(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0078224
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0134976
(22) 출원일자 2009년12월30일
심사청구일자 2009년12월30일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
유승권
경기도 용인시 처인구 양지면 평창리 13-4
문재희
서울특별시 노원구 하계동 한신아파트 1동 206호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김선애

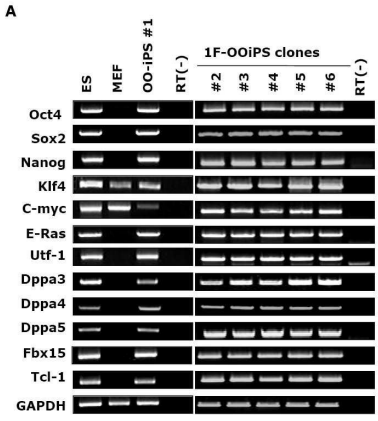
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 옥시스테롤 및 Ｏｃｔ４를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 a) 옥시스테롤 (Oxysterol); 및 b) Oct4 단백질 또는 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 Bmi1의 상위 조절인자인 Shh 유사체(analog)인 옥시스테롤 (oxysterol; hydroxycholesterol)을 처리하여 신경줄기세포와 같은 세포로의 유도를 하면서 Oct4 유전자를 도입하여 배아줄기세포 유사세포를 제조함으로써 역분화를 위한 도입 유전자 수를 감소시킬 수 있는 새로운 역분화 유도 방법을 제시하고, 본원발명에 의해 제조된 배아줄기세포 유사세포는 배아줄기세포와 같이 전분화능을 가져 각종 질병치료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2a



(72) 발명자

맹이삭

서울특별시 양천구 신정2동 296-28 상전아파트 602호

김준성

경기도 구리시 교문2동 우성한양아파트 105동 701호

윤병선

서울특별시 광진구 구의동 248-85

이중한

경기도 안양시 만안구 박달동 벽산아파트 104동 802호

전은경

경기도 성남시 중원구 중동 3587번지 2층

허준석

서울특별시 중랑구 상봉동 쌍용아파트 1304-303

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K001179

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 [협동] 체세포에서 역분화된 만능줄기세포로의 유도기술 개발 및 특성 규명[세포응용연구사업단]

기여율

주관기관 서울대학교

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다음을 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물

a) 옥시스테롤 (oxysterol); 및

b) Oct4 단백질 또는 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은

a) 옥시스테롤 (oxysterol); 및

b) Oct4 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입되어 Oct4 단백질을 발현하는 바이러스를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

체세포에 옥시스테롤 (oxysterol)을 처리하고 Oct4 유전자를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, (i) 섬유아세포 세포를 배지에서 배양하는 단계, (ii) 상기 배양한 섬유아세포에 옥시스테롤을 처리하고 Oct4 유전자를 삽입한 벡터를 트랜스펙션시킨 패키징 세포로 감염시키는 단계, (iii) 상기 감염시킨 섬유아세포를 배아줄기세포 배양조건에서 배양하는 단계를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 단계(ii)에서 상기 옥시스테롤을 신경줄기세포 배양 조건에서 처리하여 신경줄기세포와 같은 세포로의 유도를 하면서 Oct4 유전자를 섬유아세포로 도입하는 것을 특징으로 하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된 배아줄기세포 유사세포.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 옥시스테롤 및 Oct4를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 Bmi1의 상위 조절인자인 Shh의 유사체인 옥시스테롤 (oxysterols)과 역분화 유도인자인 Oct4를 이용하여 체세포로부터 리프로그래밍 과정을 통해 배아줄기세포와 같은 세포를 유도하는 새로운 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포 제조방법을 제시하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 줄기세포는 정상적인 체세포와 다르게 무한히 분열할 수 있는 능력을 가지며 적합한 환경 조건 아래에서 특정 세포로 분화하는 능력을 가진다. 그 분화 능력은 줄기세포의 특성에 따라 전분화능(pluripotency), 다분화능(multipotency), 또는 단일분화능(unipotency) 으로 정의되어진다. 따라서 줄기세포를 배양을 통해 증식시킨 후 특정 세포로 분화를 시키는 기술은 세포 치료라는 측면에서 여러 질병을 치료할 수 있는 잠재력을 가지고 있다 할 수 있다.

[0003] 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell), 골수줄기세포(bone marrow stem cell), 신경 줄기세포(neural stem cell) 등의 줄기세포는 성체에서도 존재하므로 환자 본인으로부터 추출할 수 있어 질병 치료 시 면역 거부반응이라는 문제점을 극복할 수 있는 장점이 있다. 이러한 장점은 기존의 장기이식에서 장기 제공자의 확보가 어려웠던 부분을 극복할 수 있다.

[0004] 하지만, 지금까지 알려진 견해에 따르면 성체줄기세포는 단지 다분화능으로, 분화할 수 있는 능력에 한계를 가진다. 이는 곧 조직 특이줄기세포는 같은 조직유형의 세포로만 분화할 수 있다는 것인데, 중추신경계(central nervous system) (Science 255, 1707-1710 1992; Science 287, 1433-1438 2000), 골수(bone marrow) (Science 276, 71-74, 1997; Science 287, 1442-1446, 2000; Science 284, 143-147, 1999), 망막(retina) (Science 287, 2032-2036, 2000)와 골격근(skeletal muscle) (Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 14482-14486, 1999; Nature 401, 390-394, 1999)에서 분리된 줄기세포는 분화능력 역시 유사조직 계통으로만 분화가 가능하다는 것을 의미한다. 그 예로 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)는 혈액에 관련된 세포로, 신경줄기세포(neural stem cell)는 신경세포(neuron) 또는 신경아교세포(glial cell)로, 골수줄기세포(bone marrow stem cell)는 중배엽세포(mesodermal cell) 로 분화가 가능하다. 뿐만 아니라 이론적으로 무한히 증식 가능한 성체줄기세포이지만, 현재까지의 보고로는 이러한 성체줄기세포를 인 비트로(in vitro) 상에서 증식시키는데 어려움이 있으며 실제 환자로부터 많은 양의 세포를 분리해 내는 것 또한 어렵다.

[0005] 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 앞에서 열거한 성체줄기세포가 가지고 있던 여러 가지 단점들을 극복해 줄 수 있는 훌륭한 자원이다. 이 세포는 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화가 가능하며 인비트로(in vitro) 상에서 무한히 증식이 가능하다. 현재까지 알려진 전분화능 줄기세포로는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 배아생식세포(embryonic germ cell), 배아종양세포(embryonic carcinoma cell)가 있으며 그 중 배아줄기세포는 가장 많은 연구가 이루어져 특정 세포들로의 분화 방법 및 동물질병 모델 연구한 기능성 검증과 임상 이용시 다양한 질병들에 대한 치료 가능성을 보여주었다.

[0006] 하지만 이러한 배아줄기세포 역시 성체줄기세포처럼 임상이용을 위해 극복해야만 하는 단점들이 존재한다. 우선, 배아줄기세포를 얻기 위해서는 수정된 배아를 파괴해야 하므로 윤리적인 문제점을 가지고 있으며 배아줄기에서 분화된 세포를 환자에 이식했을 경우 면역 거부반응이 일어난다는 문제점을 가지고 있다.

[0007] 때문에 배아줄기세포의 이러한 문제점들을 극복하기 위해서 다양한 접근 방법이 시도되었는데 그 중 가장 각광을 받은 것이 분화된 세포에서 미분화된 세포로의 역분화 유도 (reprogramming) 이다. 역분화는 분화된 세포를 이용하여 배아줄기세포와 같은 전분화능 줄기세포를 만들어내는 것을 총칭하며, 이러한 방법으로는 1) 핵치환 (nuclear transfer), 2) 핵융합 (cell fusion), 3) 세포추출물 처리 (cell extract treatment), 그리고 4) 유전자 도입을 통한 역분화(induced pluripotent stem cell;iPS cell) 기술이 있다 (Cell 132, 567-582, 2008).

[0008] iPS cell 기술은 현재까지 연구되어 오던 어떤 기술보다 배아줄기세포에 가까운 세포를 만들어 내는데 성공했으며 이러한 결과와 기작을 증명하기 위해 처음 기술이 발표되었던 2006년 이후 현재까지 수많은 연구 논문들이 쏟아져 나오고 있는 실정이다. 기본적으로는 마우스 또는 인간의 체세포에 4개의 유전자 (역분화 유도인자; Oct4, Sox2, Klf4, and C-Myc/Oct4, Sox2, Nanog, Lin28)를 도입한 후 배아줄기세포 배양조건에서 장기간 배양했을 경우 배아줄기세포와 유사한 특성의 줄기세포가 확립될 수 있었으며 이는 배아줄기세포와의 유전자발현 (gene expression), 후성학적 특성 (epigenetics), 인 비트로/인 비보 (in vitro/in vivo) 에서의 삼배엽성 분화 능력 (three germ layer differentiation), 테라토마 (teratoma) 형성 능력, 키메라 마우스 생성 (chimeric mouse generation) 그리고 키메라 마우스의 생식 가능 (germline transmission) 등의 특성이 상당히 유사한 것으로 증명되었다 (Cell 126, 663-676, 2006; Science 318, 1917-1920, 2007).

[0009] 하지만, 이러한 역분화 과정의 기작은 역분화 유도를 위해 사용된 유전자의 수가 너무 많아 자세한 기작을 규명하기 어렵기 때문에 현재까지 밝혀진 수준이 미미한 상태이다. 또한, 역분화 유도기술이 확립이 되었음에도 실제 치료적용을 위해서는 기술적으로 간편하고 효율이 높은 방법을 계속해서 개발해야만 하고 이렇게 개발된 기술들은 모두 효율과 안전성 측면에서 평가되어야 한다.

[0010] 최근 발표된 연구 결과에 따르면, 암억제 유전자인 p53의 비활성화 (inactivation)는 iPS 세포의 생성 효율을 증가시킨다고 보고되었다 (Nature 460, 1132-1135, 2009). p53유전자는 Ink4a/Arf locus에 의해 조절되는데 이 locus는 선택적 스플라이싱 (alternative splicing)에 의해 발현이 조절되며 Arf 에 의해 생성된 $p19^{Arf}$ 는 p53 유전자를, Ink4a에 의해 생성된 $p16^{Ink4a}$ 는 Rb 유전자의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이 두 가지 유전자 $p16^{Ink4a}$ 와 $p19^{Arf}$ 의 발현을 억제 시킨 경우 $p19^{Arf}$ 만을 억제시킨 경우 보다 iPS 생성 효율이 증가되었다는

보고도 있다 (Nature, 460, 1140-1144, 2009).

[0011] Polycomb group(PcG) 단백질은 후생유전학적 유전자 억제자 (epigenetic gene silencer)로써 PcG 단백질의 하나인 Bmi1은 $p16^{Ink4a}$ 와 $p19^{Arf}$의 발현을 억제 시킴으로써 p53과 Rb의 발현을 억제시킨다고 보고 되어있다 (Genes Dev, 2678-2690, 1999). 또한 Bmi1은 염색질(chromatin)의 구조를 변화시켜 타겟 유전자의 발현을 억제한다고 알려져 있으며 이러한 특성으로 인해 신경줄기세포 (neural stem cell) 및 조혈줄기세포 (hematopoietic stem cell)의 자가재생 (self-renewal)에서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 이에 따라 본 발명자들의 기존 연구에서는 마우스의 성상세포(astrocyte)에 Bmi1을 과발현(overexpression) 시켜 신경줄기세포(neural stem cell)로의 역분화에 성공했음을 보고 하였으며 이렇게 역분화된 신경줄기세포의 특성은 실제 마우스에서 분리한 신경줄기세포와 상당 부분 유사하였는데 그 중 역분화 유도인자 중 하나이자 신경줄기세포의 자가재생에 중요한 역할을 하는 유전자인 Sox2의 발현이 증가됨을 확인하였다 (Biochem Biophys Res Commun. 371, 267-272, 2008).

[0012] 일반 체세포의 경우 역분화를 하기 위해서는 4개 (Oct4, Sox2, Klf4, C-Myc) 혹은 3개(Oct4, Sox2, Klf4)의 유전자가 필요하지만 이 유전자를 내재적으로 발현(endogenously expression) 하는 세포에 한해서는 유전자의 도입이 추가적으로 필요하지는 않은 것으로 알려져 있다. 그중 대표적인 것이 마우스/사람의 신경줄기세포에 Oct4 유전자 하나만을 도입하여 역분화줄기세포를 확립했다는 연구 결과이며 이는 신경줄기세포가 내재적으로 Sox2, Klf4, C-Myc을 발현하기 때문이다 (Nature, 461, 649-653, 2009). 그러나 아직까지 체세포로부터 Oct4 유도인자만을 이용하여 전분화능을 가진 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법은 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 본 발명자들은 마우스의 체세포에 Oct4의 과발현과 함께 Sox2 유전자의 발현 유도 및 $p16^{Ink4a}$ 와 $p19^{Arf}$의 발현을 억제시킬 수 있는 Bmi1의 과발현을 통해 역분화된 유도 만능 줄기세포를 확립할 수 있을 것이라는 가설을 세웠다. 이 가설에 따라 본 발명자들은 Bmi1과 Oct4 유전자를 도입하고 역분화 유도를 하였을 때, 배아줄기세포와 유사한 특성을 지니고 있는 세포의 형성을 확인할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 유도된 역분화 줄기세포는 배아줄기세포가 가지고 있는 특성을 모두 가지고 있어 새로운 역분화 줄기세포주를 확립할 수 있었다.

[0014] 상기 Bmi1 유전자는 상위조절인자인 Shh 신호체계 (Sonic hedgehog signaling pathway)에 의해 조절이 되고 있는데, Shh 혹은 Shh 유사체 (Shh analog)에 의한 접근 방법의 실험 결과가 Bmi1 유전자의 과발현 시스템과 동일한 결과를 보인다면 유전자 도입의 수를 줄일 수 있는 가능성이 있다. 현재까지 마우스 섬유아세포에 하나의 유전자만으로 역분화 줄기세포를 만든 결과가 없기 때문에, 이와 같은 접근 방법을 통해 새로운 역분화 유도 방법을 제시할 수 있고 더 나아가 유전자 도입없는 역분화 줄기세포주의 유도 방법의 확립에 기반이 되는 기술을 제공할 수 있다고 생각되었다. 이러한 가설을 바탕으로 Bmi1을 과발현시키기 위해 Shh 신호체계(sonic hedgehog signaling)를 이용하였는데 Shh는 신경줄기세포의 자가재생에 있어 중요한 사이토카인으로써 직접적으로 Gli1 단백질을 조절하며 Bmi1, Sox2를 비롯한 신경줄기세포의 주요인자들의 발현을 증가시키는 것으로 보고되어 있다 (Curr Mol Med. 9, 873-886, 2009; Crit Rev Oncol Hematol. 65, 43-53, 2008). Shh 시그널을 유도하기 위해 Shh 유사체 (Shh analog)인 히드록시콜레스테롤 (hydroxycholesterol; Oxysterol)을 이용하였다 (Stem cells 27, 703-713, 2009). 히드록시콜레스테롤 (Oxysterol)을 신경줄기세포의 배양 조건에서 마우스 섬유아세포에 처리를 하였을 때 Bmi1 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이 때 Sox2의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, Bmi1 유전자의 타겟 유전자인 $p16^{Ink4a}$ 와 $p19^{Arf}$ 유전자의 발현이 줄어들고 있는 것을 확인할 수 있어 옥시스테롤 (oxysterol) 처리에 의한 Bmi1, Sox2가 조절이 되고, Bmi1의 타겟 유전자들의 발현이 조절되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 옥시스테롤의 처리에 의해 유도된 세포가 신경줄기세포와 같은 모양을 보이며 신경줄기세포의 대표적인 마커인 nestin과 sox2의 발현을 확인할 수 있었다. 이는 Bmi1이 과발현된 시스템과 동일한 결과이기 때문에, Shh 유사체인 옥시스테롤의 처리에 의한 방법이 적절한 것으로 생각되며, 이와 같은 접근 방법을 통해 유전자 수를 줄일 수 있었다. Oct4 유전자를 도입한 후에 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양한 결과 배아줄기세포와 유사한 형태의 세포군을 확립할 수 있었으며 이렇게 확립된 세포군은 유전자 발현(gene expression), 후성학적 특성(epigenetics), 인 비트로/인 비보 (in vitro/in vivo) 에서의 삼배엽성 분화 능력(three germ layer differentiation), 테라토마(teratoma) 형성 능력이 마우스 배아줄기세포와 매우 유사함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서 본 발명의 목적은 Bmi1의 상위 조절인자인 Shh의 유사체인 옥시스테롤(히드록시콜레스테롤) 및 역분화 유도인자인 Oct4 유전자를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 옥시스테롤 및 Oct4를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포와 유사한 특성을 지니는 전분화성 역분화 줄기세포를 제조하는 제조방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 방법으로 생산된 배아줄기세포 유사세포를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0019] 본 발명자들은 체세포에 옥시스테롤 (Oxysterol)을 처리하여 신경줄기세포와 같은 세포로의 유도를 하면서 Oct4 유전자를 도입하고 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양할 경우, 이미 분화된 세포 타입인 체세포가 전분화능을 가지는 배아줄기세포 유사세포로 역분화 (de-differentiation) 되는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0020] 하나의 양태로서, 본 발명은 다음을 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물을 제공한다.

[0021] a) 옥시스테롤 (Oxysterol); 및

[0022] b) Oct4 단백질 또는 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산분자.

[0023] 본 발명에서 용어, "배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC) 유사 세포"는 전분화성을 가지는 세포를 의미하며, 형질전환 없는 증식, 무한증식, 자가-재생산 및 3종류의 모든 배아 층으로부터 유래된 어떠한 세포로 발달할 수 있는 능력을 포함하는 배아줄기세포의 특성을 의미하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 배아줄기세포 유사세포는 배아줄기세포, 유도된 전분화성 줄기세포, 또는 유도 만능 줄기세포로도 기술되기도 한다.

[0024] 본 발명의 배아줄기세포 유사세포를 유도함에 있어서, 출발 체세포의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 임의의 체세포를 이용할 수 있다. 예를 들어, 태아기(embryonic period)의 체세포 이외에 성숙한(matured) 체세포를 이용해도 된다. 배아줄기세포 유사세포를 질병의 치료에 이용하는 경우에는 환자로부터 분리된 체세포를 이용하는 것이 바람직하며, 예를 들어, 질병에 관여하는 체세포나 질병치료에 관여하는 체세포 등을 이용할 수 있다. 바람직하게는 상기 체세포는 섬유아세포이며, 본 발명에서 섬유아세포는 인간과 마우스, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 섬유아세포를 포함한다.

[0025] 본 발명의 옥시스테롤은 산화된 형태의 콜레스테롤인 히드록시콜레스테롤 (hydroxycholesterol)이다. 옥시스테롤은 급·만성 염증, 담석 형성, 담도암과 같은 담도 질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 최근 뇌가 발달하는 단계에서 특정 수용체를 활성화시켜서 도파민 생산 신경세포 형성을 촉진시키는 역할을 한다고 보고되어 있을 뿐, 이를 이용한 역분화를 통한 배아줄기세포 유사세포 제조방법이 보고된 바는 없다.

[0026] 상기 옥시스테롤은 히드록시콜레스테롤이면 특별한 제한이 있는 것은 아니며Shh 시그널을 유도할 수 있다면 다양한 유도체가 사용될 수 있다. 예를 들어 25-, 7- 및 19-히드록시콜레스테롤 (25-, 7-, and 19-hydroxycholesterol)을 시중에서 구입하여 사용할 수 있다.

[0027] 상기 옥시스테롤은 신경줄기세포 유사세포로 역분화를 유도하기 위하여 통상적으로 사용되는 배지에 처리하면 된다. 이렇게 Shh 유사체인 옥시스테롤을 처리하면 용이하게 Bmi1을 유도할 수 있어, 역분화를 유도하기 위해 도입해야 하는 유전자수를 최소화할 수 있는 이점이 있다.

[0028] 상기 옥시스테롤은 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류와 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 옥시스테롤의 유효 농도는 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 0.1μM ~ 0.5μM 의 양으로 처리하였다.

[0029] 본 발명의 Oct4는 단백질 또는 이의 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공된다. 본 발명의 조성물에 사용되는 Oct4는 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 Oct4를 포함하며, 바람직하게는 인간 Oct4이다. 또한, 배아줄기세포 유사세포로의 역분화에 사용되는 본 발명의 Oct4 단백질은 이의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 Oct4 단백질의 변이체를 포함한다.

[0030] Oct4 단백질의 변이체란 Oct4의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질

과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있다. 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체이다.

[0031] 또한, Oct4 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산의 형태로 제공된다.

[0032] Oct4 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 Oct4 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0033] 상기한 Oct4 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다.

[0034] 하나의 바람직한 양태에서, 본 발명에서 체세포를 배아줄기세포 유사세포로 역분화를 유도하는 조성물은 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 Oct4 단백질을 발현하는 벡터를 포함한다.

[0035] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0036] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0037] 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

[0038] 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 HIV(Human immunodeficiency virus) MLV(Murineleukemia virus) ASLV(Avian sarcoma/leukosis), SNV(Spleen necrosis virus), RSV(Rous sarcoma virus), MMTV(Mouse mammary tumor virus) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associatedvirus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, Oct4 유전자의 경우에는 MLV-기반-바이러스 벡터로 니오마이신 (neomycine)에 대한 선별 마커를 포함하는 pBabe neo Oct4 벡터를 이용하였다.

[0039] Oct4 단백질을 코딩하는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 전달하거나(Wolff et al. Science,1990; Wolffet al. J Cell Sci. 103:1249-59, 1992), 리포좀(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer)등을 이용하여 세포내로 전달할 수 있다. 리포좀은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포좀과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포좀 복합체가 형성된다.

[0040] 또 다른 바람직한 양태로서, 본 발명에서 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물은 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 Oct4 단백질을 발현하는 바이러스를 포함한다.

[0041] 본 발명에서 용어, "바이러스"는 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 패키징 세포로 형질전환 및 감염시켜 제작한, Oct4를 발현하는 바이러스를 의미한다.

[0042] 본 발명의 Oct4 단백질을 발현하는 바이러스 제조에 사용될 수 있는 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 등을 포함하며 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는, 레트로바이러스이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, pBabe neo 벡터에 인간 Oct4 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(서열번호 1)을 삽입하여 제조한 벡터(pBabe neo Oct4)를 광범위한 포유류 숙주세포에 감염이 가능한 고역가바이러스를 생성하는 패키징 세포인 PT67 세포에 형질전환시켜 Oct4 단백질을 발현하는 바이러스를 제조하여 섬유아세포를 감염시켰다.

[0043] 또 다른 양태로서, 본 발명은 체세포에 옥시스테롤 (Oxysterol)을 처리하고 Oct4 유전자를 체세포에 도입하는

단계를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0044] 보다 구체적으로, (i) 섬유아세포 세포를 배지에서 배양하는 단계, (ii) 상기 배양한 섬유아세포에 옥시스테롤을 처리하고 Oct4 유전자를 삽입한 벡터를 트랜스펙션시킨 패키징 세포로 감염시키는 단계, (iii) 상기 감염시킨 섬유아세포를 배아줄기세포 배양조건에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0045] 상기 방법의 (i) 단계에서 섬유아세포를 배양하는 배지는 당해 분야에서 섬유아세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM (high glucose, w/o sodium pyruvate) + 10% FBS (Fstal Bovine Serum) + 0.1mM non-essential amino acid + 1% penicilin/streptomycin + 0.1mM β-mercaptoethanol) 배지에서 배양하였다.

[0046] 상기 방법의 (ii) 단계에서 상기 옥시스테롤을 신경줄기세포 배양 조건에서 처리하여 신경줄기세포와 같은 세포로의 유도를 하면서 Oct4 유전자를 섬유아세포로 도입하는 것이 바람직하다. 옥시스테롤 처리를 1일 동안 한 후에 Oct4 바이러스로 감염을 16시간 간격으로 3회에 걸쳐 실시하면서 옥시스테롤 처리를 계속하는 것이 바람직하다. 이때, 옥시스테롤 처리를 총 72시간 동안 계속하면서 신경줄기세포 배양조건을 유지한 후 배아줄기세포 배양조건으로 바꾸어 주는 것이 배아줄기세포 유사세포로의 역분화 효율을 높일 수 있어 바람직하다.

[0047] 상기 방법의 (ii) 단계에서 pBabe neo 벡터에 인간 Oct4 단백질을 코딩하는 핵산분자를 삽입하여 제조한 벡터(pBabe neo Oct4)를 광범위한 포유류 숙주세포에 감염이 가능한 고역가바이러스를 생성하는 패키징 세포인 PT67 세포에 형질전환시켜 Oct4 단백질을 발현하는 바이러스를 제조하여 섬유아세포를 감염시킨다. 상기 Oct4 단백질 또는 Oct4 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열인 핵산은 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 Oct4 일 수 있으며, 야생형 및 변이체를 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인간 Oct4(NCBI accession No. NM_002701; 서열번호 1)를 이용하였다.

[0048] 상기 방법의 (iii) 단계의 배아줄기세포 배양 조건은 당해 분야에서 배아줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 지지세포가 있는 조건에서 하이 글루코오즈 DMEM에 15% FBS (Fetal bovine serum) + 0.1mM nonessential amino acid +1% penicillin/streptomycin + 0.1mM β-mercaptoethanol + 1000 unit/ml mouse LIF (leukemia inhibitory factor)의 배양액에서 배양하면서 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 하였다.

[0049] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 배아줄기세포 유사세포를 제공한다.

[0050] 본 발명의 역분화 방법으로 제조된 배아줄기세포 유사세포는, 배아줄기세포 특이적인 마커인 알카라인포스파타아제(alkaline phosphatase) 및 SSEA1, Oct4, Sox2에 대한 항체에 양성 반응을 나타내며, 배아줄기세포의 자가재생능력의 유지에 중요한 유전자들(Oct4, Sox2, Nanog, c-myc, Klf4)의 발현이 배아줄기세포와 비슷한 양상으로 발현이 된다. 또한, 일반적인 배아줄기세포와 동일한 전분화능을 가지는 것을 확인하였다. 나아가, 본 발명의 역분화 방법으로 제조된 배아줄기세포 유사세포는 자가재생 (self-renewal)의 특징을 가진다.

[0051] 본 발명의 배아줄기세포 유사세포는 다양한 타입의 세포를 제공하는 좋은 소스(source)이다. 예를 들면, 상기 배아줄기세포 유사세포는 세포 분화를 위한 조건의 배지에서 배양하여 조혈세포, 신경세포, 베타세포, 간세포, 연골세포, 상피세포, 요로 세포 및 이의 유사 세포로 분화 유도될 수 있다.

[0052] 배아줄기세포 유사세포가 분화하기 위한 배지 조건 및 방법은 Palacios, et al., PNAS. USA, 92:7530-7537(1995), Pedersen, J. Reprod. Fertil. Dev., 6;543-552(1994), 및 Bain et al., Dev. Biol, 168:342-357(1995)에 개시되어 있다. 상기 배아줄기세포 유사세포는 이식을 통해서 수많은 치료에 응용될 수 있다. 상기 배아줄기세포 유사세포는 당뇨병, 파킨스병, 알츠하이머병, 암, 척수 손상, 다발성 경화, 근위축성 측삭 경화증(루게릭병), 근이영양증, 간 질환, 고 콜레스테롤 혈증, 심장 질환, 연골 대체, 창상, 족부 궤양, 위장병, 혈관 질환, 신장 질환, 요로 질환, 노화관련 질환 및 상태와 같은 수많은 질병 또는 질환 치료에 응용할 수 있다. 그 외, 본 발명의 배아줄기세포 유사세포는 약물개발 시 평가 등에도 응용될 수 있다.

효 과

[0053] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 Shh의 유사체인 옥시스테롤을 처리하면서 Oct4 유전자만을 도입하여 체세

포를 전분화능을 가진 역분화 줄기세포로 유도할 수 있다. 본 발명에 의해 역분화된 배아줄기세포 유사세포는 예를 들어, 심근세포, 인슐린 생산세포, 또는 신경세포 등의 세포로 분화하여 심부전, 인슐린의존성 당뇨병, 파킨슨병이나 척수손상 등 다양한 질환에 대한 줄기세포 이식요법에 이용할 수 있으며, 사람배아를 이용하는 윤리적 문제나 이식 후의 거부반응을 회피할 수 있으므로 극히 유용하다. 또한, 유도 전분화성 줄기세포를 분화시켜서 생기는 각종 세포(예를 들어, 심근세포, 간세포 등)는 화합물, 약제, 독물 등의 약효나 독성을 평가하기 위한 시스템으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명은 Bmi1 유전자의 상위 조절인자인 Shh 유사체인 옥시스테롤이라는 화학물질을 역분화 유도인자를 대체할 수 있도록 이용함으로써 Oct4 유전자 하나만으로 역분화 배아줄기세포 유사세포를 제조할 수 있으며, 더 나아가 유전자 도입없는 세포주 확립을 하는데 기반이 되는 기술을 제공하는 줄기세포분야에 매우 유용한 발명이라고 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0056] **실시예 1. 마우스 섬유아세포의 배양**

[0057] 배아줄기세포 유사세포를 제조하기 위해, 마우스 체세포 중 마우스 섬유아세포를 이용하였다. 마우스 섬유아세포는 CF1 스트레인 마우스(CF1 strain mouse)가 임신한지 13.5일째가 되었을 때의 배아(embryo)를 준비하고 DMEM (high glucose, w/o sodium pyruvate) + 10% FBS (Fetal Bovine Serum) + 0.1mM non-essential amino acid + 1% penicilin/streptomycin + 0.1mM β-mercaptoethanol) 배지의 조직배양 플라스크(tissue culture flask)에서 배양을 한 후에 3 계대(3rd passage)가 되었을 때 2 X 10^5의 세포를 6 웰플레이트(well plate)에 접종(seeding)을 하였다.

[0058] **실시예 2. 옥시스테롤 처리에 의한 Bmi1 유도 및 Oct4 유전자 도입**

[0059] 실시예 1에서 준비된 섬유아세포에 Shh (Sonic hedgehog)의 유사체인 옥시스테롤을 처리하여 Bmi1이 유도되는지를 확인하였다. 도 1a는 Bmi1 유전자의 상위 조절인자로 알려진 Shh (Sonic hedgehog)의 유사체 (analog)인 히드록시콜레스테롤(hydroxycholesterol)을 처리하였을 때 하위 유전자들이 조절되는 것을 RT-PCR 방법을 통해 확인한 결과를 나타내고 있다. 히드록시콜레스테롤 (Hydroxycholesterol, Sigma, 25-hydroxycholesterol, H1015)을 0.1μM과 0.5μM로 신경줄기세포의 배양 조건 (DMEM/F12 + B27 + N2 + 1% penicillin/streptomycin + 20 ng/ml bFGF + 20 ng/ml EGF)에서 처리를 하였을 때 Gli1과 Bmi1이 유도가 되며, 이 때 Bmi1 의 타겟 유전자인 $p16^{Ink4a}$와 $p19^{Arf}$의 발현이 마우스 섬유아세포에 비해 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 세포의 모양이 응집 (aggregation) 되면서 신경구와 같은 형태를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 1b). 이와 같이 유도된 신경줄기세포와 같은 세포는 Nestin, Sox2가 발현이 되는 것을 면역화학염색법을 통해 확인할 수 있었고, SSEA1과 AP 염색에도 포지티브 (positive)한 결과를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 1c). 이와 같은 결과를 통해 Bmi1을 조절할 수 있는 상위 조절인자인 Shh 의 유사체 (analog) 처리에 의해 Bmi1이 도입된 세포와 유사한 특성을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0060] 상기 히드록시콜레스테롤이 처리된 섬유아세포에 Oct4 유전자를 레트로 바이러스를 이용하여 도입하였다. 이때 바이러스 파티클(virus particles)을 PT67 패키징 세포주를 이용하여 준비하였다. 보다 구체적으로 pBabe neo 벡터에 인간 Oct4 (NCBI accession No. NM_002701) 유전자를 삽입하여 제조한 pBabe neo Oct4 벡터를 PT67 팩키징 세포주 (packagingcell line, Clontech)에 터보펙트(Turbofect, Fermentas)를 이용하여 트랜스펙션(transfection)을 한 후 니오마이신 (neomycine, 1000 ㎍/ml) (BD biosciences) 로 선별하였다. PT67 팩키징 세포주는 광범위한 포유류 숙주세포에 감염이 가능한 고역가 바이러스를 생성하는 세포이다.

[0061] Oct4 유전자의 발현을 RT-PCR의 방법을 통해 확인한 후에, 이와 같이 만들어진 세포주가 80% 정도 되었을 때 상등액(supernatant)을 취하여 0.45㎛ (Millipore) 필터로 필터링(filtering)을 하여 세포 파편 (cell debris)을

제거한 후에 폴리브렌 (polybrene, 6㎍/ml)(sigma)을 첨가하여 16시간 간격으로 분리한 마우스 섬유아세포에 3회 반복해서 감염(infection)시켰다.

[0062] 이때, 히드록시콜레스테롤 처리를 1일 동안 한 후 레트로바이러스 시스템을 이용하여 Oct4 유전자를 48시간 동안 16시간 간격으로 3회에 걸쳐 도입하면서 히드록시콜레스테롤 처리를 계속하였다. 히드록시콜레스테롤은 총 72시간 동안 계속 처리하였고, 히드록시콜레스테롤을 처리하는 동안 신경줄기세포 배양조건을 유지하였다. 그 이후 마우스 배아줄기세포의 배양 조건으로 바꾸어주면서 역분화 유도를 하였다 (도 1d).

[0063] **실시예 3. Shh 유사체 히드록시콜레스테롤을 처리하면서 Oct4 유전자 도입에 의한 역분화 줄기세포주 확립**

[0064] 실시예 2와 같은 방법으로, Shh 유사체 히드록시콜레스테롤(hydroxycholesterol: oxysterol)을 처리하면서 레트로바이러스를 이용하여 Oct4를 도입한 후 마우스 배아줄기세포의 배양 조건으로 옮겨서 배양을 하여 역분화 줄기세포주를 확립할 수 있었다. 마우스 배아줄기세포의 배양 조건은 지지세포가 있는 조건에서 하이 글루코오즈 DMEM에 15% FBS (Fetal bovine serum) + 0.1mM nonessential amino acid +1% penicillin/streptomycin + 0.1mM β-mercaptoethanol + 1000 unit/ml mouse LIF (leukemia inhibitory factor)의 배양액에서 배양하면서 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 하였다. 배양 후 10-14일 정도부터 콜로니와 비슷한 형태의 세포들이 보이기 시작하였고, 계속해서 배양을 한 결과 배아줄기세포와 유사한 형태의 콜로니를 얻을 수 있었다. 이와 같은 방법을 통해 확립된 역분화 줄기세포주를 OO-iPS로 명명하였다.

[0065] OO-iPS를 배아줄기세포와 비교하여 특성을 분석하였다. 배아줄기세포에서 중요한 유전자로 알려진 대표적인 유전자들의 발현을 비교 분석한 결과 배아줄기세포와 유사한 발현 양상을 보이고 있었다. 또한, 이와 같은 역분화 줄기세포의 동질적 (homogenous) 클론에서도 동일한 양상을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 2a). 웨스턴 블랏 분석 방법을 통해 Oct4, Sox2의 발현을 확인할 수 있었다 (도 2b). FACS 분석 방법을 통해 SSEA1과 Oct4가 배아줄기세포와 비슷한 정도의 %로 발현이 되고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 2c). 세포의 모양이 배아줄기세포와 유사한 것을 확인할 수 있었고, AP 염색이 포지티브 (positive)하게 된 결과를 보였다. 또한, 대표적인 마커들의 발현을 면역화학염색법을 통해 확인하였을 때 Oct4, SSEA1, Sox2의 발현이 배아줄기세포와 유사한 것을 확인할 수 있었다. 이는 역분화 줄기세포의 클론에서도 동일한 양상을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 2d).

[0066] **실시예 4. OO-iPS의 후성유전학적 특성 연구**

[0067] OO-iPS가 배아줄기세포와 비교하였을 때 배아줄기세포의 자가재생능력 유지에 중요하다고 알려진 Oct4 와 Nanog의 프로모터 부위의 메틸화 (methylation) 여부를 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing) 방법을 통해 비교 분석하였다. Oct4와 Nanog의 프로모터 부위가 탈메틸화 (demethylation) 되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 3a). 또한, 크로마틴 면역침강법 (Chromatin immunoprecipitation)으로 히스톤 H3 (histone H3)에 아세틸화 (acetylation) 되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 3b). 반면에 마우스 섬유아세포는 라이신 9 (lysine 9)에 탈메틸화 (dimethylation)되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 ChIP 분석 (ChIP assay) 후에 해당하는 Oct4, Sox2, Nanog 유전자의 프로모터 부위의 프라이머 (primer)를 이용하여 real-time PCR로 비교 분석한 결과이다.

[0068] **실시예 5. 전체 유전자 발현 (Global gene expression)을 배아줄기세포와 비교 분석**

[0069] OO-iPS를 DNA 마이크로어레이 (DNA microarray) 분석 방법을 통해 배아줄기세포와 비교 분석하였다. 산점도 (Scatter plot)로 이를 표시한 결과 대부분의 유전자의 발현이 2-fold 내에 포함이 되어 있었고, 특히 역분화 유도의 주요 인자이자 배아줄기세포에서 중요한 유전자로 알려진 Oct4, Sox2, Nanog, c-myc, Klf4 가 배아줄기세포와 거의 비슷한 정도로 발현이 되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 OO-iPS의 클론 세포에서도 동일한 결과를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 피어슨 상관관계 (pearson correlation) 방법을 통해 유사정도를 수치화한 결과 0.98정도로 높은 유사성을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었고, 클론 중의 하나를 배아줄기세포와 비교하였을 때도 0.95정도로 높은 유사성을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 4).

[0070] **실시예 6. 인 비트로와 인 비보에서의 삼배엽성 세포로의 분화 능력 비교 분석**

[0071] OO-iPS 역분화 줄기세포가 인 비트로상에서 분화 능력이 있는지 여부를 확인하기 위해서 우선 배아체 (embryonic body, EB)를 형성하는지를 확인하였다. 형성된 배아체 (embryonic body)를 0.1% 젤라틴 (gelatin)이 코팅 (coating)된 조직 배양 플레이트 (tissue culture plate)에서 자연발생적 분화 유도를 한 결과 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로의 분화 유도가 되는 것을 각각의 해당하는 마커의 염색을 통해 확인할 수 있었다. 면역화학염색법을 통해 Nestin, SMA, CK18의 발현을 확인하여 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로의 분화 유도가 되는 것을 확인할 수 있었다 (도 5a).

[0072] 인 비보에서도 분화 능력을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위해서 10^6의 세포를 8000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하고 배아줄기세포 배양액에서 펠릿 (pellet) 배양을 37℃ 인큐베이터에서 24시간 동안 한 후에 6주령 Balb/c 누드 마우스 (Balb/c nude mouse)의 신장 (kidney)에 캡슐 (capsule) 형태로 주사 (injection)하였다. 8-10주 후에 신장 (kidney)을 분리하여 삼배엽으로 분화되었는지 여부를 파라핀 블록 (parrafin block)을 만들고 H&E 염색을 하여 확인하였다. 그 결과 삼배엽에 해당하는 세포로 분화가 된 것을 확인할 수 있었다 (도 5b).

[0073] **실시예 7. 성체 마우스 섬유아세포 (Adult mouse fibroblast)에서 분리한 세포에 옥시스테롤 (Oxysterol)을 처리하면서 Oct4유전자를 도입하여 역분화 줄기세포주 확립 (OO-iPS-TTF #1,2)**

[0074] 마우스 섬유아세포에서 확인한 역분화 유도 방법을 성체 마우스 섬유아세포 (adult mouse fibroblast)에 적용을 하였다. 이와 같이 역분화 유도를 하였을 때 배아줄기세포와 비슷한 형태의 세포가 형성이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 OO-iPS-TTF #1,2로 명명하였고, 1번과 2번은 옥시스테롤 (oxysterol) 처리 농도를 각각 0.1μM과 0.5μM로 다르게 한 것을 의미한다. OO-iPS-TTF #1,2는 AP 염색이 포지티브 (positive)하게 되는 것을 확인할 수 있었고, 면역화학염색법을 통해 SSEA1, Oct4, Sox2, Nanog의 발현을 확인할 수 있었다 (도 6a). 또한, 배아줄기세포의 주요 유전자로 알려진 유전자들의 발현 정도를 real-time PCR방법을 통해 정량화하여 비교 분석하였더니, 배아줄기세포와 비슷한 정도의 발현 양상을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 6b).

[0075] **실시예 8. OO-iPS-TTF #1,2 의 후성유전학적 특성 연구**

[0076] OO-iPS-TTF #1,2가 배아줄기세포와 비교하였을 때 배아줄기세포의 자가재생능력 유지에 중요하다고 알려진 Oct4와 Nanog의 프로모터 부위의 메틸화 (methylation) 여부를 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing) 방법을 통해 비교 분석하였다. Oct4와 Nanog의 프로모터 부위가 탈메틸화 (demethylation) 되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 7a). 또한, 크로마틴 면역침강법 (Chromatin immunoprecipitation)으로 히스톤 H3 (histone H3)에 아세틸화 (acetylation) 되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 7b).

[0077] **실시예 9. OO-iPS-TTF #1,2 세포를 인 비트로와 인 비보에서의 삼배엽성 세포로의 분화 능력 비교 분석**

[0078] OO-iPS-TTF #1,2 역분화 줄기세포가 인 비트로상에서 분화 능력이 있는지 여부를 확인하기 위해서 우선 배아체 (embryonic body, EB)를 형성하는지를 확인하였다. 형성된 배아체 (embryonic body)를 0.1% 젤라틴 (gelatin)이 코팅 (coating)된 조직 배양 플레이트 (tissue culture plate)에서 자연발생적 분화 유도를 한 결과 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로의 분화 유도가 되는 것을 각각의 해당하는 마커의 염색을 통해 확인할 수 있었다. 면역화학염색법을 통해 Nestin, SMA, GATA4의 발현을 확인하여 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로의 분화 유도가 되는 것을 확인할 수 있었다 (도 8a). 인 비보에서도 분화 능력을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위해서 OO-iPS 실험을 했던 것과 동일한 방법으로 진행을 하였고, 8-10주 후에 신장 (kidney)을 분리하여 삼배엽으로 분화되었는지 여부를 파라핀 블록 (parrafin block)을 만들고 H&E 염색을 하여 확인하였다. 그 결과 삼배엽에 해당하는 세포로 분화가 된 것을 확인할 수 있었다 (도 8b).

[0079] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 도면에 의해 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 Shh (Sonic hedgehog) 유사체인 히드록시콜레스테롤 (hydroxycholesterol: oxysterol) 처리에 의한 Bmi1 유도 결과를 나타낸다.

[0081] 도 1a는 Shh (Sonic hedgehog) 유사체인 히드록시콜레스테롤을 마우스 섬유아세포에 처리를 하였을 때 하위 조절 유전자들의 발현을 확인한 결과를 나타내고 있다. 옥시스테롤 (oxysterol)를 처리한 경우 Gli1과 Bmi1의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이 때 Bmi1 유전자의 타겟 유전자로 알려진 $p16^{Ink4a}$와 $p19^{Arf}$의 유전자의 발현이 줄어드는 것을 RT-PCR 방법을 통해 확인할 수 있었다.

[0082] 도 1b는 옥시스테롤 (oxysterol)을 처리하였을 때 신경구와 같은 모양의 세포로 변화가 되는 것을 확인한 결과를 나타낸다.

[0083] 도 1c는 이와 같이 형성된 신경구와 같은 모양의 세포가 신경줄기세포와 같은 특성을 지니고 있는 것을 확인한 결과를 보여주고 있다. Nestin, Sox2의 대표적인 마커들의 발현을 면역화학염색법을 통해 확인을 하고 SSEA1과 AP에 포지티브 (positive)한 결과를 보이고 있는 것을 확인할 수 있다.

[0084] 도 1d는 옥시스테롤 (Oxysterol)을 처리하면서 Oct4 유전자를 도입하고 역분화 유도를 하는 전체적인 방법에 대한 모식도를 나타내고 있다.

[0085] 도 2는 옥시스테롤 (Oxysterol)을 처리하면서 Oct4 유전자를 도입하여 유도된 역분화 줄기세포를 배아줄기세포와 특성을 비교 분석한 결과를 보여주고 있다.

[0086] 도 2a는 RT-PCR의 방법을 통해 배아줄기세포에서 발현이 되는 대표적인 유전자들의 발현을 비교 분석한 결과를 보여주고 있고, 동질적 (homogenous) 클론에서도 동일한 결과를 보여주고 있는 것을 확인한 결과를 나타내고 있다.

[0087] 도 2b는 웨스턴 블랏 분석 방법을 통해 Oct4, Sox2의 발현을 확인한 결과를 나타내고 있다.

[0088] 도 2c는 FACS 분석방법을 통해 SSEA1과 Oct4의 발현이 배아줄기세포와 유사하게 나타나는 것을 확인한 결과를 보여주고 있다.

[0089] 도 2d는 AP 염색이 포지티브(positive)하게 되는 것을 확인한 결과를 보여주고 있고, 이 때 면역화학염색법을 이용하여 SSEA1, Oct4, Sox2가 발현이 되는 것을 확인한 결과를 나타내고 있다.

[0090] 도 3은 본 발명에 의한 배아줄기세포 유사세포의 후성유전학적 특성을 비교 분석한 결과를 나타내고 있다.

[0091] 도 3a는 역분화 줄기세포 (OO-iPS)와 배아줄기세포가 바이설파이트 시퀀싱 (Bisulfite sequencing) 방법을 통해 Oct4와 Nanog 유전자의 프로모터 부위가 탈메틸화 (demethylation) 되어 있는 것을 확인한 결과를 보여주고 있다.

[0092] 도 3b는 크로마틴 면역침강법 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)을 이용하여 배아줄기세포와 역분화 줄기세포의 Oct4, Sox2, Nanog 유전자의 프로모터의 히스톤 (histone) 3번이 아세틸화 (acetylation) 되어 유전자 발현이 활성화된 결과를 나타내고 있다는 것을 증명한 결과를 보여주고 있고, 이에 비해 마우스 섬유아세포에서는 라이신 9 (lysine 9)에서 탈메틸화 (dimethylation)되어 유전자들의 발현이 비활성화된 결과를 나타내고 있다는 것을 증명한 결과를 보여주고 있다.

[0093] 도 4는 DNA 마이크로어레이 (DNA microarray) 방법을 통해 배아줄기세포와 역분화 줄기세포인 OO-iPS를 전체 유전자상에서 비교 분석한 결과를 보여주고 있다. 산점도 (Scatter plot) 방법으로 분석 결과를 표시하였을 때 대부분의 유전자들의 발현 정도가 배아줄기세포와 비슷한 것을 확인할 수 있었다 (위쪽 panel). 또한, 피어슨 상관관계 (pearson correlation) 분석 방법을 통해 0.98정도의 유사성을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었고, 이는 클론 세포에서도 0.95정도의 유사성을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0094] 도 5는 본 발명에 의한 배아줄기세포 유사세포가 인 비트로와 인 비보에서 삼배엽성 세포로의 분화 능력을 지니고 있는지를 확인한 결과를 보여주고 있다.

[0095] 도 5a는 배아줄기세포와 같이 배아체 (embryonic body, EB)를 형성하고, 인 비트로에서 자연발생적 분화 유도

후 해당하는 마커를 면역화학염색법을 통해 확인한 결과를 보여주고 있다.

[0096] 도 5b는 인 비보에서 테라토마 (teratoma) 형성을 한다는 것을 H&E 염색을 통해 분석한 결과를 보여주고 있다.

[0097] 도 6은 성체 마우스 섬유아세포 (Adult mouse fibroblast)에 마우스 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast)에서 역분화 유도를 하였던 조건을 적용하여 역분화 줄기세포주를 확립 (OO-iPS-TTF #1,2)하고 이의 특성 분석을 한 결과를 보여주고 있다.

[0098] 도 6a는 세포의 모양이 배아줄기세포와 유사하다는 것을 보여주고 있고, AP 염색이 포지티브 (positive)하게 되고 있으며, SSEA1, Oct4, Sox2, Nanog의 발현을 면역화학염색법을 통해 확인한 결과를 보여주고 있다.

[0099] 6b는 OO-iPS-TTF #1,2의 세포가 배아줄기세포에서 중요한 유전자들의 발현이 배아줄기세포와 유사한지 여부를 real-time PCR의 방법을 통해 정량화하여 비교 분석한 결과를 나타내고 있다.

[0100] 도 7은 본 발명에 의한 성체 마우스 섬유아세포로부터 유도된 배아줄기세포 유사세포의 후성유전학적 특성을 비교 분석한 결과를 보여주고 있다.

[0101] 도 7a는 OO-iPS-TTF #1,2의 세포의 Oct4와 Nanog의 프로모터 부위가 탈메틸화 (demethylation) 되어 있는 결과를 보여주고 있다.

[0102] 도 7b는 히스톤 H3 (histone H3)가 아세틸화 (acetylation)되어 있어서 유전자 발현이 활성화되어있는 것을 보여주는 결과를 나타내고 있다.

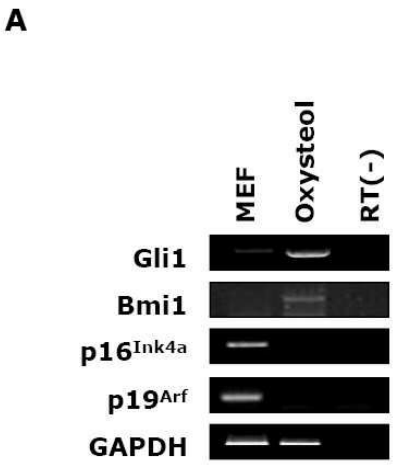
[0103] 도 8은 본 발명에 의한 성체 마우스 섬유아세포로부터 유도된 배아줄기세포 유사세포가 인 비트로와 인 비보에서 삼배엽성 세포로의 분화 능력을 지니고 있는지를 확인한 결과를 보여주고 있다.

[0104] 도 8a는 OO-iPS-TTF #1,2세포가 인 비트로상에서 배아체 (embryonic body)를 형성하고, 자연발생적 분화 유도가 가능하다는 것을 면역화학염색법을 통해 확인한 결과를 나타내고 있다.

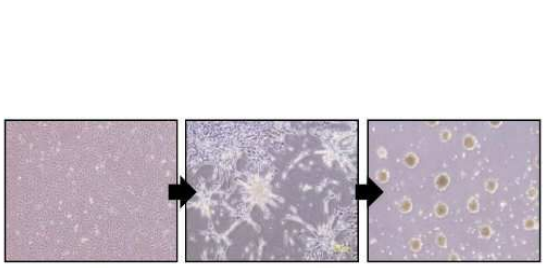
[0105] 도 8b는 인 비보에서 테라토마 (teratoma) 형성이 되는 것을 H&E 염색 방법을 통해 확인한 결과를 나타내고 있다.

도면

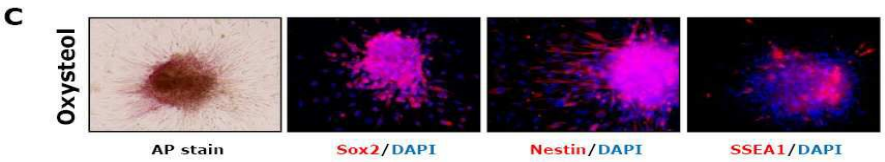
도면1a



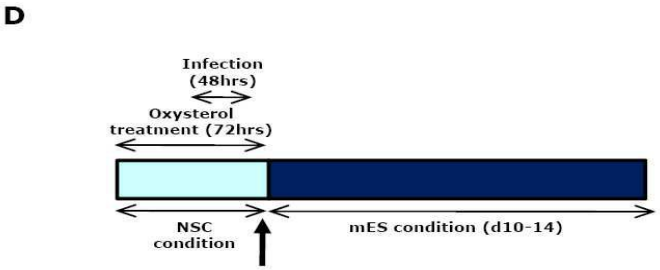
도면1b



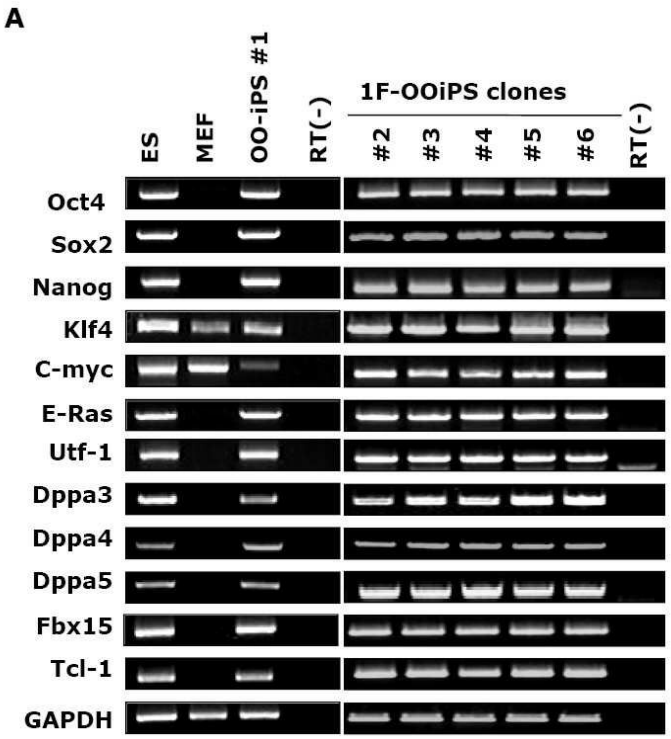
도면1c



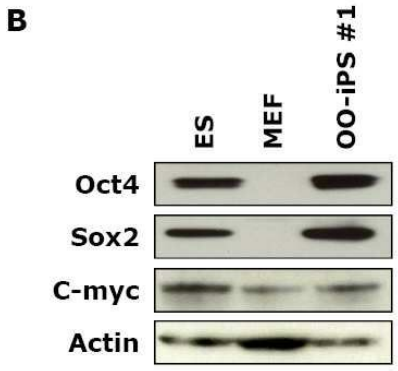
도면1d



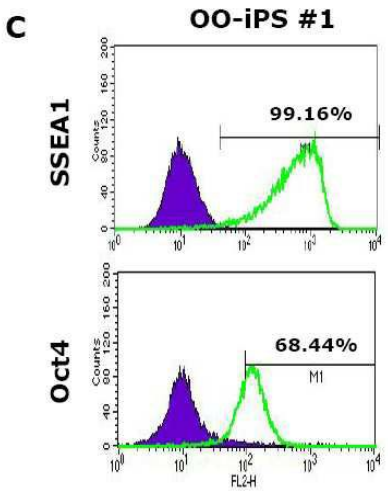
도면2a


A
ES
MEF
OO-iPS #1
RT(-)
1F-OOiPS clones
#2
#3
#4
#5
#6
RT(-)
Oct4
Sox2
Nanog
Klf4
C-myc
E-Ras
Utf-1
Dppa3
Dppa4
Dppa5
Fbx15
Tcl-1
GAPDH

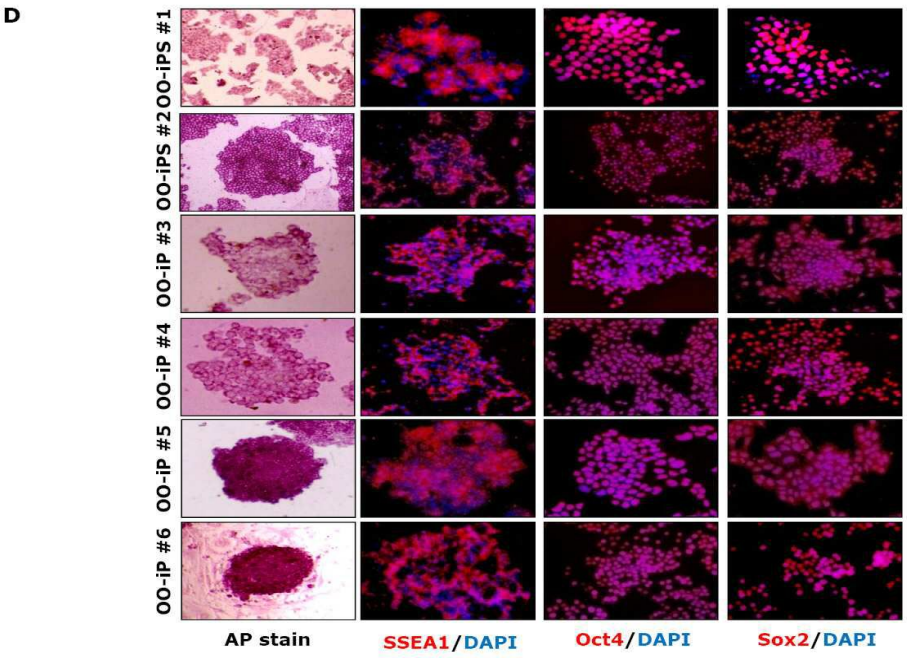
도면2b


B
ES
MEF
OO-iPS #1
Oct4
Sox2
C-myc
Actin

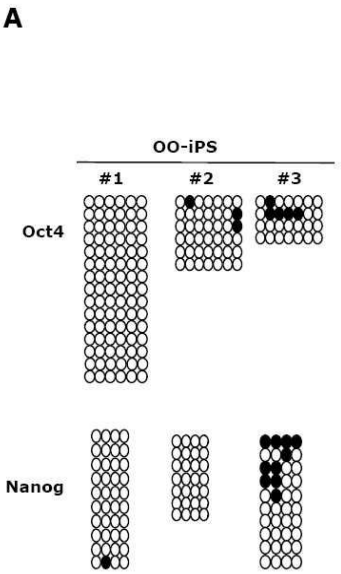
도면2c


C
OO-iPS #1
SSEA1
99.16%
Oct4
68.44%
M1
Counts
FL2-H

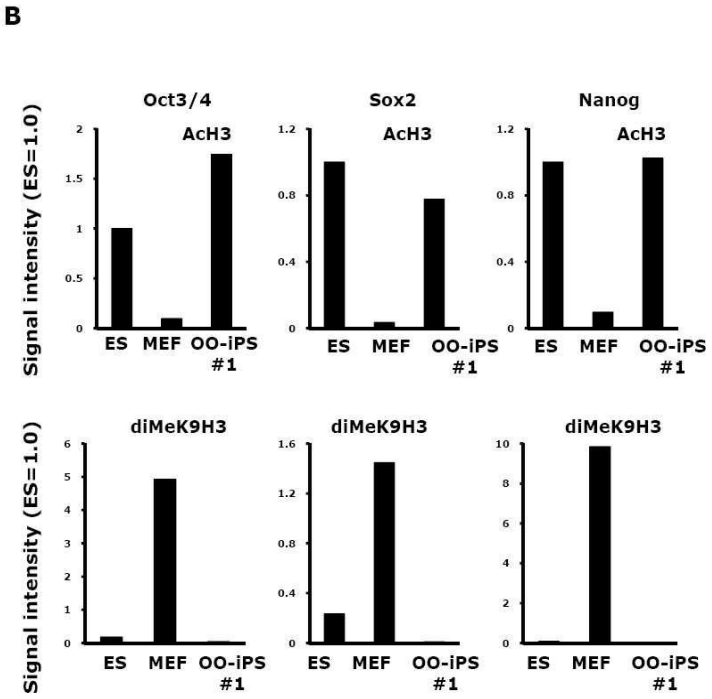
도면2d


D
OO-iPS #1
OO-iPS #2
OO-iP #3
OO-iP #4
OO-iP #5
OO-iP #6
AP stain
SSEA1/DAPI
Oct4/DAPI
Sox2/DAPI

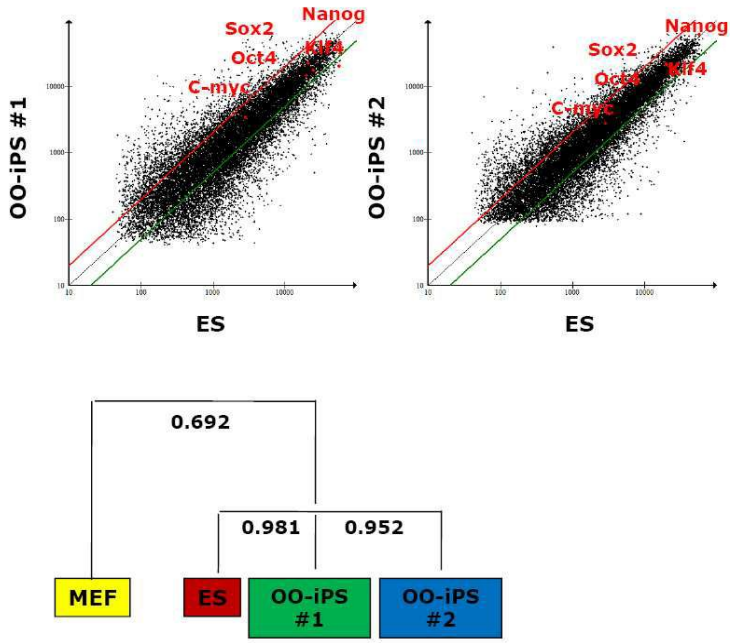
도면3a


A
OO-iPS
#1
#2
#3
Oct4
Nanog

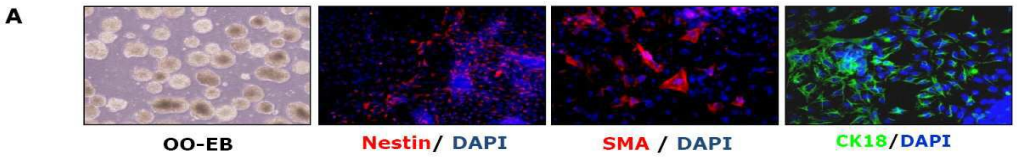
도면3b


B
Oct3/4
Sox2
Nanog
AcH3
diMeK9H3
Signal intensity (ES=1.0)
ES
MEF
OO-iPS #1

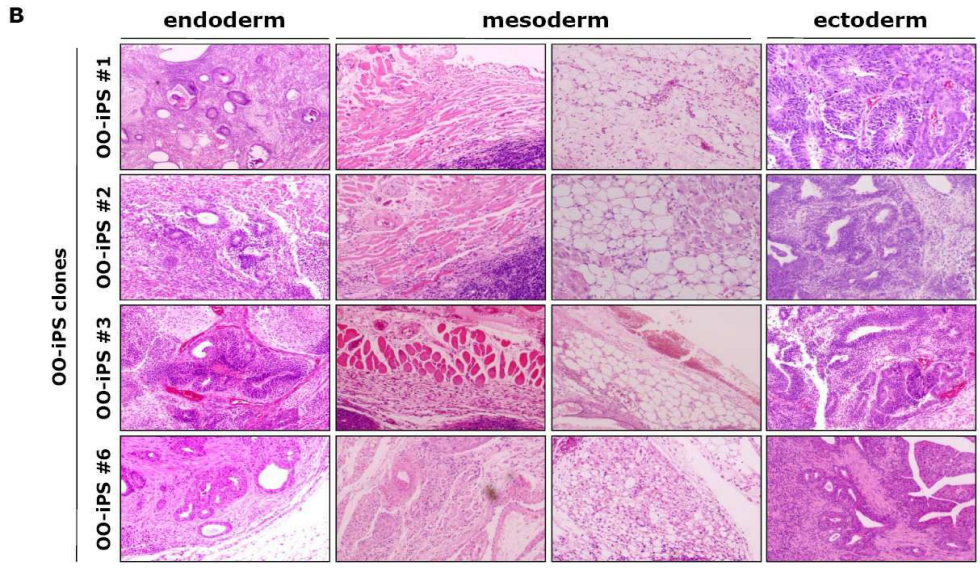
도면4



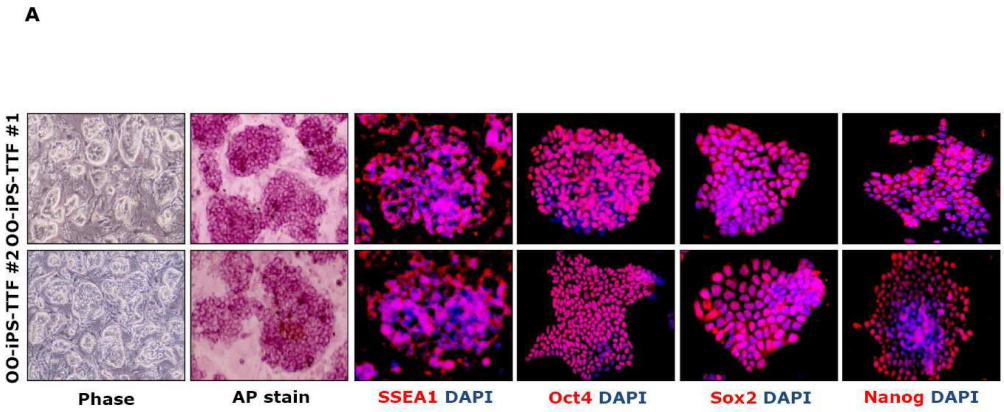
도면5a



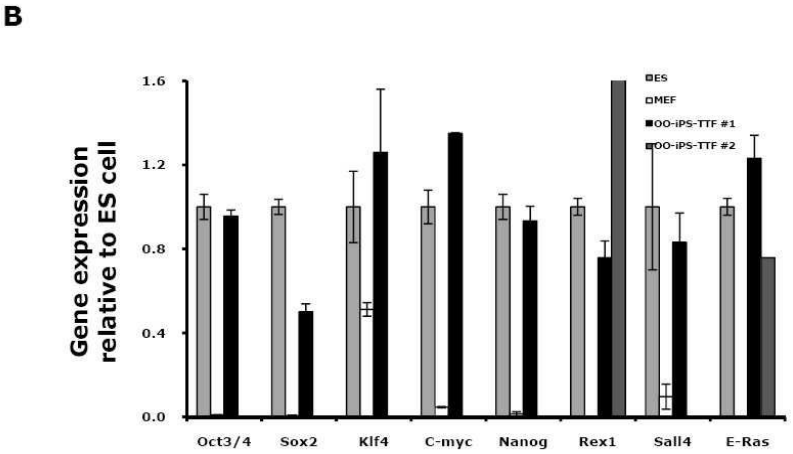
도면5b



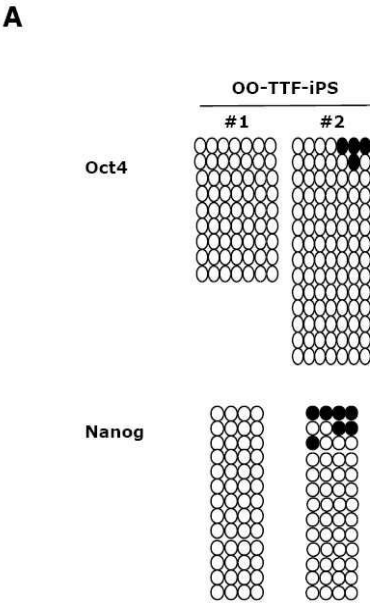
도면6a


A
OO-iPS-TTF #1
OO-iPS-TTF #2
Phase
AP stain
SSEA1 DAPI
Oct4 DAPI
Sox2 DAPI
Nanog DAPI

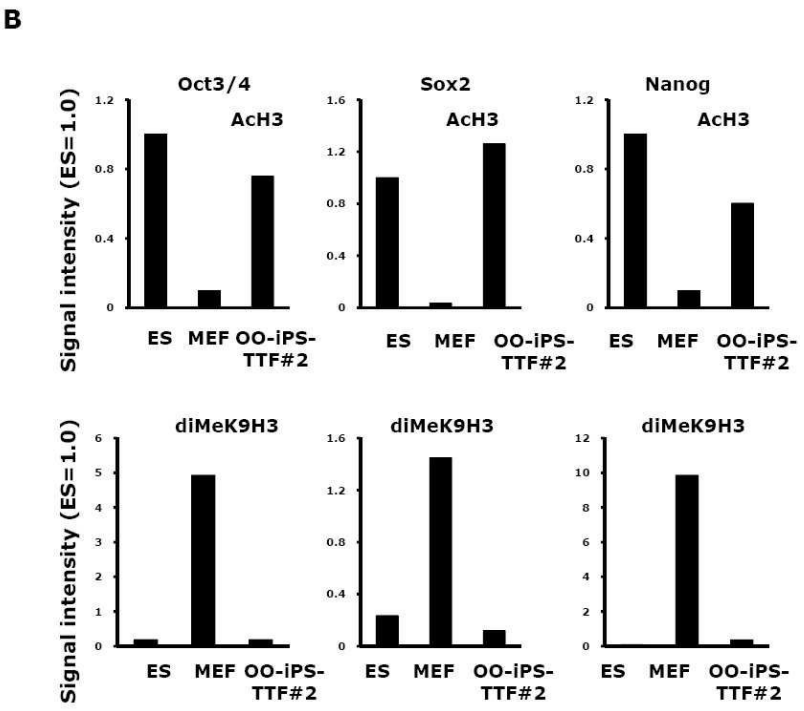
도면6b


B
Gene expression relative to ES cell
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
ES
MEF
OO-iPS-TTF #1
OO-iPS-TTF #2
Oct3/4
Sox2
Klf4
C-myc
Nanog
Rex1
Sall4
E-Ras

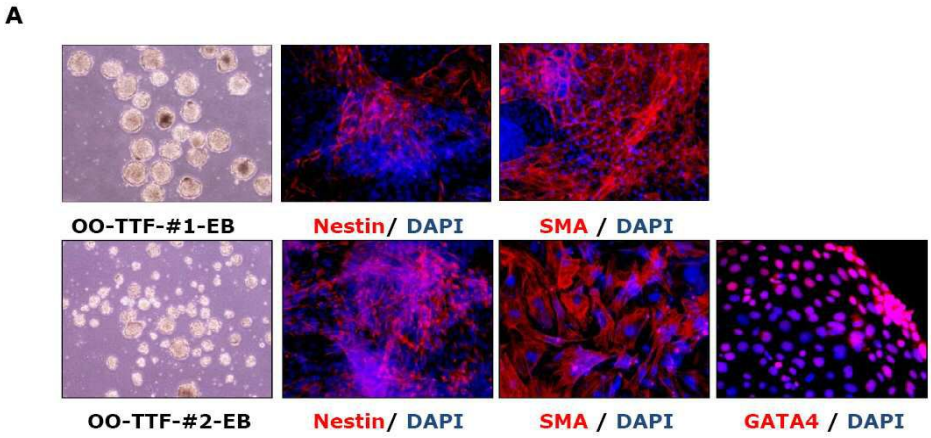
도면7a


A
OO-TTF-iPS
#1
#2
Oct4
Nanog

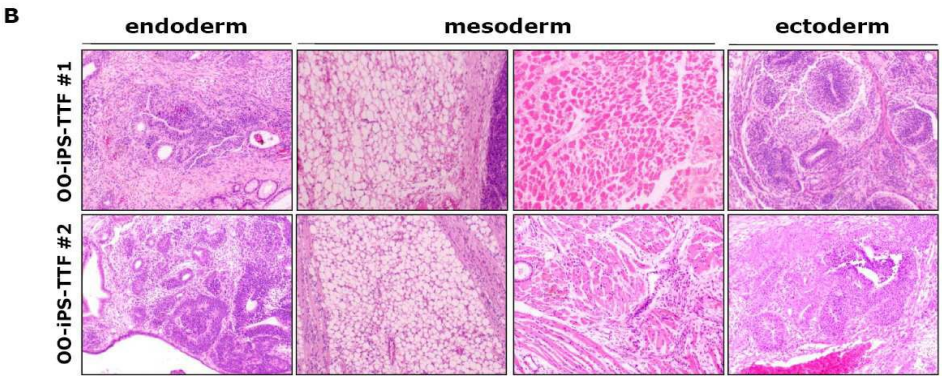
도면7b


B
Oct3/4
AcH3
Sox2
AcH3
Nanog
AcH3
diMeK9H3
diMeK9H3
diMeK9H3
Signal intensity (ES=1.0)
Signal intensity (ES=1.0)
ES
MEF
OO-iPS-TTF#2

도면8a



도면8b



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
<120> Generation composition for induced pluripotent stem cells with oxysterols treatment and Oct4, and method of manufacturing induced pluripotent stem cells using the same

<130> P11-091218-03

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1411
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1

ccttcgcaag ccctcatttc accaggcccc cggcttgggg cgccttcctt ccccatggcg 60

ggacacctgg cttcggattt cgccttctcg ccccctccag gtggtggagg tgatgggcca 120

gggggggccgg agccgggctg ggttgatcct cggacctggc taagcttcca aggccctcct 180

ggagggccag gaatcgggcc gggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattccccca 240

tgcccccccgc cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgtact gtgggcccca ggttggagtg 300

gggctagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtcggg 360

gtggagagca actccgatgg ggcctccccg gagccctgca ccgtcacccc tggtgccgtg 420

aagctggaga aggagaagct ggagcaaaac ccggaggagt cccaggacat caaagctctg 480

cagaaagaac tcgagcaatt tgccaagctc ctgaagcaga agaggatcac cctgggatat 540

acacaggccg atgtggggct caccctgggg gttctatttg ggaaggtatt cagccaaacg 600

accatctgcc gctttgaggc tctgcagctt agcttcaaga acatgtgtaa gctgcggccc 660

ttgctgcaga agtgggtgga ggaagctgac aacaatgaaa atcttcagga gatatgcaaa 720

gcagaaaccc tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga 780

ggcaacctgg agaatttgtt cctgcagtgc ccgaaaccca cactgcagca gatcagccac 840

atcgcccagc agcttgggct cgagaaggat gtggtccgag tgtggttctg taaccggcgc 900

cagaagggca agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggattttga ggctgctggg 960

tctcctttct caggggggacc agtgtccttt cctctggccc cagggcccca ttttggtacc 1020

ccaggctatg ggagccctca cttcactgca ctgtactcct cggtcccttt ccctgagggg 1080

gaagcctttc cccctgtctc cgtcaccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt 1140

gcctgccctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg 1200

agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt cttcattcac taaggaagga attgggaaca 1260

caaagggtgg gggcagggga gtttggggca actggttgga gggaaggtga agttcaatga 1320

tgctcttgat tttaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga 1380

cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a 1411