 및 빌린 발현 장세포 (오른쪽) 로 분화되어 있었다. 도 2C 는 전방 후방의 특이성을 나타내는 마커 패널의 발현 패턴을 검증하고, 배성 내배엽을 패턴 형성할 때의 BIO 및 DAPT 의 효과를 평가한 결과를 나타낸다. BIO 및 DAPT 를 첨가하지 않은 경우 또는 저농도로 첨가한 경우, 전방 마커 Pax8 이 유도되었다. Cdx2 및 Ifabp 가 중간 정도의 농도 (1/30-1) 의 BIO 및 DAPT 에서 유도되었다. BIO 및 DAPT 를 고농도로 첨가한 경우에만, Hoxc8 (후방 마커) 가 발현되었다. 도 2D 는 Pax8 및 Hoxc8 의 발현에 대한 BIO 및 DAPT 의 첨가 효과를 조사한 결과를 나타낸다. Hoxc8 (후방 마커) 가 고농도의 BIO 에서 유도되었다. 도 2E 는 BIO 및 DAPT 의 단계적 농도에 따른 장 영역 형성의 가설 모식도이다.

[도 3] 도 3A 는 실험 개요를 나타내는 도면이다. ES 세포를 4 일간에 걸쳐 M15 세포 상에서 분화시켰다. 4 일째에 배성 내배엽 세포를 단리하고, MEF 세포 상에 재플레이팅하여, BIO 및 DAPT 의 존재하에서 배양하였다. 도 3B 는 ES 세포 유래의 배성 내배엽 세포를, M15 세포 대신에 MEF 세포 또는 PA6 세포 상에서 재배양한 후에 Cdx2 의 발현을 조사한 결과를 나타낸다. 배성 내배엽 세포를 MEF 세포 상에서 재배양한 경우, Cdx2 를 발현시키는 분화 세포가 관찰되었다. 도 3C 는 M15 세포 또는 MEF 세포 상에서 배양된 배성 내배엽 세포에 관해 각종 장 마커의 발현을 RT-PCR 에 의해 분석한 결과를 나타낸다. Cdx2, Ifabp, Isx, 빌린 (Villin) 및 락타아제 (lct) 가 M15 세포 또는 MEF 세포 상에서 배양된 배성 내배엽 세포에서 유도되는 것이 나타내어졌다. 도 3D 는 MEF 세포 상에서 배양할 때의, Cdx2 발현 세포 출현의 타임·코스 분석의 결과를 나타낸다. Cdx2 발현 세포가 MEF 세포 상에서의 분화의 12 일째부터 상당량으로 관찰되었다. 도 3E 는 각종 장 마커 발현의 타임·코스 분석의 결과를 나타낸다. 분화가 개시될 때를 0 일로 정의하였다. Tff3, 배세포 마커 ; 라이소자임 (Lyz1), 파네트 세포 마커 ; Sst, 장내 분비 마커.

[도 4] 도 4 는 MEF 세포 상에서 분화시킨 ES 세포에 대해 각종 마커의 발현을 조사한 결과를 나타낸다. 도 4A 에서는, ES 세포 유래의 장세포는 Cdx2/ECD/HNF4a 양성 세포임이 나타내어져 있다. 도 4B 에서는, 이들 세포에서는 Glut2 도 발현되어 있음이 나타내어져 있다. 도 4C 는 그 세포의 집단은 클라우딘 7 을 발현시킨 것을 나타낸다. 도 4D 는 파네트 세포 (라이소자임 발현) 및 내분비 마커 (크로모그라닌 A (Chga), 소마

토스타틴 (sst)) 를 발현시키는 세포가 유도됨을 나타낸다.

[도 5] 도 5 는 MEF 세포 (도 5E 및 5F) 또는 M15 세포 (도 5G ~ 5I) 상에서 분화시킨 ES 세포에 대해 각종 마커의 발현을 조사한 결과를 나타낸다. 도 5E 는 뮤신 2 (Muc2), DBA 발현 세포도 유도되었음을 나타낸다. 도 5F 는 Sox9 발현 세포가 빌린 (Villin) 발현 세포 중에 존재하는 것을 나타낸다. 도 5G 는 장세포 (알칼리 포스파타아제 활성) 가 유도되었음을 나타낸다. 도 5H 및 5I 는 배세포 (PAS 및 Alucian 블루 염색 양성) 도 유도되었음을 나타낸다.

[도 6] 도 6A 는 인간 ES 세포 khES-3 으로부터 BIO 및 DAPT 의 존재에서 M15 세포 상에서 25 일째에 Cdx2 를 발현시키는 장세포가 유도된 결과를 나타낸다. 도 6B 는 인간 ES 세포 khES-3 에 관해 각종 장 마커의 발현에 대해 RT-PCR 에 의해 타임·코스 분석한 결과를 나타낸다. BIO 및 DAPT 의 존재하에서, 또한 M15 세포 상에서 분화 유도를 실시한 khES-3 세포에 있어서, 장 마커, Cdx2, 빌린 (Villin) ; 장세포 마커, Ifabp, Isx ; 배세포 마커, Tff3 ; 파네트 세포 마커, 라이소자임 (Lyz1) ; 및 장내 분비 마커, Sst, Sct, Syp, Sst, Gast 가 발현되었다. 도 6C 및 6D 는 분화된 khES-3 세포는 알칼리 포스파타아제 활성 (C) 를 나타내고, PAS 염색 (D) 양성이었음을 나타낸다.

[도 7] 도 7A 는 각종 마커에 대해 M15 세포 상에서 분화시킨 ES 세포에 BIO 및 DAPT 를 첨가한 것과 FGF2 (bFGF) 를 첨가한 것을 비교한 결과를 나타낸다. BIO 및 DAPT 의 첨가에 의해 ES 세포로부터 장세포 (enterocyte), 배세포 (goblet cell), 파네트 세포 (paneth cell) 및 장내 분비 세포 (enteroendocrine cell) 의 분화 세포형이 유도되었다. BIO 및 DAPT 대신에, 256 ng/㎖ 의 FGF2 (bFGF) 에 의해 장 분화 (intestine) 가 유도되었지만, 분화 세포 마커의 발현은 더 작은 정도임을 알 수 있다. 도 7A 는 15 일째의 분화 세포를 사용하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과를 나타내고 있다. 도 7B 는 배성 내배엽에 대한 각종 FGF 의 효과를 조사한 결과를 나타낸다. 액티빈 및 bFGF 를 사용하여 4 일간에 걸쳐 M15 세포 상에서 배양된 ES 세포로부터 배성 내배엽을 선별하고, 선별된 세포를 MEF 세포 상에 재플레이팅하였다. FGF4, 5, 7, 8b, 9, 10 및 FGF18 을 첨가하여, ES 세포의 Cdx2 발현 장세포로의 분화를 항진시키는 이들 FGF 의 잠재 능력을 조사하였다. 도 7B 는 분화 12 일째에 실시한 면역 조직 화학적 검사의 결과를 나타낸다. 도 7C 및 7D 는 BIO 및 DAPT 첨가의 효과에 대한 SU5402 (FGF 수용체 안타고니스트), LY29402 (PI3K 저해제) 및 U0126 (MAPK 저해제) 의 영향을 조사한 결과를 나타낸다. BIO 및 DAPT 에 의한 ES 세포로부터의 장 분화가 SU5402 (FGF 수용체 안타고니스트) 및 LY29402 (PI3K 저해제) 에 의해 부분적으로 저해되었지만, U0126 (MAPK 저해제) 에서는 저해되지 않았다. 도 7C 및 7D 에는, Cdx2 의 발현에 대해 12 일째의 분화된 ES 세포에서의 RT-PCR 분석 (C) 및 항Cdx2 항체를 사용한 면역 조직 화학적 검사 (D) 에 의해 분석한 결과가 나타내어져 있다. 도 7 에 나타내는 결과에 관한 실험에서는, ES 세포를, M15 세포 상에서 액티빈 및 bFGF 를 사용하여 4 일간 배양하고, 그 후에 M15 세포 (도 7A) 또는 MEF 세포 (도 7B, 7C, 7D) 상에서의 컨트롤 (2000KSR) 을 사용하여, 또는 BIO 및 DAPT (BIO & DAPT) 의 존재하에서, 저해제 (SU5402, LY29402, 또는 U0126) 를 수반하거나, 또는 수반하지 않은 배양을 12 일째까지 계속하였다.

[도 8] 실시예 2 에 있어서의 시험예 1 및 2 의 결과를 나타내는 도면이다.

[도 9] 실시예 2 에 있어서의 시험예 3 의 결과를 나타내는 도면이다.

[도 10] 실시예 2 에 있어서의 시험예 4 의 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 장세포의 제조 방법은 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 공정 (A) ; 및 상기 배성 내배엽을 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심 (BIO) 및 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-Ala-2-페닐-L-Gly-tert-부틸-OH (DAPT) 의 존재하에서 배양함으로써, 그 상기 배성 내배엽으로부터 장세포를 분화 유도하는 공정 (B) 를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명에 있어서, 「다능성 줄기세포」란 시험관내 등의 인공적으로 구성된 조건하 (in vitro) 에서 증식능을 갖고, 생체의 모든 조직 세포에 분화가 가능한 세포를 말한다. 본 발명에서는, 다능성 줄기세포로서 배성 줄기세포 또는 인공 다능성 줄기세포를 사용하는 것이 바람직하고, 배성 줄기세포를 사용하는 것이 보다 바람직하다.

[0027] (배성 줄기세포)

[0028] 본 발명에서 사용하는 배성 (ES) 세포는 포유 동물 유래의 ES 세포이면 되고, 그 종류 등은 특별히 한정되지 않

고, 예를 들어, 마우스, 원숭이 또는 인간 유래의 ES 세포 등을 사용할 수 있다. ES 세포로는, 예를 들어, 그 분화 정도의 확인을 용이하게 하기 위해서, Pdx1 유전자 부근에 리포터 유전자를 도입한 세포를 사용할 수 있다. 예를 들어, Pdx1 자리에 LacZ 유전자를 삽입한 129/Sv 유래 ES 세포주 또는 Pdx1 프로모터 제어하의 GFP 리포터 트랜스 진을 갖는 ES 세포 SK7 주 등을 사용할 수 있다. 또는, Hnf3β 내배엽 특이적 인핸서 단편 제어하의 mRFP1 리포터 트랜스 진 및 Pdx1 프로모터 제어하의 GFP 리포터 트랜스 진을 갖는 ES 세포 PH3 주를 사용할 수도 있다. 또, 본 발명에서는, 마우스 유래의 것이면 마우스 ES 세포주 R1, 인간 유래의 것이면 인간 ES 세포주인 KhES-1, KhES-2 및 KhES-3 을 사용할 수 있고, 이 중에서 마우스 ES 세포주 R1 또는 인간 ES 세포주 KhES-3 을 바람직하게 사용할 수 있다.

[0029] 포유 동물 유래의 ES 세포의 배양 방법은 통상적인 방법에 의해 실시할 수 있고, 예를 들어, 필요에 따라 피더 세포로서 마이토마이신 C 처리 마우스 배선유아세포 (MEF) 의 존재하에서, 1000 유닛/㎖ 백혈병 억제 인자 (LIF ; Chemicon), 15 % 녹아웃 혈청 리플레이스먼트 (KSR ; Gibco), 1 % 소 태아 혈청 (FBS ; Hyclone), 100 μM 비필수 아미노산 (NEAA ; Invitrogen), 2 mM L-글루타민 (L-Gln ; Invitrogen), 1 mM 피루브산 나트륨 (Invitrogen), 50 유닛/㎖ 페니실린 및 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 (PS ; Invitrogen) 및 100 μM β-메르캅토 에탄올 (β-ME ; Sigma) 를 함유하는 글래스고 최소 필수 배지 (Invitrogen) 중에서 유지할 수 있다.

[0030] (인공 다능성 줄기세포)

[0031] 본 발명에서 사용하는 인공 다능성 줄기세포 (iPS) 세포는 체세포를 초기화 함으로써 제조할 수 있다. 여기서 사용하는 체세포의 종류는 특별히 한정되지 않고, 임의의 체세포를 사용할 수 있다. 즉, 본 발명에서 말하는 체세포란, 생체를 구성하는 세포의 내생식세포 이외의 모든 세포를 포함하고, 분화된 체세포이어도 되고, 미분화의 줄기세포이어도 된다. 체세포의 유래는 포유 동물, 조류, 어류, 파충류, 양서류 중 어느 것이어도 되고 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 포유 동물 (예를 들어, 마우스 등의 설치류, 또는 인간 등의 영장류) 이며, 특히 바람직하게는 마우스 또는 인간이다. 또, 인간의 체세포를 사용하는 경우, 태아, 신생아 또는 성인 중 어느 체세포를 사용해도 된다.

[0032] 본 발명에서 말하는 iPS 세포는 소정의 배양 조건하 (예를 들어, ES 세포를 배양하는 조건하) 에서 장기간에 걸쳐 자기 복제능을 갖고, 또 소정의 분화 유도 조건하에서 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 다분화능을 갖는 줄기세포를 말한다. 또, 본 발명에서의 인공 다능성 줄기세포는 마우스 등의 시험 동물에 이식한 경우에 테라토마를 형성하는 능력을 갖는 줄기세포이어도 된다.

[0033] 체세포로부터 iPS 세포를 제조하기 위해서는, 먼저 적어도 1 종류 이상의 초기화 유전자를 체세포에 도입한다. 초기화 유전자란, 체세포를 초기화하여 iPS 세포로 하는 작용을 갖는 초기화 인자를 코드하는 유전자이다. 초기화 유전자의 조합의 구체예로는, 이하의 조합을 들 수 있지만, 이것들에 한정되는 것은 아니다.

[0034] (i) Oct 유전자, Klf 유전자, Sox 유전자, Myc 유전자

[0035] (ii) Oct 유전자, Sox 유전자, NANOG 유전자, LIN28 유전자

[0036] (iii) Oct 유전자, Klf 유전자, Sox 유전자, Myc 유전자, hTERT 유전자, SV40 large T 유전자

[0037] (iv) Oct 유전자, Klf 유전자, Sox 유전자

[0038] Oct 유전자, Klf 유전자, Sox 유전자 및 Myc 유전자에는 각각 복수의 패밀리 유전자가 포함되어 있다. 각각의 패밀리 유전자의 구체예로는, 국제 공개공보 WO2007/069666호의 명세서의 11 페이지 내지 13 페이지에 기재되어 있는 것을 사용할 수 있다. 구체적으로는 이하와 같다.

[0039] Oct 유전자에 속하는 유전자의 구체예로는, Oct3/4(NM_002701), Oct1A(NM_002697) 및 Oct6(NM_002699) 등을 들 수 있다 (괄호 내는 인간 유전자의 NCBI accession 번호를 나타낸다). 바람직하게는 Oct3/4 이다. Oct3/4 는 POU 패밀리에 속하는 전사 인자이며, 미분화 마커로서 알려져 있고, 또 다능성 유지에 관여되어 있다는 보고도 있다.

[0040] Klf 유전자에 속하는 유전자의 구체예로는, Klf1 (NM_006563), Klf2 (NM_016270), Klf4 (NM_004235) 및 Klf5 (NM_001730) 등을 들 수 있다 (괄호 내는 인간 유전자의 NCBI accession 번호를 나타낸다). 바람직하게는 Klf4 이다. Klf4 (Kruppel like factor-4) 는 종양 억제 인자로서 보고되어 있다.

[0041] Sox 유전자에 속하는 유전자의 구체예로는, 예를 들어, Sox1 (NM_005986), Sox2 (NM_003106), Sox3 (NM_005634), Sox7 (NM_031439), Sox15 (NM_006942), Sox17 (NM_0022454) 및 Sox18 (NM_018419) 를 들 수 있

다 (괄호 내는 인간 유전자의 NCBI accession 번호를 나타낸다). 바람직하게는 Sox2 이다. Sox2 는 초기 발생 과정에서 발현되고, 전사 인자를 코드하는 유전자이다.

[0042] Myc 유전자에 속하는 유전자의 구체예로는, c-Myc (NM_002467), N-Myc (NM_005378) 및 L-Myc (NM_005376) 등을 들 수 있다 (괄호 내는 인간 유전자의 NCBI accession 번호를 나타낸다). 바람직하게는 c-Myc 이다. c-Myc 는 세포의 분화 및 증식에 관여하는 전사 제어 인자이며, 다능성 유지에 관여하고 있다는 보고가 있다.

[0043] 상기한 유전자는 인간을 포함하는 포유류 동물에게 있어서 공통되게 존재하는 유전자이며, 본 발명에 있어서 임의의 포유류 동물 유래 (예를 들어 인간, 마우스, 래트, 원숭이 등의 포유류 동물 유래) 의 유전자를 사용할 수 있다. 또, 야생형 유전자에 대해 수 개 (예를 들어 1 ~ 30 개, 바람직하게는 1 ~ 20, 보다 바람직하게는 1 ~ 10 개, 더욱 바람직하게는 1 ~ 5 개, 특히 바람직하게는 1 내지 3 개) 의 염기가 치환, 삽입 및/또는 결실된 변이 유전자로서, 야생형 유전자와 동일한 기능을 갖는 유전자를 사용할 수도 있다.

[0044] 본 발명에서는 특히 바람직하게는 초기화 유전자로서 Oct3/4 유전자, Klf4 유전자, Sox2 유전자 및 c-Myc 유전자의 조합을 이용할 수 있다.

[0045] 초기화 유전자를 체세포에 도입하는 방법은 도입된 초기화 유전자가 발현되어 체세포의 초기화를 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 적어도 1 종류 이상의 초기화 유전자를 포함하는 발현 벡터를 사용하여 그 초기화 유전자를 체세포에 도입할 수 있다. 벡터를 이용하여 2 종류 이상의 초기화 유전자를 체세포에 도입하는 경우에는, 하나의 발현 벡터에 2 종류 이상의 초기화 유전자를 삽입하고, 그 발현 벡터를 체세포에 도입해도 되고, 1 종류의 초기화 유전자를 삽입한 발현 벡터를 2 종류 이상 준비하고, 그들을 체세포에 도입해도 된다.

[0046] 발현 벡터의 종류는 특별히 한정되지 않고, 바이러스 벡터이어도 되고, 플라스미드 벡터이어도 되는데, 바람직하게는 바이러스 벡터이며, 특히 바람직하게는 도입된 초기화 유전자가 체세포의 염색체에 삽입되는 바이러스 벡터이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 바이러스 벡터로는, 레토르바이러스 벡터 (렌티바이러스 벡터를 포함한다), 아데노바이러스 벡터, 아데노 수반 바이러스 벡터 등을 들 수 있다. 상기 중에서도 바람직하게는 레토르바이러스 벡터이며, 특히 바람직하게는 렌티바이러스 벡터이다.

[0047] 재조합 바이러스 벡터를 제조하기 위해서 사용하는 패키징 세포로서는, 바이러스의 패키징에 필요한 단백질을 코드하는 유전자의 적어도 하나를 결손시킨 재조합 바이러스 벡터 플라스미드의 그 결손되는 단백질을 보급할 수 있는 세포이면 임의의 세포를 사용할 수 있다. 예를 들어 인간 신장 유래의 HEK293 세포, 마우스 선유아세포 NIH3T3 에 근거하는 패키징 세포를 사용할 수 있다.

[0048] 재조합 바이러스 벡터 플라스미드를 패키징 세포에 도입함으로써 재조합 바이러스 벡터를 생산할 수 있다. 상기 패키징 세포에 대한 상기 바이러스 벡터 플라스미드의 도입법은 특별히 한정되지 않고, 인산 칼슘법, 리포펙션법 또는 일렉트로포레이션법 등의 공지된 유전자 도입법으로 실시할 수 있다.

[0049] ES 세포의 미분화성 및 다능성을 유지할 수 있는 배지는 당업계에서 공지되어 있어, 적당한 배지를 조합해서 사용함으로써, 본 발명의 인공 다능성 줄기세포를 분리 및 배양할 수 있다. 즉, 본 발명의 인공 다능성 줄기세포를 배양하기 위한 배지로서는, ES 배지, ES 배지에 10 ng/㎖ FGF-2 (bFGF) 를 첨가 후에 마우스 배성 선유아세포를 24 시간 배양한 상청인 MEF 순화 ES 배지 (이하 MEF 순화 ES 배지) 등을 들 수 있다. 본 발명의 인공 다능성 줄기세포를 배양하기 위한 배지에는, 각종 성장 인자, 사이토카인, 호르몬 등 (예를 들어, FGF-2 (bFGF), TGFb-1, 액티빈 A, 노긴 (Noggin), BDNF, NGF, NT-1, NT-2, NT-3 등의 인간 ES 세포의 증식·유지에 관여하는 성분) 을 첨가해도 된다. 또, 분리된 인공 다능성 줄기세포의 분화능 및 증식능은 ES 세포에 대해 알려져 있는 확인 수단을 이용함으로써 확인할 수 있다.

[0050] (다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포로의 분화 유도)

[0051] 본 발명에 있어서 「배성 내배엽 세포」(definitive Endoderm) 란, 식도, 위, 소장 및 대장을 포함하는 전체 장관, 그리고 폐, 간장, 흉선, 부갑상선, 갑상선, 담낭 및 췌장 등의 장관에서 유래되는 기관으로 분화할 수 있는 세포를 의미하고, 구체적으로는 마커 유전자가 되는 E 카데린 (E-cadherin ; ECD) 및 CXCR4 또는 E-카데린 및 CD55 가 양성인 내배엽 세포를 말한다 (Shiraki N, Harada S, Ogaki S, Kume K. and Kume S. Identification of DAF1/CD55, a novel definitive endoderm marker. Cell Struct. Funct. 35, 73-80, 2010 ; 일본 특허출원 제2009-225758호).

[0052] 본 발명에 있어서, 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 공정 (A) 는 특별히 한정되는 것

이 아니라, 각종 공지된 방법에 의해 실시할 수 있다. 예를 들어, 일본 공표특허공보 2007-516728호 등에 기재된 방법을 이용할 수 있지만, 이하에 바람직한 방법에 대해 설명한다.

[0053] 본 발명의 공정 (A) 에서는, 상기 다능성 줄기세포를, 적절한 지지 세포의 존재하 또한 액티빈 및/또는 염기성 선유아세포 성장 증식 인자 (bFGF) 의 존재하에서 배양함으로써, 원하는 배성 내배엽 세포를 분화 유도할 수 있다.

[0054] 본 발명에서 사용되는 상기 지지 세포로서는, 다능성 줄기세포를 배성 내배엽 세포로 분화 유도할 수 있는 세포이면, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 중배엽에서 유래되는 세포를 지지 세포로서 사용할 수 있다. 그러한 지지 세포의 구체예로는, M15 세포, MEF 세포, ST2 세포 등을 들 수 있다. 또, 지지 세포는 마이토마이신 C 처리 또는 방사선 조사에 의해 세포 증식을 상실하게 한 것을 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명에서 사용하는 M15 세포 (mouse, mesonephros) 는 등록 번호 ECACC 95102517 로서 세포 뱅크 (CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire)) 에 등록되어 있다. M15 세포는 문헌 (Larsson, S.H., Charlieu, J.P., Miyagawa, K., et al.(1995). Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. Cell 81, 391-401) 의 기재에 따라 입수 가능하다. M15 에 대한 뱅크 정보를 이하에 기재한다.

Version 4.200201

M15 (mouse, mesonephros)

ECACC 95102517

Morphology: Epithelial

Mouse mesonephric epithelium, polyoma virus large T transformed

Depositor: Prof V van Heyningen, MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh, UK (Originator)

No restrictions. Patent: None Specified By Depositor

Properties: Products: WT1 (expressed gene) Applications: Gene expression and protein studies connected to kidney development and Wilms' tumourigenesis.

Available in the following LABORATORY:

CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire)

DMEM + 2mM Glutamine + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Split confluent cultures 1:5 to 1:10 i.e. seeding at 5x1,000 to 1x10,000 cells/cm2 using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO2; 37C [cell growth impaired at lower densities]. Karyotype: Hyperdiploid

Hazard: CZ-II

The WT1-expressing mesonephric cell line M15 (alias Meso15) was established from mouse mesonephros transgenically expressing the large T protein of polyoma virus under the control of the early viral enhancer. As a tumour suppresser gene with a key role in urogenital development, WT1 is implicated as predisposition gene in the pathogenesis of Wilms' tumour (WT).

Further information

Research council deposit: Yes

[0056]

Price_code: C

Bibliographic references:

Cell 1995;81:391

By Beatrice...

TITLE:M15

DATE:2005/04/24 00:32

URL:http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl3312.html

European Collection of Cell Cultures,

Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK

June Poulton

European Collection of Cell Cultures

Health Protection Agency,

Porton Down

SP40JG Salisbury, Wiltshire UK

Phone: +44-1980-612512

Fax: +44-1980-611315

E-mail: ecacc@hpa.org.uk

URL: http://www.ecacc.org.uk/

[0057]

[0058] MEF 세포 (ICR 마우스로부터) 는 ATCC 에 카탈로그 번호 ATCC＃SCRC－1046 으로서 등록되어 있다. 또, MEF 세포는 문헌 (Nagy A, et al. Manipulating The Mouse Embryo：A Laboratory Manual. Third Edition Cold Spring Harbor Press；2003) 의 기재에 따라 입수 가능하다.

[0059] ST2 세포는 RCB0224 로서 독립행정법인 이화학 연구소 츠쿠바 연구소 바이오 리소스 센터에 등록되어 있다. 또, ST2 세포는 문헌 (Ogawa, M., Nishikawa, S., Ikuta, K., Yamamura, F., Naito, M., Tkahashi, K. and Nishikawa, S.EMBO J 1988；7：1337-1343) 의 기재에 따라 입수 가능하다.

[0060] 이들 피더 세포는 혈청 등을 보충한 동물세포용의 통상적인 배지 (예를 들어, RPMI 배지, DMEM 배지) 를 사용하여 통상적인 방법에 따라 배양할 수 있다.

[0061] 본 발명의 공정 (A) 에 있어서, 상기 지지 세포의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양하는 방법은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 상기 지지 세포를 피더 세포로서 사용하여 다능성 줄기세포를 공 (共) 배양할 수 있다. 구체적으로는, 상기 피더 세포 (지지 세포) 를 미리 1 층에 생착시킨 플레이트에, 액티빈 및/또는 bFGF 를 함유하는 적절한 배지를 사용하고, 다능성 줄기세포를 파종하여 공배양할 수 있다. 수 일간, 그 공배양을 실시함으로써, 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도할 수 있다.

[0062] 본 발명의 공정 (A) 에 있어서 사용되는 배지에 대해서는, DMEM 배지, RPMI 배지 등의 통상적인 동물세포용 배지를 사용할 수 있고, 배지 중에 액티빈 및/또는 bFGF 를 첨가하여 사용될 수 있다. 또, 공정 (A) 에서 사용되는 배지는 필요에 따라 소 태아 혈청 등의 혈청, 녹아웃 혈청 리플레이스먼트 (KSR), 글루코오스 등의 임의의 성분을 함유하고 있어도 된다. 또, 액티빈으로는, 액티빈 A 를 사용하는 것이 바람직하다. 배지 중의 액티빈의 농도에 대해서는, 배성 내배엽 세포가 분화 유도될 수 있는 한 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 5 ～ 300 ng/㎖, 바람직하게는 10 ～ 200 ng/㎖ 로 할 수 있다. 배지 중의 bFGF 의 농도에 대해서도, 배성 내배엽 세포가 분화 유도될 수 있는 한 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 5 ～ 300 ng/㎖, 바람직하게는 10 ～ 200 ng/㎖ 로 할 수 있다.

[0063] 본 발명의 공정 (A) 에 있어서, 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포가 분화 유도되었는지 여부는 상기 서술한 ECD 및 CXCR4 가 발현을 조사함으로써 확인할 수 있다. 또한, 필요에 따라 공정 (A) 에서 얻어진 배양물로부터, 배성 내배엽 세포를 분리하고, 분리된 배성 내배엽 세포를 본 발명의 공정 (B) 에 공시 (供試) 할 수도 있다. 구체적으로는, ECD 및 CXCR4 에 대한 형광 표지 항체를 사용한 플로우 사이토메트리에 의해 배성

내배엽 세포를 분리할 수 있다.

[0064] (배성 내배엽 세포로부터 장세포로의 분화 유도)

[0065] 본 발명의 공정 (B) 에서는 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime) (BIO) 및 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-Ala-2-페닐-L-Gly-tert-부틸-OH ((3,5-Difluorophenylacetyl)-Ala-Phg-Obu') (DAPT) 의 존재하에서, 공정 (A) 에서 얻어진 배성 내배엽 세포를 배양함으로써, 배성 내배엽 세포로부터 장세포를 분화 유도한다. 구체적으로는, BIO 및 DAPT 의 존재하에서, 배성 내배엽 세포를, 수 일간 (예를 들어, 1 ~ 30 일간, 1 ~ 20 일간, 1 ~ 16 일간) 배양하면, Cdx2, Ifabp, Isx, Villin 1 (빌린 1), 락타아제 (Lactase), Glut2 등의 장세포 마커 유전자의 발현이 확인되는 세포가 출현한다. 즉, 본 발명의 공정 (B) 에 의하면, 각종 장세포 마커 유전자의 발현이 확인되는 장세포의 분화 유도가 가능해진다. 배지 중의 BIO 및 DAPT 의 농도는 배성 내배엽 세포로부터 장세포가 분화 유도할 수 있는 범위이면 되고, 특별히 한정되는 것은 아니다. 배지 중의 BIO 의 농도는, 예를 들어, 1 ~ 500 μM 의 범위, 바람직하게는 1 ~ 100 μM, 보다 바람직하게는 1 ~ 50 μM, 더욱 바람직하게는 1 ~ 20 μM, 더욱더 바람직하게는 1 ~ 10 μM 의 범위로 할 수 있다. 한편, 배지 중의 DAPT 의 농도는, 예를 들어, 1 ~ 500 μM 의 범위, 바람직하게는 1 ~ 100 μM, 보다 바람직하게는 1 ~ 50 μM, 더욱 바람직하게는 1 ~ 20 μM 의 범위로 할 수 있다. 또, 공정 (B) 에 있어서, BIO 및 DAPT 에 추가하여, 배성 내배엽 세포로부터 장세포로의 분화 유도를 활성화하는 추가적인 물질을 배지 중에 첨가할 수도 있다. 이러한 물질의 예로는, FGF 시그널 전달을 활성화하는 물질, BMP 시그널 전달을 활성화하는 물질, 헤지호그 (Hh) 시그널 전달을 활성화하는 물질 등을 들 수 있다. FGF 시그널 전달을 활성화하는 물질의 구체예로는 FGF2, BMP 시그널 전달을 활성화하는 물질의 구체예로는 BMP4, 헤지호그 (Hh) 시그널 전달을 활성화하는 물질의 구체예로는 SAG (Smoothened Agonist ; N-Methyl-N'-(3-pyridinylbenzyl)-N'-(3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1,4-diaminocyclo hexane, $SAG_{1.3}$) 를 각각 들 수 있다. 이들 물질은 마우스 ES 세포를 출발 재료로 한 경우에 특히 장세포로의 분화 유도를 촉진할 수 있기 때문에, 마우스 ES 세포를 출발 재료로서 사용한 경우에 이들 물질을 사용하는 것이 바람직하고, 그 경우 그들의 물질을 단독 또는 조합해서 사용할 수 있다.

[0066] 또, 공정 (B) 에서는, 상기 배성 내배엽 세포를, 지지 세포로서 M15 세포 또는 MEF 세포의 존재하에서 배양하는 것이 바람직하다. 상기 BIO 및 DAPT 의 존재하에서, 또한 이들 지지 세포의 존재하에서 배성 내배엽 세포를 배양한 경우, 상기 장세포의 마커 유전자를 보다 강하게 발현시키는 각종 장세포 분화종이 얻어지기 때문이다.

[0067] 또, 본 발명에 의해 제조된 장세포에는, Tff3 (배세포 마커), 뮤신 2 (Muc2) (배세포 마커), DBA (Dolilchos biflorus agglutinin) (배세포 마커), 라이소자임 (파네트 세포 마커), Sox9 (파네트 세포 마커), 소마토스타틴 (Sst) (장내 분비 세포 마커), 크로모그라닌 A (장내 분비 세포 마커), 가스트린 (장내 분비 세포 마커), 시냅토파이신 (장내 분비 세포 마커), Sst (장내 분비 세포 마커), Sct (장내 분비 세포) 등의 각 장세포형의 마커의 발현이 확인되는 세포가 포함된다. 즉, 본 발명에 따르면, 장세포 계통의 모든 세포형을 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에서는, 공정 (B) 에 의해 장세포를 분화 유도시킨 후에, 상기 서술한 장세포의 마커 유전자 및/또는 장세포 계통의 각종 세포형의 마커 유전자의 발현을 mRNA 및/또는 단백질 레벨로 검출하는 공정을 설정해도 된다. 이와 같은 마커 유전자의 발현을 검출하는 방법으로는, RT-PCR법, 웨스턴 블롯팅법 등의 각종 공지된 수법을 채용할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에서는, 플로우 사이토메트리 (FACS 해석) 등의 각종 공지된 수법을 이용하여, 분화 유도시킨 장세포 내지 각종 장세포를 각각 분리하는 공정을 추가로 설정해도 된다.

[0068] 공정 (B) 에 관해 사용되는 배지의 종류, 배성 내배엽의 배양 조건, M15 세포 또는 MEF 세포의 배양 방법 등은 상기 공정 (A) 에 준한 것을 채용할 수 있다.

[0069] 상기와 같이 본 발명의 제조 방법에 따르면, 장세포 계통의 모든 세포형을 제조할 수 있기 때문에, 그들 각종 장세포는 각종 소화기계 악성 종양, 궤양성 대장염, 크론병 등의 질환에 대한 재생 의료에 사용할 수 있다. 또, 본 발명에 의해 제조된 각종 장세포는 의약품의 독성 시험 (안전성 시험) 이나 약효·약리 시험에 사용할 수도 있다.

[0070] 또한, 본 발명에 따르면, 다능성 줄기세포로부터 배성 내배엽 세포를 분화 유도하는 공정 (A) ; 및 상기 배성 내배엽을 BIO 및 DAPT 의 존재하에서 배양함으로써, 그 상기 배성 내배엽으로부터 장세포를 분화 유도하는 공정 (B) 에 의해 장세포를 제조할 때에, 피험 물질의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양하고, 피험 물질의 비존재하에서 다능성 줄기세포를 배양한 경우에 있어서의 장세포로의 분화 유도의 정도와, 피험 물질의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양한 경우에 있어서의 장세포로의 분화 유도의 정도를 비교하는 것을 포함하는 다능성 줄기

세포로부터 장세포로 분화 유도를 촉진 또는 저해시키는 물질을 스크리닝하는 방법이 제공된다. 피험 물질로서는, 성장 인자 또는 저분자 화합물 등을 사용할 수 있다. 이 때, 장세포에서 발현되는 마커의 전사 산물이나 단백량을 지표로 하여 장세포로의 분화 유도의 정도를 측정할 수 있다.

[0071] 이하의 실시예에 의해 본 발명을 더 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 의해 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0072] 실시예

[0073] [실시예 1]

[0074] (A) 재료 및 방법

[0075] (1) 세포주

[0076] 본 실시예에서는, 마우스의 ES 세포로서 R1 세포주를 사용하였다. R1 세포주를, 백혈병 억제 인자 (LIF), 10 % 소 태아 혈청 (FBS), 100 μM 비필수 아미노산 (NEAA), 2 mM L-Gln, 50 단위/㎖ 페니실린 및 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 (PS), 그리고 100 μM β-메르캅토 에탄올이 첨가된 2000 mg/ℓ 글루코오스 DMEM 중의 마우스 태자 유래 선유아세포 (MEF) 의 피더 상에서 유지하였다.

[0077] MEF 는 태생기 (E) 12.5 ~ 14.5 의 마우스 태아로부터 단리되었다.

[0078] 신장 세포주 M15 는 T.Noce 박사 (케이오 대학) 및 M.Rassoulzadegan 박사 (University of Nice-Sophia Antipolis, Antipolis, France)로부터 분여된 것이다. R1 ES 세포는 Andras Nagy 박사로부터 분여된 것이다. MEF 세포 및 M15 세포를 마이토마이신 C (Sigma) 로 처치하고, 그리고 과거에 보고된 바와 같이 사용하였다 (Shiraki, N., Higuchi, Y., Harada, S., Umeda, K., Isagawa, T., Aburatani, H., Kume, K. and Kume, S.(2009). Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. Biochem Biophys Res Commun 381, 694-9 ; Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K. and Kume, S.(2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. Genes Cells 13, 731-46 ; Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa, A., Higuchi, Y., Goto, H., Kume, K. and Kume, S.(2008). Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. Stem Cells 26, 874-85.).

[0079] (2) 마우스 ES 세포의 장 분화

[0080] ES 세포를, 10 % 소 태아 혈청 및 4500 mg/㎖ 글루코오스를 함유하는 DMEM 배지 중에서 20 ng/㎖ 액티빈 및 50 ng/㎖ bFGF 를 첨가한 M15 세포 상에서 5 일간에 걸쳐 배양하고, 배성 내배엽 (definitive endoderm) 에 대해 플로우 사이토메트리를 사용하여 분석하였다. 장 분화를 위해서, ES 세포를, M15 세포 또는 MEF 세포 상에서 BIO 및 DAPT 의 존재에서 또는 BIO 및 DAPT 를 수반하지 않고, 그러나, bFGF 를 수반하여 10 % KSR 을 수반하는 배지 중에서 글루코오스 농도 2000 mg/㎖ 로 추가로 배양하였다.

[0081] (3) 인간 ES 세포의 유지

[0082] 인간 ES 세포 (KhES-3) (PMID : 16707099) 는 나카츠지 박사와 스에모리 박사 (쿄토 대학) 로부터 분여된 것으로, 일본 정부의 hES 세포 가이드 라인에 따라 사용하였다. 미분화 hES 세포를, MEF 의 피더층 상에서, 20 % KSR, L-Gln, NEAA 및 β-ME 가 첨가된 Knockout DMEM/F12 (Invitrogen) 중에서, 3 % CO_2 하에서 유지하였다. hES 세포를 계대하기 위해서, hES 세포 콜로니를, 20 % KSR 및 1 mM $CaCl_2$ 를 함유하는 PBS 중의 0.25 % 트립신 및 0.1 mg/㎖ 콜라게나아제 IV 를 사용하여, 그들을 37 ℃ 에서 5 분간 처리하고, 계속해서 배양액을 첨가하여 순조롭게 수 회 피펫 조작함으로써 ES 세포덩어리를 소편 (小片 ; 5 ~ 20 개의 세포) 으로 탈응집시킴으로써 피더층으로부터 박리시켰다.

[0083] (4) 인간 ES 세포의 장 분화

[0084] 분화 유도에서는, 인간 ES 세포를, Y27632 (Wako) 를 사용하여 24 시간에 걸쳐 전처리하고, 미리 M15 세포로 코팅된 24 웰 플레이트에 있어서, 1 웰 당 50,000 개의 세포를 플레이팅하였다. ES 세포를 0.25 % 트립신-EDTA (Invitrogen) 를 사용하여 분리하고, ES 유지 배지를 함유하는 Y27632 중에서 1 일간 배양하였다. 플레이팅으로부터 1 일 후, 세포를 PBS 에 의해 세정하고 배지를 분화 배지로 바꿨다. 세포를, 제 1 분화 배지 [2 % B27 (Invitrogen), NEAA, L-Gln, PS 및 β-ME 가 첨가된 RPMI1640 (Invitrogen)] 중에서 0 ~ 10 일째에 배

양하고, 제 2 분화 배지 (10 % KSR, NEAA, L-Gln, PS 및 β-ME 가 첨가된 DMEM) 에 10 일째에 전환하여 35 일째까지 배양하였다. 액티빈 A (100 ng/mℓ) 를 분화의 0 ~ 10 일째에 더하여 BIO 및 DAPT 를 10 ~ 35 일째에 추가하였다. 배지를, 2 일마다 증식 인자가 첨가된 신선 배지와 교환하였다.

[0085] (5) 증식 인자 및 저해제

[0086] 특별한 기재가 없는 경우, 이하의 농도를 사용하였다. BIO (Calbiochem) 5 mM; DAPT (Peptide Inst.) 10 μM; 재조합 인간 액티빈 A (R&D Systems), 20 ng/mℓ. 인간 bFGF (Peprotech), U0126 (Sigma), LY294002 (Calbiochem), SU5402 (Calbiochem), 10 ㎍/mℓ ; FGF2 (인간 bFGF) (Peprotech), 256 ng/mℓ ; FGF4 (Peprotech), FGF5 (Sigma), FGF7 (R&D Systems), FGF8 (Cosmo Bio), FGF9 (Peprotech), FGF10 (R&D Systems) 및 FGF18 (Sigma), 50 ng/mℓ.

[0087] (6) 플로우 사이토메트리 분석 및 선별된 세포의 재배양

[0088] 세포를 Cell Dissociation Buffer (Invitrogen) 를 사용하여 분리하고, 1×10^6 개 세포/50㎕ 로 조정하여 적절한 항체로 염색하였다. 항체로서 비오틴 또는 Alexa 488 포합 항E 카데린 모노클로날 항체 ECCD2, 피코에리트린 (PE) 포합 항Cxcr4 mAb 2B11 (BD Pharmingen) 을 사용하였다. 염색된 세포를, FACS Aria (BD Pharmingen) 를 사용하여 정제하였다. 데이터를 BD FACSDiva 소프트웨어 프로그램 (BD Pharmingen) 을 사용하여 기록하고, Flowjo 프로그램 (Tree Star) 을 사용하여 분석하였다.

[0089] (7) 역전사 폴리머라아제 연쇄 반응 (RT-PCR) 분석

[0090] RNA 를, TRI Reagent (Sigma) 또는 RNeasy 마이크로 키트 (Qiagen) 를 사용하여 ES 세포로부터 추출하고, 다음으로 DNase (Sigma) 를 사용하여 처리하였다. 3 ㎍ 의 RNA 를, MMLV 역전사 효소 (Toyobo) 및 올리고 dT 프라이머 (Toyobo) 를 사용하여 역전사하였다. 프라이머 배열 및 사이클수를 표 1 에 나타낸다. 각 사이클의 PCR 조건은 처음에는 96 ℃ 에서 1 분간의 변성, 2 사이클째부터는, 96 ℃ 에서 30 초간의 변성, 60 ℃ 에서 2 초간의 어닐링, 그리고 72 ℃ 에서 20 초간의 신장으로 하였다. 최종 사이클에서는 72 ℃ 에서 7 분간의 신장으로 하였다. RT-PCR 산물을 5 % 비변성 폴리아크릴 아미드 겔 전기 영동에 의해 분리하고, SYBR Green I (Molecular Probes) 을 사용하여 염색하고, Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) 을 사용하여 가시화하였다.

표 1

마우스 프라이머	배열	사이클수
Pax8-U	TGCCTTTCCCCATGCTGCCTCCGTGTA(배열번호1)	27
Pax8-D	GGTGGGTGGTGCGCTTGGCCTTGATGTAG(배열번호2)	
Cdx2-U	TGGTGTACACAGACCATCAGC(배열번호3)	25
Cdx2-D	CCTTGGCTCTGCGGTTCT(배열번호4)	
Ifabp-U	GGAAAGGAGCTGATTGCTGTCC(배열번호5)	25
Ifabp-D	CTTTGACAAGGCTGGAGACCAG(배열번호6)	
Isx-U	AGTTTGCCCAGACCACAAAG(배열번호7)	25
Isx-D	CAGGGTAATGGGTGAAGTGG(배열번호8)	
Hoxc8-U	GTCTCCCAGCCTCATGTTTC(배열번호9)	27
Hoxc8-D	TGGAACCAAATCTTCACTTGTC(배열번호10)	
Villin-U	GTTATGAGCCCGAAAGTGGA(배열번호11)	25
Villin-D	AGAGAAGGCAGCTGGAGTCA(배열번호12)	
Lactase (Lct)-U	CCCATCTTCAAAAACGGAGA(배열번호13)	27
Lactase (Lct)-D	CCCTATCGGCATCAAAAGAC(배열번호14)	
β-actin-U	GTGATGGTGGGAATGGGTCA(배열번호15)	18
β-actin-D	TTTGATGTCACGCACGATTTCC(배열번호16)	
Tff-3-U	CATCCTGTGCAGTGGTCCT(배열번호17)	25
Tff-3-D	GCACCATACATTGGCTTGG(배열번호18)	
Lysozyme (Lyz1)-U	GAGACCGAAGCACCGACTATG(배열번호19)	25
Lysozyme (Lyz1)-D	CGGTTTTGACATTGTGTTCGC(배열번호20)	
Sst-U	CCGTCAGTTTCTGCAGAAGT(배열번호21)	23
Sst-D	CAGGGTCAAGTTGAGCATCG(배열번호22)	
Secretin (Sct)-U	GTTGCAGCATTTGTCACACC(배열번호23)	25
Secretin (Sct)-D	TGAACGATCAACAGCAGACC(배열번호24)	
Synaptophysin (Syp)-U	GGTTCCGGAGTGGGCAGGTTTG(배열번호25)	25
Synaptophysin (Syp)-D	GGGGCGTGGGGTGGAATCAG(배열번호26)	
Gast-U	ACCAATGAGGACCTGGAACA(배열번호27)	25
Gast-D	TCCTACTGGTCTTCCTCAGCA(배열번호28)	
Cck-U	ATGAAGAGCGGCGTATGTCT(배열번호29)	25
Cck-D	CGATGGGTATTCGTAGTCCTC(배열번호30)	
인간 프라이머	**배열**	**사이클수**
hCDX2-U	GGAACCTGTGCGAGTGGATG(배열번호31)	25
hCDX2-D	AGGTGGTGGGGCTTGCGGGGGCG(배열번호32)	
hVILLIN-U	ACTTCTATGGGGGCGACTG(배열번호33)	25
hVILLIN-D	ATGCGTCCCTTGAAGATGG(배열번호34)	
hIFABP-U	GATAAACTAAAAGCATAGGCTGCATATG(배열번호35)	25
hIFABP-D	TCAAAATCAGAATGGCAATTATCTCT(배열번호36)	
hISX-U	CAGGAGGCTCTGAGAGGACA(배열번호37)	25
hISX-D	ATCTGTGCAGAAGGGATGCT(배열번호38)	
hLCT-U	GCTGCACCGTTAGAGATGAC(배열번호39)	25
hLCT-D	CGGTTTTTGCTCCCTTAACA(배열번호40)	
hTFF3-U	CCCAAGGAGTGCAACAACC(배열번호41)	25
hTFF3-D	GGGACAGAAAAGCTGAGATGA(배열번호42)	
hLYZ-U	GATGGCTACAGGGGAATCAG(배열번호43)	25
hLYZ-D	TAACTGCTCCTGGGGTTTTG(배열번호44)	
hGAST-U	TGGCTGGAGGAAGAAGAAGA(배열번호45)	25
hGAST-D	TCAGTTTTTCAGGGGACAGG(배열번호46)	
hSYP-U	CTCCACTCCTCCCAACTCTG(배열번호47)	25
hSYP-D	ACTCCACACCTCCTCTCCAA(배열번호48)	
hSST-U	GATGCTGTCCTGCCGCCTCC(배열번호49)	25
hSST-D	TGCCATAGCCGGGTTTGA(배열번호50)	
hFOXA2-U	GCAGATACCTCCTACTACCA(배열번호51)	25
hFOXA2-D	GAAGCAGGAGTCTACACAGT(배열번호52)	
hGAPDH-U	CGAGATCCCTCCAAAATCAA(배열번호53)	20
hGAPDH-D	CATGAGTCCTTCCACGATACCAA(배열번호54)	

96℃ 1min

96℃ 30sec
60℃ 2sec
72℃ 20sec

72℃ 7min
4℃-

[0091]

[0092] (8) 항체

[0093] 사용한 항체는 이하와 같다.

[0094] · 마우스 항Cdx2 (BioGenex, San Ramon, CA)

[0095] · 래트 항마우스 E 카데린 (TaKaRa BIO INC., Japan)

[0096] · 염소 항HNF4a (Santa cruz Biotechnology Inc)

[0097] · 마우스 항빌린 (BD Transduction Laboratories)

[0098] · 토끼 항라이소자임 (Diagnostic Biosystems)

[0099] · 토끼 항크로모그라닌 A (Epitomics, Inc.)

[0100] ·비오틴 포합 드리코스마메 응집소 (DBA) 렉틴 (SIGMA)

[0101] ·염소 항소마토스타틴 (Santa cruz Biotechnology Inc.)

[0102] ·마우스 항Muc2 (visionbiosystems novocastra)

[0103] ·토끼 항Sox9 (Millipore)

[0104] ·토끼 항클라우딘 7 (Abcam)

[0105] ·토끼 항Glut-2 (Chemicon)

[0106] (9) 알칼리 포스파타아제 활성의 측정

[0107] 배양 세포를 4 % 파라포름알데히드 중에서 10 분간 고정시켰다. 0.1 % Tween-20 (TBST) 을 함유하는 인산 완충 식염수로 20 분간 세정 후, 발색 반응을, NTMT (100 mM Tris-HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 0.1 % Tween-20, 2 mM레바미솔) 중의 35 ㎍/㎖ 니트로 블루 테트라졸륨 (NBT), 17.5 ㎍/㎖ 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴인산을 사용하여 실시하였다.

[0108] (10) PAS 염색 및 Alucian 블루 염색

[0109] 배양 세포를 4 % 파라포름알데히드 중에서 10 분간 고정시켰다. PAS 염색 용액 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) 또는 Alucian 블루 8GX (SIGMA) 를 제조업자의 설명서에 따라 사용하였다.

[0110] (B) 결과

[0111] (1) 고전적 Wnt 시그널 전달 (canonical Wnt signaling) 의 활성화 및 Notch 시그널 전달의 저해에 의해 M15 세포 상에서의 ES 세포의 장 분화가 증강된다.

[0112] 본 발명자들은, 이전에 M15 세포 상에서 ES 세포를 배양했을 때, ES 가 배성 내배엽 운명 (definitive endoderm fate) 으로, 다음으로 배성 내배엽 계통의 여러 가지 세포형 (Caudal 형 호메오박스 2 (Cdx2) 발현 장세포를 포함한다) 으로 분화되는 것을 나타냈다. Cdx2 는, 장 특이적 전사 인자의 일종으로, 장세포의 마커 유전자로서 유용하다 (Silberg, D.G., Swain, G.P., Suh, E.R. and Traber, P.G.(2000). Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. Gastroenterology 119, 961-71.).

[0113] 배성 내배엽이 장세포 계열로 분화하기 위한 최적 조건을 조사하기 위해서, 배성 내배엽 세포가 유도된 후에 ES 세포 배양에 화학 물질을 첨가함으로써, 몇 가지 배양 조건을 시험하였다 (도 1A). 정량 PCR 에 의해 에세이하여 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심 (BIO) (GSK3β 의 저해제 또는 고전적 Wnt 시그널 전달의 활성화인자) 또는 (3,5-디플루오로페닐아세틸)-Ala-Phg-OBu' (DAPT) (Notch 시그널 전달의 저해제로서 기능하는 감마 세크레타아제 저해제) 가 장 지방산 결합 단백질 (Ifabp) 발현을 분화의 20 일째 (d20) 에 유도하는 것이 발견되었다 (도 1B). 장 지방산 결합 단백질 (Ifabp) 은 장세포의 마커 유전자로서 유용하다 (Green, R.P., Cohn, S.M., Sacchettini, J.C., Jackson, K.E. and Gordon, J.I.(1992). The mouse intestinal fatty acid binding protein gene：nucleotide sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product. DNA Cell Biol 11, 31-41.). 또한, BIO 및 DAPT 의 동시 첨가에 의해 Cdx2 및 Ifabp 의 발현이 극적으로 증가하는 것이 발견되었다 (도 1B, 1C). M15 세포 상에서 배양된 ES 세포에 있어서의 BIO 및 DAPT 의 존재에서의 여러 가지의 장 마커의 시간적 발현을 검증하였다 (도 1D). 빌린 1 (Villin) (Maunoury, R., Robine, S., Pringault, E., Leonard, N., Gaillard, J.A. and Louvard, D.(1992). Developmental regulation of villin gene expression in the epithelial cell lineages of mouse digestive and urogenital tracts. Development 115, 717-28.) 의 발현이 5 일째에 유도되고, Cdx2 발현이 분화의 10 일째에 실질적인 레벨로 유도되었다. 또한, 15 일째에 Ifabp 의 유도가, 20 일째에 락타아제 (Lct) (Bosse, T., Fialkovich, J.J., Piaseckyj, C.M., Beuling, E., Broekman, H., Grand, R.J., Montgomery, R.K. and Krasinski, S.D.(2007). Gata4 and Hnf1alpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292, G1302-14.) 및 장 특이적 호메오박스 (Isx) (Choi, M.Y., Romer, A.I., Hu, M., Lepourcelet, M., Mechoor, A., Yesilaltay, A., Krieger, M., Gray, P.A. and Shivdasani, R.A.(2006). A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. Development 133, 4119-29.) 의 발현이 확인되었다. RT-PCR 분석과 상관하여, Cdx2 발현의 면역 조직 화학 분석에 의해 BIO 및 DAPT 의 존재에서 높은 비율의 ES 세포가 Cdx2 발현 세포로 변화하는 것이 확인되었다.

[0114] (2) BIO 및 DAPT 의 첨가에 의해 배성 내배엽이 후방화된다.

[0115] 유도된 장세포가 배성 내배엽에서 유래되는지 여부를 검증하기 위해서, 플로우 사이토메트리에 의해 분화의 4 일째에 배성 내배엽을 회수하고 (도 2A), 이들 세포를 15 일째까지 재배양하였다. 배성 내배엽 세포는 또한 BIO 및 DAPT 의 첨가시에 Cdx2 또는 빌린 발현 장세포로 분화되었다 (도 2B). 이 결과에 따라 Cdx2 및 빌린 발현 장세포가 배성 내배엽에서 유래되는 것임이 명확해졌다.

[0116] 다음으로, 영역 특이적인 전방·후방 마커를 나타내는 마커 패널의 발현에 대한 단계적 농도의 BIO 및 DAPT 의 효과를 시험하였다. BIO 및 DAPT 를 첨가하지 않은 경우 또는 저농도로 첨가한 경우에는, 갑상선 영역의 전방 마커인, 페어드 박스 유전자 8 (Pax8) (Mansouri, A., Chowdhury, K. and Gruss, P.(1998). Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. Nat Genet 19, 87-90.) 의 발현이 확인되었다. Cdx2 및 Ifabp 는 중간 정도의 농도의 BIO 및 DAPT 에서 유도되었다. Isx 및 호메오박스 C8 (Hoxc8) (Kawazoe, Y., Sekimoto, T., Araki, M., Takagi, K., Araki, K. and Yamamura, K.(2002). Region-specific gastrointestinal Hox code during murine embryonal gut development. Dev Growth Differ 44, 77-84.) 은 고농도의 BIO 및 DAPT 에서 유도되었다 (도 2C). 이들 결과에 따라 장 영역화는 BIO 및 DAPT 의 단계적인 농도에 의해 특정되는 것이 시사되었다.

[0117] 다음으로, 추가로 BIO (5 μM) 또는 DAPT (10 μM) 를 사용하여 ES 세포를 처리하여, Pax8 및 Hoxc8 의 발현에 대한 다른 편측의 인자 (BIO 또는 DAPT) 의 단계 농도에서의 효과를 시험하였다. BIO (5μM) 의 존재하에서, 고 DAPT 농도에 의해 전방 마커 Pax8 이 오프가 되고, 후방 마커 Hoxc8 이 유도되었다 (도 2D). 한편, ES 세포를 DAPT (10 μM) 및 단계 농도의 BIO 로 처리한 경우, 고 BIO 농도에 의해 Pax8 이 오프가 되고, Hoxc8 이 온이 되었다. 이들 결과는, Notch 시그널 전달이 저해된 경우, BIO 에 의한 고전적 시그널 전달의 활성화에 의해 배성 내배엽의 전방 분화가 저해되고, 또한 후방 분화가 항진되었음을 실증하고 있다 (도 2E).

[0118] (3) MEF 세포는, BIO 및 DAPT 의 존재하에서의 ES 세포의 장 계통으로의 분화를 유도할 때에, M15 세포보다 강력하다.

[0119] 다음으로, M15 세포에 대해 MEF 세포 또는 PA6 세포 상에서의 배성 내배엽의 배양을 비교함으로써, 각각의 지지 세포에 대해 장 분화의 효과를 시험하였다. ES 세포를 M15 세포 상에서 또한 액티빈 및 bFGF 의 존재하에서 4 일간에 걸쳐 배양함으로써 배성 내배엽 세포를 얻고, 이어서 플로우 사이토메트리에 의해 선별하였다. 선별된 배성 내배엽 세포를, BIO 및 DAPT 의 존재하에서, M15 세포, MEF 세포, 또는 PA6 세포 상에서 15 일째까지 재배양하였다 (도 3A). Cdx2 를 발현시키는 분화 세포가 MEF 세포를 사용한 경우에도 관찰되었지만, PA6 세포에서는 확인되지 않았다 (도 3B). RT-PCR 분석에 의해 M15 세포의 경우와 비교한 결과, MEF 세포 상에서 증식시킨 경우에는, 유도되는 장 마커의 더 강한 발현이 확인되었다 (도 3C). Cdx2 의 발현이 분화의 12 일째부터 높은 레벨로 검출되었다 (도 3D). 다른 마커로서 트레포일 팩터 3 (Tff3, 배세포 마커); 라이소자임 (Lyz1, 파네트 세포 마커); 소마토스타틴 (Sst, 장내 분비 마커); 및 Lct 등도 12 일째 또는 15 일째부터 검출되었다 (도 3E) (Hocker, M. and Wiedenmann, B.(1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. Ann N Y Acad Sci 859, 160-74.; Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M. and Leiter, A.B.(2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. Endocrinology 145, 2639-44.).

[0120] (4) ES 세포 유래의 장세포의 특성

[0121] 다음으로, ES 세포로부터 분화된 장세포형에 대해 조사하였다. Cdx2 발현 장세포는 E 카데린 (상피 마커)의 발현에 의해 나타내어지는 상피 세포이다 (Lugo-Martinez, V.H., Petit, C.S., Fouquet, S., Le Beyec, J., Chambaz, J., Pincon-Raymond, M., Cardot, P. and Thenet, S.(2009). Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296, G235-44.). Cdx2 발현 세포는, 또, 줄기세포 핵인자 4 알파(HNF4a) (내배엽 마커) (Cattin, A.L., Le Beyec, J., Barreau, F., Saint-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F.J., Robine, S., Pincon-Raymond, M., Cardot, P., Lacasa, M. et al.(2009). Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. Mol Cell Biol 29, 6294-308.) 및 Glut2 (흡수 장세포 마커) (Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellett, G.L., Thorens, B., Leturque, A. and Brot-Laroche, E.(2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. J Physiol 552, 823-32.), 또는 클라우딘 7 (타이트 정크션 마커) (Fujita, H.,

Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., Kojima, T., Yamashita, T. and Sawada, N.(2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. J Histochem Cytochem 54, 933-44.) 을 공발현시킨다 (도 4A ~ 4C). 또한, 다른 마커에 대해서도 검증하였다. 파네트 세포 (라이소자임 발현) 및, 크로모그라닌 A 및 소마토스타틴 등의 내분비 마커를 발현시키는 세포가 유도되었다 (도 4D). 이들 세포는, 또한, 뮤신 2 (van Klinken, B.J., Einerhand, A.W., Duits, L.A., Makkink, M.K., Tytgat, K.M., Renes, I.B., Verburg, M., Buller, H.A. and Dekker, J.(1999). Gastrointestinal expression and partial cDNA cloning of murine Muc2. Am J Physiol 276, G115-24.) 및 렉틴 DBA (돌리코스 비플로루스 응집소) (배세포 마커) (Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M. and Doi, K.(1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. Exp Anim 45, 155-60.), 그리고 전사 조절인자 Sox9 (파네트 세포 마커) (Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J.H., Hamilton, S.R., Adams, H.P., Zhang, J., Clevers, H. and de Crombrugghe, B.(2007). SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. Gastroenterology 133,539-46.) 를 발현시키고, 분화된 ES 세포 중에서도 검출되었다 (도 5E, 5F). 장세포가 알칼리 포스파타아제 활성에 의해 특징지어졌다 (도 5G). 배세포는 PAS 양성 (도 5H) 및 Alucian 블루 염색 (도 5I) 에 의해 특징지어졌다. 이들 특징은 모두 본 실시예의 배양 중에서 생성된 ES 세포 유래의 장세포에서 확인된다. 이들 결과는 ES 세포가 장세포 계통의 모든 세포형 (장세포의 흡수 세포 및 파네트 세포의 분비 세포, 배세포, 그리고 내분비 세포를 포함한다) 에 분화 유도되는 것을 나타내고 있다.

[0122] (5) 인간 ES 세포의 장세포로의 분화는 고전적 Wnt 시그널 전달의 활성화 및 Notch 시그널 전달의 저해에 의해 증강된다.

[0123] 다음으로, 인간 ES 세포가 마우스 ES 세포와 마찬가지로 BIO 및 DAPT 의 첨가에 의해 장세포로 방향잡을 수 있는지 여부를 조사하였다. 이 시험예에서는, khES-3 (인간 ES 세포주) (Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N.(2006). Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. Biochem Biophys Res Commun 345, 926-32.) 을 사용하였다. 액티빈 (100 μM) 을 사용하여 KhES-3 을 10 일간에 걸쳐 배양한 후, khES-3 이 배성 내배엽으로 분화되었다. 다음으로, KhES-3 의 배양물에 BIO 및 DAPT 를 첨가하여 35 일째까지 배양을 계속하였다. 이어서, 면역 조직 화학적 해석 또는 RT-PCR 에 의해 어세이하였다. Cdx2 를 발현시키는 khES-3 이 면역 조직 화학적 해석 (도 6A) 에 의해 25 일째에 및 RT-PCR (도 6B) 에 의해 15 일째라는 조기에 검출되었다. RT-PCR 에 의해 장세포 (hVillin, hIfabp, hIsx), 배세포 (hTff3) (Suemori, S., Lynch-Devaney, K. and Podolsky, D.K.(1991). Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor：tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 11017-21.), 파네트 세포 (hLyz) (Ouellette, A.J.(1997). Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. Gastroenterology 113, 1779-84.), 내분비 세포 (가스트린, hGast；시냅토파이신, hSyp；소마토스타틴, hSst) (Hocker, M. and Wiedenmann, B.(1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. Ann N Y Acad Sci 859, 160-74.；Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M. and Leiter, A.B.(2004). Minireview：Development and differentiation of gut endocrine cells. Endocrinology 145, 2639-44.) 의 분자 마커도 검출되고, 이들 분자 마커의 발현이 유도되는 것도 명확해졌다 (도 6B). 분화된 khES-3 세포는 PAS 염색 양성이며, 기능적인 배세포가 유도되는 것이 명확해졌다.

[0124] (6) 장 계열로의 ES 세포 분화가 FGF 시그널 전달에 의해 증강되고, MAPK 가 아니라 PI3K 를 통해 매개된다.

[0125] M15 세포 및 MEF 세포의 양방이 실질적인 레벨에서 FGF2 (bFGF) 를 발현시키는 것은 이미 공지되었다. 따라서, 다음으로 장 분화에 대한 FGF2 (bFGF) 의 효과를 시험하였다. 플로우 사이토메트리에 의해 회수된 배성 내배엽 세포를, BIO 및 DAPT 대신에 FGF2 (bFGF) 의 존재하에서 재배양하였다. RT-PCR 에 의한 분석에 의해 BIO 및 DAPT 의 존재하에서 배양한 경우에는, 장세포 (Ifabp, Isx), 배세포 (Tff3), 파네트 세포 (Lyz1) 및 장내 분비 세포 (Sct(Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellett, G.L., Thorens, B., Leturque, A. and Brot-Laroche, E.(2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption：a study in GLUT2-null mice. J Physiol 552, 823-32.), Syp, Sst, Gast) 의 분자 마커가 발현되는 것이 증명되었다. 그러나, BIO 및 DAPT 없이, FGF2 (bFGF) 만의 존재하에서 배양한 경우에는, 이들 마커는 훨씬 낮은 레벨에서 유도되었다. 따라서, 콜레시스토키

닌 (Cck) 을 제외한 장세포의 대부분의 분화 마커를 유도하기 위해서, BIO 및 DAPT 의 동시 첨가는 FGF2 (bFGF) 보다 효과가 있다 (도 7A).

[0126] 다음으로, 분화의 4 일째부터 각종 FGF 를 ES 세포 배양에 첨가함으로써, 각종 FGF 의 효과를 시험하였다. FGF2 (bFGF) 의 첨가에 의해 Cdx2 를 발현시키는 장세포가 유도되었다. FGF4 는 Cdx2 를 발현시키는 세포를 유도하기 위해서 FGF2 (bFGF) 보다 효과적이었다. FGF7, 9, 10 및 18 도 ES 세포의 장 분화를 유도했지만, 그 정도는 더 낮은 것이었다 (도 7B). 그러나, 이들 FGF 의 첨가는 장 분화에 있어서 BIO 및 DAPT 의 첨가만큼 효과적이지는 않다. 이 결과는 도 7A 와 모순되지 않는다.

[0127] 다음으로, BIO, DAPT 및 FGF 시그널 전달 사이에서의 관계를 정밀 조사 하였다. FGF 수용체의 안타고니스트 SU5402 및 PI3K 의 저해제 LY294002 를 사용하였다. SU5402 에 의한 FGF 시그널 전달의 차단, 또는 LY294002 에 의한 PI3K 의 차단에 의해 BIO 및 DAPT 매개성의 장 분화가 부분적으로 저해되었다 (도 7C 및 7D).

이들 결과에 따라 FGF 시그널 전달이 특히 PI3K 를 통해서 Wnt 및 Notch 시그널 전달과 협동적으로 기능하여, 장 분화를 매개하는 것이 증명되었다.

[0128] (C) 고찰

[0129] 장 상피에서는, 장 줄기세포 (ISC) 및 음와(陰窩) 중에 존재하는 전구세포가 활발히 증식되어 분화 세포를 제공한다. 장세포, 융털 돌기 중에 존재하는 배세포 및 장내 분비 세포, 그리고 음와 기저부에 위치하는 파네트 세포 등, 4 종류의 비증식성의 최종 분화된 상피 세포가 존재한다 (Barker, N., van de Wetering, M. and Clevers, H.(2008). The intestinal stem cell. Genes Dev 22, 1856-64.).

[0130] 본 실시예에 있어서, ES 세포에서 유래되는 배성 내배엽 세포를 M15 세포 또는 MEF 세포 상에서 배양함으로써, BIO 의 첨가에 의한 고전적 Wnt 시그널 전달 경로의 활성화 및 DAPT 의 첨가에 의한 Notch 경로의 저해에 의해, 동시에 장관 내배엽에서의 후방 마커의 발현이 유도되고 장 분화가 항진되는 것이 확인되었다. M15 세포 및 MEF 세포로부터 방출된 Fgf 는 장 특징의 확립을 조장한다 (도 7). 따라서, 본 실시예의 결과는 FGF, Wnt 및 Notch 시그널 전달이 협동적으로 기능하고, 장 계열로의 ES 세포의 분화를 촉진시키는 것도 나타내고 있다.

[0131] FGF 가 용량 의존적인 양식에서 인간 ES 세포 유래의 배성 내배엽의 상이한 전장 계통으로의 특정화에 관여하고 있음이 알려져 있다 (Ameri, J., Stahlberg, A., Pedersen, J., Johansson, J.K., Johannesson, M.M., Artner, I. and Semb, H.(2010). FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. Stem Cells 28, 45-56.). 높은 FGF2 (bFGF) 레벨에서 중장 내배엽의 소장 전구세포로의 특정화가 Pdx1+췌장 전구세포 대신에 증가하는 것이 알려져 있다 (상기 Ameri 등의 문헌).

[0132] 또, 고전적 Wnt 경로에 의해 음와 중에서의 미숙 세포의 증식 및 파네트 세포의 성숙이 활성화되는 것이 보고되어 있다 (van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T. et al.(2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. Nat Cell Biol 7, 381-6.). 또, Notch 시그널 전달의 활성화는 장 전구세포 풀을 증폭시켜 배세포 및 장내 분비 세포의 분화를 저해시킬 수 있음이 알려져 있다 (Zecchini, V., Domaschenz, R., Winton, D. and Jones, P.(2005). Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. Genes Dev 19, 1686-91.). 또, 공통되는 Notch 경로의 전사 조절인자 CSL/RBP-J 의 조건부 제거 후, 증식성 음와 세포가 유사 분열 후의 배세포로 신속하게 대규모로 변환되는 것이 관찰되었다 (van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F. et al.(2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature 435, 959-63.). 또한, 유사한 표현형이 감마 세크레타아제 저해제를 사용하여 Notch 캐스케이드를 차단함으로써 얻어지는 것이 알려져 있다 (상기 van Es 등 문헌).

[0133] 이와 같이 음와 및 선종에 있어서의 미분화 증식성 세포의 유지에는, Notch 캐스케이드 및 Wnt 캐스케이드의 협주적 활성화가 필요해진다.

[0134] [실시예 2]

[0135] 실시예 2 는 본 발명의 방법에 있어서 BIO 및 DAPT 에 추가하여 각종 시그널 전달계의 저해제 또는 활성화제를 더 첨가한 예를 나타낸다.

[0136] (1) 시험예 1 : 각종 저해제의 첨가

[0137] 마우스 ES 세포를 출발 재료로서 사용한 경우에, BIO 및 DAPT 에 추가하여 더 어떠한 메커니즘에 의해 장 분화가 유도되고 있는지를 명확히 하기 위해서, 각종 시그널 전달계의 저해제를 첨가하여, 장 마커인 Cdx2 유전자의 발현이 떨어지는 조건에 대해 검토를 실시하였다.

[0138] 저해제로서는, BMP 시그널 저해제인 노긴 (Noggin) 500 ng/㎖ (R&D systems) 또는 도르소모르핀 (dorsomorphin) 200 nM (SIGMA-ALDRICH)；레티노산 시그널의 저해제인 LE540 1 μM (Wako)；헤지호그 시그널의 저해제인 KAAD-시클로파민(KAAD-Cyclopamine) 250 nM (Calbiochem)；또는 Cxcr4 의 저해제인 AMD3100 10 μM (SIGMA-ALDRICH) 를 첨가하였다. 실시예 1 에 기재된 바와 같이, 마우스 ES 세포를 M15 세포 상에서 배성 내배엽까지 분화 유도한 후에, 플로우 사이토메트리를 사용하여 배성 내배엽을 분취하여 MEF 세포 상에 재배양하였다. 그 후, 상기 분취된 배성 내배엽을, 실시예 1 에 기재된 방법에 준하여, BIO (5 μM) 및 DAPT (10 μM) 그리고 상기 저해제의 존재하에서, 8 일간 (배양 12 일째) 배양하고, 실시예 1 에 기재된 방법에 의해 세포로부터 RNA 를 추출하고, 장 마커인 Cdx2 유전자의 발현에 대해 리얼타임 PCR 에 의해 해석하였다. 리얼타임 PCR 은 실시예 1 에서 사용한 프라이머·페어 (표 1 참조), Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo) 및 7500 Fast Real-time PCR system (ABI 사) 을 사용하여 실시하였다. PCR 의 반응 사이클은 표 1 에 나타내는 바와 같다. 결과를 도 8A 에 나타낸다.

[0139] 그 결과, 노긴 (Noggin), 도르소모르핀 (dorsomorphin) 또는 KAAD-시클로파민 (KAAD-Cyclopamine) 을 첨가함으로써 Cdx2 의 발현이 저하되었다. 즉, 마우스 ES 세포를 출발 재료로 한 경우에는, BMP 시그널 전달계 및 헤지호그 (Hh) 시그널 전달계가 장 분화를 촉진적으로 제어하고 있음이 시사되었다.

[0140] (2) 시험예 2：각종 활성화제의 첨가

[0141] 상기 저해제를 사용한 실험에 의해 FGF 시그널 전달계 (SU5402 첨가 실험) 나 BMP 시그널 전달계 내지 Hh 시그널 전달계가 장으로의 분화에 관여하고 있음이 판명되었다.

[0142] 그래서, 다음은 FGF 시그널 전달계, BMP 시그널 전달계 및 Hh 시그널 전달계의 활성화 실험을 실시하였다. 마이크로 어레이 데이터에 있어서 MEF 세포에서는 FGF2 및 BMP4 가 발현되어 있음을 고려하여, FGF 시그널 전달계 및 BMP 시그널 전달계의 활성화를 위해서 FGF2 (PEPROTECH) 50 ng/㎖ 및 BMP4 (R&D systems) 25 ng/㎖ 를 사용하였다. Hh 시그널 전달계의 활성화에 대해서는, SAG(MERCK) (smoothend agonist；smo) 300 nM 을 사용하였다.

[0143] 분화 유도 실험을 위해서, 이하와 같이 무피더계에서 분화 유도를 실시하였다. 먼저, 마우스 ES 세포를 젤라틴·코트·디시에 6900 세포/㎠ 로 파종하였다. ES 세포는 NEAA, L-Gln, PS, β-ME, 인슐린 (Sigma-Aldrich) 10 ㎍/㎖, 트랜스페린 (Sigma-Aldrich) 5.5 ㎍/㎖, 셀렌 (Sigma-Aldrich) 6.7 pg/㎖, 0.25 % 의 알브막스 (Albmax) (Invitrogen) 및 재조합 인간 액티빈 A (R&D Systems, Minneapolis, MN) 10 ng/㎖ 를 첨가한, 4500 mg/ℓ 의 글루코오스를 함유하는 DMEM 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen, Glasgow, UK) 에서 7 일간 배양하고, 이어서, 배지를, 글루코오스 2000 mg/㎖, BIO (5 μM) 및 DAPT (10 μM) 를 함유하고, 또한 각 활성화제 내지 성장 인자를 첨가한 10 % KSR 로 치환하였다. 그 후, 추가로 배양을 계속하여, 배양 10 일째와 15 일째에 실시예 1 에 기재된 바와 같이 세포를 분리하고, 플로우 사이토메트리를 사용하여 Cdx2 양성 세포의 비율을 평가하였다. 플로우 사이토메트리 (FACS) 해석은 BD Cytofix /Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) 를 사용하여 제조원의 매뉴얼에 따라 실시하였다. 그 결과를 도 8B 에 나타낸다.

[0144] 도 8 에 나타내는 바와 같이, 배양 10 일째에 컨트롤 (BIO, DAPT 만 첨가한 것) 에 대해서는 30 % 정도가 Cdx2 양성이었다. 한편, FGF2 를 첨가한 것에 대해서는 40 % 가 되어 유의하게 Cdx2 양성 세포수에 대해 상승이 보였다. 또, SAG (Smoothened Agonist) 를 첨가하면 Cdx2 양성 수가 저하되지만, 이것은 BMP4 를 첨가함으로써 개선되었다. 배양 15 일째에는 컨트롤에서는 20 % 정도 Cdx2 양성이지만, 조금 전과 마찬가지로 FGF2 를 첨가하면 60 % 정도가 Cdx2 양성이 되어 더 효율적으로 분화되는 것이 보였다. 또, FGF2 에 첨가하여 BMP4 또는 SAG 를 첨가함으로써 더 효율적으로 분화되는 것이 판명되었다. 이 결과로부터 마우스 ES 세포로부터의 장으로의 분화에 대해서는 FGF2 가 촉진적으로 기능하고, 또한 배양 후기에 BMP4 또는 SAG 에 의해 BMP 시그널 전달계 또는 Hh 시그널 전달계가 활성화되어, 분화가 더 촉진되는 것이 명확해졌다.

[0145] (3) 시험예 3：인간 ES 세포에 있어서의 각종 활성화제의 첨가

[0146] 인간 ES 세포에 대해 동일하게 무피더계로 FGF2, BMP4 및/또는 SAG 를 첨가함으로써 CDX2 양성 세포로의 분화 효율이 개선될지의 검토를 실시하였다.

[0147] 먼저, 분화 유도 실험을 위해서, 인간 ES 세포를 젤라틴·코트·디시에 69000 세포/㎠ 로 파종하였다. ES 세포는 NEAA, L-Gln, PS, β-ME, 인슐린 (Sigma-Aldrich) 10 ㎍/㎖, 재조합 인간 액티빈 A (R&D Systems, Minneapolis, MN) 100 ng/㎖ 및 B27 서플리먼트 (Invitrogen) 를 첨가한 RPMI 1640 배지 (Invitrogen) 에서 7 일간 배양하였다. 이어서, 배지를, 글루코오스 2000 mg/㎖, BIO (5 μM), DAPT (10 μM) 및 시험예 2 에 기재된 농도의 각 활성화제 내지 성장 인자를 첨가한 10 % KSR 로 치환하였다. 그 후, 추가로 배양을 계속하여, 배양 9 일째와 20 일째에 실시예 1 에 기재된 바와 같이 세포를 분리하고, 플로우 사이토메트리를 사용하여 Cdx2 양성 세포의 비율을 평가하였다. 플로우 사이토메트리 (FACS) 해석은 BD Cytofix /Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) 를 사용하여 제조원의 매뉴얼에 따라 실시하였다. 그 결과를 도 9 에 나타낸다.

[0148] 배양 9 일째에는 어느 조건에도 차이는 없었지만, 배양 20 일째에 Fgf2 를 첨가한 것에 대해서는 CDX2 양성 세포의 비율이 저하되었다. 이 결과로부터 인간 ES 세포에 있어서는 FGF 시그널이 장으로의 분화를 억제적으로 기능하여, 마우스 ES 세포와는 장으로의 분화 메커니즘이 상이함이 시사되었다.

[0149] (4) 시험예 4 : 인간 ES 세포에 있어서의 FGF2 농도의 영향

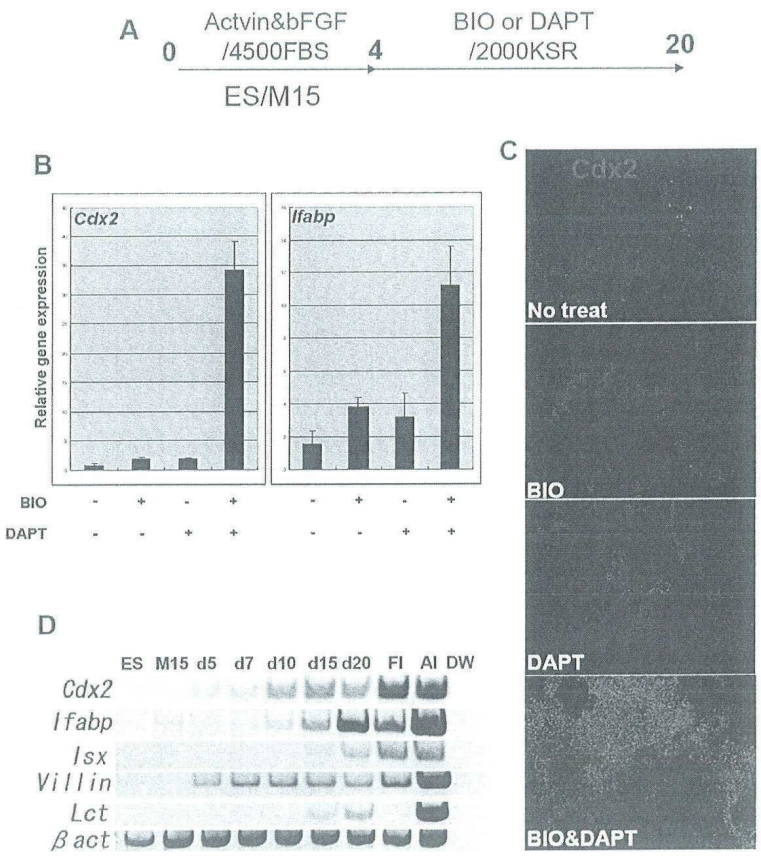
[0150] 고농도의 FGF2 가 인간 ES 세포로부터 CDX2 양성 세포로의 분화에 중요하다는 과거의 보고가 있기 때문에, 동일한 결과가 얻어질지에 대해서 시험하였다. 최종 농도 250 ng/㎖ 의 FGF2 를 사용하였다. 시험예 3 의 방법에 준하여, 젤라틴·코트·디시 상에서 인간 ES 세포를 내배엽까지 분화 유도한 후 (배양 7 일째) 에, BIO (5 μM) 및 DAPT (10 μM) 에 첨가하여 FGF2 를 0, 50 및 250 ng/㎖ 로 각각 첨가하고, 9 일째 또는 20 일째까지 배양하고, 플로우 사이토메트리에 의해 Cdx2 양성 세포의 비율을 평가하였다. 플로우 사이토메트리 (FACS) 해석은 BD Cytofix /Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) 를 사용하여 제조원의 매뉴얼에 따라 실시하였다. 그 결과를 도 10 에 나타낸다.

[0151] 도 10 에 나타낸 바와 같이, 배양 9 일째에는 250 ng/㎖ 로 FGF2 를 첨가한 것에 대해 CDX2 양성 세포의 비율이 저하되는 것을 확인하였다 (도 10A). 또, 배양 20 일째에는, Fgf2 의 농도 의존적으로 CDX2 양성 세포의 비율이 저하되었다 (도 10B). 이 결과는 도 9 의 결과에 상응하여, 다시 FGF2 가 분화 유도 후기 (9 ~ 20 일째의 기간) 에 장으로의 분화에 대해 억제적으로 기능함을 확인하였다.

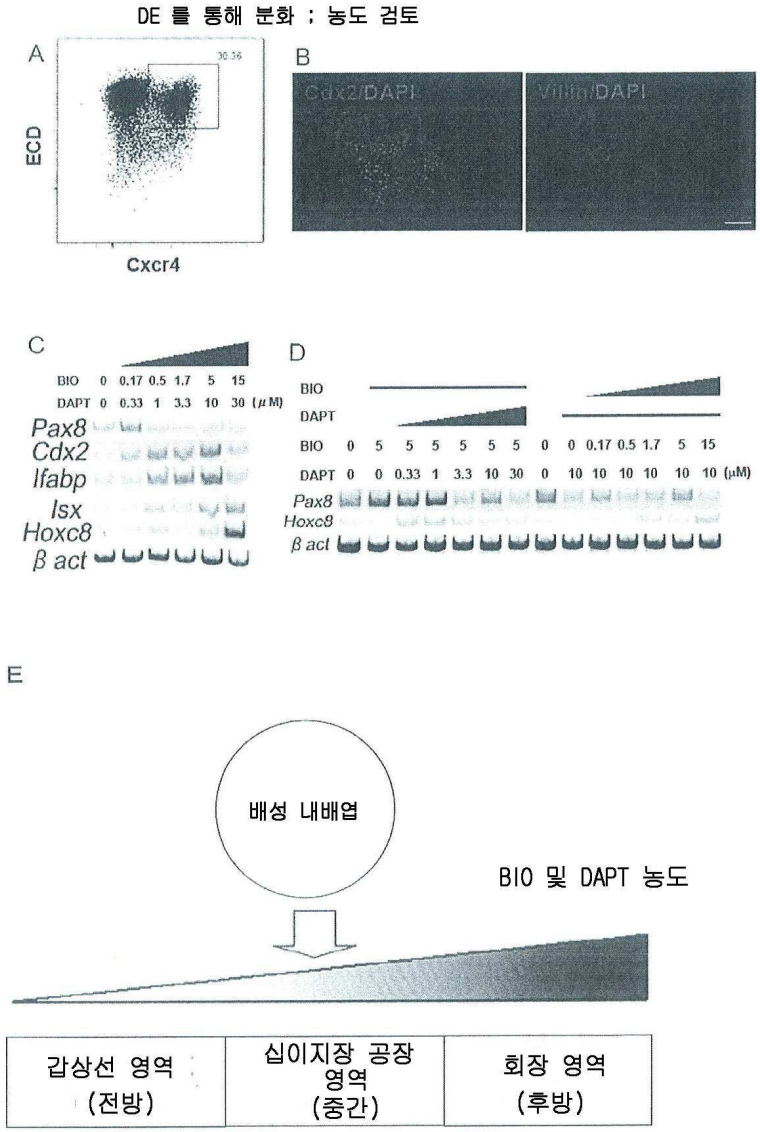
[0152] 본 실시예의 결과에 따르면, FGF, Wnt, BMP, Hh 및 Notch 시그널 전달의 조작에 의해 장의 기능적인 성숙 세포형의 분화가 가능함이 증명되었다. 이들 지견에 따르면, 본 발명이 발생 생물학 및 재생 의료 분야에 있어서 높은 산업상의 이용 가능성을 갖는 것은 명확하다.

도면

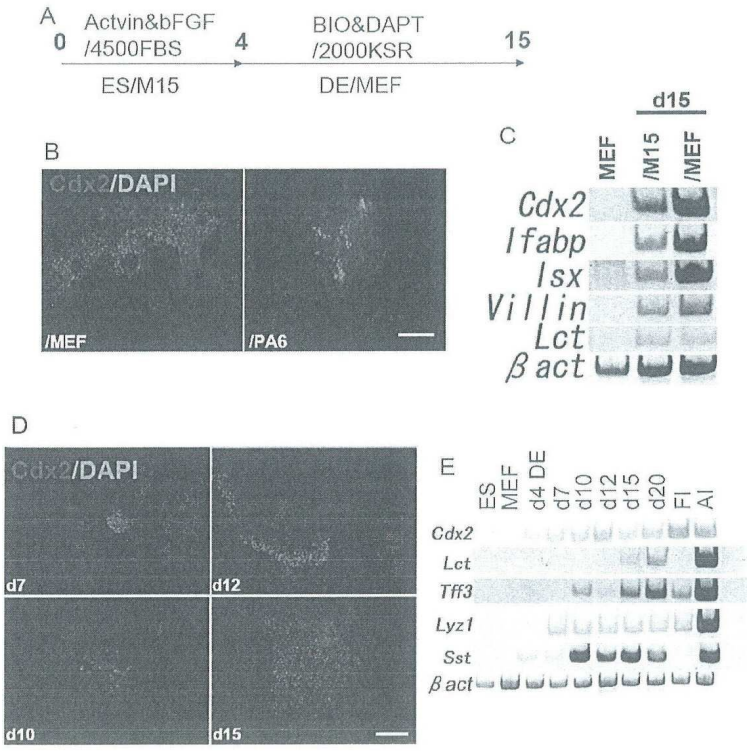
도면1


A
0
Actvin&bFGF
/4500FBS
4
BIO or DAPT
/2000KSR
20
ES/M15
B
Cdx2
Ifabp
Relative gene expression
BIO
DAPT
C
Cdx2
No treat
BIO
DAPT
BIO&DAPT
D
ES M15 d5 d7 d10 d15 d20 FI AI DW
Cdx2
Ifabp
Isx
Villin
Lct
β act

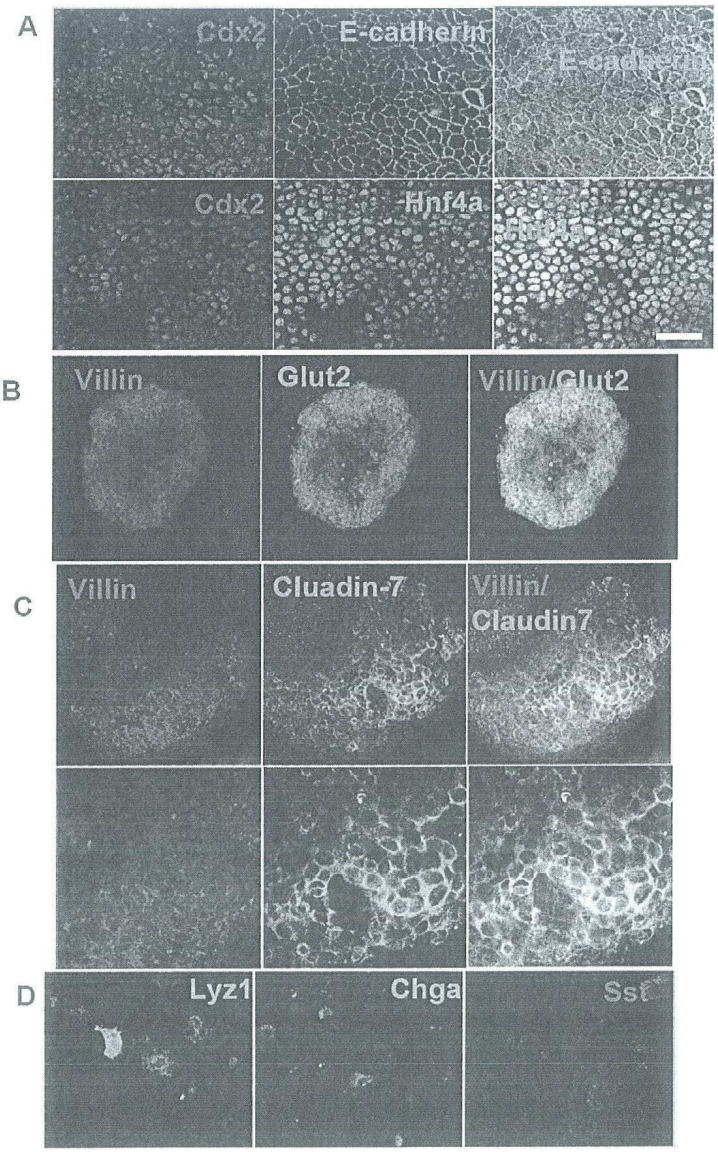
도면2


DE 를 통해 분화 ; 농도 검토
A
ECD
Cxcr4
B
Cdx2/DAPI
Villin/DAPI
C
BIO 0 0.17 0.5 1.7 5 15
DAPT 0 0.33 1 3.3 10 30 (μM)
Pax8
Cdx2
Ifabp
Isx
Hoxc8
β act
D
BIO
DAPT
BIO 0 5 5 5 5 5 5 0 0 0.17 0.5 1.7 5 15
DAPT 0 0 0.33 1 3.3 10 30 0 10 10 10 10 10 10 (μM)
Pax8
Hoxc8
β act
E
배성 내배엽
BIO 및 DAPT 농도
갑상선 영역 (전방)
십이지장 공장 영역 (중간)
회장 영역 (후방)

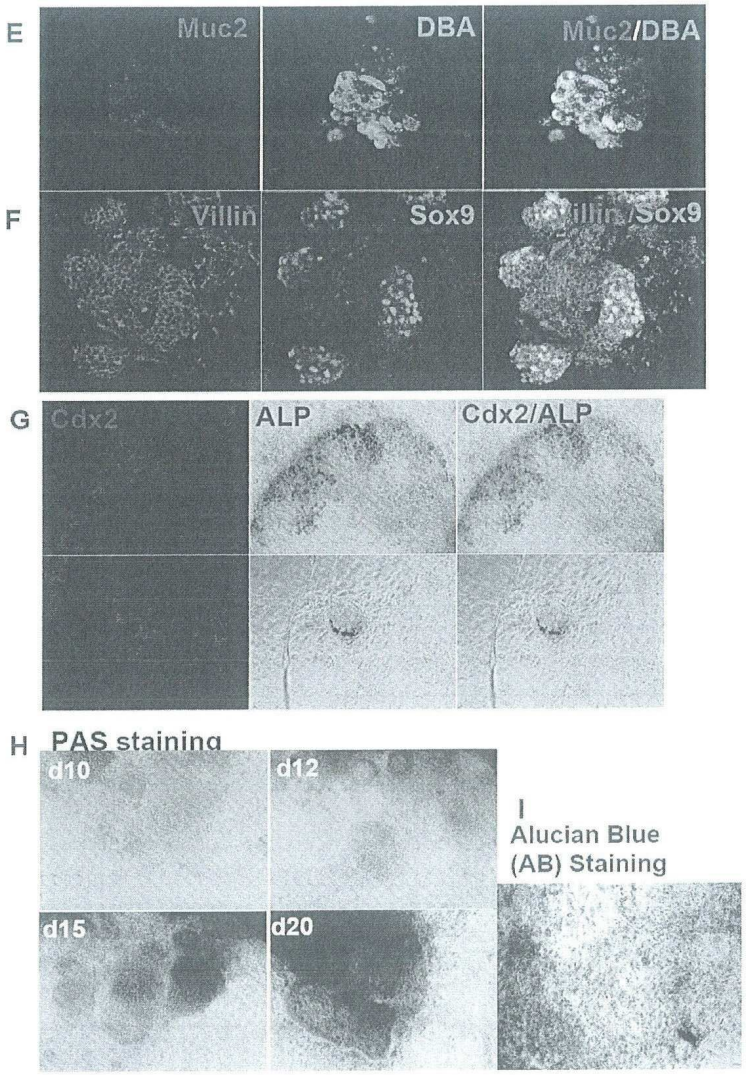
도면3


A
0
Actvin&bFGF
/4500FBS
4
BIO&DAPT
/2000KSR
15
ES/M15
DE/MEF
B
Cdx2/DAPI
/MEF
/PA6
C
d15
MEF
/M15
/MEF
Cdx2
Ifabp
Isx
Villin
Lct
βact
D
Cdx2/DAPI
d7
d12
d10
d15
E
ES
MEF
d4 DE
d7
d10
d12
d15
d20
FI
AI
Cdx2
Lct
Tff3
Lyz1
Sst
βact

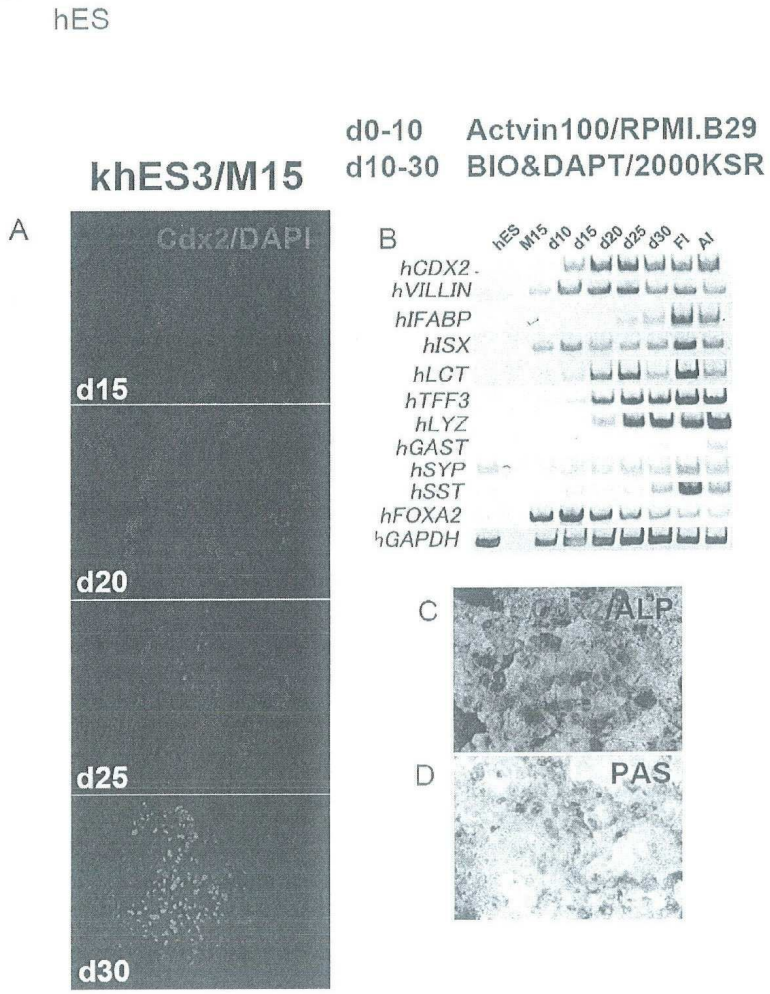
도면4


A
Cdx2
E-cadherin
E-cadherin
Cdx2
Hnf4a
B
Villin
Glut2
Villin/Glut2
C
Villin
Cluadin-7
Villin/
Claudin7
D
Lyz1
Chga
Sst

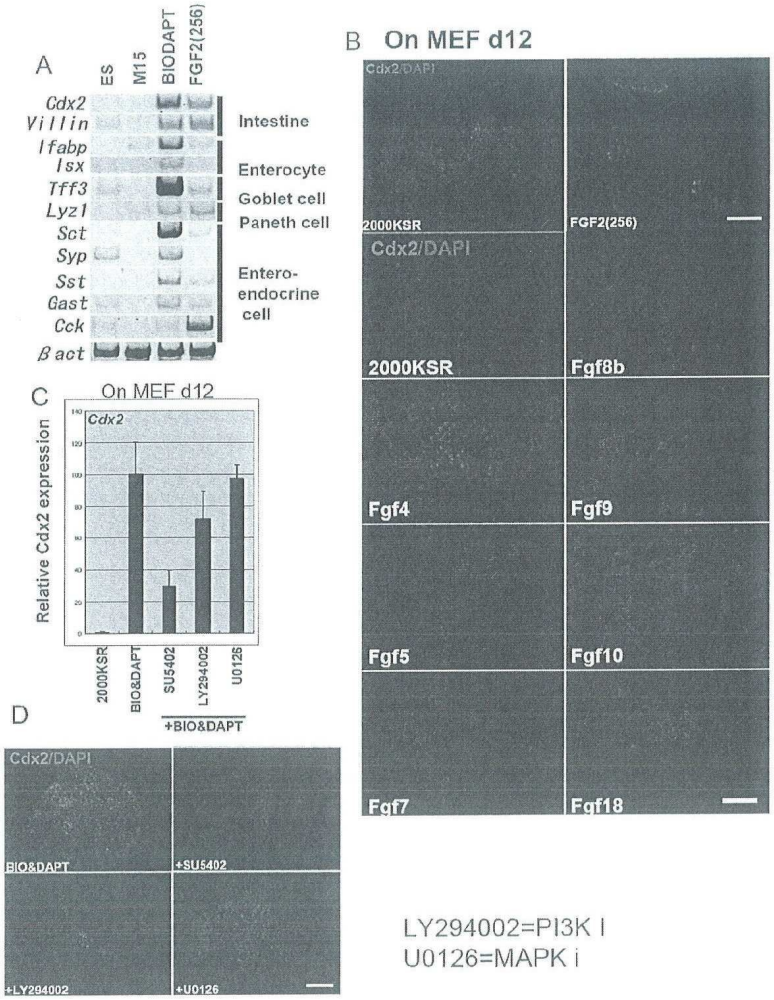
도면5


E
Muc2
DBA
Muc2/DBA
F
Villin
Sox9
Villin/Sox9
G
Cdx2
ALP
Cdx2/ALP
H
PAS staining
d10
d12
d15
d20
I
Alucian Blue
(AB) Staining

도면6

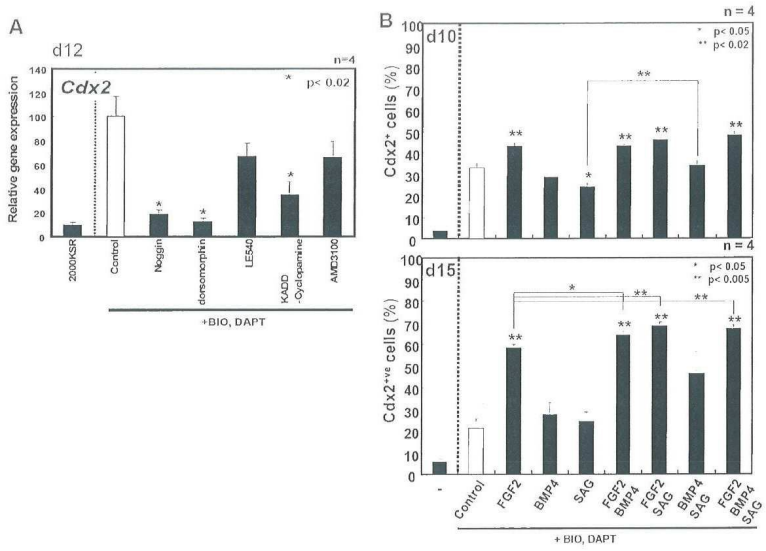

hES
khES3/M15
d0-10 Actvin100/RPMI.B29
d10-30 BIO&DAPT/2000KSR
A
Cdx2/DAPI
d15
d20
d25
d30
B
hES
M15
d10
d15
d20
d25
d30
FI
AI
hCDX2
hVILLIN
hIFABP
hISX
hLCT
hTFF3
hLYZ
hGAST
hSYP
hSST
hFOXA2
hGAPDH
C
Cdx2/ALP
D
PAS

도면7

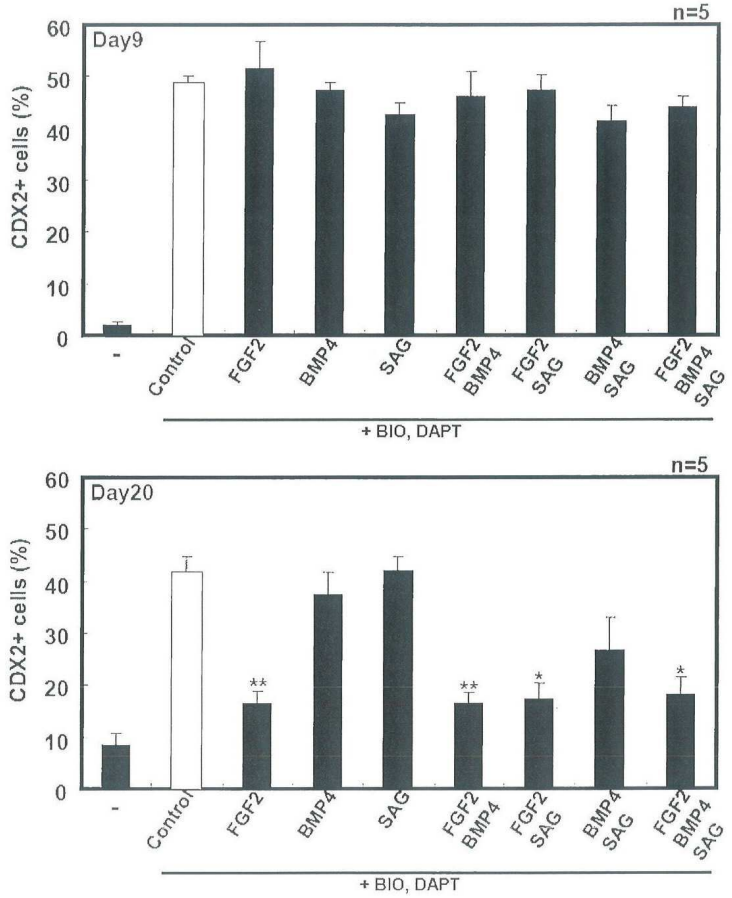


LY294002=PI3K I
U0126=MAPK i

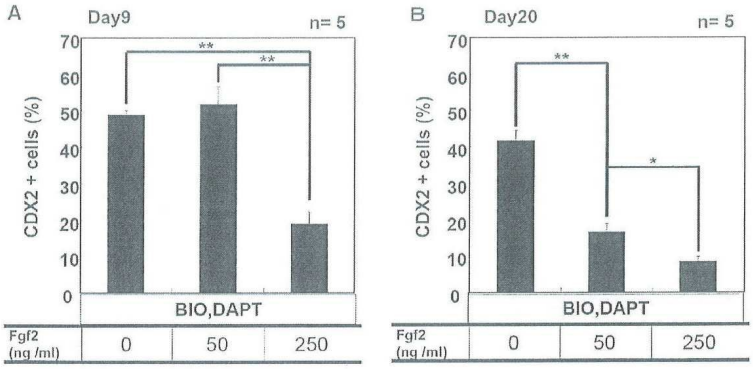
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> National University Corporation Kumamoto University

<120> A method of producing intestinal cells

<130> 111550AB

<150> JP 2010-246161

<151> 2010-11-02

<160> 54

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 1

tgcctttccc catgctgcct ccgtgta 27

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 2

ggtgggtggt gcgcttggcc ttgatgtag 29

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 3

tggtgtacac agaccatcag c 21

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 4

ccttggctct gcggttct 18

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 5

ggaaaggagc tgattgctgt cc 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 6

ctttgacaag gctggagacc ag 22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 7

agtttgccca gaccacaaag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 8

cagggtaatg ggtgaagtgg 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 9

gtctcccagc ctcatgtttc 20

<210> 10

<211

> 22

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 10

tggaaccaaa tcttcacttg tc 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 11

gttatgagcc cgaaagtgga 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 12

agagaaggca gctggagtca 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 13

cccatcttca aaaacggaga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 14

ccctatcggc atcaaaagac 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 15

gtgatggtgg gaatgggtca 20

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 16

tttgatgtca cgcacgattt cc 22

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 17

catcctgtgc agtggtcct 19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 18

gcaccataca ttggcttgg 19

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 19

gagaccgaag caccgactat g 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 20

cggttttgac attgtgttcg c 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 21

ccgtcagttt ctgcagaagt 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 22

cagggtcaag ttgagcatcg 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 23

gttgcagcat ttgtcacacc 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 24

tgaacgatca acagcagacc 20

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 25

ggttccggag tgggcaggtt tg 22

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 26

ggggcgtggg gtggaatcag 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 27

accaatgagg acctggaaca 20

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 28

tcctactggt cttcctcagc a 21

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 29

atgaagagcg gcgtatgtct 20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 30

cgatgggtat tcgtagtcct c 21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 31

ggaacctgtg cgagtggatg 20

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 32

aggtggtggg gcttgcgggg gcg 23

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 33

acttctatgg gggcgactg 19

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 34

atgcgtccct tgaagatgg 19

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 35

gataaactaa aagcataggc tgcatatg 28

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 36

tcaaaatcag aatggcaatt atctct 26

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 37

caggaggctc tgagaggaca 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 38

atctgtgcag aagggatgct 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 39

gctgcaccgt tagagatgac 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 40

cggtttttgc tcccttaaca 20

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 41

cccaaggagt gcaacaacc 19

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 42

gggacagaaa agctgagatg a 21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 43

gatggctaca ggggaatcag 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 44

taactgctcc tggggttttg 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 45

tggctggagg aagaagaaga 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 46

tcagtttttc aggggacagg 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 47

ctccactcct cccaactctg 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 48

actccacacc tcctctccaa 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 49

gatgctgtcc tgccgcctcc 20

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 50

tgccatagcc gggtttga 18

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 51

gcagatacct cctactacca 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 52

gaagcaggag tctacacagt 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 53

cgagatccct ccaaaatcaa 20

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 54

catgagtcct tccacgatac caa 23