



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0013034

(43) 공개일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/074 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0092074

(22) 출원일자 2014년07월21일

심사청구일자 2014년07월21일

(30) 우선권주장

1020130089205 2013년07월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍성희

서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)

박항수

서울특별시 성북구 인촌로10길 19-6, 옥탑 (안암동3가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

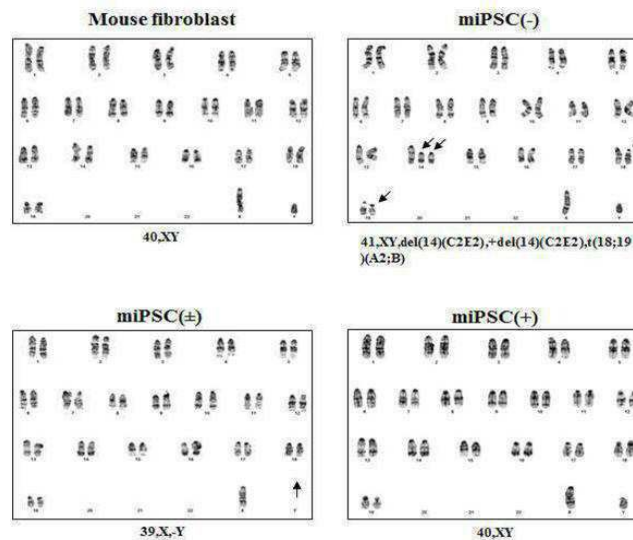
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 소분자 화합물을 포함하는 만능성 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물

(57) 요약

본 발명은 소분자 화합물을 포함하는 만능성 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell)의 유도 단계 및 유도 과정과 이후 배양 동안 염색체의 구조적, 수적 돌연변이 또는 DNA 손상을 억제할 수 있는 ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 또는 항산화제를 포함하는 만능성 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 소분자 화합물을 포함하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물은 역분화 줄기세포 제작시 역분화의 속도와 효율을 높이고, 염색체의 구조적, 수적 돌연변이 억제 또는 DNA 손상 억제 효과가 우수하므로, 염색체 안정성이 우수한 역분화 줄기세포 치료제 개발에 매우 유용하다.

대표도 - 도6d



(72) 발명자

황인식

서울특별시 성동구 왕십리로33길 12-1 (하왕십리동)

최경아

강원도 철원군 동송읍 금학로62번길 29 (주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012050131
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.10.01 ~ 2013.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A12039212010000300
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	다양한 세포근원 유래 신경 줄기세포의 임상적용 가능성 검증 연구
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.08.01 ~ 2013.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

ROCK(Rho-associated kinase) 억제제, MEK(mitogen-activated protein kinase) 억제제, ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제 및 항산화제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 소분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제는 티아조비빈(Thiazovivin), Y-27632, 파수딜(HA-1077), 하이드록시파수딜(HA-1100), H-1152, 3-(4-피리딜)-1H-인돌, N-(4-피리딜)-N'-(2,4,6-트리클로로페닐)우레아, 아우로티오글루코즈 및 LY294002로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 MEK(mitogen-activated protein kinase) 억제제는 PD0325901 또는 U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제는 A-83-01 또는 SB431542인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항산화제는 L-아스코르브산, 비타민E, A, C, 옥소티아졸리딘(Oxothiazolidine), N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine), TEMPO, SOD(superoxide dismutase), 글루타치온 과산화효소, 스캐빈저 산소, 과산화수소, 리포옥사이드 라디칼, 히드록시 라디칼, 금속결합단백질, 셀레늄, 환원형 글루타치온, 베타카로틴, 플라보노이드(flavonoids), 세사몰(Sesamol), 몰식자산 유도체(Gallic Acid), 아요완(Ajowan), 오리자놀(Oryzanol), 레스베라트롤, 카테킨, 레시틴(lecithin), 세파린(cephalin), sulfhydryls(SRH), 구연산, 아스코르빈산, 카탈라아제(catalase), BHA, BHT, PG, NDGA, 하이드로퀴닌(hydroquinone), 카테콜(catechol) 및 DPPD(N,N-diphenyl-pp-phenylene-diamine)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 Oct4, Klf4, Sox2 및 cMyc로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 도입에 의해 유도되는 만능성 역분화 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 염색체의 구조적, 수적 돌연변이 억제 또는 DNA 손상 억제를 통하여 염색체 안정성을 유지시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물로 역분화 줄기세포를 처리하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 체세포의 역분화를 유도하는 단계에 첨가되는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 조성물은 역분화 유도 후에 첨가되는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물 존재하에 역분화 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 배양방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는 역분화 줄기세포의 배양방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 소분자 화합물을 포함하는 만능성 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell)의 유도 단계 및 유도 과정과 이후 배양 동안 염색체의 구조적, 수적 돌연변이 또는 DNA 손상을 억제할 수 있는 ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 또는 항산화제를 포함하는 만능성 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

역분화 줄기세포 제작기술은 동물의 체세포를 이용하여 배아줄기세포와 유사한 상태의 세포를 만드는 기술로, 알려진 4가지의 역분화 인자(Oct4, Klf4, Sox2, cMyc)를 세포내로 도입하여 특정 배양조건에서 배양하는 것으로 진행된다. 이러한 방식으로 만들어진 역분화 줄기세포는 모든 조직 특이적 세포로 분화할 수 있는 가능성이 있어서 윤리적 문제가 없는 세포치료제의 재료로 사용될 수 있는 장점이 있으나 그 제작효율이 매우 낮고, 만들어진 역분화 줄기세포의 안전성도 보장하기 어려우며 배아줄기세포와 완벽하게 유사하지 못하다는 단점이 있다.

[0003]

역분화 줄기세포 기술이 정립된 2006년 이후, 많은 연구들을 통하여 역분화 줄기세포의 제작 효율을 향상시키는데 여러 가지 조성물이 사용 되어졌다. 그 결과 23편의 논문에서 특정 조성물을 이용하여 역분화 줄기세포의 제작 효율을 향상시키는데 성공하였고, 6편의 논문에서는 하나 이상의 역분화 인자가 빠진 조건에서도 역분화 줄기세포를 제작하는 데 성공하였다.

[0004]

현재까지의 연구들은 주로 역분화 줄기세포의 효율을 높이는 것을 중심으로 이루어져 왔다. 하지만 안전성에 대한 검증이 부족한 상황에서 제작효율만 높인다고 해서 역분화 줄기세포를 임상적용이 가능한 수준으로 사용하기

는 어렵다. 따라서 역분화 줄기세포를 이용한 임상적용의 가능성을 높이기 위해서는 그 안전성을 높이는 연구가 반드시 필요하고, 보다 배아줄기세포와 유사한 역분화 줄기세포를 만드는 방법이 정립되어야 한다.

[0005]

본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 등록특허 10-1211610(2012.12.06)에는 Bmi1, MEK 억제제와 GSK 억제제를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 10-1211624(2012.12.06)에는 Shh, FGFR 티로신 키나아제 억제제, MEK 억제제와 GSK 억제제를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 10-2010-0101764호(2010.09.20.), 대한민국 공개특허공보 10-2011-0094348호(2011.08.23.), 대한민국 공개특허공보 10-2012-0094488호(2012.08.24.), 대한민국 공개특허공보 10-2012-0121084호(2012.11.05.) 등에는 만능성 세포를 생성 및 유지시키는 유용한 배양 방법 및 배지 등이 개시되어 있다.

[0006]

본 발명의 배경이 되는 기술로 몇몇 논문에서 조성물 처리가 역분화 줄기세포의 효율을 향상시킨다는 발표는 있으나, 이러한 조성물 처리가 역분화 줄기세포의 돌연변이를 억제할 수 있는지에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 특히, MEK 억제제, ALK5 억제제, ROCK 억제제, 항산화제를 포함하는 조성물을 이용하여 역분화 줄기세포 제작의 문제점 중에 하나인 돌연변이 또는 DNA 손상을 억제 할 수 있어 안정한 역분화 줄기세포를 제공하는 것에 대해 개시된 바는 없다.

[0007]

이에, 본 발명자들은 ROCK 억제제 티아조비빈(Thiazovivin), MEK 억제제 PD0325901, ALK5 억제제 SB431542 또는 항산화제 L-아스코브산을 함유하는 조성물이 역분화 줄기세포의 구조적, 수적 돌연변이 또는 DNA 손상을 억제함으로써 염색체 안정성이 유지되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008]

- (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1211610(2012.12.06)
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 10-1211624(2012.12.06)
- (특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 10-2010-0101764호(2010.09.20.)
- (특허문헌 0004) 대한민국 공개특허공보 10-2011-0094348호(2011.08.23.)
- (특허문헌 0005) 대한민국 공개특허공보 10-2012-0094488호(2012.08.24.)
- (특허문헌 0006) 대한민국 공개특허공보 10-2012-0121084호(2012.11.05.)

비특허문헌

[0009]

- (비특허문헌 0001) Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009a). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. Cell Stem Cell 4, 16-19.
- (비특허문헌 0002) Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Scholer, H.R., Hayek, A., and Ding, S. (2009b). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. Stem Cells 27, 2992-3000.
- (비특허문헌 0003) Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H.S., Hao, E., Hayek, A., et al. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. Nat Methods 6, 805-808.
- (비특허문헌 0004) Yuan, X., Wan, H., Zhao, X., Zhu, S., Zhou, Q., and Ding, S. (2011). Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts. Stem Cells.
- (비특허문헌 0005) Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasudhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. Cell

Stem Cell 7, 651-655.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은, ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 및 항산화제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 소분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물로 역분화 줄기세포를 처리하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지 방법 및 배양방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 및 항산화제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 소분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 조성물로 역분화 줄기세포를 처리하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 조성물로 역분화 줄기세포를 처리하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 소분자 화합물을 포함하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물은 역분화 줄기세포 제작시 역분화의 속도와 효율을 높이고, 염색체의 구조적, 수적 돌연변이 억제 또는 DNA 손상 억제 효과가 우수함으로, 염색체 안정성이 우수한 역분화 줄기세포 치료제 개발에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1a는 역분화 줄기세포 제작방법에 있어 전체적인 실험 계획을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 1b는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 처리한 경우 및 조성물을 처리하지 않은 경우에 전형적인 형태의 역분화 줄기세포가 형성된 사진이다.
- 도 1c는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 처리하지 않은 역분화 줄기세포 및 조성물을 처리한 역분화 줄기세포의 제작 효율과 속도를 비교하여 분석한 그래프이다.
- 도 2a 및 2b는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포 및 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포의 만능성 유전자 및 단백질의 발현을 RT-PCR과 형광염색을 사용하여 비교 분석한 사진이다.
- 도 3a는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포 및 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포의 삼배엽성 분화 능력을 세포를 분화시킨 후 형광염색을 통하여 보여준 사진이다.
- 도 3b는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포 및 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포의 생체 내에서 분화능력을 면역결핍 마우스를 이용한 기형종(테라토마) 형성 실험을 통하여 종양을 형성시킨 후 조직학적 검사를 통해 삼배엽성 분화 능력을 확인한 사진이다.
- 도 4a는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포를 지지세포 없이 배양하였을 때 의도하지 않은 분화를 일으키지 않고 더 안정적으로 유지될 수 있다는 것을 확인한 사진이다.

도 4b 및 4c는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포의 증식능력 및 만능성 유전자의 발현 정도가 증가한 것을 세포수 측정과 PCR을 통하여 확인한 그래프이다.

도 5a ~ 도 5d는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포 및 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포의 형광염색을 통한 세포수 측정, 면역결핍 마우스의 생체 내에서 형성되는 종양의 크기를 비교, EB(embryonic body)를 형성하는 능력을 비교하여 분화능력이 향상되는 것을 확인한 것이다.

도 6a는 소분자 화합물을 포함하는 조성물로 장기간 배양한 역분화 줄기세포(miPSC(+)), 역분화를 유도시킨 후 초기배양 단계에 조성물을 첨가한 뒤 계대배양 과정에서 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(±)) 및 조성물을 전혀 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(-))에서 염색체의 이상이 발생한 빈도를 비교하여 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 염색체의 구조적 이상을 방지한다는 것을 확인한 도표이다.

도 6b 및 6c는 소분자 화합물을 포함하는 조성물로 장기간 배양한 역분화 줄기세포(miPSC(+)), 역분화를 유도시킨 후 초기배양 단계에 조성물을 첨가한 뒤 계대배양 과정에서 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(±)) 및 조성물을 전혀 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(-))에서 염색체의 수적 이상 및 구조적 이상을 나타낸 대표핵형을 분석하여 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 염색체의 수적 이상 및 구조적 이상을 방지한다는 것을 확인한 결과이다.

도 6d는 소분자 화합물을 포함하는 조성물로 장기간 배양한 역분화 줄기세포(miPSC(+)), 역분화를 유도시킨 후 초기배양 단계에 조성물을 첨가한 뒤 계대배양 과정에서 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(±)) 및 조성물을 전혀 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(-))에서 전체핵형을 비교 분석하여 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 염색체의 이상을 방지한다는 것을 확인한 결과이다.

도 7a 및 7b는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용하여 제작한 역분화 줄기세포(miPSC(+))의 p1 및 p30와 조성물을 전혀 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(-))의 p1 및 p30에서 DNA 손상정도의 마커인 γH2AX단백질을 분석하여 DNA 손상 방지를 비교한 결과이다.

도 7c 및 7d는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용하여 제작한 역분화 줄기세포(miPSC(+)) 및 조성물을 전혀 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(-))의 역분화 유도 후 초기 7일동안 DNA 손상정도의 마커인 γH2AX단백질을 분석하여 배지 조성물이 초기 역분화 단계에서 발생하는 DNA 손상을 방지한다는 것을 확인한 결과이다.

도 7e 및 7f는 본 발명의 모든 소분자 화합물의 조합을 사용한 조건(SPTA), 소분자 화합물 각각을 처리한 조건 및 역분화 효율을 향상시키는 것으로 알려진 다른 소분자 화합물들을 처리한 조건에서 역분화 유도 후 초기 5일째에 DNA 손상정도의 마커인 γH2AX단백질을 검출하여 비교 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 본 발명은 일관점에서, ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 및 항산화제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 소분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서, 상기 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제는 염색체의 안정성을 향상시키는 역할을 하며, Thiazovivin, Y-27632, HA-1077(파수딜), HA-1100(하이드록시파수딜), H-1152, 3-(4-피리딜)-1H-인돌, N-(4-피리딜)-N'-(2,4,6-트리클로로페닐)우레아, 아우로티오글루코즈 및 LY294002 등으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 ROCK 억제제는 Thiazovivin인 것이 가장 바람직하다.

[0020] 본 발명에서, 상기 MEK(mitogen-activated protein kinase) 억제제는 신속한 역분화를 유도하여 염색체 안정성을 향상시키는 역할을 하며, PD0325901 또는 U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene)인 것이 바람직하며, PD0325901인 것이 더욱 바람직하다. 그러나, 이에 한정되지는 않으며, 상기 화합물 외에도 모든 MEK의 대사과정을 억제하거나, 발현을 억제하는 신호전달 억제제가 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명에서, 상기 ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제는 신속한 역분화를 유도하여 염색체 안정성을 향상시키는 역할을 하며, 바람직하게 A-83-01 또는 SB431542이고, 더욱 바람직하게 SB431542이다. 그러나,

이에 한정되지는 않으며, 상기 화합물 외에도 모든 ALK5의 대사과정을 억제하거나, 발현을 억제하는 신호전달 억제제가 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명에서, 상기 항산화제는 그 종류에 있어서 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 비타민E, A, C 등, Oxothiazolidine, N-acetylcysteine, TEMPO, SOD (superoxide dismutase), 글루타치온 과산화효소, 스캐빈저 산소, 과산화수소, 리포옥사이드 라디칼, 히드록시 라디칼, 금속결합단백질, 셀레늄, 환원형 글루타치온, 베타카로틴, flavonoids (플라보노이드), Sesamol (세사몰), Gallic Acid (물식자산 유도체), Ajowan (아요완), Oryzanol (오리자놀), 레스베라트롤, 카테킨, lecithin (레시틴), cephalin (세파린), sulfhydryls (SRH), 구연산, 아스코르빈산, 카탈라아제 (catalase), BHA, BHT, PG, NDGA, hydroquinone, catechol 및 DPPD (N,N-diphenyl-pp-phenylene-diamine)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 L-아스코르브산이다. 특히 L-아스코르브산은 항산화 작용을 통하여 세포의 생존율을 향상시켜 염색체 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0023] 본 발명에서, 상기 항산화제는 그 종류에 있어서 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 비타민E, A, C 등, Oxothiazolidine, N-acetylcysteine, TEMPO, SOD (superoxide dismutase), 글루타치온 과산화효소, 스캐빈저 산소, 과산화수소, 리포옥사이드 라디칼, 히드록시 라디칼, 금속결합단백질, 셀레늄, 환원형 글루타치온, 베타카로틴, flavonoids (플라보노이드), Sesamol (세사몰), Gallic Acid (물식자산 유도체), Ajowan (아요완), Oryzanol (오리자놀), 레스베라트롤, 카테킨, lecithin (레시틴), cephalin (세파린), sulfhydryls (SRH), 구연산, 아스코르빈산, 카탈라아제 (catalase), BHA, BHT, PG, NDGA, hydroquinone, catechol 및 DPPD (N,N-diphenyl-pp-phenylene-diamine)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 L-아스코르브산이다. 특히 L-아스코르브산은 항산화 작용을 통하여 세포의 생존율을 향상시켜 염색체 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물의 소분자 화합물은 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 제품을 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 제품의 사용은 DMSO에 녹여서 배지에 첨가하여 사용하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 첨가하여 사용하였다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 Oct4, Klf4, Sox2 및 cMyc로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 유도되는 만능성 역분화 줄기세포인 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명에 있어서, 염색체의 구조적, 수적 돌연변이 억제 또는 DNA 손상 억제를 통하여 염색체의 안정성을 유지시키는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명의 용어, "만능" 또는 "만능성"은 자연적인 분화를 유도하는 조건하에서 3개의 배엽(내배엽, 중배엽, 및 외배엽) 모두에 속하는 세포 계통과 관련된 특징들을 총괄적으로 나타내는 세포 유형으로 분화될 수 있는 능력을 의미한다. 만능성 줄기세포 또는 역분화 줄기세포는 성체 동물의 조직 다수 또는 모든 조직을 생성할 수 있다. 예컨대, 5-10주령 된 SCID 마우스에서 기형종(teratoma)을 형성할 수 있는 능력에 관한 테스트와 같은, 당업계에서 일반적으로 인정되는 표준 테스트가 세포 군집의 만능성을 증명하는 데 사용될 수 있지만, 만능성 세포를 검출하는 데 각종의 만능성 줄기세포 특이적인 유전자 발현들을 확인하는 것도 사용될 수 있다. 세포 만능성은 배아의 모든 세포를 적절히 형성할 수 있는 완전하게 만능성인 세포, 예컨대, 배아 줄기세포 및 역분화 줄기세포에서부터, 3종류의 배엽층 모두의 세포를 형성할 수 있다. 예를 들어, 생식선 전달 또는 전체 유기체를 생성할 수 있는 능력과 같은, 완전하게 만능성인 세포의 특징들 모두를 나타낼 수는 없는, 불완전하게 또는 부분적으로 만능성인 세포까지의 범위에 이르는 연속체이다. 실시예에서, 본원 어디에서나 논의되는 바와 같은 만능성 유전자 또는 만능성 마커의 발현은 세포의 만능성을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어, "만능성 줄기세포"는 만능성 줄기세포의 특징을 가지는 세포를 말하며, 만능성 역분화 줄기세포, 유도 만능성 줄기세포, 또는 배아 줄기세포 등을 의미하며, 바람직하게는 만능성 역분화 줄기세포이다.

[0029] 본 발명에 있어, "만능성 줄기세포의 특징"이란 만능성 줄기세포를 다른 세포와 구별 지어 주는 세포의 특징을 의미한다. 분화를 유도하는 조건하에서 3종류의 배엽층(내배엽, 중배엽, 및 외배엽) 모두에 해당하는 세포 계통과 관련된 특징들을 총괄적으로 나타내는 세포 유형으로 분화될 수 있는 능력이 만능성 줄기 세포의 특징이 된다. 생쥐 만능성 줄기세포는 SSEA1, Oct4, Klf4, Sox2, Rex1, 및 Nanog등의 마커들 중 적어도 일부, 및 임의로는 그들 모두를 발현한다. 만능성 줄기세포와 관련된 세포 형태 또한 만능성 줄기세포의 특징이 된다.

[0030] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 역분화 속도와 효율을 향상시키는지 확인하기 위하여, 생쥐 꼬리에서 추출한 섬유아세포(tail tip fibroblast)에 역분화 인자(Oct4, Klf4, Sox2, cMyc)를 함유한 레트로바이러스를 이용하여 역분화 줄기세포를 제작하였다. 이때 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 첨가하여 배양한 세포집단(miPSC(+))과 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 없는 조건에서

배양한 세포집단(miPSC(-)) 사이에 역분화 줄기세포의 군집(colony)이 생성되는 시점과 그 숫자를 비교하여 역분화 속도와 효율을 확인하였다. 그 결과, 본 발명에 의해 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 조건에서 역분화의 속도가 향상되었으며, 생성된 역분화 줄기세포의 군집수를 집계한 결과 그 제작 효율도 향상된 것을 확인하였다.

[0031] 본 발명에 따른 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용하여 제작된 역분화 줄기세포는 증식능력과 만능성 유지능력이 배아줄기세포에 더욱 가까워짐을 특징으로 한다. 본 발명의 조성물을 이용한 역분화 줄기세포에서는 의도하지 않은 분화가 거의 없었을 뿐만 아니라, 배아줄기세포에서 발현하는 만능성 유전자(pluripotency gene)인 Nanog, Klf4, Zfp296과 같은 유전자들의 발현 수준이 향상되었음을 확인하였다.

[0032] 또한, 본 발명에 따른 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용하여 제작된 역분화 줄기세포는 분화능력도 배아줄기세포에 더욱 가까워짐을 확인하였고, 신경세포 특이 발현 단백질인 Tuj1으로 외배엽성 분화능력을, 근육세포 특이 발현 단백질인 Desmin으로 중배엽성 분화능력을, 원시간세포 특이 발현 단백질인 AFP로 내배엽성 분화능력을 각각 확인하였다. 최종적으로 기능성 신경세포로의 분화를 유도하는데 있어서도 본 발명의 조성물을 사용한 역분화 줄기세포가 더 높은 효율로 기능성 신경세포를 형성함을 확인하였다.

[0033] 본 발명의 소분자 화합물을 포함하는 조성물은 역분화 줄기세포 제작시의 급격한 세포 상태변화로 인한 세포 염색체의 수적, 구조적 돌연변이를 억제할 수 있는 것을 특징으로 한다. 염색체 핵형분석을 통하여 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포에서는 duplication, deletion, translocation과 같은 다양한 구조적 염색체 변이가 일어났지만, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포에서는 염색체의 구조적 변이가 발견되지 않음을 확인하였다.

[0034] 또한, 본 발명의 소분자 화합물을 포함하는 조성물은 역분화 줄기세포 제작시의 급격한 세포 상태변화로 인한 세포 DNA의 손상을 억제할 수 있는 것을 특징으로 한다. γ H2AX 단백질의 면역 형광염색을 통하여 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포에서는 최대 20%정도의 세포에서 DNA 손상이 일어났지만 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포에서는 정상세포와 유사한 수준인 5% 미만의 세포에서만 DNA 손상이 나타났다. 특히, 본 발명에서 사용한 소분자 화합물은 단독으로 사용할때도 DNA 손상을 억제할 수 있으며, 역분화 효율을 높이는 것으로 알려진 다른 소분자 화합물에서는 이러한 DNA 손상 억제 효과가 나타나지 않았다.

[0035] 상기와 같은 염색체 돌연변이 또는 DNA 손상은 세포의 유지 및 분화 과정의 효율을 떨어뜨리고 비정상적인 분화를 유도하여 암세포로 발전할 수 있는 잠재위험을 가지고 있기 때문에 본 발명의 조성물은 안전한 세포치료를 위한 역분화 줄기세포 제작의 목적에도 부합한다고 할 수 있다.

[0036] 상술한 바를 종합하면, 본 발명에 의한 소분자 화합물을 포함하는 조성물은 역분화 과정의 급격한 세포상태 변화로 인한 세포 염색체의 돌연변이 또는 DNA 손상을 예방할 수 있다. 또한, 체세포의 역분화 과정을 더욱 빠르게 일어나도록 유도하고 역분화의 효율을 향상시키며, 배아줄기세포 특이적으로 발현하는 유전자들의 발현 수준을 향상시킨다. 따라서 본 발명에 의하면, 증식능력 및 분화능력에 있어서 보다 배아줄기세포와 유사한 성질을 가지는 만능성의 역분화 줄기세포를 제공할 수 있다.

[0037] 따라서, 종래 기술에서 역분화 효율을 향상시키는 것만 언급한 것과는 달리 본 발명의 염색체의 안정성도 높일 수 있는 소분자 화합물을 포함하는 조성물은 역분화 줄기세포를 임상기술에 이용할 때 효율증대 효과 이외에도 안전성을 향상시키는 효과가 있으며, 세포치료제의 원료뿐 아니라 염색체 돌연변이 연구용 소재로서 이용가치도 높다 할 것이다.

[0038] 본 발명은 다른 관점에서, ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 및 항산화제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 소분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물로 역분화 줄기세포를 처리하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 체세포의 역분화를 유도하는 초기 단계에 첨가되는 것이 바람직하며, 상기 초기 단계는 Oct4, Klf4, Sox2 및 cMyc로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 도입 후부터 배양하여 콜로니가 형성될 때 까지를 의미하므로, 상기 조성물은 역분화를 유도하는 초기 단계인 유전자 도입 후 4일 이내에 첨가되는 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 조성물은 역분화 유도 후 형성된 역분화 줄기세포를 유지하는 장기 배양 단계에 첨가되는 것이 바람직하다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 MEK 억제제, ALK5 억제제, ROCK 억제제, 항산화제를 각각 사용할 수도

있으며, 바람직하게는 조합하여 사용하는 것이고, 모두 조합하여 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0041] 본 발명은 또 다른 관점에서, ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제 및 항산화제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 소분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 역분화 줄기세포의 염색체 안정성 유지용 조성물로 역분화 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 역분화 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

[0042] 본 발명에 있어서, 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 수행되는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 역분화 줄기세포들이 안정화되면 지지세포 없이 젤라틴만 코팅한 배양접시 위에서도 배양이 가능하다. 지지세포가 없는 조건에서 배양할 경우 본 발명의 조성물을 사용하지 않은 조건에서는 불필요한 분화가 일어나서 세포가 균일한 형태를 나타내기 어려운 반면, 본 발명의 조성물을 사용한 조건에서는 조성물이 불필요한 분화를 억제해주어 보다 안정적이고 효과적인 역분화 줄기세포의 유지가 가능하다.

[0043] 본 발명의 역분화 줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에서 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 DMEM 배지일 수 있다. 또한, 상기 기본 배지에는 10%(v/v)의 horse serum을 포함하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 배양시켰다.

[0044] 본 발명은 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용하여 증식능력과 분화능력에 있어서 보다 배아줄기세포와 유사한 성질을 가지는 역분화 줄기세포의 제작방법을 제공할 수 있다.

[0045] 상술한 바와 같이, 본 발명은 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용하여 역분화 줄기세포의 염색체의 안정성 유지 방법 및 배양하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 역분화 줄기세포의 제작 효율을 향상시키는 소분자 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 새로운 용도에 관한 것으로, 생쥐의 꼬리에서 추출된 섬유아세포(Tail tip fibroblast)에 4개의 역분화 인자(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)를 도입한 뒤 소분자 화합물(ROCK 억제제, MEK 억제제, ALK5 억제제, 항산화제)을 유효성분으로 포함하는 배지 및 조건에서 제작된 역분화 줄기세포주는 빠르고 효율적으로 제작될 뿐만 아니라 염색체의 돌연변이 및 DNA 손상을 억제할 수 있다. 이러한 결과는 향후 임상적응에 이용될 수 있는 안전한 역분화 줄기세포의 제작과 이를 이용한 다양한 기능성 세포로의 분화 후 다양한 질병치료를 위한 세포치료제 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 즉, 본 발명은 다양한 난치성 질환을 치료할 수 있는 세포치료용 줄기세포주의 개발을 위한 원천기술로 유용하게 사용될 수 있다.

[0046] 상기에서는 역분화 줄기세포의 배양을 중심으로 설명하였으나, 본 발명은 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 유효성분으로 하는 만능성 유지 및 염색체 돌연변이 또는 DNA 손상 억제 효과가 있는 조성물로서 공지의 기술을 이용하여 활용할 수 있다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[0047] [실시예]

[0048] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0049] <실시예 1> 역분화 유도를 위한 역분화 인자를 포함하는 레트로바이러스 제작

[0050] 4종류의 역분화 인자 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc의 유전자를 전달할 수 있는 레트로 바이러스를 제작하기 위하여 Addgene 사의 pMXs 벡터 플라스미드를 구매하여 사용하였다. 레트로 바이러스 제작용 세포주인 293GPG 세포를 100mm 세포배양 접시에 80%정도의 밀도로 자라도록 배양하고 invitrogen 사의 Lipofectamin 2000 제품을 이용하여 동봉된 설명서를 참고하여 293GPG 세포에 해당 플라스미드를 도입하였다. 48시간 이후부터 매일 5ml씩 세포 배양액의 상등액으로 분리된 레트로 바이러스를 2주간 모아서 -80℃에서 보관하다 사용하였다. 레트로 바이러스는 2-4 μ g/ml의 polybrene이 함유된 배지와 혼합하여 4~5시간 세포와 배양하는 것으로 세포를 감염시키고 해당 유전자를 세포 내로 전달하였다.

[0051] <실시예 2> 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 이용한 역분화 줄기세포 제작

[0052] 2-1: 소분자 화합물의 조합 및 첨가

[0053] 소분자 화합물을 이용하여 역분화 줄기세포를 제작하는 경우 배지조성물에 MEK 억제제, ALK5 억제제, ROCK 억제제, 항산화제를 첨가하여 세포를 배양하였다. 구체적으로는 소분자 화합물은 MEK 억제제 PD0325901, ALK5 억제제 SB431542, ROCK 억제제 티아조비빈(Thiazovivin), 항산화제 L-아스코르브산을 조합하거나 단독으로 사용하였다. 각각의 소분자 화합물은 stemgent, cayman, sigma와 같은 제조사에서 분말형태로 판매되는 제품을 구매하여 사용하였다. 이때 MEK 억제제 PD0325901는 해당 시약 분말을 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 0.5mM의 농도로 녹여서 1000배 농축액으로 -20℃ 온도에서 보관하였고, ALK5 억제제 SB431542는 해당 시약 분말을 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 2mM의 농도로 녹여서 1000배 농축액으로 -20℃ 온도에서 보관하였다. ROCK 억제제 Thiazovivin은 해당 시약 분말을 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 0.5mM의 농도로 녹여서 1000배 농축액으로 -20℃ 온도에서 보관하였고, 항산화제 L-아스코르브산은 해당 시약 분말을 3차 증류수에 200mM의 농도로 녹여서 1000배 농축액으로 -20℃ 온도에서 보관하였다. 각각의 소분자 화합물은 역분화 줄기세포 제작 또는 유지 배양 시 배양액의 첨가성분으로 이용되었다. 이때 배양액에 포함되는 소분자 화합물의 최종농도는 PD0325901의 경우 0.5 μM, SB431542의 경우 2 μM, Thiazovivin의 경우 0.5 μM, L-아스코르브산의 경우 200 μM로 하였다.

[0054]

[0055] 2-2: 역분화 줄기세포 제작

[0056] 마우스 꼬리에서 추출한 섬유아세포(mouse tail tip fibroblast)에 레트로 바이러스를 이용하여 역분화 인자를 주입하여 역분화 줄기세포를 얻었다. 구체적으로는, passage 2~3 정도의 마우스 섬유아세포를 100mm 세포배양 접시에 50,000개에서 100,000개 정도의 세포를 배양하면서 4종류의 역분화 인자 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc의 플라스미드를 각각 포함하고 있는 레트로 바이러스를 MOI 2이상으로 감염시켰다.

[0057]

바이러스에 감염된 세포들을 이틀 정도 더 배양한 뒤 0.05% Trypsin-EDTA 2-3분 처리하여 single cells로 분리한 후, 0.1% 젤라틴으로 코팅된 6 well 세포 배양 접시에 지지세포를 자라게 한 뒤 그 위에서 배양하였다. 지지세포로는 mitomycin으로 분열을 억제시킨 마우스 섬유아세포를 이용하였고, 역분화 인자가 도입된 섬유아세포를 마우스 배아줄기세포 배양용 배지에 상기 실시예 2-1의 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 첨가하여 이산화탄소 5%의 조건에서 37℃의 온도로 배양시켰다. 마우스 줄기세포 배양용 기본배지의 조성은 GIBCO사의 DMEM high glucose 배지에 2mM L-글루타민, 10mM 베타-머캅토에탄올, 0.1mM MEM NEAA, 500unit/ml ESGRO(LIF), 10% 말혈청(horse serum), 항생제인 Pen/strep을 첨가하여 이용하였다.

[0058] 2-3: 역분화 줄기세포 배양

[0059] 약 1주일간의 배양 이후, 지지세포 위에 배아줄기세포와 유사한 형태의 역분화 줄기세포 colony가 형성되는 것을 확인하였으며(도 1b), 형성된 역분화 줄기세포의 colony가 배아줄기세포와 유사한 특징을 지니는 세포인지 확인하기 위해 실시한 AP 염색에서 붉은색으로 염색이 되어 양성반응을 나타내는 역분화 줄기세포의 colony를 확인하였다(도 1b). AP 염색을 위해서는 stemgent사의 실험키트와 첨부된 설명서를 이용하여 AP 염색을 실시하였다. 또한 본 발명의 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화의 속도와 효율을 향상시킴을 확인하였다(도 1c).

[0060]

생성된 역분화 줄기세포 colony를 유리 파이펫을 이용하여 물리적으로 떼어내어 새로운 지지세포 위에서 배양하였다. 이 역분화 줄기세포들은 안정화되면 지지세포 없이 젤라틴만 코팅한 배양접시 위에서도 배양이 가능한 것을 확인하였다.

[0061] <실시예 3> RT-PCR과 면역 형광염색을 이용한 역분화 줄기세포의 만능성 확인-제작된 역분화 줄기세포의 검증

[0062]

RT-PCR을 위한 역분화 줄기세포를 0.05% Trypsin-EDTA 2-3분 처리하여 single cells로 분리한 후 원심분리기를 이용하여 그 침전물만 1.5ml 튜브에 옮겨 담아서 RNA를 추출하였다. 세포의 RNA는 TRI reagent를 이용하여 분리하였다. 3μg의 RNA를 역전사 효소와 oligo (dT)를 이용하여 cDNA로 변환하고, 해당 cDNA를 이용하여 각각의 primer를 이용하여 PCR로 증폭시켜서 전기영동을 통하여 해당 유전자의 발현 정도를 조사하였다. PCR을 통하여 제작된 역분화 줄기세포주는 모두 Oct4, Klf4, Sox2, Nanog, Rex1 등의 만능성 유전자를 발현하는 것이 확인되

었다(도 2a). 면역형광염색을 위하여 멀티웰 배양접시에 배양중인 세포를 PBS로 씻어낸 뒤 4% 파라포름알데하이드 용액을 이용하여 상온에서 1시간 또는 4℃에서 하룻밤 동안 고정하였다. 고정된 세포는 0.1% 트리톤-X 용액을 5분간 처리하여 세포막에 구멍을 내었으며, 10% 정상당나귀혈청으로 블로킹을 시킨 뒤 1차 항체와 반응시켰다. 면역형광염색 결과, 모든 역분화 줄기세포주에서 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc, SSEA1 등의 만능성 마커들이 발현되는 것을 확인하였다(도 2b).

[0063] <실시예 4> 역분화 줄기세포의 분화능력 확인-제작된 역분화 줄기세포의 검증

[0064] 4-1: 역분화 줄기세포의 분화

[0065] 제작된 역분화 줄기세포의 분화능력을 확인하기 위하여 모든 세포주들은 Trypsin-EDTA를 처리하여 single cells로 분리한 후 embryonic body(EB) 형성을 유도하였다. 역분화 줄기세포를 embryonic body(EB)로 분화시키기 위하여 역분화 줄기세포의 분화를 억제시켜 주는 LIF가 없는 배양조건에서 부유상태로 배양시키는 방법이 이용되었다. 구체적으로는 배양중인 역분화 줄기세포를 PBS를 이용하여 세척한 뒤 0.05% Trypsin-EDTA 2-3분 처리하여 single cell로 분리한 후 GIBCO사의 DMEM high glucose 배지에 2mM L-글루타민, 10mM 베타-머캅토에탄올, 0.1mM MEM NEAA, 10% 우태아혈청(FBS), 항생제인 Pen/strep을 첨가한 배지로 세포가 부착되지 않는 박테리아 배양용 배양접시를 이용하여 부유상태로 4일간 배양하여 부유상태의 EB를 확보하였다.

[0066] 이렇게 확보된 EB는 다시 세포배양용 배양접시에 옮겨져서 부착상태로 배양되었으며, 이때 형성되는 외배엽성, 내배엽성, 중배엽성의 분화된 세포들을 면역형광염색을 통하여 확인하였다. 면역형광염색 결과, 제작된 모든 역분화 줄기세포주는 정상적인 분화능력을 지녔으며 삼배엽성 분화가 모두 가능한 세포임이 확인되었다(도 3a).

[0067] 4-2: 기형종 생성

[0068] 역분화 줄기세포의 생체 내 분화능력을 확인하기 위해서는 면역결핍 마우스를 이용한 기형종 생성법이 이용되었다. 즉, 역분화 줄기세포의 이식을 통하여 기형종이 생성되는지를 확인하기 위하여 면역결핍 SCID 마우스(BALB/c nu)의 피하에 역분화 줄기세포를 이식하는 방법이 이용되었다. 구체적으로는 배양중인 역분화 줄기세포를 PBS를 이용하여 세척한 뒤 Trypsin-EDTA를 이용하여 single cell로 분리한 후, 1,000,000개의 세포를 0.1ml의 배양액으로 희석하여 BD Matrigel matrix 0.1ml과 균등하게 혼합한 뒤 5~10주령 사이의 SCID 마우스의 옆구리 피하에 주사하여 이식하였다. 주사한 뒤 8~10주가량 마우스를 사육하며 기형종의 형성 유무를 관찰하고, 생성된 기형종을 적출하여 H&E 염색을 이용한 조직학적 분석법을 통해 삼배엽성의 분화를 현미경으로 확인하였다. 기형종의 조직학적 분석결과, 모든 역분화 줄기세포주는 정상적으로 기형종을 생성하였고 종양 내부에서 외배엽, 내배엽, 중배엽에 해당하는 구조가 모두 발견되었다(도 3b).

[0069] <실시예 5> 소분자 화합물을 포함하는 조성물에 의한 역분화 줄기세포의 안정적인 유지 효과 확인

[0070] 실시예 2에서 제작되고 배양된 역분화 줄기세포에서 소분자 화합물을 포함하는 조성물의 영향을 확인하기 위하여 형태적인 분석, 증식속도 분석, 유전자 발현 정도의 분석이 이루어졌다. 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 형태와 육안적 변화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포(miPSC(-))와, 조성물을 사용하여 제작된 역분화 줄기세포(miPSC(+))를 지지세포가 있는 조건과 없는 조건에서 서로 비교하였다.

[0071] 지지세포가 있는 조건에서는 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용하지 않아도 세포의 형태와 특성을 유지하는데 크게 문제가 없었지만, 지지세포가 없는 조건에서 배양할 경우, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용하지 않은 조건에서는 불필요한 분화가 일어나서 세포가 균일한 형태를 나타내기 어려웠다. 반면, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 조건에서는 조성물이 불필요한 분화를 억제해주어 보다 안정적이고 효과적인 역분화 줄기세포의 유지가 가능함을 확인하였다(도 4a).

[0072] 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 증식속도에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포와 조성물을 사용하여 제작된 역분화 줄기세포의 증식 정도를 비교하였다. 동일한 숫자의 세포를 동일한 시간 동안 배양하여 세포수를 측정하여 비교한 결과, 1회 분열하는데 필요한 시간은 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 처리한 역분화 줄기세포가 더 짧은 것으로 나타났으며 이는 배아줄기세

포와 거의 유사한 결과를 보였다(도 4b).

[0073] 마지막으로 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 유지과정에서 만능성 유전자의 발현 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시예 2에서 확인한 만능성 유전자의 발현을 정량적으로 분석하였다. 그 결과, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포주는 대부분의 만능성 유전자의 발현 정도가 미미하게 더 높다는 것을 확인하였다(도 4c).

[0074] **<실시예 6> 소분자 화합물을 포함하는 조성물에 의한 역분화 줄기세포의 분화능력 향상 효과 확인**

[0075] 실시예 2에서 제작되고 배양된 역분화 줄기세포의 분화 과정 중에 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 분화능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 상기 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포와 조성물을 사용하여 제작된 역분화 줄기세포 사이에 삼배엽성 분화의 효율과, 생성된 기형종의 크기, 및 EB의 형성 효율을 각각 비교하였다.

[0076] 외배엽, 내배엽, 중배엽으로 분화된 세포를 면역형광염색으로 확인하면서 각각의 마커를 발현하는 세포의 숫자를 측정하여 삼배엽성 분화의 효율을 측정하였다. 그 결과, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 세포주가 그렇지 않은 세포주와 비교했을 때 외배엽성 분화의 효율이 뛰어난 것을 확인하였다. 이로써, 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 분화능력을 향상시킴을 확인하였다(도 5a 및 5b).

[0077] 생체 내에서 생성된 기형종의 크기를 비교한 결과, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용하지 않은 세포주로부터 생성된 기형종은 그 크기가 작은 반면, 상기 조성물을 사용한 세포주로부터 생성된 기형종의 크기는 배아 줄기세포에서 생성된 기형종과 그 크기가 유사함을 확인하였고, 본 발명의 조성물이 생체 내에서의 분화력도 향상시킴을 확인하였다(도 5c).

[0078] 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포와 상기 조성물을 사용하여 제작한 역분화 줄기세포로부터 형성된 EB의 숫자를 측정하여 비교한 결과, 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 EB의 형성 효율도 향상시킴을 확인하였다(도 5d).

[0079] **<실시예 7> 소분자 화합물을 포함하는 조성물에 의한 역분화 줄기세포의 염색체 돌연변이 억제 효과 확인**

[0080] 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포 유도과정과, 그 후 초기 배양과정, 장기간 유지 배양과정 중에도 유전적 안정성을 향상시키는지 알아보기 위하여, 상기 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포와 조성물을 사용한 역분화 줄기세포의 핵형분석을 통하여 염색체 돌연변이 유무와 빈도를 조사하였다. 모든 세포는 자연적으로 돌연변이가 생길 수 있을 정도로 장기간 배양되었으며 일반적인 핵형분석의 과정을 통해 염색체를 분석하였다.

[0081] 소분자 화합물을 포함하는 조성물의 효과를 확인하기 위하여, 조성물을 사용하지 않은 세포주와 조성물을 사용하여 제작한 세포주를 비교하였다. 그 결과, 상기 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포에서는 염색체의 구조적, 수적 돌연변이가 일어난 반면, 상기 조성물을 사용한 역분화 줄기세포주에서는 염색체상의 돌연변이는 일어나지 않은 것을 확인하였다. 또한, 상기 조성물을 이용하여 역분화를 유도하는 초기 배양 단계 이후 장기배양 과정에서는 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포주의 경우(miPSC(±)) 염색체의 구조적인 돌연변이는 발생하지 않았지만 염색체 숫자에 돌연변이가 발생한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포의 염색체의 돌연변이를 억제할 수 있다는 것을 확인하였고, 역분화 유도과정과 초기 단계의 배양뿐 아니라 그 이후의 장기간 세포를 유지 배양하는 단계에 발생할 수 있는 돌연변이에 대해서도 그 억제력이 유효함을 확인하였다(도 6a ~ 도 6d).

[0082] **<실시예 8> 소분자 화합물을 포함하는 조성물에 의한 DNA 손상 억제 효과 확인**

[0083] 소분자 화합물을 포함하는 조성물이 역분화 줄기세포 유도과정과, 그 후 초기 배양과정, 장기간 유지 배양과정 중에도 유전적 안정성을 향상시키는지 알아보기 위한 또 다른 분석으로 DNA 손상 정도를 분석하였다.

[0084] 역분화를 일으키기 전의 섬유아세포와 생쥐 배아줄기세포를 기준으로, 상기 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포주의 초기계대배양(-, p1) 세포, 장기계대배양(-, p30) 세포와 조성물을 사용한 역분화 줄기세포주의 초

기계대배양(+, p1) 세포, 장기계대배양(+, p30) 세포 사이에 DNA 손상 정도 차이를 조사하였다. DNA가 손상되면 생성되는 γ H2AX 단백질의 존재 유무를 통하여 DNA 손상 정도를 확인하였으며, 해당 단백질은 면역형광염색법으로 녹색 형광으로 표지된 항체를 이용하여 염색하고 분석하였다(도 7a).

[0085]

소분자 화합물을 포함하는 조성물의 효과를 보다 자세히 분석하기 위하여, 상기 조성물을 사용하지 않은 세포주와 조성물을 사용하여 제작한 세포주 사이에 γ H2AX 단백질의 발생 비율을 분석하였다.

[0086]

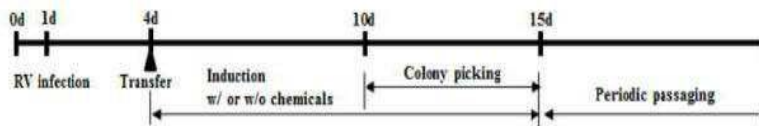
그 결과, 조성물을 사용하지 않은 역분화 줄기세포에서는 초기계대배양(p1)에서 약 13%, 장기계대배양(p30)에서 약 5% 정도의 세포가 DNA 손상을 일으킨 반면, 소분자 화합물을 포함하는 조성물을 사용한 역분화 줄기세포주에서는 초기계대배양(p1)에서 약 5%, 장기계대배양(p30)에서 1% 미만의 세포만 DNA 손상을 일으킨 것을 확인하였다. 이는 역분화 과정 동안 또는 역분화 후 장기배양 동안 소분자 화합물을 사용하게 되면 역분화를 일으키기 전의 정상 섬유아세포 또는 정상 배아줄기세포와 유사한 수준의 DNA 상태를 보여줌으로써, 본 발명의 조성물이 역분화 줄기세포의 DNA 손상을 정상세포와 유사한 수준으로 억제할 수 있다는 것을 나타낸다(도 7b).

[0087]

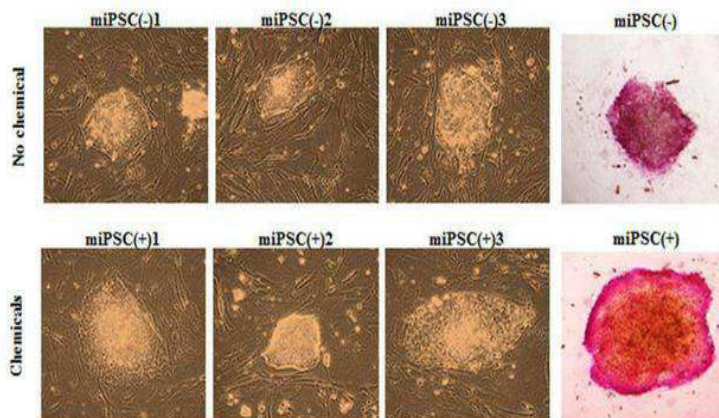
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

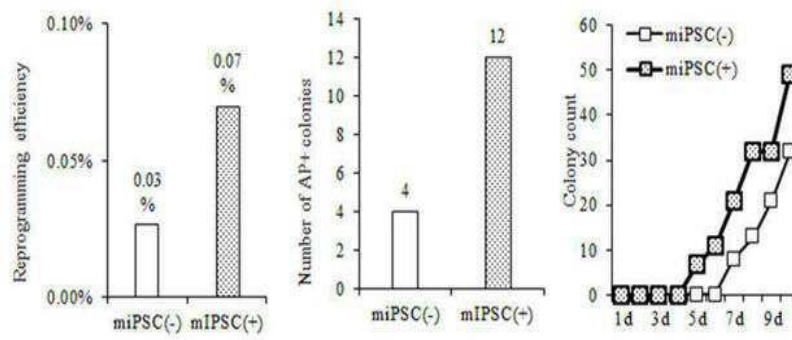
도면1a



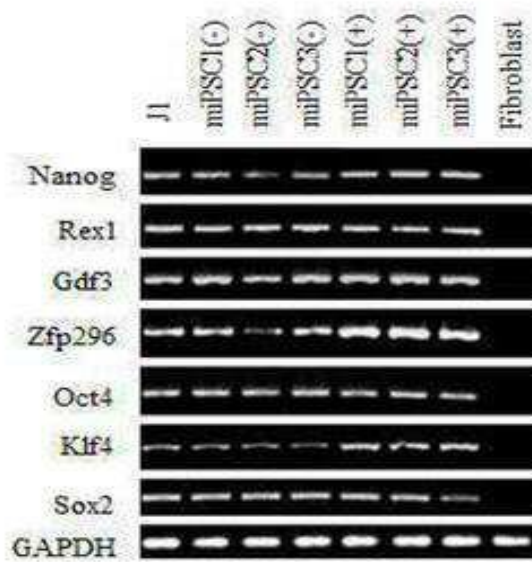
도면1b



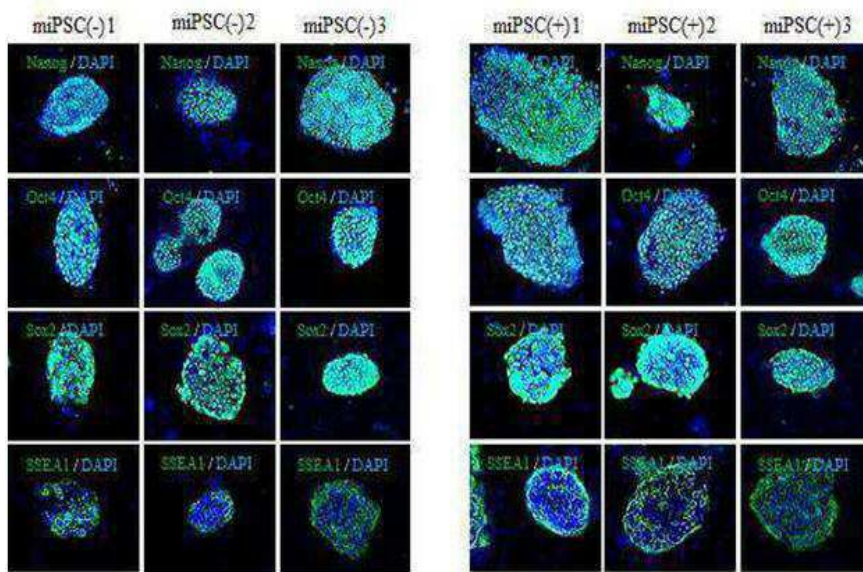
도면1c



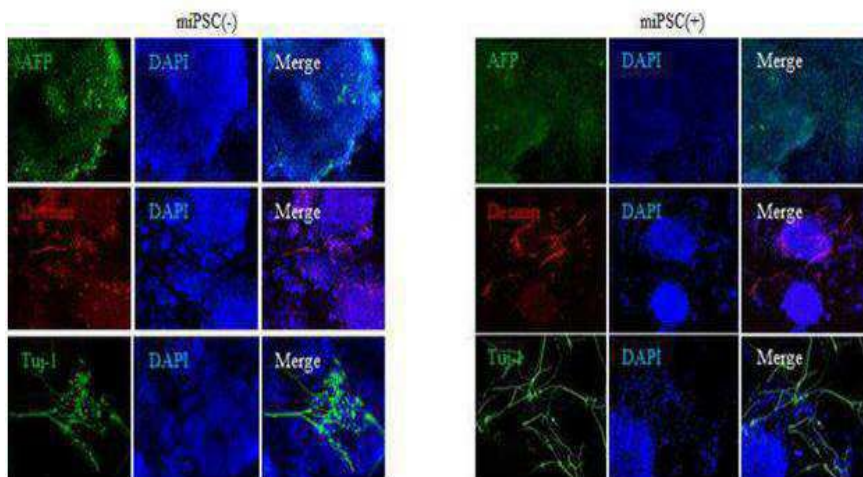
도면2a



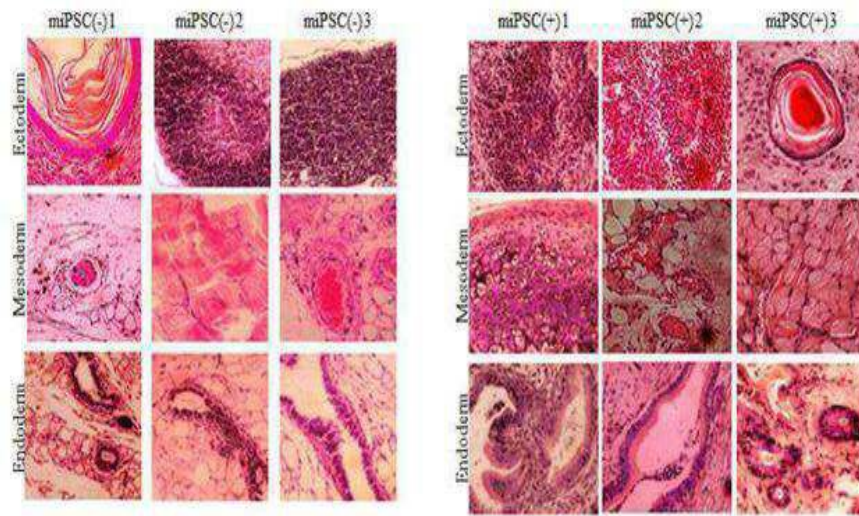
도면2b



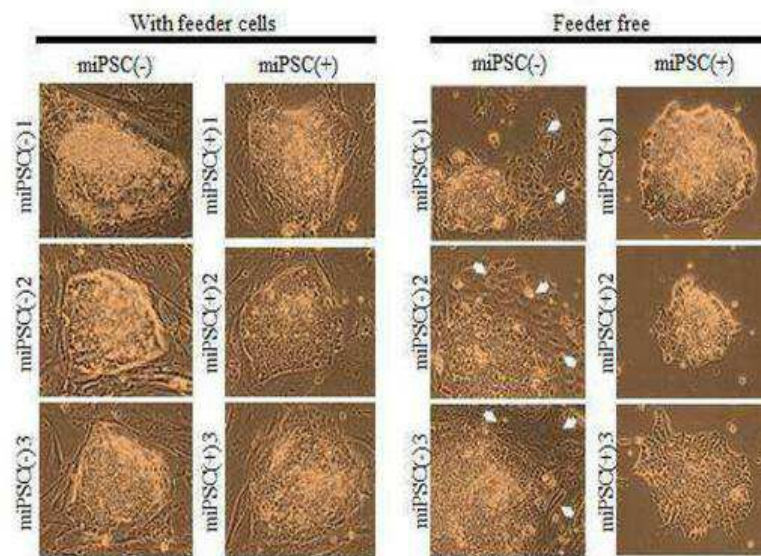
도면3a



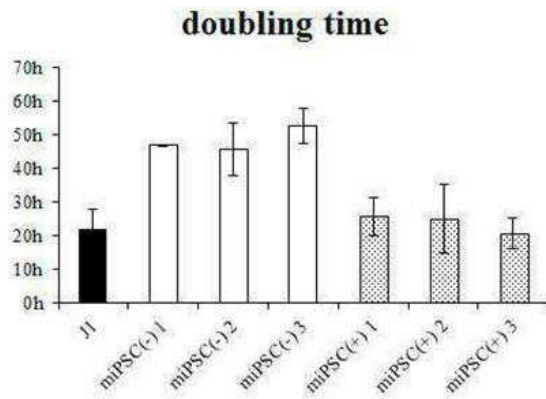
도면3b



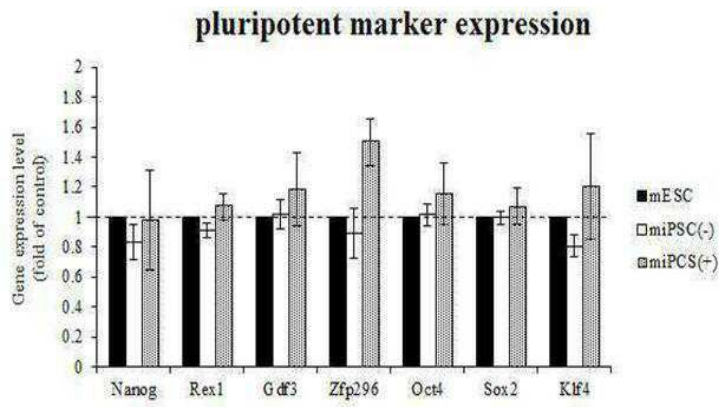
도면4a



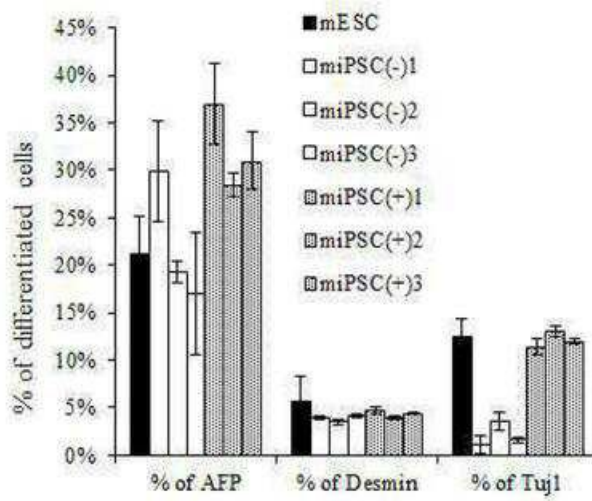
도면4b



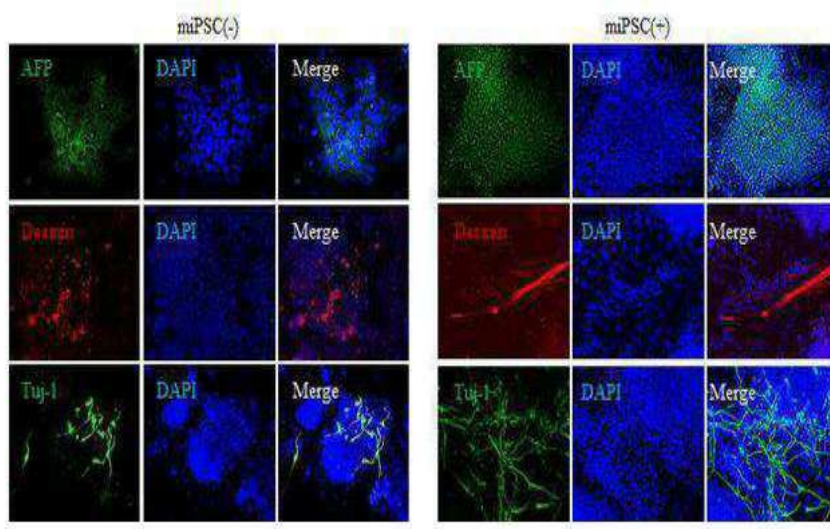
도면4c



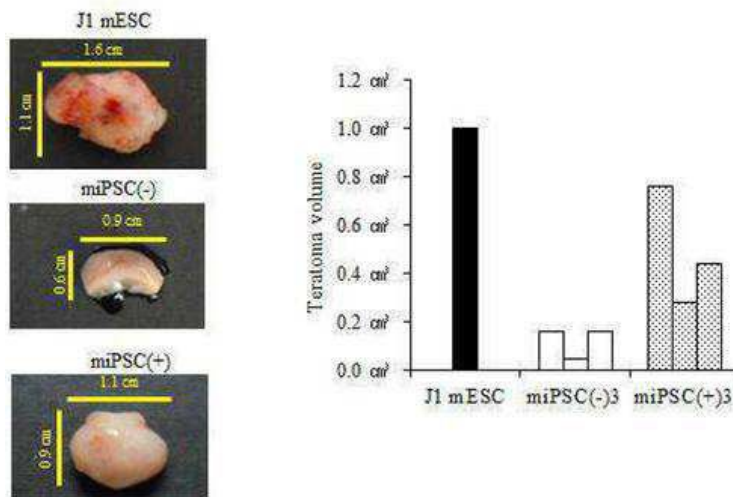
도면5a



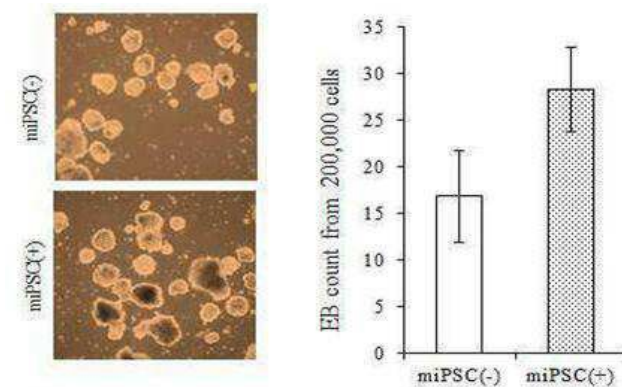
도면5b



도면5c



도면5d



도면6a

Table 1. The chromosomal mutation observed in 60 analyzed cells in chemical free and chemical treated mouse iPSCs

	chromosome																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	
miPSC(-)																					20	
loss of 1 copy																					20	
gain of 1 copy		1						6		1	1			4								
deletion														20								
duplication						22																
translocation																		20	20			
miPSC(±)																						
loss of 1 copy																					38	
gain of 1 copy								20		33												
deletion																						
duplication																						
translocation																						
miPSC(+)																						
loss of 1 copy																						
gain of 1 copy																						
deletion																						
duplication																						
translocation																						

도면6b

Table 2. The chromosomal aneuploidy mutation observed in chemical free and chemical treated mouse iPSC lines

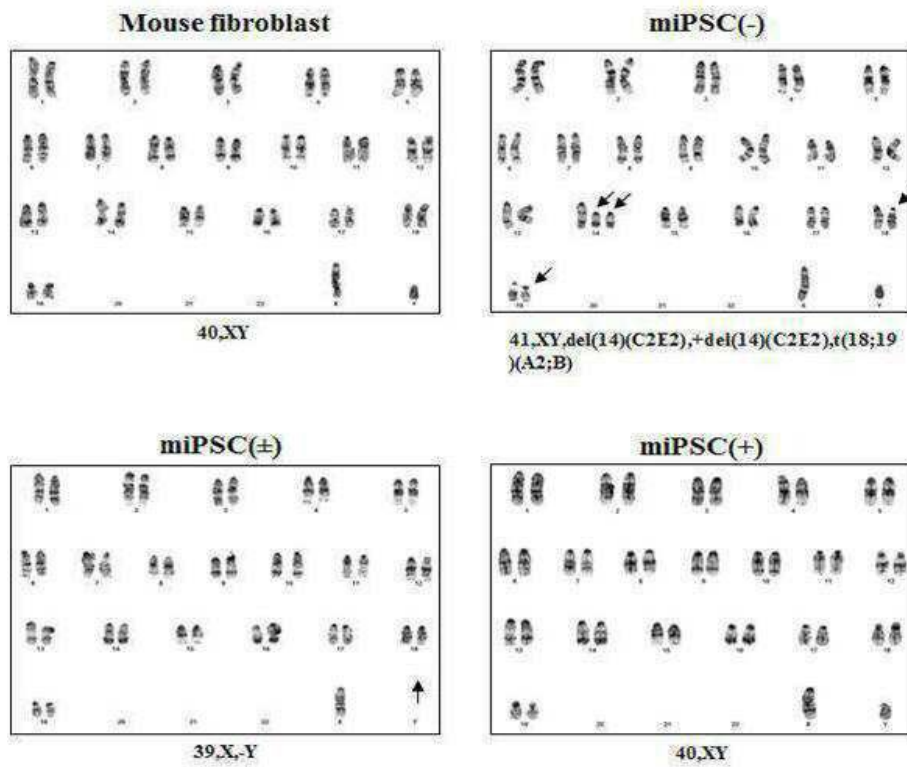
	Ch.2	Ch.8	Ch.10	Ch.11	Ch.14	Ch.Y	Mutation
miPSC(-)	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Loss of 1 copy	O
miPSC(±)	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Loss of 1 copy	O
miPSC(+)	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Gain of 1 copy	 Loss of 1 copy	X

도면6c

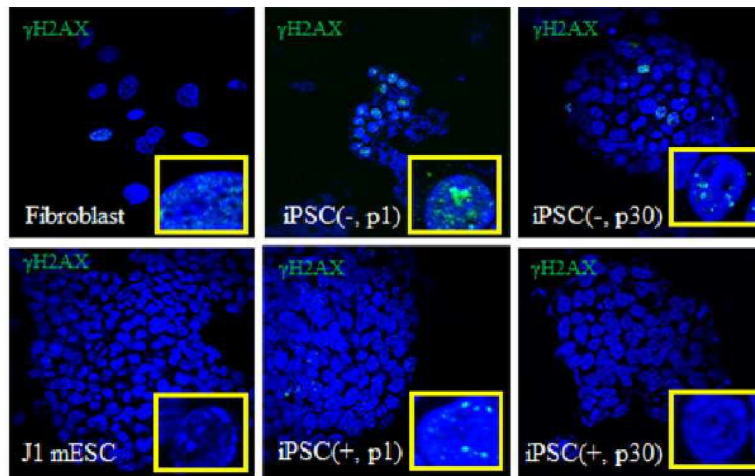
Table 3. The chromosomal structure mutation observed in chemical free and chemical treated mouse iPSC lines

	Ch.6	Ch.14	Ch.18	Ch.19	Mutation
miPSC(-)	 Duplication	 Deletion	 t(18;19)	 t(18;19)	O
miPSC(±)	 6	 14	 18	 19	X
miPSC(+)	 6	 14	 18	 19	X

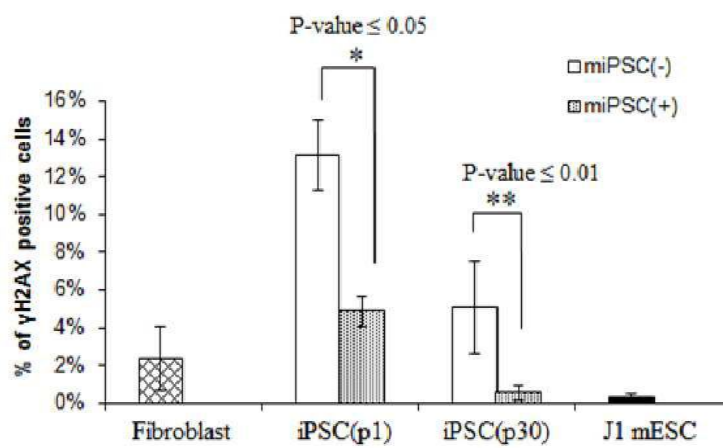
도면6d



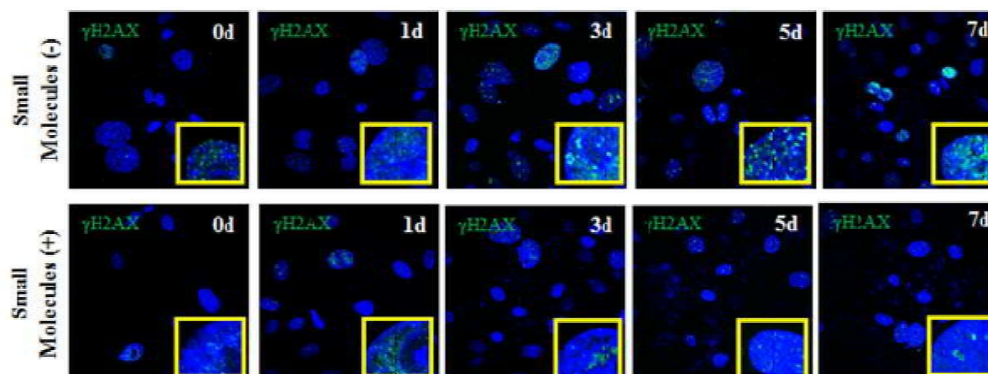
도면7a



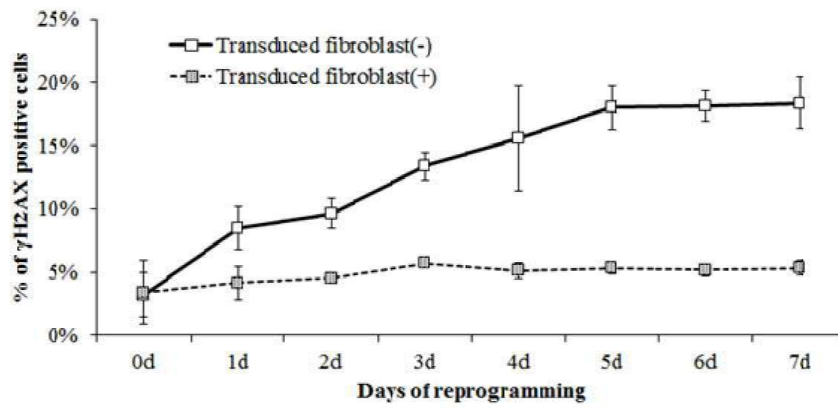
도면7b



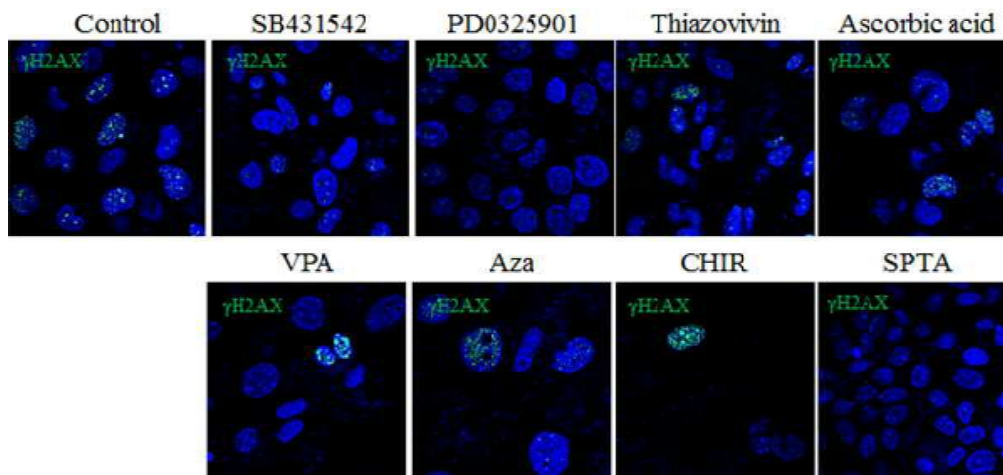
도면7c



도면7d



도면7e



도면7f

