



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0105614
(43) 공개일자 2015년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) A61K 35/30 (2015.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 5/079 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0032322
(22) 출원일자 2015년03월09일
심사청구일자 2015년03월09일
(30) 우선권주장
1020140027245 2014년03월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인
국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김정범
경남 김해시 율하1로 64, 403동 1802호 (율하동,
율상마을푸르지오4단지)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 10 항

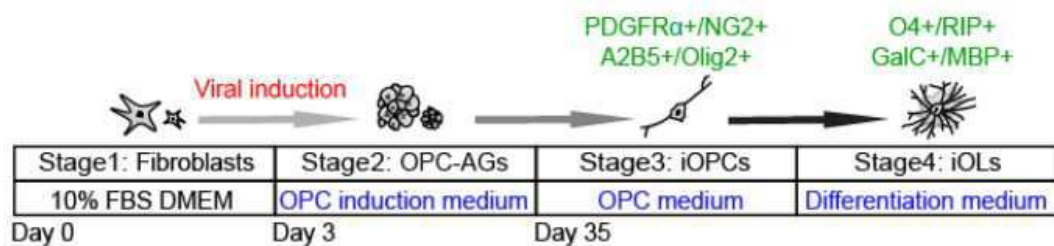
(54) 발명의 명칭 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이의 이용

(57) 요약

직접교차분화인자 OCT4, SOX1, SOX2, SOX10, OLIG2, NKX2.2 및 NKX6.2 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell; OPCs)로의 직접교차분화 유도용 조성물,

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물, 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제, 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료용 세포치료제, 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료 약물 스크리닝용 조성물, 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물 및 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법에 대한 것이다. 본 발명에 따라 체세포로부터 직접교차분화를 통해 희소돌기아교 전구세포를 제조함으로써, 척수 손상 및 수초탈락 질환 등의 치료에 우수하게 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 5/0622 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711000472

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 줄기세포연구사업

연구과제명 체세포-특이적 역분화 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711002001

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 세포재생기술개발사업

연구과제명 직접교차분화를 이용한 환자 특이적 유도신경계세포치료제의 개발과 임상적용에 적합한 대량 생산을 위한 고품격 스캐폴드용 그래핀 저온성장 기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murine leukemia virus) 벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus) 벡터, RSV(Rous sarcoma virus) 벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 벡터인 것을 특징으로 하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포(fibroblast), 상피세포, 근육세포, 신경세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포(astrocyte) 혈액세포, 신경줄기세포, 조혈모줄기세포, 제대혈 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 세포인 것을 특징으로 하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 4

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell).

청구항 5

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 수초탈락 질환은 다발성 경화증(multiple sclerosis), 뇌성마비(cerebral palsy), 백질 이영양증(leukodystrophy), 신경병질, 중심다리뇌 수초용해 또는 수초형성부전증(hypomyelination)인 것을 특징으로 하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제.

청구항 8

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나

이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료 약물 스크리닝용 조성물.

청구항 9

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물.

청구항 10

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 희소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 유도희소돌기아교 전구세포(induced Oligodendrocyte Progenitor Cell; iOPCs)로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 상기 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법에 의해 분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제, 약물 스크리닝용 조성물, 또는 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

희소돌기아교세포(Oligodendrocyte)는 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cells, OPCs)로 알려진 한정된 전구체의 신경교 세포 계통(glial lineage)의 발달 분화 중의 신경상피로부터 유래한다. 희소돌기아교 전구세포는 중추신경계(central nervous system, CNS)에서 수초(myelin sheath) 생성에 필수적인 역할을 하는 신경아교세포 유형 중 하나이다. 수초형성(Myelination)은 뉴런이 축삭의 단절을 통하여 활동전위(action potential)의 전기적 자극(electrical impulse)을 유지하게 한다.

[0003]

희소돌기아교세포의 기능장애(dysfunction)는 수초의 손실로 인한 장애로, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 뇌성마비(cerebral palsy), 백질이영양증(leukodystrophy), 신경병질, 중심다리뇌 수초용해 및 수초형성부전증(hypomyelination)을 포함하는 많은 신경퇴행성(neurodegenerative) 질환을 유발한다. 손상된 희소돌기아교세포의 치료하기 위해서 내생(endogenous) 세포를 재생(restoration)하거나 수초를 생성하는 기능을 가진 희소돌기아교 전구세포를 중추신경계로 이식하는 것이, 수초 손상을 치료하는 가장 근본적인 방법이다.

[0004]

이와 관련하여, 희소돌기아교세포를 이식하여 수초 손상을 치료하였으나, 희소돌기아교세포의 효과적인 분화방법이 명확하지 않았고, 많은 양의 희소돌기아교세포를 얻는 것이 매우 어려워 문제점이 있었다.

[0005]

또한, 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs) 및 유도만능줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 분화하는 방법도 있으나, 목적하는 세포로의 유도효율이 낮고 특정 세포로 분화 시 상기 배아줄기세포 또는 만능줄기세포로부터 종양이 형성 될 수 있는 위험성이 있기 때문에 문제가 있다.

[0006]

상기 종양형성 위험성을 없애기 위하여, 만능줄기세포 상태를 통하지 않고 체세포를 다른 계통의 체세포로 또는 다분화능 줄기세포로 직접교차분화하기 위한 연구가 진행되고 있으나, 이러한 세포 리프로그래밍과정의 기작은 유도를 위해 사용된 유전자의 수가 너무 많아 자세한 기작을 규명하기 어렵기 때문에 현재까지 밝혀진 수준이 미미한 상태이다. 또한, 역분화기술이 확립이 되었음에도 실제 치료적용을 위해서는 기술적으로 간편하고 효율이 높은 방법을 계속해서 개발해야만 하고 이렇게 개발된 기술들은 모두 효율과 안전성 측면에서 평가되어야 하므로 제한적이다. 아울러, 아직까지 체세포로부터 단일 유전자만을 발현시켜 희소돌기아교 전구세포를 제조하는

방법은 알려진 바가 없다.

- [0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 중 어느 하나 이상의 유전자를 사용하여 중앙형성 위험성 없이 체세포로부터 희소돌기아교세포의 전구세포를 직접교차분화 방법으로 제조할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0011023호(2013.01.30)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공하는데 있다.

- [0010] 본 발명의 다른 목적은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물, 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제, 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료 약물 스크리닝용 조성물 및 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물을 제공하는데 있다.

- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.

- [0013] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)를 제공한다.

- [0014] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [0015] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.

- [0016] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다.

- [0017] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직

접교차분화 유도된 회소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료용 인공 조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물을 제공한다.

[0018]

또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 회소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019]

본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 중 어느 하나 이상의 유전자의 사용으로 체세포로부터 회소돌기아교 전구세포로의 직접교차분화를 유도할 수 있는 조성물을 제공하고, 상기 조성물을 이용하여 체세포로부터 회소돌기아교 전구세포를 제조할 수 있고, 이를 통하여 척수 손상 및 수초탈락 질환 등의 치료에 우수하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도면에서 "iOPC-C1" 및 "iOPC-C2"는 본 발명에 따라 제조된 회소돌기아교세포 전구체 세포의 클론 1 및 클론 2를 각각 나타낸다.

도 1a는 섬유아세포로부터 *OCT4*-유도된 iOPC의 제조과정을 도식화한 그림이다.

도 1b는 섬유아세포로부터 iOPCs로의 분화가 점진적으로 진행됨에 따른 변화를 확인한 위상차-현미경의 이미지를 나타낸다. "B"는 감염되지 않은 섬유아세포, "C"는 대조군, "D"는 섬유아세포-*OCT4* 25일 제, "E"는 *OCT4*-유도된 섬유아세포 형성 집합체, "F"는 iOPC 같은 군집, 및 "G"는 iOPCs의 양극성 형태를 나타낸다. E 및 F의 스케일 바(Scale bars)는 500um, B 내지 D의 스케일 바는 200um, G의 스케일 바는 100um이다.

도 1c는 PDGFR- α , NG2, A2B5, 및 *Olig2*의 iOPC 특이적인 마커로 이중 염색된 *OCT4*-유도된 iOPC 클론의 면역형광분석 결과를 나타낸다. 스케일 바는 125um이다.

도 1d는 자가분열하는 iOPCs의 위상차 현미경 이미지를 나타낸다. 스케일 바는 100um 이다.

도 1e는 초기 패시지(P3)와 늦은 패시지(P31)에서 시간에 따른 iOPCs의 증식률을 각각 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었다.

도 2a는 분화되지 않은 iOPCs의 면역형광 이미지를 나타낸다. "A"는 PDGFR- α , GFAP로 염색한 이미지, "B"는 NG2, *Tuj1*로 염색한 이미지, "C"는 A2B5 and RIP로 염색한 이미지를 나타낸다. 스케일 바는 250um 이다.

도 2b는 iOPCs의 in vitro 분화 중 형상 변화를 위상차 현미경 이미지로 나타낸 것이다. "D"는 1일차, "E"는 5일 차, "F"는 16일 차의 결과를 나타낸다. 녹색화살표는 회소돌기아교세포를 가리키고 빨간색 화살표는 성상교세포를 가리킨다. 스케일 바는 100um 이다.

도 2c는 분화 후에 iOPCs의 다분화능을 나타내는 O4+ 회소돌기아교세포(녹색) 및 GFAP+ 성상교세포(빨간색)가 함께 존재하는 것을 나타낸다. 스케일 바는 125um이다.

도 2d는 분화 30일 후에 성숙한 회소돌기아교세포 마커를 발현하는 회소돌기아교세포의 면역형광 이미지를 나타낸다. "M" 및 "P"는 RIP의 발현, "N" 및 "Q"는 GalC의 발현, "O" 및 "R"은 MBP 발현을 나타낸다. 스케일 바는 125um이다.

도 3a는 *OCT4*-유도된 iOPCs의 전체적인 유전자 발현에 대한 마이크로어레이 분석의 열지도(Heatmap) 결과를 나타낸 것이다. "fibroblasts"는 섬유아세포, "fib-*OCT4* D3"는 *OCT4*에 의한 분화 유도 3일 제 섬유아세포, "fib-*OCT4* D10"은 *OCT4*에 의한 분화 유도 10일 제 섬유아세포, "mock"은 대조군, "wtOPC"는 만능 줄기 세포로부터 유래된 OPC를 나타낸다.

도 3b는 섬유아세포와 OPC, 섬유아세포와 iOPCs-C1, 섬유아세포와 iOPCs-C2, iOPC-C1과 OPC, iOPC-C2와 OPC, iOPC-C1과 iOPC-C2의 상관관계를 보여주는 전체적인 유전자 발현과 비교한 산포도(Scatter plot)를 나타낸다. 검은 선은 짝지은 샘플 사이에 2배의 유전자 발현 변화가 있는 경계선을 나타낸다. 유전자 발현 수준은 log2 값으로 나타내었다.

도 3c는 OPC 계열 마커 유전자와 회소돌기아교세포 마커 유전자를 발현하는 *OCT4*-유도된 OPCs의 정량 RT-PCR 결과를 나타낸다. 그래프는 log2 배 변화(log2 fold change)로 나타내었고 *GAPDH* 로 정상화(normalize)하였다.

도 3d는 3D 주성분 분석 결과를 나타낸다. 1차 주요 성분(first principal component, PC1) 유전자 발현 변동성의 64%를 차지했다. 2차 주요 성분(second principal component, PC2)은 변동성의 14%를 차지했고 3차 주요 성분(third principal component, PC3)은 변동성의 8.3%를 차지했다.

도 3e는 전체적인 유전자 발현의 계층 클러스터링 결과를 나타낸다. 마이크로어레이 분석 결과를 통하여 OCT4 유도 후에 유전자 발현의 변화를 확인하였다. 회소돌기아교세포와 신경 발달은 섬유아세포와 비교하여 iOPCs에서 매우 높게 발현되는 유전자와 관계있음을 확인하였다.

도 4a는 손상 및 이식 12주 후에 H&E 염색된 쥐의 척수 부분의 이미지를 나타낸다. 스케일 바는 200um이다.

도 4b는 손상 받은 부분의 척수에 대한 면역조직화학 분석 결과를 나타낸다. "C" 및 "F" O4로 염색, "D" 및 "G"는 MBP로 염색, "E 및 H"는 GFAP로 염색한 결과를 나타낸다.

도 4c는 쥐의 척수에서 이식된 iOPCs의 O4, MBP 및 GFAP 양성 세포로의 분화 및 분화되지 않은 iOPCs의 A2B5의 미성숙 마커(I 및 I') 발현을 확인한 결과를 나타낸다. J'에서 하얀색 화살표 머리는 O4 양성 및 MBP 양성 세포를 가리킨다. 스케일 바는 100um, 50um이다.

도 5는 pMX 레트로바이러스 벡터의 개열지도를 나타낸다.

도 6은 OPC 계열 마커 유전자와 회소돌기아교세포 마커 유전자를 발현하는 *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 또는 *NKX6.2*로 유도된 iOPCs의 정량 RT-PCR 결과를 나타낸다. 그래프는 log2 배 변화(log2 fold change)로 나타내었고 *GAPDH* 로 정상화(normalize)하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 중 어느 하나 이상의 유전자를 이용하여 유도회소돌기아교 전구세포(induced Oligodendrocyte Progenitor Cells, iOPCs)를 제조할 수 있는지 확인하기 위해서, 체세포를 분리하고 직접교차분화인자 유전자 전사 인자를 암호화하는 레트로바이러스(retrovirus)를 체세포에 감염시켜 iOPCs를 제조하였다(실험결과 1).

[0022] 또 다른 실시예에서는, 제조된 iOPCs가 전구체로서의 미성숙 상태(immature state)임을 면역세포화학 분석 및 이중염색을 통하여 확인하였고, 그 결과, 전구체로서의 자가분열 능력 및 31 패시지 이상까지 생장물을 확인하였다(실험결과 2).

[0023] 또한, 제조한 iOPCs의 분화능을 확인하기 위하여 분화를 유도하였다. 그 결과, 성숙한 회소돌기아교세포 또는 성상교세포로 분화할 수 있음을 확인하였다(실험결과 3).

[0024] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 제조된 iOPCs와 OPCs의 전체적인 유전자 프로파일 발현을 비교하였다. 그 결과, iOPCs와 OPCs의 전체적인 유전자 프로파일 발현이 유사함을 확인하여, 제조된 iOPCs가 OPCs의 기능을 수행할 수 있음을 다시 한 번 확인하였다(실험결과 4).

[0025] 나아가, 본 발명에서는 in vivo 상에서 척수 손상된 쥐에 iOPCs를 이식하여 척수 손상에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 손상된 척수 조직이 현저히 감소한 것을 확인하였고, 종양의 발생 없이 수초형성을 회복시키는 것을 입증하였다.

[0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0027] 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 회소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 *OCT4* (octamer-binding transcription factor 4) 단백질은 POU5F1 단백질으로도 알려져 있으며, POU5F1 유전자에 의하여 코딩된다. *OCT4*는 POU 패밀리의 호메오도메인(homeodomain) 전사 인자 중 하나이다. *OCT4* 단백질은 분화되지 않은 배아줄기세포의 자가분열과 관계되어 있음은 알려져 있으나, 체세포로부터 회소돌기아교 전구세포로의 직접교차분화와 관계된 내용은 전혀 알려진 바가 없다. *OCT4*의 유전자 서열은 NCBI 등록번호 NM_014209, NM_013633.3으로 등록되어 있다.

- [0029] 상기 *SOX1*는 SOX 단백질 패밀리의 전사인자 중 하나이고, NCBI 등록번호 NM_005986.2, NM_009233.3으로 등록되어 있다.
- [0030] 상기 *SOX2*는 SOX 단백질 패밀리의 전사인자 중 하나이고, NCBI 등록번호 NM_003106.3, NM_011443.3으로 등록되어 있다.
- [0031] 상기 *SOX10*는 SOX 단백질 패밀리의 전사인자 중 하나이고, NCBI 등록번호 NM_006941.3, NM_011437.1로 등록되어 있다.
- [0032] 상기 *OLIG2*는 OLIG 단백질 패밀리의 전사인자 중 하나이고, NCBI 등록번호 NM_005806.3, NM_016967.2로 등록되어 있다.
- [0033] 상기 *NKX2.2*는 NK2 패밀리의 호메오도메인(homeodomain) 전사 인자 중 하나이고, NCBI 등록번호 NM_002509.3, NM_001077632.1로 등록되어 있다.
- [0034] 상기 *NKX6.2*는 NK2 패밀리의 호메오도메인(homeodomain) 전사 인자 중 하나이고, NCBI 등록번호 NM_177400.2, NM_183248.3으로 등록되어 있다.
- [0035] 본 발명의 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 유전자는 단백질 또는 이의 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공될 수 있는데, 단백질은 인간과 마우스, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용되는 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 단백질은 이의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 각 유전자의 단백질 변이체를 포함한다.
- [0036] 상기 단백질의 변이체란, 상기 단백질의 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 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있고, 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체일 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 단백질을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 단백질을 코딩하는 염기서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기한 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(genomic DNA, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예로, 본 발명에서 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 단백질을 코딩하는 핵산분자는 각 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 단백질을 발현하는 벡터일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 ‘벡터’란 숙주세포에서 목표 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명에서 ‘벡터’는 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 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [0041] 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터 등을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 HIV(Human immunodeficiency virus), MLV(Murine leukemia 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. 이러한 벡터 시스템은 특정 세포에 관련된 유전자를 체세포에서 과발현시켜 직접교차분화를 유도하는 목적을 위해 사용하는것으로서 어떠한 벡터 시스템을 사용하더라도 본 발명의 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예로서, *OCT4*를 발현하는 pMX 기반의 레트로바이러스 벡터일 수 있다 (도 5).

- [0042] 또한, 상기 단백질을 암호화하는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 전달하거나, 리포솜(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer)등을 이용하여 세포 내로 도입할 수 있다. 상기 리포솜은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체를 형성하여 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명에서 상기 단백질을 암호화하는 핵산분자는, 상기 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 패키징(packaging) 세포로 형질전환 및 감염시켜 각 유전자를 발현하도록 제작한 벡터 및 바이러스에 포함되어 체세포 내로 도입될 수 있다. 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 등을 포함하며 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명에서 용어 “체세포”는, 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미할 수 있다. 예를 들어, 섬유아세포, 근육세포, 신경세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, 주피세포(pericyte), 성상교세포(astrocyte), B세포, 혈액세포, 상피세포 신경줄기세포, 조혈모세포, 중간엽줄기세포 또는 재대혈 줄기세포 등을 사용할 수 있다. 그러나, 직접교차분화는 시작세포가 체세포이면 특정 조직세포 여부에 상관없이 적용할 수 있으므로, 상기에 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 피부의 섬유아세포(fibroblast)를 사용하였다.
- [0045] 본 발명에서 용어 “회소돌기아교 전구세포”는 중추신경계에 있는 신경교 세포(glial cell)의 아류(subtype)의 세포를 의미한다. 이는 회소돌기아교세포의 전구체이고 뉴런과 성상교세포로 분화할 수 있다. 또한 본 발명에서 “iOPCs”는 유도된 회소돌기아교 전구세포를 말하고, 예를 들어, 본 발명의 방법에 따른 직접분화를 통하여 체세포로부터 유도된 회소돌기아교 전구세포를 의미할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 회소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Progenitor Cell)를 제공한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 회소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 회소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0049] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 회소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 척수 손상은 중추신경계인 척수가 외부적 요인 또는 내부적 요인으로 인하여 손상되어 제 기능을 하지 못하는 모든 경우를 포함하며, 예를 들어, 진탕(commotion), 압박(compression), 좌상(contusion) 등의 외상에 의한 손상일 수 있으나 이에 제한되지 않고, 중추신경계의 일부인 척수가 자신의 기능을 수행하지 못함에 따라 체온조절 장애, 횡경막마비, 늑간근마비, 발한, 운동마비, 지각마비, 배뇨장애, 욕창, 이소성골화, 경축 등의 다양한 증상이 나타날 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 수초탈락 질환은 신경에서 수초와 관련된 모든 질환을 의미하고, 예를 들어, 다발성 경화증, 뇌성마비, 백질이영양증, 신경병질, 중심다리뇌 수초용해 또는 수초형성부전증 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명에서 있어서, “세포치료제”는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저장을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을

변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다.

[0053] 즉, 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 분화 유도된 희소돌기아교 전구세포의 반응성을 확인하는 방법으로 척수 손상 또는 수초탈락 질환의 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 분화 유도된 희소돌기아교 전구세포는 수초탈락질환의 회복 또는 치료에 중요한 신경세포로서 후보 물질에 대한 독성 또는 약효를 평가하는데 사용할 수 있다.

[0054] 상기 독성의 평가는 본 발명의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 분화 유도된 희소돌기아교 전구세포가 희소돌기아교세포로 분화를 억제하거나 또는 본 발명의 분화 유도된 희소돌기아교 전구세포의 IC₅₀ 등 당업계에서 통상적으로 독성을 판단하는 방법에 따라 평가할 수 있다. 또한, 상기 약효의 평가는 본 발명의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 분화 유도된 희소돌기아교 전구세포가 희소돌기아교세포로 분화를 촉진하거나 또는 수초 생성을 촉진하는 등 당업계에서 수초탈락질환의 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있는 방법에 따라 평가할 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 희소돌기아교 전구세포를 유효성분으로 포함하는 척수 손상 또는 수초탈락 질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물을 제공한다.

[0056] 또한, 본 발명은 직접교차분화인자 *OCT4*, *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2* 및 *NKX6.2* 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 희소돌기아교 전구세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

[0057] 보다 구체적으로, 체세포를 배지에서 배양하는 단계, 상기 배양한 체세포에 상기 유전자를 삽입한 벡터로 형질감염(transfection) 시키는 단계, 및 상기 감염된 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0058] 상기 체세포의 배양에 사용되는 배지는 당해 분야에서 체세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 프로타민 설페이트(protamine sulphate)를 함유하는 배지를 사용하였다.

[0059] 또한, 상기 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건은 당해 분야에서 체세포에 대하여 직접교차분화를 유도하는 데 통상적으로 사용되는 배지를 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 N2가 보충된 DMEM/F12, 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin), PDGF- α 20ng/ml, FGF-2 10ng/ml를 포함하는 배지를 사용하였다.

[0060] 상기 본 발명의 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 통하여, 직접교차분화인자의 이소성 발현을 유도할 수 있다. 이소성 발현이란, 어떤 유전자가 원래 발현하는 조직이나 세포 외에서 발현하는 것, 또는 원래 발현하는 시기와 다른 시기에 발현하는 것을 의미한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 유도용 조성물을 체세포에 도입함으로써 체세포에서 직접교차분화인자의 발현을 유도하는 것일 수 있다. 그에 따라, 체세포로부터 희소돌기아교 전구세포가 제조될 수 있다.

[0061] 본 발명에 따라 제조된 희소돌기아교 전구세포는 중추신경계에서 수초 생성에 필수적인 역할을 하고, 희소돌기아교세포, 뉴런 또는 성상교세포로 분화가 가능하므로 수초 손실로 인한 질병의 예방 또는 치료에 적용될 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0063] **실험예 1. iOPCs의 제조**

[0064]

피부 섬유아세포를 10% FBS 배양 배지 내 젤라틴 코팅된 6well 플레이트 위에 3×10^4 cells로 분주하였다. 하루 후에, 섬유아세포를 $6 \mu\text{g/ml}$ 의 프로타민 설페이트를 함유하는 배지에서 OCT4를 발현하는 pMX 레트로바이러스 벡터로 감염시켰다. 감염 24시간 후에, 바이러스 상층액을 제거하고 새로운 배지로 대체하였다. 감염 3일째, 세포들을 화학적으로 변형된 OPC 배지(N2가 보충된 DMEM/F12, 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin), PDGF- α 20ng/ml (Peprotech), FGF-2 10ng/ml (Peprotech))로 바꾸어주었다. OPC 배지에서 추가 배양 12일 후에, OPC 같은 군집을 기계적으로 분리하고 젤라틴 코팅된 플레이트에서 성숙한 iOPC를 선별(picking)하거나 트립신처리하여 계대배양(subculture) 하였다.

[0065]

실험예 2. iOPCs의 분화(in vitro)

[0066]

성숙한 회소돌기아교세포의 제조를 위해서, iOPCs를 OPC 배지의 PDL/laminin-coated 4-well 플레이트에 플레이팅하였다. 그 다음날, 배지를 회소돌기아교세포 분화 배지 1(N2가 보충된 DMEM/F12, 페니실린/스트렙토마이신, FGF-2 10ng/ml(Peprotech), forskolin 10mM(Sigma))로 교체하고 4-5일간 유지하였다. 첫 번째 분화단계 이후에, 세포를 회소돌기아교세포 분화 배지 2(30ng/ml 3, 3, 5-tri-iodothyronine(T3; Sigma), 20ng/ml ascorbic acid (AA; Sigma))로 처리하였다.

[0067]

실험예 3. 레트로바이러스 생산

[0068]

OCT4를 발현하는 pMX 기반의 레트로바이러스 벡터를 VSV-G 유사유형 바이러스의 패키징인 X-tremeGENE9 DNA 형질감염 시약(Roche)을 이용하여 293T 세포(ATCC, CAT #. CRL-3216)로 함께 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후에, 바이러스를 함유하는 상층액을 수집하고 $0.45 \mu\text{m}$ 주사기 필터(syringe filter)에 여과하여 바이러스를 수확하였다.

[0069]

실험예 4. 정량 실시간 PCR

[0070]

DNA가 없는 전체 RNA를 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 추출하였다. 반응 당 총 500ng의 RNA를 이용하여 SuperScript® III 역전사효소(Invitrogen)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 총 부피 20ul로 LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix (Roche)을 이용하여 주형으로 사용하였다. OPCs 마커 유전자와 만능줄기세포 및 신경 마커에 대하여 실험은 3회 반복하여 실시하였고 항존유전자(housekeeping gene) Gapdh로 정상화하였다. 유전자 발현은 Ct 값 계산 방법으로 측정하였다. 모든 실험은 제조업체의 설명에 따라서 수행하였다.

[0071]

실험예 5. 면역세포화학 분석

[0072]

세포를 4% 파라-포름알데하이드(para-formaldehyde)에서 10분간 고정하고 0.1% Triton X-100으로 10분동안 처리하여 투과성으로 만들었다. 세포는 4% FBS 블라킹(blocking) 용액에서 30분간 배양하고 그 뒤에 블라킹 용액으로 희석시킨 1차 항체에서 상온으로 1시간동안 배양하였다 Oligo2 (Santacruz, 1:200), PDGF- α (Abcam, 1:500), A2B5 (Millipore, 1:500), NG2 (Millipore, 1:200), O4 (Millipore, 1:400), RIP (DSHB, 1:200), GalC (Chemicon, 1:200), GFAP (Sigma, 1:500). 1차 항체 배양 후에, 세포는 PBST(0.05% tween20)로 3회 세척하였다. 2차 항체를 PBS로 희석하고 1시간동안 세포와 함께 배양하였다(Alexa Fluor 488/568 anti-mouse IgG1, IgG3, IgM, anti-goat IgG (Invitrogen, 1:1000)). 핵은 Hoechst 33342 (Thermo)을 이용하여 10초간 염색하였다. 실험에서 사용한 1차 항체는 표 1에 정리하였다.

표 1

[0073]

Antibody	Source	Isotype	Dilution	Localization
Oligo2	Santacruz	Goat IgG	1:200	Nucleus
PDGFR- α	Abcam	Mouse IgG	1:200	Receptor
A2B5	Millipore	Mouse IgM	1:500	Cell surface
NG2	Millipore	Mouse IgG	1:100	Cell surface
O4	Millipore	Mouse IgM	1:200	Cell surface
RIP	DSHB	Mouse IgG1	1:200	Cell surface

MBP	Millipore	Mosue IgG2a	1:100	Myelin membrane
GalC	Millipore	Mosue IgG3	1:200	Cytoplasm
GFAP	SIGMA	Mouse IgG1	1:500	Cytoplasm

[0074] **실험예 6. 피부 섬유아세포의 준비**

[0075] 피부 섬유아세포를 분리하고 MEF 배지(Dullbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, nonessential amino acids, L-glutamine, penicillin/streptomycin, mercaptoethanol)에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

[0076] **실험예 7. RT-PCR 및 면역세포화학에 의한 섬유아세포의 특성 확인**

[0077] Taq DNA 중합효소 재조합체(Invitrogen)를 이용하여 35사이클 동안 RT-PCR을 수행하였다. 면역세포화학을 위해서, 세포를 4% PBS(pH 7.4) 내 파라-포말데하이드(para-formaldehyde)에서 10분간 고정하고 0.1% Triton X-100으로 10분동안 처리하여 투과성으로 만들었다. 세포는 4% FBS 블라킹(blocking) 용액에서 30분간 배양하고 그 뒤에 블라킹 용액으로 희석시킨 1차 항체에서 상온으로 1시간 동안 배양하였다. Oct4 (Santacruz, 1:200), Sox2 (Santacruz, 1:400), Olig2 (Santacruz, 1:200), Pax6 (DSHB, 1:200), O4 (Millipore, 1:400), RIP (DSHB, 1:200), GFAP (Sigma, 1:500). 1차 항체 배양 후에, 세포를 세척하고 2차 항체에서 1시간 동안 배양하였다 (Alexa Fluor 488/568 anti-mouse IgG1, IgG3, IgM, anti-goat IgG (Invitrogen, 1:1000)). 핵은 Hoechst 33342 (Thermo)을 이용하여 10초간 염색하였다.

[0078] **실험예 8. 정량적인 실시간 PCR을 통한 OCT4 이식유전자의 사일런싱 확인**

[0079] 전체 RNA를 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 추출하였다. 반응 당 총 500ng의 RNA를 SuperScript® III 역전사효소(Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 PCR 분석은 총 부피 20ul로 LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix (Roche)을 이용하여 수행하였다. 실험은 3회 반복하여 실시하였고 항존유전자(housekeeping gene) GAPDH로 정상화(normalize)하였다. 유전자 발현은 Ct 값 계산 방법으로 측정하였다.

[0080] **실험예 9. 마이크로어레이 분석**

[0081] 마이크로어레이 분석을 이용하여 섬유아세포, OCT4 감염 3일 후의 섬유아세포 (fibroblasts-day3), OCT4 감염 10일 후의 섬유아세포 (fibroblasts-day10), 대조군(감염없이 OPC 배지에서 배양한 섬유아세포), iOPC-C1, iOPC-C2의 전체적인 유전자 발현을 프로파일 하고 이전에 발표된 데이터의 bona fide OPC 샘플과 비교하였다. 전체 RNA는 제조업체의 지시에 따라 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 분리하였다. 샘플은 Affymetrix array와 혼성화 하였다. RMA (Robust Multi-array Analysis) 알고리즘으로 계산하여 정상화하였다. 데이터 처리 및 그래픽은 내부에 개발된 Matlab으로 수행하였다. 유전자 및 샘플의 계층 클러스터링은 one minus correlation metric and the unweighted average distance (UPGMA) linkage 방법으로 수행하였다.

[0082] **실험예 10. 척수 손상 및 이식**

[0083] 척수 손상 모델은 6주령의 남성 쥐에 척수의 가슴등뼈 level 9(T9)에 손상을 주기 위한 공기 펀치 장치를 이용하여 제작하였다. 손상 1주 후에, 수확한 iOPCs를 DiI으로 표지하고 1×10^5 iOPCs/rat 농도로 정위 고정방법(stereotaxic)으로 척수의 가슴등뼈 level 8(T8) 및 가슴등뼈 level 10(T10)에 각각 주입하였다. 쥐에게 규칙적으로 물과 음식을 제공하고 배뇨 작용을 위해 방광을 마사지 해주었다. 동물 실험 과정은 동물 시설(animal facility) 및 울산과학기술대학교의 IBR 위원회에서 승인받았다. 동물 실험 과정은 동물연구에 대한 미국국립보건원의 지침을 기반으로 하였다.

[0084] **실험예 11. 조직학적 과정 및 면역조직화학 분석**

[0085] 이식 12주 후에 쥐를 마취하고 PBS를 관류(perfuse)시켰다. 척수는 4% 파라폼알데하이드로 밤새 고정시키고 알코올 및 자일렌의 단계적 농도를 거쳐 탈수시켰다. 조직은 파라핀 블록에 넣고 사상면(sagittal) 및 관상면(coronal) 방향으로 4um 두께로 연속하여 분할하였다. 분할된 부분은 0.25% Triton X-100로 투과성으로 만들고 비특이적인 결합 부위에 대하여 10% 블라킹 용액으로 블라킹하였다. 면역조직화학 분석을 위해, 분할된 부분은 일차 항체로 배양하였다 PDGF- α (Abcam, 1:100), O4 (Millipore, 1:100), RIP (DSHB, 1:100), GFAP (Sigma, 1:100), MBP (Millipore, 1:100). 그 후 척수 부분은 이차 항체로 염색하였다. 형광 이미지는 Olympus microscope equipment IX81-ZDC로 시각화 하였다.

[0086] **실험결과**

[0087] **1. OCT4 단독의 성체 섬유아세포로부터 iOPCs 제조 확인**

[0088] 도 1a의 분화 유도 과정에 따라 OPCs로의 운명 변화를 유도하기 위해 OCT4 전사 인자를 암호화하는 레트로바이러스(retrovirus)를 피부 섬유아세포에 감염시켰다. 도 1b에서 확인할 수 있는 바와 같이 감염되지 않은 섬유아세포는 유도 전까지 전형적인 섬유아세포의 형태를 나타내었다. 분리된 섬유아세포는 만능분화세포 유전자 및 신경 계통 유전자를 발현하지 못하였고, 면역염색을 통하여도 만능줄기세포 또는 신경 세포 군집을 확인할 수 없었다. 섬유아세포의 형태는 신경교세포 유도 배지에 OCT4 투입 후 25일부터 더 작아지고 신경 세포 같은 모양으로 변화하였으나, OCT4를 투입하지 않은 대조군 세포는 변화가 없었다(도 1b의 D 및 C). iOPC 같은 세포의 발생을 증가시키기 위해, OPCs에 필수적인 성장 인자인 PDGF-AA가 보충된 특정 배양 배지에 배양하였다. 투입 30일 후에, 신경 세포 같은 형태의 세포를 기계적으로 분리하고 특정 OPC 배지에서 신경교세포 유도를 계속하였다. 그 결과 OPC 배지에서 배양 20일 후에 iOPC 집합체(iOPC aggregates, iOPC-Ag)를 확인하였다(도 1b의 E). 다음, iOPC-Ag를 젤라틴으로 코팅된 플레이트로 옮겼을 때 iOPC 같은 무리(cluster)를 형성하였고(도 1b의 F), iOPC 같은 세포는 부착 후에 상기 무리로부터 벗어났다(도 1b의 G). PCR을 이용하여 iOPC의 기주 DNA로 OCT4 유전자가 전이되어 통합되었음을 확인하였다. 상기 전이된 유전자의 침묵(silencing)을 확인하기 위하여, 실시간 PCR을 이용하여 OCT4의 mRNA 수준을 확인하였다. 게다가, 상기 iOPCs는 바이러스 감염(viral induction)으로 세포 운명 전환 후에 염색체의 정상 핵형(karyotype)을 유지하였다. 이를 통하여, OCT4는 섬유아세포로부터 iOPCs의 초기 운명 전환에 충분한 것을 입증하였다.

[0089] **2. OCT4에 의해 유도된 iOPCs의 자가 분열 및 OPCs 특성 확인**

[0090] OCT4에 의해 유도된 iOPCs의 계통 및 전구체로서의 미성숙 상태를 확인하기 위하여, PDGFR- α , NG2, A2B5 및 Olig2의 OPC 마커로 면역세포화학(immunocytochemical) 분석을 수행하였다. 상기 마커들은 모든 iOPCs에서 발현하였고, 이중 면역염색(double-immunostaining)을 통하여 상기 마커들이 공통적으로 발현되는 것을 확인하였다.

[0091] 안정적으로 균일하게 증식하는 2개의 iOPC 클론을 얻었다. 2개의 클론 모두 자신의 특성 및 형태의 변화없이 31 패시지 이상까지 확장가능하였다(도 1d). 성장 특성을 평가하기 위해, iOPCs의 평균 배가 기간(doubling time)을 측정하였다(도 1e). 성장 곡선(growth curve)은 iOPCs의 자가분열 능력을 나타낸다. 성장률(Growth rate)은 31 패시지 이상의 늦은 패시지까지 유지되었다.

[0092] **3. 다분화능 iOPCs의 신경교 제한적 체세포의 줄기세포로서 성숙한 회소돌기아교세포 및 성상교세포로의 분화**

[0093] iOPC 클론이 신경교 계통 제한적이고 균질의 전구체임을 평가하기 위하여, iOPCs에서 GFAP (성상교세포), Tuj1 (미성숙 뉴런), RIP (성숙한 회소돌기아교세포) 마커 발현을 확인하였다. GFAP 양성 성상교세포는 검출되지 않거나 분화되지 않은 iOPCs 사이에는 거의 존재하지 않았다(도 2a의 A). iOPCs가 신경교 계통에 제한적인지 확인하기 위하여, 세포를 분화되지 않은 iOPCs에서는 발현되지 않는 신경 마커인 Tuj1으로 염색하였다(도 2a의 B). 게다가, 분화되지 않은 iOPC에서 늦은 단계의 회소돌기아교세포 마커인 RIP는 확인되지 않았다. 이러한 결과를 통하여 iOPCs는 균일한 개체군임을 확인하였다(도 2a의 C).

[0094] iOPCs는 신경교 계통의 세포 유형으로 분화할 수 있는 다분화능 줄기세포이다. iOPCs의 다분화능을 확인하기 위하여, iOPCs에 분화를 유도하여 iOPCs가 성숙한 회소돌기아교세포 또는 다른 신경교 세포 유형으로 분화하는 능력이 있는지 알아보았다. 분화되지 않은 iOPCs는 PDL/Laminin-coated 플레이트에 회소돌기아교세포의 성숙을 촉진하는 forskolin, ascorbic acid 및 T3가 보충된 분화 유도 배지와 함께 플레이트링한 후에 즉시 변화하였다(도

2b의 D). 분화 5일간 작은 가지와 함께 점차적으로 납작해지는 형상으로 변화하였다(도 2b의 E). 16일까지, 희소돌기아교세포의 성숙한 형상을 더 많이 확인하였고, 분화된 성상교세포와 함께 존재하였다(도 2b의 F). 분화 후에 희소돌기아교세포 마커인 O4 및 성상교세포 마커인 GFAP로 염색하여, 희소돌기아교세포와 성상교세포가 함께 존재하는 것을 확인하였다(도 2c의 G 내지 L). 그러나, 이러한 iNSCs의 희소돌기아교세포 분화 가능성은 사용한 전사인자에 따라 달라지고, 효율은 상대적으로 낮다. *OCT4*-iOPC의 분화 효율을 평가하기 위하여, O4, GFAP, *Tuj1*, 및 A2B5로 염색하여 분화 후에 iOPCs의 비율을 분석하여, 성숙하는 동안에 분화 진행을 확인하였다. 게다가, iOPCs는 성상교세포 및 뉴런 조건으로 유도할 때 신경교 제한적 특성을 나타내었다. iOPCs는 성상교세포로 효율적으로 분화하는 것에 반하여 *Tuj1* 양성 뉴런으로는 분화하지 못하였다. 이러한 결과를 통하여 신경교 계통 제한적 iOPCs는 성상교세포 뿐만 아니라 희소돌기아교세포로의 분화할 수 있는 다분화능이 있다는 것을 입증하였다.

[0095]

iOPCs가 늦은 단계의 성숙한 희소돌기아교세포로 완전히 분화하였을 때, 분화되지 않은 iOPCs는 RIP를 발현하지 못하는데(도 2a의 C) 반하여, RIP, GalC, 및 MBP와 같은 단백질 마커를 발현하였다(도 2d의 M 내지 R). 게다가, 이러한 결과를 통하여 균일한 *OCT4*-iOPCs는 희소돌기아교세포로의 분화할 수 있는 다분화능이 있다는 것을 입증하였다.

[0096]

4. iOPCs의 OPCs 전체적인 유전자 프로파일 발현 확인

[0097]

섬유아세포와 iOPCs의 전체적인 유전자 발현 양상을 평가하기 위하여, 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 2개의 확립된(established) iOPC 클론의 유전자 발현 패턴은 만능줄기세포에서 유도된 OPCs와 매우 유사하였다(도 3a). 이와 대조적으로, 섬유아세포와 대조군(Mock)(*OCT4* 유도 없이 OPC 배지에서 배양된 섬유아세포)에서는 전체적인 유전자 발현이 반대 패턴임을 확인하였다. 게다가, *OCT4* 유도 없이 OPC 배지에서만 배양한 섬유아세포에서 특별한 변화를 확인할 수 없었다. 이러한 결과를 통하여, *OCT4*가 iOPC로의 세포 운명 전환에 필수적인 것을 확인하였다. 마이크로어레이 데이터의 Pairwise scatter plot을 통하여 섬유아세포와 iOPCs 사이의 유사성, OPC(bona fide)와 iOPCs사이의 유사성을 확인하였다(도 3b). 3D PCA 분석 및 계층 클러스터링(hierarchical clustering)를 통하여, iOPC 및 OPCs(bona fide)는 섬유아세포와 비교하여 밀접한 연관성이 있다는 것을 입증하였다(도 3d 및 3e). 다음으로, 실시간 PCR(real-time PCR)을 이용하여 OPC 특이적인 유전자 발현을 확인하였다(도 3c). 마이크로어레이 데이터와 일치하게, iOPCs는 *PTPRZ1*, *SIAT8A*, *OLIG2*, *OLIG1*, *SOX10*, *NKX2.2*, *MAG*, *MYRF* 및 *CNP* 와 같은 OPC 특이적인 유전자의 mRNA를 높은 수준으로 발현하였다. 전환 후에 발현이 증가한 유전자를 확인하기 위하여, 섬유아세포와 비교하여 iOPCs에서 발현이 증가한 희소돌기아교세포 및 신경계 발달과 관련된 68개의 유전자를 확인하였다.

[0098]

5. iOPCs에 의한 척수 손상된 쥐의 회복력 증가 확인(in vivo)

[0099]

In vivo에서 iOPCs의 기능적인 특성을 확인하기 위하여, 척수 손상 모델인 성체 쥐에 세포 이식을 수행하였다. 척수 손상 1주 후까지, iOPCs를 손상받은 척수에 주입하였고 12주까지 관찰하였다. 손상 부위의 회복을 확인하기 위하여, 척수 부분에 H&E 염색을 수행하였다. iOPCs가 주입된 군은 대조군과 비교하여 손상된 부분의 손상된 조직이 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 4a). 면역조직화학 염색을 수행하여 이식된 세포의 생착(engraftment)를 확인하였다. 이식된 골수에서 O4, MBP 및 GFAP 양성 세포가 많이 확인된 반면, 섬유아세포를 이식한 쥐에서는 거의 확인할 수 없었다(도 4b의 C 내지 H). 회복된 척수 세포에서, 손상 부위를 A2B5, O4, MBP 및 GFAP와 같은 희소돌기아교세포 마커로 염색하였다(도 4c의 I 내지 K'). A2B5 및 O4 양성 세포는 MBP를 공통 발현하였으나 GFAP 양성 세포는 MBP를 발현하지 못하였다. 이를 통하여, 이식된 iOPCs는 수초-형성 희소돌기아교세포 또는 GFAP 양성 성상교세포 중 하나로 분화할 수 있다는 것을 입증하였다. 종양유전자의 우려를 배제하기 위하여, 마우스에 iOPCs를 주입하고, 주입 후 8개월까지 종양이 발생하는지 확인하였다. 그 결과, iOPCs 이식은 종양의 발생 없이 척수에서 수초형성을 회복시키고 척수 손상 모델 쥐에서 손상된 부분을 회복시키는 것을 입증하였다.

[0100]

6. 직접교차분화인자 *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 중 단일유전자 하나만으로 제작한 iOPCs의 유전자발현 확인

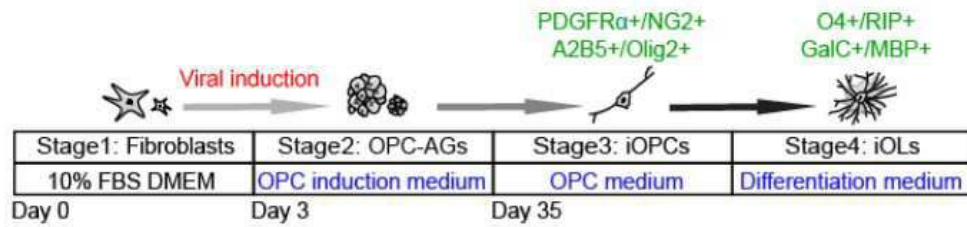
[0101]

신경계발달에 중요한 유전자 *SOX1*, *SOX2*, *SOX10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* 중 하나의 단일유전자만을 이용하여

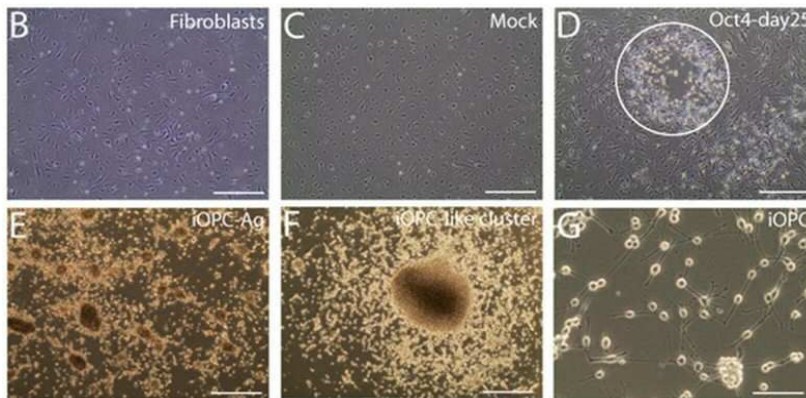
iPSCs를 유도하였다. 각 유전자로 제작한 iOPCs의 OPC 특이적인 유전자의 mRNA 발현을 확인한 결과 *PTPRZ1*, *NKX2.2*, *OLIG2*, *OLIG1* 및 *SOX10*의 발현이 높게 발현하는 것을 확인하였다(도 6).

도면

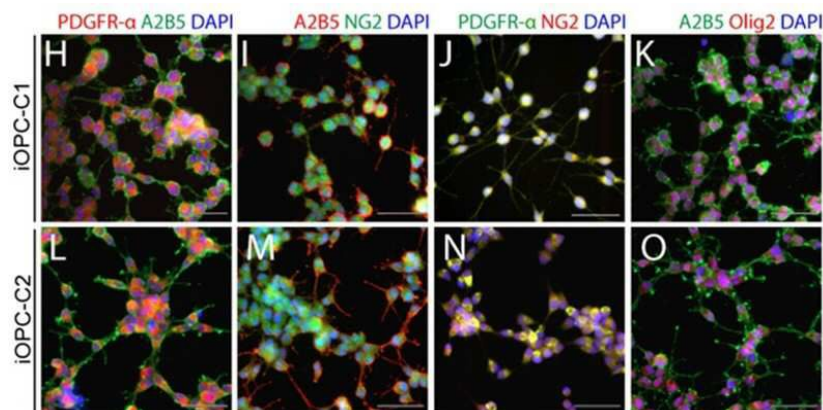
도면1a



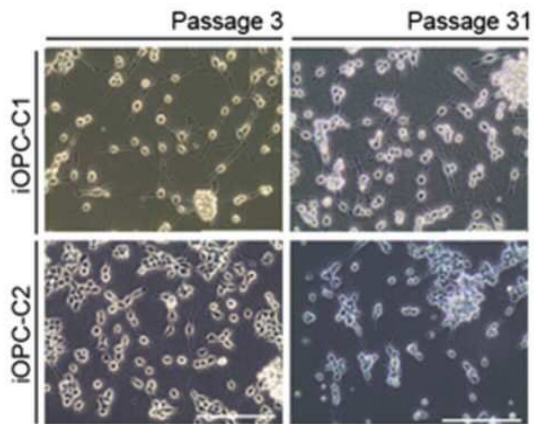
도면1b



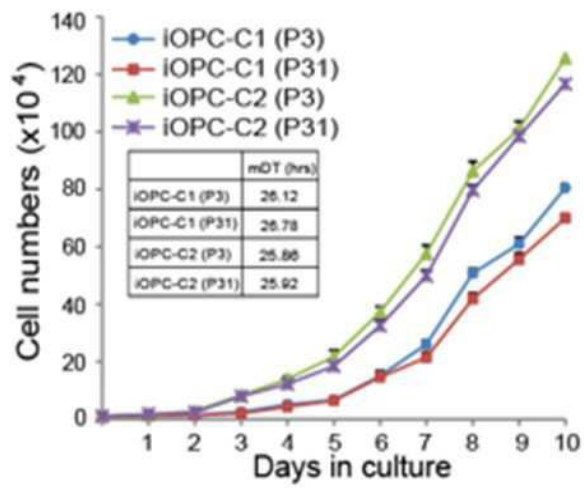
도면1c



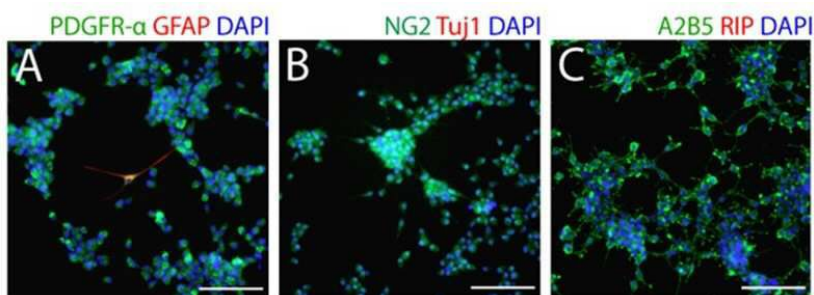
도면1d



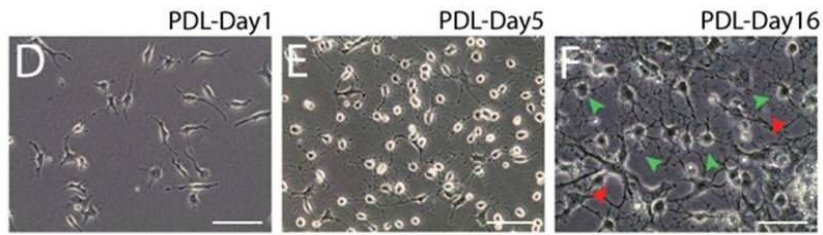
도면1e



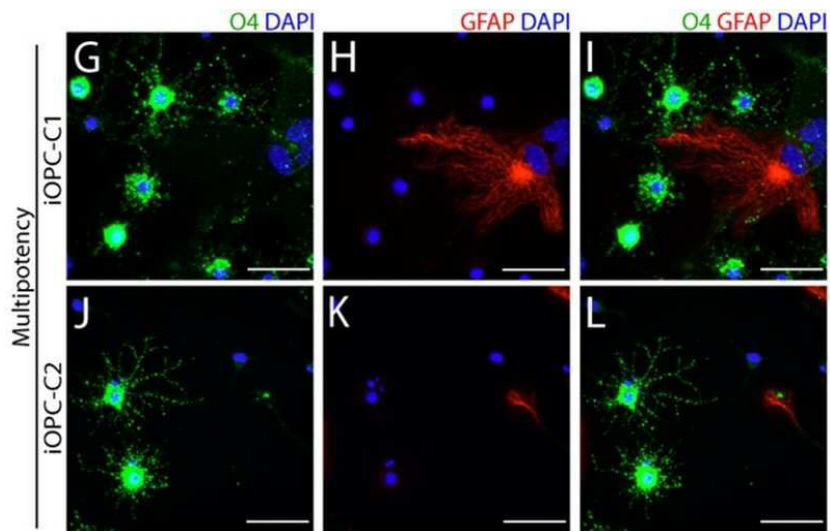
도면2a



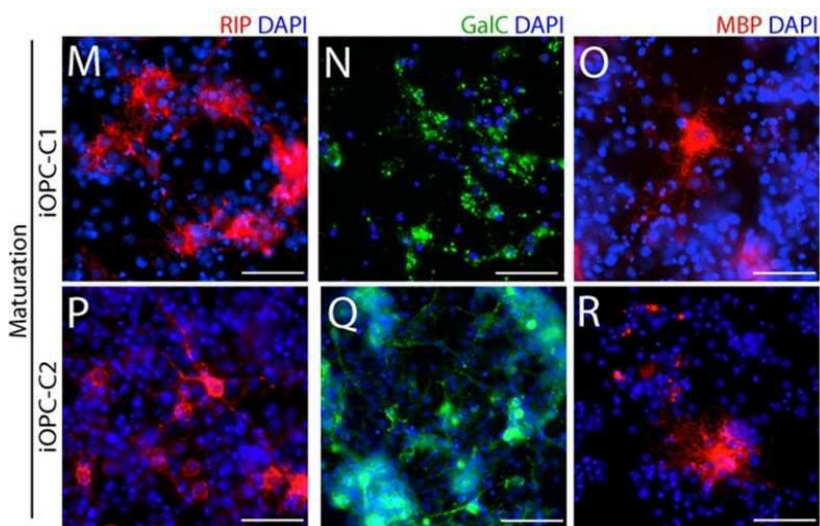
도면2b



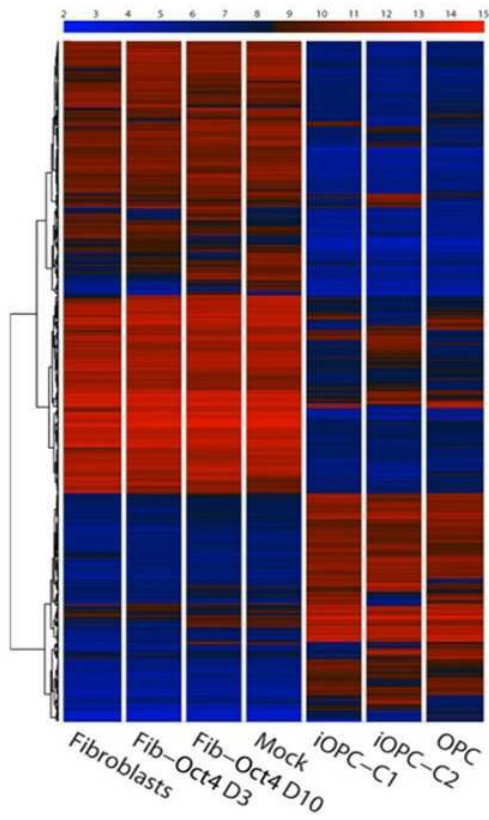
도면2c



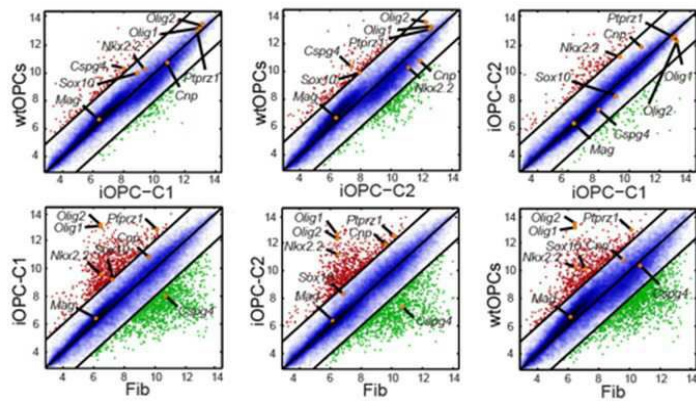
도면2d



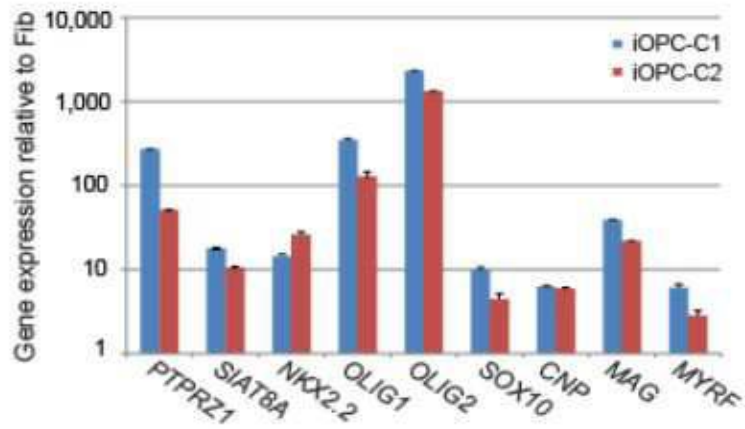
도면3a



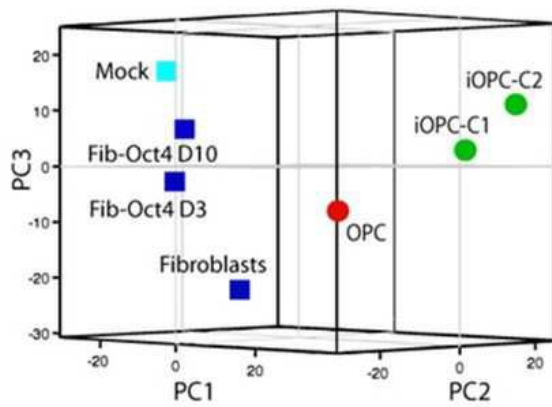
도면3b



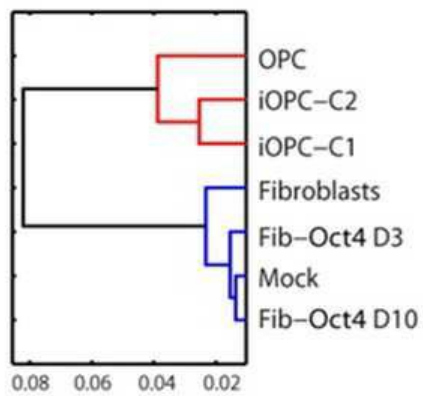
도면3c



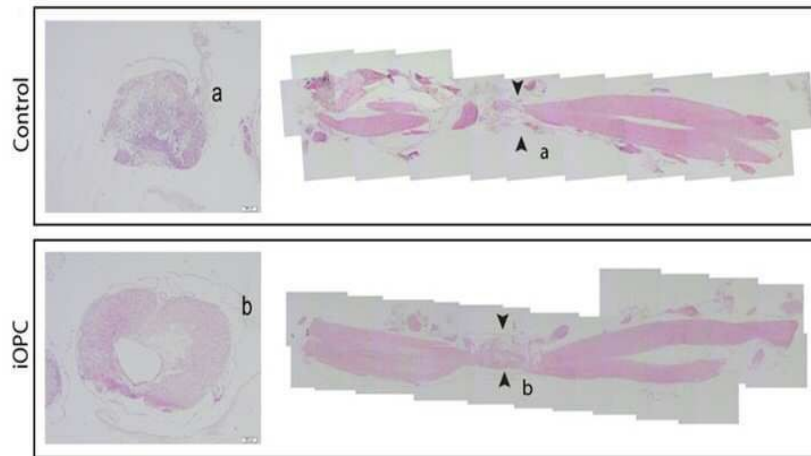
도면3d



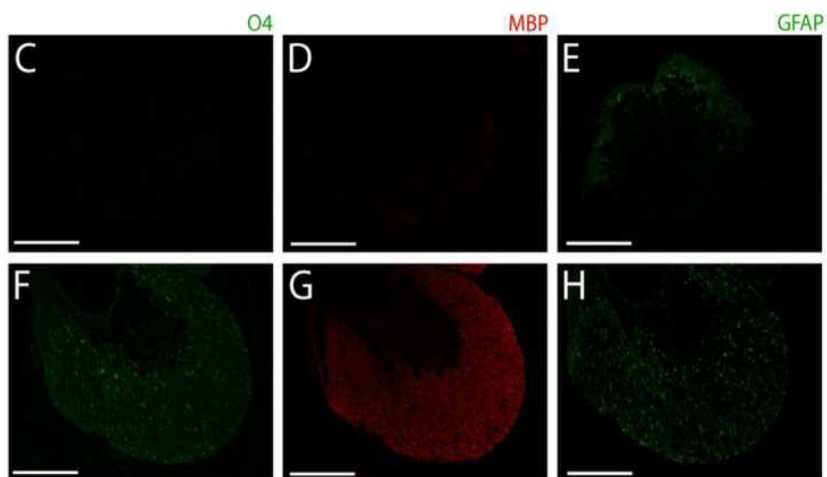
도면3e



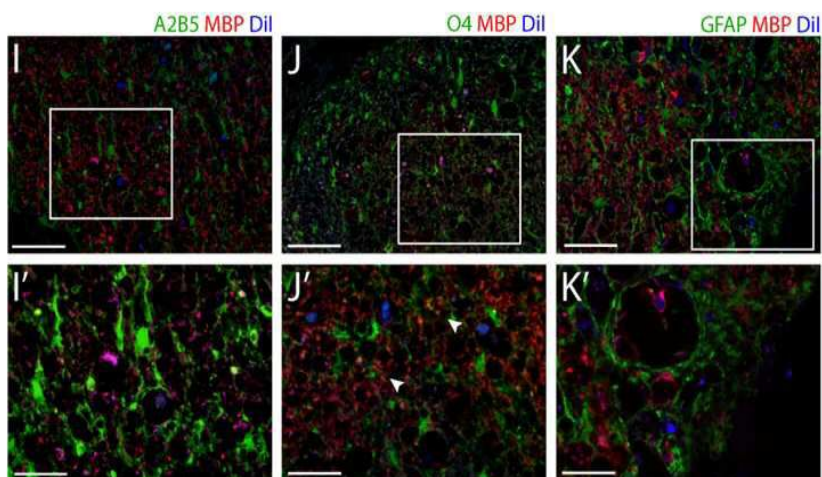
도면4a



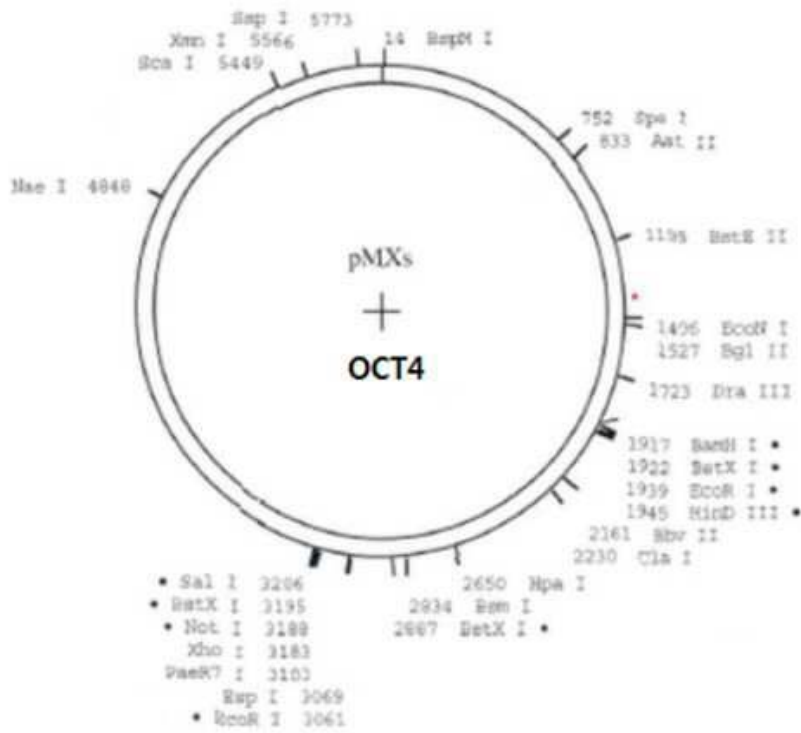
도면4b



도면4c



도면5



도면6

