(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0085404
(43) 공개일자 2019년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 5/079* (2010.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 5/0622* (2013.01)
*C12N 2500/38* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0003498
(22) 출원일자 2018년01월10일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**홍성희**
서울특별시 광진구 아차산로70길 61, 503동 1202호 (광장동, 광장현대아파트)
**최연호**
서울특별시 강남구 선릉로 221, 405동 603호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**이처영, 장제환**

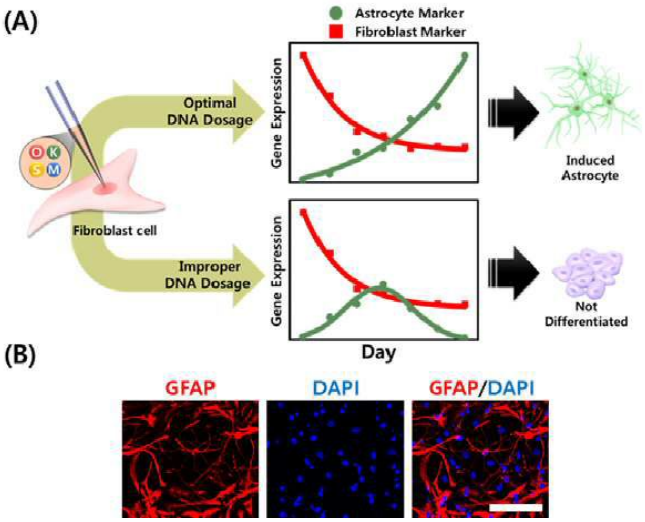
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **단일세포 내로 정량적 유전자 전달기술을 이용한 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 체세포를 성상아교세포로 변환시키는 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 단일세포 내로 정량적 유전자 전달기술을 이용하여 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 전달체를 이용하지 않고 단일세포 내로 직접 유전자를 주입하고, 원하는 양만큼 정량적으로 유전자 전달이 가능하며, 단일세포 단위로 직접세포전환이 가능하므로, 안정적으로 최적화된 조건에서 세포치료제로 이용할 수 있는 기능성 신경경아교세포를 제작할 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12N 2501/11* (2013.01)
*C12N 2501/115* (2013.01)
*C12N 2501/727* (2013.01)
*C12N 2506/1307* (2013.01)
*C12N 2510/00* (2013.01)
(72) 발명자
**박항수**
서울특별시 성북구 인촌로10길 19-6, 옥탑 (안암동3가)

**유제원**
서울특별시 동대문구 고산자로 552-8, 101호 (제기동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014060890
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구
기 여 율 1/4
주관기관 고려대학교
연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012050124
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 역분화 줄기세포의 기전연구를 위한 단일세포내 역분화 인자 나노전달기술 개발
기 여 율 1/4
주관기관 고려대학교
연구기간 2012.10.01 ~ 2013.09.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017027000
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (원천)바이오.의료기술개발
연구과제명 나노기술 기반의 직접 교차 분화를 통한 신경 줄기세포 및 교세포 제작 및 기전 연구
기 여 율 1/4
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.04.01 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017026996
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (원천)바이오.의료기술개발
연구과제명 소분자화합물만을 이용한 인간 섬유아세포의 직접교차분화-기반 신경줄기세포전환 원천기술 개발연구
기 여 율 1/4
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.04.01 ~ 2017.12.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

다음 단계를 포함하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법:

(a) 역분화인자 DNA를 섬유아세포의 단일세포 내로 직접 주입하는 단계; 및

(b) 상기 역분화인자가 도입된 섬유아세포를 티아조비빈(Thiazovivin), SB431542, 아스코브산 (Ascorbic acid) 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 배양하여 성상아교세포로 유도하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 역분화인자는 Oct4, Klf4, Sox2 및 cMyc으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 주입은 핵막을 침투하여 핵 내로 직접 주입하는 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 주입은 2가지 이상의 역분화인자 DNA를 동시에 주입하는 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 2500 내지 4000 분자의 DNA를 주입하는 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배지는 N2, B27, bFGF 및 EGF가 포함된 DMEM/F12인 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 10~16일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 유도된 성상아교세포를 티아조비빈(Thiazovivin), SB431542, 아스코브산 (Ascorbic acid) 및 CHIR99021를 포함하고, 사이토카인을 포함하지 않는 배지에서 추가 배양하는 단계를 포함하는 것을 특

징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 성상아교세포는 GFAP, S100b 또는 Kir4 마커를 발현하는 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 섬유아세포는 인간 또는 마우스 유래인 것을 특징으로 하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 체세포를 성상아교세포로 변환시키는 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 단일세포 내로 정량적 유전자 전달기술을 이용하여 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0003] 난치성 질환의 치료 또는 약물 개발을 위한 목적으로 자연적으로 재생이 어려운 기능성 세포를 제작하는 연구에 대한 수요는 날로 증가하고 있다. 이러한 기능성 세포를 제작하는 방법 중 한가지로 직접세포전환을 이용하여 체세포를 기능성 세포로 전환시키는 기술이 주목받고 있다. 대부분의 직접세포전환 기술은 특정 유전자를 세포 내로 전달하는 방법을 기반으로 하고 있으며, 유전자를 세포 내로 전달하기 위하여 바이러스 또는 비바이러스성 전달체 (cationic lipid, 자성 나노입자 등)를 이용하는 방법이 주로 사용된다.

[0004] 그러나, 동물세포 내로 유전물질을 비롯한 고분자와 화합물의 전달을 위하여 고안된 cationic lipid를 이용한 기술 (US 07937508)은 배양용기에 부착되어 있는 다수의 세포에 임의적으로 물질을 전달하는 방식이며, 특정 단일 세포로 선택적인 전달은 불가능하다. 또한, 지질을 사용하지 않고 동물 세포 내로 유전물질을 비롯한 고분자와 화합물의 전달을 위하여 자성을 띄는 나노입자를 이용한 기술 (US 09895019) 역시 배양용기에 부착되어 있는 다수의 세포에 임의적으로 물질을 전달하는 방식이며, 특정 단일 세포에만 물질을 전달할 수는 없다.

[0005] 배양중인 수많은 세포들 중에서 단일 세포를 조작하기 위한 몇몇 장치들이 고안되었으며, 에펜도르프 (Eppendorf) 사의 manipulation 장치가 대표적이다 (US 09150437). 또한, 이전 연구에서 본 발명자들은 단일 세포에 정량적으로 유전자 및 소분자 화합물 등을 전달하여 정량적인 물질전달을 위한 방법을 제시한 바 있다 (KR 10-2014-0050244). 많은 연구자들이 이러한 장치 또는 이와 유사한 장치를 이용하여 단일 세포를 조작하는 연구를 하였으나, 기능성 세포를 성공적으로 제작하지는 못하였다.

[0006] 한편, 체세포를 기능성 세포로 변화시키는 직접세포전환을 유발시키는 외부 유전자는 제작하려는 기능성 세포의 종류에 따라 다양한 유전자가 고려될 수 있다. 예를 들어, 직접세포전환을 통하여 신경계통의 세포로 제작하기 위해서는 신경특이전사인자인 Ascl1, Nurr1 등이 사용될 수 있다고 알려져 있다 (Vierbuchen, T. *et al*, *Nature*, 7284:1035-1041, 2010). 뿐만 아니라 신경계통 세포로의 직접세포전환에는 역분화인자인 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc를 이용하여 부분적 역분화가 진행된 세포로부터 신경세포를 유도하는 방법 또한 알려져 있다 (Han, D. W. *et al*, *Cell Stem Cell*, 10:465-672, 2012).

[0007] 이에, 본 발명자들은 단일세포를 조작하여 섬유아세포를 기능성 성상아교세포로 직접 전환하기 위해 예의 노력한 결과, 정량적 유전자 전달기술을 이용한 외부유전자인 역분화인자를 단일세포 내로 정량적으로 전달하여 섬유아세포의 기능성 성상아교세포로의 직접 세포전환을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 역분화인자를 섬유아세포의 단일세포 내로 정량적으로 전달하여 섬유아세포를 기능성 성상아교세포로 직접 전환하는 방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 역분화인자 DNA를 섬유아세포의 단일세포 내로 직접 주입하는 단계; 및 상기 역분화인자가 도입된 섬유아세포를 티아조비빈(Thiazovivin), SB431542, 아스코브산 (Ascorbic acid) 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 배양하여 성상아교세포로 유도하는 단계를 포함하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 단일세포 내로 정량적 유전자 전달기술을 이용한 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법은 전달체를 이용하지 않고 단일세포 내로 직접 유전자를 주입하고, 원하는 양만큼 정량적으로 유전자 전달이 가능하며, 단일세포 단위로 직접세포전환이 가능하므로, 안정적으로 최적화된 조건에서 세포치료제로 이용할 수 있는 기능성 신경경아교세포를 제작할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 (A) 직접교차분화를 위하여 단일세포내로 유전자를 전달하여 기능성 성상아교세포를 제작하는 과정에 대한 개념도 및 (B) 제작된 성상아교세포에서 특이마커인 GFAP의 발현을 확인한 것이다.

도 2는 (A) 단일세포에서 주입된 유전자의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 결과 및 (B) 단일세포에 4가지 다른 양의 유전자를 주입했을 때, 주입된 유전자의 발현 지속시간과 강도를 비교한 것이다.

도 3은 단일세포내 정량적 유전자 전달을 통한 직접교차분화로 기능성 신경아교세포인 성상아교세로를 제작하기 위한 배양방법에 대한 모식도이다.

도 4는 단일세포에 4가지 다른 양의 유전자를 주입한 후, 주입된 유전자의 양에 따라 세포의 형태적 변화 정도 차이를 비교하여 직접세포전환 유도 결과를 확인한 것이다.

도 5는 단일세포에 4가지 다른 양의 유전자를 주입한 후, 주입된 유전자의 양에 따라 세포의 유전자 발현 변화 정도 차이를 비교하여 직접세포전환 유도 결과를 확인한 것이다.

도 6은 직접세포전환이 가능한 2500분자의 유전자를 단일세포에 주입하여 주입된 유전자로 인하여 활성화되는 유전자들의 발현을 시간대별로 확인한 것이다.

도 7은 섬유아세포에 정량적 유전자 전달을 통한 직접세포전환을 이용하여 성상아교세포를 제작중인 세포에서 (A) 섬유아세포 마커인 CD90과 성상아교세포 마커인 GFAP의 발현을 면역형광염색 후 형광현미경을 통하여 확인한 것이며, (B) 직접세포전환 과정 중에 CD90과 GFAP를 발현하는 세포의 비율을 조사한 것이다.

도 8은 섬유아세포에 정량적 유전자 전달을 통한 직접세포전환을 이용하여 제작된 성상아교세포의 기능적 특성 확인을 위해 최종 제작된 세포에서 (A) 성상아교세포 마커인 GFAP와 S100b의 발현을 형광현미경으로 확인하고, (B) 글루탐산(Glutamate) 흡수능력, (C) 성상아교세포 마커 유전자 GFAP 발현과 이온채널 마커 Apq4, Kir4.1, Twik1의 발현 및 (D) 전기생리학적 특성을 확인한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서

사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 섬유아세포 (fibroblast)를 직접세포전환(direct conversion) 방법을 이용하여 기능성 세포로 유도하는 대부분의 방법은 유도하고자 하는 세포의 형성에 관련된 외부 유전자를 도입하는 방식으로 이루어지고 있다. 이때 다양한 방법을 통해 외부 유전자를 도입하게 되는데, 주로 이용되는 방법은 lentiviral 또는 retroviral 벡터 시스템을 이용하는 것이다. 바이러스를 이용하여 유전자를 도입하는 것은 외부 유전자의 무작위적인 integration으로 인한 유전자 불안정성 (genomic instability)을 야기하여, 향후 환자에 임상 적용시 암이 발생할 가능성이 있다. 이러한 이유로 인해 점차적으로 바이러스를 이용하지 않고 비바이러스성 유전자 전달체를 이용하는 방법들이 제시되고 있는 실정이다. 비바이러스성 유전자 전달체를 이용하는 기존의 체세포 직접세포전환 방법은 세포가 배양되어 있는 배양접시 (culture dish)의 배양액 (medium) 상에 외부유전자와 전달체의 결합체를 투여하여 세포가 배양되어 있는 dish 단위로 진행되었다. 이 기존의 모든 방법들의 문제점은 단일세포에 유전자를 정량적으로 전달할 수 없다는 것이다. 또한 전달된 물질의 작용과정을 단일세포 수준에서 명확하게 관찰할 수 없다는 단점 때문에 직접세포전환 과정의 기전도 명확하게 규명하지 못하고 있다.

[0019] 이러한 기존 방법들의 단점을 해결하고자 본 발명에서는 단일세포에 전달되는 외부 유전자의 정량적 조절이 가능한 비바이러스성 유전자 전달방법을 통하여 섬유아세포 (fibroblast)로부터 기능성 신경아교세포의 일종인 성상아교세포 (astrocyte)를 제작하는 방법을 고안하였다.

[0020] 본 발명에서는 유전물질의 단일세포 내 정량적 전달방법을 통하여 4가지 유전자를 세포 내로 직접 전달하여 섬유아세포를 성상아교세포로 직접세포전환 하였다. 기존의 기술이 가진 문제점인 전달체로 이용한 물질이 세포에 악영향을 미칠 수 있는 문제와 세포에 정량적으로 외부유전자를 전달하고 관찰하지 못하여 직접세포전환 과정의 기전을 분석할 수 없는 문제를 극복함으로써 환자를 위한 세포치료제로 활용 및 세포생물학 기초연구에 응용될 수 있는 세포 모델로써 활용 가능성이 매우 높다. 본 발명의 방법으로 제작된 성상아교세포는 경제적 측면에서 역분화 줄기세포와 비교하여 매우 경제적이고 효율적이다. 역분화 줄기세포는 역분화 줄기세포로 제작하는 과정과 이를 다시 기능성 신경아교세포로 분화시키는데 소요되는 시간과 비용이 2배 이상 많이 소요된다.

[0021] 따라서, 본 발명의 방법으로 제작된 세포는 뇌질환 치료를 위한 임상적용 가능한 성상아교세포로 활용이 가능할 뿐만 아니라, 유전성 뇌신경질환 환자 유래 질병 성상아교세포를 제작할 경우 발병기전연구에 직접적으로 활용할 수 있는 뇌질환 세포모델로 사용될 수 있고, 유전자 조작을 이용한 돌연변이 유전자를 정상 유전자로 대체하게 되면 유전성 뇌질환 환자 치료를 위한 세포치료제로 사용될 수 있다. 또한, 기존의 방법이 배양접시에 배양된 모든 세포 전체 단위로 물질전달 또는 세포의 형질전환을 유도한 것에 반해, 본 발명의 전달기술은 단일세포의 기능성 세포로의 전환을 배양액 성분이나 전달체에 영향을 받지 않고 정량적 전달이 가능하므로, 체세포의 직접세포전화 기술 연구를 위한 새로운 전달법으로 사용될 수 있다. 아울러, 본 기술을 통해 세포 내로 주입된 유전자의 주입 총량을 정량적으로 계산해낼 수 있어 세포 내로 정확한 유전자 전달 및 세포의 직접세포전환 또는 역분화의 최적조건 확립과 같은 기전연구를 수행할 수 있다. 본 발명의 기술을 통해 단일세포 내에 역분화 인자와 같은 전사인자 (transcription factor)를 주입함으로써 직접세포전환의 생물학적 기전을 규명하고, 더 나아가 신경아교세포의 질병모델을 이용한 발병기전의 모델 세포로 활용하거나 세포치료제로 이용할 수 있는 기능성 신경아교세포를 제작할 수 있다.

[0023] 본 발명에서는 섬유아세포를 기능성 신경아교세포인 성상아교세포로 변환시키기 위하여 세포에 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc의 유전자를 주입하였다. 단일세포 단위로 유전자를 주입하기 위해서 마이크로(μ) 단위로 조절 가능한 Robotic manipulator를 이용하여, 주입량을 femtoliter(fL) 단위로 미세하게 조절할 수 있고 내경이 500nm 이하인 femtotip 인젝터 (injector)를 이용하였다. 이때, 주입 총량은 미세관내 점성유체의 유량을 구하는 공식인 Poiseuille's Law를 이용해 계산하여 정량화할 수 있다. 직접세포전환을 위하여 유전자가 주입된 세포를 신경세포 분화용 배지조성에서 배양하여 최종적으로 성상아교세포를 제작하였다. 제작된 성상아교세포는 특이마커의 발현과 전기생리학적 특성의 확인을 통하여 기능성을 확인하였다.

[0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 (a) 역분화인자 DNA를 섬유아세포의 단일세포 내로 직접 주입하는 단계; 및 (b) 상기 역분화인자가 도입된 섬유아세포를 티아조비빈(Thiazovivin), SB431542, 아스코브산 (Ascorbic acid) 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 배양하여 성상아교세포로 유도하는 단계를 포함하는 섬유아세포를 성상아교세포로 직접 전환하는 방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 역분화인자는 Oct4, Klf4, Sox2 및 cMyc으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] Sox 패밀리 유전자들은 Oct4와 유사하게 만능성 유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 Oct4 유전자가 만능성 줄기세포에만 관여하고 있는 반면 Sox 패밀리 유전자들은 다능성 줄기세포나 단능성 줄기세포와도 관련되어 있다. Sox2 (SRY-type high mobility group box 2) 전사인자는 Sox 패밀리 단백질 중 유일하게 배아줄기세포의 만능성 유지에 중요한 역할을 한다 (Avilion *et al., Genes Dev,* 17:126-140, 2003). Oct4와 마찬가지로 생쥐의 배아줄기세포에서 Sox-2의 발현을 저해하면 분화가 유도된다 (Ivanova *et al., Nature,* 442:533-538, 2006). 또한 여러 Sox2 하위 유전자의 프로모터 영역에서 발견되는 Sox-2 결합부위는 종종 Oct4와 Nanog 결합부위와 인접하게 존재한다 (Boyer *et al., Cell,* 122:947-956, 2005). 그러므로 Sox2 전사인자와 Oct4 전사인자 사이의 상호작용이 유도 만능 줄기세포가 미분화 상태를 유지하고 배아줄기세포의 특성을 나타나게 하는데 기본적인 틀을 제공할 것으로 예상된다 (Lewitzky and Yamanaka, Current Opinion in Biotechnology, 18:467-473, 2007).

[0027] c-Myc는 세포 성장, 분화, 증식, 세포 예정사 및 암세포로의 형질 전환 등의 다양한 세포 내 기능을 수행하는 발암 유전자이다. 또한 만능성을 유지하는 주요 기작인 LIF (Leukemia Inhibitory Factor)/STAT3와 Wnt 신호전달 메커니즘의 하위 유전자로 밝혀졌다 (Sears *et al., Genes Dev,* 14:2501-2514, 2000). c-Myc 전사인자는 유도 만능 줄기세포 내에서 세포의 증식을 저해하는 것을 막아주는 역할을 하는 것으로 예상되고 있다. 또한 c-Myc은 게놈 상에 존재하는 Myc 인식부위에 결합하는 것 뿐만 아니라 염색질 구조를 변화시켜 Oct4와 Sox2 가 표적 유전자에 잘 결합할 수 있도록 도와주는 기능을 수행한다 (Lewitzky and Yamanaka, Current Opinion in Biotechnology, 18:467-473, 2007).

[0028] Klf4는 성장 억제에 관여하여 세포주기를 조절하는 역할을 한다. 최근 연구에 따르면 c-Myc과 유사하게 배아줄기세포에서 STAT3의 하위 유전자로 작용하며, 과발현시 Oct4 발현을 유지시켜 생쥐 배아줄기세포의 분화를 억제한다고 밝혀졌다 (Li *et al., Blood,* 105:635-637, 2005).

[0029] 본 발명에서 "역분화"는 부분 또는 최종 분화된 세포를 만능 또는 다능과 같은 미분화 상태로 되돌려서, 새로운 분화 조직의 형성이 가능하도록 하는 후성학적인 역행 과정을 의미한다. 이러한 역분화 현상은 세포 유전체의 후성학적인 변형(epigenetic changes)들이 고정되어 있는 것이 아니라 지워지고 다시 형성될 수 있는 가역적인 과정이기 때문에 가능하다. 역분화는 "재프로그램화 (reprogramming)"라고도 불리우며, 부분 또는 최종 분화된 세포의 유전적 및 표현적 프로필을 배아줄기세포의 그것과 비슷하도록 변화시키는 과정에 관한 것이다. 예를 들면, 상기 변화는 메틸화 패턴의 변화, 줄기세포성 유전자의 발현율 변화 등을 포함한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 주입은 핵막을 침투하여 핵 내로 직접 주입하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 주입은 2가지 이상의 역분화인자 DNA를 동시에 주입하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 2000 내지 4000 분자의 DNA를 주입하는 것을 특징으로 할 수 있다. 특히, 마우스인 경우 2000 내지 3000 분자의 DNA를 주입하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 2500 분자의 DNA를 주입하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 인간인 경우 2500 내지 4000 분자의 DNA를 주입하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 3300 분자의 DNA를 주입하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 상기 2000 내지 4000 분자의 DNA는 Oct4, Klf4, Sox2 및 cMyc 유전자 DNA를 모두 합한 DNA 분자이다.

[0033] 본 발명의 용어 "DNA 분자"란 Oct4, Klf4, Sox2 등의 유전자를 포함하고 있는 플라스미드 (plasmid) 분자를 의미한다

[0034] 본 발명에서 "미세팁" 또는 "팁"은 내경이 500nm인 매우 미세한 유리 모세관 (ultra-fine glass capillary)으로, Eppendorf사의 Femtotip을 의미하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 내경이 500nm이하, 바람직하게는 300 내지 500nm인 팁으로 주입량(부피)을 펨토리터(fL)단위로 적재할 수 있는 팁을 모두 포함한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 배지는 N2, B27, bFGF 및 EGF가 포함된 DMEM/F12인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명의 배양 배지는 당업계에 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α-MEM(α-Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및

Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 DMEM 배지일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 배양시켰다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 10~16일 동안 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 유도된 성상아교세포를 티아조비빈(Thiazovivin), SB431542, 아스코브산 (Ascorbic acid) 및 CHIR99021를 포함하고, 사이토카인을 포함하지 않는 배지에서 추가 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0039] 본 발명의 티아조비빈(Thiazovivin), SB431542, 아스코브산 (Ascorbic acid) 및 CHIR99021와 같은 소분자 화합물은 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 제품을 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 제품의 사용은 DMSO에 녹여서 배지에 첨가하여 사용하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 첨가하여 사용하였다.

[0040] 상기 "티아조비빈(Thiazovivin: N-benzyl-2-(pyrimidin-4-ylamino)thiazole-4-carboxamide)"은 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제로 신경세포와 신경줄기세포의 세포사멸을 유도하는 Rho/ROCK 신호를 막고 신경줄기세포의 증식을 억제하는 PTEN 신호를 막는다고 알려져 있어, 신경줄기세포의 세포사멸 억제와 자가재생능력과 자가증식능력을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다(Matthias Groszer, *et al., Science* 294: 2186, 2001). 상기 티아조비빈(Thiazovivin)은 ROCK 억제제 (inhibitor of Rho-associated kinase: ROCK)로 ROCK(Rho-associated kinase)을 선택적으로 억제하는 역할을 하는 물질로 티아조비빈 외에 Y-27632, HA-1077(파수딜), HA-1100(하이드록시파수딜), H-1152, 3-(4-피리딜)-1H-인돌, N-(4-피리딜)-N'-(2,4,6-트리클로로페닐)우레아, 아우로티오글루코즈 및 LY294002 등을 사용할 수 있다. 상기 티아조비빈을 배지에 처리하여 유효 농도로 포함되도록 하며, 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다.

[0041] 상기 SB431542는 ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제로 마찬가지로 신속한 역분화를 유도하여 염색체 안정성을 향상시키는 역할을 하며, 상기 아스코브산은 항산화제로 항산화 작용을 통하여 세포의 생존율을 향상시켜 염색체 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0042] 상기 "CHIR99021"은 GSK (glycogen synthase kinase) 억제제로 GSK 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림(upstream) 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질이다. 상기 CHIR99021은 아미노피리미딘 (aminopyrimidine)으로 표시되며, CHIR99021 외에도 모든 GSK 억제제가 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 성상아교세포는 성상아교세포 특이 단백질인 GFAP와 S100b가 발현하고, 성상아교세포의 대표적인 이온채널 유전자인 Kir4가 발현하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 섬유아세포는 인간 또는 마우스 유래인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 용어 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)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 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0047] 본 발명에서 용어, "치료"는 상기 세포치료제의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0049] **[실시예]**

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] **실시예 1: 단일 세포내 형질전환 유전자 미세주입**

[0053] 단일 세포내 형질전환 유전자를 직접 전달하기 위하여 이전 연구에서 개발한 기술 (KR 2014-0050244)을 이용하였다.

[0054] 세포 배양 배지내의 세포로 물질을 전달하는 과정에서 세포내 손상이 없도록 내경이 500nm 이하로 매우 작은 팁(Femtotip)을 사용하며, 이 팁내에 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc 유전자를 포함하는 플라스미드인 pCX-OKS-2A 및 pCX-cMyc를 적재 후 팁을 manipulator 및 Injector에 연결된 지지대에 부착하였다. 이렇게 연결된 팁은 injector로부터 발생된 압력을 받아 적재된 유전자 플라스미드를 세포 내부로 전달할 수 있게 된다.

[0055] 본 실시예에서는 마우스 배아 유래 섬유아세포를 배양접시 바닥에 부착시킨 상태에서 유전자를 주입하였다. 주입된 외부 유전자의 발현 효율을 높이기 위하여 세포의 핵 (nucleus) 부분에 직접 팁을 찔러 넣어 유전자를 주입하였다 (도 1). 유전자를 주입한 세포는 이산화탄소 5%, 37℃의 배양조건에서 하루동안 배양하며 회복시킨 뒤 실험에 사용하였다. 본 발명에서는 주입하는 유전자의 양을 정량적으로 조절이 가능한 기술을 이용하였기 때문에 특정 양의 유전자를 주입한 조건에서만 성상아교세포가 제작되는 것을 확인하였다.

[0057] **실시예 2: 단일 세포내 전달될 유전자의 확인**

[0058] 정량적 유전자 전달기술을 이용하여 마우스 배아 유래 섬유아세포에 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc 역분화인자와 같은 전사인자(transcription factor)가 전달될 수 있는지 확인하였다. 즉, 세포 내로 유전자를 주입한 뒤 주입한 유전자가 정상적으로 발현되는지 조사하였다.

[0059] 주입한 유전자의 발현을 확인하기 위하여 세포를 4% 포름알데하이드로 고정한 후 면역형광염색법으로 염색하였다. 그 결과, 세포에서 발현된 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc 각각의 단백질은 녹색 형광으로 염색되어 형광현미경을 통해서 확인하였다 (도 2A).

[0060] 다음으로, 정량적 유전자 주입법을 이용하여 유전자 주입량을 조절하여 주입한 후 발현 정도를 비교하였다. 체세포에 1700분자의 DNA 부터 4200분자의 DNA까지 다양한 양의 유전자를 주입하고, 각각 조건에서 유전자 발현의 지속시간과 발현 강도를 비교함으로써, 체세포에서 역분화인자의 발현을 효과적으로 유지할 수 있는 최적 주입 조건을 확인하였다 (도 2B).

[0062] **실시예 3: 정량적 유전자 전달을 이용한 체세포의 직접세포전환**

[0063] 직접세포전환을 통하여 유전자를 주입한 세포를 기능성 신경아교세포의 일종인 성상아교세포로 변화시키기 위하여 신경세포분화 조성으로 세포를 배양하였다 (도 3). 체세포를 신경세포로의 분화를 촉진시키기 위하여, 마우스 섬유아세포에 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc 역분화인자를 주입한 후 DMEM/F12, N2, B27, bFGF, EGF로 구성된 neurobasal 배지에 SB431542, 티아조비빈 (thiazovovon), 아스코브산 (ascorbic acid), CHIR99021의 4가지 소분자 화합물을 첨가하여 배양하였다. 유도를 시작한지 10일 전후로 세포에서 형태적인 변화를 관찰할 수 있었다 (도 3).

[0065] <u>3-1: 전달된 유전물질의 양과 직접세포전환의 상관관계 분석</u>

[0066] 성상아교세포를 제작할수 있는 최적의 DNA 양을 확인하기 위하여 체세포에 1700분자의 DNA 부터 4200분자의 DNA까지 다양한 양의 유전자를 주입하여 직접세포전환을 유도하였다. 각각의 조건에서 약 2주일간 배양하면서 세포의 형태적 변화를 비교하였다 (도 4). 그 결과, 특이적으로 2500 분자의 DNA를 주입한 조건에서만 신경계열 세포와 유사한 형태로 세포가 변화한 것을 확인할 수 있었다. 다른 양의 유전자를 주입한 조건에서는 이러한 변화를 관찰할 수 없었다.

[0067] 이에, 세포의 다양한 양의 유전자를 주입하여 직접세포전환을 유도하는 과정에서의 형태적인 변화뿐만 아니라 다양한 유전자 발현의 차이도 비교하였다 (도 5). 그 결과, 성상아교세포 마커 유전자인 GFAP와 S100b 유전자는 형태적 변화 결과와 마찬가지로 2500분자의 DNA를 주입한 조건에서 2주동안 발현이 유지되는 것을 확인하였다. 반면 다른 양의 유전자를 주입한 조건에서는 해당 유전자들의 발현이 오래 지속되지 못하고 금방 사라지는 것을 확인하였다.

[0068] 따라서, 본 발명에서는 2500분자의 DNA를 주입하여 마우스 섬유아세포를 성상아교세포로 전환시킬수 있음을 확

인하게 되었다. 또한, 성상아교세포 마커 유전자가 아닌 다른 유전자들은 직접세포전환이 진행되는 동안 발현이 증가하지 않거나 발현이 지속되지 못하는 것도 알 수 있었다. 특히 섬유아세포 마커 유전자인 CD90 유전자의 경우, 직접세포전환이 시작된 시점부터 지속적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 5).

[0070] 3-2: 성상아교세포 마커인 GFAP가 발현되기까지의 기전 확인

[0071] 본 실시예에서는 정량적 유전자 전달로 인하여 발생하는 직접세포전환 과정 동안 체세포에서 일어나는 대략적인 유전자 발현 기전을 규명하였다.

[0072] 우선적으로 주입된 역분화인자 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc가 체세포의 탈메틸화를 촉진시키고, 이로 인하여 GFAP 조절 유전자 중 일부가 활성화될 것이라는 가정을 세우고 이를 규명하였다. 역분화 인자가 주입된 세포에서 날짜별로 RNA를 추출하여 real-time PCR 기법을 통해 주입된 유전자의 발현량 변화, 3가지 탈메틸화 조절 유전자의 발현량 변화 및 GFAP의 발현을 조절하는 유전자의 발현량 변화를 비교하였다.

[0073] 그 결과, TET1 유전자만이 역분화 인자 주입후 유의미하게 증가하는 것을 확인하였고 이를 토대로 주입된 유전자로 인하여 촉진될 수 있는 탈메틸화 조절 유전자는 TET1 유전자로 확인되었다 (도 6).

[0074] 또한, 주입된 유전자 중 가장 발현이 높고 오래 유지되는 Sox2 유전자로 인하여 활성화된다고 알려져 있으면서, 성상아교세포 마커인 GFAP의 발현을 향상시키는 것으로 알려진 몇가지 유전자의 발현 (Dore, J. J., *Dev Neurosci,* 31(6):473-486, 2009)을 분석하였다. 그 결과, BMP2 유전자의 발현만이 직접세포전환이 진행됨에 따라 증가하는 것을 확인하였다 (도 6).

[0075] 이러한 결과들은, 주입된 유전자의 영향으로 인하여 세포의 유전자 발현 변화를 촉진시키는 탈메틸화가 TET1 유전자를 통해 일어날 수 있으며, 주입된 유전자 중 특히 Sox2의 영향으로 BMP2 유전자의 발현이 증가하고, 이를 통하여 GFAP 유전자의 발현이 증가하는 기전을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0077] **실시예 4: 정량적 유전자 전달기술을 이용한 직접세포전환으로 섬유아세포로부터 기능성 성상아교세포의 제작**

[0078] 4-1: 직접세포전환에 의한 유전자 발현 변화

[0079] 실시예 3-1에서는 정량적 유전자 전달기술을 이용한 직접세포전환이 2500 분자의 DNA를 주입하는 조건에서 가능한 것을 확인하였다.

[0080] 따라서, 본 실시예에서는 단일세포에 2500 분자의 DNA를 주입하여 직접세포전환을 유도하였으며, 이 과정에서 섬유아세포가 성상아교세포로 변화하는 과정을 마커 단백질의 발현을 통해 형광현미경으로 관찰하였다 (도 7). 그 결과, 약 2주간의 직접세포전환 과정을 거친 세포는 섬유아세포 마커인 CD90을 발현이 모두 사라지는 대신 약 30%의 세포에서 성상아교세포 마커인 GFAP를 발현하는 것을 확인하였다.

[0082] 4-2: 제작된 성상아교세포의 기능적 특성 검증

[0083] 성숙한 성상아교세포를 제작하여 기능적 특성을 검증하기 위하여 14일간 직접세포전환을 진행한 세포의 배양조성에서 사이토카인을 제거하여 5일 가량 더 배양하였다.

[0084] 직접세포전환으로 제작된 성숙한 성상아교세포는 첫 번째로 마커 단백질의 발현을 확인하여 그 기능적 특성을 검증한 결과, 세포질에서 GFAP 단백질과 S100b 단백질을 모두 발현하는 정상적인 성상아교세포의 특성을 지니고 있었다 (도 8A).

[0085] 다음으로, 성상아교세포의 특성인 글루탐산 (glutamate) 흡수능력을 확인하기 위해, 세포를 배양한 후 배양액에 남아있는 글루탐산 수치를 분석키트를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 제작된 성상아교세포를 배양한 배양액에 남아있는 글루탐산 수치가 섬유아세포를 배양한 배양액에 남아있는 글루탐산 수치보다 절반가량 낮은 것을 확인하였다 (도 8B). 이는 제작된 성상아교세포가 정상적인 글루탐산 흡수능력이 있다는 것을 보여주는 것이다.

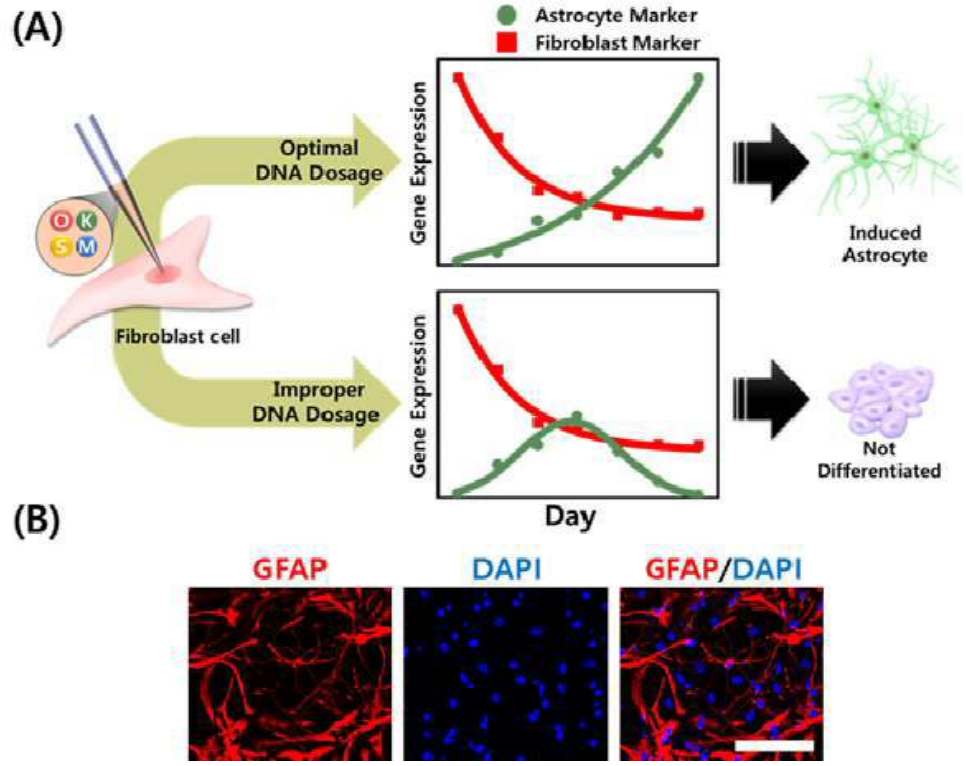
[0086] 마지막으로, 성상아교세포의 이온 채널과 이에 따른 전기생리학적인 특성을 판단하기 위하여 이온채널 마커 유전자의 발현 정도의 분석과 전기생리학 검사를 진행하였다. 그 결과, 제작된 성상아교세포는 이온채널 마커 Kir4를 모두 발현하고 있었으며, 다른 종류의 이온채널 마커는 세포마다 차이가 있었다 (도 8C). 또한, 직접세

포전환으로 제작된 성상아교세포는 정상 성상아교세포와 거의 동일한 전기적 성질을 지니고 있음이 전기생리학 검사에서 확인되었으며 (도 8D), 이를 통하여 정량적 유전자 전달기술에 의한 직접세포전환으로 기능성 성상아교세포를 제작이 가능하다.

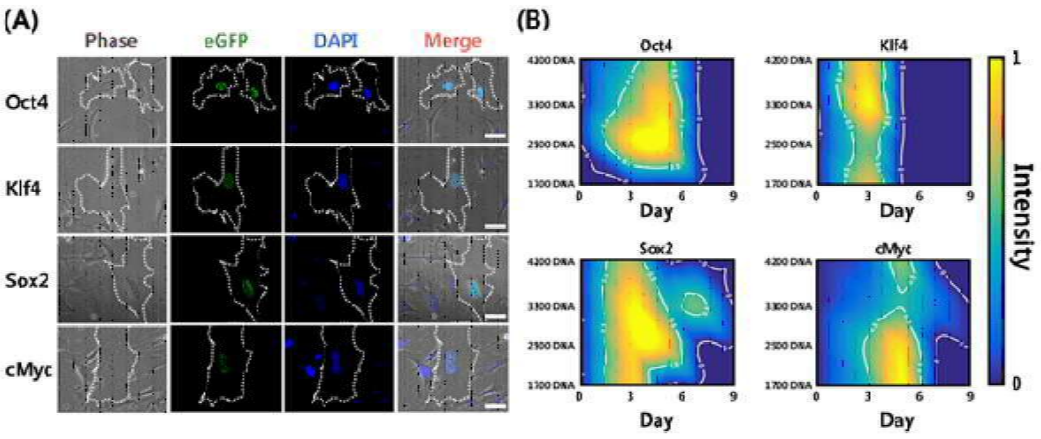
[0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

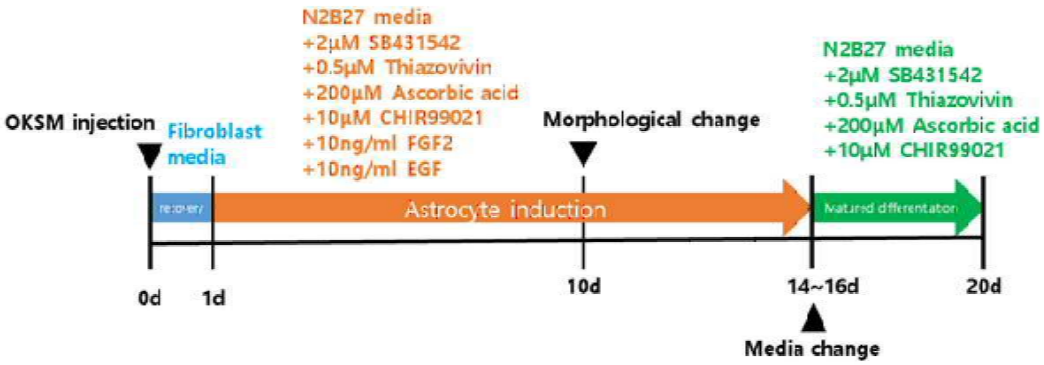
### 도면1



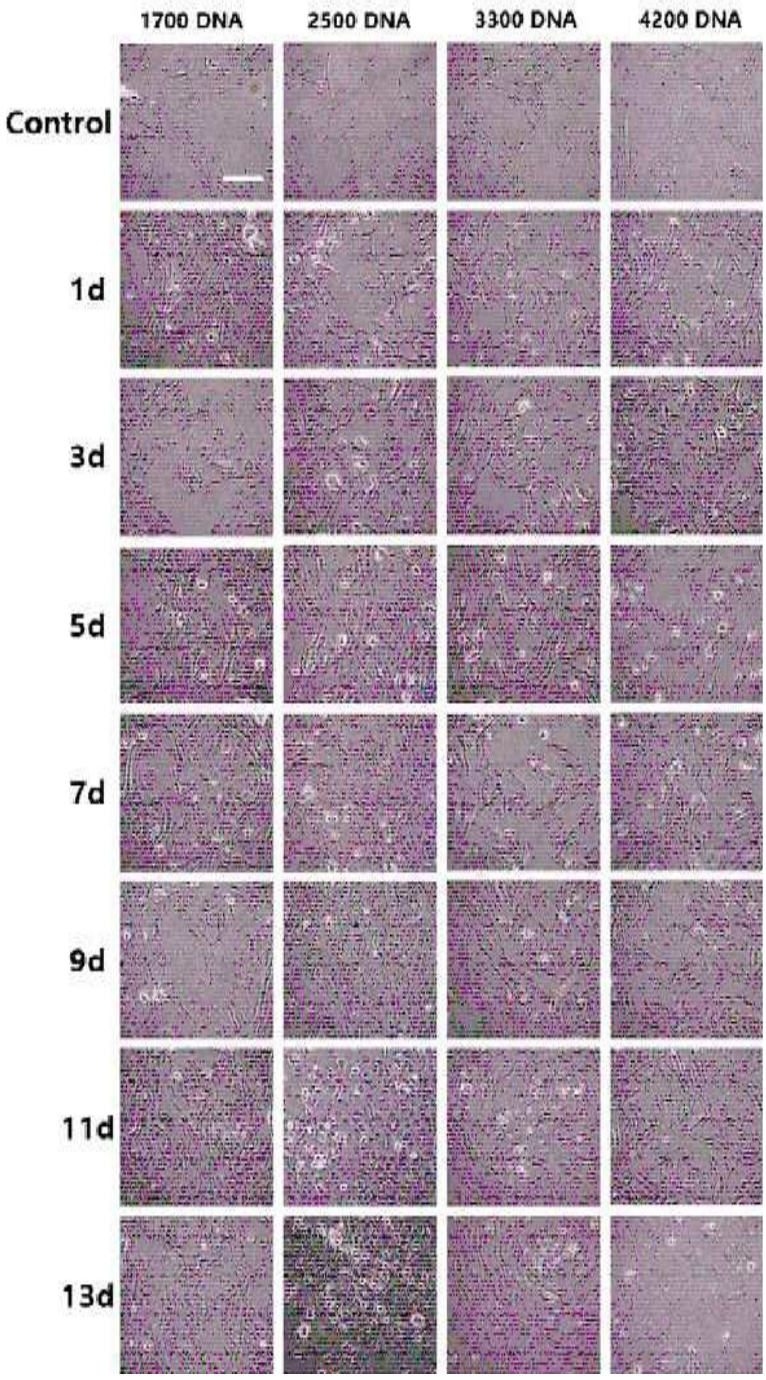

### 도면2



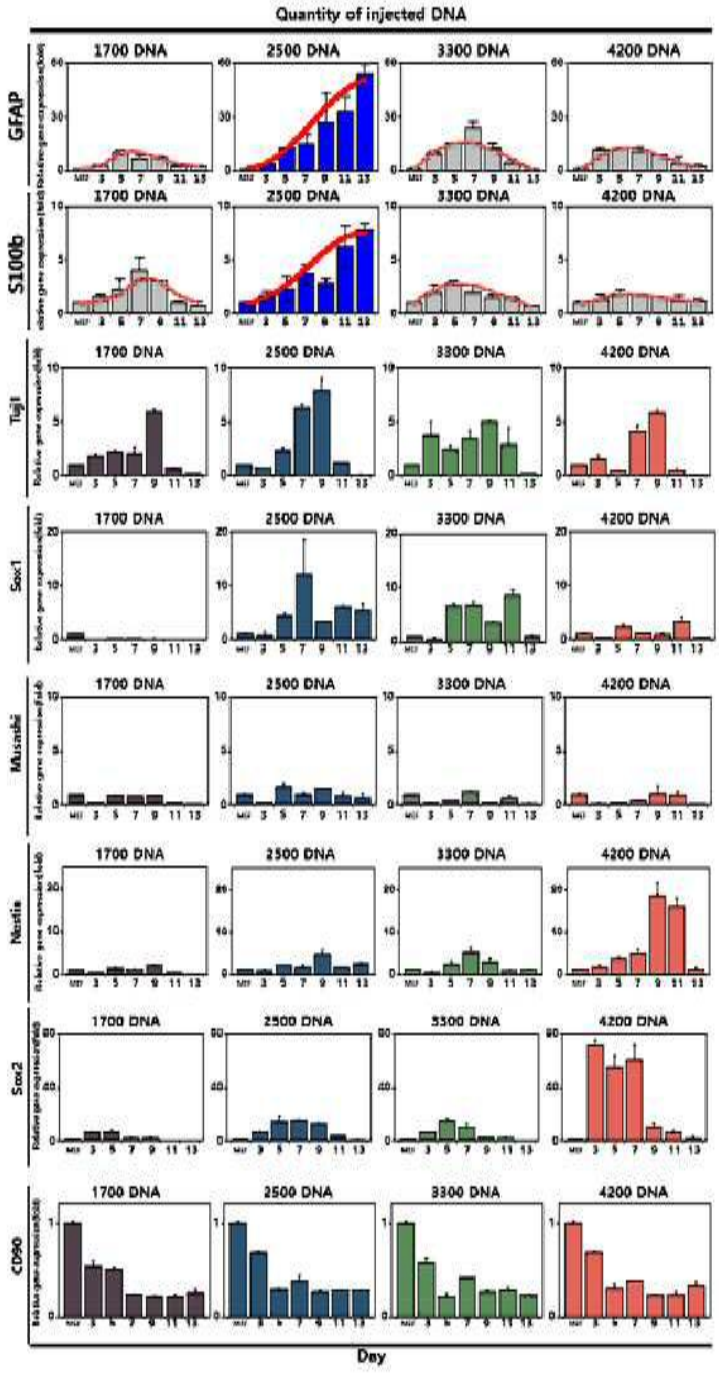
도면3


N2B27 media
+2μM SB431542
+0.5μM Thiazovivin
+200μM Ascorbic acid
+10μM CHIR99021
+10ng/ml FGF2
+10ng/ml EGF
N2B27 media
+2μM SB431542
+0.5μM Thiazovivin
+200μM Ascorbic acid
+10μM CHIR99021
OKSM injection
Fibroblast media
Morphological change
recovery
Astrocyte induction
Matured differentation
0d
1d
10d
14~16d
20d
Media change

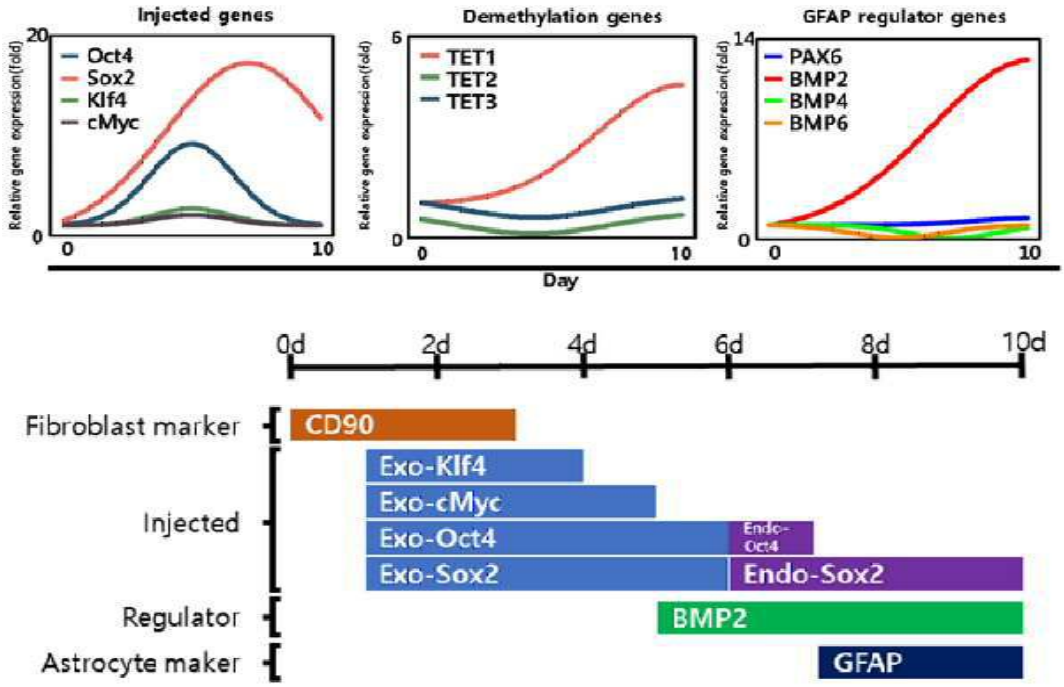
도면4


1700 DNA
2500 DNA
3300 DNA
4200 DNA
Control
1d
3d
5d
7d
9d
11d
13d

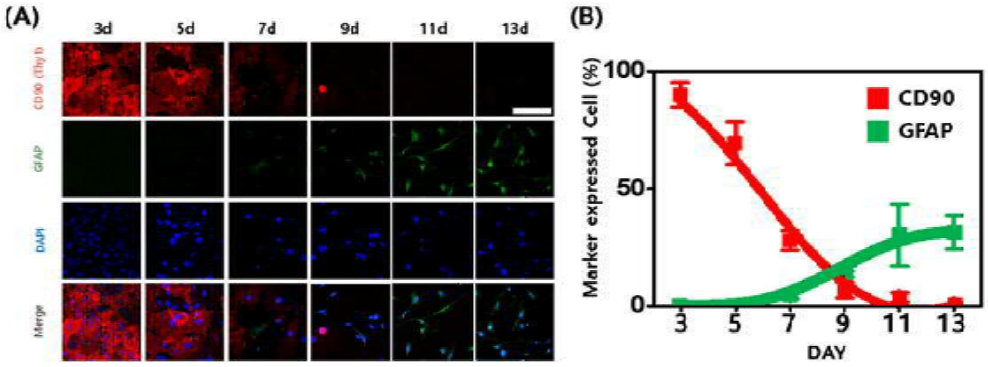
도면5


Quantity of injected DNA
1700 DNA
2500 DNA
3300 DNA
4200 DNA
GFAP
S100b
Tuj1
Sox1
Musashi
Nestin
Sox2
CD90
Day

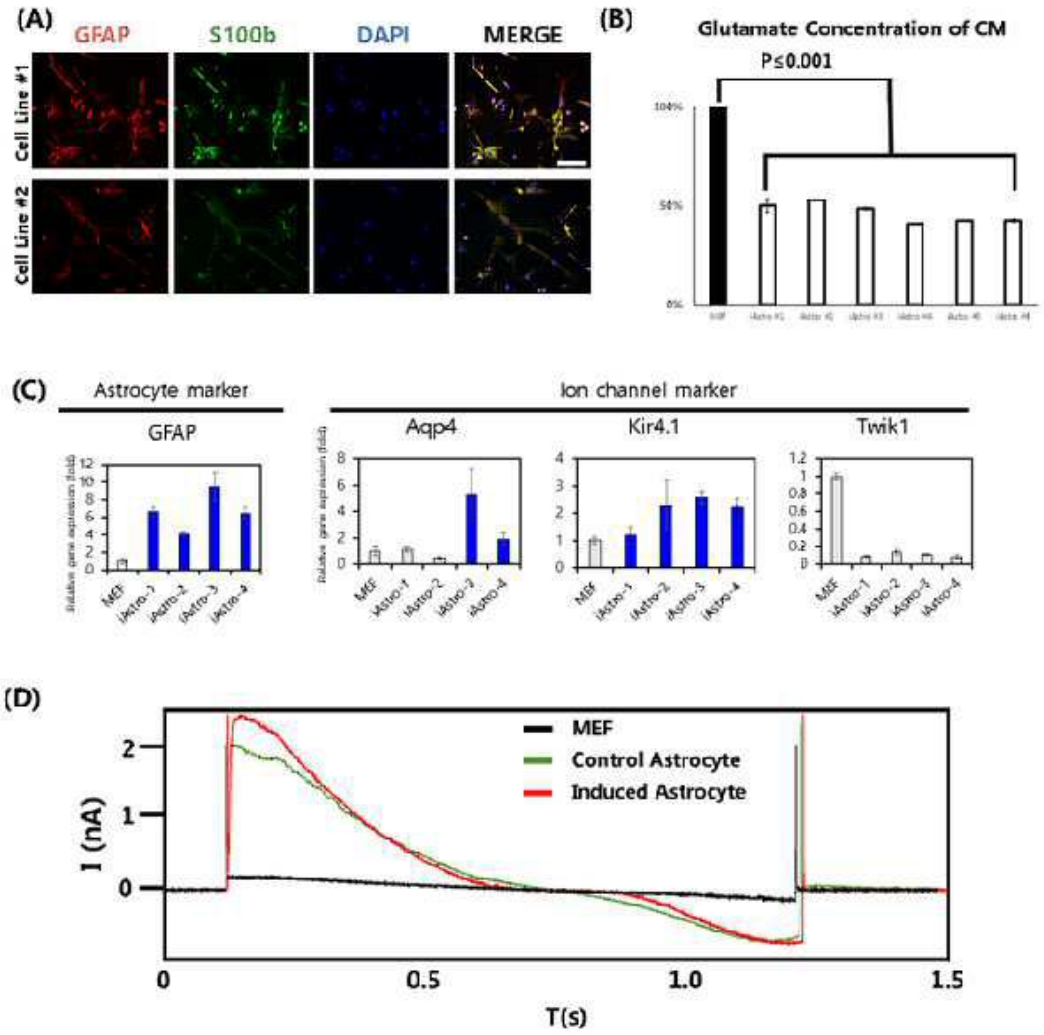
도면6


Injected genes
Demethylation genes
GFAP regulator genes
Relative gene expression(fold)
Oct4
Sox2
Klf4
cMyc
TET1
TET2
TET3
PAX6
BMP2
BMP4
BMP6
Day
0d
2d
4d
6d
8d
10d
Fibroblast marker
CD90
Injected
Exo-Klf4
Exo-cMyc
Exo-Oct4
Endo-Oct4
Exo-Sox2
Endo-Sox2
Regulator
BMP2
Astrocyte maker
GFAP

도면7


(A)
3d
5d
7d
9d
11d
13d
CD90 (Thy1)
GFAP
DAPI
Merge
(B)
Marker expressed Cell (%)
CD90
GFAP
DAY

도면8


(A)
GFAP
S100b
DAPI
MERGE
Cell Line #1
Cell Line #2
(B)
Glutamate Concentration of CM
P≤0.001
(C)
Astrocyte marker
GFAP
Ion channel marker
Aqp4
Kir4.1
Twik1
(D)
MEF
Control Astrocyte
Induced Astrocyte
I (nA)
T(s)