(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113388
(43) 공개일자 2024년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0657 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0001908
(22) 출원일자 2024년01월05일
심사청구일자 2024년01월05일
(30) 우선권주장
1020230005080 2023년01월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임도선
서울특별시 강남구 선릉로 206, 101동 204호
송명화
서울특별시 성북구 안암로9나길 14, 7동 776호
(74) 대리인
위병갑

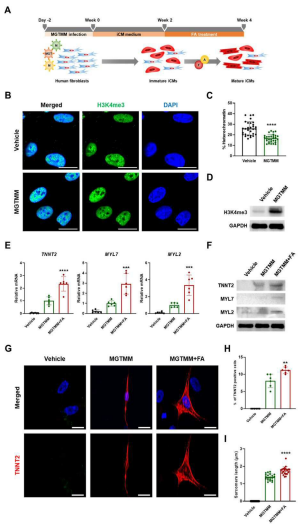
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **성숙한 심근세포로의 직접교차분화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 섬유아세포로부터 성숙한 심근세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 직접교차분화 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, FGF4 및 아스코르브산 처리에 의해 심실 타입으로의 성숙 분화가 유도되고 섬유아세포에서 심근세포로의 직접교차분화가 촉진되었으므로, 이를 심근세포 성숙용 또는 직접교차분화 촉진용 조성물로 이용할 수 있고, 이를 심장 오가노이드 제작에 적용하여 인공 심장, 질환 모델링, 약물 스크리닝, 신약 독성평가 등에 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2501/119 (2013.01)
C12N 2506/1307 (2013.01)
C12N 2740/15043 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711159391
과제번호	2019R1A2C2087198
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	크리스퍼시스템 기반 전사체 활성인자를 이용한 세포전환기술 개발
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

FGF4(fibroblast growth factor 4) 및 아스코르브산(Ascorbic acid)을 유효성분으로 포함하는 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 심근세포는 섬유아세포로부터 직접교차분화된 심근세포인, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 직접교차분화된 심근세포는 직접교차분화되지 않은 세포에 비해 MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD의 유전자 발현이 증가된, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 직접교차분화된 심근세포는 H3K4me3 또는 TNNT2의 유전자 및 단백질의 발현이 증가된, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, FGF4를 5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 포함하는, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 아스코르브산을 100 μg/ml 내지 300 μg/ml의 농도로 포함하는, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, MYL7, MYL2, MYH6, MYH7, TNNI3, BIN1, CAV3, JPH2, CACNA1C, RYR2, PPARGC1A, TFAM, SIRT1, CPT1B, CD36, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2, GDF5, STAT3, p21, Laminin, COL1A1, ITGAV, ITGA7, ITGB3, ROCK1, ROCK2, TLN1 또는 DES의 발현을 증가시키는, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, JAK2, STAT3 또는 SMAD3의 인산화를 증가시키는, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, FN1의 발현을 감소시키는, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 미토콘드리아의 수를 증가시키는, 심근세포 성숙용 조성물.

청구항 11

FGF4 및 아스코르브산을 유효성분으로 포함하는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, FGF4를 5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 포함하는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 13

제 11항에 있어서, 아스코르브산을 100 μg/ml 내지 300 μg/ml의 농도로 포함하는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 14

제 11항에 있어서, 섬유아세포의 심실타입 심근세포로의 직접교차분화를 촉진하는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 15

제 11항에 있어서, MYL7, MYL2, MYH6, MYH7, TNNI3, BIN1, CAV3, JPH2, CACNA1C, RYR2, PPARGC1A, TFAM, SIRT1, CPT1B, CD36, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2, GDF5, STAT3, p21, Laminin, COL1A1, ITGAV, ITGA7, ITGB3, ROCK1, ROCK2, TLN1 또는 DES의 발현을 증가시키는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 16

제 11항에 있어서, JAK2, STAT3 또는 SMAD3의 인산화를 증가시키는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 17

제 11항에 있어서, FN1의 발현을 감소시키는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 18

a) 섬유아세포에서 MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD의 과발현을 유도하는 단계; 및

b) 제 11항의 직접교차분화 촉진용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 단계 a) 전에 섬유아세포를 단일세포로 분리하여 분주하는 단계를 추가로 포함하는, 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법.

청구항 20

제 18항에 있어서, MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD를 과발현하는 바이러스로 섬유아세포를 감염시켜 과발현을 유도하는, 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법.

청구항 21

제 18항에 있어서, 단계 b)의 제 11항의 직접교차분화 촉진용 조성물을 처리는 과발현 유도 후 10일 내지 30일 동안 수행되는, 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 섬유아세포로부터 성숙한 심근세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 직접교차분화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 심장질환은 우리나라 주요 사망원인 중 하나로 심근경색, 협심증 등의 유병률 및 사망률이 타 질환보다 월등히 높으며, 매년 사망률이 증가하고 있는 상황이다. 손상된 심장 조직을 재생하기 위하여 경색된 심장 내로 줄기세포를 직접 주사하는 방법 및 세포 배양 시트를 이식하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 손상된 심장 조직 내로 이식된 줄기세포는 생착률이 매우 낮으며, 면역 거부 반응이나 이식된 세포가 심근세포로의 분화되는 비율이 매

우 낮아 이식을 성공적으로 할지라도 기대 이상의 치료 효과를 보기에 한계가 있는 상황이다.

[0003] 세포성 치료법은 예를 들면 재생 의료, 장기이식 및 심지어 암과 같은 임의의 상태의 진단 또는 예방 목적을 포함하는 임의의 목적을 위해서 살아있는 세포를 투여하는 것을 포함한다. 줄기세포는 세포치료법에 있어서 매우 훌륭한 잠재성을 갖는 것으로 평가되고 있으나, 종래의 유도만능줄기세포를 이용한 특정세포로의 분화 및 이를 통한 세포치료의 한계점이 있어왔다. 이를 극복하기 위하여, 임의의 체세포를 모든 세포로 분화가 가능한 유도만능줄기세포로 역분화 시킨 후 다시 하위로 분화시키는 과정(re-differentiation)을 거치지 않고, '직접' 원하는 특정 세포로 전환시키는 기술인 직접교차분화(direct conversion)에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 직접교차분화 기술은 분화된 세포에 유전자 또는 화합물을 도입하여 세포를 전환시키는 기술로, 유도만능줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 원하는 세포로 전환을 유도할 수 있다. 생체 내 직접교차분화 기술은 세포의 체외 조작 없이 생체 내에서 직접교차분화를 유도하여 세포의 운명을 바꾸는 기술로서, 생체 내에서 재생이 필요한 세포를 주변의 세포로부터 직접 만들어 낼 수 있기 때문에 세포의 이식과 같은 침습적인 방법에 따른 불편이나 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 기대되어, 많은 연구진들에 의해 생체 내 직접 세포 전환기술에 대하여 리프로그래밍과 관련된 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 그 중 가장 많은 연구가 이루어진 부분은 심장이다. 심장은 대표적으로 알려진 재생능력이 낮은 장기이고, 수술을 통한 이식이나 세포 이식이 쉽지 않기 때문에 생체 내 직접 교차분화를 적용하기에 가장 적합한 장기이다. 심혈관 질환의 치료를 위해 바이러스 기반 전사인자를 세포 내로 도입하여 과발현하여 생체 내에서 섬유아세포가 심근세포로 전환된다는 연구는 보고되고 있으나, 임상에 적용가능하기 위해서는 심근세포로 전환율을 높여야 할 뿐만 아니라 부분적인 전환에 의한 구조 및 기능적으로 미성숙한 심근세포가 아니라 성숙한 성체 심근세포와 같은 완전한 리프로그래밍을 유도할 수 있는 인자의 발굴과 기술 개발이 필요한 상황이다. 또한, 마우스 섬유아세포와 인간 섬유아세포를 심근세포로 직접 교차분화를 유도할 수 있는 전사인자들이 종간에 차이를 나타내기 때문에 인간 섬유아세포를 높은 효율 및 고성숙 심근세포로 분화시킬 수 있는 성숙인자의 발굴이 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 심근세포 성숙용 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 또한, 본 발명의 목적은 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 아울러, 본 발명의 목적은 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 FGF4 및 아스코르브산을 유효성분으로 포함하는 심근세포 성숙용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 FGF4 및 아스코르브산을 유효성분으로 포함하는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0009] 아울러, 본 발명은 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, FGF4 및 아스코르브산 처리에 의해 심실 타입으로의 성숙 분화가 유도되고 섬유아세포에서 심근세포로의 직접교차분화가 촉진되었으므로, 이를 심근세포 성숙용 또는 직접교차분화 촉진용 조성물로 이용할 수 있고, 이를 심장 오가노이드 제작에 적용하여 인공 심장, 질환 모델링, 약물 스크리닝, 신약 독성평가 등에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 MGTMM (MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD)을 과발현시키기 위한 바이러스 벡터와 이의 발현을 확인한 도이다.

도 2는 인간 섬유아세포를 성숙한 심근세포로 직접교차분화시키고 이를 확인한 도이다:

A: 직접교차분화 과정의 모식도;

B: 면역형광염색법으로 분석한 H3K4me3의 발현;

C: 전체 핵 중 H3K4me3가 발현되지 않는 부분에 대한 비율;

D: H3K4me3의 단백질 발현;

E 및 F: 심근세포 마커인 TNNT2, 심방 심근세포 마커인 MYL7 및 심실 심근세포 마커인 MYL2의 발현;

G 및 H: 심근세포 마커인 TNNT2 양성 세포; 및

I: TNNT2 양성 세포에서의 근절의 길이.

도 3은 직접교차분화시킨 심근세포를 분석한 도이다:

Vehiocle: MGTMM을 과발현시키지 않은 인간 섬유아세포;

MGTMM: MGTMM을 과발현시킨 심근세포;

MGTMM+FA: MGTMM을 과발현시킨 후 FGF4 및 아스코르브산을 처리한 심근세포;

A: 인간 섬유아세포로부터 직접교차분화시킨 심근세포의 이미지; 및

B: 심근세포 그룹 (MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹)에서 GATA4, MEF2C, TBX5, MESP1 및 MYOCD의 발현.

도 4는 성숙 심근세포로의 분화 유도 및 구조적 성숙을 분석한 도이다:

A: 노달 심근세포 마커인 TBX18의 발현;

B: 성숙 심근세포 마커인 TNNI3, MYH6 및 MYH7의 발현;

C 및 D: T-세관 마커인 BIN1, CAV3 및 JPH2의 발현; 및

E: 심근세포 마커인 TNNT2 및 T-세관 마커인 JPH2의 발현.

도 5는 인간 섬유아세포로부터 직접교차분화시킨 심근세포의 대사적 성숙을 분석한 도이다:

A: 칼슘채널 마커인 CACNA1C 및 RYR2의 발현;

B: 칼륨채널 마커인 KCNH2 및 KCNJ2의 발현;

C 및 D: 미토콘드리아 생합성 마커인 TFAM, PPARGC1A 및 SIRT1의 발현;

E: 정량 분석한 미토콘드리아의 수;

F 및 G: 미토콘드리아와 칼슘 이온의 공동 발현; 및

H 및 I: 지방산 산화 마커인 CPT1B, CD36 및 PPARA의 발현.

도 6은 성숙화 관련 신호기전을 전사체 분석으로 확인한 도이다:

A: MGTMM/Vehicle, MGTMM+FA/Vehicle 및 MGTMM+FA/MGTMM에서 유전자의 증감을 보여주는 벤다이어그램;

B: MGTMM/Vehicle, MGTMM+FA/Vehicle 및 MGTMM+FA/MGTMM의 산포도;

C: 심근세포 관련 유전자의 발현을 나타내는 히트맵;

D: MGTMM에 대비하여 MGTMM+FA에서 증가하는 유전자 온톨로지;

E: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 신호기전; 및

F 내지 J: KEGG 신호기전과 관련된 유전자들의 발현.

도 7은 JAK2-STAT3 신호전달 경로가 직접교차분화된 심근세포의 성숙화에 미치는 영향을 확인한 도이다:

MGTMM: MGTMM을 과발현시킨 심근세포;

MGTMM+FA: MGTMM을 과발현시킨 후 FGF4 및 아스코르브산을 처리한 심근세포;

MGTMM+Inh: MGTMM을 과발현시킨 후 JAK2-STAT3의 억제제를 처리한 심근세포;

MGTMM+FA+Inh: MGTMM을 과발현시킨 후 FGF4 및 아스코르브산 그리고 JAK2 및 STAT3의 억제제를 처리한

심근세포;

A: 처리군의 모식도;

B: JAK2-STAT3 신호기전의 발현;

C 및 D: JAK2-STAT3 신호기전의 하위 신호기전인 TGFB 신호기전의 발현;

E: TGFB 신호기전의 하위 신호기전인 세포외기질의 발현; 및

F 내지 J: 심근세포 및 성숙 심근세포의 발현을 분석하기 위한 유전자 및 단백질 발현.

도 8은 섬유아세포에서 심근세포로의 직접교차분화에 관여하는 신호기전을 분석한 도이다:

A: Vehicle 대비 MGTMM에 의한 KEGG 신호기전 변화;

B: 세포외기질 마커인 Laminin, FN1 및 COL1A1의 발현;

C: 인테그린 마커인 ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGA7, ITGB1 및 ITGB3의 발현; 및

D: 국소접착 마커인 ROCK1, ROCK2, VCL, TLN1, TLN2 및 DES의 발현.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0013] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0016] 일 측면에서, 본 발명은 FGF4(fibroblast growth factor 4) 및 아스코르브산(Ascorbic acid)을 유효성분으로 포함하는 심근세포 성숙용 조성물에 관한 것이다.

[0017] 일 구현예에서, 상기 심근세포는 섬유아세포로부터 직접교차분화된 심근세포일 수 있으며, 직접교차분화된 심근세포는 직접교차분화되지 않은 세포에 비해 MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD의 유전자 발현이 증가될 수 있으며, 직접교차분화된 심근세포는 H3K4me3 또는 TNNT2의 유전자 및 단백질의 발현이 증가될 수 있다.

[0018] 일 구현예에서, FGF4를 5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 포함할 수 있으며, 10 ng/ml 내지 25 ng/ml의 농도로 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

[0019] 일 구현예에서, 아스코르브산을 100 μg/ml 내지 300 μg/ml의 농도로 포함할 수 있다.

[0020] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 섬유아세포로부터 직접교차분화된 미성숙 심근세포를 성숙화할 수 있으며, 미성숙 심근세포(immature cardiomyocytes)는 심방, 심실 및 노달 심근세포 타입 등이 섞여 있는 심근세포일 수 있다.

[0021] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 처리에 의해 성숙된 심근세포는 심실 타입(ventricular-like) 심근세포일 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 MYL7, MYL2, MYH6, MYH7, TNNI3, BIN1, CAV3, JPH2, CACNA1C, RYR2,

PPARGC1A, TFAM, SIRT1, CPT1B, CD36, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2, GDF5, STAT3, p21, Laminin, COL1A1, ITGAV, ITGA7, ITGB3, ROCK1, ROCK2, TLN1 또는 DES의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 JAK2, STAT3 또는 SMAD3의 인산화를 증가시킬 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 FN1의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0025] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 직접교차분화된 심근세포에서 MYL7, MYL2, MYH6, MYH7, TNNI3, BIN1, CAV3, JPH2, CACNA1C, RYR2, PPARGC1A, TFAM, SIRT1, CPT1B, CD36, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2, GDF5, STAT3, p21, Laminin, COL1A1, ITGAV, ITGA7, ITGB3, ROCK1, ROCK2, TLN1 또는 DES의 발현을 증가시킴으로써 미성숙한 직접교차분화된 심근세포를 성숙한 직접교차분화된 심근세포로 성숙시키고, 성숙한 심실타입의 심근세포로 분화를 유도할 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 미토콘드리아의 수를 증가시킬 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 T-세관의 유전자 발현을 증가시키고, 근절과 T-세관의 배열을 정렬시킬 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 심장 대사를 증진시킬 수 있다.

[0029] 일반적으로, 성숙 심근세포(mature cardiomyocytes)를 질병모델링 및 약물 독성 평가에 사용하는 것이 보다 정확한 효능 및 안전성을 평가할 수 있으므로, 본 발명에서는 종래의 인간 섬유아세포로부터 직접교차분화된 심근세포들이 배아기 심근세포 또는 심방, 심실 및 노달 심근세포 타입 등이 섞여 있는 미성숙 심근세포(immature cardiomyocytes)의 특징을 나타내는 문제점을 해결하기 위해, 심근세포 성숙용 조성물을 처리함으로써 심근세포 타입별 성숙 심근세포로 성숙화시켰다.

[0030] 일 측면에서, 본 발명은 FGF4 및 아스코르브산을 유효성분으로 포함하는, 섬유아세포의 심근세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0031] 일 구현예에서, FGF4를 5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 포함할 수 있으며, 10 ng/ml 내지 25 ng/ml의 농도로 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

[0032] 일 구현예에서, 아스코르브산을 100 μg/ml 내지 300 μg/ml의 농도로 포함할 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 섬유아세포의 심실타입 심근세포로의 직접교차분화를 촉진시킬 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 MYL7, MYL2, MYH6, MYH7, TNNI3, BIN1, CAV3, JPH2, CACNA1C, RYR2, PPARGC1A, TFAM, SIRT1, CPT1B, CD36, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2, GDF5, STAT3, p21, Laminin, COL1A1, ITGAV, ITGA7, ITGB3, ROCK1, ROCK2, TLN1 또는 DES의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 JAK2, STAT3 또는 SMAD3의 인산화를 증가시킬 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 FN1의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 섬유아세포에서 MYL7, MYL2, MYH6, MYH7, TNNI3, BIN1, CAV3, JPH2, CACNA1C, RYR2, PPARGC1A, TFAM, SIRT1, CPT1B, CD36, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2, GDF5, STAT3, p21, Laminin, COL1A1, ITGAV, ITGA7, ITGB3, ROCK1, ROCK2, TLN1 또는 DES의 발현; 또는 JAK2, STAT3 또는 SMAD3의 인산화를 증가시킴으로써 심근세포로의 직접교차분화를 촉진시킬 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 섬유아세포는 인간 섬유아세포일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어, "인간 섬유아세포(human fibroblast)"는 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)로 인간의 피부에서 채취한 조직으로부터 섬유아세포를 분리하는 단계를 통하여 생성된 섬유아세포를 의미한다.

[0040] 일반적으로, 심근경색 등과 같은 심장질환은 손상을 받으면, 심근세포의 죽음 및 섬유아세포의 활성화가 나타나, 심장의 섬유화 과정이 유도되므로, 본 발명에서는 이렇게 발생한 섬유아세포를 이용하여 심근세포로의 직접교차분화를 유도하였으며, 본 발명의 조성물은 성숙한 심근세포로 직접교차분화를 유도하므로, 종래의 인간 섬유아세포로부터 직접 교차분화된 심근세포들이 배아기 심근세포와 미성숙 심근세포의 특성을 나타내는 문제점을 해결하였다.

[0041] 본 발명에서 사용된 용어, "분화"는 세포가 분열하여 증식하며 전체 개체가 성장하는 동안에 세포의 구조나 기

능이 특수화되는 현상을 의미한다. 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어지는 역할을 수행하기 위해 적합한 형태 및 기능으로 변하는 과정을 말하며, 예를 들어, 만능 줄기세포가 외배엽, 중배엽 및 내배엽 세포로 변하는 과정뿐 아니라 전구세포가 특정 분화형질을 발현하게 되는 것도 모두 분화에 포함될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용된 용어, "직접교차분화(direct reprogramming/direct conversion/transdifferentiation)"는 체세포로부터 전능성 단계(Pluripotent state)를 경유하지 않고, 유전자 또는 화합물을 도입하여 목적하는 세포로 운명을 전환시키는 기술로써 다른 세포타입을 가지는 세포간의 전환을 유도하는 과정을 의미한다. 직접교차분화 기술은 유도만능줄기세포로 리프로그래밍하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 세포 전환을 하는 과정과 달리, 유도만능줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 차이를 가지며, 유도만능줄기세포 단계를 거치지 않으므로서 기형종 혹은 암 발생에 대한 위험성을 최소화할 수 있고, 환자맞춤형의 재생의학적 치료 세포를 생산하는 유용한 기술로 평가받는다.

[0043] 일 측면에서, 본 발명은 a) 섬유아세포에서 MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD의 과발현을 유도하는 단계; 및 b) 본 발명의 직접교차분화 촉진용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화하는 방법에 관한 것이다.

[0044] 일 구현예에서, 상기 단계 a) 전에 섬유아세포를 단일세포로 분리하여 분주하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 섬유아세포는 4.5×10^3 내지 4.5×10^5 세포/cm^2의 밀도로 분주될 수 있다.

[0045] 일 구현예에서, 상기 단계 b)는 MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD를 과발현하는 바이러스로 섬유아세포를 감염시켜 수행될 수 있으며, 상기 유전자를 과발현하는 바이러스는 1종 이상일 수 있고, MEF2C, GATA4 및 TBX5를 과발현하는 바이러스 벡터, MESP1를 과발현하는 바이러스 벡터 및 MYOCD를 과발현하는 바이러스 벡터를 조합할 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 상기 세포 당 바이러스 감염 수 (MOI)가 50 내지 200의 농도일 수 있고, 감염은 2일 동안 수행될 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 상기 단계 b)는 과발현 유도 후 10일 내지 30일 동안 수행될 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 상기 방법으로 직접교차분화된 심근세포는 FGF4 및 아스코르브산을 처리하지 않은 심근세포에 비해 기능적, 구조적 또는 대사적으로 성숙될 수 있다.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 i) 인간 섬유아세포를 단일세포로 분리하는 단계; ii) 0.1% Gelatin으로 코팅된 배양접시에서 배양하는 단계; iii) MGTMM 과발현 렌티바이러스로 감염시키는 단계; iv) B27 보충제를 포함하는 RPMI1640 배양액에서 심근세포로의 분화를 유도하는 단계; v) B27 보충제를 포함하는 RPMI1640 배양액에 FGF4 및 아스코르브산을 처리하여 성숙 심근세포의 분화를 유도하는 단계를 포함하는, 섬유아세포를 심근세포로 직접교차분화 방법에 관한 것이다.

[0050] 일 구현예에서, 상기 MGTMM 과발현 렌티바이러스는 MEF2C, GATA4 및 TBX5를 과발현하는 바이러스 벡터, MESP1를 과발현하는 바이러스 벡터 및 MYOCD를 과발현하는 바이러스 벡터의 조합일 수 있다.

[0052] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. 직접교차분화 유도용 바이러스 벡터 제작**

[0055] 1-1. 바이러스 벡터 제작

[0056] 인간 섬유아세포(fibroblast)로부터 심근세포로 직접교차분화를 유도하기 위하여 과발현이 요구되는 MGTMM (MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD)의 바이러스 벡터를 구축하였다. 바이러스 벡터의 백본은 pLVX-EF1α이며, 벡터는 pLVX-EF1α-Human MGT (MEF2C-GATA4-TBX5 순서), pLVX-EF1α-Human MESP1 및 pLVX-EF1α-Human MYOCD로 총 3가지이며, 각각 사이즈는 12,052 bp, 9,643 bp 및 11,803 bp이다 (도 1A 내지 C). 293 FT 세포를 이용하여 상기 바이러스 벡터로부터 렌티바이러스를 획득하였다.

[0058] 1-2. 바이러스 벡터의 과발현 확인

[0059] 바이러스 벡터의 과발현 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 제작한 벡터들을 각각 293 FT 세포에 감염시킨 후 중합효소연쇄반응으로 확인하였다. 중합효소연쇄반응을 위해, TRIzol을 이용하여 세포에서 전체 RNA를 추출하고, RNA의 농도와 순도를 Nanodrop 흡광기기로 측정하였다. 추출한 전체 RNA를 M-MLV 역전사 효소를 이용하여 37℃에서 50분 동안 20 μL의 양으로 반응시켜 cDNA를 생성하고, iQTM SYBR Green supermix를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행한 뒤, 결과는 MYIQ2 Detection System을 이용하여 기록하였다. Ct 값을 기반으로 정량화하여 유전자 발현 수준을 비교하였으며, 참조 유전자는 GAPDH를 이용하여 표준화하였다. 이 때, 게놈 DNA의 증폭을 피하기 위하여, intron-spanning 프라이머를 ProbeFinder software을 이용하여 디자인하였다.

[0060] 그 결과, MGT 과발현 벡터를 감염시킨 세포에서 MEF2C, GATA4 및 TBX5의 발현이 증가하였으며, MESP1 과발현 벡터를 감염시킨 세포에서 MESP1의 발현이 증가하였고, MYOCD 과발현 벡터를 감염시킨 세포에서 MYOCD의 발현이 증가한 것으로 나타났다 (도 1D).

[0062] **실시예 2. 인간 섬유아세포로부터 심근세포로의 직접교차분화**

[0063] 2-1. 직접교차분화 조건 확립

[0064] 인간 섬유아세포로부터 심근세포로 직접교차분화를 유도하는 조건을 확립하였다. 구체적으로 인간 섬유아세포를 TE(Trypsin-EDTA)를 이용해 단일세포로 분리한 뒤, Gelatin 코팅된 6웰 플레이트에 FGM(Fibroblast growth medium; LONZA)를 이용하여 4.5 X 10^4 세포/cm^2으로 분주하였다. 분주 1일 후, 상기 실시예 1에서 획득한 렌티바이러스 (pLVX-EF1α-Human MGT, pLVX-EF1α-Human MESP1 및 pLVX-EF1α-Human MYOCD)를 MOI 100으로 감염시키고 2일 동안 배양하였다. 감염 2일차에 B27 보충제가 함유된 RPMI1640 배지로 교환해주고 2주간 배양하였으며, 감염 2주부터 4주까지 10 ng/ml의 FGF4 및 200 μg/ml의 아스코르브산(Ascorbic acid)를 포함하는 B27 보충제가 함유된 RPMI1640 배지로 교환해주고 4주간 배양하였다 (도 2A). 이 때, MGTMM으로 감염시키지 않은 그룹을 대조군(Vehicle), MGTMM으로 감염시키고 FGF4 및 아스코르브산을 처리하지 않은 그룹을 MGTMM, 및 MGTMM으로 감염시키고 FGF4 및 아스코르브산을 처리한 그룹을 MGTMM+FA으로 명명하였다. 4주간 배양 후 (Day 28) 현미경으로 세포의 형태를 관찰하고, MGTMM의 과발현을 중합효소연쇄반응으로 확인하였다.

[0065] 현미경으로 세포를 관찰한 결과, MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹의 세포에서 대조군에 비해 더 길고 두꺼운 모양을 보였다 (도 3A). 또한, 중합효소연쇄반응 결과, MEF2C, GATA4, TBX5, MESP1 및 MYOCD 모두 대조군에 비하여 MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹에서 증가한 것으로 나타났다 (도 3B).

[0067] 2-2. 심근세포의 분화 확인

[0068] 섬유아세포로부터 심근세포로 직접교차분화되었는지 확인하기 위해, 심근세포로 직접교차분화가 유도되었을 경우 발현이 증가하는 H3K4me3의 발현을 바이러스 감염 유도 1주차에 면역형광염색 및 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. H3K4me3의 발현을 면역형광염색법으로 분석하기 위해, 세포를 PBS를 이용하여 2번 세척한 후 4% 파라포름알데하이드(PFA)를 이용하여 20분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 0.25%의 Triton X-100을 이용하여 30분 동안 투과시켰으며, 5% 일반 염소 혈청(NGS)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 블록킹하였다. 그 후 심장 오가노이드를 각 마커에 대한 1차 항체인 항-H3K4me3 항체 (1:400)와 4 ℃에서 밤새 반응시켰다. 각 세포를 PBS에 0.1%의 Tween 20이 함유된 PBST로 3번 세척한 후, 상온에서 2시간 동안 2차 항체인 Alexa Fluor 488 chicken 항-rabbit IgG (1:1000)와 반응시켰으며, 핵은 1 μg/mL의 DAPI로 염색하였다. 형광 이미지는 형광현미경과 공초점 형광현미경을 이용하여 얻었다. 또한, H3K4me3의 발현을 웨스턴블롯 분석으로 확인하기 위해, 세포를 각각 PBS에서 세척한 후, 1 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoriderk 함유된 1X 세포 용해 버퍼로 용해하였다. Bradford 분석을 통해 단백질의 농도를 측정한 뒤, 15 μg의 단백질을 1X 로딩 염색제와 섞은 후 8분간 가열하였다. 이후, 각 단백질 시료를 10%의 SDS 아크릴아마이드 젤에서 전기영동으로 분리한 뒤 polyvinylidene fluoride 멤브레인으로 트랜스퍼하고, 상온에서 1시간 동안 멤브레인을 5%의 탈지분유 또는 BSA를 포함하는 TBST에서 블록킹하였다. 블록킹한 멤브레인을 1차 항체인 항-H3K4me3 항체 (1:1000)와 4 ℃에서 밤새 반응시켰다. 그 뒤, 멤브레인을 TBST로 3번 세척하고 horseradish peroxidase가 컨쥬게이트된 2차 항체와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 밴드는 ECL 및 ECL plus를 이용하여 시각화하였으며, ChemiDoc 이미징 시스템을 이용하여 얻었다.

[0069] 면역형광염색 분석 결과, 대조군에 비해 MGTMM 그룹에서 H3K4me3의 발현이 현저히 증가된 것으로 나타났으며

(도 2B), 이를 그래프화하여 분석한 결과, 핵과 겹치지 않는 부분의 형광은 대조군에서 더 높게 관찰되었다 (도 2C). 또한, 웨스턴블롯 분석 결과, 면역형광염색과 유사하게 MGTMM 그룹에서 H3K4me3의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 2D).

[0071] 2-3. 심근세포의 분화 타입 분석

[0072] 심근세포가 성숙화가 진행되면 심실타입의 심근세포로의 분화가 증가되므로, 심근세포의 타입별 분화를 관찰하기 위해, 심근세포 마커인 TNNT2, 심방타입 심근세포 마커인 MYL7 및 심실타입 심근세포 마커인 MYL2의 발현을 중합효소연쇄반응 및 웨스턴블롯을 통하여 분석하였다. 또한, 심근세포로의 분화를 분석하기 위하여 면역형광염색법을 통하여 심근세포 마커인 TNNT2의 발현을 확인하였다.

[0073] 그 결과, MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹 모두에서 대조군에 비해 TNNT2, MYL7 및 MYL2의 발현이 증가하였으며, MGTMM 그룹에 대비하여 MGTMM+FA 그룹에서 증가하였다 (도 2E 및 2F). 또한, MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹에서 TNNT2 양성 세포가 대조군에 비해 증가된 것으로 관찰되었으며, TNNT2 양성세포가 MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 더욱 성숙화된 형태를 보였고 (도 2G), TNNT2 양성세포를 그래프화하여 분석한 결과, TNNT2 양성세포가 MGTMM 그룹에서 약 8%, MGTMM+FA 그룹에서 약 12%를 차지하는 것으로 나타났다 (도 2H). 아울러, 근절의 길이를 Image J 소프트웨어를 통하여 분석한 결과, MGTMM 그룹에서 약 1.5 μm, MGTMM+FA 그룹에서 약 1.8 μm로 확인되었다 (도 2I).

[0075] 이를 통해, MGTMM의 과발현이 심근세포로의 직접교차분화를 유도한다는 것을 확인하였으며, FGF4 및 아스코르브산의 처리가 심근세포로의 분화 및 심실타입으로의 분화를 촉진한다는 것을 입증하였다.

[0077] **실시예 3. FGF4 및 아스코르브산의 심근세포 성숙화 유도 효과 확인**

[0078] 3-1. 성숙 심근세포로의 분화 유도 효과

[0079] 상기 실시예를 통해 MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹에서 인간 섬유아세포로부터 심근세포로의 직접교차분화가 유도되었다는 것을 확인하였으며, FGF4 및 아스코르브산의 처리가 심근세포로의 직접교차분화를 촉진한다는 것을 밝혔으므로, FGF4 및 아스코르브산의 처리가 성숙화를 유도하는지를 확인하기 위해, 노달 심근세포 마커인 TBX18, 성숙 심근세포 마커인 TNNI3, MYH6 및 MYH7의 발현을 중합효소연쇄반응으로 확인하였다.

[0080] 그 결과, MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 TNNI3, MYH6 및 MYH7의 발현이 현저히 증가하였으나, 노달타입 심근세포 마커인 TBX18의 발현은 유의차가 없었다 (도 4A 및 4B).

[0082] 이를 통해, FGF4 및 아스코르브산이 성숙 심근세포로의 분화를 유도하는 것을 확인하였다.

[0084] 3-2. 구조적 성숙화 유도 효과

[0085] FGF4 및 아스코르브산의 처리가 심근세포의 구조적 성숙화를 유도하는지 확인하기 위해, 성숙한 심근세포에서 관찰되는 구조인 T-세관(T-tubule)의 마커인 BIN1, CAV3 및 JPH2의 유전자 발현 및 단백질 발현을 중합효소연쇄반응 및 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. 또한, 근절과 T-세관의 배열을 분석하기 위하여 면역형광염색법을 통하여 심근세포 마커인 TNNT2 및 T-세관 마커인 JPH2의 발현을 확인하였다.

[0086] 그 결과, MGTMM+FA 그룹에서 MGTMM 그룹에 비해 BIN1, CAV3 및 JPH2의 유전자 발현이 증가되는 것으로 나타났으며, 이러한 결과와 유사하게 단백질 발현에서도 MGTMM+FA 그룹에서 CAV3의 발현이 MGTMM 그룹에 비해 증가되는 것으로 나타나 (도 4C 및 4D), 인간 섬유아세포로부터 심근세포로의 직접교차분화에서 FGF4 및 아스코르브산이 T-세관의 유전자 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 면역형광염색법을 통하여 직접교차분화에서 FGF4 및 아스코르브산이 근절과 T-세관의 배열의 정렬을 증가시키는 것을 확인하였다 (도 4E).

[0088] 3-3. 이온 채널 발현 증가

[0089] 심근세포로의 분화가 증가되면 칼슘과 칼륨 등의 이온 채널의 기능이 증가되므로, 중합효소연쇄반응을 통해 칼슘 및 칼륨채널의 발현을 확인하였다.

[0090] 그 결과, 칼슘채널 마커인 CACNA1C 및 RYR2의 발현이 MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 유의하게 증가한 것으로 나타나 (도 5A), 인간 섬유아세포로부터 심근세포로의 직접교차분화에서 FGF4 및 아스코르브산이 칼슘채널의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0092] 3-4. 대사적 성숙화 유도 효과

[0093] 심장의 대사는 성숙화가 되면 미토콘드리아의 생합성이 증가하며, 지방산산화를 통하여 에너지를 생성하므로, 미토콘드리아의 생합성을 미토콘드리아 생합성 마커를 중합효소연쇄반응 및 웨스턴블롯을 통하여 분석하였다. 또한, 미토콘드리아의 수를 미토콘드리아 DNA (mtDNA)/핵 DNA (nDNA) 비율로 조사하였다. 또한, 내부 미토콘드리아 막에는 칼슘이온의 채널이 존재하며, 이는 칼슘이온의 저장뿐만 아니라 수축에 필요한 ATP 생성 능력에 중요하므로, 미토콘드리아와 칼슘이온을 면역형광염색을 통하여 분석하였다. 아울러, 지방산 산화 마커를 중합효소연쇄반응 및 웨스턴브롯을 통하여 분석하였다.

[0094] 그 결과, 미토콘드리아 생합성 마커인 PPARGC1A, TFAM 및 SIRT1의 유전자 발현이 MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 현저히 증가하는 것으로 나타났으며 (도 5C), 단백질 발현도 대조군에 비해 MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹에서 증가하였고, MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 현저히 증가되는 것으로 나타났다 (도 5D). 또한, 미토콘드리아의 생합성이 증가하였으므로, 미토콘드리아의 수를 분석하기 위하여 mtDNA/nDNA 비율을 확인한 결과, MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 5E). 미토콘드리아와 칼슘이온의 공동발현이 MGTMM 그룹에 대비하여 MGTMM+FA 그룹에서 증가하였다 (도 5F 및 5G). 아울러, 지방산 산화 마커의 발현을 확인한 결과, 특히, CPT1B 및 CD36의 유전자 발현이 MGTMM 그룹보다 MGTMM+FA 그룹에서 현저히 증가되는 것으로 나타났으며 (도 5H), CPT1B의 단백질 발현도 대조군에 비해 MGTMM 그룹 및 MGTMM+FA 그룹에서 증가하였고, MGTMM 그룹에 비해 MGTMM+FA 그룹에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 5I).

[0096] 상기 결과를 통해, FGF4 및 아스코르브산의 처리가 인간 섬유아세포로부터 심근세포로의 직접교차분화에서 심장대사를 증진시킨다는 것을 입증하였다.

[0098] 이를 통해, 인간 섬유아세포에서 심근세포로의 직접교차분화에서 FGF4 및 아스코르브산의 처리를 통하여 심근세포의 성숙도가 향상되고, 심장 성숙과 관련된 유전자가 상향 조절됨으로써 성숙한 심실타입의 심근세포로 분화를 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0100] **실시예 4. 심근세포의 성숙화를 유도하는 신호기전 분석**

[0101] 4-1. 전사체 분석을 통한 성숙화 관련 신호기전 분석

[0102] 상기 실시예를 통해 FGF4 및 아스코르브산의 처리가 심근세포로의 직접교차분화를 촉진한다는 것을 밝혔으므로, 성숙화에 관여하는 신호기전을 전사체 분석을 통하여 확인하였다. 각 그룹의 전사체의 증감을 벤 다이어그램 및 산포도 분석을 통하여 분석하였으며 (도 6A 및 6B), 히트맵 분석을 통하여 심장과 관련된 유전자의 발현이 대조군에 비하여 MGTMM 및 MGTMM+FA 그룹에서 증가됨을 확인하였다 (도 6C). 유전자 온톨로지 분석 결과, 심장으로의 분화에 관련된 유전자 카테고리들이 MGTMM에 대비하여 MGTMM+FA 그룹에서 증가되었다 (도 6D). KEGG 신호기전 분석을 통하여 다양한 신호기전들이 증가된 것을 확인하였으며, 이들 신호기전들에서 세포외기질, TGFB 신호기전 및 JAK2-STAT3 신호기전이 포함된 것을 확인하였다 (도 6E). 이에, 해당 신호기전 경로를 중합효소연쇄반응 및 웨스턴블롯을 통하여 검증하였다.

[0103] 그 결과, MGTMM 대비 MGTMM+FA에서 TGFB 신호기전 중 TGFB1 및 TGFB2의 발현, 및 하위 신호기전인 p-SMAD3의 발현이 증가하였으며, GDF5 또한 증가하였으나, BMP2 및 GDF5와 BMP2의 하위 신호기전인 p-SMAD1/5의 발현은 큰 차이를 보이지 않았다 (도 6F 내지 6I). 아울러, JAK2-STAT3 신호기전과 관련하여, p-JAK2, STAT3 및 p21의 발현이 증가되었다 (도 6J).

[0105] 이를 통해, 직접교차분화된 심근세포의 성숙화에 JAK2-STAT3 및 TBFB 신호기전이 관여할 수 있음을 확인하였다.

[0107] 4-2. JAK2-STAT3 신호전달 경로 억제를 통한 JAK2-STAT3 신호기전 분석

[0108] TGFB 신호기전은 JAK2-STAT3의 하위 신호기전으로 보고되어 있으므로, JAK2-STAT3의 억제를 통한 직접교차분화된 심근세포의 성숙화의 영향을 평가하고자 하였다. 실시예 2-1의 직접교차분화 조건 확립에서 MGTMM 및 MGTMM+FA를 대조군으로 하여, 이 그룹들에 JAK2-STAT3 억제제인 cryptotanshinone (10 μM)을 각각 처리하고 4주차에 qRT-PCR 및 웨스턴블롯을 수행하였다 (도 7A).

[0109] 그 결과, p-JAK2, JAK2, p-STAT3 및 STAT3의 발현이 MGTMM+Inh 및 MGTMM+FA+Inh 그룹에서 감소하는 것으로 나타났으며 (도 7B), 하위 신호기전인 TGFB 신호기전 중, TGFB2, TGFBR1, TGFRBR2 및 p-SMAD3가 MGTMM+FA 그룹에 비하여 MGTMM+FA+Inh 그룹에서 감소하였고, TGFB1은 MGTMM+FA 및 MGTMM+FA+Inh 그룹에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 7C 및 7D). 아울러, TGFB 신호기전에 의해 발현이 조절된다고 알려진 세포외기질에 대하여 MGTMM+FA 및 MGTMM+FA+Inh 그룹에서 Laminin 및 COL1A1의 발현이 감소됨을 관찰하였다 (도 7E).

[0111] 이를 통해, 직접교차분화된 성숙 심근세포에서 JAK2-STAT3 신호기전, TGFB2 신호기전 및 세포외기질이 작용할 수 있음을 확인하였다.

[0113] 4-3. JAK2-STAT3 신호전달 경로 억제를 통한 심근세포의 성숙화 분석

[0114] 심근세포의 성숙화와 관련하여 MYH7, TNNT2, MYL2, CAV3, JPH2, PPARGC1A 및 TFAM의 유전자 및 단백질 발현을 분석한 결과, MYH7, MYL2, CAV3, JPH2, PPARGC1A 및 TFAM의 발현이 MGTMM+FA 그룹에 비해 MGTMM+FA+Inh 그룹에서 감소하였으며, TNNT2는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 7F 내지 7J).

[0116] 결론적으로, JAK2-STAT3 신호가 TGFB2 신호기전, 세포외기질 경로를 활성화시키며, 심근세포의 성숙분화를 촉진하는 역할을 하는 것을 확인하였다.

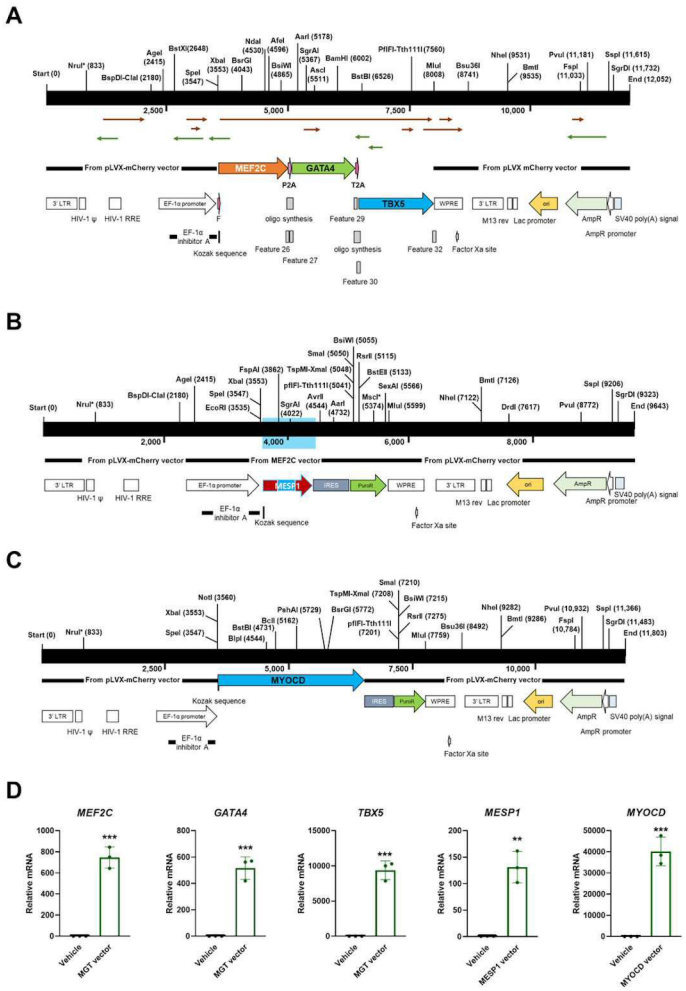
[0118] **실시예 5. 섬유아세포에서 심근세포로의 직접교차분화에 관여하는 신호기전 분석**

[0119] KEGG 신호기전을 통해 직접교차분화에 관여하는 신호기전 (Vehicle에 대비하여 MGTMM에서 증가되는 신호기전)을 전사체 분석으로 분석하였다. 그 결과, 세포외기질, 인테그린 및 국소접합이 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다 (도 8A). 이에 대한 단백질 및 유전자 발현을 분석하기 위하여 웨스턴블롯 및 중합효소연쇄반응 분석을 진행한 결과, Vehicle에 비해 MGTMM 및 MGTMM+FA에서 세포외기질인Laminin은 증가하였으며, FN1은 감소되었고, MGTMM+FA에서 MGTMM에 비하여 COL1A1이 증가됨을 관찰하였다 (도 8B). 인테그린과 관련하여, ITGAV, ITGA7 및 ITGB3가 Vehicle에 비하여 MGTMM 및 MGTMM+FA 그룹에서 증가하였으며, IGTA5, ITGA6 및 ITGB1는 큰 차이가 없었다 (도 8C). 또한 세포외기질 및 인테그린의 하위 신호기전인 국소접합 중 ROCK1, ROCK2, TLN1 및 DES가 Vehicle에 비하여 MGTMM 및 MGTMM+FA 그룹에서 증가하였으며, VCL 및 TLN2는 큰 차이가 없었다 (도 8D).

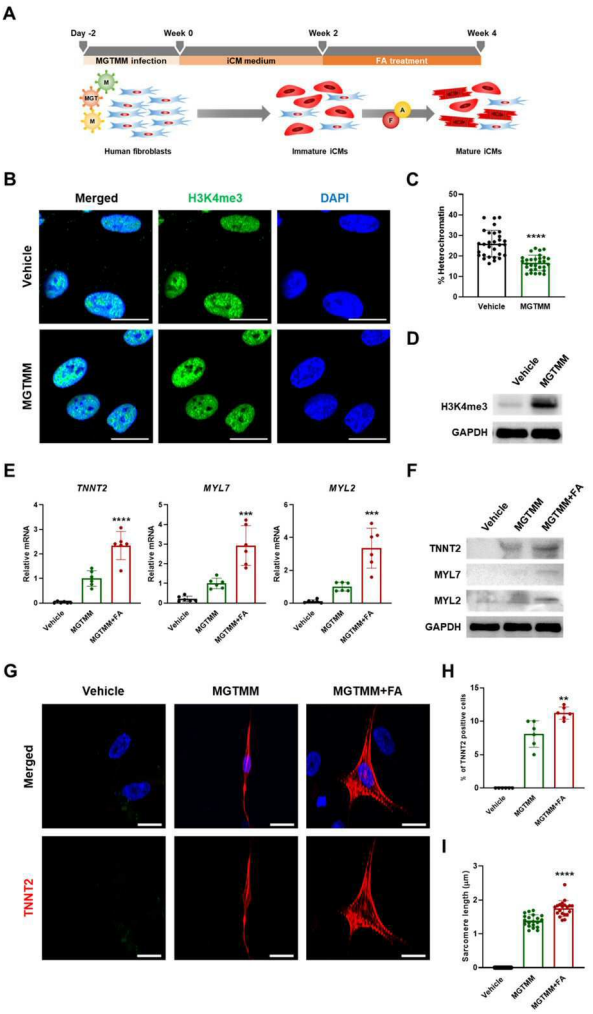
[0121] 이러한 결과를 통하여, Laminin-인테그린-국소접합 등이 섬유아세포에서 심근세포로의 직접교차분화에 관여함을 입증하였다.

도면

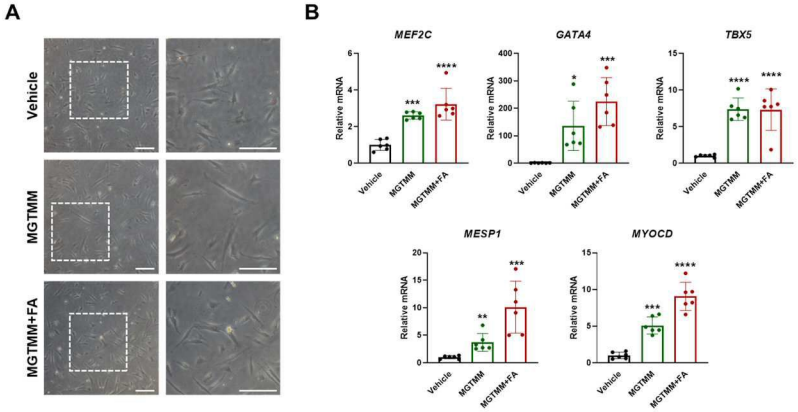
도면1


A
Start (0)
NruI* (833)
BspDI-ClaI (2180)
AgeI (2415)
BstXI(2648)
SpeI (3547)
XbaI (3553)
BsrGI (4043)
NdaI (4530)
AfeI (4596)
BsiWI (4865)
AarI (5178)
SgrAI (5367)
AscI (5511)
BamHI (6002)
BstBI (6526)
PflFI-Tth111I(7560)
MluI (8008)
Bsu36I (8741)
NheI (9531)
BmtI (9535)
PvuI (11,181)
FspI (11,033)
SspI (11,615)
SgrDI (11,732)
End (12,052)
2,500
5,000
7,500
10,000
From pLVX-mCherry vector
MEF2C
GATA4
P2A
T2A
From pLVX mCherry vector
3' LTR
HIV-1 ψ
HIV-1 RRE
EF-1α promoter
F
EF-1α inhibitor A
Kozak sequence
oligo synthesis
Feature 29
TBX5
WPRE
M13 rev
Lac promoter
ori
AmpR
SV40 poly(A) signal
AmpR promoter
Feature 26
Feature 27
oligo synthesis
Feature 32
Factor Xa site
Feature 30
B
Start (0)
NruI* (833)
BspDI-ClaI (2180)
AgeI (2415)
XbaI (3553)
SpeI (3547)
EcoRI (3535)
FspAI (3862)
TspMI-XmaI (5048)
pflFI-Tth111I(5041)
SgrAI (4022)
AvrII (4544)
AarI (4732)
BsiWI (5055)
SmaI (5050)
RarII (5115)
BstEII (5133)
SexAI (5566)
MscI* (5374)
MluI (5599)
NheI (7122)
BmtI (7126)
DrdI (7617)
PvuI (8772)
SspI (9206)
SgrDI (9323)
End (9643)
2,000
4,000
6,000
8,000
From pLVX-mCherry vector
From MEF2C vector
From pLVX-mCherry vector
MESP1
IRES
PuroR
C
Start (0)
NruI* (833)
XbaI (3553)
SpeI (3547)
NotI (3560)
BstBI (4731)
BlpI (4544)
BclI (5162)
PshAI (5729)
TspMI-XmaI (7208)
BsrGI (5772)
pflFI-Tth111I (7201)
SmaI (7210)
BsiWI (7215)
RarII (7275)
MluI (7759)
Bsu36I (8492)
NheI (9282)
BmtI (9286)
PvuI (10,932)
FspI (10,784)
SspI (11,366)
SgrDI (11,483)
End (11,803)
2,500
5,000
7,500
10,000
From pLVX-mCherry vector
MYOCD
From pLVX-mCherry vector
Kozak sequence
IRES
PuroR
WPRE
M13 rev
Lac promoter
AmpR
SV40 poly(A) signal
AmpR promoter
Factor Xa site
D
MEF2C
GATA4
TBX5
MESP1
MYOCD
Relative mRNA
Vehicle
MGT vector
MESP1 vector
MYOCD vector

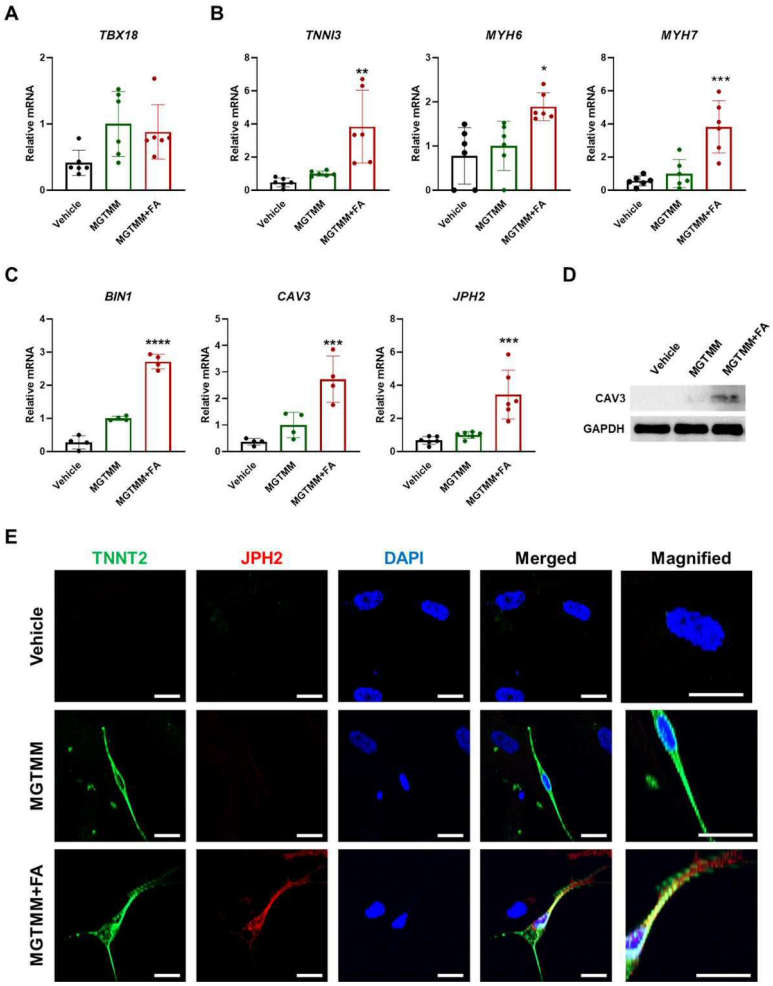
도면2


A
Day -2
Week 0
Week 2
Week 4
MGTMM infection
iCM medium
FA treatment
Human fibroblasts
Immature iCMs
Mature iCMs
B
Merged
H3K4me3
DAPI
Vehicle
MGTMM
C
% Heterochromatin
Vehicle
MGTMM
D
Vehicle
MGTMM
H3K4me3
GAPDH
E
TNNT2
MYL7
MYL2
Relative mRNA
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
F
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
TNNT2
MYL7
MYL2
GAPDH
G
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
Merged
TNNT2
H
% of TNNT2 positive cells
I
Sarcomere length (μm)

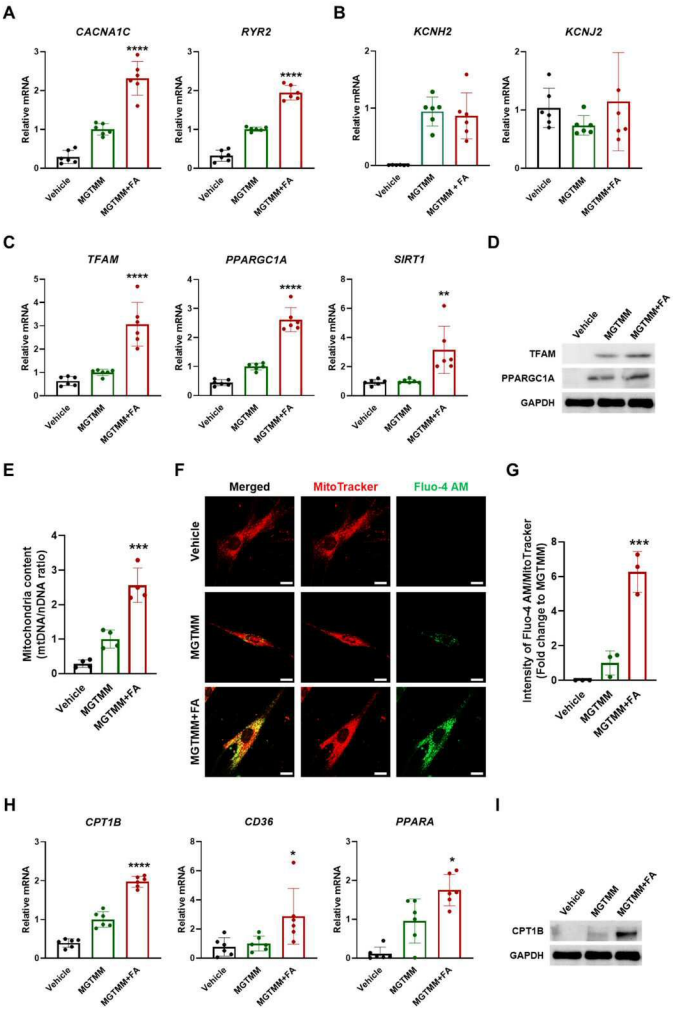
도면3


A
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
B
MEF2C
GATA4
TBX5
MESP1
MYOCD
Relative mRNA
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA

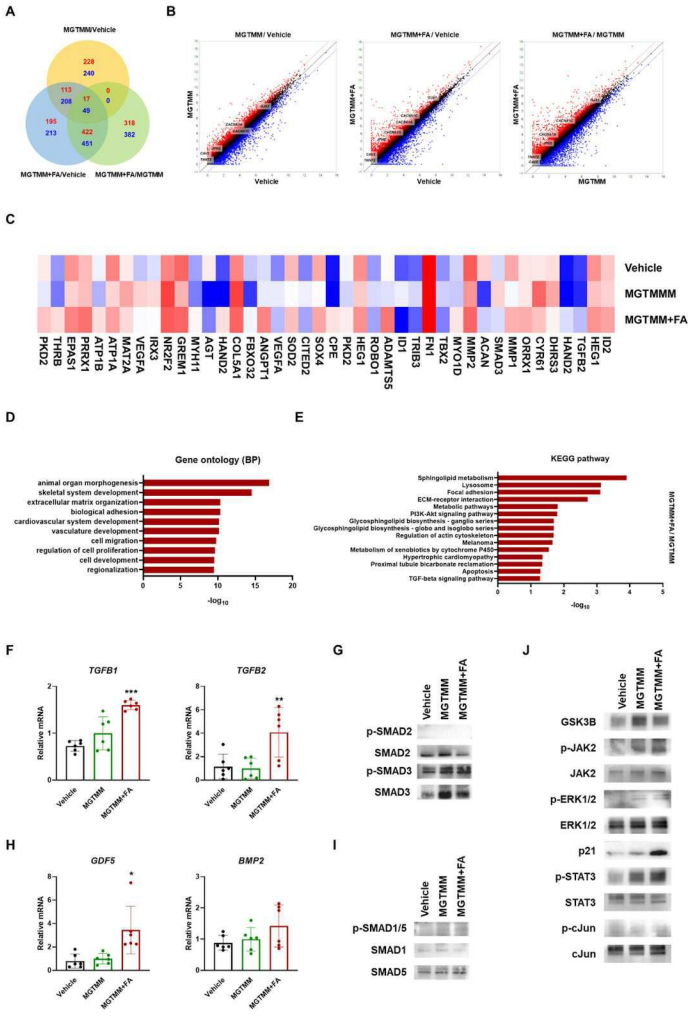
도면4


A
TBX18
B
TNNI3
MYH6
MYH7
Relative mRNA
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
C
BIN1
CAV3
JPH2
D
CAV3
GAPDH
E
TNNT2
JPH2
DAPI
Merged
Magnified
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA

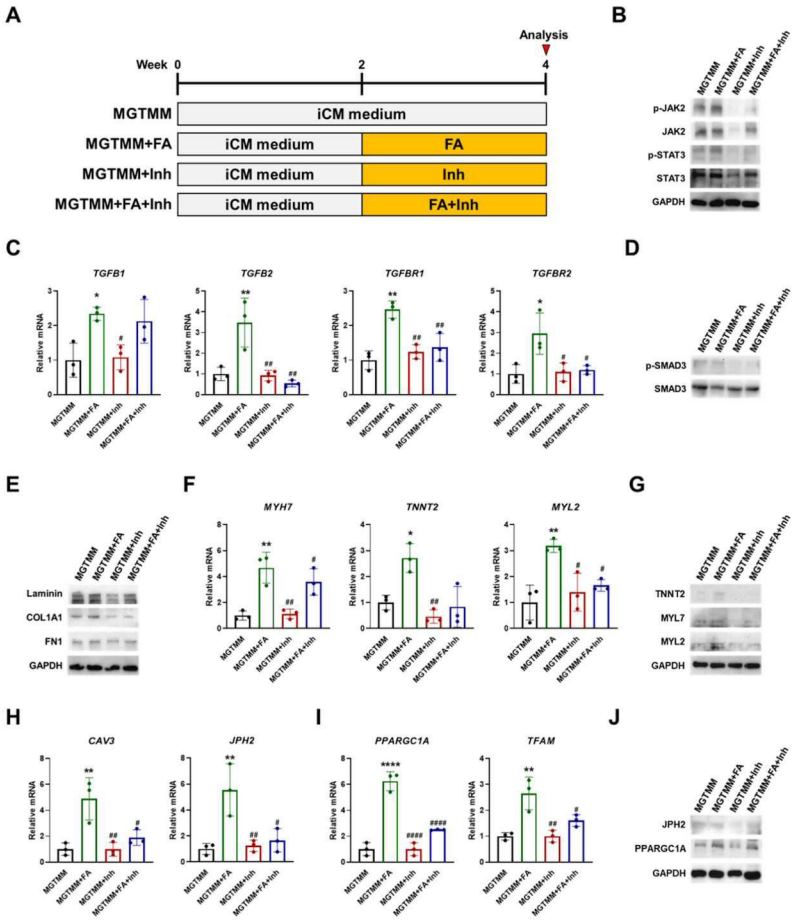
도면5


A
CACNA1C
RYR2
B
KCNH2
KCNJ2
Relative mRNA
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
C
TFAM
PPARGC1A
SIRT1
D
TFAM
PPARGC1A
GAPDH
E
Mitochondria content (mtDNA/nDNA ratio)
F
Merged
MitoTracker
Fluo-4 AM
G
Intensity of Fluo-4 AM/MitoTracker (Fold change to MGTMM)
H
CPT1B
CD36
PPARA
I
CPT1B
GAPDH

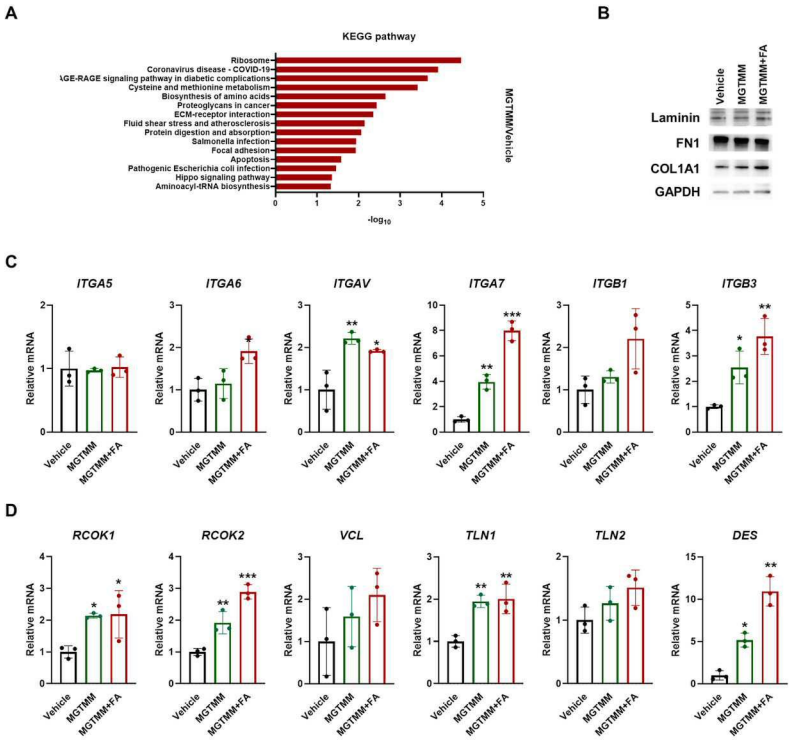
도면6


A
MGTMM/Vehicle
228
240
113
208
17
49
0
0
195
213
422
451
318
382
MGTMM+FA/Vehicle
MGTMM+FA/MGTMM
B
MGTMM/ Vehicle
MGTMM+FA/ Vehicle
MGTMM+FA/ MGTMM
MGTMM
MGTMM+FA
Vehicle
MGTMM
C
Vehicle
MGTMMM
MGTMM+FA
PKD2
THRB
EPAS1
PRRX1
ATP1B
ATP1A
MAT2A
VEGFA
IRX3
NR2F2
GREM1
MYH11
AGT
HAND2
COL5A1
FBXO32
ANGPT1
VEGFA
SOD2
CITED2
SOX4
CPE
PKD2
HEG1
ROBO1
ADAMTS5
ID1
TRIB3
FN1
TBX2
MYO1D
MMP2
ACAN
SMAD3
MMP1
CYR61
DHRS3
HAND2
TGFB2
TEG1
ID2
D
Gene ontology (BP)
animal organ morphogenesis
skeletal system development
extracellular matrix organization
biological adhesion
cardiovascular system development
vasculature development
cell migration
regulation of cell proliferation
cell development
regionalization
-log10
E
KEGG pathway
Sphingolipid metabolism
Lysosome
Focal adhesion
ECM-receptor interaction
Metabolic pathways
PI3K-Akt signaling pathway
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series
Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series
Regulation of actin cytoskeleton
Melanoma
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
Hypertrophic cardiomyopathy
Proximal tubule bicarbonate reclamation
Apoptosis
TGF-beta signaling pathway
MGTMM+FA/MGTMM
-log10
F
TGFB1
TGFB2
Relative mRNA
***
**
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
G
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
p-SMAD2
SMAD2
p-SMAD3
SMAD3
J
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
GSK3B
p-JAK2
JAK2
p-ERK1/2
ERK1/2
p21
p-STAT3
STAT3
p-cJun
cJun
H
GDF5
BMP2
Relative mRNA
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
I
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
p-SMAD1/5
SMAD1
SMAD5

도면7


A
Week 0
2
4
Analysis
MGTMM
iCM medium
MGTMM+FA
FA
MGTMM+Inh
Inh
MGTMM+FA+Inh
FA+Inh
B
p-JAK2
JAK2
p-STAT3
STAT3
GAPDH
C
TGFB1
TGFB2
TGFBR1
TGFBR2
Relative mRNA
D
p-SMAD3
SMAD3
E
Laminin
COL1A1
FN1
GAPDH
F
MYH7
TNNT2
MYL2
G
TNNT2
MYL7
MYL2
GAPDH
H
CAV3
JPH2
I
PPARGC1A
TFAM
J
JPH2
PPARGC1A
GAPDH

도면8


A
KEGG pathway
Ribosome
Coronavirus disease - COVID-19
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
Cysteine and methionine metabolism
Biosynthesis of amino acids
Proteoglycans in cancer
ECM-receptor interaction
Fluid shear stress and atherosclerosis
Protein digestion and absorption
Salmonella infection
Focal adhesion
Apoptosis
Pathogenic Escherichia coli infection
Hippo signaling pathway
Aminoacyl-tRNA biosynthesis
MGTMM/Vehicle
-log10
B
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
Laminin
FN1
COL1A1
GAPDH
C
ITGA5
ITGA6
ITGAV
ITGA7
ITGB1
ITGB3
Relative mRNA
Vehicle
MGTMM
MGTMM+FA
D
RCOK1
RCOK2
VCL
TLN1
TLN2
DES