



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0069663
(43) 공개일자 2012년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7003879
(22) 출원일자(국제) 2010년07월15일
 심사청구일자 2012년02월14일
(85) 번역문제출일자 2012년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/062480
(87) 국제공개번호 WO 2011/007900
 국제공개일자 2011년01월20일
(30) 우선권주장
 61/213,788 2009년07월15일 미국(US)
 61/290,159 2009년12월24일 미국(US)

(71) 출원인
 데자와 마리
 일본, 미야기, 센다이시, 아오바쿠, 이치반쵸,
 1-9-2-1507
 후지요시 요시노리
 일본, 교토, 우지시, 우지, 토노카와, 115-31
 (뒷면에 계속)
(72) 발명자
 데자와 마리
 일본, 미야기, 센다이시, 아오바쿠, 이치반쵸,
 1-9-2-1507
 후지요시 요시노리
 일본, 교토, 우지시, 우지, 토노카와, 115-31
 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
 이덕록

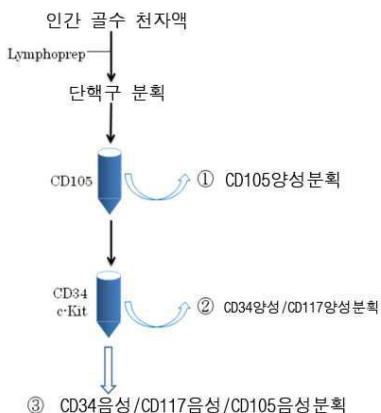
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 생체조직으로부터 단리 할 수 있는 다능성 줄기세포

(57) 요 약

본 발명은 생체조직으로부터 다능성 줄기세포를 직접 얻는 방법의 제공 및 그렇게 해서 얻어진 다능성 줄기세포의 제공을 목적으로 하고 있고, 본 발명은 생체조직으로부터 단리(單離)할 수 있는 SSEA-3 양성의 다능성 줄기세포다.

대 표 도 - 도4



(71) 출원인

키타다 마사아키

일본, 사이타마, 토코로자와시, 쿠메, 534-3

와카오 쇼헤이

일본, 미야기, 센다이시, 아오바쿠, 키마치도리,
1-3-7-312

나베시마 요이치

일본, 교토, 교토시, 나카교쿠, 히가시노토우인도
리 산조사가루, 산몬지쵸, 205-3-1302

(72) 발명자

나베시마 요이치

일본, 교토, 교토시, 나카교쿠, 히가시노토우인도
리 산조사가루, 산몬지쵸, 205-3-1302

와카오 쇼헤이

일본, 미야기, 센다이시, 아오바쿠, 키마치도리,
1-3-7-312

특허청구의 범위

청구항 1

생체조직으로부터 단리(單離)할 수 있는 SSEA-3 양성(陽性)인 다능성(多能性) 줄기세포.

청구항 2

제 1항에 있어서, CD105 양성(陽性)인 다능성(多能性) 줄기세포.

청구항 3

제 1항에 있어서, CD117 음성(陰性) 및 CD146 음성(陰性)인 다능성 줄기세포.

청구항 4

제 1항에 있어서, CD117 음성, CD146 음성, NG2 음성, CD34 음성, vWF 음성 및 CD271 음성인 다능성 줄기세포.

청구항 5

제 1항에 있어서, CD34 음성, CD117 음성, CD146 음성, CD271 음성, NG2 음성, vWF 음성, Sox10 음성, Snail 음성, Slug 음성, Tyrp1 음성 및 Dct 음성인 다능성 줄기세포.

청구항 6

제 1항에 있어서, 텔로머라아제(telomerase) 활성이 낮거나 또는 없는 다능성 줄기세포.

청구항 7

제 1항에 있어서, 3배엽으로 분화하는 능력을 갖는 다능성 줄기세포.

청구항 8

제 1항에 있어서, 종양성 증식을 나타내지 않는 다능성 줄기세포.

청구항 9

제 1항에 있어서, 셀프 리뉴얼(self-renewal) 능력을 갖는 다능성 줄기세포.

청구항 10

제 1항에 있어서, 스트레스 내성(耐性)인 다능성 줄기세포.

청구항 11

제 1항에 있어서, 탐식능(貪食能)이 높은 다능성 줄기세포.

청구항 12

제 1항에 있어서, 아래에 나타낸 22개의 오드란트(odorant) 수용체의 적어도 하나가 양성(陽性)인 다능성 줄기세포.

olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2 (OR8G2);

olfactory receptor, family 7, subfamily G, member 3 (OR7G3);

olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 5 (OR4D5);

olfactory receptor, family 5, subfamily AP, member 2 (OR5AP2);

olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 4 (OR10H4);

olfactory receptor, family 10, subfamily T, member 2 (OR10T2);
olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 2 (OR2M2);
olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 5 (OR2T5);
olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 4 (OR7D4);
olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 3 (OR1L3);
olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4 (OR4N4);
olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 7 (OR2A7);
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type (GNAL);
olfactory receptor, family 6, subfamily A, member 2 (OR6A2);
olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 6 (OR2B6);
olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 1 (OR2C1);
olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 (OR52A1);
olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3);
olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 2 (OR10H2);
olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 2 (OR51E2);
olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 2 (OR5P2); 및
olfactory receptor, family 10, subfamily P, member 1 (OR10P1).

청구항 13

제 1항에 있어서, 아래에 나타낸 5개의 케모카인(chemokine)의 적어도 하나가 양성(陽性)인 다능성 줄기세포:
chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5);
chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4);
chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1);
Duffy blood group, chemokine receptor(DARC); 및
chemokine (C-X-C motif) receptor 7 (CXCR7).

청구항 14

제 1항에 있어서, 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 유래인 다능성 줄기세포.

청구항 15

제 1항에 기재한 다능성 줄기세포를 포함하는 세포덩어리 또는 세포분획.

청구항 16

생체조직으로부터 아래의 (i) ? (vi)의 특성 중 적어도 하나의 특성을 지표(指標)로 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법:

- (i) SSEA-3 양성(陽性);
- (ii) CD105 양성(陽性);
- (iii) CD117 음성(陰性) 및 CD146 음성(陰性)
- (iv) CD117 음성, CD146 음성, NG2 음성, CD34 음성, vWF 음성 및 CD271 음성;

(v) CD34 음성, CD117 음성, CD146 음성, CD 271 음성, NG2 음성, vWF 음성, Sox10 음성, Snail 음성, Slug 음성, Tyrpl 음성 및 Dct 음성; 및

(vi) 텔로머라아제(telomerase) 활성이 낮거나 또는 없다.

청구항 17

생체조직 유래 세포를 세포 스트레스에 폭로(暴露)해 살아남은 세포를 회수하는 것을 포함하는 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 세포 스트레스가 프로테아제(protease) 처리, 저산소 조건하에서의 배양, 저인산 조건하에서의 배양, 혈청(血清) 기아상태(飢餓狀態)에서의 배양, 당(糖) 기아상태(飢餓狀態)에서의 배양, 방사선 폭로 하에서의 배양, 열 쇼크에의 폭로하에서의 배양, 유해물질 존재하에서의 배양, 활성 산소 존재하에서의 배양, 기계적 자극하에서의 배양 및 압력처리하에서의 배양으로부터 선택되는 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 세포 스트레스가 트립신(trypsin) 처리인 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법.

청구항 20

제 1항 내지 제 14항의 어느 한 항에 기재한 다능성 줄기세포의 파생세포 또는 유도세포인 다능성 줄기세포.

청구항 21

제 1항에 기재한 다능성 줄기세포의 파생세포 또는 유도세포인 분화된 세포.

청구항 22

제 1항에 기재한 다능성 줄기세포를 포함하는 의약조성물.

청구항 23

제 20항에 기재한 줄기세포를 포함하는 의약조성물.

청구항 24

제 21항에 기재한 분화된 세포를 포함하는 의약조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 생체조직 유래의 다능성 줄기세포에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

플라나리아(planarians)나 영원류(newts)는 몸의 일부가 절단된 후라도 몸을 재생할 수 있다. 이들의 높은 재생 능력은 간엽계(間葉系)에 존재하는 다능성(多能性) 줄기세포(adult pluripotent stem cell)의 존재에 따르고 있다. 한편, 인간 등의 고등생물에 있어서는 조직 재생 능력은 이들 동물에 비교해서 훨씬 낮다. 배반포(胚盤胞)의 내부세포 덩어리(ICM : Inner cell mass)는 다능성(多能性) 세포의 모임으로 인식되고 있어 외배엽(外胚葉), 중배엽(中胚葉), 내배엽(內胚葉)계의 세포로 분화되는 능력을 가진다. 그렇지만 발생이 진행함과 동시에 이러한 다능성(多能性)이 제한되어도 좋은 조직에 특화한 세포로 분화되어 간다.

[0003]

최근 조직 재생에 공헌할 수 있는 성인 줄기세포 또는 조직 줄기세포가 주목받고 있다. 그러나 포유류의 성체(成體)에 플라나리아(planarians)나 영원류(newts)와 같이 다능성(多能性;pluripotent) 줄기세포가 존재할 것인지 아닌지는 불분명했다.

[0004] 성체(成體)로 얻을 수 있는 분화 능력을 갖는 세포로서 예를 들면 뼈, 연골, 지방세포, 신경세포, 골격근육 등으로의 분화 능력을 갖는 골수간엽계(骨髓間葉系) 세포분획(MSC:Bone marrow stromal cell)이 보고되어 있다(비특허문헌 1 및 2을 참조). 그렇지만 골수간엽계(骨髓間葉系) 세포분획(細胞分劃)은 다양한 세포를 포함하는 세포군이며, 그 분화 능력은 다양하면서 본체가 분명하지 않고, 또 특정한 세포로 분화되도록 하기 위해서 특정한 화합물에 의한 자극이나 유전자도입 등이 필요하여 분화 유도시스템을 구축할 필요가 있었다.

[0005] 게다가 성체 유래의 다능성 줄기세포로서 iPS세포(induced pluripotent stem cell; 특허문헌 1, 특허문헌 2, 비특허문헌 3등을 참조)가 보고되어 있었다. 그렇지만 iPS세포의 수립에는 간엽계(間葉系) 세포인 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획(dermal fibroblast)에 특정한 유전자나 특정한 화합물을 체세포(體細胞)에 도입한다고 하는 특정한 물질을 채용한 유도조작이 필요하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1 : 일본국 특허 제4183742호 공보

(특허문헌 0002) 특허문헌 2 : 일본국 특허공개 2008-307007호 공보

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1 : M. DEZAWA et al., The Journal of Clinical Investigation, 113, 12, pp.1701-1710, (2004)

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2 : M. DEZAWA et al., SCIENCE, 2005 July 8, 309, pp.314-317, (2005)

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3 : Okita K. et al. SCIENCE, 2008 Nov 7, 322(5903), pp.949-953

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 생체조직으로부터 다능성(多能性) 줄기세포를 직접 얻는 방법의 제공 및 그 방법에 의해 얻어진 다능성 줄기세포의 제공을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명자들은 골수간엽계(骨髓間葉系) 세포분획(MSC:Bone marrow stromal cell)에 관한 연구 과정에서 무처리(無處理)의 인간 MSC세포로부터 지극히 낮은 빈도로 특징적인 세포덩어리가 형성되는 것을 찾아냈다. 초기 세포덩어리의 외견(外見)은 ES세포를 매우 닮아 있었다. 그렇지만 ES세포와는 달리 무한증식을 하지 않고 어떤 일정한 기간인 크기에 도달하면 증식을 정지하고, 더구나 텔, 색소세포 등의 각종 세포를 포함하는 불균일한 집단으로 되었다. 또한 이 세포덩어리에 대해서 면역세포화학(immunocytochemistry)을 한바, 외배엽(外胚葉), 중배엽(中胚葉) 및 내배엽(內胚葉) 마커(makers)에 각각 양성의 세포가 세포덩어리 내에 혼재해서 검출되었다. 본 발명자들은 이 결과보다 무처리(無處理)의 통상으로 유지·배양되고 있는(naive) 인간 MSC세포 분획 중에 다능성 세포에 상당하는 세포가 존재할 가능성을 고려해 더욱 예의 검토를 하였다.

[0010] 생체가 스트레스를 받거나 상해를 받으면 휴면 상태의 조직 줄기세포가 활성화되어 조직 재생에 기여하는 것이 알려져 있다. 본 발명자는 골수간엽계(骨髓間葉系) 세포분획이나 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획 등의 간엽계(間葉系) 세포 또는 중배엽계 세포를 배양하고 있는 때에 각종 방법으로 스트레스 자극을 주어(예컨대, 무혈청배양, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)에 의한 배양, 저산소배양, 토탈 3시간의 간헐적 단시간 트립신(trypsin) 배양, 8시간 혹은 16시간의 장시간의 트립신(trypsin) 배양 등), 생존하고 있는 세포를 모으고, 메틸 셀룰로오스(MC) 함유 배양지 중에서 부유배양(MC 배양이라고 한다)을 하였다. 그 결과 최대지름 150 μm 까지의 다양한 크기의 배양체양(胚樣體樣; embryooid body-like) 세포덩어리의 형성이 인정을 받았다. 특히 장시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 인간 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획 및 인간 MSC 분획에 있어서 가장 많은 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성율이 인정을 받았다.

[0011] 본 발명자들은 얻어진 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 중의 세포의 특성을 조사하여 그 세포가 다능성 줄기세

포의 특성을 갖고 있는 것을 찾아냈다. 게다가 본 발명자들은 얻어진 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 중의 세포가 종래 보고되어 있었던 다능성 줄기세포가 갖지 않은 특성을 갖는 것을 찾아내고, 게다가 얻어진 세포덩어리 중의 세포의 발현 단백질을 조사하고, 종래 보고되어 있었던 ES세포, iPS세포 등의 다능성 줄기세포와는 다른 발현 패턴을 나타내는 것을 찾아냈다.

[0012] 본 발명자들은 더구나 상기 다능성 줄기세포의 표면 항원으로서 SSEA-3이 발현되고 있는 것을 찾아내고, SSEA-3의 발현을 지표(指標)로 상기 다능성 줄기세포를 생체조직으로부터도 단리(單離) 할 수 있는 것을 찾아냈다.

[0013] 본 발명자들은 상기 다능성 줄기세포는 신규한 다능성 줄기세포이며, 종래 보고되어 있었던 ES세포나 iPS세포 등의 다능성 줄기세포와 다르고, 생체조직으로부터 유도 조작 없이 직접 얻을 수 있는 다능성 줄기세포인 것을 찾아내고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 본 발명자들은 그 다능성 줄기세포를 Muse세포(Multilin eage differentiating Stress Enduring cells)라고 명명했다.

[0014] 즉, 본 발명은 아래와 같다.

과제의 해결 수단

[0015] [1] 생체조직으로부터 단리(單離)할 수 있는 SSEA-3 양성인 다능성 줄기세포.

[0016] 그 다능성 줄기세포는 배양선(培養線) 유아세포(維芽細胞)나 골수 줄기세포 등의 생체조직의 배양물로부터도 단리(單離)할 수 있고, 또 단일 세포로서 단리(單離)할 수 있다.

[0017] [2] CD105 양성인 [1]의 다능성 줄기세포.

[0018] [3] CD117(c-Kit) 음성 및 CD146 음성인 [1] 또는 [2]의 다능성 줄기세포.

[0019] [4] CD117 음성, CD146 음성, NG2 음성, CD34 음성, vWF 음성 및 CD271 음성인 [1] 또는 [2]의 다능성 줄기세포.

[0020] [5] CD34 음성, CD117 음성, CD146 음성, CD271 음성, NG2 음성, vWF 음성, Sox10 음성, Snail 음성, Slug 음성, Tyrpl 음성 및 Dct 음성인 [1] 또는 [2]의 다능성 줄기세포.

[0021] [6] 텔로머라아제(telomerase) 활성이 낮거나 또는 없는 [1] ? [5]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0022] [7] 3배엽으로 분화하는 능력을 갖는 [1] ? [6]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0023] 본 발명의 다능성 줄기세포는 *in vitro* 의 접착배양에서 3배엽으로 분화하는 능력을 갖고, *in vitro* 에서 유도 배양함으로써 피부, 간, 신경, 근육, 뼈, 지방 등으로 분화하여 얻는다. 또한 *in vivo* 에서 정소(精巢)로 이식한 경우에도 3배엽으로 분화하는 능력을 갖는다. 더구나 정주(靜注)에 의해 생체로 이식하는 것에서 손상을 받은 장기(피부, 척수, 간, 근육 등)에 생착(生着)하여 분화하는 능력을 갖는다.

[0024] [8] 종양성 증식을 나타내지 않는 [1] ? [7]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0025] 본 발명의 다능성 줄기세포는 부유배양(浮遊培養)에서 증식속도 약 1.3일로 증식하지만, 10일 동안 정도로 증식을 멈춘다고 하는 성질을 갖고, 더우기 정소(精巢)에 이식했을 경우 적어도 반년간은 암화(癌化) 하지 않는다고 하는 성질을 갖는다.

[0026] [9] 셀프 리뉴얼(self-renewal) 능력을 갖는 [1] ? [8]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0027] 본 발명의 다능성 줄기세포는 부유배양(浮遊培養)과 접착배양(接培養)의 조작을 반복함으로써 증식시킬 수 있다. 또한 본 발명의 다능성 줄기세포는 다른 체성(體性) 줄기세포와 같이 비대칭 분열을 한다.

[0028] [10] 스트레스 내성(耐性)인 [1] ? [9]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0029] [11] 탐식능(貪食能)이 높은 [1] ? [10]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0030] [12] 아래에 나타낸 22개의 오드란트(odorant) 수용체의 적어도 하나가 양성(陽性)인 [1] ? [11]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.

[0031] olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2 (OR8G2);

[0032] olfactory receptor, family 7, subfamily G, member 3 (OR7G3);

- [0033] olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 5 (OR4D5);
- [0034] olfactory receptor, family 5, subfamily AP, member 2 (OR5AP2);
- [0035] olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 4 (OR10H4);
- [0036] olfactory receptor, family 10, subfamily T, member 2 (OR10T2);
- [0037] olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 2 (OR2M2);
- [0038] olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 5 (OR2T5);
- [0039] olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 4 (OR7D4);
- [0040] olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 3 (OR1L3);
- [0041] olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4 (OR4N4);
- [0042] olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 7 (OR2A7);
- [0043] guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type (GNAL);
- [0044] olfactory receptor, family 6, subfamily A, member 2 (OR6A2);
- [0045] olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 6 (OR2B6);
- [0046] olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 1 (OR2C1);
- [0047] olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 (OR52A1);
- [0048] olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3);
- [0049] olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 2 (OR10H2);
- [0050] olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 2 (OR51E2);
- [0051] olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 2 (OR5P2); 및
olfactory receptor, family 10, subfamily P, member 1 (OR10P1).
- [0052] [13] 아래에 나타낸 5개의 케모카인(chemokine)의 적어도 하나가 양성(陽性)인 [1] ? [12]의 어느 것인가의
다능성 줄기세포:
- [0054] chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5);
- [0055] chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4);
- [0056] chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1);
- [0057] Duffy blood group, chemokine receptor(DARC); 및
- [0058] chemokine (C-X-C motif) receptor 7 (CXCR7).
- [0059] [14] 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 유래인 [1] ? [13]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포.
- [0060] [15] [1] ? [14]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 덩어리 또는 세포분획.
- [0061] [16] 생체조직으로부터 아래의 (i) ?(vi)의 특성 중 적어도 하나의 특성을 지표(指標)로 다능성 줄기세포 또
는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법:
- [0062] (i) SSEA-3 양성(陽性);
- [0063] (ii) CD105 양성(陽性);
- [0064] (iii) CD117 음성(陰性) 및 CD146 음성(陰性)
- [0065] (iv) CD117 음성, CD146 음성, NG2 음성, CD34 음성, vWF 음성 및 CD271 음성;

- [0066] (v) CD34 음성, CD117 음성, CD146 음성, CD 271 음성, NG2 음성, vWF 음성, Sox10 음성, Snail 음성, Slug 음성, Tyrpl 음성 및 Dct 음성; 및
- [0067] (vi) 텔로머라아제(telomerase) 활성이 낮거나 또는 없다.
- [0068] [17] 생체조직 유래 세포를 세포 스트레스에 폭로(暴露)해 살아남은 세포를 회수하는 것을 포함하는 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법.
- [0069] [18] 세포 스트레스가 프로테아제(protease) 처리, 저산소 조건하에서의 배양, 저인산 조건하에서의 배양, 혈청 기아상태에서의 배양, 당 기아상태에서의 배양, 방사선 폭로하에서의 배양, 열 쇼크에의 폭로하에서의 배양, 유해물질 존재하에서의 배양, 활성 산소 존재하에서의 배양, 기계적 자극하에서의 배양 및 압력처리하에서의 배양으로부터 선택되는 [17]의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법.
- [0070] [19] 세포 스트레스가 트립신(trypsin) 처리인 [18]의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離)하는 방법.
- [0071] [20] [1]?[14]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포의 파생세포 또는 유도세포인 다능성 줄기세포.
- [0072] 그 파생세포 또는 유도세포로서 예를 들면 유전자의 도입이나 화합물 첨가에 의해 유도한 세포를 들 수 있다. 또 본 발명의 줄기세포 유래의 iPS세포를 들 수 있다.
- [0073] [21] [1]?[14]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포의 파생세포 또는 유도세포인 분화된 세포.
- [0074] [22] [1]?[14] 및 [20]의 어느 것인가의 다능성 줄기세포를 포함하는 의약조성물.
- [0075] [23] [21]의 분화된 세포를 포함하는 의약조성물.
- [0076] 본 명세서는 본원의 우선권의 기초인 미국 가출원 61/213,788호 및 미국 가출원 61/290,159호의 명세서 및/또는 도면에 기재되는 내용을 포함한다.

발명의 효과

- [0077] 본 발명에 의해 생식 세포나 초기배(初期胚)를 이용하는 일 없이 한편, 외래 유전자의 도입이나 특정 화합물의 도입 등의 인위적인 유도 조작을 경과하지 않고, 생체조직으로부터 다능성 줄기세포를 얻을 수 있다. 외래 유전자의 도입 등의 인위적 조작을 경과하지 않기 때문에 본 발명의 다능성 줄기세포는 효율적으로 제작하는 것이 가능하여 치료에 이용할 경우여도 안전하게 이용할 수 있다. 또한 본 발명의 다능성 줄기세포는 재생의 료나 기능 부전조직(不全組織)의 치료 등에 이용할 수 있고, 게다가 세포분화나 조직 재생의 연구 등에 이용할 수 있다.

[0078] 본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특히 및 특허출원을 그대로 참고로서 본명세서에 넣는 것으로 한다.

도면의 간단한 설명

- [0079] 도 1a는 세포분획, Muse세포 및 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 관계를 나타낸 도면이다. 도 1에 나타낸 바와 같이 SSEA-3 양성세포(陽性細胞)를 직접 분리하고, 장시간의 스트레스를 거는 일 없이 부유 배양(浮遊培養)함으로써 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 얻을 수 있다.
- 도 1b는 Muse세포를 대량으로 증식시키는 방법을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/무처리(無處理) 세포분획에서의 발현량의 비가 높은 인자를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/인간 ES세포에서의 발현량의 비가 높은 인자를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 MACS소팅(sorting)의 프로토콜을 나타낸 도면이다.

도 5는 트리판블루 염색상(染色像)에서 죽은 세포의 제거를 나타낸 사진으로서, a는 인간 섬유아세포(H-fibroblast) 분획의 16시간의 장시간 트립신(try psin) 처리후의 트리판블루 염색상(染色像)에서 죽은 세포의 제거를 나타낸 사진이고, b는 1800 ? 2200rpm/분으로 3분간 보텍스(vortex) 처리를 한 후의 트리판블루 염색상(染色像)에서 죽은 세포의 제거를 나타낸 사진이다.

도 6은 각종 세포의 사진으로서, a는 부(富) Muse세포 분획 중 1세포(Bar = 10 μm)를 나타낸 사진이고, b는

인간 ES세포 유래의 배양체세포(胚樣體細胞) 덩어리(Bar = 25 μm)를 나타낸 사진이며, c는 직경 약25 μm의 Muse세포 유래의 배양체세포(胚樣體細胞) 덩어리(Bar = 25 μm)를 나타낸 사진이고, d는 인간 ES세포 유래 세포덩어리 4일째의 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색상(染色像; Bar = 25 μm)를 나타낸 사진이며, e ? g는 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 Oct3/4(e), Sox2(f) 및 PAR4(g)의 면역 염색상(染色像)을 나타낸 사진이다.

도 7a는 H-fibroblast 분획 및 인간 MSC(H-MSC) 분획 유래의 세포덩어리의 특징을 나타낸 사진으로서, a 및 b는 무처리(無處理) 인간 MSC 분획의 통상의 접착 배양에 있어서 자발적으로 생긴 세포덩어리(Bar = 100 μm)를 나타내고, c 및 d는 0일째(c) 및 7일째(d)의 H-fibroblast-1 분획의 장시간 트립신(trypsin) 처리후의 MC배양의 상태를 나타내며(Bar = 100 μm), (d)의 화살표는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 나타내고, e 및 f는 MC배양 7일후의 H-fibroblast-1 분획으로부터 형성된 Muse세포 유래 배양체세포(胚樣體細胞) 덩어리를 나타낸다(Bar = 50 μm).

도 7b는 H-fibroblast 분획 및 인간 MSC(H-MSC) 분획 유래의 세포덩어리의 특징을 나타낸 사진으로서, g ? l은 H-fibroblast 분획으로부터 형성된 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(g, i 및 k) 및 H-MSC 분획으로부터 형성된 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(h, j 및 l)의 Nanog(g 및 j), Oct3/4(h), SSEA-3(i), PAR4(k) 및 Sox2(l)의 국(局) 존재를 나타내는 면역염색의 결과를 나타낸다(Bar = 50 μm).

도 7c는 H-fibroblast 분획 및 인간 MSC(H-MSC) 분획 유래의 세포덩어리의 특징을 나타내는 사진으로서, m ? o는 인간 ES세포(m), H-fibroblast 분획 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(n) 및 무처리(無處理) H-fibroblast-1 분획(o)의 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색의 결과를 나타낸다(Bar = 50 μm).

도 7d는 H-fibroblast 분획 및 인간 MSC(H-MSC) 분획 유래의 세포덩어리의 특징을 나타낸 전자현미경 사진으로서, p ? r은 인간 ES세포 배양체(胚樣體)(p, MC배양 3일째), H-fibroblast-1 분획 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(q 및 r, MC배양 5일째)의 전자현미경상을 나타낸다(Bar = 5 μm).

도 8a는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(M-cluster)의 클론성(clonality) 및 셀프 리뉴얼을 나타내는 도면이며, Muse세포의 클론성(clonalit y) 및 셀프 리뉴얼을 결정하기 위해 실행한 실험의 개요를 나타낸 도면이다.

도 8b는 Muse세포의 부유세포(浮遊細胞)에 있어서의 증식 속도를 나타낸 도면이다.

도 8c는 단일의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(H-fibroblast-1 유래, 제1세대(사이클)로부터 증식한 세포(clonally expanded cells)의 정상핵형(正常核型)을 나타낸 도면이다.

도 9a는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 분화를 나타낸 도면으로서, a ? c는 H-fibroblast-1 분획 유래의 분화 세포의 덩어리의 α 평활근 액틴(actin) 및 신경 필라멘트(a 및 b) 및 α-페토프로테인(c)의 국(局) 존재를 나타낸 면역염색상(免疫染色像)이다(Bar는 a가 500 μm, b 및 c가 50 μm). a의 화살표 머리는 접착한 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 나타낸다.

도 9b는 무처리(無處理) 세포분획, H-fibroblast 분획 유래의 제1 및 제3세대의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(Cluster)를 젤라틴(gelatin)상에서 배양해 자발적 분화를 유도한 세포군에 있어서의 α-페토프로테인(α-FP), GATA6, MAP-2 및 Nkx2.5 발현의 RT-PCR 분석의 결과를 나타낸다. 양성 컨트롤로서는 α-FT에 대하여 인간 태아 간장을, GATA6, MAP-2 및 Nkx 2.5에 대하여는 인간 배(胚) 전체를 채용했다.

도 9c ? l은 부(富) Muse세포 분획을 투여한 면역부전(免疫不全) 마우스의 정소(精巢)를 나타낸다. e는 컨트롤(intact)이 되는 무상(無傷)의 정소(精巢) 및 마우스 ES세포(mES cells)(8주), MEF[피더(feeder)세포](8주), Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(M-cluster)(6개월) 및 부(富) Muse세포 분획(Muse) (6개월)을 투여한 정소(精巢)를 나타낸다. f ? l은 부(富) Muse세포 분획 또는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 투여한 정소(精巢) 조직의 신경 필라멘트(f, 사진에서는 초록으로 염색), α-페토프로테인(g, 사진에서는 초록으로 염색) 및 평활근 액틴(actin)(h, 도면에서는 빨강으로 염색)의 면역염색상(免疫染色像)을 나타낸다(Bar = 50 μm). i의 3장의 패널은 인간 미토콘드리아(초록으로 염색) 및 평활근 액틴(actin)(빨강으로 염색)의 이중 염색상(染色像)을 나타낸다 (Bar = 20 μm). j ? l은 부(富) Muse세포 분획을 투여한 정소(精巢)의 조직상(組織像)을 나타낸다(j 및 k). k에 인정을 받는 튜브 모양의 구조는 인간 미토콘드리아에 대한 항체로 염색되어 있다 (Bar는 j가 500 μm, k ? l이 50 μm).

도 10a는 H-fibroblast(Fibro-1, Fibro-2) 및 H-MSC(MSC-1, MSC-2)의 pluripotency 및 미분화 세포상태에 관

여하는 인자의 정량PCR의 결과를 나타낸 도면이다(그의 2). 도면 중 열(column)의 모양은 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(7일째)의 무처리(無處理) 세포분획에 비교한 유전자 발현 레벨을 나타낸다. 흰 부분은 부(富) Muse세포군 또는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/무처리(無處理) 세포분획의 비가 1/3보다 크고 3보다 작은 것을 나타내고, 회색(gray) 부분은 부(富) Muse세포 분획 또는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/무처리(無處理) 세포분획의 비가 3보다 큰 것을 나타내며, 사선부분은 부(富) Muse세포 분획 또는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/무처리(無處理) 세포분획의 비가 1/3보다 작은 것을 나타낸다.

도 10b는 H-MSC 유래의 무처리(無處理) 세포분획(Naive), 부(富) Muse세포분획(Muse) 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(M-cluster)(7일째)의 텔로미라아제(telomerase) 활성을 나타낸 도면이다. 열 불활성화 샘플(Heat)을 음성(陰性) 컨트롤로서 이용했다.

도 11은 H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 무처리(無處理) 세포분획, 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 DNA마이크로 어레이 분석의 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 인간 골수의 단핵 구성분(球成分)으로부터 SSEA-3/CD 105 이중 양성세포(陽性細胞)로서 직접 채취한 Muse세포를 MC배양하여 형성된 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 나타낸 사진으로서, a는 인간 골수로부터 단리(單離)하여 8시간의 장시간 트립신(trypsin) 처리를 한 단핵세포 분획을 MC배양하여(8hr-hBM-MC, 7일) 형성된 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 나타낸다(Bar = 100 μm). b는 8hr-hBM-MC(7일)에 의해 형성된 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색상(染色像)을 나타낸다(Bar = 50 μm).

도 13은 무처리(無處理) H-MSC-1 분획(naive1), 무처리(無處理) H-MSC-2 분획(naive2)(어느 것도 네가티브 컨트롤), 및 8시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 인간골수 유래 단핵세포 분획(8hr-hBM) 혹은 트립신(trypsin) 처리를 하지 않은 인간골수 유래 단핵세포 분획(naive hBM)으로부터 형성된 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 젤라틴(gelatin) 상에서 배양해 자발적 분화를 유도한 세포군에 있어서의 α-페토프로테인(α-FP), GATA6, MAP-2 및 Nkx 2.5의 RT-PCR 분석의 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 H-fibroblast 분획(무처리 세포) 및 H-MSC 분획(무처리 세포)의 FACS 분석의 결과를 나타내는 도면이다.

도 15a는 무처리 세포 분획 중의 SSEA-3 양성세포(a 왼쪽) 및 FACS 소팅(sorting)에 의해 채취한 SSEA-3 양성 세포 유래의 단일 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 클론(clone) 증식한 SSEA-3 양성세포(a 오른쪽)의 염색상(染色像)을 나타낸 사진이다. 도면 중 Bar는 100 μm이다.

도 15b는 Muse세포(H-fibroblast)의 세포분열 중의 비대칭 분열에 영향을 미치는 인자인 Numblike(녹색)의 국(局) 존재를 나타내는 염색상(染色像)을 나타낸 사진이다. 도면 중 Bar는 10 μm이다.

도 15c는 H-fibroblast 유래의 SSEA-3 음성세포(c) 및 SSEA-3 양성세포(d)의 전자현미경사진이다. 도면 중 Bar는 5 μm이다.

도 15d는 H-fibroblast 유래 Muse세포의 Oct3/4(녹색)(e), Sox2(녹색)(f) 및 SSEA-3(적색)(g)의 염색상(染色像)을 나타낸 사진이다.

도 16a는 초면역(超免疫) 부전(不全) 마우스(Nog 마우스) 손상 조직에 있어서의 GFP 표식 SSEA-3 양성 Muse세포 분획의 분화를 나타낸 사진이다. N 및 O는 암박 손상 척수(4주일후)에 있어서의 GFP 양성세포이며, 신경 필라멘트(neurofilament; 적색) 및 인간 골지(golgi) 복합체(백색)가 발현되어 있다. O는 N의 사각으로 둘러싼 부분의 확대 상이다. P는 손상간장(損傷肝臟; 4주일후)의 GFP 양성 표식세포이며, 인간 알부민(적색) 및 인간 골지(golgi) 복합체(백색)가 발현되어 있다.

도 16b는 RT-PCR에서 조사한 SSEA-3 양성 Muse세포를 이식한 간장(肝臟)에 있어서의 인간 알부민의 발현을 나타낸 사진이다.

도 16c는 초면역(超免疫) 부전(不全) 마우스(Nog마우스) 손상 조직에 있어서의 GFP 표식 SSEA-3 양성 Muse세포 분획의 분화를 나타낸 사진이며, 인간 디스트로핀(dystrophin; 적색)이 발현되고 있는 근육(3주일후)의 GFP 양성세포를 나타낸 사진이다.

도 17a는 단일 Muse세포로부터 형성된 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 증식시킨 세포의 분화를 나타내는 사진으로서, A?D는 신경유도의 결과를 나타내고, A는 형성된 sphere를 나타내며, 더욱이

shpere의 면역 염색 데이터로서 A는 네스틴(nestin), B는 Musashi, C는 NuroD의 발현을 나타낸다. E는 이들 sphere를 더욱 신경계 세포로의 분화를 시킨 것이고, MAP-2 양성세포를 나타낸다. F?G는 뼈세포 유도의 결과를 나타내며, 오스테오칼신(osteocalcin; F) 및 ALP(G)의 발현을 나타낸다. H 및 I는 지방세포 유도의 결과를 나타내고, H는 기름방울을 포함하는 세포를 나타내며, I는 오일 레드(oil red) 염색의 결과를 나타낸다. J는 간장세포(肝臟細胞) 유도의 결과를 나타내고, α -페토프로테인(α -fetoprotein) 양성세포를 나타낸다.

도 17b는 RT-PCR에서 조사한 간세포(肝細胞) 유도한 세포에 있어서의 인간 알부민 및 인간 α -페토프로테인의 발현을 나타낸 사진이다.

도 18a는 RT-PCR에서 조사한 SSEA-3 양성 Muse세포에 있어서의 Sox10, Sna i11, Slug, Tyrp1 및 Dct의 발현을 나타낸 사진이다.

도 18b는 FACS에서 분석한 NG2, CD34, vWF, CD117, CD146 및 CD271의 발현을 나타낸 도면이다. 무처리(無處理) 인간 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞)에 있어서, 주피세포(周皮細胞; pericyte) 마커(marker)인 NG2, 내피(內皮) 전구세포(前驅細胞) 마커(marker)인 CD34 및 vWF는 음성이며, SSEA-3 양성세포에서도 음성이었다. 멜라노블래스트(melanoblast) 마커(marker)인 CD117, 주피세포(周皮細胞; pericyte) 마커(marker)인 CD146, NCSC 마커인 CD271은 무처리(無處理) 인간 피부선(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞)에서는 조금 양성세포가 인정을 받았지만(각각 0.2%, 0.2% 및 0.8%), 그것들은 SSEA-3 음성세포이었기 때문에 Muse세포가 아니라고 생각된다.

도 18c는 Muse세포가 페라이트(ferrite)를 탐식(貪食)한 것을 나타낸 도면이다.

도 19는 Muse세포로부터 제작한 iPS세포의 형성을 나타낸 사진이며, a는 피부선(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞; NHDF) 유래 Muse세포로부터 유도된 인간 iPS세포의 형태를 나타내고, b?f는 다능성 세포 마커(b가 Nonog, c가 Oct3/4, d가 Sox2, e가 SSEA-3, f가 Tra-1-60)의 발현을 나타낸다.

도 20은 Nonog(E), Oct3/4(F), Sox2(G) 및 Tra-1-81(H)의 면역 조직화학(組織化學)의 결과를 나타낸 사진이다.

도 21은 Muse 유래 iPS세포(Mi-1, Mi-2) 및 SSEA-3 음성세포로부터 증식한 콜로니((-)-1, (-)-2)의 RT-PCR에 의해 조사한 다능성 마커(marker)의 발현을 나타낸 사진이다.

도 22a는 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myse를 레트로바이러스(retrovirus)에서 도입하고, 그 후 피더(feeder) 세포 MEF 상에서 배양한 30일후의 SSEA-3 양성 및 음성세포로부터 형성된 콜로니의 Tra-1-81 면역 염색의 결과를 나타낸 사진이다. 인간 ES세포를 컨트롤로서 이용하고 있다. SSEA-3 양성세포로부터의 콜로니(a1) 및 인간 ES세포(a2)는 Tra-1-81 양성이지만, SSEA-3 음성세포로부터의 콜로니는 모두 음성이다.

도 22b는 22-1과 같이 MEF에서 30일 배양한 단계에 있어서의 SSEA-3 양성 및 음성세포의 다능성 마커[내인성 Oct3/4(endo Oct), 내인성 Sox2(endo Sox2), Na nog, 내인성 Klf4(endo Klf4), Rex1 및 UTF1]의 발현을 나타낸 사진이다. SSEA-3 음성 세포군에서는 Sox2, Nanog의 시그널이 보이지 않는다.

도 22c는 Muse세포로부터 유도한 iPS세포(Muse세포 유래 iPS세포)(C 및 C1) 및 SSEA-3 음성세포로부터 증식한 콜로니(D 및 D1)의 콜로니를 나타낸 사진이다.

도 23a는 피부선(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞; NHDF) 유래 Muse세포로부터 유도된 iPS세포의 in vitro에서의 분화의 모양을 나타낸 사진이다. i는 내배엽 마커인 α -페토프로테인(녹색) 및 중배엽(中胚葉) 마커인 평활근액틴(actin; 적색, 청색은 DNA)의 발현을 나타내고, j는 외배엽 마커인 신경 필라멘트(녹색)의 발현을 나타낸다.

도 23b는 Muse세포로부터 유도된 iPS세포의 in vitro에서의 분화의 RT-PCR 분석 결과를 나타낸 도면이며, 3배 엽 마커의 발현을 나타냈다.

도 23c는 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞; NHDF) 유래 Muse세포로부터 유도된 iPS세포로부터 형성된 기형 종(teratomas)의 조직 구조를 나타낸 사진이며, HE(Hematoxylin 및 eosin)염색에 의해 iPS세포가 각종 조직에 분화되어 있는 것을 나타내고 있다. m은 연골(cartilage), n은 근육(Muscle), o는 신경상피(neural epithelium), p는 색소상피(pigmented epithelium), q는 원주상피(columnar epithelium)을 나타낸다.

도 24는 SSEA-3 음성 세포분획, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 Muse 유래 iPS세포의 Nanog 유전자 및 Oct3/4 유전자의 Bisulfite(아황산수소염) 시퀀스(order)의 결과를 나타낸 도면이다. 각각의 칼럼

(column)의 수치는 전사(轉寫) 시작 부위(TSS)의 하류에 대한 CpG의 위치를 나타낸다. 흰색 원(白丸)은 메틸화되지 않고 있는 시토신(cytosine)을, 검은 원(黑丸)은 메틸화된 시토신(cytosine)을 나타낸다.

도 25는 무처리(無處理) 섬유아세포(纖維芽細胞; Naive), Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(Cluster) 및 iPS세포 중의 세포주기에 관련된 인자의 정량 PCR의 결과를 나타낸 도면이다. 「/Naive」에서 나타낸 칼럼(column) 중 흰색 칼럼은 무처리(無處理) 세포에 대한 Muse분획 또는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리와의 비가 2 미만으로 1/2보다 큰 것을 나타낸다. 또 빈틈없이 칠된 칼럼은 비가 2보다 큰 것을 나타내고, 사선이 쳐진 칼럼은 비가 1/2보다 작은 것을 나타낸다. 「/iPS」에서 나타낸 칼럼 중「*」은 발현된 유전자의 양이 iPS보다 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에서 큰 것을 나타내고, 「**」은 발현된 유전자의 양이 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리보다 iPS에서 큰 것을 나타낸다.

도 26은 무처리(無處理) 섬유아세포(纖維芽細胞; Naive), Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(Cluster) 및 iPS세포 중의 다능성 및 미분화 세포상태에 관련된 인자의 정량 PCR의 결과를 나타낸 도면이다. 각 칼럼의 의미는 도 25와 같다.

도 27은 인간 및 마우스 모델에 있어서 제작된 iPS세포주의 유도 효율에 관한 논문보고를 정리한 도면이다. 도 27은 핵의 리프로그래밍(reprogramming)을 유도하는 전사(轉寫) 인자의 편성을 나타내고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080]

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0081]

본 발명은 생체의 생체조직으로부터 직접 얻을 수 있는 다능성(pluripotent)줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획 및 그 다능성 줄기세포 또는 그 다능성 줄기세포획 분획을 단리(單離)하는 방법, 및 그 방법에 의해 얻어진 생체조직 유래의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획이다. 본 발명의 다능성 줄기세포를 Muse세포(multilineage differentiating stress enduring cells)라고 말한다.

[0082]

본 발명에 있어서, 세포분획이라고 할 때는 단리(單離)하고 싶은 세포를 적어도 일정량 포함하는 세포군을 말한다. 예를 들면 다능성 줄기세포 분획으로는 다능성 줄기세포를 1%이상, 10%이상, 30%이상, 50%이상, 70%이상, 90%이상 또는 95%이상 포함하는 세포군을 들 수 있고, 다능성 줄기세포의 배양에 의해 얻어진 세포덩어리나 다능성 줄기세포를 농축한 세포군을 포함한다. 또한 상기 세포분획을 실질적으로 균일한 세포분획이라고 하는 것도 있다.

[0083]

생체(生體)는 포유 동물의 생체를 좋은, 어느 정도 발생이 진행한 동물체(動物體)를 말한다. 본 발명에 있어서 생체로는 수정란이나 포배기보다 발생 단계가 앞의 배(胚)는 포함되지 않지만, 태아나 포배를 포함하는 포배기 이후의 발생 단계의 배(胚)는 포함된다. 포유 동물은 한정되지 않지만, 예를 들면 인간, 원숭이 등의 영장류(靈長類), 생쥐(mice), 쥐(rats), 토끼(rabbits), 모르모트(guinea pigs) 등의 설치류, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 말, 당나귀, 염소, 페렛(ferrets) 등이 포함된다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 생체의 조직 유래인 점에서 배성간(胚性幹)세포(ES세포)나 배성생식(胚性生殖) 줄기세포(EG세포)로 명확히 구별된다.

[0084]

중배엽계(中胚葉系) 조직으로는 동물의 초기 발생 도상(途上)으로 나타나는 중배엽(中胚葉) 기원의 조직이 좋은, 근육계 조직, 결합조직, 순환계 조직, 배설계 조직, 생식계 조직 등이 포함된다. 예를 들면 본 발명의 다능성 줄기세포는 골수액이나 진피(眞皮) 결합조직 등의 피부조직으로부터 얻을 수 있다.

[0085]

간엽계(間葉系) 조직으로는 뼈, 연골, 지방, 혈액, 골수, 골격근(骨格筋), 진피(眞皮), 인대, 힘줄(腱), 심장 등의 조직을 말한다. 예컨대 본 발명의 다능성 줄기세포는 골수나 피부로부터 얻을 수 있다. 또한 텃줄로부터 얻을 수도 있다.

[0086]

세포가 조직으로부터 직접 얻을 수 있는 것이라 함은 조직으로부터 단리(單離) 할 수 있고, 외래 유전자나 외래 단백질의 도입 또는 화합물의 투여 등 화합물처리 등의 인위적인 유도 조작을 경과하지 않고 얻을 수 있는 것을 의미한다. 여기서 외래 유전자는 한정되지 않지만, 예를 들면 체세포의 핵을 초기화할 수 있는 유전자가 좋은 예컨대 Oct3/4유전자 등의 Oct 패밀리 유전자, Klf 유전자 등의 Klf 패밀리 유전자, c-Myc 유전자 등의 Myc 패밀리 유전자, Sox2 유전자 등의 Sox 패밀리 유전자를 들 수 있다. 또 외래 단백질로서는 이들의 유전자가 코드 하는 단백질이나 사이토카인(cytokine)을 들 수 있다. 게다가 화합물로서는 예를 들면 상기한 체세포의 핵을 초기화할 수 있는 유전자의 발현을 유도하는 저분자 화합물이나 DM SO, 환원제로서 기능하는 화합물, DNA 메틸화제 등을 들 수 있다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 생체 혹은 조직으로부터 직접 얻을 수 있다고 하는 점에서 iPS(induced pluripotent stem cell)세포 및 ES세포와는 명확히 구별된다. 한편 본 발명에 있어

서는 세포의 배양, 세포의 표면 마커(marker)를 지표로 세포 또는 세포분획을 단리(單離)하는 것, 세포를 세포 스트레스에 폭로(暴露)하는 것 및 세포에 물리적 충격을 주는 것은 인위적인 유도 조작에는 포함되지 않는다. 또 본 발명의 다능성세포는 리프로그래밍(reprogramming) 또는 탈(脫) 분화의 유도를 필요로 하지 않고 얻을 수 있는 것을 특징으로 하여도 좋다.

[0087] 본 발명의 다능성 줄기세포는 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등에 존재하고 있다고 생각되어 본 발명에 있어서는 이들 조직에 존재하고 있는 세포 또는 세포분획을 단리(單離) 한다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 예를 들면, 골수에 존재하고 있어 골수로부터 혈액 등을 통해서 생체의 각 조직에 공급될 가능성이 있다. 이 때문에 골수나, 피부 등의 생체의 각 조직, 더욱이 혈액으로부터 단리(單離)하는 것이 가능하다.

[0088] 다능성 줄기세포로는 pluripotency를 갖는 세포가 좋은, 이하의 특성을 갖는다.

(1) Nanog, Oct3/4, SSEA-3, PAR-4 및 Sox2 등의 다능성 마커(Pluripotent marker)를 발현한다.

(2) 1세포로부터 증식하고, 자기의 클론(clone)을 계속해서 만드는 클론성(Clonality)을 갖는다.

(3) 자기복제(셀프 리뉴얼) 능력을 갖는다.

(4) 3배엽계(내배엽계, 중배엽계 및 외배엽계)에로 in vitro 및 in vivo에서 분화될 수 있다.

(5)마우스의 정소(精巢)나 피하에 이식한 경우 3배엽계에로 분화를 보인다.

(6)알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색으로 양성이 된다.

[0095] 본 발명의 다능성 줄기세포는 pluripotency를 갖고 있는 점에서 성인 줄기세포, 조직 줄기세포와는 명확히 구별된다. 또 본 발명의 다능성 줄기세포는 pluripotency를 갖고 있는 단일의 또는 복수의 세포로서 단리(單離)되어 있는 점에서 골수 간엽계(間葉系) 세포 등의 세포분획과는 명확히 구별된다.

[0096] 게다가, 본 발명의 다능성 줄기세포는 이하의 특성을 갖는다.

[0097] (i) 증식속도가 비교적 완만해서 분열 주기가 1일 이상, 예를 들면 1.2 ?1.5일이다. 단, ES세포나 iPS세포가 나타내는 것 같은 무한증식은 나타내지 않는다.

[0098] (ii) 면역부전(免疫不全) 마우스에 이식한 경우에 내배엽계(內胚葉系), 중배엽계(中胚葉系) 및 외배엽계(外胚葉系)에로의 분화를 나타낸다. ES세포나 iPS세포에서는 기형종(奇形腫; teratomas)이 단기간에 암화(癌化)하는데 비해 반년 이상 암화(癌化)하지 않는 것을 특징으로 한다.

[0099] (iii) 부유 배양에 의해 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성한다.

[0100] (iv) 부유 배양에서 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성하고, 10일 정도에서 증식이 정지한다. 그 후 접착 배양으로 이동시킴으로써 재증식한다.

[0101] (v) 증식할 때에 비대칭 분열을 따른다.

[0102] (vi) 핵형은 정상이다.

[0103] (vii) 텔로머라아제(telomerase) 활성이 없거나 또는 낮다. 여기서 텔로머라아제(telomerase) 활성이 없거나 또는 낮다고 하는 것은 예를 들면 TRAPEZE XL telomerase detection kit(Millipore사)를 이용해서 텔로머라아제(telomerase) 활성을 검출한 경우에 검출할 수 없거나 또는 낮은 것을 말한다. 텔로머라아제(telomerase) 활성이 낮다고 하는 것은 예컨대 인간 섬유아세포(纖維芽細胞)와 같은 정도의 텔로머라아제(telomerase) 활성을 갖고 있거나 혹은 HeLa세포에 비해서 1/5 이하, 바람직하게는 1/10 이하의 텔로머라아제(telomerase) 활성을 갖고 있는 것을 말한다.

[0104] (viii) 메틸화의 상태에 대해서는 Muse세포로부터 유도한 iPS세포에 관해서는 Nanog 및 Oct3/4의 프로모터(promoter) 영역의 메틸화 레벨이 낮다.

[0105] (ix) 탐식(貪食) 능력이 높다.

[0106] (x) 종양성 증식을 나타내지 않는다. 여기서 종양성 증식을 나타내지 않는 것은 부유 배양을 했을 경우, 일정한 크기의 세포덩어리(클러스터)에 달하면 증식이 정지하고 무한증식하지 않는 것을 말한다. 또 면역부전(免疫不全) 마우스의 정소(精巢)에 이식해도 기형종(奇形腫)을 형성하지 않는 것이다. 또한 상기(i) ? (iv) 등도 종양성 증식을 나타내지 않는 것에 관련된다.

- [0107] 즉, 본 발명의 세포는 예를 들면 아래의 다능성 줄기세포이다.
- [0108] (A) 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등으로부터 얻을 수 있는 세포이며, 해당 세포 내에 화학물질, 외래 유전자 또는 외래 단백질을 도입할 일 없이 직접 얻을 수 있는 다능성 줄기세포.
- [0109] (B) 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등이 골수, 피부, 혈액, 텃줄, 지방 등으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 상기(1)의 특성을 갖는 다능성 줄기세포.
- [0110] (C) 리프로그래밍(reprogramming) 또는 탈(脫) 분화를 유도하는 일 없이 얻을 수 있는 상기(A) 또는 (B)의 다능성 줄기세포.
- [0111] (D) 정소(精巢)에로 이식한 경우에 적어도 반년간은 암화(癌化)하지 않는 상기(A) 또는 (B)의 다능성 줄기세포.
- [0112] (E) ES세포, iPS세포와 같이 무한증식을 나타내지 않는 상기(A) 또는 (B)의 다능성 줄기세포.
- [0113] (F) 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등 유래의 다능성 줄기세포이며, 생체의 중간층계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직등의 세포를 프로테아제(protease)로 처리했을 때에 살아남는 프로테아제(protease)에 내성인 다능성 줄기세포.
- [0114] 게다가 본 발명의 다능성 줄기세포는 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등의 세포에 세포 스트레스를 걸어 살아 남은 세포를 회수함으로써 단리(單離) 할 수 있다. 여기서 세포 스트레스로는 외적 스트레스가 좋은, 프로테아제(protease) 처리, 저산소 조건하에서의 배양, 저인산 조건하에서의 배양, 혈청(血清) 기아상태(飢餓狀態)에서의 배양, 당(糖) 기아상태(飢餓狀態)에서의 배양, 방사선 폭로(暴露) 하에서의 배양, 열쇼크에의 폭로(暴露) 하에서의 배양, 유해물질 존재하에서의 배양, 활성산소 존재하에서의 배양, 기계적 자극하에서의 배양, 압력처리하에서의 배양 등에 의해 스트레스에 폭로하는 것을 말한다. 이 중에서도 프로테아제 처리 즉, 프로테아제(protease) 존재하에서의 배양이 바람직하다. 프로테아제(protease)는 한정되지 않고, 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin) 등의 세린(serine) 프로테아제, 펩신 등의 아스파라긴산 프로테아제, 파파인(papain), 키모파파인(chymopapain) 등의 시스테인(systeme) 프로테아제, 서물리신(thermolysin) 등의 금속 프로테아제, 글루타민산(Glutamic acid) 프로테아제, N- 말단(末端) 트레오닌(threonin) 프로테아제 등을 이용할 수 있다. 프로테아제를 배양에 첨가할 때의 첨가 농도는 한정되지 않고, 일반적으로 살례(petri dish) 등으로 배양한 부착 세포를 벗겨낼 때에 이용하는 농도로 이용하면 좋다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 상기 외적 스트레스에 내성을 갖는 줄기세포 예를 들면, 트립신(trypsin)에 내성을 갖는 세포라고 할 수 있다.
- [0115] 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등은 한정되지 않고, 골수단핵세포, 피부세포 등의 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획, 치수조직(齒髓組織), 안구조직, 모근조직 등이 포함된다. 세포로서는 배양세포도 조직으로부터 채취한 세포도 이용할 수도 있다. 이 중에서도 골수세포, 피부세포가 바람직하고, 예컨대 인간 골수 간엽계(間葉系) 세포(MSC) 분획 또는 인간 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획을 들 수 있다. 골수 간엽계(間葉系) 세포분획은 골수천자액(骨髓穿刺液)을 2~3주일 배양함으로써 얻을 수 있다.
- [0116] 상기의 각종 스트레스를 받은 조직 세포의 대부분은 사멸하고, 살아남은 세포 중에 본 발명의 다능성 줄기세포가 포함된다. 세포에 스트레스를 건 뒤, 죽은 세포를 제거할 필요가 있지만, 프로테아제를 이용했을 경우는 이들의 죽은 세포는 프로테아제의 작용에 의해 분해된다.
- [0117] 또한, 세포에 스트레스를 건 후에 세포에 물리적 충격을 주어 깨지기 쉬워진 세포를 제거해도 좋다. 물리적 충격은 예를 들면 심한 퍼펫팅(petting), 심한 휘저음, 보텍스(vortex) 등에 의해 줄 수 있다.
- [0118] 세포에 세포 스트레스를 걸고, 필요에 따라 물리적 충격을 준 후에 세포군을 원심분리에 걸어 살아남은 세포를 펠렛(pellet)으로서 얻어서 회수함으로써 본 발명의 다능성 줄기세포를 단리(單離) 할 수 있다. 또 이렇게 하여 얻어진 세포로부터 더욱이 아래의 표면 마커(marker)를 지표로 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離) 할 수도 있다.
- [0119] 또한, 외상이나 화상 등의 스트레스를 받은 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등을 배양하고, 유주(遊走)한 세포를 회수해도 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離) 할 수 있다. 상해를 받은 조직의 세포는 스트레스에 폭로(暴露)되므로 본 발명에 있어서는 상해를 받은 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등을 배양하는 것도 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 세포 등에 세포 스트레스를 건다고 한다.

- [0120] 하나의 예로서 이들 세포를 트립신(trypsin) 처리하는 방법에 대해서 설명한다. 이때의 트립신(trypsin) 농도는 한정되지 않지만 예를 들면 접착 세포의 통상의 배양에 있어서, 배양 용기에 접착한 접착 배양을 벗길 때에 이용하는 농도범위에서 이용하면 좋고, 0.1 ~ 1%, 바람직하게는 0.1 ~ 0.5%가 예시된다. 예컨대 10 ~ 50 만개의 세포를 포함하는 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등 유래의 세포를 상기 농도의 트립신(trypsin) 용액 5ml 중에서 인큐베이팅(incubating) 함으로써 외적 스트레스에 노출할 수 있다. 트립신(trypsin) 처리 시간은 5 ~ 24시간, 바람직하게는 5 ~ 20시간 정도이다. 본 발명에 있어서는 8시간 이상의 트립신(trypsin) 처리 예를 들면 8시간 또는 16시간의 처리를 장시간 트립신(trypsin) 처리라고 한다.
- [0121] 트립신(trypsin) 처리후 상기한 바와 같이 페펫팅(petting), 휘저음, 보텍스(vortex) 등에 의해 물리적 충격을 주는 것이 바람직하다. 그것은 죽은 세포 혹은 다 죽어 가고 있는 세포를 제거하기 위해서다.
- [0122] 트립신(trypsin) 처리후의 부유(浮遊) 배양의 때는 세포끼리의 응집을 막기 위해서 예를 들면, 메틸셀룰로오스 겔(methylcellulose gel) 등의 겔 중에서 인큐베이션(incubation) 하는 것이 바람직하다. 또, 세포의 배양 용기에의 부착을 막아 부유(浮遊) 상태를 유지하기 위해 용기를 Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) 등에서 코트(coat) 해 두는 것이 바람직하다.
- [0123] 외적 스트레스에 노출한 세포를 원심분리에 의해 모아 배양을 하면 세포덩어리(세포 클러스터)을 형성한다. 이 세포덩어리의 크기는 지름 25 μm으로부터 150 μm 정도이다. 본 발명의 다능성 줄기세포(Muse세포)는 이 외적 스트레스에 노출되어 살아 남은 세포집단 중에 농축한 상태로 포함된다. 이 세포집단을 부(富) Muse 세포 분획(Muse enriched population)이라고 부른다. 부(富) Muse 세포분획 중의 Muse세포의 존재 비율은 스트레스 처리의 방법에 의해 다르다.
- [0124] 이와 같이 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획이 스트레스를 견 후도 생존하는 것은 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획이 스트레스 내성인 것을 나타내고 있다.
- [0125] 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등 유래의 세포의 배양에 이용하는 배지, 배양 조건은 통상의 동물세포의 배양에 이용하는 배지, 배양 조건을 채용하면 좋다. 또, 공자의 줄기세포 배양용 배지를 이용해도 좋다. 배지로는 적당한 송아지(calf) 태아 혈청 등의 혈청이나 페니실린, 스트렙토마이신(streptomycin) 등의 항생 물질 및 각종 생리 활성물질을 첨가해도 좋다.
- [0126] 게다가, 본 발명은 본 발명의 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등으로부터 직접 얻을 수 있는 다능성 줄기세포의 파생세포 또는 유도세포인 다능성 줄기세포도 포함한다. 파생세포 또는 유도세포로는 상기 다능성 줄기세포를 배양해서 얻을 수 있는 세포 또는 세포군 혹은 상기 다능성 줄기세포에 의해 유전자의 도입 등 인위적인 유도 조작을 해 얻을 수 있는 세포가 좋은 자손세포(子孫細胞)도 포함한다. 한편, 본 발명 시점에 있어서 보고되어 있는 iPS 세포는 피부(皮膚線) 섬유아세포(纖維芽細胞) 등 생체조직의 분화한 세포에 의해 유전자 도입 등을 함으로써 리프로그래밍(reprogramming) 한 결과, 다능성 줄기세포에 유도된 세포라고 하고 있어 본 발명의 조직으로부터 직접 얻을 수 있고, 이미 다능성 줄기세포로서의 성질을 갖는 세포에 의해 유전자 도입 등의 인위적인 유도 조작을 하여 얻을 수 있었던 세포는 iPS세포와 구별된다.
- [0127] 본 발명의 다능성 줄기세포를 부유 배양함으로써 배양체양(胚樣體樣)(Embryoid body(EB body)-like) 세포덩어리를 얻을 수 있지만, 본 발명은 이 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 배양체양(胚樣體樣)에 포함되는 세포도 포함한다. 배양체(胚樣體)는 본 발명의 다능성 줄기세포를 부유 배양함으로써 세포덩어리로서 형성된다. 이때 본 발명에 있어서는 본 발명의 다능성 줄기세포를 배양함으로써 얻어지는 배양체(胚樣體)를 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리라고 부를 수 있다[M클러스터(M-cluster)라고 부를 수도 있다]. 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성하기 위한 부유 배양의 방법으로서 메틸 셀룰로오스(cellulose) 등의 수용성 폴리머를 함유한 배지를 이용한 배양(Nakahata, T. et al., Blood 60, 352- 361(1982))이나 행잉 드롭(hanging drop) 배양(Keller, J. Physiol. (Lond) 168: 131-139, 1998) 등을 들 수 있다. 본 발명은 상기 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 셀프 리뉴얼해서 얻어진 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 포함되는 세포 및 다능성 줄기세포도 포함한다. 여기서 셀프 리뉴얼로는 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 포함되는 세포를 배양하고, 다시 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성시키는 것을 말한다. 셀프 리뉴얼은 1?복수회의 사이클을 되풀이하면 좋다. 또 본 발명은 상기 어느 것인가의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 포함되는 세포로부터 분화한 세포 및 조직도 포함한다.
- [0128] 도 1a에 간엽계(間葉系) 세포[인간 섬유아세포(纖維芽細胞), 인간 골수 간엽계(間葉系) 세포, 신선골수액(新鮮骨髓液)] 분획과 Muse세포 및 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 관련을 나타낸다. 간엽계(間葉系) 세포양(細胞 樣) 세포덩어리에 장시간 트립신(trypsin) 처리(Long term trypsin incubation; LTT) 등

의 스트레스 자극을 주면, Muse세포가 농축되어 Muse세포를 많이 포함하는 세포분획을 얻을 수 있고[부(富) Muse세포 분획이라고 부른다], 그 세포분획 중의 Muse세포를 부유 배양하면 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 [Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리]을 얻을 수 있다. 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 젤라틴으로 코트한 배양접시에서 배양하면 3배엽(3胚葉)의 세포에 분화한다. 또, 도 1a에 나타낸 바와 같이 SSEA-3양성세포를 직접 분리하고, 장시간의 스트레스를 겪는 일 없이 부유 배양함으로써 Muse세포 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 얻을 수 있다.

[0129] Muse세포는 부유 배양으로 일단 증식이 정지하여도 접착 배양으로 옮김으로써 증식을 시작한다. 부유 배양-접착 배양-SSEA-3발현을 지표로 한 분리를 되풀이함으로써 Muse세포를 대량으로 증식시키는 것이 가능하다(도 1b).

[0130] 게다가 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획은 생체조직으로부터 세포 스트레스에 폭로(暴露)하지 않고 직접 단리(單離) 할 수도 있다. 즉, 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획은 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등으로부터 외래 유전자를 도입하는 일 없이 유도 조작없이 이하의 방법으로 단리(單離) 할 수 있다.

[0131] 생체조직은 한정되지 않지만 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직, 예를 들면 골수, 피부, 텃줄 등을 들 수 있다. 골수를 이용할 경우, 골수의 단핵구(單核球) 분획을 이용할 수 있다. 단리(單離)는 Muse세포의 표면에 많이 발현되고 있는 세포표면 마커(maker)를 이용해서 할 수 있고, 예컨대 SSEA-3의 발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있다. 본 발명의 다능성 줄기세포를 SSEA-3 양성 Muse세포라고 할 것도 있다. 게다가, Muse세포는 간엽세포(間葉細胞) 마커(maker)인 CD105를 발현하고 있어 SSEA-3 양성이며, CD105 양성이다. 따라서 SSEA-3 및 CD105의 양쪽의 발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있다. 이 세포표면 마커(maker)를 이용함으로써 본 발명의 다능성 줄기세포를 단일세포로서 단리(單離) 할 수 있고, 단리(單離) 한 단일세포를 배양에 의해 증식시킬 수 있다. 한편 본 발명은 인간 이외의 포유 동물의 생체조직으로부터 SSEA-3에 상당하는 마커(maker)에 의해 단리(單離) 할 수 있는 다능성 줄기세포도 포함하는 것으로 한다.

[0132] 한편, Muse세포는 NG2, CD34, vWF(폰빌레브란트인자; von Willebrand factor), c-kit(CD117), CD146, CD271(NGFR)이 음성이다. 게다가 Sox10, Snai1, Slug, Tyrp1, Dct가 음성이다.

[0133] NG2, CD34, vWF, CD117, CD146, CD271 등의 표면항원이 음성인가 아닌가, 발현이 약한 것인가 아닌가는 이들 항원에 대한 항체이며, 발색효소, 형광 화합물 등으로 표식한 항체를 이용해서 세포가 염색된 것인가 아닌가를 현미경 관찰 등에 의해 결정할 수 있다. 예를 들면 이들 항체를 이용해서 세포를 면역 염색하고, 표면항원의 유무를 결정할 수 있고, 또 그 항체를 결합시킨 자성 비즈(beads)를 이용해도 결정할 수 있다. 또, FACS 또는 플로사이토 메타(flowcytometer)를 이용해도 표면항원이 있는 것인가 아닌가 결정할 수 있다. 플로사이토 메타(flowcytometer)로서는 예컨대 FACSaria(Becton Dickinson 사제), FACS vantage(Becton Dickinson 사제), FACS Calibur(Becton Dickinson 사제) 등을 이용할 수 있다.

[0134] 또, Sox10, Snai1, Slug, Tyrp1, Dct 등의 전사(轉寫) 인자에 관해서는 RT-PCR 등의 수법에 의해 발현을 조사할 수도 있다.

[0135] 이들의 표면항원이 음성으로는 상기한 바와 같이 FACS를 이용해서 분석했을 경우에 양성세포로서 소팅(sorting) 되지 않는 것 혹은 RT-PCR에 의해 발현을 조사했을 경우에 발현이 인정을 받지 않은 것이 좋은 이들 수법에 의해 검출할 수 없는 정도 발현되어 있었다고 하여도 본 발명에 있어서는 음성으로 한다. 또한 상기 마커(maker)가 양성인 것이 공지의 조혈 줄기세포 등의 세포와 동시에 측정을 하고, 이들 양성세포와 비교하고, 대부분 검출되지 않거나 혹은 유의로 발현량이 낮은 경우에 음성으로 하여도 좋다.

[0136] 본 발명의 세포는, 이들 세포표면의 항원특성에 근거해서 단리(單離) 할 수 있다.

[0137] 상기한 바와 같이 Muse세포는, SSEA-3 양성을 지표로 단리(單離) 할 수 있고, 더욱이 CD105의 발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있지만, 게다가 NG2, CD34, vWF(폰빌레브란트인자; von Willebrand factor), c-kit(CD117), CD146, CD271(NGFR), Sox10, Snai1, Slug, Tyrp1 및 Dct로부터 이루어지는 군으로서 선택되는 11개의 마커(maker) 가운데 적어도 1개, 예를 들면 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 11개의 마커(maker)의 비발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있다. 예를 들면 CD117 및 CD146의 비발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있고, 게다가, CD117, CD146, NG2, CD34, vWF 및 CD271의 비발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있고, 게다가 상기 11개의 마커(maker)의 비발현을 지표로 단리(單離) 할 수 있다.

[0138] 표면 마커(maker)를 이용해서 단리(單離) 할 경우 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직

등으로부터 1개 또는 복수개의 본 발명 다능성 줄기세포를 배양 등을 경과하는 일 없이 직접 단리(單離) 하는 것이 가능하다. 또, 본 발명의 다능성 줄기세포의 세포형태를 현미경 등을 사용해서 눈으로 봄으로써 동정(同定)하여 단리(單離) 할 수 있다.

- [0139] 생체의 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등에 세포 스트레스를 견 후에 생존한 세포군으로부터 표면 마커(maker)를 이용하여 단리(單離) 하여도 좋다.
- [0140] 또, 상기의 마커(maker)에 더하여 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획은 다른 특정한 인자의 고발현에 의해서도 특징 지울 수 있다.
- [0141] 무처리의 골수 간엽계(間葉系) 세포분획 또는 피부(皮膚) 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획으로부터 본 발명의 다능성 줄기세포인 Muse세포를 얻을 수 있고, 더욱 Muse세포를 배양함으로써 Muse세포 유래의 배양체(EB)양 세포덩어리를 얻을 수 있다. Muse세포, 무처리 세포, Muse 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 인간 ES세포에 있어서 발현되고 있는 인자를 비교 검토함으로써 Muse세포에서 고발현하고 있는 인자를 안다. 여기서 인자로는 유전자 전사(轉寫) 산물, 단백질, 지방질, 당을 포함한다.
- [0142] 도 2에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/무처리 세포에서의 발현량의 비가 높은 인자를 나타낸다. 특히 이하의 18개의 인자의 비교가 높다.
- [0143] (i) SSEA-3
- [0144] (ii) v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
- [0145] (iii) solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
- [0146] (iv) tyrosinase-related protein 1
- [0147] (v) Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
- [0148] (vi) chromosome 16 open reading frame 81
- [0149] (vii) chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
- [0150] (viii) protease, serine, 35
- [0151] (ix) kynureninase (L-kynurene hydrolase)
- [0152] (x) solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
- [0153] (xi) apolipoprotein E
- [0154] (x ii) synaptotagmin-like 5
- [0155] (x iii) chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
- [0156] (x iv) ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13
- [0157] (x v) angiopoietin-like 4
- [0158] (x vi) prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
- [0159] (x vii) stanniocalcin 1
- [0160] (x viii) coiled-coil domain containing 102B
- [0161] 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획은 상기 인자의 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개 또는 18개가 고발현하고 있는 것을 특징으로서, 적어도 2개의 인자가 고발현하고 있는 것을 지표로 단리(單離) 할 수 있다.
- [0162] 도 3에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리/인간 ES세포에서의 발현량의 비가 높은 인자를 나타낸다. 특히 이하의 20개의 인자의 비가 높다.
- [0163] (a) matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)
- [0164] (b) epiregulin
- [0165] (c) chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)

- [0166] (d) Transcribed locus
- [0167] (e) chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
- [0168] (f) serglycin
- [0169] (g) mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1913076
- [0170] (h) Ras and Rab interactor 2
- [0171] (i) lumican
- [0172] (j) CLCA family member 2, chloride channel regulator
- [0173] (k) interleukin 8
- [0174] (l) Similar to LOC166075
- [0175] (m) dermatopontin
- [0176] (n) EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1
- [0177] (o) insulin-like growth factor binding protein 1
- [0178] (p) solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5)
- [0179] (q) serglycin
- [0180] (r) gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)
- [0181] (s) insulin-like growth factor binding protein 5
- [0182] (t) sulfide quinone reductase-like (yeast)
- [0183] 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획은 상기 인자의 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20가 고발현하고 있는 것을 특징으로서, 적어도 2개의 인자가 고발현하고 있는 것을 지표로 단리(單離) 할 수 있다.
- [0184] 게다가, 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획은 상기 (i)? (xviii)의 인자의 적어도 2개와 상기(a) ? (t)의 인자의 적어도 2개가 동시에 고발현하고 있어도 좋고, 이를 유전자가 고발현하고 있는 것을 지표로 단리(單離) 할 수 있다.
- [0185] 더욱이 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획은 다능성 마커(marker) 이외의 오더런트(odorant) 수용체[알팩터리 수용체(olfactory receptor)]군 및 케모카인(chemokine) 수용체 군의 인자를 발현되고 있는 것, 즉 특정의 오더런트(odorant) 수용체나 케모카인(chemokine) 수용체 양성인 것을 특징으로 한다.
- [0186] 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획으로 발현되고 있는 오더런트(odorant) 수용체로서 예를 들면, 이하의 22개의 수용체를 들 수 있다.
- [0187] olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2 (OR8G2);
- [0188] olfactory receptor, family 7, subfamily G, member 3 (OR7G3);
- [0189] olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 5 (OR4D5);
- [0190] olfactory receptor, family 5, subfamily AP, member 2 (OR5AP2);
- [0191] olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 4 (OR10H4);
- [0192] olfactory receptor, family 10, subfamily T, member 2 (OR10T2);
- [0193] olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 2 (OR2M2);
- [0194] olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 5 (OR2T5);
- [0195] olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 4 (OR7D4);

- [0196] olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 3 (OR1L3);
- [0197] olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4 (OR4N4);
- [0198] olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 7 (OR2A7);
- [0199] guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type (GNAL);
- [0200] olfactory receptor, family 6, subfamily A, member 2 (OR6A2);
- [0201] olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 6 (OR2B6);
- [0202] olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 1 (OR2C1);
- [0203] olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 (OR52A1);
- [0204] olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3);
- [0205] olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 2 (OR10H2);
- [0206] olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 2 (OR51E2);
- [0207] olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 2 (OR5P2); 및
- [0208] olfactory receptor, family 10, subfamily P, member 1 (OR10P1).
- [0209] 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획으로 발현되고 있는 케모카인(chemokine) 수용체로서는 이하의 5개의 수용체를 들 수 있다.
- [0210] chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5);
- [0211] chemokine(C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4);
- [0212] chemokine(C-C motif) receptor 1 (CCR1);
- [0213] Duffy blood group, chemokine receptor(DARC); 및
- [0214] chemokine(C-X-C motif) receptor 7(CXCR7)
- [0215] 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획은 상기한 후각 수용체의 적어도 1개를 발현하고 있고, 혹은 상기한 케모카인(chemokine) 수용체의 적어도 1개를 발현하고 있다.
- [0216] 이들 오더런트(odorant) 수용체나 케모카인(chemokine) 수용체에 결합하는 유주인자(遊走因子)의 작용으로 본 발명의 다능성 줄기세포는 손상 조직에로 유주(遊走) 하고, 생착(生着)하여 그 자리에서 분화한다. 예컨대 간장, 피부, 척수, 근육이 손상한 경우, 특정의 유주인자(遊走因子)와 세포표면에 발현되고 있는 오더런트(odorant) 수용체의 활동으로 각각의 조직에 유주(遊走) 하고, 생착(生着)하여 간장(내배엽), 피부(외배엽), 척수(외배엽), 근육(중배엽) 세포로 분화하여 조직을 재생할 수 있다.
- [0217] 게다가, 본 발명의 다능성 줄기세포인 Muse세포가 풍부하게 포함되는 부(富) Muse세포 분획에 있어서, Rex1, Sox2, KLF-4, c-Myc, DPPA2, ERAS, GRB7, SPAG9, TDGF1 등이 업레귤레이트(upregulate) 되고 있고 Muse세포의 세포덩어리에 있어서, DAZL, DDX4, DPPA4, Stella, Hoxb1, PRDM1, SPRY2 등이 업레귤레이트(upregulate) 되고 있다.
- [0218] 또, 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획분에 있어서는 조혈 줄기세포 마커(marker)인 CD34 및 CD117의 발현은 인정되지 않거나 혹은 발현이 지극히 낫다.
- [0219] 본 발명은 Muse세포 뿐만 아니라 Muse세포를 농축한 세포집단, Muse세포를 증식시킨 세포집단, Muse세포를 분화시킨 세포집단을 포함하고, 게다가 Muse세포나 Muse세포 유래의 세포를 포함하는 연구용 키트(kit), 세포칩, 치료용 디바이스(device)도 포함한다.
- [0220] 본 발명의 다능성 줄기세포는 pluripotency를 갖고 있어 모든 조직으로도 분화할 수 있다. 그 다능성 줄기세포 또는 다능성세포 분획은 재생 의료 등에 이용할 수 있다. 예를 들면 각종 조직, 각종 기관(器官) 등의 재생에 이용할 수 있다. 구체적으로는 피부(皮膚), 뇌척수(腦脊髓), 간장(肝臟), 근육(筋肉) 등을 들 수 있다. 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획을 손상 혹은 장해를 받은 조직, 기관(器官) 등에 직접

혹은 근방에 투여함으로써 그 다능성 줄기세포는 그 조직, 기관내에 침입하여 그 조직 특유의 세포로 분화하고, 조직, 기관의 재생, 재건에 공헌할 수 있다. 또, 정맥투여 등에 의해 전신투여해도 좋다. 이 경우 그 다능성 줄기세포는 예컨대 손상을 받은 조직이나 기관을 호밍(homing) 등에 의해 지향하고, 거기에 도달·침입한 상에서 그 조직이나 기관의 세포로 분화하여 조직, 기관의 재생, 재건에 공헌할 수 있다.

[0221] 투여는 예를 들면 피하주(皮下注), 정주(靜注), 근주(筋注) 복강내주(腹腔內注)) 등의 비경구 투여나 경구투여, 혹은 배(胚)에의 자궁내 주사 등에 의해 할 수 있다. 또, 국소투여라도 전신투여라도 좋다. 국소투여는 예컨대 카테터(catheter)를 이용해서 할 수 있다. 투여량은 재생하려고 하는 기관, 조직의 종류나, 사이즈에 의해 적당히 결정할 수 있다.

[0222] 재생하려고 하는 기관은 한정되지 않고, 골수(骨髓), 척수(脊髓), 혈액(血液), 비장(脾臟), 간장(肝臟), 폐(肺), 장관(腸管), 눈(眼), 뇌(腦), 면역계(免疫系), 순환계(循環系), 뼈(骨), 결합조직(結合組織), 근(筋), 심장(心臟), 혈관(血管), 췌장(胰臟), 중추신경계(中樞神經系), 말초신경계(末梢神經系), 신장(腎臟), 방광(膀胱), 피부(皮膚), 상피부속기(上皮付屬器), 유방(乳房)-유선(乳腺), 지방조직(脂肪組織), 및 입(口), 식도(食道), 질(腔), 항문(肛門)을 포함하는 점막(粘膜) 등을 포함한다. 또, 치료 대상이 되는 질환으로서 암(癌), 심혈관질환(心血管疾患), 대사질환(代謝疾患), 간질환(肝疾患), 당뇨병(糖尿病), 간염(肝炎), 혈우병(血友病), 혈액계(血液系) 질환, 척수손상(脊髓損傷) 등의 변성(變性) 또는 외상성(外傷性) 신경질환(神經疾患), 자기면역질환(自己免疫疾患), 유전적(遺傳的) 결함, 결합조직(結合組織) 질환, 빈혈(貧血), 감염증(感染症), 이식거절(移植拒絕), 허혈(虛血), 염증(炎症), 피부(皮膚)나 근육(筋肉)의 손상 등을 들 수 있다.

[0223] 세포는 의약으로서 허용되는 기본 재료와 함께 투여해도 좋다. 그 기본 재료는 예를 들면 콜라겐 등으로 된 생체친화성이 높은 물질이거나, 생분해성의 물질일 수 있고, 입자상(粒子狀), 판상(板狀), 통상(筒狀), 용기상(容器狀) 등의 형상으로 하면 좋으며, 세포를 그 기본 재료에 결합시켜 혹은 그 기본 재료 중에 수용하여 투여하면 좋다.

[0224] 또한, 본 발명의 다능성 줄기세포를 *in vitro*에서 분화 유도하고, 게다가 분화된 세포를 이용하여 조직을 구축시켜 그 분화한 세포 또는 그 조직을 이식해도 좋다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 종양화(腫瘍化) 하지 않으므로 이식한 상기 분화한 세포 또는 그 조직에 본 발명의 다능성 줄기세포가 미분화 인체로 포함되어 있어도 암화(癌化)의 가능성이 낮아 안전하다. 이를 재생 의료에 있어서, 이식한 세포 또는 조직의 수용자(recipient)에 의한 거절을 피하기 위해서는 재생 의료를 받으려고 하는 환자로부터 중배엽계(中胚葉系) 조직 또는 간엽계(間葉系) 조직 등을 채취하고, 그 조직으로부터 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 세포분획을 단리(單離) 하여 이용하는 것이 바람직하다. 게다가 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획을 조직의 변성이나 기능 부전(不全)을 원인으로 하는 질환의 치료로 이용할 수 있다. 이 경우 예컨대 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획을 *ex vivo*에서 농축하고, 중식시켜 혹은 분화시켜 체내로 되돌리면 좋고, 예컨대 다능성 줄기세포를 특정한 조직의 세포로 분화시켜 그 세포를 치료하려고 하는 조직에 이식하면 좋다. 또, 세포의 이식에 의해 *in situ* 세포치료를 할 수도 있다. 이 경우 대상세포의 예로서 간장세포, 신경세포나 신경膠(神經膠) 세포(glial cells) 등의 신경계세포, 피부세포, 골격근(骨格筋) 세포 등의 근육세포를 들 수 있고, 본 발명의 다능성 줄기세포를 이들 세포로 분화시켜 이식하여 *in situ*에서 치료를 할 수 있다. 그 치료에 의해, 예를 들면 파킨슨 병(Parkinson's disease), 뇌경색, 척수손상, 근변성(筋變性) 질환 등을 치료할 수 있다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 종양화(腫瘍化) 하지 않으므로 이러한 치료에 이용해도 암화(癌化)의 가능성이 낮아 안전하다.

[0225] 또, 본 발명의 다능성 줄기세포를 분화시켜 혈액이나 혈액 성분을 형성시킴으로써 혈액이나 혈액 성분을 *ex vivo*, *in vitro*로 형성시킬 수 있는 혈액 성분으로서, 적혈구, 백혈구, 혈소판 등을 들 수 있다. 이와 같이 하여 형성시킨 혈액이나 혈액 성분을 자가수혈(自家輸血)이나 타가수혈(他家輸血)에 이용할 수 있다.

[0226] 상기한 바와 같이 본 발명의 다능성 줄기세포 또는 다능성 줄기세포 분획을 치료에 이용하는 경우, *ex vivo*, *in vivo*, *in vitro*의 어느 것으로 분화시켜도 좋다. 본 발명의 다능성 줄기세포는 예를 들면 골아세포(骨芽細胞; osteoblast), 연골세포, 지방세포, 섬유아세포(纖維芽細胞), 골수간질(骨髓間質), 골격근(骨格筋), 평활근(平滑筋), 심근(心筋), 눈, 내피(內皮), 상피(上皮), 간, 췌장, 조혈(造血), 신경膠(神經膠; glial), 신경세포, 희돌기교세포(稀突起膠細胞) 등으로 분화한다. 본 발명의 다능성 줄기세포의 분화는 분화 인자의 존재 하에서 배양함으로써 달성할 수 있다. 분화 인자로서는 염기성 섬유아세포(纖維芽細胞) 성장인자(bFGF), 혈관내피 성장인자(VEGF), 디메틸сульфон이드(DMSO; dimethyl sulfoxide) 및 이소프로테레놀(isoproterenol) 혹은 섬유아세포(纖維芽細胞) 성장인자 4(FGF4), 간세포 성장인자(HGF) 등을 들 수 있다. 본 발명은 본발명의 다능성

줄기세포로부터 분화한 세포도 포함한다.

[0227] 본 발명의 다능성 줄기세포를 치료로 채용할 경우, 단백질성의 항암물질이나 생리활성 물질 등을 엔코딩(encoding) 하는 유전자를 도입해도 좋다. 그에 따라 본 발명의 다능성 줄기세포는 치료 약의 딜리버리(delivery) 기능도 갖게 된다. 이러한 물질로서 예를 들면 항혈관(抗血管) 신생약(新生藥)을 들 수 있다.

[0228] 본 발명은 Muse세포, Muse세포로부터 생긴 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리, 및 Muse세포나 상기 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 분화시켜 얻어진 세포 혹은 조직·기관을 포함하는 세포이식 치료용 재료 혹은 세포이식 치료용 조성물, 또는 재생 의료용 재료 혹은 재생 의료용 조성물을 포함한다. 그 조성물은 Muse세포, Muse세포로부터 생긴 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리, 또는 Muse세포나 상기 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 분화시켜 얻어진 세포 혹은 조직·기관에 대해서 의약적으로 허용되는 완충액이나 희석액 등을 포함한다.

[0229] 게다가 환자에게서 세포를 채취하고, Muse세포를 단리(單離)하여 그 Muse세포를 이용해서 각종 진단에 이용할 수 있다. 예를 들면, Muse세포로부터 환자의 유전자를 채취하여 유전자정보를 얻고, 그 정보를 반영시킨 정확한 진단이 가능해진다. 예컨대 피험체(被驗體)의 세포 유래의 Muse세포를 분화시키는 것으로, 피험자와 같은 유전자 배경 등의 성질을 가진 각 조직·기관의 세포를 얻을 수 있기 때문에 질병의 진단이나 병태(病態) 해명(解明), 약제의 효과나 부작용의 진단 등에 관하여 각각의 피험자의 성질에 맞추어 적절한 진단을 할 수 있다. 즉, Muse세포, Muse세포로부터 생긴 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 Muse세포나 상기 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 분화시켜 얻어진 세포 혹은 조직·기관은 진단용 재료로서 이용할 수 있고, 예를 들면 본 발명은 피험체(被驗體)로부터 Muse세포를 단리(單離)하여 그 Muse세포 또는 Muse세포로부터 분화시켜 얻어진 피험체(被驗體)와 같은 유전자 배경을 갖는 조직이나 기관을 이용해서 피험체(被驗體)의 질병 등을 진단하는 방법을 포함한다.

[0230] 또한, Muse세포를 분화시키는 것으로 체세포를 대량으로 얻을 수 있기 때문에 질병의 메커니즘 해명 등의 기초적 연구, 치료약 개발, 약제의 효과나 독성에 관한 스크리닝(screening), 약제평가 등을 할 수 있다. 즉, Muse세포, Muse세포로부터 생긴 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 Muse세포나 상기 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 분화시켜 얻어진 세포 혹은 조직·기관을 약제평가나 약제 스크리닝(screening)의 재료로서 이용할 수 있다. 예를 들면 본 발명은 Muse세포를 분화·증식시켜 체세포를 얻고, 그 체세포에 후보약제를 투여하여 체세포의 응답을 조사함으로써 약제의 스크리닝이나 약제평가를 하는 방법을 포함한다.

[0231] 또한, 각종(예컨대 여러 가지 HLA형의) Muse세포를 라이브러리(library)화 한 Muse세포 뱅크를 구축함으로써 상기한 Muse세포 이용 장면에 있어서의 세포를 필요에 따라 제공할 수 있는 체제를 실현할 수 있고, 예를 들면 상기에 든 목적과 다른 긴급하게 요하는 세포이식 치료를 위한 거절반응이 없는(적은) 세포제공 등을 할 수 있다. 즉, 본 발명은 각종 유전자 특성을 갖는 Muse세포를 단리(單離)하고, 모음으로써 다른 유전자 특성을 갖는 Muse세포의 라이브러리(library), 즉 Muse세포 뱅크를 제작하는 방법을 포함한다. 또 Muse세포뿐만 아니라 Muse세포로부터 생긴 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 Muse세포나 상기 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 분화시켜 얻어진 세포 혹은 조직·기관을 얻어서 라이브러리나 뱅크를 구축할 수도 있다. 본발명에 있어서는, 이 Muse세포로부터 할 수 있었던 배(胚)님체님 세포덩어리, 및 Muse세포나 전기 배(胚)님체님 세포덩어리로부터 분화되게 해서 얻을 수 있었던 세포 와카(若) 미친다는 조직·기관을 얻어서 라이브러리나 뱅크도 세포 라이브러리 또는 세포 뱅크라고 칭한다. 본 발명은 이렇게 하여 제작한 세포 라이브러리 또는 세포 뱅크를 포함한다. 그 세포 라이브러리 또는 세포 뱅크는 예를 들면 다른 유전적 특성을 소유하는 세포 등이 수납된 복수의 튜브 등의 용기로 이루어지고, 그 세포는 동결되어 있어도 좋다. 예컨대 피험체(被驗體)에 있어서, 조직이나 기관을 이식하고, 혹은 재생할 필요가 생겼을 경우에 상기 세포 라이브러리 또는 세포 뱅크에서 상기 피험체(被驗體)에 유전적 배경 등에 관해서 적합한 세포를 선택하여 그 세포를 이용해서 이식이나 재생 치료를 할 수 있다.

[0232] 본 발명은 질환의 치료를 위해 본 발명의 다능성 줄기세포나 그 세포분획이나 그 세포 유래의 파생 세포나 유도 세포의 치료상 유효한 양을 치료를 필요로 하고 있는 환자에게 투여하는 것을 포함한 치료 방법을 포함한다. 여기서 유효한 양으로는 예를 들면 투여하는 세포수로 특정할 수 있고, 질환의 종류나 중독도(重篤度; severity)에 의해 적당히 결정할 수 있다. 상기 치료법에 있어서는 본 발명의 다능성 줄기세포는 테라토마(teratoma; 奇形腫)을 형성하지 않기 때문에 환자에게 테라토마(teratoma; 奇形腫)가 형성되지 않는다. 또 자기세포 유래의 Muse세포를 투여할 경우 환자를 방사선조사나 화학요법 등의 처치에 의해 골수기능을 결손시킬 필요는 없지만, 자기세포가 아닌 Muse세포를 채용할 경우는 상기 처치를 하면 좋다.

- [0233] 게다가 Muse세포는 iPS세포(induced pluripotent stem cell)의 소스(source)가 될 수 있다. Muse세포를 소스(source)로 한 iPS세포의 제작 효율은 다른 세포(예를 들면, SSEA-3 발현을 자표로 분획하지 않는 피부 섬유아세포)를 소스(source)로 했을 경우에 비해 훨씬(적어도 25배 이상, 바람직하게는 30배 이상) 높다.
- [0234] Muse세포에 특정의 유전자를 도입하고, 혹은 특정의 화합물을 도입하는 것 등에 의해 세포 형질을 변화시킴으로써 iPS세포를 제작할 수 있다. 세포 형질의 변화는 리프로그래밍(reprogramming)이나 암화(癌化)를 포함하고, 현재 알려져 있는 방법 혹은 장래적으로 확립되는 모든 방법을 이용할 수 있다.
- [0235] 예를 들면, 특히 4182742호의 기재에 따라서 유전자를 Muse세포에 도입하고, 혹은 도 27의 기재에 따라서 Muse세포로부터 iPS세포를 확립할 수 있다. 또한 도 27에 기재한 방법 이외에 화학물질, 외래 유전자 또는 외래 단백질을 도입하고, iPS세포를 수립하는 것이 가능하다고 말할 수 있다. Muse세포로부터의 iPS세포의 확립은 예컨대 후술의 실시 예에 기재한 방법으로 할 수 있다.
- [0236] 이와 같이 하여 Muse세포로부터 얻어진 iPS세포를 Muse 유래 iPS세포(Muse- iPSC)이라고 부르는 일이 있어 본 발명은 그 Muse 유래 iPS세포도 포함한다. Muse유래 iPS세포는 Muse세포 유래의 종식성을 갖는 다능성 줄기세포라고 할 수 있다.
- [0237] 본 발명을 이하의 실시예에 따라서 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0238] 실시예 1
- [0239] 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 조제 및 특성분석
- [0240] 재료 및 방법
- [0241] 간엽계(間葉系) 세포로서 2주(2株)의 인간 피부 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획 및 4주(4株)의 인간 MSC(bone marrow stromal cell) 분획을 이용했다. 인간 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획은 (1)H-fibroblast-1(정상 인간 섬유아세포(NHDF), Lonza사에서 입수) 및 (2)H-fibroblast-2(성인 인간 섬유아(HDFA), ScienCell사에서 입수)을 이용했다. 인간 MSC 분획으로서는 H-MSC-1, H-MSC-2, H-MSC-3 및 H-MSC-4를 Lonza사 및 ALLCELLS사에서 입수해서 이용했다. 인간 MSC 분획에 대해서는 Pittenger, M. F. et al. Science 284, 143-147(1999); Dezawa, M. et al. J Clin Invest 113, 1701-1710(2004); Dezawa, M. et al. Science 309, 314-317(2005)에 상세하게 기재되어 있다.
- [0242] 세포는 10% FBS 및 0.1mg/ml 카나마이신(kanamycin) 함유 α-MEM(alpha- minimum essential medium)을 이용하고, 37도, 5% CO₂ 조건하에서 배양했다. 입수(入手)했지만 최초의 배양을 제1대라고 해서 그 후 세포가 95% 칸플루언스(confluence)가 된 바에서 세포 배양액:배지의 비를 1:2로하여 계대(繼代)하고, 4~10 대 계대(繼代)) 한 것을 이용했다.
- [0243] 인간 ES세포(hESC)는 교토대학에서 입수한 kyoto hESC-1(KhES-1)을 이용했다.
- [0244] 마우스 ES세포(TT2세포) 및 인간 ES세포(KhES-1)은 C57BL/6 마우스의 12.5일 배(胚)보다 확립한 마우스 유래 피더(feeder) 세포 존재하에서 유지했다.
- [0245] 이하의 방법으로 실험을 했다.
- [0246] 1. 간엽계(間葉系) 세포의 스트레스 자극
- [0247] 스트레스 자극으로서 저영양 조건에서의 배양, 저혈청 농도에서의 배양, 저산소 농도에서의 배양, 반복 트립신(trypsin) 처리, 장시간 트립신(trypsin) 처리를 하기 위해 이하의 배양 조건을 채용했다.
- [0248] (1) 무혈청 배지(STEMPRO MSC SFM(Invitrogen 사)를 이용한 2일간의 배양(무혈청))
- [0249] (2) Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS) 버퍼(buffer)(Invitrogen 사)를 이용한 2일간의 배양(HBSS)
- [0250] (3) 10% FBS함유 α-MEM을 이용해서 저산소 농도(1%)에서의 2일간의 배양(10% FBS + LowO₂)
- [0251] (4) 트립신(trypsin) 중 (0.25% 트립신(trypsin)-HBSS)에서의 1시간 인큐베이션(i ncubation) 3회의 처리(토탈 3시간의 트립신(trypsin) 처리)(Try 3×1hr)

- [0253] (5) 트립신(trypsin) 중에서의 8시간 인큐베이션(incubation)(LTT 8hr)
- [0254] (6) 트립신(trypsin) 중에서의 16시간 인큐베이션(incubation)(LTT 16hr) 음성대조로서, 인간 말초혈단(末梢血單) 핵세포 분획을 이용했다.
- [0255] 상기 (4), (5) 및 (6)의 조건의 경우, 100,000개?500,000개의 세포를 5ml 트립신(trypsin) 용액 중에 부유시켜 배양을 했다. 상기 (1)?(3)의 스트레스 자극의 경우, 자극후 세포를 5분간의 트립신(trypsin) 처리에 의해 모으고, (4)?(6)의 스트레스 자극의 경우, 세포를 직접 튜브에 모았다.
- [0256] 스트레스 자극후에 생기는 대량의 죽은 세포는 보텍스(vortex) 처리함으로써 파괴했다. 즉, 최대 500,000개의 세포를 포함하는 5ml의 배지를 15ml의 팔콘 튜브에 옮기고, 보텍스(vortex) 믹서(IKA Works 사)를 이용해서 1800?2200rpm/min으로 3분간 보텍스(vortex) 처리를 했다. 그 후 2000rpm으로 15분간 원심분리를 하여 상청(上清)을 제거했다. 생세포(生細胞)의 회수율은 약 70?80% 이었다.
- [0257] 2.MC배양
- [0258] 본 실시예에 있어서는 세포를 메틸 셀룰로오스(methylcellulose) 함유 배지 중에서 부유 배양했다. 메틸 셀룰로오스(methylcellulose) 함유 배지 중에서의 배양을 MC배양이라고 부른다. MC배양에 대해서는 Nakahata, T. et al. ,Blood 60, 352-361(1982)에 기재되어 있다.
- [0259] 세포가 용기 밑바닥에 부착하는 것을 막기 위해서 배양 디시(dish)를 Poly- HEMA(Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)에서 코트(coat) 했다. 즉, 600mg의 poly- HEMA(SIGMA 사)를 95% 에탄올 40ml에 37℃에서 교반하여 용해하고, 디시(dish)에 첨가해(96 웰(well) 배양 디시(dish)의 경우 40 µl/웰, 12웰 디시(dish)의 경우 200 µl/웰), 하룻밤 건조시켰다.
- [0260] MC(MethoCult H4100)(StemCell technologies 사에서 입수)를 20% FBS함유 α-MEM에 최종 농도 2%로 혼탁했다. 젤상의 MC 배지 중의 세포 농도는 세포끼리의 응집을 억제하는 충분한 세포간 거리를 확보할 수 있는 8000세포/ml로 했다. 세포와 MC 배지를 온화한 피펫팅(pipetting)에 의해 충분히 혼합하고, poly-HEMA 코트(coat) 한 배양 디시(dish)로 옮겼다. 건조를 막기 위해 10% FBS함유 α-MEM을 3일마다 최초의 MC배양 용적의 1/10 양, 천천히 첨가했다.
- [0261] 세포덩어리(세포덩어리)는 본 발명의 다능성 줄기세포 Muse세포 유래의 세포덩어리이기 때문에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리라고 부른다)의 클로닝(cloning)은 7일째에 했다. 0.01M의 PBS를 배지에 첨가하고, 2000rpm으로 20분간 원심 하여 상청(上清)을 베렸다. 이 처리를 3회 되풀이하고, 세포를 세정했다. 회수한 세포 펠렛(pellet)을 10 µl의 0.01M 함유 트리판블루(Trypan Blue) 용액에 혼탁하고, 슬라이드 글라스(slide glass)에 재치시켜 위상차 현미경을 이용해서 사진을 찍었다. 지름 25 µm보다 큰 인간 ES세포와 외관이 닮아 있는 트리판블루(Trypan Blue) 음성 세포덩어리만을 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로서 세웠다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성을은 세포덩어리의 수/모든 생세포수(모든 트리판블루(Trypan Blue) 음성세포)에 의해 산출했다. 세포의 계수 때 세포덩어리는 그 크기에 관계없이 1세포로서 세웠다. 이것은 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 중에 포함되는 세포 수의 정확한 계측은 곤란하기 때문이다.
- [0262] 인간 ES세포에 있어서는 세포를 주의 깊게 피더(feeder) 세포가 포함되지 않도록 단리(單離)하고, 상기의 방법으로 MC배양을 했다. 배양 3일째에 위상차 현미경 관찰상을 얻었다.
- [0263] 3. 단일세포 부유배양
- [0264] 96웰 디시(dish)를 상기한 방법으로 poly-HEMA에서 코트(coat)하고, 10% FBS함유 α-MEM을 이용해서 한계 회색법에서 단일세포를 각각의 웰에 뿐려 위상차 현미경에서 웰(well) 중의 실제의 세포수를 계수하고, 세포가 들어 있지 않은 웰 혹은 복수 들어 있는 웰은 계측에서 제외했다. 배양 10일째에 배양체(胚樣體)(EB)(Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리) 형성을 계수했다. 각각의 세포주(細胞株)에 대하여 3회의 실험을 하고, 일회의 실험에서는 최저 250웰 이상의 관찰을 했다.
- [0265] 4. 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색
- [0266] H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 모아 생리식염수로 수화 세정하고, Leukocyte Alkaline Phosphatase kit(sigma 사)를 이용해서 염색했다.
- [0267] 5. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 in vitro에서의 분화

- [0268] MC배양 또는 단일세포 부유배양의 7?10일 후, H-fibroblast 분획 및 H-MSC분획 유래의 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 글라스 마이크로피펫(glass microp ipette)에 의해 채취하고, 젤라틴 코트(coat) 배양 디시(dish) 또는 커버 유리 상에 옮겨 더 7일간 배양하면 세포덩어리로부터 세포가 퍼진다. 이러한 세포에 있어서의 분화의 유무를 면역조직화학 분석 및 RT-PCR분석에 제공했다.
- [0269] 6. 면역조직화학
- [0270] 세포를 0.01M PBS중 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하고, H- fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse 세포분획 또는 Muse 세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 원심분리에 의해 모으고, OCT 콤파운드(compound) 중에 매입(埋入) 8 μ m의 동결(凍結) 절편(切片)을 제작했다. 세포덩어리는 젤라틴 코트(gelatin-coat) 슬라이드 글라스 상에서 고정하고, 면역조직화학 분석에 제공했다.
- [0271] 1차 항체로서 Nanog(1:500, Chemicon 사), Oct3/4(1:800, 오사카대학 Dr. H. Hamada에서 입수), Sox2(1:1000, Abcam사), PAR4 (1:100, Santa Cruz 사), SSEA-3 (1:20, DSHB 사), 평활근 액틴(1:100, Lab Vision 사), neurofilamentM(1:200, Chemicon 사), α -페토프로테인(1:100, DAKO 사), 마우스 Numblike(1:500, 캘리포니아 대학 샌프란시스코교의 Dr. Yuh-Nung Jan에서 입수) 및 type1 콜라겐(1:20, Southern Biotech 사)에 대한 항체를 이용했다. 2차 항체로서 Alexa488 또는 568과 콘주게이트(conjugate) 항토끼 IgG, 항마우스 IgG 또는 항마우스 IgM항체(Molecular Probes 사)를 이용하여 면역조직화학 분석을 했다.
- [0272] 7. 핵형(核型)의 결정
- [0273] H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 단일세포를 취해 다시 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성시키는 것을 1?3회 되풀이한 것)로부터의 증식세포(clonally expanded cells)의 핵형을 quinacrine-Hoechst 염색에 의해 결정했다.
- [0274] 8. 면역부전(免疫不全) 마우스 정소(精巢)에의 세포의 주입
- [0275] 무처리(無處理) 분획과 H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 이용했다. 부(富) Muse세포 분획의 경우, 장시간 트립신(trypsin) 처리 후 혈청을 첨가하고, 0.01M PBS로 3회 세정했다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리도 MC배양으로부터 채취 후에 동(同) PBS로 3회 세정했다. 1×10^5 개의 세포를 PBS에 부유하고, NOG마우스(등록상표)(NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic, 8주령(8週齡), 재단법인 실험동물중앙연구소에서 입수)의 정소(精巢)에 글라스 마이크로튜브(glass micro tube)를 이용해서 주입했다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 이용한 경우, 레이저 공초점 현미경의 3D 그래픽 분석 수법을 이용하고, 50개의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 취하여 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 토탈 부피를 측정해 핵의 수로 나눔으로써 각각의 구성 세포의 평균 부피를 측정했다. 측정의 결과 1.5×10^5 세포/ μ l인 것이 산정(算定)되어, 이 산정(算定)에 따라서 상기 수의 세포를 모아 NOG 마우스 정소(精巢)에 주입했다. 마우스는 주입 6개월 후에 실험에 제공했다.
- [0276] 대조시험으로서, 1×10^6 의 마우스 ES세포(양성대조) 및 마이토마이신(mitomycin)C 처리MEF(마우스 배성(胚性) 피더(feeder) 세포)(음성대조)을 SCID 마우스 정소(精巢)에 주입하고, 주입 후 8주 후에 실험에 제공했다.
- [0277] 9. 광학현미경에 의해 세포의 고해상도 분석
- [0278] H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 대해서 안정한 고해상도 광학현미경을 이용해서 인간 MSC, 섬유아세포(纖維芽細胞) 및 신경세포 등의 세포 타입의 관찰을 했다.
- [0279] 10. 전자현미경에 의한 극박(極薄) 절편(切片) 관찰
- [0280] Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리, H-fibroblast 분획 및 H- MSC 분획 유래의 SSEA-3 양성세포 및 SSEA-3음성세포, 및 인간 ES세포의 세포덩어리를 원심분리에 의해 모으고, 100mM 인산 버퍼(buffer)(pH7.2) 중 2 .5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)에서 30분간 고정하고, 1% 한천 중에 포매(包埋) 하며, 1mm³로 잘라 PBS에서 세정 후, 100mM 인산 버퍼(buffer)(pH7.2) 중 2% OsO₄로 4°C에서 10분간 염색했다.

샘플을 중류수로 세정 후, 5방울의 2% 초산 우라닐(uranyl)로 4℃에서 20분간 염색했다. 중류수로 세정 후, 염색 샘플을 50%, 70% 또는 90% 에탄올을 이용해 4℃에서 10분간 탈수하고, 이어서 100% 에탄올을 3회 교환함으로써 완전히 탈수했다. 얻어진 샘플을 산화 프로필렌으로 5분간 치환하고, 산화 프로필렌중 50% 에폭시 레진 중에 60분간 포매(包埋) 했다. 이것을 순수한 에폭시 레진에 포매(包埋) 하고, 60℃ 오버 나이트(overnight)로 경화시켰다. 초박(超薄) 절편(切片)은 70 ? 80nm의 두께로 제작하고, CCD카메라 부착의 100kV 전자현미경으로 관찰했다.

[0281] 11. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 증식 속도

H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 대해서 세포군의 배화시간(倍化時間)을 측정하기 위해 각각의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 하나씩 96 웨플레이트에 옮기고, 15분간의 트립신(trypsin) 처리를 한 후에 글라스 마이크로피펫(glass micropipette)을 이용해 페랫팅(petting)을 했다. 세포의 수를 계측하고, 소정의 시간 후마다 적어도 20 ? 30개의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 대해서 분석했다.

[0283] 12. RT-PCR

무처리(無處理) 세포분획(24 웨 스케일 중 약 10,000세포) 및 H-fibroblast분획 및 H-MSC 분획(24 웨 스케일 중 약 10,000세포) 유래의 *in vitro*에서 단일Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 분화된 세포(1 ? 3 사이클)를 이용했다. 토탈 RNA를 NucleoSpin RNA XS(Macherey-Nagel 사)를 이용해서 추출, 정제하고, 제1쇄(鎖) cDNA를 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit(Invitrogen)를 이용해서 조제했다. PCR 반응은 적절한 프라이머(primer)를 설계하고, Ex Taq DNA polymerase(다카라 바이오 사)를 이용해 하였다. 이용한 프라이머(primer)는 이하 대로하였다.

[0285] 양성대조로서는 α -페토프로테인 프라이머에 대해서는 인간 태아간장(Clone tech 사)를 이용하고, 그 이외는 인간 완전배(完全胚)(Clonetech 사)를 이용했다.

[0286] 13. 정량적 PCR(Q-PCR)

무처리(無處理) 세포분획, H-fibroblast-1, H-fibroblast-2, H-MSC-1 및 H-MSC-2 유래의 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터의 토탈 RNA를 Rneasy Mini Kit(Qiagen GmbH 사)에 의해 모으고, cDNA를 RT² First Strand Kit(SA Biosciences 사)를 이용해서 합성했다. 프라이머(primer)는 SA Biosciences 사에서 특별 주문하고, 7300real time PCR시스템(Applied Biosyst ems 사)를 이용해서 정량적 PCR을 하였다. 얻어진 데이터는 $\Delta\Delta C_t$ 방법(Livak KJ et al., Methods 25:402-408, 2001)에 의해 해석했다.

[0288] 14. DNA 마이크로 어레이 분석

무처리(無處理) 세포분획, H-fibroblast-1, H-fibroblast-2, H-MSC-1 및 H-MSC-2 유래의 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리, 및 4명의 정상인 유래 인간 말초혈단핵세포(末梢血單核細胞) 분획 혼합물을 이용했다. total RNA를 Rneasy Mini Kit(Qiagen GmbH 사)에 의해 모으고, DNA 마이크로 어레이에 의해 분석했다(다카라 바이오 사). 어레이 시그널은 Affimetrix Expression Console V1.1 소프트웨어에 의해 처리해 정규화(normalize) 했다. Pathway Studio 6.0(Ariadne genomics 사)를 이용해 발현 변동이 인정된 유전자를 유전자 온톨로지(ontology)의 기능적 카테고리에 할당했다. 계층적 클러스터링은 (clustering)은 MeV4에 의한 군평균(群平均) 클러스터링의 수법을 이용하고, 유전자의 발현 변동에 근거해서 유클리드(Euclid)의 거리를 이용해 하였다(Saeed AI et al., Biotechniques 34(2):374-378, 2003).

[0290] 15. 텔로머라아제(telomerase) 활성의 검출

H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse세포 분획, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 HeLa세포를 이용했다. 텔로머라아제(telo merase) 활성은 TRAPEZE XL telomerase detection kit(Millipore 사)와 Ex Taq 폴리메라아제(polymerase)(다카라 바이오 사)를 이용해서 검출했다. 형광강도는 마이크로 플레이트 리더(TECAN 사)를 이용해서 측정했다.

[0292] 16. Bisulfite(아황산수소염) 시퀀스(sequence)

무처리(無處理) 세포분획, H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 유래의 1 μ g의 게놈 DNA를 CpGenome DNA modification kit(chemicon 사)로 처리했다. DNA를 QIAqui ck column(Qiagen 사)로 정제했다. 인간 Oct3/4 및 Nanog 유전자의 프로모터(prom

oter) 영역을 PCR에 의해 증폭하고, PCR 산물을 pCR 2.1-TOPO 중에 서브 클로닝(subcloning)해 각각의 샘플에 대해서 10클론(clone)까지를 M13 유니버설 프라이머(primer)를 이용해 배열 결정하고, 프로모터(promoter) 영역의 메틸화의 상태를 조사했다. PCR 증폭에는 Shimazaki T et al., EMBO J, 12:4489-4498, 1993에 기재된 프라이머(primer)를 이용했다.

[0294] 17. 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)에서의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성

[0295] 3명의 정상인에서의 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)(ALLCELLS 사에서 입수)으로부터 단핵세포 분획을 Lymphoprep Tube(Axis-Shield PoC AS 사)를 이용해서 모으고, 8시간의 장시간 트립신(trypsin) 처리를 한 후에 MC배양을 하였다. 또 트립신(trypsin) 처리를 하지 않고 직접 그대로 MC배양에도 실행했다. 7일째에 세포수를 측정했다.

[0296] 18. MACS소팅(sorting)

[0297] 3명의 정상인에서의 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)(ALLCELLS 사에서 입수) 유래의 단핵세포 분획을 항CD105 항체와 마이크로비즈(microbeads)의 콘주게이트(co conjugate)와 반응시켜 MS칼럼(Miltenyi Biotech 사)을 이용해 소팅(sorting) 했다. CD105 양성세포를 프랙션(Fraction)1(간엽계(間葉系) 세포군)로서 모으고, 더욱 CD105 음성세포를 항CD34 항체 및 항CD117 항체의 혼합물과 마이크로비즈(microbeads)의 콘주게이트(conjugate)와 인큐베이트(incubate) 하고, 다시 소팅(sorting) 하여 CD34 양성 · CD117 양성세포(프랙션(Fraction)2; 조혈 줄기세포군에 해당한다) 및 CD105 음성 · CD34 음성 · CD117 음성세포(프랙션(Fraction)3)을 얻었다(도 4). 모든 샘플을 8시간의 장시간 트립신(trypsin) 처리를 한 후에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성을 측정했다.

[0298] 19. 면역조직화학(免疫組織化學)

[0299] 마우스 정소(精巢)를 0.02MPBS 중 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 이용해 고정했다. 절편(切片)은 동결 절편으로서 10 μm의 두께로 제작했다. 샘플을 0.02MPBS로 세정하고, 20% BlockAce(유끼지루시(雪印) 사) 함유 버퍼(buffer)를 이용해서 블로킹(blocking)한 후에 면역조직화학(免疫組織化學) 분석용 1차 항체와 인큐베이트(incubate) 했다. 이용한 1차 항체는 항평활근 액틴(actin) 항체(1: 200, Lab Vision 사), 항MAP-2 항체(1:200, Biogenesis 사) 및 항α-페토프로테인항체(1:10, DAKO 사)이었다.

[0300] 2차 항체로서는 Alexa488 또는 Alexa568을 결합한 항토끼 IgG항체, Alexa568을 결합한 항마우스 IgG항체를 이용하고, DAPI존재 하에서 반응시켰다. 샘플은 니콘(Nikon) 공초점 현미경 시스템 C1si(니콘)을 이용해 관찰했다.

[0301] 20. 플로우 사이타미트리(Flow cytometry) 및 세포 소팅(sorting)

[0302] 세포를 피코에리트린(phycoerythrin) 표식(標識) 항CD11c 항체, 항CD29 항체, 항CD34 항체, 항CD44 항체, 항CD45항체, 항CD49f 항체, 항CD54 항체, 항CD71 항체, 항CD90 항체, 항CD105 항체, 항CD166 항체, 항CD271 항체 또는 항vWF 항체(Becton Dickinson 사) 또는 항SSEA-3 항체(Millipore 사)와 인큐베이트(incubate)했다. 항SSEA-3 항체를 이용할 경우, 세포를 더욱 FITC결합 항래트(rat) IgM 항체와 반응시켰다. 2mM EDTA 및 0.5% 소혈청(牛血清) 일부분을 첨가한 칼슘 및 마그네슘을 포함하지 않는 0.02M PBS를 FACS항체 희석액으로서 이용했다. FACSCalibur(Becton Dickinson)에 의해 CellQuest 소프트웨어 또는 FACSaria에 의해 DIA 소프트웨어를 이용해 데이터 해석을 하였다. 세포를 FACS항체 희석액 중에서 항SSEA-3 항체와 인큐베이트(incubate) 해 FACSaria(Becton Dickinson)에 의해 저유속 및 4way purity 소팅(sorting) 모드로 소팅(sorting)하여 세포의 소팅(sorting)을 하였다.

[0303] 21. 통계 해석

[0304] 데이터는 평균±SEM으로 나타냈다. 데이터는 Bonferroni법에 의한 한쌍 비교에 의해 ANOVA를 이용해 비교했다.

[0305] 결과

[0306] A. H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획의 스트레스 자극

[0307] H-fibroblast 분획과 H-MSC 분획의 스트레스 자극의 결과의 일례를 표 1에 나타냈다.

[0308] 스트레스 자극과 보텍스(vortex) 처리 후, 트리판블루(Trypan Blue) 염색에 의해 생세포(生細胞) 수를 계측하고, 생존율을 계산했다. 생세포(生細胞)를 회수하고, 7일간의 MC배양에 제공했다. 조건(2)의 경우, 대량의 죽

은 세포가 존재하고, 생세포(生細胞) 회수 효율이 낮았기 때문에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 잘 계측할 수 없었다. 표 1에는 「ND(not determined)」로 나타냈다.

[0309] 6개의 조건 중에서, H-fibroblast 분획의 16시간 트립신(trypsin) 처리 및 H-MSC 분획의 8시간의 트립신(trypsin) 처리가 가장 효율적인 자극이었다. 2주(2株)의 H-fibroblast 분획 및 4주의 H-MSC 분획을 이용해서 반복하여 이 실험을 한 바, 같은 경향이 인정을 받았다. 음성대조(인간 말초혈단핵세포(末梢血單核細胞) 분획)에 있어서는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 인정을 받지 못했다. 대표적인 관찰 값을 표 1에 나타냈다.

표 1

H-fibroblast, H-MSC 및 인간 말초단핵의 MC배양에 있어서의 스트레스 자극 후의 생존율 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성.				
H-fibroblast-1				
	당초 세포수	스트레스 자극 후의 생존율(%)	MC배양에 있어서의 세포덩어리(>25 ㎛)형성(성분(性本)세포에 대한 %)	
1. 무혈(無血清)	30,000	75	7	
2. HBSS	2,000,000	6	ND	
3. 10%FBS + LowO ₂	30,000	99	8	
4. Trpn 3 × 1hr	2,000,000	0.3	6	
5. LTT 8hr	2,000,000	1	15	
6. LTT 16hr	500,000	5	20	

H-MSC-1				
1. 무혈(無血清)	30,000	44	5	
2. HBSS	2,000,000	2	ND	
3. 10%FBS + LowO ₂	300,000	99	8	
4. Trpn 3 × 1hr	380,000	0.0	9	
5. LTT 8hr	380,000	10	21	
6. LTT 16hr	500,000	3	14	

인간 말초단핵구(末梢單核球)				
5. LTT 8hr	200,000	2	0	
6. LTT 16hr	300,000	1	0	

[0310]

[0311] ND(not determined): 대량의 죽은 세포가 존재하고, 생세포(生細胞) 회수 효율이 낮았기 때문에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 계측할 수 없었다.

[0312] Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성 효율로부터 판단하면, 16시간(H-fibroblast 분획) 및 8시간(H-MSC 분획)의 트립신(trypsin) 처리가 6개의 조건 중에서 가장 효율적이라고 생각되었다. 16시간 또는 8시간 트립신(trypsin) 처리, 1800 ? 2000rpm/min에서의 3분간의 보텍스(vortex) 및 2000rpm 15분간의 원심분리의 일련의 조작을 Muse세포의 농축을 위한 장시간 트립신(trypsin) 처리(LT T)라고 명명했다. 보텍스(vortex) 처리 후 세포의 회수율은 약 70 ? 80%이었다 (도 5).

[0313] B. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 판정 기준

[0314] 본 실시예에 있어서, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 판정 기준을 마련했다. H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse세포 분획 중의 단일세포의 평균 직경은 10 ? 13 μm이었다(도 6a). 이들 세포를 MC배양하면, 세포는 분열을 시작했다. 분열되면 각각의 세포 사이즈는 작아져 8 ? 10 μm의 세포로부터 구성되는 다세포 덩어리가 서서히 형성되었다(도 7e 및 7f). 각각의 세포의 사이즈와 외관은 MC배양한 인간 ES세포에 유사하였다(도 6b 및 6c). 7일째에 대부분의 다세포 덩어리는 25 μm보다 커지고, 직경 100 ? 150 μm가 되었다. 그 세포덩어리는 ES세포와 유사한 외관을 갖고 있었다. Φ25 μm의 필터를 이용함으로써 25 μm보다 큰 덩어리를 회수했다(도 6b). H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획의 100개의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리까지의 면역세포화학(免疫細胞化學)에 의해 대부분의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 다능성 마커(maker) Nanog, Oct3/4, Sox2, PAR4 및 SSEA-3이 양성인 것을 알았고, 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색에서도 양성이었다(도 6e-g). 25 μm보다 작은 세포덩어리의 경우, 마커(maker)는 검출될 경우로 여겨지지 않을 경우가 있고, 또 다능성 마커(maker)의 국재(局在)는 이들 마커(maker)에 전형적인 패턴을 나타내지 않을 경우도 있었다. 게다가 세포의 외관은 오히려 부(富) Muse세포

분획에 유사하고 있을 경우가 있었다.

[0315] 상기 결과에서 지름 25 μ m을 넘는 다세포덩어리를 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로 했다.

C. 인간 간엽계(間葉系) 세포 분획으로부터 형성되는 세포덩어리의 분석

생체가 스트레스에 노출되거나 상해를 받으면 휴면 상태의 조직 줄기세포가 활성화되는 것이 알려져 있다. 본 실시예에 있어서, H-MSC 분획 및 H-fibroblast 분획에 각종 방법으로 스트레스를 걸어(무혈청 처리, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)에 의한 처리, 저산소 처리, 토탈 3시간, 8시간 혹은 16시간의 트립신(trypsin) 처리 등), 생존한 세포를 모으고, 그 후 메틸 셀룰로오스(cellulose)(MC)함유 배지 중에서 부유 배양(MC배양이라고 한다)을 하고, 더욱이 8000세포/mL의 밀도로 7일간 MC배양을 했다(도 7a d). 그 결과 최대로 약 직경 150 μ m까지의 각종 크기의 세포덩어리의 생성이 인정되었다(도 7a e 및 f). 도 7a c는 H-fibroblast-1 분획의 MC배양의 0일째의 상태를, 도 7a d는 7일째의 상태를 나타낸다. 16시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 H-fibroblast 분획 및 8시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 H-MSC 분획에 있어서, 가장 많은 세포덩어리의 형성이 인정되었다. 도 7a e 및 f에 H-fibroblast-1 분획에서 형성된 세포덩어리(Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리)의 상태를 나타냈다. 도 7a e는 MC배양 7일째의 상태이며, 도 7a f는 단일세포의 부유 배양 10일째의 상태다. 세포덩어리를 사이즈마다 필터를 이용해서 분획하고, 면역세포화학(免疫細胞化學) 분석을 했다. 직경 25 μ m을 넘는 세포덩어리 중에 Nanog, Oct3/4, SSEA-3, PAR-4 및 Sox2의 다능성 줄기세포 마커(maker)가 양성이며(도 7b g-l), 더욱이 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색에서 양성의 세포(도 7c m-o)가 검출되었다. 이들 세포에 대해서 전자현미경을 이용해서 관찰한 바, H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획으로부터 형성한 세포덩어리에 있어서, ES세포와 같은 핵/세포질비(細胞質比), 세포 내 기관(器官)의 감소, 핵 중의 1개 혹은 2개의 거대한 핵소체(核小體)의 존재라고 하는 특징이 인정되었다(도 7d p-r).

[0318] 생체의 H-MSC 분획 및 H-fibroblast 분획으로부터 다능성 마커(maker) 양성 및 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색 양성을 나타내는 세포덩어리를 부유 배양으로 형성할 수 있는 세포를 찾아냈다. 본 발명자들은 이 세포를 Muse세포(multilineage differentiating stress enduring cells)라고 명명했다. 16시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 H-fibroblast 분획 및 8시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 H-MSC 분획으로부터 형성한 세포집단을 「부(富) Muse세포 분획(Muse-enriched population)」이라고 부르고, 그 집단으로부터 얻은 단일세포를 부유 세포로 한바, 부(富) Muse세포 분획의 9~10%에 있어서, 세포덩어리의 형성(Muse세포 유래 세포덩어리:Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리)이 인정되었다. 이것은 부(富) Muse세포 분획에는 약 9~10%의 Muse세포가 포함되는 것을 나타내고 있다.

[0319] 단리(單離)한 Muse세포의 증식에 대해서 조사한바, 배양 시작 후 1~2일째에 세포 분열이 관찰되어 세포는 10일째경까지는 약 1.3일의 분열 주기로 증식했다(도 8b). 그러나 11~12일째에는 증식 속도는 저하되고, 14일째에 약 150 μ m의 크기의 세포덩어리가 형성된 시점에서 증식이 정지했다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 5분의 트립신(trypsin) 처리로 뿔뿔이 흩어지게 해 단일세포로 하여 단일부유 배양을 한바, 세포는 생존했지만, 증식 속도는 분열 주기가 5~7일로 매우 낮은 채로이며, 세포에 따라서는 세포증식의 정지도 관찰되었다(도 8a의(1)). 이것은 이들 세포덩어리의 증식이 제한되어 일단 속도가 저하되면 부유 배양에 있어서, 증식 속도는 재상승하기 어려운 것을 나타낸다. 그렇지만, 단일의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 접착 배양으로 옮기면, 증식을 재개했다. 5~7일 후, 비교적 소규모의 증식 세포군(3000~5000 세포)을 5분의 트립신(trypsin) 처리로 뿔뿔이 흩어지게 하여 MC배양하면, 약 40%의 효율로 세포덩어리의 형성이 인정되었다(도 8a의(2)). 세포군의 스케일을 더욱 올려서 약 5~10 $\times 10^4$ 에 달한 바에서, 트립신(trypsin)으로 장시간 처리하여 다시 Muse세포(2nd cycle)을 생성하고, 약 10%의 율(率)로 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성했다(도 8a). 트립신(trypsin)에서의 장시간 처리-부유 배양-접착 배양을 5회 반복한바, 각각의 세대(世代)에 있어서, 같은 특성 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성율을 나타냈다. 5cycle 째의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 있어서도 다능성 마커(maker) 및 알칼리 포스파타아제(phosphatase)는 양성이었다.

[0320] 이들의 현상이 이번 등을 일으킨 이상한 세포에 의한 것이 아닌 것을 확인하기 위해서 핵형검사(核型検査)를 했다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 유래의 세포(clonally expanded cells)에 있어서는 대부분은 정상인 핵형(核型)을 갖고, 염색체의 이상은 인정되지 않았다(도 8-3). 그에 따라 정상인 세포에 의한 현상인 것을 나타냈다.

[0321] 상기한 결과는 Muse세포가 자기복제(셀프 리뉴얼)능력을 갖고, 클론(clone) 증식하는 것을 나타내고 있다.

Muse세포는 Muse세포-Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 클론(clone) 증식의 일련의 사이클에 의해 증식한다. 따라서 간엽계(間葉系) 세포집단으로부터 대량인 Muse세포를 얻는 것이 가능하다고 예측된다.

[0322] D. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 3배엽 세포로의 분화

[0323] 분화 능력을 확인하기 위해서 단일의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 젤라틴으로 코트(coat) 밀 디시(dish)에 옮겨 분화시켰다. 7일째에 α 평활근 액틴(중배엽(中胚葉) 마커(maker)), 데스민(desmin; 중배엽(中胚葉) 마커(marker)), 신경 필라멘트-M(외배엽(外胚葉) 마커(maker)), α 폐토프로테인(내배엽(內胚葉) 마커(maker)) 및 시토케라틴(cytokeratin)-7(내배엽(內胚葉) 마커(maker))이 검출되었다(도 9-a-c). RT-PCR에 의해 1에서 3사이클의 배양을 한 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리(제1로에서 3cycle)는 α 폐토프로테인(fetoprotein) 및 GATA6(내배엽(內胚葉) 마커(maker)), 미소 관결합 단백질 2:MAP-2(중배엽(中胚葉) 마커(maker)) 및 Nkx 2.5(중배엽(中胚葉) 마커(marker))를 발현하고 있는 것이 확인되었지만, 무처리의 H-fibroblast 또는 MSC들은 젤라틴 코트(coat) 한 디시(dish) 상에서의 배양에서도 분화가 인정되지 않았다(도 9b).

[0324] 게다가, 부(富) Muse세포 분획, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 및 ES세포를 면역부전(免疫不全) 마우스의 정소(精巢)에 주입하고, 테라토마(奇形腫; teratoma)를 형성할 것인지 여부를 확인했다(도 9c-e). 조직학검사의 결과, ES세포에서는 모든 마우스에 있어서 8주 이내에 테라토마(奇形腫; teratoma)의 형성이 인정되었다. 그렇지만, 부(富) Muse세포 분획에서는 13마리 중 10마리로, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에서는 11마리 중 10마리로, 도 9-3e에 나타낸 바와 같이 이식된 인간 세포의 잔존과, 각종 세포종으로의 분화가 인정되었다. 테라토마(奇形腫; teratoma)는 적어도 6개월까지 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 이식군에 있어서 형성이 완전히 인정되지 않았다. 이식한 인간 세포는 항 인간 미토콘드리아 항체에 의해 표식(標識) 되지만, 그들 세포는 동시에 외배엽(外胚葉) 마커(maker)(신경 필라멘트), 내배엽(內胚葉) 마커(maker)(α -폐토프로테인) 및 중배엽(中胚葉) 마커(maker)(평활근액틴)을 발현하는 것이 확인되었다(도 9-3f-i).

[0325] 이들 데이터는 H-fibroblast 분획, H-MSC 분획 유래 Muse세포 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 in vitro에서도 in vivo에서도 3배양(胚樣)으로 분화할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0326] E. 정량적 PCR

[0327] 다능성 및 분화 상태에 관련된 마커(maker)의 발현을 도 10에 나타냈다. Nanog의 발현은 부(富) Muse세포 분획 및 세포 클러스터(cluster)에 있어서는 무처리 세포에 비해 그다지 높지 않았다. 다능성 줄기세포의 몇 가지에 있어서는, Nanog은 그다지 발현되지 않는다(Chou YF et al., Cell 135, 449-461(2008); Bui HT et al., Development, 135(23):3935-3945(2008)). Nanog과 동일하게 Q-PCR에서의 Oct-4는 마우스 ES세포에 비교하면 리프로그래밍 체세포(體細胞)에 있어서 낮다 (Bui HT et al., Development, 135(23):3935-3945(2008)). 따라서, Nanog 및 다른 다능성(pluripotency) 마커(maker)의 발현량은 pluripotency에 있어서 그다지 중요하지 않다.

[0328] F. 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 유전자 발현

[0329] 정량 PCR에 의해 다능성 및 비분화 상태에 관련되는 몇 가지의 마커(maker)가 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에서 업레귤레이트(up-regulate) 되고 있는 것이 나타났다. 부(富) Muse세포 분획은 상기한 바와 같이 9~10%의 Muse세포를 포함하고 있는 것에 지나지 않지만, Rex1(ZFP42), Sox2, KLF-4, c-Myc, DPPA2(developmental pluripotency associated 2), ER AS, GRB7(Growth factor receptor-bound protein 7), SPAG9(Sperm associated antigen), TDGF1(teratocarcinoma-derived growth factor 1)이 무처리 세포분획에 비해서 고도로 또는 적당하게 업레귤레이트(up-regulate) 되고 있었다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 있어서는 DAZL(azoospermia-like), DDX4(VASA), DPPA4(developmental pluripotency associated 4), Stella, Hoxb1, PRDM1 및 S PRY2(sprouty homolog2)이 무처리 세포에 비해서 업레귤레이트(up-regulate) 되고 있었다(도 10a).

[0330] H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 유래의 무처리 세포분획, 부(富) Muse세포분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 전체적인 유전자 발현을 인간 말초혈관핵세포(末梢血單核細胞) 분획을 컨트롤로서 비교한바, 무처리 세포분획, 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 사이에 몇 가지의 유전자에 있어서 발현 패턴의 변화가 인정되었다(도 10a).

[0331] 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 있어서의 텔로머라아제

(telomerase) 활성은 낮았다. 이것은 텔로머라아제(telomerase) 활성이 Muse세포의 증식 활성에 그다지 관여하지 않고 있는 것을 나타내고 있다(도 10b).

[0332] G. DNA 마이크로 어레이에 의한 전체적 유전자 발현

[0333] 108 프로브(probe)의 피어슨(Person) 상관 분석을 인간 말초혈단핵세포(末梢血單核細胞; 음성대조(陰性對照)), 무처리 세포분획, H-fibroblast 분획 및 H-MSC분획 유래의 부(富) Muse세포 분획 및 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 대해서 하였다(도 11).

[0334] 또한, DNA 마이크로 어레이에 의해 발현되고 있는 오더런트(odorant) 수용체 및 케모카인(chemokine) 수용체를 꼽았다.

[0335] H. 생체에 있어서의 Muse세포의 존재

[0336] 상기에 나타낸 검토는 안정한 배양 세포를 이용해 하였다. 세포를 성체로부터 취출해 배양한 경우, 생체 내와는 다른 특성을 가질 수 있으므로 Muse세포나 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리가 아티팩트(artifact) 한 산물일 가능성은 부정할 수 없다. 거기서 인간 생체 즉, 인간 골수 세포로부터 배양을 경유하지 않고 직접 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 얻는 것을 시도했다. 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)에서 단핵세포 분획을 단리(單離)하고, 직접 MC배양에 제공하거나(naive hBM-MC) 혹은 8시간의 트립신(trypsin) 처리를 한 후에 MC배양에 제공했다(8hr-hBM-MC, 트립신(trypsin) 처리 후의 단핵세포 분획의 생존율은 약 3.5%이었다). 7일 후, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성이 무처리의 naive hBM-MC에서는 약 0.004%의 효율로 인정되고, 8hr-hBM-MC에서는 약 0.3% 즉, 약 75배의 효율이었다(도 12a). 이들의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 알칼리 포스파타제(phosphatase) 염색 양성이었다(도 12b). 무처리의 naive hBM-MC 및 8hr-hBM-MC 유래의 단일 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 클론(clone) 증식한 세포의 RT-PCR에 의해 α-페토프로테인, GATA6, MAP-2 및 Nkx 2.5의 발현이 인정되었다(도 13). 이들의 결과는 인간 골수중에 in vivo에 있어서도 Muse세포가 존재하고, 8시간의 트립신(trypsin) 처리로 부화(富化) 해 Muse세포 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성시킬 수 있는 것을 나타내고 있다. 게다가 골수의 많은 타입의 세포 중에서 Muse세포가 CD105 양성 간엽계(間葉系) 세포분획에 속해 있는 것이 확인되었다.

[0337] 상기한 바와 같이, 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)에서 직접 단리(單離)한 단핵세포 분획 중의 무처리 hBM-MC의 형성 효율은 0.004%로 현저하게 낮았다. 배양 중의 세포에 있어서는 세포집단의 구성이 변화할 수 있기 때문에 안정적인 배양을 하고 있는 세포는 골수로부터 단리(單離)한 무처리 단핵구(單核球)와는 다른 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성 경향을 나타낸다고 생각된다. 이것을 확인하기 위해 이어서 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)을 배양하고, 초대(初代) MSC를 회수해 MC배양을 한바, 약 0.2%의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성이 인정되었다. 이 초대(初代) MSC를 더욱 2회 또는 5회 계대(繼代) 배양한바, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성 효율은 무처리 세포분획에 대하여 약 0.5% ? 1.0% 각각 상승했다. 무처리의 H-fibroblast 분획 및 인간MSC 분획의 약 1.2%가 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성한다. 이들의 결과는 Muse세포와 같은 스트레스 내성을 갖는 세포는 계대(繼代) 배양 등의 in vitro 배양 환경에서 잔류해, 이것 때문에 안정한 계대(繼代) 배양 세포분획이 골수천자액(骨髓穿刺液)에서 직접 단리(單離)한 단핵세포 분획보다도 보다 높은 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성 효율을 나타낸 것을 시사한다.

[0338] 골수는 MSC, 조혈계 세포, 내피세포를 포함하는 다종의 단핵세포를 포함한다. 어느 분획이 Muse세포를 포함하는지를 조사하기 위해, 인간 골수천자액(骨髓穿刺液)에서 단리(單離)한 단핵세포 분획을, CD34, CD117(어느 것도 조혈 줄기세포 마커) 및 CD105(간엽계(間葉系) 세포의 마커)에 대한 항체를 이용해 직접 MACS소팅(sorting)에 제공하고, 각각의 분획을 8시간 트립신(trypsin) 처리하여 7일간 MC배양을 했다. CD34양성, CD117양성 분획에는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 대부분 검출되지 않았지만, CD34음성, CD117음성, CD105양성 분획에는 CD34음성, CD117음성, CD105음성 분획의 50배의 클러스터(cluster)의 형성이 인정되었다. 이 결과는 Muse세포는 주로 CD105양성 간엽계(間葉系) 세포분획 중에 존재하는 것을 시사하고 있다.

[0339] I. MACS소팅(sorting)

[0340] 골수단핵세포 분획에서의 각각의 프랙션(fraction)의 효율은 프랙션(fraction)1(CD105양성 프랙션(fraction))에서 1.8%, 프랙션(fraction)2(CD34양성 · CD117양성 프랙션(fraction))에서 8.5%, 프랙션

(fraction)3(CD34음성 · CD117음성 · CD105음성 프랙션(fraction))에서 89.7%이었다. 프랙션(fraction)1, 2 및 3의 세포덩어리 형성을은 각각 0.5%, 0% 및 0.01%이었다. 따라서, 프랙션(fraction)1의 세포덩어리 형성을은 프랙션(fraction)3의 약 50배이었다.

[0341] J. FACS소팅(sorting)

하나의 예로서 SSEA-3을 마커로서 FACS소팅(sorting)을 하였다.

H-fibroblast 및 HMSC의 양쪽에 대해서 SSEA-3 양성세포 및 SSEA-3 음성세포를 FACS소팅(sorting)에 의해 분리하고, 단일세포 혼탁 배양에 제공했다. SSEA-3 양성세포의 약 50 ? 60%가 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성했다. 한편, SSEA-3 음성세포에서는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성하지 않았다.

[0344] K. Muse세포의 특징

FACS 분석에 의해 무처리H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획은 간엽계(間葉系) 세포에 발현하는 CD44, CD49f, CD54, CD90, CD105 양성의 분획을 포함하는 것을 알았다. 그러나 CD11c, CD34, CD45, CD71, CD166, CD271 및 폰빌레브란트(von Willebrand)(vWF)인자는 음성이었다. 부(富) Muse세포 분획에 있어서는 CD44 및 CD54이 음성으로 된 SSEA-3 양성분획은 약 0.7 ? 1.9%이었다(도 14).

SSEA-3은 다능성 마커(maker)의 1개이므로 무처리의 H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 중의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성을(약 1.2%) 및 부(富) Muse세포 분획에서의 형성을(9 ? 10%)은 각각의 SSEA-3의 양성을(陽性率; 무처리 세포분획은 약 0.7 ? 0.9%, 부(富) Muse세포 분획에서는 7 ? 8.3%)에 유사하였다. SSEA-3의 양성을(陽性率)은 Muse세포가 있는 상태를 나타내고 있는 가능성 있다. 면역조직화학(免疫組織化學)에 의하면, 무처리의 H-fibroblast 분획 및 H-MSC 분획 중의 SSEA-3 양성세포의 수는 1% 미만이었다. 거기서 H-fibroblast분획 및 H-MSC 분획 유래의 부(富) Muse세포 분획으로부터 SSEA-3 양성세포를 소팅(sorting)하고, 단일 부유배양을 했다. 그 결과 SSEA-3 양성세포의 50 ? 60%가 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성했다. 이것은 부(富) Muse세포 분획의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성의 약 6 ? 7배, 무처리 세포분획의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리 형성의 약 60 배다. 한편 SSEA-3 음성의 세포분획으로부터는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성은 인정되지 않았다. FACS에 의한 소팅(sorting)에 의해 얻어진 SSEA-3 양성세포 분획 유래의 단일세포 덩어리로부터 클론(clone) 증식에 의해 얻어진 세포(3,000 ? 5,000 세포)의 SSEA-3 양성을은 약 45%이었다(도 15a a). 이것은 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 형성 과정에 있어서, 비대칭성 분열이 관여하고 있어 단일 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 클론(clone) 증식에 있어서도 같은 것을 시사하고 있다. 실제로 비대칭성 분열에 관여하고 있는 것이 알려져 있는 Numblike는 2개의 세포로의 분열의 과정에서 1개의 세포 중에만 존재한다(도 15b b). 이들의 결과는 비대칭성 세포분열이 Muse세포의 증식에 관여하고 있는 것을 시사한다.

[0347] 전자현미경 관찰에 의해 H-fibroblast 분획 및 장시간 트립신(trypsin) 처리후에 소팅(sorting)한 H-MSC 분획 유래 SSEA-3 음성세포에 있어서 핵의 변형과 세포질 중의 소포(小胞)가 관찰되어 세포가 장해를 받고 있는 것이 나타났다. 그러나, SSEA-3 음성세포와 양성세포의 사이에 명확한 형태적인 차이는 인정되지 않았다(도 15c c 및 d).

[0348] SSEA-3 양성세포의 중요성은 이식 실험에 있어서도 나타났다. SSEA-3 음성세포 분획을 이식했을 경우 SSEA-3 양성세포 분획을 이식했을 경우에 비해, 조직 마커의 발현은 대부분의 세포에서 인정되지 않았다.

[0349] 부(富) Muse세포 분획에 있어서, 대부분의 SSEA-3 양성세포는 Oct3/4 및 Sox2을 공발현(共發現)하고 있어 세포질 중에 검출되었다(도 15d e 및 g). 그러나, 핵 중에서 발현하고 있는 세포는 자극히 적었다(도 15d f). 이 결과는 SSEA-3이 Muse세포가 좋은 마커가 될 수 있는 것을 나타내고 있다. 한편 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리의 세포에 있어서는 Oct3/4 및 Sox2은 핵 중에 주로 국재(局在) 하고 있었다(도 7b h 및 i). 이 2개 마커의 세포내 국재(局在)의 차이는 세포 상태의 차이를 반영하고 있는 가능성이 있다.

[0350] Muse세포가 장시간의 트립신(trypsin) 처리에 의해 인공적으로 유도된 가능성도 부정할 수 없다. 많은 Muse세포가 골수 중의 CD105 양성세포 분획에 존재한다. 게다가 SSEA-3 양성세포는 Muse세포의 특성을 나타낸다. 거기서 인간 성체 골수천자액(骨髓穿刺液)으로 SSEA-3 및 CD105의 이중양성(double positive)세포로서, Muse세포를 직접 얻는 것을 시도했다. 2중 양성세포는 골수 유래 단핵구(單核球) 중에 0.025% ? 0.05% 존재하고, 그것을 장시간의 트립신(trypsin) 처리 없이, 직접 단일세포 부유배양에 제공했다. 7일 후, 11.4 ± 1.2%의 세

포(단핵구(單核球)의 0.003 ~ 0.005%에 상당한다)가 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성하고, 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 양성이었다. 그 다음에 단일 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 접착 배양에 의해 3,000 세포까지 증식시켜 단일 부유배양에 제공했다. 이 세포 중 33.5 ± 3.1%의 세포가 제2세대의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성했다. 또, 단일 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 젤라틴으로 코트(coat)한 배양 디시(dis h)에서 증식시킨 세포에 대해서 RT-PCR을 한바, α -페토프로테인, GATA6, MAP-2 및 Nkx 2.5의 발현이 인정되었다. 이것은 인간 성체 골수 중에 Muse세포의 특성을 갖는 세포가 존재하는 것을 시사한다.

[0351] 상기한 바와 같이, 스트레스 자극에 의해 비줄기세포를 제거함으로써 줄기세포를 부화(富化)할 수 있었다. Muse세포를 장시간 트립신(trypsin) 처리와 그 후의 SSEA-3 양성세포의 소팅(sorting)에 의해 효율적으로 모을 수 있었다. Muse세포는 다능성 마커를 발현하고, 알칼리 포스파타아제(phosphatase) 염색 양성이며, 외배엽(外胚葉), 중배엽(中胚葉) 및 내배엽계(內胚葉系) 세포로 분화할 수 있는 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성했다. 또, 증식 속도의 측정에 있어서 종양 형성성 증식에 관한 특징을 갖고 있지 않고, 텔로머라아제(telomerase) 활성도 갖고 있지 않았다. 이것은 Muse세포는 폭발적 증식을 막기 위한 다중의 시큐리티(security) 시스템을 갖고 있는 것을 나타내고 있다. Muse세포의 비종양 형성성 특성은 Muse세포를 마우스 정소(精巢)에 주입하는 실험에 있어서도 인정되었다. 이 특성은 생체 기능의 밸런스를 유지하는데 있어서 형편이 좋고, 이 특성이 없으면, 이상 증식이나 기형성에 의해 생체는 파괴되어 종양 형성이 나 테라토마(teratoma) 형성을 초래한다.

[0352] Muse세포의 다능성은 접착 배양계에서는 표면화되지 않고, 부유 배양에서 관찰되었다.

[0353] 통상, Muse세포는 불활성 휴면 상태에 있어 생체가 위기적(危機的) 상태에 빠지거나, 혹은 위독한 상해를 입거나 또는 혀혈상태(虛血狀態) 등의 스트레스 과다 상태가 유지되면 어느 종류의 시그널이 전달되어 활성화 한다라고 생각된다. 그 후, Muse세포는 조직 재생에 공헌하고, 세포간 상호 작용이나 조직화에 공헌한다.

[0354] 실시예 2

[0355] SSEA-3을 이용해서 단리(單離)한 Muse세포의 특성 분석

[0356] 실시예 1의 검토에 있어서, FACS에 의해 얻어진 SSEA-3 양성세포 분획이 다능성 줄기세포의 특성을 갖고 있는 것 즉, Muse세포인 것이 밝혀졌지만(상기 J, K등), 게다가 단리(單離)한 SSEA-3 양성세포를 이용하여 *in vitro*에서의 분화능(分化能) 및 *in vivo*에서의 분화능(分化能)을 검토하고, 더욱 Muse 유래 iPS세포의 확립을 하였다.

[0357] 1. 손상 조직에의 이식에 의한 *in vivo*에서의 분화능(分化能)의 검토

[0358] GFP(녹색형광 단백질)-렌티바이러스(lentivirus)로 표식(標識)한 SSEA-3 양성 Muse세포를 단리(單離)하고, 척수(압박손상), 간장(CCl₄을 복강내 주사, 극증(劇症) 간염 모델) 또는 비복근(cardiotoxin 주사)에 손상을 준 면역부전(免疫不全) 마우스(OG마우스)에 정맥 주사에 의해 이식했다. 인간 피부세포 유래의 Muse세포를 GFP(녹색형광 단백질)-렌티바이러스(lentivirus)로 표식(標識)하고(Hayase M et al., J Cereb Blood Flow Metab. 29(8):1409-20, 2009), Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리가 표식세포(標識細胞) 유래인 것을 GFP에 의해 확인했다. 척수손상은 OG마우스에 대하여 레벨 Th9로 하고(Farooque M et al., Acta Neuropathol., 100;13-22, 2000), OG마우스의 비복근(gastrocnemius)에 cardiotoxin을 투여해 근육변성을 유발하여 사염화탄소를 OG마우스에 복강내 투여하고, 간장변성을(肝臟變性) 유발했다. 근육 및 간장에 대해서는 2일 후, 척수에 대해서는 7일 후에 1×10^5 의 Muse세포를 정맥 주사에 의해 이식했다(각 6마리의 마우스를 사용). 컨트롤로서 GFP 표식(標識) MEC집단을 정맥 주사한 마우스를 이용했다. 이식의 3 또는 4주일 후에 마우스를 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하고, 면역조직화학(免疫組織化學) 및 공초점 레이저 현미경 관찰에 제공했다.

[0359] 척수손상의 4주일 후 GFP 및 인간 골지(Golgi) 복합체 양성세포가 신경 필라멘트(neurofilament)를 형성하고 있었다(도 16a N 및 O). 또한 4주일 후 재생하고 있는 간장에 있어서, GFP 및 인간 골지(Golgi) 복합체 양성세포가 인간 알부민을 발현하고 있었다(도 16a P). RT-PCR의 결과에 의해 Muse세포를 이식한 OG 마우스 간장에 있어서 인간 알부민의 형성이 나타났다(도 16b). GFP 양성세포를 재생하고 있는 근육에 주사한 경우, 3주일에서 인간 디스트로핀(dystrophin)을 발현했다(도 16c). 한편, SSEA-3 음성 인간 피부 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획을 이식한 경우, 세포의 인터그레이트(integrate)는 현저하게 적고, 조직 마커(maker)가 양성인 세포는 대부분 인정되지 않았다. 이를 결과는 Muse세포가 손상 조직에 통합되어 각각 *in vivo*에서 외배엽(外胚

葉), 중배엽(中胚葉) 및 내배엽(內胚葉)으로 분화할 수 있는 것을 나타낸다.

[0360] 2. 단일 Muse세포 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터의 증식세포의 분화

Muse세포의 분화 조절에 유도 시스템이 유효한지 어떤지를 검토했다. 단일 SSEA-3 양성 Muse세포 유래의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 접착 배양에 제공하여 증식시켰다. 단일 Muse세포 유래의 증식세포를 회수하고, 4개의 군으로 나누어 각각의 군에 대하여 신경(神經), 뼈세포(骨細胞), 지방세포(脂肪細胞) 및 줄기세포로의 분화 유도를 하였다(n=5).

[0362] 신경유도를 위해서는 세포를 poly-HEMA에서 코트(coat)한 디시(dish)를 이용해서 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 밀도로 B-27 supplement를 포함하는 NEUROBASAI 배지(Gibco 사)중에서 7일간 배양하고, sphere(구상(球狀))의 세포덩어리)을 형성시켰다. 분화시키기 위해 sphere를 폴리-L-리신(Lysin)에서 코트(coat)한 글라스 위로 옮기고, 25ng/ml FGF 및 25ng/ml BDNF를 포함하는 2% FBS 중에서 10일간 배양했다.

[0363] 뼈세포(骨細胞) 유도를 위해서는 세포를 $4.2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 밀도로 Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit(R&D Systems)의 뼈세포(骨細胞) 유도 배지를 이용해서 14일간 배양했다.

[0364] 지방세포(脂肪細胞) 유도를 위해서는 세포를 $2.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 의 밀도로 Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit(R&D Systems)의 지방세포(脂肪細胞) 유도 배지를 이용해서 14일간 배양했다.

[0365] 간장세포(肝臟細胞) 유도를 위해서는 세포를 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 의 밀도로 DMEM(10% FBS, 10nM 덱사메타손(dexamethasone) 및 100ng/ml HGF를 포함하는 10×ITS(GIBCOO 사), 50ng/ml FGF4를 포함한다)을 이용해서 콜라겐 코트(collagen coat)한 디시(dish) 상에서 14일간 배양했다.

[0366] 신경유도에 의해 sphere가 형성되어 sphere는 신경 줄기세포 마커(maker)인 네스틴(nestin), Musashi 및 NeuroD 양성인 것이 확인되었다(도 17a A?D). 이를 sphere를 분화배지 중에서 배양하면 MAP-2 또는 GFAP 양성 세포로 분화하였다(도 17a E, MAP-2, GFAP 모두 89 ± 5.7%의 양성을). 세포를 뼈세포(骨細胞) 유도했을 때, 오сте오칼신(osteocalcin) 양성세포(97 ± 3.5%) 및 알칼리 포스파타제(phosphatase)가 인정되었다(도 17a F 및 G). 지방세포 분화에 대해서는 오일 레드(oil red)로 염색되는 지방방울을 갖는 세포가 형성되었다(90 ± 4.9%)(도 17a H?I). 간세포(肝細胞) 유도에 인간 α-페토프로테인(fetoprotein) 양성세포(도 17a J, 87 ± 7.6%) 및 인간 알부민과 인간 α-페토프로테인(fetoprotein) 양성세포(도 17b)의 형성이 RT-PCR에 의해 인정되었다. 이들 결과는 Muse세포의 3배엽으로의 분화가 대단히 높은 효율로 유도에 의해 조절할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0367] 3. 인간 성인 피부로부터의 SSEA-3 양성세포의 채취

[0368] 배양 세포를 배양하거나 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성시키는 일 없이 인간 성인 피부로부터 직접 Muse세포를 단리(單離)하는 것을 시도했다.

[0369] 인간 정상인(n=3)으로부터의 피부(BIOPREDIC International에서 입수)의 상피 및 지방조직을 제외한 진피(眞皮)를 얻어 진피(眞皮)를 10% FBS를 포함하는 α-MEM 중 콜라제나제(Collagenase)/디스파아제(Dispase)와 함께 37°C에서 36시간 인큐베이트 했다. 여과에 의해 소화(消化)된 피부세포를 회수하고, 1500rpm으로 20분간 원심분리하고, α-MEM에서 세정하여 0.25% 트립신(trypsin)-HBSS에서 5분간 인큐베이트 했다. 세포를 더욱 FACS버퍼(buffer)에서 천조지(千兆誌), SSEA-3과 인큐베이트 하고, FACS를 이용해서 SSEA-3 양성세포를 소팅(sorting) 했다. 약 7cm²의 피부조직으로부터 $1.3 \pm 0.3 \times 10^4$ 의 단일세포를 회수할 수 있었다. SSEA-3 양성세포는 회수한 단일세포의 1.7 ± 0.2%이었다.

[0370] SSEA-3 양성세포의 21.0 ± 1.7%가 한계희석에 의한 단일세포 부유 배양으로 7일에 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 형성했다. Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리는 ALP 양성이며, 단일의 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리로부터 젤라틴으로 코트(coat)한 디시(dish)를 이용해서 증식시킨 세포에 대해서 RT-PCR에서 확인한바, MAP-2, Brachyury, Nkx 2.5, GATA6 및 α-페토프로테인(fetoprotein)을 발현하고 있었다. 이 결과는 Muse세포와 같은 성질을 갖는 세포가 상술한 성인 인간 골수액과 동일하게 성인 인간 피부에도 존재하는 것을 나타내고 있다.

[0371] 인간 성인 피부는 SKP(피부 유래 전구세포(前驅細胞)), NCSC(신경계(神經堤) 줄기세포), 멜라노블래스트(melanoblast; MB), 혈관주위세포(PC), 내피 전구세포(前驅細胞; EP), 지방 유래 줄기세포(ADSC)등 각종 타

입의 줄기세포나 전구세포(前驅細胞)를 포함하고 있다. Muse세포가 이들 줄기세포 등과 같은 가능성을 배제하기 위해 Muse세포에 있어서의 Snai1(SKP의 마커), Slug(SKP의 마커), Sox10(NCSC의 마커), CD271(NCSC의 마커), Tyrp1(MB의 마커), Dct(MB의 마커), CD117(c-Kit)(MB의 마커), CD146(PC 및 ADSC의 마커), NG2(PC의 마커), CD34(EP 및 ADSC의 마커) 및 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자(EP의 마커)의 발현을 분석했다. 이들 마커의 모두 SSEA-3 양성세포에 있어서, FACS분석 또는 RT-PCR에서 인정되지 않았다(도 18a 및 도 18b). 이 결과는 Muse세포는 인간 성인 피부에 존재하는 것이 공지(公知)인 줄기세포나 전구세포(前驅細胞)와 다른 세포인 것을 나타내고 있다.

[0372] 게다가, 페라이트(ferrite) 입자를 이용해서 Muse세포의 탐식능(貪食能)을 조사한바, Muse세포는 페라이트(ferrite) 입자를 용이하게 혼합, 높은 탐식능(貪食能)을 갖고 있었다(도 18c).

[0373] 4. Muse유래 iPS세포(Muse-iPSC)의 확립

[0374] iPS세포는 Oct3/4 유전자, Sox2 유전자, Klf4 유전자, c-Myc 유전자, Nanog유전자, Lin28 유전자 등을 도입해 제작되고 있다. Muse세포는 다능성(pluripotency) 마커를 발현하고, 외배엽(外胚葉), 내배엽(內胚葉) 및 중배엽계(中胚葉系) 세포로 분화할 수 있다고 하는 점에서 iPS세포와 유사한 특성을 갖고 있다. 거기서 Muse세포가 iPS세포의 좋은 재료로 될 수 있을지를 검토했다. 방법은 아래대로 이었다.

[0375] H-fibroblast 분획 유래의 SSEA-3 양성세포 및 음성세포에 Takahashi et al., Cell, 131, 861-872(2007)의 기재에 따라서 레트로바이러스(retroviral) 백터를 이용하고, Nanog, Oct3/4, KLF4 및 c-Myc의 4개의 인자를 도입하여 배양했다. 이하에, 방법의 상세를 나타냈다.

[0376] 플라스미드(plasmid)의 확립

[0377] pMXs 레트로바이러스(retroviral) 백터(Cell Biolabs)에 인간 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc의 open reading frame를 주입했다.

[0378] 레트로바이러스(retroviral)의 감염 및 iPS세포의 확립

[0379] PLAT-A 세포를 100mm dish에 5×10^6 세포의 밀도로 뿐려 하룻밤 배양했다. 다음 날에 Fugene HD를 이용해서 트랜스펙션(transfection)을 하였다. 트랜스펙션(transfection)으로부터 24시간 후, 새로운 배지로 교환했다. 3일 후에 상청(上清)을 회수하고, 0.45 μm의 필터에 통과시켜 4 μg/ml의 폴리브렌(polybrene)을 가했다. 60mm dish에 1×10^5 세포의 밀도로 뿐린 NHDF(피부 섬유아세포(纖維芽細胞))에 바이러스(virus) 용액을 감염시켰다. 24시간 후 바이러스가 들어 있지 않은 새로운 배지로 교환했다. 바이러스 감염으로부터 4일 후에 트립신(trypsin)에 의해 벗긴 세포를 MEF(피더(feeder) 세포) 상에 3×10^4 세포의 밀도로 뿐렸다. 다음날 배지를 4ng/ml bFGF를 가한 Primate ES medium으로 교환했다. 그 후 2일에 1회 배지교환을 하고, 30일 후 콜로니를 꾹업하여 24웰 플레이트에 뿐렸다.

[0380] PCR분석

[0381] RNeasy mini kit(QIAGEN)에 의해 RNA를 정제했다. 500ng의 RNA를 Super Scr ipt II를 이용해서 역전사(逆轉寫) 했다. 내인성(内因性)의 Oct, Sox2, Klf4, Myc, Nanog의 프라이머(primer)와 PCR의 조건 등은 akahashi et al., Cell, 131, 861- 872(2007)에 기재한 대로 하였다.

[0382] in vitro에 있어서의 iPS세포의 분화

[0383] 콜라겐나제(collagenase)에 의해 iPS세포를 채취했다. 세포의 덩어리를 Poly -HEMA에서 코팅(coating)한 dish에 20% Knockout serum replacement(Invitrogen), 2mM-Glutamine, 1×10^{-4} M nonessential amino acid, 1×10^{-4} M 2-mercaptoethanol(Nacalai), 0.5% Penicillin/Streptomycin을 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양했다. 배지는 2일에 일회 교환했다. 7일 후 EB를 젤라틴 코트(coat)한 dish에 뿐려 같은 배지에서 일주일 간 배양했다.

[0384] 테라토마(teratoma)의 형성

[0385] 60mm dish의 iPS세포를 Rock inhibitor에 의해 처리하고, Accutase(등록상표)에 의해 채취해 튜브에 모아 원심 후 PBS에 부유시켰다. 이것을 NOG mouse(등록상표)(재단법인 실험동물중앙연구소)의 정소(精巢)에 주사를 하였다. 12주 후에 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 의해 고정했다. 파라핀(paraffin) 절편은

HE(Hematoxylin & Eosin) 염색을 했다.

[0386] 아래의 결과를 얻었다.

[0387] H-fibroblast 분획 유래의 SSEA-3 양성세포 및 음성세포에 Takahashi et al., Cell, 131, 861-872(2007)의 기재에 따라 레트로바이러스(retroviral) 벡터를 이용하고, Nanog, Oct3/4, KLF4 및 c-Myc의 4개의 인자를 도입하여 5일 후에 MEF 상에 다시 뿌려 배양했다. colony pickup을 하는 직전 즉, MEF상에서의 배양 30일째에 있어서는 SSEA-3 음성세포 중에서 형성된 콜로니는 비ES 세포양(細胞樣) 콜로니이며, ES세포의 마커인 Tra-1-80 양성의 콜로니는 완전히 보여지지 않았다. 한편, 많은 SSEA-3 양성세포에 있어서는 음성 세포군의 약 7배 정도 수의 콜로니를 형성하고, 그것들의 Tra-1-80은 양성이었다. 주목해야 할 것은 SSEA-3 음성세포(콜로니나 콜로니를 형성하지 않은 세포 모두를 회수)에서는 RT-PCR에서 측정한바, MEF 상 30일째의 colony pick up직전에서도 Nonog, Sox2 등의 다능성에 밀접하게 관련한 중요한 유전자는 음성이었다. 한편, SSEA-3 양성세포에 있어서, 내인성(內因性)의 Oct3/4, KLF4 및 Rex1이 업레귤레이션(up-regulation) 되어 있어 더욱 Nanog, Sox2 이 발현하고 있었다. 예측되고 있었던 대로 SSEA-3 양성세포를 colony pickup 하고, 새로운 MEF(피더(feeder) 세포) 상으로 옮겼을 경우, 무처리 H-fibroblast 분획 세포를 이용했을 경우보다도(25배 정도, 바람직하게는 30배 정도) 높은 효율로 iPS 세포(줄기세포 포함)를 제작할 수 있었다. 이들 iPS세포에 있어서 면역세포화학(免疫組織化學), RT-PCR 및 Q-PCR에 의해 Tra-1-60, Tra-a-80, Rex1, UTF-1, 텔로머라아제(telomerase) 역전사(逆轉寫) 효소(TERT) 및 인간 ES세포에 있어서 발현하고 있는 인자가 업레귤레이션(up-regulation) 하고 있고, 혹은 새롭게 발현하고 있었다(도 19, 21). 또, 얻어진 Muse세포 유래 iPS세포에 있어서 Nanog, Oct3/4, Sox2 및 TRA-1-81이 발현하고 있었다(도 19). RT-PCR에 의해 Muse세포 유래 iPS세포에서는 Nanog, Oct3/4 및 Sox2이 발현하고 있지만, SSEA-3 음성세포 유래 콜로니에서는 발현하지 않는 것을 알았다(도 21).

[0388] SSEA-3 양성세포와 SSEA-3 음성세포 분획에서 Oct3/4 유전자, Sox2 유전자, Klf4 유전자 및 c-Myc 유전자의 도입 효율은 대부분 같았다. 도입한 세포를 마우스 피더(feeder) 세포 상에서 디시(dish)당 1×10^5 의 밀도로 배양했다. 양쪽의 각군에서 콜로니를 형성했지만, SSEA-3 음성세포 분획으로부터 형성된 콜로니 수는 SSEA-3 양성세포 분획의 7분의 1정도이었다. 게다가 SSEA-3 양성세포 분획과 달리 SSEA-3 음성세포 분획분에서는 인간 다능성 줄기세포 마커인 TRA-1-81 양성 콜로니를 채취하는 직전의 배양 30일 후에서도 인정되지 않았다(도 22a). RT-PCR에 의해 내인성(內因性) Sox2 및 Nanog은 SSEA-3 양성세포 유래 분획만으로 발현하고 있고, SSEA-3 음성세포 분획에서는 발현하고 있지 않았다(도 22b).

[0389] 게다가 SSEA-3 양성 및 음성세포 분획을 각각 계대(繼代) 하고, iPS세포주(細胞株)를 확립했다. 3계대(繼代) 후 인간 ES세포양(細胞樣)의 형태(평평한 콜로니)을 나타낸 각각의 콜로니(도 22c C 및 C1)에 대해서 RT-PCR을 하고, 내인성(內因性) oct3/4, Sox2 및 Nanog을 발현하고 있는 콜로니를 iPS콜로니로서 카운트했다. 그 결과 iPS세포는 SSEA-3 양성세포 유래 콜로니만으로부터 형성되어 효율은 0.03%이었다. SSEA-3 음성세포 유래 콜로니로부터는 형성되지 않았다(도 22c D 및 D1).

[0390] 게다가 Muse세포로부터 확립한 iPS세포는 외배엽(外胚葉), 내배엽(內胚葉) 및 중배엽계(中胚葉系) 세포로 분화하여 마우스 정소(精巢)에서 테라토마(teratoma a)를 형성했다(도 23a?23c).

[0391] Muse세포의 증식 활성은 증식속도 및 텔로머라아제(telomerase) 활성의 관점에서 그다지 높지 않다. 이것은 Muse세포는 마우스 정소(精巢) 중에서 3배엽성의 세포로 분화하지만, 테라토마(teratoma)는 형성하지 않는 것과 대응하고 있다. 만일 Muse세포가 피부나 골수 등의 인간 성인 조직에 있어서 유지되고 있을 경우, 그 증식은 엄밀하게 조절되고 있을 것이며, 그렇지 않으면, Muse세포는 생체의 모든 부분으로 종양을 형성해버릴 것인 것을 생각해도 타당하다. 게다가 어떤 조건 아래에서 배양한 배반엽상층(杯盤葉上層; epiblast) 줄기세포가 마우스 정소(精巢) 중에서 테라토마(teratoma)를 형성하지 않는 것이 나타나 있는 것을 고려하면(Chou et al., Cell, 135, 449-461(2008)), 다능성 세포가 항상 테라토마(teratoma)를 형성한다고는 말할 수 없다. Muse세포는 처음부터 다능성 마커의 발현이나 분화능(分化能) 등에 있어서 다능성 세포의 특성을 나타내므로 Muse세포는 단독으로 iPS세포가 되고, 증식 활성이 상승하여 마우스 정소(精巢) 중에서 테라토마(teratoma)를 형성하게 되는 것이 예측된다. iPS의 유도 메커니즘은 해명되지 않고 있지만, 간엽계(間葉系) 세포 중의 Muse 세포에 있어서의 종양성 증식성의 획득 가능성성이 있다.

[0392] 무처리 인간 피부 섬유아세포(纖維芽細胞) 분획으로부터 약 0.001%의 효율로 iPS세포를 확립할 수 있었지만, 이것은 K. Takahashi et al., Cell 131, 861(2007)의 보고와 일치한다. 따라서 SSEA-3 양성세포로부터의

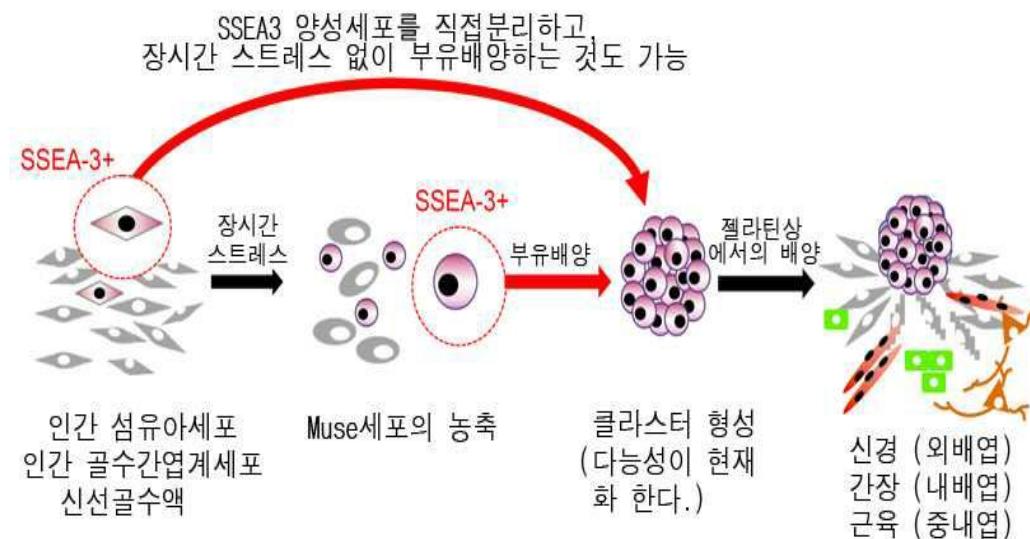
iPS세포 제작 효율은 무처리 섬유아세포(纖維芽細胞)에 대하여 30배 높았다. 이것은 iPS세포의 형성에 주로 Muse세포가 기여하고 있는 것을 시사하고 있다.

[0393] 면역조직화학(免疫組織化學) 및 RT-PCR에 의해 Muse 유래 iPS세포로부터 얻은 배양체(胚樣體)는 in vitro에서 외배엽(外胚葉; 신경 필라멘트 및 MAP-2), 중배엽(中胚葉; SMA, Brachyury 및 Nkx 2.5), 및 내배엽세포(內胚葉細胞; α -페토프로테인(fetoprotein) 및 GATA-6)로 분화하는 것을 알았다. 게다가 면역부전(免疫不全) 마우스 정소(精巢)에 Muse유래 iPS세포를 투여한바, 테라토마(teratoma)의 형성이 관찰되었다. 한편, Muse세포 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리를 정소(精巢)에 주사한 경우, 6개월 후에 있어서도 테라토마(teratoma)의 형성은 인정되지 않고, MEF를 주사한 컨트롤과 비교해서 크기도 그다지 커지지 않았다. 그러나 인간 미토콘드리아 및 SMA, α -페토프로테인(fetoprotein) 및 신경 필라멘트가 양성의 세포로 동정(同定) 되었다. 이 결과는 Muse 유래 iPS세포와 달리 원래의 Muse세포는 테라토마(teratoma)를 형성하지 않지만, 면역부전(免疫不全) 마우스 중에서 외배엽(外胚葉), 중배엽(中胚葉) 및 내배엽(內胚葉)으로 분화할 수 있는 것을 나타낸다.

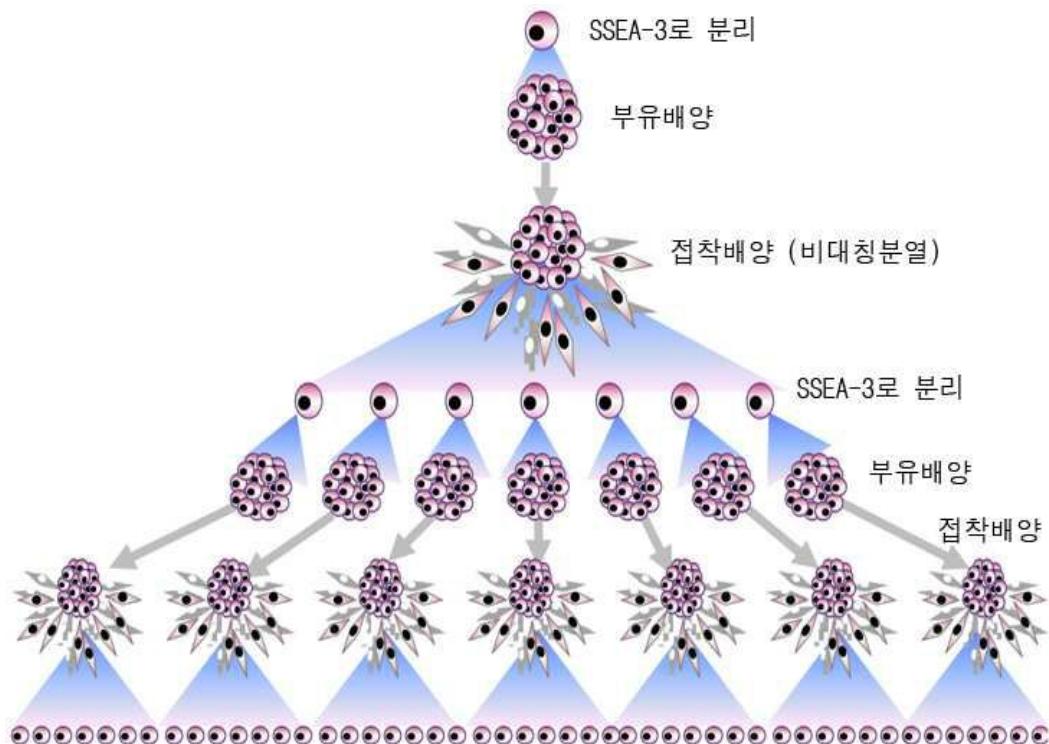
[0394] Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리와 Muse 유래 iPS세포에 대해서 정량 PCR(Q-PCR)을 하였다. 결과를 도 25 및 26에 나타냈다. 세포 주기조절에 관련한 유전자의 발현 패턴은 크게 차이가 났다. 세포 주기진행에 관련한 유전자의 대부분은 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에서는 다운 레귤레이트(down-regulate) 되고 있었지만, Muse 유래 iPS세포에서는 업 레귤레이트(up-regulate)되고 있었다. 한편, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리와 Muse 유래 iPS세포에 있어서 다능성 및 미분화 상태에 관여한 유전자의 발현은 같은 경향을 나타냈다. 단, Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 있어서의 Nanog, Oct3/4 및 Sox2의 발현 레벨은 Muse 유래 iPS세포보다 훨씬 낮았다. Nanog 유전자 및 Oct3/4 유전자의 프로모터(promoter) 영역의 시토신(cytosine) · 구아닌 뉴클레오티드(CpG)는 Muse 유래 iPS세포로 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에 비해서 메틸화의 정도는 작았다. 한편, Nanog 유전자의 프로모터(promoter) 영역의 CpG의 메틸화는 SSEA-3 음성 무처리 세포분획에 비해 Muse세포 유래 배양체양(胚樣體樣) 세포덩어리에서 낮았다(도 24). 이 결과는 Muse세포와 Muse 유래 iPS세포 사이의 다능성 마커의 발현 레벨의 차이를 설명한다.

도면

도면1a



도면1b



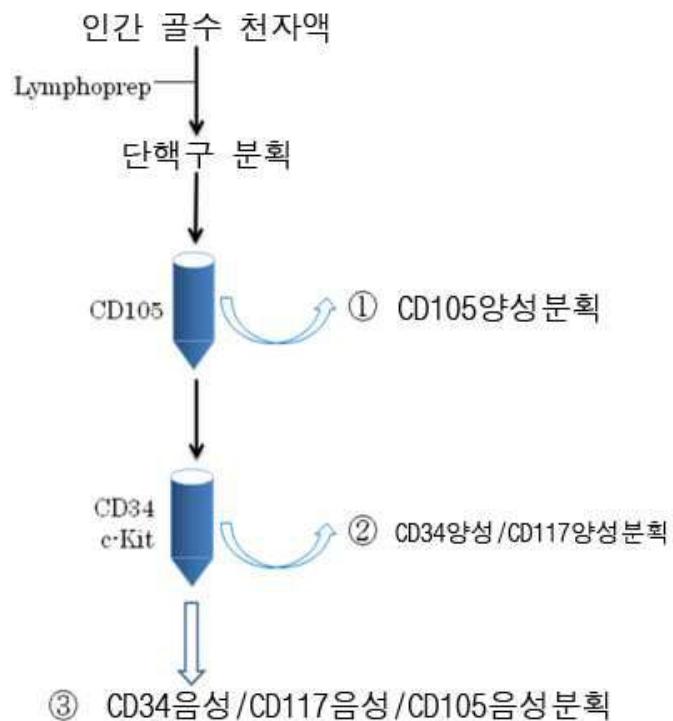
도면2

Gene Symbol	Total	D24 EB body/D24 Native	NHDF EB body/NHDF Native	Gene Title
THBD	1267.42467	42.96487494	1224.459795	thrombomodulin
IL1RN	960.4457022	12.0038603	948.4418419	interleukin 1 receptor antagonist
FOS	954.4076469	88.7202031	865.6874438	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
SLC16A6	849.437506	715.7799818	133.8575242	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
TYRP1	768.3374259	11.67216252	756.6652634	tyrosinase-related protein 1
CAON1A	685.5302732	3.084442121	682.445831	Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
C16orf81	531.0858738	528.3969782	2.688895627	chromosome 16 open reading frame 81
CHI3L1	489.924397	373.8511267	116.0732704	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
PRSS35	441.7622409	371.6403738	70.12186703	protease, serine, 35
KYNU	420.8532931	182.1885786	238.6647145	kynureninase (L-kynurenone hydrolase)
SLC16A6	407.4159044	315.8163678	91.59953662	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
APOE	357.4991884	105.5807107	251.9184778	apolipoprotein E
THBD	347.7592226	34.12473279	313.6344898	thrombomodulin
SYTL5	320.0330513	15.80876986	304.2242814	synaptotagmin-like 5
CHI3L1	299.4142542	280.1989748	39.21527948	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
ABCA13	290.3969665	271.9782856	18.41868089	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13
ANGPTL4	284.3113469	11.53113972	272.7802072	angiopoietin-like 4
PTGS2	273.0706903	201.4865123	71.58417805	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
STC1	255.0878156	29.28287475	225.8049409	stanniocalcin 1
CCDC102B	253.1960755	37.22467468	215.9714008	coiled-coil domain containing 102B

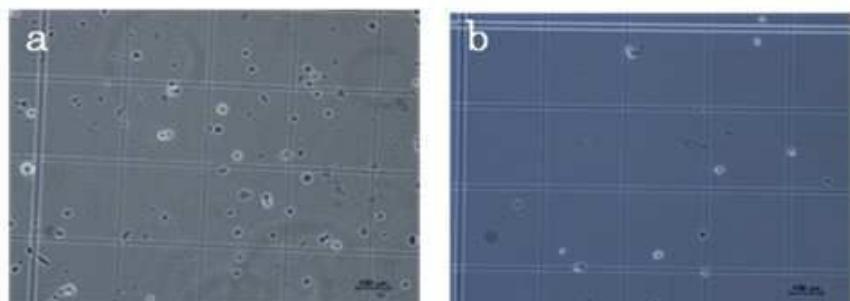
도면3

Gene Symbol	Total	D24 EB/hES	NHDF EB/hES	Gene Title
MMP1	36528.90821	6836.563387	29692.34482	matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)
EREG	19813.4402	18961.45781	851.9823837	epiregulin
CHI3L1	9641.34444	8842.305483	799.038957	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
---	7940.341316	7298.64809	641.6932268	Transcribed locus
CHI3L1	5714.359227	5385.877948	328.4812811	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
SRGN	4655.28423	4636.821682	18.46256778	serglycin
---	4397.855874	3959.205654	438.6502206	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1913076
RIN2	3611.379317	859.9132609	2751.466056	Ras and Rab interactor 2
LUM	3396.245648	1797.976375	1598.269272	lumican
CLCA2	3331.259662	747.5657674	2583.693895	CLCA family member 2, chloride channel regulator
IL8	3143.389365	2638.045747	505.3436182	interleukin 8
LOC401097	3012.485859	1860.366679	1152.119181	Similar to LOC166075
DPT	2807.405268	56.39203934	2751.013226	dermatopontin
ELTD1	2658.65006	1751.976082	906.6739784	EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1
IGFBP1	2423.035758	2405.299722	17.73603586	insulin-like growth factor binding protein 1
SLC16A4	2305.561138	1826.823388	478.7378001	solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5)
SRGN	2293.730946	2279.537455	14.19349126	serglycin
GREM2	2053.928699	159.813291	1894.115408	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)
IGFBP5	1960.755393	1915.425977	45.3294163	insulin-like growth factor binding protein 5
SQRDL	1918.477233	1217.387684	701.0895492	sulfide quinone reductase-like (yeast)

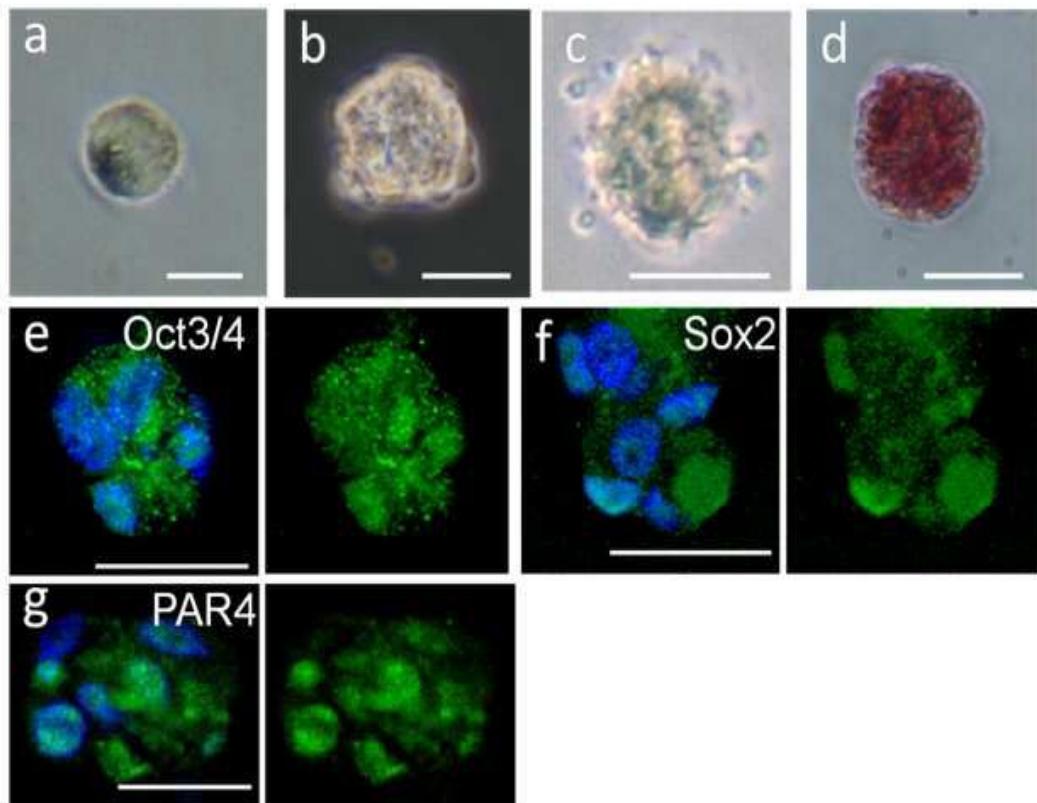
도면4



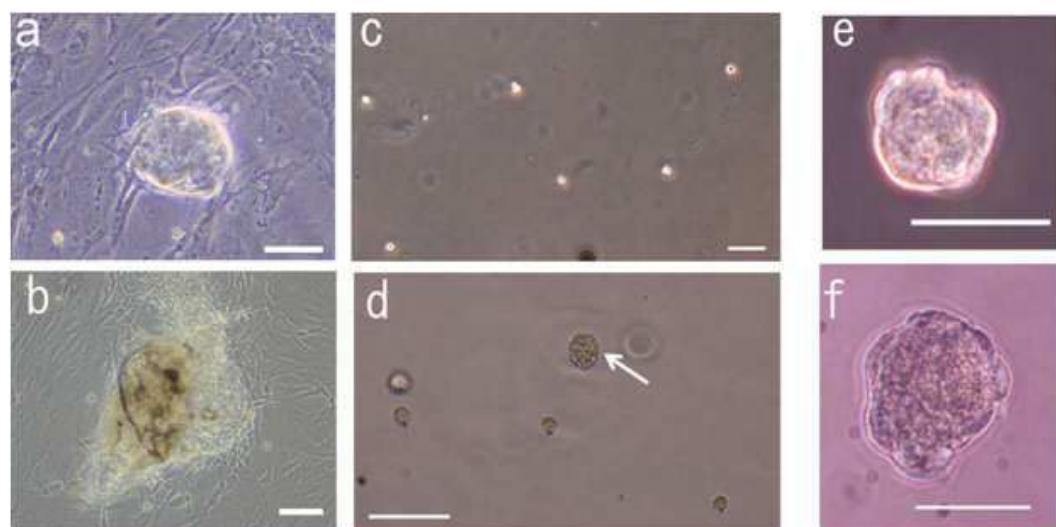
도면5



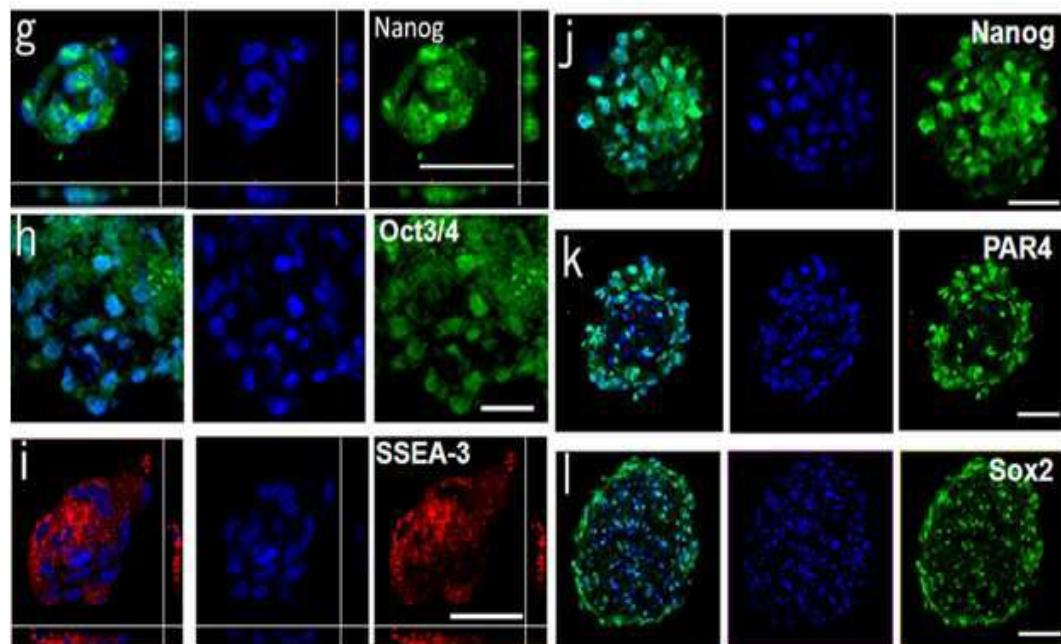
도면6



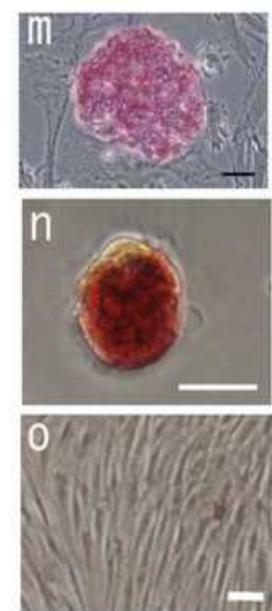
도면7a



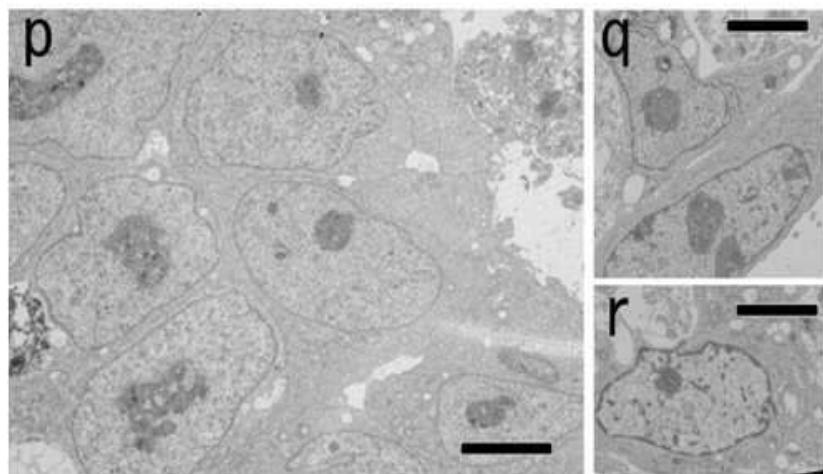
도면7b



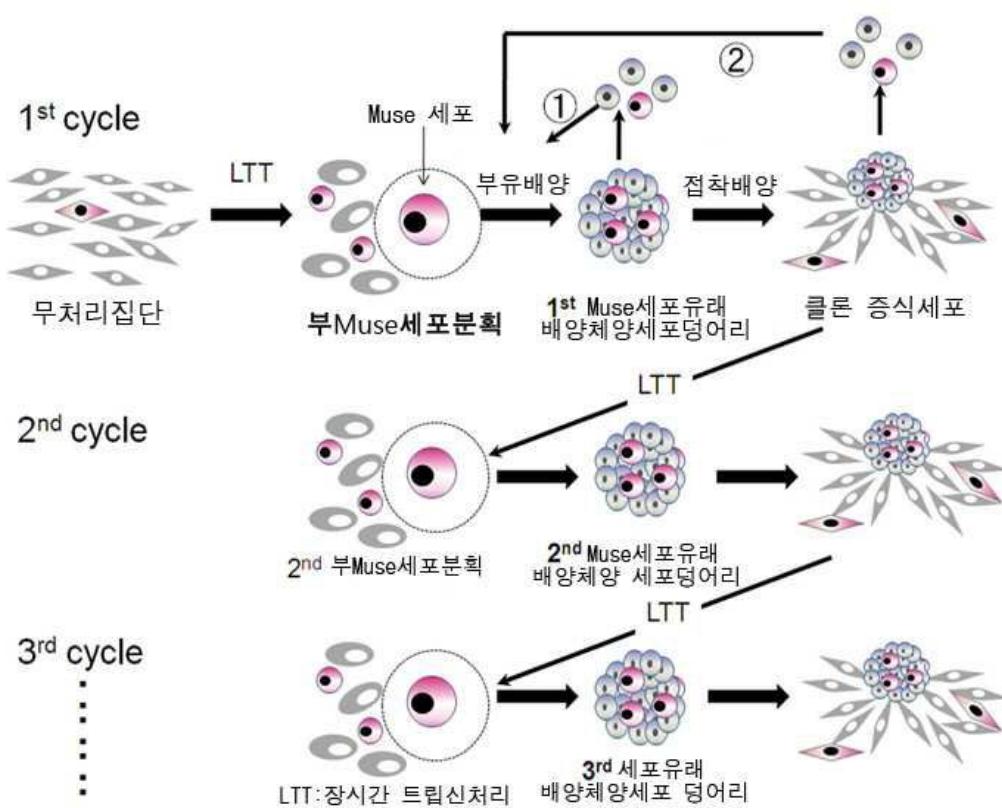
도면7c



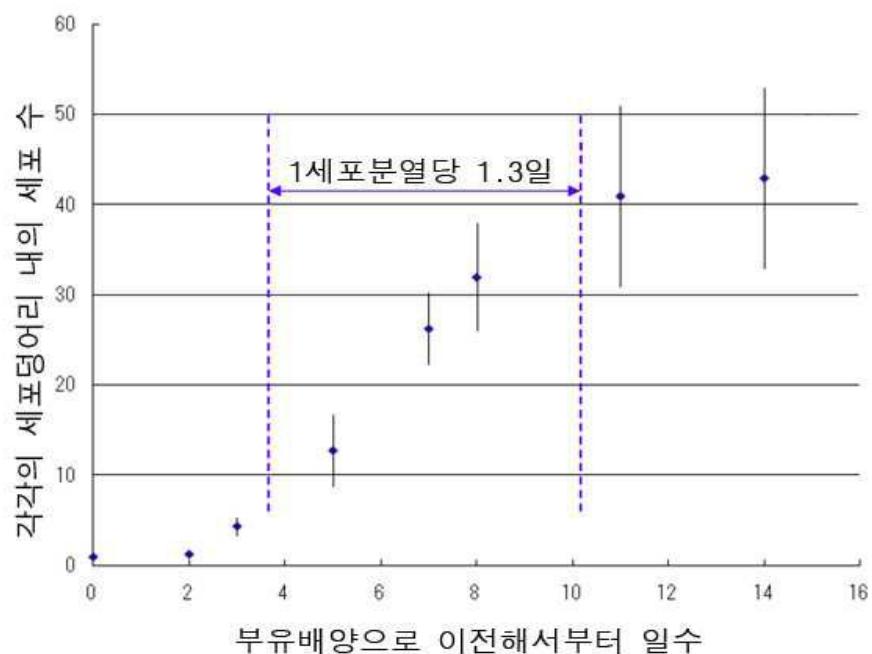
도면7d



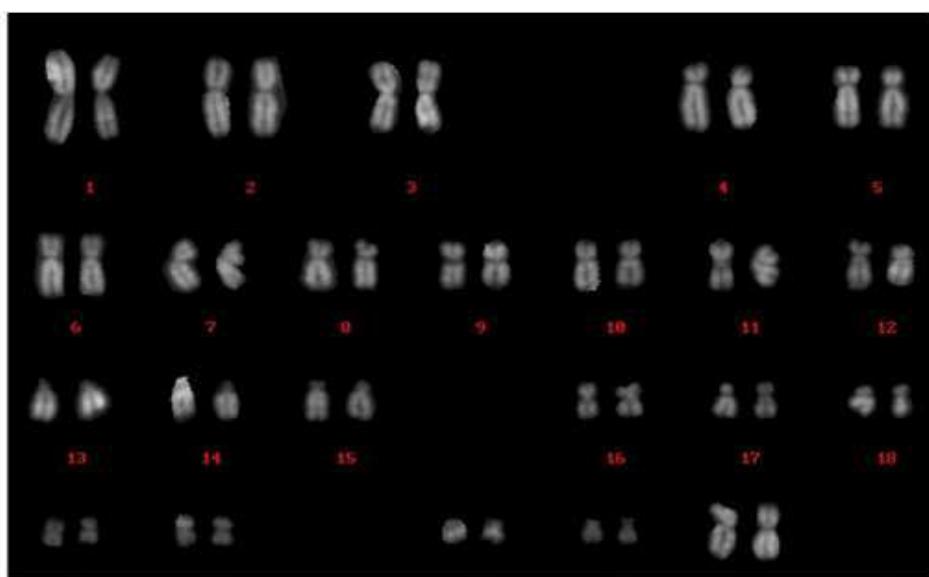
도면8a



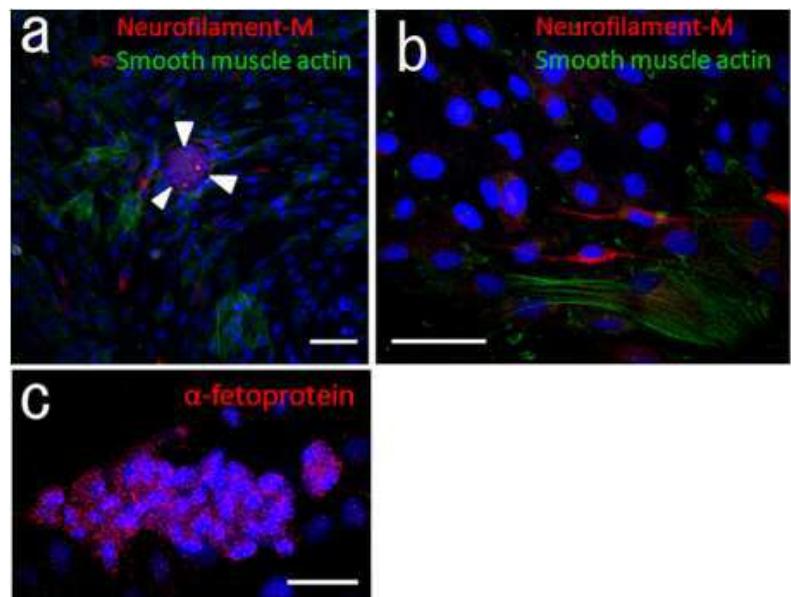
도면8b



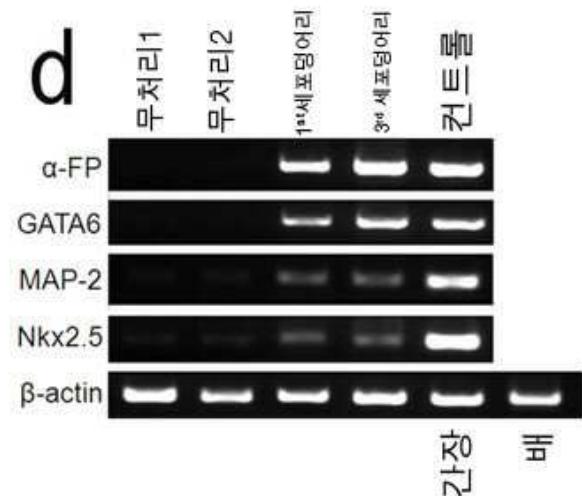
도면8c



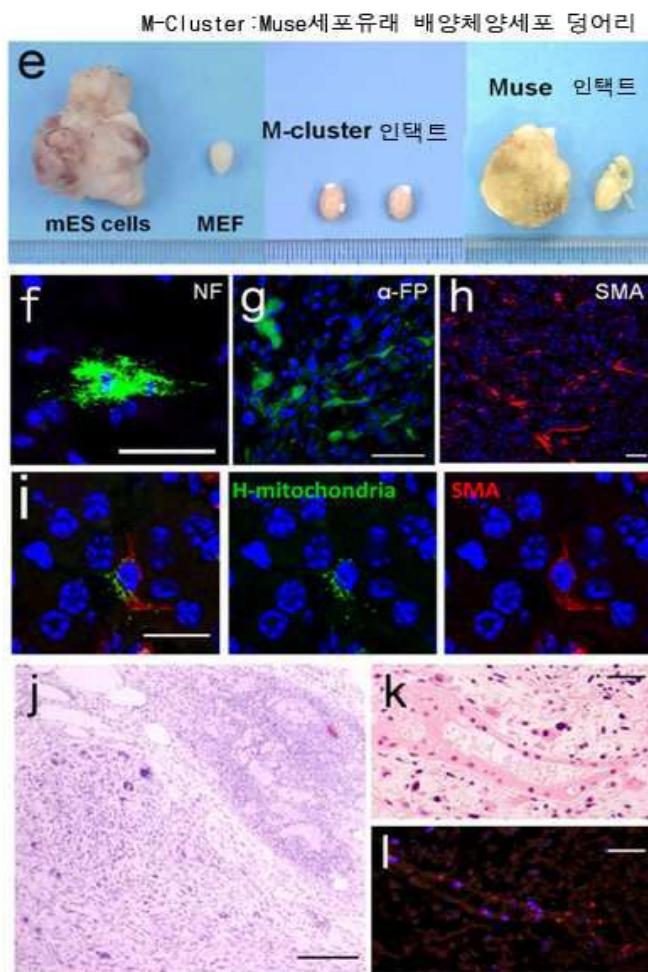
도면9a



도면9b



도면9c

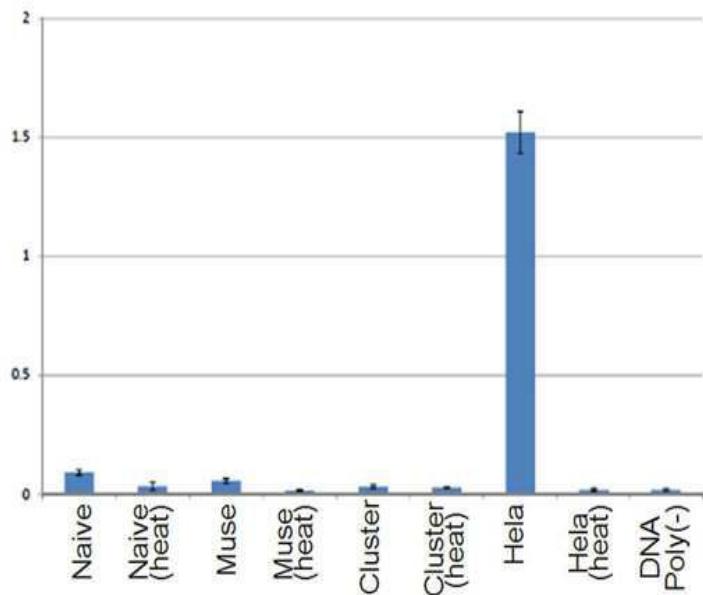


도면10a

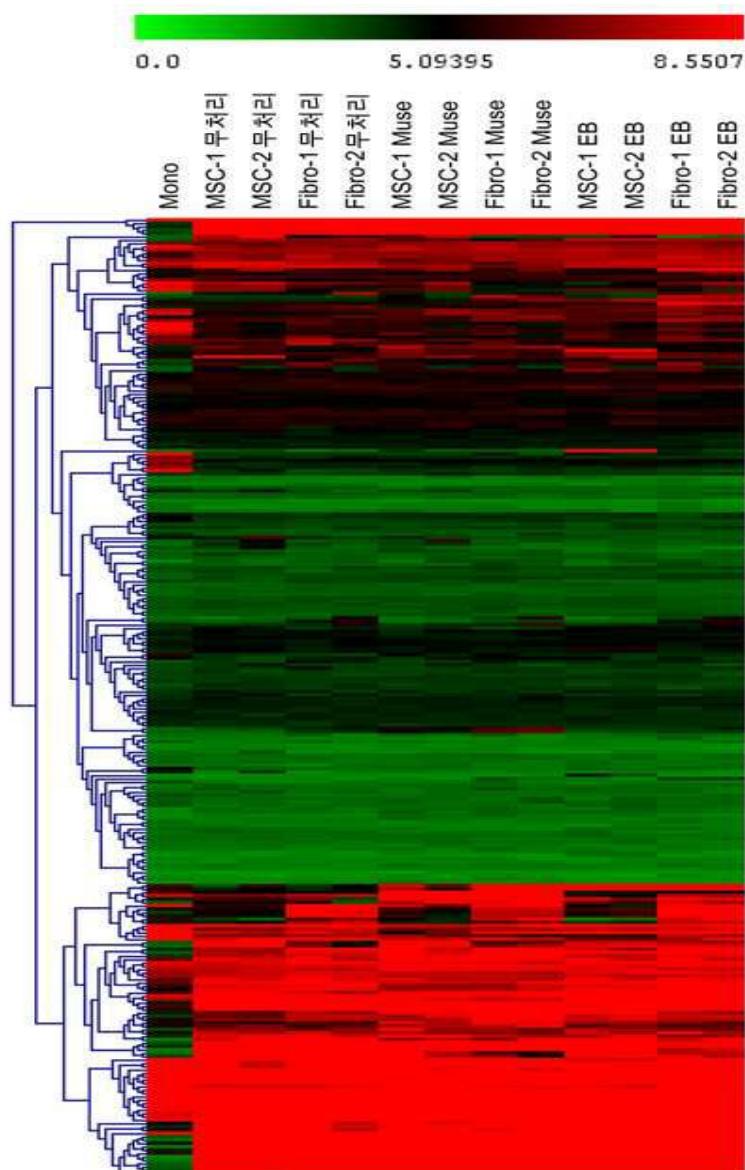
심 블	명 칭	MUSE/무처리				세포덤어리/무처리			
		Fibro1	Fibro2	MSC-1	MSC-2	Fibro1	Fibro2	MSC-1	MSC-2
DAZL	Deleted in azoospermia-like								
DPPA2	Developmental pluripotency associated 2 (PESCRG1)								
DPPA4	Developmental pluripotency associated 4			▨					
ERAS	ES cell expressed Ras								
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7								
HOXB1	Homeobox B1								
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)							▨	
MYC	c-Myc								
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain								
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2								
SPAG9	Sperm associated antigen 9								
SPRY2	Sprouty homolog 2, antagonist of FGF signaling								
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1								
ZFP42	Zinc finger protein 42 homolog (Rex1)								

■ + ▨ - □ No Change

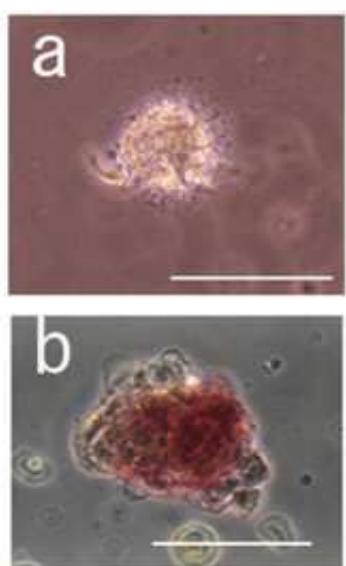
도면10b



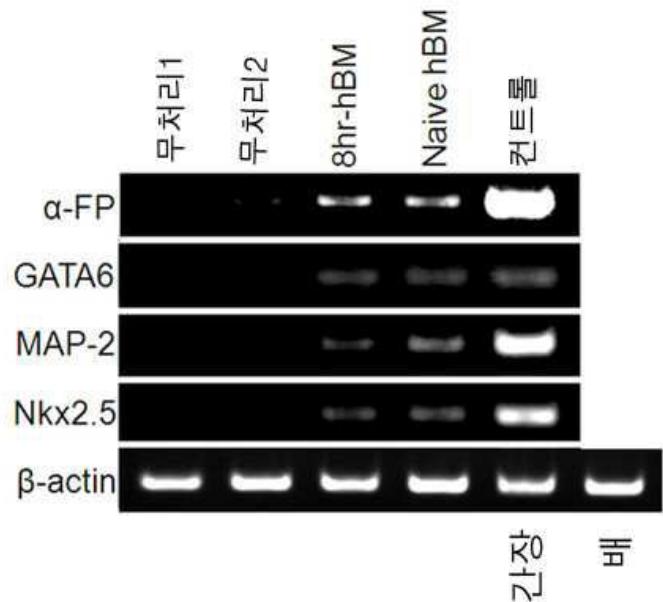
도면11



도면12

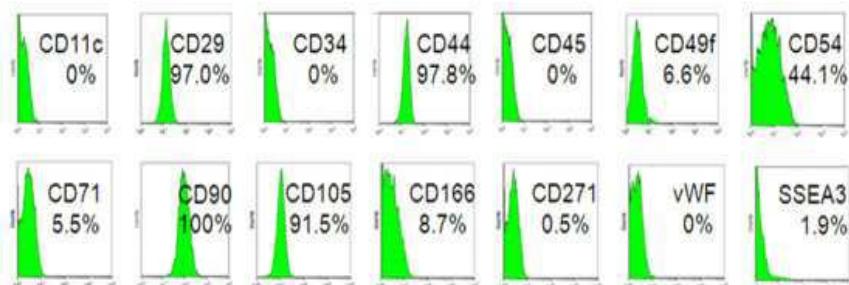


도면13

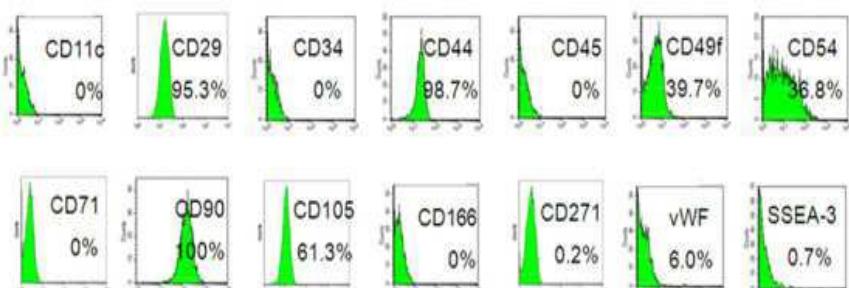


도면14

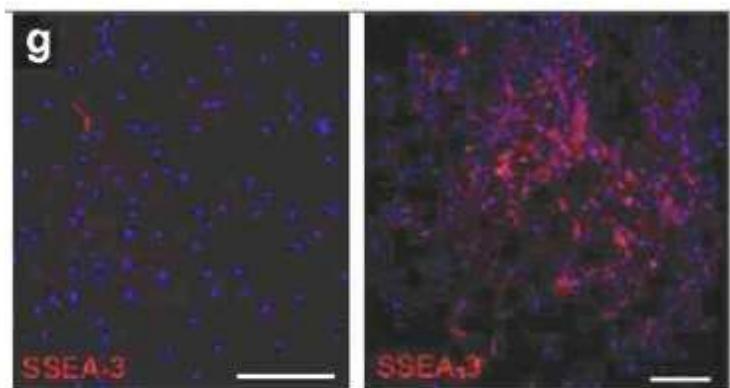
a H-fibroblasts (무처리 세포)



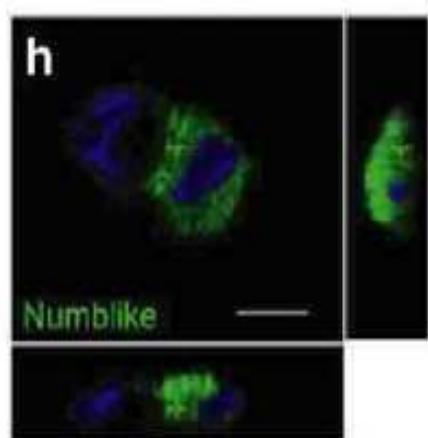
C H-MSCs (무처리 세포)



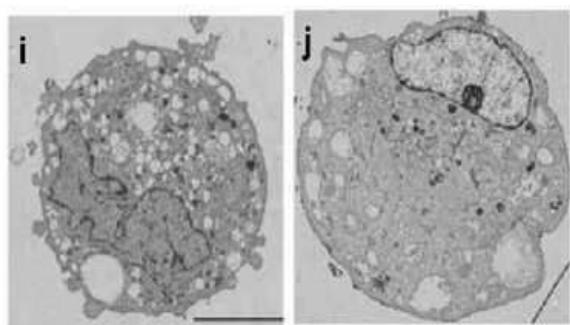
도면15a



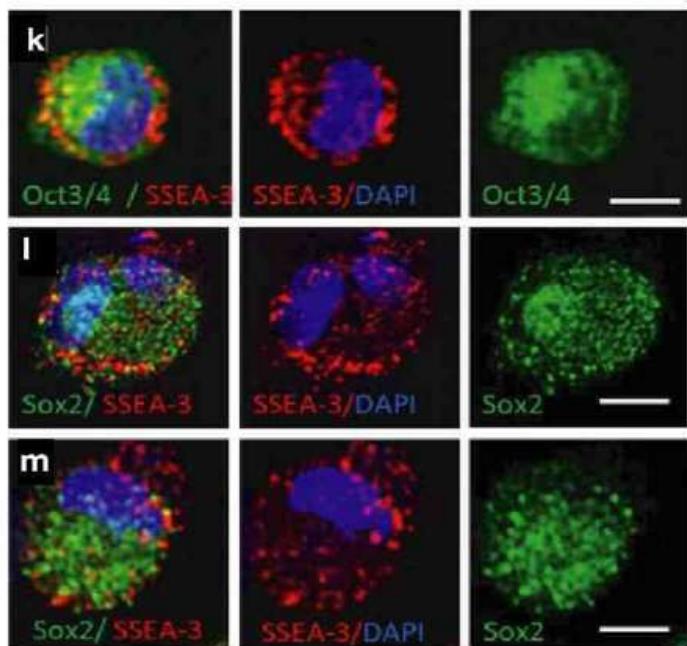
도면15b



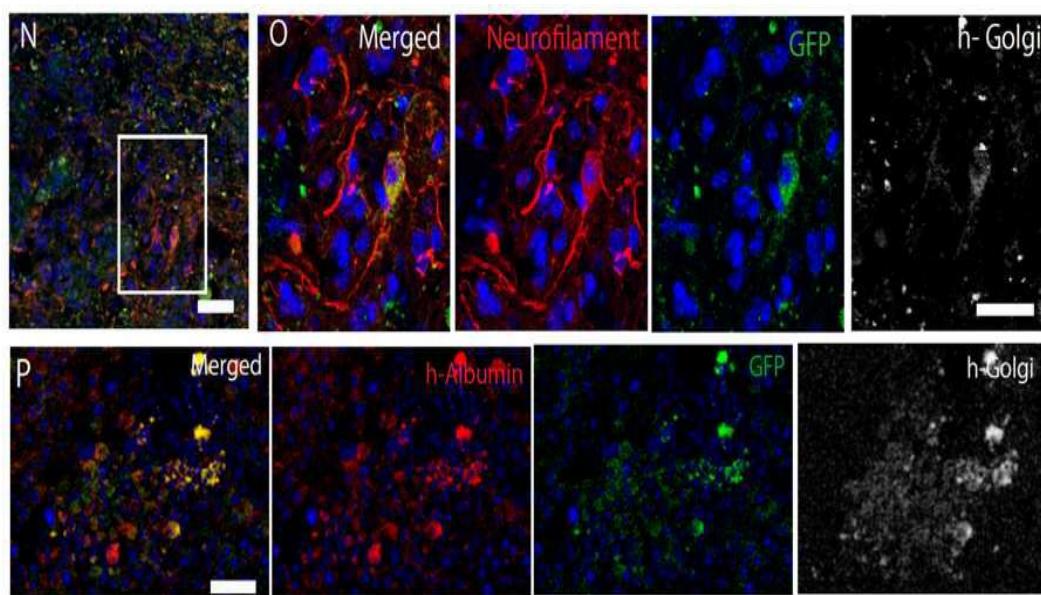
도면15c



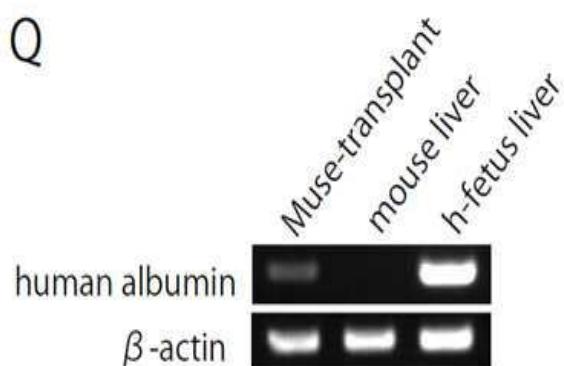
도면15d



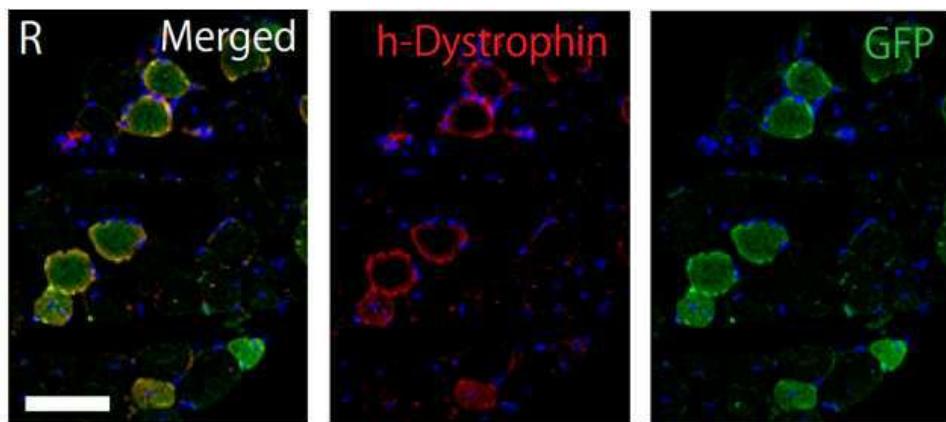
도면16a



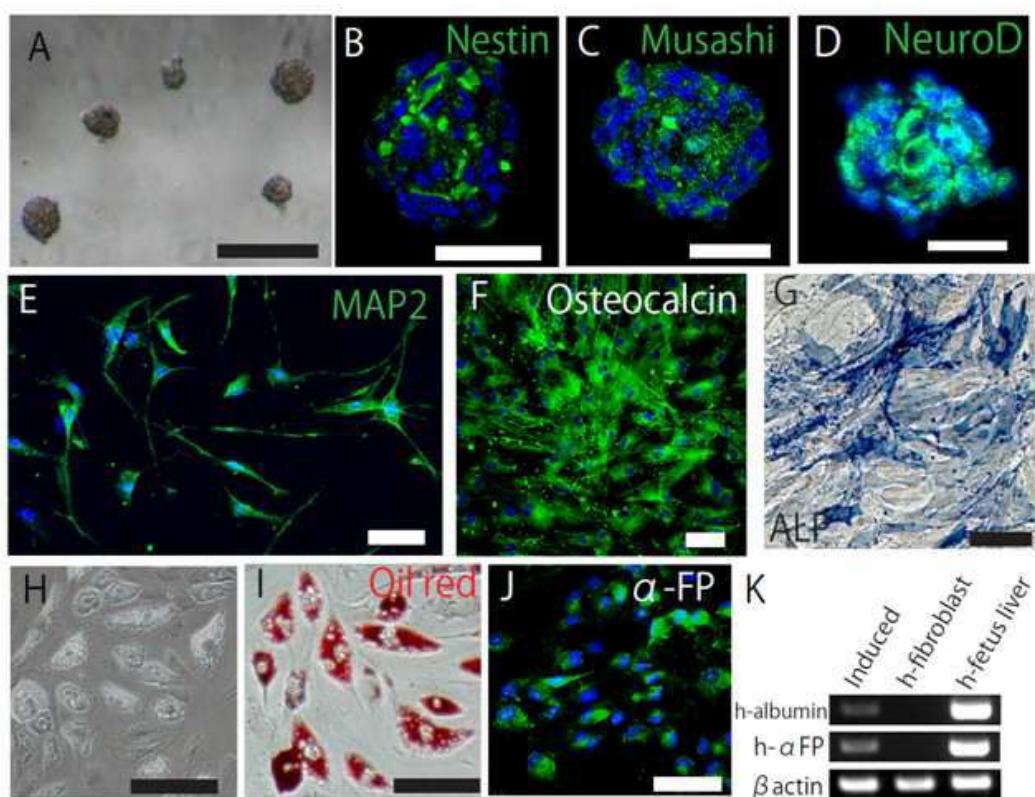
도면16b



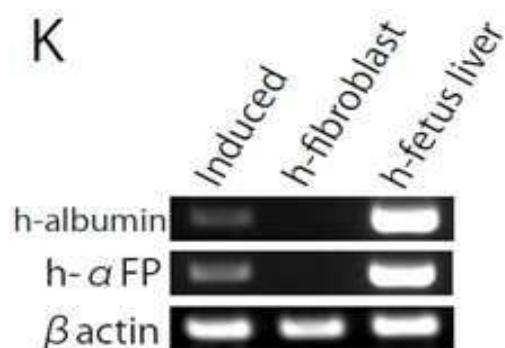
도면16c



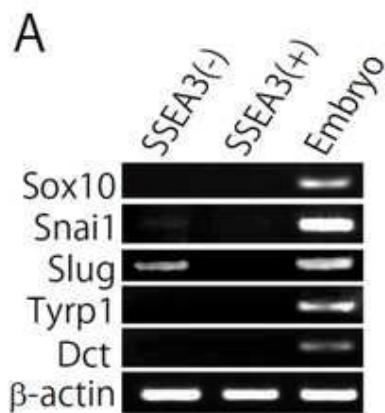
도면17a



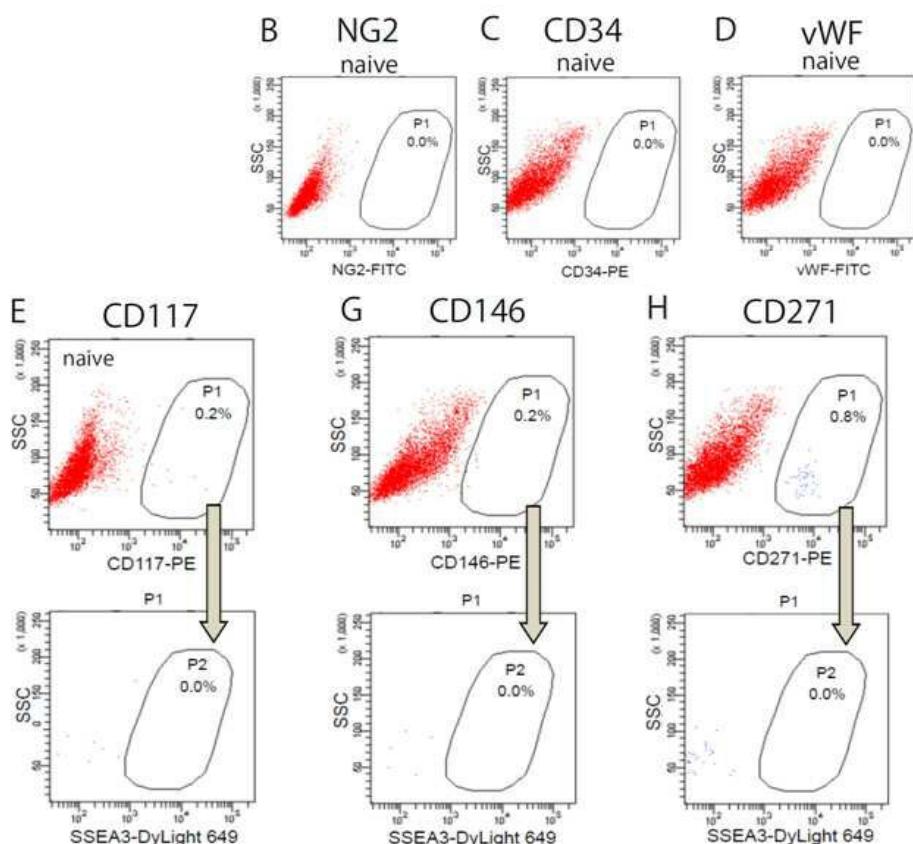
도면17b



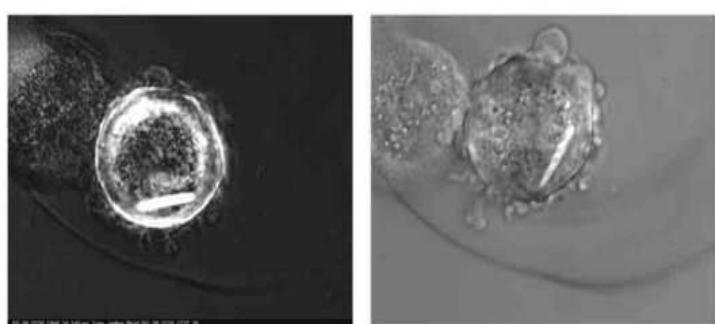
도면18a



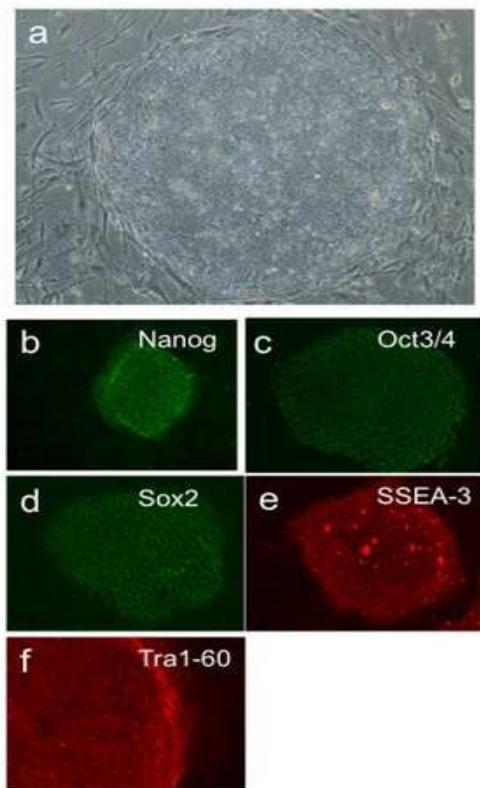
도면18b



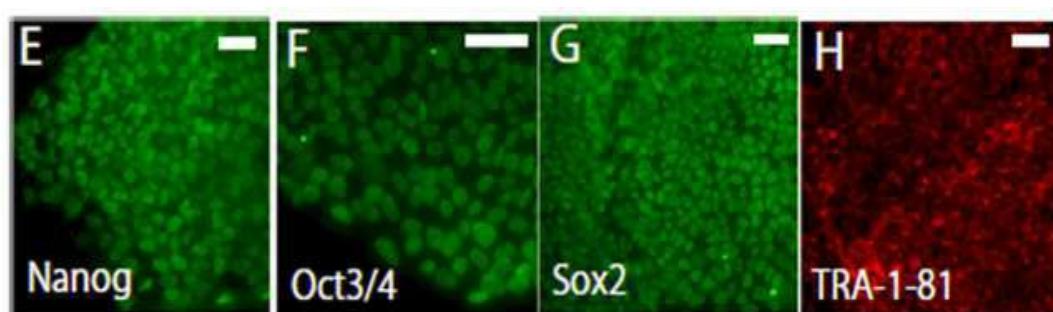
도면18c



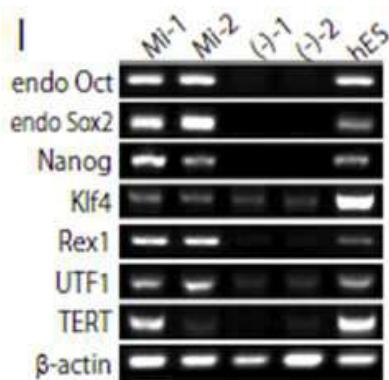
도면19



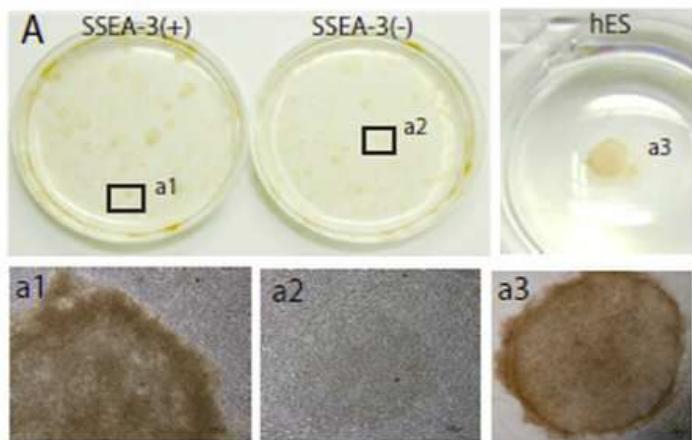
도면20



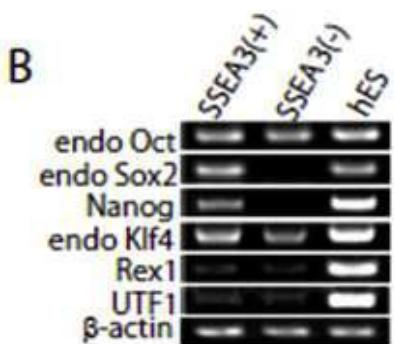
도면21



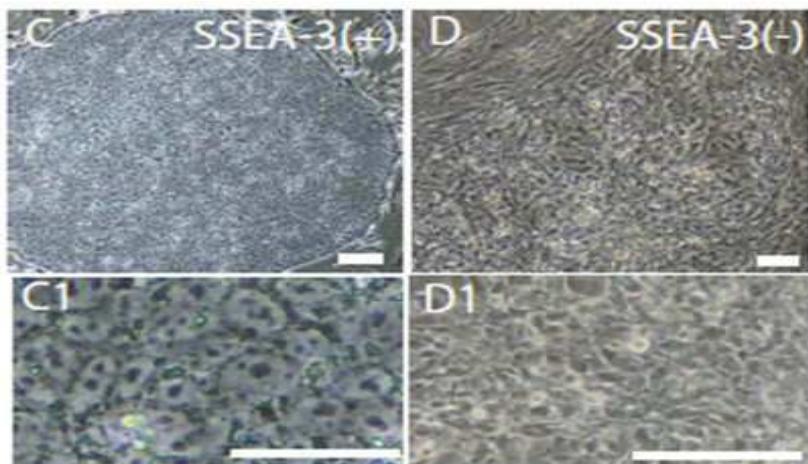
도면22a



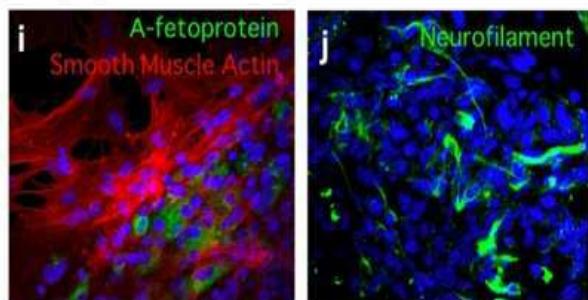
도면22b



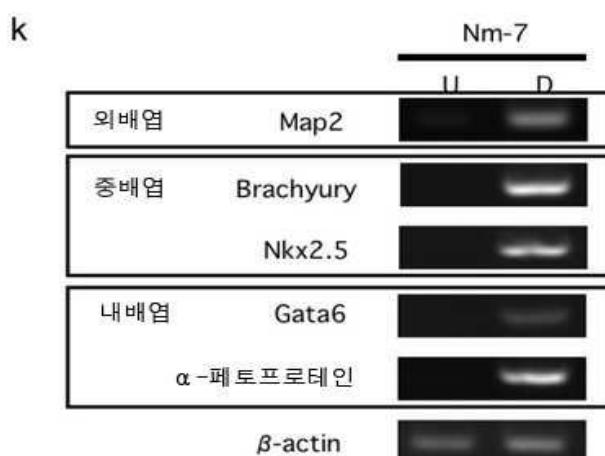
도면22c



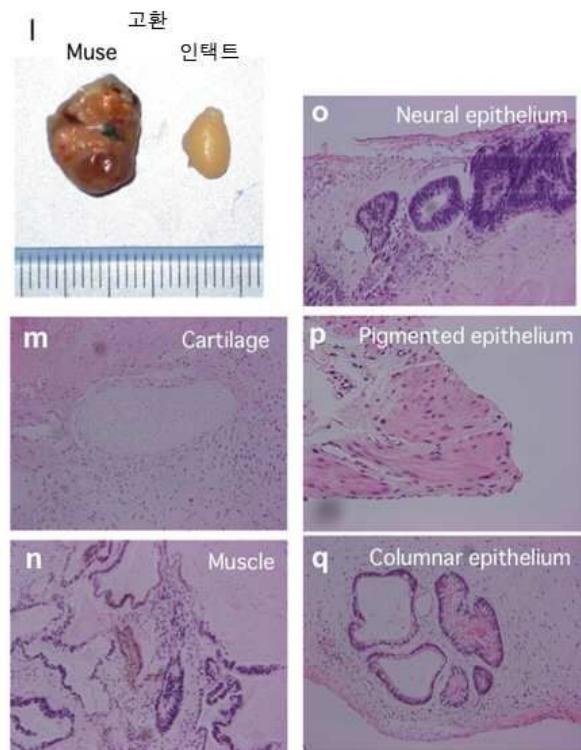
도면23a



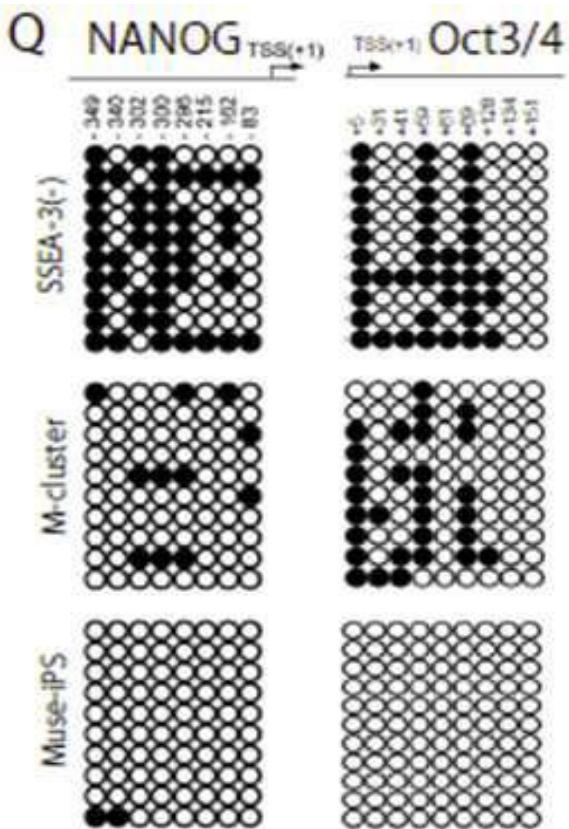
도면23b



도면23c



도면24



도면25

Symbol	Description	/Naive		/iPS	
		Cluster	iPS	Cluster	iPS
ABL1	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase				1.2E+00
ANAPC2	Anaphase promoting complex subunit 2				8.5E-01
ANAPC4	Anaphase promoting complex subunit 4				5.0E-01
ATM	Ataxiatelangiectasia mutated				1.7E+00
ATR	Ataxiatelangiectasia and Rad3 related				9.5E-01
BRCA1	Breast cancer 1, early onset				1.3E-01*
CCNB1	Cyclin B1				5.9E-02*
CCNB2	Cyclin B2				6.6E-02*
CCNC	Cyclin C				2.2E-01*
CCND1	Cyclin D1				3.7E+00**
CCND2	Cyclin D2				3.7E-02*
CCNE1	Cyclin E1				1.0E-01*
CCNF	Cyclin F				1.1E-01*
CCNG1	Cyclin G1				4.1E-01
CCNG2	Cyclin G2				1.1E+01**
CCNH	Cyclin H				6.6E-01
CCNT1	Cyclin T1				5.8E-01
CCNT2	Cyclin T2				4.0E-01
CDC16	Cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)				3.3E-01*
CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M				6.4E-02*
CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)				3.3E-02*
CDC34	Cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)				4.7E-01
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2				3.0E-01*
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4				6.4E-01
CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)				2.2E-01*
CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1				3.2E-01*
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6				5.7E-01
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7				3.5E-01
CDK8	Cyclin-dependent kinase 8				4.7E-01
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)				8.3E-01**
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)				8.2E-01
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)				3.7E-02**
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)				7.8E-01**
CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)				1.3E-01*
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)				1.7E-01*
CHK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)				7.7E-02*
CUL1	Cullin 1				4.2E-01
E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding				4.8E-01
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha				5.1E+00**
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)				4.4E-02*
MAD2L2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)				8.2E-02*
MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2				5.6E-02*
MCM3	Minichromosome maintenance complex component 3				5.7E-02*
MCM4	Minichromosome maintenance complex component 4				2.2E-01*
MCM5	Minichromosome maintenance complex component 5				3.3E-02*
MNAT1	Menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)				6.8E-01
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)				3.7E-01
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen				2.0E-01*
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)				7.0E-02*
RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)				4.0E+00**
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8				1.8E-01*
RBL1	Retinoblastoma-like 1 (p107)				2.3E-01*
RBL2	Retinoblastoma-like 2 (p130)				5.5E+00**
RPA3	Replication protein A3, 14kDa				1.3E-01*
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)				1.2E-01*
TERT	Telomerase reverse transcriptase				0.0E+00*
TFDP1	Transcription factor Dp-1				8.4E-01
TFDP2	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)				6.6E-01
TP53	Tumor protein p53				3.3E-01*

도면26

Symbol	Description	/Naive		/iPS	
		Cluster	iPS	Cluster	iPS
ABCA13	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13				4.1E-01
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney				2.9E-01*
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)				9.9E-01
BMP4	Bone morphogenetic protein 4				1.4E-01*
BMPRIA	Bone morphogenetic protein receptor, type IA				6.6E-01
CBX7	Chromobox homolog 7				5.5E+00**
CTR9	Ctr9, Paf1 RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)				6.2E-01
DAZL	Deleted in azoospermia-like				5.8E-02*
DDX4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4				5.0E-01
DNMT1	DNA (cytosine-5')-methyltransferase 1				2.1E-01*
DNMT3B	DNA (cytosine-5')-methyltransferase 3 beta				6.2E-04*
DPPA2	Developmental pluripotency associated 2				1.6E-03*
DPPA3	Developmental pluripotency associated 3				1.1E-02*
DPPA4	Developmental pluripotency associated 4				1.1E-04*
EPC1	Enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila)				8.2E-01
ERAS	ES cell expressed Ras				1.1E-01*
F11R	F11 receptor				2.0E-03*
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fins-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)				5.8E-01
FOXD3	Forkhead box D3				4.2E-04*
GDF3	Growth differentiation factor 3				0.0E+00*
GREB7	Growth factor receptor-bound protein 7				1.8E-03*
HAND1	Heart and neural crest derivatives expressed 1				1.9E-02*
HES1	Hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)				1.4E+00
HEXIM1	Hexamethylene bis-acetamide inducible 1				2.8E+00
HOXB1	Homeobox B1				4.7E-02*
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein				3.3E+00**
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein				3.0E+00**
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)				1.7E-01*
KCNK3	Potassium channel, subfamily K, member 3				3.4E+00**
KITLG	KIT ligand				1.2E+01**
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)				1.0E+00
LIN28	Lin-28 homolog (C. elegans)				3.5E-04*
MSX2	Msx homeobox 2				3.8E-01
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)				7.6E-01
NANOG	Nanog homeobox				4.0E-04*
NAT1	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)				9.4E-01
NKX1-2	NK1 homeobox 2				2.3E-03*
NR0B1	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1				2.4E+01**
OCT3/4	POU class 5 homeobox 1				1.8E-02*
OTX2	Orthodenticle homeobox 2				0.0E+00*
PAN3	PAN3 polyA specific ribonuclease subunit homolog (S. cerevisiae)				4.5E-01
PODXL	Podocalyxin-like				3.8E-02*
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain				1.0E+01**
RAG1AP1	Recombination activating gene 1 activating protein 1				8.6E-01
SALL4	Sal-like 4 (Drosophila)				6.4E-04*
SIX4	SIX homeobox 4				9.9E-01
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2				7.4E-04*
SPAG9	Sperm associated antigen 9				1.3E+00
SPRY1	Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)				8.1E-01
SPRY2	Sprouty homolog 2 (Drosophila)				1.9E+00
SSBP2	Single-stranded DNA binding protein 2				1.7E+00
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)				1.6E+00
TGFI	Terato carcinoma-derived growth factor 1				3.8E-05*
TFE3	Transcription factor binding to IGHM enhancer 3				1.1E+00
TRDMT1	TRNA aspartic acid methyltransferase 1				7.3E-01
UTF1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1				0.0E+00*
VIM	Vimentin				1.4E+02**

도면27

동물	리프로그래밍인자 ^b	세포타입	시간(주)	효율
마우스	Viral-integrating vectors			
	O,K,S,M	MEFs	2-3	0.01-0.50%
	O,K,S,M	간세포	2-3	1-3%
	O,K,S,M	위상피세포	2-3	1-3%
	O,K,S,M	B세포	2-3	0.01-0.10%
	O,K,S,M	β세포	3-4	0.1-0.2%
	O,K,S,M	신경간세포	1-2	3-5%
	O,K,S	MEFs	3-4	0.001-0.010%
	O,K,S	간세포	2-3	0.5-1.0%
	O,K,M	신경간세포	1-2	0.1-1.0%
	O,K,	신경간세포	2-3	0.1-1.0%
	O,M,S	신경간세포	3-4	0.1-1.0%
	O,K	신경간세포	2-3	0.1-0.2%
	O,M	신경간세포	3-4	0.1-0.2%
인간	Non-integrating viral vectors ^c	간세포	4-5	0.0001 to 0.0010%
	O,K,S,M	MEFs	3-4	0.0001 to 0.0010%
	Plasmid-based vedtros ^c			
	O,K,S,M	MEFs	3-4	0.0001 to 0.0010%
	Viral-integrating vectros			
	O,K,S,M	피부섬유아세포	4-5	0.001-0.002%
	O,K,S,M	피부섬유아세포	2-3	N.D.
	O,K,S,M	골수기면세포	2-3	N.D.
	O,K,N	피부섬유아세포	2-3	N.D.
	O,K,L	피부섬유아세포	2-3	N.D.
	O,S,K ^d	피부섬유아세포	4	0.1-1.0%
	O,S ^d	피부섬유아세포	4	0.001-0.010%
	O,S,L,N ^e	피부섬유아세포		0.002%
	O,K,S,M,T,LT	피부섬유아세포		0.0417%
	O,K,S,M,p,U	피부섬유아세포		N.D.

MEFs, 마우스배설유아세포

;N.D.,not determined

^bO,Oct4; S,Sox2;M,c-myc;K,klf4;N,Nanog;L,Lin28;T,hTERT;LT,LargeT antigen;p,pS3RNAi;U,Utf1^cintegration-free clones^dValpronic acid (VPA)를 겸용^eCHIR99021,PD0325901 A-83-01