(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0047545
(43) 공개일자 2014년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C07D 311/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0121029
(22) 출원일자 2013년10월11일
심사청구일자 2013년10월11일
(30) 우선권주장
1020120113636 2012년10월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
차혁진
서울 강남구 선릉로130길 19, 101동 106호 (삼성동, 서광아파트)
(74) 대리인
양부현

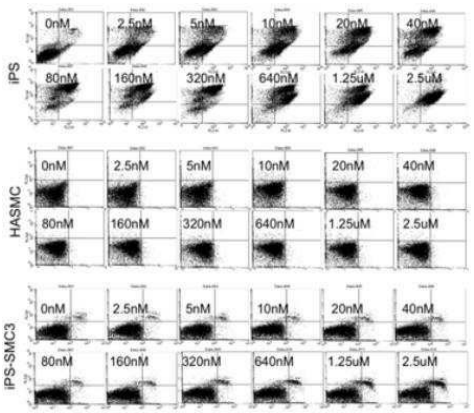
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **미분화 인간 유도만능줄기세포의 선택적 세포사멸 유도를 통한 테라토마 형성 억제 방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료를 준비(preparation)하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 다음 화학식 1의 쿠어세틴(Quercetin) 또는 다음 화학식 2의 YM-155을 처리하여 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계를 포함하며, 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 유도만능줄기세포로부터 특정 분화세포로 분화시킨 후, 쿠어세틴 또는 YM-155을 포함하는 분화용 배지에서 배양함으로써, 미분화된 유도만능줄기세포만을 효과적으로 선택적 사멸시킬 수 있으며, 본 발명에 따른 유도만능줄기세포 분화방법은 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화된 유도만능줄기세포만을 선택적 사멸하여 분화된 분화세포에는 전혀 영향을 미치지 않는다. 즉, 분화세포의 생존능 및 기능은 그대로 유지시키므로, 임상에 있어 세포 치료제로의 적용 시 종양 형성 가능성을 배제함으로써 안전성 확보가 기대된다.

대 표 도 - 도6a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0030043
부처명	미래창조과학부
연구사업명	기초연구사업-선도연구센터육성사업(이공학분야)-유전체 불안정성 제어연구센터
연구과제명	줄기세포 유전체 안정성 유지 신호 연구
기 여 율	1/2
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.07 ~ 2018.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0006835
부처명	교육부
연구사업명	일반연구자지원사업-기본연구지원사업
연구과제명	스트레스 환경에서의 뇌신경 줄기세포의 노화 기전 연구
기 여 율	1/2
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

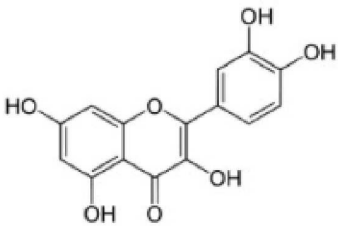
청구항 1

다음 단계를 포함하며, 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법:

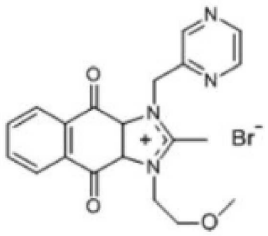
(a) 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료를 준비(preparation)하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 결과물에 다음 화학식 1의 쿠어세틴(Quercetin) 또는 화학식 2의 YM-155을 처리하여 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계.

화학식 1



화학식 2



청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포는 인간, 소, 말, 염소, 양, 개, 고양이, 마우스, 래트 또는 조류로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 쿠어세틴 및 YM-155의 농도는 각각 20-100 μM 및 2.5-80 nM 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

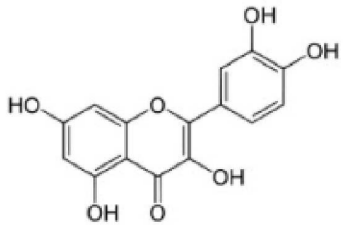
상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 미분화 유도만능줄기세포가 제거된 세포 조성물.

청구항 5

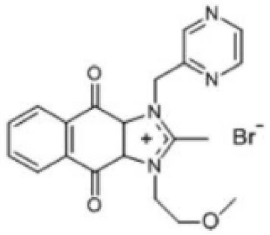
다음 화학식 1의 쿠어세틴(Quercetin) 또는 화학식 2의 YM-155를 포함하는 미분화 유도만능줄기세포의 선택적

사멸용 조성물.

화학식 1



화학식 2



명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미분화 인간 유도만능줄기세포의 선택적 세포사멸 유도를 통한 테라토마 형성 억제법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간 유도만능줄기세포는, 인간 몸을 구성하는 삼배엽성(내배엽, 중배엽, 외배엽)으로 분화될 수 있는 전분화능(Pluripotency)을 가지며 끊임없이 분열을 거듭하는 특성(self-renewal)을 가지는 세포로서, 재생의학(regenerative medicine)에 필요한 세포들, 예를 들어, 신경세포, 간세포, 혈액세포 등으로의 분화와 관련하여 다양한 연구가 진행되고 있다. 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 세포를 얻기 위해서는, 인간 유도만능 줄기세포를 특정 세포로 분화를 유도하고, 분화된 세포의 특정 표지 인자(surface makers)의 항체를 이용하여 인지된 세포를 유세포 분리기(Fluorescent Activated Cells Sorter : FACS)를 통해 분리하여 분화된 세포만을 얻거나(Fukuda, H 등, "Fluorescence-Activated Cell Sorting-Based Purification of Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors Averts Tumor Formation After Transplantation" Stem Cells(2006)(24.3: 763-771)), 또는 항체를 이용하여 표지시킨 후 자성을 이용한 분리법(Magnetic Cell sorting: MACS)이 사용되고 있다(David, R 등, "Magnetic Cell Sorting Purification of Differentiated Embryonic Stem Cells Stably Expressing Truncated Human Cd4 as Surface Marker" Stem Cells(2005)(23.4: 77-82)). 자성을 이용한 분리법(MACS)은 유세포 분리기를 이용할 경우 시행되는 레이져에 대한 세포의 노출의 위험을 제거할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

[0003] 그러나, FACS 및 MACS 방법 모두 미분화된 유도만능 줄기세포의 혼재 가능성을 배제할 수 없기 때문에, 100%의 순도로 분화된 세포만을 분리하는 것은 기술적인 한계가 있다. 특히, 유도만능 줄기세포에서 유래한 분화세포에서 미분화세포가 혼재되어 있을 가능성이 존재하여, 유도만능 줄기세포를 이용한 세포치료제 개발에 있어서 테라토마라는 미분화 만능 줄기세포에서 유래한 종양형성 위험에 대한 문제점이 끊임없이 대두되고 있는 실정이다. 따라서, 분화된 세포에는 영향이 없이, 테라토마의 위험성이 내재된 미분화 세포를 선택적으로 제거하는 기술의 개발이 당 업계에 요구되고 있다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명

의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 순수하게 얻을 수 있는 방법, 특히 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화 유도만능 줄기세포의 종양 형성 가능성을 제거하여 분화된 세포만을 순수하게 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 발현을 억제하는 쿠어세틴(Quercetin) 또는 YM-155를 처리하면, 분화된 세포에는 전혀 영향을 미치지 않으면서 미분화 유도만능줄기세포만이 효과적으로 선택적 사멸된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된 세포 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 미분화 유도만능줄기세포의 선택적 사멸용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하며, 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법을 제공한다:

[0011] (a) 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료를 준비(preparation)하는 단계; 및

[0012] (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 쿠어세틴(Quercetin) 또는 YM-155을 처리하여 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계.

[0013] 본 발명자들은 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 순수하게 얻을 수 있는 방법, 특히 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화 유도만능 줄기세포의 종양 형성 가능성을 제거하여 분화된 세포만을 순수하게 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 발현을 억제하는 쿠어세틴(Quercetin) 또는 YM-155를 처리하면, 분화된 세포에는 전혀 영향을 미치지 않으면서 미분화 유도만능줄기세포만이 효과적으로 선택적 사멸된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 본 발명의 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0015] 단계 (a): 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료 준비(preparation)

[0016] 본 발명에 따르면, 우선 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화 세포를 포함하는 세포시료를 준비한다.

[0017] 상기 세포시료는 다양하게 준비될 수 있다. 예를 들어, 유도만능줄기세포를 분화시킨(예컨대, 평활근 세포로 분화) 결과물이 상기 세포시료이다. 유도만능줄기세포를 분화시킨 결과물에는 일반적으로 모든 세포들이 분화

세포를 포함하지 않으며, 미분화 유도만능줄기세포가 소량 잔존 해 있는 비균질 파퓰레이션을 이룬다. 따라서, 분화시킨 결과물을 세포 치료제로 이용하기 위해서는 미분화 유도만능줄기세포의 완전한 제거가 필요하다.

[0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 “유도만능줄기세포”는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 특정 유전자를 삽입하여 인위적으로 유래된 전분화능 줄기세포이다. 상기 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성, 테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일하다고 여겨진다.

[0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 “분화세포”는 줄기세포가 특정 분화 자극에 의해 특정 세포로 분화가 진행된 세포이다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 유도만능줄기세포는 인간, 소, 말, 염소, 양, 개, 고양이, 마우스, 래트 또는 조류로부터 유래된 것이고, 바람직하게는 인간 유도만능줄기세포이다.

[0021] 상기 유도만능줄기세포는 분화된 세포를 3 종 또는 4 종의 유전자를 도입시켜 배아줄기세포의 전분화성을 유도한 전능 세포를 의미하며, 이러한 유도만능줄기세포는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 용이하게 구축될 수 있다(Takahashi K, Yamanaka S (August 2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* 126(4):66376). 예를 들어, 마이토마이신-C를 처리하여 증식을 억제시킨 생쥐 배아 섬유아세포(MEF)가 지지세포로서 포함되고, 소태아혈청(FBS), β-머캅토에탄올 및 비-필수 아미노산이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 같은 적절한 배지에서 배양한 후, 혈청대체물, β-머캅토에탄올, 비-필수 아미노산 및 bFGF2로 보충된 Knockout-DMEM에서 계대배양하여 유도만능 줄기세포를 얻을 수 있다. 알려진 유도만능줄기세포주로서 예컨대, SES-8 (Tae-Hee Lee 등, “Functional Recapitulation of Smooth Muscle Cells Via Induced Pluripotent Stem Cells From Human Aortic Smooth Muscle Cells” Circulation Research(2010) (106:120-128)) 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 방법에서 이용되는 유도만능줄기세포는 유래되는 대상에 대하여 자가(autologous)이거나 또는 타가(allogenic)일 수 있으나, 바람직하게는 자가이다. 자가 유도만능줄기세포는 객체 자신의 조직으로부터 유도만능줄기세포를 분리 및 배양하여 제조된다.

[0023] 본 발명의 방법에 있어서, 쿠어세틴 또는 YM-155가 처리되는 세포시료는 유도만능줄기세포를 분화시켜 얻은 어떠한 결과물도 포함한다.

[0024] 예를 들어, 유도만능줄기세포를 특정 세포로 분화시켜 얻은 세포 파퓰레이션 및 유도만능줄기세포로부터 유래된 배상체(embryoid body)를 분화시켜 얻은 세포 파퓰레이션 등을 본 발명에서 이용할 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 “배상체(embryoid body)”는 배아 줄기 세포가 자연 분화되어 형성되는 세포 덩어리로, 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 3가지 배아 배엽층(three germ layer)으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포 집합체를 의미하며, 얻어진 배상체는 적당한 배지 상태에서 유지될 수 있다. 유도만능줄기세포로부터 배상체를 형성하는 방법은 당업계에 알려진 다양한 방법을 통해 실시할 수 있다. 예를 들어, Kim J 등, "Effective Isolation and Culture of Endothelial Cells in Embryoid Body Differentiated from Human Embryonic Stem Cells" Stem cell and Development(2007)(16:269-280)에 개시된 방법에 따라 유도만능줄기세포를 혈청(또는 혈청 대체물), L-글루타민, 비필수 아미노산, 및 β-머캅토에탄올을 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양함으로써, 배상체를 형성할 수 있다. 또한, 유도만능줄기세포의 콜로니를 공배양된 주변 지지세포(MEF)로부터 분리하여, bFGF2가 첨가되지 않은 배양액, 즉, 혈청대체물, β-머캅토에탄올, 비-필수 아미노산 및 bFGF2로 보충된 Knockout-DMEM 중에서 부유 배양함으로써 배상체를 형성할 수 있다.

[0026] 본 발명의 방법에 있어서, 얻고자 하는 세포의 종류에 따라 다양한 조성의 기질 세포를 배지에 함유할 수 있으며, 상기 배상체의 분화방법은 공지의 방법에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어, Cho SW 등 Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia Circulation (2007)(20;116(21):2409-19)에 개시된 바와 같이, 유도만능줄기세포 유래의 배상체를 내피 세포(Endothelial cells)로 분화시키는 경우, 배상체를 적절한 배양용 배지(예를 들어, 10% 소태아혈청(FBS) 및 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM/F12 배지)에서 약 9 일간 부유 배양시킴으로써 얻을 수 있다. 이와 같이 얻은 배상체는 예컨대, 파이펫을 이용하여 물리적인 힘을 가해, 배상체의 중심부를 분리하여 얻을 수 있으며, 이렇게 분리한 인간 배상체의 중심부는 상기 줄기세포

분화용 배지(예컨대, EGM-2)에서 배양될 수 있다. 상기와 같은 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 단계 (b): 상기 단계 (a)의 결과물에 쿠어세틴(Quercetin) 또는 YM-155을 처리하여 미분화된 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계

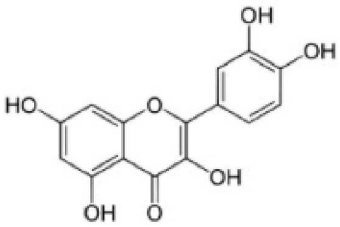
[0028] 이어, 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 제거하기 위하여, 상기 단계 (a)의 결과물에 쿠어세틴(Quercetin) 또는 YM-155을 처리한다. 그 결과, 분화세포에는 전혀 영향을 미치지 않아 분화세포의 생존능 및 기능은 그대로 유지되고, 미분화된 유도만능줄기세포만이 선택적으로 사멸된다.

[0029] 본 명세서에서 미분화 유도만능줄기세포를 언급하면서 사용되는 용어 "제거(depletion or removal)"는 비균질 세포 파퓰레이션으로부터 미분화 유도만능줄기세포가 실질적으로 제거되어 테라토마를 형성하지 않는 것을 의미한다. 예를 들어, 용어 "제거"는 본 발명의 방법이 적용된 시료에서 미분화 유도만능줄기세포의 양이 1% 미만, 바람직하게는 0.5% 미만, 보다 바람직하게는 0.1% 미만, 가장 바람직하게는 실질적으로 없는 것을 의미한다. 상기 용어 "%"는 세포개수(cell count)를 기준으로 한 백분율이다.

[0030] 본 명세서에서 세포 사멸은 특별하게 다르게 언급되지 않는 한, 아폽토시스를 의미한다. 아폽토시스(apoptosis)는 다세포에서 일어나는 프로그램화된 세포사멸(programmed cell death: PCD)이다(Alberts, Bruce et al., (2008). "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". Molecular Biology of the Cell(5th ed.). Garland Science. p. 1115). 아폽토시스의 생화학적 현상은 세포의 형태를 변화시키고 사멸을 이끈다. 이러한 변화는 세포막의 기포형성, 세포 수축, 핵 파쇄, 염색체 응축 및 염색체 DNA 파쇄를 포함한다. 세포괴사와 다르게, 아폽토시스에 의해 생산된 아폽토틱 바디는 세포 밖으로 유출되어 세포를 손상시키기 전에 탐식형 세포(phagocytic cells)가 에워싸서 제거하게 된다.

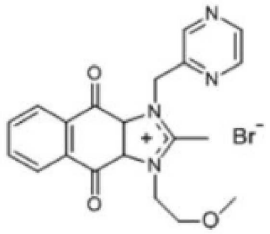
[0031] 본 발명에서 이용되는 쿠어세틴(Quercetin)은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 화학적 억제제이며, 화학명은 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one으로 하기 화학식 1의 구조를 갖는다:

[0032] **화학식 1**

[0033] 

[0034] 본 발명에서 이용되는 YM-155은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 화학적 억제제이며, 화학명은 4,9-Dihydro-1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(2-pyrazinylmethyl)-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide으로, 하기 화학식 2의 구조를 갖는다:

[0035] **화학식 2**

[0036] 

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 처리되는 쿠어세틴의 농도는 20-100 μM이며, 보다 바람직하게는 30-90 μM, 보다 더 바람직하게는 40-80 μM, 가장 바람직하게는 50 μM이다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 YM-155의 농도는 2-80 nM이며, 보다 바람직하게는 5-70 nM, 보다 더 바람직하게는 10-60 nM, 가장 바람직하게는 10-50 nM이다.

[0039] 본 발명의 단계 (b)의 배양 기간은 크게 제한되지 않으나, 바람직하게는 약 5-100 시간, 보다 바람직하게는 약 10-50 시간, 보다 더 바람직하게는 약 15-30 시간, 가장 바람직하게는 약 24 시간이다.

[0040] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의해 미분화 유도만능줄기세포가 제거된 세포 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 조성물은 상기 상술된 본 발명의 방법에 의해 제조된 것이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0042] 상기 본 발명의 방법에 의해 미분화 유도만능줄기세포가 제거된 세포 조성물은 다양한 응용성을 가지며, 특히 세포 치료제로서 이용될 수 있다.

[0043] 예를 들어, 미분화 유도만능줄기세포가 제거된, 근세포로 분화된 결과물인 경우에는 근이양증(muscular dystrophy), 근위축증(muscular atrophy), 근육염(Myositis), 다발성 근육염(polymyositis), 말초혈관 질환(peripheral vascular disease) 및 섬유증(fibrosis)과 같은 근육 손상 질환, 신경근육계 질환, 근육계 관절염, 퇴행성 근육 질환 및 허혈성 근육 질환 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 근육계 질환의 세포치료 요법에 대한 우수한 공급원으로서 역할을 할 수 있다.

[0044] 또한, 예를 들어, 미분화 유도만능줄기세포가 제거된, 신경세포로 분화된 결과물인 경우에는 뇌졸중(stroke), 외상성 뇌손상, 뇌성마비, 간질, 알츠하이머병, 다발성경화증, 파킨슨병, 척추 손상 질환(spinalcord injury disease), 치매, 간성 뇌증 및 저산소증, 탈수초질환, 헌팅톤병, 근위축성 척수측색경화증, 퇴행성 질환 및 허혈성 질환 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 신경계 질환의 세포치료 요법에 대한 우수한 공급원으로서 역할을 할 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 쿠어세틴(Quercetin) 또는 YM-155를 포함하는 미분화 유도만능줄기세포의 선택적 사멸용 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명의 조성물은 상기 본 발명의 방법에 이용하는 쿠어세틴(Quercetin) 또는 상기 YM-155를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0048] (a) 본 발명은 유도만능줄기세포로부터 특정 분화세포로 분화시킨 후, 쿠어세틴 또는 YM-155을 포함하는 분화용 배지에서 배양함으로써, 미분화된 유도만능줄기세포만을 효과적으로 선택적 사멸시킬 수 있다.

[0049] (b) 본 발명에 따른 유도만능줄기세포 분화방법은 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화된 유도만능줄기세포만을 선택적 사멸하여 분화된 분화세포에는 전혀 영향을 미치지 않는다. 즉, 분화세포의 생존능 및 기능은 그대로 유지시키므로, 임상에 있어 세포 치료제로의 적용 시 종양 형성 가능성을 배제함으로써 안전성 확보가 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1a는 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS), HASMC, iPS에서 분화-유래된 평활근 세포 1번(iPS-SMC-1) 및 iPS에서 분화-유래된 평활근 세포 3번(iPS-SMC-3)에 50 μM 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 후, 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포형으로 확인한 현미경 사진이다. 그 결과, 쿠어세틴 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 관찰되었다. 도 1b는 면역 블랏팅법을 이용하여, 도 1a와 같은 방법으로 처리한 세포 용해액의 세포사멸 표지

단백질을 확인한 결과이다. 그 결과, 쿠어세틴 처리시 인간 유도만능줄기세포에서, 세포사멸 시 발생하는 Parp-1의 절단(T형), 카스파아제 3 번 및 9번의 절단형(cleaved 카스파아제)이 발현되었다.

도 2a는 다양한 농도의 쿠어세틴(QC)를 처리하여, 농도 의존적인 유도만능줄기세포의 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포 표현형으로 확인한 현미경 사진이다. 도 2b는 Annexin V 법을 이용하여, 도 2a의 다양한 농도의 쿠어세틴에 의한 iPS 및 HASMC의 세포사멸 정도를 확인한 결과이다. 도 2c는 도 2b에서 얻은 세포사멸 정도를 그래프로 나타낸 결과로서, iPS 및 HASMC의 각 생존세포(live cells)의 비율을 보여준다.

도 3a는 HASMC 및 iPS-SMC3에 50 μM 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 후, 면역형광법을 이용하여 평활근세포에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 α-Smooth muscle actin (α-SMA)의 발현을 확인한 결과이다. 도 3b는 RT-PCR을 이용하여, 도 3a와 같은 방법으로 처리한 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3의 세포 내 α-SMA의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과이다. 도 3c는 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3에 50 μM 의 쿠어세틴 또는 DMSO를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM의 칼륨 용액($75K^+$)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3의 세포내 칼슘 농도를 측정함으로써 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인한 결과이다. 도 3d는 도 3c에서 측정된 내부 칼슘 농도를 그래프로 나타낸 결과이다.

도 4a는 50 μM 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 미분화 유도만능줄기세포를 마우스의 고환에 주입하여, 10 주 후 테라토마 형성능을 대조군과 비교한 결과이다. 도 4b는 도 4a의 테라토마 형성여부를 확인하기 위해, Secretory eipthelium 및 Neural rosette structure를 각각 PAS 염색, H&E 염색한 결과이다.

도 5는 iPS, HASMC 및 iPS-SMC-3에 다양한 농도의 YM-155를 24 시간 처리한 후, 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포형으로 확인한 현미경 사진이다. 그 결과, YM-155 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 농도 의존적으로 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 관찰되었다.

도 6a는 Annexin V 법을 이용하여, 다양한 농도의 YM-155에 농도 의존적인 iPS, HASMC 및 iPS-SMC3의 세포사멸 정도를 확인하고 유세포 분리법을 통해 측정한 결과이다. 도 6b는 도 6a에서 얻은 세포사멸 정도를 그래프로 나타낸 결과로서, iPS, HASMC 및 iPS-SMC3의 각 생존세포 (live cell)의 비율을 보여준다.

도 7a는 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3에 50 nM의 YM-155 또는 DMSO를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM의 칼륨 용액($75K^+$)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3의 세포내 칼슘 농도를 측정함으로써, 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인한 결과이다. 도 7b는 도 7a에서 측정된 내부 칼슘 농도를 그래프로 나타낸 결과이다.

도 8a는 인간 유도만능줄기세포 및 인간 유도만능줄기세포 유래의 평활근세포(SMC3)을 1:1로 혼합하고, 쿠어세틴 50 μM을 24시간 동안 처리한 후 SSEA-4(녹색) 및 절단형 카스파아제-3(빨강색)(위쪽 패널), 또는 SMA(녹색) 및 절단형 카스파아제-3(빨강색)(아래쪽 패널)로 면역염색 분석한 결과를 보여준다. 스케일 바는 100 μm를 나타낸다. 도 8b는 SMA-양성 파퓰레이션 또는 SSEA-4-양성 파퓰레이션에서의 절단형 카스파아제-3 양성 파퓰레이션의 백분율을 나타낸다. **는 ‘ P<0.01’의 유의성을 나타낸다.

도 9a는 인간 유도만능줄기세포 및 평활근의 1:1 혼합물을 마우스에 주입한 결과를 나타낸다. 미처리 또는 10 mM YM155를 전처리한 인간 유도만능줄기세포를 마우스에 주입하여 형성된 테라토마의 이미지를 보여준다. NC는 세포를 주입하지 않은 마우스의 고환이다. 도 9b는 인간 유도만능줄기세포를 주입한 마우스에서 형성된 테라토마의 H&E, Masson's trichrome 및 Acian Blue 염색 결과를 보여준다. 테라토마는 내장 상피, 연골, 분비 상피 및 신경 로제트 구조를 나타내는 세포를 생산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0052] **실시예**

[0053] **재료 및 방법**

[0054] *시약*

[0055] 쿠어세틴(Quercetin, Cat # Q0125)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, YM-155(Cat # S1130)은 Selleck chemicals 에서 구매하였다.

[0056] *인간 유도만능줄기세포(iPS)의 배양 및 분화*

[0057] 마이토마이신-C를 처리한 생쥐 배아 섬유아세포(MEF)가 지지세포로서 포함된 ESC 배지(20% KnockOut™ 혈청 대체물, 0.1% 젠타마이신(gentamycin), 1% 비-필수 아미노산, 0.1% β-머캅토에탄올 및 4 ng/ml bFGF가 보충된 DMEM/F/12)에서 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능 줄기세포(iPS)(Lee, T.H., et al., (2010). Functional recapitulation of smooth muscle cells via induced pluripotent stem cells from human aortic smooth muscle cells. Circ Res 106, 120-128)를 계대 배양하였다.

[0058] 본 발명의 쿠어세틴 및 YM-155에 대한 전처리를 위하여, iPS는 매트리겔이 코팅된 60 mm 디쉬에서 mTeSR™1 배지(29106, Stem Cell Technology)로 배양하여 평활근세포(smooth muscle cells: SMC)로의 분화를 유도하였다.

[0059] *인간 대동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC) 및 인간 유도만능 줄기세포-유래 분화세포(iPS-SMC)의 배양*

[0060] 인간 대동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC) 및 인간 유도만능 줄기세포-유래 분화세포, 즉 인간 유도만능 줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)는 상술한 참조문헌(Lee et al., 2010)에 기재된 바와 같이, SMCM 배지(ScienCell research laboratories, cat # 1101)에서 배양하였다.

[0061] *면역블롯팅법(Immunoblotting) 및 면역형광세포화학염색법(Immuno fluorescence cytochemistry, IFC)*

[0062] 면역블롯팅 분석에 이용한 항체는 항-PARP1(SC-7150) 및 항-β-액틴(SC-47778)는 Santa Cruz Biotech Inc.(CA, 미국)에서 구매하였다. 또한, 항-카스파아제9(Cat# 9502) 및 항-cleaved 카스파아제-3(Cat# 9661)는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구매하였다.

[0063] IFC에 사용된 제1차 항체(1:200)는 항-α-smooth muscle actin (α-SMA) (Dako Inc, Carpinteria, Calif)을 사용하였다. Axioscope A1 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 이미지들을 얻고 분석하였다.

[0064] *실시간 PCR(Real-time PCR)*

[0065] RNA 추출 및 cDNA 합성은 일반적인 프로토콜(VanGuilder HD, et al (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". Biotechniques 44 (5): 619626)을 이용하였다.

[0066] 본 실시예에서 이용되는 유전자-특이적 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0067] β-액틴: 5'-GTCCTCTCCCAAGTCCACAC-3', 5'-GGGAGACCAAAAGCCTTCAT -3'

[0068] α-SMA: 5'- AGAACATGGCATCATCACCA-3', 5'-TACATGGCTGGGACATTGAA-3'

[0069] *FACS 분석*

[0070] 모든 FACS 분석에는 FACS calibur™ (BD Biosciences) 및 CellQuest 소프트웨어를 이용하였다. 세포는 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™)를 이용하여 제품에 동봉된 프로토콜에 기재된 바와 같이 염색하였다.

[0071] *테라토마 형성 및 면역조직화학법*

[0072] 이미 분화된 세포의 경우 테라토마 형성능력이 없기 때문에, 쿠어세틴 또는 YM-155의 테라토마 형성 억제 효과

를 확인하기 위하여, 미분화된 상태의 세포가 포함된 조건을 만들어 테라토마 형성 실험을 실시하였다. 즉, iPS로부터 형성된 배상체(EB)에 쿠어세틴(100 μM) 또는 YM-155(10 nM)을 24 시간 동안 처리한 세포(약 5 x 10^6 cells) 또는 미처리한 세포(약 5 x 10^6 cells)를 수득하고, NOD/SCID 마우스(Charles River Laboratories, Yokohama, Japan)의 고환에 주입하여 테라토마를 형성시켰다. 주입 10 주 후, 상기 이종 이식된 세포(xenograft mass)을 수득하여 4% PFA에 2 주 동안 고정시키고, Tissue-Tek VIP embedding machine (Miles Scientific, Naperville, IL) 및 Thermo Shandon Histocenter2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 이용하여 파라핀에 포매하였다. 상기 제조된 파라핀 블록은 Leica RN2065 microtome (Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 절편(2 μm 두께)으로 만들었다. 테라토마의 형성을 확인하기 위하여 헤마토자일린-에오신(H&E), PAS(Periodic-Acid-Schiff) 염색한 후, 숙련된 병리학자가 분석하였다.

[0073] 본 발명의 모든 실험들은 차의과대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of CHA University)의 승인을 받았으며, 본 발명의 모든 과정은 미국 국립보건원 (NIH publication no. 85-23, revised 1996)에서 발행한 'Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals'에 따라 수행하였다.

[0074] *세포내 칼슘(Ca^{2+}) 측정*

[0075] 평활근세포로의 분화가 완료된 분화세포의 기능을 확인하기 위하여 세포내 칼슘 반응을 이용하였다. 상술한 참조문헌(Lee et al., 2006)에 기재된 바와 같이, 세포 내외의 칼슘 이동(calcium transients)은 약리적 시약, ATP 또는 75 mM K^+ 용액을 이용하여 유도하였으며, 칼슘 인디케이터 Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR)를 이용하여 형광으로 값을 수치화하여 측정하고 이미지화하였다.

[0076] **실험 결과**

[0077] **쿠어세틴에 의한 미분화 인간 유도만능줄기세포의 세포사멸 및 인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 확인**

[0078] *쿠어세틴의 세포사멸*

[0079] 쿠어세틴의 미분화 인간 유도만능줄기세포에 대한 선택적 세포사멸을 확인하기 위하여, 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS), HASMC, iPS에서 분화-유래된 평활근 세포 1번(iPS-SMC-1) 및 iPS에서 분화-유래된 평활근 세포 3번에 50 μM의 쿠어세틴을 24 시간 처리하고 세포사멸 시 나타나는 세포사멸 특이 세포 표현형을 확인한 결과, 쿠어세틴 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 발견되었다(도 1a). 또한, 면역 블랏팅법을 이용하여, 세포사멸 관련 표지 단백질을 확인한 결과, 쿠어세틴 처리시 인간 유도만능줄기세포에서, 세포사멸 시 발생하는 Parp-1의 절단(T형), 카스파아제 3 번 및 9번의 절단형(cleaved 카스파아제)이 발현되었다(도 1b).

[0080] 다양한 농도의 쿠어세틴(QC)를 처리 시, 농도 의존적인 유도만능줄기세포의 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포 표현형으로 확인하였다(도 2a). 또한, Annexin V 법을 이용하여, 다양한 농도의 쿠어세틴에 의한 iPS 및 HASMC의 세포사멸 정도를 확인하였고, 이를 그래프로 나타내어 iPS 및 HASMC의 각 생존세포(live cells)의 비율을 확인하였다(도 2b 및 c).

[0081] *인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 기능확인*

[0082] 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, HASMC 및 iPS-SMC3에 50 μM 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 후, 면역형광법을 이용하여 평활근세포에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 α-Smooth muscle actin(α-SMA)의 발현을 확인한 결과 α-SMA의 발현을 확인하였고, 또한 RT-PCR을 이용하여, iPS-SMC1 및 iPS-SMC3의 세포 내 α-SMA의 mRNA 발현도 확인하였다(도 3a 및 b).

[0083] 또한, 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, iPS-SMC1 및 iPS-SMC3에 50 μM 의 쿠어세틴 또는 DMSO를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM의 칼륨 용액(75K^+)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3의 세포내 칼슘 농도를 측정한 결과, 평활근세포로서의 기능을 확인하였다(도 3c 및 d).

[0084] *테라토마 형성능*

[0085] 쿠어세틴의 처리시 테라토마 형성여부를 확인하기 위해, 50 μM 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 미분화 유도만능줄기세포를 마우스의 고환에 주입하여, 10 주 후 테라토마 형성능을 대조군(쿠어세틴 미처리 유도만능줄기세포)과 비교한 결과한 결과, 대조군에서 Secretory eipthelium 및 Neural rosette structure이 확인되었고, 이를 각각 PAS 염색 및 H&E 염색하여 테라토마의 형성을 확인하였다.

[0086] **YM-155에 의한 미분화 인간 유도만능줄기세포의 세포사멸 유도 및 인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 확인**

[0087] *YM-155의 세포사멸*

[0088] YM-155의 미분화 인간 유도만능줄기세포에 대한 선택적 세포사멸을 확인하기 위하여, 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS), HASMC 및 iPS에서 분화-유래된 평활근 세포 3번에 다양한 농도의 YM-155을 24 시간 처리하고 세포사멸 시 나타나는 세포사멸 특이 세포 표현형을 확인한 결과, 농도 의존적인 YM-155 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 발견되었다(도 5).

[0089] 또한, Annexin V 법을 이용하여, 다양한 농도의 YM-155에 의한 iPS, HASMC 및 iPS-SMC3의 세포사멸 정도를 확인하였고, 이를 그래프로 나타내어 iPS, HASMC 및 iPS-SMC3의 각 생존세포(live cells)의 비율을 확인하였다(도 6a 및 b).

[0090] *인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 기능확인*

[0091] 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, iPS-SMC1 및 iPS-SMC3에 50 nM 의 YM-155 또는 DMSO를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM의 칼륨 용액($75K^+$)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 의 세포내 칼슘 농도를 측정한 결과, 평활근세포로서의 기능을 확인하였다(도 7a 및 b).

[0092] *쿠어세틴 처리에 의한 분화된 세포의 기능에 대한 영향 확인*

[0093] 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, 인간 유도만능줄기세포 및 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포를 1:1로 혼합하여 배양한 파플레이션에 50 μM 쿠어세틴을 24시간 동안 처리하고, SMA-양성 파플레이션 또는 SSEA-4-양성 파플레이션에서의 절단형 카스파아제-3 양성 파플레이션을 확인한 결과, 인간 유도만능줄기세포-평활근세포의 혼합 세포 파플레이션에서 쿠어세틴 처리 후 SSEA-4 양성 파플레이션 내 절단형 카스파아제-3 양성 파플레이션이 우세한 것을 확인하였다(도 8a 및 b).

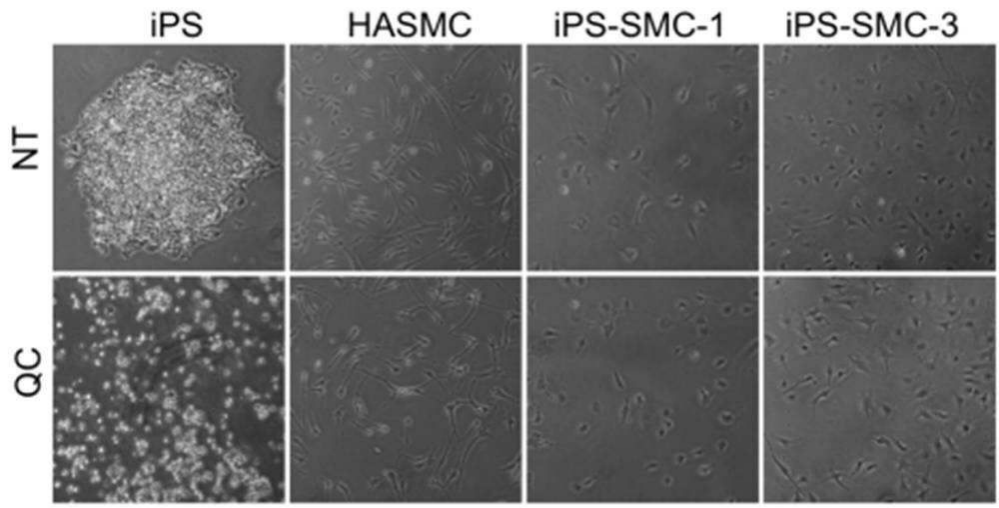
[0094] **서바이빈 억제제인 YM-155의 인간 유도만능줄기세포의 사멸 유도**

[0095] 서바이빈 억제제인 YM-155의 인간 유도만능줄기세포의 선별적 사멸을 확인하기 위해, 인간 유도만능줄기세포 및 평활근의 1:1 혼합물을 마우스에 주입한 결과를 나타낸다. 미처리 또는 10 mM YM155를 전처리한 인간 유도만능줄기세포를 마우스에 주입하여 테라토마를 유도한다(도 9a). 인간 유도만능줄기세포를 주입한 마우스에서 형성된 테라토마의 H&E, Masson's trichrome 및 Acian Blue 염색한 결과, YM-155의 24시간 단회 처리에 의해 테라토마의 형성이 억제됨을 보여준다.

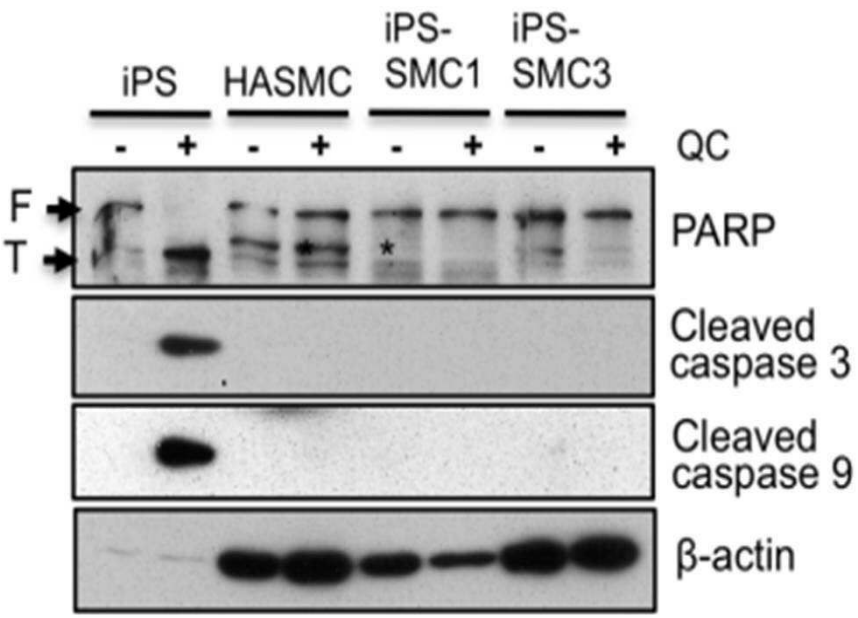
[0096] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

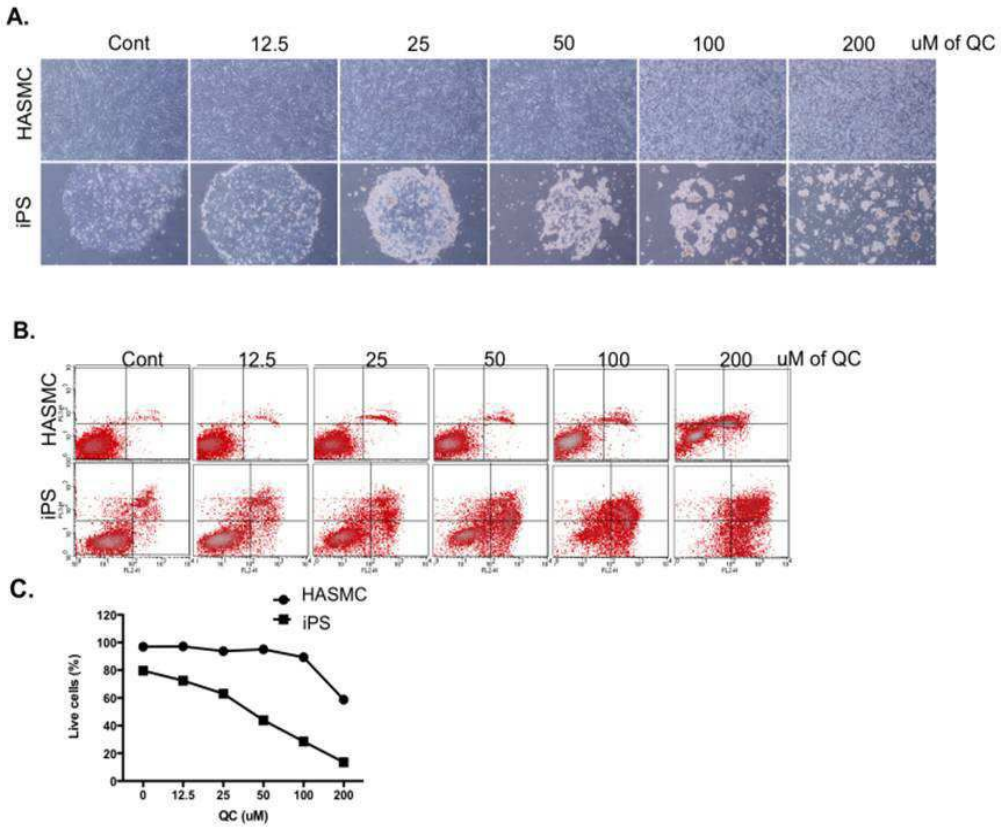
도면1a


iPS
HASMC
iPS-SMC-1
iPS-SMC-3
NT
QC

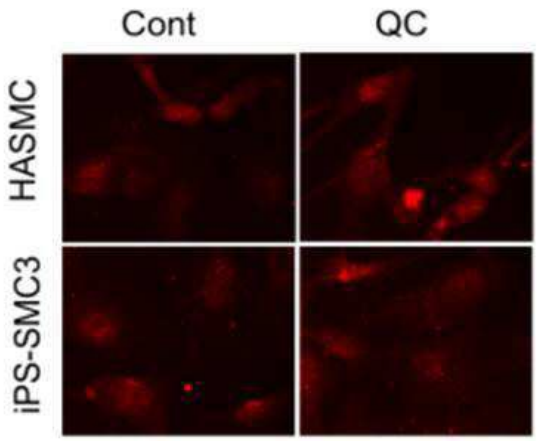
도면1b


iPS
HASMC
iPS-SMC1
iPS-SMC3
- + - + - + - +
QC
F
T
PARP
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 9
β-actin

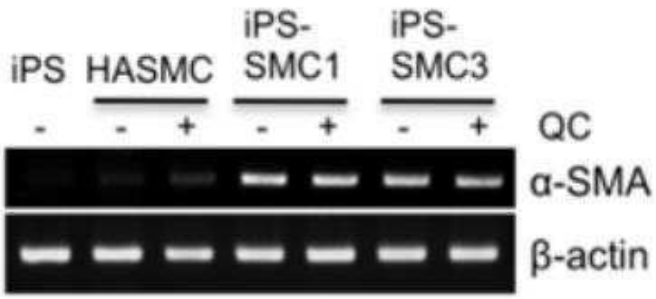
도면2


A.
Cont
12.5
25
50
100
200
uM of QC
HASMC
iPS
B.
Cont
12.5
25
50
100
200
uM of QC
HASMC
iPS
C.
HASMC
iPS
Live cells (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
12.5
25
50
100
200
QC (uM)

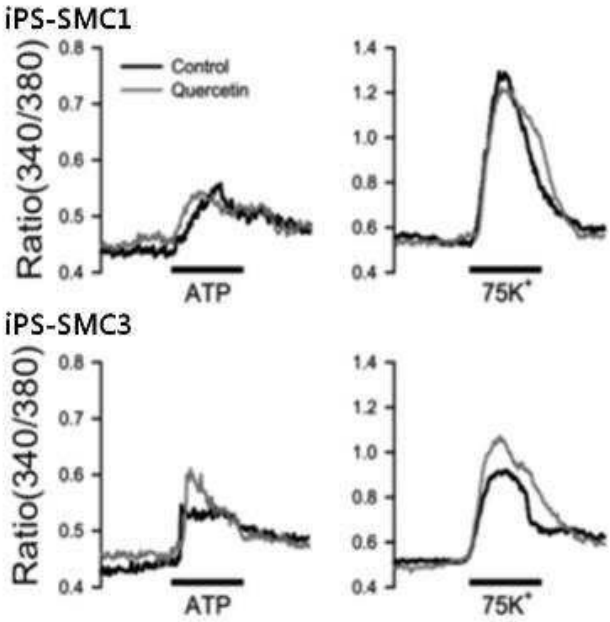
도면3a


Cont
QC
HASMC
iPS-SMC3

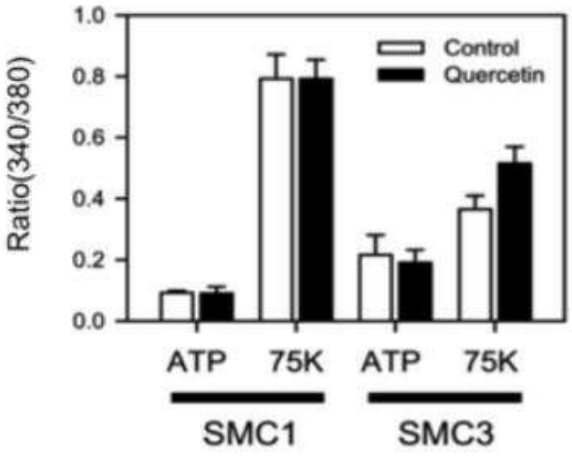
도면3b



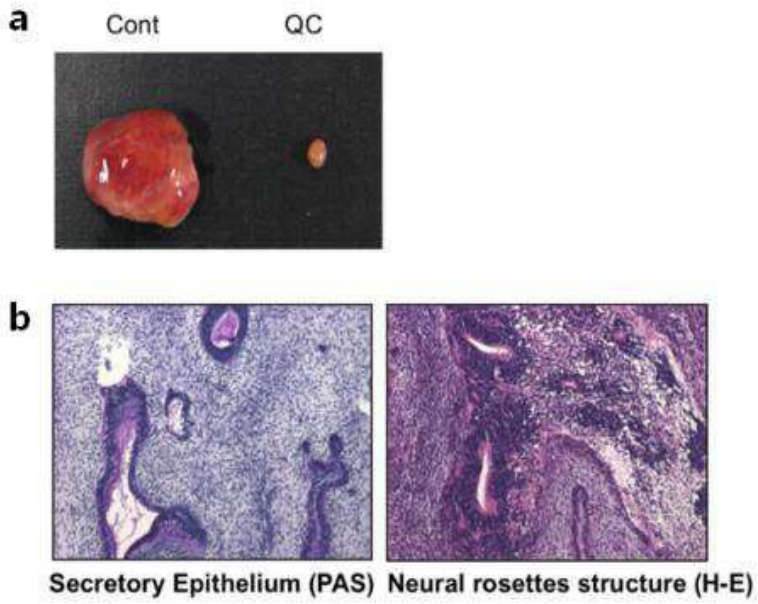
도면3c



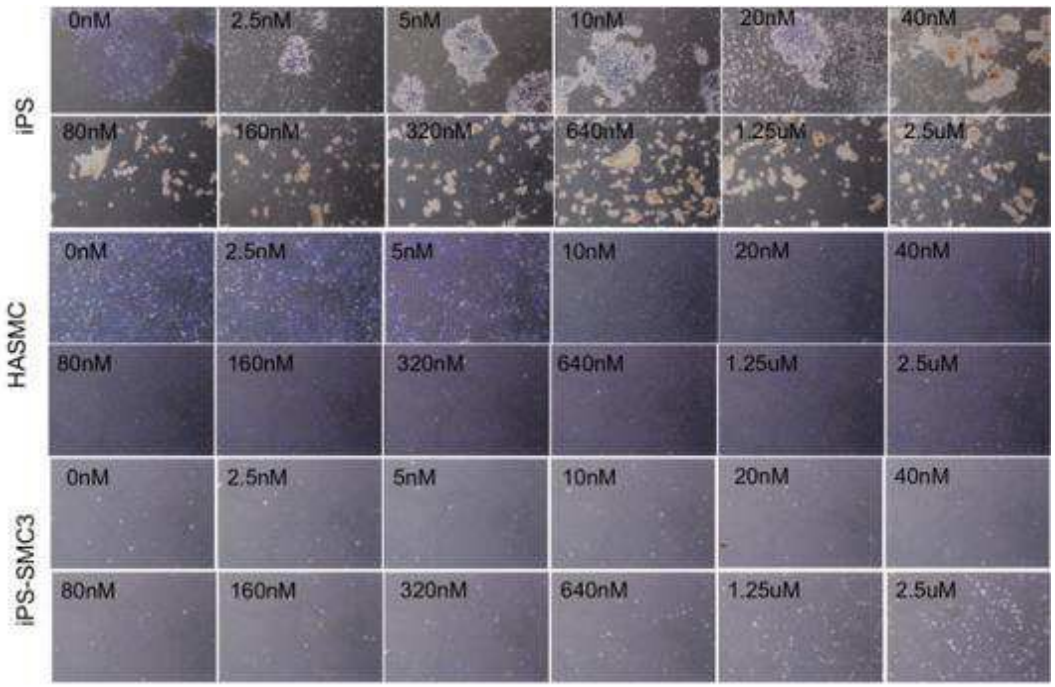
도면3d



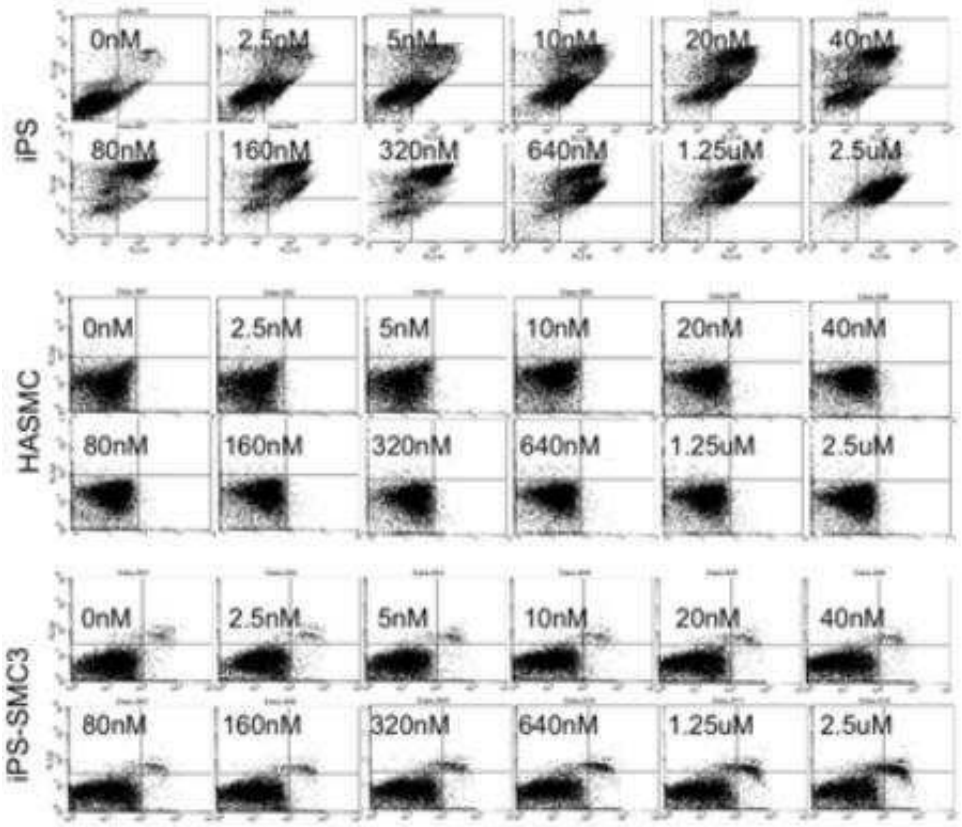
도면4


a
Cont
QC
b
Secretory Epithelium (PAS)
Neural rosettes structure (H-E)

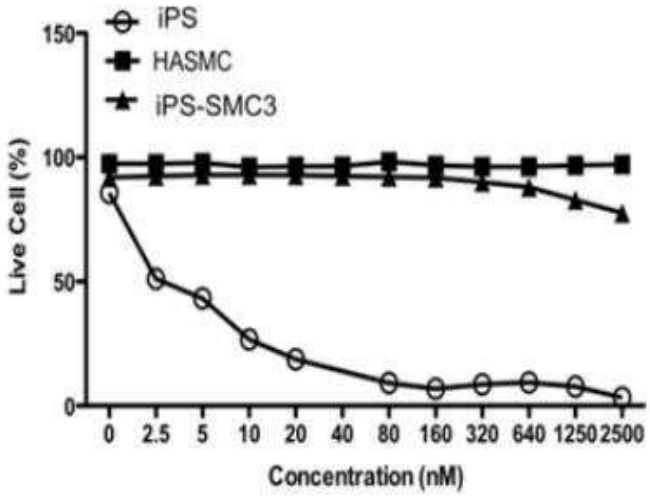
도면5


iPS
0nM
2.5nM
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
160nM
320nM
640nM
1.25uM
2.5uM
HASMC
0nM
2.5nM
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
160nM
320nM
640nM
1.25uM
2.5uM
iPS-SMC3
0nM
2.5nM
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
160nM
320nM
640nM
1.25uM
2.5uM

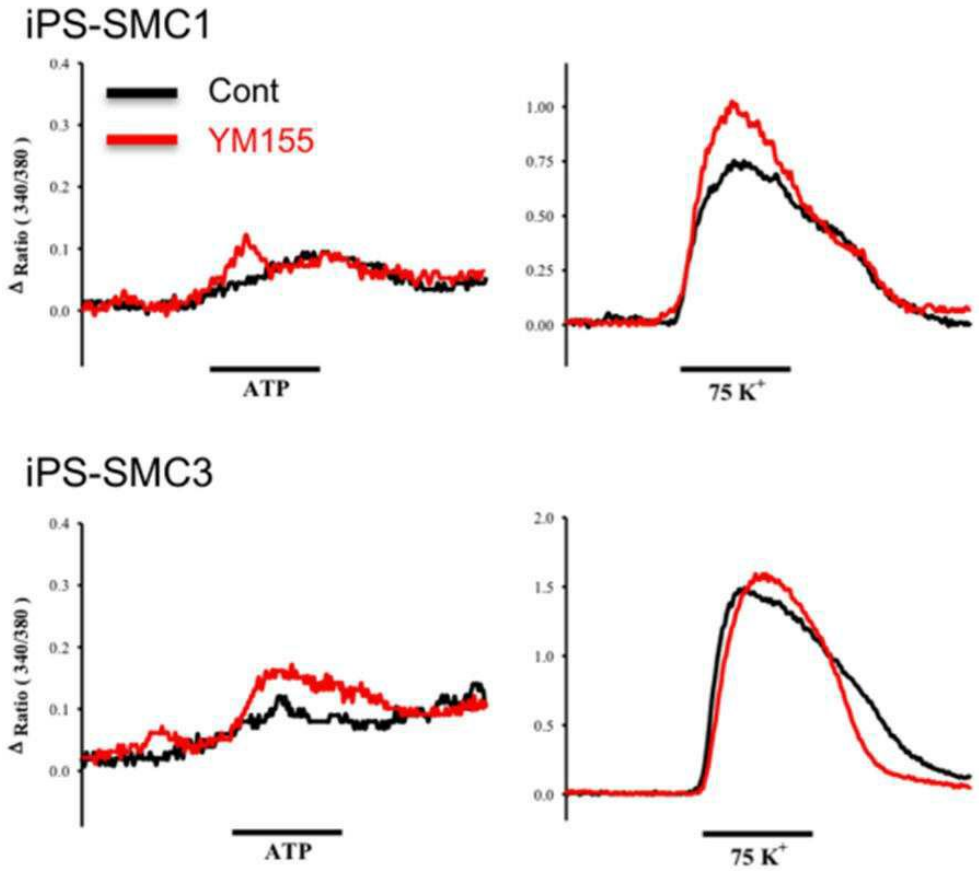
도면6a


iPS
0nM
2.5nM
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
160nM
320nM
640nM
1.25uM
2.5uM
HASMC
0nM
2.5nM
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
160nM
320nM
640nM
1.25uM
2.5uM
iPS-SMC3
0nM
2.5nM
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
160nM
320nM
640nM
1.25uM
2.5uM

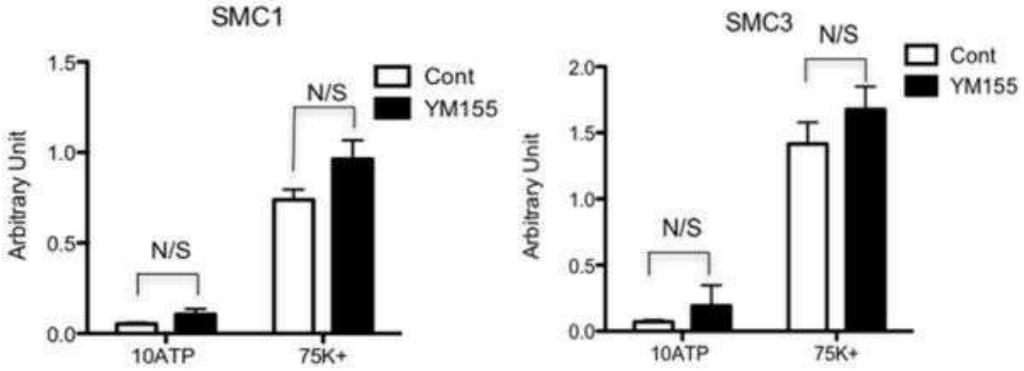
도면6b


iPS
HASMC
iPS-SMC3
Live Cell (%)
150
100
50
0
0
2.5
5
10
20
40
80
160
320
640
1250
2500
Concentration (nM)

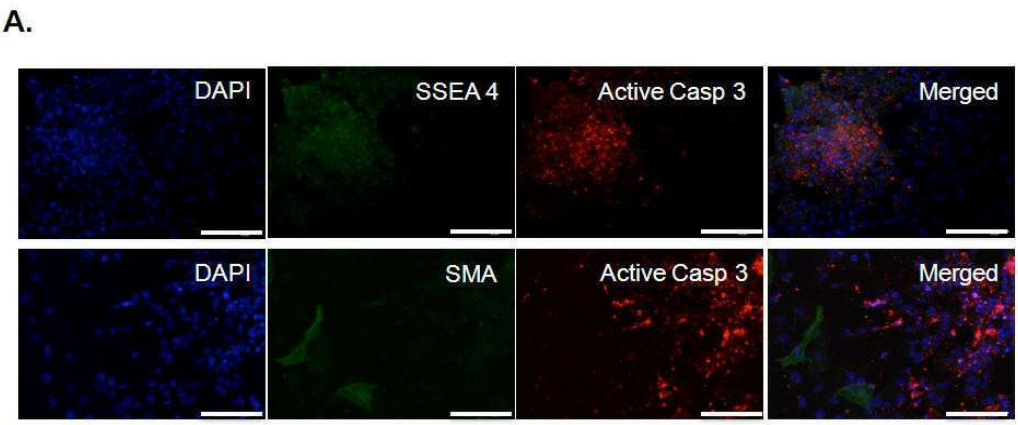
도면7a


iPS-SMC1
Cont
YM155
Δ Ratio (340/380)
ATP
75 K+
iPS-SMC3
Δ Ratio (340/380)
ATP
75 K+

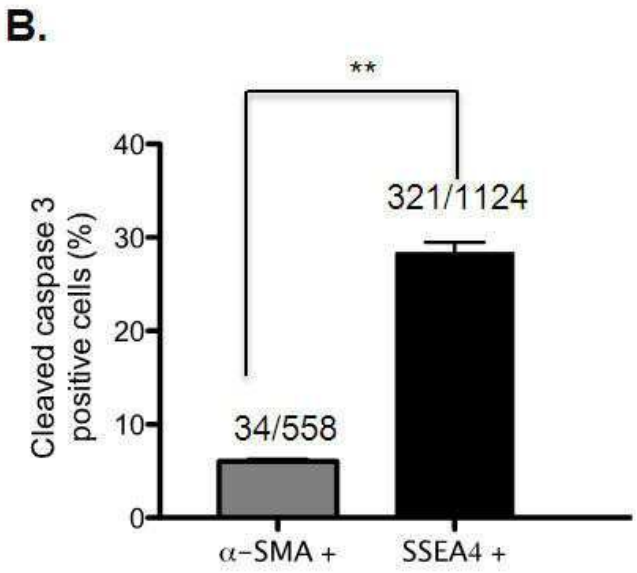
도면7b


SMC1
Arbitrary Unit
N/S
N/S
Cont
YM155
10ATP
75K+
SMC3
Arbitrary Unit
N/S
N/S
Cont
YM155
10ATP
75K+

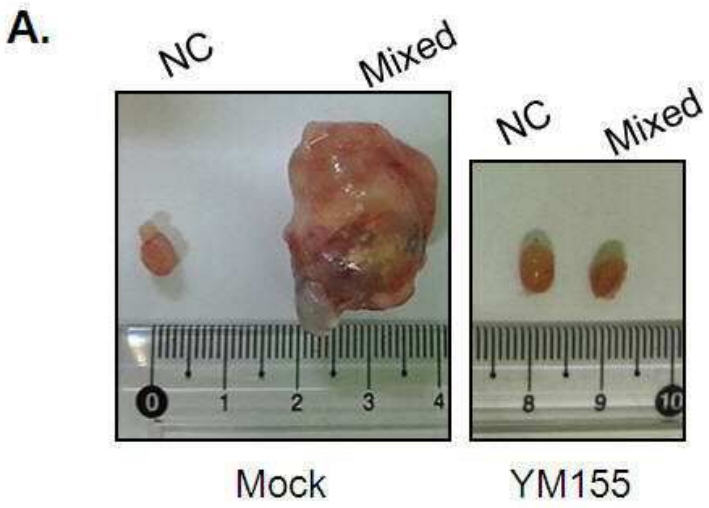
도면8a



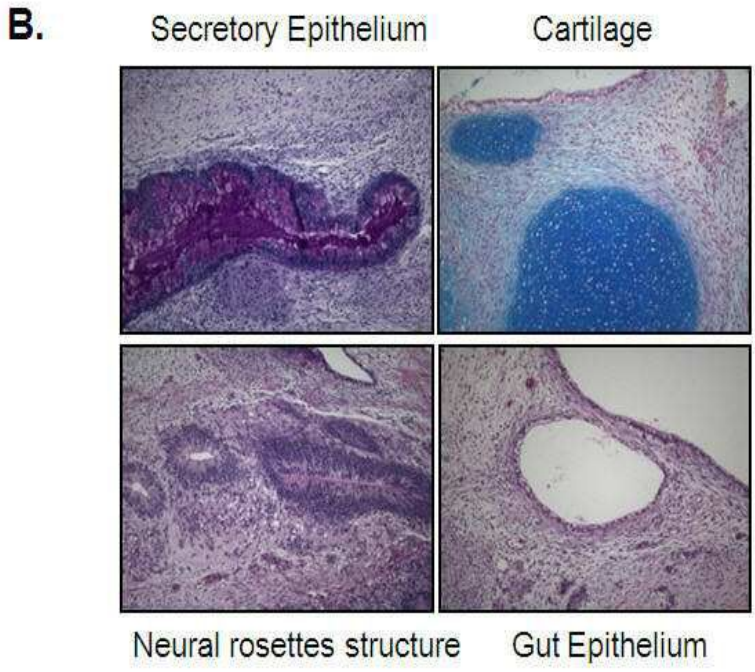
도면8b



도면9a



도면9b


B.
Secretory Epithelium
Cartilage
Neural rosettes structure
Gut Epithelium