

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 8월 6일 (06.08.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/115690 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/074 (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/000880
- (22) 국제출원일: 2014년 1월 29일 (29.01.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0010398 2014년 1월 28일 (28.01.2014) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 한용만 (HAN, Yong-Mahn); 305-707 대전시 유성구 가정로 43 한울아파트 110 동 305 호, Daejeon (KR). 주영희 (JU, Young Hee); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 의과학센터 E7 7101 호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-080 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

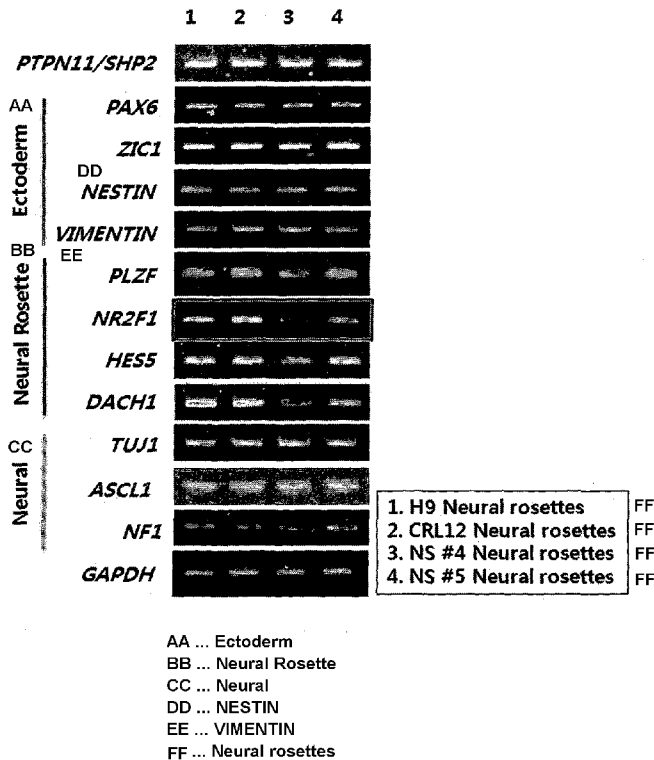
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL MODEL OF NOONAN SYNDROME AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 누난 증후군의 유도-만능 줄기세포 모델 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an induced pluripotent stem cell (iPSC) model of Noonan syndrome, a preparation method therefor, and uses to be used in the study of the pathogenesis of Noonan syndrome and in a therapeutic agent screening method. Particularly, generation and differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from Noonan syndrome, embryoid bodies (EB), and neural rosettes were induced from fibroblasts from a patient with Noonan syndrome and it was ascertained that iPSCs derived from Noonan syndrome exhibit the morphology and differentiation potency of normal iPSCs. In addition, as a result of inducing natural differentiation and chemical differentiation in order to differentiate iPSCs derived from Noonan syndrome into embryoid bodies and neural rosettes, embryoid bodies and neural rosettes induced via chemical differentiation exhibit cell morphology similar to that of normal cells and significantly express ectoderm, neural rosette, and neuron marker genes. Thus, the cellular model can be useful in analytical research for the pathogenesis of Noonan syndrome and in analytical research for the therapeutic agent screening method.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 누난 증후군(noonan syndrome)의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSC) 모델, 이의 제조 방법, 및 상기 iPSC 모델을 누난 증후군의 발병 연구 및 치료제 스크리닝 방법에 이용하는 용도에 관한 것으로, 구체적으로 누난 증후군 환자의 섬유아세포로부터 누난 증후군 유래의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSC), 배상체(embryoid body, EB) 및 신경 로제트(neural rosettes)의 발생 및 분화를 유도하였으며, 상기 누난 증후군 유래의 iPSC는 정상적인 iPSC의 형태 및 분화능을 나타내는 것을 확인하였고, 누난 증후군 유래의 iPSC로부터 배상체 및 신경 로제트로 분화하기 위해 자연분화 및 화학적 분화를 유도한 결과, 화학적 분화를 통해 유도된 배상체 및 신경 로제트는 정상 세포와 유사한 세포 형태를 나타내며, 외배엽, 신경로제트 및 신경세포 마커 유전자를 유의적으로 발현하므로, 상기 세포 모델은 누난 증후군의 기전 분석 연구 및 치료제 스크리닝 방법을 위한 분석 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

누난 증후군의 유도-만능 줄기세포 모델 및 이의 용도

5 【기술분야】

본 발명은 누난 증후군(noonan syndrome)의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSC) 모델, 이의 제조 방법, 및 상기 iPSC 모델을 누난 증후군의 발병 연구 및 치료제 스크리닝 방법에 이용하는 용도에 관한 것이다.

10 【배경기술】

누난 증후군(noonan syndrome)은 Ras-MAPK 신호전달 체제의 과도한 활성화로 유발되는 유전병으로서, 1983 년 J.A.누난에 의해 발표되었다. 누난 증후군은 초반에 터너 증후군(Turner syndrome)과 유사한 외형적 증상으로 인하여 혼란을 가져왔으나, 터너 증후군과는 달리 정상적 핵형을 나타내며, 15 남녀에서 모두 발병하는 것을 통해 별개의 질병으로 확인되었다.

누난 증후군 환자에게서 나타나는 증상 및 신체 소견은 개인마다 증상의 심각한 정도와 범위가 매우 다양하며, 주로 특징적 외모, 성장 및 발달 장애 등의 증상을 나타내어, 정상적인 생활이 가능한 환자로부터 지적 장애 또는 발달 장애를 나타내는 환자까지 정도가 다양하다. 보고된 누난 증후군의 주요 20 증상은 하기 [표 1]에 나타난 바와 같으며, 주로 내배엽(endoderm)에 의한 증상보다는 외배엽(ectoderm)과 중배엽(mesoderm)에 관련된 신체부위에 나타나는 것으로 보고되고 있다.

【표 1】

25 누난 증후군의 주요 증상

외모 특징	얼굴	머리가 길고 좁으며 위가 뽀족한 세모형의 얼굴, 두드러진 인중 및 주름진 피부
-------	----	--

	입	깊은 인중, 넓은 윗입술(95%), 아치형 구개(45%) 및 작은 턱(25%)
	목	익상경, 낭성 림프관종, 짧은 목
성장 및 발달 장애	사춘기	저신장(50~70%)
	영유아	발달장애(40%), 발달지연(26%), 학습장애(15%), 언어발달지연(20%) 및 경미한 지적 장애(35%)
혈액, 림프계 장애		손, 발 림프부종(신생아 시기), 혈액 응고 지연, 백혈병
비뇨 생식기계 장애		잠복고환(60~80%), 콩팥기형(10%)
안과적 증상		안검하수(95%), 사시(50~60%), 양안격리, 근시 및 원시(60~70%) 및 안구진탕(10%)
근 골격계 및 치아발달 장애		흉곽기형(90%), 척추측만증(10~15%), 발 기형(10~15%), 외반주(50%), 경추융합(2%) 및 치아 부정교합
신경계 장애		경련(10%), 근긴장도 저하, 관절 유연, 드물게 뇌신경계의 기형
심장 기형		심전도도 이상(90%), 선천성 심장기형(68%), 폐동맥판막 연관 기형(20~50%) 및 비후성 심근증(20~30%)

누난 증후군의 주요 원인이 되는 유전자는 12번 염색체(chromosome)에 위치하는 PTPN11 유전자로 알려져 있다. 상기 PTPN11 유전자는 티로신 포스파타아제를 포함하는 Src-상동성 도메인 2(Src-homology domain 2 containing tyrosine phosphatase, SHP-2)를 암호화하며, 이는 FGFR, EGFR, HGFR, MET와 같은 수용체에 리간드가 결합하여 활성화되면, GRB2와 SOS1을 통하거나 혹은 독립적으로 Ras를 활성화하여 ERK에 인산화(phosphorylation)를 유도하는 과정을 통해, Ras-MAPK에 중점적으로 관여하는 것으로 알려져 있다(Yoko Aoki et al., (2008) Human mutation, 29(8), 992-1006).

상기 Ras-MAPK 신호전달 체제는 세포의 증식(proliferation), 이주(migration), 생존(survival), 세포 운명 결정(cell fate determination), 골격근 재배열(cytoskeletal rearrangement), 대사과정(metabolism) 및 노화(senescence) 등 다양한 생물학적 조절 기능을 나타낸다. 또한, 개체 내에서 형태학(morphology)적 결정, 기관 형성(organogenesis) 및 신경의 성장 과정에 관여하는 것으로 보고된 바 있다.

Ras-MAPK 신호전달 체제의 활성화는 사이토카인, 성장 인자(growth

factor) 또는 호르몬과 같은 리간드(ligand)가 수용체에 결합하면서 나타나며, Ras-MAPK 신호전달 체제를 구성하는 매개체의 유전자에 변이가 유발되면, 상기 리간드가 수용체에 결합하지 않아도 비정상적인 활성화가 일어나, 그 결과 정상적인 세포의 발달 및 분화에 영향을 미쳐 기능적인 이상이 동반되어
5 나타난다.

누난 증후군에 대한 발병 연구 및 치료제 스크리닝을 위하여, 마우스 모델로서 누난 증후군을 재현하고자 하는 연구가 진행되고 있으나, 현재 누난 증후군의 구체적인 발생학적 기전의 분석에 대하여 알려진 바가 없으며, 이에
10 따라 누난 증후군에 대한 치료제 또는 치료법에 대한 연구 또한 부족한 상황이므로, 환자 특이적인 발병 기전 및 이에 대한 치료제의 개발이 요구되고 있다.

줄기세포(stem cell)는 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있을 수 있으며, 미분화 상태에서 무한 증식이 가능한 자가증식능 및 특정 분화 자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재적 가능성인 다분화능(pluripotency)을 가진 세포를 말한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해
20 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation, expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)를 포함하는
25 인간 다능성 줄기세포(Human pluripotent stem cells; hPSCs)는 다양한 특정 세포 종류로 분화할 수 있는 능력을 가져, iPSC를 시험관 내의 분화 시스템을 사용하였을 때, 면역 거부반응의 낮은 위험도와 같은 치료 가능성(therapeutic potential) 뿐만 아니라, 기관 형성(organogenesis)의 초기 발달 동안에 복합적

질병의 메커니즘을 이해하는데 효과적인 평가자로 알려져 있다 Muotri, A. R. (2009) *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1: 81-85; Marchetto, M. C., B. Winner, et al. (2010) *Hum Mol Genet* 19(R1): R71-76).

현재까지, 다양한 유전적 질병을 가지는 환자로부터 유래된 iPSC가
 5 질병과-관련있는 세포 종류로 직접 분화되었을 때 질병-특이적인
 표현형(phenotypes)을 나타내는 것에 관련되어 보고된 바 있다(Park, I. H. et
 al. *Cell* 134, 877-886 (2008); Tiscornia, G. et al. *Nature medicine* 17,
 1570-1576 (2011)). 이러한 질병-특이적인 iPSC는 질병과 관련있는 세포
 종류로 분화될 수 있으며, 이에 따라 질병의 구체적인 기작 또는 치료제
 10 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 여겨지고 있다.

따라서, 본 발명자들은 누난 증후군을 연구하기 위한 줄기세포 모델을
 확립하기 위해 노력한 결과, 누난 증후군 환자의 섬유아세포로부터 누난
 증후군 유래의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSC),
 15 배상체(embryoid body, EB) 및 신경 로제트(neural rosettes)의 발생 및 분화를
 유도하였으며, 상기 누난 증후군 유래의 iPSC는 정상적인 iPSC의 형태 및
 분화능을 나타내는 것을 확인하였고, 누난 증후군 유래의 iPSC로부터 배상체
 및 신경 로제트로 분화하기 위해 자연분화 및 화학적 분화를 유도한 결과,
 화학적 분화를 통해 유도된 배상체 및 신경 로제트는 정상 세포와 유사한 세포
 20 형태를 나타내며, 외배엽, 신경로제트 및 신경세포 마커 유전자를 유의적으로
 발현하므로, 본 발명의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells;
 iPSC)를 이용한 누난 증후군의 세포 모델링 방법은 누난 증후군의 발병 연구
 및 치료제 후보물질 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써
 본 발명을 완성하였다.

25

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 누난 증후군(noonan syndrome) 환자의 세포와 동일한

특성을 유지하는 새로운 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSC)을 제공하여, 이를 누난 증후군의 발병 연구 및 치료제 후보물질 스크리닝 방법을 위한 연구에 이용하는 방법을 제공하는 것이다.

5 【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은

i) 시험관 내(*In vitro*)에서 누난 증후군(N Noonan syndrome) 환자로부터 분리된 섬유아세포(fibroblast)를 유도-만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cells; iPSC)로 유도하는 단계; 및

10 ii) 상기 단계 i)에서 유도된 iPSC를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 누난 증후군 iPSC 모델의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된, 누난 증후군 iPSC 모델을 제공한다.

또한, 본 발명은

15 i) 상기 iPSC로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 신경세포로 분화를 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체 또는 신경세포의 특성을 분석하는 단계를 포함하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

20 i) 상기 iPSC 모델, 또는 이로부터 분화된 배상체 또는 신경세포를 수득하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 iPSC 모델, 배상체 또는 신경세포에 피검 화합물 또는 피검 조성물을 처리하는 단계;

25 iii) 상기 단계 ii)의 처리된 iPSC 모델, 배상체 또는 신경세포의 특성을 분석하는 단계; 및

iv) 상기 단계 iii)의 분석한 결과를 무처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 누난 증후군의 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된, 누난 증후군 iPSC 모델의 용도를

제공한다.

아울러, 본 발명은

i) 상기 iPSC로부터 배상체 또는 신경세포로 분화를 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체 또는 세포의 특성을 분석하는

5 단계를 포함하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 용도를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 누난 증후군(N Noonan syndrome) 환자의 섬유아세포로부터 유래한 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)를 이용한
10 줄기 세포 모델은 배상체 및 신경세포로 분화될 수 있으며, 분화된 신경세포는 외배엽, 신경 로제트 및 신경세포 마커 유전자를 유의적으로 발현하나, *NR2F1* 유전자의 감소를 나타내므로, 상기 세포 모델은 누난 증후군의 기전 분석 연구 및 치료제 스크리닝 방법을 위한 분석 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

15 【도면의 간단한 설명】

도 1은 누난 증후군(N Noonan syndrome) 환자 유래의 섬유아세포(fibroblast)로부터 발생된 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 세포의 형태를 나타낸다.

20 도 2는 누난 증후군 환자 유래의 iPSC(NS-iPSC)에서 누난 증후군 원인 유전자의 변이 확인을 나타낸다.

도 3은 미분화 상태인 NS-iPSC에서 중아황산염 서열(bisulfite sequencing) 분석을 수행하여 DNA 탈메틸화(demethylation) 여부 확인을 나타낸다.

도 4는 NS-iPSC에서 정상적인 핵형을 나타내는 것을 확인을 나타낸다.

25 도 5는 미분화 여부를 확인하기 위한 NS-iPSC의 알칼라인 포스파타아제 염색(Alkaline phosphatase staining, AP staining)을 확인을 나타낸다.

도 6은 NS-iPSC의 다분화능을 확인하기 위한 전분화능 마커 유전자 발현의 확인을 나타낸다.

도 7은 누란 증후군 유래의 iPSC인 NS-iPSC #4에서 줄기세포성 마커인 OCT4, NANOG, SOX2, SSEA4, Tra-1-81 및 Tra-1-60 단백질의 발현 확인을 나타낸다.

5 도 8은 누란 증후군 유래의 iPSC인 NS-iPSC #5에서 줄기세포성 마커인 OCT4, NANOG, SOX2, SSEA4, Tra-1-81 및 Tra-1-60 단백질의 발현 확인을 나타낸다.

도 9는 누란 증후군 유래의 iPSC인 NS-iPSC #4에서 생체 내에서 분화 가능성을 확인하기 위한 기형종 형성(teratoma formation)을 나타낸다.

10 도 10은 누란 증후군 유래의 iPSC인 NS-iPSC #5에서 생체 내에서 분화 가능성을 확인하기 위한 기형종 형성을 나타낸다.

도 11은 NS-iPSC로부터 배상체(EB) 및 신경 로제트(신경외배엽, neuroectoderm, neural rosettes)로의 자연분화 유도의 과정을 모식도로 나타낸다.

15 도 12는 NS-iPSC로부터 자연분화 유도된 배상체 및 신경 로제트의 세포 형태를 나타낸다.

도 13은 NS-iPSC로부터 자연분화 유도된 배상체에서 줄기 세포 관련 유전자의 발현 감소를 나타낸다.

도 14는 NS-iPSC로부터 자연분화 유도된 배상체에서 신호전달인자 유전자의 발현 수준 변화를 나타낸다.

20 도 15는 NS-iPSC로부터 자연분화 유도된 배상체에서 신호전달인자 단백질의 인산화(phosphorylation) 수준 증가를 나타낸다.

도 16은 NS-iPSC로부터 자연분화 유도된 신경 로제트에서 신경세포 마커 유전자 발현 수준의 감소를 나타낸다.

25 도 17은 NS-iPSC로부터 자연분화 유도된 신경 로제트에서 신경세포 마커 유전자 발현 수준의 감소를 정량적으로 나타낸다.

도 18은 NS-iPSC로부터 배상체 및 신경 로제트로의 화학적 분화 유도의 과정을 모식도로 나타낸다.

도 19는 NS-iPSC로부터 화학적 분화 유도된 배상체 및 신경 로제트의

세포 형태를 나타낸다.

도 20은 NS-iPSC로부터 화학적 분화 유도된 배상체, 신경 로제트, 신경 전구체(Neural precursors) 및 신경 세포(neural cells)의 세포 형태를 나타낸다.

5 도 21은 NS-iPSC로부터 화학적 분화 유도된 신경 로제트에서 외배엽(ectoderm), 신경 로제트 및 신경세포 유전자의 발현 확인을 나타낸다.

도 22는 NS-iPSC로부터 화학적 분화 유도된 신경 로제트에서 *NR2F1* 유전자 발현의 감소를 정량적으로 나타낸다.

10 【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은

15 i) 시험관 내(*In vitro*)에서 누난 증후군(N Noonan syndrome) 환자로부터 분리된 섬유아세포(fibroblast)를 유도-만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cells; iPSC)로 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 iPSC를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 누난 증후군 iPSC 모델의 제조 방법을 제공한다.

20 상기 단계 i)의 유도는 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC를 포함하는 다분화능 마커(pluripotent marker)의 이소성 발현(ectopic expression)을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 누난 증후군(N Noonan syndrome) 환자의 임상적인 증상 및 상기 환자로부터 유래한
25 섬유아세포(fibroblast)에서 원인 유전자인 *PTPN11* 유전자의 변이를 확인하였으며(표 2 및 표 3 참조), 상기 섬유아세포로부터 누난 증후군 유래 iPSC(NS-iPSC)의 발생을 유도하였다(도 1 참조). 또한, 상기 NS-iPSC는 누난 증후군 원인 유전자를 유지하면서(도 2 참조), 정상적 핵형을 나타내고(도 4

참조), 미분화 상태인 것을 확인하였다(도 3 및 도 5 참조).

또한, 본 발명자들은 상기 NS-iPSC의 분화능을 확인한 결과, NS-iPSC는 다분화능 마커 유전자 및 단백질을 유의적으로 발현하며(도 6 내지 도 8 참조), 생체 내에서 기형종을 형성(teratoma formation)하여(도 9 및 도 10 참조),

5 다분화능을 가지는 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 누난 증후군 유래의 iPSCs 모델은 누난 증후군 환자의 유전자 변이와 동일한 변이를 나타내면서 다분화능을 나타내므로, 상기 iPSCs 모델의 제조 방법은 누난 증후군을 위한 분석 연구에 이용하는 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

10

또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 누난 증후군 iPSCs 모델을 제공한다.

상기 iPSC는 하기 i) 내지 iii) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

15 i) 정상 세포의 iPSC 형태;

ii) *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *c-MYC*, *REX1*, *ECAT15*, *GDF3* 및 *TERT*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 다분화능 마커 유전자의 발현; 및

iii) *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *SSEA4*, *Tra-1-81* 및 *Tra-1-60*으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포성 마커 단백질의 발현.

20

본 발명의 누난 증후군 유래의 iPSCs 모델은 누난 증후군 환자의 유전자 변이와 동일한 변이를 나타내면서 다분화능을 나타내므로, 상기 iPSCs 모델은 누난 증후군을 위한 분석 연구에 이용하는 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

25

i) 상기 iPSC로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 신경세포로 분화를 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체 또는 신경세포의 특성을 분석하는 단계를 포함하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 방법을 제공한다.

상기 유도는 자연적인 유도 또는 화학적 유도 물질(chemical)의 첨가로 인한 직접적(directed)인 유도 둘 중 어느 하나인 것인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

5 상기 화학적 유도 물질은 도소모르핀(dorsomorphin) 및 SB431542와 같이 줄기세포를 신경세포로 분화하기 위해 당업자에 의해 사용되는 유도 물질인 것이 바람직하고, 구체적으로 도소모르핀 또는 SB431542 중 어느 하나 또는 둘 다인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 도소모르핀 및 SB431542는 분화 유도 시 동시에 또는 순차적으로 배지에 첨가될 수 있다.

10 상기 배상체의 특성은 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

i) 정상 세포의 형태;

ii) *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, 및 *c-MYC*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 다분화능 마커 유전자의 발현;

15 iii) *Id1* 또는 *Id2* 둘 중 하나 이상을 포함하는 BMP 신호 전달 체제 유전자의 증가;

iv) p-SMAD1, p-SMAD5 및 p-SMAD8로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 BMP 신호전달 체제 단백질의 인산화 수준의 증가;

v) SMAD2 또는 SMAD3 둘 중 하나 이상을 포함하는 TGF- β 신호전달 체제 유전자의 증가; 및

20 vi) p-SMAD2 또는 p-SMAD3 둘 중 하나 이상을 포함하는 TGF- β 신호전달 체제 단백질의 인산화 수준의 증가.

상기 신경세포의 특성은 하기 i) 내지 ii) 중 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

i) 정상 세포의 형태; 및

25 ii) *PAX6*, *ZIC1*, *NESTIN*, *VIMENTIN*, *PLZF*, *HES5*, *DACH1*, *TUJ1*, *ASCL1* 및 *NFI*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 신경세포 유전자의 발현.

본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 누난

증후군 환자로부터 유래한 iPSC로부터 배상체 및 신경 로제트를 수득하기 위해
 자연적으로 분화를 유도한 결과(도 11 참조), 분화 개시 2 일 후의 분화
 초기에는 정상적인 세포의 형태를 나타내나, 배상체 및 신경 로제트의 세포
 형태가 무너지고(도 12 참조), 배상체에서는 감소된 전분화능 마커 유전자,
 5 증가하는 BMP 및 TGF- β 신호전달 체제 유전자의 발현 수준 및 증가하는 BMP
 신호 전달체제 단백질 인산화 수준을 확인하였다(도 13 내지 도 15 참조).
 또한, 신경 로제트에서 신경 세포 마커 유전자의 발현이 나타나지 않는 것을
 확인하였다(도 16 및 도 17 참조).

또한, 본 발명자들은 누난 증후군 환자로부터 유래한 iPSC로부터 배상체
 10 및 신경 로제트를 수득하기 위해 도소모르핀(dorsomorphin) 및 SB431542의
 순차적 처리를 통해 화학적으로 분화를 유도한 결과(도 18 참조), 화학적으로
 분화 유도된 배상체 및 신경 로제트의 정상 세포 형태가 회복되며(도 19 및 도
 20 참조), 외배엽, 신경 로제트 및 신경세포 마커 유전자의 발현이 정상
 대조군과 유사한 수준으로 발현되나, 신경 로제트 유전자중 하나이고 아직
 15 라이간드(Ligand)가 밝혀지지 않은 Orphan nuclear receptor인 *NR2F1* 유전자의
 발현만 감소하는 것을 확인하였다(도 21 및 도 22 참조). 상기 유전자는
 현재까지 질병과 연관되어 연구된 것으로 밝혀진 바가 없으며, 초기
 발생상에서의 역할이 많이 알려지지 않았으므로, 이에 대한 연구가 필요하다고
 볼 수 있다.

20 따라서, 본 발명의 누난 증후군 유래의 iPSCs 모델은 배상체 및
 신경세포로 분화될 수 있으므로, 상기 세포 모델은 누난 증후군의 기전 분석
 연구 및 치료제 스크리닝 방법을 위한 분석 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

25 i) 상기 iPSC 모델, 또는 이로부터 분화된 배상체 또는 신경세포를
 수득하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 iPSC 모델, 배상체 또는 신경세포에 피검 화합물
 또는 피검 조성물을 처리하는 단계;

iii) 상기 단계 ii)의 처리된 iPSC 모델, 배상체 또는 신경세포의 특성을 분석하는 단계; 및

iv) 상기 단계 iii)의 분석한 결과를 무처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 누란 증후군의 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

5 상기 유도는 자연적인 유도 또는 화학적 유도 물질의 첨가로 인한 직접적인 유도 둘 중 어느 하나인 것인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 화학적 유도 물질은 도소모르핀 및 SB431542와 같이 줄기세포를 신경세포로 분화하기 위해 당업자에 의해 사용되는 유도 물질인 것이
10 바람직하고, 구체적으로 도소모르핀 또는 SB431542 중 어느 하나 또는 둘 다인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 도소모르핀 및 SB431542는 분화 유도 시 동시에 또는 순차적으로 배지에 첨가될 수 있다.

상기 배상체의 특성은 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

15 i) 정상 세포의 형태;

ii) *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, 및 *c-MYC*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 다분화능 마커 유전자의 발현;

iii) *Id1* 또는 *Id2* 둘 중 하나 이상을 포함하는 BMP 신호 전달 체제 유전자의 증가;

20 iv) p-SMAD1, p-SMAD5 및 p-SMAD8로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 BMP 신호전달 체제 단백질의 인산화 수준의 증가;

v) SMAD2 또는 SMAD3 둘 중 하나 이상을 포함하는 TGF- β 신호전달 체제 유전자의 증가; 및

vi) p-SMAD2 또는 p-SMAD3 둘 중 하나 이상을 포함하는 TGF- β 신호전달
25 체제 단백질의 인산화 수준의 증가.

상기 신경세포의 특성은 하기 i) 내지 ii) 중 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

i) 정상 세포의 형태; 및

ii) *PAX6*, *ZIC1*, *NESTIN*, *VIMENTIN*, *NP2F1*, *PLZF*, *HES5*, *DACH1*, *TUJ1*, *ASCL1* 및 *NF1*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 신경세포 유전자의 발현.

상기 누란 증후군의 치료제 후보물질은, 본 발명의 iPSC 모델, 또는
5 이로부터 분화된 배상체 또는 신경세포의 특징을 분석함에 있어서 정상 대조군과 유사한 수준의 특성을 나타내도록 하는 물질로서 선별될 수 있으며, 구체적으로 본 발명의 iPSC 모델로부터 분화 유도된 신경세포에서 *NP2F1* 유전자의 발현 수준을 정상 대조군과 유사한 수준으로 증가하도록 하는 물질이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

10 본 발명의 누란 증후군 유래의 iPSCs 모델로부터 자연 분화된 배상체 및 신경세포는 누란 증후군에서 나타나는 비정상적인 세포의 형태 및 유전자의 발현을 재현하며, 화학적 유도를 통해 분화된 배상체 및 신경세포는 누란 증후군의 정상적인 세포 형태 및 신경세포 마커 유전자의 발현을 나타내므로, 상기 iPSC 모델은 누란 증후군의 치료제 후보물질의 스크리닝 방법에 유용하게
15 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된, 누란 증후군 iPSC 모델의 용도를 제공한다.

아울러, 본 발명은

20 i) 상기 iPSC로부터 배상체 또는 신경세포로 분화를 유도하는 단계; 및
ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체 또는 세포의 특성을 분석하는 단계를 포함하는, iPSC를 누란 증후군의 모델로 사용하는 용도를 제공한다.

본 발명의 누란 증후군 유래의 iPSCs 모델로부터 자연 분화된 배상체 및 신경세포는 누란 증후군에서 나타나는 비정상적인 세포의 형태 및 유전자의
25 발현을 재현하며, 화학적 유도를 통해 분화된 배상체 및 신경세포는 누란 증후군의 정상적인 세포 형태 및 신경세포 마커 유전자의 발현을 나타내므로, 상기 iPSC 모델은 누란 증후군의 치료제 후보물질의 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

5

<실시예 1> 누난 증후군(N Noonan syndrome)의 임상적 증상 및 원인 유전자 변이의 확인

<1-1> 누난 증후군의 임상적 증상의 확인

10 누난 증후군 환자의 임상적인 증상을 확인하기 위하여, 누난 증후군 환자를 선별하여 임상적 증상을 확인하였다.

구체적으로, 서울 아산병원(Asan medical center, 한국)에서 누난 증후군 환자(B.S.Y, 남성)가 연결되었으며, 하기 [표 2]에서 나타난 바와 같은 누난 증후군의 대표적 증상이 나타나는 것을 확인하였다(표 2).

15 【표 2】

누난 증후군 환자의 임상적 증상 확인

증상(feature)	내용(description)	증상	내용
얼굴(face)	전형적 형상	선천성 심장병 (congenital heart disease)	있음
목 장애 (neck problem)	짧은 목 (short neck)	비후성 심근증 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM)	없음
저신장 (short stature)	있음	폐동맥협착증 (pulmonary stenosis)	있음
<3p	있음	지적장애(intellectual disability)	경계성 지능 저하

<1-2> 누난 증후군 환자의 원인 유전자 변이 확인

20 누난 증후군의 원인이 되는 유전자 변이를 확인하기 위하여, 누난 증후군 관련 유전자로 알려져 있는 PTPN11 유전자의 서열을 누난 증후군 환자의 섬유아세포(fibroblast)로부터 확인하였다.

- 구체적으로, 병원의 임상연구 윤리 심의위원회의 심사를 통과한 후, 상기 실시예 <1-1>에서 선별한 누난 증후군로부터, 환자와 법적 대리인의 동의를 얻어 국소 마취 후 펀치 생검법(punch biopsy method)으로 피부 조직 생검을 수행하여 누난 증후군의 진피(dermal fibroblast) 조직을 수득하였다. 그런 다음, 상기 수득한 진피 조직에서 섬유아세포를 분리하여 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; GIBCO 사, 미국), 1% 페니실린(penicillin; GIBCO 사, 미국)과 1% MEM-NEAA용액(MEM Non-Essential Amino acids Solution; GIBCO 사, 미국)을 포함하는 둘베코 변이된 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Welgene 사, 한국)에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 수득한 섬유아세포로부터 유전체 DNA(genomic DNA, gDNA)를 추출하고, PTPN11 유전자의 염기 서열을 확인하였다.

그 결과, 하기 [표 3]과 같이 누난 증후군 환자는 PTPN11 유전자에서 A922G(N308D) 변이를 나타내는 것을 확인하였다(표 3).

【표 3】

15 누난 증후군 환자의 원인 유전자 변이의 확인

유전자	위치	DNA 염기 변화	단백질 아미노산 변화	변이 지역	표준 서열 (reference sequence)
PTPN11	12q24.13	c.922A>G (AAT→GAT)	p.Asn308Asp (N308D)	Exon 8 PTP	NM_002834.3

<실시예 2> 누난 증후군 유래의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSC)의 제조

<2-1> 누난 증후군 환자 유래의 iPSC 발생의 유도

- 20 본 발명의 실시예를 수행하기 위하여, 리프로그래밍 인자(reprogramming factor)인 OCT4, SOX2, C-MYC 및 KLF4를 이용한 이소성 발현(ectopic expression) 방법(Takahashi, K et al, Cell 131(5): 861-872, 2007)을 통해 누난 증후군 유래의 iPSC(NS-iPSC)의 발생을 유도하였다.

- 구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 누난 증후군 환자의 섬유아세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; GIBCO 사, 미국)을

포함하는 DMEM 배지에 배양하였다. 그런 다음, OCT4, SOX2, c-MYC 및 KLF4 인자를 발현하는 레트로바이러스(retrovirus)를 감염(infection)한 후, 상기 감염된 세포를 미토마이신 C(mitomycin C; AG scientific 사)를 처리한 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF) 위에 올려서 20% 혈청 대체물(serum replacement; GAIBCO 사, 미국) 및 10 ng/ml bFGF(R&D systems 사, 미국)를 포함하는 DMEM/F12 배지(GAIBCO 사, 미국)에서 10 내지 15 일 동안 공동-배양(co-culture)한 후 계대 배양하여 NS-iPSC의 발생을 유도한 후, 상기 유도된 NS-iPSCs를 위상차 현미경(phase-contrast microscopy, Olympus사, 일본)으로 확인하였다. 정상 대조군으로 사용하기 위하여, 인간 피부 섬유아세포(CRL-2097; 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection; ATCC), 미국)로부터 상기와 동일한 방법으로 iPSC의 발생을 유도하여, 인간 피부 섬유아세포 유래의 iPSC(CRL-12)를 제조하였다(Kim et. al, BBRC 424 (2012) 331-337; 참고문헌 상의 iPSCs #2 세포와 동일함).

그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 누난 증후군 환자 유래의 섬유아세포로부터 발생된 NS-iPSC 세포주를 두 개 수득하였으며(NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5), 정상 세포의 iPSC 형태를 나타내는 것을 확인하였다(도 1).

<2-2> 누난 증후군 유래 iPSC의 누난 증후군 원인 유전자 변이의 확인

누난 증후군으로부터 유래된 iPSC가 누난 증후군 환자가 나타내는 유전자 변이를 유지하여 나타내는지 확인하기 위하여, NS-iPSC의 유전자에서 누난 증후군 원인 유전자의 변이 유무를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 발생을 유도한 NS-iPSC를 수득하고, NS-iPSC의 유전체 DNA(genomic DNA, gDNA)를 추출한 다음, PTPN11 유전자의 염기 서열을 확인하여 누난 증후군 유래의 섬유아세포(NS-fibroblast)와 비교하였다.

그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 누난 증후군 유래의 섬유아세포에서 나타나는 PTPN11 유전자 변이인 A922G 변이가 NS-iPSC에서도 나타나, 이로부터 만들어진 단백질에서 N308D의 아미노산 변이가 나타내는

것을 확인하였다(도 2).

<실시예 3> 누난 증후군 유래 iPSC의 특징 확인

<3-1> 미분화 NS-iPSC에서 리프로그래밍 과정 진행의 확인

- 5 발생 후 미분화 상태인 NS-iPSC에서 리프로그래밍 과정이 진행되었는지 여부를 확인하기 위하여, 중아황산염 서열(bisulfite sequencing) 분석을 수행하여 NS-iPSC의 OCT4, REX1 및 NANOG 유전자 프로모터 부위에서 CpG 위치의 DNA 탈메틸화(demethylation) 여부를 CT 전환법(CT conversion)을 통해 확인하였다(Park, S. W. et al. (2010) Blood 116, 5762-5772).
- 10 구체적으로, EZ DNA 메틸화-금 키트(EZ DNA methylation-Gold Kit; Zymo Research 사, 미국)를 사용하여, 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 유전체 DNA에 아황산수소나트륨(sodium bisulfite) 처리하여, 25 내지 50 ng의 아황산-처리된 DNA를 주형으로 PCR을 통해 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 AccuPrep 플라스미드 미니 추출 키트(AccuPrep plasmid Mini extraction
- 15 Kit; 바이오니아 사, 한국)를 사용하여 정제하고, pGEM-T EASY 벡터(프로메가 사, 미국)에 서브클로닝(subcloning)하여 삽입하였다. 그런 다음, 삽입한 벡터를 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 누난 증후군 유래 섬유아세포 및 상기 실시예 <2-1>에서 발생을 유도한 NS-iPSC에 형질전환한 클론(clone)을 수득하고, SP6, T7 및 M13 프라이머를 사용하여 서열을 확인한 후, 솔젠트(서열 분석사, 한국)로부터 Chromas231 프로그램을 사용하여 분석하였다.
- 20

그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 발생 후의 미분화 상태인 NS-iPSC에서, 섬유아세포 단계에 비하여 각 유전자의 프로모터 영역에서 메틸화가 풀려있는 것을 통해, iPSC에서 리프로그래밍이 이루어졌음을 확인하였다(도 3).

25

<3-2> 누난 증후군 유래 iPSC의 핵형 분석

누난 증후군 환자 유래의 iPSC의 염색체 형성에서 이상 유무를 확인하기 위하여, NS-iPSC의 핵형 분석을 수행하여 염색체(chromosome)의 삽입, 전이

또는 삭제 여부를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 발생을 유도한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5를 수득한 다음, 젠덱스 사(한국)에 의뢰하여 상기 NS-iPSC의 핵형 분석을 수행하였다.

- 5 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 누난 증후군 유래의 iPSC는 정상적인 핵형을 나타내는 것을 확인하였다(도 4).

<3-3> NS-iPSC의 미분화 상태 확인

- 10 누난 증후군 환자로부터 유래한 NS-iPSC가 미분화 상태인지 여부를 확인하기 위하여, NS-iPSC를 알칼라인 포스파타아제 염색(Alkaline phosphatase staining, AP staining)하여 미분화 여부를 확인하였다.

- 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도하여 수득한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5를 준비하였다. 그런 다음, AP 염색 키트(Alkaline phosphatase kit, Sigma Aldrich사, 미국)를 사용하여 구연산 용액(citrate solution) 1 ml, 아세톤 2.6 ml 및 37% 포름알데하이드(Formaldehyde; Sigma Aldrich 사, 미국) 320 μ l를 혼합하여 고정 용액(fixative solution)을 제조하였다. 또한, 질산나트륨 용액(sodium nitrate solution) 100 μ l 및 FRV-알칼린 용액(FRV-alkaline solution) 100 μ l과 혼합하여 2 분 동안 방치한 다음, 4.5 ml의 멸균수 및 Naphthol AS-BI 알칼리 용액 100 μ l을 첨가하여 호일로 감싸 빛을 차단하여 보관하였다. 상기 준비한 iPSC를 PBS로 1 회 세척한 후, 상기 제조한 고정 용액을 가하여 어둠 속에서 15 분 동안 상온에 방치하였다. 방치 후에는, 물 또는 PBS로 2 분씩 2 회 세척하여 AP 염색된 세포를 위상차 현미경(Phase contrast microscope; Olympus사, 일본)으로 관찰하였다.
- 25 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 NS-iPSC는 미분화 상태인 것을 확인하였다(도 5).

<실시예 4> 누난 증후군 유래 iPSC의 전분화능(pluripotency) 확인

<4-1> NS-iPSC의 다분화능 유전자의 발현 확인

누난 증후군 환자로부터 유래된 미분화 상태의 NS-iPSC가 다분화능을 나타내는지 확인하기 위하여, NS-iPSC에서 다분화능 마커 유전자의 발현을 확인하였다.

- 5 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도하여 수득한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5를 이지블루(Easy-blue; Intron 사, 한국)에 현탁하고 제조사의 프로토콜에 따라 NS-iPSC의 전체 RNA를 추출하였다. 그런 다음, 상기 추출한 RNA 1 μ g을 M-MLV 역전사 합성효소(Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase; Enzymomics 사, 한국)를 사용하여 전체
- 10 cDNA를 합성하였다. 상기 합성한 전체 cDNA는 하기 [표 4]에 기재된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머와 함께 증폭하여 전기영동(electrophoresis)로 상기 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. 정상 대조군으로 사용하기 위하여, 정상 인간배아줄기세포주인 H9 세포주(H9 hESC)를 사용하고, 음성 대조군으로는 누난 증후군 환자 유래의 섬유아세포(NS-fibroblast)를 사용하여,
- 15 상기와 동일한 방법을 통해 정상 줄기세포주에서 OCT4, SOX2, NANOG, c-MYC, KLF4, REX1, ECAT15, GDF3 및 TERT 유전자의 발현을 확인하였고, 발현 수준을 보정하기 위한 대조군으로는 GAPDH 유전자를 상기와 동일한 방법을 수행하여 발현량을 확인하였다.

【표 4】

20 다분화능 마커 유전자의 발현 확인을 위한 프라이머 서열

증폭유전자	프라이머 명칭	프라이머 서열	서열번호
OCT4	OCT4_F	TCGGGGTGGAGAGCAACT	서열번호 1
OCT4-RT	OCT4_R	GGGTGATCCTCTCTGCTTC	서열번호 2
SOX2	SOX2_F	ACTGGCGAACCATCTCTGTG	서열번호 3
SOX2-RT	SOX2_R	AATTACCAACGGTGTCAACCTG	서열번호 4
c-MYC	c-MYC_F	CCTACCCTCTCAACGACAGC	서열번호 5
c-MYC-RT	c-MYC_R	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG	서열번호 6
ECAT4-macaca	ECAT4-macaca-968S	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC	서열번호 7
ECAT4-macaca	ECAT4-macaca-1334AS	CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCACC	서열번호 8
KLF4	KLF4_F	GAACTGACCAGGCACTACCG	서열번호 9
Trans_KLF4	KLF4_R	TTCTGGCAGTGTGGGTCATA	서열번호 10

hREX1	hREX1-RT-U	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	서열번호 11
hREX1-RT	hREX1-RT-L	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	서열번호 12
hECAT15-1	hECAT15-1-S532	GGAGCCGCCTGCCCTGGAAAATTC	서열번호 13
hECAT15-1	hECAT15-1-AS916	TITTTCTGATATTCTATTCCCAT	서열번호 14
hTERT	hTERT-F-3012	TGTGCACCAACATCTACAAG	서열번호 15
hTERT	hTERT-R-3177	GCGTTCCTGGCTTTCAGGAT	서열번호 16
GAPDH	GAPDH_F	CTTCGCTCTCTGCTCCTCCT	서열번호 17
GAPDH-RT	GAPDH_R	GTATAAGCAGCCCTGGTGA	서열번호 18

그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이, 누란 증후군 유래의
 섬유아세포에서는 전분화능 마커 유전자인 OCT4, SOX2, NANOG, c-MYC, REX1,
 ECAT15, GDF3 및 TERT의 발현이 나타나지 않는 반면, NS-iPSC는 H9 세포주와
 5 동일하게 전분화능 마커 유전자를 모두 나타내는 것을 확인하였다(도 6).

<4-2> NS-iPSC의 다분화능 마커 단백질의 발현 확인

누란 증후군 환자로부터 유래된 미분화 상태의 NS-iPSC가 다분화능을
 나타내는지 확인하기 위하여, NS-iPSC에서 줄기세포성 마커(stemness maker)
 10 단백질의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법을 수행하여 발생을
 유도하여 수득한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5를 4% 포르말린(Formalin solution 10%
 neutral buffered, sigma aldrich사, 미국)로 실온에서 30분간 고정하고, 0.1%
 트윈-20(Tween-20, Sigma aldrich 사, 미국)을 포함하는
 15 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, GIBCO사, 미국)인 PBS-T를
 처리하여 실온에서 10 분씩 3번 세척하였다. 세척 후, 0.1% 트리톤
 X-100(triton X-100)을 포함하는 PBS를 상온에서 30 분 동안 처리하여 세포막에
 투과성(Permeability)을 부여하였다. 상기 처리한 세포를 3% 소 혈청
 알부민(Bovine serum albumin, BSA, Sigma aldrich사, 미국)을 첨가하여 1 시간
 20 동안 상온에서 차단(blocking)한 다음, 1차 항체로 항-OCT4 항체(1:200 희석,
 Santa Cruz 사, 미국), 항-SOX2 토끼 항체(1:200희석, Cell signaling technology
 사, 미국), 항-NANOG 항체(1:200 희석, Cell signaling technology 사, 미국),

항-SSEA-4 항체(1:200 희석, R&D Systems 사, 미국), 항-Tra-1-60 항체(1:200 희석, Millipore 사, 미국) 또는 항-Tra-1-81 항체(1:200 희석, Millipore 사, 미국)를 각각 처리하여 4℃에서 밤새 배양하고, PBS-T로 수회 세척하였다. 세척 후, 알렉사 플루오르 488(Alexa Fluor 488, Invitrogen사, 미국) 또는 알렉사 플루오르 594(Alexa Fluor 594, Invitrogen사, 미국)가 결합된 2차 항체를 처리하여 실온에서 1 시간 동안 배양하여 NS-iPSC를 면역형광염색을 수행하였다. 형광 현미경(fluorescence microscope; Olympus, 일본)으로 관찰하여 OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, Tra-1-60 및 Tra-1-81 단백질의 발현을 확인하였다. 단백질의 발현이 세포의 내부와 외부에서 정확하게 나타나는지 확인하기 위해, 세포의 핵을 염색하는 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(4'6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, Sigma aldrich사, 미국)을 처리하여 비교하였다.

그 결과, 도 7 및 도 8에서 나타난 바와 같이, NS-iPSC에서 줄기세포성 마커인 OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, Tra-1-60 및 Tra-1-81 단백질이 유의적으로 발현하는 것을 확인하였다(도 7 및 도 8).

<4-3> 누란 증후군 유래 iPSC의 분화 가능성 확인

누란 증후군 유래의 iPSC가 생체 내에서 전분화(pluripotent) 가능성을 나타내는지 확인하기 위해, 면역력 저하 누드마우스에서 NS-iPSC의 기형종 형성(teratoma formation)을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도하여 수득한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5를 준비하였다. 준비한 세포는 60 mm 세포 배양 디쉬에 올려져 있는 상태로 5 장씩을 모아 매트릭젤(Matrigel, BD biosciences사, 미국)과 섞어 샘플을 제조하였다. 제조된 샘플은 각각 생후 4 주령 누드 마우스(CAnN.Cg-Foxn1 nu/crljOri, female, 오리엔트바이오, 한국)의 가슴과 옆구리 사이에 18G 주사기로 주입하여 SPF 동물실에서 멸균 상태를 유지하며 사육하였다. 40 일간 사육한 다음, 기형종이 형성된 마우스로부터 이를 분리하여, PBS에서 2 내지 3 회 세척하였다. 세척한 기형종은 4%

포름알데하이드를 가하고 4℃에서 밤새 고정하였다. 고정 후, 기형종을 조직용 플라스틱 카세트(cassette)에 넣어, 흐르는 물에서 6 내지 8 시간동안 세척하여 고정액을 제거하였다. 저농도에서 고농도의 알코올로 조직의 수분을 제거한 후, 파라핀 침윤(paraffin infiltration) 하여 조직 내를 고정시키고, 5 박음(embedding) 과정을 수행하여 상기 고정된 조직을 부분화(section)하여 슬라이드글라스 위에 위치하였다. 그런 다음, 파라핀을 제거하고 고농도에서 저농도의 알코올로 수화(hydration)하고, 헤리스 헤마토실린(Harris hematoxylin) 및 에오신(Eosin)을 처리하여 H&E 염색(Hematoxylin & Eosin staining)을 수행하였다. 염색된 조직은 위상차 현미경(Phase contrast 10 microscopy, Olympus사, 일본)을 통해서 외배엽인 신경외배엽 조직(neural tissue), 내배엽인 분비선(secretory gland), 및 중배엽인 평활근(smooth muscle) 및 지방조직(adipose tissue)이 형성되어 있음을 관찰하였다.

그 결과, 도 9 및 도 10에서 나타난 바와 같이 외배엽인 신경외배엽 조직, 중배엽인 분비선, 및 내배엽인 평활근 및 지방조직이 NS-iPSC의 15 전분화능(pluripotency)에 의해 형성되는 것을 확인하여, NS-iPSC이 효과적인 전분화능을 가지는 것을 확인하였다(도 9 및 도 10).

<실시에 5> 누란 중후군 환자 유래의 배상체(embryoid body, EB) 및 신경 로제트(neural rosettes)의 자연 분화 유도

20 <5-1> NS-iPSC로부터 배상체 및 신경 로제트의 자연 분화 유도

시험관 내(in vitro)에서 NS-iPSC로부터 신경 세포로의 분화능을 확인하기 위하여, 도 11에서 나타난 모식도의 과정을 따라 NS-iPSC로부터 배상체(EB) 및 신경 로제트(신경외배엽, neuroectoderm, neural rosettes)를 형성하도록 자연 분화를 유도하였다(도 11).

25 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도하여 수득한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5의 집락(colony)을 1 ml 인슐린 주사기를 사용하여 4 등분하였다. 상기 4 등분한 NS-iPSC는 초-저 부착 배지(ultra-low attachment dish)에 뿌려 10% 혈청 대체물(serum replacement,

SR; SPL life sciences Co., Ltd, 한국)을 포함하는 DMED/F12 배지(Invitrogen 사, 미국)인 배상체 분화 배지(embryoid body differentiation media) 4 ml에 재-현탁하였다. 상기 재-현탁한 NB-iPSC는 4 일간 배양하여 NS-iPSC 유래의 배상체(NS-배상체)로 분화를 유도하였다. 그런 다음, 상기 분화를 유도한

5 NS-배상체를 수득하여, 신경분화촉진물질인 N2 및 B27 첨가제를 포함하는 DMEM/F12에 20 ng/ml bFGF(FGF2, R&D systems, 미국)를 첨가한 배지인 신경 배상체 배지(Neural rosette media)를 첨가한 매트릭셀(1:50희석, Matrigel, BD biosciences사, 미국)이 코팅된 디쉬에 상기 수득한 NS-배상체를 부착 배양하여 4-5일 동안 배양하였다. 형성된 누란 증후군 유래의 신경

10 로제트(NS-신경 로제트)를 선택적으로 수득하여, 다시 파이브로넥틴(Fibronectin, BD biosciences사, 미국)을 코팅한 디쉬(dish)에 옮겨 4-5일 동안 신경 배상체 배지에서 배양하였다. 정상대조군으로, 정상 인간배아줄기세포주인 H9 세포주(H9 hESC) 및 인간 피부 섬유아세포 유래의 iPSC(CRL12)를 사용하여, 상기과 동일한 방법을 수행하여 배상체로 분화를

15 유도하였다.

그 결과, 도 12에서 나타난 바와 같이, NS-iPSC로부터 NS-배상체로의 분화 유도 2 일에는 H9 세포주와 유사하게 정상 세포의 배상체 형태를 나타내나, 분화 유도 4 일 후에는 정상 세포의 배상체 형태인 동그란 형태가 무너지는 것을 확인하였다. 또한, 이 시기에 수득한 배상체를 매트릭셀이 코팅된 디쉬

20 위에 올려 NS-신경 로제트로 분화를 유도하였을 때, NS-신경 로제트로의 형태가 보이지 않고 정상적인 분화가 일어나지 않는 것을 확인하였다(도 12).

<5-2> 누란 증후군 유래 배상체의 전분화능 마커 유전자 발현 확인

정상 세포의 배상체 형태를 나타내지 않는 NS-배상체에서 전분화능이

25 감소하는지 확인하기 위하여, NS-배상체에서 전분화능 마커 유전자의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법을 수행하여 NS-배상체의 자연 분화를 유도하면서, 유도 개시 2, 3 및 4 일에 각각의 NS-배상체를

수득하였다. 그런 다음, 상기 수득한 NS-배상체를 이지블루에 현탁하고 제조사의 프로토콜에 따라 NS-iPSC의 전체 RNA를 추출하고, 추출한 RNA 1 μ g을 M-MLV 역전사 합성효소를 사용하여 전체 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 하여, 상기 [표 4]에 기재된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를

5 각각 10 pmole의 농도로 하여, 사이버그린(SybrGreen, Invitrogen사, 미국)을 사용하는 바이오-라드 CFX 매니저(Bio-Rad CFX manager; Bio-Rad Laboratories 사, 미국)로, 정량적인 실시간 PCR(real-time PCR; q-PCR)를 수행하여 OCT4, SOX2, NANOG 및 c-MYC 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. 발현 수준을 보정하기 위한 대조군으로 GAPDH 유전자를 상기와 동일한 방법을 수행하여

10 발현량을 확인하였으며, 상기 유전자 각각의 Δ Ct 값은 GAPDH 및 각각의 유전자의 Ct 값의 차이로 계산하였다.

실험군으로는 NS-iPSC를 사용하고, 정상 대조군으로는 정상 인간배아줄기세포주인 H9 세포주 유래의 배상체(H9-ES)를 사용하여, OCT4, SOX2, NANOG 및 c-MYC 유전자의 발현을 확인하고, 이를 NS-배상체의 유전자의

15 발현량과 각각 비교하여 하기 [수학식 1]로 계산되는 발현 배수(fold change)로 표현하였다.

【수학식 1】

$$\text{발현 배수} = 2^{-(S \Delta Ct - C \Delta Ct)}$$

$S \Delta Ct$: NS-배상체에서 각각의 유전자의 Δ Ct 값; 및

20 $C \Delta Ct$: H9-ES에서 각각의 유전자의 Δ Ct 값.

그 결과, 도 13에서 나타난 바와 같이, 정상 대조군과 비교하였을 때, NS-배상체의 자연 분화 유도 동안 줄기 세포 관련의 유전자 발현이 감소하여 분화능이 감소하는 것을 확인하였다(도 13).

25 <5-3> 누난 증후군 환자 유래의 배상체에서 BMP 및 TGF- β 신호전달 체계 유전자 발현 수준의 확인

누난 증후군 환자로부터 자연 분화를 유도한 NS-배상체에서

신호전달인자의 발현 수준 변화를 확인하기 위해, 자연 분화로 유도한 NS-배상체에서 BMP 신호 전달 체제의 하류(downstream) 유전자인 Id1 및 Id2, 및 TGF- β 신호전달 체제의 신호 전달인자인 SMAD2 및 SMAD3 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

- 5 구체적으로, 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법을 수행하여 NS-배상체의 자연 분화를 유도하면서, 유도 개시 2, 3 및 4 일에 각각의 NS-배상체를 수득하였다. 그런 다음, 상기 수득한 NS-배상체를 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법을 수행하여, BMP 신호 전달 체제의 하류유전자인 Id1 및 Id2, 및 TGF- β 신호전달체제의 신호 전달인자인 SMAD2 및 SMAD3 유전자의 발현 수준
- 10 mRNA 레벨에서 확인하였다. 확인을 위하여, 하기 [표 5]에 기재된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 사용하였다. 실험군으로는 NS-iPSC를 사용하고, 정상 대조군으로는 정상 인간배아줄기세포주인 H9 세포주(H9-ES)를 사용하였다.

【표 5】

- 15 NS-배상체에서 신호전달 인자의 발현 수준 변화 확인을 위한 프라이머 서열

증폭 유전자	프라이머 명칭	프라이머 서열	서열 번호
Id1	Id1-F	GTGCGCTGTCTGTCTGAG	서열번호 19
	Id1-R	CTGATCTCGCCGTTGAGG	서열번호 20
Id2	Id2-F	CGTGAGGTCCGTTAGGAAAA	서열번호 21
	Id2-R	AATTCAGAAGCCTGCAAGGA	서열번호 22
SMAD2	SMAD2-F	CTGGCGTCTACTGCATTTC	서열번호 23
	SMAD2-R	CAGGACACCCAATTCCTTCA	서열번호 24
SMAD3	SMAD3-F	CGATGTCCCCAGCACATAA	서열번호 25
	SMAD4-R	ATTGAGGGGTCCGTGAA	서열번호 26

그 결과, 도 14에서 나타난 바와 같이 정상 대조군과 비교하였을 때, NS-배상체의 자연 분화 유도 동안 신호전달 인자 유전자 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 14).

- 20 <5-4> 누란 증후군 환자 유래의 배상체에서 BMP 신호 전달체제 단백질의 인산화 수준 확인

누난 증후군 환자로부터 자연 분화를 유도한 NS-배상체에서 신호전달인자의 발현 수준 변화를 확인하기 위해, 자연 분화로 유도한 NS-배상체에서 BMP 신호 전달 체제의 신호 전달인자인 SMAD1/5/8, 및 TGF- β 신호전달체제의 신호 전달인자인 SMAD2/3 단백질의 인산화(phosphorylation) 수준을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법을 수행하여 정상 대조군인 H9 hESCs, CRL12 iPSCs(control)와 함께 NS-배상체 #4와 #5의 자연 분화를 유도하면서, 유도 개시 2 및 4 일에 각각의 NS-배상체를 수득하였다. 그런 다음, EDTA를 포함하는 RIPA 세포 용해 완충용액 1X(R4100-100, GenDEPOT사, 미국)에 상기 NS-배상체 세포를 재-현탁(re-suspension)하였다. 상기 재-현탁한 세포는 얼음 위에서 10분마다 3 내지 4회 볼텍싱(vortexing)하여 파쇄하고, 4°C 및 13000 rpm에서 30 분간 원심 분리하였다. 세포의 단백질을 포함하는 상층액을 수득하고, 기준 단백질의 커브(standard curve)와 함께 상기 단백질의 농도를 BCA 단백질 분석(BCA protein assay kit, Thermo scientific, 미국)로 확인하였다. 그런 다음, 각각의 세포로부터 수득한 상층액을 25% 글리세롤(glycerol), 2% 도데실 황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS), 14.4 mM β -머캅토에탄올(β -mercaptoethanol) 및 0.1% 브로모페놀 블루(bromophenol blue)를 포함하는 60 mM 트리스-염산 완충용액(Tris-HCl buffer; pH 6.8)로 희석하여 100°C에서 3 분간 가열하였다. 가열한 단백질은 30 내지 100 kDa 이하 및 이상의 분자량을 나타내는 단백질을 10% SDS-PAGE 겔에서 분리하고, 니트로셀룰로오즈 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시켜 4% 스킴 밀크(skim milk) 또는 5% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)로 차단하였다. 차단 후, 상기 막(membrane)에 1차 항체로 p-ERK1/2(1:1000, #4370S, Cell signaling 사, 미국), ERK1/2(1:1000, #9102, Cell signaling 사, 미국), SMAD2[S465/467](1:500, #3108, Cell signaling 사, 미국), p-SMAD2/3(1:500, #3102, Cell signaling 사, 미국), p-SMAD1/5/8(1:500, #9511S, Cell signaling 사, 미국), p-AKT[S473](1:1000, #4051S, Cell signaling 사, 미국), AKT(1:1000, #9272, Cell signaling 사, 미국), OCT4(N-19, 1:1000, Santacruz사, 미국)를 각각

- 처리하여 4°C에서 밤새 배양하고, TBS-T로 3 회 세척하여, 염소(goat)로부터 유래한 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)가 결합된 항-토끼 IgG (H+L) 2차 항체(Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate; Santacruz 사, 미국), 항-쥐 IgG (H+L) 2차 항체(Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate; Santacruz 사, 미국), 당나귀(Donkey)로부터 유래한 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)가 결합된 항-염소 IgG (H+L) 2차 항체(Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate; Santacruz 사, 미국)를 2차 항체로 하여 4% 스킴밀크(skim milk, BD sciences사, 미국)를 포함하는 TBS-T와 함께 막에 처리하여 한 시간 동안 처리하였다.
- 10 TBS-T로 3회한 후, LAS-4000(후지필름, 일본)으로 밴드를 확인하였다. 대조군으로, 정상 인간배아줄기세포주인 H9 세포주(H9 hESC)를 사용하고, 정상 대조군으로는 인간 피부 섬유아세포 유래의 iPSC(CRL12)를 사용하여, 상기와 동일한 방법을 수행하여 배상체로 분화를 유도하였으며, 발현을 보정하기 위한 housekeeping 단백질로 액틴(actin-HRP conjugate, Santacruz사, 미국) 단백질을
- 15 사용하였다.

그 결과, 도 15에서 나타난 바와 같이 BMP 신호전달 체제의 p-SMAD1/5/8 및 TGF- β 신호전달 체제의 p-SMAD2/3의 발현이 정상 대조군에 비하여 2일 및 4일에서 증가하는 양상을 나타내는 것을 확인하였다(도 15).

20 <5-5> 누난 증후군 유래 신경 로제트의 신경세포 마커 유전자 발현 확인

누난 증후군 유래의 배상체로부터 자연 분화된 신경 로제트가 신경 세포로의 특징을 나타내는지 확인하기 위하여, NS-iPSC에서 자연 분화된 NS-배상체로부터 신경 로제트로 분화하여 PAX6, SOX2, ZIC1, OTX2 및 NESTIN 유전자의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

- 25 구체적으로, 상기 실시예 <5-1>와 동일한 방법을 수행하여 분화를 유도한 누난 증후군 유래의 신경 로제트(NS-NR)를 수득하여, 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법을 수행하여 PAX6, SOX2, ZIC1, OTX2 및 NESTIN 유전자 등의 cDNA를 각각 합성하고, 이를 증폭하여 전기영동으로 상기 유전자의

발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. RT-PCR과 qPCR에서 상기 유전자들의 발현 수준을 보정하기 위한 대조군으로 GAPDH 유전자를 상기와 동일한 방법을 수행하여 발현량을 확인하였으며, 상기 유전자 각각의 ΔCt 값은 GAPDH 및 각각의 유전자의 Ct값의 차이로 계산하였다. 대조군으로는 정상 인간 배아줄기세포주인 H9 세포주 및 정상 인간 섬유아세포주 유래 iPSC인 CRL12로부터 상기 실시예 <5-1>와 동일한 방법으로 자연 분화를 유도한 신경로제트(H9-NR 및 CRL12-NR)를 사용하였으며, 이를 NS-신경로제트(NS-NR)의 유전자의 발현량과 각각 비교하여 상기 [수학식 1]로 계산되는 발현 배수로 표현하였다.

10 그 결과, 도 16 및 도 17에서 나타난 바와 같이, 누란 증후군 유래의 iPSC로부터 신경로제트 및 신경관(neural tube)의 형성이 이루어지지 않는 것을 확인하였다. 또한, 이와 관련한 유전자인 SOX2의 발현이 유의적으로 감소하였고, PAX6, OTX2 및 ZIC1 유전자의 발현이 거의 나타나지 않는 것을 확인하였다. 반면, NESTIN은 발현의 차이가 없었음을 확인하였다(도 16 및 도 15 17).

<실시예 6> 누란 증후군 환자 유래의 배상체(embryoid body, EB) 및 신경로제트(neural rosettes)의 화학적 분화 유도

<6-1> NS-iPSC로부터 배상체 및 신경로제트의 화학적 분화 유도

20 누란 증후군에서 나타나는 신호전달 체제의 이상으로 인해 NS-iPSC로부터 자연 분화 유도되어 형성된 배상체 및 신경로제트가 정상적인 분화를 나타내지 않으므로 이를 극복하기 위하여, 도 18에서 나타난 모식도의 과정을 따라 NS-iPSC로부터 배상체 및 신경로제트를 형성하도록 화학적 약물인 도소모르핀(dorsomorphin, DM) 및 SB431542를 사용하여, 화학적 분화를 25 유도하였다(도 18 및 표 6).

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도하여 수득한 NS-iPSC #4 및 NS-iPSC #5의 집락(colony)을 1. ml 인슐린 주사기를 사용하여 4 등분하였다. 상기 4 등분한 NS-iPSC는 초-저 부착

배지(ultra-low attachment dish, SPL life sciences Co.,Ltd, 한국)에 뿌려 10% 혈청 대체물(serum replacement, SR; GIBCO 사, 미국)을 포함하는 DMEM/F12 배지(Invitrogen 사, 미국)인 배상체 분화 배지(embryoid body differentiation media) 4 ml에 재-현탁하였다. 4 일간 배양하여 NS-iPSC 유래의 배상체(NS-배상체)로 분화를 유도하였다. 그런 다음, 상기 분화를 유도한 NS-배상체를 수득하여, 신경분화촉진물질인 N2 및 B27 첨가제를 포함하는 DMEM/F12에 20 ng/ml bFGF(FGF2, R&D systems, 미국)를 첨가한 배지인 신경 배상체 배지(Neural rosette media)를 첨가한 매트리지엘(1:50희석, Matrigel, BD sciences사, 미국)이 코팅된 디쉬에 상기 수득한 NS-배상체를 부착 배양하여 4-5일 동안 배양하였다. 형성된 누란 증후군 유래의 신경 로제트(NS-신경 로제트)를 선택적으로 수득하여, 다시 파이브로넥틴(Fibronectin, BD sciences사, 미국)을 코팅한 디쉬(dish)에 옮겨 4~5일 동안 신경 배상체 배지에서 배양한다. 정상대조군으로, 정상 인간배아줄기세포주인 H9 세포주(H9 hESC) 및 인간 피부 섬유아세포 유래의 iPSC(CRL12)를 사용하여, 상기와 동일한 방법을 수행하여 배상체로 분화를 유도하였다.

【표 6】

화학적 분화 유도를 위한 배상체 분화 배지의 조성 변화

날짜(day)	조성
1	10% SR*을 포함하는 DMEM/F12 배지
2	10% SR 및 10 μ M SB431542 를 포함하는 DMEM/F12 배지
3	10% SR, 10 μ M SB431542 및 5 μ M DM 을 포함하는 DMEM/F12 배지
4	20 ng/ml bFGF 를 포함하는 N2 배지**

* SR: 혈청 대체물(serum replacement)

** N2 배지는 매트리지엘이 코팅된 디쉬에 첨가하여 사용하였다.

그 결과, 도 19 및 도 20에서 나타난 바와 같이, 자연분화로 유도되어 형성된 NS-배상체 및 NS-신경 로제트에 비하여, 화학적 분화로 유도되어 형성된 NS-배상체 및 NS-신경 로제트에서 정상 대조군에서 나타나는 세포의 형태와 유사하게 회복되어 신경 로제트 및 신경관의 형성을 나타내는 것을 확인하였다(도 19 및 도 20).

<6-2> 화학적 분화 유도된 NS-iPSC 유래의 신경 로제트의 신경세포 마커 유전자 발현 확인

누란 증후군 유래의 iPSC로부터 화학적으로 분화 유도된 신경 로제트에서 신경세포로서의 마커 유전자를 정상적으로 발현하는지 확인하기 위하여, 화학적 분화 유도된 NS-배상체에서 외배엽(ectoderm) 유전자인 PAX6, ZIC1, NESTIN 및 VIMENTIN, 신경 로제트 유전자인 PLZF, NR2F1, HES5 및 DACH1, 및 신경세포 유전자인 TUJ1, ASCL1 및 NF1 유전자의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <6-1>과 동일한 방법을 수행하여 화학적 분화를 유도한 NS-iPSC 유래의 신경 로제트를 수득하여, 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법을 수행하여, NS-iPSC의 전체 RNA를 추출하고, 추출한 RNA 1 μ g을 M-MLV 역전사 합성효소(Enzynomics사, 한국)를 사용하여 cDNA를 각각 합성하였다. 외배엽 유전자인 PAX6, ZIC1, NESTIN 및 VIMENTIN, 신경 로제트 유전자인 PLZF, NR2F1, HES5 및 DACH1, 및 신경세포 유전자인 TUJ1, ASCL1 및 NF1 유전자의 cDNA를 각각 합성하고, 하기 [표 7]의 프라이머 서열을 사용하여 이를 증폭하여 전기영동으로 상기 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 확인하였다. 정상 대조군으로는, 상기 실시예 <6-1>에서 화학적 분화를 유도한 H9 세포주 및 CRL12 유래의 신경 로제트를 사용하였다.

【표 7】

신경 로제트의 신경세포 마커 유전자 발현 확인을 위한 프라이머 서열

증폭 유전자	프라이머 명칭	프라이머 서열	서열 번호
PTPN11	PTPN11-F	CTGTGCAGATCCTACCTCTGA	서열번호 27
	PTPN11-R	TCCCCTTTGTCATCACCAGT	서열번호 28
PAX6	PAX6_F	GTGTCCAACGGATGTGTGAG	서열번호 29
	PAX6_R	CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC	서열번호 30
ZIC1	ZIC1-F	GCGCTCCGAGAATTTAAAGA	서열번호 31
	ZIC1-R	CGTGGACCTTCATGTGTTTG	서열번호 32
NESTIN	NESTIN-F	GCAGGAGAAACAGGGCCTAC	서열번호 33
	NESTIN-R	AAAGCTGAGGGAAGTCTTGGA	서열번호 34

VIMENTIN	VIMENTIN-F	TGCAGGACTCGGTGGACTT	서열번호 35
	VIMENTIN-R	TGGACTCCTGCTTTGCCTG	서열번호 36
PLZF	PLZF-F	CTATGGGCGAGAGGAGAGTG	서열번호 37
	PLZF-R	TCAATACAGCGTCAGCCTTG	서열번호 38
NR2F1	NR2F1-F	ACAGGAAGTGTCCCATCGAC	서열번호 39
	NR2F1-R	GATGTAGCCGGACAGGTAGC	서열번호 40
HES5	HES5-F	CATCCTGGAGATGGCTGTCA	서열번호 41
	HES5-R	AGCAGCTTCATCTGCGTGT	서열번호 42
DACH1	DACH1-F	GTGGAAAACACCCCTCAGAA	서열번호 43
	DACH1-R	CTTGTTCACATTGCACACC	서열번호 44
TUJ1	TUJ1-F	GAACAGCACGGCCATCCAGG	서열번호 45
	TUJ1-R	CTTGGGGCCCTGGGCCTCCGA	서열번호 46
ASCL1	ASCL1-F	CATCTCCCCCACTACTCCA	서열번호 47
	ASCL1-R	TCGGGGCTGAGCGGGTCGTA	서열번호 48
NF1	NF1-F	AGCAGCAGTTTGGCCACTACAA	서열번호 49
	NF1-R	TTGCAGCACTTCTGTGTCAGCTG	서열번호 50

그 결과, 도 21에서 나타난 바와 같이 대부분의 유전자인 PAX6, ZIC1, NESTIN, VIMENTIN, PLZF, HES5, DACH1, TUJ1, ASCL1 및 NF1 유전자는 정상 대조군과 유사한 수준으로 발현되는 것을 확인하였으나, NR2F1의 발현은 감소하는 것을 확인하였다(도 21).

5

<6-3> 화학적 분화 유도된 NS-iPSC 유래의 신경 로제트의 NR2F1 유전자 발현의 감소 확인

화학적으로 분화 유도된 누란 증후군 유래의 신경 로제트에서 NR2F1 유전자 발현이 감소되는 것을 확인하기 위해서, 화학적 분화 유도된 NS-신경로제트에서 NR2F1 유전자 발현의 감소를 정량적으로 재확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <6-1>과 동일한 방법을 수행하여 화학적 분화를 유도한 NS-iPSC 유래의 신경 로제트를 수득하여, 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법으로 NR2F1 유전자 cDNA를 각각 합성하고, q-PCR를 수행하여 NR2F1 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. 발현 수준을 보정하기 위한 대조군으로 GAPDH 유전자를 상기와 동일한 방법을 수행하여 발현량을 확인하였으며, 상기 유전자 각각의 ΔCt 값은 GAPDH 및 NR2F1 유전자의 Ct 값의

차이로 계산하였다. 대조군으로는 상기 실시예 <6-1>에서 화학적 분화를 유도한 H9 세포주 및 CRL12 유래의 신경 로제트를 사용하였으며, 이를 NS-신경 로제트의 유전자의 발현량과 각각 비교하여 상기 [수학식 1]로 계산되는 발현 배수로 표현하였다.

- 5 그 결과, 도 22에서 나타난 바와 같이 정상 대조군에 비해서 NS-신경 로제트에서 NR2F1 유전자 발현 수준이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 22).

【청구의 범위】

【청구항 1】

i) 시험관 내(*In vitro*)에서 누난 증후군(N Noonan syndrome) 환자로부터 분리된 섬유아세포(fibroblast)를 유도-만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cells; iPSC)로 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 iPSC를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 누난 증후군 iPSC 모델의 제조 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 단계 i)의 유도는 다분화능 마커(pluripotent marker)의 이소성 발현(ectopic expression)을 사용하는 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 누난 증후군 iPSC 모델의 제조 방법.

【청구항 3】

제 1항의 방법으로 제조된, 누난 증후군 iPSC 모델.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 iPSC는 하기 i) 내지 iii) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 누난 증후군 iPSC 모델;

i) 정상 세포의 iPSC 형태;

ii) *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *REX1*, *ECAT15*, *GDF3* 및 *TERT*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 다분화능 마커 유전자의 발현; 및

iii) *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *SSEA4*, *Tra-1-81* 및 *Tra-1-60*으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포성 마커(stemness marker) 단백질의 발현.

【청구항 5】

i) 제 3항의 iPSC로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 신경세포로

분화를 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체 또는 세포의 특성을 분석하는 단계를 포함하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 방법.

5 【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 유도는 자연적인 유도 또는 화학적 유도 물질(chemical)의 첨가로 인한 직접적(directed)인 유도 둘 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 방법.

10 【청구항 7】

제 5항에 있어서, 상기 단계 iii)의 iPSC 모델의 특성은 iPSC 모델의 배상체 또는 신경세포로의 분화능을 분석하는 것을 특징으로 하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 방법.

15 【청구항 8】

제 5항에 있어서, 상기 배상체의 특성은 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는 방법;

i) 정상 세포의 형태;

ii) *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *c-MYC*, 및 *KLF4*로 구성된 군으로부터 선택된 어느
20 하나 이상의 다분화능 마커 유전자의 발현;

iii) *Id1* 또는 *Id2* 둘 중 하나 이상을 포함하는 BMP 신호 전달 체제 유전자의 증가;

iv) p-SMAD1, p-SMAD5 및 p-SMAD8로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 BMP 신호전달 체제 단백질의 인산화 수준의 증가;

25 v) SMAD2 또는 SMAD3 둘 중 하나 이상을 포함하는 TGF- β 신호전달 체제 유전자의 증가; 및

vi) p-SMAD2 또는 p-SMAD3 둘 중 하나 이상을 포함하는 TGF- β 신호전달 체제 단백질의 인산화 수준의 증가.

【청구항 9】

제 5항에 있어서, 상기 신경세포의 특성은 하기 i) 내지 iii) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, iPSC를 누난 증후군의 모델로 사용하는
5 방법;

i) 정상 세포의 형태;

ii) *PAX6*, *ZIC1*, *NESTIN*, *VIMENTIN*, *NP2F1*, *PLZF*, *HESS*, *DACH1*, *TUJ1*, *ASCL1* 및 *NF1*로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 신경세포 유전자의 발현; 및

10 iii) 정상 세포에 비해 *NR2F1* 유전자의 발현 감소.

【청구항 10】

i) 제 3항의 iPSC 모델, 또는 이로부터 분화된 배상체 또는 신경세포를 수득하는 단계;

15 ii) 상기 단계 i)의 iPSC 모델, 배상체 또는 신경세포에 피검 화합물 또는 피검 조성물을 처리하는 단계;

iii) 상기 단계 ii)의 처리된 iPSC 모델, 배상체 또는 신경세포의 특성을 분석하는 단계; 및

20 iv) 상기 단계 iii)의 분석한 결과를 무처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 누난 증후군의 치료제 후보물질의 스크리닝 방법.

【청구항 11】

제 1항의 방법으로 제조된, 누난 증후군 iPSC 모델의 용도.

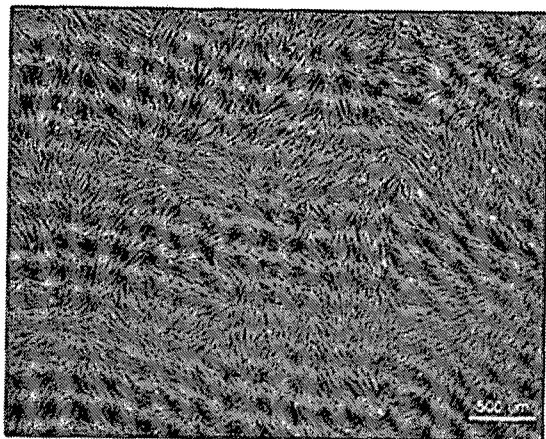
25 【청구항 12】

i) 제 3항의 iPSC로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 신경세포로 분화를 유도하는 단계; 및

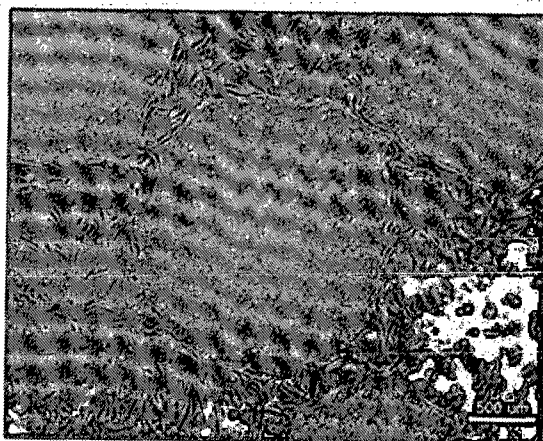
ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체 또는 세포의 특성을 분석하는

단계를 포함하는, iPSC를 누란 증후군의 모델로 사용하는 용도.

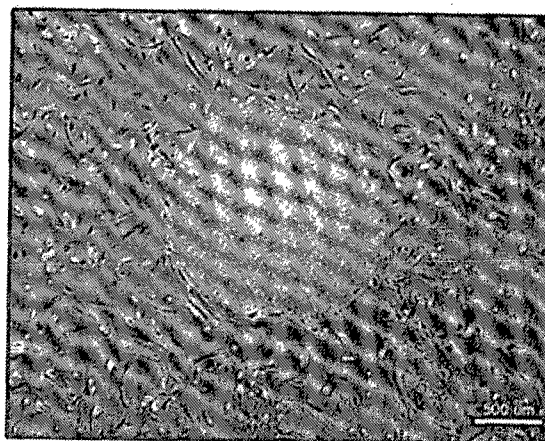
[도 1]



NS-fibroblasts

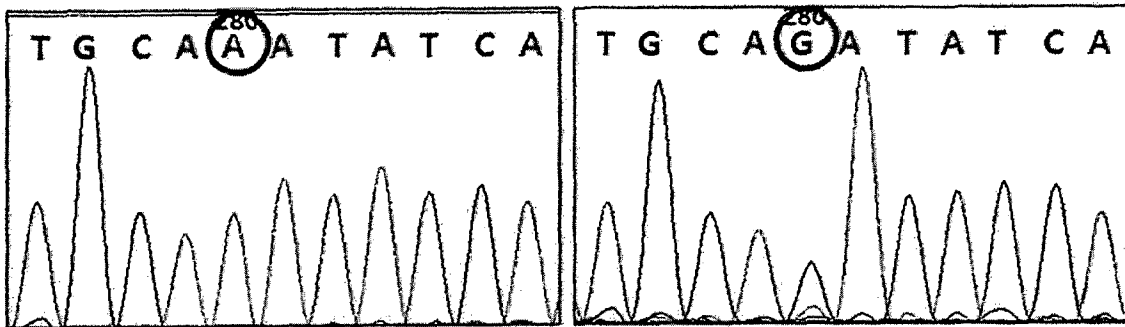
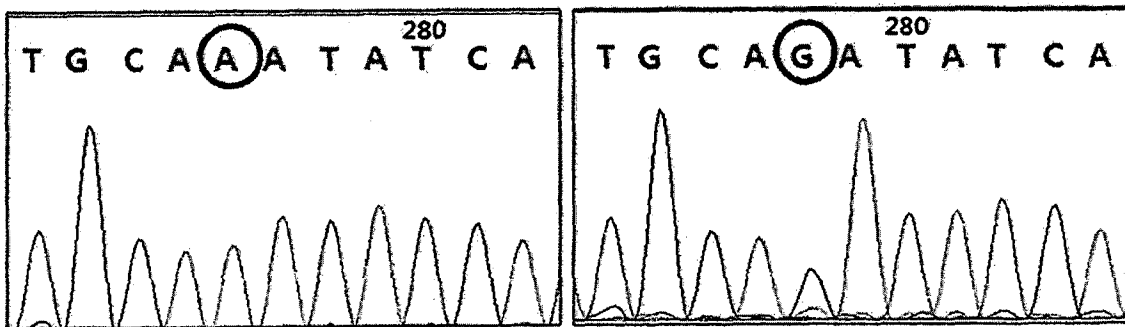
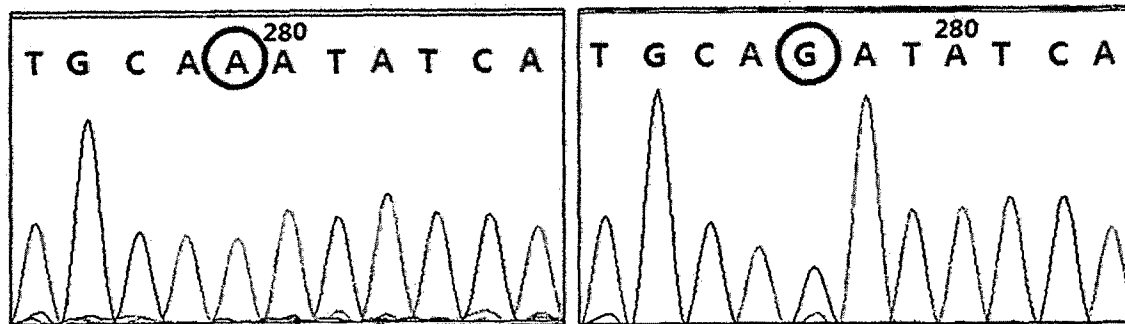


NS-iPSCs #4

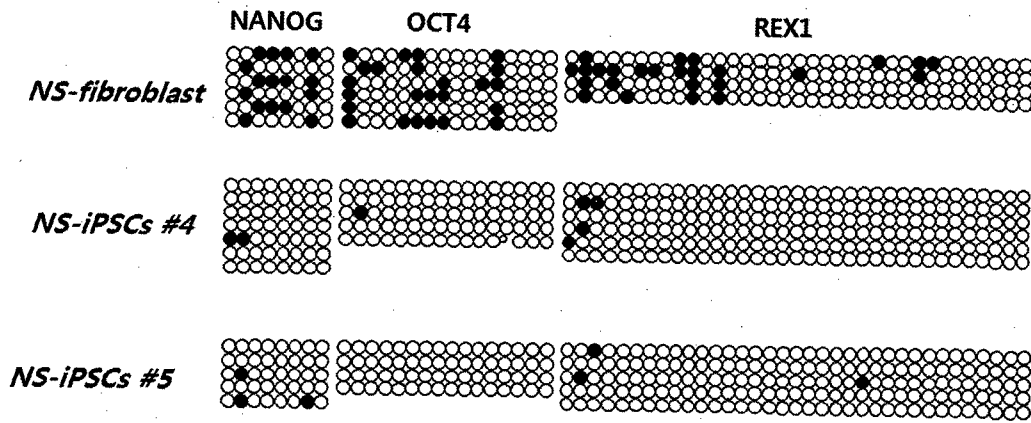


NS-iPSCs #5

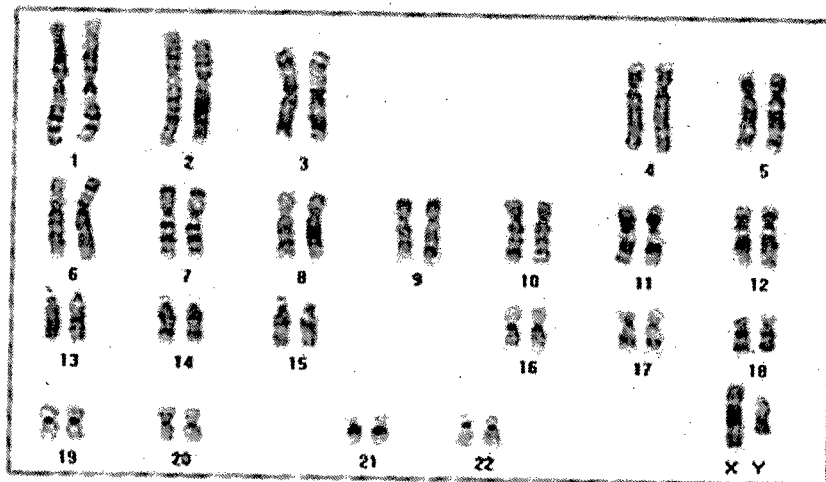
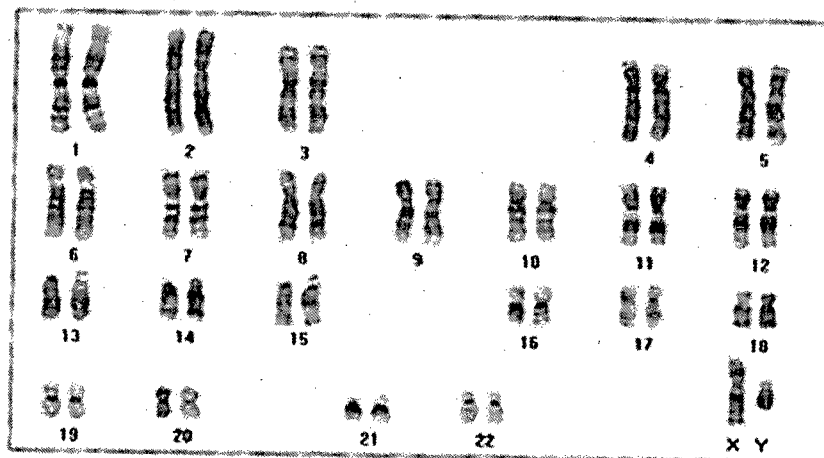
[도 2]

NS-fibroblasts**NS-iPSCs #4****NS-iPSCs #5**

[도 3]

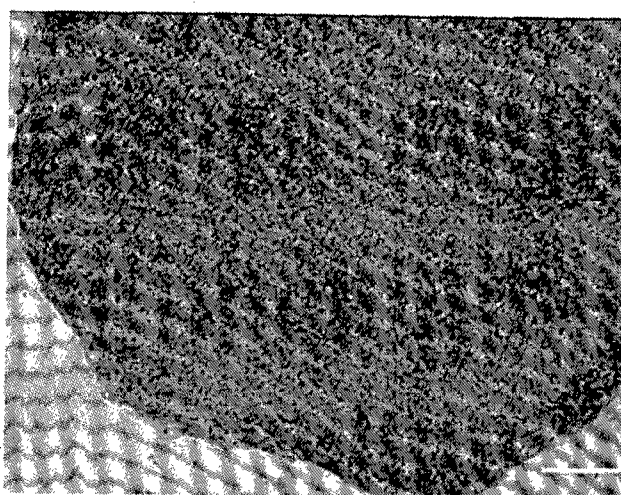


[도 4]

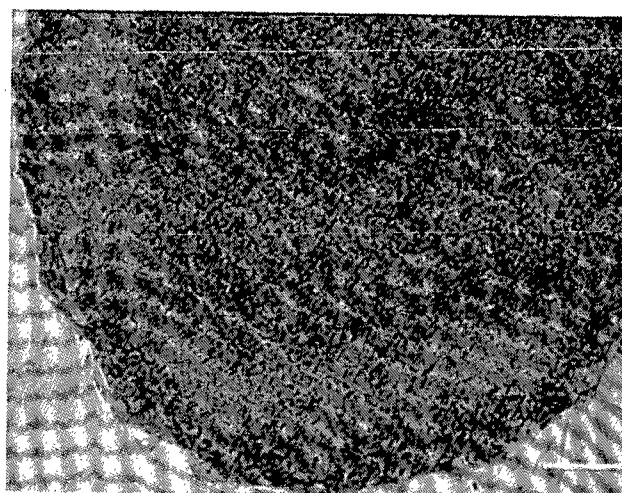
NS-iPSCs #4**NS-iPSCs #5**

[도 5]

NS-iPSCs #4

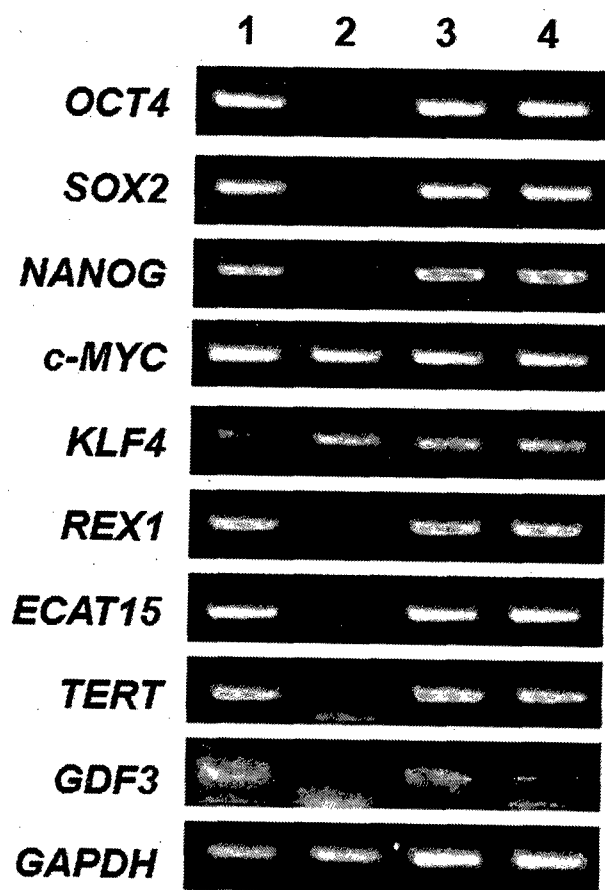


NS-iPSCs #5



scale bar: 200 μm

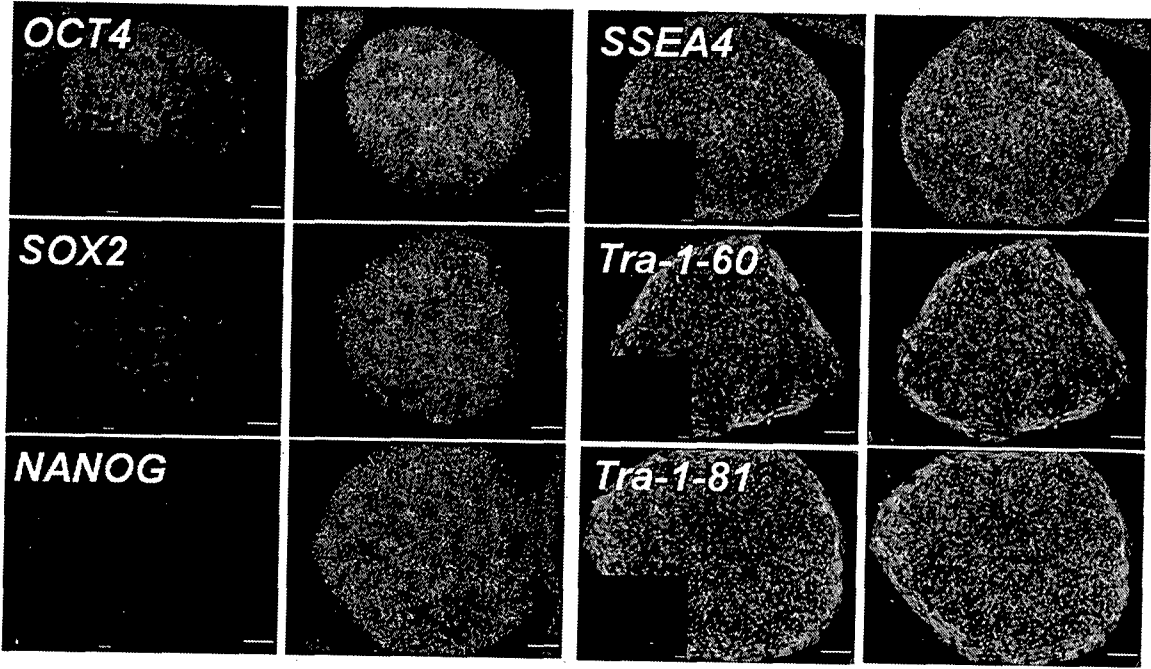
[도 6]



1. H9 hESCs
2. NS-fibroblasts
3. NS-iPSCs #4
4. NS-iPSCs #5

[도 7]

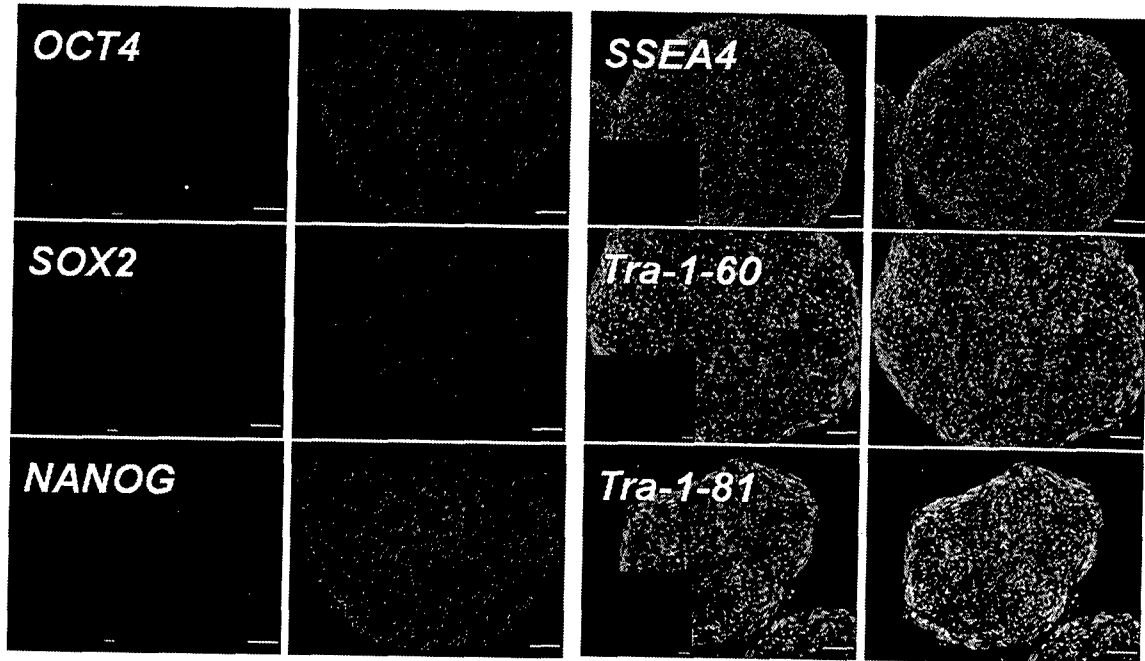
NS-iPSCs #4



Blue: DAPI staining

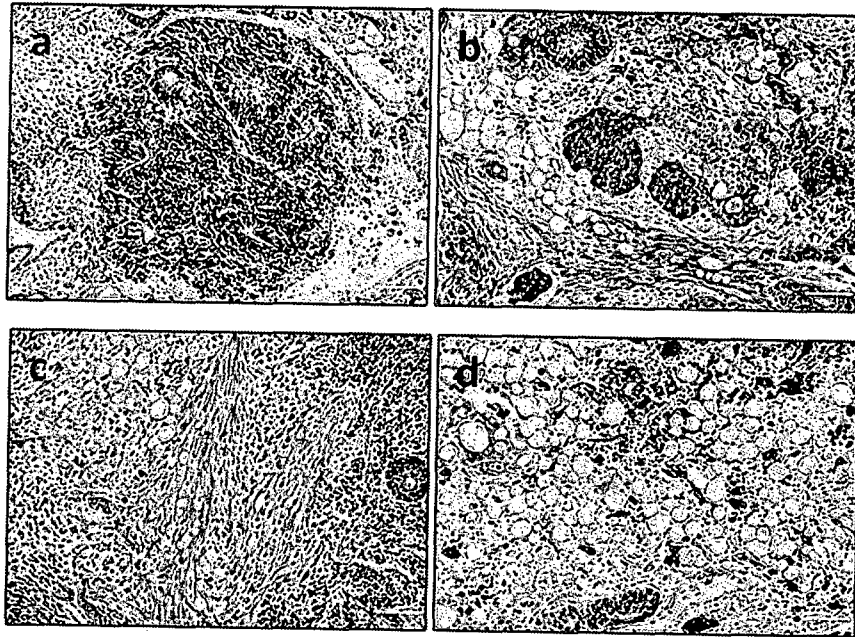
[도 8]

NS-iPSCs #5



Blue: DAPI staining

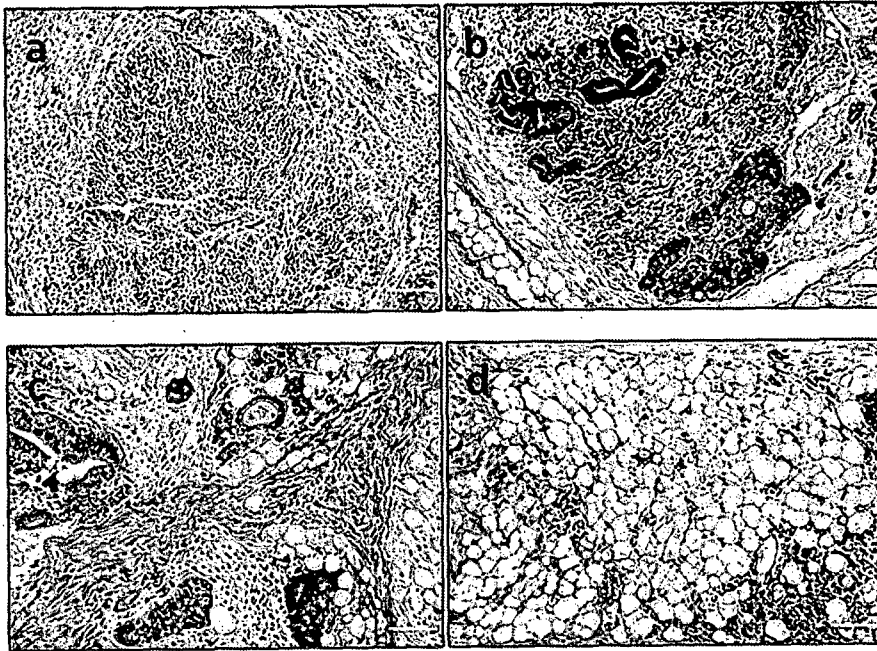
[도 9]

NS-iPSCs #4

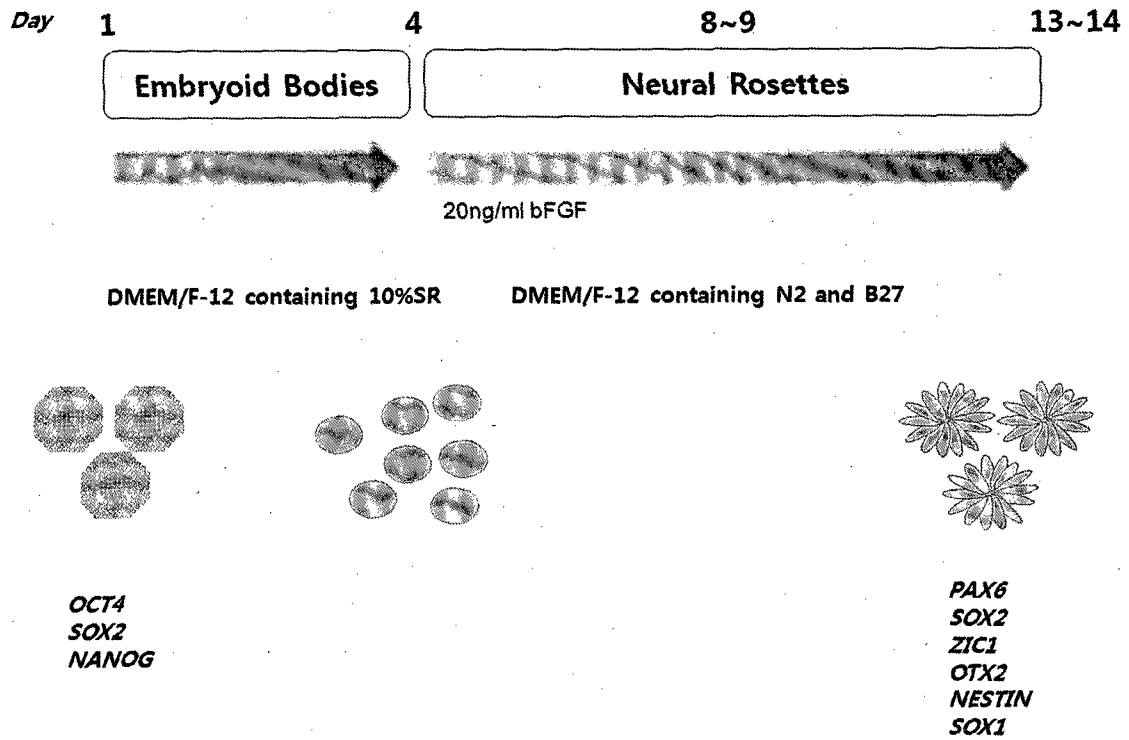
a : Neuroectodermal tissues
c : Smooth muscle

b : Secretoty gland
d : Adipose tissues

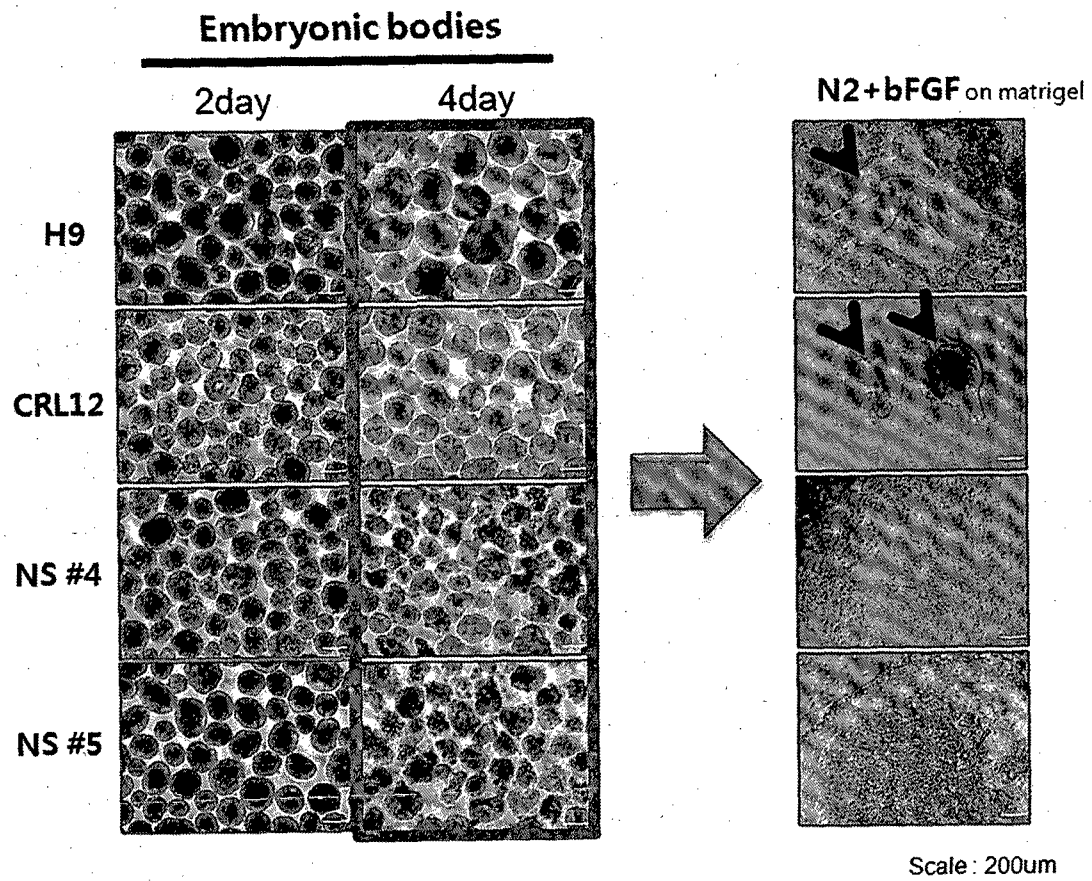
[도 10]

NS-iPSCs #5**a** : Neuroectodermal tissues**c** : Smooth muscle**b** : Secretoty gland**d** : Adipose tissues

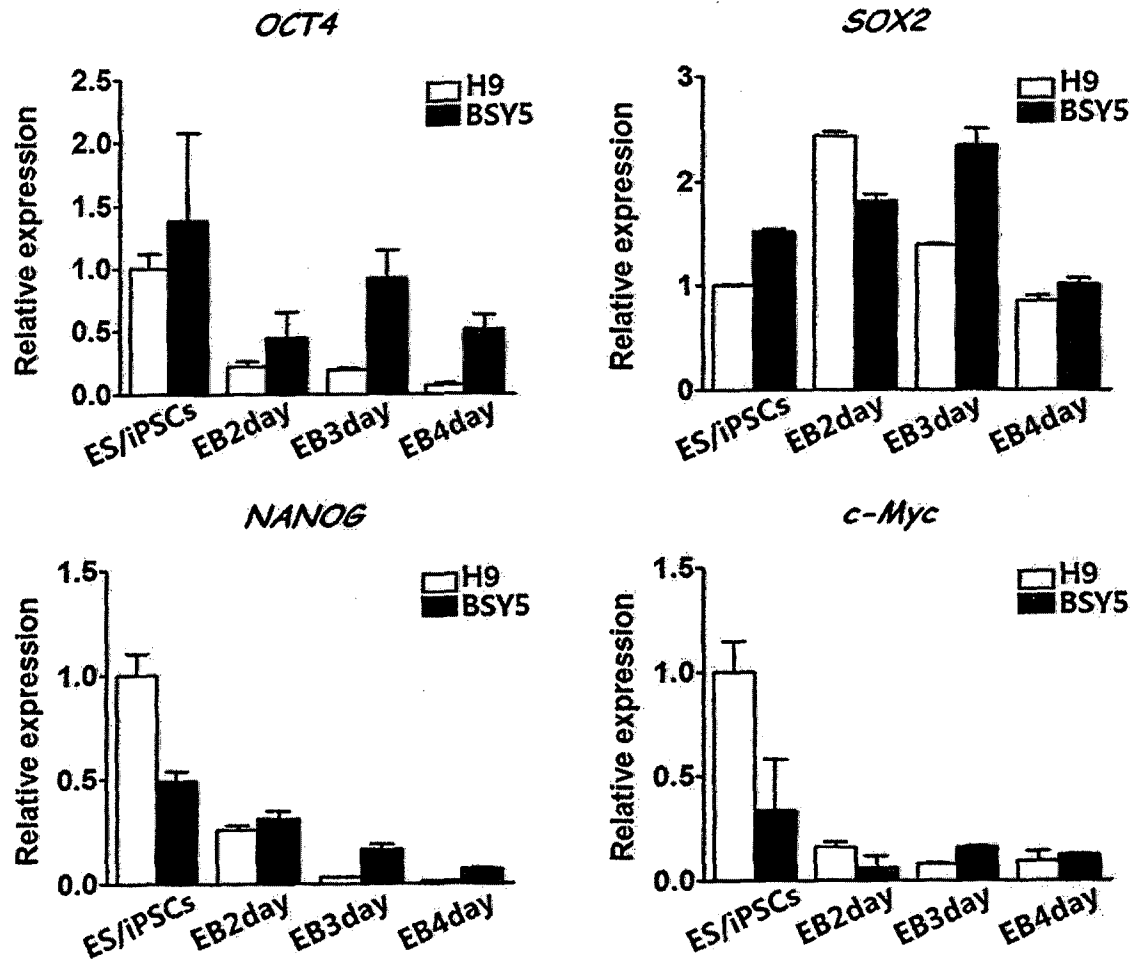
[도 11]



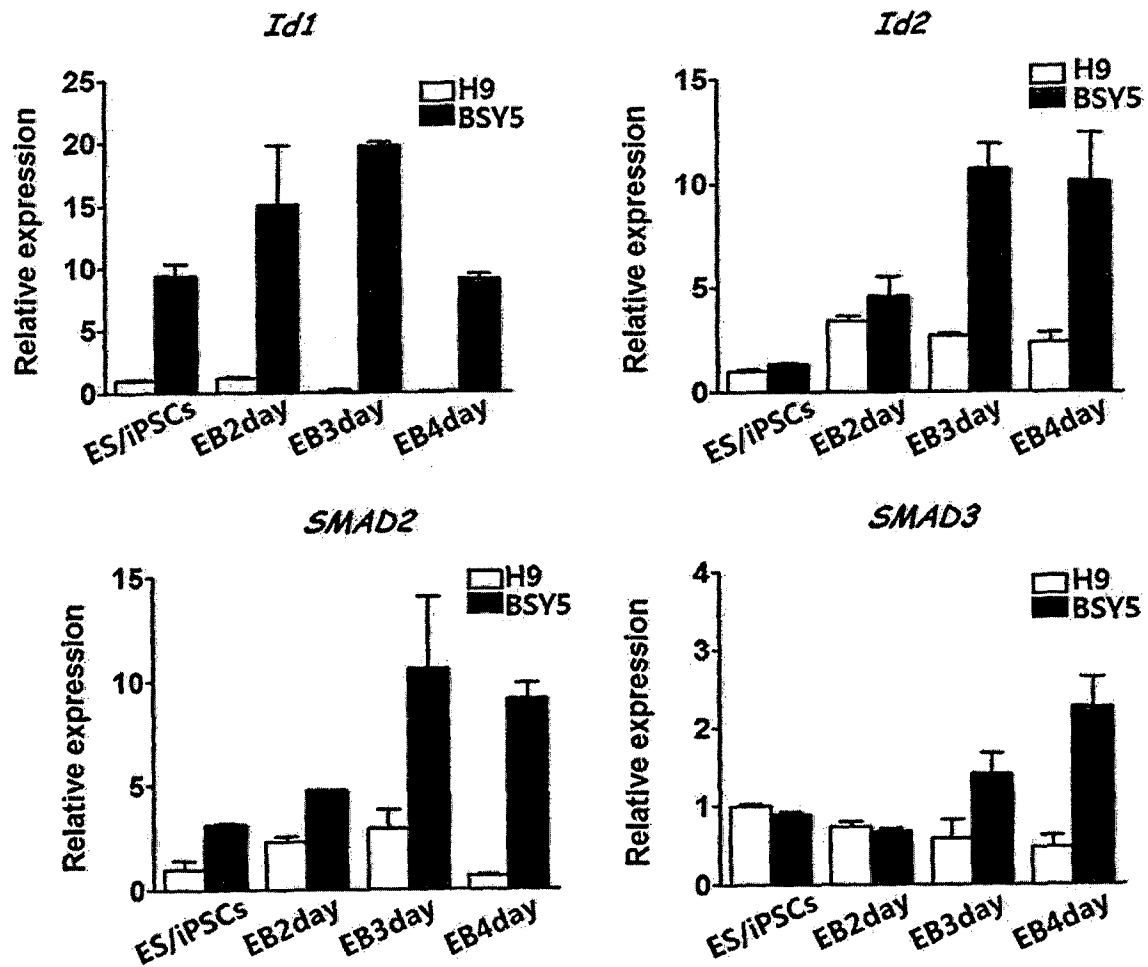
[도 12]



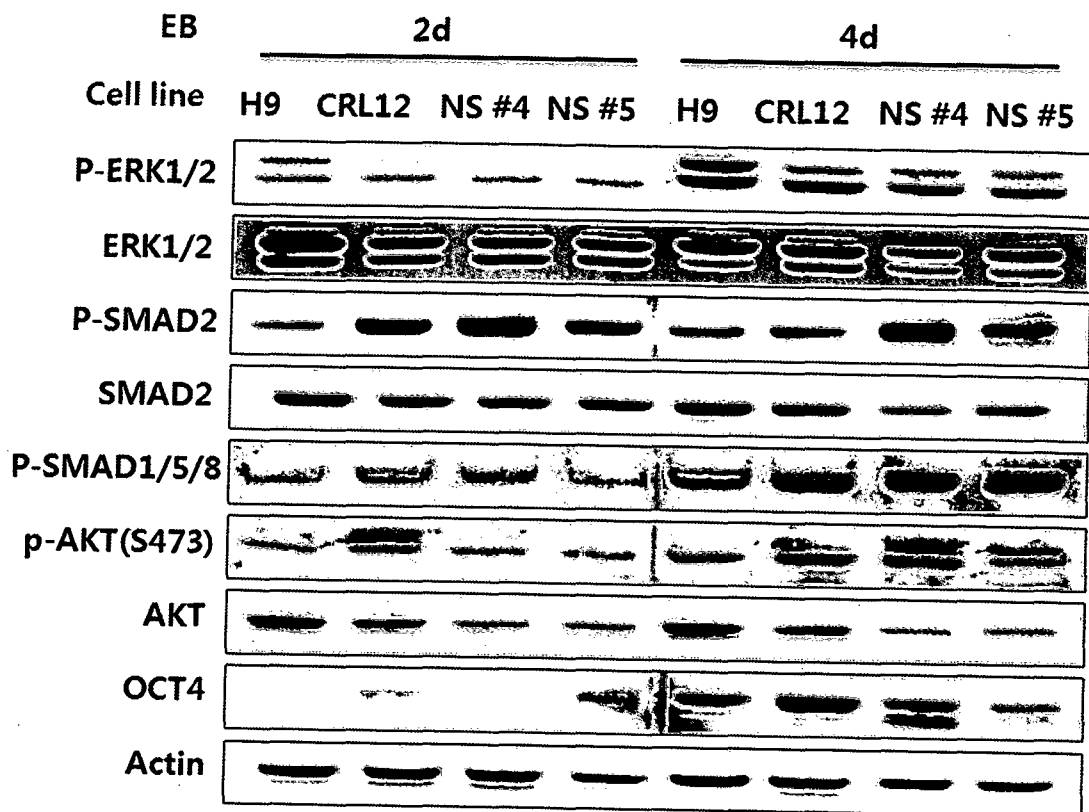
[도 13]



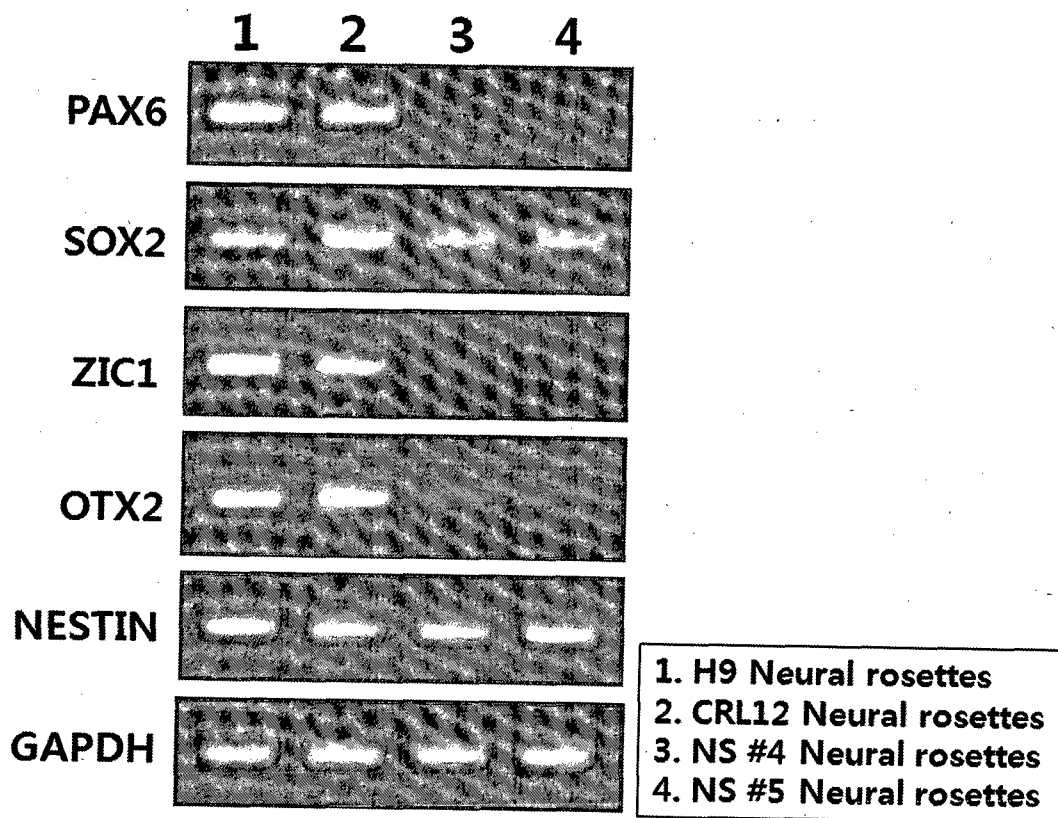
[도 14]



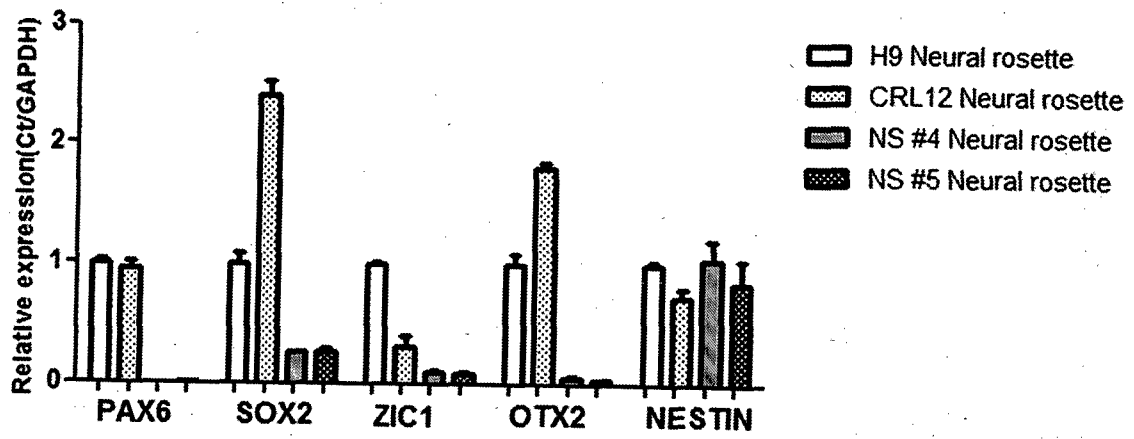
[도 15]



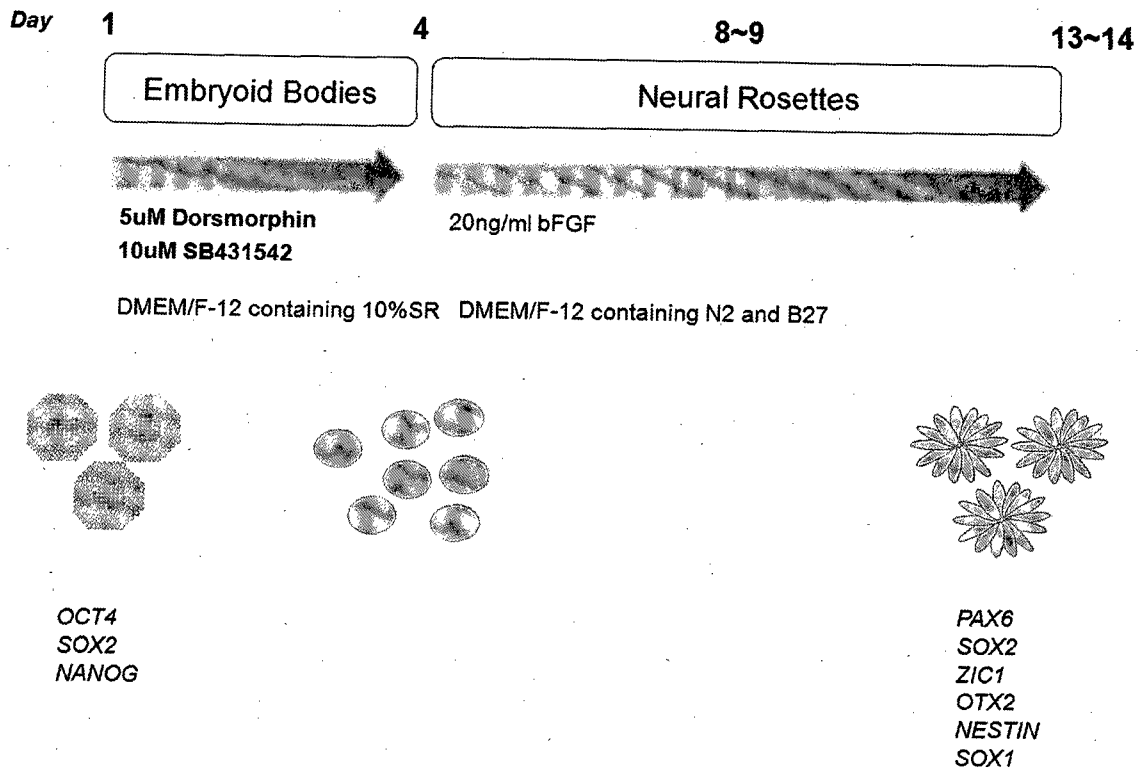
[도 16]



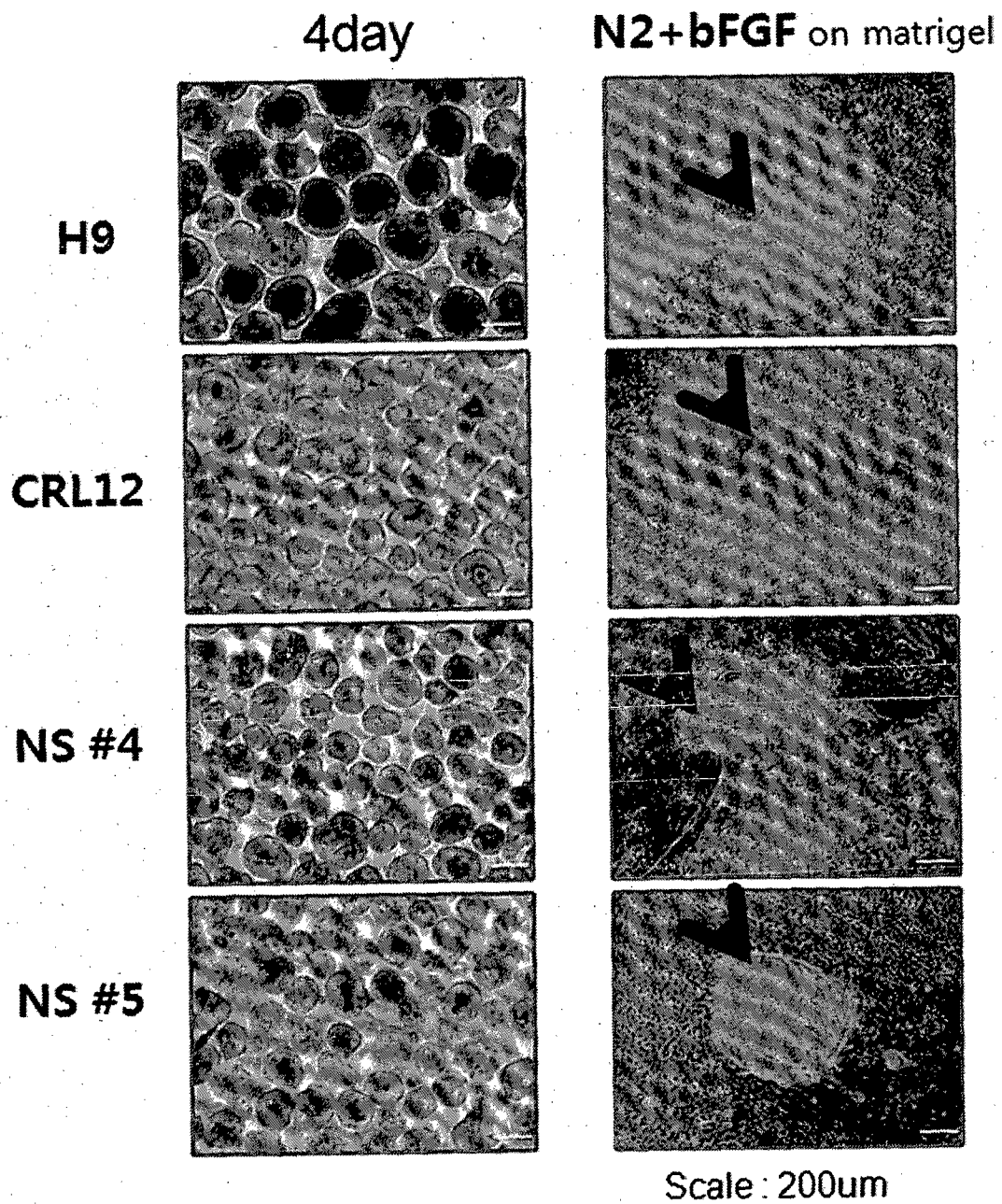
[도 17]



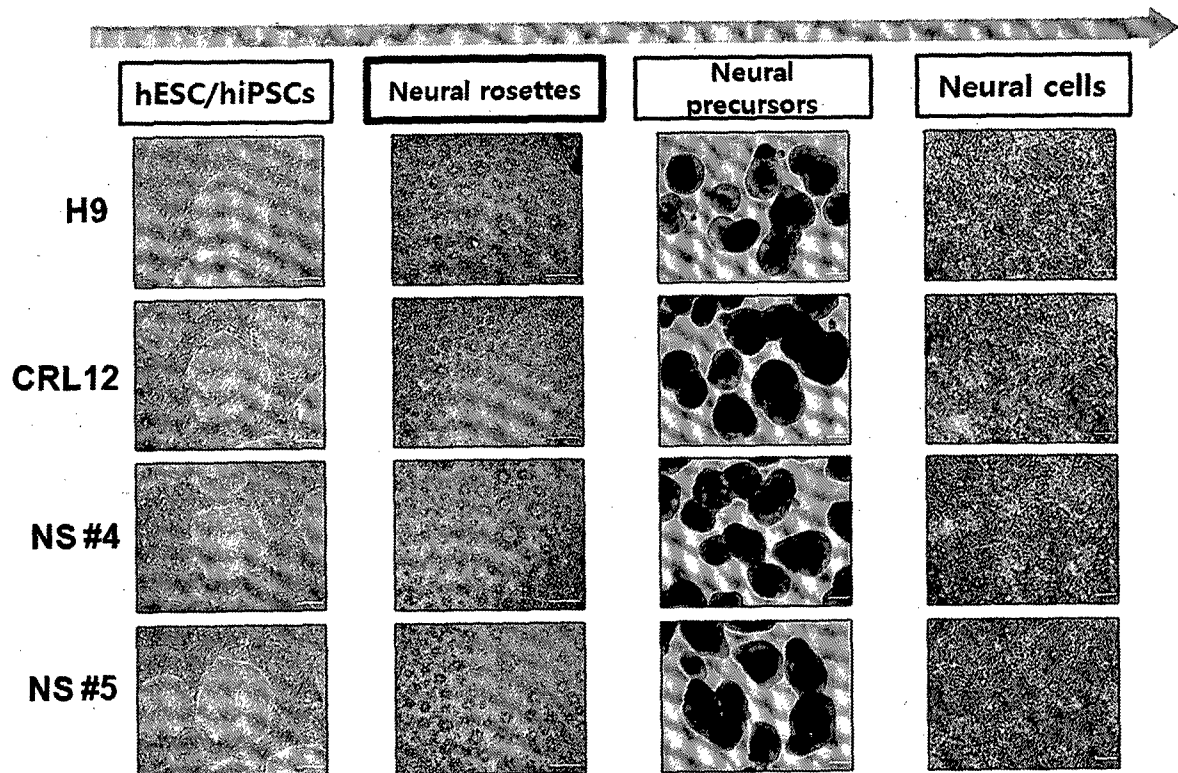
[도 18]



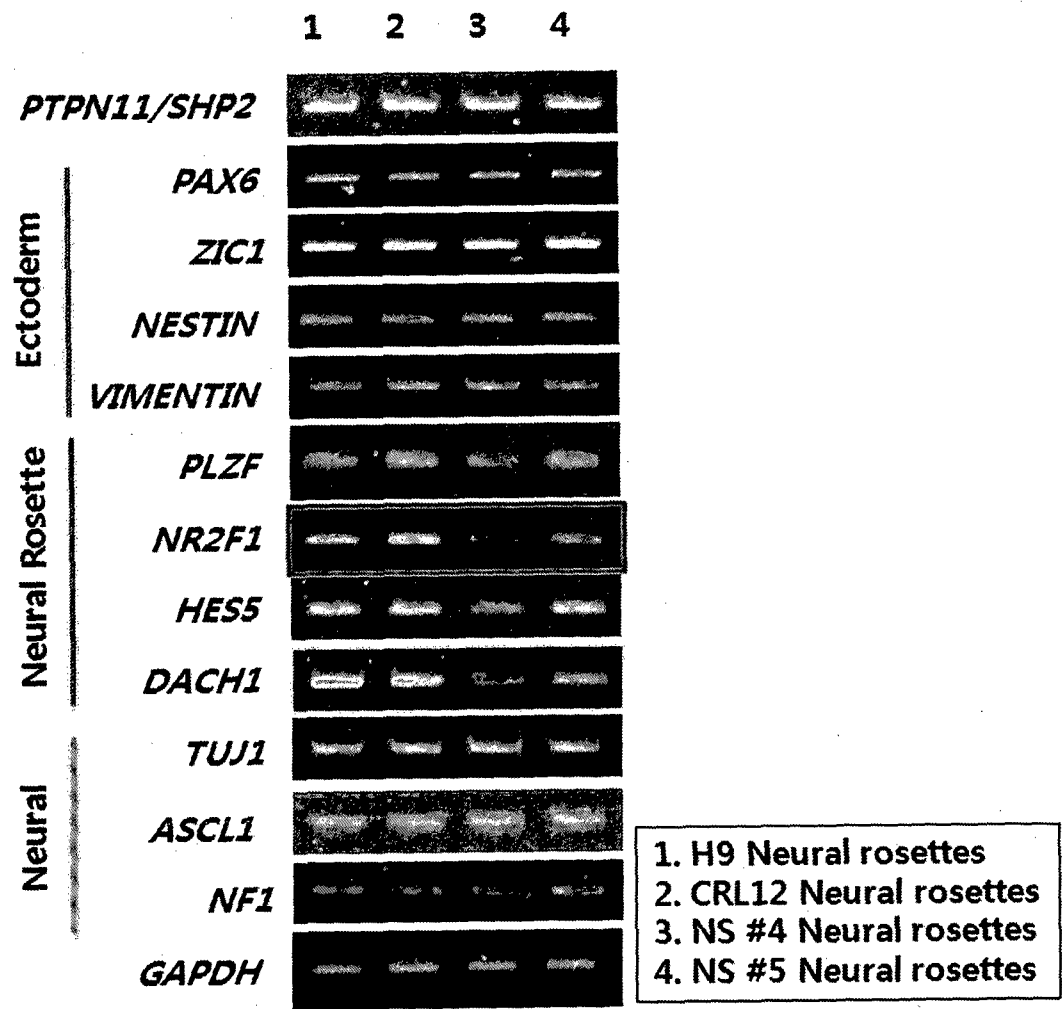
[도 19]



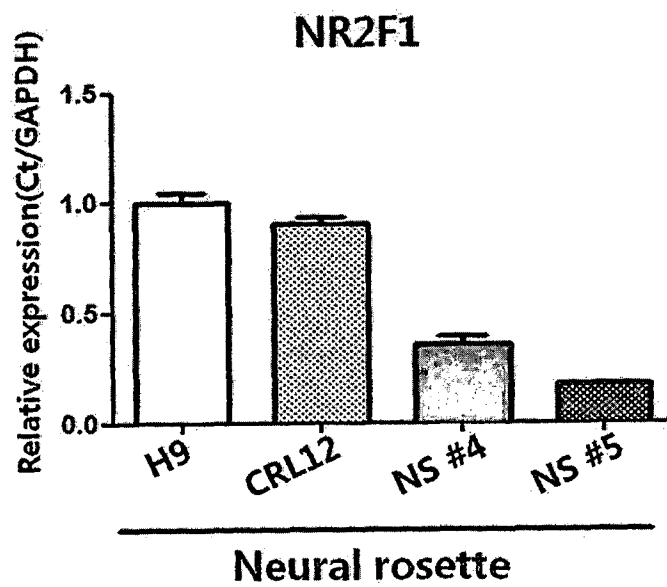
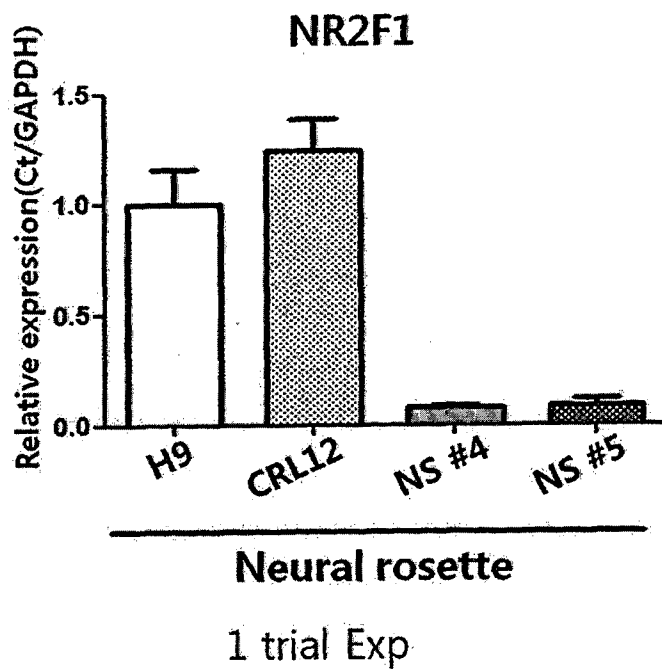
[도 20]



[도 21]



[도 22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/000880**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/074(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/074; A61P 25/18; C12N 5/071; A61K 35/12; C12N 5/07; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: noonan syndrome, induced pluripotent stem cells(iPSC), screening, embryoid body, nerve cell**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARVAJAL-VERGARA, X. et al., "Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome", Nature, 2010, vol. 465, pp. 808-812 (10 June 2010) See abstract; pages 808, 809, 811, 812; METHOD; Fig. 1, 3	1-9,11,12
Y		10
Y	KR 10-2013-0133598 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 09 December 2013 See abstract; claims 5, 8	10
A		1-9,11,12
X	WO 2011-130217 A1 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE et al.) 20 October 2011 See abstract; pages 24, 39; claims 1, 4, 28	1-9,11,12
Y		10
A	RAJAMOCHAN, D. et al., "Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells", Bioessays, 2013, vol. 35, no. 3, pp. 281-298 (Published Online on 08 August 2012)	1-12
A	KR 10-1168053 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 24 July 2012 See abstract	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 AUGUST 2014 (28.08.2014)

Date of mailing of the international search report

28 AUGUST 2014 (28.08.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/000880

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0133598 A	09/12/2013	NONE	
WO 2011-130217 A1	20/10/2011	NONE	
KR 10-1168053 B1	24/07/2012	EP 2502987 A2	26/09/2012
		JP 2012-501194 A	19/01/2012
		US 2011-0217774 A1	08/09/2011
		US 8551783 B2	08/10/2013
		WO 2011-055899 A2	12/05/2011
		WO 2011-055899 A3	21/07/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/074(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/074; A61P 25/18; C12N 5/071; A61K 35/12; C12N 5/07; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 누난 증후군, 유도만능줄기세포, 스크리닝, 배상체, 신경세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CARVAJAL-VERGARA, X. et al., 'Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome', Nature, 2010, vol.465, pp.808-812 (2010.6.10.) 초록; 808, 809, 811, 812면; METHOD; Fig.1, 3 참조	1-9, 11, 12
Y		10
Y	KR 10-2013-0133598 A (차의과학대학교 산학협력단) 2013.12.09 초록; 청구항 5, 8 참조	10
A		1-9, 11, 12
X	WO 2011-130217 A1 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE 외 3명) 2011.10.20 초록; 24, 39면; 청구항 1, 4, 28 참조	1-9, 11, 12
Y		10
A	RAJAMOHAN, D. et al., 'Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells', Bioessays, 2013, vol.35, no.3, pp.281-298 (2012.8.8. 온라인 공개)	1-12
A	KR 10-1168053 B1 (연세대학교 산학협력단) 2012.07.24 초록 참조	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 08월 28일 (28.08.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 08월 28일 (28.08.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이효진

전화번호 +82-42-481-8743



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0133598 A	2013/12/09	없음	
WO 2011-130217 A1	2011/10/20	없음	
KR 10-1168053 B1	2012/07/24	EP 2502987 A2	2012/09/26
		JP 2012-501194 A	2012/01/19
		US 2011-0217774 A1	2011/09/08
		US 8551783 B2	2013/10/08
		WO 2011-055899 A2	2011/05/12
		WO 2011-055899 A3	2011/07/21