(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월16일
(11) 등록번호 10-2807995
(24) 등록일자 2025년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0679 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7024207(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년12월05일
심사청구일자 2023년08월14일
(85) 번역문제출일자 2023년07월14일
(65) 공개번호 10-2023-0110839
(43) 공개일자 2023년07월25일
(62) 원출원 특허 10-2019-7018724
원출원일자(국제) 2017년12월05일
심사청구일자 2020년11월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/064600
(87) 국제공개번호 WO 2018/106628
국제공개일자 2018년06월14일
(30) 우선권주장
62/429,948 2016년12월05일 미국(US)
62/478,962 2017년03월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20130137130 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
칠드런즈 호스피탈 메디칼 센터
미국 오하이오주 45229-3039 신시내티 버넷 애비뉴 3333
(72) 발명자
웰스 제임스 엠.
미국 오하이오주 45244 신시내티 킴비 드라이브 8047
무네라 조지 올란도
미국 오하이오주 45202 신시내티 아파트먼트 5티 시카모어스트리트 634
(74) 대리인
장훈

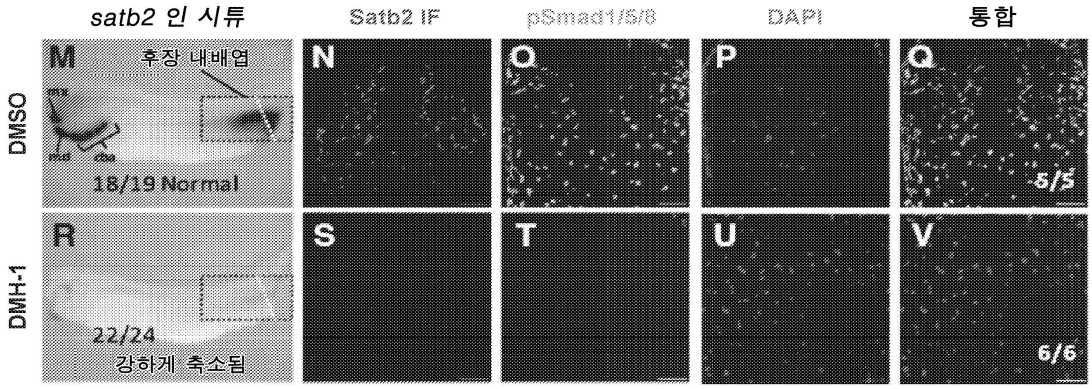
전체 청구항 수 : 총 32 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **결장 유사장기 및 이를 제조 및 사용하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 전구체 세포를 최종 내배엽으로 *체외* 분화시키는 방법을 개시하며, 이것은 신호 전달 경로의 조절을 통해 인간 결장 유사장기(HCO)로 추가로 분화될 수 있다. 더 나아가, 예를 들어 상기 HCO가 대장염, 결장암, 용종증 증후군, 대장염, 및/또는 과민성 대장 증후군에서 선택되는 질병에 대한 잠재적 치료제의 효능 및/또는 독성을 결정하기 위해 사용될 수 있기에, HCO 및 사용 가능할 수 있는 HCO를 사용하는 방법이 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 33/5088 (2013.01)
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 결장 유사장기 (human colon organoid) (HCO)의 형성을 유도하는 방법으로서,

a. 제1 기간 동안 최종 내배엽 (definitive endoderm) (DE)에서 FGF 신호 전달 경로 및 WNT 신호 전달 경로를 활성화하여, 상기 DE가 중장-후장(mid-hindgut) 회전타원체(spheroid)를 형성하도록 하는 단계;

b. 1 일 내지 3 일의 제2 기간 동안 단계 (a)의 중장-후장 회전타원체에서 BMP 신호 전달 경로 및 EGF 신호 전달 경로를 활성화하는 단계; 및

c. 제3 기간 동안 단계 (b)의 중장-후장 회전타원체에서 BMP 신호 전달 경로를 활성화시키지 않고 EGF 신호 전달 경로를 활성화하여, 상기 인간 결장 유사장기를 형성하도록 하는 단계를 포함하고,

상기 인간 결장 유사장기는 SATB2를 발현하고,

상기 인간 결장 유사장기가 결장 장내분비(enteroendocrine) 세포(EEC), 결장 특이성 배상 세포, 음와(crypt), 결장 특이성 호르몬 INSL5 분비를 포함하며,

상기 인간 결장 유사장기에 실질적으로 파네드(Paneth) 세포 및 융모가 없는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DE가 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포에서 유래되는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 DE가 유도된 다능성 줄기 세포에서 유래되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 FGF 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 FGF 신호 전달 경로 활성화제와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 FGF 신호 전달 경로 활성화제가 소분자 FGF 신호 전달 경로 활성화제, 단백질 기반 FGF 신호 전달 경로 활성화제, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23 또는 이들의 조합물에서 선택되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 FGF 신호 전달 경로 활성화제가 200 내지 1000 ng/mL의 농도로 제공되는 FGF4인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 FGF4가 500 ng/mL의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 WNT 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 Wnt 신호 전달 경로 활성화제와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 WNT 신호 전달 경로 활성화제가 단백질 Wnt 신호 경로 활성화제, 소분자 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, 염화 리튬; 2-아미노-4,6-이중 치환된 피리미딘(헤테로) 아릴피리미딘; IQ1; QS11; NSC668036; DCA 베타-카테닌; 2-아미노-4-[3,4-(메틸렌디옥시)-벤질-아미노]-6-(3-메톡시페닐) 피리미딘, Wnt1, Wnt2,

Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, GSK3 억제제, CHIR99021, 또는 이들의 조합물에서 선택되는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 WNT 신호 전달 경로 활성화제가 1 내지 50 μM의 농도로 제공되는 CHIR99021인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 CHIR99021가 3 μM의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 BMP 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 BMP 신호 전달 경로 활성화제와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 BMP 활성화제가 BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP 경로를 활성화시키는 소분자, BMP 경로를 활성화시키는 단백질, 노긴(Noggin), 도르소몰핀, LDN189, DMH-1, 벤트로몰핀, 및 이들의 조합물에서 선택되는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 BMP 활성화제가 50 내지 500 ng/mL의 농도로 제공되는 BMP2인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 BMP2가 100 ng/mL의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 EGF 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 EGF 신호 전달 경로 활성화제와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 EGF 신호 전달 경로 활성화제가 EGF, TGF 알파, HB-EGF, 암피레귤린(Amphiregulin), 에피겐(Epigen), 베타셀룰린(Betacellulin), db-cAMP와 같은 소분자, 및 이들의 조합물에서 선택되는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 EGF 신호 전달 경로 활성화제가 50 내지 500 ng/mL의 농도로 제공되는 EGF인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 EGF가 100 ng/mL의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 FGF 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 FGF4와 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 WNT 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 CHIR99021과 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 BMP 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 BMP2와 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 EGF 신호 전달 경로를 활성화하는 것은 EGF와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 FGF4가 200 내지 1000 ng/mL의 농도로 제공되고, 상기 CHIR99021가 1 내지 50 μM의 농도로 제공되고, 상기 BMP2가 50 내지 500 ng/mL의 농도로 제공되고, 상기 EGF가 50 내지 500 ng/mL의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 FGF4가 500 ng/mL의 농도로 제공되고, 상기 CHIR99021가 3 μM의 농도로 제공되고, 상기 BMP2가 100 ng/mL의 농도로 제공되고, 상기 EGF가 100 ng/mL의 농도로 제공되는, 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 제1 기간이 3일 내지 5일인, 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 제1 기간이 4일인, 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 단계 (b)의 제2 기간이 3일인, 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 DE가 중장-후장 회전타원체를 형성하는 상기 제1 기간이 단계(a)의 상기 중장-후장 회전타원체에 의한 CDX2의 발현에 의해 결정되는, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 중장-후장 회전타원체가 상기 인간 결장 유사장기를 형성하는 상기 제3 기간이 상기 인간 결장 유사장기의 세포에 의한 SATB2 및 CDX2의 발현에 의해 결정되는, 방법.

청구항 28

제1항의 방법에 따라 수득된 인간 결장 유사장기(HCO).

청구항 29

제28항에 있어서, SATB2 발현, 결장 장내분비 세포 (EEC), 결장 특이성 배상 세포, 음와, 결장 특이성 호르몬 INSL5 분비를 포함하는 HCO로서, 상기 HCO에 실질적으로 파네드 세포 및 융모가 존재하지 않는, HCO.

청구항 30

사람이 아닌 포유 동물의 신장 캡슐(kidney capsule) 하에 제28항 또는 제29항의 HCO를 이식하는 단계를 포함하는, 결장 조직을 형성하는 방법.

청구항 31

대장염, 결장 암(colon cancer), 용종증 증후군 및/또는 과민성 대장 증후군에서 선택된 질환에 대한 잠재적인 치료제의 효능 및/또는 독성을 결정하는 방법으로서, 상기 잠재적인 치료제를 제28항 또는 제29항의 HCO와, 상기 잠재적 치료제의 효능 및/또는 독성을 결정하기에 충분한 시간 동안, 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

제28항 또는 제29항의 HCO를 포함하는 면역 저하된 설치류.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 응용 프로그램에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2016년 12월 5일자로 출원된 미국 가출원 제62/429,948호의 이익을 주장하며, 이는 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참고로 통합된다.

[0003] 우선권 언어: 본 출원은, 2017년 3월 30일에 출원된 미국 가출원 연속 번호 62/478,962, 및 2016년 12월 5일에 출원된 미국 가출원 연속 번호 62/429,948의 이권을 주장하는, 2017년 12월 5일에 출원된 국제 특허 출원 번호

PCT/US17/64600에 대한 이권을 주장하고, 이들은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0004] 정부 지원 조항: 본 출원은 국립보건원(the National Institutes of Health)이 수여하는 EB021780, DK103117 및 AI116491하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0005] 다능성 줄기 세포(PSC)에서 유래된 위장 및 소장 유사장기의 생성은 인간 위장관(GI) 발달 및 질병에 대한 연구에 혁명을 일으켰지만, 소대장 유사장기를 생성하기 위한 노력은, 부분적으로 후궁 소화관 발달에 대한 굳건한 이해의 부족으로 뒤쳐져 있다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 전구체 세포를 최종 내배엽으로 *체외* 분화시키는 방법을 개시하는데, 이것은 추가로 신호 경로의 조절을 통해 인간 결장 유사장기(HCO)로 분화될 수도 있다. 더 나아가, HCO 및 HCO를 사용하는 방법이 개시되는데, 예를 들어 HCO는 대장염, 결장암, 용종증 증후군 및/또는 과민성 대장 증후군에서 선택되는 질병에 대한 잠재적 치료제의 효능 및/또는 독성을 판단하는 데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0007] 본 출원 파일에는 색상으로 실행된 도면이 하나 이상 포함되어 있다. 컬러 도면이 있는 본 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료의 지불이 있을 때, 사무소가 제공할 것이다.

당업자라면 아래에 설명된 도면이 단지 예시적인 목적을 위한 것임을 이해할 것이다. 도면은 어떤 식으로든 본 교시의 범위를 제한하지 않는다.

도 1. Bmp 신호 전달은 마우스 및 개구리 배아에서의 *Satb2* 발현을 조절한다. (a) 발달중인 후장(hindgut)(n=6) 주위의 핵 염색을 보여주는 e8.5 마우스 배아의 온조직 표본고정 pSmad158(적색) 및 Foxa2(녹색) 염색. (b) 후장 중배엽과 내배엽(D, 등쪽, V, 복부)에서 pSmad1/5/8 염색을 보여주는(a)의 박스 부위에서 광학 조각의 삽도. (c) 머리주름(headfold)단계에서 단리되고 DMH-1로 2일 +/-BMP 억제에 대해 배양된 마우스 배아의 도식. 배양 48 시간 DMSO(0) 및 DMH-1(E) 처리된 배아의 온조직 표본고정 pSmad1/5/8(적색) 및 Foxa2(녹색) 염색. (f) DMSO 또는 DMH-1에서 배양된 배아에서의 Cdx2에 대하여 pSmad1/5/8 및 pSmad2/3 염색의 정량(조건 당 3 마리의 배아). (g~j) DMSO(g, h) 또는 DMH-1(i, j)에서 배양 2 일 후 마우스 배아(각 조건에 대해 n=6)의 Cdx2(녹색), Satb2(적색) 및 Foxa2(흰색)의 온조직 표본고정 면역 염색. h~j에서의 화살표는 난황 자루(BA1, 첫 번째 상완 아치)의 대략적인 위치를 가리킨다. (k) DMSO 또는 DMH-1로 처리한 마우스 배아에서의 *Satb2* 발현의 정량화. (l) 제노푸스 트로피칼리스(손톱개구리속) 배아에서 Bmp 억제의 도식. DMSO(m) 또는 DMH-1(r)로 처리한 제노푸스 트로피칼리스(손톱개구리속) 배아에서의 Satb2의 *원위치* 하이브리드화. (m)과(r)의 흰색 점선은 후속 분석에 사용된 단면 평면을 나타낸다. 첫 번째 상완 아치의 Mx와 md=상악과 하악 과정. Cba=꼬리 상완 아치. DMSO(n~q) 또는 DMH-1(s~v)로 처리한 제노푸스 트로피칼리스(손톱개구리속) 배아의 Satb2(적색), pSmad1/5/8(녹색), DAPI(파란색) 및 색 병합 이미지의 면역 형광. g~h에서 100㎛, 다른 모든 패널에서 50㎛의 스케일 막대. 2 꼬리 t-검정의 경우, **p <0.01 및 ***p 0.001.

도 2. BMP2는 사람의 장의 관 회전 타원체에서 SATB2와 후방의 HOX 코드를 유도한다. (a) 장의 관 회전 타원체 패턴화 프로토콜의 도식. (b~d) NOGGIN(b), 미처리(c) 및 BMP2(d)로 12 시간 동안 처리된 회전 타원체의 pSMAD1/5/8(적색) 염색에 의해 측정된 BMP 신호 수준. (e) 성체 마우스 결장의 pSmad1/5/8 염색은 음낭 상단으로 증가된 BMP 신호 전달을 나타낸다. (f~h) NOGGIN(f), 미처리(g) 및 BMP2(h)로 72 시간 동안 처리된 회전 타원체에서 SATB2의 발현. (i) 패턴화 후 SATB2 + CDH1 + 상피의 비율을 정량화. (j) 3일간의 패턴화 후 초기 회전 타원체 및 회전 타원체의 주요 구성 요소 분석. (k) BMP 대 NOG 처리된 회전 타원체 사이에 차별적으로 발현된 유전자의 유전자 온톨로지(존재론) 분석. (l) 패턴화 전후의 회전 타원체의 TPM(백만당 전사) 값. 분석한 샘플은 패턴화 이전의 회전 타원체(n=2)였고, 패턴화 3 일 후에 NOGGIN, 대조군 및 BMP2 처리된 회전 타원체(각 그룹에 대해 n=4)였다. i에서의 정량화를 위해, 적어도 3 회의 실험으에서 20 개의 유사장기가 검사되었다. 오류 막대는 SD를 나타낸다. 스케일 막대=50 미크론. **** ps 0.0001은 2개 꼬리 t-검정에 의해 결정됨.

도 3. 부위별 패턴화는 장기간의 체외 배양 후 인간 장내 유사장기에서 유지된다. (a~d) NOGGIN, 대조군 또는 BMP2로 회전 타원체를 처리한 결과로 28 일된 유사장기의 근위 표지자 ONECUTI(녹색)를 이용한 온조직 표본고정 면역형광법 및 QPCR 분석. CDX2(적색) 및 DAPI(청색)를 이용한 염색은 또한 상피와 중간엽을 검출하는데 사용되

었다. (e~h) IF 및 QPCR에 의해 검출된 후방 표지자 SATB2(적색)의 발현. (i~l) IF와 QPCR에 의한 전범위 배상 세포 표지자 MUC2(적색)의 분석. (m~p) IF에 의한 결장 특이 배상 세포 표지자 MUC5B(적색)의 분석. (p)에서 MUC5B + 세포의 수를 정량화 하였다. (q~s) 전체 유사장기에 비해 단리된 중간엽 배양물의 패턴화 표지자의 분석. 전체 유사장기에서 및 NOGGIN, 대조군 또는 BMP2 처리된 유사장기에서 유래된 중간엽 배양물에서 CDH1(q), 근위 HOX 유전자 HOXD3(r) 및 원위 HOX 유전자 HOXA13(s)의 QPCR 분석. CDH1은 상피 세포를 포함한 전체 유사장기에서만 관찰되었다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. IF의 경우, 적어도 3 가지 실험에서 최소 10 개의 유사장기가 각 조건에 대해 조사되었다. QPCR의 경우, 2 개의 개별적인 실험에서 최소 5 개의 생물학적 복제물이 조사되었다. 스케일 막대=100 미크론. **p5 0.01 및 ****p5 0.0001(꼬리 t-검정에 의해 결정됨).

도 4. HIO는 아니지만, HCO는 내분비 생산 관련(proendocrine) 전사 인자 NEUROGENIN 3의 발현에 반응하여 결장 특이적 장 내분비 세포를 생산하였다. (a~b) IPSC72.3 유도성 NEUROG3 세포주를 생산하기 위해 사용되는 독시사이클린 유도성 NEUROG3 렌티바이러스 구성체 및 독시사이클린 유도 프로토콜의 도식. NOGGIN(c, f), 미처리(d, g) 또는 BMP(e, h)로 패턴화된 35 일된 유사장기의 크로마그라닌 A(녹색), CDX2(적색) 및 INS L5(흰색)로의 온조직 표본고정 염색. (c~e) 미처리 유사장기(-Dox) 및(f~h) NEUROG3(+Dox)가 발현된 유사장기. e와 h의 삽도는 INSL5 염색의 확대보기를 보여준다. (i, j) CHGA(i) 및 INSL5(j) 발현에 의해 측정된 HIO 및 HCO 내의 장내 구획 세포의 NEUROG3 유도의 QPCR 분석. 데이터는 NOGGIN(n=3), 대조군(n=3) 또는 BMP(n=6) 처리된 유사장기로의 2 가지 실험을 대표한다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 스케일 막대=50 미크론. *p <0.05(2가지 꼬리 t-검정에 의해 결정됨).

도 5. HIO 및 HCO는 체내 이식 후 부위적 동일성을 유지하였다. (a~e) 인간의 공장 및 결장에서 생검 및 마우스 신피막 아래에 이식하고 체내에서 8~10 주 동안 성장된 NOGGIN 유래 HIOs, 대조군 HIOs, 그리고 BMP2 유래 HCO의 H & E 염색. 동일한 조건의 샘플이 근위 장 표지자 ATA4(f~j), 원위 장 표지자 SATB2(k-0), 파네스(Paneth) 세포 표지자 DEFAS(p~t) 및 결장-특이 배상세포 표지자 MUC5B(u~y)로 염색되었다. GATA4 및 SATB2 이중 염색이 다른 채널에서, 그러나 패널에 대해서는 동일한 슬라이드에서 수행되었지만(f-0), 개별 유사 색상(빨간색) 이미지로 표시된다. 인간 생검의 경우, n=2이었다. 이식된 NOGGIN 처리 유사장기의 경우, n=12이고, 대조군 유사장기의 경우 n=7, BMP2 처리 유사장기는 n=16이었다. 스케일 막대=50 pm.

도 6. *체내* 성장 유사장기는 부위 특이성 호르몬을 발현한다. 마우스 신피막 아래에서 8~10주 동안 성장시킨 HIOs 및 HCO에서 부위별로 발현된 호르몬(a~d) 그렐린(GHRL), 모티린(MLN), (e~h) GIP, (i~l) GLP-1, (m~p) PYY 및 (q~t) INSL5의 발현의 분석. 근위 농축된 호르몬인 GHRL, GIP 및 MLN은 NOGGIN및 대조군 HIO에서 풍부하였다(a~h). GLP-1과 PYY는 BMP2 유래 HCO에 풍부하였다(1-0). 결장 특이성 호르몬 INSL5는 HCO에만 존재했다(q~t). 데이터는 조건 당 최소 5 개의 이식된 유사 장기를 대표한다. (a)와 (b)의 삽도는 GHRL과 MLN 이중 양성 세포를 보여준다. GHRL, MLN, GIP, GLP1, PYY 및 INSL5에 대한 (D, H, L, P, T)FPKM 값은 RNA-seq 데이터에서 유래되었다. FPKM 값은 조건 당 3 개의 생물학적 복제를 나타낸다. 스케일 막대=30 마이크론.

도 7. HIO 및 HCO의 전체적 전사 분석 및 인간의 소장 및 결장과의 비교. (a) 이식된 HIO 및 HCO와 비교하여, 인간 성인 및 태아 소장 및 결장의 주성분 분석. (b) 초기 대장 측정은 인간 성인 소장과 HIOs의 비교 및 인간 성인 결장과 HCO를 비교하는 초기하 수단 검사(Hypergeometric means test). (c) HIO 및 HCO와 비교하여, 인간의 소장 및 결장에서 차별적으로 발현된 전사물을 비교하는 4-방향 산점도(scatter plot).

도 8. Gata4와 Satb2는 소장 및 대장의 발달 동안 신중한 부위 경계를 표시한다. (a) 난황 줄기(n=9)에서 발현 경계를 보여주는 e9.5 마우스 배아에서 Gata4(녹색)와 Satb2(빨간색)의 온조직 표본고정 염색. (b) 낮은 Gata4 및 낮은 Satb2 발현의 이행부위를 나타내는 el 1.5 장의 Gata4 및 Satb2 발현 부위를 묘사하는 모델. (c~e) 난황 줄기에서 Gata4의 후궁 경계와 Satb2의 전 경계를 보여주는 e11.5 마우스 배아에서의 Gata4와 Satb2의 온조직 표본고정 염색(n=3). (f~h) Satb2 발현의 전 경계가 유지되는 것을 보여주는 el 2.5 마우스 배아에서 Satb2 및 Foxa2의 온조직 표본고정 염색(n=3). (i) e1 6.5 마우스 배아(n=6)에서 단리된 근위 소장 및 대장에서 Gata4 및 Satb2의 온조직 표본고정 염색. (j) e1 6.5 마우스 배아(n=6)에서 단리된 원위 소장 및 대장에서 Gata4 및 Satb2의 온조직 표본고정 염색. (k) 사람의 공장(n=2)과 (l) 결장(n=2)의 섹션에서 GATA4와 SATB2의 염색. 스케일 막대=50μm(b~d) 및 100 1Am(e~m). (c)와 (f)의 점선은 배꼽의 대략적인 위치를 표시한다. 약어:ys, 난황 줄기; cb, 맹장싹; tz, 이행부위; mx, 상악; 및 md, 첫 번째 상완 아치의 하악 부분; ti, 말단 회장; icj, 회맹부 교차점.

도 9. SATB2는 GATA4 음성의 인간 소장 및 대장에서 발현된다. SATB2 발현이 원위 소장 및 전체 대장에 존재함을 보여주는 인간 성인 십이지장, 소장, 맹장, 결장 및 직장에서의 SATB2 염색. 인간 성인 및 태아 장 샘플에서

발표된 RNA-seq 데이터의 GATA4 및 SATB2 분석. 플롯된 샘플에는 인간 성인 십이지장(HuSI_Duo_A), 십이지장(HuSI_Dist_A), 인간 성인 결장(HuColon_A) 및 인간 태아 소장(HuSI_F)이 포함된다. (c) 십이지장(Duo), 공장(Jej), 회장(Ile), 상행 결장(AC), 횡행 결장(TC) 및 공기 결빙 인터페이스(ALI)에서 자라는 내림차순 결장에서 유래된 태아 장의 줄기 세포에 대한 Wang et al. 2015에 의해 생성된 마이크로어레이 데이터에서의 GATA4 및 SATB2 발현의 분석. r2 값은 Excel에서 CORREL 함수를 사용하여 결정되었다.

도 10. BMP는 후방 HOX 유전자의 SHH 활성화를 매개한다. (a) SHH-매개 후방 HOX 유전자의 이전 모델. (b) 후방 HOX 유전자의 SHH 매개 활성화 및 내배엽 HOX 유전자의 BMP-매개 활성화의 새로운 모델. (c) NOGGIN, 대조군, 평활화된 작용제(Smoothened agonist)(SAG) 또는 BMP2로의 처리 후 HOX 인자의 QPCR 분석. (d) SAG에 의해 유도된 HOX13 유전자의 BMP4 의존 활성화 모델. (e) 3 일 후에 대조군에서, 5μM SAG, 5μM SAG + NOG 및 BMP2 처리된 유사장기에서 HOXA13의 QPCR 분석. (f) 외인성 재조합 인간 BMP2에 의해 유도된 HOX13 유전자의 SHH 독립 활성화 모델. (g) 3 일 후, 대조군, BMP 및, BMP + 사이클로파민으로 처리된 유사장기에서 HOXA13의 QPCR 분석(조건 당 n=6).

도 11. 연장된 체외 배양은 배상 세포의 성숙을 가능하게 한다. (a) 패턴화되고 이어서 다시 패턴화된 유사장기에서 CDX2 + SATB2 + 세포의 비율의 정량화. 28일된 유사장기에서 HOXB13(b) 및 HOXD13(c)의 QPCR 분석. (d~f) 44 일된 NOGGIN, 대조군 및 BMP로 처리된 유사장기에서 CDH1(녹색), CDX2(적색) 및 MUC2(흰색)로 온조직 표본고정 염색 및 (G1) 단면 염색. (j~l) 44 일된 BMP2 처리된 유사장기의 절편 염색. 흰색 화살표는 Mucin 2를 분비하는 중이던 배상 세포를 가리킨다. QPCR의 경우, 2 개의 개별적인 실험에서 유래된 최소 5 개의 생물학적 복제물을 조사 하였다. IF의 경우, 조건 당 최소 10 개의 유사장기를 검사하였다. 스케일 막대=50 pm.

도 12. 유사장기의 BMP 패턴화는 체외 체외 및 체내에서 안정하다. (a) NOGGIN, 대조군 및 BMP 패턴화된 유사장기의 유사장기 이식의 효율성. 이식된 패턴화된 유사장기에서 GATA4 + CDX2 + 세포(b) 및 SATB2 + CDX2 + 세포(c)의 비율의 정량화. 이식된 유사장기에서 GATA4(d) SATB2(e) DEFAS(f)와 MUCSB(g)에 대한 RNA-seq 데이터에서 유래된 FPKM 값. (h~i) 인간의 공장 및 결장 생검(부위마다 n=2) 및 (j~l)이식된 유사장기(n=5/조건)의 MUC2(적색) 염색. 스케일 막대=50 미크론.

도 13. *체외* 및 *체내*에서 자란 유사장기는 장 전구체(조상s)를 함유한다. NOGGIN, 대조군 또는 BMP로 처리된 H9-LGR5-GFP 유래 유사장기에서 CDH1 및 GFP의 대표적인 온조직 표본 고정(a, f, k) 및 슬라이스 단면(b, g, l) 이미지. (c~e) NOGGIN, (h~j) 대조군 또는 (m~o) BMP2 처리된 유사장기 섹션의 CDX2(적색) 및 SOX9(녹색) 염색. NOGGIN, 대조군 또는 BMP로 처리된 H9-LGR5-GFP 유사장기에서 유래된 유사장기 내 에서 염색된 CDX2 및 LGR5-GFP(p, s, v), CDX2 및 SOX9(q, t, w) 및 CDH1 및 KI67(r, u, x)의 대표적인 이미지. (y~a') NOGGIN, 대조군 또는 BMP 이식체 각각에서 유래된 엔테로이드(enteroid)를 보여주는 입체 현미경 사진. (b'~d') 대조군 엔테로이드(2 개 이식체에서 유래된 > 100 풀링된 엔테로이드) 및 BMP2로 처리된 콜로니오드(1 개 이식체에서 유래된 50 개 이상의 콜로노이드)의 근위 및 원위 유전자에 대한QPCR 분석. 스케일 막대=50 μm.

도 14. 리보솜과 면역 세포 신호는 이식된 유사장기와 일차 인간 조직 간에 차별적으로 발현된다. (a) 패턴화된 이식 유사장기 및 인간 성인 및 태아 소장 및 결장의 주성분 분석. (b) 이식체에서 상향조절된 유전자와 사람의 일차 조직에 대한 유전자 존재론 분석. (c) 사람의 일차 조직과 이식체에서 상향조절된 유전자의 유전자 존재론 분석.

도 15. (a) 마트리겔에서 15 일 성장 후 HCO 온조직 표본 고정 면역형광법 염색. HCO 배양물은 내피 표지자 CD31(녹색) 및 후장 상피 표지자 CDX2(적색)에 대해 염색되었다. 배양물은 또한 조혈 세포 표지자 PU.1(빨간색 우측 패널)에 대해 염색되었다. (b) 조혈 전구 세포 분석의 도식. 세포를 HCO에서 수거하고, 원심 분리하고 Giemsa Wright 염색을 사용하여 염색하거나 또는 Methocult 배지에서 배양하여 조혈 세포 분화를 분석하였다. (c) Giemsa Wright의 대표 이미지는 대식세포, 호중구, 호염기 및 호산구로의 분화와 일치하는 형태학을 가진 세포를 염색했다. (d) Methocult에서 14 일 후에 형성된 콜로니의 대표 이미지. 적혈구, 대식 세포 및 과립구 콜로니가 HCO에서 유래된 세포에는 존재하지만, NOGGIN으로 처리된 HIO에서 유래된 세포에는 존재하지 않았다.

도 16. (a) 마트리겔에서 28 일 동안 성장한 인간 결장 생검 또는 HCO의 면역형광 염색. 염색은 대식세포의 표지자인 CD68에 대해 행해졌다. (b) HIOs 및 HCO에서 CD14 및 CD16의 CYTOF 분석 플롯. 작은 비율의 CD14+/CD16 + 세포가 HCO(파란색 사각형)에 존재하지만, HIO에는 없다. 또한, CD16 단일 양성 세포가 HCO에 존재했는데, 이는 단구세포가 상기 배양물에 존재함을 시사한다. (c) 14 일 및 28 일된 HIO 및 HCO에서 수집된 상등액의 Luminex 어레이 분석. IL6과 IL8이 28 일된 HCO(BMP)에서는 검출되었지만 HIO에서는 검출되지 않았다. (d) 14 일 및 28 일된 HIO 및 HCO에서 수집된 상등액의 Luminex 어레이 분석. 대식세포에 특이적인 사이토킨인

MIP1A와 MIP1B가 14 일과 28 일된 HCO(BMP)에서는 검출되었지만, 14 일이나 28 일된 HIO에서는 검출되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 정의.

[0009] 달리 언급되지 않는 한, 용어는 관련 기술 분야에서 당업자에 의한 통상적인 사용법에 따라 이해되어야 한다.

[0010] "약"또는 "대략"이라는 용어는 당업자가 결정한 특정 값에 대한 수용 가능한 오차 범위 내에 있음을 의미하며, 이는 값이 어떻게 측정되거나 결정되는지에, 예를 들어, 측정 시스템의 제한에 부분적으로 달려있다. 예를 들어, "약"은 당업계의 관행에 따라 1 또는 1 이상의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 또는 "약"은 주어진 값의 최대 20 %, 최대 10 % 또는 최대 5 % 또는 최대 1 %의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여,이 용어는 값의 자릿수 내, 바람직하게는 5 배 이내, 보다 바람직하게는 2 배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 출원 및 청구 범위에 기재된 경우, 달리 언급되지 않는 한, 특정 값에 대한 허용 오차 범위 내에서 "약"이란 용어의 의미를 가정해야 한다.

[0011] 본 명세서에서 사용되는 "전능 줄기 세포"(전능성 줄기 세포로도 알려짐)는 배아 및 외배엽 세포 유형으로 분화할 수 있는 줄기 세포이다. 그러한 세포는 완전한 생존 가능한 유기체를 구성할 수 있다. 이 세포들은 난자와 정자 세포의 융합으로 만들어진다. 수정된 난자의 처음 몇 개의 분열에 의해 생산된 세포도 전능(totipotent)이다.

[0012] 본원에서 사용된 "다능성 줄기 세포(PSC)"라는 용어는 일반적으로 PS세포로도 알려져 있는데, 신체의 거의 모든 세포 유형으로 분화할 수 있는 임의의 세포, 즉 내배엽(위장 내부면, 위장관, 폐), 중배엽(근육, 뼈, 혈액, 비뇨 생식기) 및 외배엽(표피 조직과 신경계)을 포함하는 3 가지 배아 층(배아 상피)에서 유래된 세포를 아우른다. PSCs는 배아 줄기세포(배아 생식 세포 포함)에서 유래되거나, 또는 특정 유전자의 발현을 강요함으로써 성체세포와 같은 비다능성 세포의 유도를 통해 얻어지는 전능 세포의 자손일 수 있다.

[0013] 본원에서 사용된 용어 "유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)"는 일반적으로 iPS 세포로 약칭되며, 특정 유전자의 "강제적" 발현을 유도함으로써, 성숙한 체세포와 같은 정상적으로 비-다능성 세포에서 인위적으로 유래된 유형의 다능성 줄기 세포를 가리킨다.

[0014] 본 명세서에서 사용되는 "배아 줄기 세포(ESC)"는 일반적으로 ES 세포로 약칭되며, 다능성이고, 초기 단계 배아인 배반포의 내부 세포 덩어리에서 유래된 세포를 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "ESC"는 때로는 배아 생식 세포를 포함하도록 광범위하게 사용된다.

[0015] 본원에 사용된 바와 같이, "전구 세포"라는 용어는 하나 이상의 전구 세포가 자체를 갱신하거나 하나 이상의 특수화된 세포 유형으로 분화하는 능력을 얻는 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있는 임의의 세포를 포함한다. 일부 측면에서, 전구 세포는 다능성이거나 다능성이 될 수 있는 능력을 갖는다. 일부 측면에서, 전구 세포는 다능성을 획득하기 위해 외부 인자(예:성장 인자)의 처리를 받는다. 일부 측면에서, 전구 세포는 전능성(전능) 줄기 세포; 다능성 줄기 세포(유도되거나 유도되지 않음); 다중능력성(multipotent) 줄기 세포; 만능 줄기 세포 및 단일능 줄기 세포일 수 있다. 일부 측면에서, 전구 세포는 배아, 유아, 어린이 또는 성인으에서 유래 될 수 있다. 일부 측면에서, 전구 세포는 유전자 조작 또는 단백질/펩티드 처리를 통해 다능성이 부여되는 치료 대상 체세포일 수 있다.

[0016] 발달 생물학에서 세포 분화는 덜 특수화된 세포가 좀 더 특수화된 세포 유형이 되는 과정이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "지향성 분화"라는 용어는 덜 특수화된 세포가 특정한 특수화된 표적 세포 유형이 되는 과정을 기술한다. 특수화된 표적 세포 유형의 특수성은 초기 세포의 운명을 정의하거나 변경하는 데 사용할 수 있는 적용 가능한 방법으로 판단할 수 있다. 예시적인 방법에는, 비제한적으로, 유전자 조작, 화학 처리, 단백질 처리 및 핵산 처리가 포함된다.

[0017] 본원에서 사용된 용어 "세포 성분"은 개개의 유전자, 단백질, mRNA 발현 유전자 및/또는 기타 가변 세포 성분 또는, 단백질 변성(예:인산화)과 같은 (당업자에 의해 생물학적 실험(예를 들어, 마이크로 어레이 또는 면역 조직 화학에 의해)에서 전형적으로 측정되는) 단백질 활성이다. 생명체의 기저를 이루는 생화학적 과정의 복잡한 네트워크, 일반적인 인간 질병, 유전자 발견 및 구조 결정과 관련된 중요한 발견은 연구 과정의 일부로서 세포 성분 풍부 데이터(abundance data)의 응용에 기인할 수 있다. 세포 성분 풍부 데이터는 바이오표지자를 확인하고 질병 아형을 식별하며 독성 메커니즘을 확인하는 데 도움이 될 수 있다.

[0018] 본원에 기술된 바와 같이, 방법 및 시스템은 배양물에서의 배아 장 발달을 모방하기 위한 일련의 성장 인자 조작을 사용하여 확립되어 있다. 특히, PSC, 인간 배아 줄기 세포(hESC) 및 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 둘 다를 장내 조직 내로 *체외* 분화시키는 방법 및 시스템이 확립되어 있다

[0019] 다능성 줄기 세포(PSC)에서 위 및 소장 유사장기의 생성은 인간 위장(GI) 발달 및 질병의 연구에 혁명을 일으켰다. 그러나, 대장 유사장기 생성을 위한 노력은, 부분적으로는 후방 장관 발달의 분자수준의 이해가 강하기 때문에, 뒤쳐져 있다. 여기서, 출원인은 탯줄 후방의 장 상피가 발달 전 기간에 걸쳐, 그리고 출생 후 Satb2를 발현한다는 것을 발견했다. 출원인은 추가로 BMP 신호 전달이 개구리 및 마우스 배아에서 Satb2 + 영역을 확립하고, BMP 신호 전달의 짧은 활성화가 후방 HOX 코드를 활성화시키고 인간 PSC-유래 장관(gut tube) 배양물을 결장 유사장기(HCO)로 직접 유도하기에 충분하다는 것을 추가로 발견하였다. *체외에서* 성장한 HCO는 결장의 동일성과 일치하는 표지자 프로필과 독특한 세포 유형을 가지고 있었다. 쥐에 이식한 후, HCO는 인간 결장의 분자, 세포 및 형태적 성질을 갖는 조직을 형성하는 형태 형성(morphogenesis) 및 성숙을 겪었다. 개시된 결장 유사장기는 대장염과 결장암에 대한 향후 연구에 사용될 수 있다.

[0020] 일 측면에서, 인간 결장 유사장기의 형성을 유도하는 방법이 개시된다. 상기 방법은 (a) 최종 내배엽(DE)을 상기 DE가 중간 후장 회전 타원체를 형성하기에 충분한 기간 동안 FGF 신호 전달 경로 활성화제 및 WNT 신호 전달 경로 활성화제(예를 들어, CHIRON/GSK2 억제제)와 접촉시키는 단계, 및 (b) 단계(a)의 중간 후장 회전 타원체를 상기 인간 결장 유사장기를 형성하기에 충분한 시간 동안 BMP 활성화제 및 EGF 신호 전달 경로 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 인간 결장 유사장기는 SATB2 를 발현한다.

[0021] 일 측면에서, DE는 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 중배엽 세포, 최종 내배엽 세포, 후 내배엽 세포, 후장 세포 또는 이들의 조합물에서 선택된 전구 세포에서 유래될 수 있다.

[0022] 일 측면에서, FGF 신호 전달 경로 활성화제는 소분자 또는 단백질 FGF 신호 전달 경로 활성화제, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19 , FGF20, FGF21, FGF22, FGF23 또는 이들의 조합물에서 선택될 수 있다. WNT 신호 경로 활성화제는 소분자 또는 단백질 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, 바람직하게는 염화 리튬; 2-아미노-4,6-이중 치환된 피리미딘(헤테로)아릴피리미딘; IQ1; QS11; NSC668036; DCA 베타 카테닌; 2-아미노-4-[3,4-(메틸렌디옥시)-벤질-아미노]-6-(3-메톡시페닐)피리미딘, Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b , Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, GSK3 억제제, 바람직하게는 CHIRON 또는 이들의 조합물에서 선택될 수 있다. 일 측면에서, BMP 활성화제는 BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP 경로를 활성화시키는 소분자, BMP 경로를 활성화시키는 단백질에서 선택될 수 있으며, 다음을 포함할 수 있다:Noggin, 도르소모르핀(Dorsomorphin), LDN189, DMH-1, 벤트로모핀 및 이들의 조합물.

[0023] 일 측면에서, 상기 DE가 중간 후장 회전 타원체를 형성하기에 분한 시간은 상기 단계(a)의 상기 중간 후장 회전 타원체에 의한 CDX2의 발현에 의해 결정될 수 있다. 이러한 측정은 일상적인 방법을 사용하여 당업자가 할 수 있는 능력 내에 있다.

[0024] 일 측면에서, 중간 후장 회전 타원체가 인간 결장 유사장기를 형성하기에 충분한 기간은 상기 인간 결장 유사장기의 세포에 의한 SATB2 및 CDX2의 발현에 의해 결정되되, SATB2 및 CDX2가 발현될 때, 중간 후장 회전 타원체는 인간의 결장 조직을 이미 형성한 후이다. 그러한 측정은 시간 측정 대신에 사용될 수 있는데, 상기 나열된 유전자의 발현이 단계(a) 및(b)가 충분한 기간 동안 수행되었음을 나타내기 때문이다.

[0025] 일 측면에서, 본원에 기재된 방법에 따라 수득된 HCO가 개시된다. 본 발명의 HCO는 다양한 상이한 방식으로 특성화될 수 있다. 일 측면에서, 상기 HCO는 결장 장내분비(enteroendocrine) 세포(EEC)의 존재를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 상기 HCO는 음와(crypt)의 존재를 특징으로 할 수 있고 실질적으로 융모가 없다. 일 측면에서, 상기 HCO는 결장-특이성 배상 세포의 존재를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 상기 HCO는 실질적으로 파네스(Paneth) 세포가 없는 것을 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 상기 HCO는 결장-특이적 호르몬인 INSL5를 분비하는 능력을 특징으로 할 수 있다. 장 유사장기는 면역 기능, 신경 분포, 혈관, 융모 및 판테스 세포 중 하나 이상이 없을 수 있다.

[0026] 일 측면에서, 결장 조직을 형성하는 방법이 개시되되, 기술된 발명의 HCO가 포유류, 바람직하게는 설치류, 바람직하게는 면역 저하된 설치류, 바람직하게는 면역 저하된 마우스의 신피막 하에 이식될 수 있다.

[0027] 일 측면에서, 본원에 개시된 HCO는 대장염, 결장암, 용종증 증후군 및/또는 과민성 대장 증후군에서 선택된 질환에 대한 잠재적 치료제의 효능 및/또는 독성을 판단하는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 상기 잠재적 치료제

의 효능 및/또는 독성을 판단하기에 충분한 시간 동안 잠재적 치료제를 본원에 기재된 HCO와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0028] 일 측면에서, 임의의 한 항의 HCO에서 유도된 장 콜로노이드가 고려된다.

[0029] 일부 측면에서, 다능성이거나 다능성이 되도록 유도될 수 있는 줄기 세포가 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 다능성 줄기 세포는 초기 포유류 배아의 전능 세포에서 차례로 유도되고, 무제한의 미분화된 증식이 가능한 배아 줄기 세포에서 유래된 것이다. 배아 줄기 세포는 초기 단계의 배아인 배반포의 내부 세포 덩어리에서 유래된 다능성 줄기 세포이다. 배반포에서 배아 줄기 세포를 유도하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 3개의 세포주(H1, H13, 및 H14)는 정상적인 XY 핵형을 가지고, 두 개의 세포주(H7과 H9)는 정상적인 XX 핵형을 가지고 있었다. 인간 배아 줄기 세포 H9(H9-hESC)는 본원에 기술된 예시적인 측면에서 사용되지만, 본원에 기술된 방법 및 시스템이 임의의 줄기 세포에 적용 가능하다는 것은 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0030] 본 발명에 따른 측면에서 사용될 수 있는 추가의 줄기 세포에는, 비제한적으로, 국립 줄기 세포 은행(National Stem Cell Bank, NSCB), 캘리포니아 샌프란시스코 대학(UCSF)의 인간 배아 줄기 세포 연구 센터; Wi 세포 연구소의 WISC 세포 은행; 위스콘신 대학 줄기 세포 및 재생 의학 센터(UW-SCRMC); Novocell, Inc. (San Diego, Calif.); Cellartis AB(예테보리, 스웨덴); ES Cell International Pte Ltd(싱가포르); 이스라엘 공대(Haifa, Israel)에서 관리하는 데이터베이스; 및 프린스턴 대학 및 펜실베니아 대학에서 관리하는 줄기 세포 데이터베이스에 의해 제공되거나 또는 그것에 기술된 것들이 포함된다. 본 발명에 따른 측면에서 사용될 수 있는 예시적인 배아 줄기 세포에는, 비제한적으로, SA01(SA001); SA02(SA002); ES01(HES-1); ES02(HES-2); ES03(HES-3); ES04(HES-4); ES05(HES-5); ES06(HES-6); BG01(BGN-01); BG02(BGN-02); BG03(BGN-03); TE03(13); TE04(14); TE06(16); UC01(HSF1); UC06(HSF6); WA01(H1); WA07(H7); WA09(H9); WA13(H13); WA14(H14)가 포함된다.

[0031] 일부 측면에서, 줄기 세포는 추가 특성을 포함하도록 추가로 변형된다. 예시적인 변형된 세포주에는, 비제한적으로, H1 OCT4-EGFP; H9 Cre-LoxP; H9 hNanog-pGZ; H9 hOct4-pGZ; H9 inGFPhES; 및 H9 Syn-GFP가 포함된다.

[0032] 배아 줄기 세포에 대한 자세한 내용은 예를 들어 Thomson *et al.*, 1998, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," *Science* 282 (5391):1145-1147; Andrews *et al.*, 2005, "Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin," *Biochem Soc Trans* 33:1526-1530; Martin 1980, "Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis,". *Science* 209 (4458):768-776; Evans and Kaufman, 1981, "Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos," *Nature* 292(5819): 154-156; Klimanskaya et al., 2005, "Human embryonic stem cells derived without feeder cells," *Lancet* 365 (9471): 1636-1641에서 발견될 수 있고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0033] 대안적으로, 다능성 줄기 세포는 배아 생식 세포(EGCs)에서 유래될 수 있는데, 이는 유성생식을 하는 유기체의 생식 세포를 발생시키는 세포이다. EGCs는 후기 배아의 생식선 융기에서 발견된 원시 배아 세포에서 유래되었으며, 배아 줄기 세포의 많은 특성을 가지고 있다. 배아의 원시 생식세포는 줄기 세포로 발전하여 성인에서는 생식세포체(정자 또는 난자)를 생성한다. 생쥐와 인간에서, 적절한 조건 하의 조직 배양물에서 배아 생식 세포를 성장시키는 것이 가능하다. EGC와 ESC는 모두 다능성이다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "ESC"는 때로는 배아 생식 세포를 포함하도록 광범위하게 사용된다.

[0034] 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)

[0035] 일부 측면에서, iPSC는 특정 줄기 세포-관련 유전자를 성인 섬유 모세포와 같은 비-다능성 세포로 형질 감염시킴으로써 유도된다. 형질감염은 레트로 바이러스와 같은 바이러스 벡터를 통해 달성될 수 있다. 형질 감염된 유전자에는, 다른 유전자들이 유도 효율을 향상시키는 것으로 알려져 있지만, 마스터 전사 조절 인자 Oct-3/4(Pouf51)와 Sox2가 포함된다. 3~4 주 후, 소수의 형질 감염된 세포는 다능성 줄기 세포와 형태학적으로 생화학 적으로 유사하기 시작하며, 형태학적 선택, 배가된 시간을 통해 또는 리포터 유전자 및 항생제 선택을 통해 전형적으로 단리된다. 본 명세서에 사용된 iPSC에는, 비제한적으로, 마우스의 1 세대 iPSC, 2 세대 iPSC 및 인간 유도 다능성 줄기 세포가 포함된다.

[0036] 일부 측면에서 비-바이러스 기반 기술을 사용하여 iPSC를 생성할 수 있다. 일부 측면에서, 아데노바이러스가 사용되어 마우스의 피부 및 간세포 DNA로 필요한 4 개의 유전자를 수송할 수 있는데, 이것은 결과적으로 배아 줄기 세포와 동일한 세포를 야기한다. 아데노 바이러스는 자신의 유전자를 표적화된 숙주와 결합시키지 않기 때문에, 종양 생성의 위험이 제거된다. 일부 측면에서, 재프로그램화는, 비록 효율이 매우 낮지만, 바이러스 형질감염 없이 플라스미드를 통해 수행될 수 있다. 다른 측면에서, 단백질의 직접 전달을 사용하여 iPSC를 생성함으로

써, 바이러스 또는 유전적 변형의 필요성이 제거된다. 일부 구현예에서, 마우스 iPSCs의 생성은 하기의 유사한 방법론을 사용하여 가능하다: 폴리-아르기닌 앵커를 통해 세포 내로 보내진 특정 단백질로 세포를 반복적으로 처리하면 다능성을 유도하기에 충분했다. 일부 측면에서, 다능성 유도 유전자의 발현은 저 산소 조건 하에서 FGF2로 체세포를 처리함으로써 또한 증가될 수 있다.

[0037] 배아 줄기 세포에 대한 자세한 내용은 예를 들어, Kaji *et al.*, 2009, "Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors," *Nature* 458:771-775; Woltjen *et al.*, 2009, "*piggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells," *Nature* 458:766-770; Okita *et al.*, 2008, "Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors," *Science* 322(5903):949-953; Stadtfeld *et al.*, 2008, "Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration," *Science* 322(5903):945-949; and Zhou *et al.*, 2009, "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins," *Cell Stem Cell* 4(5):381-384에서 발견될 수 있고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0038] 일부 측면에서, 예시적인 iPS 세포주는, 비제한적으로, iPS-DF19-9; iPS-DF19-9; iPS-DF4-3; iPS-DF6-9; iPS (포피); iPS(IMR90); 및 iPS(IMR90)을 포함한다.

[0039] **최종 내배엽**

[0040] 본 개시의 HCO는 최종 내배엽(DE)라고 불리는 단순한 세포 시트에서 유도될 수 있다. 전구체 세포에서 최종 내배엽을 유도하는 방법은 D' Armor 2005 및 Spence et al. 등에 의해 교시된 바와 같이 당업계에 잘 알려져 있다. 전방 DE는 전장 및 그것과 관련된 기관, 예컨대 간과 췌장을 형성하고 후방 DE는 중간 장 및 후장(midgut and hindgut)을 형성하여, 소장 및 대장 및 비뇨 생식기 계통의 일부를 형성한다. 마우스, 병아리 및 개구리 배아를 이용한 연구는 낭배기(gastrula stage)의 DE에서 전-후방 패턴을 확립하는 것이 후속 전방-후방 발달을 위한 전제 조건임을 시사한다. Wnt 및 FGF 신호 전달 경로는 이 과정에 중요하며 후방 내배엽 및 후장의 운명(fate)을 촉진하고, 전방 내배엽 및 전장 운명을 억제하는 작용을 한다고 알려져 있다. 후장의 단순한 입방 상피는 우선 거짓중층 원주 상피로 발달하고, 이어서 가정에 있는 조상 부위와 일치하는 융모의 기초에 극화된 원주 상피와 증식 부위를 포함하는 융모로 발달한다.

[0041] 출원인은 본원에서 DE의 분화를 장 조직, 특히 인간 결장 조직 *으로 체외에서 유도*하기위한 견고하고 효율적인 방법을 설명한다. 유도된 분화는 iPSC 및/또는 DE 세포에서 특정 신호 전달 경로를 선택적으로 활성화시킴으로써 달성될 수 있다.

[0042] 일반적으로 장 발달과 관련된 경로의 추가 세부 사항은 예를 들어, Sancho *et al.*, 2004, "Signaling Pathways in Intestinal Development and Cancer," *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:695-723; Logan and Nusse, 2004, "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease," *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:781-810; Taipale1 and Beachy1, 2001, "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer," *Nature* 411:349-354; Gregorieff and Clevers, 2005, "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer," *Genes & Dev.* 19: 877-890에서 발견되고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 참고 문헌으로 포함된다. DE 발달과 관련된 신호 전달 경로의 기능에 대한 좀 더 자세한 내용은 예를 들어 Zorn and Wells, 2009, "Vertebrate endoderm development and organ formation," *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:221-251; Dessimoz *et al.*, 2006, "FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis *in vivo*," *Mech Dev* 123:42-55; McLin *et al.*, 2007, "Repression of Wnt/{beta}-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. Development," 134:2207-2217; Wells and Melton, 2000, *Development* 127:1563-1572; de Santa Barbara *et al.*, 2003, "Development and differentiation of the intestinal epithelium," *Cell Mol Life Sci* 60(7): 1322-1332에서 발견될 수 있고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0043] 다능성 세포(예:iPSC 또는 ESC)에서 최종 내배엽을 생산하는 방법은 본원에 기술된 방법에 적용할 수 있다. 일부 측면에서, 다능성 세포는 상실배에서 유도된다. 일부 측면에서, 다능성 줄기 세포는 줄기 세포이다. 이러한 방법에 사용되는 줄기 세포에는, 비제한적으로, 배아 줄기 세포가 포함된다. 배아 줄기 세포는 배아 내 세포 덩어리 또는 배아 생식선에서 유래될 수 있다. 배아 줄기 세포 또는 생식 세포는, 비제한적으로, 인간을 비롯한 다양한 포유 동물 종을 포함하는 다양한 동물 종에서 유래할 수 있다. 일부 측면에서, 최종 내배엽을 생산하기 위해 인간 배아 줄기 세포가 사용된다. 일부 측면에서, 최종 내배엽을 생산하기 위해 인간 배아 생식 세포가 사용된다. 일부 측면에서, 최종 내배엽을 생성하기 위해 iPSC가 사용된다.

[0044] 일부 측면에서, 다능성 줄기 세포에서 DE 세포로의 분화 과정에 하나 이상의 성장 인자가 사용된다. 분화 과정에서 사용되는 하나 이상의 성장 인자에는 TGF-β 수퍼 패밀리에서의 성장 인자가 포함될 수 있다. 이와 같은 측면에서, 하나 이상의 성장 인자는 성장 인자의 TGF-베타 수퍼 패밀리의 Nodal/Activin 및/또는 BMP 서브 그룹을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 성장 인자는 Nodal, Activin A, Activin B, BMP4, Wnt3a 또는 임의의 이들 성장 인자의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 측면에서, 배아 줄기 세포 또는 생식 세포 및 iPSC는 하나 이상의 성장 인자로 6 시간 이상; 12 시간 이상; 18 시간 이상; 24 시간 이상; 36 시간 이상; 48 시간 이상; 60 시간 이상; 72 시간 이상; 84 시간 이상; 96 시간 이상; 120 시간 이상; 150 시간 이상; 180 시간 이상; 또는 240 시간 이상 처리된다. 일부 측면에서, 배아 줄기 세포 또는 생식 세포 및 iPSC는 10ng/ml 이상; 20ng/ml 이상; 50ng/ml 이상; 75ng/ml 이상; 100ng/ml 또는 그 이상; 120ng/ml 또는 그 이상; 150ng/ml 이상; 200ng/ml 이상; 500ng/ml 이상; 1,000ng/ml 이상; 1,200ng/ml 이상; 1,500ng/ml 이상; 2,000ng/ml 이상; 5,000ng/ml 이상; 7,000ng/ml 이상; 10,000ng/ml 또는 그 이상; 또는 15,000ng/ml 이상의 농도로 상기 하나 이상의 성장 인자로 처리된다. 일부 측면에서, 성장 인자의 농도는 처리 과정 중에 일정한 수준으로 유지된다. 다른 측면에서, 성장 인자의 농도는 처리 과정 동안 변경된다. 일부 측면에서, 성장 인자는 다양한 HyClone 농도를 갖는 태아 소 세린(FBS)을 포함하는 배지에 현탁된다. 당업자는 본원에 기재된 처방이 단독으로 또는 조합하여 임의의 공지된 성장 인자에 적용 가능하다는 것을 이해할 것이다. 둘 이상의 성장 인자가 사용될 때, 각 성장 인자의 농도는 독립적으로 변화될 수 있다.

[0045] 일부 측면에서, 최종 내배엽 세포에 풍부한 세포 집단이 사용된다. 일부 측면에서, 최종 내배엽 세포는 단리되거나 실질적으로 정제된다. 일부 측면에서, 단리되거나 실질적으로 정제된 최종 내배엽 세포는 SOX17, FOXA2 및/또는 CXRC4 표지자를 OCT4, AFP, TM, SPARC 및/또는 SOX7 표지자보다 더 많이 발현한다. 최종 내배엽을 갖는 세포 집단을 풍부하게 하는 방법 또한 고려된다. 일부 측면에서, 최종 내배엽 세포는 정제된 내배엽 세포의 표면 상에 존재하지만 다른 세포의 표면 상에 존재하지 않는 분자에 결합하는 시약과 세포를 접촉시키고, 이어서 시약에 결합된 세포를 단리함으로써, 혼합된 세포 집단에서 단리되거나 실질적으로 정제될 수 있다. 특정 측면에서, 최종 내배엽 세포의 표면 상에 존재하는 세포 성분은 CXCR4이다.

[0046] 본 발명에서 사용될 수 있는 DE 세포를 획득하거나 생성하기 위한 추가의 방법에는, 비제한적으로, D'Amour et al.의 미국 특허 제 7,510,876 호; Fisk 등의 미국 특허 제 7,326,572 호; Kubo1 et al., 2004, "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture," Development 131:1651-1662; D'Amour *et al.*, 2005, "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm," Nature Biotechnology 23:1534-1541; and Ang *et al.*, 1993, "The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins," *Development* 119:1301-1315에 기술된 것이 포함되고; 이들 각각은 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0047] **최종 내배엽에서 중장-후장 회전 타원체로**

[0048] 일부 측면에서, DE의 사후 내배엽 세포는 하나 이상의 특화된 세포 유형으로 추가로 발달된다. 액티빈에 의해 유도되는 최종 내배엽(DE)은 FGF/Wnt에 의해 유도된 후방 내배엽 패턴화, 후장 지정(specification) 및 형태 형성, 및 최종적으로, 장 세포 성장, 형태 형성 및, 장 세포, 배상 세포, 파네스 세포 및 장내분비 세포를 비롯한 기능성 장 세포 유형으로의 세포분화를 촉진한 장 발달 배양 체계(pro-intestinal culture system)를 추가로 겪을 수 있다. 일부 측면에서, 인간 PSC는 체외에서 분비, 내분비 및 흡수 세포 유형을 포함할 수 있는 장 상피로 효율적으로 분화하도록 유도된다. 성장 인자와 같은 분자가 특정 유형의 장 조직 형성을 촉진시키기 위해 임의의 성장 단계에 첨가될 수 있음이 이해될 것이다.

[0049] ESC 및 iPSC와 같은 PSC는 처음에는 최종 내배엽(DE)으로, 이어서 중장-후장 상피 및 중간엽(*예를 들어* , 후장 회전 타원체)으로, 그러고 나서 장 조직으로 단계별 또는 비-단계별로 유도된 분화를 겪는다. 일부 측면에서, 최종 내배엽 세포 및 hESC는 하나 이상의 성장 인자로 처리된다.

[0050] 일부 측면에서, 용해성 FGF 및 Wnt 리간드는 iPSCs 또는 ESCs에서 발달된 DE를, 직접 분화를 통해, 모든 주요 장 세포 유형을 효율적으로 유발하는 후장 상피로 전환시키는 배양물에서 조기 후장 지정을 모방하는 데 사용된다. 인간에서, DE의 직접 분화는 장 발달에 중요한 특정 신호 전달 경로를 선택적으로 활성화시킴으로써 이루어진다. 임의의 FGF 리간드와 조합하여 임의의 Wnt 신호 전달 단백질의 발현을 변경하면 본원에 기술된 바와 같은 직접적인 분화를 일으킬 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0051] 더 자세한 내용은 예를 들어 Liu *et al.*, "A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway," *Angew Chem Int Ed Engl.* 44(13):1987-1990 (2005); Miyabayashi *et al.*, "Wnt/beta-catenin/CBP signaling

maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency," *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(13):5668-5673 (2007); Zhang *et al.*, "Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway," *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(18):7444-7448 (2007); Neiiendam *et al.*, "An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons," *J Neurochem.* 91(4):920-935 (2004); Shan *et al.*, "Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain," *Biochemistry* 44(47):15495-15503 (2005); Coghlan *et al.*, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," *Chem Biol.* 7(10):793-803 (2000); Coghlan *et al.*, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," Chemistry & Biology 7(10):793-803; and Pai *et al.*, "Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness," *Mol Biol Cell.* 15(5):2156-2163 (2004)에서 발견되고; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 통합된다.

[0052] 일부 측면에서, Wnt 및/또는 FGF 신호 전달 경로와 관련된 세포 성분 요소를 표적으로 하는 siRNA 및/또는 shRNA는 이러한 경로를 활성화시키는데 사용될 수 있다.

[0053] Wnt 신호 전달 경의 조절제/활성화제에는 Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 및 Wnt16이 포함된다. 일부 측면에서, 경로의 조절은 전술한 경로를 활성화시키는 소분자 조절제 또는 단백질 조절제 또는 상기 경로를 활성화시키는 단백질의 사용을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, Wnt 경로의 소형 분자 조절제에는, 비제한적으로, 염화 리튬; 2-아미노-4,6-이중 치환된 피리미딘(헤테로) 아릴피리미딘; IQ1; QS11; NSC668036; DCA 베타 카테닌; 2-아미노-4-[3,4-(메틸렌디옥시)-벤질-아미노]-6-(3-메톡시페닐) 피리 미딘이 포함된다. Wnt 신호 전달의 예시적인 천연 억제제에는, 비제한적으로, Dkk1, SFRP 단백질 및 FrzB이 포함된다. 일부 측면에서, 외인성 분자에는, 비제한적으로, WAY-316606과 같은 소형 분자; SB-216763; 또는 BIO(6-브로모 인디루빈-3'-옥심)이 포함된다. 일부 측면에서, Wnt 및/또는 FGF 신호 전달 경로와 관련된 세포 성분 요소를 표적으로 하는 siRNA 및/또는 shRNA는 이러한 경로를 활성화시키는데 사용될 수 있다. 당해 분야의 숙련자는 표적 세포 성분에, 비제한적으로, SFRP 단백질; GSK3, Dkk1 및 FrzB이 포함됨을 이해할 것이다. 추가적인 조절제에는 Wnt 신호 전달 경로를 활성화시키는, GSK3를 억제하는 분자 또는 단백질이 포함된다. 예시적인 GSK3 억제제에는, 비제한적으로, 예를 들어 GSK3â를 억제하는 Chiron/CHIR99021이 포함된다. 당업자는 개시된 방법을 수행하기에 적합한 GSK3 억제제를 인식할 것이다. GSK3 억제제는 약 1uM 내지 약 100uM, 또는 약 2uM 내지 약 50uM, 또는 약 3uM 내지 약 25uM의 양으로 투여될 수 있다. 당업자라면 적절한 양 및 기간을 쉽게 알 수 있을 것이다.

[0054] 섬유 아세포 성장 인자(Fibroblast growth factor, FGF)는 혈관 신생, 상처 치유 및 배아 발육과 관련된 성장 인자군이다. 일부 측면에서, 임의의 FGF가 Wnt 신호 경로에서 유래된 단백질과 함께 사용될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 일부 측면에서, 가용성 FGF에는, 비제한적으로, FGF4, FGF2 및 FGF3이 포함된다. 일부 구현예에서, FGF 신호 전달 경로는 FGF1 , FGF2, FGF3, FGF4, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 및 FGF23로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분자와 전구 세포를 접촉시킴으로써 활성화된다. 일부 구현예에서, FGF 신호 전달 경로와 관련된 세포 성분 요소를 표적으로 하는 siRNA 및/또는 shRNA는 이러한 경로를 활성화시키는데 사용될 수 있다. Wnt 및 FGF 신호 전달 경로와 관련하여 본원에 기술된 방법 및 조성물이 실시예에 의해 제공됨을 당업자가 이해할 것이다. 유사한 방법 및 조성물이 본원에 개시된 다른 신호 전달 경로에도 적용 가능하다.

[0055] 일부 측면에서, DE 배양물은 본원에 기재된 신호 전달 경로의 하나 이상의 조절제로 6 시간 이상; 12 시간 이상; 18 시간 이상; 24 시간 이상; 36 시간 이상; 48 시간 이상; 60 시간 이상; 72 시간 이상; 84 시간 이상; 96 시간 이상; 120 시간 이상; 150 시간 이상; 180 시간 이상; 200 시간 이상, 240 시간 이상; 270 시간 이상; 300 시간 이상; 350 시간 이상; 400 시간 이상; 500 시간 이상; 600 시간 이상; 700 시간 이상; 800 시간 이상; 900 시간 이상; 1,000 시간 이상; 1,200 시간 이상; 또는 1,500 시간 이상 동안 처리된다.

[0056] 일부 측면에서, DE 배양물은 10ng/ml 이상; 20ng/ml 이상; 50ng/ml 이상; 75ng/ml 이상; 100ng/ml 또는 그 이상; 120ng/ml 또는 그 이상; 150ng/ml 이상; 200ng/ml 이상; 500ng/ml 이상; 1,000ng/ml 이상; 1,200ng/ml 이상; 1,500ng/ml 이상; 2,000ng/ml 이상; 5,000ng/ml 이상; 7,000ng/ml 이상; 10,000ng/ml 또는 그 이상; 또는 15,000ng/ml 이상의 농도로 본원에 기재된 FGF 신호 전달 경로의 하나 이상의 분자로 처리된다. 일부 측면에서, 신호 전달 분자의 농도는 처리 과정 중에 일정하게 유지된다. 다른 측면에서, 신호 전달 경로의 분자의 농도는

처리 과정 동안 변화된다. 일부 측면에서, 본 발명에 따른 신호 전달 분자는 DMEM 및 소 태아 혈청(fetal bovine serine, FBS)을 포함하는 배지에 현탁된다. FBS는 2 % 이상; 5 % 이상; 10 % 이상; 15 % 이상; 20 % 이상; 30 % 이상; 또는 50 % 이상의 농도일 수 있다. 당업자는 본원에 기술된 요법이, 비제한적으로, Wnt 및 FGF 신호 전달 경로의 임의의 분자를 포함하는, 본원에 기재된 신호 경로의 임의의 공지된 분자에, 단독으로 또는 조합하여 적용 가능하다는 것을 이해할 것이다.

[0057] 2 개 이상의 신경전달 분자가 DE 배양물을 처리하는 데 사용되는 측면에서, 신호 전달 분자는 동시에 또는 개별적으로 첨가될 수 있다. 2 개 이상의 분자가 사용되는 경우, 각각의 농도는 독립적으로 변할 수 있다.

[0058] CDX2의 발현은 DE가 FGF 신호 전달 활성화제 및 Wnt 신호 활성화제, 예를 들어, FGF4 및 Wnt3a와 함께, 예를 들어 12 시간 이상; 18 시간 이상; 24 시간 이상; 36 시간 이상; 48 시간 이상; 60 시간 이상; 또는 90 시간 이상 동안 배양된 후, 후장 형성 경향을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 장기간 발현된 CDX2에 의해 측정된 안정한 후 내배엽 표현형을 달성하기 위해 보다 긴 배양 시간이 필요하다. 이와 같은 일 측면에서, 배양 기간은 60 시간 이상; 72 시간 이상; 84 시간 이상; 96 시간 이상; 108 시간 이상; 120 시간 이상; 140 시간 이상; 160 시간 이상; 180 시간 이상; 200 시간 이상; 240 시간 이상; 또는 300 시간 이상이 될 수 있다.

[0059] 대안적으로, 일부 측면에서, 전장 표지자 Sox2, Pdx1, Cldn18 및 알부민과 같은 세포 성분의 부재는 유도된 후장 형성을 나타내는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 장내 전사 인자 CDX2, KLF5 및 SOX9가 장 발달을 나타내는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, GATA6 단백질 발현이 장 발달을 나타내는 데 사용될 수 있다. 이와 같은 측면에서, 배양 기간은 12 시간 이상; 18 시간 이상; 24 시간 이상; 36 시간 이상; 48 시간 이상; 60 시간 이상; 또는 90 시간 이상이 될 수 있다. 대안적으로, 배양 기간은 60 시간 이상; 72 시간 이상; 84 시간 이상; 96 시간 이상; 108 시간 이상; 120 시간 이상; 140 시간 이상; 160 시간 이상; 180 시간 이상; 200 시간 이상; 240 시간 이상; 또는 300 시간 이상이 될 수 있다.

[0060] 일부 측면에서, 세포 성분 예를 들어, 단백질 및/또는 유전자 발현 수준의 풍부 데이터는 관련 신호 경로에서 분자를 표적으로 하는 1 차 및/또는 2 차 항체를 사용하는 면역 조직 화학에 의해 결정된다. 다른 측면에서, 세포 성분, 예를 들어, 단백질 및/또는 유전자 발현 수준의 의 풍부 데이터는 마이크로어레이 분석에 의해 결정된다.

[0061] 또 다른 방법으로, 형태학적 변화는 유도된 분화의 진행을 나타내는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 후장 회전 타원체는 추가 성숙을 위해 3 차원 배양 조건에 추가로 종속된다. 다른 측면에서, 중간엽 세포에 의해 둘러싸인 고도의 복잡한(convoluted) 상피가 후장의 회전 타원체 형성 후에 관찰 될 수 있다. 또한, 장 유사장기; 분극된 원주 상피; 배상 세포; 또는 평활근 세포가 6 일 이상; 7 일 이상; 9 일 이상; 10 일 이상; 12 일 이상; 15 일 이상; 20 일 이상; 25 일 이상; 28 일 이상; 32 일 이상; 36 일 이상; 40 일 이상; 45 일 이상; 50 일 이상; 또는 60 일 이상 관찰 될 수 있다.

[0062] **중장-후장 회전 타원체에서 결장 유사 장기로**

[0063] FGF 및 WNT 신호 전달 외에도, BMP(Bone Morphogenetic Protein), 특히 BMP2 및 BMP4가 후방/후장 운명을 촉진하고 전장 운명을 억압할 수 있음이 밝혀졌다. 또한, BMP 신호 전달은 장의 뚜렷한 부위 유형의 형성을 조절한다. 후장 단계 후에 noggin으로 BMP를 억제하면 근위 장의 운명(십이지장/공장)이 촉진된다. 후장 단계 후에 BMP 신호 전달을 활성화 시키면 좀더 먼 원위 장 세포의 운명(맹장/결장)이 촉진된다.

[0064] BMP의 활성화는 상기 인간 결장 유사장기를 형성하기에 충분한 시간 동안 중장-후장 회전 타원체를 BMP 활성화제 및 EGF 신호 전달 경로 활성화제와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 배양기간의 경계는 인간 결장 유사장기가 SATB2를 발현하는 시점에 의해 정의될 수 있다. 적합한 BMP 활성화제 및 EGF 신호 전달 경로 활성화제는 당업자에 의해 용이하게 이해될 것이다. 적합한 BMP 활성화제에는, 예를 들어 BMP2, BMP4, BMP7, BMP9 및 단백질, 또는 벤트로모르핀(Genthe 등, 2017)과 같은 소분자 작용제 또는 작용제로서 작용하는 단백질이 포함될 수 있다. BMP 활성화제 및 EGF 신호 전달 경로 활성화제는 약 1 일 내지 약 3 일 동안 중장-후장 회전 타원체와 접촉될 수 있다. BMP 신호 전달은 처음 3 일 이내에 활성화될 수 있다. 일 측면에서, BMP 활성화제 및 EGF 신호 전달 경로 활성화제의 접촉 단계는 24 시간 내지 약 10 일, 또는 약 48 시간 내지 약 9 일, 또는 약 3 일 내지 약 8 일, 또는 약 4 일 약 8 일, 또는 약 5 일 내지 약 7 일 동안 지속될 수 있다. 적합한 EGF 활성화 인자에는, 예를 들어 TGF 알파, HB-EGF, 암피레귤린, 에피겐, 베타 셀 룰린 및, db-cAMP와 같은 소분자가 포함될 수 있다. EGF 활성화제는 약 10ng/ml 내지 10,000ng/ml의 농도로 약 24 시간 내지 약 10 일 또는 약 48 시간 내지 약 9 일, 또는 약 3 일 내지 약 8 일, 또는 약 4 일 내지 약 8 일, 또는 약 5 일 내지 약 7 일 동안,

중장-후장 회전 타원체와 접촉될 수 있다.

[0065] 상기 중장-후장 회전 타원체는 5ng/ml 이상; 20ng/ml 이상; 50ng/ml 이상; 75ng/ml 이상; 100ng/ml 또는 그 이상; 120ng/ml 또는 그 이상; 150ng/ml 이상; 200ng/ml 이상; 500ng/ml 이상; 1,000ng/ml 이상; 1,200ng/ml 이상; 1,500ng/ml 이상; 2,000ng/ml 이상; 5,000ng/ml 이상; 7,000ng/ml 이상; 10,000ng/ml 이상; 또는 15,000ng/ml 이상의 농도로 BMP 활성화제 및/또는 EGF 활성화제와, 단독으로 또는 조합하여 접촉될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 전달 분자의 농도는 처리 과정 동안 일정하게 유지된다. 다른 구현예에서, 신호 전달 경로의 분자의 농도는 처리 과정 동안 변화된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 신호 전달 분자는 DMEM 및 소 태아 혈청(fetal bovine serine, FBS)을 포함하는 배지에 현탁된다. FBS는농도가 2 % 이상; 5 % 이상; 10 % 이상; 15 % 이상; 20 % 이상; 30 % 이상; 또는 50 % 이상일 수 있다. 당업자는 본원에 기술된 요법이 본원에 기재된 신호 경로의 임의의 공지된 분자에 단독으로 또는 조합하여 적용 가능하다는 것을 이해할 것이다.

[0066] 실시예

[0067] 하기 비 제한적인 실시예는 본원에 개시된 본 발명의 측면을 추가로 설명하기 위해 제공된다. 하기 실시예에 개시된 기법은 본 발명의 실시에서 잘 기능하는 것으로 밝혀진 방법을 나타내므로 그 실시를 위한 모드의 예를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것이 당업자에게 자명하다. 그러나, 당업자라면, 본 개시 내용에 비추어 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 특정 측면에서 많은 변화가 이루어질 수 있고 여전히 유사하거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

[0068] 위장관의 상피는 이것은 장배 형성(gastrulation) 중에 확립되는 일차 배아층 중 하나인 최종 내배엽에서 유래된다. 장관 형태 생성 과정은 최종 내배엽을 전장, 중장 및 후장을 갖는 원시적 장관으로 변형시킨다. 중장은 소장 및 근위부의 대장을 생성하고, 후장은 원위 대장과 직장을 야기한다(Zorn and Wells, 2009). 소장은 영양분의 흡수와 철분 흡수에 관여하는 십이지장, 영양소의 소화 흡수에 관여하는 공장 및 담즙산과 비타민-B12의 흡수에 관여하는 회장(ileum)의 세 부분으로 세분된다(Jeejeebhoy, 2002). 대장은 물과 전해질의 흡수에 관여하는 맹장, 결장 및 직장으로 세분된다(Jeejeebhoy, 2002). 최근의 진보가 소장의 발달을 밝혀 주었지만(Finkbeiner et al., 2015; Spence et al., 2011; Watson et al., 2014), 사람의 대장/결장 발달에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 또한 위장관의 이들 부위에 생기는 질병들, 대장염, 결장암, 용종증, 과민성 대장 증후군이 널리 퍼져 있다(Molodecky et al., 2012; Siegel et al., 2014; Zbuk and Eng, 2007). 용종증과 장암의 동물 모델은 폴립과 종양이 소장에서 우선적으로 형성되고 드물게 결장이나 직장에서 형성되기 때문에 제한적이다(Haramis et al., 2004; He et al., 2004; Moser et al., 1990).

[0069] 본 출원인은 이전에 인간 다능성 줄기 세포가 소장의 배아 발달과 유사한 유도성 분화 단계를 통해 장 조직으로 분화될 수 있는 방법을 기재하였다. 우선, 다능성 줄기 세포가 Activin A로 처리하여 최종 내배엽으로 분화된다. 고농도의 Wnt 및 FGF에 최종 내배엽의 노출이 중장-후장 관 회전 타원체로 형태 형성을 유도한다. 일단 형성되면, 이러한 중장-후장 회전 타원체는 장의 성장을 촉진하는 조건 하에 3 차원 배양에서 성장하면, 체내 소장 발달과 유사한 단계를 통해 이행하여 인간 장 유사장기(HIO)를 형성한다 (Spence et al., 2011). HIO는 소장의 동일성을 가지고 있으며 소장 생물학 모델링에 매우 유용함이 입증되었다(Bouchi et al., 2014; Finkbeiner et al., 2015; Watson et al., 2014; Xue et al., 2013). 그러나 지금까지는 PSC에서 유래한 대장 유사장기가 개발되지 않았으며, 대장에서 질병의 유행을 감안할 때, 이러한 시스템은 위장관의 이 부위에서 발달 및 질병 기전의 연구를 허용할 것이다.

[0070] 대장 유사장기를 생성하는 방법을 개발하기 위해, 본 출원인은 먼저 개구리, 생쥐 및 인간에서 추정되는 대장 상피의 최종 표지자로 Satb2를 식별하였다. Satb2를 표지자로 사용하여, 출원인은 후각-복부 발달에서 BMP의 공지된 역할과 일치하는, 개구리 및 마우스의 후방 장 내배엽의 지정에 BMP 신호 전달이 요구됨을 보여 주었다(Kumar et al., 2003; Roberts 등, 1995; Sherwood et al., 2011; Tiso et al., 2002; Wills et al., 2008). 또한 PSC 유래 장관 배양에서 3 일간 BMP 신호 전달의 자극이 후방 HOX 코드를 유도하고 SATB2- 발현 결장 유사장기를 형성하는데 충분하다. 인간 결장 유사장기(HCO)는 대장과 일치하는 표지자 프로필과 세포 유형을 가졌다. 또한 HCO는, HIOs는 아니지만, NEUROG3의 발현에 반응하여 결장 장내분비 세포(colonic enteroendocrine cell, EEC)를 형성함으로써, HCO가 기능적으로 결장 부위에 전념한다는 것을 보여 주었다. 또한 면역 저하 마우스의 신피막 아래 이식되고 8-10 주 동안 체내에서 성장한 HCO는 결장 형태를 갖는 조직을 형성하고, 결장 특이적 세포 유형을 포함하고, 증식 및 분화 부위 뿐만 아니라 잘 형성된 평활근층을 가짐으로써 부위적 동일성을 유지하였다. *체내에서* 자란 유사장기에서 유래된 장 엔테로이드와 콜로노이드가 부위적 동일성을 유지하였다. 마지막으로, RNA-seq 분석이 HIO와 HCO가 상당한 성숙을 겪었으며, 각각 소장 및 대장의 동일성

과 일치하는 부위 표지자를 발현함을 입증하였다. 요약하면, 본 출원인은 개구리 및 마우스에서 진화적으로 보존된 BMP-HOX 경로를 식별하고, 이를 사용하여 후장 패턴화 및 인간 결장 유사장기를 유도하였다.

[0071] 결과

[0072] SATB2 발현은 후방 배아 및 성인 장의 장 내배엽을 표시한다.

[0073] 중장 및 후장(소장 및 대장으로 추정됨)을 확립하는 분자 경로는, 부분적으로, 잘 정의된 표지자의 부족으로 인해 제대로 이해되지 못했다. 이것은 인간 PSC를 부위적으로 뚜렷하게 다른 장 유사장기, 특히 대장 유사장기로 분화하도록 유도하는 능력을 제한했다. 출원인은 따라서 마우스 배아 장관의 상이한 영역을 구별하는 표지자를 식별하고, 이들을 사용하여 조기 창자를 패턴화하는 신호 전달 경로를 조사하였다. 이전의 보고와 일치하게도, 출원인은 e9.5 마우스 배아에서, Gata4가 후방 전장에서 난황 줄기로의 장 내배엽을 표시함을 발견했다(도 8a)(Aronson et al., 2014; Battle et al., 2008; Beuling et al Beuling et al., 2007a; Beuling et al., 2007b; Beuling et al., 2010; Beuling et al., 2008b; Bosse et al., 2007; Kohlnhofer et al., 2016; Patankar et al., 2012a; Patankar et al., 2012b; Sherwood et al., 2009; Walker et al., 2014). 발달 후기 단계(e11.5-e16.5)에서, Gata4는 후방의 창자가 아니라 전방의 창자를 지속적으로 뚜렷히 표시했다(도 8b~d, i~j). 이 발현 영역은 마우스(도시되지 않음) 및 인간(도 8k~l) 둘 다에서 성인기까지 손상되지 않은 채로 있다.

[0074] 후방 태아 장의 표지자를 확인하기 위해, 출원인은 결장에 풍부한 유전자(재료 및 방법 섹션에 기술되어 있음)를 찾기 위해 GNCProTM, TiGER 및 Human Protein Atlas와 같은 공공 발현 데이터베이스를 뒤졌고, Satb2가 대장의 잠재적 표지자임을 발견했다. Satb2는 핵 모세관 결합 부위에 결합하고 염색질 재구성에 관여하는(Gyorgy et al., 2008) 호메오박스(homeobox) 유전자의 CUT-클래스(Holland et al., 2007)의 구성원이다. 면역 염색은 Satb2 단백질이 e9-9.5에서 마우스 배아의 후 내배엽에서 처음으로 검출되었고, 난황 줄기에서 Gata4(도 8a)와는 신중한 발현 경계를 형성하였음을 보여주었는데, 이것은 Satb2 + 영역이 이전에 확인된 것(Dobreva et al., 2006)보다 더 넓은 발현인 후방 창자를 표시 함을 시사한다. Satb2 발현은 발달(e11.5-16.5)(도 8b, c, e, f, h, j) 전 기간 동안, 그리고 마우스(도시되지 않음) 및 인간(도 8l)의 출생 후 결장에서 후 장내 내배엽을 표시하였다. 공개된 인간 프로테옴 및 RNA-seq 데이터를 사용하여, 출원인은 GATA4 및 SATB2가 각각 인간 태아 및 성인 장의 근위 및 원위 부위를 차별적으로 표시한다는 것을 확인했다(Bernstein et al., 2010; Fagerberg et al., 2014)(Wang et al., 2015)(도 9a~c). 이 데이터는 Gata4 및 Satb2 발현 경계가 마우스의 발달 초기에 확립되고, 마우스 및 인간에서 발달되는 소장 및 대장의 미래 경계를 표시함을 입증한다.

[0075] **BMP 신호는 배아 후장 내배엽에서의 Satb2 발현에 필요하다.**

[0076] 출원인은 다음으로 배아에서 후방 창자의 운명을 촉진시키는 경로를 확인하기위한 지표로 Satb2를 사용했다. 출원인은 우선BMP 신호 전달이 제브라피시, 손톱개구리속, 병아리 및 마우스의 여러 단계의 발달 단계에서 내배엽을 패턴화하는 것으로 알려진 역할(Kumar et al., 2003; Roberts et al., 1995; Sherwood et al., 2011; Tiso et al., 2002; Wills et al., 2008)을 감안하여, 후방 장관에서 활성인지 여부를 판단하였다. 출원인은 BMP 신호 전달이 인산화된 Smad1/5/8(pSMAD1/5/8)(도 1a~b)에 의해 측정된 바와 같이 e8.5 마우스 배아의 후방 장관의 내배엽 및 중배엽에서 매우 활성임을 관찰하였다. BMP 신호 전달이 후방 장관의 패턴화에 필요한지 여부를 판단하기 위해, 본 출원인은 BMP 신호 전달 억제제 DMH-1(도 1c)에서 초기 머리주름 단계 마우스 배아(e7.5)를 배양하였다. 48 시간의 DMH-1 처리 후, 출원인은 pSmad1/5/8 수준의 현저한 감소 및 후방 장관에서의 Satb2 발현의 감소를 보았다(도 2d~k). 또한, 제브라피시의 이전 연구(Sheehan-Rooney et al., 2013)와 일치되게, DMH-1 처리 배아의 첫 번째 상완 아치에서 Satb2 발현이 상실되었다. DMH-1은 pSmad2/3 수준에 의해 측정된 바와 같이 TGFI3 신호 전달에 영향을 미치지 않았다(도 1f). 척추 동물 종에 걸친 Satb2의 진화적 보존을 감안하여(Li et al., 2006), 출원인은 BMP가 개구리 배아의 후장에서 Satb2 발현에 필요한지 여부를 조사하였다(도 2l). 마우스와 유사하게, DMH-1로의 손톱개구리속 배아의 처리 (도 1m~v) 또는 BMP-길항제 Noggin의 형질전환 발현(도시되지 않음)이 후장 및 상완 아치에서 Satb2 발현의 손실을 초래하였다. BMP 신호 전달은 Smad1/5를 보존된 인핸서에 직접 결합시킴으로써 마우스 배아 중궁에서 Satb2 발현을 직접 조절하는 것으로 나타났는데(Bonilla-Claudio et al., 2012), 이는 Satb2가 장에서 또한 직접적인 BMP 표적일 수 있음을 시사한다. 종합적으로 살펴보면 이와 같은 결과는 척추 동물에서 보존 경로를 밝혀주었고, 이로써 BMP 신호 전달이 원위 회장 및 대장을 생성하는 발달 중인 장관의 대부분의 후방 부위를 정의하는 데 필요함을 보여주었다.

[0077] **BMP 신호 전달이 인간 장관 배양물에서 후방의 운명을 촉진한다.**

[0078] 출원인은 다음으로 BMP 신호 전달이 이전에 기술된 바(Spence et al., 2011)와 같이 인간 PSC에서 유래된 초기 CDX2 + 장관 회전 타원체를 사용하여 인간에서 후방 장관을 촉진시키는데 사용될 수 있는지를 조사하였다. 출원인은 각각 BMP 억제제인 NOGGIN 또는 BMP2를 사용하여 BMP 신호 전달을 각각 억제하거나 활성화 시켰으며(도 2a), 핵 pSMAD1/5/8의 축적에 의해 BMP 신호 수준을 모니터링하였다. 대조군 배양물은 낮은 수준의 pSMAD1/5/8 단백질을 갖고, NOGGIN의 첨가는 이 염색을 취소시켰다(도 2b~d). 대조적으로, BMP2의 첨가는 상피 세포 및 중배엽 세포 모두에서 pSMAD158의 빠른 축적을 유발하였고, 이는 두 세포 유형이 본 출원인이 마우스 배아에서 관찰한 것과 유사한 BMP 신호에 반응한다는 것을 시사한다(도 1a~b). 성숙한 마우스 결장을 사용하여 pSmad1/5/8 염색의 특이성을 확인하였으며, 이는 이전에 보고된 바(Hardwick et al., 2004; van Dop et al., 2009; Whissell et al., 2014)와 같이 상부 음와의 분화된 구획으로 제한된 pSmad1/5/8 염색을 나타냈다(도 2e). 유사장기의 추가 분석에 따르면, 3 일간의 BMP2 처리가 NOGGIN 및 대조군 배양과 비교하여 상피에서 높은 수준의 SATB2 단백질을 유도하는데 충분함이 밝혀졌다(도 2f-i). 이것은 BMP 활동의 짧은 펄스가 회전 타원체 내배엽을 후방 장관 운명으로 패턴화하기에 충분함을 시사한다.

[0079] BMP 신호 전달이 내배엽의 전후방 패턴화를 조절하는 것으로 알려져 있지만, 포유 동물에서 A~P 축을 따라 궁극적으로 위치 동질성을 부여하는 전사 네트워크에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 출원인은 인간 장관 회전 타원체 및 RNA-seq를 사용하여 BMP 신호가 발달 중인 인간 창자에서 후방 영역을 확립하는 방법을 식별하였다. 주성분 분석 결과, BMP로 3 일간 처리한 장관 회전 타원체가 NOGGIN과 대조군으로 처리된 유사장기에서 별도로 군집되었다(도 2j). 유전자 온톨로지 용어(GO terms)를 조사한 결과, BMP 신호 전달의 조절은 기관 형태 형성, 세포-세포 신호 전달, 패턴 지정 및 BMP 신호 전달에 대한 세포 반응을 포함하는 다수의 생물학적 과정에 영향을 미친다(도 2k). A~P 패턴화의 가장 결정적인 조절 인자는 HOX 유전자이고, 출원인은 BMP 활성화가 전방 HOX 유전자의 하향 조절 및 후방 HOX 유전자의 상향 조절을 유도한다는 것을 발견하였다(도 2l). 특히, 출원인은 HOX 10, 11, 12 및 13 그룹의 다중 파라로그(paralog)에서 BMP-매개 증가를 관찰하였다. 이러한 결과는 BMP 신호 전달이 인간 장관의 패턴화 동안 A~P hox 코드를 광범위하게 조절함을 입증하고, 원위 GI 관이 처음 지정되는 메커니즘을 시사한다.

[0080] **BMP 신호 전달이 SHH의 하류에서 작용하여 후방 HOX 코드를 유도한다.**

[0081] 이전의 연구에 따르면, 소닉 헤지호그(Shh)가 병아리 배아에서 후장의 패턴화 동안 Bmp4 및 Hox13 발현의 상류에서 작용함을 시사한다(도 10a)(Roberts 등, 1995). 그러나, BMP와 Hox13(도 10b) 간의 상대적인 상위(epistatic) 관계는 중장 및 후장에서 Bmp4 과발현에 기인한 배아의 치사로 인해 조사되지 않았다(De Santa Barbara et al., 2005; Roberts et al., 1995). 출원인은 인간 장관 배양물을 사용하여 후방 장관 패턴화 중에 SHH-BMP-HOX13의 상위 관계를 보다 잘 모델링하였다. 평활화된 작용제 SAG로 헤지호그 신호 전달을 활성화 시키면 BMP 신호 전달 표적 유전자 MSX2 및 중간 엽성 HOX 인자, HOXA13 및 HOXD13의 농도 의존적 활성화가 유도되었다(도 10c). 그러나, 이들 인자의 SAG-매개된 활성화는 BMP2에 의해 활성화된 분획에 불과했다(도 10c). 출원인은 HOXA13을 활성화시키는 HH 신호 전달의 능력이 BMP에 전적으로 의존한다는 것을 보여 주었고(도 10d~e), 이것은 보고된 바(Shyer et al., 2015; Walton et al., 2012 Walton et al., 2009; Walton et al., 2016)와 같이 BMP 신호 전달이 SHH의 하류에서 기능함을 확인시켜주었다. BMP 신호 전달이 HH 신호 전달의 후방 HOX 프로그램을 활성화시키기에 충분한지 여부는 판단되지 않았다. 따라서, 출원인은 SHH 억제제인 사이클로 파민의 존재 하에 BMP에 의한 HOXA13 유도를 조사하였고, SHH 신호 전달이 억제될 때 HOXA13을 유도하는데 BMP2가 충분하다는 것을 발견하였다(도 10f~g). 이것과 일치하여, BMP 패턴화 동안 SHH 신호 전달의 활성화는 SATB2 발현을 향상시키지 못했다(도 11a). 손톱개구리속의 실험은 SHH와 BMP 사이의 이러한 상위 관계를 확인했는데(데이터는 표시되지 않음), 이것은 메커니즘이 진화적으로 보존되었음을 시사한다. 종합해보면, 출원인의 데이터는 BMP 신호 전달이 후방 HOX 코드를 활성화시키는 데 충분하고 HH 신호 전달의 하류에서 그렇게 한다는 것을 시사한다.

[0082] **체외에서 배양된 BMP 유래 유사장기는 원위 동일성을 유지한다.**

[0083] 출원인은 다음으로 3 일간의 BMP 처리가 25 일 동안의 유사장기의 연장된 배양 후 안정한 부위별 동일성을 부여하기에 충분한지를 조사 하였다(도 3). ONECUT1(근위부 소장 표지자)의 수준은 NOGGIN 및 대조군 처리 기관에서 가장 높았고, BMP2 처리 기관에서 부재하였다(도 3a~d). 반대로, SATB2는 NOGGIN 및 대조군 처리 기관의 상피에서는 결핍되었지만, BMP2 처리된 기관의 CDX2+ 상피 세포의 거의 모든 곳에서 광범위하게 발현되었다(도 3e~h, 도 11a). 중요하게도, BMP 신호 전달의 조절이 배아 줄기 세포주 H1 및 H9와 유도된 다능성 줄기 세포주(IPSC 54.1 및 IPSC 72.3)(아래 참조)를 포함하여 여러 인간 PSC 세포주에 유사한 근위-원위 패턴화 효과를 나타냈다. 출원인은 체외에서 HIOs에 존재하는 것으로 알려진 다른 세포 유형으로 인해(Spence et al., 2011), NOGGIN 및 대조군 유사장기에서 비-상피성 SATB2 발현(데이터는 표시되지 않음)을 빈번하게 관찰했다. 후방 상피 및 중간

엽에서 각각 발현되는 HOXB13 및 HOXD13의 시험은 BMP 처리 유사장기가 체외에서 연장된 배양 후 후방 패턴화를 유지함을 추가로 나타내었다(도 11b~c).

[0084] 배상 세포는 근위부 소장에서 원위 대장까지 저고 구배로 분포하고(Rodriguez-Pineiro et al., 2013), 그래서 출원인은 배상세포의 수가 근위 유사장기에서는 더 적고 원위 유사장기에서는 더 높은지를 조사하였다. 28 일차에 MUC2 염색을 분석한 결과, BMP2 처리 유사장기는, 좀더 근위부의 NOGGIN 처리 유사장기 및 대조군 유사장기(희소한 세포 내 MUC2 염색만을 보임)와 비교하여, 세포 내 MUC2에 의해 가시화된 많은 수의 배상 세포를 가졌다(도 3i~l). 출원인은 결장 내(소장에서는 아님) (van Klinken et al., 1998)배상 세포의 소집합에 의해 발현되는 표지자 MUC5B를 사용하여 배상 세포의 부위 동일성을 추가로 확인했다. Mog5B 염색은 Noggin 및 대조군 처리 28 일차 유사장기에서 부재하였고, BMP2 처리된 유사장기에서는 존재 하였다(도 4m~p). 배상 세포 형태는 오래된 유사장기에서 더 성숙되었는데(도 11d-i), 44 일차 BMP 처리 유사장기에서, 출원인은 유사장기의 내강으로 점액을 분비하는 과정에서 배상 세포를 관찰 하였다(도 11j-l). BMP처리 유사장기에서 점액 분비를 관찰하는 능력은 이 유사장기 계가 장의 병태 생리학에서 점액 분비 및 점액의 역할을 연구하는데 유용할 수 있음을 시사한다.

[0085] 유사장기의 부위 패턴이 배양 28 일 후에 안정적이었지만, 출원인은 초기 3 일 처리 후 조기 패턴화가 완전히 확립되었는지를 조사하기를 원했다. 그렇게 하기 위해, 출원인은 3 일간 NOGGIN으로 처리된 회전 타원체를 BMP2 함유 배지로 3 일 동안 이동시켰고, 반대로 3 일간 BMP로 처리 회전 타원체를 NOGGIN 함유 배지로 3 일 동안 이동시켰다. NOGGIN으로 생성된 근위 유사장기는 BMP2에 반응하여 SATB2를 발현하지 않았으며, 이것은 근위부의 운명이 3 일의 패턴화 후에 안정하다는 것을 보여주었다(도 11a). 역 실험에서, 3 일간의 BMP2 처리가 안정한 원위부의 운명을 유도하기에 충분하지만, 유사장기의 서브 세트는 NOGGIN 처리에 반응하여 SATB2 발현을 상실하였다(도 11a). 3 일간의 BMP2 처리가 체외 및 체내에서 안정한 결장 운명을 유도하기 위해 충분한 반면(도 12), 초기 후방 장관에는 가소성이 남아있다. 이것은 임신중기의 래트 배아의 결장 내배엽이 소장 내배엽보다 더 부위적인 가소성을 갖는다는 관측과 일치한다(Ratineau et al., 2003).

[0086] **BMP 신호 전달에 의한 유사장기 중간엽의 패턴화.**

[0087] BMP 신호 전달의 자극이 유사장기 상피에 부위적 동일성을 부여하는 반면, 본 출원인은 또한 패턴화 동안 BMP2 처리 유사장기의 비-상피 구획에서 pSMAD1/5/8을 관측하였고, 중간엽에서 발현되는 것으로 공지된 후방 HOX 인자의 상향 조절을 관찰하였다. 중간엽의 패턴화가 안정적인지 또는 상피에서의 지속적인 패턴화 입력이 필요한지를 판단하기 위해, 출원인은 중간엽 세포 배양물을 단리하여 2~3 주간 확장시켰고, 상기 배양물을 부위별 HOX 유전자의 발현에 대해 분석하였다. 중간엽 배양물은 E-cadherin 발현 세포가 부족하였고, 이것은 상기 배양물이 중간엽으로 구성되었음을 시사한다(그림 3q). 근위 장 중간엽에 풍부한 HOXD3의 분석(Yahagi et al., 2004)이 NOGGIN및 대조군 처리 유사장기에서 유래된 중간엽이 안정한 근위 동일성을 보인 반면, BMP처리 유사장기는 HOXD3의 발현 감소(도 3r) 및, 인간 결장 섬유 아세포에서 계속해서 발현되는(Higuchi et al., 2015), HOXA13의 높은 수준(도 3s)을 보임을 확인시켜주었다. 종합해 보면, 이러한 데이터는 BMP 신호 전달의 조기 조절이 상피와 중간엽 모두를 패턴화하고, 상기 중간엽의 패턴화가 상피의 부재에서도 안정하다는 것을 시사한다.

[0088] **결장 장내분비 세포의 유도가 BMP2 처리 유사장기에 제한된다.**

[0089] 여러 ECC 아형의 발달은 소장과 대장의 특정 부위에 국한되어 있다. 예를 들어, 단백질 INSL5의 발현은 결장 EEC에 국한된다(Burnicka-Turek et al., 2012, Thanasupawat et al., 2013). 결장 동일성의 기능 시험으로서, 출원인은 결장 EEC 표지자 INSL5의 실험적 유도가 BMP2-처리 원위 유사장기에 국한하는지를 판단하였다. 이것을 하기 위해, 출원인은 앞서 기술된 바(McCracken et al., 2017; McCracken et al., 2014)와 같이 독시사이클린(DOX) 유도성 NEUROG3 발현 카세트를 보유하는 iPSC 세포주를 사용하여 유도차원으로 전-내분비 전사 인자 NEUROG3을 발현시켰다(도 4a). 출원인은 DOX의 6 시간 펄스를 수행하고, 추가 7 일 동안 배양한 후, CHGA 양성 세포에 의해 측정된 EEC의 강력한 유도를 관찰하였다(도 4b~i). 그러나, 본 출원인은 오직 BMP2 처리 유사장기에서 INSL5 양성 세포를 관찰하였고, 이를 QPCR 분석으로 확인하였다(도 4c~h, j). INSL5 발현 세포가 결장 내에만 존재한다는 것을 감안할 때, 본 출원인의 데이터는 BMP2 처리 유사장기가 기능적으로 결장암에 전념한다는 것을 강하게 시사한다. SATB2, MUC5B 및 HOXA13과 같은 원위 표지자의 발현 및 결장 특이적 ECC를 생성할 수 있는 능력은 BMP2 처리 유사장기가 결장이며, 따라서 인간 결장 유사장기(HCOs)로 언급 될 것이라는 결론을 뒷받침한다.

[0090] **패턴화된 유사장기의 부위적 동일성은 체내에서 유지된다.**

[0091] 마우스 및 인간 태아 장의 이전 연구는 면역 결핍 마우스의 동종 이식 및 성장 이후 장의 다른 부위의 부위적 동일성 및 조직 형태가 유지된다는 것을 보여 주었다(Duluc et al., 1994; Savidge et al., 1995). 체외에서 패턴화된 HIO 및 HCO가 부위적 동일성을 유지하고 소장 및 대장 조직으로 자라는지를 판단하기 위해, 본 출원인은 6-10 주 동안 마우스 신피막하에 이들을 이식 하였는데, 출원인이 이전에 입증한 바와 같이, 이것은 HIO가 소장 조직으로 성숙되는 결과를 낳는다(Watson et al., 2014). 출원인은 NOGGIN 및 대조군 HIO의 이식이 HCO보다 더 효율적임을 관찰하였다(도 12a). 그들의 부위적 동일성과 일치하여, 이식된 HIO 및 HCO는 각각 소장 또는 대장에 형태 학적으로 유사한 성숙 조직으로 발달하였다(도 5a~e). NOGGIN과 대조군 유사장기의 상피 세포는 인간의 소장에 필적할만한 명확한 음와와 긴 융모를 형성하였다. 대조적으로, BMP2 처리 유사장기는, 결장과 유사하게, 음와를 포함하고 있지만 융모는 없었다.

[0092] 소장과 대장의 형태학적 유사성 외에도, 이식된 HIO와 HCO는 별개의 부위 표지자를 발현하고 부위적으로 풍부한 세포 유형을 함유하였다. 예를 들어, NOGGIN 및 대조군 HIO의 상피의 대부분은 근위 표지자 GATA4를 발현하였고 대장 표지자 SATB2 를 발현하지 않았다 (도 5f-i, k~n,도 12b~e). 반대로 HCO 상피 세포는 균일하게 SATB2 +이었지만, GATA4를 발현하지 않았다(도 5j, 0, 도 12b~e). 또한, DEFA5를 발현하는 파네스 세포가 NOGGIN 및 대조군 HIOs의 음와에 존재하였지만, 인간 결장과 유사하게, HCO에는 없었다(도 5p~t,도 12f)(Wehkamp et al., 2006). 출원인은 HCO의 배상 세포에 의해 발현되지만 NOGGIN 또는 대조군 HIOs에서는 검출되지 않는 결장 내 배상 세포 표지자 MUC5B(van Klinken et al., 1998)를 사용하여 HCO의 결장 동일성을 확인했다(도 5u~y, 도 12g). 또한, MUC2 + 배상 세포의 수는 HIO와 비교하여 HCO에서 상당히 더 높았고, 이는 인간 결장에서 보이는 배상 세포의 풍부성과 일치하였다(도 12h~l). 패턴화 표지자, MUC5B 발현 세포의 존재 및 파네스 세포의 부재는 모두 이식된 HCO가 결장 상피를 갖는다는 결론을 뒷받침한다.

[0093] **체내 성숙한 HIO 및 HCO가 부위 장내분비 호르몬을 발현한다.**

[0094] 적어도 12 개의 주요 EEC 아형이 위장관의 다른 부위에서 발견되는 적어도 12 개의 주요 EEC 아형이 있으며 출원인은 부위 EEC의 존재에 대해 HIO 및 HCO를 분석하였다. 그렐린(Ghrelin)과 모틸린(Motilin)은 주로 근위 장에서 발견되며, 이에 따라 이들 호르몬은 NOGGIN 및 대조군 HIO에서 주로 발현되지만, HCO에서는 발현되지 않는다(도 6a~d). 이와 유사하게, 소장의 K-세포에서 발견되지만 결장에는 결여된 GIP가 NOGGIN 및 대조군 HIO에서 발견되었지만, HCO에서는 발견되지 않았다(도 6e~h). 그런 다음 출원인은 결장에서 더 풍부한 GLP-1과 PYY의 발현에 대해 분석하여 HCO에서 원위에서 풍부한 EEC의 존재를 살펴보았다. 출원인은 HIOs보다 HCO에서 GLP-1 및 PYY 세포의 수가 더 많고 전전글루카곤(preproglucagon) 및 PYY의 발현이 더 높다는 것을 관찰하였다(도 6l~p). 또한, 출원인은 HCO에서만 결장 특이성 호르몬 INSL5(Burnicka-Turek 외, 2012, Thanasupawat 외, 2013)의 발현을 발견하였다(도 6q~t).

[0095] **체외 및 체내에서 HIO 및 HCO의 줄기 세포 및 선조 세포의 분석**

[0096] 체외 유래 HIO와 HCO가 줄기 세포와 선조 세포의 표지자를 발현하는지 여부를 판단하기 위해, 본 출원인은 이전에 기술된(McCracken et al., 2014; Watson et al., 2014) H9-BAC-LGR5-eGFP 형질 전환 세포주를 사용했다. 유사장기에서 LGR5-eGFP 발현을 조사한 결과, e13.5(Shyer 등, 2015)와 같은 초기에 Lgr5-eGFP 마우스의 발현 패턴과 유사한 넓은 상피 영역에서의 발현이 확인되었다(도 13a, b, f, g, k, l). GFP 발현은 또한 조직학 및 FACS 분석에 의해 결정된 바와 같이 유사장기 상피 외부에서 명백했고, 이것은 GFP + EPCAM-세포 집단을 나타났다(데이터는 나타내지 않음). 또한, 본 출원인은 태아 및 성인 장에서 선조 세포의 표지자인 SOX9의 발현을 조사하여, HIO 및 HCO 둘 다의 상피에서 발현됨을 확인하였다(도 13c~e, h~j, m-o). 이러한 데이터는 LGR5-eGFP 및 SOX9로 표시되는 배아/태아의 선조 세포가 체외에서 HIO 및 HCO에 존재함을 시사한다.

[0097] 장내 발달의 후반 단계에서, 선조 세포는 융모를 발달시키는 기저에 국한되며 결국 Lieberkuhn의 음와의 장 줄기 세포(ISC)에 기여하게 된다. 체외에서 관찰된 선조 세포가 이와 같은 발달 전환을 겪는지를 판단하기 위해, 출원인은 HIO 및 HCO를 이식하고 LGR5-eGFP, SOX9 및 KI67 단백질을 모니터링했다. 체내에서 유사장기의 성숙 후에, 본 출원인은 기저 추정 음와에 국한된 LGR5-eGFP, SOX9 및 KI67을 관찰하였다(도 13p~x). 또한, SOX9는 HIOs의 융모의 EECs에서, 그리고 세포 유형에서 SOX9 발현과 일치하는 결장 상피 이식 HCO의 커프에서 관찰되었다. Sox9와 Lgr5가 마우스에서 엔테로이드 및 콜로노이드를 형성할 수 있는 장 및 결장 줄기 세포를 표시한다는 것을 감안하여(Gracz et al., 2010; Ramalingam et al., 2012), 본 출원인은 이식된 장기의 상피가 단리되어 엔테로이드 및 콜로노이드를 생성하는 데 사용될 수 있는지 여부를 조사하였다. HIO 및 HCO 모두 성장하고 계대배양될 수 있는 상피 유사장기의 배양물을 생성하였다 (도 13y~a'). 더욱이, HCO-유도 상피 배양물은 결장 표지자 CKB, FXYD3, SATB2 및 HOXB13을 발현하였으나, 근위 소장 표지자 PDX1 또는 GATA4를 발현하지 않았고, 이것

은 부위 동일성이 유지되었음을 시사한다(도 13b'~d'). 이러한 데이터는 체내에서 성장한 HIO 및 HCO에는 선조 세포와 줄기 세포가 있음을 시사한다.

[0098] **HIO 및 HCO의 전반적 전사 분석.**

[0099] 출원인은 HIO 및 HCO의 부위적 동일성 및 성숙도를 광범위하게 조사하기 위해, 체내에서 성장한 HIO 및 HCO의 RNA-seq 분석을 수행하고, 이를 인간 태아 및 성인 소장 및 대장의 발표된 데이터 세트와 비교하였다. 주성분 분석 결과, 성인 및 태아 장에서 단리된 1차 조직이 주성분 1(PC1) 축을 따라 모두 모여 있었으며, 이는 샘플들 간의 누적 편차가 36.5 %를 차지하였다(도 14a). GO 분석 결과, 상기 변형이 PSC 유래 이식편이 아닌 1 차 조직에만 존재하는 세포 유형이 원인이라는 사실이 밝혀졌다. 예를 들어, 인간의 일차 조직에 존재하고 이식편에 존재하지 않는 상위 10 개의 생물학적 과정 중 6 개는 면역 세포와 관련이 있다(도 14b~c). 제 2 주성분(PC2)은 누적편차가 17.7%를 차지하고, 성숙도에 따라 샘플을 분리한다(도 7a). 이와 같은 성분은 이식된 유사장기가 인간의 태아 장과 태아 결장보다 성숙하지만, 성인 결장 및 창자만큼 성숙하지는 않은 것으로 나타났다. 제3 주성분(PC3)은 누적 편차가 6.7 %를 차지하고 부위적 동일성에 따라 표본을 분리하며, HCO는 결장과 더 유사하지만 HIO는 소장과 군집함을 나타낸다(도 7a). 흥미롭게도, 인간 태아 샘플은 부위적 동일성(소장 대 결장)에 기초하여 군집하지 않았는데, 이는 이들 샘플이 위장관의 지정된 부위에서 깨끗하게 단리되지 않았을 수 있음을 시사한다.

[0100] 다음으로 출원인은 HIO 및 HCO가 소장 및 결장과 유사한 패턴의 부위-특이적 유전자 발현을 공유할 확률을 결정하기 위해 초고속 평균 시험을 사용했다(도 7b). 결장 또는 BMP2 처리 HCO와 비교하여 소장과 NOGGIN 처리 HIO에서 총 341 개의 전사체가 발현되었는데, 이는 우연만으로는 극히 희박한 비율이다(P=1.5 x 10~143). 이와 유사하게, 대조군 HIO에서 상향 조절된 유전자 세트가 성체 결장(P=2.5 x 10-203)에 비해 성숙한 소장에서 상향조절된 유전자와 매우 중요한 유사성을 공유한다. 반대로, HCO에서 상향조절된 유전자는 소장과 비교하여 결장에서 상향 조절되는 유전자들에 대해 매우 풍부해진다(P=4.1 x 10~53 및 P=6.0 x 1073). 이 분석은 HIO 패턴화가 인간의 소장과 가장 유사하고 HCO 패턴화가 결장인 것으로 결론 지었다. HIO(NOG 및 대조군 처리) 및 HCO의 특성을 더 조사하기 위해, 출원인은 차별화된 발현 분석(성인 소장 대 성인 결장, HIO 대 HCO)을 실시했다. 출원인은 결장에서 상향 조절된 유전자의 높은 비율이 또한 HCO에서 상향 조절되었고 소장에서 상향 조절된 유전자의 대부분도 HIOs에서 상향 조절되었다는 것을 증명하는 4-방향 점도(scatter plot)을 생성했다(도 7c, 표 1). 마지막으로, 풍부해진 생물학적 과정의 분석의 결과, 성인 결장 및 이식된 HCO가 매우 활성인 Wnt 신호 전달 및 유사한 HOX 코드를 갖는 것으로 나타났다(도 7d). 종합해 보면, 이들 데이터는 출원인이 PSC를 인간 결장 조직으로 분화시키는 확실한 방법을 개발했음을 시사한다.

[0101] [표 1]

[0102] 표1. HIO와 HCO에서 각각 상향 조절되는 성인 소장과 결장에서 상향 조절된 유전자. 열 1, 일반적으로 HCO 대 HCO 및 성인 소장 대 성인 결장에서 보통 상향조절됨. 열 2, 대조군 HCO 대 HCO 및 성인 소장 대 성인 결장에서 보통 상향조절됨. 열3, HCO 대 NOG HIOs 및 성인 결장 vs 성인 소장에서 보통 상향 조절됨. 열 4, HCO 대 대조군 HIOs 및 성인 결장 대 성인 소장에서 보통 상향 조절 됨.

[0103]

ABCA4	AADAC	AAGAB	AAK1
ABCC2	ABCA4	ABCA12	ABHD10
ABCC6	ABCB8	ACTR2	ABHD17C
ABCD1	ABCC10	ADAM10	ABL2
ABCG8	ABCC6	ADAM22	ACTR2
ABHD14A, ABHD14A-ACY1,ACY1	ABCD1	AGPS	ACVR2B
ABHD6	ABCG5	AGTPBP1	ACYP1
ACBD4	ABCG8	AKAP13, MIR7706	ADAM10
ACO2	ABHD14A, ABHD14A-ACY1, ACY1	ALDH1B1	ADAM17
ACOT11	ABHD16A	ALG5	ADAM22
ACP2	ABHD4	ANKDD1B	ADGRF4
ACSL5	ABHD6	ANKRD30BP2	AEBP2
ACY3	ACACB	ANTXR2	AGPS
ADAMTSL5	ACADS	ANXA3	AHI1
AGPAT3	ACADVL	ARFGEF3	AIDA
AKR1B10	ACKR4	ARHGAP44	AIFM3
AKR1C1	ACO2	ARPC5	AKAP11
AKR1C3	ACOT11	ASCC1	AKAP13,MIR7706
ALDOB	ACOT7	ASIP	AKAP5
ALPI	ACOX2	ATF6	ALG8
ANGPTL4	ACP2	ATOH1	ANKDD1B
ANXA13	ACSL5	ATXN3	ANKFY1
APOA1	ACTN4	B3GALNT2	ANKS1B
APOA1-AS	ACY3	B3GNT6	ANP32B
APOA4	ADAMTSL5	B4GALNT3	ANTXR2
APOBEC1	ADGRG4	BCAS1	AP2B1
APOBEC2	ADGRG5	BCL10	AP3M1
APOC2,APOC4, APOC4-APOC2	AGMO	BCLAF1	APH1B
APOC3	AGPAT1,MIR6721	BEND3	APOBR
APOL2	AGPAT2	BEST2	ARFGEF3
AQP3	AGPAT3	BTBD3	ARFIP1
AQP7	AK2	BZW1	ARL14EP
AQP7P1	AKR1A1	C11orf58	ARMC8
ATG4D	AKR1B10	C12orf75	ARPC5
AVIL	AKR1C1	CA12	ARRDC3
BAK1	AKR1C3	CAMSAP1	ASB7
BCRP3	AKR1C4	CAPN2	ASPH
BRE-AS1,RBKS	AKR7A3	CAPRIN1	ATG4C
BTD	ALDH1A3	CASC18	ATL3

[0104]

BTNL3	ALDH2	CBFB	ATM
BTNL8	ALDOB	CCPG1,DYX1C1,DYX1C1-CCPG1	ATP13A3
C10orf25	ALPI	CD24	ATP2A3
C10orf67	AMBRA1	CD9	ATR
C11orf24	ANAPC2	CDC23	ATRX
C11orf86	ANGPTL4	CEACAM6	ATXN1
C19orf66	ANPEP	CEP290	ATXN3
C1orf115	ANXA13	CFC1,CFC1B	B3GALNT2
C1orf116	ANXA4	CLIC4	B3GNT6
C5orf56	AP5B1	CLMN	BAG5
C6orf132	APOA1	CLNS1A	BAZ1B
C6orf136	APOA1-AS	CLSTN1	BBIP1
C8G	APOA4	CNTN3	BCAS1
C9orf173	APOBEC1	CSRNP3	BCAT1
CA13	APOBEC2	DAAM1	BCLAF1
CALM3	APOC2,APOC4,APOC4-APOC2	DDX50	BEND3
CAMKK2	APOC3	DGKH	BEST2
CAPN10-AS1	APOL2	DICER1	BIN1
CAPN3	APOM	DIP2B	BMPR2
CASP1	AQP3	DMTN	BNC2
CATSPER2	AQP7	EARS2	BTBD10
CBR1	ARHGEF16	EBPL	BTBD3
CCL11	ASAH2	EEA1	BTBD7
CCL25	ASB13	EHF	BTF3L4
CD82	ASIC2	EPHA10	BTRC
CDCA3	ASPA	EPHB4	BZW1
CDH4	ATG4D	EXOC5	C10orf99
CDIP1	ATP11A	EXOC6	C11orf58
CDR2L	ATP5SL	FAM105A	C18orf54
CERK	ATXN2L	FAM169A	C3orf52
CES2	AZGP1	FAM175A	C7orf60
CGREF1	B3GNT8	FAM218A	CA12
CHRM4	BAG6	FAM60A	CA4
CIB2	BAIAP2L2	FAS	CAMK1D,LOC283070
CIDEB	BAIAP3	FECH	CAMSAP2
CIDEC	BAK1	FERMT1	CAPN8
CLDN15	BET1L	FFAR4	CAPZA1
CMTR1	BLNK	FGF7	CASC4
CNNM3	BRE-AS1,RBKS	FKTN	CASD1
CPS1	BTD	FMN2	CBFB
CRAT	BTNL3	FRMPD3	CBX5,MIR3198-2
CREB3L3	BTNL8	G3BP1	CCDC132
CRIP3	BUD13	GARS	CCDC88A
CTD-3080P12.3	C10orf54	GCSH	CCND1
CYP27A1	C11orf24	GGH	CCNJL

[0105]

CYP2B7P	C11orf86	GJB4	CCNT1
CYP2C9	C15orf62	GLIS3	CD24
CYP2S1	C16orf58	GLUL	CD59
CYP3A5	C17orf78	GMNN	CD9
CYTH2	C18orf8	GNE	CDC42
DBP	C19orf12	GNPTAB	CDHR1
DCAF11	C19orf54	GOT2	CDK19
DECR1	C1orf116	GP9	CEACAM5
DGAT1,MIR6848	C2CD2L	GRSF1	CEACAM6
DGAT2	C5orf56	GSPT1	CEBPZ
DGKA	C6orf132	GYG2	CELF2
DHDH	C6orf136	HDAC1	CENPO
DHRS1	C8G	HIATL1	CEP250
DHRS11	CALCOCO1	HK2	CHD9
DHX16	CALM3	HMGA2	CHIC1
DMBT1	CAMK2G	HN1L	CLIC4
DNAJC22	CAMTA2	HNMT	CLMN
DNASE1	CAPN1	HNRNPAB	CLNS1A
DNPEP	CAPNS1	HOXA10-AS	CLTC
DOLPP1	CARD10	HOXA10,HOXA10-HOXA9,HOXA9	CMTM6
DOT1L	CARD6	HOXA11	CNEP1R1
DTX1	CASP1	HOXB9	CNTN3
ELMOD3	CASP4	HOXB-AS3	CPM
EMB	CASP9	IARS	CRK
ENKUR	CBLC	IFT74-AS1	CRYM
EPHX2	CBR1	IL1R2	CSNK1A1
ERICH4	CC2D1A	ILDR1	CSRNP3
ESPN	CCL25	IPO5P1	CTDSPL
ETV7	CD302,LY75,LY75-CD302	IQGAP1	CTTNBP2NL
EXOC3L4	CD68	ITM2C	CYLD
F10	CD74	JAG1	CYP20A1
FAM102A	CD82	JPH1	DAAM1
FAM109A	CDC42BPB	KCNJ2	DCBLD2
FBP1	CDC42EP4	KCNN4	DCP2
FBXO7	CDCA3	KCNRG,TRIM13	DDX50
FCHSD1	CDHR5	KCTD1	DDX6
FLJ12825	CDIP1	KCTD20	DGKH
FLJ22763	CDK18	KLK15	DHRS13
FUOM	CDK2	KNOP1	DHRS9
FXR2	CDK20	KPNA4	DHX57
GABRE	CDR2L	LEFTY1	DICER1
GALK1	CEACAM18	LIMK2	DIO3OS
GALT	CELA3A	LINC00341	DISC1,TSNAX,TSNAX-DISC1
GATA4	CENPV	LINC00858	DNAJC3
GATA5	CERS2	LIPH	DNAL1

[0106]

GATS	CES2	LOC100507346	DPY19L1
GCHFR	CFI	LOC101928233	DSEL
GIGYF1	CFL1	LOC101929395	DSTYK
GNA11	CGREF1	LOC101929524	DTD2
GOLT1A	CHP2	LRRK1	EBPL
GOSR2	CHRM4	MAML2	EED,MIR6755
GPD1	CIAO1	MAPRE2	EFNA5
GPRIN1	CIB2	MARCH3	EHF
GRAMD1B	CIDEB	MARCKSL1	EI24
GRIA1	CIDEC	MBNL3	EID1
GSDMB	CISD1	MCOLN2	EIF4E
GSK3A	CLDN15	MECOM	EIF5B
GSTK1	CLDN18	METTL5	EMC1
HADHA	CLPTM1	MFAP3L	ENAH
HAGH	CMBL	MFHAS1	ENDOD1
HAPLN4	CNNM3	MINA	ENTPD1
HEBP1	CNPY2,PAN2	MLLT3	EPAS1
HOPX	COASY	MPHOSPH6	ERCC6L2
HOXA4	COMMD9	MPLKIP	ERMP1
HPS1	COMT,MIR4761	MPZL2	ERN2
IDH3A	CPA2	MREG	EXOC2
IFIT3	CPPED1	MRPL1	EXOC4
IGSF23	CRADD	MRPL3	EXOC5
IL2RB	CRAT	MTL5	EXOC6
INTS12	CREB3L3	MYO3A	FAM102B
IRF1	CRELD1	MYO5C	FAM103A1
IRF8	CS	NAA15	FAM105A
ISG20	CSK	NAP1L1	FAM120A
ITPK1	CTSO	NCBP1	FAM13B
KDM2A	CXCR3	NDC1	FAM169A
KDM6B	CYB5A	NEDD4L	FAM178A
KDM8	CYP27A1	NEURL1B	FAM208A
KHK	CYP2C19	NLE1	FAM46A
KIAA2013	CYP2S1	NOLC1	FAM83H-AS1
KIFC3	CYP3A4	NOTCH1	FAM8A1
KLC4	CYSLTR2	NOTCH2	FAM98B
LBX2-AS1	DBP	NRARP	FANCI
LINC00574	DCAF11	NRXN1	FAR2P2
LINC01268	DECR1	NSF,NSFP1	FBXO28
LOC100240735	DEDD	NT5DC3	FBXO45
LOC284825	DEGS2	NUDT4	FCF1
LOC646471	DERA	NXPE1	FEM1B
LOC728989	DESI1	NXPE2	FEM1C
LPCAT3	DFNA5	NXPE4	FFAR4
LPIN3	DGAT1,MIR6848	ODC1	FKBP5,LOC285847
LRRC75A	DGAT2	ORC5	FKTN
LRRC75B	DGKA	P4HA1	FLOT2
MALL	DGKG	PAPPA2	FNDC3B

[0107]

MAPKBP1	DGKQ	PARM1	FOCAD
METTL7B	DGKZ	PAWR	FOXD2
MFSD2A	DHDH	PCDHB11	FOXO3
MGAM	DHRS11	PDE3B	FOXO3B,ZNF286B
MICALL2	DHRS7	PDZK1IP1	FRMPD3
MICU1	DHX16	PGBD5	FRYL
MIR1268A,SLC27A4	DMBT1	PHF20	FSIP2
MIR22,MIR22HG	DNAJC22	PHF6	FZD4
MIR31HG	DNASE1	PKIB	G3BP1
MIR3615,SLC9A3R1	DNPEP	PLCD3	GGH
MIR5187,TOMM40L	DOLPP1	PLSCR4	GIN1
MIR5193,UBA7	DPP9	POF1B	GJC1
MIR6073,SOX6	DSCR3	POLR3B	GLB1L2
MIR621,SLC25A15	DTX1	POSTN	GLG1
MIR7703,PSME2	E2F4	PP14571	GLIS3
MISP	EGFR-AS1	PPIC	GLTSCR1L
MME	EIF6	PPP1R8	GLUL
MMEL1	ENPP6	PPP2R3A	GMNN
MOCS1	EPB41L3	PPP3CA	GNAI1
MOGAT3	EPHA1	PREP	GNAQ
MON1A	EPHB1	PRKACB	GNE
MS4A8	EPHX2	PRKAR2A	GOLGA3
MSRA	EPS8L2	PRKRIR	GOPC
MST1	EPSTI1	PRMT5	GP9
MTTP	ERAL1	PSMD6	GPC6
MUS81	ERF	PSME4	GPX8
MYO15B	ESPN	PTAR1	GRM7
MYO1A	ESRRA	PTTG1IP	GRSF1
NAGS	ETV3	PUM1	GTF2F2
NELL2	ETV7	PYGL	GTF3C1
NGEF	EWSR1	QPCT	HABP4
NOP9	EXOC3L4	R3HDM1	HEATR3
NPC1L1	F10	RAB3B	HIATL1
NR0B2	FABP2	RABEP1	HMG20A
NR1I3	FAH	RAP1GDS1	HMGA2
NSUN6	FAM101A,ZNF664,ZNF664-FAM101A	RAPGEF2	HN1L
NUB1	FAM102A	RBMS3	HOXA10-AS
OGDH	FAM109A	RCC2	HOXA10,HOXA10-HOXA9,HOXA9
OTC	FAM32A	REXO2	HOXB5
P4HB	FAM83G	RIF1	HOXB6
PARP12	FBLIM1	RIMS3	HOXB7
PARP3	FBP1	RNASEH2B	HOXB8

[0108]

PATL2	FLJ22763	RPA2	HOXB9
PCK2	FUOM	RSF1	HOXB-AS3
PCSK5	FZR1	RSL24D1	IFFO2
PDLIM2	GABRA4	RXFP4	IFNAR1
PDZD7	GAL3ST1	SATB2	IFT74-AS1
PDZK1	GALK1	SATB2-AS1	IGF1R
PEBP1	GALNT6	SCLT1	IGIP
PEPD	GALT	SERBP1	IL17RD
PEX14	GATA4	SETBP1	IL1R2
PGRMC2	GATA5	SH3PXD2A-AS1	IL20RB
PHEX	GCNT4	SIPA1L2	IL6ST
PKLR	GFI1B	SLC16A9	ILDR1
PLA2G6	GGT1	SLC1A3	IMPAD1
PLCB3	GLOD5	SLC39A8	INPP5F
PLEKHS1	GLRX	SLC7A2	IPO11,IPO11-LRRC70,LRRC70
PLIN2	GLYCTK	SLC9A2	IPO5
PLIN3	GNA11	SLCO4A1-AS1	IPO5P1
PLLP	GNB1	SMAD5	IPO7
PNP	GOLT1A	SMARCA5	IQGAP1
PP7080	GOSR2	SMC6	ITGAV
PQLC2	GPD1	SNRPE	ITGB1
PRAP1	GPR108	SNX13	ITM2A
PRDM7	GPR35	SOCS5	ITPRIPL2
PRODH	GRAMD1B	SORBS2	JAG1
PSMB9	GRIA1	SPAG1	JPH1
PSMD9	GRK5	SRSF12	KBTBD6
PSME1	GRTP1-AS1	SRSF9	KCNJ2
PTPRH	GSDMB	ST6GAL2	KCNN4
PXDC1	GSK3A	STAB2	KCNRG,TRIM13
RAB11FIP3	GSTA1	STMND1	KCTD10
RAB17	GSTA2	STS	KCTD20
RAB5C	GSTK1	STX19	KDM5B
RAB8A	GSTM4	SUSD1	KIAA0226L
RARRES3	GTF2I	SUV39H2	KIAA0232
RBP2	GTPBP1	TBL2	KIAA0513
REEP6	GUCD1	TCTA	KIAA1143
REG1A	HADHB	TDGF1	KIAA1429
RPS6KA1	HAGH	TFRC	KIAA1715
RTKN	HAPLN4	TMA16	KLHL15
RTP4	HDAC6	TMCC1-AS1	KLK15
SAT1	HDGF	TMED10	KPNA4
SAT2	HDHD3	TMED2	KRR1
SCAMP5	HEBP1	TMEM123	LAPTM4A
SCNN1D	HECTD3	TMEM159	LARS
SCRN2	HIP1R	TMEM200B	LEFTY1
SDHA	HLA-F	TMEM38A	LIFR
SEC14L2	HMGA1	TRABD2A	LIMD1

[0109]

SERP2	HNF1A	TSN	LIMK2
SFRP5	HNF4A-AS1	TSPAN5	LINC00341
SFXN3	HOPX	TTC3	LINC00482
SH3BP1	HPS1	TTC8	LINC00515
SH3GL1	HRASLS2	TTPA	LINC00657
SHBG	HRH2	UBE2A	LINC01006
SIDT2	HSD3B7	UBE2N	LMAN2L
SLC12A7	HYKK	UGP2	LOC100129550
SLC15A1	IDNK	UNC13B	LOC100507351
SLC1A7	IFIT3	URB1	LOC101929374
SLC22A4	IFNLR1	VWA3B	LOC101929524
SLC23A1	IGSF23	WDHD1	LOC105372441
SLC25A20	IL22RA1	WDR35	LOC731424
SLC25A34	IL2RB	WDR78	LOC93622
SLC25A44	ILVBL	WIPI1	LRCH2
SLC25A45	IMMP2L	WNK4	LRRC37A4P
SLC26A11	INPP5J	WWP1	LRRC58
SLC2A2	INTS12	XPO4	LUZP6
SLC35B1	IQSEC2	YWHAE	LYST
SLC37A4	IRF1	ZBTB7C	MAFA
SLC39A5	ISG20	ZBTB8B	MAGEF1
SLC3A2	ITM2B	ZFHX3	MAGT1
SLC52A1	ITPK1	ZNF658	MAL2
SLC5A1	ITPKA	ZNF774	MAP3K7
SLC5A9	KALRN	ZNF780B	MARCKS
SLC6A19	KDF1		MATR3,SNHG4
SLC6A20	KDM6B		MBNL2
SLC7A7	KDM8		MBNL3
SMIM24	KHK		MBOAT2
SMIM5	KIAA0141		MBTPS2
SMLR1	KIAA1551		MDN1
SMPD3	KIAA2013		MECOM
SOWAHA	KLC4		METTL8
SPNS3	KLHDC8B		MFAP3L
ST7,ST7-OT3	LASP1		MFSD4
STRC	LBX2-AS1		MFSD6L
SULT1A1	LEAP2		MIB1
SULT1A2	LHPP		MIER1
SYK	LINC00319		MIOS
SYP	LINC00330		MIR1244-4,PTMA
TAP2	LINC00483		MIR4680,PDCD4
TCF7	LINC00574		MIR6824,SLC26A6
TICAM1	LINC00667		MLF1
TKFC	LINC01137		MLLT3
TM4SF20	LINC01347		MLXIP
TM4SF4	LIPE		MMGT1
TM4SF5	LIPT1		MOB1B
TM6SF2	LMBR1L		MON2

[0110]

TMEM150B	LOC100093631		MORF4L1
TMEM184A	LOC100506302		MPZL1
TMEM253	LOC100507334		MREG
TMEM37	LOC101927051		MRPL1
TMEM41A	LOC284825		MRPS6,SLC5A3
TMEM82	LOC90768		MTHFD2
TMEM86B	LPCAT3		MTMR6
TNFRSF14	LRP5		MTSS1
TNFRSF1A	LRRC28		MTURN
TNRC6C-AS1	LRRC41		MUC1
TOM1	LRRC66		MUC12
TREH	LRRC75A		MYO3A
TRIM15	LSMEM2		MYO5C
TRIM50	LYRM5		NAA15
TTC31	LZTS3		NAA50
TTC38	MALL		NAP1L1
			NBPF10,NBPF12,NB
			PF20,NBPF25P,NBPF
UGT2B7	MAP2K3		8,NBPF9
UGT3A1	MAP3K11		NCBP1
USH1C	MAPK3		NCOA3
WBP2	MAPKAPK2		NDC1
WNT3	MAPKBP1		NEK1
XAF1	MARC2		NEURL1B
XDH	MBD1		NFIA
XPNPEP2	MCRS1		NFYB
ZMYND15	MCUR1		NIFK-AS1
ZNF300	MEP1A		NKIRAS1
ZSWIM8	MEP1B		NOL11
	METTL17		NOL9
	METTL7B		NOTCH1
	MFSD2A		NPAS1
	MGAM		NRXN1
	MGAM2		NSF,NSFP1
	MGAT3		NT5C2
	MGST3		NT5DC3
	MICAL1,ZBTB24		NUBPL
	MICU1		NUCKS1
	MIR1268A,SLC27A		
	4		NUDT4
	MIR22,MIR22HG		NUP133
	MIR3615,SLC9A3R1		NUP205
	MIR5187,TOMM40L		NUS1
	MIR5193,UBA7		NXPE1
	MIR639,TECR		NXPE4
	MIR7109,PISD		OPHN1
	MIR7703,PSME2		ORC5
	MISP		PARM1

[0111]

	MLF2		PBRM1
	MLX		PCM1
	MLXIPL		PDE3B
	MME		PDE4D
	MMEL1		PDS5A
	MMP24		PDS5B
	MOCOS		PEAK1
	MOCS1		PGBD5
	MOGAT2		PGGT1B
	MOGAT3		PGM2L1
	MOGS		PHC3
	MON1A		PHF14
	MOV10		PHF20
	MPP1		PHF6
	MS4A8		PHIP
	MSRA		PHTF2
	MST1		PIAS2
	MST1R		PIBF1
	MTTP		PIGN
	MUC17		PIGX
	MYD88		PIK3R3
	MYO15B		PIKFYVE
	MYO19		PITHD1
	MYRF		PJA2
	NAALADL1		PKI55
	NAGS		PKIB
	NAPRT		PKNOX1
	NCK2		PLEKHF2
	NCSTN		PLXNA2
	NELL2		POF1B
	NGEF		POLR1E
	NIT1		POT1
	NLRP6		POU2F1
	NOL4L		PP14571
	NOP9		PPIC
	NPC1L1		PPIP5K2
	NPY6R		PPM1B
	NQO2		PPM1K
	NR0B2		PPP1R3B
	NR1H3		PPP2R5C
	NR1I3		PPP3CA
	NUCB1		PRKACB
	NUTM2B-AS1		PRKDC
	OCIAD2		PRKG1
	OGDH		PRKRIR
	OGG1		PRPS2
	OTC		PRRT3-AS1
	OXNAD1		PSME4

[0112]

	P4HB		PTAR1
	PAOX		PTEN
	PARP2		PTGDR
	PARP3		PTPN14
	PBLD		PUM1
	PBX2		PURB
	PCBP2,PCBP2-OT1		PWWP2A
	PCK2		PYGB
	PCSK5		PYGO1
	PCYT1A		PYURF
	PDE8B		QPCT
	PDLIM2		RAB11FIP2
	PDSS1		RAB3B
	PDXP		RAB40B
	PDZD7		RABEP1
	PEBP1		RABGAP1
			RALGAPA1,RALGA
	PEPD		PA1P
	PEX14		RANBP2
	PEX16		RAP1GDS1
	PFKL		RAP2A
	PFKP		RAP2B
	PGD		RAPGEF6
	PGRMC2		RASA2
	PGS1		RASEF
	PIM1		RBFOX2
	PIP5K1A		RBM7
	PKLR		RBMS3
	PLCB3		RBPJ
	PLEK2		RBPMS-AS1
	PLEKHA7		RBSN
	PLEKHS1		RBX1
	PLIN3		RCC2
	PLLP		RDX
	PMM1		REXO2
	PNLIPRP2		RGL3
	PNP		RIF1
	POLR3H		RIMKLA
	POMGNT1		RLIM
	POR		RND3
	PP7080		RNF139
	PPIP5K1		RNF144A
	PPP2R5D		RNF145
	PPP6R1		RNF223
	PQBP1		RNMT
	PQLC2		RSL24D1
	PRAP1		RXFP4
	PRDX2		SAMD13

[0113]

	PRKCD		SAR1A
	PRKCZ		SARAF
	PRKD2		SATB2
	PRODH		SATB2-AS1
	PRR13		SBNO1
	PRSS1		SCAI
	PRSS3P2		SCFD1
	PSD4		SDC4
	PSMA1		SEC22A
	PSMB10		SEC23IP
	PSMB8		SEC62
	PSMB9		SECISBP2L
	PSMD9		SEL1L
	PSME1		SEMA3C
	PTK2B		SEMA3D
	PTPRH		SEMA5A
	PVRL2		SEPT11
	PXDC1		SEPT7
	QRICH1		SERBP1
	RAB11FIP3		SERINC5
	RAB17		SERTAD2
	RAB5C		SESN1
	RAB8A		SESN3
	RARA		SETX
	RARRES3		SH3PXD2A-AS1
	RASSF4		SHOC2
	RBP2		SHROOM4
	REEP6		SIPA1L2
	REG1A		SLC10A7
	RFX5		SLC15A2
	RGN		SLC16A9
	RIC3		SLC19A2
	RIPK3		SLC1A3
	RIPK4		SLC22A15
	RMDN3		SLC25A12
	RMND1		SLC25A30
	RNF10		SLC2A10
	RNF123		SLC30A6
	RNF167		SLC35A1
	RRNAD1		SLC37A3
	RTKN		SLC38A2
	RTP4		SLC38A6
	SAPCD1-AS1,VWA7		SLC39A8
	SAT2		SLC44A1
	SCAMP5		SLC7A2
	SCARB1		SLC9A2
	SCML4		SMAD5

[0114]

	SCNN1D		SMARCA5
	SCRN2		SMC6
	SDHD		SMG1
	SEC13		SMIM14
	SEC14L2		SNRPE
	SEC16B		SNX13
	SFRP5		SOCS5
	SFXN3		SORBS2
	SH3BP1		SPAG1
	SH3GL1		SPIN2B
	SHPK,TRPV1		SPIRE1
	SIDT2		SPTAN1
	SIGLEC12		SPTSSA
	SLC12A7		SRSF12
	SLC13A2		SSB
	SLC16A13		SSR1
	SLC16A5		SSR3
	SLC19A1		ST6GAL2
	SLC22A18		ST7L
	SLC22A4		STAB2
	SLC23A1		STAG1
	SLC25A20		STMND1
	SLC25A44		STRN3
	SLC25A45		STS
	SLC25A5		STX19
	SLC26A11		STX6
	SLC2A12		SUMF1
	SLC2A5		SUPT16H
	SLC2A9		SUV39H2
	SLC35B1		SYT7
	SLC37A4		SYTL2
	SLC39A5		SYTL4
	SLC3A2		TACC1
	SLC52A1		TAF9B
	SLC5A1		TAOK1
	SLC5A6		TBL1X
	SLC6A19		TCAM1P
	SLC6A20		TDGF1
	SLC7A7		TEAD1
	SLC7A9		TFCP2L1
	SLC9A3		TFRC
	SLX4		TGFBR1
	SMAD3		THADA
	SMARCD1		TICAM2,TMED7,TMED7-TICAM2
	SMIM24		TINCR
	SMLR1		TLK1
	SMOX		TLN2

[0115]

	SMPD3		TMCC1-AS1
	SOAT2		TMED10
	SPANXN3		TMED9
	SPHK2		TMEM106B
	SPNS3		TMEM123
	SRC		TMEM159
	SSTR1		TMEM194A
	ST7,ST7-OT3		TMEM194B
	STAT6		TMEM2
	STAU1		TMEM44
	STK24		TMEM45A
	SUCLG1		TMEM87A
	SULT1A1		TMX1
	SULT1A2		TNFRSF10D
	SULT2A1		TNKS
	SYP		TNRC6C
	TAP2		TOP2B
	TBK1		TP53BP1
	TCF7		TP53INP1
	TFG		TRABD2A
	THRA		TRIM23
	TIAM2		TRIM37
	TICAM1		TRIP12
	TJAP1		TRMT5
	TKFC		TROVE2
	TLDC2		TSN
	TM4SF4		TSPAN5
	TM4SF5		TSPAN6
	TM6SF2		TSPYL4
	TMED4		TTC28
	TMEM116		TTC3
	TMEM120A		TTL
	TMEM139		TTPA
	TMEM150B		TTPAL
	TMEM177		TWISTNB
	TMEM184A		TWSG1
	TMEM229B		TXNDC15
	TMEM253		UBE2D1
	TMEM25,TTC36		UBE2Q2
	TMEM37		UBR5
	TMEM51		UGGT1
	TMEM51-AS1		UGGT2
	TMEM82		UNC5C
	TMEM86B		USP13
	TMEM92		USP24
	TNFRSF14		USP34
	TNFRSF1A		USP47
	TNIK		USP53

	TOM1 TOM1L1 TOX4 TPI1 TRAF4 TREH TRIM14 TRIM15 TRIM16 TRIM21 TTC38 UBXN2A UGT3A1 UNC5CL USF1 USH1C USP10 USP2 VRK3 VRTN WBP2 WDR45 WDTC1 WNT3 WWC1 XAF1 XDH XPNPEP1 ZDHHC9 ZER1 ZFAND3 ZFYVE27 ZMYND15 ZNF384 ZNF782 ZRANB2-AS1 ZSWIM8		UXS1 VANGL1 VKORC1L1 VOPP1 VPS13B VPS13C WAC-AS1 WBP5 WDFY1 WDHD1 WDR36 WDR7 WDR78 WDR89 WNK4 XIAP XPNPEP3 XPO4 YTHDF3 ZBTB10 ZBTB7C ZDHHC7 ZFHX3 ZFP90 ZFX ZMAT2 ZMPSTE24 ZMYM4 ZNF148 ZNF260 ZNF264 ZNF320 ZNF555 ZNF644 ZNF652 ZNF678 ZNF69 ZNF704 ZNF709 ZNF766 ZNF780B ZNF81 ZYG11B

[0116]

[0117] **결론**

[0118] 역사적으로 전장, 중장 및 후장의 분류는 전장 및 후방 장 입구 및 장간막 혈액 공급원의 발달을 기반으로 한다(Uppal et al., 2011). 중장 및 후장의 대안적인 정의가 제안된 바 있는데, 중장은 배꼽 앞쪽 부분에서 유래된 장의 부분이고 후장은 배꼽 뒤쪽에서 유래한다(Johnston, 1913; Savin et al., 2011). 두 경우 모두, 해부학적 경계표에 대한 역사적인 의존과 전장, 중장 및 후장을 구별하기위한 보다 정확한 분자 표지자의 부재로 인해, PSC에서 이러한 세포/조직을 체외에서 생성하는 방법을 개발하는 것이 어려워졌다. 따라서 중장과 후장을 발달시키는 부위를 분명히 구분하는 표지자를 식별하는 것이 필수적이다.

[0119] 출원인은 CDX2, GATA4, ONECUT1 및 SATB2의 조합을 사용하여 손톱개구리속, 마우스 및 인간에서 중장 및 후장 발달의 초기 단계에 별개의 분자 경계가 확립되었음을 확인하였다. 흥미롭게도, GATA4 및 SATB2 발현 영역은 마우스의 난황 줄기/추정 탯줄에서 경계를 형성하며,이 경계는 발달 및 성인 장에서 유지된다. GATA4 발현이 배꼽 앞쪽의 장을 표시하고 SATB2 발현이 배꼽 뒤쪽의 영역을 표시한다는 사실은 배꼽이 중장과 후장 사이의 경계임을 시사한다(Johnston, 1913; Savin et al., 2011).

[0120] HIO에서 ONECUT1 발현 및 HCO에서 SATB2 발현은 각각 그들의 근위 및 원위 동일성과 일치하는 반면, GATA4는, 배아 발현을 고려할 때 예상되는 바와 같이, 체외에서 근위 HIO에서 견고하게 발현되지 않았다(데이터는 표시되지 않음). 대조적으로, GATA4는 HIOs의 체내 성숙 이후, 그리고 환자 생검에서 생성된 엔테로이드에서 견고하게 발현되었다(데이터는 표시되지 않음). 이것은 GATA4의 발현과 관련된 인자가 배양 조건에서 부재하거나 또는 체내 성숙이 GATA4의 상피 발현에 필요하다는 것을 시사할 수 있다. 이 데이터는 GATA4의 발현의 높은 수준이 장

의 조기 부위화에 불필요할 수 있음을 시사하는데, 이것은 정상적인 Onecut 인자 발현을 유지하는 장 Gata4 녹아웃 마우스(Battle et al., 2008)와 일치한다. 또한, BMP 처리 유사장기의 작은 일부는 CDX2 발현을 상실하였고, 방광 표지자인 Keratin 13과 Uroplakin 1a(데이터는 표시되지 않음)를 활성화하였다. 이것은 요로상피 조직이 후장/배설강에서 유래되기 때문에(Georgas et al., 2015), 후장 운명을 가지는 BMP 유사장기와 일치한다.

[0121] SATB2는 원위부 회장 및 대장의 발달 전 기간동안 발현되지만, SATB2가 원위 대장의 발달에 필요한지는 알려지지 않았다. 마우스 녹아웃 연구는 SATB2의 돌연변이가 2q32-q33 결실 및 유리 증후군과 관련된 구개열(Cleft Palate)과 관련되어 있기 때문에 두개 안면 신경 및 피질의 신경 발달에 초점을 두었다(FitzPatrick et al., 2003). 그러나 SATB2가 인간의 결장 생리에서 역할을 맡을 수 있다는 간접적인 증거가 있다. SATB2는 궤양성 대장염 감수성 유전자로 게놈 광역학 연구에서 확인되었다(McGovern et al., 2010). 또한 SATB2 발현의 상실은 결장 직장암 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 나타났다(Eberhard et al., 2012). HCO에 대한 앞으로의 연구로 결장 내 SATB2 표적을 확인할 수 있을 것이고, 이것은 궤양성 대장염과 결장 직장암의 병리학에 대한 통찰력을 제공할 수 있을 것이다.

[0122] 모델 생물체에서의 여러 연구는 후장 형성 중에 내배엽을 패턴화하는 과정에서 BMP 신호 전달 경로를 연루시킨다(Kumar et al., 2003; Roberts et al., 1995; Sherwood et al., 2011; Tiso et al., 2002; Wills et al., 2008). 이와 일치하여, 본 출원인은 BMP 억제가 WNT 및 FGF가 후배 내배엽의 운명을 촉진시키는 능력을 배제시킴에 따라, 인간 최종 내배엽의 후방 패턴화가 BMP 신호 전달에 의존함을 입증하였다(McCracken et al., 2014). 그러나 BMP 신호 전달이 장 발달 중에 일시적으로 다른 역할을 하는 것은 놀라운 일이 아니다. 예를 들어, 근위-원위부 부위 영역의 확립 후에, BMP 신호 전달은 장 및 결장에 음와-융모 축(Crypt-villus axis)을 확립하는 기능을 한다(Li, 2005). 초파리 중장에서 보고된 바(Driver and Ohlstein, 2014, Guo et al., 2013)와 같이, 패턴화에 대한 시간 요구는 배아가 다중 목적의 장 발달을 위해 동일한 신호 전달 경로를 사용할 수 있게 한다. 인간의 질병 상황에서, BMPR1A의 돌연변이는 청소년 폴리시 증후군 환자의 하위 집합과 관련된다. HCO 시스템은 초기 발달 중에 BMP의 하류에 있는 HOX 코드를 확인하는 데 매우 유용했으며, BMPR1A 돌연변이를 가진 과민성 폴립이 HOX 유전자 발현을 변경하는지 여부를 판단하는 것은 흥미로울 수 있다.

[0123] 출원인은 소장이었던 HIO의 체외 유도 분화 및 체내 이식을 이전에 보고했다(Spence et al., 2011; Watson et al., 2014). 대장에 영향을 미치는 독특한 생리학 및 병리학적 조건을 감안할 때, 결장에 특이적인 병태 생리학적 질문을 조사하기 위해 결장 모델 시스템을 개발하는 것이 필수적이었다. 발달 적으로,이 시스템은 부위 동일성이 어떻게 확립되는지에 관한 근본적인 질문을 조사할 수 있는 기회를 제공한다. HIO 및 HCO는 HIO의 HIO에서 파네스 세포 및 HCO에서 대장 특이성 배상 세포와 같은 독특한 세포 유형을 발달시킨다. 더욱이 HIO와 HCO에는 일반적으로 각각 소장과 대장에서 풍부한 EEC 세트가 있다. 부위화된 유사장기는 장의 다른 부위가 어떻게 부위화된 줄기 세포를 발생시키는 지에 대한 향후 연구를 위한 기반을 제공해야 한다. 또한, HCO의 생성은 궤양성 대장염 및 결장 직장암과 같은 결장에 영향을 미치는 질병의 모델링을 가능하게 한다.

[0124] **재료 및 방법**

[0125] **동물.** 8~16주령, 면역 결핍성 NOD-SCID IL-2Rynu"(NSG) 마우스를 이식 실험에 사용했다(오하이오 주 신시내티의 포괄적 인 마우스 및 암 핵심 시설에서 얻음). 야생형 마우스를 마우스 태아 장의 연구에 사용하였다. 모든 마우스는 신시내티 어린이 병원 의료 센터(CCHMC)의 동물 시설에 수용되었다. 모든 실험은 CCHMC의 기관 동물 보호 및 사용위원회의 승인을 받아 수행되었다.

[0126] **개구리 및 마우스 배아에서 BMP 억제.** 제노푸스 트로피칼리스(손톱개구리속) 배아 배양과 소분자 처리는 이전에 기술된 것처럼 수행되었다(Rankin et al., 2012, Rankin et al., 2015). DMH-1(Sigma D8946)을 DMSO에 용해시키고 최종 농도 20pM으로 사용하였다; 동등한 농도의 DMSO 운반체를 형제 배아에 사용하였다. 억제제 처리 실험을 분석한 표지자에 유사한 효과로 두 번 반복하였다. 손톱개구리속 제자리 혼성화 분석을 위해 선형화된 전장 cDNA 플라스미드 템플릿을 사용하여 DIG 표지된 안티센스 RNA 프로브를 생성하였다(X.tropicalis satb2는 ATCC에서 구입, 클론 7720194, 프로브 용 HinDIII, T7, X.laevis satb2는 콜로라도-볼더 대학의 Tyler Square와 Daniel Medeiros의 기증; Xbal, 프로브용 Sp6). 프로브 합성과 제자리 혼성화 프로토콜을 설명하는 자세한 내용은 Xenbase(hftp://wiki.xenbase.orq/xenwiki/index.php/Protocols)에서 입수가능하다.

[0127] 마우스 전체 배아 배양물의 경우, e7.5 배아는 Ham's F12 배지와 N-2 보충물(Invitrogen)을 함유하는 전체 배아 배양 래트 혈청(Harlan 연구소)의 1:1 혼합물에서 배양하였다. 용기를 롤러 배양 장치(BTC Engineering, Cambridge, UK)에 놓고 37 ℃에서 2 일간 유지하고, 20% O2 및 5% CO2로 가스를 흘렸다. BMP 신호 전달은 비히클 대조군으로서 역할하는 DMSO와, 5 pM DMH-1에 의한 처리에 의해 억제하였다.

[0128] **인간 후장/전장 회전 타원체의 생성.** 인간의 장 기관은 이전에 기술된 것(Watson et al., 2014)처럼 생성하고 유지하였다. 인간 배아 줄기 세포와 유도된 다능성 줄기 세포를 마트리겔(기저막 매트릭스, BD Biosciences)을 도포하고, mTESR1 배지(Stem Cell Technologies)에서 유지시킨 6 웰 Nunclon 표면 플레이트(Nunc)에서 피더가 없는 조건에서 성장시켰다. 최종 내배엽(DE)의 유도를 위해, 인간 ES 또는 iPS 세포를 Accutase(Invitrogen)로 계대배양하였고, 마트리겔 도포, Nunclon 표면 24-웰 플레이트에서 1 웰당 100,000 세포의 밀도로 플레이팅하였다. Accutase 분열 세포의 경우, 첫 날 동안 10 pM Y27632 화합물(Sigma)를 배지에 첨가했다. 첫날 이후 배지를 mTESR1로 변경하고 세포를 추가로 24 시간 동안 배양했다. 세포를 앞서 기술된 바(Spence et al., 2011)와 같이 100ng/mL의 Activin A로 3 일 동안 처리하였다. 이어서, DE를 후장 유도 배지(RPMI 1640, 2 mM L-글루타민, 2 % 분해 FBS, 페니실린-스트렙토 마이신 및 100ng/mL Activin A)로 4일 동안 500ng/mL FGF4(R & D) 및 3 pM Chiron 99021(Tocris)와 함께 처리하여, 중장-후장 회전 타원체의 형성을 유도하였다.

[0129] **HIO 및 HCO로의 중장-후장 회전 타원체의 패턴화.** 회전 타원체를 24 웰 플레이트에서 수집하고 마트리겔(BD)에 도금했다. 근위 HIO를 생성하기 위해, 회전 타원체를 100ng/mL EGF(R & D)만을 보충하거나, 또는 100ng/ml NOGGIN(R & D)와 함께 100ng/mL EGF를 보충한 장 성장 배지(Advanced DMEM/F-12, N2, B27, 15 mM HEPES, 2 mM L-글루타민, 페니실린-스트렙토 마이신)으로 덧씌웠다. HCO를 생성하기 위해, 회전 타원체를 100ng/mL EGF와 100ng/mL BMP(R & D)로 덧씌웠다. SHH 실험을 위해, 1 pM SAG(Tocris), 5 pM SAG 또는 2.5 pM 시클로파민(Tocris)을 초기 3 일 동안 대조군 배지에 첨가하고, 그런고 산서, RNA 샘플을 채취하였다. 모든 패턴화 조건에서 EGF 만을 배지에 유지시키면서, 3일차에 배지를 변경하였다. 그러고 나서, 배지를 매주 2 회 변경하였다. HIOs와 HCO를 14 일마다 새로운 마트리겔에서 다시 도금하였다.

[0130] **NEUROGENIN3 유도성 세포주의 생성.** 독시사이클린 유도성 NEUROG3 세포주를 생성하기 위해, 본 출원인은 IPSC 72.3 세포에 pINDUCER21-NEUROG3 렌티 바이러스를 형질 도입하고, 250 g/mL의 G418을 사용하여 선별하였다. IPSC 72.3 세포주와 유도성 NEUROG3는 이전에 기술된 바 있다(McCracken et al., 2014). 안정적으로 형질 도입된 세포를 중장-후장 회전 타원체로 분화한 다음 HIO 또는 HCO로 패턴화 하였다. 회전 타원체를 28 일 동안 성장시켰고, 8 시간 동안 독시사이클린 0.5ug/mL로 맥동하였다. 35 일차에 유사장기를 수집하여, QPCR 및 IF로 분석 하였다.

[0131] **유사장기 중간엽의 성장.** 24-웰 플레이트의 바닥에 부착된 유사장기의 중간엽 세포는 2 차원으로 부착 및 성장시켰다. 유사장기의 중간엽 세포를 확장하기 위해, DMEM 10 % FBS + L-글루타민 + 페니실린-스트렙토 마이신을 웰에 첨가하였고, 그로부터 14 일 후에 유사장기를 수확하였다. 거의 100 % 세포군집이 이루어질 때까지, 총 2~3주 동안 매주 2 회씩 배지를 변경하였다.

[0132] **인간 장 유사장기의 이식.** NSG 생쥐를 항생제(275 ppm 술파메톡사졸과 1,365 ppm 트리메토프림, Test Diet)에 보관했다. 수술 전후에 음식과 물을 자유롭게 제공하였다. 28 일 동안 체외에서 성숙한 단일 HIO를 마트리겔에서 제거하고 차가운 인산염 완충 식염수(DPBS, Gibco)로 세척 한 후 수술 12 시간 전에 정제된 I 형 콜라겐(래트 꼬리 콜라겐; BD Biosciences)에 삽입하여 응고된 겔 플러그를 형성하였다. 이 플러그를 100ng/mL EGF(R&D)가 보충된 장 성장 배지(Advanced DMEM/F-12, B27, 15mM HEPES, 2mM L-글루타민, 페니실린-스트렙토 마이신)에서 밤새 표준 성장 배지에 넣었다. HIOs는 이전에 보고된 것(Watson et al., 2014)처럼 신피막 아래에 이식하였다. 간단히 말하면, 마우스를 2% 흡입된 이소플루란(Butler Schein)으로 마취시키고 마우스의 좌측면을 이소프로필 알콜 및 포비딘 요오드로 무균 방식으로 준비 하였다. 신장을 노출시키기 위해 작은 좌측 후방 늑골절개가 이루어졌다. 피막하 주머니를 형성하고, 콜라겐 삽입된 HIO를 상기 주머니에 삽입하였다. 그런 다음, 신장을 복막강으로 되돌리고 마우스에 Zosyn(100 mg/kg; Pfizer Inc.)의 IP 세척을 실시했다. 피부를 이중층으로 닫고 마우스에게 부프레넥스(Buprenex)(0.05 mg/kg, Midwest Veterinary Supply)를 피하 주사하였다. 이식 후 8~10 주차에 마우스를 인위적으로 안락사 시키거나 추가 실험을 실시했다.

[0133] **조직 처리, 면역형광법 및 현미경.** 조직은 조직의 크기에 따라 얼음 위에서 4 % 파라 포름 알데히드(PFA)로 1 내지 3 시간 동안 고정시켰다. 유사장기 및 이식 편을 OCT에서 동결시켰다. OCT 절편을 당나귀 혈청(1X PBS + 0.5% Triton-X에서 5% 혈청)을 사용하여 30 분간 차단하고 1 차 항체와 함께 밤새 4 ℃에서 항온 배양하였다. 이어서 슬라이드를 1X PBS + 0.5% Triton-X로 3 회 세척하고 실온에서 2 시간 동안 블로킹 완충액에서 DAPI와 함께 2차 항체로 배양하였다. 항체 및 해당 희석액의 목록은 표 2를 참조할 수 있다. 이어서 슬라이드를 1X PBS + 0.5% Triton-X로 2회 세척한 후 1X PBS로 최종 세척하였다. 이어서 덮개유리를 Fluoromount-G® (SouthernBiotech)를 사용하여 장착했다. 영상을 Nikon Al 공 촛점 현미경으로 포착하고, Imaris Imaging 소프트웨어(Bitplane)를 사용하여 분석하였다. 온조직 표본고정염색의 경우, 조직을 위와 비슷하게 처리한 다음

Murray의 용액에서 세정하였다. 영상을 Nikon A1 공 촛점 현미경으로 포착하였다.

[0134] [표 2]

[0135] **표 2. 사용된 QPCR 프라이머. 도 3 및 도 4 참조.**

[0136]

유전자	서열
CDH1 FWD	GACCGGTGCAATCTTCAAA
CDH1 REV	TTGACGCCGAGAGCTACAC
CHGA FWD	TGTGTCGGAGATGACCTCAA
CHGA REV	GTCCTGGCTCTTCTGCTCTG
CKB FWD	CCCACACCAGGAAGGTCTTA
CKB REV	CCTCTTCGACAAGCCCGT
FXYD3 FWD	AGGGTCACCTTCTGCATGTC
FXYD3 REV	CTTCGGATAAACGCAGGACT
GATA4 FWD	TAGCCCCACAGTTGACACAC
GATA4 REV	GTCCTGCACAGCCTGCC
HOXA13 FWD	GCACCTTGGTATAAGGCACG
HOXA13 REV	CCTCTGGAAGTCCACTCTGC
HOXB13 FWD	GCTGTACGGAATGCGTTTCT
HOXB13 REV	AACCCACCAGGTCCCTTTT
HOXD13 FWD	CCTCTTCGGTAGACGCACAT
HOXD13 REV	CAGGTGTACTGCACCAAGGA
HOXD3 FWD	CACCTCCAATGTCTGCTGAA
HOXD3 REV	CAAAATTCAAGAAAACACACACA
INSL5 FWD	GAAGGTTTTGCGCTGGATT
INSL5 REV	GATCCCTCAAGCTCAGCAAG
MSX2 FWD	GGTCTTGTGTTTCCTCAGGG
MSX2 REV	AAATTCAGAAGATGGAGCGG
MUC2 FWD	TGTAGGCATCGCTCTTCTCA
MUC2 REV	GACACCATCTACCTCACCCG
ONECUT1 Fwd	TTTTTGGGTGTGTTGCCTCT
ONECUT1 Rev	AGACCTTCCGGAGGATGTG
PDX1 FWD	CGTCCGCTTGTTCTCCTC
PDX1 REV	CCTTTCCCATGGATGAAGTC
PPIA (CPHA) FWD	CCCACCGTGTTCTTCGACATT
PPIA (CPHA) REV	GGACCCGTATGCTTTAGGATGA
SATB2 FWD	CCACCTTCCCAGCTTGATT
SATB2 REV	TTAGCCAGCTGGTGGAGACT

[0137] **면역형광법 영상의 정량화.** 전체 배아의 영상 정량은 영상을 분리된 채널로 분할한 다음 ImageJ(NIH)를 사용하여 픽셀 부위를 측정함으로써 수행하였다. 각 채널에 대해 픽셀 부위를 결정하고, 채널 사이의 비율을 결정하고, 대조군 처리 배아에 대한 비율을 100으로 나타내었다. 체외 및 체내 성장 유사장기의 정량화는 위에서 설명한대로 영상이 포착된 섹션에서 수행하였다. CDX2, GATA4 및 SATB2 양성 핵의 수는 인간 생검 시료로 보정한 후 marl에서 스폿(spot) 기능을 사용하여 정량화하였다.

[0138] **RNA 단리 및 QPCR.** Nucleospin® RNA 추출 키트(Macharey-Nagel)를 사용하여 RNA를 추출하고 제조업체의 프로토콜에 따라 Superscript VILO(Invitrogen)를 사용하여 cDNA로 역전사하였다. QPCR 프라이머는 qPrimerDepot 웹 기반 도구(primerdepot.nci.nih.gov)를 사용하여 디자인하였다. 프라이머 서열은 표 3에 열거되어 있다. QPCR은 Quantitect SYBR® Green PCR kit(Qiagen)와 QuantStudio TM 6 Flex Real-Time PCR System(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다.

표 3

[0139] **사용된 항체. 도 1~6 참조**

항체	숙주	카탈로그 번호	희석
B-카테닌	토끼	Santa Cruz #sc-7199	1:200
CDH17*	토끼	Sigma #HPA023616	1:1,500
Cdx2	쥐	BioGenex cdx2-88	1:300
Cdx2	토끼 단클론성	Cell Marque EPR2764Y	1:100
Chr-A(C20)	염소	Santa Cruz #sc-1488	1:100

DEFA5*	마우스 단클론성	Novus BiologicalsNB 110-60002	1:60,000
E- Cadherin	염소	R & D #AF648	1:400
E-Cadherin(마우스 특이적)	래트	R & D #MAB7481	1:500
E- Cadherin	마우스	R & D #AF648	1:500
FoxA2	염소	Santa Cruz #sc-6554	1:500
GATA4	염소	Santa Cruz #sc-1237	1:100
GATA4	토끼	Santa Cruz #sc-9053	1:100
GFP(녹색 형광 단백질)	토끼	Invitrogen #A11122	1:1,000
그렐린	염소	Santa Cruz #sc-10368	1:500
GIP(가스트린 억제 폴리펩티드)	염소	Santa Cruz #sc-23554	1:500
GLP-1	마우스	BioVision #3104-100	1:200
HNF-6(ONECUT1)	토끼	Santa Cruz #sc-13050	1:100
INSL5(H-110)*	토끼	Santa Cruz #sc-67190	1:100
KI67	토끼 단클론성	Cell Marque SP6	1:100
모틸린	마우스 단클론성	Santa Cruz #sc-376605	1:100
뮤신	토끼	Santa Cruz #sc-20119	1:100
뮤신	토끼	Santa Cruz #sc-15334	1:200
펩티드 YY	토끼	Abcam #ab22663	1:1000
pSmad 1/5/8(단종 및 로 교체	토끼	Cell Signaling 9511S	1:100
pSmad 2/3	토끼	Cell Signaling 9510S	1:100
SATB2	토끼 단클론성	Cell Marque EP281	1:100
SATB2(SATBA4610)*	마우스 단클론 성	Santa Cruz #sc-81376	1:100
Sox9	토끼	Millipore#AB5535	1:10,000
Alexafluor ®당나귀 항-염소 488	당나귀	Life Technologies A-11055	1:500
Alexafluor ®당나귀 항- 염소568	당나귀	Life Technologies A-11057	1:500
Alexafluor ®당나귀 항- 마우스 568	당나귀	Life Technologies A-10037	1:500
Alexafluor ®당나귀 항-토끼 647	당나귀	Life Technologies A-31573	1:500
Alexafluor ®당나귀 항-랫트 488	당나귀	Life Technologies A-21208	1:500

[0140] **대장 표지자인 SATB2의 식별.**대장 표지자를 확인하기 위해 출원인은 처음에 GNCPro http://gncpro.sabiosciences.comigncpro/expression_grapherphp를 사용하여 University of Tokyo 데이터베이스를 기반으로 (다른 조직과 비교하여) 결장에서 상향 조절된 전사 인자를 확인하였다. 이 검색을 바탕으로, SATB2는 대장에서 6 위의 유전자였다. 결장에서 SATB2가 실제로 상향 조절되는지 확인하기 위해, 출원인은 TiGER 데이터베이스(hftp://bioinfo.wilmer.ihu.edu/tiger/db gene/SATB2-index.html)를 사용하여 SATB2 발현을 검색했다. 결장에서 SATB2의 발현을 더 확인하고 수많은 조직에서 단백질 발현을 검사하기 위해, 출원인은 Human Protein Atlas(http://www.proteinatlas.org/search/satb2)를 사용하였다. 유사한 접근법을 사용하여 대장/결장의 다른 표지자를 확인하였다.

[0141] **공개 RNA-seq 승인 번호.** 성인 소장과 대장 RNA-seq 데이터를 공개 데이터베이스 E-MTAB-1733에서 다운로드하였다. 이 데이터 세트는 상피 및 근육 층을 포함하는 전체 장기 조직을 나타낸다. 소장 샘플의 승인 번호:ERR315344, ERR315381, ERR315409, ERR315442, ERR315461. 대장 샘플의 승인 번호:ERR315348, ERR315357, ERR315484. 도 9b의 경우, 처리된 FPKM 데이터는 https://qithub.com/hilldr/FinkbeinerStemCellReports2015에서 다운로드하였다. 이러한 데이터에는 GSE18927의 인간 태아 장(또한 전체 장기) 샘플뿐만 아니라 E-MTAB-1733에서 위에 나열된 성인 십이지장(ERS326992, ERS326976) 및 소장 샘플이 포함된다. 인간 태아 소장의 등록 번호는 GSM1059508, GSM1059521, GSM1059486, GSM1059507, GSM1059517, GSM1220519이다. 도 9c에서, 데이터는 GEO 가입 GSE66749 플랫폼 GLP5175에서 수득하였다. 하기 샘플을 사용하였다: GSM1385161, GSM1385161, GSM1385162, GSM1385163, GSM1385164, GSM1385165, GSM1385166, GSM1385167, GSM1385168, GSM1385169, GSM1385170, GSM1385171, GSM1614646, GSM1614646. 샘플 값은 GEO2R "프로파일 그래프" 함수를 사용하고 식별 번호(각각 3086100 및 2594089)로 GATA4 및 SATB2를 검색하여 결정하였다.

[0142] **RNA-seq 서열 조립 풍부 추정.** RNA 라이브러리 구축 및 RNA 시퀀싱은 Illumina HiSeq2500 플랫폼을 사용하여 신시내티 소아병원 DNA 시퀀싱 코어에 의해 수행하였다. Illumina 시퀀싱 작업의 품질은 FastQC 버전 0.10.1

http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc를 사용하여 각 샘플의 FASTQ 데이터를 분석하여 품질 문제를 표시할 수 있는 데이터의 특징을 확인함으로써 평가하였다(예:낮은 점수, 지나치게 표현된 서열, 부적당 한 GC 함량 등). 주요 쟁점은 QC 분석에 의해 확인되지 않았다. 출원인은 정렬, 차동 발현 분석 및 사후 분석 진단을 위해 소프트웨어 패키지 Tuxedo Suite를 사용하였다. 간단히 말하면, 출원인은 TopHat 버전 2.0.13과 Bowtie 버전 2.2.5(Langmead et al., 2009)를 사용하여 참조 전사체(UCSC hg19)에 대한 판독갑들을 정렬하였다. 출원인은 판독값 매핑을 공지된 전사에 제한하는 "-no-coverage-search" 및 "-no-novel-juncs"뿐만 아니라, 판독값 정렬의 정확성을 최대화하기 위해 "-b2-very-sensitive"를 제외하고, 정렬을 위한 기본 매개 변수 설정을 사용하였다. RNA 풍부(abundance) 추정을 위해 Cufflinks 2.2.1 버전(Trapnell et al., 2012)을 사용하였다. 참조 게놈 서열로 UCSC hg19.fa를 사용하였고, UCSC hg19.gtf를 전사체 주석에 사용하였다. 출원인은 Cufflinks에서 하기 매개 변수를 적용하였다: 둘 이상의 유전자좌에 매핑되는 판독값에 대한 발현 계산을 조정하기 위해 "-multi-read-correct" 및 발현값의 정규화를 위해 "-compatible-hits-norm"및 "-upper-quartile-norm". CuffNorm 함수를 사용하여 발현값의 정규화된 FPKM 표를 생성하였다. 64 비트 데비안 리눅스 안정 버전 7.10("Wheezy") 플랫폼을 사용하여 RNA 서열 조립 및 전사 분석을 수행하였다.

[0143] 차동 발현 분석.

[0144] 모든 플롯 및 통계 분석은 R 버전 3.3.1(2016-06-21)에서 수행하였다. 플롯은 R 패키지 'ggplot2'(Ginestet, 2011)를 사용하여 생성하였다. Cufflinks 출력의 차동 발현 분석 및 통계 테스트는 R 패키지 'SeqRetriever' 'SeqRetriever'버전 0.6 https://github.com/hilldr/SeqRetrieyer로 완료하였다. 초기하 수단 테스트를 사용하여 R 패키지 'GeneOverlap'http://shenlab-sinai.cithub.io/shenlab-sinai/를 사용하는 그룹 간의 공유 유전자 발현 시그니처의 상대적인 풍부도를 평가하였다. 완전한 RNA-seq FASTQ 프로세싱 파이프 라인 및 분석 스크립트는 https://qithub.com/hilldr/Munera2016에서 입수 가능하다.

[0145] 참고 문헌

Aronson, B.E., Aronson, S.R., Berkhout, R.P., Chavoushi, S.F., He, A., Pu, W.T., Verzi, M.P., and Krasinski, S.D. (2014). GATA4 represses an ileal program of gene expression in the proximal small intestine by inhibiting the acetylation of histone H3, lysine 27. Bba-Gene Regul Mech 1839, 1273-1282.

Battle, M.A., Bondow, B.J., Iverson, M.A., Adams, S.J., Jandacek, R.J., Tso, P., and Duncan, S.A. (2008). GATA4 is essential for jejuna! function in mice. Gastroenterology 135, 1676¬1686 e1671.

Bernstein, B.E., Stamatoyannopoulos, J.A., Costello, J.F., Ren, B., Milosavljevic, A., Meissner, A., Kellis, M., Marra, M.A., Beaudet, A.L., Ecker, J.R., et al. (2010). The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. Nat Biotechnol 28, 1045-1048.

Beuling, E., Bosse, T., aan de Kerk, D.J., Piaseckyj, C.M., Fujiwara, Y., Katz, S.G., Orkin, S.H., Grand, R.J., and Krasinski, S.D. (2008a). GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors. Dev Biol 322, 179-189.

Beuling, E., Bosse, T., Buckner, M.A., and Krasinski, S.D. (2007a). Co-localization of Gata4 and Hnfl alpha in the gastrointestinal tract is restricted to the distal stomach and proximal small intestine. Gastroenterology 132, A586-A586.

Beuling, E., Bosse, T., de Kerk, D.A., Piaseckyj, C.M., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., and Krasinski, S.D. (2007b). Fog cofactors partially mediate Gata4 function in the adult mouse small intestine. Gastroenterology 132, A692-A693.

[0146]

Beuling, E., Kerkhof, I.M., Nicksa, G.A., Giuffrida, M.J., Haywood, J., aan de Kerk, D.J., Piaseckyj, C.M., Pu, W.T., Buchmiller, T.L., Dawson, P.A., et al. (2010). Conditional Gata4 deletion in mice induces bile acid absorption in the proximal small intestine. Gut 59, 888-895.

Beuling, E., Kerkhof, I.M., Piaseckyj, C.M., Dawson, PA., Pu, W.T., Grand, R.J., and Krasinski, S.D. (2008b). The absence of GATA4 in the distal small intestine defines the ilea! phenotype. Gastroenterology 134, A83-A84.

Bonilla-Claudio, M., Wang, J., Bai, Y., Klysik, E., Selever, J., and Martin, J.F. (2012). Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. Development 139, 709-719.

Bosse, T., Fialkovich, J.J., Piaseckyj, C.M., Beuling, E., Broekman, H., Grand, R.J., Montgomery, R.K., and Krasinski, S.D. (2007). Gata4 and Hnflalpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292, G1302-1314.

Bouchi, R., Foo, K.S., Hua, H., Tsuchiya, K., Ohmura, Y., Sandoval, P.R., Ratner, L.E., Egli, D., Leibel, R.L., and Accili, D. (2014). FOXO1 inhibition yields functional insulin-producing cells in human gut organoid cultures. Nat Commun 5, 4242.

Burnicka-Turek, 0., Mohamed, B.A., Shirneshan, K., Thanasupawat, T., Hombach-Klonisch, S., Klonisch, T., and Adham, I.M. (2012). INSL5-deficient mice display an alteration in glucose homeostasis and an impaired fertility. Endocrinology 153, 4655-4665.

De Santa Barbara, P., Williams, J., Goldstein, A.M., Doyle, A.M., Nielsen, C., Winfield, S., Faure, S., and Roberts, D.J. (2005). Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 234, 312-322.

[0147]

Dobreva, G., Chahrour, M., Dautzenberg, M., Chirivella, L., Kanzler, B., Farinas, I., Karsenty, G., and Grosschedl, R. (2006). SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. Cell 125, 971-986.

Driver, I., and Oh!stein, B. (2014). Specification of regional intestinal stem cell identity during Drosophila metamorphosis. Development 141, 1848-1856.

Duluc, I., Freund, J.N., Leberquier, C., and Kedinger, M. (1994). Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. J Cell Biol 126, 211-221.

Eberhard, J., Gaber, A., Wangefjord, S., Nodin, B., Uhlen, M., Ericson Lindquist, K., and Jirstrom, K. (2012). A cohort study of the prognostic and treatment predictive value of SATB2 expression in colorectal cancer. Br J Cancer 106, 931-938.

Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., et al. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. Mol Cell Proteomics 13, 397-406.

Finkbeiner, S.R., Hill, D.R., Altheim, C.H., Dedhia, P.H., Taylor, M.J., Tsai, Y.H., Chin, A.M., Mahe, M.M., Watson, C.L., Freeman, J.J., et al. (2015). Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. Stem Cell Reports.

FitzPatrick, D.R., Carr, I.M., McLaren, L., Leek, J.P., Wightman, P., Williamson, K., Gautier, P., McGill, N., Hayward, C., Firth, H., et al. (2003). Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. Hum Mol Genet 12, 2491-2501.

Georgas, K.M., Armstrong, J., Keast, J.R., Larkins, C.E., McHugh, K.M., Southard-Smith, E.M., Cohn, M.J., Batourina, E., Dan, H., Schneider, K., et a/. (2015). An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract. Development 142, 1893-1908.

[0148]

Ginestet, C. (2011). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. J R Stat Soc a Stat 174, 245–245.

Gracz, A.D., Ramalingam, S., and Magness, S.T. (2010). Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. Am J Physiol-Gastr L 298, G590-G600.

Guo, Z., Driver, I., and Ohlstein, B. (2013). Injury-induced BMP signaling negatively regulates Drosophila midgut homeostasis. J Cell Biol 201, 945-961.

Gyorgy, A.B., Szemes, M., de Juan Romero, C., Tarabykin, V., and Agoston, D.V. (2008). SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons. Eur J Neurosci 27, 865-873.

Haramis, A.P.G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J.A., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. Science 303, 1684-1686.

Hardwick, J.C., Van Den Brink, G.R., Bleuming, S.A., Ballester, I., Van Den Brande, J.M., Keller, J.J., Offerhaus, G.J., Van Deventer, S.J., and Peppelenbosch, M.P. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. Gastroenterology 126, 111-121.

He, X.C., Zhang, J.W., Tong, W.G., Tawfik, 0., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et a/. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. Nature Genetics 36, 1117-1121.

Higuchi, Y., Kojima, M., Ishii, G., Aoyagi, K., Sasaki, H., and Ochiai, A. (2015). Gastrointestinal Fibroblasts Have Specialized, Diverse Transcriptional Phenotypes: A Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Fibroblasts. Plos One 10.

Holland, P.W.H., Booth, H.A.F., and Bruford, E.A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. Bmc Biol 5.

[0149]

Jeejeebhoy, K.N. (2002). Short bowel syndrome: a nutritional and medical approach. CMAJ 166, 1297-1302.

Johnston, T.B. (1913). Extroversion of the Bladder, complicated by the Presence of Intestinal Openings on the Surface of the Extroverted Area. J Anat Physiol 48, 89-106.

Kohlnhofer, B.M., Thompson, C.A., Walker, E.M., and Battle, M.A. (2016). GATA4 regulates epithelial cell proliferation to control intestinal growth and development in mice. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2, 189-209.

Kumar, M., Jordan, N., Melton, D., and Grapin-Botton, A. (2003). Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. Dev Biol 259, 109-122.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10, R25.

Li, H., Coghlan, A., Ruan, J., Coin, L.J., Heriche, J.K., Osmotherly, L., Li, R., Liu, T., Zhang, Z., Bolund, L., et al. (2006). TreeFam: a curated database of phylogenetic trees of animal gene families. Nucleic Acids Res 34, D572-580.

Li, L.H. (2005). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through antagonizing Wnt signaling. Gastroenterology 128, A702-A702.

McCracken, K.W., Aihara, E., Martin, B., Crawford, C.M., Broda, T., Treguier, J., Zhang, X., Shannon, J.M., Montrose, M.H., and Wells, J.M. (2017). Wnt/beta-catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. Nature 541, 182-187.

[0150] McCracken, K.W., Cata, E.M., Crawford, C.M., Sinagoga, K.L., Schumacher, M., Rockich, B.E., Tsai, Y.H., Mayhew, C.N., Spence, J.R., Zavros, Y., et al. (2014).

Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. Nature 516, 400–404.

McGovern, D.P., Gardet, A., Torkvist, L., Goyette, P., Essers, J., Taylor, K.D., Neale, B.M., Ong, R.T., Lagace, C., Li, C., et al. (2010). Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. Nat Genet 42, 332-337.

Molodecky, NA., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 142, 46-54 e42; quiz e30.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A Dominant Mutation That Predisposes to Multiple Intestinal Neoplasia in the Mouse. Science 247, 322-324.

Patankar, J., Obrowsky, S., Hoefler, G., Battle, M., Kratky, D., and Levak-Frank, S. (2012a). Intestinal Deficiency of Gata4 Protects from Diet-Induced Hepatic Steatosis by Suppressing De Novo Lipogenesis and Gluconeogenesis in Mice. J Hepatol 56, S496-S496.

Patankar, J.V., Obrowsky, S., Doddapattar, P., Hoefler, G., Battle, M., Levak-Frank, S., and Kratky, D. (2012b). Intestinal GATA4 deficiency protects from diet-induced hepatic steatosis. J Hepatol 57, 1061-1068.

Ramalingam, S., Daughtridge, G.W., Johnston, M.J., Gracz, A.D., and Magness, S.T. (2012). Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302, G10-20.

Rankin, S.A., Gallas, A.L., Neto, A., Gomez-Skarmeta, J.L., and Zorn, A.M. (2012). Suppression of Bmp4 signaling by the zinc-finger repressors Osrl and Osr2 is required for Wnt/beta-catenin-mediated lung specification in Xenopus. Development 139, 3010-3020.

[0151]

Rankin, S.A., Thi Tran, H., Wlizla, M., Mancini, P., Shifley, E.T., Bloor, S.D., Han, L., Vleminckx, K., Wert, S.E., and Zorn, A.M. (2015). A Molecular atlas of Xenopus respiratory system development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 244, 69-85.

Ratineau, C., Duluc, I., Pourreyron, C., Kedinger, M., Freund, J.N., and Roche, C. (2003). Endoderm- and mesenchyme-dependent commitment of the differentiated epithelial cell types in the developing intestine of rat. Differentiation 71, 163-169.

Roberts, D.J., Johnson, R.L., Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., and Tabin, C. (1995). Sonic Hedgehog Is an Endodermal Signal Inducing Bmp-4 and Hox Genes during Induction and Regionalization of the Chick Hindgut. Development 121, 3163-3174.

Rodriguez-Pineiro, A.M., Bergstrom, J.H., Ermund, A., Gustafsson, J.K., Schutte, A., Johansson, M.E., and Hansson, G.C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 305, G348–356.

Savidge, T.C., Morey, A.L., Ferguson, D.J., Fleming, K.A., Shmakov, A.N., and Phillips, A.D. (1995). Human intestinal development in a severe-combined immunodeficient xenograft model. Differentiation 58, 361-371.

Savin, T., Kurpios, N.A., Shyer, A.E., Florescu, P., Liang, H., Mahadevan, L., and Tabin, C.J. (2011). On the growth and form of the gut. Nature 476, 57-62.

Sheehan-Rooney, K., Swartz, M.E., Lovely, C.B., Dixon, M.J., and Eberhart, J.K. (2013). Bmp and Shh signaling mediate the expression of satb2 in the pharyngeal arches. PLoS One 8, e59533.

Sherwood, R.I., Chen, T.Y., and Melton, D.A. (2009). Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 238, 29-42.

[0152]

Sherwood, R.I., Maehr, R., Mazzoni, E.O., and Melton, D.A. (2011). Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. Mech Dev 128, 387-400.

Shyer, A.E., Huycke, T.R., Lee, C., Mahadevan, L., and Tabin, C.J. (2015). Bending gradients: how the intestinal stem cell gets its home. Cell 161, 569-580.

Siegel, R., Desantis, C., and Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin 64, 104-117.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Valiance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, Si., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature 470, 105-109.

Thanasupawat, T., Hammje, K., Adham, I., Ghia, J.E., Del Bigio, M.R., Krcek, J., Hoang-Vu, C., Klonisch, T., and Hombach-Klonisch, S. (2013). INSL5 is a novel marker for human enteroendocrine cells of the large intestine and neuroendocrine tumours. Oncol Rep 29, 149–154.

Tiso, N., Filippi, A., Pauls, S., Bortolussi, M., and Argenton, F. (2002). BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. Mech Dev 118, 29-37.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nat Protoc 7, 562-578.

Uppal, K., Tubbs, R.S., Matusz, P., Shaffer, K., and Loukas, M. (2011). Meckel's diverticulum: a review. Clin Anat 24, 416-422.

van Dop, W.A., Uhmann, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G.J., Weerman, M.A.V., Boeckxstaens, G.E., Hommes, D.W., Hardwick, J.C., et al. (2009). Depletion of the Colonic Epithelial Precursor Cell Compartment

[0153]

Upon Conditional Activation of the Hedgehog Pathway. Gastroenterology 136, 2195-2203.

van Klinken, B.J., Dekker, J., van Gool, S.A., van Marie, J., Buller, H.A., and Einerhand, A.W. (1998). MUCSB is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. The American journal of physiology 274, G871-878.

Walker, E.M., Thompson, C.A., and Battle, M.A. (2014). GATA4 and GATA6 regulate intestinal epithelial cytodifferentiation during development. Dev Biol 392, 283-294.

Walton, K.D., Kolterud, A., Czerwinski, M.J., Bell, M.J., Prakash, A., Kushwaha, J., Grosse, A.S., Schnell, S., and Gumucio, D.L. (2012). Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 15817–15822.

Walton, K.D., Kolterud, A., Grosse, A.S., Hu, C.B., Czerwinski, M., Richards, N., and Gumucio, D.L. (2009). Epithelial Hedgehog signals direct mesenchymal villus patterning through BMP. Dev Biol 331, 489-489.

Walton, K.D., Whidden, M., Kolterud, A., Shoffner, S.K., Czerwinski, M.J., Kushwaha, J., Parmar, N., Chandhrasekhar, D., Freddo, A.M., Schnell, S., et al. (2016). Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. Development 143, 427-436.

Wang, X., Yamamoto, Y., Wilson, L.H., Zhang, T., Howitt, B.E., Farrow, M.A., Kern, F., Ning, G., Hong, Y., Khor, C.C., etal. (2015). Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. Nature 522, 173-178.

Watson, C.L., Mahe, M.M., Munera, J., Howell, J.C., Sundaram, N., Poling, H.M., Schweitzer, J.I., Valiance, J.E., Mayhew, C.N., Sun, Y., et al. (2014). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. Nat Med 20, 1310-1314.

[0154]

Wehkamp, J., Chu, H., Shen, B., Feathers, R.W., Kays, R.J., Lee, S.K., and Bevins, C.L. (2006). Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. FEBS Left 580, 5344-5350.

Whissell, G., Montagni, E., Martinelli, P., Hernando-Momblona, X., Sevillano, M., Jung, P., Cortina, C., Caton, A., Abuli, A., Castells, A., et al. (2014). The transcription factor GATA6 enables self-renewal of colon adenoma stem cells by repressing BMP gene expression. Nat Cell Biol 16, 695-707.

Wills, A., Dickinson, K., Khokha, M., and Baker, J.C. (2008). Bmp signaling is necessary and sufficient for ventrolateral endoderm specification in Xenopus. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 237, 2177-2186.

Xue, X., Ramakrishnan, S., Anderson, E., Taylor, M., Zimmermann, E.M., Spence, J.R., Huang, S., Greenson, J.K., and Shah, Y.M. (2013). Endothelial PAS domain protein 1 activates the inflammatory response in the intestinal epithelium to promote colitis in mice. Gastroenterology 145, 831-841.

Yahagi, N., Kosaki, R., Ito, T., Mitsuhashi, T., Shimada, H., Tomita, M., Takahashi, T., and Kosaki, K. (2004). Position-specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract. Congenit Anom (Kyoto) 44, 18-26.

Zbuk, K.M., and Eng, C. (2007). Hamartomatous polyposis syndromes. Nat Clin Pract Gastr 4, 492-502.

Zorn, A.M., and Wells, J.M. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. Annu Rev Cell Dev Biol 25, 221-251.

[0155]

[0156] 모든 백분율 및 비율은 달리 명시되지 않는 한 중량 기준으로 계산된다. 모든 백분율 및 비율은 달리 명시되지 않는 한 총 조성물을 기준으로 계산된다.

[0157] 본 명세서 전반에 걸쳐 주어진 모든 최대 수치 제한은, 마치 보다 작은 수치 제한이 본 명세서에 명시적으로 기재된 것처럼, 모든 보다 낮은 수치 제한을 포함한다는 것을 이해해야 한다. 본 명세서 전반에 걸쳐서 주어진 모든 최소 수치 제한은, 마치 보다 높은 수치 제한이 본 명세서에 명시적으로 기재된 것처럼, 모든 높은 수치 제한을 포함할 것이다. 이 명세서 전체에 주어진 모든 수치 범위는, 마치 보다 좁은 수치 범위가 모두 여기에 명시적으로 기재되어 있는 것처럼, 보다 넓은 수치 범위 내에 속하는 모든 보다 좁은 수치 범위를 포함 할 것이다.

[0158] 본 명세서에 개시된 치수 및 값은 열거된 정확한 수치로 엄격하게 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다. 대신, 달리 명시되지 않는 한, 각각의 이러한 치수는 언급된 값과 그 값을 둘러싼 기능적으로 동등한 범위 모두를 의미하는 것이다. 예를 들어, "20 ㎜"로 개시된 치수는 "약 20 ㎜"를 의미하는 것이다.

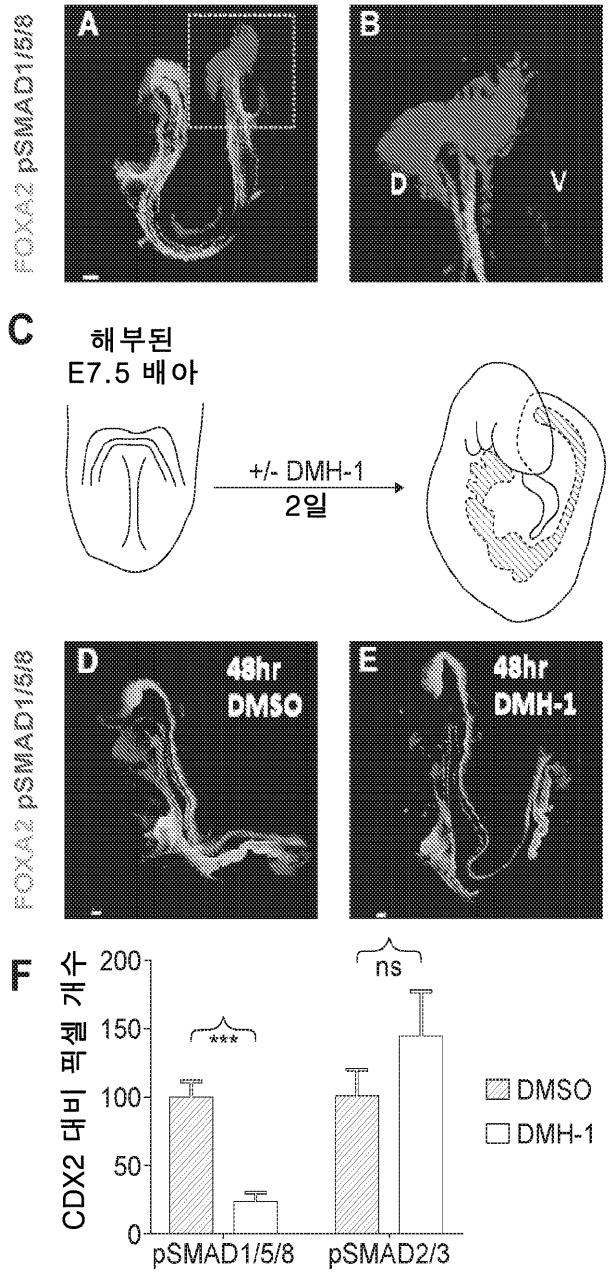
[0159] 상호 참조되거나 관련된 특허 또는 출원을 포함하여, 본원에 통합된 모든 문서는, 명시적으로 제외되거나 달리 제한되지 않는 한, 그 전체가 참조로 본원에 통합된다. 모든 문헌의 인용은 이것이 본원에 개시 또는 청구된 발명에 관한 선행 기술이거나, 또는 그 자체로 또는 임의의 다른 참고 문헌과의 임의의 조합으로, 모든 그와 같은 발명을 교시, 제안 또는 개시하는 것임을 인정하는 것이 아니다. 또한 본 문서에서 용어의 모든 의미 또는 정의가 참조로 통합된 문서에서의 동일한 용어의 의미 또는 정의와 상충하는 경우, 본 문서의 해당 용어에 지정된 의미 또는 정의가 우선할 것이다.

[0160] 본 발명의 특정 구현예들이 도시되고 기술되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 다른 변경 및 수정이 이루어질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 범위 내에 있는 이러한 모든 변경

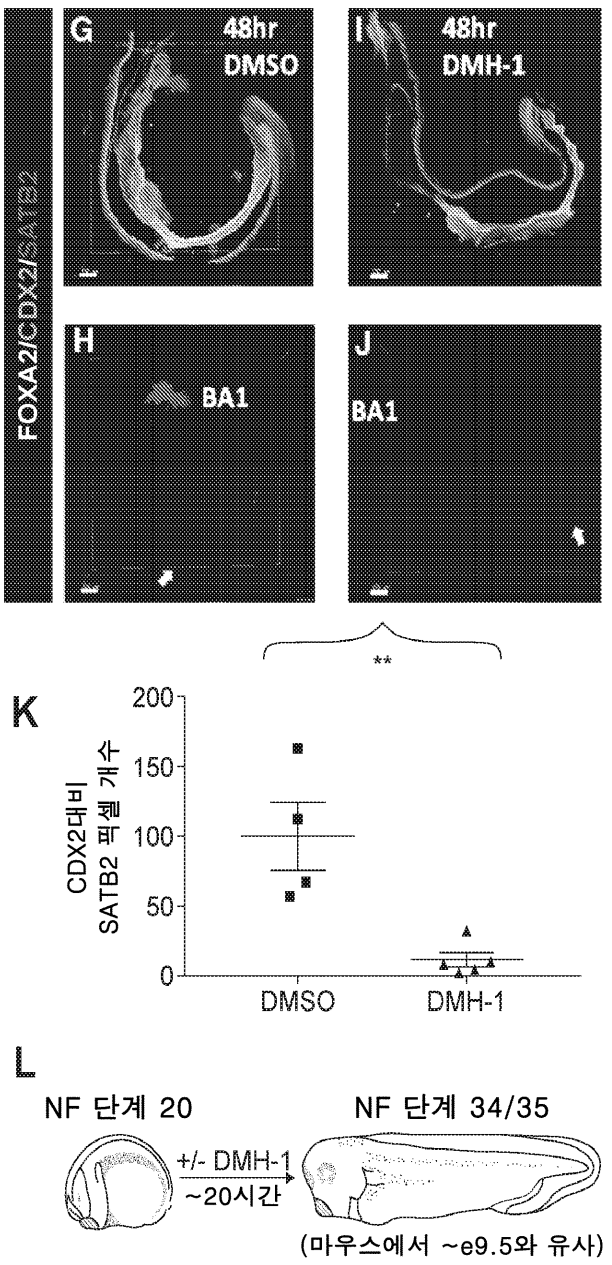
및 수정을 첨부된 청구 범위에 포함하고자 한다.

도면

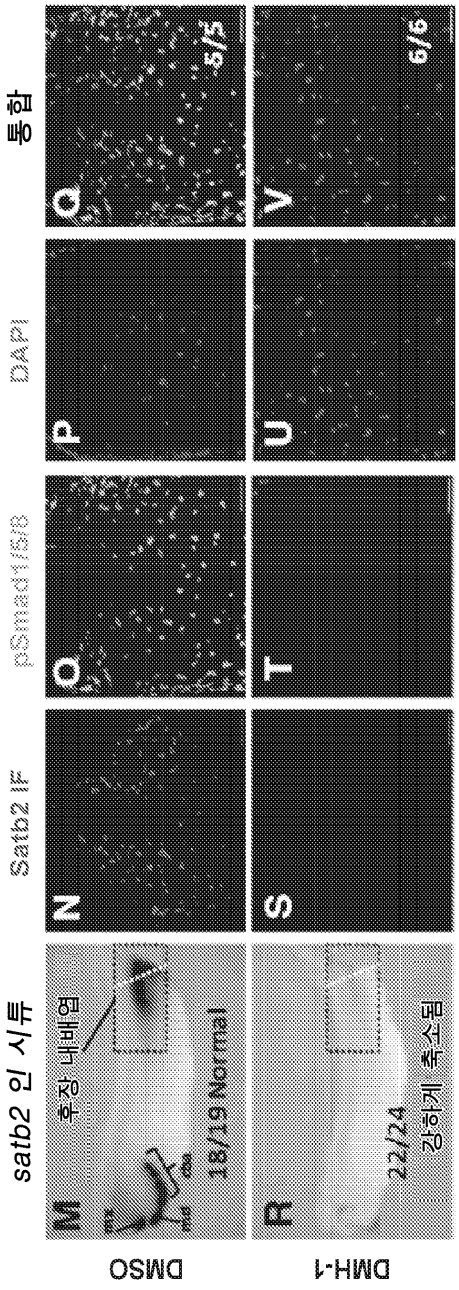
도면1a



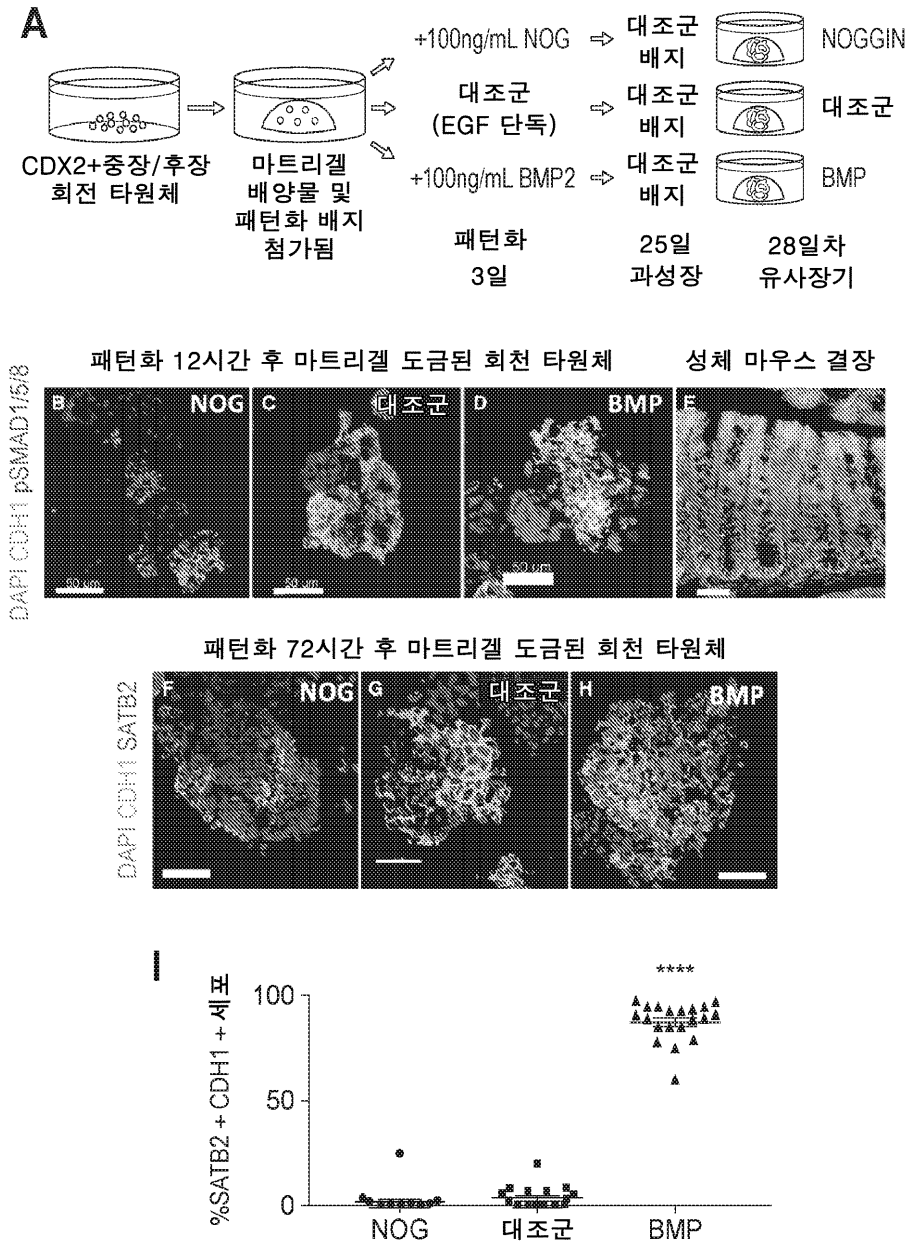
도면1b


FOXA2/CDX2/SATB2
G
48hr
DMSO
I
48hr
DMH-1
H
BA1
J
BA1
**
K
CDX2대비
SATB2 픽셀 개수
200
150
100
50
0
DMSO
DMH-1
L
NF 단계 20
NF 단계 34/35
+/- DMH-1
~20시간
(마우스에서 ~e9.5와 유사)

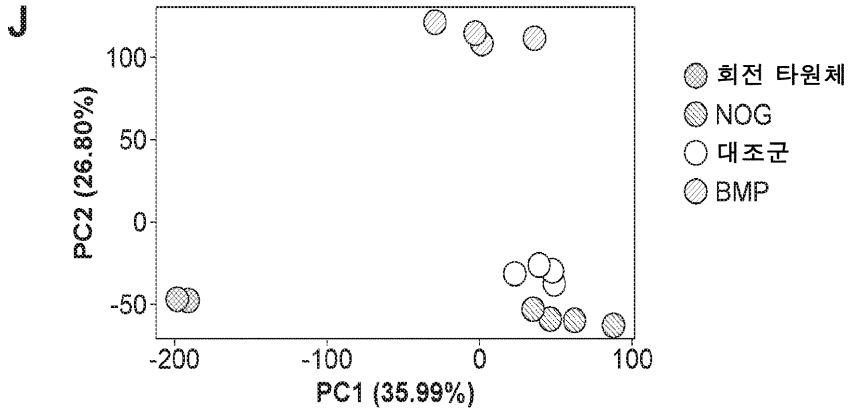
도면1c


satb2 인 시튜
Satb2 IF
pSmad1/5/8
DAPI
통합
DMSO
DMH-1
후장 내배엽
18/19 Normal
22/24
강하게 축소됨
5/5
6/6

도면2a


A
CDX2+중장/후장
회전 타원체
마트리겔
배양물 및
패턴화 배지
첨가됨
+100ng/mL NOG
대조군
(EGF 단독)
+100ng/mL BMP2
패턴화
3일
대조군
배지
대조군
배지
대조군
배지
25일
과성장
NOGGIN
대조군
BMP
28일차
유사장기
패턴화 12시간 후 마트리겔 도금된 회천 타원체
성체 마우스 결장
DAPI CDH1 pSMAD1/5/8
B NOG
C 대조군
D BMP
E
패턴화 72시간 후 마트리겔 도금된 회천 타원체
DAPI CDH1 SATB2
F NOG
G 대조군
H BMP
I
%SATB2 + CDH1 + 세포
100
50
0
****
NOG
대조군
BMP

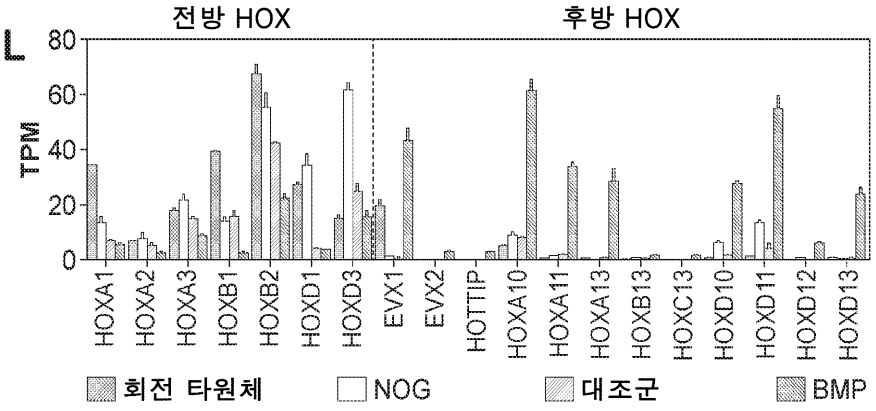
도면2b



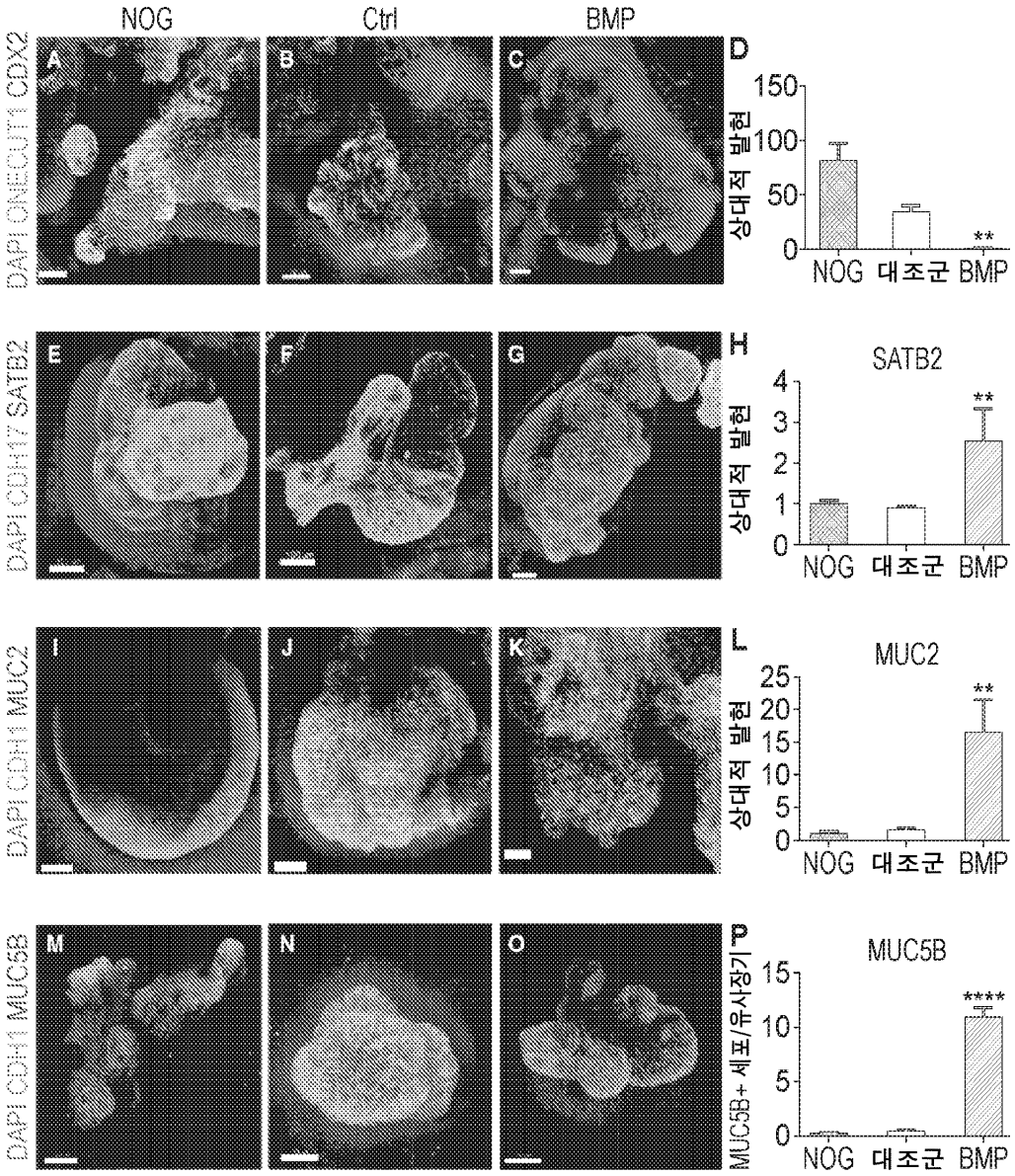
K

세포존재론 BMP 대 NOG

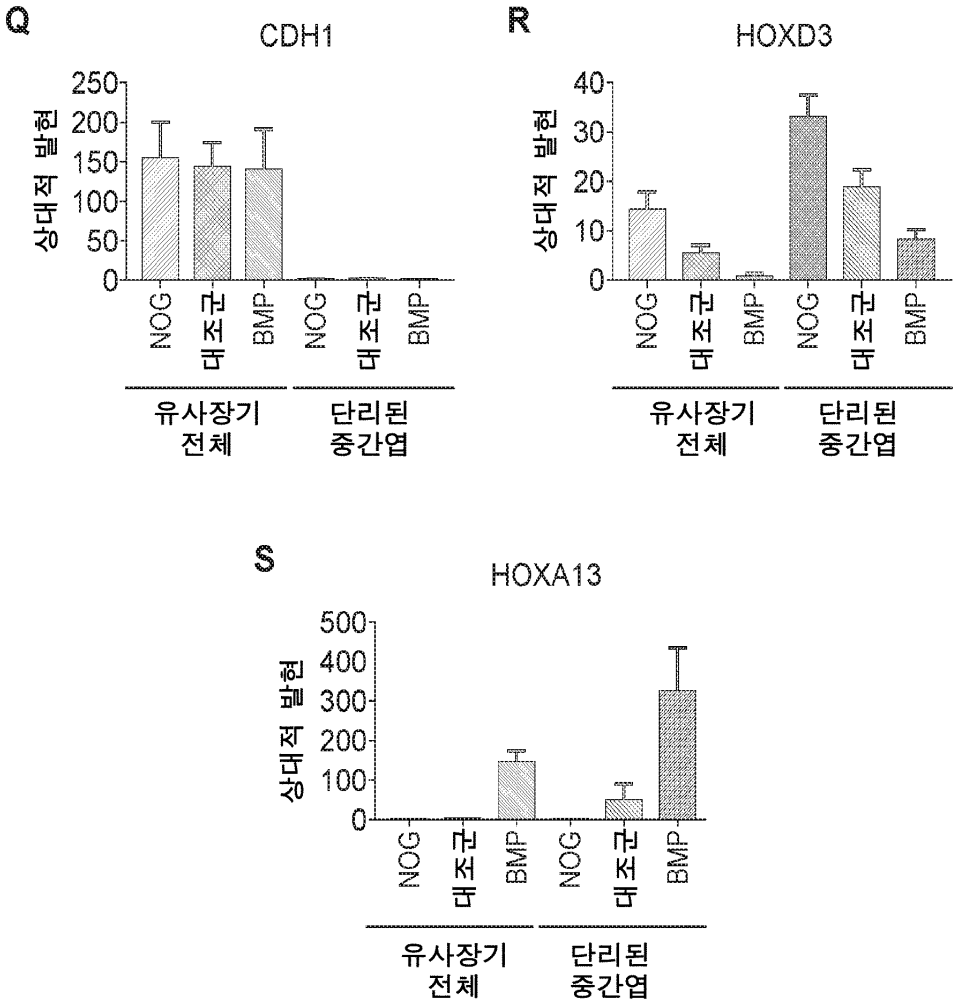
분류	명칭	p-값
GO: 세포 성분	플라즈마 막의 본질적 성분	4.87E-38
GO: 세포 성분	플라즈마 막의 통합적 성분	4.34E-36
GO: 세포 성분	세포외 기질	5.08E-36
GO: 생물학적 과정	동물 장기 형태 형성	4.86E-34
GO: 생물학적 과정	세포-세포 신호전달	6.46E-33
GO: 생물학적 과정	다세포 또는 유기체 발달의 조절	1.89E-31
GO: 생물학적 과정	*패턴 지정 과정*	3.43E-30
GO: 생물학적 과정	*BMP에 대한 세포성 반응*	8.62E-14



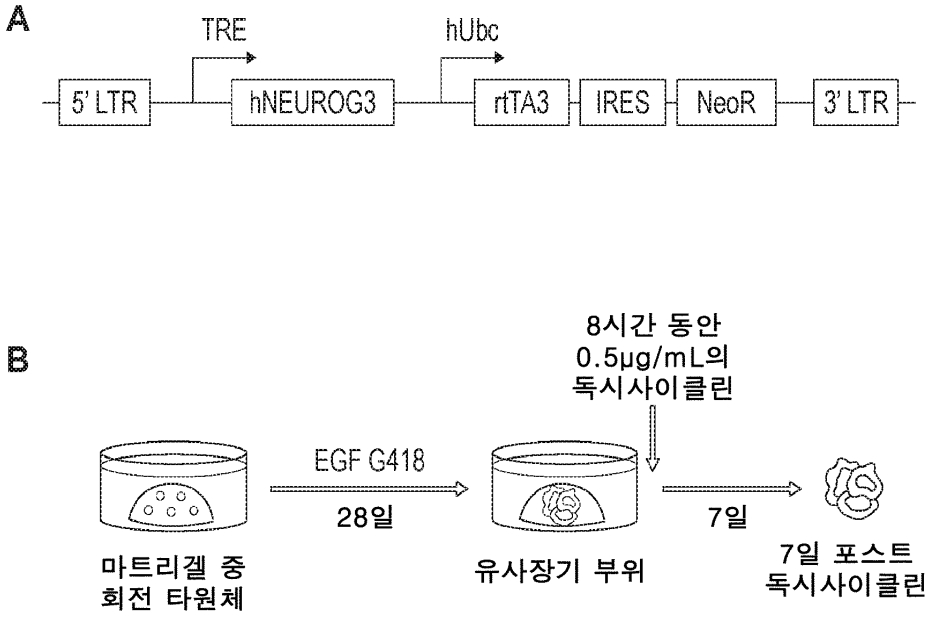
도면3a

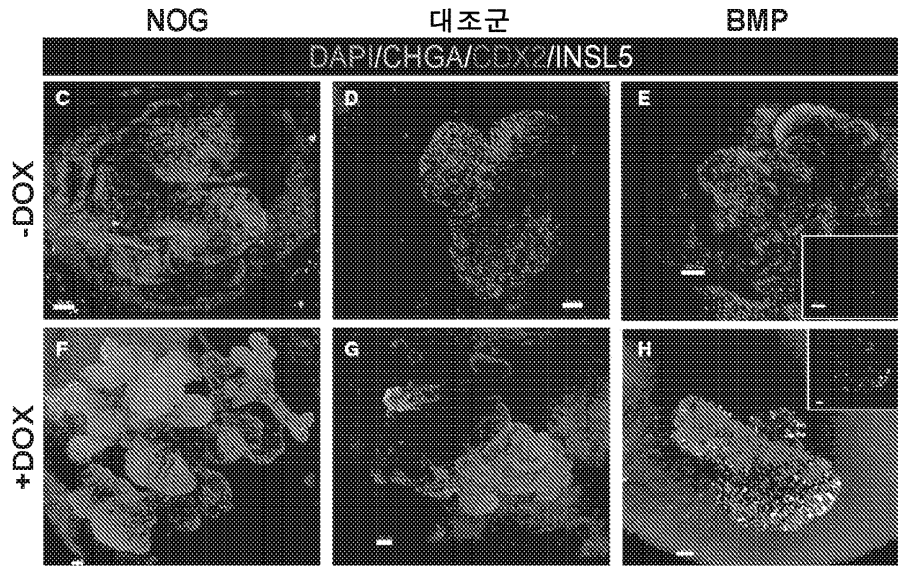

NOG
Ctrl
BMP
DAPI ONECUT1 CDX2
DAPI CDH17 SATB2
DAPI CDH1 MUC2
DAPI CDH1 MUC5B
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
상대적 발현
SATB2
MUC2
MUC5B
MUC5B+ 세포/유사장기
NOG
대조군
BMP
**
****

도면3b

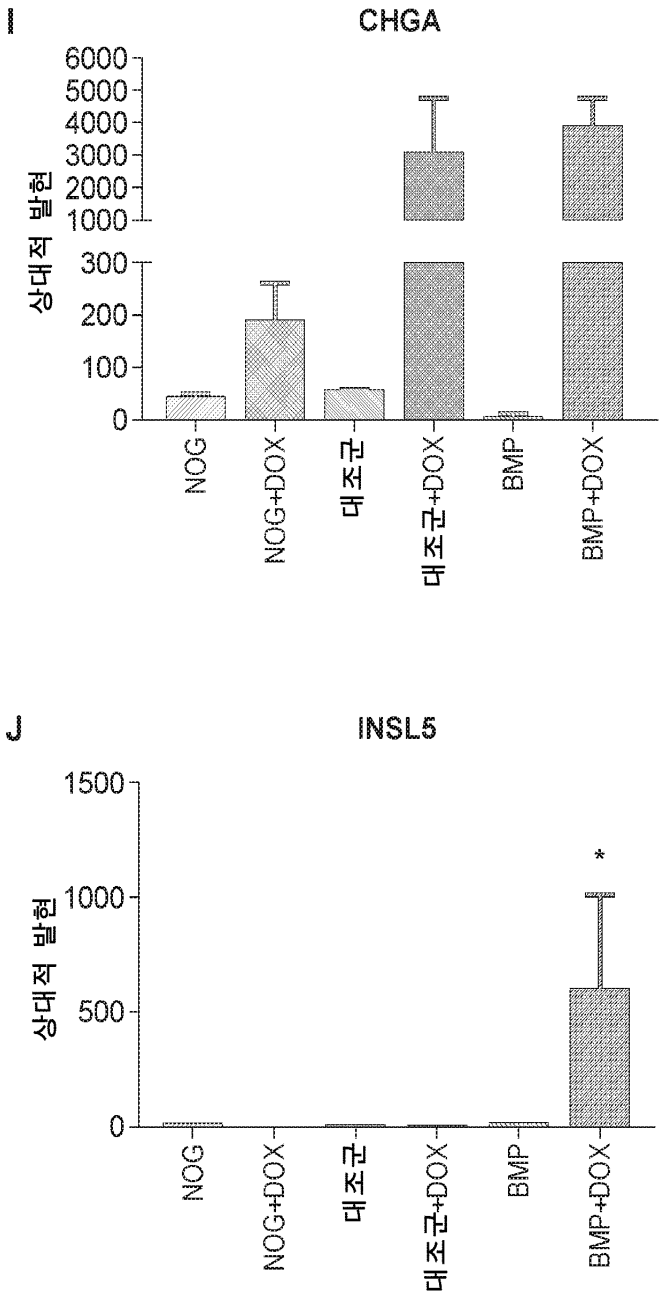

Q
CDH1
상대적 발현
250
200
150
100
50
0
NOG
대조군
BMP
NOG
대조군
BMP
유사장기 전체
단리된 중간엽
R
HOXD3
상대적 발현
40
30
20
10
0
NOG
대조군
BMP
NOG
대조군
BMP
유사장기 전체
단리된 중간엽
S
HOXA13
상대적 발현
500
400
300
200
100
0
NOG
대조군
BMP
NOG
대조군
BMP
유사장기 전체
단리된 중간엽

도면4a

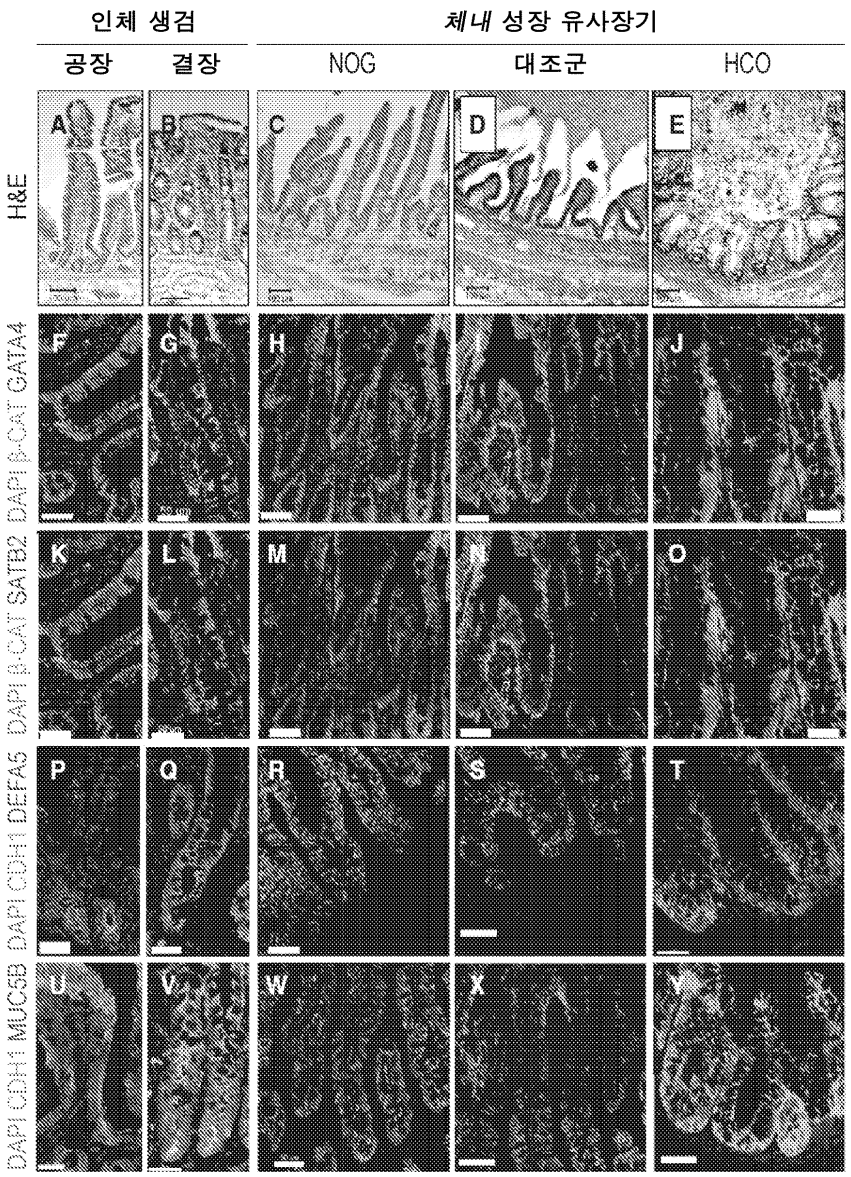

A
TRE
hUbc
5' LTR
hNEUROG3
rtTA3
IRES
NeoR
3' LTR
B
8시간 동안
0.5μg/mL의
독시사이클린
EGF G418
28일
7일
마트리겔 중
회전 타원체
유사장기 부위
7일 포스트
독시사이클린


NOG
대조군
BMP
DAPI/CHGA/CDX2/INSL5
-DOX
+DOX
C
D
E
F
G
H

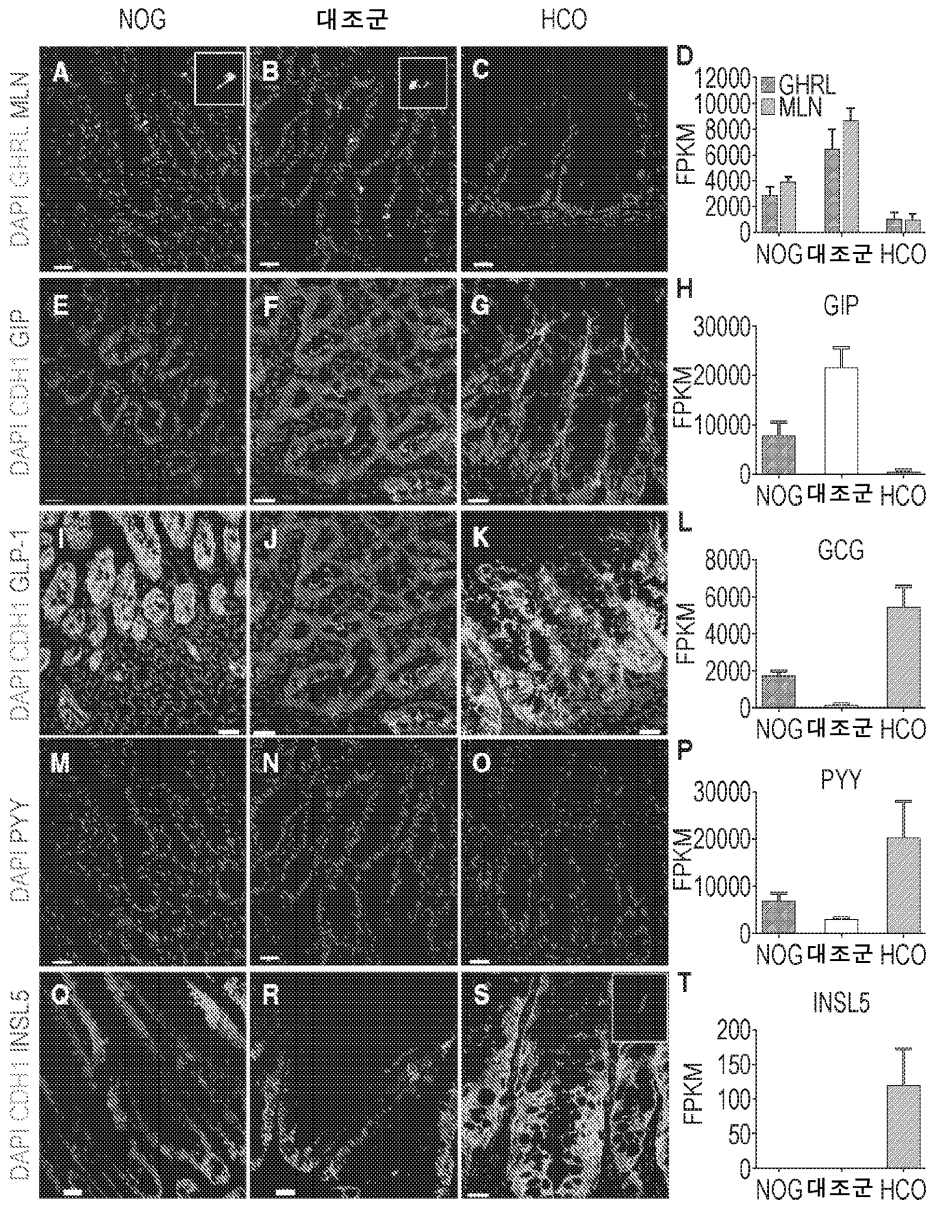
도면4b


I
CHGA
상대적 발현
6000
5000
4000
3000
2000
1000
300
200
100
0
NOG
NOG+DOX
대조군
대조군+DOX
BMP
BMP+DOX
J
INSL5
상대적 발현
1500
1000
500
0
*
NOG
NOG+DOX
대조군
대조군+DOX
BMP
BMP+DOX

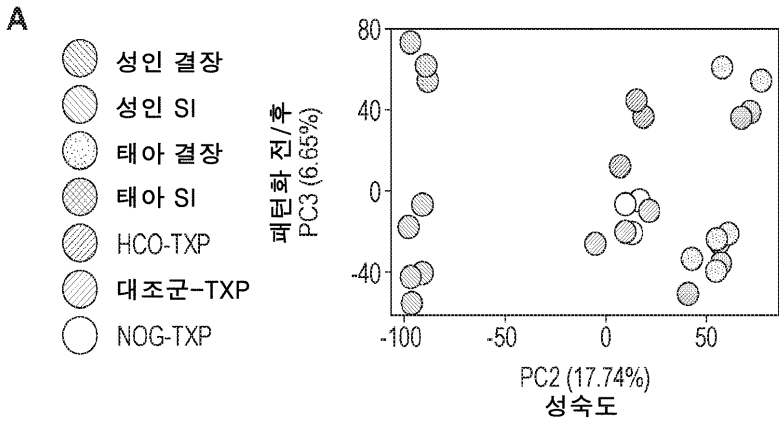
도면5


인체 생검
체내 성장 유사장기
공장
결장
NOG
대조군
HCO
H&E
DAPI β-CAT GATA4
DAPI β-CAT SATB2
DAPI CDH1 DEFA5
DAPI CDH1 MUC5B
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X
Y

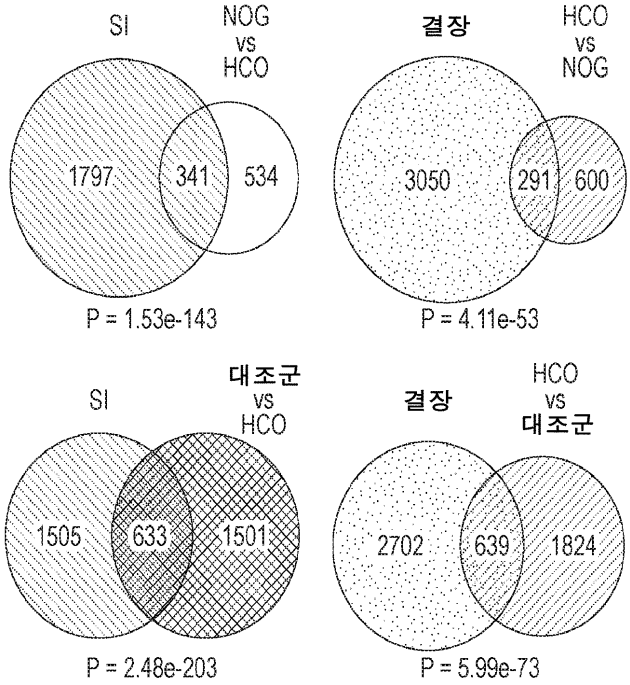
도면6


NOG
대조군
HCO
DAPI GHRL MLN
DAPI CDH1 GIP
DAPI CDH1 GLP-1
DAPI PYY
DAPI CDH1 INSL5
A
B
C
D
GHRL
MLN
FPKM
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
NOG 대조군 HCO
E
F
G
H
GIP
30000
20000
10000
I
J
K
L
GCG
8000
M
N
O
P
PYY
Q
R
S
T
INSL5
200
150
100
50

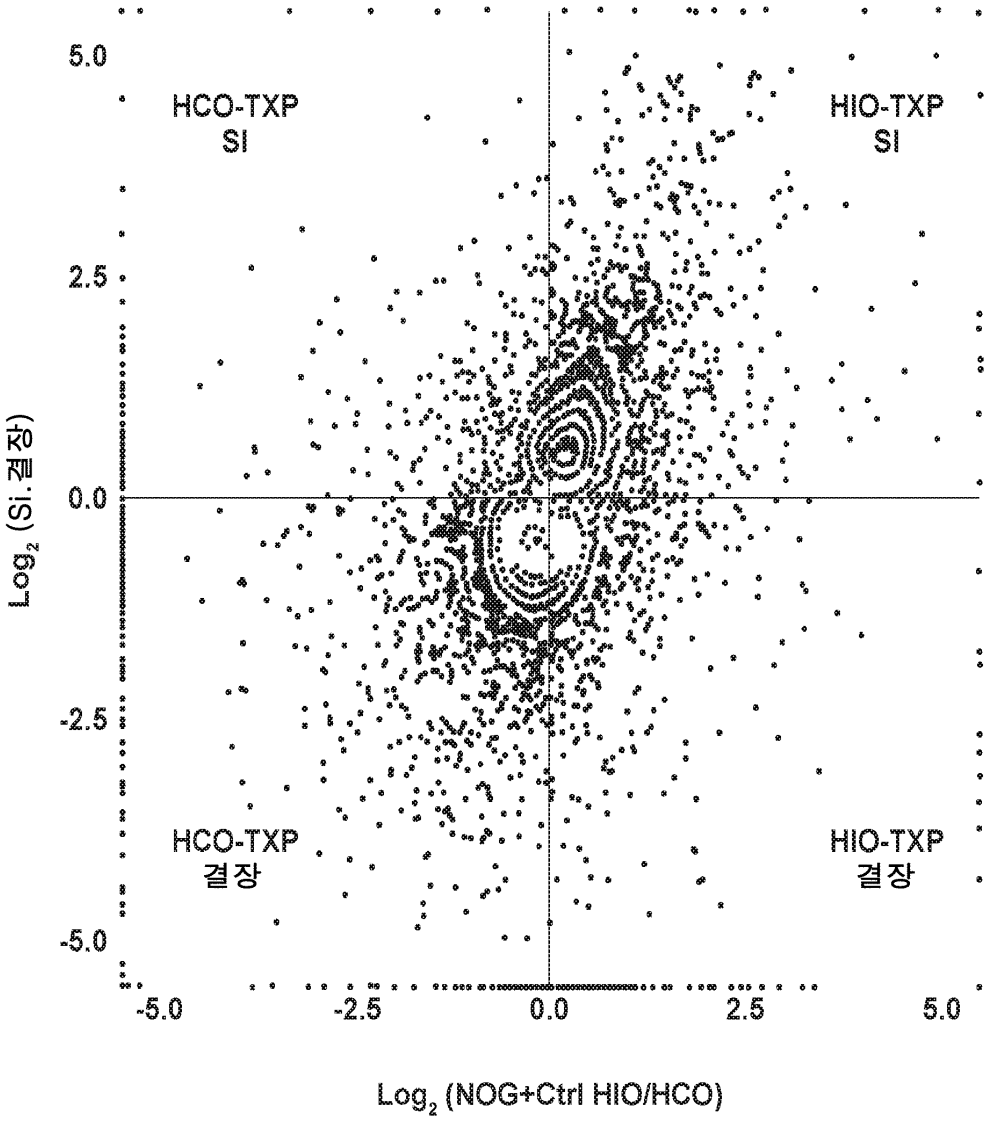
도면7a



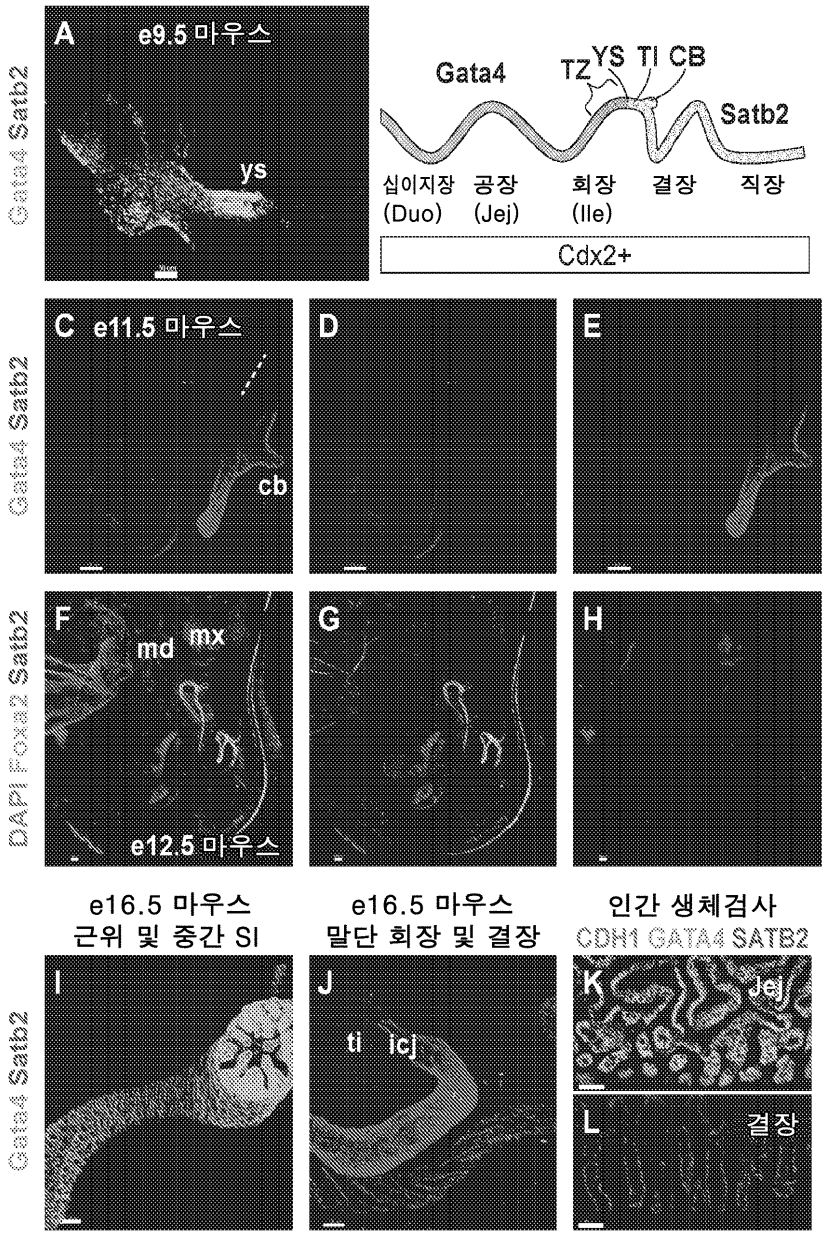
B *초기하 수단 검사가 유전자 세트를 유의미하게 조절하지 않았다*



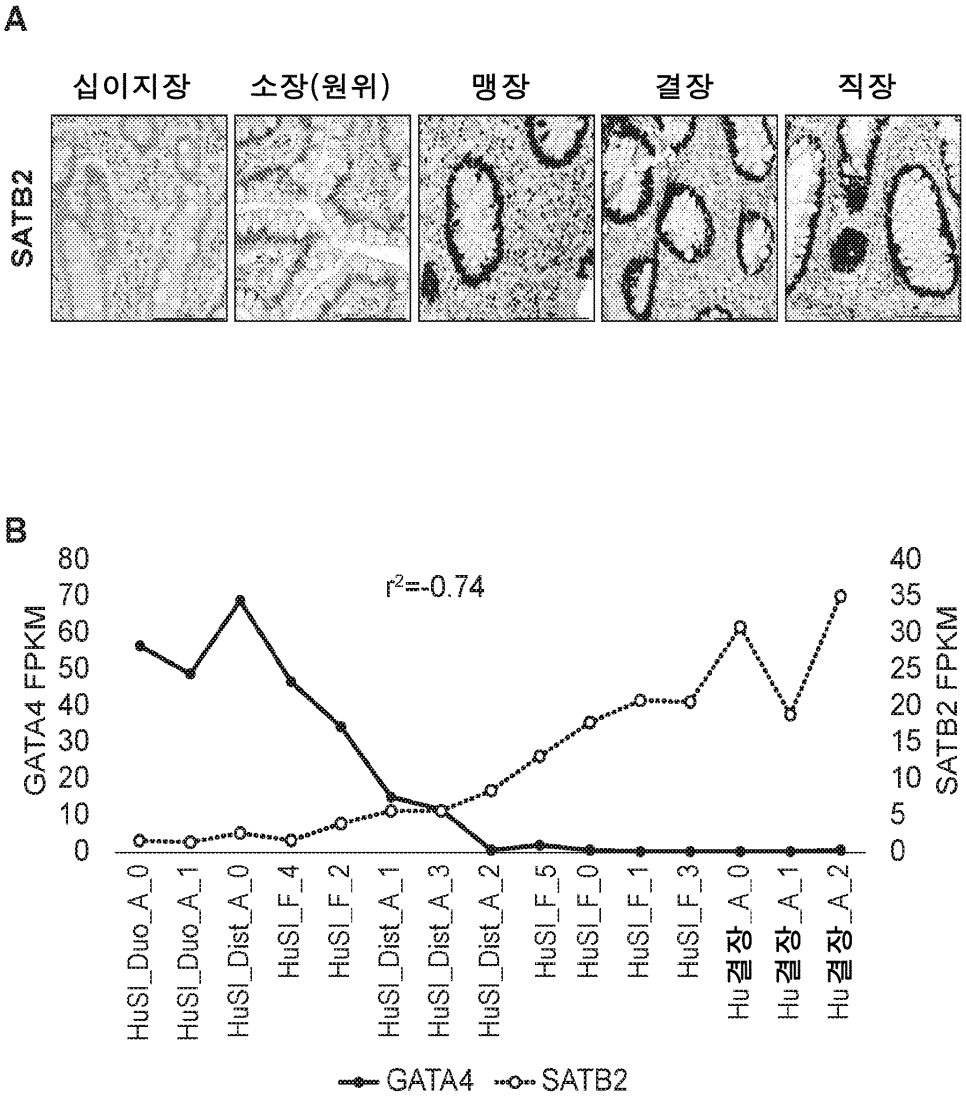
도면7b


HCO-TXP
SI
HIO-TXP
SI
HCO-TXP
결장
HIO-TXP
결장
5.0
2.5
0.0
-2.5
-5.0
-5.0
-2.5
0.0
2.5
5.0
Log2 (Si.결장)
Log2 (NOG+Ctrl HIO/HCO)

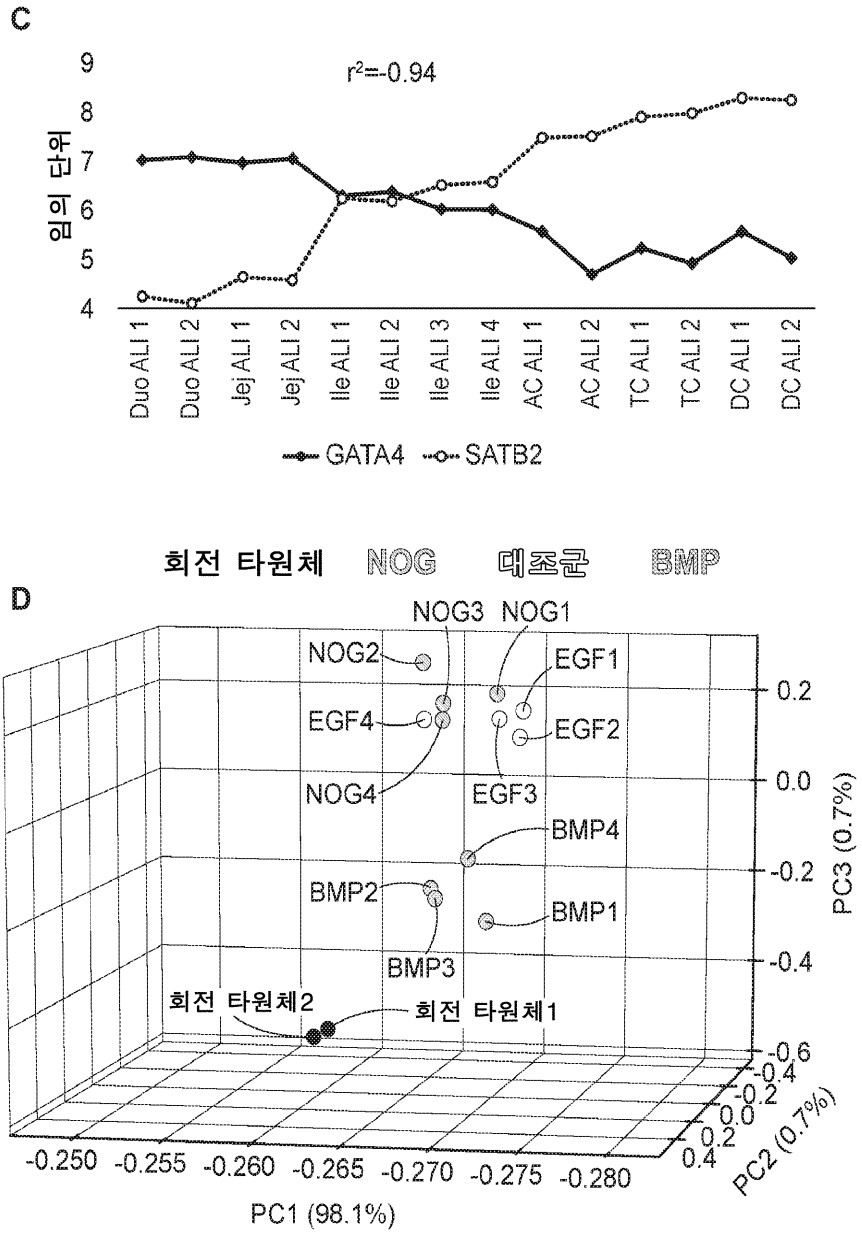
도면8


A
e9.5 마우스
ys
Gata4 Satb2
Gata4
TZ
YS TI CB
Satb2
십이지장 (Duo)
공장 (Jej)
회장 (Ile)
결장
직장
Cdx2+
C e11.5 마우스
cb
D
E
Gata4 Satb2
F
md
mx
e12.5 마우스
G
H
DAPI Foxa2 Satb2
e16.5 마우스
근위 및 중간 SI
e16.5 마우스
말단 회장 및 결장
인간 생체검사
CDH1 GATA4 SATB2
I
J
ti
icj
K
Jej
L
결장
Gata4 Satb2

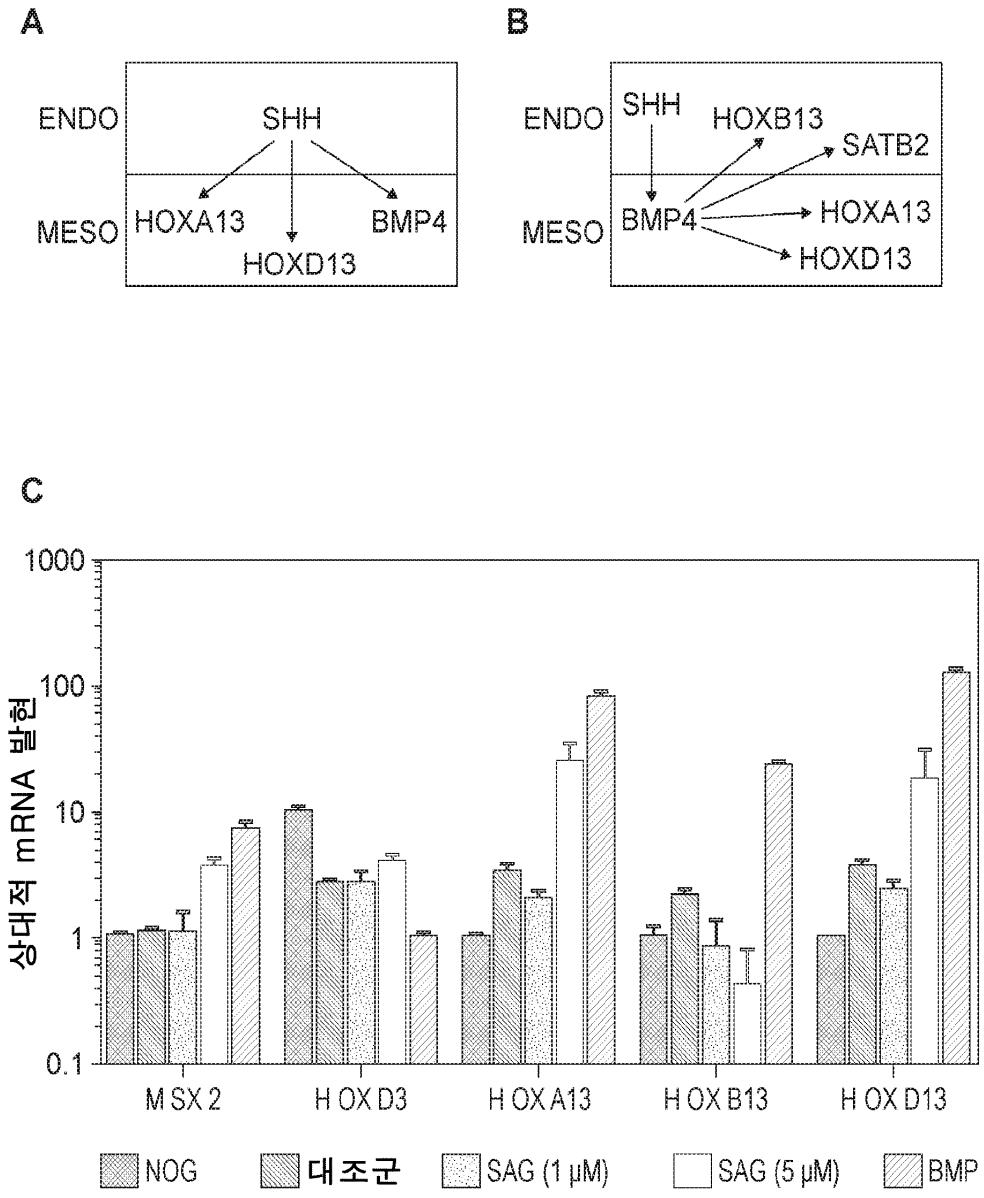
도면9a


A
십이지장
소장(원위)
맹장
결장
직장
SATB2
B
GATA4 FPKM
SATB2 FPKM
r²=-0.74
HuSI_Duo_A_0
HuSI_Duo_A_1
HuSI_Dist_A_0
HuSI_F_4
HuSI_F_2
HuSI_Dist_A_1
HuSI_Dist_A_3
HuSI_Dist_A_2
HuSI_F_5
HuSI_F_0
HuSI_F_1
HuSI_F_3
Hu결장_A_0
Hu결장_A_1
Hu결장_A_2
GATA4
SATB2

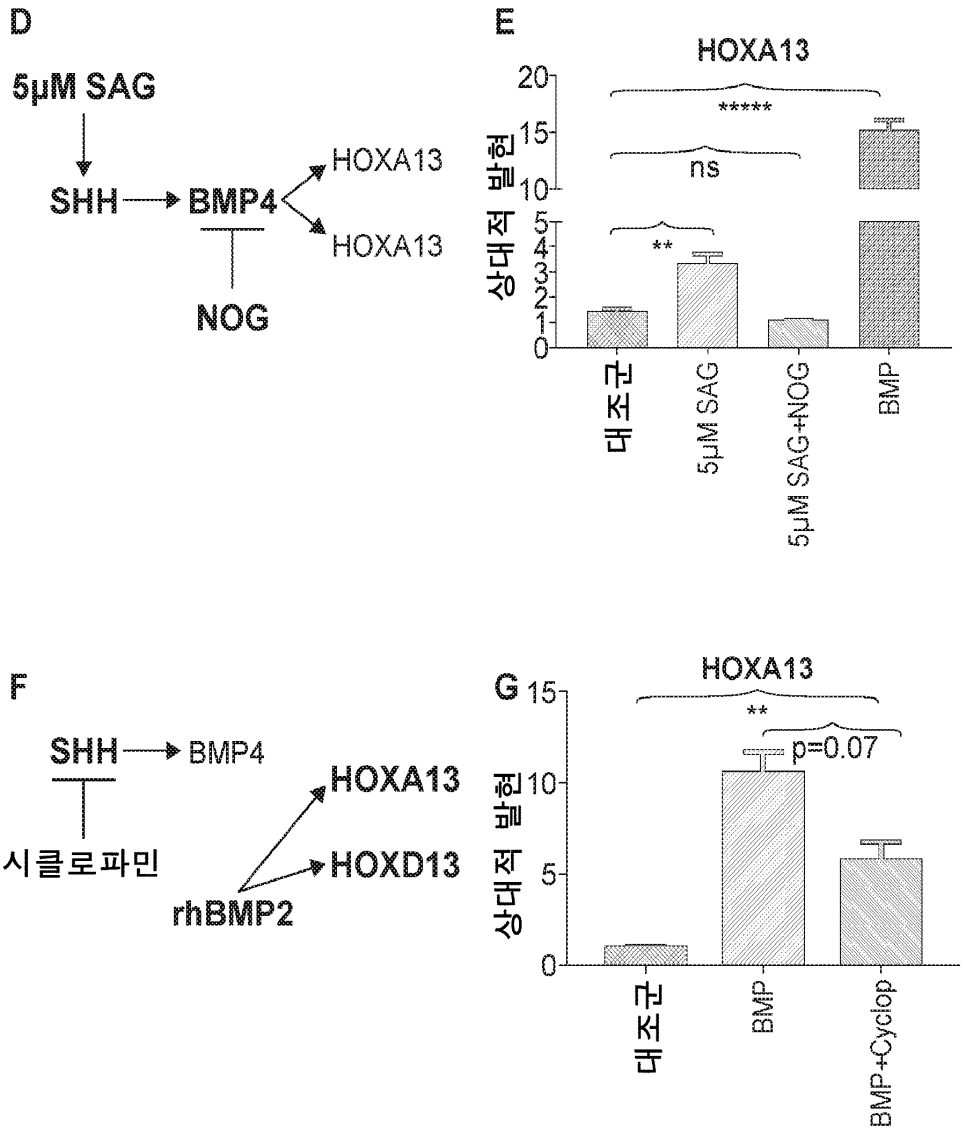
도면9b


C
r^2=-0.94
임의 단위
9
8
7
6
5
4
Duo ALI 1
Duo ALI 2
Jej ALI 1
Jej ALI 2
Ile ALI 1
Ile ALI 2
Ile ALI 3
Ile ALI 4
AC ALI 1
AC ALI 2
TC ALI 1
TC ALI 2
DC ALI 1
DC ALI 2
GATA4
SATB2
회전 타원체
NOG
대조군
BMP
D
NOG3
NOG1
NOG2
EGF1
EGF4
EGF2
NOG4
EGF3
BMP4
BMP2
BMP1
BMP3
회전 타원체2
회전 타원체1
0.2
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
PC3 (0.7%)
-0.250
-0.255
-0.260
-0.265
-0.270
-0.275
-0.280
PC1 (98.1%)
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
PC2 (0.7%)

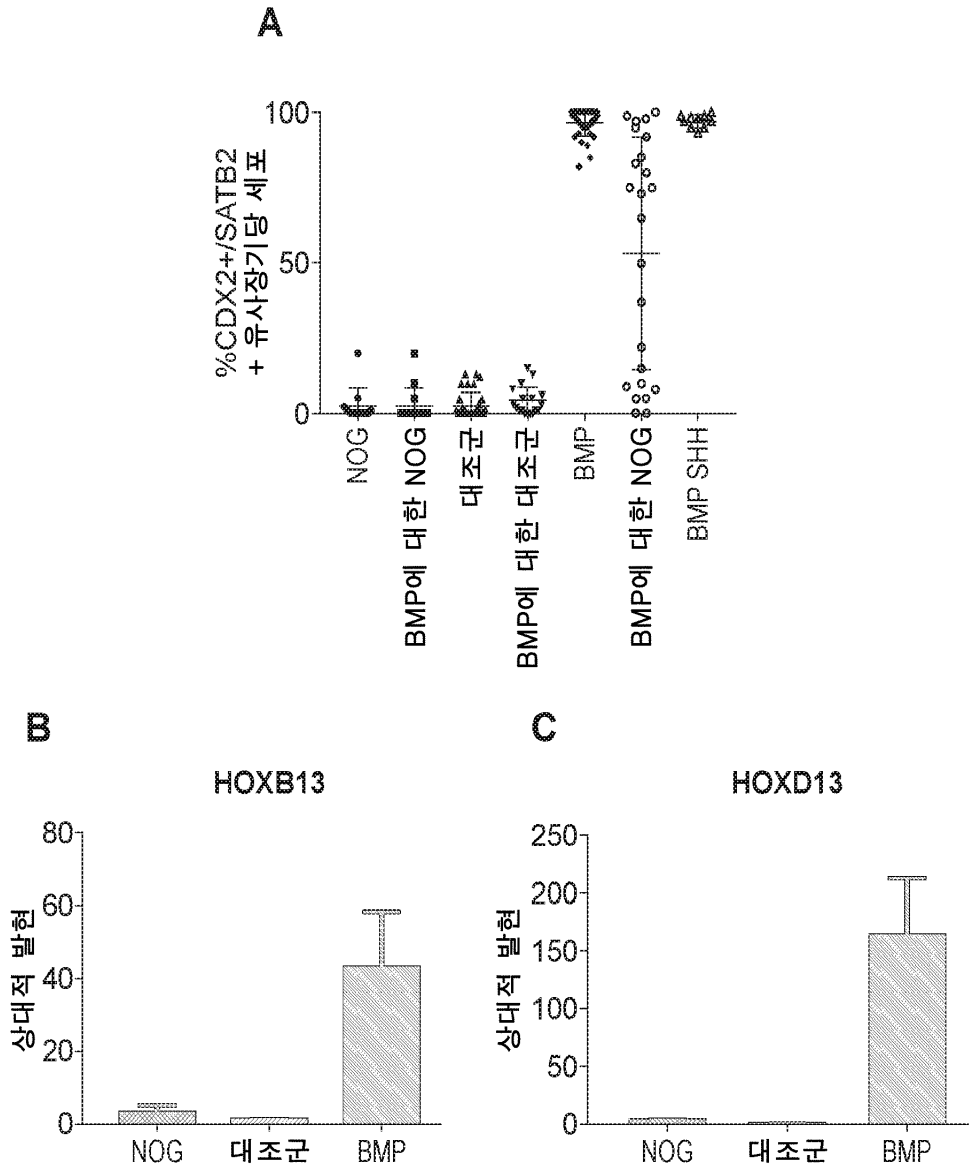
도면10a


A
ENDO
SHH
MESO
HOXA13
BMP4
HOXD13
B
ENDO
SHH
HOXB13
SATB2
MESO
BMP4
HOXA13
HOXD13
C
상대적 mRNA 발현
1000
100
10
1
0.1
MSX2
HOXD3
HOXA13
HOXB13
HOXD13
NOG
대조군
SAG (1 μM)
SAG (5 μM)
BMP

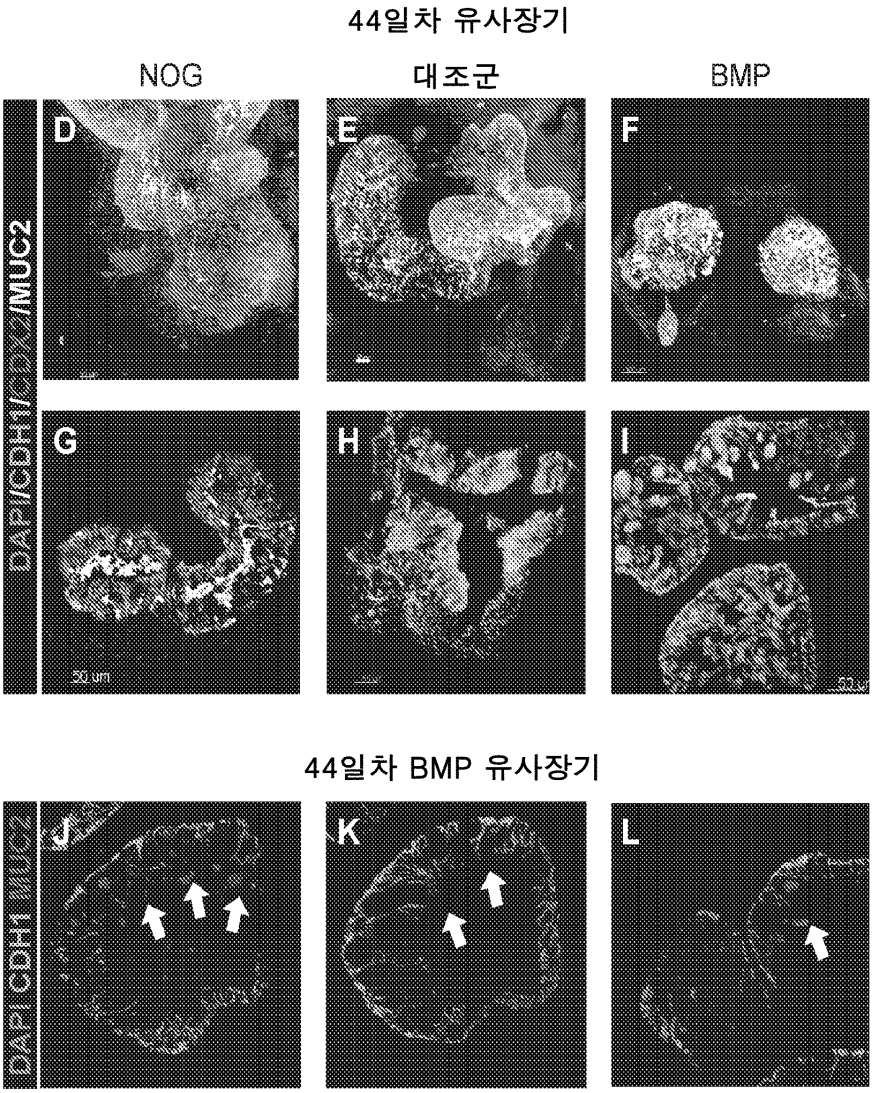
도면10b


D
5μM SAG
SHH
BMP4
HOXA13
HOXA13
NOG
E
HOXA13
*****
ns
**
상대적 발현
20
15
10
5
4
3
2
1
0
대조군
5μM SAG
5μM SAG+NOG
BMP
F
SHH
BMP4
시클로파민
HOXA13
HOXD13
rhBMP2
G
HOXA13
**
p=0.07
상대적 발현
15
10
5
0
대조군
BMP
BMP+Cyclop

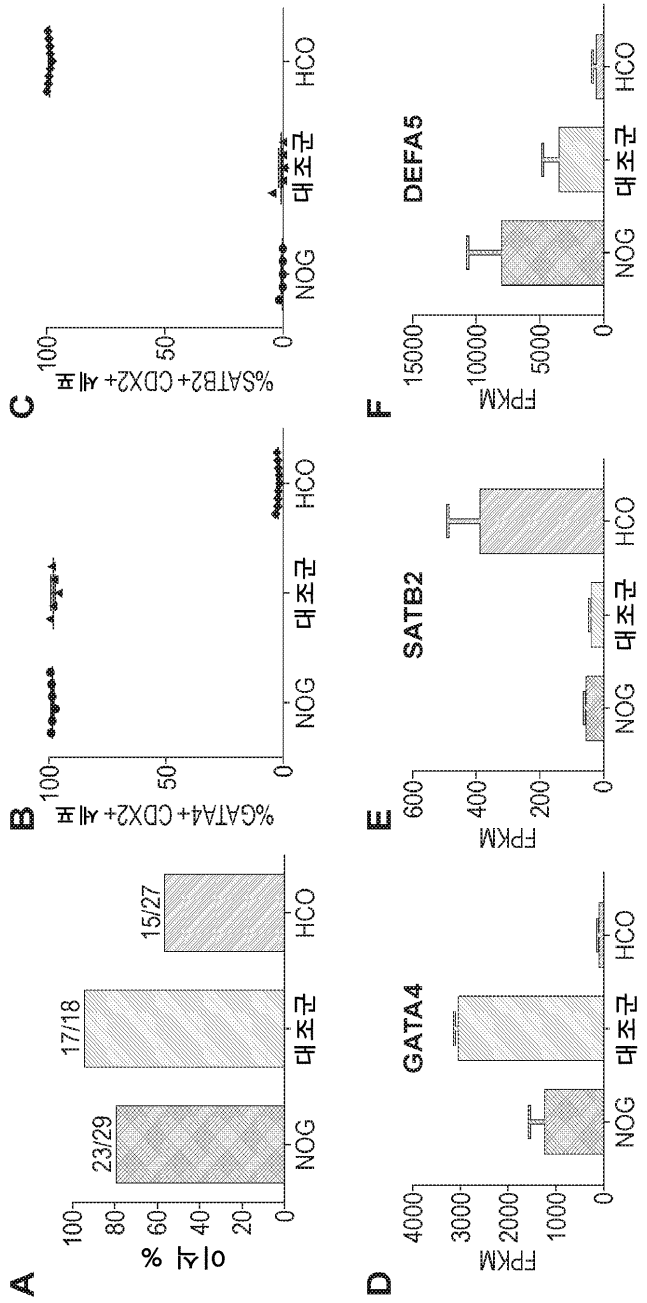
도면11a


A
%CDX2+/SATB2 + 유사장기당 세포
100
50
0
NOG
BMP에 대한 NOG
대조군
BMP에 대한 대조군
BMP
BMP에 대한 NOG
BMP SHH
B
HOXB13
상대적 발현
80
60
40
20
0
NOG
대조군
BMP
C
HOXD13
상대적 발현
250
200
150
100
50
0
NOG
대조군
BMP

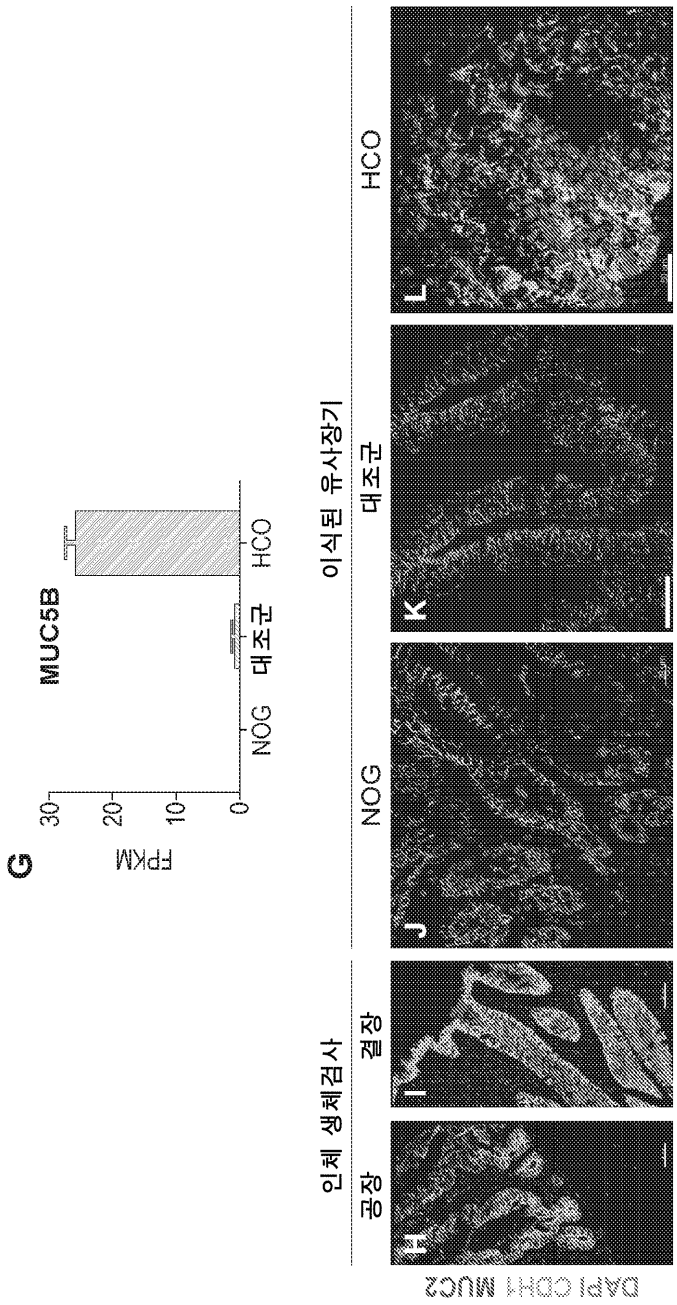
도면11b


44일차 유사장기
NOG
대조군
BMP
DAPI/CDH1/CDX2/MUC2
D
E
F
G
H
I
50 um
44일차 BMP 유사장기
DAPI CDH1 MUC2
J
K
L

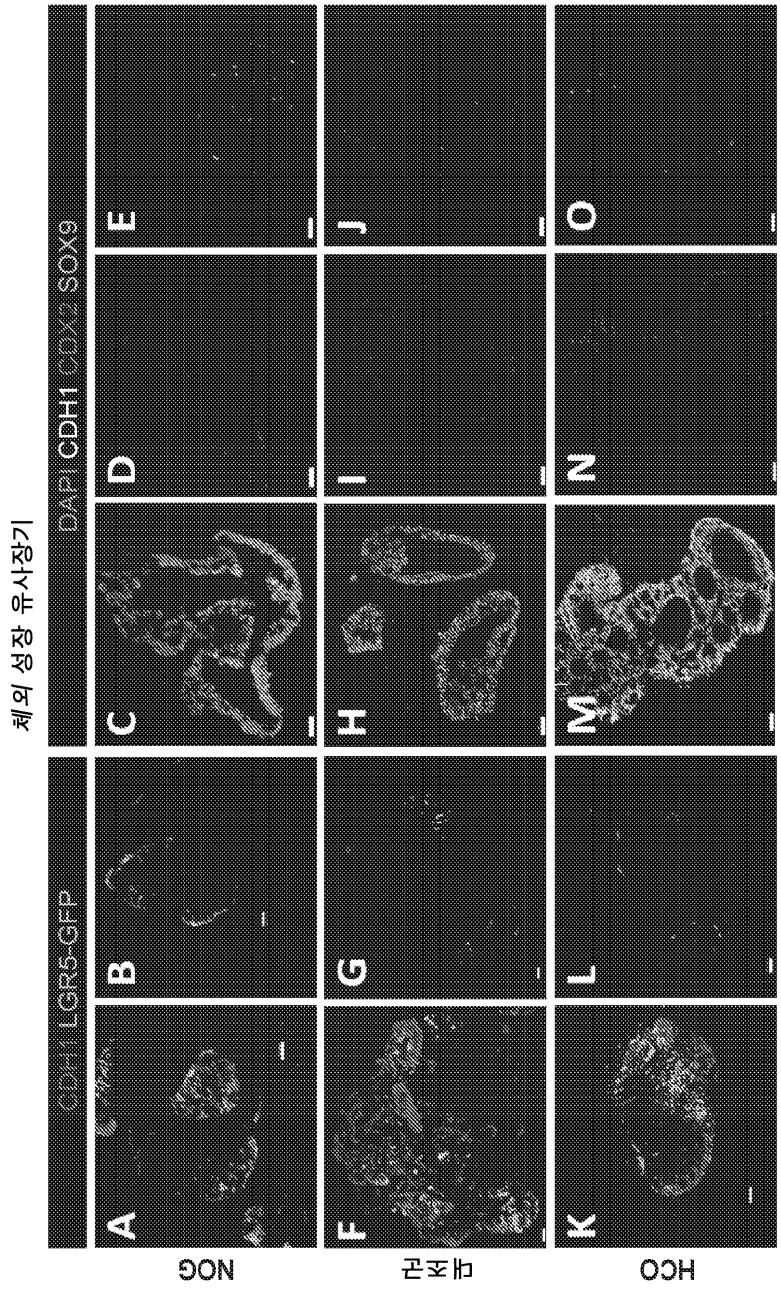
도면12a


A
%
100
80
60
40
20
0
23/29
17/18
15/27
NOG
대조군
HCO
B
%GATA4+ CDX2+ 세포
100
50
0
NOG
대조군
HCO
C
%SATB2+ CDX2+ 세포
100
50
0
NOG
대조군
HCO
D
GATA4
FPKM
4000
3000
2000
1000
0
NOG
대조군
HCO
E
SATB2
FPKM
600
400
200
0
NOG
대조군
HCO
F
DEFA5
FPKM
15000
10000
5000
0
NOG
대조군
HCO

도면12b

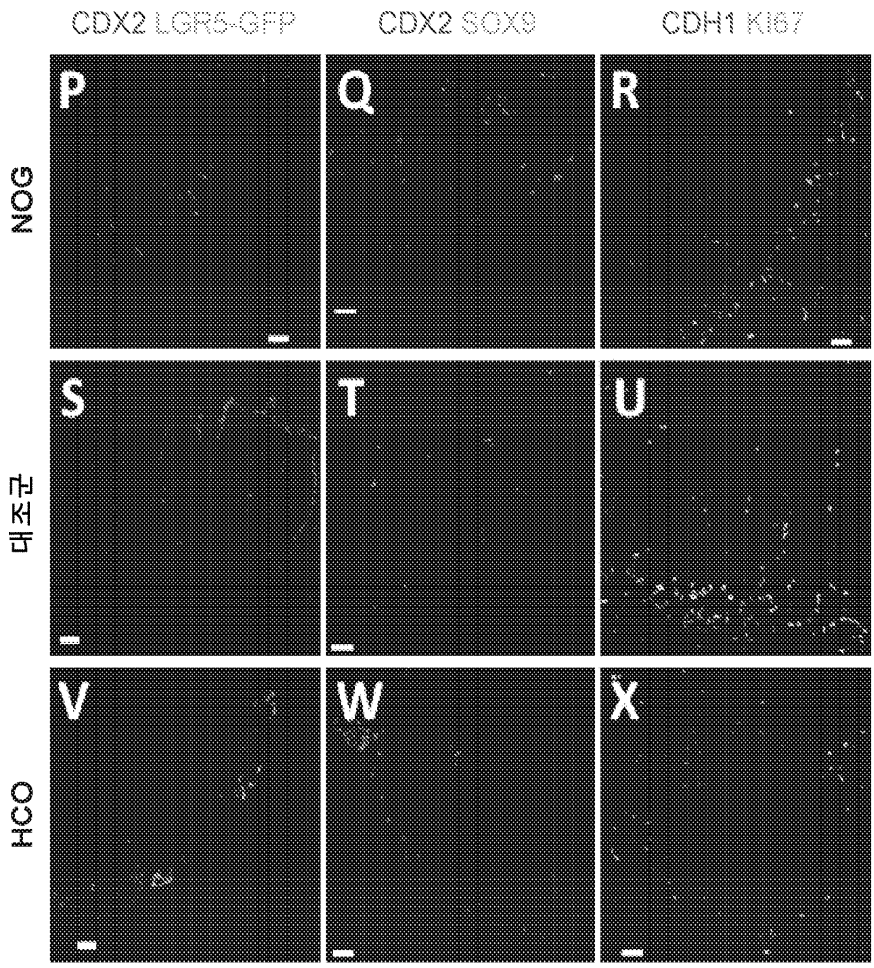

G
MUC5B
FPKM
30
20
10
0
NOG
대조군
HCO
인체 생체검사
공장
결장
이식된 유사장기
NOG
대조군
HCO
H
I
J
K
L
DAPI CDH1 MUC2

도면13a

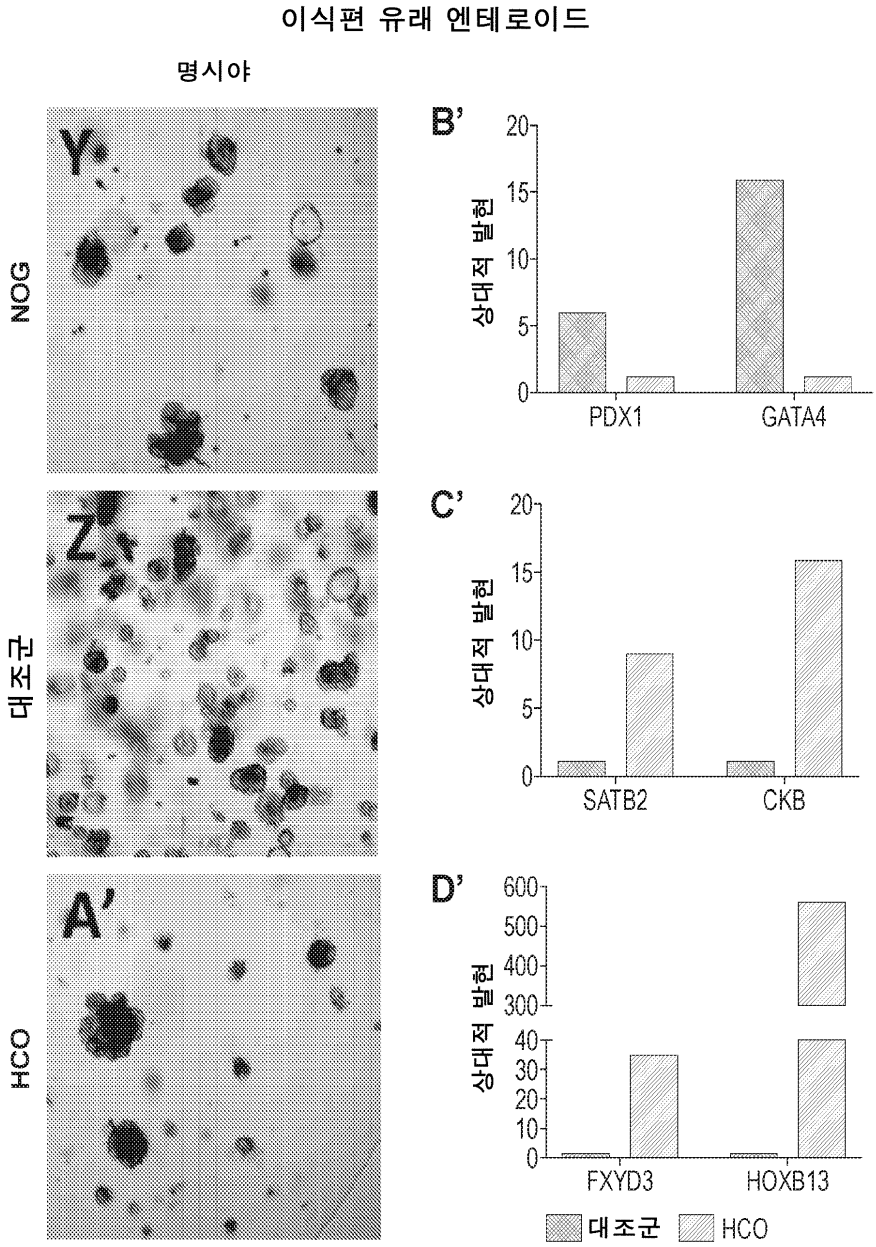

체외 성장 유사장기
DAPI CDH1 CDX2 SOX9
CDH1 LGR5-GFP
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
NOG
대조군
HCO

도면13b

체내 이식된 유사장기

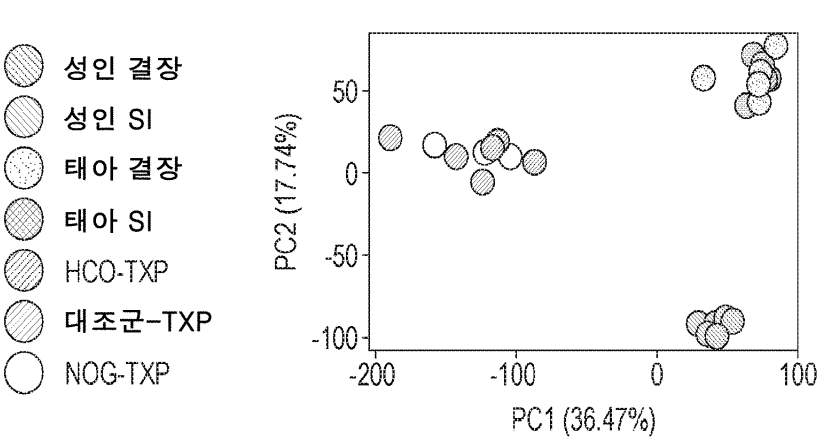


도면13c


이식편 유래 엔테로이드
명시야
NOG
대조군
HCO
Y
Z
A'
B'
C'
D'
상대적 발현
PDX1
GATA4
SATB2
CKB
FXYD3
HOXB13
대조군
HCO

도면14a

A



B

TXP 대 1차 조직에서 Up

분류	명칭	p-값
경로	리보솜	2.20E-57
GO: 세포 성분	리보솜 하위단위	3.20E-55
GO: 세포 성분	리보솜	2.61E-48
GO: 분자 기능	리보솜의 구조적 구성체	5.07E-26
GO: 세포 성분	세포액 리보솜	1.66E-41
GO: 세포 성분	세포액 리보솜	2.43E-39
GO: 생물학적 과정	막 표적 SRP 의존 공동-번역 단백질	8.02E-39
GO: 생물학적 과정	ER에 대한 표적 단백질	1.14E-36
GO: 세포 성분	미토콘드리아	7.71E-36
GO: 생물학적 과정	막 표적 공동-번역 단백질	1.57E-35

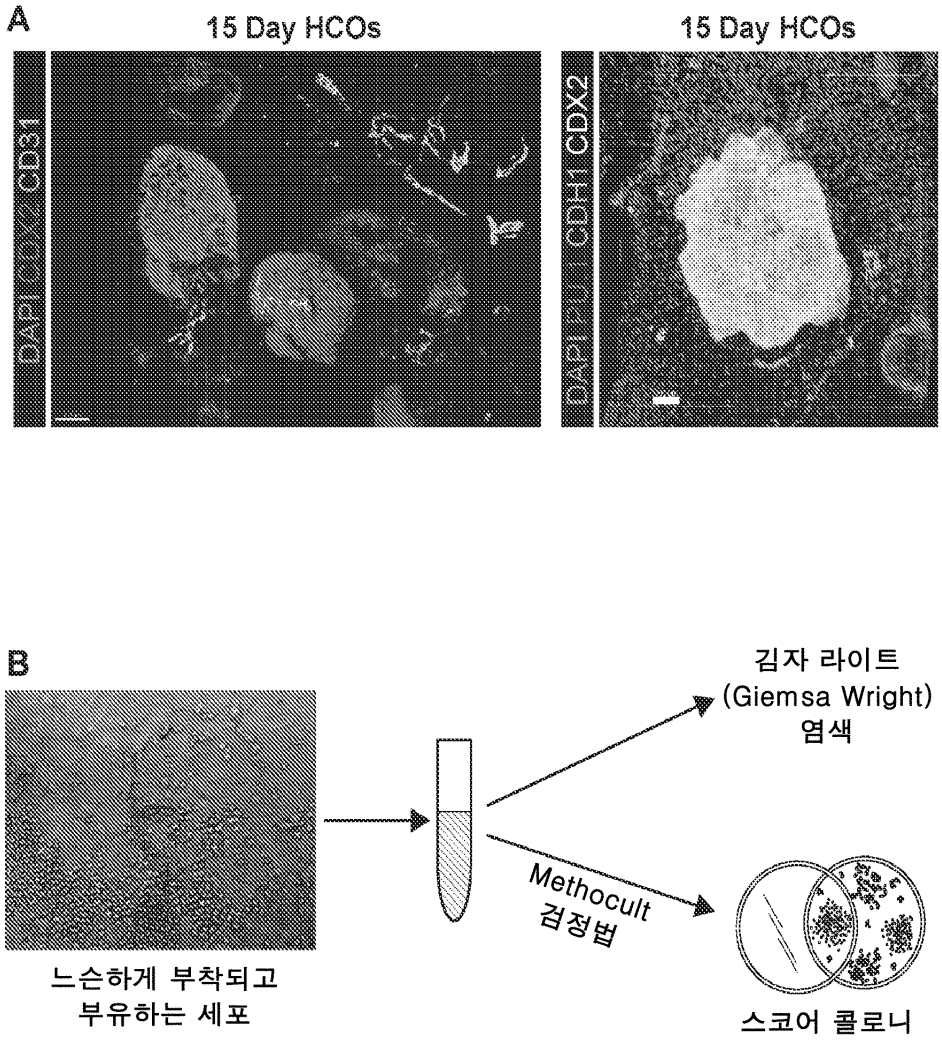
도면14b

C

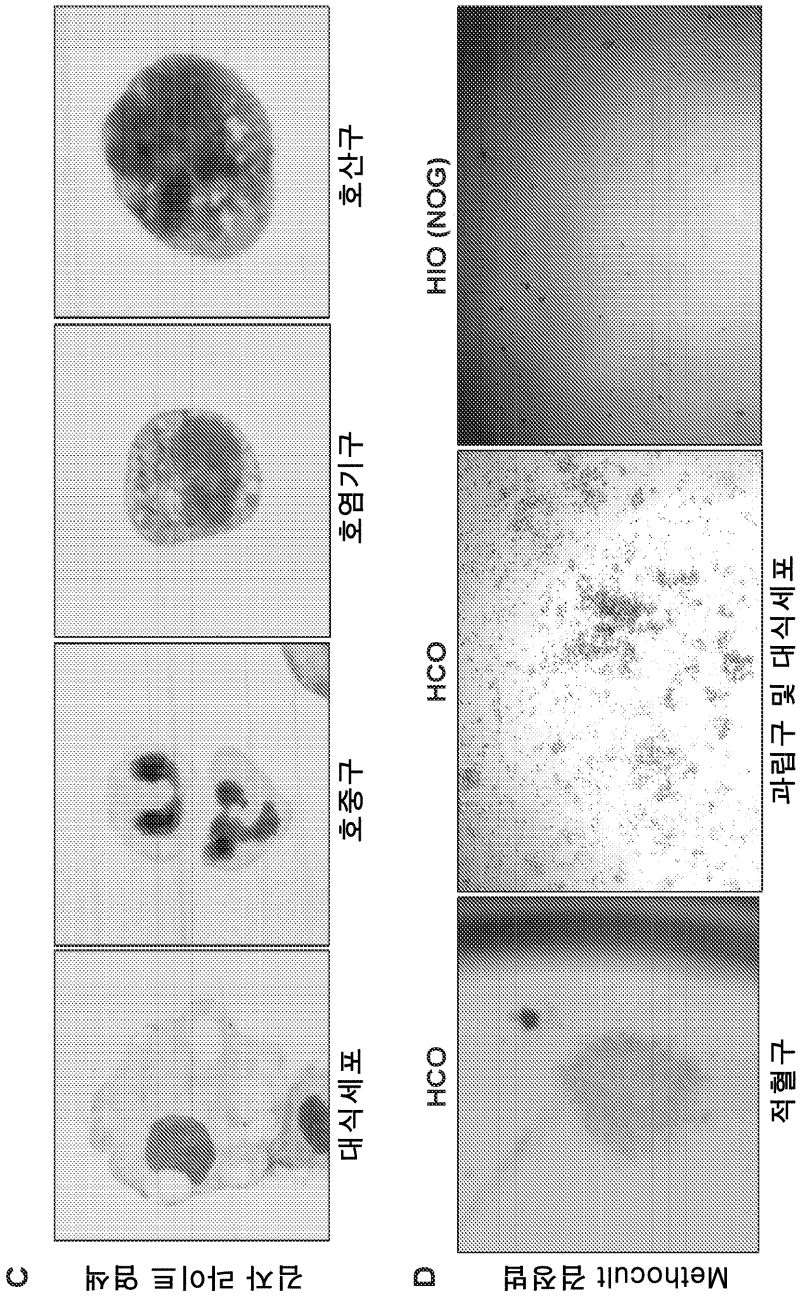
1차 조직 대 TXP의 Up

분류	명칭	p-값
GO: 생물학적 과정	백혈구 활성화	2.26E-22
GO: 생물학적 과정	면역계 과정	3.25E-22
GO: 생물학적 과정	세포 활성화	1.46E-21
GO: 생물학적 과정	면역계 과정 양성 조절	2.72E-19
GO: 세포 성분	플라즈마 막 부분	1.89E-18
GO: 생물학적 과정	림프구 활성화	3.14E-18
GO: 생물학적 과정	백혈구 세포-세포 점착	6.71E-18
GO: 생물학적 과정	단일 유기체 세포-세포 점착	8.69E-18
GO: 생물학적 과정	면역 반응	8.81E-18
GO: 생물학적 과정	세포간 신호 변환	2.82E-17

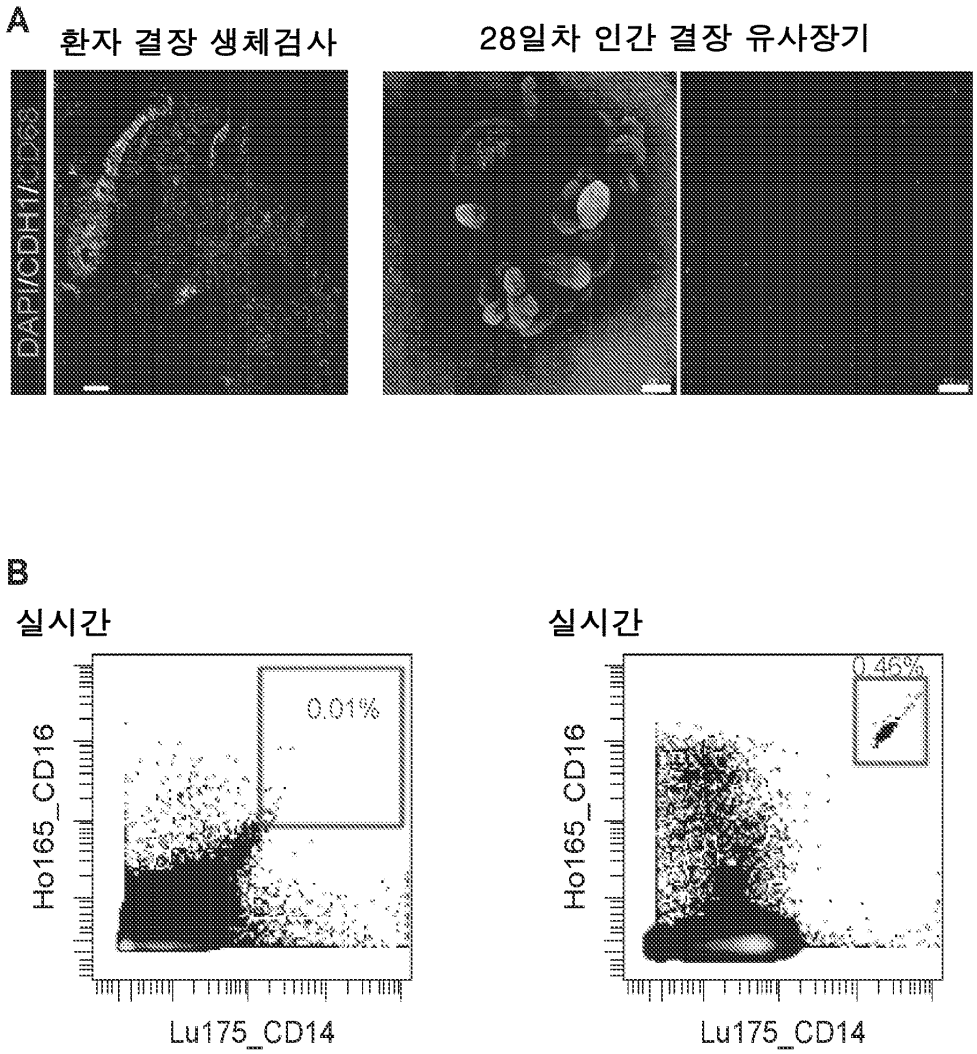
도면15a


A
15 Day HCOs
15 Day HCOs
DAPI CDX2 CD31
DAPI CDH1 CDX2
B
김자 라이트
(Giemsa Wright)
염색
Methocult
검정법
느슨하게 부착되고
부유하는 세포
스코어 콜로니

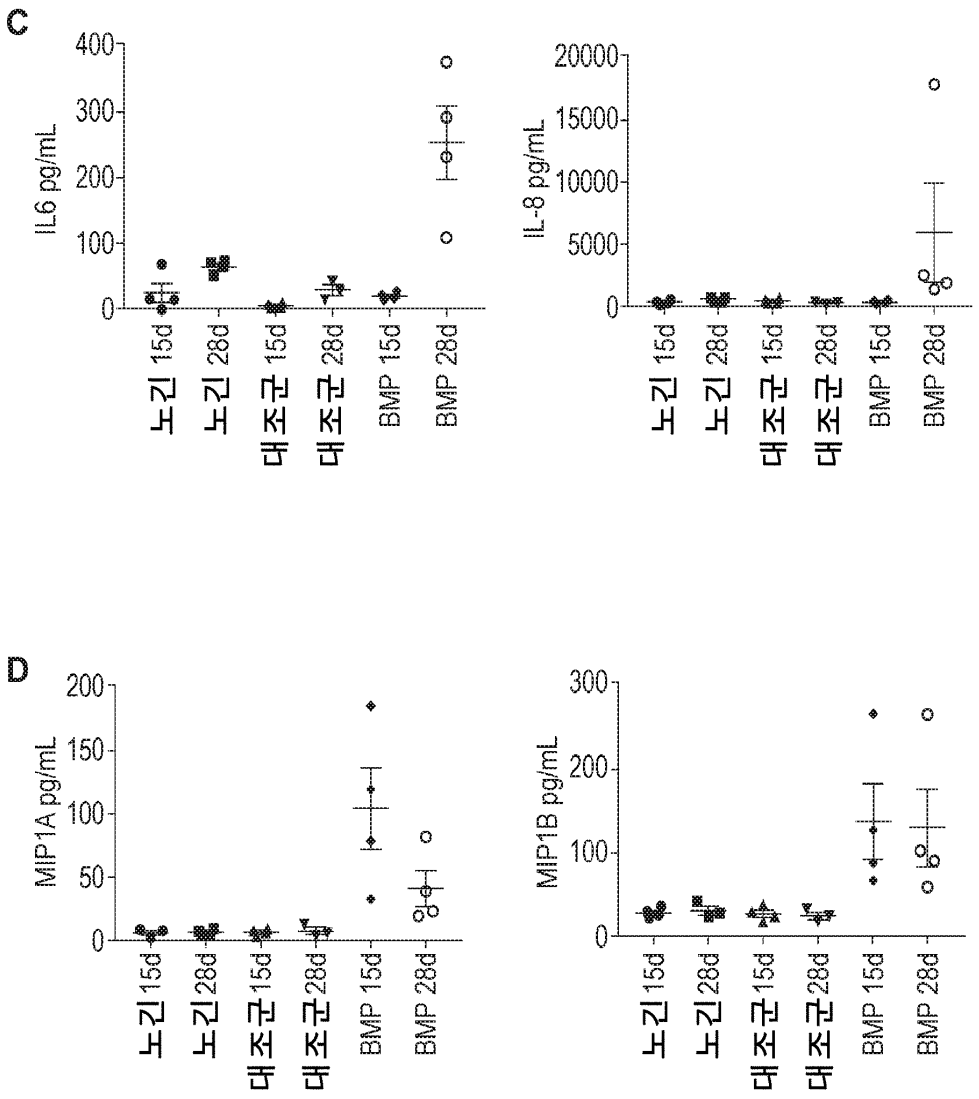
도면15b


C
김자 라이트 염색
대식세포
호중구
호염기구
호산구
D
Methocult 검정법
HCO
적혈구
HCO
과립구 및 대식세포
HIO (NOG)

도면16a


A
환자 결장 생체검사
28일차 인간 결장 유사장기
DAPI/CDH1/CD63
B
실시간
실시간
Ho165_CD16
Lu175_CD14
0.01%
Ho165_CD16
Lu175_CD14
0.45%

도면16b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER

<120> COLONIC ORGANOIDS AND METHODS OF MAKING AND USING SAME

<130> 0652608

<150> US 62/429,948

<151> 2016-12-05

<150> US 62/478,962

<151> 2017-03-30

<160> 32

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDH1 Forward

<400> 1

gaccggtgca atcttcaaa 19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDH1 Reverse

<400> 2

ttgacgccga gagctacac 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHGA Forward

<400> 3

tgtgtcggag atgacctcaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHGA Reverse

<400> 4

gtcctggctc ttctgctctg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> CKB Forward

<400> 5

cccacaccag gaaggtctta 20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CKB Reverse

<400> 6

cctcttcgac aagcccgt 18

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FXYD3 Forward

<400> 7

agggtcacct tctgcatgtc 20

<210> 8

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FXYD3 Reverse

<400> 8

cttcggataa acgcaggact 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GATA4 Forward

<400> 9

tagccccaca gttgacacac 20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GATA4 Reverse

<400> 10

gtcctgcaca gcctgcc 17

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXA13 Forward

<400> 11

gcaccttggt ataaggcacg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXA13 Reverse

<400> 12

cctctggaag tccactctgc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXB13 Forward

<400> 13

gctgtacgga atgcgtttct 20

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXB13 Reverse

<400> 14

aacccaccag gtccctttt 19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXD13 Forward

<400> 15

cctcttcggt agacgcacat 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXD13 Reverse

<400> 16

caggtgtact gcaccaagga 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXD3 Forward

<400> 17

cacctccaat gtctgctgaa 20

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HOXD3 Reverse

<400> 18

caaaattcaa gaaaacacac aca 23

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> INSL5 Forward

<400> 19

gaaggttttg cgctggatt 19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> INSL5 Reverse

<400> 20

gatccctcaa gctcagcaag 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSX2 Forward

<400> 21

ggtcttgtgt ttcctcaggg 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSX2 Reverse

<400> 22

aaattcagaa gatggagcgg 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MUC2 Forward

<400> 23

tgtaggcatc gctcttctca 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MUC2 Reverse

<400> 24

gacaccatct acctcacccg 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ONECUT1 Forward

<400> 25

tttttgggtg tgttgcctct 20

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ONECUT1 Reverse

<400> 26

agaccttccg gaggatgtg 19

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDX1 Forward

<400> 27

cgtccgcttg ttctcctc 18

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDX1 Reverse

<400> 28

cctttcccat ggatgaagtc 20

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPIA (CPHA) Forward

<400> 29

cccaccgtgt tcttcgacat t 21

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPIA (CPHA) Reverse

<400> 30

ggacccgtat gctttaggat ga 22

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SATB2 Forward

<400> 31

ccaccttccc agcttgatt 19

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SATB2 Reverse

<400> 32

ttagccagct ggtggagact 20