



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월05일
 (11) 등록번호 10-1834687
 (24) 등록일자 2018년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) **A61K 35/18** (2015.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/0641 (2013.01)
A61K 35/18 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-7027550(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2016년09월15일
 심사청구일자 2016년10월05일
 (85) 번역문제출일자 2016년10월05일
 (65) 공개번호 10-2016-0121592
 (43) 공개일자 2016년10월19일
 (62) 원출원 특허 10-2012-7009225
 원출원일자(국제) 2010년09월15일
 심사청구일자 2014년11월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2010/065903
 (87) 국제공개번호 WO 2011/034073
 국제공개일자 2011년03월24일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2009-213645 2009년09월15일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2009511081 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고쿠리츠다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠
 일본, 도쿄, 분쿄구, 혼고 7-쵸메 3-1
 (72) 발명자
에토 고지
 일본 606-8507 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와
 하라쵸 53 교토다이가쿠 아이피에스 사이보 갱큐
 쇼
다카야마 나오야
 일본 606-8507 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와
 하라쵸 53 교토다이가쿠 아이피에스 사이보 갱큐
 쇼
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 9 항

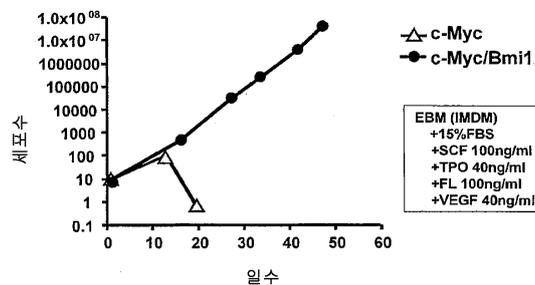
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **분화 세포의 신규 제조법**

(57) 요약

본 발명은, 원하는 분화 단계의 세포를 증폭시켜 특정한 세포를 제조하는 방법의 제공을 목적으로 한다. 본 발명은, 세포를 분화 유도하여 특정한 세포를 제조하는 방법으로서, 원하는 분화 단계의 세포를 증폭시키기 위해, 상기 원하는 분화 단계의 세포 내에서 암유전자를 강제 발현시켜 특정한 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 또한, 상기 원하는 분화 단계의 세포 내에서 발현되는 암유전자가 유도하는 암유전자 유도성 세포 노화(OIS)를 억제하여 특정한 세포를 제조하는 방법도 제공한다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

C12N 5/0644 (2013.01)
C12N 2501/40 (2013.01)
C12N 2501/48 (2013.01)
C12N 2501/60 (2013.01)
C12N 2501/606 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)

(72) 발명자

나카무라 소

일본 113-8654 도쿄도 분쿄구 혼고 7 초메 3-1 고
쿠리츠다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠 나이

나카우치 히로미츠

일본 113-8654 도쿄도 분쿄구 혼고 7 초메 3-1 고
쿠리츠다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠 나이

명세서

청구범위

청구항 1

적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,

적혈구 전구세포에 있어서, (i) MYC 패밀리 유전자와 HOXA2(Homeobox A2) 유전자 또는 (ii) MYC 패밀리 유전자와 BCLXL(B-cell lymphoma extra large) 유전자를 강제 발현시켜 상기 세포를 배양하여 증식시키는 공정과, 상기 증식시킨 세포를 적혈구 세포로 분화시키는 공정을 포함하는 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 분화시키는 공정은, 상기 (i) MYC 패밀리 유전자와 HOXA2(Homeobox A2) 유전자 또는 (ii) MYC 패밀리 유전자와 BCLXL(B-cell lymphoma extra large) 유전자의 강제 발현을 억제하거나, 또는, 상기 (i) MYC 패밀리 유전자와 HOXA2(Homeobox A2) 유전자 또는 (ii) MYC 패밀리 유전자와 BCLXL(B-cell lymphoma extra large) 유전자를 상기 세포로부터 제거하여, 상기 증식시킨 세포를 배양함으로써 행하는 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 증식시키는 공정 후 상기 증식시킨 세포를 동결 보존하는 공정을 더 포함하고, 상기 동결 보존한 세포를 해동한 후 상기 분화시키는 공정을 행하는 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 적혈구 전구세포는 글리코포린 A(Glycophorin A) 양성의 탈핵전의 세포인 제조 방법.

청구항 5

혈액 제제의 제조 방법으로서,

제1항에 기재된 방법으로 적혈구 세포를 제조하는 공정과,

상기 적혈구 세포를 해당 적혈구 세포의 안정화에 기여하는 성분과 혼합하여 혈액 제제를 얻는 공정을 포함하는 제조 방법.

청구항 6

(i) MYC 패밀리 유전자와 HOXA2(Homeobox A2) 유전자 또는 (ii) MYC 패밀리 유전자와 BCLXL(B-cell lymphoma extra large) 유전자가 도입되어 있는 적혈구 전구세포를 포함하는 세포 집단.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 적혈구 전구세포는 글리코포린 A(Glycophorin A) 양성의 탈핵전의 세포인 세포 집단.

청구항 8

제6항에 기재된 세포 집단을 포함하는 동결 세포 조성물.

청구항 9

(i) MYC 패밀리 유전자와 HOXA2(Homeobox A2) 유전자 또는 (ii) MYC 패밀리 유전자와 BCLXL(B-cell lymphoma extra large) 유전자를 강제 발현시키기 위한 발현 벡터를 포함하는, 적혈구 전구세포 또는 적혈구 세포를 제조하기 위한 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은, 특정 분화된 세포를 제조하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 세포에 관한 것이다. 특히, 본 발명은, 분화된 혈구계 세포를 제조하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 혈구계 세포에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 질환의 치료를 위해 특정한 세포를 필요로 하는 경우, 치료 목적을 달성하는 데 충분한 양의 세포를 확보해야 한다. 그러나, 치료에 이용되는 세포의 충분한 양을 생체로부터 취득하는 것은 어렵기 때문에, 생체외에서, 예를 들어 그 전구세포 등으로부터 목적으로 하는 세포를 분화 유도하여 조제하는 방법 등이 시도되고 있다.

[0003] 혈액 관련 질환을 치료하는 경우 또는 외과적인 치료를 하는 경우, 치료에 이용되는 혈구계 세포가 필요하다. 혈구계 세포 중에서도, 혈액 응고(지혈)를 위해 필수적인 세포인 혈소판, 혈소판 전구체(proplatelet), 그리고 혈소판을 생성하는 세포인 거핵구 세포는 특히 많이 요구되는 세포이다. 특히 혈소판은, 백혈병, 골수 이식, 항암 치료 등에서의 수요가 많아, 안정 공급의 필요성이 높다. 지금까지 혈소판은, 도너로부터의 헌혈에 의해 채취하는 방법 외에, TPO 유사 구조(미메틱스) 체제를 투여하는 방법, 제대혈 또는 골수 세포로부터 거핵구 세포를 분화시키는 방법 등에 의해 확보되어 왔다. 또한, 조혈 줄기 세포 또는 조혈 전구세포를 생체외에서 증폭시켜, 이들의 전구세포로부터 혈구계 세포를 조제하는 방법 등도 시도되고 있다. 예를 들어, 마우스 ES 세포로부터 조혈 줄기 세포주를 수립하는 방법(특허문헌 1), 영장류 동물의 배성(胚性) 줄기세포로부터 조혈계 세포로 분화시키는 방법(특허문헌 2), 또는 조혈 줄기 세포의 미분화성을 유지한 CD34 양성/CD38 음성 세포를 생체외에서 간편하고 안정적으로 증폭시키는 방법(특허문헌 3) 등이 보고되어 있다.

[0004] 그런데, 세포를 분화 유도하는 경우, 다능성 줄기 세포의 유용성은 높다. ES 세포나 iPS 세포 등의 다능성 줄기 세포는, 혈소판 등의 혈구계 세포를 인공적으로 제조하기 위한 소스로서 이용할 수 있다. 최근에는, iPS 세포의 수립에 의해, 재생 의료에서의 세포 요법이 중요한 소스로서 다능성 줄기 세포의 유용성이 한층 더 주목을 받게 되었다. 지금까지, 예를 들어, Takayama 등이 인간 ES 세포로부터 거핵구 세포 및 혈소판을 분화 유도하는 것에 성공하고, 그 결과, 혈소판 수혈의 소스로서 ES 세포로부터 분화시킨 혈소판의 이용의 가능성이 나왔다(특허문헌 4 및 비특허문헌 1). 또한, 발명자들은, iPS 세포로부터의 거핵구 세포 및 혈소판의 조제법을 확립시켜, ES 세포 유래의 혈소판의 수혈에서는 회피하기 어려웠던 백혈구 항원(human leukocyte antigen; HLA) 적합성의 문제를 해결 가능하게 했다. 그리고, 종래, 도너로부터의 헌혈에 의해 공급되었던 혈소판은, 만성적인 도너 부족 등에 의해 충분한 양의 혈소판의 안정 공급이 어려웠지만, 이 점에 관해서도, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 혈소판을 분화 유도시킴으로써 대응 가능하게 생각되었다. 그러나, 지금까지의 방법에서는 iPS 세포 또는 ES 세포로부터 조제되는 혈소판은, 조제되는 양이 적고, 또한, 일련의 공정을 그 때마다 제조하는 방법밖에 없기 때문에, 혈소판의 양적 안정성을 확보하기 위한 효율적인 방법으로 개선하는 것이 요구되고 있다.

[0005] 이러한 거핵구 세포나 혈소판 등의 혈구계 세포의 충분한 양을 안정적으로 공급하기 위해 해결해야 할 문제는, 다른 세포의 공급에 관해서도 이야기 할 수 있는 것이다.

[0006] 원하는 세포를, 세포의 분화 유도에 의해 조제하는 경우라 하더라도, 원하는 세포의 전구세포를 대량으로 조제하는 것은 용이한 것이 아니기 때문에, 최종적으로 분화한 원하는 세포를 충분한 양 확보하는 것은 현단계에서는 어렵다.

[0007] (특허문헌 1) 특허문헌 1 : 일본 특허 공개 제2006-141356호 공보

[0008] (특허문헌 2) 특허문헌 2 : 일본 특허 공개 제2004-350601호 공보

[0009] (특허문헌 3) 특허문헌 3 : 일본 특허 공개 제2006-61106호 공보

[0010] (특허문헌 4) 특허문헌 4 : W02008/041370

[0011] (비특허문헌 1)비특허문헌 1 : Takayama 등, Blood, 111 : 5298-5306 2008

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은, 혈구계 세포에 관하여, iPS 세포로부터 거핵구 및 혈소판을 취득하는 방법을 확립했지만, 이 방법을 임상 응용함에 있어서, 거핵구 및 혈소판을 대량 생성 가능한 방법으로 개선하는 것이 필요하다. 또, 혈소

판의 공급 요구에 신속하게 대응할 수 있고, 또한 안정적인 공급을 가능하게 하는 것도, 장래의 임상 응용을 목표로 하는 데에 있어서는 중요해진다.

- [0013] 따라서, 상기 사정을 감안하여, 본 발명은, 세포를 분화 유도하여 목적으로 하는 세포를 제조하기 위해, 원하는 분화 단계에 있는 세포의 증식능을 높이고 세포수를 증폭시켜, 상기 세포로부터 목적으로 하는 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은, 상기 방법을 사용하여, 원하는 분화한 혈구계 세포를 제공한다. 특히, 본 발명은, 성숙 거핵구 세포나 혈소판의 소스가 되는 혈구계 세포인 증식능이 높은 거핵구 전구세포 및 그 제조방법을 제공한다.
- [0015] 또, 본 발명은, 상기 거핵구 전구세포로부터 대량으로 또한 안정적으로 성숙 거핵구 세포 및 혈소판을 제조하는 방법, 그리고 이러한 방법에 의해 제조되는 성숙 거핵구 세포 및 상기 성숙 거핵구 세포로부터 분화 유도되는 혈소판의 제공을 목적으로 한다.
- [0016] 또, 적혈구 세포에 관해서도 혈소판과 마찬가지로 안정 공급의 필요성이 지적되고 있기 때문에, 본 발명은, 적혈구 세포의 제조방법 및 상기 방법으로 제조되는 적혈구의 제공도 목적으로 한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 혈소판의 전구세포인 성숙 거핵구 세포의 미성숙 상태의 세포인 거핵구 전구세포의 장기간 보존방법의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0018] 발명자들은, 4 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC)에 의해 수립한 iPS 세포와 c-MYC를 제외한 3 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4)에 의해 수립한 iPS 세포의 거핵구 및 혈소판 생성능을 비교한 결과, 4 유전자에 의한 iPS 세포가 유의하게 효율적으로 거핵구 및 혈소판을 생성하는 것을 밝혔다. 또한, 수립시에 도입한 4 유전자의 발현은, iPS 세포의 상태에서는 억제되어 있는 데 비해, 거핵구 분화에 따라 c-MYC 유전자의 재활성화가 유도되어, 거핵구 생성량의 증가에 관여하고 있는 것이 밝혀졌다. 또한, c-MYC 유전자를 강제 발현시킨 다핵화 전의 거핵구 전구세포는, 높은 증식능을 획득하는 것도 밝혀졌다.
- [0019] 또, 일반적으로, c-MYC 등의 암유전자를 세포중에서 과잉 발현시킨 경우, 세포 주기가 항진하여 증식이 활발해진다. 세포는, 이 증식을 스트레스로서 파악하여, 이것을 억제하는 방어 반응(oncogene-induced senescence : OIS 암유전자 유도성 세포 노화)이 유도되어, 과잉된 세포 증식을 억제하는 것이 알려져 있다. 본 발명자들은 또한, 이 현상에 착안하여, 분화 단계에 있는 세포의 OIS를 제어함으로써 특정한 분화한 세포를 대량으로 제조하는 방법을 발견했다.
- [0020] 본 발명은, 이상의 지견에 기초하여 완성된 것이다.
- [0021] 즉, 본 발명은 이하의 (1)~(30)에 관한 것이다.
- [0022] (1) 세포를 분화 유도하여 특정한 세포를 제조하는 방법으로서,
- [0023] 원하는 분화 단계의 세포를 증폭시키기 위해, 상기 원하는 분화 단계의 세포 내에서 암유전자를 강제 발현시키는 특정 세포의 제조방법.
- [0024] (2) 원하는 분화 단계의 세포 내에서 암유전자를 강제 발현시킴으로써 유도되는, 암유전자 유도성 세포 노화를 억제하는 것을 특징으로 하는 상기 (1)에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0025] (3) 상기 암유전자 유도성 세포 노화의 억제가 폴리콤 유전자를 발현시킴으로써 달성되는 상기 (1) 또는 (2)에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0026] (4) 상기 원하는 분화 단계의 세포가, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 분화 유도된 세포인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0027] (5) 상기 원하는 분화 단계의 세포 내에, 외래의 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 도입하여, 상기 암유전자, 또는 상기 암유전자 및 상기 폴리콤 유전자를 강제 발현시키는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0028] (6) 상기 외래의 암유전자 또는 폴리콤 유전자를, 원하는 분화 단계의 세포의 전구세포에 도입하여, 상기 암유전자, 또는 상기 암유전자 및 상기 폴리콤 유전자를 강제 발현시키는 것을 특징으로 하는 상기 (5)에 기재된 특정 세포의 제조방법.

- [0029] (7) 상기 암유전자 및/또는 폴리콤 유전자를, 각각 유도형 프로모터의 하류에 작용 가능하게 연결하여, 상기 암 유전자, 또는 상기 암유전자 및 상기 폴리콤 유전자를 유도적으로 강제 발현시키는 것을 특징으로 하는 상기 (5) 또는 (6)에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0030] (8) 상기 원하는 분화 단계의 세포의 분화를 진행시키기 위해, 상기 원하는 분화 단계의 세포 내의 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 상기 (5) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0031] (9) 상기 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자의 발현 억제가, 각각 억제형 프로모터 하류에 작용 가능하게 연결하여, 상기 유전자의 발현을 억제함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는 상기 (8)에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0032] (10) 상기 암유전자가 MYC 패밀리 유전자인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (9) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0033] (11) 상기 폴리콤 유전자가 BMI1인 것을 특징으로 하는 상기 (3) 내지 (10) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0034] (12) 상기 원하는 분화 단계의 세포의 전구세포가 조혈 전구세포이고, 상기 원하는 분화 단계의 세포가 다핵화 전의 거핵구 전구세포이고, 상기 특정 세포가 성숙 거핵구 세포인 것을 특징으로 하는 상기 (6) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0035] (13) 상기 원하는 분화 단계의 세포의 전구세포가 조혈 전구세포이고, 상기 원하는 분화 단계의 세포가 다핵화 전의 거핵구 전구세포이고, 상기 특정 세포가 혈소판인 것을 특징으로 하는 상기 (6) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0036] (14) 상기 조혈 전구세포가, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 조제된 네트형 구조물 내에 존재하는 것을 특징으로 하는 상기 (12) 또는 (13)에 기재된 특정 세포의 제조방법.
- [0037] (15) 상기 (12) 또는 (14)에 기재된 특정 세포인 성숙 거핵구 세포.
- [0038] (16) 상기 (13) 또는 (14)에 기재된 특정 세포인 혈소판.
- [0039] (17) 상기 (16)에 기재된 혈소판을 유효 성분으로 하는 혈액 제제.
- [0040] (18) 상기 (15) 또는 (16)에 기재된 성숙 거핵구 세포 또는 혈소판을 제조하기 위한 키트.
- [0041] (19) 암유전자가 강제 발현된 원하는 분화 단계의 혈구계 세포.
- [0042] (20) 또한 폴리콤 유전자가 강제 발현된 상기 (19)에 기재된 혈구계 세포.
- [0043] (21) 상기 원하는 분화 단계의 혈구계 세포가, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 분화 유도된 세포인 것을 특징으로 하는 상기 (19) 또는 (20)에 기재된 혈구계 세포.
- [0044] (22) 상기 원하는 분화 단계의 혈구계 세포 내에, 외래의 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 도입하여, 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 강제 발현시키는 것을 특징으로 하는 상기 (19) 내지 (21) 중 어느 하나에 기재된 혈구계 세포.
- [0045] (23) 상기 외래의 암유전자 또는 폴리콤 유전자를, 원하는 분화 단계의 혈구계 세포의 전구세포에 도입하여, 상기 암유전자, 또는 상기 암유전자 및 상기 폴리콤 유전자를 강제 발현시키는 것을 특징으로 하는 상기 (22)에 기재된 혈구계 세포.
- [0046] (24) 상기 암유전자 및/또는 폴리콤 유전자를, 각각 유도형 프로모터의 하류에 작용 가능하게 연결하여, 상기 암유전자, 또는 상기 암유전자 및 상기 폴리콤 유전자를 유도적으로 강제 발현시키는 것을 특징으로 하는 상기 (22) 또는 (23)에 기재된 혈구계 세포.
- [0047] (25) 상기 암유전자가 MYC 패밀리 유전자인 것을 특징으로 하는 상기 (19) 내지 (24) 중 어느 하나에 기재된 혈구계 세포.
- [0048] (26) 상기 폴리콤 유전자가 BMI1인 것을 특징으로 하는 상기 (20) 내지 (25) 중 어느 하나에 기재된 혈구계 세포.

- [0049] (27) 상기 원하는 분화 단계의 혈구계 세포의 전구세포가 조혈 전구세포이고, 상기 원하는 분화 단계의 혈구계 세포가 다핵화 전의 거핵구 전구세포인 것을 특징으로 하는 상기 (23) 내지 (26) 중 어느 하나에 기재된 혈구계 세포.
- [0050] (28) 상기 조혈 전구세포가, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 조제된 네트형 구조물 내에 존재하는 것인 것을 특징으로 하는 상기 (27)에 기재된 혈구계 세포.
- [0051] (29) 상기 (19) 내지 (28) 중 어느 하나에 기재된 혈구계 세포를 포함하는 동결 세포 조성물.
- [0052] (30) 상기 (27) 또는 (28)에 기재된 혈구계 세포인 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 제조하기 위한 키트.

발명의 효과

- [0053] 본 발명에 의하면, 원하는 분화 단계에 있는 세포를 증폭시킬 수 있고, 또한, 상기 증폭된 세포로부터 분화하는 특정한 세포를 대량으로 제조하는 것이 가능해진다.
- [0054] 또한, 본 발명을 분화한 혈구계 세포의 제조에 사용하는 경우, 다능성 줄기 세포로부터, 예를 들어, 거핵구 세포 및 혈소판 등의 혈구계 세포를 안정적으로 또한 대량으로 제조하는 것이 가능해진다.
- [0055] 또, 본 발명에 의해 제조되는 혈구계 세포는 동결 보존이 가능하다. 따라서, 혈구계 세포로서, 예를 들어, 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 제조하면, 이것을 동결 보존할 수 있기 때문에, 동일한 소스의 거핵구 전구세포 유래의 성숙 거핵구 세포 및 혈소판의 공급이 가능해진다.
- [0056] 특히, 본 발명의 방법에 의하면, iPS 세포로부터, 동결 보존 가능한 다핵화 전의 거핵구 전구세포(성숙 거핵구 세포의 전구세포)를 대량으로 조제할 수 있다. 그 결과, 이 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 소스로 하면, HLA 적합성의 문제를 회피하고, 반복 수혈에 충분히 대응할 수 있는 양의 혈소판을 제조하여, 공급하는 것이 가능해진다.
- [0057] 또한, 본 발명에 의해, 적혈구 세포를 인비트로로 안정적으로 공급하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은, 4 유전자 유래의 iPS 세포와 3 유전자 유래의 iPS 세포로부터 생성된 거핵구 세포수를 비교한 그래프. 종축은, 배양후 22일째의 ES 세포 유래의 CD42b 양성 거핵구 세포수를 1로 한 각 세포 유래의 CD42b 양성 거핵구 세포수. 횡축은, iPS 세포 및 ES 세포의 배양 개시로부터의 일수. 3-f는 3 유전자 유래의 세포주, 4-f는 4 유전자 유래의 세포주를 나타낸다. ES는 ES 세포.

도 2는, 인간 iPS 세포 유래 거핵구 세포에서의 도입 유전자의 재활성화의 확인. 4인자 유래의 iPS 세포(TkDA3-2, TkDA3-4 및 TkDA3-5)와 3인자 유래의 iPS 세포(TkDN4-M)에서의 각 도입 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC)의 발현을, 미분화 iPS 세포 및 분화한 거핵구 세포에 대해 확인했다. 또, 유전자 도입의 컨트롤로서, 각 유전자를 도입한 인간 피부 선유아세포(HDF)에 대해서도 그 발현을 확인했다. endo는 내재성의 유전자인 것을, Tg는 도입한 유전자인 것을 나타낸다. 미분화 iPS 세포에 관해서는, REX1 및 NANOG에 대해서도 발현을 확인했다.

도 3은, ES 세포 유래 조혈 전구세포 중에서의 c-MYC 강제 발현에 의한 거핵구 세포수의 증가. 인간 ES 세포의 배양후 15일째의 네트형 구조물로부터 혈액 전구세포를 추출하고, 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC)를 각각 단독으로 도입하여, 그 후 생성되는 거핵구 세포수를 시간의 경과에 따라 카운트했다. 종축은, 바이러스 벡터만을 도입한 조혈 전구세포(mock) 유래의 CD42b 양성 거핵구 세포수를 1로 한 각 세포 유래의 CD42b 양성 거핵구 세포수. 횡축은, ES 세포의 배양 개시로부터의 일수.

도 4는, 4 유전자 유래의 iPS 세포와 3 유전자 유래의 iPS 세포로부터 생성된 혈소판수를 비교한 그래프. 종축은, 배양후 21일째의 ES 세포 유래의 혈소판수를 1로 한 각 세포 유래의 혈소판수. 횡축은, iPS 세포 및 ES 세포의 배양 개시로부터의 일수. 3-f는 3 유전자 유래의 세포주, 4-f는 4 유전자 유래의 세포주를 나타낸다. ES는 ES 세포를 말한다.

도 5는, iPS 세포 유래의 혈소판에 의한 모델 마우스에 대한 수혈 실험. 미리 방사선 조사하여 혈소판 감소 모델의 면역 부전 마우스를 제작했다(A). TkDA3-4주로부터 생성된 혈소판을 면역 부전 마우스의 미정맥을 통해 수혈했다. B는, 수혈후의 시간의 경과에 따른 변화를 나타낸다(30분, 2시간, 24시간). PB; 인간 말초혈

도 6은, 인간 iPS 세포 유래 혈소판의 생체에서의 혈전 형성능의 확인. 인간 iPS 세포 유래 혈소판을, 테트라메틸로다민에틸에스테르(TMRE; 붉은 색소)로 염색하고, 헤마토포피린(hematoporphyrin)과 혼합하여 마우스 미정맥을 통해 주사했다. 장간막 동맥에 대한 레이저 조사후, 0초, 6초, 13초, 20초의 혈관 내에서의 혈전의 형성 상태를 타임랩스 공초점 현미경으로 관찰했다. Blood flow: 혈류

도 7은, ES 세포로부터 조제한 조혈 전구세포에 유전자를 도입하는 프로토콜의 개요를 나타낸다.

도 8은, ES 세포로부터 조제한 조혈 전구세포에 대한 c-MYC 유전자 도입후, 9일째에서의 FACS 해석의 결과를 나타낸다. A는 FACS 해석의 결과. B는 c-MYC 도입후 9일째의 도입 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 컨트롤은 MYC 바이러스 벡터만을 도입한 세포.

도 9는, c-MYC 유전자를 발현시킨 거핵구 전구세포의 증식능을 나타낸다. 종축은 CD42b 양성 세포수. 횡축은 세포에 c-MYC 유전자를 도입하고나서부터의 일수. ■는, c-MYC 대신 바이러스 벡터만을 도입한 컨트롤의 결과.

도 10은, c-MYC 유전자와 BMI1 유전자를 도입한 거핵구 전구세포의 FACS 해석의 결과를 나타낸다. c-MYC/BMI1(상측 도면)은, c-MYC 유전자와 BMI1 유전자를 모두 도입한 세포의 FACS 해석 결과를 나타내고, c-MYC 단독(하측 도면)은, c-MYC 유전자만을 도입한 세포의 FACS 해석 결과를 나타낸다.

도 11은, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 세포에 도입하여, 배양 35일째의 세포의 FACS 해석 결과를 나타낸다. A는, 거핵구의 특이적 기능 분자에 관해 모식적으로 나타낸 도면이다. B는, FACS 해석의 결과를 나타낸다.

도 12는, MYC/BMI1 발현 세포의 증식능을 조사한 결과를 나타낸다. 종축은 세포수를, 횡축은 세포로의 유전자 도입후의 일수를 나타낸다.

도 13은, c-MYC/BMI1 발현 세포 유래의 거핵구 전구세포로부터 방출된 혈소판의 전자 현미경에 의한 관찰 이미지를 나타낸다.

도 14는, c-MYC 유전자 및 HOXA2 유전자, 그리고 c-MYC 유전자 및 BCLXL 유전자를, ES 세포(KhES) 유래 조혈 전구세포에 도입하여, 각각 105일후 및 27일후의 세포에 관해 FACS 해석을 행한 결과를 나타낸다.

도 15는, pMX tet off 벡터에 의한 유전자 발현 제어 시스템의 확인. pMX tet off 벡터에 c-MYC 및 BMI1을, 2A를 사이에 끼워 연결한 콘스트럭트를 293GPG 세포 내에서 발현시켜, 유전자의 발현 제어가 기능하는지를 검토한 결과이다. A는, 벡터의 콘스트럭트 및 작용 메커니즘을 설명한 도면이다. B는, 테트라사이클린 및 β-에스트라디올을, 첨가 또는 비첨가의 상태로, 세포 내에서의 c-MYC의 발현을 플로우사이트미터에 의해 조사한 결과이다. B의 횡축은 c-MYC의 발현량이다. 「293gpg」는 컨트롤의 293GPG 세포의 결과를 나타낸다.

도 16은, 유전자 제어 벡터 발현 세포주의 증식능 및 분화 능력에 관해 검토한 결과를 나타낸다. A는, 각종 벡터에 의해 c-MYC 및 BMI1을 발현시킨 세포의 증식능을 조사한 결과이다. 종축은 세포수를, 횡축은 세포에의 유전자 도입후의 일수를 나타낸다. B는, 항CD42b(GPIb-alpha) 항체 및 항CD41a(Integrin alphaIIb/beta3 복합체) 항체(상단), 항Glycophorin-a 항체 및 항CD41a 항체(하단)로 세포를 염색하여, 플로우사이트미터로 해석한 결과이다. B의 상하 모두, 좌측은 pMX c-MYC 및 Dsam BMI1을 별개로 강제 발현시킨 세포의 결과이고, 우측은 pMX tet off c-MYC 2A BMI1을 발현시킨 세포의 결과이다.

도 17은, β-에스트라디올의 존재하, pMX tet off c-MYC 2A BMI1을 발현시킨 거핵구 세포주의 다핵화의 정도를 검토했다. A는 벡터만(유전자를 발현시키지 않은 주)의 컨트롤의 세포의 결과이고, B는 c-MYC 및 BMI1을 발현시킨 세포의 결과이다.

도 18은, c-MYC 및 BMI1을 강제 발현시킨 거핵구 유래 혈소판에 관하여, 피브리노겐 결합 분석을 행한 결과를 나타낸다. 상단(인간 혈소판)은 인간 말초혈 유래의 혈소판의 결과이고, 중간단(pMX tet off c-MYC 2A BMI1)은 β-에스트라디올의 존재하에서의 pMX tet off c-MYC 2A BMI1주 유래 혈소판의 결과, 하단(pMx Myc Dsam Bmi1)은 pMX c-MYC 및 Dsam BMI1으로, c-MYC 및 BMI1을 강제 발현시킨 주 유래의 혈소판의 결과를 나타낸다.

도 19는, c-MYC 및 BMI1의 발현을 억제한 거핵구주로부터 생성되는 혈소판의 인테그린 활성화능을 조사한 결과를 나타낸다. 좌측 도면은 ADP 부재하에, 우측도는 ADP 존재하(50 μm)에 인테그린 활성화능을 플로우사이트미터에 의해 해석했다.

도 20은, ES 세포로부터의 거핵구계로의 분화 경로를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 본 발명의 실시형태의 하나는, 소스가 되는 세포를 분화 유도하여 특정한 세포를 제조하는 방법으로서, 소스가 되는 세포로부터 특정한 세포로의 분화 도중에서의 원하는 분화 단계의 세포를 증폭시키기 위해(또는 증식시키기 위해), 상기 원하는 분화 단계의 세포 내에서 암유전자를 강제 발현시키는 특정 세포의 제조방법이다.
- [0060] 여기서, 「소스가 되는 세포」로는, 분화 유도를 행하여 얻어지는 목적 세포(여기서는, 특정 세포)의 전구세포에 해당하는 것으로서, 분화능을 유지한 최종 분화한 세포 이외의 세포라면 어떠한 것이어도 좋고, 예를 들어, 완전히 미분화의 다능성 줄기 세포 등이어도 좋고, 또는 어느 정도 분화는 진행되었지만 여전히 분화능을 유지하고 있는 세포(예를 들어, 혈구계 세포의 조혈 전구세포 등)이어도 좋다. 또, 본 실시형태에서 제조되는 「특정한 세포」 또는 「특정 세포」란, 완전 미분화한 세포(예를 들어, 다능성 줄기 세포) 이외의 세포라면, 어느 정도 미분화한 상태를 유지한 세포이어도 좋고, 즉, 완전 미분화한 단계에서 최종 분화한 단계의 사이에 등장하는 세포로서, 완전 미분화한 세포 이외의 세포를 말한다. 예를 들어, 본 실시형태의 「특정한 세포」 또는 「특정 세포」란, 혈구계 세포의 예의 일부를 들면, 성숙 거핵구 세포, 혈소판 또는 적혈구 세포 등을 들 수 있다.
- [0061] 본 실시형태에서 증폭(또는 증식)되는 「분화 단계의 세포」란, 완전 미분화한 단계에서 최종 분화한 단계의 사이에 등장하는 세포로서, 완전 미분화한 단계의 세포(예를 들어, 다능성 줄기 세포 등) 및 최종 분화한 단계의 세포 이외의 세포를 말한다. 예를 들어, 본 실시형태의 「분화 단계의 세포」란, 혈구계 세포의 일례를 들면, 성숙 거핵구 세포의 전구세포인 조혈 전구세포 또는 다핵화 전의 거핵구 전구세포 등을 들 수 있다. 분화 단계의 세포로서, 예를 들어, ES 세포 또는 iPS 세포 등의 다능성 줄기 세포로부터 유도된 세포 등을 사용할 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 사용되는 ES 세포는, 특별히 한정되는 것은 아니고, 일반적으로는, 배반포기의 수정란을 피더 세포와 함께 배양하고, 증식한 내부 세포피 유래의 세포를 흠뜨리고, 또한 계대 배양 조작을 반복하여, 최종적으로 ES 세포주로서 수립할 수 있다. 이와 같이, ES 세포는, 수정란으로부터 취득하는 경우가 많지만, 그 밖에 예를 들어, 지방 조직, 용모막 용모, 양수, 태반, 정소 세포 등, 수정란 이외로부터 취득되고, ES 세포와 유사한 특징을 가지며, 분화 다능성을 갖는 ES 세포형의 세포이어도 좋다.
- [0063] 또, 본 발명에서 사용되는 iPS 세포는, 체세포(예를 들어, 선유아세포나 혈액 세포 등)에 분화 다능성을 부여하는 여러 종류의 전사 인자(이하, 여기서는 「분화 다능성 인자」로 칭함) 유전자를 도입함으로써, ES 세포와 동등한 분화 다능성을 획득한 세포라면 어떠한 유래의 세포이어도 좋다. 분화 다능성 인자로는 이미 많은 인자가 보고되어 있고, 한정은 하지 않지만, 예를 들어, Oct 패밀리(예를 들어, Oct3/4), SOX 패밀리(예를 들어, SOX2, SOX1, SOX3, SOX15 및 SOX17 등), Klf 패밀리(예를 들어, Klf4, Klf2 등), MYC 패밀리(예를 들어, c-MYC, N-MYC, L-MYC 등), NANOG, LIN28 등을 들 수 있다. iPS 세포의 수립 방법에 관해서는 많은 문헌이 발명되어 있기 때문에, 이들을 참고로 할 수 있다(예를 들어, Takahashi 등, Cell 2006, 126: 663-676; Okita 등, Nature 2007, 448: 313-317; Wernig 등, Nature 2007, 448: 318-324; Maherali 등, Cell Stem Cell 2007, 1: 55-70; Park 등, Nature 2007, 451: 141-146; Nakagawa 등, Nat Biotechnol 2008, 26: 101-106; Wernig 등, Cell Stem Cell 2008, 10: 10-12; Yu 등, Science 2007, 318: 1917-1920; Takahashi 등, Cell 2007, 131: 861-872; Stadtfeld 등, Science 2008 322: 945-949 등을 참조할 것).
- [0064] 본 발명에서 사용되는 암유전자란, 그 유전자가 내재하는 세포의 암화를 유도하는 유전자를 말하며, 한정은 하지 않지만, 예를 들어, MYC 패밀리 유전자, SRC 패밀리 유전자, RAS 패밀리 유전자, RAF 패밀리 유전자, c-Kit나 PDGFR, Abl 등의 프로틴 키나아제 패밀리 유전자 등을 들 수 있다.
- [0065] 본 발명에서, 원하는 분화 단계의 세포 내에서의 암유전자 또는 이후에 상세하게 설명하는 폴리콤 유전자의 강제 발현은, 암유전자 또는 폴리콤 유전자를 상기 「원하는 분화 단계의 세포」내에 도입하여 강제 발현시킴으로써 달성되어도 좋고, 또 상기 「원하는 분화 단계의 세포」의 전구세포 내에 이들 유전자를 도입하여 강제 발현시키고, 그 발현을 유지하면서 분화를 진행시켜, 「원하는 분화 단계의 세포」내에서 이들 유전자의 강제 발현 상태를 유지함으로써 달성되어도 좋고, 또한, 상기 「원하는 분화 단계의 세포」의 전구세포 내에 이들 유전자를 도입해 두고, 「원하는 분화 단계의 세포」로 분화했을 때 이들 유전자의 강제 발현을 유도함으로써 달성되어도 좋다. 예를 들어, 원하는 분화 단계의 세포로서 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 증폭시키는 경우에는, 그 전구 단계에 있는 조혈 전구세포(후술)에 암유전자 또는 폴리콤 유전자를 도입하여 강제 발현시켜도 좋다. 원하는 분화 단계의 세포 내에서 암유전자와 폴리콤 유전자를 강제 발현시키는 경우, 암유전자와 폴리콤 유전자는 동시에 세포에 도입해도 좋고, 상이한 타이밍에 도입해도 좋다.
- [0066] 또한, 본 발명의 실시형태에는, 원하는 분화 단계의 세포를 증폭시키기 위한(또는 증식시키기 위한) 방법으로서, 상기 원하는 분화 단계의 세포 내에서 강제 발현시킨 암유전자에 의해 유도되는 암유전자 유도성

세포 노화를 억제하는 것이 포함된다.

- [0067] 암유전자 유도성 세포 노화(oncogene-induced senescence : OIS)란, RAS나 MYC 등의 암유전자에 의한 비정상적인 증식 자극 등에 의해 유도되는 스트레스 유도성 세포 노화를 말한다. 암유전자 산물이 세포 내에서 과잉으로 발현되면, CDKN2a(INK4a/ARF) 유전자좌에 코드되는 p16이나 p19 등의 암억제 유전자 산물의 발현이 유도된다. 그 결과 세포의 노화와 아포토시스가 유도되고, 세포의 증식 활성이 저하된다. 따라서, 암유전자가 유도하는 OIS를 회피하면, 세포의 증식능을 높은 상태로 유지할 수 있는 것이 예상된다.
- [0068] 암유전자 유도성 세포 노화의 억제는, 예를 들어, 암유전자가 발현된 세포 내에 폴리콤 유전자를 발현시킴으로써 달성할 수 있다. 폴리콤 유전자(polycomb group : PcG)는, CDKN2a(INK4a/ARF) 유전자좌를 마이너스로 제어하여, 세포 노화를 회피하기 위해 기능하고 있다(이상, 예를 들어 오구로 등, 「폴리콤군 단백질 복합체에 의한 줄기 세포의 노화 제어」, 재생의료 vol.6. No4 pp26-32; Jseus et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology vol.7 pp667-677 2006; Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.100 pp211-216 2003을 참조할 것). 따라서, MYC 패밀리 유전자 등의 암유전자의 발현에 더하여, 폴리콤 유전자를 세포 내에서 발현시킴으로써 OIS를 회피하여, 암유전자 산물에 의한 세포 증식 효과를 더 높일 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 사용되는 폴리콤군 유전자로는, 예를 들어, BMI1, Me118, Ring1a/b, Phc1/2/3, Cbx2/4/6/7/8, Ezh2, Eed, Suz12, HADC, Dnmt1/3a/3b 등을 들 수 있지만, 특히 바람직한 폴리콤군 유전자는 BMI1 유전자이다.
- [0070] 또한, 암유전자 유도성 세포 노화의 억제는, HOXA2 유전자 또는 BCLXL 유전자의 발현에 의해서도 달성할 수 있다.
- [0071] 암유전자, 폴리콤 유전자를 세포 내에서 강제 발현시키는 경우, 당업자에게 주지인 어떠한 방법에 의해 실시해도 좋지만, 예를 들어, 외래의 암유전자 또는 외래의 폴리콤 유전자를, 예를 들어, 랜치바이러스나 레트로바이러스 등에 의한 유전자 도입 시스템을 이용하여 세포 내에 도입하여 발현시켜도 좋다. 바이러스 유전자 도입 벡터에 의해 유전자 발현을 행하는 경우, 적당한 프로모터의 하류에 상기 유전자를 작용가능하게 연결하여 이것을 유전자 도입 벡터에 삽입하고, 세포 내에 도입하여 목적 유전자를 발현시켜도 좋다. 여기서, 「작용가능」하게 연결한다는 것은, 상기 프로모터에 의해 목적 유전자가 시스에 지배되고, 목적 유전자의 원하는 발현이 실현되도록 프로모터와 목적 유전자를 연결하는 것을 의미한다. 본 발명의 실시에서는, 예를 들어, CMV 프로모터, EF1 프로모터 등을 사용하여 항상적으로 목적 유전자를 발현시켜도 좋고, 또는 테트라사이클린 등의 약제 응답 엘리먼트 등의 트랜스 인자에 의해 활성 제어되는 엘리먼트의 지배하에, 적당한 프로모터(유도형 프로모터)를 배치하여, 예를 들어, 약제 첨가 등의 제어에 의해 목적 유전자를 유도적으로 발현시킬 수도 있다. 이러한 약제에 의한 유전자 발현 시스템은, 암유전자 또는 폴리콤 유전자의 원하는 발현 제어를 실현하기 위해, 당업자가 적당한 시스템을 용이하게 선택할 수 있다. 이러한 발현 시스템을 위한 키트의 시판품을 구입하여 사용해도 좋다. 또, 발현 제어의 목적 유전자인 암유전자, 폴리콤 유전자는, 각각 다른 벡터에 삽입해도 좋지만, 동일한 벡터에 암유전자 및 폴리콤 유전자를 삽입하는 것이 보다 바람직하다.
- [0072] 또, 본 실시형태에는, 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 발현시킨 원하는 분화 단계의 세포를 더 분화 유도하여, 목적으로 하는 특정 세포를 제조하는 방법이 포함된다. 원하는 분화 단계의 세포를 더 분화 유도하기 위해서는, 상기 분화 유도에 적합한 배양 조건(배지, 배양 온도 등의 조건)으로 분화 단계의 세포를 배양하는 것 외에, 필요에 따라, 상기 분화 단계의 세포 내에서 발현된 암유전자 또는 폴리콤 유전자의 발현을 억제적으로 조절해도 좋다. 이 경우, 암유전자, 폴리콤 유전자의 발현의 억제는, 예를 들어, 전술한 유도적인 발현 시스템에 의해 유도되는 발현을 약제 등의 제거에 의해 유전자의 유도를 해제함으로써 달성해도 좋다. 또는, 약제 등이 존재하지 않는 경우에는 항상적인 발현 제어를 행하는 프로모터로서, 약제 존재하에서 억제적인 발현 제어를 행하는 억제형 프로모터에, 암유전자 또는 폴리콤 유전자를 작용가능하게 연결하여, 이들 유전자의 발현을 억제적으로 제어해도 좋다. 또한, 도입한 암유전자, 폴리콤 유전자를 Cre/Lox 시스템 등을 사용하여 제거하고, 이들 유전자의 발현을 억제적으로 제어해도 좋다. 암유전자 또는 폴리콤 유전자의 발현을 억제적으로 조절하기 위해, 시판하는 키트 등을 적절하게 사용할 수도 있다.
- [0073] 본 실시형태에는, 원하는 분화 단계의 세포로서 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 증폭시켜(증식시켜), 다핵화 전의 거핵구 전구세포로부터, 특정 세포로서, 성숙 거핵구 세포를 제조하는 방법이 포함된다. 여기서, 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 다핵화 전의 거핵구 전구세포 내에서 강제 발현시키는 경우, 다핵화 전의 거핵구 전구세포의 전구 단계에 있는 조혈 전구세포 내에서, 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 발현시키는 것이 바람직하다.

- [0074] 본 명세서에서, 「다핵화 전의 거핵구 전구세포」란, 거핵구 계열의 특이적 마커인 CD41a 양성/CD42a 양성/CD42b 양성이며, 핵의 다배체화를 일으키지 않은 단핵 또는 이핵의 세포이다. 또, 「조혈 전구세포」란, CD34⁺ 세포(CD34 양성 세포)로서 특징지워진 조혈계의 세포이며, 예를 들어, ES 세포 또는 iPS 세포 유래의 세포, 특히 ES 세포 또는 iPS 세포로부터 조제되는 네트형 구조물(ES-sac 또는 iPS-sac로도 칭함)로부터 얻어지는 세포(특히, 네트형 구조물로부터 분리된 직후의 세포)가 바람직하다. 여기서, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 조제되는 「네트형 구조물」이란, ES 세포 또는 iPS 세포 유래의 입체적인 주머니형(내부에 공간을 수반하는 것) 구조체이며, 내피 세포 집단 등으로 형성되고, 내부에 조혈 전구세포를 포함하는 것이다. 네트형 구조물의 상체에 관해서는, 예를 들어 TAKAYAMA 등, BLOOD 2008, 111: 5298-5306을 참조할 것.
- [0075] 네트형 구조물을 인간 ES 세포 또는 인간 iPS 세포로부터 조제하기 위해 적합한 세포의 배양 조건은, 이용하는 ES 세포 또는 iPS 세포에 따라 다르지만, 예를 들어, 배지로는, 최종 농도 15%의 FBS를 첨가한 IMDM을 이용하고, 기타 무혈청의 경우에도 적절하게 증식 인자 및 보충제 등을 첨가한 것을 사용할 수 있다. 또한, 네트형 구조물을 효율적으로 형성시키기 위해, VEGF를 0~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 20 ng/ml 정도 첨가하는 것이 좋다. 배양의 환경으로는, 이용하는 ES 세포 또는 iPS 세포의 종류에 따라 다르지만, 예를 들어, 5% CO₂, 36~38℃, 바람직하게는 37℃의 조건을 이용할 수 있다. 네트형 구조물이 형성되기까지의 배양 기간은, ES 세포 또는 iPS 세포의 종류에 따라 다르지만, 피더 세포 상에 뿌리고 나서 14~16일후 정도에 그 존재를 확인할 수 있다.
- [0076] 형성된 네트형 구조물은 여포(濾胞)형 구조로 되어 있고, 내부에는 조혈 전구세포가 농축된 상태로 존재하고 있다. 네트형 구조물의 내부에 존재하는 조혈 전구세포는, 물리적인 수단, 예를 들어 멸균된 체형상 기구(예를 들어, 셀 스트레이너 등)에 통과시킴으로써 분리할 수 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 조혈 전구세포를 본 발명에 사용할 수 있다.
- [0077] 조혈 전구세포 내에서 강제 발현시키는 암유전자는, 전술한 암유전자의 어느 것이어도 좋지만, 특히 MYC 패밀리 유전자가 바람직하고, MYC 패밀리 유전자로는, 예를 들어 c-MYC, N-MYC, L-MYC 등을 들 수 있고, 특히 c-MYC가 바람직하다. 또, 조혈 전구세포 내에서 강제 발현시키는 폴리콤 유전자는, 전술한 폴리콤 유전자의 어느 것이어도 좋지만, 특히 BMI1 유전자가 바람직하다.
- [0078] MYC 패밀리 유전자 등의 암유전자, 및 BMI1 유전자 등의 폴리콤 유전자를 발현시킨 조혈 전구세포는, SCF(10~200 ng/ml, 예를 들어 100 ng/ml), TPO(10~200 ng/ml, 예를 들어 40 ng/ml), FL(10~200 ng/ml, 예를 들어 100 ng/ml), VEGF(10~200 ng/ml, 예를 들어 40 ng/ml) 등의 어느 것 또는 이들 중의 2개 이상을 조합하여 첨가한 조건으로 배양을 행하고, 예를 들어, 유전자 도입후 4~7일 정도에, 높은 증식능을 획득한 다핵화 전의 거핵구 전구세포가 된다. 이와 같이 하여 얻어진 다핵화 전의 거핵구 전구세포는, 세포 증식이 적어도 30~50일 정도, 바람직하게는 50~60일 정도 이상, 보다 바람직하게는 60일 이상은 계속되고, 그 세포수는, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자 도입시의 세포수의 약 1.0×10⁴ 배 이상, 바람직하게는 약 1.0×10⁵ 배 이상, 보다 바람직하게는 약 1.0×10⁶ 배 이상으로까지 증폭시킨다(예를 들어, 도 12를 참조할 것).
- [0079] 본 발명에는, 본 발명의 방법에 의해 제조된 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 혈구계 세포의 분화 유도에 적합한 조건으로 배양하여, 성숙 거핵구 세포, 그리고 혈소판을 생성하는 방법이 포함된다. 여기서 혈구계 세포의 분화 유도에 적합한 조건이란, 예를 들어, TPO, IL-1α, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, Flt3 리간드, 헤파린 등의 어느 것 또는 이들 중의 2개 이상을 조합하여 첨가한 조건을 들 수 있다. 성숙 거핵구 세포 및 혈소판을 분화 유도하는 경우에는, 예를 들어, TPO(10~200 ng/mL, 바람직하게는 100 ng/mL 정도)의 존재하에, 또는, TPO(10~200 ng/mL, 바람직하게는 100 ng/mL 정도), SCF(10~200 ng/mL, 바람직하게는 50 ng/mL 정도) 및 헤파린(10~100 U/mL, 바람직하게는 25 U/mL 정도)의 존재하에, 7~15일 정도 배양할 수 있다. 배양 환경으로는, 생체외에서 혈구계 세포의 분화 유도를 행함에 있어서 적합한 환경이면 되지만, 예를 들어 5% CO₂, 36~38℃, 바람직하게는 37℃의 조건하에서 배양을 실시한다.
- [0080] 암유전자 및 폴리콤 유전자를 도입하여 높은 증식능을 획득한 다핵화 전의 거핵구 전구세포를, 성숙 거핵구 세포 및 혈소판 등으로 분화 유도하는 경우, 전술한 바와 같이, 필요에 따라서, 암유전자 및 폴리콤 유전자의 발현을 억제적으로 제어해도 좋다.
- [0081] 본 발명의 다른 실시형태는 적혈구 세포를 제조하는 방법에서, 적혈구 전구세포를 증폭시키기 위해, 조혈 전구세포 내에 암유전자 및 HOXA2 유전자 또는 BCLXL 유전자를 강제 발현시켜 적혈구 세포를 제조하는 방법이다. 보

다 구체적으로는, 본 실시형태는, MYC 패밀리 유전자 등 암유전자를, 원하는 분화 단계의 세포인 적혈구 전구세포 내에서 강제 발현시켜, 그 결과 유도되는 암유전자 유도성 세포 노화를 HOXA2 유전자 또는 BCLXL 유전자의 발현에 의해 억제하고, 적혈구 전구세포를 증폭시켜, 특정 세포인 적혈구 세포를 제조하는 방법이다. 본 실시형태는, 조혈 전구세포에 암유전자인 MYC와 함께 수십종류의 조혈 전사 인자나 항아포토시스 관련 유전자를 도입하여 스크리닝한 결과, HOXA2 또는 BCLXL이 적혈구 전구세포를 증식시킨다는 지견에 기초한다.

[0082] 조혈 전구세포 내에서 강제 발현시키는 암유전자는, 전술한 바와 같이, 암유전자라면 어떤 것이라도 사용할 수 있지만, MYC 패밀리 유전자가 바람직하고, 특히 c-MYC 유전자가 바람직하다.

[0083] 본 명세서에서 「적혈구 전구세포」란, 적혈구 계열 특이적인 분자인 Glycophorin A(글리코포린 A) 양성의 탈핵전의 세포이다.

[0084] MYC 패밀리 유전자 등의 암유전자, 및 HOXA2 유전자 또는 BCLXL 유전자를 발현시킨 조혈 전구세포는, SCF(10~200 ng/ml, 예를 들어 100 ng/ml), TPO(10~200 ng/ml, 예를 들어 40 ng/ml), FL(10~200 ng/ml, 예를 들어 100 ng/ml), VEGF(10~200 ng/ml, 예를 들어 40 ng/ml), EPO(1~100 U/ml, 예를 들어 6 U/ml) 등의 어느 것 또는 이들 중의 2개 이상을 조합하여 첨가한 조건으로 배양을 행하고, 예를 들어, 유전자 도입후 4~7일 정도에, 높은 증식능을 획득한 탈핵전의 적혈구 전구세포가 된다.

[0085] MYC 패밀리 유전자 및 BCLXL 유전자 또는 HOXA2 유전자를 발현시킨 조혈 전구세포로부터 얻어지는 적혈구 전구세포를 통해, 성숙 적혈구 세포를 분화 유도하기 위해 적합한 조건이란, 예를 들어, TPO, IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, Flt3 리간드, 헤파린 등의 어느 것 또는 이들 중의 2개 이상을 조합하여 첨가한 조건을 들 수 있다. 특히, 적혈구 세포의 경우, EPO (2~100 U/mL, 바람직하게는 10 U/mL 정도)의 존재하에, 또는 EPO(2~100 U/mL, 바람직하게는 10 U/mL 정도), SCF(10~200 ng/mL, 바람직하게는 50 ng/mL 정도)의 존재하에 7~15일 정도 배양할 수 있다. 배양 환경으로는, 생체외에서 혈구 세포의 분화 유도를 행함에 있어서 적합한 환경이면 되지만, 예를 들어 5% CO₂, 36~38℃, 바람직하게는 37℃의 조건하에서 배양을 실시한다.

[0086] 본 발명의 다른 실시형태에는, 암유전자가 강제 발현된 원하는 분화 단계의 혈구계 세포가 포함된다. 여기서, 암유전자로는, 전술한 암유전자를 사용할 수 있고, 예를 들어 MYC 패밀리 유전자 등을 사용할 수 있고, 특히 c-MYC 유전자가 바람직하다. 또, 「분화 단계의 혈구계 세포」란, 완전 미분화한 단계부터 최종 분화한 단계의 사이에 등장하는 혈구계 세포로서, 완전 미분화한 단계의 세포 및 최종 분화한 단계의 세포 이외의 혈구계 세포를 말한다. 예를 들어, 본 실시형태의 「분화 단계의 혈구계 세포」란, 예를 들어, 다핵화 전의 거핵구 전구세포 등을 들 수 있다. 이러한 분화 단계의 혈구계 세포로서, 예를 들어, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 유도된 세포 등을 사용할 수 있다. 특히, ES 세포 또는 iPS 세포로부터 조제되는 네트형 구조물(ES-sac 또는 iPS-sac로도 칭함)로부터 얻어지는 혈구계 세포(특히, 네트형 구조물로부터 분리된 직후의 세포)가 바람직하다. 또, 본 실시형태에는, 암유전자 외에, 전술한 폴리콤 유전자가 강제 발현된 분화 단계의 혈구계 세포도 더 포함된다. 암유전자 및 폴리콤 유전자의 강제 발현은, 전술한 바와 같이, 유도형 프로모터 등을 사용하여 실시할 수 있다.

[0087] 원하는 분화 단계의 세포 내에서의 암유전자 또는 폴리콤 유전자의 강제 발현은, 암유전자 또는 폴리콤 유전자를 상기 「원하는 분화 단계의 혈구계 세포」 내에 도입하여 강제 발현시킴으로써 달성되어도 좋고, 또 상기 「원하는 분화 단계의 혈구계 세포」의 전구세포 내에 이들 유전자를 도입하여 강제 발현시키고, 그 발현을 유지하면서 분화를 진행시켜, 「원하는 분화 단계의 혈구계 세포」 내에서 이들 유전자의 강제 발현 상태를 유지함으로써 달성되어도 좋다. 또한, 상기 「원하는 분화 단계의 혈구계 세포」의 전구세포 내에 이들 유전자를 도입해 두고, 「원하는 분화 단계의 혈구계 세포」로 분화했을 때, 이들 유전자의 강제 발현을 유도함으로써 달성되어도 좋다. 예를 들어, 원하는 분화 단계의 혈구계 세포로서 다핵화 전의 거핵구 전구세포를 증폭시키는 경우에는, 그 전구 단계에 있는 조혈 전구세포에 암유전자 또는 폴리콤 유전자를 도입하여 강제 발현시켜도 좋다.

[0088] 본 실시형태에서의, 예를 들어, 다핵화 전의 거핵구 전구세포 등의 혈구계 세포는, 동결 보존후 해동하더라도 세포 증식능 및 분화능을 유지하고 있는 동결 해동 내성을 갖고 있다. 그 때문에, 상기 혈구계 세포를 동결하여, 필요에 따라서 용해하여, 분화 유도한 혈구계 세포를 제조하는 것이 가능하다. 따라서, 본 세포를 이용함으로써, ES 세포나 iPS 세포로부터 혈구계 세포, 예를 들어 혈소판을 제조하는 일련의 작업을 처음 공정부터 행할 필요가 없어진다. 즉, 본 발명의 암유전자, 또는 암유전자 및 폴리콤 유전자를 강제 발현시킨 혈구계 세포를 원료로 다량으로 조제하고, 필요에 따라 동결 보존해 둬으로써, 제조 프로세스의 합리화·효율화가 도모되어, 혈소판 등의 다양한 혈구계 세포를 신속하게 공급할 수 있는 구조를 구축할 수 있다.

- [0089] 본 발명의 다핵화 전의 거핵구 전구세포 등의 혈구계 세포를 이용하여, 동결 세포 조성물을 제작하는 경우에는, 다핵화 전의 거핵구 전구세포 등의 혈구계 세포와, 동결 보존액으로 구성할 수 있고, 기타 필요에 따른 첨가제 등도 조성 중에 포함시킬 수 있다.
- [0090] 동결 보존액으로는, DMSO가 들어간 동결액 등을 이용할 수 있다. 구체적으로는 셀뱅크(니쁜젠야쿠코교 카부시키가이샤)나 밤뱅크(니쁜제네틱스 카부시키가이샤), TC 프로텍터(DS 파머바이오메디컬 카부시키가이샤), 알부민첨가 cp-1(교쿠토세이야쿠코교 카부시키가이샤) 등이다.
- [0091] 본 발명에서 이용되는 MYC 패밀리 유전자, 폴리콤 유전자(예를 들어 BMI1 유전자), HOXA2 유전자 및 BCLXL 유전자는, 이미 그 cDNA 서열이 공개되어 있는 유전자는 물론, 이들 공지된 cDNA 서열의 상동성에 기초하여 종래 기술에 의해 동정되는 호몰로그도 포함된다.
- [0092] MYC 패밀리 유전자 중 c-MYC 유전자의 호몰로그란, 그 cDNA 서열이, 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 유전자를 말한다. 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 cDNA는, 서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어진 DNA와, 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 보다 바람직하게는 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 가장 바람직하게는 약 99%의 동일성을 갖는 서열로 이루어진 DNA, 또는 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열에 상보적인 서열로 이루어진 DNA와 스트린젠트 조건하에 하이브리다이즈할 수 있는 DNA로서, 이들 DNA에 의해 코딩되는 단백질이, 다핵화 전의 거핵구 전구세포 등 분화 단계의 세포의 증폭에 기여하는 것을 말한다.
- [0093] 또, 본 발명에서 이용되는 BMI1 유전자의 호몰로그란, 그 cDNA 서열이, 예를 들어, 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 유전자를 말한다. 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 cDNA는, 서열번호 2로 표시되는 서열로 이루어진 DNA와, 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 보다 바람직하게는 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 가장 바람직하게는 약 99%의 동일성을 갖는 서열로 이루어진 DNA, 또는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열에 상보적인 서열로 이루어진 DNA와 스트린젠트 조건하에 하이브리다이즈할 수 있는 DNA로서, 그 DNA에 의해 코딩되는 단백질이, MYC 패밀리 유전자 등의 암유전자가 발현된 세포 내에서 생기는 암유전자 유도성 세포 노화를 억제하여, 상기 세포의 증폭을 촉진하는 것을 말한다.
- [0094] 본 발명에서 이용되는 HOXA2 유전자 또는 BCXL 유전자는, 각각 그 cDNA 서열이, 예를 들어, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 유전자를 말한다. 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열과 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 cDNA는, 각각 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 서열로 이루어진 DNA와, 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 보다 바람직하게는 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 가장 바람직하게는 약 99%의 동일성을 갖는 서열로 이루어진 DNA, 또는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열에 상보적인 서열로 이루어진 DNA와 스트린젠트 조건하에서 하이브리다이즈할 수 있는 DNA로서, 그 DNA에 의해 코딩되는 단백질이, 적혈구 전구세포를 증식시키는 효과를 갖는 것을 말한다.
- [0095] 여기서, 스트린젠트 조건이란, 당업자에 의해 용이하게 결정되는 하이브리다이제이션의 조건을 말하며, 일반적으로 프로브 길이, 세정 온도 및 염 농도에 의존하는 경험적인 실험 조건이다. 일반적으로, 프로브가 길어지면 적절한 어닐링을 위한 온도가 높아지고, 프로브가 짧아지면 온도는 낮아진다. 하이브리드 형성은, 일반적으로 상보적 쇄가 그 용점보다 약간 낮은 환경에서의 재어닐링 능력에 의존한다.
- [0096] 구체적으로는, 예를 들어 저스트린젠트 조건으로서, 하이브리다이제이션후의 필터의 세정 단계에서, 37℃~42℃의 온도 조건하, 0.1×SSC, 0.1% SDS 용액 중에서 세정하는 것 등을 들 수 있다. 또, 고스트린젠트 조건으로서, 예를 들어, 세정 단계에서, 65℃, 5×SSC 및 0.1% SDS 중에서 세정하는 것 등을 들 수 있다. 스트린젠트 조건을 보다 높게 함으로써, 상동성이 높은 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.
- [0097] 본 발명의 실시형태에는, 원하는 분화 단계의 세포(예를 들어, 다핵화 전의 거핵구 전구세포 또는 적혈구 전구세포), 최종적으로 제조되는 특정 세포(예를 들어, 거핵구 세포, 혈소판 또는 적혈구 세포)를 제조하기 위한 키트가 더 포함된다. 상기 키트에는, 암유전자, 폴리콤 유전자, BCLXL 유전자, HOXA2 유전자 등을 세포 내에서 발현시키는 데 필요한 발현 벡터 등 및 시약 등 외에, 세포 배양을 위한 배지, 혈청, 증식 인자 등의 보충제(예를 들어, TPO, EPO, SCF, 헤파린, IL-6, IL-11 등), 항생 물질 등이 포함된다. 기타, 예를 들어, ES 세포 또는 iPS 세포 유래의 세포를 사용하는 경우, 이들 세포로부터 조제한 네트형 구조물을 동정하기 위한 마커 확인용

항체(예를 들어, Flk1, CD31, CD34, UEA-I 력틴 등에 대한 항체) 등도 포함된다. 키트 중에 포함되는 시약, 항체 등은, 구성 성분이 활성을 장기간 유효하게 지속하고, 용기의 재질에 의해 흡착되지 않고, 변질되지 않는 어떤 용기중에 공급된다.

[0098] 또, 본 발명에 의해 제조되는 혈소판 및 적혈구 세포는, 제제의 형태로 안정적으로 공급하는 것도 가능하다. 본 발명의 방법에 의해 생성되는 혈소판은, 거핵구 세포로부터 방출되어 혈소판이 풍부하게 존재하는 배양액의 회분을 회수하고, 백혈구 제거 필터(예를 들어, 테루모사, 아사히카세이메디컬사 등에서 구입 가능) 등을 사용하여, 거핵구 세포, 그 밖에, 혈소판 이외의 혈구계 세포 성분을 제거하여 조제할 수 있다. 혈액 제제를 조제함에 있어서는, 혈소판 또는 적혈구 세포의 안정화에 기여하는 다른 성분을 함유시킬 수도 있다. 이러한 안정화에 기여하는 성분은, 상기 기술분야의 전문가에게 주지인 방법을 선택하는 것이 가능하다.

[0099] 보다 구체적으로는, 취득한 혈소판은, 예를 들어 이하의 방법에 의해 제제화할 수 있다.

[0100] ACD-A 액 : FFP(fresh frozen plasma; 현혈로 얻어진 총혈액으로부터 조정된 것, 알부민, 응고 인자 등 혈액 성분 이외의 것을 모두 포함)를 1:10의 비율로 조정하여, 15-50Gy의 방사선 조사후에 20-24℃로 진탕하면서 보존한다. ACD-A 액; 시트르산나트륨 22 g/시트르산 8 g/포도당 22 g을 주사용수로 전체를 1 L로 하도록 조정한다.

[0101] 이상의 방법을 사용하는 경우, 혈소판의 농도로는, 예를 들어 1×10^9 혈소판/mL 정도가 바람직하다.

[0102] 또, GM6001(a broad-range hydroxamic acid-based metalloprotease inhibitor) (Calbiochem사, La Jolla, CA, USA)을 첨가해 두면, 냉동 보존 및 실온 보존중에 일어나는 혈소판 기능 분자 GPIb-V-IX나 GPVI의 절단에 따른 불활화를 예방할 수 있다. 본 발명자들은, 이 방법에 의해, 마우스 ES 세포 유래 혈소판에 관해 불활성화의 예방이 가능하다는 것을 확인했다. 또한, 인간 혈소판을 사용한 이 혈소판 불활성화에 관한 메커니즘의 참고 논문으로서, Bergmeier, W et al., *Cir Res* 95: 677-683, 2004 및 Gardiner, EE et al., *J Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1530-1537, 2007을 참조할 것.

[0103] 또한, 혈소판을 포함하는 제제를 수납하는 용기는, 유리와 같이 혈소판을 활성화하는 재질인 것을 피하는 것이 바람직하다.

[0104] 한편, 적혈구 세포의 제제화에 관해서는 이하와 같이 행할 수 있다. 보다 구체적으로는, 취득한 적혈구는, 예를 들어 이하의 방법에 의해 제제화할 수 있다.

[0105] 배양 상청을 원심후 농축한 농후 적혈구액에 MAP액(조성은 이하 참조)을 첨가하여 조제하고, 15-50Gy의 방사선 조사후에 2~6℃로 보존한다.

[0106] 이상의 방법을 사용하는 경우, 적혈구의 농도로는, 예를 들어 1×10^{10} 적혈구/mL 정도가 바람직하다. 취득한 적혈구는, 적혈구 보존용 첨가액(MAP액)으로서, 예를 들어, D-만니톨(14.57 g), 아데닌(0.14 g), 결정 인산이수소나트륨(0.94 g), 시트르산나트륨(1.50 g), 시트르산(0.20 g), 포도당(7.21 g), 염화나트륨(4.97 g)을, 주사용수를 첨가하여 용해하여 총량을 1000 ml로 한 것을 사용할 수 있다.

[0107] 그 밖에, 적혈구의 제제화에 적합하다고 생각되는 공지의 방법을 적절하게 선택하는 것은 당업자에게 용이한 것이다.

[0108] 또한 본 발명에는, 본 발명의 혈구계 세포의 동결 조성물이 포함된다. 본 조성물에는, 혈구계 세포 외에, 상기 혈구계 세포를 보존하기 위해 필요한 배지, 완충액 및 동결시에 세포를 보호하기 위해 DMSO, 글리세롤 등이 포함되어 있어도 좋다. 그 밖에, 세포의 동결에 필요로 되는 통상의 물질이라면 어떠한 것이 포함되어 있어도 좋다. 또는, 시판하는 세포 동결용 시약을 사용한 경우에는, 그 시약에 포함되는 물질을 포함하고 있어도 좋다.

[0109] 본 명세서 중에 기재되는 「세포」의 유래는, 인간 및 비인간 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 소, 말, 돼지, 양, 원숭이, 개, 고양이, 새 등)이며, 특별히 한정되는 되지 않지만, 특히 바람직하게는 인간 유래의 세포이다.

[0110] 이하에 실시예를 나타내어 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 실시예에 의해 전혀 한정되지 않는다.

[0111] **실시예**

[0112] 1. 4 유전자 유래의 iPS 세포와 3 유전자 유래의 iPS 세포로부터의 거핵구 생성 효율의 비교

[0113] 4 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC)에 의해 수립한 iPS 세포(TkDA3-2, TkDA3-4 및 TkDA3-5)와 c-MYC를 제외

한 3 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4)에 의해 수립한 iPS 세포(253G1(교토대학, 야마나카신야 박사가 공여) 및 TkDN4-M) 및 인간 ES 세포(KhES-3; 교토대학, 나카즈지노리오 선생이 공여)로부터 생성되는 거핵구 세포의 수를 비교했다(도 1). iPS 세포 및 ES 세포로부터의 배양후 15일째에, 네트형 구조물로부터 추출한 조혈 전구세포를 피더 세포 상에 과중하고, 최종 농도 15%의 FBS를 첨가한 IMDM에 TPO(100 ng/mL), SCF(50 ng/mL) 및 헤파린(25 U/ml)의 존재하에 배양을 행한다. 그 후, 유도되는 CD42b 양성인 거핵구 세포의 수를 시간의 경과에 따라 카운트했다(도 1). 그 결과, 3 유전자(c-MYC 없음) 유래 iPS 세포 및 인간 ES 세포에 비해, 4 유전자(c-MYC 있음) 유래의 iPS 세포는, 사용한 3주 모두 거핵구 세포수가 증가했다.

[0114] 다음으로, iPS 세포를 제작할 때 도입한 유전자(OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC)의 미분화 iPS 세포에서의 발현 활성을 조사한 결과, 모든 유전자가 사일렌싱 기구에 의해 발현이 억제되었다(도 2A). 이에 비해, 분화 유도를 행한 배양 25일째의 거핵구 세포에서는, 각 도입 유전자의 발현의 재활성화가 확인되었다(도 2B).

[0115] 이상으로부터, iPS 세포를 제작하기 위해 도입한 유전자 중, 어떤 유전자 발현의 재활성화가, 생성되는 거핵구 세포수의 증가에 관여하고 있을 가능성이 시사되었다. 따라서, 거핵구 세포수의 증가에 관여하고 있는 원인 유전자의 검증을 행했다. 인간 ES 세포(iPS 세포와 달리 OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC가 외인성으로 도입되지 않았다) 유래의 조혈 전구세포에, 레트로바이러스에 의해 각 유전자를 단독으로 강제 발현시켜, 생성된 CD42b 양성인 거핵구 세포의 수를 카운트했다. 그 결과, c-MYC를 도입한 경우, 다른 유전자를 도입한 경우와 비교하여, 생성되는 CD42b 양성인 거핵구 세포수가 약 10배 정도 증가하는 것이 밝혀졌다(도 3). 이상으로부터, 4 유전자 유래 iPS 세포로부터의 거핵구 유도 효율이 높은 이유로서, c-MYC 유전자의 발현의 재활성화가 생각되었다.

[0116] 또, 4 유전자 유래 iPS 세포로부터 유도한 거핵구 세포는, ES 세포 또는 3 유전자 유래 iPS 세포로부터 유도한 거핵구 세포보다 동결 용해후 생존률이 높은 것이 확인되었다. 구체적으로는, 인간 ES 세포(KhES-3) 또는 3 유전자 유래 인간 iPS 세포(TkDN4-M)로부터 유도한 거핵구 세포의 동결 용해후 생존률이, 각각 56.7%, 54.5%로 약 5할 정도에 그친 데 비해, 4 유전자 유래 인간 iPS 세포(TkDA3-4)로부터 유도한 거핵구 세포의 동결 용해후 생존률은, 81.0%로 약 8할에 이른다는 것을 알 수 있다. 이것으로부터, c-MYC 유전자 등의 암유전자의 재활성화가 생긴 거핵구 전구세포는, 보다 동결 보존에 적합하고, 해동후의 공급을 하기 쉬운 세포라고 생각된다.

[0117] 혈소판의 생성수에 관해서도 거핵구 세포와 동일한 검토를 행했다. iPS 세포 및 ES 세포로부터의 배양후 15일째에, 네트형 구조물로부터 추출한 조혈 전구세포를 과중한 후, 유도되는 혈소판의 수를 시간의 경과에 따라 카운트한 결과, 거핵구 세포와 마찬가지로, 4 유전자 도입에 의한 iPS 세포로부터 효율적으로 혈소판의 생성이 이루어졌다(도 4).

[0118] 다음으로, 가장 혈소판 생성능이 높은 TkDA3-4주를 이용하여, 시험관 내에서 생성된 혈소판의 수혈 실험을 행했다. 미리 방사선 조사하여 혈소판 감소 모델의 면역 부전 마우스를 제작하여, iPS 세포 유래의 혈소판을 미정맥을 통해 수혈했다(도 5A). 수혈후 30분후에는 20% 전후, 2시간후에도 10% 전후의 혈소판 키메리즘이 관찰되어, 인간 말초혈 유래의 신선한 혈소판과 동일했다(도 5B).

[0119] 또한, 인간 iPS 세포 유래 혈소판의 생체에서의 혈전 형성능을 타임랩스 공초점 현미경(Time-lapse confocal microscopy)을 이용하여 평가했다.

[0120] 미리, iPS 세포 유래 혈소판은 테트라메틸로다닌에틸에스테르(TMRE; 붉은 색소)로 염색하고, 헤마토포르피린(hematoporphyrin)과 혼합하여 마우스 미정맥을 통해 주사했다. 혈류(세포 성분 이외)를 FITC-dextran(녹색)으로 염색함으로써, 혈관 내의 혈액 성분이 빠져나가, 형태나 크기로부터 혈구 성분을 확인할 수 있다. 레이저에 의해 헤마토포르피린이 반응하여 혈관 내피 장해가 야기되면, 장해 내피 또는 내피 박리 스폿에 혈소판이 고착화 및 접착하여 혈전 형성이 유도된다.

[0121] 마우스의 장간막 미소 동맥에 과장 488 nm, 30 mW의 레이저 조사를 행하면, 13초 후에는 붉게 염색된 iPS 세포 유래 혈소판이 장해 내피에 접착되었다(도 6 중, 화살표로 「iPS 유래」로 나타내는 부위). 20초후에는 다른 호스트 유래의 혈소판(마우스 혈소판)과 협조하여 혈전을 형성하여 혈관 폐색을 야기한 것이 확인되어, iPS 세포 유래의 혈소판은 생체내의 혈류하에 혈전을 형성할 능력이 있는 것이 증명되었다.

[0122] 이상으로부터, c-MYC 유전자를 포함하는 4 유전자의 도입에 의해 수립되고, c-MYC 유전자가 재활성화되어 있는 iPS 세포로부터 조제한 혈소판도, 인간 말초혈 유래의 혈소판과 동일한 생리학적 특징을 유지하고 있는 것이 확인되었다.

[0123] 여기까지의 해석으로부터, iPS 세포로부터 거핵구 세포 및 혈소판을 효율적으로 유도하기 위해서는, c-MYC 유전자의 발현 유도와 그 c-MYC 유전자 산물의 세포 내에서의 효과를 유지하는 것이 중요하다는 것이 밝혀졌다. 따

라서, iPS 세포로부터 거핵구 세포 및 혈소판을 유도하는 경우, 미분화의 거핵구 전구세포인 단핵의 거핵구 전구세포 중에서 c-MYC 유전자를 발현시키고 c-MYC 유전자 산물의 효과를 유지하기 위해, 암유전자 유도성 세포 노화(OIS)를 억제하는 것이 효과적일 거라고 예상된다. 따라서, OIS의 억제를 위해, 폴리콤군 유전자를 c-MYC 유전자와 동시에 발현시키고, 그 효과에 대해 검토했다.

[0124] 2. c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 발현시킨 거핵구 전구세포로부터의 성숙 거핵구 세포의 생성 효율

[0125] iPS 세포의 4 유전자 수립주와 3 유전자 수립주의 거핵구 생성 효율의 비교에 의해, 거핵구 전구세포 중에서의 c-MYC 유전자의 재활성화가, 그 후 유도되는 성숙 거핵구 세포의 수에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 따라서, c-MYC 유전자가 도입되지 않은 다능성 줄기 세포인 ES 세포 유래의 거핵구 전구세포에서의 c-MYC 유전자의 발현이, 그 후의 거핵구 세포의 유도에 어떠한 영향을 미치는지를 검토했다.

[0126] 인간 ES 세포주(KhES-3)로부터 20 ng/ml VEGF 존재하에 네트형 구조물을 조제하고, 이 네트형 구조물로부터 취출한 거핵구 전구세포(다핵화 전)를, 10T1/2 세포 상에 세포수 1×10^5 /웰이 되도록 뿌리고, c-MYC 유전자(서열 번호 1)를 유지한 레트로바이러스 벡터를 파종후, 0시간, 12시간, 24시간 경과시에 감염시켰다. 36시간후에, 레트로바이러스를 포함하지 않는 배지로 변경하여 배양을 계속했다. 레트로바이러스에 의한 유전자 도입은, 배지를 2~3 ml 첨가한 6웰 플레이트를 사용하여, 900 rpm, 90분의 조건으로, 스핀 감염법(Spin infection)을 이용하여 행했다. 최종 농도 15%의 FBS를 첨가한 IMDM에 100 ng/ml SCF, 40 ng/ml TPO, 100 ng/ml FL, 40 ng/ml VEGF 및 프로타민을 첨가한 배지를 이용하여 배양을 행했다(도 7).

[0127] 레트로바이러스의 감염후 9일째에 FACS 해석을 행한 결과, 컨트롤 벡터와 비교하여 c-MYC를 도입한 세포에서는, CD41a, CD42b를 갖는 세포가 우위로 증가한 것이 관찰되었다(도 8A). 또, 사이트 스핀으로 세포를 관찰한 결과, 컨트롤에서는 다핵화한 세포가 관찰되지만, c-MYC 도입 세포에서는, 다핵화 전의 단핵의 세포가 관찰되었다(도 8B). 이상의 결과에서, c-MYC의 강제 발현에 의해 단핵의 미성숙한 거핵구 세포가 증가하는 것이 시사되었다. 그 결과는, 거핵구 특이적으로 c-MYC를 발현시킨 트랜스제닉 마우스와 동일한 결과였다(Alexander et al., *Deregulated expression of c-MYC in megakaryocytes of transgenic mice increases megakaryopoiesis and decreases polyploidization*. J. Biol. Chem., 1996 Sep 20; 271(38): 22976-82를 참조할 것).

[0128] 다음으로, c-MYC를 발현시킨 상태에서의 세포의 증식능을 관찰한 결과, 감염후 14일째부터 증식이 감소하는 것이 관찰되었다(도 9). 이 현상은, c-MYC 등의 Oncogene의 과잉 발현에 의한 비정상적인 증식 시그널에 대하여, 세포 주기의 정지, 세포 노화, 아포토시스를 행하는 세포의 암화 회피 기구이고, 암유전자 유도성 세포 노화(oncogene-induced senescence : OIS)로 불리고 있다(전술). 따라서, 암억제 유전자 산물인 p16 및 p19를 코드 하고 있는 Ink4a/Arf 유전자를 마이너스로 제어하는 폴리콤군 유전자의 하나, BMI1을 거핵구 전구세포 내에 도입하여, OIS를 회피하는 것을 시도했다. 전술한 레트로바이러스에 의한 유전자 도입법에 의해, c-MYC 유전자와 BMI1 유전자(서열번호 2)를 세포 내에 도입하여 발현시킨 후 FACS 해석을 행했다. 그 결과, 유전자 도입후의 시간 경과에 따라, 지수 함수적으로 안정적으로 증식하는 CD41a 양성 CD42b 양성(거핵구의 마커) 세포군을 얻을 수 있었다(도 10). c-MYC 유전자만을 세포에 도입한 경우, 유전자 도입후 20일째에는, CD41a 양성 CD42b 양성 세포가 상당히 감소한 데 비해(도 10 하의 해석 결과), c-MYC 유전자와 BMI1 유전자를 도입한 경우에는, 날이 지날 때마다 CD41a 양성 CD42b 양성 세포가 증가해 가는 것이 확인되었다(도 10 상의 해석 결과). 이 결과로부터, 폴리콤 유전자의 하나인 BMI1 유전자를 도입한 c-MYC 유전자 도입 다핵화 전의 거핵구 전구세포는, OIS를 회피하고, 높은 증식능을 유지하면서 거핵구 세포로 분화하는 것이 밝혀졌다. 따라서, 여기서 얻어진 거핵구 세포의 특징을 확인하기 위해, 또 다른 거핵구 특이적 기능 분자인 CD9 및 CD42a가 세포 표면 상에 존재하는지의 여부를(도 11A를 참조), FACS 해석에 의해 검토했다. 그 결과, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 도입한 세포주에서, CD9 및 CD42a의 존재를 확인할 수 있었다(도 11B).

[0129] 다음으로, c-MYC/BMI1 발현 세포의 증식능에 대해 검토했다. c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 도입한 다핵화 전의 거핵구 전구세포를, 최종 농도 15%의 FBS를 첨가한 IMDM에, 100 ng/ml SCF, 40 ng/ml TPO, 100 ng/ml FL, 40 ng/ml VEGF를 첨가한 배지로 배양하여, 시간의 경과에 따라 세포수를 카운트했다. 그 결과, 유전자 도입후 49일째에 약 4×10^7 개의 CD41a 양성 세포가 얻어졌다(도 12). 또한, c-MYC/BMI1 발현 세포 유래의 거핵구 전구 세포로부터 방출된 혈소판을 전자 현미경에 의해 관찰한 결과, 혈소판에 특징적인 미소관 구조, 개방 소관계(Open canalicular system), 혈소판 과립을 확인할 수 있었다(도 13).

[0130] 3. c-MYC 유전자 도입 조혈 전구세포로부터의 적혈구 전구세포를 통한 적혈구의 유도

[0131] 다음으로, c-MYC 유전자를 도입한 조혈 전구세포로부터 얻어지는 적혈구 전구세포로부터의 적혈구의 생성을 시

도했다. 상기 2에서 기재한 c-MYC 유전자 또는 BMI1 유전자의 도입과 마찬가지로, c-MYC/HOXA2(서열번호 3) 발현 세포 및 c-MYC/BCLXL(서열번호 4) 발현 세포를 제작하여 FACS 해석을 행했다. 그 결과, c-MYC/HOXA2 발현 세포에서는, 유전자 도입후 105일째에 적혈구의 마커인 CD71 및 GlyA 양성 세포군의 존재가 확인되었다(도 14 우측 상단). 또, c-MYC/BCLXL 발현 세포에서도 GlyA 양성 세포군의 존재가 확인되었다(도 14 우측 하단). 이 결과로부터, c-MYC 유전자의 도입한 조혈 전구세포는, 조합시키는 도입 인자를 바꿈으로써, 적혈구로의 분화도 가능하다는 것을 알 수 있다.

[0132] 4. 유전자의 발현 유도 시스템을 이용한 기능성 혈소판의 제조

[0133] 거핵구 세포, 혈소판을 효율적으로 대량으로 조제하기 위해서는, 거핵구 전구세포의 수를 증가시키는 것이 유효하다는 것이 밝혀졌다. 그것을 위해서는, c-MYC 패밀리 유전자, 폴리콤 유전자를 다핵화 전의 거핵구 전구세포 중에서 동시에 모두 발현시켜, 상기 다핵화 전의 거핵구 전구세포의 증식능을 높이는 것이 필요하지만, 거핵구 세포의 성숙화(다핵화)를 촉진하기 위해, 경우에 따라서는, c-MYC 패밀리 유전자, 폴리콤 유전자의 발현을 억제적으로 제어하는 것이 바람직하다.

[0134] 따라서, pMX tet off 시스템을 이용하여, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자의 발현을 유도적으로 조절하여 혈소판을 제조하고, 그 혈소판의 생리적 기능에 관해 검토를 했다.

[0135] 4-1. 유전자 제어부 벡터의 기능성의 확인

[0136] pMX tet off 벡터(지치외과대학 마노히로유키 교수가 공여)에 c-MYC-2A-BMI1을 넣은 올인원(all in one)형 벡터를 제작했다(「2A」는 구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus) 유래의 자가 분해(self cleavage) 활성을 갖는 펩티드이며, 이 서열을 복수의 단백질 사이에 끼움으로써 단일 프로모터로부터 복수의 단백질을 효율적으로 취득하기 위한 것이다(Hasegawa 등, 2007 Stem Cells)). pMX tet off c-MYC 2A BMI1 벡터는, 에스트라디올 존재하에, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 발현시킨다. 한편, 테트라사이클린 존재하, 에스트라디올 부재하에서는, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자의 발현을 억제한다.

[0137] 제작한 pMX tet off c-MYC 2A BMI1 벡터를, 293GPG 세포 내에서 발현시켜, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자의 발현 제어의 상황을 FACS에 의해 확인했다. 도 15는, 세포 내의 c-MYC 단백질을 항c-MYC 단백질 항체로 염색후, Alexa647 표지의 2차 항체로 염색하여 FACS 해석을 행한 결과이다. pMX tet off c-MYC 2A BMI1을 도입한 293GPG 세포에서, 테트라사이클린 존재하에서는, 컨트롤의 293GPG 세포와 다름없는 c-MYC 유전자의 발현량이지만(도 15 중, 293gpg 및 + 테트라사이클린으로 나타내는 그래프), 에스트라디올 존재하에서는 c-MYC 유전자의 발현이 촉진되고 있는 것을 알 수 있다(도 15, +β-에스트라디올).

[0138] 이상의 결과로부터, 여기서 사용하는 pMX tet off c-MYC 2A BMI1 벡터에 의해 목적 유전자의 발현 제어가 가능한 것이 확인되었다.

[0139] 4-2. 유전자 제어 벡터에 의한 거핵구 세포주의 제작

[0140] 상기 4-1에서 기재한 유전자 제어 벡터를 이용하여, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 인간 ES 세포주(KhES-3) 유래의 거핵구 전구세포 내에서 발현시켜, 그 증식능 및 분화 능력에 관해 검토했다.

[0141] 벡터만을 도입한 세포(도 16A(a)), pMX c-MYC 및 Dsam BMI1을 별개로 강제 발현시킨 세포주(도 16A(b)), pMX tet off c-MYC 및 pMX tet off BMI1로 별개로 발현시킨 세포주(도 16A(c)), pMX tet off c-MYC 2A BMI1로 발현시킨 세포주(도 16A(d)) 및 pMX tet off BMI1 2A c-MYC(도 16A(e))로 발현시킨 세포주에 관해 검토를 행했다. 여기서, (d) 와 (e)는, 2A 서열을 사이에 두고 c-MYC 유전자와 BMI1 유전자의 배치의 순서가 상이한 콘스트럭트이다.

[0142] 이들 세포주에 관해, CD41a⁺ 세포의 증식 곡선을 도 16A에 나타낸다. 거핵구 마커인 항CD41a 항체 및 항CD42b 항체로 각 세포주를 염색하고, 플로우사이트미터를 이용하여 해석했다. pMX tet off c-MYC 2A BMI1로 작성한 세포주(도 16A(d))는, pMX c-MYC 및 Dsam BMI1을 별개로 강제 발현시킨 세포주(도 16A(b))와 동일한 표현계를 나타내고, 대부분의 집단이 거핵구 마커를 발현시켰다(도 16B 상의 패널). 또한, pMX tet off c-MYC 2A BMI1로 작성한 세포주(도 16A(d))는, pMX tet off c-MYC 및 pMX tet off BMI1을 별개로 도입한 세포주(도 16A(c)) 및 pMX tet off BMI1 2A c-MYC로 작성한 세포주(도 16A(e))보다 높은 증식능을 나타냈다.

[0143] 또, 항Glycophorin-a 항체 및 항CD41a 항체로 염색하면, pMX c-MYC 및 Dsam BMI1을 별개로 강제 발현시킨 세포주에서는, 거핵구/적아구 공통의 마커인 CD41a⁺/Gly-a⁺의 세포 집단이 존재하는 데 비해(도 16B, 하측 패널

좌측), pMX tet off c-MYC 2A BMI1로 작성한 세포주에서는 Gly-a는 소실되었다(도 16B, 하측 패널 우측). 그 결과는, pMX tet off c-MYC 2A BMI1로 작성한 세포주는, pMX c-MYC 및 Dsam BMI1을 별개로 강제 발현시킨 세포주보다, 거핵구계로의 분화가 더 진행된 세포주인 것을 나타내고 있다.

[0144] 4-3. 거핵구의 다핵화에 관해

[0145] β -에스트라디올의 존재하, pMX tet off c-MYC 2A BMI1 벡터로 c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 강제 발현시킨 세포주의 다핵화의 정도에 관해 검토를 행했다. 인간 유래 거핵구는 통상 32N 정도로 다핵화하고 있지만(도 17A), pMX tet off c-MYC 2A BMI1 벡터로 c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 강제 발현시킨 세포주에서는, 거의 다핵화가 진행되지 않고, 2N-4N인 것이 나타났다.

[0146] 4-4. c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 발현시키는 거핵구 세포주 유래의 혈소판의 기능 해석

[0147] c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 발현시키는 거핵구 세포주에 유래하는 혈소판의 기능 분석을 행했다.

[0148] 컨트롤의 인간 말초혈 유래 혈소판은, ADP(아데노신이인산; 혈소판을 활성화하는 세포내 인자) 존재하에 피브리노겐과 결합하여, 혈전 형성의 초기에 필요한 인테그린 활성화능(인사이드아웃 시그널)이 정상인 것으로 나타난다(도 18 상단 우측도). 한편, pMX tet off c-MYC 2A BMI1주(에스트라디올 존재하) 및 pMX c-MYC 및 Dsam BMI1 강제 발현주 모두, ADP를 첨가하더라도 피브리노겐에 결합하지 않았다(도 18 중간단 및 하단). 따라서, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자가 강제 발현된 채로 있으면, 정상 기능을 갖는 혈소판을 방출하지 않는다는 것을 알 수 있다.

[0149] 다음으로, pMX tet off c-MYC 2A BMI1 벡터로 c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 강제 발현시키고 있는 세포주에 대하여, +테트라사이클린 및 $-\beta$ -에스트라디올의 조건하에서 강제 발현을 해제한 후, 배양 4일째의 CD41a⁺/CD42b⁺ 혈소판의 인테그린 활성화능을, 플로우사이트미터를 이용하여 해석했다(도 19). 그 결과, ADP 존재하에 PAC1 항체(활성형 인테그린 α IIb β 3 결합 항체)가 결합하여, 인테그린 활성화능(인사이드아웃 시그널)이 정상인 것이 나타났다(도 19 우측).

[0150] 이상의 결과로부터, c-MYC 유전자의 강제 발현에 의해 증식시킨 거핵구주로부터 생성되는 혈소판은, 기능에 장애를 갖지만, 거핵구주의 c-MYC 유전자 등의 강제적인 발현을 해제함으로써, 정상적인 기능을 갖는 혈소판의 생성이 가능한 것이 나타났다.

[0151] 상기 거핵구 전구세포 내에서의 c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자의 발현 제어는, 마찬가지로 적혈구 전구세포주 수립에 이용한 MYC 패밀리 유전자, BCLXL 유전자, HOXA2 유전자에 관해서도 사용할 수 있어, 성숙 적혈구의 유도가 가능해진다고 생각된다.

[0152] MYC 및 BMI1은, 거핵구 세포·적혈구 세포의 공통 전구세포인 MEP 분획, 또는 그것으로부터 분화가 진행된 거핵구 전구세포의 단계에서 세포를 증식시키고 있는 것이 나타났다(도 20). 또, c-MYC 유전자 및 BMI1 유전자를 도입한 다핵화 전의 거핵구 전구세포는, 동결 보존이 가능하기 때문에, 필요할 때 동결 스톱으로부터 거핵구 세포, 혈소판을 조제할 수 있다.

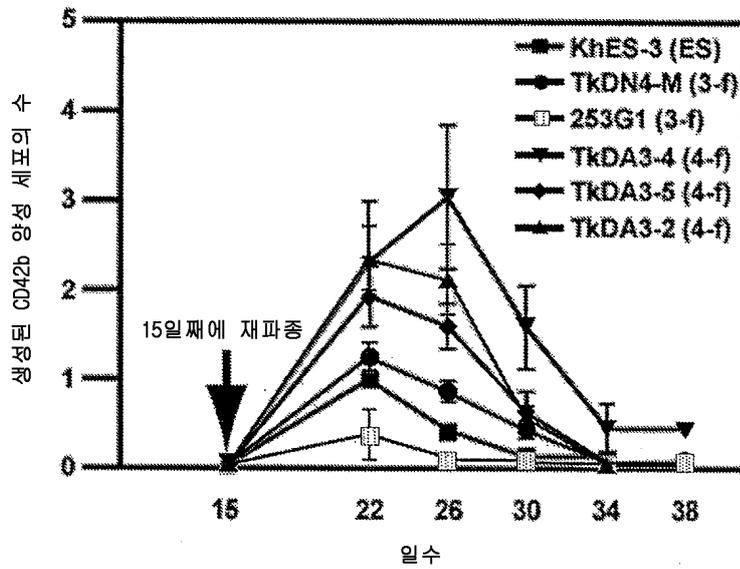
[0153] 마찬가지로 MYC 유전자와 BCLXL 또는 HOXA2 유전자 도입으로 제작한 적혈구 전구세포주도 동결 보존하고, 필요할 때 해동하여 조제할 수 있다.

[0154] 또, 도입한 MYC 유전자, BMI1 유전자의 발현을 상방 또는 하방으로 제어함으로써, 생리 활성을 유지한 혈소판 또는 적혈구 세포를 충분한 양으로 조제하는 것이 가능해진다.

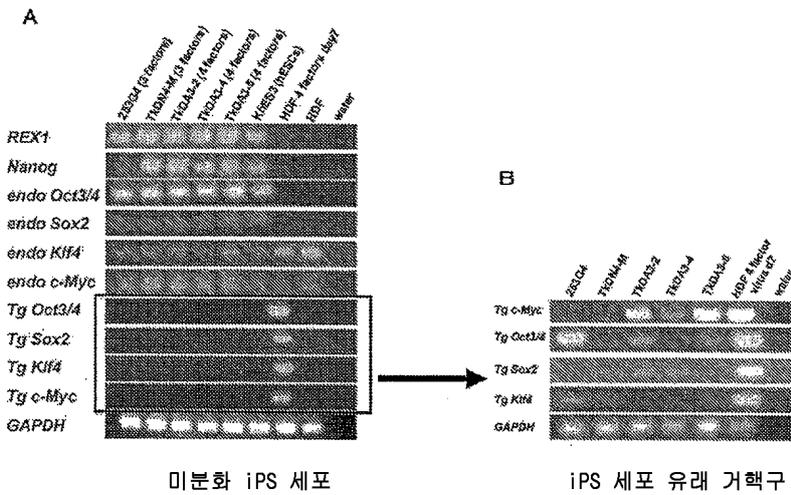
[0155] 본 발명은, 분화 단계의 세포를 증폭시켜 더 분화된 특정한 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법을 예를 들어 혈구계 세포에 적용함으로써, 원하는 분화 단계의 세포를 대량으로 공급하는 것이 가능해진다. 따라서, 본 발명은, 특히 의료 분야에서의 치료법의 발전에 크게 기여하는 것이다.

도면

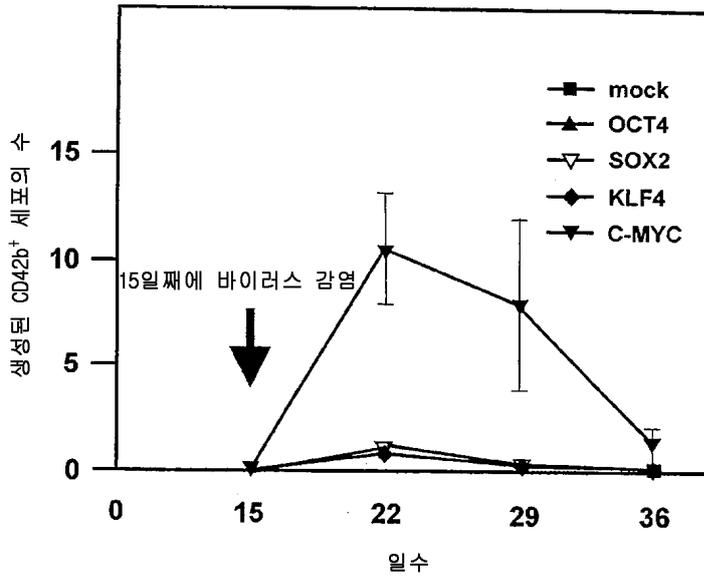
도면1



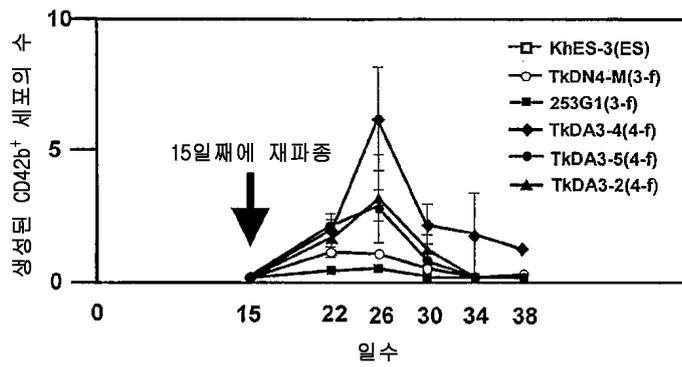
도면2



도면3



도면4

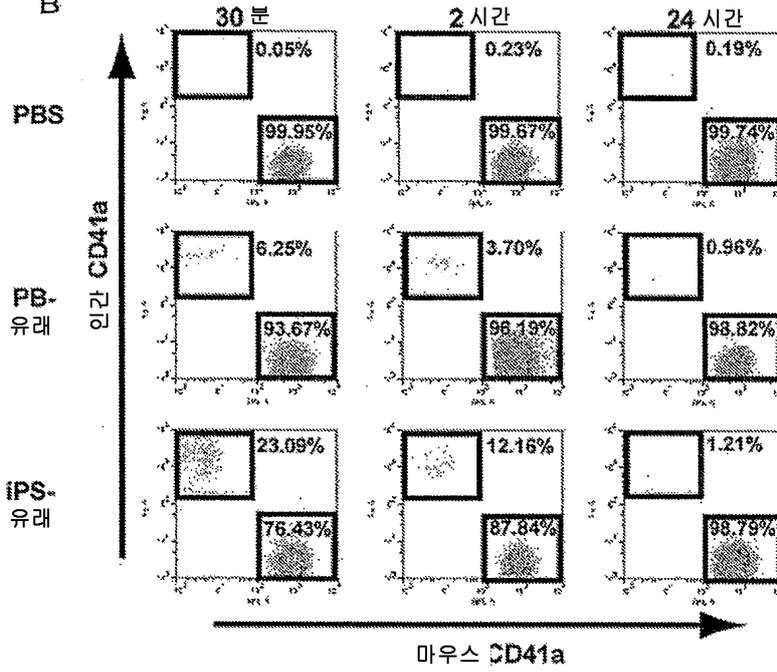


도면5

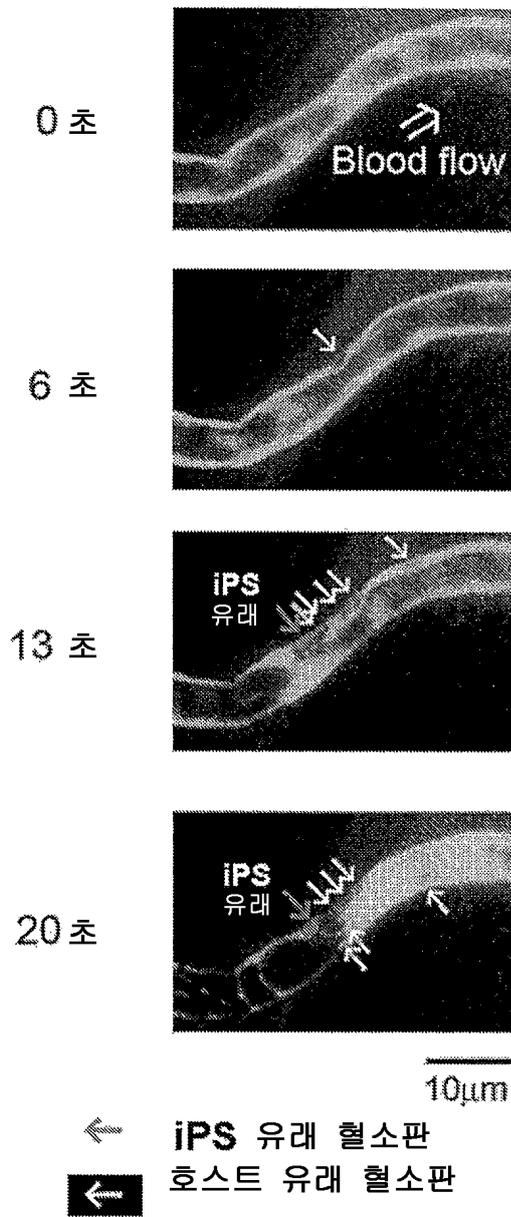
A



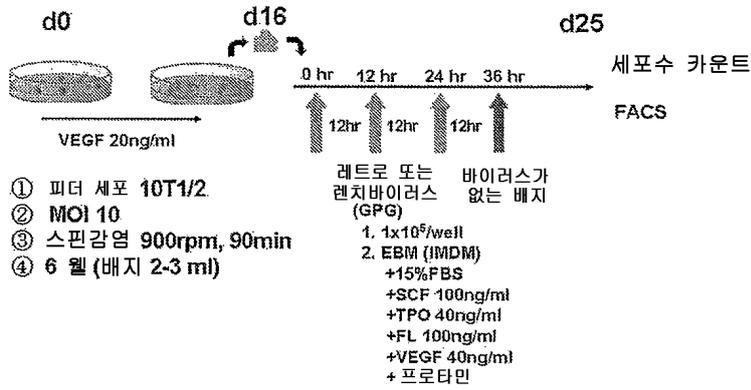
B



도면6

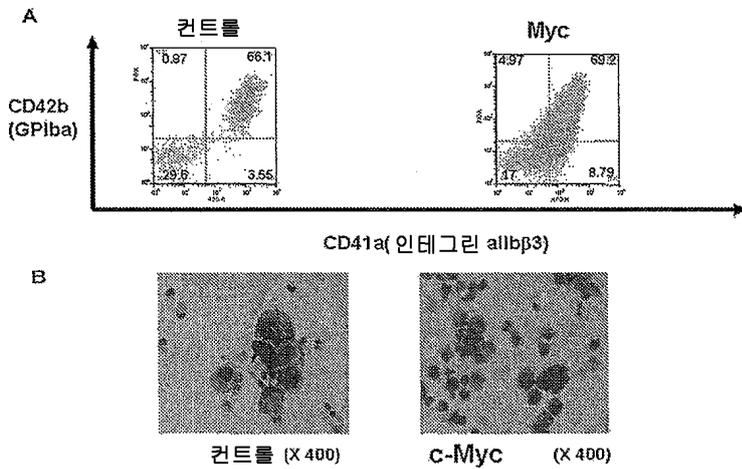


도면7

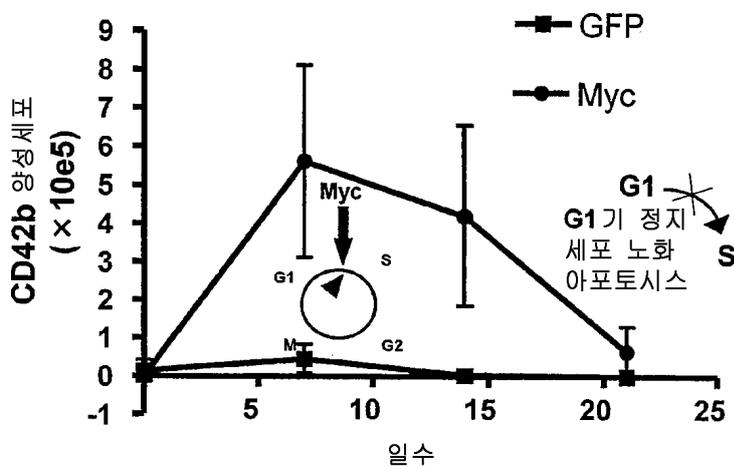


- ① 피터 세포 10T1/2
- ② MOI 10
- ③ 스피닝감염 900rpm, 90min
- ④ 6 웰 (배지 2-3 ml)

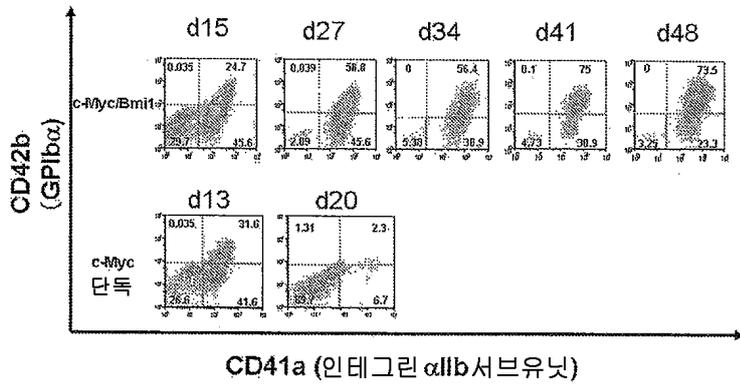
도면8



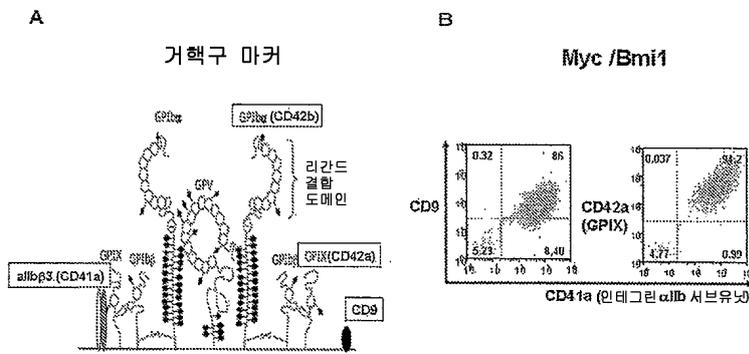
도면9



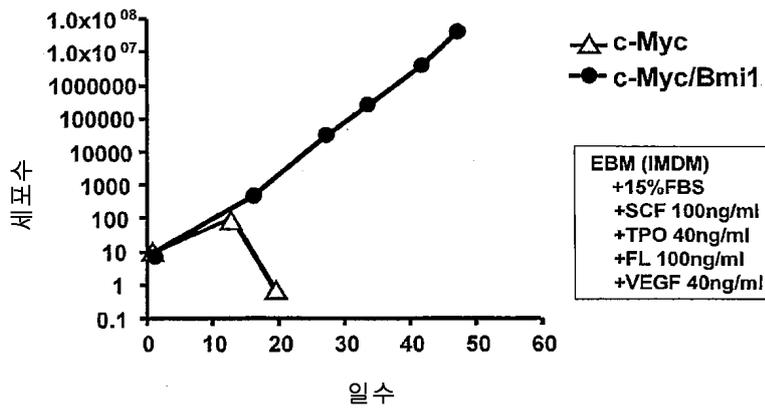
도면10



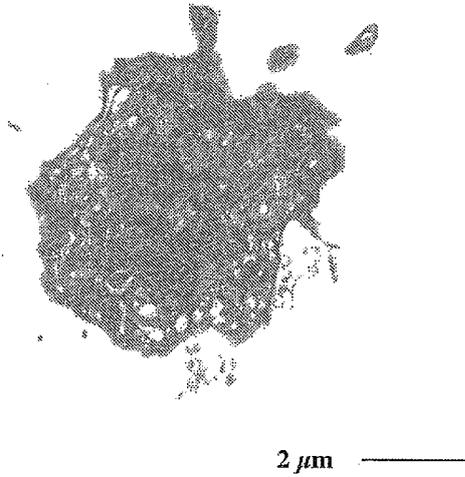
도면11



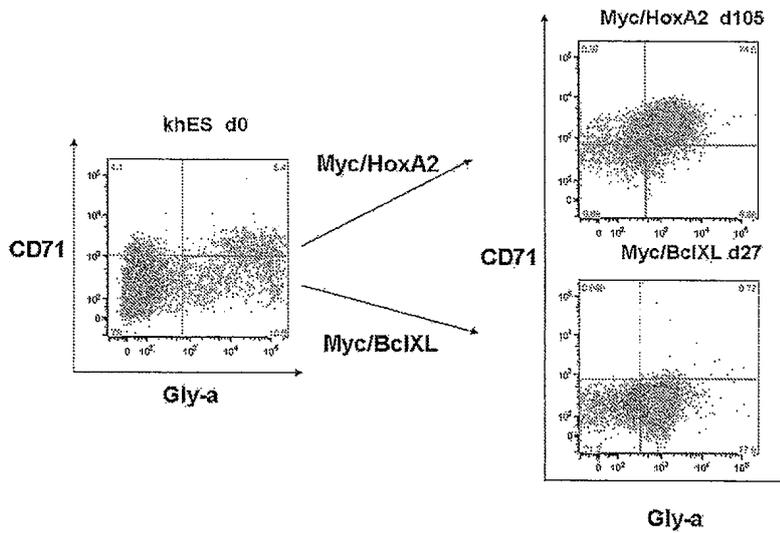
도면12



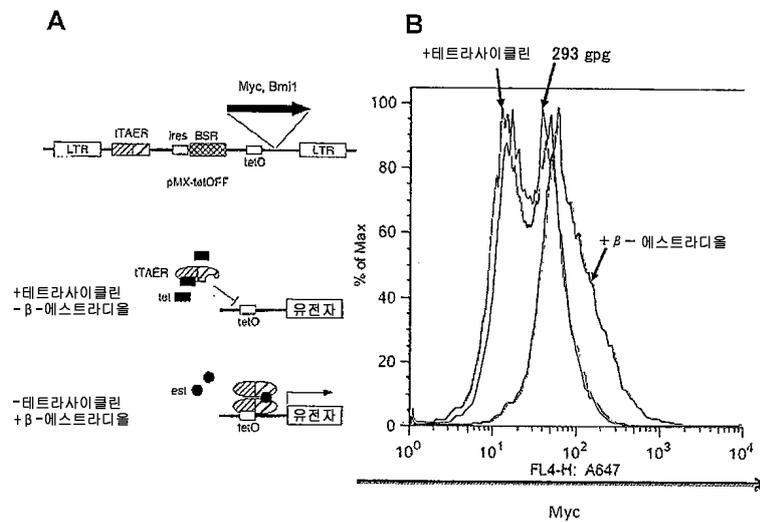
도면13



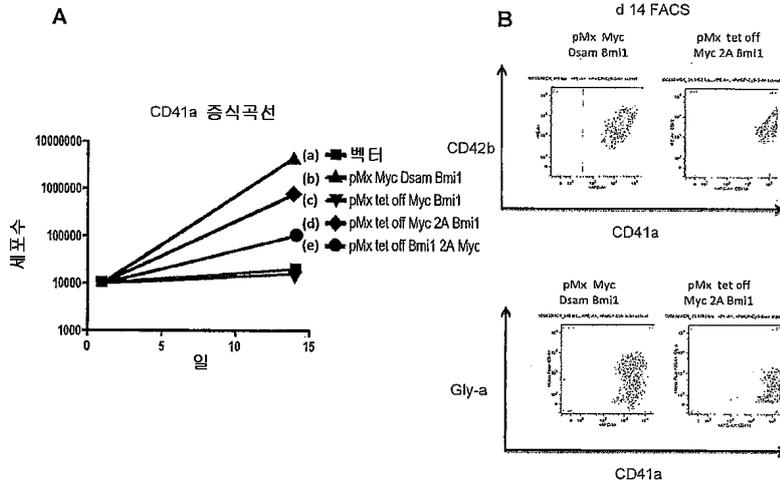
도면14



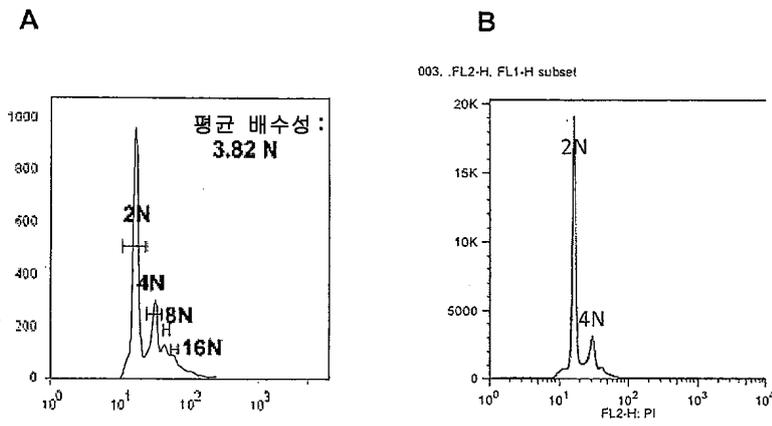
도면15



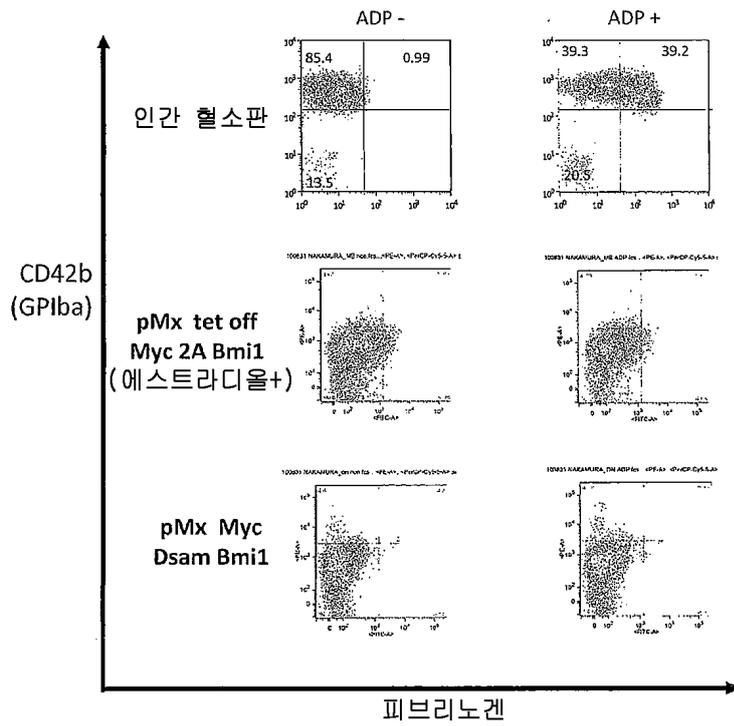
도면16



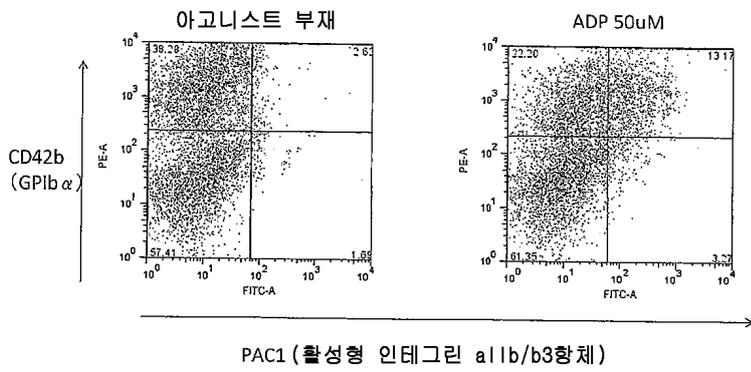
도면17



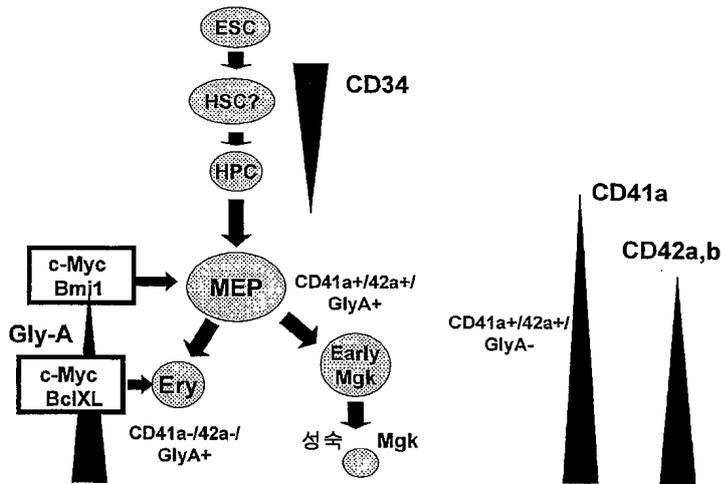
도면18



도면19



도면20



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Tokyo
 <120> A novel method for producing differentiated cells
 <130>
 <150> JP2009-213645
 <151> 2009-09-15
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1319
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atgccctca acgttagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag 60
 ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg 120
 cagcccccg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc cccccgcc 180

 ctgtccccta gccgccgctc cgggctctgc tcgccctct acgttgcggt cacacccttc 240
 tcccttcggg gagacaacga cggcggtggc gggagcttct ccacggccga ccagctggag 300
 atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg cgaccggac 360
 gacgagacct tcataaaaa catcatcadc caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc 420
 gccccaagc tcgtctcaga gaagctggcc tctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc 480
 agcccgaacc ccgcccgagg ccacagcgtc tgetccacct ccagcttgta cctgcaggat 540

ctgagcgccg ccgctcagag tgcacgacc cctcgggtgt cttcccctac cctctcaacg 600

acagcagctc gcccaagtcc tgcgcctcgc aagactccag cgccttctct ccgtcctcgg 660

attctctgct ctctcagag gagtctctcc cgcagggcag ccccgagccc ctgggtctec 720

atgaggagac accgcccacc accagcagcg actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag 780

aaatcgatgt tgtttctgtg gaaaagagcg aggtccttgg caaaaggtca gagtctggat 840

caccttctgc tggaggccac agcaaacctc ctcacagccc actggtcctc aagaggtgcc 900

acgtctccac acatcagcac aactacgag cgctcctc cactcggag gactatctg 960

ctgccaagag ggtcaagtg gacagtgtca gagtctgag acagatcagc aacaaccgaa 1020

aatgcaccag cccagggtcc tccgacaccg aggagaatgt caagaggcga acacacaacg 1080

tcttgagcgc ccagaggagg aacgagctaa aacggagctt ttttgcctg cgtgaccaga 1140

tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc ccaaggtagt tatccttaaa aaagccacag 1200

catacatcct gtcgctcaa gcagaggagc aaaagctcat tctgaagag gacttgttgc 1260

ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaa 1319

<210> 2

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgcatcgaa caacgagaat caagatcact gagctaaatc cccacctgat gtgtgtgctt 60

tgtggagggt acttcattga tgccacaacc ataatagaat gtctacattc cttctgtaaa 120

acgtgtattg ttcgttacct ggagaccagc aagtattgtc ctatttgtga tgtccaagtt 180

cacaagacca gaccactact gaatataagg tcagataaaa ctctccaaga tattgtatac 240

aaattagttc cagggtcttt caaaaatgaa atgaagagaa gaagggattt ttatgcagct 300

catccttctg ctgatgctgc caatggctct aatgaagata gaggagaggt tgcagatgaa 360

gataagagaa ttataactga tgatgagata ataagcttat ccattgaatt ctttgaccag 420

aacagattgg atcggaaagt aaacaaagac aaagagaaat ctaaggagga ggtgaatgat 480

aaaagatact tacgatgecc agcagcaatg actgtgatgc acttaagaaa gtttctcaga 540

agtaaaatgg acatacctaa tactttccag attgatgtca tgtatgagga ggaaccttta 600

aaggattatt atacactaat ggatattgcc tacatttata cctggagaag gaatggtcca 660

cttcattga aatacagagt tcgacctact tgtaaaagaa tgaagatcag tcaccagaga 720

gatggactga caaatgctgg agaactggaa agtgactctg ggagtgacaa ggccaacagc 780

ccagcaggag gtattccctc caccctttct tgtttgecta gccccagtac tccagtgcag 840
 tctcctcacc cacagtttcc tcacatttcc agtactatga atggaaccag caacagcccc 900

agcggtaace accaatcttc ttttgccaat agacctcgaa aatcatcagt aatgggtca 960
 tcagcaactt ctctggttg a 981

<210> 3

<211> 1131

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgaattacg aatttgagcg agagattggt tttatcaata gccagccgtc gctcgctgag 60
 tgctgacat cttttcccc tgtcgctgat acatttcaaa gttcatcaat caagacctcg 120
 acgctttcac actcgacact gattcctcct cttttgagc agaccattcc cagcctgaac 180
 cccggcagtc accctcgcca cggcgctggc ggccgcccc aagccgagccc cgcgggcagc 240

cgcggcagcc cgggtgccgc cggcgccctg cagccgcccg agtaccctg gatgaaggag 300
 aagaaggcgg ccaagaaaac cgcacttctg ccggccgccg ccgcccgcgc caccgccgca 360
 gccaccggcc ctgcttgctt cagccacaaa gaatccctgg aatcgccga tggcagcggc 420
 gggggatcgc ggcgcctgag aactgcttac accaacacac agcttctaga gctggaaaaa 480
 gaatttcatt tcaacaagta cttttgcaga ccccgaaggg tggagattgc agcgtgctg 540
 gatttgactg agagacaagt gaaagtgtgg tttcagaacc ggaggatgaa gcacaagagg 600
 cagaccctgt gcaaggaaaa ccaaacagc gaagggaat gtaaaagcct tgaggactcc 660

gagaaagtag aggaggacga ggaagagaag acgctctttg agcaagcct tagcgtctct 720
 ggggcccttc tggagaggga aggctacact tttcagcaaa atgcctctc tcagcagcag 780
 gctcccaatg gacacaatgg cgactccaa agtttccag tctcgcttt aaccagcaat 840
 gagaaaaatc tgaaacattt tcagcaccag tcaccactg ttccaactg cttgtcaaca 900
 atgggccaga actgtggagc tggcctaac aatgacagtc ctgaggcct tgaggctccc 960
 tctttgcagg actttagcgt tttctccaca gattcctgcc tgcagctttc agatgcagtt 1020
 tcaccagtt tgccaggttc cctcgacagt cccgtagata tttcagctga cagcttagac 1080

tttttacag acacactcac cacaatcgac ttgcagcatc tgaattacta a 1131

<210> 4

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgtctcaga gcaaccggga gctggtggtt gactttctct cctacaagct ttcccagaaa	60
ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggc cccagaaggg	120
actgaatcgg agatggagac cccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca	180
gacagccccg cggatgaatgg agccactggc cacagcagca gtttggatgc ccgggaggtg	240
atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgtg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgcgg	300
taccggcggg cattcagtga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat	360
cagagctttg aacaggtagt gaatgaactc ttccgggatg gggtaaactg gggtcgcatt	420
gtggcctttt tctccttcgg cggggcactg tgcgtgaaa gcgtagaaa ggagatgcag	480
gtattggtga gtcggatcgc agcttggatg gccacttacc tgaatgacca cctagagcct	540
tggatccagg agaacggcgg ctgggatact ttgtggaac tctatgggaa caatgcagca	600
gccgagagcc gaaaggcca ggaacgctc aaccgctggt tcctgacggg catgactgtg	660
gccggcgtgg ttctgctggg ctcactcttc agtcggaat ga	702