



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0055869
(43) 공개일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.

C12N 15/64 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0122718

(22) 출원일자 2007년11월29일

심사청구일자 2007년11월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

최승철

서울시 중구 신당2동 420-3 장충시스모빌 202호

임도선

서울시 강남구 대치동 동부센트레빌 101-204

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 7 항

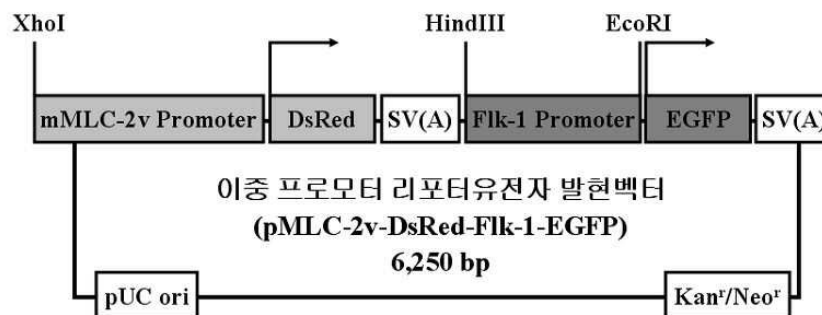
(54) 이중 프로모터 리포터유전자 발현 시스템 및 이를 이용한심근세포 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링하는방법

(57) 요약

본 발명은 심근세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제1 리포터 유전자, 그리고 혈관내피세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제2 리포터 유전자를 함께 포함하는 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 심근 및 혈관내피세포로의 분화능을 가지고 있어 심혈관질환의 유전자 및 세포 치료 연구에 널리 이용되고 있는 중간엽 줄기세포내로 심근 또는 혈관내피세포 프로모터의 활성을 동시에 모니터링할 수 있는 이중 프로모터 기반 리포터유전자 발현벡터들을 도입한 후 심근세포 분화의 특이적인 모니터링을 하여 심혈관질환의 세포치료 후 이식된 세포의 분화 탐지 및 안전성 검증에 크게 기여할 수 있고, 더 나아가 심근 및 혈관내피세포 특이적인 발현이 확인된 본 발명의 프로모터 영역에 양전자 방사 단층 X선 사진법(PET) 또는 자기공명영상(MRI) 표지자들을 부착하여 생체내로 이식된 줄기세포의 심근 및 혈관내피세포로의 분화 추적 연구에 응용할 수 있어 심혈관질환의 줄기세포 치료 효능 및 안전성 확보에 크게 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SC3170

부처명 과학기술부 세포응용연구사업단

연구사업명 세포응용연구사업

연구과제명 급·만성 심장질환 재생을 위한 최적의 줄기세포 규명 및임상 치료 효과와 안전성 검출

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2005년 4월 1일 ~ 2008년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

심근세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제1 리포터 유전자, 그리고 혈관내피세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제2 리포터 유전자를 함께 포함하는 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 심근세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터는 서열번호 1을 갖는 마우스 미오신 경쇄 2v 프로모터, 서열번호 2를 갖는 래트 미오신 경쇄 2v 프로모터 또는 서열번호 3의 심근 트로포닌I 프로모터인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혈관내피세포 특이적 프로모터는 서열번호 4의 Flk-1 프로모터 또는 서열번호 5의 Tie-2 프로모터인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제1 리포터 유전자 및 제2 리포터 유전자는 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP), 청색형광단백질(CFP), 황색형광단백질(YFP) 및 적색형광단백질(DsRed)로 구성된 군으로부터 선택되고, 양자는 서로 다른 파장을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 pMLC-2v-DsRed-Flk-1-EGFP 벡터 또는 도 2의 개열지도를 갖는 pMLC-2v-DsRed-Tie-2-EGFP 벡터인 것을 특징으로 하는 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터.

청구항 6

제1항의 재조합 발현벡터가 형질도입되어 심근세포 또는 혈관내피세포로의 분화시 리포터 유전자가 발현되는 골수 중간엽 줄기세포.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 심근세포 또는 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링하는 방법:

- (a) 중간엽 줄기세포를 준비하는 단계;
- (b) 제1항에 따른 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터를 상기 준비된 중간엽 줄기세포에 도입시키는 단계; 및
- (c) 상기 형질도입된 중간엽 줄기세포에서 리포터 유전자의 발현 여부를 확인하는 단계.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 이중 프로모터 리포터유전자 발현 시스템 및 이를 이용한 심근세포 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 심근세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제1 리포터 유전자, 그리고 혈관내피세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제2 리포터 유전자를 함께 포함하는 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 최근 서구식 식습관의 영향, 운동 부족, 고령화 사회로의 진입에 따른 노년층의 증가 등으로 인해 허혈성 심장 질환에 의한 사망자수가 급격히 증가하는 추세이다. 여러 가지 약물 요법이나 Drug-Eluting Stent 등의 장치의 발달에도 불구하고 이미 손상된 심근은 재생이 불가능하기 때문에 사망률이 급격히 증가하고 있기 때문에 기존의 치료법을 보완하거나 대체할 수 있는 새로운 치료법이 절실히 요구되고 있는 상황에서 허혈성 심혈관질환의 혈관신생을 촉진하기 위한 유전자 치료요법 및 줄기세포를 이용한 세포치료요법이 관심의 대상이 되고 있다.
- <3> 줄기세포를 이용한 심혈관질환의 치료 연구는 쥐의 골수에서 분리한 중배엽 줄기세포를 급성심근경색 모델 동물 내로 이식한 후 심장 기능이 개선되었다는 첫 실험(Tomita 등 1999, Circulation)이후 마우스, 쥐 및 돼지를 대상으로 한 동물모델에서 줄기세포 치료 효과가 입증되었지만 연구 결과가 상이하고 세포 치료에 의한 심장 기능 개선 효과가 제한적인 상황이다. 또한, 골수 간엽 줄기세포를 이용한 첫 임상 실험이 Strauer BE 등 (2002, Circulation 106:1913-1918)에 의해 시도된 이후 자가 골수 간엽줄기세포 및 자가 혈액 전구세포 (Assmus B 등 2002, Circulation 106:3009-3017), 자가 골격근아세포 (skeletal myoblast, Menasche 등 2001, Lancet 357:279-280) 및 사이토카인 (G-CSF)을 주사하여 말초혈액으로 가동화된 단핵구세포(Kang HJ 등 2004, Lancet 363:751-756)를 이용한 임상 실험 결과들이 보고되고 있다. 그러나 심혈관질환자의 세포 치료후 심장 기능의 개선 정도도 미미하고, 세포 이식이 시행된 환자수도 적고 장기간에 걸친 환자의 예후 관찰 자료도 부족한 실정이다. 심혈관질환의 줄기세포 치료의 긍정적인 연구결과와 더불어 자가 골격근아세포를 이식한 후 이식한 세포와 주변세포와의 전기생리적인 연결의 부재에 의한 부정맥 발생 보고와 G-CSF 투여 후 줄기세포 이식한 환자에서 스텐트-관동맥재협착이 발견되었다는 보고 등으로 인해 줄기 세포를 이용한 심장 질환의 치료 효과와 함께 안전성에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있다.
- <4> 최근 심혈관질환 모델동물내로 이식된 줄기세포가 기능적인 심근세포로 분화되는 비율은 매우 미미할 뿐 아니라, 이식된 줄기세포가 심근세포로 분화(transdifferentiation)되는 것이 아니라 심장내에 존재하는 심근세포와 이식된 줄기세포와의 세포융합(cell fusion)에 의해 심근세포로 분화된 것처럼 보인다는 주장이 제기되고 있다(Balsam LB 등 2004, Nature 428:668-673; Nygren JM 등 2004, Nat Med 10:494-501). 또한, 심장내로 이식된 세포가 혈관내피세포나 심근세포로 분화되는 비율은 극히 미미하고, 이식된 세포에서 분비된 인자들이 심장내의 세포들의 생존성, 증식, 분화를 촉진하여 심장 기능의 개선이 이루어진다는 패러크라인 효과(paracrine effect)와 관련되어 있다는 주장이 제기되고 있다. 그러므로, 향후 심혈관질환의 줄기세포 치료가 임상에 안정적으로 적용되기 위해서는 세포 이식후 심기능의 개선 등 효능 측면뿐만 아니라 줄기세포 치료의 안전성을 확보하는 연구 및 기술 개발이 당업계에 요구된다.
- <5> 상기 기술한 바와 같이 현재 심혈관질환의 세포치료 효과가 미미한 상황임에도 불구하고 줄기세포 연구의 중요성을 인지하고, 의학 및 생명공학 선진국에서는 정부차원에서 지원을 아끼지 않고 있다. 현재 줄기세포 치료 분야는 바이오벤처를 중심으로 상업화임상이 활발히 진행되고 있고 최근에는 다국적 제약기업이 벤처간의 인수, 합병을 통한 세포 치료분야에 진출하고 있는 실정이다. 심혈관질환의 줄기세포 치료시장 규모는 2010년 38억 달러에서 2015년 59억 달러에 이를 것으로 전망되고 있으며 (A Jain PharmaBiotech Report 2005), 미국의 심장질환 분야 줄기세포 연구 잠재적 수혜 대상 및 규모는 5,800 만명으로 예상되고 있다(D. Perry 2000, "Patients' Voices: The powerful Sound in the Stem Cell Debate", Science 287:1423).
- <6> 심근세포 또는 혈관내피세포의 특이적인 발현을 유도하는 것은 프로모터 및 인핸서 부위내에 존재하는 전사활성 및 저해 부위의 존재가 가장 중요하다고 할 수 있다. 그러나, 동일한 프로모터 및 인핸서 영역을 사용할지라도 도입된 세포에 존재하는 전사인자들의 활성을 조절할 수 있는 세포 내 환경에 따라 심근세포 또는 혈관내피세포 특이적 유전자 조절 부위들의 발현 특이성은 영향받을 수 있다.
- <7> 종래에 심근 특이적인 발현 또는 혈관내피세포에서의 특이적인 유전자 조절 부위에 대한 많은 선행 보고들이 있지만 심근 또는 혈관내피세포 특이적인 프로모터에 서로 다른 표지유전자를 부착하여 동시에 서로 다른 세포 계통으로의 분화를 탐지하려는 시도는 거의 전무하다.
- <8> 이에 본 발명에서는 심혈관 질환의 세포치료를 위해 이식된 줄기세포가 심근을 재생할 수 있는 심근세포로 분화되었는지 또는 새로운 신생혈관을 만드는 혈관내피세포로 구성되었는가를 기내 및 생체 내에서 모니터링하는 기술을 개발함으로써 논란이 되고 있는 교차분화, 세포융합과 관련한 기술적인 문제를 해결하고 줄기세포 치료의 효능 및 안전성 확보에 기여하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <9> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 심혈관 질환의 세포치료를 위해 이식된 줄기세포가 심근을 재생할 수 있는 심근 세포로 분화되었는지 또는 새로운 신생혈관을 만드는 혈관내피세포로 분화하였는지의 여부를 확인할 수 있는 이중 리포터 리포터유전자 발현 시스템을 제공하는 데 있다.
- <10> 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현백터를 이용한 심근세포 및 혈관내피세포의 분화 모니터링 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <11> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 심근세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제1 리포터 유전자, 그리고 혈관내피세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 제2 리포터 유전자를 함께 포함하는 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현백터를 제공한다.
- <12> 본 발명에서, 상기 발현백터는 심근세포 또는 혈관내피세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터들과 이와 작동가능하게 연결된 리포터 유전자가 삽입 또는 도입될 수 있는 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 리포터 유전자 서열은 상기 심근세포 또는 혈관내피세포 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 프로모터 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. “작동 가능하게 연결(operably linked)” 된다는 것은 적절한 유전자 서열이 프로모터 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된다는 것을 의미한다. 따라서, 상기 발현백터는 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 코딩서열의 인프레임(in frame)을 맞추기 위한 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 심근세포 또는 혈관내피세포 특이적 발현을 유도하는 프로모터는 심근세포 또는 혈관내피세포에서 특징적으로 발현하는 마커단백질의 프로모터를 지칭하며, 이들 프로모터에 전사인자가 결합하여 심근세포 또는 혈관내피세포 특이적 마커단백질을 발현시키는 프로모터를 의미한다. 상기 플라스미드의 예로는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스와 같은 곤충 바이러스가 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포에 도입시키는데 적합한 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다.
- <13> 본 발명의 재조합 발현백터에 있어서, 상기 심근세포 특이적 프로모터는 심근세포에서 특이적으로 발현되는 마커 단백질들의 전사를 조절하는 어떠한 프로모터도 될 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1을 갖는 마우스 심근 미오신 경쇄 2v 프로모터, 서열번호 2를 갖는 래트 심근 미오신 경쇄 2v 프로모터 또는 서열번호 3의 마우스 심근 트로포닌I 프로모터인 것을 특징으로 한다.
- <14> 본 발명의 재조합 발현백터에서, 상기 혈관내피세포 특이적 프로모터는 혈관내피세포에서 특이적으로 발현되는 마커 단백질들의 전사를 조절하는 어떠한 프로모터도 될 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 4의 Flk-1 프로모터 또는 서열번호 5의 Tie-2 프로모터인 것이 좋다.
- <15> 본 발명의 재조합 발현백터에서, 상기 리포터 유전자는 유전자가 전사되어 번역된 단백질을 in vivo 또는 in vitro에서 확인할 수 있는 어떠한 리포터 유전자도 될 수 있으나, 바람직하게는 형광단백질을 코딩하는 리포터 유전자가 발현된 단백질의 유무를 별도의 과정을 거치지 않고 확인할 수 있어서 좋다. 상기 형광단백질의 예로서 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP), 청색형광단백질(CFP), 황색형광단백질(YFP) 또는 적색형광단백질(DsRed) 등이 있다. 녹색형광단백질은 에쿠오레아 빅토리아(Aequorea Victoria)라는 발광 해파리에서 유래하였고, 이를 유전공학적으로 돌연변이시켜 다른 여기 및 방출파장을 갖도록 조작된 청색(CFP), 황색(YFP), 적색(DsRed) 형광단백질 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 상기 제1 리포터 유전자 및 제2 리포터 유전자는 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP), 청색형광단백질(CFP), 황색형광단백질(YFP) 및 적색형광단백질(DsRed)로 구성된 군으로부터 선택되고, 양자는 서로 다른 파장을 갖는 것이 좋다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 형광단백질로 녹색형광단백질 EGFP(enhanced GFP)과 적색형광단백질 DsRed를 각각 사용하였는데 EGFP 유전자의 염기서열(GeneBank Accession No. U55761)과 DsRed 유전자의 염기서열(GeneBank Accession No.

AF506025)은 당업계에서 잘 알려져 있다. 적색형광단백질 DsRed는 558 nm에서 최고의 여기과장(excitation)과 583 nm에서 최고의 방출과장(emission)을 나타내고, 녹색형광단백질 GFP는 488 nm에서 최고의 여기과장과 507 nm에서 최고의 방출과장을 나타낸다. 이러한 형광단백질의 유전자를 리포터 유전자로서 이용하는 경우 면역염색 또는 공초점 현미경 등을 이용하는 방법을 사용함으로써, 줄기세포에서 심근세포 또는 혈관내피세포로의 분화를 하나의 벡터를 사용하여 보다 쉽게 모니터링할 수 있다.

- <16> 본 발명의 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터에서, 상기 발현벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 pMLC-2v-DsRed-Flk-1-EGFP 벡터 또는 도 2의 개열지도를 갖는 pMLC-2v-DsRed-Tie-2-EGFP 벡터인 것이 바람직하다.
- <17> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터가 형질도입되어 심근세포 또는 혈관내피세포의 분화시 리포터 유전자가 발현되는 골수 중간엽 줄기세포를 제공한다. 상기 본 발명에 따른 재조합 벡터를 숙주 세포에 도입하는 방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, 염화칼슘 (CaCl₂) 및 열쇼크 (heat shock) 방법, 입자 총 충격법 (particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스터 (Silicon carbide whiskers), 초음파 처리 (sonication), 전기천공법 (electroporation) 및 PEG (polyethylenglycol)에 의한 침전법 등을 사용할 수 있다. 상기 본 발명의 재조합 발현벡터가 도입된 줄기세포는 세포치료를 필요로 하는 환자에 이식한 후, 이식된 줄기세포가 심근세포 또는 혈관내피세포로의 어느 정도 분화가 진행되었는지를 확인하는데 이용될 수 있다. 이를 위해서 상기 재조합 발현벡터가 도입된 줄기세포는 혈관 질환 환자의 심장 부위에 직접 투여 또는 이식할 수 있으며, 이후 혈액이나 극소량의 조직 샘플을 채취하여 이식된 세포의 분화 진행 여부 및 정도를 확인할 수 있다.
- <18> 다음의 단계를 포함하는 심근세포 또는 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링하는 방법:
- <19> (a) 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계;
- <20> (b) 제1항에 따른 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터를 상기 준비된 중간엽 줄기세포에 도입시키는 단계; 및
- <21> (c) 상기 형질도입된 중간엽 줄기세포에서 리포터 유전자의 발현 여부를 확인하는 단계.
- <22> 본 발명의 심근세포 또는 혈관내피세포로의 분화를 모니터링 방법에 있어서, 상기 a)단계에서 중간엽 줄기세포를 준비하는 방법으로서, 본 발명에서는 중간엽 줄기세포의 특징적 마커 부재로 인한 줄기세포 연구의 제한점을 해결하기 위하여 중간엽 줄기세포를 고순도로 분리할 수 있는 특정한 마커인 Sca-1를 사용하였다. 종래 보고된 쥐, 동물 및 인간 유래 골수 중간엽 줄기세포는 CD29+, CD44+, CD90+이고, 조혈모세포 마커인 CD34-, CD45-는 발현하지 않는 것으로 보고 되고 있으나, 세포 표면 단백질의 발현에 대한 상이성이 보고 되는 등 완전히 확립되지 않고 있다. 비록 CD29, CD44, CD90과 같은 세포 표면 단백질이 중간엽 줄기세포에 양성을 나타내지만, 이들 마커들은 조혈모세포를 분리하는 데 있어서 많이 이용되고 있는 CD34, CD117, CD133과 같은 특징적인 마커들과는 달리 일반세포에서도 세포 접촉, 인지 등과 관련하여 발현되는 것으로 보고 되고 있다. 따라서 본 발명에서는 골수세포를 분리한 후 세포용기에 부착된 세포들의 세포 표면 특성을 파악한 후 골수 중간엽 줄기세포를 순도 높게 분리할 수 있는 특정한 세포 표면 마커로서, Sca-1을 마커로서 사용하였다.
- <23> 본 발명에서, 상기 c)단계의 리포터 유전자의 발현 여부를 확인하는 과정은 상기 리포터 유전자 예컨대, 형광단백질의 발현 여부를 면역염색 또는 공초점 현미경 등으로 확인함으로써 줄기세포에서 심근세포로의 특이적 분화를 모니터링할 수 있다. 본 발명의 실시예 5에서는 붉은 형광단백질이 심근세포에서만 특이적으로 발현하고, 녹색 형광단백질이 혈관내피세포에서만 특이적으로 발현함을 면역염색한 후 공초점 현미경으로 확인하였다(도 5, 도 6).
- <24> 이하, 본 발명의 심근세포 및 혈관내피세포 분화 모니터링용 재조합 발현벡터의 구축과 이를 이용한 심근세포 또는 혈관내피세포로의 분화 모니터링 방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.
- <25> 본 발명이전의 공지기술들도 심근세포 또는 혈관내피세포 특이적인 프로모터 및 인핸서 영역의 활성분석과 이들 유전자 조절부위를 이용한 발현벡터를 구축하여 조직 특이적인 특이성을 나타내었지만, 본 발명의 독창성은 한 발현벡터내에 심근세포와 혈관내피세포 프로모터 영역을 클로닝한 후 각각 다른 리포터유전자를 부착함으로써 동시에 심근 및 혈관내피세포 분화를 모니터링할 수 있는 특징을 갖는다. 본 발명은 심혈관질환의 줄기세포 치료 연구에 적용성이 큰 심근세포 및 혈관내피세포 프로모터를 이용한 이중 프로모터 기반 리포터 유전자 발현벡터의 구축 방법을 제공한다. 본 발명에서 구축한 이중 프로모터 기반 리포터 유전자 발현벡터는 심혈관질환의 세포 치료를 위해 널리 이용되고 있는 중간엽 줄기세포내로 도입될 수 있으며, 본 발명에서는 심근세포 또는 혈관

내피세포로 분화한 중간엽 줄기세포에서만 리포터유전자가 특이적으로 발현됨을 입증하였다. 또한 본 발명의 심근 및 혈관내피세포 특이적인 발현이 확인된 프로모터 영역은 양전자 방사 단층 X선 사진법(PET) 또는 자기공명영상(MRI) 표지자들을 부착함으로써 생체내로 이식된 줄기세포의 심근 및 혈관내피세포로의 분화 추적 연구에 적용될 수도 있다. 본 발명은 기존에 사용된 프로모터 영역과 일부 서열은 동일하지만 완전히 일치되지 않은 고유한 서열을 사용하였다.

- <26> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 다음 단계를 포함한다.
- <27> (a) 자석활성법을 이용한 Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포의 고순도 분리 단계;
- <28> (b) 심근세포 특이적 프로모터에 리포터유전자가 부착된 발현벡터의 구축 단계;
- <29> (c) 혈관내피세포 특이적 프로모터에 리포터유전자가 부착된 발현벡터의 구축 단계;
- <30> (d) 심근세포 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링할 수 있는 이중 프로모터 리포터유전자 발현 시스템 구축 단계; 및
- <31> (e) 이중 프로모터 리포터유전자 발현 벡터를 Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포내로 도입한 후 심근 또는 혈관내피세포로의 분화의 특이성을 검증하는 단계.
- <32> 본 발명에서는 Sca-1+ 세포 표면 마커를 사용하여 골수 유래의 중간엽 줄기세포를 자석활성법(magnetic activated cell sorting, MACS)에 의해 고순도로 분리하였다.
- <33> 심근세포로의 분화를 특이적으로 모니터링할 수 있는 유전자들의 프로모터에 관한 문헌 검색을 통하여 래트 미오신 경쇄-2v (myosin light chain-2v, MLC-2v) 유전자 조절 영역이 골수 중간엽줄기세포(Hattan N 등 2005, Cardiovas Res 65:334-344), P19CL6 배아줄기세포 (Moore JC 등 2004, Int J Dev Biol 48:47-55) 등에서 특이적으로 발현됨을 확인하였다. 본 발명에서는 래트 미오신 경쇄-2v에 상응하는 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터 영역을 확보하기 위하여 래트 미오신 경쇄-2v 프로모터 서열과 마우스 유전자은행의 정보(NT_078458.5)를 토대로 염기서열의 상보성을 확인한 결과 래트 염기서열에 약 90%의 일치성을 나타내는 327 bp 크기의 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터 영역을 선정하였다. 리포터유전자로의 클로닝을 고려하여 특정한 제한효소 서열을 포함하는 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터 고유의 프라이머쌍을 제작하여 마우스 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR에 의해 증폭한 후 TA 클로닝 벡터에 동정하였다. 염기서열 검정을 통하여 유전자은행에 보고된 서열과 동일한 프로모터 영역이 정확하게 클로닝되었음을 확인하였다. 다음 단계로 TA 클로닝 벡터내로 동정된 327bp 크기의 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터를 리포터유전자를 갖고 있는 pDsRed-Express-1 내로 클로닝한 후 제한효소 처리에 의해 클로닝 방향 및 크기를 확인하였다.
- <34> 혈관내피세포로의 분화를 특이적으로 모니터링할 수 있는 유전자들의 프로모터에 관한 문헌 검색을 통하여 마우스 Flk-1 유전자 조절 부위는 기네(Heidenreich R 등 2000, Cancer Res 60:6142-6147) 뿐만 아니라 생체(Licht AH 등 2004, Dev Dyn 229:312-318)내에서 혈관내피세포에서의 특이적인 분화를 유도함을 확인하였다. 본 발명에서는 혈관내피세포 분화를 반영할 수 있는 마우스 Flk-1 프로모터 영역을 기존 연구보고와 마우스 유전자은행의 정보(#NT_039306.6)를 토대로 하여 리포터유전자로의 클로닝을 고려하여 특정한 제한효소 서열을 포함하는 고유의 프라이머쌍을 제작하여 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR에 의해 증폭한 후 TA 클로닝 벡터에 동정하였다. 마우스 Flk-1 프로모터 서열내에 BglII 제한효소 사이트를 갖고 있기 때문에 리포터유전자로의 클로닝시 BglII 제한효소를 제외한 다른 제한효소를 이용하는 전략을 택하였다. 염기서열 검정을 통하여 유전자은행에 보고된 서열과 동일한 프로모터 영역이 정확하게 클로닝되었음을 확인하였다. 다음 단계로 TA 클로닝 벡터내로 동정된 844bp 크기의 마우스 Flk-1 프로모터를 pEGFP-1 벡터내로 클로닝한 후 제한효소 처리에 의해 클로닝 방향 및 크기를 확인하였다.
- <35> 또한, 혈관내피세포로의 분화를 특이적으로 모니터링할 수 있는 유전자들의 프로모터에 관한 문헌 검색을 통하여 마우스 Tie-2 유전자 조절 영역이 기네(Fadel BM 등 1998, Biochem J 330:335-343) 뿐만 아니라 생체(De Palma M 등 2003 Hum Gene Ther 14:1193-1206; Kisanuki YY 등 2001, Dev Biol 230:230-242)내에서 혈관내피세포에서의 특이적인 분화를 유도함을 확인하였다. 본 발명에서는 혈관내피세포 분화를 반영할 수 있는 마우스 Tie-2 프로모터 영역을 기존 연구보고와 마우스 유전자은행의 정보(#NT_039280.5)를 토대로 하여 리포터유전자로의 클로닝을 고려하여 특정한 제한효소 서열을 포함하는 고유의 프라이머쌍을 제작하여 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR에 의해 증폭한 후 TA 클로닝 벡터에 동정하였다. 마우스 Tie-2 프로모터 서열내에 SacI, BamHI 제한효소 사이트를 갖고 있기 때문에 리포터유전자로의 클로닝시 상기 제한효소를 제외한 다른 제한효소를 이용하는 전략을 택하였다. 염기서열 검정을 통하여 유전자은행에 보고된 서열과 동일한 프로모터 영역이 정확하게 클로

닝되었음을 확인하였다. 다음 단계로 TA 클로닝 벡터내로 동정된 1,061bp 크기의 마우스 Tie-2 프로모터를 pEGFP-1 벡터내로 클로닝한 후 제한효소 처리에 의해 클로닝 방향 및 크기를 확인하였다.

- <36> 본 발명자들은 심근세포 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링할 수 있는 이중 프로모터 리포터유전자 발현 시스템을 구축하였다. 구체적으로, 심근세포 프로모터에는 리포터유전자인 DsRed를 부착하고 동시에 혈관내피세포 프로모터에는 EGFP 리포터유전자를 발현하는 벡터를 제작하기 위하여 첫 단계로 심근세포 프로모터, 혈관내피세포 프로모터, DsRed 및 EGFP 리포터유전자의 염기서열내에 존재하는 제한효소 지도를 파악하였다. 두 번째로는 프로모터 영역과 리포터유전자 서열내에 존재하지 않는 제한효소와 클로닝벡터의 클로닝 사이트(multicloning site)에 존재하는 고유한 제한효소(unique enzyme site)를 선정한 후 클로닝을 용이하게 하기 위하여 제한효소 서열을 프라이머 서열에 포함시켰다. 세 번째로 심근세포 특이 프로모터와 혈관내피세포 특이 프로모터에 의해 발현되는 리포터유전자들이 서로 영향을 미치지 않고 각각 조직특이적인 프로모터 영역에 결합하는 전사조절인자들의 조절에 의해 발현될 수 있도록 리포터유전자서열 다음에 시미안바이러스40 폴리아(simian virus 40, SV40) 서열을 함께 증폭하여 전사체(mRNA)의 안정성을 확보하였다. 마지막으로, 제한효소 처리와 염기서열 검증에 의해 클로닝 전략과 일치하는 이중 프로모터 리포터유전자 발현 시스템이 구축되었음을 확인하였다.
- <37> 구체적으로, 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에는 리포터유전자인 DsRed를 부착하고 동시에 Flk-1 프로모터에는 EGFP 리포터유전자를 발현하는 벡터의 제작과 관련된 고유한 프라이머쌍의 제작, 클로닝 벡터 및 삽입물(inserts)의 제한효소 처리 단계 등을 실시예 5-1에 기술하였고, 관련 벡터의 모식도는 도 1에 표시하였다.
- <38> 본 발명에서 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에는 리포터유전자인 DsRed를 부착하고 동시에 Tie-2 프로모터에는 EGFP 리포터유전자를 발현하는 벡터의 제작과 관련된 고유한 프라이머쌍의 제작, 클로닝 벡터 및 삽입물의 제한효소 처리 단계 등을 실시예 5-2에 기술하였고, 관련 벡터의 모식도는 도 2에 표시하였다.
- <39> 본 발명에서 제작한 심근세포 및 혈관내피 세포 프로모터에 서로 다른 리포터유전자가 부착된 발현벡터들을(pMLC-2v-DsRed-Flk-1-EGFP, pMLC-v-DsRed-Tie-2-EGFP) Sca-1+ 골수 중간엽세포내로 도입한 후에 5-아자시티딘 처리에 의해 심근세포로의 분화를 유도하거나, VEGF(vascular endothelial growth factor) 처리에 의해 혈관내피세포로의 분화를 유도한 후에 구축된 발현벡터의 프로모터 유전자에 상응하는 항체들(미오신 단백질, Flk-1 단백질 항체, Tie-2 단백질 항체)을 사용한 면역염색법을 실시하였다.
- <40> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <41> 실시예 1. Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포의 고순도 분리
- <42> 1-1. 골수 세포의 분리
- <43> 마우스 대퇴골로부터 주사기를 사용하여 관류함으로써 내부의 골수세포를 분리한 후 70 μ m 세포 메쉬를 사용하여 조직과편 등을 제거하고 개개의 분리된 세포만을 회수하였다. 골수 세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media) + 10% 우태아혈청 + 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 배지를 사용하여 0.1% 젤라틴 코팅된 세포용기(10cm)에서 3일 동안 배양하였다. 배양 3일후에 세포용기에 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 배양액을 교환한 후 세포밀도가 배양 용기의 80% 이상 될 때 까지 6-7일간 더 배양하였다.
- <44> 1-2. 자석 활성화법에 의한 Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포의 분리
- <45> 세포 배양 용기에 부착된 골수 세포에서 Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포는 자석 활성화법을 사용하여 분리하였다. 구체적으로 계대배양 3회 후에 골수세포를 PE-결합된 Sca-1 항체(D7 단일클론항체, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)와 15분 동안 4℃에서 반응, 세정액(PBS + 0.5% BSA + 2mM EDTA)으로 세정, 항-PE 마이크로비드(anti-PE microbeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)와 15분 동안 4℃에서 반응, 세정액으로 세정 후 자석활성법 칼럼(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany, MACS Separation Column, LS Columns Cat # 130-042-401)을 통과시켜 Sca-1+ 세포만을 분리하였다. 세포 분리순도를 증진시키기 위하여 자석 활성화법 칼럼을 통과시키는 단계를 4회 반복하였다. 골수 세포로부터 분리된 Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포의 분리순도는 유세포분석을 실시하여 검증하였다.
- <46> 실시예 2. 마우스 심근 미오신 경쇄-2v 프로모터에 DsRed 리포터유전자가 부착된 발현벡터의 제작

<47> 2-1. DsRed 리포터유전자 발현벡터로의 클로닝을 위한 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터의 증폭

<48> 본 발명자들은 마우스 C57BL/6J 게놈 DNA로부터 PCR을 통해 미오신 경쇄-2v 프로모터 염기서열(유전자은행 #NT_078458.5) 중 심근세포로 분화시에 특이적인 발현을 유도할 수 있는 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터 부분을 증폭하기 위해 새로운 프라이머쌍을 제작한 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 마우스 게놈 DNA에 XhoI 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 6의 프라이머, EcoRI 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 7의 프라이머, dNTP, 10× PCR 버퍼 및 Taq 중합효소를 첨가하여 94℃에서 5분 동안 반응하고, 94℃에서 30초, 56℃에서 40초, 72℃에서 40초동안 반응을 35회 수행한후, 72℃에서 7분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 반응후 얻은 반응 산물을 전기영동한 결과 유전자은행 염기서열 정보에 상응하는 327bp 크기의 DNA 절편임을 확인하였다.

<49> 마우스 MLC-2v 1F-XhoI : 5'-ctcgagTCCTCCTCCTCGGGTTAC-3' (서열번호 6)

<50> 마우스 MLC-2v 1R-EcoRI : 5'-gaattcCCTCTGGAGAGTCGAGGAG-3' (서열번호 7)

<51> PCR에 의해서 증폭된 327bp의 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터 유전자 단편을 pGEM-T Easy 벡터(Promega) 내로 클로닝하였다.

<52> 2-2. 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터를 DsRed 리포터유전자 발현벡터로의 클로닝

<53> 본 발명자들은 상기 실시예 2-1에서 증폭한 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터 유전자를 프로모터가 없는 pDsRed-Express-1 벡터(Clontech #632412)에 클로닝하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 증폭한 마우스 미오신 경쇄-2v 단편을 XhoI 및 EcoRI로 절단한 후 젤 회수 키트(gel elution kit, Qiagen)를 사용하여 정제한 후, 동일한 제한효소로 절단한 pDsRed-Express-1 벡터와의 리게이션(T4 DNA ligase, Promega)을 수행하여 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터와 리포터유전자인 DsRed를 포함하는 발현벡터를 제작하였다.

<54> **실시예 3 마우스 혈관내피세포 Flk-1 프로모터에 EGFP 리포터유전자가 부착된 발현벡터의 제작**

<55> 3-1. EGFP 리포터유전자 발현벡터로의 클로닝을 위한 마우스 Flk-1 프로모터의 증폭

<56> 본 발명자들은 마우스 C57BL/6J 게놈 DNA로부터 PCR을 통해 Flk-1 프로모터 염기서열(유전자은행 #NT_039306.6) 중 혈관내피세포로 분화시에 특이적인 발현을 유도할 수 있는 마우스 Flk-1 프로모터 부분을 증폭하기 위해 새로운 프라이머쌍을 제작한 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 마우스 게놈 DNA에 HindIII 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 8의 프라이머, EcoRI 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 9의 프라이머, dNTP, 10× PCR 버퍼 및 Taq 중합효소를 첨가하여 94℃에서 5분 동안 반응하고, 94℃에서 30초, 56℃에서 40초, 72℃에서 40초동안 반응을 35회 수행한후, 72℃에서 7분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 반응후 얻은 반응 산물을 전기영동한 결과 유전자은행 염기서열 정보에 상응하는 844bp 크기의 DNA 절편임을 확인하였다.

<57> 마우스 Flk-1 1F-HindIII : 5'-aagcttAGGGCAATGCACAGAGAAG-3' (서열번호 8)

<58> 마우스 Flk-1 1R-EcoRI : 5'-gaattcCAGGGGAACACCGATAAAAA-3' (서열번호 9)

<59> PCR에 의해서 증폭된 844bp의 Flk-1 프로모터 유전자 단편을 pGEM-T Easy 벡터내로 클로닝하였다.

<60> 3-2. 마우스 Flk-1 프로모터를 EGFP 리포터유전자 발현벡터로의 클로닝

<61> 본 발명자들은 상기 실시예 3-1에서 증폭한 마우스 Flk-1 프로모터 유전자를 pEGFP-1 벡터(Clontech)에 클로닝하였다. 구체적으로, 상기 실시예 3-1에서 증폭한 Flk-1 단편을 HindIII 및 EcoRI로 절단한 후 젤 회수 키트를 사용하여 정제한 후, 동일한 제한효소로 절단한 pEGFP-1 벡터와의 리게이션을 수행하여 Flk-1 프로모터와 리포터유전자인 pEGFP를 포함하는 발현벡터를 제작하였다.

<62> **실시예 4. 마우스 혈관내피세포 특이 Tie-2 프로모터에 EGFP 리포터유전자가 부착된 발현벡터의 제작**

<63> 4-1. EGFP 리포터유전자 발현벡터로의 클로닝을 위한 마우스 Tie-2 프로모터의 증폭

<64> 본 발명자들은 마우스 C57BL/6J 게놈 DNA로부터 PCR을 통해 Tie-2 프로모터 염기서열(유전자은행 #NT_039280.5) 중 혈관내피세포로 분화시에 특이적인 발현을 유도할 수 있는 마우스 Tie-2 프로모터를 증폭하기 위해 새로운 프라이머쌍을 제작한 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 마우스 게놈 DNA에 HindIII 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 10의 프라이머, EcoRI 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 11의 프라이머, dNTP, 10× PCR 버퍼 및 Taq 중합효소를 첨가하여 94℃에서 5분 동안 반응하고, 94℃에서 30초, 56℃에서 40초, 72℃에서 40초동안 반응을 35회 수행한후, 72℃에서 7분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 반응후 얻은 반응 산물을 전기영동한 결과 유전자은행

염기서열 정보에 상응하는 1,061bp 크기의 DNA 절편임을 확인하였다.

<65> 마우스 Tie-2 1F-HindIII : 5'-aagcttGTCTTGGTTTACCGGCTGA-3' (서열번호 10)

<66> 마우스 Tie-2 1R-EcoRI : 5'-gaattcACTCACAACCTTGCCTTCC-3' (서열번호 11)

<67> PCR에 의해서 증폭된 1,061bp의 Tie-2 프로모터 유전자 단편을 pGEM-T Easy 벡터내로 클로닝하였다.

<68> 4-2. 마우스 Tie-2 프로모터를 EGFP 리포터유전자 발현벡터로의 클로닝

<69> 본 발명자들은 상기 실시예 4-1에서 증폭한 마우스 Tie-2 프로모터 유전자를 pEGFP-1 벡터에 클로닝하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4-1에서 증폭한 Tie-2 단편을 HindIII 및 EcoRI로 절단한 후 젤 회수 키트를 사용하여 정제한 후, 동일한 제한효소로 절단한 pEGFP-1 벡터와의 리게이션을 수행하여 Tie-2 프로모터와 리포터유전자인 EGFP를 포함하는 발현벡터를 제작하였다.

<70> **실시예 5. 심근세포 및 혈관내피세포 분화 탐지를 위한 이중 프로모터 리포터유전자 발현벡터의 제작**

<71> 5-1. 마우스 심근 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed 와 Flk-1 프로모터/EGFP 동시 발현벡터의 제작

<72> 본 발명자들은 실시예 2에서 제작한 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에 DsRed 리포터유전자가 부착된 발현벡터를 주형으로 하여 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed/SV40 서열을 포함하는 부분(1,271 bp)을 PCR 반응을 통해 증폭하였다. 구체적으로 PCR 반응은 XhoI 제한효소 서열을 포함하는 서열번호 6의 프라이머, HindIII 제한효소 서열을 포함하는 SV40-폴리A 위치에서 선정된 서열번호 12의 역위 프라이머, dNTP, 10× PCR 버퍼 및 Taq 중합효소를 첨가하여 94℃에서 5분 동안 반응하고, 94℃에서 30초, 56℃에서 40초, 72℃에서 40초 동안 반응을 35회 수행한 후 72℃에서 7분 동안 반응시켰다.

<73> 마우스 MLC-2v 1F-XhoI: 5'-ctcgagTCCTCCTCCTCTGGGTAC-3' (서열번호 6)

<74> SV40 polyA 1R-HindIII: 5'-aagcttCAAACCACAACCTAGAATGCAGTG-3' (서열번호 12)

<75> PCR에 의해서 증폭된 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed/SV40 유전자 단편을 pGEM-T Easy 벡터내로 클로닝하였다. 마우스 XhoI/HindIII 제한효소 처리에 의해 pGEM-T Easy 벡터내에 동정된 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed/SV40 서열을 절단하였고, 실시예 3에서 제작한 마우스 Flk-1 프로모터에 EGFP 리포터유전자 발현벡터를 XhoI/HindIII로 절단한 후 리게이션 반응을 통해 최종적으로 마우스 심근 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed와 Flk-1 프로모터/EGFP를 동시에 발현하는 벡터를 제작하였다(도 1, 도 3).

<76> 5-2. 마우스 심근 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed 와 Tie-2 프로모터/EGFP 동시 발현벡터의 제작

<77> 본 발명자들은 5-1에서 pGEM-T Easy 벡터내로 클로닝된 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed/SV40 유전자 단편(1,271 bp)을 XhoI/HindIII 제한효소 처리에 의해 절단하였고, 실시예 4에서 제작한 마우스 Tie-2 프로모터에 EGFP 리포터유전자 발현벡터를 XhoI/HindIII로 절단한 후 리게이션 반응을 통해 최종적으로 마우스 심근 미오신 경쇄-2v 프로모터/DsRed와 Tie-2 프로모터/EGFP를 동시에 발현하는 벡터를 제작하였다(도 2, 도 4).

<78> **실시예 6. Sca-1+ 골수 중간엽세포내로 심근 및 혈관내피세포 이중 프로모터 리포터유전자 발현벡터의 도입 후 분화의 특이성 검증**

<79> DNA 도입효율을 증진시키기 위해 항생제를 포함하지 않은 10% 우태아혈청을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 실시예 1에 의해 분리한 Sca-1+ 골수 중간엽줄기세포(2×10^4 세포/well)를 0.1% 젤라틴 코팅된 커버슬립이 놓인 24-well 세포 용기에 접종하였다. 배양 24 시간후에 도 1, 도 2에서 구축한 각각 1 ug 농도의 이중 프로모터 기반한 리포터유전자 발현벡터(pMLC-2v-DsRed-Flk-1-EGFP, pMLC-2v-DsRed-Tie-2-EGFP)를 50 ul의 Opti-Mem 배양액(Invitrogen)에 혼합한 후 5분 동안 반응시켰다. 2 ul의 리포펙타민 (Lipofectamine 2000, Invitrogen) 용액과 50 ul의 Opti-Mem 배양액을 혼합한 후 5분 동안 반응시켰다. 발현벡터와 리포펙타민용액을 혼합한 후 상온에서 20분 동안 반응시킨 후 Sca-1+ 골수 중간엽줄기세포가 접종된 배양용액내로 첨가한 후 48시간 동안 배양하였다.

<80> 심근세포로의 분화 유도를 위해 이중 프로모터 기반한 리포터유전자 도입 48시간후에 DMEM/10% 우태아혈청을 포함한 배양액으로 2회 세정후에 1 μ M 농도로 5-아자시티딘을 처리한 후 14일동안 배양하여 심근세포로의 분화를 유도하였다. 5-아자시티딘을 함유한 배양액은 3일마다 교환하였다. 혈관내피세포로의 분화 유도를 위해 20ng/ml VEGF 존재하에 DMEM/10% 우태아혈청 배지에서 14일 동안 분화를 유도하였다. 20ng/ml VEGF를 함유한 배양액은 3일마다 교환하였다. 면역염색법을 통한 세포 분화를 확인하기 위하여 분화 처리된 Sca-1+ 골수 중간

엽줄기세포를 2% 파라포름알데히드 고정액으로 15분 처리, PBS/0.1% Twen20(PBST) 용액으로 세정, 0.25% Triton X-100 용액으로 30분 동안 처리, PBST 용액으로 세정, 5% 염소 혈청으로 1시간 배양, 1차항체인 미오신 경쇄 항체 (Sigma), Flk-1 항체 (Santa Cruz Biotechnology) 및 Tie-2 항체 (Upstate)를 사용하여 1시간 배양, PBST 용액으로 세정, 2차항체인 Alexa 488 항체 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 또는 Cy3(Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) 항체와 1시간 배양, PBST 용액으로 세정, 핵염색을 위해 DAPI 용액과 1시간 배양, PBST 용액으로 세정 후 형광현미경하에서 형광신호의 강도를 유지하기 위한 마운팅 용액을 사용하여 시료를 준비한 후 형광현미경하에서 관찰하였다(도 5, 도 6).

산업이용 가능성

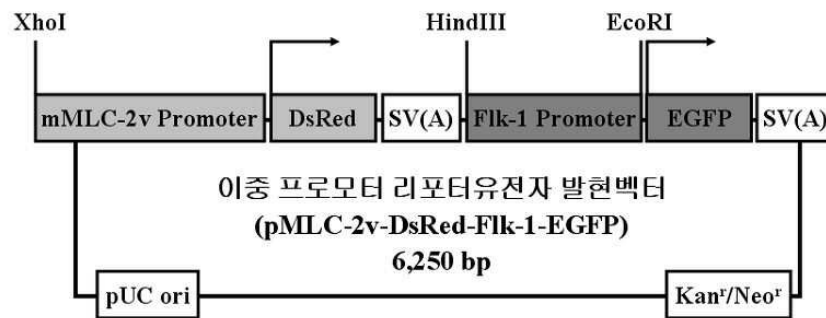
- <81> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 심근세포 프로모터에는 리포터유전자인 DsRed를 부착하고, 동시에 혈관내피세포 프로모터에는 EGFP를 부착하여, 상기 리포터유전자를 발현하는 심근세포 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링할 수 발현 시스템을 구축할 수 있다.
- <82> 구축된 발현백터를 Sca-1+ 골수 중간엽 줄기세포로 도입한 후 5-아자시티딘 처리에 의해 심근세포로 분화를 유도하거나 VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로 분화를 유도한 후에 리포터유전자의 발현을 모니터 하는 경우 심근 및 혈관내피세포의 분화를 특이적으로 분석할 수 있고, 더 나아가 심근 및 혈관내피세포 특이적인 발현이 확인된 본 발명의 프로모터 영역에 양전자 방사 단층 X선 사진법(PET) 또는 자기공명영상(MRI) 표지자들을 부착하여 생체내로 이식된 줄기세포의 심근 및 혈관내피세포로의 분화 추적 연구에 응용할 수 있어 심혈관질환의 줄기세포 치료 효능 및 안전성 확보에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

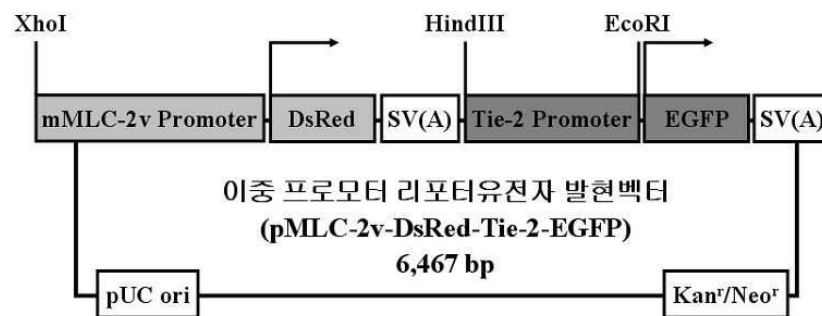
- <83> 도 1은 본 발명에 따른 재조합 발현백터 pMLC-2v-DsRed-Flk-1-EGFP의 모식도이다.
- <84> 도 2는 본 발명에 따른 재조합 발현백터 pMLC-2v-DsRed-Tie-2-EGFP의 모식도이다.
- <85> 도 3은 심근 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에 DsRed가 부착되고 동시에 혈관내피세포 프로모터인 Flk-1에 EGFP가 부착된 심근 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링할 수 있는 이중 프로모터 리포터유전자 시스템 구축 과정을 나타낸다.
- <86> 도 4는 심근 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에 DsRed가 부착되고 동시에 혈관내피세포 프로모터인 Tie-2에 EGFP가 부착된 심근 및 혈관내피세포 분화를 동시에 모니터링할 수 있는 이중 프로모터 리포터유전자 시스템 구축 과정을 나타낸다.
- <87> 도 5는 심근 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에 DsRed가 부착되고 동시에 혈관내피세포 프로모터인 Flk-1에 EGFP가 부착된 발현백터(pMLC-2v-DsRed-Flk-1-EGFP)를 Sca-1+ 중간엽 줄기세포내로 도입한 후 5-아자시티딘 처리에 의해 심근세포로의 분화를 유도하거나 VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로의 분화를 유도한 후 미오신 경쇄-2v 프로모터 항체 및 Flk-1 프로모터 항체를 사용하여 면역염색을 실시한 사진이다.
- <88> 도 6은 심근 마우스 미오신 경쇄-2v 프로모터에 DsRed가 부착되고 동시에 혈관내피세포 프로모터인 Tie-2에 EGFP가 부착된 발현백터(pMLC-2v-DsRed-Tie-2-EGFP)를 Sca-1+ 중간엽 줄기세포내로 도입한 후 5-아자시티딘 처리에 의해 심근세포로의 분화를 유도하거나 VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로의 분화를 유도한 후 미오신 경쇄-2v 프로모터 항체 및 Tie-2 프로모터 항체를 사용하여 면역염색을 실시한 사진이다.

도면

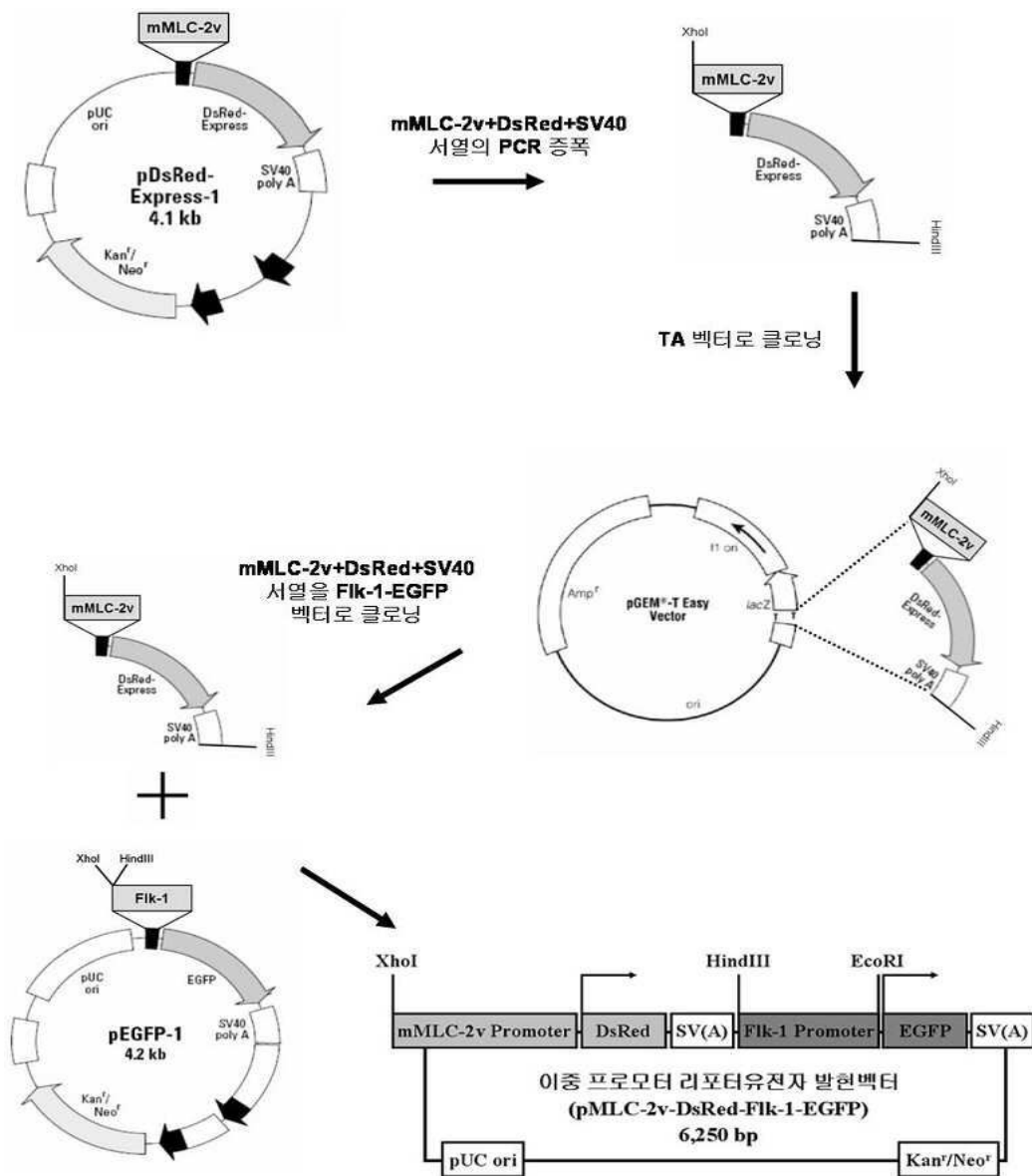
도면1



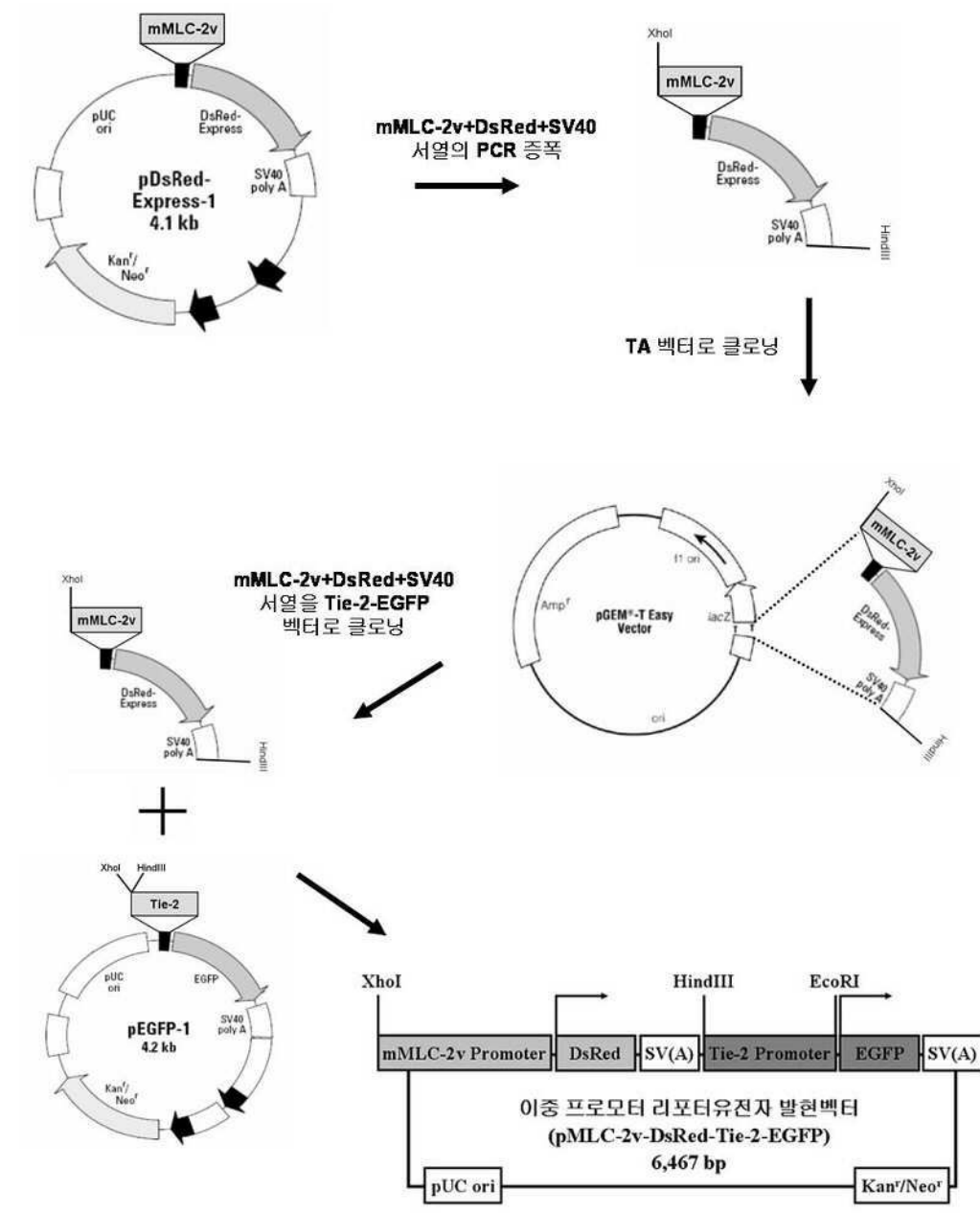
도면2



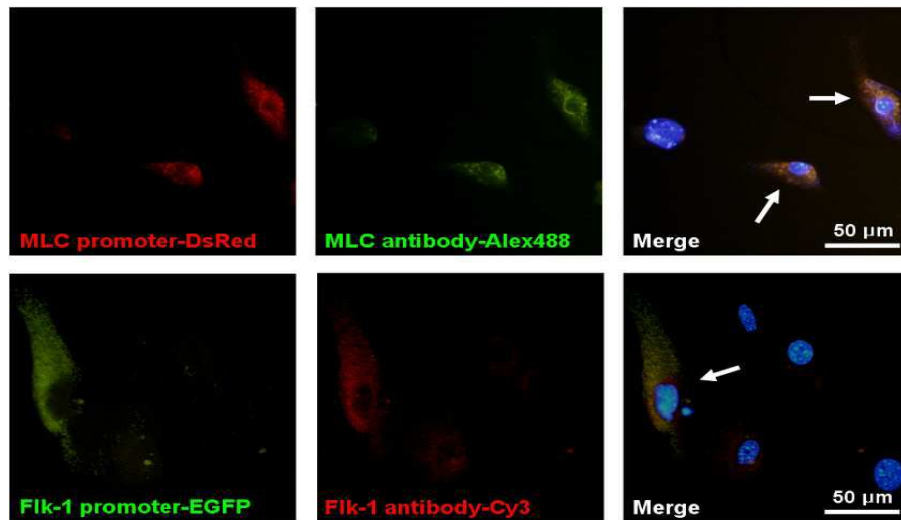
도면3



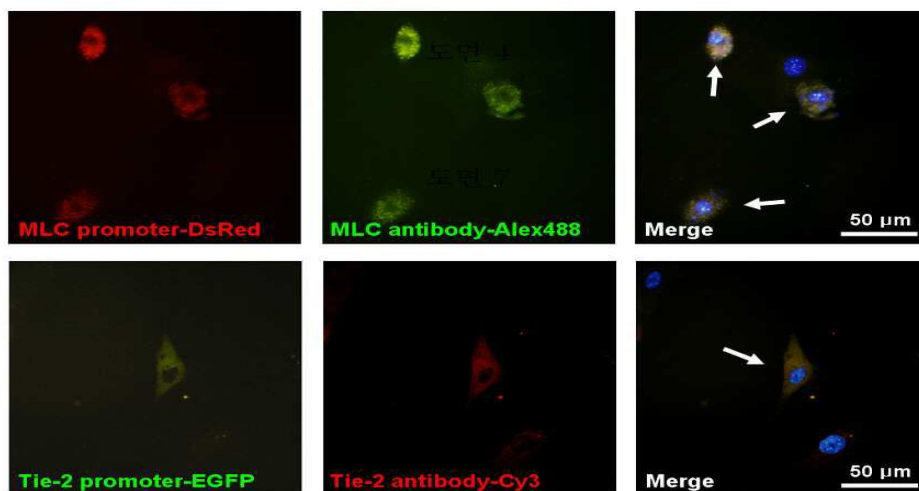
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> Expression vectors for monitoring differentiation of mesenchymal stem cell into the cardiomyogenic lineage, and monitoring methods of differentiating into the cardiomyogenic lineage by using the same
- <160> 12
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 327
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 1
 tcctcctcct cctgggttac tcttcccat tagacaatgg caggaagag agcacacccc 60
 atcatcccca ggccaggccc cagccactga ctctttaacc ttgaaggcat ttttgggtct 120
 cacgtgtcca ccaggcggg tggccgcctt tgagcagctc ttacttcaga agaacggcat 180
 ggagtggggg gtggggggct taggtggcct cgcctcacc tacaactgcc aaaagtggc 240
 atggggttat ttttaacccc aggggagagg tatatttgt tccacagcag gggcagaggc 300
 cagcaggtc ctcgaactct ccaggagg 327

<210> 2
 <211> 309
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 2
 tcccctcct gggttacttt tcccattag acaatggcag gaccagagc acagagcatc 60
 gtcccaggc caggccccag ccactgtctc tttaaccttg aaggcatttt tgggtctcac 120
 gtgtccacc aggcgggtgt cggacttga acggtcttta cttcagaaga acggcatggg 180
 gtgggggggc ttaggtggcc tctgcctcac ctacaactgc caaaagtggc catggggtta 240
 tttttaaccc caggaagag gtatttattg ttccacagca ggggccggcc agcaggtcc 300
 ttgaattct 309

<210> 3
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 3
ggcatggatt tctgggtatg aacatgggaa gctgaagtct agactcttgg atttgagaga 60

agagggacct tgctccgggt tttcctaagt ttgaggagg aggagctgg ggcgctagag 120

tcaaaggagg aggggtgtag atcctgggca ccttggttga cccaactgga gctttgcaca 180

cggtccctt cacacctgt tatcgttat cctgggcagg ggaggagaca gcagtatatt 240

tagtctttgt cctgcctt tatctcagt tcctcagtga ggcttgagca gccagagga 300

aaccaacct ctagagacct ccaaggtcac caggacacc ctccaggac ctccaggaa 360

tctccgatcc tgttctctgc ctctggag 388

<210> 4
<211> 844
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 4
agggcaaatg cacagagaag agccccgggt ccttctccag tggctgctag agtgcttttg 60

tctaccagt tccatgacca cggcccccta cagtaacttt ggccaggccc cttttcagag 120

ctgaccttc agccaagata tgcttggggg gaagagaagg gagagtttct tgccagaggc 180

gccagtgtag gaacaaagag gaaaccggtc ccatgtgaac agtcccccc cccccccag 240

ctatgtagac ttcaagtgc gactagagag gaacagcagc cttaccctt cgttttcttt 300

ccattccttt cctccacgc ctgggaaatg acaacaata tcttgtgaca tgttttactc 360

ctggcaaaaa ccaatgcat ttagaatgat agtttaaagg acagtcttc agccagacaa 420

agagataaga ttattgtctc tacatcgat ctaaactaca ctgatatgca tgattaatga 480

tgtaacatgg tgcttttctt taaaaaaaaat aaggggggaa acaggcatgc tcctttatca 540

cgtagcctaag cctcaagtat ggtgccagaa gcaggtggca aaccaggagg gtttgtaaaa	600
tccaggttca ctataaaaac atgtcaacac atagcgaatc tatataataa aattatactt	660
gaagatcttg ggcatgtttg gtgtgggcat cctcatttag cagaggcatg cctggctcgc	720
tcacatttag ctttgttgta tattcagctc ctacagatg aaaactccgt atgaaggctg	780
cttgggtgac ctatcgacag cgttctgaag gttctggctt gttcttttta tcggtgttcc	840
cctg	844
<210> 5	
<211> 1061	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 5	
gtcttggttt taccggctga gccatctcac ctgcctgatt atttaaaaat ctccggagta	60
atccaagagt gtggtttatg attgtagtat caacactcgg gaggtgagg gagcatcggt	120
atcatgagct ccaggctagt tccaggcttg cctaagctgt agagcaagtc actctcttaa	180
aaagtcctc tcccatatct ttgtatataa ttgcatctg aaattctgtt tgccaataac	240
tatgaaatta ttacattac taaaatcttc ctgtgccaag ttctccaacg aattagatca	300
cactcagatg aaatgctaata aaaaattaaa gctgtagcca gtagcatgcg tatatttggg	360
ctcagggccca acaggcaggc gatctgggtg taagaaaata ggctaattgc tgtggaatct	420
ggtctctagt ggctccgctg agagctgacc tcaaccacgc tccctcaaat tgattgcctt	480
ccaggttatg atttctcacc acaggaaact ttgttgccca attcaaacc tgtgagtga	540
aacaaaaaca ggagagcaag tgctgctccc cgtgccccaa agccccctct gtcagggatc	600
ccaaatgcac cccagagaac agcttagcct gcaagggtg gtcctcatcg cataccatac	660

ataggaggag ggcttggtat tcaattcctg gcctatgaga ggataccctt attgttcctg	720
aaaatgctga ccaggacctt acttgtaaca aagatccctc tgccccacaa tccagttaag	780
gcaggagcag gagccggagc aggagcagaa gataagcctt ggatgaaggg caagatggat	840
agggtctgct ctgccccaa gacctgtgat accaagtgcc ttttaagatac agcctttccc	900
atcctaattc gcaaaggaaa caggaaaaag gaacttaacc ctcctgtgc tcagacagaa	960
atgagactgt taccgctgc ttctgtgtg tttctccttg ccgccaactt gtaaacaaga	1020
gcgagtgagc catgcgagcg ggaagtcgca aagttgtgag t	1061

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 5 prime PCR primer for MLC2v

<400> 6	
ctcgagtcct cctcctcctg ggttac	26

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3 prime PCR primer for MLC2v

<400> 7	
gaattccctc tggagagttc gaggag	26

<210> 8
 <211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5 prime PCR primer for Flk1

<400> 8
aagcttaggg caaatgcaca gagaag 26

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3 prime PCR primer for Flk1

<400> 9
gaattccagg ggaacaccga taaaaa 26

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5 prime PCR primer for Tie2

<400> 10
aagcttgtct tggttttacc ggctga 26

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3 prime PCR primer for Tie2

<400> 11
gaattcactc acaactttgc gacttcc

27

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3 prime PCR primer for SV40 polyA

<400> 12
aagcttcaaa ccacaactag aatgcagtg

29