



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월29일
 (11) 등록번호 10-1972766
 (24) 등록일자 2019년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 5/074 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)
 C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/0735 (2010.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0041753
 (22) 출원일자 2012년04월20일
 심사청구일자 2017년04월13일
 (65) 공개번호 10-2013-0118674
 (43) 공개일자 2013년10월30일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020120017019 A*
 PLoS One. 4(11): e7780 (2009.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 차바이오텍
 서울특별시 강남구 도산대로 442, 3층 (청담동, 피엔폴루스)
차의과학대학교 산학협력단
 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)
 (72) 발명자
김정모
 서울 강남구 봉은사로26길 10, 3층 (역삼동, 한양빌딩)
문성환
 서울 강남구 봉은사로26길 10, 3층 (역삼동, 한양빌딩)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 유성진

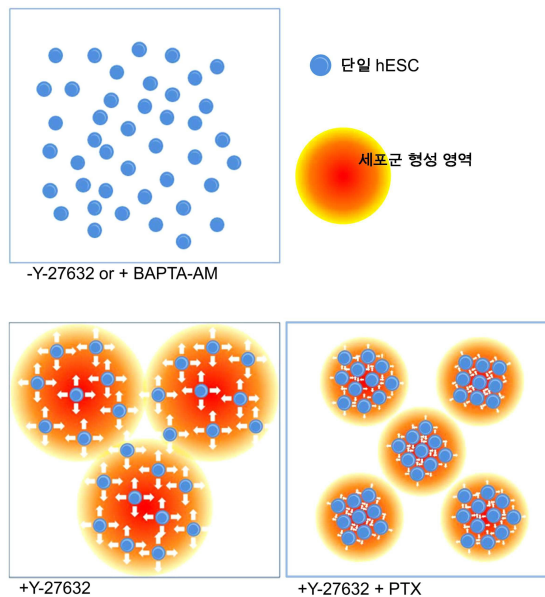
(54) 발명의 명칭 **인간 다능성 줄기세포 단일세포의 계대배양 방법, 및 이를 이용한 형질전환 인간 다능성 줄기세포 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 인간배아줄기세포 및 유도만능 줄기세포를 비롯한 인간 다능성 줄기세포의 단일세포를 효과적으로 계대배양할 수 있는 방법 및 이를 이용하여 인간 다능성 줄기세포에 효과적으로 유전자 도입할 수 있는 방법에 관한 것이다. 구체적으로는 효소적으로 분리되어 단일세포화된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



cell)에 대하여 세포 내 G_i 단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달을 저해하는 단계를 포함함으로써, 영양공급세포 없이 계대배양할 수 있는 방법, 및 이를 이용하여 효과적으로 인간 다능성 줄기세포에 유전자 도입할 수 있는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하면, 영양공급세포가 없는 조건에서, 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포의 세포 부착 및 세포군 형성 개시를 촉진할 수 있고, 나아가 분리된 인간 다능성 줄기세포를 더욱 농축, 밀집, 압축된 세포군으로 형성하여, 다능성 세포군 상태로 계속적이고 안정적으로 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법을 이용하면, 배양이 어려운 분리된 hPSC를 효과적으로 세포군으로 제조하여 다능성이 유지된 상태로 성공적으로 계대 배양할 수 있고, 이를 이용하여 클론 분리된 hPSC를 이용하여 유전자 도입, 분화 유도 등의 후속 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

(72) 발명자

박순정

서울 강남구 봉은사로26길 10, 3층 (역삼동, 한양빌딩)

정형민

서울 강남구 봉은사로26길 10, 3층 (역삼동, 한양빌딩)

황성규

서울 송파구 양재대로 1218, 120동 704호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110019487

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술 개발사업

연구과제명 인간배아줄기세포 분화기술을 이용한 당뇨성 망막손상 및 혈관손상 재건 기능성 세포치료제 개발

기여율 1/1

주관기관 차의과학대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 분리된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell) 단일세포를 준비하는 단계; 및
(b) 상기 인간 다능성 줄기세포 단일세포의 Gi-결합된 GPCR 신호전달 및 로 연관 키나제(Rho-associated kinase, ROCK)를 저해하는 단계를 포함하며,
상기 (b) 단계는 인간 다능성 줄기세포의 세포균형성 능력을 증진시키고, 인간 다능성 줄기세포 세포군의 다능성을 유지시키며,
상기 방법은 영양 공급세포 없이 배양하는 조건 하에서 수행되는 것인 인간 다능성 줄기세포 단일세포의 계대배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 다능성 줄기세포는 인간 배아 줄기 세포(hESC) 또는 유도된 인간 다능성 줄기세포(iPSC)인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포는 영양 공급세포 없이 배양한 것인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 ROCK 저해는 Y27632를 처리하여 수행하는 것인 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포는 인간 다능성 줄기세포 세포군으로부터 효소 처리하여 분리한 것인 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 인간 다능성 줄기세포 세포군은 Oct-4 및 E-카드헤린을 발현하는 것인 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 Gi-결합된 GPCR 신호전달은 PKC 매개 신호전달인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 Gi-결합된 GPCR 신호전달 저해는 백일해 독소 (pertussis toxin)를 처리하여 수행하는 것인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간배아줄기세포 및 유도만능 줄기세포를 비롯한 인간 다능성 줄기세포의 단일세포를 효과적으로 계대배양할 수 있는 방법 및 이를 이용한 형질전환 인간 다능성 줄기세포 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로는 효소적으로 분리되어 단일세포화된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell)에 대하여 세포 내 Gi 단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달을 저해하는 단계를 포함함으로써, 영양공급세포 없이 계대배양할 수 있는 방법, 및 이를 이용하여 효과적으로 형질전환 인간 다능성 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)란, 미분화 상태를 유지하면서 무한히 증식할 수 있으며 일정한 환경과 조건이 주어질 경우 특정 기능과 형태를 갖도록 분화할 수 있는 세포를 말한다. 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell, hPSC)는 적당한 체외 배양조건에서 무한 증식(자가재생산능; self-renewal)을 할 수 있고, 개체를 이루고 있는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 특성(다능성 또는 전분화능 ;pluripotency)으로 인해 개체의 발생, 분화 및 성장에 대한 기초 지식 이해 측면에서 뿐만 아니라 개체의 손상 또는 다양한 질병의 근본적인 치료 방법인 세포 치료제 개발 및 다양한 신약후보물질의 약효 검색, 질환의 원인 규명, 치료법 개발 등 다양한 측면에서 이를 대상으로 한 연구성과의 활용범위가 확대되고 있다. 다양한 분야에서 인간 다능성 줄기세포 이용에 대한 수요가 급증하고 있음에도 불구하고 미분화 상태의 인간 다능성 줄기세포를 유지 및 배양하기 위한 배양 배지가 한정적일 뿐만 아니라 배양이 어렵다는 점은 관련 기술 개발의 장애요소로 작용하고 있으며 특히, 세포치료제 개발을 위해서는 영양 공급 세포, 동물 유래 인자 등을 사용하지 않은 배지 사용 등 임상적용 가능한 배양조건을 구축하고 수요가 발생할 시 필요한 양을 효율적으로 공급할 수 있는 대량 배양 시스템을 개발하는 것이 필수적이다.

[0003] hESC 세포는 세포군의 형태로 존재함으로써 다능성을 유지하며 생존할 수 있고, 세포가 분리되면 쉽게 세포자살 과정으로 들어가고, 분리된 hESC는 일반적으로 1% 이하의 클로닝 효율을 나타낸다. 따라서, hESC를 클론 분리하여 유전자 전달, 분화의 유도 등의 과정에 유용한 단일세포 배양 상태로 이용하는 것이 매우 어렵다. 세포 분리 후의 낮은 hESC 생존율을 개선하기 위해, 로 연관 키나제(Rho-associated kinase, ROCK) 저해제인 Y27632를 적용하였으나, 지금까지 상기 저해제 처리가 성공한 예는 효소 처리 계대 배양에 적응된 고품질의 미분화 hPSC를 사용하고, 세포들을 적절한 밀도로 접종하고, 영양공급세포를 이용한 것이었다. 그러나, 효소처리로 분리된 단

일세포 hESC의 배양은 상기 조건에 해당되지 않아서, 분리된 단일세포 hESC를 효과적으로 생존시켜 세포군을 형성하기 위한 최적의 요구 조건은 아직 알려져 있지 않은 상황이다.

[0004] 두껍고 다층 형태를 가지는 마우스 다능성 세포군과 달리, 인간 다능성 줄기세포 세포군은 평면표피와 비슷한 형태의 단일층을 형성하는 형태를 가진다. 세포군의 형태는 다능성의 유지와 높은 관련이 있기 때문에, 세포군 형성과 조직화 기작의 이해는 생체외 (ex vivo)에서의 hPSC의 성장과 분화 조절을 통한 실제 치료 적용을 위한 기작 연구에 중요함에도, hPSC 세포군의 형성과 조직화를 위한 분자 기작은 잘 알려져있지 않다.

[0005] 본 발명자들은 분리된 단일세포 hESC를 효과적으로 생존시켜 세포군으로 형성하기 위한 요구 조건에 대하여 연구한 결과, hPSC 세포군 형성, 및 다능성 세포군의 형태와 조직화의 유지가 G_i-결합된 GPCR 신호전달을 통해 조절된다는 것을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 주된 목적은, 분리된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell) 단일세포를 준비하는 단계; 및 상기 인간 다능성 줄기세포의 G_i-결합된 GPCR 신호전달을 저해하여 인간 다능성 줄기세포의 세포군형성 능력을 증진시키는 단계를 포함하는 인간 다능성 줄기세포 단일세포의 계대배양 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은, 분리된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell) 단일세포를 준비하는 단계; 및 상기 인간 다능성 줄기세포 G_i-결합된 GPCR 신호전달을 저해하여 인간 다능성 줄기세포의 세포군형성 능력을 증진시키는 단계를 포함하는 인간 다능성 줄기세포 세포군 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 제조된 인간 다능성 줄기세포 세포군에 관심 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 인간 다능성 줄기세포 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 하나의 실시 양태로서, 본 발명은 분리된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell) 단일세포를 준비하는 단계; 및 상기 인간 다능성 줄기세포의 G_i-결합된 GPCR 신호전달을 저해하여 인간 다능성 줄기세포의 세포군형성 능력을 증진시키는 단계를 포함하는 인간 다능성 줄기세포 단일세포의 계대배양 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 '다능성 줄기세포'는 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 다능성(多能性, pluripotent)이거나 전능성(全能性, totipotent)이 있는 자가재생산능(self-renewal)을 갖는 줄기세포를 말하며, 배아줄기세포 또는 유도 다능성 줄기세포를 포함할 수 있다. '배아줄기세포(ESC)'는 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 내세포괴(inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것으로서, 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 다능성(多能性, pluripotent)이거나 전능성(全能性, totipotent)이 있는 자가재생산능(self-renewal)을 갖는다. 넓은 의미로는 배아줄기세포로부터 유래한 배아체(embryoid bodies)도 포함한다. '유도 다능성 줄기세포'는 분화된 세포들로부터 인위적인 역분화 과정을 통해 다능성 분화능을 가지도록 유도된 세포들을 일컫는 말로서 역분화줄기세포(iPSC: induced pluripotent stem cells)이라고도 한다. 인위적인 역분화 과정은 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 이용한 바이러스-매개 또는 비바이러스성 벡터 이용, 단백질 및 세포 추출물 등을 이용하는 비바이러스-매개 역분화 인자의 도입에 의해 수행되거나, 줄기 세포 추출물, 화합물 등에 의한 역분화 과정을 포함한다. 유도 다능성 줄기세포는 배아줄기세포와 거의 같은 특성을 가지며, 구체적으로는 비슷한 세포 모양을 보여주며, 유전자, 단백질 발현 패턴이 유사하며, in vitro 및 in vivo에서 전분화능을 가지며, 테라토마(teratoma)를 형성하고, 생쥐의 배반포(blastocyst)에 삽입시켰을 때, 키메라(chimera) 생쥐를 형성하고, 유전자의 생식선 전이(germline transmission)가 가능하다.

[0011] 인간 다능성 줄기세포(hPSC)는 세포군의 형태로 존재함으로써 다능성을 유지하며 생존할 수 있고, 세포가 분리되면 쉽게 세포자살과정으로 들어가고, 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포는 일반적으로 1% 이하의 클로닝 효율을 나타낸다. 따라서, 분리된 hPSC 단일세포의 배양은 mESC 배양과 비교할 때 매우 어렵다. 본 발명은 이렇듯 배양이 어려운 분리된 hPSC 단일세포를 효과적으로 세포군으로 제조하여 다능성이 유지된 상태로 성공적으로

계대 배양하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

- [0012] 상기 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포는 인간 다능성 줄기세포 세포군으로부터 효소적 분리한 것일 수 있다. 본 발명에서 '효소적 분리'는 효소 처리를 통하여 세포 덩어리를 분리 하는 것을 의미하며, 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 트립신-EDTA 또는 TrypLE 를 처리하여 분리하여 계대 배양할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 구체적 실시예에서, hPSC 세포군을 분리하여 인간 다능성 줄기세포 단일세포를 준비하기 위하여, hPSC 세포군을 Dispase (Invitrogen)를 이용하여 일차로 영양공급세포 층에서 분리하고, 떼어낸 hPSC 세포군을 TrypLE-Select (Invitrogen)와 같은 효소에 37°C에서 5분간 배양하였다. 분리된 단일세포는 영양공급세포 없이 배양하였다.
- [0014] 본 발명에서 '영양공급세포(feeder cell)'는, 줄기세포의 미분화를 돕는 다른 세포를 말하며, 주로 마우스배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast)나 인간동피섬유아세포(human foreskin fibroblast)를 포함한다. 그러나, 영양공급세포를 사용할 경우, 순수한 미분화 줄기세포를 얻는 것에 방해가 될 수 있으며, 영양공급세포에 의한 바이러스 등의 감염 위험이 있고, 줄기세포의 제한된 계대능으로 인하여 장기간 줄기세포의 성장력을 저해할 수 있다는 단점이 있다. 이에 본 발명은 영양공급세포가 없는 조건에서의 다능성 줄기 세포 세포군의 제조 방법을 개발하였으며, '영양공급세포가 없는 조건'은 라미닌(laminin), 매트릭젤(matrigel)과 같은 매트릭스를 사용하고, bFGF 등의 성장 인자 (growth factor)의 조합을 이용하거나 (STEM CELLS 23:315, 2005), bFGF와 BMP 신호전달과정의 억제제인 노긴 (noggin)을 배양 배지에 첨가(Nat Methods 2:185, 2005)하는 조건 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 효소적으로 분리된 hPSC 단일세포의 영양공급세포 없는 조건 하에서의 생존 특성을 확인하기 위하여, 본 발명의 구체적 실시예에서는, hESC 세포주 및 hiPSC 세포주를 효소 처리로 단일세포로 분리하고, 영양공급세포 없이 배양하며, 라이브 세포 이미징 도구를 이용하여 그 효과를 관찰하였다. 단일세포로 분리된 hESC 세포 및 hiPSC 세포는 부착과 집합을 시작하지 못하고, 48시간 내에 세포자살단계로 들어갔으며, 세포군을 거의 형성하지 못하였다 (도 1B, 1C).
- [0016] 그러나, 로 연관 키나제(Rho-associated kinase, ROCK) 저해제인 Y27632 ((1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamide)를 처리해준 경우에는, 영양공급세포 없이 배양하는 경우에도, hESC의 경우, 분주 후 18시간 이후에 부착과 집합을 시작하고(도 1D), 결국 매우 많은 세포군을 형성하였으며(도 1E), 거의 모든 세포들이 알카라인 포스파타제 염색에서 양성반응을 보여 다능성을 유지한다는 것을 확인하였다 (도 1F, 1G, 1H).
- [0017] 즉, 효소적으로 분리된 단일세포 hPSC는 단독으로는 생존하지 못하며, 다능성을 가지는 세포군을 형성하여 생존하기 위해서는 이웃세포들과의 접촉이 필요하다는 것을 확인하였다. 구체적으로는, 이웃세포들과 집합체(10개 가량의 단일세포로 구성)를 이룬 후 비로소 세포분열을 시작하여 세포군을 형성할 수 있다는 것을 확인하였다. 다만, Y27632는 분리된 특정 iPSC (도 1I) 세포 또는 후기 계대 hESC에서는 효과를 나타내지 않아 한계가 있었다.
- [0018] hPSC의 세포군 형성은, 세포가 부착, 이동, 집합, 조직화의 4단계를 거쳐 세포군을 형성하는데, 본 발명의 구체적 실시예에서, Y27632가 존재하는 배지에서, 세포 투과가 가능한 BAPTA 유도체인 BAPTA-AM을 이용하여 세포내 칼슘 킬레이팅의 효과를 실험한 결과, 칼슘 킬레이터를 처리하지 않은 군에서만 많은 세포군이 형성되었고(도 2A), 칼슘 킬레이터를 처리한 군에서는 hPSC를 영양공급세포가 없는 조건에서 배양용기에 부착조차 하지 않았다(도 2B). 단일세포 hPSC를 분주하고 hPSC가 부착한 후에도 칼슘 킬레이터를 처리하면 세포이동 및 세포군 형성을 개시하지 못하였다(도 2C). ROCK 저해제를 처리했음에도 불구하고 세포내 칼슘의 킬레이팅이 hPSC 부착을 저해하고 또한 부착된 단일세포 hPSC의 이동을 막는다는 것은 세포 내 칼슘 농도 증가가 hPSC의 부착, 이동을 통한 세포군 형성에 필수적임을 암시한다.
- [0019] 상기와 같이 분리된 hPSCs 세포에서 세포내 칼슘이 세포군 형성의 개시에 중요한 역할을 하는 것을 확인한 이후, 본 발명자들은 세포내 칼슘의 이동에 연관되는 신호전달경로를 규명한 결과, 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달 경로가 중요함을 확인하였고, 나아가 인간 다능성 줄기세포의 G_i-결합된 GPCR 신호전달을 저해하면 인간 다능성 줄기세포의 세포군형성 능력이 증진됨을 밝혔다.
- [0020] 상기 G_i-결합된 GPCR 신호전달의 저해는 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포, 또는 상기 단일세포끼리 집합,

부착하여 생성된 집합체에서 수행될 수 있다. 상기 G_i단백질 결합된 수용체(G_iPCR)매개 신호전달은 PLCβ-매개 신호전달이 아니며, 더욱 바람직하게는, PKC 매개 신호전달일 수 있다.

[0021] 본 발명의 구체적 실시예에서는, G_i-결합된 GPCR 신호전달의 저해제는 갈슘 길레이션의 존재하에서도 세포군의 조직화를 강화시킨다는 것, 및 G_i-결합된 GPCR 매개 신호전달 경로의 이펙터로 알려진 PLC의 활성화제인 2,4,6-트리메틸-N-[3-(트리플루오로메틸)페닐] 벤젠설포아미드(m-3M3FBS)를 hESC 및 hiPSC에 처리한 결과 hESC (도 5C) 및 hiPSC (도 5D)에서 세포내 갈슘 농도가 증가되지 않는다는 것을 확인한 바, 상기 G_i단백질 결합된 수용체(G_iPCR)매개 신호전달이 PLCβ-매개 신호전달이 아님을 확인하였다. G_i-결합된 GPCR 신호전달의 또다른 다운스트림 신호전달 매개체인 PKC 발현 정도를 측정된 결과(도 5G), HFF-1세포와는 달리, hESC에서 PKC γ , 신규한 PKC, 그리고 비정형적 PKC들이 발현된 것을 확인하였다.

[0022] 본 발명에서는, 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포, 또는 상기 단일세포끼리 집합, 부착하여 생성된 집합체에서, 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달을 저해하면, 분리된 인간 다능성 줄기세포가 더욱 농축, 밀집, 압축된 세포군을 형성할 수 있고, 다능성 세포군 상태로 계속적이고 안정적으로 유지할 수 있다는 것을 밝혔다. 미분화된 hPSC 세포군은 평편한 단일층을 가지는 퍼진 원형의 형태를 가지고, hPSC 배양에서 이러한 형태가 사라지면 일반적으로 다능성을 잃어버리는 것으로 알려져 왔으며, 외향적(outward) 증식을 할 수 없어 세포군의 온전성(integrity)을 유지할 수 없다고 알려져 왔다. 그러나, 본 발명에서는 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달을 저해하면, 분리된 인간 다능성 줄기세포가 크고 느슨한 세포 집합체를 형성한 후, 조직화 과정을 거쳐 더욱 농축, 밀집, 압축된 다층 형태의 세포군을 형성할 수 있고, 이러한 농축, 밀집, 압축된 다층 형태의 세포군은 다능성을 여전히 유지하며, 영양공급세포와 같이 배양한 미분화된 hPSC로부터 형성된 세포군과 유사한 형태의 촘촘한 세포군의 형성을 가능하게 한다는 것을 밝혔다. 그 결과, 이러한 세포군은 효소적으로 분리, 현탁, 계대 배양하는 등 비선호적인 배양 조건 하에서도 안정적으로 유지, 성장할 수 있어 hPSC 단일세포 클로닝 효율을 개선할 수 있다는 것을 밝혔다.

[0023] 본 발명에서 농축, 밀집 또는 압축된 다층 구조의 세포군은, 시계당 많은 핵의 수, 적은 핵의 영역, 높은 핵:세포질의 비율 등의 특성으로 확인할 수 있으며, 본 발명의 구체적 실시예에서는, 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달을 저해한 결과, 시계당 가장 많은 핵의 수(도 4G), 가장 적은 핵의 영역(도 4H), 가장 높은 핵:세포질의 비율(도 4I)을 나타내는 세포군이 형성되었음을 확인하였다.

[0024] 또한, 본 발명의 구체적 실시예에서는, 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달을 저해한 경우, 5 계대 후에도 세포군을 형성하는 능력이 유지되고(도 6B), 다능성 표지(Oct-4 및 E-cadherin)에 대하여 양성을 유지하였으며(도 3H), 핵의 분포가 조밀하게 조직화되는 모습을 확인하였다. 더욱이, 계속적으로 효소적 분리하여 계대 배양했음에도 불구하고 대조군에 비하여 거의 손실 없이 안정적인 AP 양성 세포군을 형성하였음을 확인하였다(도 6C).

[0025] 본 발명에서 '계대 배양'은, 세포증식 방법의 하나로 세포의 대를 이어가기 위해 5-7일마다 주기적으로 새로운 배지에 이식시키는 것을 의미하고, 구체적으로 '계대(passage)'는 배양 용기에서 초기 종배양부터 동일한 배양 용기에 세포가 왕성하게 자라는 시기(confluence)까지의 다능성줄기세포의 성장을 의미한다.

[0026] 상기 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달 저해는 백일해 독소 (pertussis toxin, PTX)를 처리하여 수행할 수 있다. 백일해 독소는 *Bordetella pertussis*에서 유래한 독소로서, 비가역적이며 특이적으로 G_i 신호전달을 조절할 수 있다. PTX는 50 ng/ml 내지 400 ng/ml 농도로 처리할 수 있으며, 바람직하게는 최종농도 200 ng/ml로 처리할 수 있다.

[0027] 상기와 같이 백일해 독소를 처리하여 세포 내 G_i단백질 결합된 수용체(GPCR) 매개 신호전달 저해함으로써, 다능성을 유지하고, 계속적으로 효소적 분리하여 계대 배양하여도 안정적인 다능성 줄기세포 세포군을 형성할 수 있으므로, 본 발명은 다른 양태로서, 백일해 독소를 포함하는 인간 다능성 줄기세포 단일세포 계대배양용 배지 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 추가적으로 로 연관 키나제(Rho-associated kinase, ROCK) 저해제를 더 포함할 수 있으며, 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 또다른 양태는 분리된 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell) 단일세포를 준비하는 단계; 및 상기 인간 다능성 줄기세포 G_i-결합된 GPCR 신호전달을 저해하여 인간 다능성 줄기세포의 세포군형성 능

력을 증진시키는 단계를 포함하는 인간 다능성 줄기세포 세포군 제조 방법을 제공한다. 상기 제조된 세포군은 다능성을 유지하고, 계속적으로 효소적 분리하여 계대 배양하여도 안정적인 다능성 줄기세포 세포군을 형성할 수 있으므로, 이로부터 클론 분리된 hPSC를 이용하여 유전자 도입, 분화 유도 등의 후속 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또 다른 양태로서, 상기 제조된 인간 다능성 줄기세포 세포군에 관심 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 형질전환 인간 다능성 줄기세포 제조 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명에서 '형질전환'은 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질을 변화시키는 것을 의미한다. 형질전환시키는 방법으로는 종래 알려진 다양한 방법, 예를 들면, 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 정자를 이용하는 방법(sperm-mediated gene transfer), 바이러스 감염법(viral infection), 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존(trnasposon)을 이용한 기법 중에서 적절하게 선택하여 적용할 수 있다. 바람직하게는 렌티바이러스 벡터를 이용할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 '렌티바이러스 벡터'는 관심 유전자를 발현하도록 변형시킨 레트로바이러스를 지칭한다. 레트로바이러스 벡터를 사용하여 바이러스 감염 과정을 활용함으로써 유전자를 숙주 세포에 효율적으로 전달할 수 있다. 레트로바이러스 게놈으로 클로닝된 외래 또는 이종 유전자는 레트로바이러스에 의한 감염에 감수성이 있는 숙주 세포에 효율적으로 전달될 수 있다. 공지된 유전자 조작을 통해, 레트로바이러스 게놈의 복제 능력을 파괴할 수 있다. 생성된 복제-결핍 벡터를 사용하여 새로운 유전 물질을 세포에 도입할 수 있으나 이들은 복제될 수는 없다. 헬퍼 바이러스 또는 패키징 세포주를 사용하여 벡터 입자 조립 및 세포로부터의 방출이 가능해질 수 있다. 본 발명의 레트로바이러스 벡터는 비-분열된 세포들 내로 융합될 수 있는 렌티비리다에 패밀리(Lentiviridae family, 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 원숭이 면역결핍 바이러스, 말 감염성 빈혈 바이러스, 및 염소의 관절염-뇌염 바이러스)에 의해 유래된 레트로바이러스성 벡터를 의미한다.

[0032] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 상기 효소적으로 분리된 hPSC로부터 형성한 다능성 줄기세포 세포군에 인슐린 발현 리포터 렌티바이러스 벡터를 도입한 결과, 제1계대배양시 추가한 인슐린 발현 리포터 렌티바이러스 벡터에 의해 제2계대배양시 배양액에 추가한 항생제에 내성을 나타냄으로써, 빠르고 안정적으로 형질전환 세포주가 확립됨을 확인하였다(도 8). 이는, 기존에 hESC에 대한 유전자 도입에 있어서, 항생제 내성을 지닌 영양공급 세포에 의한 문제, 긴 형질전환 여부 확인 시간(selection 시간)에 의한 문제를 본 발명의 방법에 의해 해결할 수 있음을 나타낸다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 방법을 이용하면, 영양공급세포가 없는 조건에서, 분리된 인간 다능성 줄기세포 단일세포의 세포 부착 및 세포군 형성 개시를 촉진할 수 있고, 나아가 분리된 인간 다능성 줄기세포를 더욱 농축, 밀집, 압축된 세포군으로 형성하여, 다능성 세포군 상태로 계속적이고 안정적으로 유지할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법을 이용하면, 배양이 어려운 분리된 hPSC를 효과적으로 세포군으로 제조하여 다능성이 유지된 상태로 성공적으로 계대 배양할 수 있고, 이를 이용하여 클론 분리된 hPSC를 이용하여 유전자 도입, 분화 유도 등의 후속 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 ROCK 저해제 Y27632를 효소적으로 분리한 hPSC에 처리한 결과를 나타낸 것이다. (A-C) 분주 18시간 (A) 후 및 72시간 (B, C) 후, 분리한 hPSC세포를 Y27632 처리 없이(NT) 영양공급세포 없는 조건 하에서 배양한 결과이다. (D-F) 분주 18시간 (D)후 및 72시간 (E, F) 후, 10 μM Y27632처리 후 영양공급세포 없는 조건 하에서 배양한 결과이다. (C, F) Matrigel로 코팅된 배양용기에 분주 72시간 후 분리된 hPSC를 알카라인 포스파타제(AP)로 염색한 결과이다. Y27632 없을 경우는 소수의 세포군이 형성되나 (C), Y27632 처리했을 경우는 세포군 형성이 확연히 증가하였다 (F) (black bars = 200 μm). (G-I) H9 hESC(G), CHA15 hESC (H), hiPSC (I)를 다양한 밀도로 초기분주 했을 경우 NT와 Y27632 처리한 군에서의 AP 양성반응을 보이는 세포군의 숫자를 비교한 것이다 (* P < 0.05, *** P < 0.001, versus NT; n = 12).

도 2는 Y27632 처리한 분리된 hPSC 세포에 세포내 칼슘 킬레이팅 처리한 결과를 나타낸 것이다. (A-C) 분리된

hPSC 세포에 20 μ M BAPTA-AM를 1시간 처리하여 세포내 칼슘 킬레이팅하면 세포군 형성은 완전히 저해된다. 조건은 다음과 같다: (A) Y27632 를 분주 전에 전처리, (B) Y27632와 BAPTA-AM를 분주 전에 전처리 (C) Y27632를 분주전에 전 처리하고 BAPTA-AM를 분리된 hPSC를 분주 후 18시간 후에 부착된 세포에 처리 (black bars = 200). (D) 다양한 처리군과 세포주에서의 AP 양성반응을 보이는 세포군의 비교 (***) P < 0.001 versus NT; n = 12).

도 3은 PTX 처리로 G_i신호전달을 저해한 후 분리된 hPSC 세포의 세포군 형성의 조직화 결과를 나타낸 것이다. (A-F) 분리된 hPSC 세포에 Y27632(A, B); Y27632와 PTX (C, D); 또는 Y27632와 CTX (E, F) 처리하여 분주 후 72시간에의 세포군 형성의 형태를 나타낸다. PTX 처리는 분리된 hPSC 세포의 응축된 세포군 형성을 유도한다. (black bars = 200 μ m). (G, H) Y27632 처리한 분리된 hPSC에서 PTX 비처리 (G) 또는 처리 (H) 하여 세포군 형성 후 다능성 표지로 면역염색을 수행한 결과이다. PTX 처리는 다능성에 영향을 미치지 않으면서 세포군의 응축을 야기한다 (DAPI - 파란색, Oct-4 - 녹색, 및 E-cadherin - 빨간색; white scale bars = 50 μ m).

도 4는 PTX 처리 후 분리된 hPSC세포에서 형성된 세포군의 응축된 조직화를 나타낸 도면이다. (A-F) PTX 처리한 다능성 세포군은 대조군과 CTX 처리군과 비교하여, 세포군 조직화를 증가시키는 것이 DAPI 염색으로 밝혀졌다. 분주 후 72시간 후 Y27632(A, B), Y27632와 PTX (C, D), Y27632와 CTX (E, F)를 처리한 후 분리된 hPSC 세포의 세포군의 핵의 분포 (white scale bars = 50 μ m). (G-I) 실험군 간의 핵분포. 측정은 다음과 같다: (G) 시계에서의 핵의 숫자, (H) 핵의 영역, (I) 핵: 세포질의 비율. 오차 막대는 평균의 표준오차를 표현 (***) P < 0.001 versus Ctl; n = 6).

도 5는 hPSC에서 G_i매개된 PLC β 신호전달이 존재하지 않는다는 것을 확인한 결과이다. (A-D) PLC β 를 통한 리간드 유도 칼슘 신호전달체계는 (A) 인간 피부 섬유아세포 (HFF-1)에는 존재하나, (B) 인간 말초혈관 자연 살해 세포(hPB-NK), (C) hESC, (D) hiPSC에는 존재하지 않는다. 500 μ M ATP와 10 μ M meADP를 purinergic G_i-GPCRs을 위한 리간드로 사용하였다. 직접적인 PLC β 활성제로서 50 μ M m-3M3FBS를 사용하였다. 칼슘 로딩의 양성 대조군으로 5 μ M LPC를 사용하였다. (E, F) HFF-1(E) 세포와 hESC (F) 세포에서 PLC β 를 측정하기 위하여 면역염색을 수행한 결과이다 (DAPI - 파란색, PLC β - 녹색). 오른쪽의 이미지는 왼쪽 흰박스로 표시한 부위를 확대한 것이다 (white scale bars = 50 μ m). (G) HFF-1과 hESC 세포에서의 PKC 이소타입의 차등 발현을 나타낸 것이다 ("M" - size marker, "-" - no RT, "+" - GAPDH 양성 대조군).

도 6은 PTX가 분리된 hPSC세포의 영양공급세포 없는 조건 하에서의 배양에서 지속적인 계대배양능을 직접적으로 강화함을 나타내는 결과이다. (A, B) PTX의 비처리 (A) 및 처리 (B) 조건에서, 지속적인 효소적 분리시킨 Y27632 처리 hPSC 세포로부터의 세포군을 면역염색한 결과이다. Oct-4 (녹색)와 E-cadherin (빨간색)로 염색한 이미지를 겹쳐 나타내었다 (white scale bars = 50 μ m). (C) PTX 비처리 (black circle, ●) 또는 PTX 처리 (white circle, ○)조건에서, 다른 계대 수로부터 분리한 Y27632 처리 hPSC 세포의 영양공급세포 없는 조건 하 배양에서 세포군 확장 측정 결과를 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준오차를 표현 (n = 12).

도 7은 분리된 hPSC의 조직화에 의한 세포군의 형성에 대한 도식 표현을 나타낸다. 효소적 분리된 단일세포 hPSC의 생존은 Y27632 처리로 인하여 보장된다. 단일세포 분리된 hPSC 세포는 세포내 칼슘 농도 의존적 방식으로 세포군 형성이 개시된다. 그러나, 단일세포 hPSC 세포는 이동성이 크고, 세포들이 크고 느슨하게 집합하는 형태를 가진다. 이러한 단일세포 hPSC의 이동성을 제한하기 위하여 PTX로 G_i신호전달을 저해하면 세포군 형성과 조직화에 변화가 유도된다.

도 8은 본 발명의 방법에 의해 제조된 인간 다능성 줄기세포 세포군에 렌티바이러스를 이용하여 유전자 도입한 결과이다. 도입된 유전자는 퓨로마이신 선택인자가 추가된 인간 인슐린 프로모터-GFP이다. (A) 본 발명의 계대 배양방법 과정에서 유전자 도입된 hESC (H9-Insulin^P)가 퓨로마이신 처리된 배지에서 항생제 저항을 나타냄으로써 생존함과 동시에 세포군을 형성하게된다. (B) 대조군(H9 hESCs)에 대하여, 유전자 도입된 H9-Insulin^P를 genomic DNA PCR 한 결과, 도입된 GFP를 가지고 있음을 확인하였다. (C) H9-Insulin^P를 자연 분화시킨 각각의 군에서 RT-PCR을 통해 GFP가 발현됨을 확인하였다. (D) H9-Insulin^P를 배상체로 분화시켜 GFP의 발현을 형광현미경으로 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일

[0035]

본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0036] **재료 및 방법**
- [0037] **hPSC의 유지를 위한 배양**
- [0038] 두 개의 미분화 hESC lines (CHA15 and H9)을 전술한 바와 같이 배양하였다 [36]. 인간 iPSC 세포주 SC101A-1 (System Biosciences, Mountain View, CA, USA)는 제조업체의 방법에 따라 배양하였다. 간단히 설명하면, 미분화된 hPSC 세포를 분열이 비활성화된 MEF 세포 (MMC 방법) 위에서 20% 혈청 대체물(Invitrogen), 및 1 mM L-글루타민 (Invitrogen), 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Invitrogen), 1% 비필수아미노산(NEAA, Invitrogen), 0.1 mM 베타-머캅토에탄올(Invitrogen), 4 ng/ml (hESC 용) 혹은 10 ng/ml (hiPSC 용)의 기본 섬유아세포 성장인자 (bFGF; Invitrogen)를 포함하는 기본 hPSC 배양액으로 보충된 녀아웃 DMEM/F-12 (1:1; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 에서 배양하였다. 배양액은 매 24시간마다 교환해주었으며 hPSC은 매 5-7일마다 해부 피펫을 이용하여 새로운 영양공급세포로 옮겨주었다..
- [0039] **효소적으로 분리한 hPSC의 영양공급세포 없는 조건에서의 배양**
- [0040] 영양공급세포가 없는 조건에서의 hESC 배양은 마우스 Engelbreth-Holm-Swarm 육종에서 추출한 세포막 일종인 BD Matrigel™ hESC-qualifiedmatrix(BDBiosciences, Bedford, MA, USA)상에서 수행하였다. hESC의 배양에 앞서, 배양 접시는 DMEM/F-12 (Invitrogen)에 희석된 BD Matrigel™ hESC-qualifiedmatrix로 코팅하였다. hPSC 세포군을 단 세포 hPSC로 분리하기 위하여, 영양공급세포 층으로부터 세포를 떼어내기 전에 ROCK 저해제 Y27632 (Tocris, Ellisville, MO, USA)를 배양액에 10 μM 농도로 1시간 동안 추가하였다. hPSC 는 Dispase (Invitrogen)를 이용하여 일차로 영양공급세포 층에서 분리하고, 떼어낸 hPSC 세포군을 PBS로 세척한 후, TrypLE-Select (Invitrogen)에 37°C에서 5분간 배양하였다. 분리된 단일세포는 BD Matrigel™ hESC-qualifiedmatrix로 코팅된 배양접시에 접종하고 배양하였다. 분리된 hPSC 세포를 1 mM L-글루타민, 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Invitrogen), 20% 녀아웃 혈청 대체물 배지 (Invitrogen), 0.1 mM NEAA (Invitrogen), 0.1 mM 베타-머캅토에탄올(Invitrogen), 및 10 ng/ml bFGF (Invitrogen)로 보충된 녀아웃 DMEM/F-12 (Invitrogen)에서 배양하였다.
- [0041] **독소 처리**
- [0042] *Bordetella pertussis*에서 유래한 PTX (Tocris)를 2.5 mg/ml 소 혈청 알부민(BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 물에 추가하여 50 mg/ml의 농도의 PTX 스탁 용액을 제조하였다. *Vibrio cholera*에서 유래한 CTX (Sigma)를 10 mg/ml 의 농도의 CTX 스탁 수용액을 준비하였다. 인간 PSC을 PTX (최종농도 200 ng/ml) 혹은 CTX (최종농도 10 μg/ml)로 2시간 동안 hPSC 배양액에서 전 처리하였다. 대조군은 독소 용액 대신에 2.5 mg/ml의 BSA를 포함하는 물을 사용하는 것을 제외하고는 같은 방식으로 처리하였다. 분리한 hPSC의 영양공급세포 없는 배양물에 새 배양액을 추가하여 세포군 형성 분석 내내 동일한 배양 조건 하에서 유지시켰다.
- [0043] **시약 및 세포 출처**
- [0044] 2-메틸티오아데노신 다이포스페이트 트리소듐 염(meADP), 아데노신 5'-트리포스페이트 다이소듐 염(ATP), 및 2,4,6-트리메틸-N-[3-(트리플루오로메틸)페닐] 벤젠설폰아미드(m-3M3FBS)들은 Tocris사로부터 구입하였고 1-올레오일-2-히드록시-sn-글리세로-3-포스포콜린(LPC)는 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, Alabama, USA)사에서 구입하였다.
- [0045] 정상 인간 피부 섬유아세포에서 유래한 HFF-1 세포주(SCRC-1041™)는 ATCC ()에서 구입하였다. 말초 혈액은 건강한 기증자로부터 모았으며, 인간 말초 단핵세포는 림프구 분리법을 이용하여 분리하였다. 간단하게 설명하면, 말단 혈액 NK 세포를 혈액 NK 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 말단 단핵 세포에서 분리하였다.

[0046] **라이브 비디오 이미징**

[0047] hPSC를 배양하는 동안 라이브 비디오 이미징을 현미경을 위한 Tokai Hit 배양 시스템을 이용하여 수행하였다 (Tokai Hit Co., Ltd., Shizuoka-ken, Japan). 영상은 Nikon ECLIPSE TS 100 현미경 (Nikon, Chiyoda-ku, Japan)을 이용하여 기록하였고 *i*-solution software (iMT technology Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 분석하였다. 라이브 이미징 영상 파일은 72시간동안 매 분 캡처된 이미지를 시간 순으로 배열하여 제작하였다.

[0048] **알카라인 포스파타제 (AP) 염색 (다능성 test)**

[0049] AP의 분포를 조사하기 위해, hPSC 세포군을 4% 파라포름알데히드로 5분간 상온에서 고정한 후 PBS로 세 번 세척하였다. 세척 후, AP를 ES Cell Characterization Kit (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 검출하였다. 이미지들은 도립 형광 현미경(ECLIPSE TE2000, Nikon Instruments Inc., NY, USA)을 이용하여 분석하였다.

[0050] **면역세포화학**

[0051] 세포를 4% 파라포름알데히드로 20분간 고정하고 0.1% Triton X-100 를 포함한 PBS (Sigma) 용액에서 5분간 투과시켰다. 5% 정상 염소 혈청으로 30분간 처리한 후, 세포를 다능성 마커 중 하나인 Oct-4 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), E-cadherin (BD Biosciences), 및 PLC β (Santa Cruz)에 대한 1차 항체로 18시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 세포를 PBS로 세 번 세척하고 Alexa Fluor 488- 또는 594-컨쥬게이트된 2차 항체 (Invitrogen)로 1시간 동안 배양하였다. Dulbecco's modified PBS로 3번 세척 후, DAPI (Invitrogen) 염색을 10분간 수행하였다. 시료를 LSM 510 META 공초점 현미경 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)를 이용하여 즉시 이미지화 하였다. 이미지 분석은 ImageJ software ()를 이용하였다.

[0052] **세포내 칼슘 측정**

[0053] 세포내 칼슘 농도는 Grynkiewicz 방법의 fura-2/AM을 이용하여 측정하였다. 간단하게 설명하면, 준비된 세포를 3 μ M fura-2/AM와 함께 계속적으로 교반하며 무혈청 녀아웃 DMEM/F12 배양액에서 37 $^{\circ}$ C에서 50분간 배양하였다. 각각의 실험을 위하여 세포(2×10^6)를 Locke's 용액(154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.2 mM MgCl $_2$, 5mM HEPES pH7.3, 10mM glucose, 2.2mM CaCl $_2$, 및 0.2 mM EGTA) 내에 분배하였다. 형광을 340 및 380 nm 여기 파장을 이용하여 500 nm 에서 측정하였다.

[0054] **총 RNA 추출 및 역전사 PCR (RT-PCR)**

[0055] 총 RNA 추출을 TRIzol (Invitrogen)을 이용하여 제조업체의 방법에 따라 수행하였다. 간단하게 설명하면, 총 RNA를 클로로포름으로 추출하고 80% (v/v) 이소프로판올로 침전시켰다. 상층액을 제거한 후 RNA 펠렛을 75% (v/v) 에탄올로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 RNase-free DEPC water (Bioneer, Daejeon, South Korea)로 녹였다. 표본을 DNase (Invitrogen)로 처리 후 RNA 농도를 NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE)를 이용하여 측정하였다. 1 μ g의 총 RNA를 주형으로 하고 AccuPowerTM RT PreMix(Bioneer)를 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. cDNA를 제작한 후 주형으로 하여 PCR 증폭을 AccuPowerTM Hotstart PCR premix(Bioneer)을 이용하여 제조업체의 방법에 따라 수행하였다; 이러한 PKC 이소타입 증폭을 위한 PCR 프라이머의 서열은 하기 표와 같다. PCR은 1 μ l의 cDNA를 주형으로 하여 수행하였고 최적 결합온도에서 35회를 순환하여 증폭하였다. 표본을 400 ng/ml 에티디움 브로마이드를 포함하는 1% (w/v) 아가로스 젤에서 분리한 후 UV transilluminator를 이용하여 가시화하였다.

표 1

markers	assession number	sense	antisense	bp
PKC α	NM_002737.2	CCTATGGCGTCCTGTTGTATG	GGCTGTCCTCGTGTGAAGAAC	337
PKC β 1	NM_212535.2	GGAAGTCCGTGGATTGGTGGGC	TCAGTGGGGGT CAGTTCCACAG	379
PKC β 2	NM_002738.6	CCAGACTACATCGCCCCGA	TTAGGACTGGTGGATGGCGGG	409
PKC γ	NM_002739.3	CCTGCCTTTGGCTCTTCTCCCC	TTTCTGCAAAACAGGGGCCGGG	297
PKC δ	NM_006254.3	GCAGCGGGAGCCAGGACTAA	ACCGACACACCCACGGTCAC	334
PKC ϵ	NM_005400.2	GTCCACAAGCGGTGCCACGA	CAGAAGCAGGCTGCGGGGAC	382
PKC η	NM_006255.3	CCAGGAAGCGCAAAGGGCT	AGGGGCCACGTTGCTTGAC	416
PKC θ	NM_006257.3	TCGCCTTTCCACGGGCAGGA	TCGGCAAATGACAGCCGGGG	308
PKC ζ	NM_002744.4	GTCGGTCTGAGCGCTGCCTT	TGCTGCTGGTGCAGACGACAC	276
PKC ι	NM_002740.5	CCATGTCCCACACGGTCGCA	TTCTCCAGCGGCGTGCACCT	375
PKC μ	NM_002742.2	ACGCTGCGGAAACGGCACTA	GCCACATCTGCACCAACGCC	278

[0056]

[0057]

렌티바이러스를 통한 유전자 도입

[0058]

효소적으로 분리한 hPSC의 영양공급세포 없는 조건에서의 배양 1일차에 인슐린 프로모터-GFP가 도입된 리포터 렌티바이러스(SBI System Bioscience)를 처리하여 18 h 동안 처리하였다. 제1계대배양시 유전자도입을 하고, 제2계대배양시 6 ng/ml의 퓨로마이신을 배양배지에 추가하여 selection 하였다.

[0059]

통계분석

[0060]

모든 실험은 최소한 3회 이상 수행한 후 결과가 반복됨을 확인하였다. 정량 데이터는 평균값 \pm 표준편차 (SE M)로 표현하였다. Student's paired t-tests 또는 one-way ANOVAs로 각각의 반응 변수의 통계학적 유의성을 분석하였다. 각각 그룹간의 비교는 SPSS program 상의 Tukey's method 이용하는 post-hoc testing에 의하여 수행하였다 (version 17, Chicago, IL, USA). P 값이 0.05 보다 작을 경우에 통계학적으로 유의하다고 고려하였다. 얻어진 데이터의 히스토그램은 GraphPad Prism program을 이용하여 나타내었다(version 5, San Diego, CA, USA).

[0061]

실시예 1: 효소적으로 분리한 인간 다능성 줄기 세포에의 ROCK 저해제 처리

[0062]

영양공급세포 없는 조건 하에서의 효소적으로 분리한 hPSC 생존에 대한 ROCK 저해제 Y27632의 효과를 확인하기 위해, 두 개의 hESC (CHA15 및 H9) 세포주와 상업적으로 구입가능한 hiPSC 세포주에서 72시간 동안 라이브 세포 이미징 도구를 이용하여 그 효과를 관찰하였다. 세포들은 2시간동안 10 mM Y27632 (일반적으로 사용하는 농도)를 전처리한 군과 비처리군으로 구분하였고, hPSC은 TrypLE 효소 처리로 단일세포로 분리하였다. 분리된 hPSC를 Matrigel로 코팅된 배양용기에 분주 후 Y27632가 있거나 없는 배양액에서 유지하였다 (도 1). Y27632를 처리한 분리된 hPSC는 분주 후 18시간 이후에 부착과 집합을 시작하는 것이 관찰된 것에 반해 (도 1D), Y27632를 처리하지 않은 세포들은 이러한 과정에 들어가지 못하였으며 48시간내에 세포자살단계로 들어갔다. 72시간까지, Y27632 처리를 하지 않은 분리된 hESC는 세포군을 거의 형성하지 못하였다 (도 1B, 1C). 그에 반해, Y27632 처리한 hESC는 매우 많은 세포군을 형성하였고 (도 1E), 거의 모든 세포들이 알카라인 포스파타제 염색에서 양성 반응을 보였다 (ALP; 도 1F). Y27632 처리의 효과는 2개의 hESC 세포주 모두에서 관찰되었으나 (도 1G, 1H), 분리된 iPSC (도 1I) 세포 또는 후기 계대 hESC에서는 거의 효과를 보이지 못하였다.

[0063]

라이브 이미지 분석으로 증명되었듯이, 단일세포 hPSC는 세포군 형성을 위해 부착, 집합, 세포군 형성의 3단계를 거치며, 대부분의 분리된 세포들은 분주 후 48시간이 넘게 세포 분열 없이 이웃 세포들과 집합된 형태로 남아있었다; hESC는 세포분열 전에 48시간동안 이웃세포들과 활발하게 집합체를 이룬다 (도 1J). 10여개 가량의 단일세포 hESC로 이루어진 이러한 집합체들은 중국에는 세포군을 형성하나 단일세포는 세포군을 형성하지 못하였다. 48시간 후, 집합체를 이룬 세포들은 세포분열을 시작하고 Matrigel로 코팅된 배양접시에서 분주된지 7일 이후에 세포군을 형성한다.

[0064]

이러한 결과들은 효소적으로 분리된 단일 hPSC는 단독으로 생존하지 못하며 다능성을 가지는 세포군을 형성하기

위하여 이웃세포들과의 접촉하여야 한다는 것을 보여준다. 이 모델에서는, ROCK 저해제 Y27632가 hPSC의 생존을 촉진시키고 세포군 형성을 개시할 수 있도록 하였다. 그러나 hiPSC 나 후기 계대 hESC에서와 같이 예외적인 경우도 있으므로 상기 저해제가 세포 생존력을 보장하기 위한 필수 요소는 아니다.

[0065] 실시예 2: 분리된 인간 다능성 줄기 세포에의 세포내 칼슘 농도 조절

[0066] 세포군 형성에서의 역할을 규명하기 위하여, Y27632가 존재하는 배지에서, 세포 투과가 가능한 BAPTA 유도체인 BAPTA-AM을 이용하여 세포내 칼슘 킬레이팅의 효과를 실험하였다 (도 2). Y27632 전처리 2시간 후, BAPTA-AM 처리하거나 (도 2B) 하지 않은 조건에서 (도 2A), 분리된 단일 hPSC를 72시간 동안 분주한 결과, Y27632처리한 군에서만 많은 세포군이 형성되었다 (도 2A). 그러나, BAPTA-AM-전처리한 hPSC는 Matrigel로 코팅된 배양용기에 부착하는데 실패하였다 (도 2B). 더욱이, Y27632 처리된 단일세포를 분주한지 18시간 후에서의 BAPTA-AM 처리의 효과를 시험한 결과, 부착된 hPSC가 세포이동 또는 세포군 형성을 개시하지 못하였다 (도 2C). Y27632처리 전후에 BAPTA-AM처리 효과는 모든 hPSC에서 비슷하게 나타났으며 (도 2D), 이것은 세포내 칼슘이 분리된 hPSC의 세포군 형성의 개시에 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다.

[0067] 실시예 3: 백일해 독소를 이용한 G_i 신호전달 저해

[0068] GPCR 신호전달을 연구하기 위해, 비가역적이며 특이적으로 G_i나 G_s 신호전달을 조절하는 백일해 독소(pertussis toxin; PTX) 혹은 콜레라 독소(cholera toxin; CTX)를 다능성 세포군에 처리한 후 실시간 공초점 현미경을 이용하여 세포군 형성을 관찰하였다. 다능성 hPSC 세포군을 Y27632, 및 PTX 혹은 CTX로 2시간 동안 전처리하고 효소로 분해하였다. 이렇게 분리된 hPSC를 Matrigel로 코팅된 배양용기에 전처리에서 사용된 조건과 동일한 조건 하의 배지에서 유지하였다 (도 3). 48시간후에 PTX-처리된 군은 (도 3C, 3D) 밀집하여 집합되고, 조직화된 형태를 나타내었고, 밖으로 돌출되는 세포가 사라지고, 다른 군과 비교할 때 작은 세포군을 형성하였다 (도 3A-F). CTX-처리된 hPSC 세포군은 항상적으로 활성화된 G_s 신호전달을 나타내었고, 형태는 독소처리에 의해 영향을 받지 않고(도 3E, 3F) Y27632 처리한 대조군과 비슷한 모양을 보였다 (도 3A, 3B). 또한, PTX-처리군은 분주 후 48시간 후에 추가적 재조직화하는 것을 확인하였다. PTX는 다능성 표지인 Oct-4 과 E-cadherin (도 3G (Y27632) 및 3H (PTX 및 Y27632)를 비교)의 발현을 검출하기 위한 면역세포화학 분석 결과에서 확인할 수 있는 바와 같이, 다능성의 유지에는 영향이 없었다.

[0069] 세포군 형성에 대한 PTX의 영향을 측정하기 위해, PTX 처리군의 세포조직화를 관찰하기 위해 DAPI-염색된 핵을 공초점 현미경을 이용하여 이미지 분석을 하였다 (도 4). PTX 처리된 세포군은 (도 4C, 4D) 대조군 (도 4A, 4B)과 CTX 처리군(도 4E, 4F)에 비해 재조직화를 거쳐 훨씬 두껍고 밀집된 경향을 보였다. 또한, PTX 처리군에서 유래한 세포군은 3개 군중에서, 시계당 가장 많은 핵의 수(도 4G), 가장 적은 핵의 영역(도 4H), 가장 높은 핵:세포질의 비율(도 4I)을 나타내었다. 미분화된 hESC과 hiPSC에서도 같은 결과를 얻었다. 따라서, PTX 처리에 의한 G_i 신호전달의 저해는 hPSC 세포군의 형태와 조직화 모두를 변화시키고 그 결과 작고 압축된 세포군을 형성한다.

[0070] 실시예 4: G_i-결합된 GPCR 신호 전달 분석

[0071] 리간드 특이적인 G_i-결합된 GPCR의 활성화가 포스포리파제 Cβ (PLCβ) 및 프로테인 키나제 C (PKC)에 의해 매개되는 세포내 칼슘 농도 증가를 포함한 세포내 신호전달을 개시하는 것으로 알려져 있다. ATP와 ADP는 HFF-1 인간 소포 섬유아세포 같은 섬유아세포에서 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₂, 및 P2Y₁₃ purinergic G_i-결합된 GPCRs의 자극을 통하여 세포내 칼슘 농도를 증가시킬 수 있다(도 5A). 인간 말초 혈액에서 유래한 자연 살해 세포 (hPB-NKs) 같은 몇몇 예외적인 경우, purinergic 수용체가 발현되었음에도 불구하고 리간드가 세포내 칼슘 농도를 증가시키는데 실패하였다 (도 5B). HFF-1s와 hPB-NKs 세포 모두 직접적인 PLC 활성화제인 2,4,6-트리메틸-N-[3-(트리플루오로메틸)페닐] 벤젠설포나미드(m-3M3FBS) 의해서 세포내 칼슘 농도가 크게 증가되었다.

[0072] 그러나, 이러한 리간드들과 PLC 활성화제 모두 hESC (도 5C) 와 hiPSC (도 5D)에서 세포내 칼슘 농도를 증가시키는데는 실패하였다. G_i-결합된 GPCRs의 리간드 중 세포내 칼슘 농도를 증가시킬 수 있는 리간드를 확인하지 못

했다. 비록 hPSC는 m-3M3FBS에 대한 반응은 없었지만 PLCβ는 HFF-1s(도 5E)와 hPSC(도 5F) 모두에서 발현하였다. 이러한 결과들은 hPSC에서 G_i-결합된 GPCR 신호전달이 PLCβ-에 의해 매개되는 세포내 칼슘 이동을 이용하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0073] PTX가 분리된 hPSC에서 세포군 형성의 내재적 메커니즘에 어떻게 영향을 미치는지 알아보기 위해, RT-PCR을 이용하여, G_i-결합된 GPCR 신호전달의 또다른 다운스트림 신호전달 매개체인 다양한 PKC 이소타입의 발현 정도를 측정하였다(도 5G). PKC군은 약 12개의 이소자임으로 구성되어 있으며, 그들의 필요한 2차 전달자에 따라 전형적, 신규한, 그리고 비정형의 3개의 아군으로 구분된다. 흥미롭게도, hESC에서는 PKCγ, 신규한 PKC, 그리고 비정형적 PKCs들이 발현된 것에 비해, HFF-1세포에서는 PKCα, PKCβ1, 비정형적 PKC들이 발현되었다(도 5G). PKC 이소타입의 발현은 Y27632나 PTX의 처리에 영향을 받지 않았다. 요약하자면, PTX 처리가 PLCβ 통한 세포내 칼슘 이동을 야기한다는 증거가 없고, 이는 hPSC 세포군 형성의 주요 추진력은, PKC 이소타입의 차등적 발현과 같은 것임을 암시한다.

[0074] **실시예 5: 백일해 독소 처리에 의한 다능성 세포군 상태의 계속적이고 안정적인 유지**

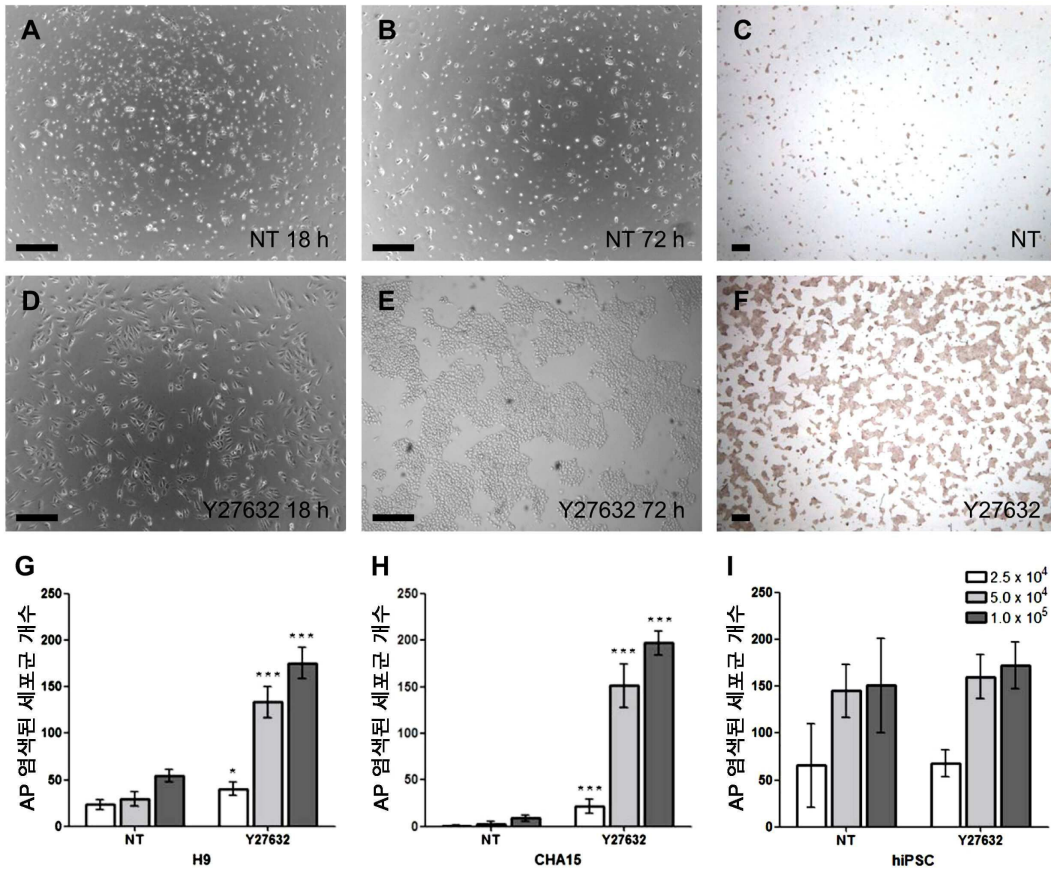
[0075] 효소적으로 분리된 hPSCs에 의해 형성된 다능성 세포군의 안정적인 유지에 대한 PTX의 영향을 실험했다. 5 계대 이상 동안 Y27632 처리한 세포들은 E-cadherin의 발현과 생존능력이 줄어들었으며 3 계대 후에는 세포군의 유지가 어려웠다(Fig. 6A, 6C). Y27632 처리한 군에서 분리된 hPSCs의 세포군 형성능이 급격히 줄어들었다(Fig. 6C). 반면에 PTX와 Y27632로 처리한 군은 5 계대 후에도 세포군을 형성하는 능력이 유지되었다(Fig. 6B). 또한, PTX/Y27632 처리한 군의 hPSC 세포군은 다능성 표지(Oct-4 및 E-cadherin)에 대하여 양성을 유지하였으며, 핵의 분포가 조밀하게 조직화되는 모습을 보여줬다. 계속적으로 효소적 분리하여 계대 배양했음에도 불구하고 PTX/Y27632 처리군은 대조군에 비하여 거의 손실 없이 안정적인 AP 양성 세포군을 형성하였다(Fig. 6C). 이러한 결과들은 PTX가 분리된 hPSC 세포군의 재조직화를 야기할 뿐만 아니라 효소적으로 분리한 영양공급세포가 없는 배양조건에서의 세포군의 계속적이며 안정적인 유지에 도움을 준다는 것을 나타낸다.

[0076] **실시예 6: 백일해 독소 처리에 의한 빠르고 안정적인 다능성 줄기세포 세포군에의 유전자 도입**

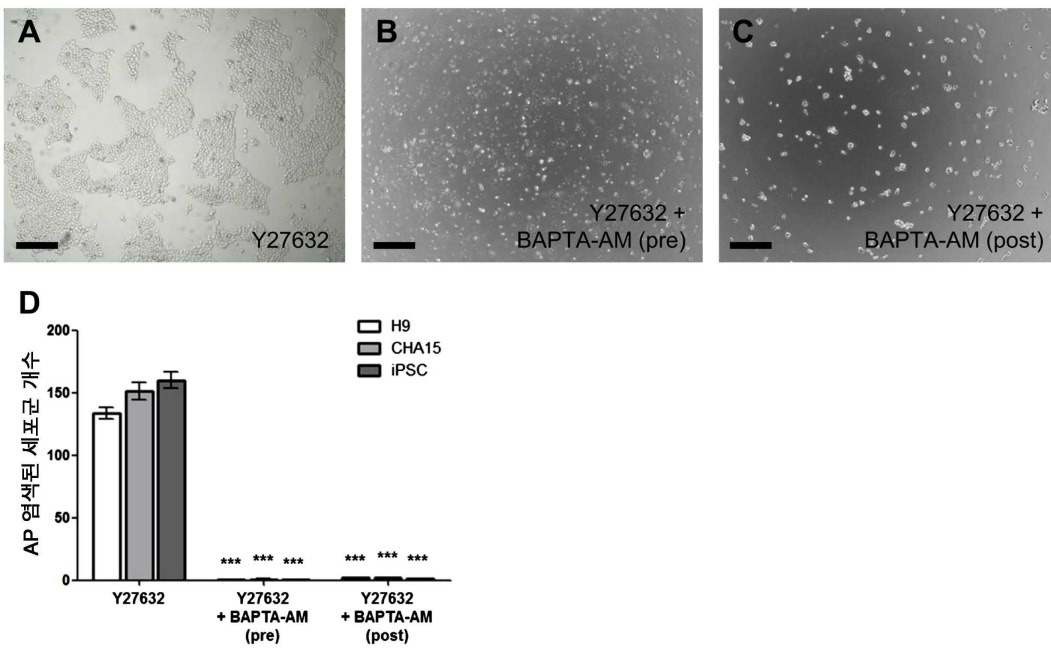
[0077] 효소적으로 분리된 hPSCs에 의해 형성된 다능성 줄기세포 세포군에 유전자 도입이 가능한지 실험하였다. 효소적으로 분리된 hPSC로부터 형성한 다능성 줄기세포 세포군에 인슐린 발현 리포터 렌티바이러스 벡터를 도입한 결과, 제1계대배양시 추가한 인슐린 발현 리포터 렌티바이러스 벡터에 의해 제2계대배양시 배양액에 추가한 항생제에 내성을 나타냄으로써, 빠르고 안정적으로 형질전환 세포주가 확립됨을 확인하였다(도 8). 이는, 기존에 hESC에 대한 유전자 도입에 있어서, 항생제 내성을 지닌 영양공급세포에 의한 문제, 긴 형질전환 여부 확인 시간(selection 시간)에 의한 문제를 본 발명의 방법에 의해 해결할 수 있음을 나타낸다.

도면

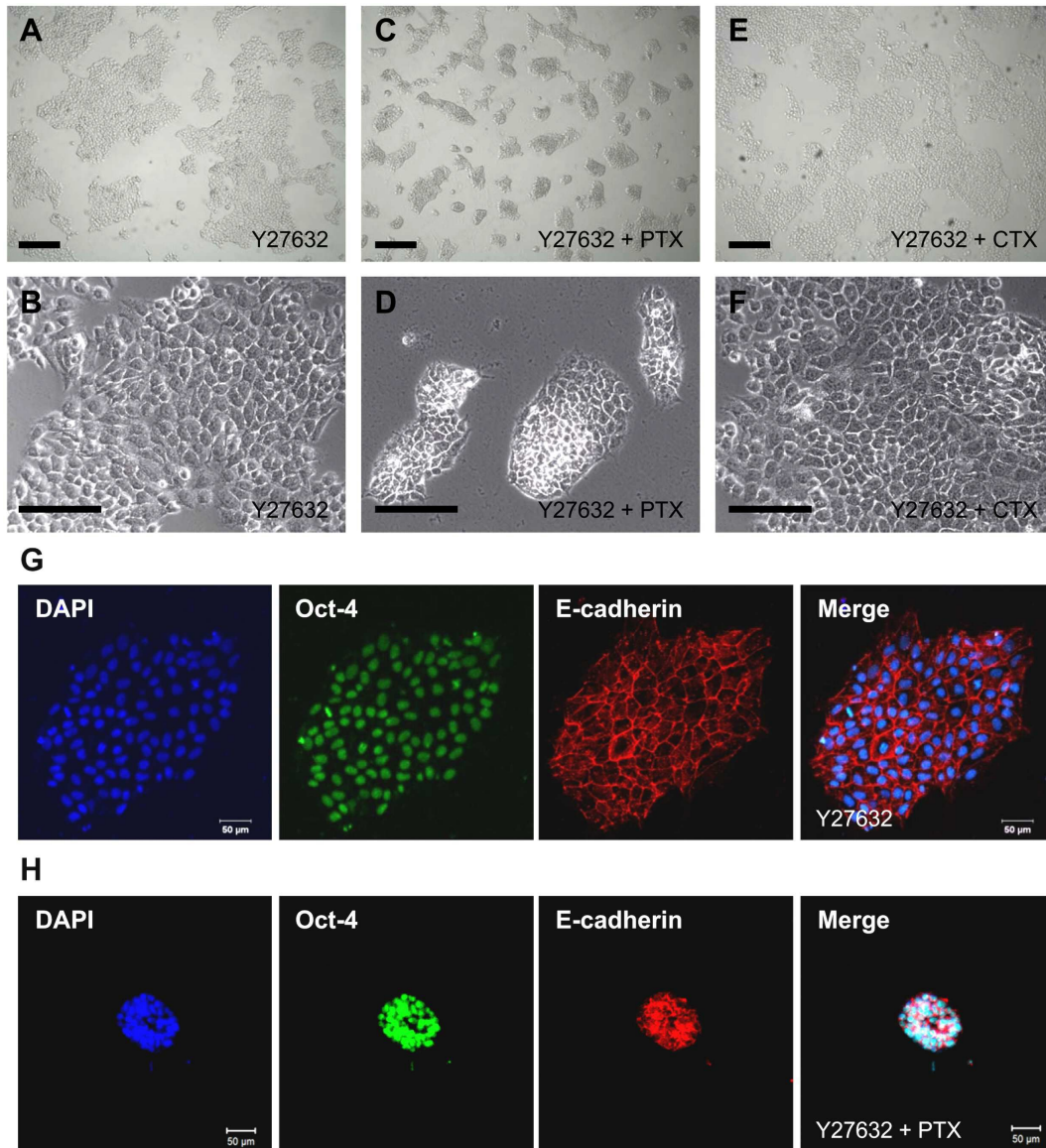
도면1



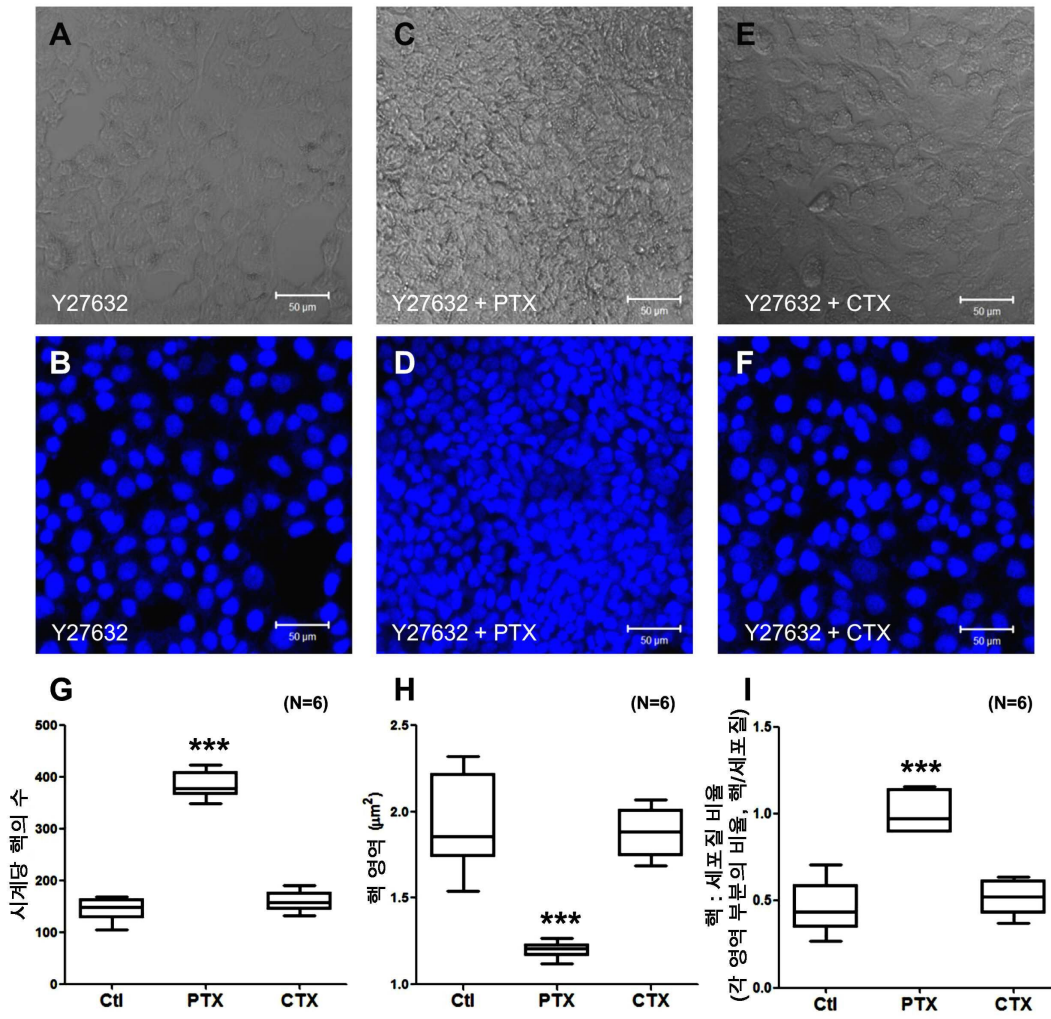
도면2



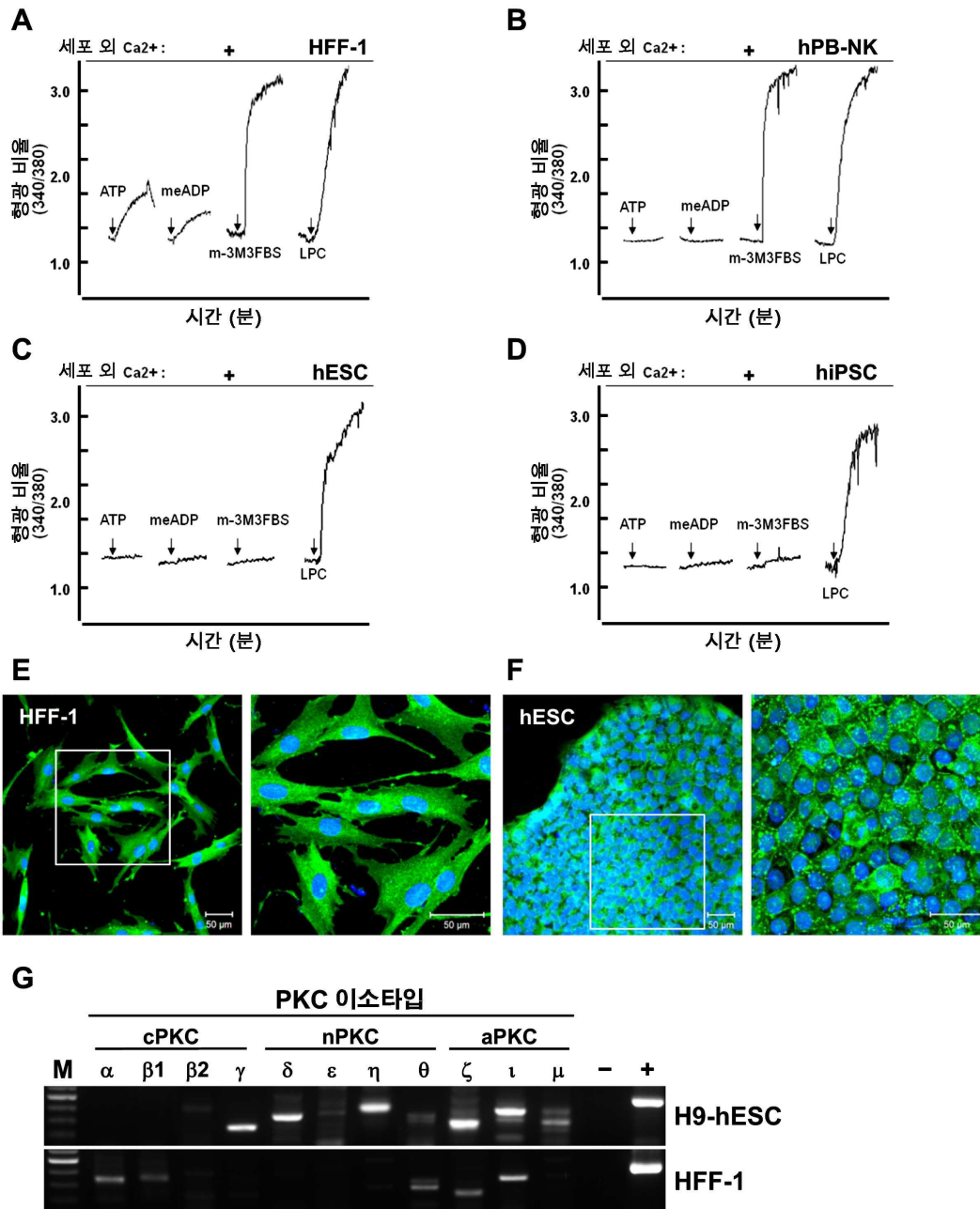
도면3



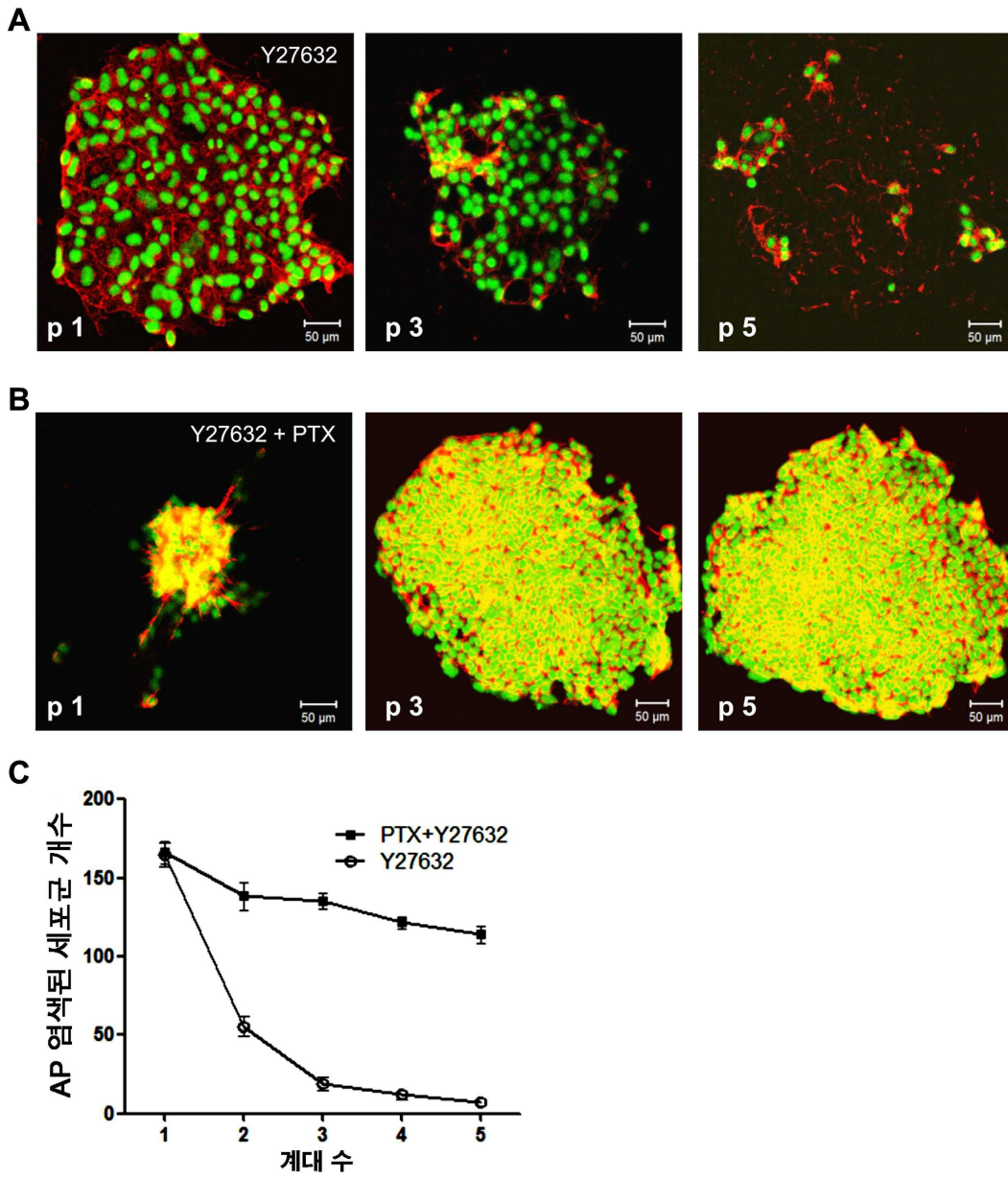
도면4



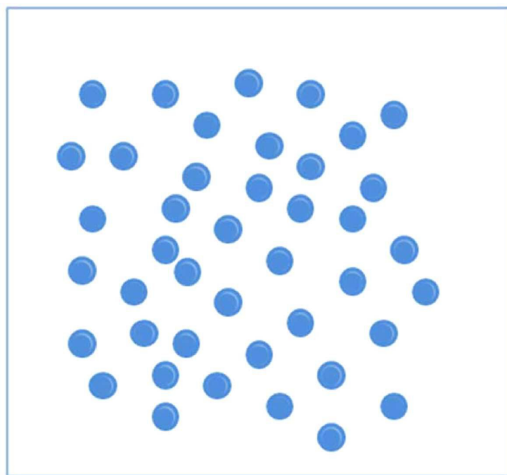
도면5



도면6



도면7

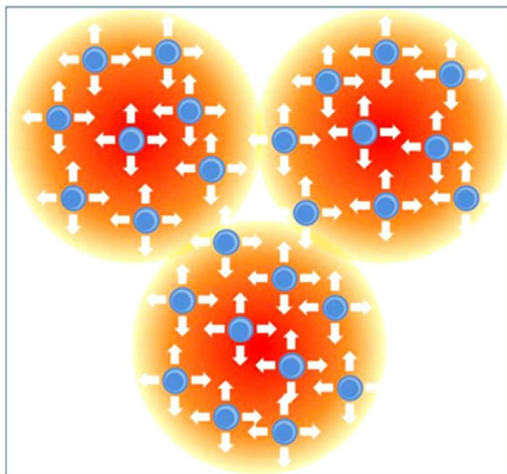


● 단일 hESC

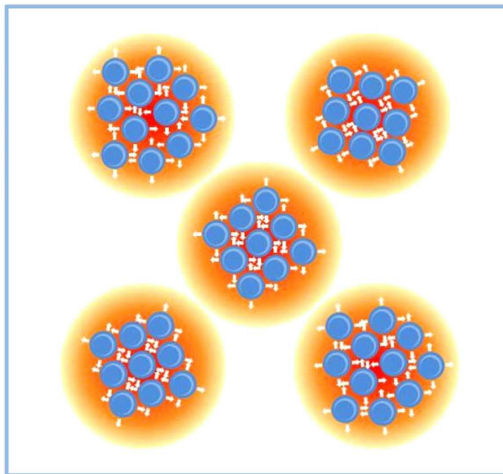


세포군 형성 영역

-Y-27632 or + BAPTA-AM



+Y-27632



+Y-27632 + PTX

도면8

