



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0019697
(43) 공개일자 2017년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0602 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0113834
(22) 출원일자 2015년08월12일
심사청구일자 2015년08월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김병수
서울특별시 강남구 압구정로29길 69, 201동 603호 (압구정동, 현대아파트)
정지혜
서울특별시 서초구 사평대로14길 32, 402호 (반포동, 효성빌라)
박용
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 112동 202호 (잠실동, 잠실엘스아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

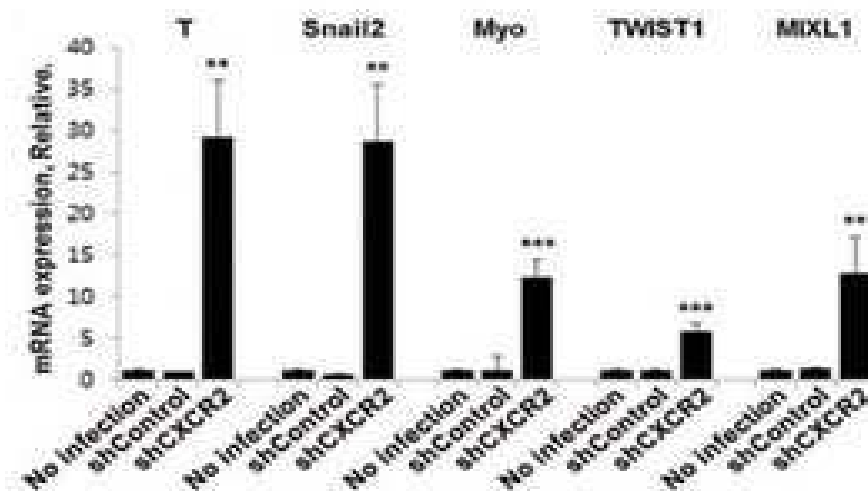
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 CXCR2 억제제를 통한 인간 전분화능 줄기세포의 내배엽 및 중배엽 분화 방법

(57) 요약

본 발명은 CXCR2 억제제를 통한 인간 전분화능 줄기세포의 내배엽 및 중배엽 분화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인간 전분화능 줄기세포의 표면 수용체 CXCR2의 발현을 shRNA 기법을 통해 억제하여 내배엽 및 중배엽으로 분화를 촉진하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CXCR2 억제제를 통한 인간 전분화능 줄기세포의 내배엽 및 중배엽 분화 방법은 특정 세포로 분화를 유도하기 위한 첫 번째 중요한 단계인 목적 세포의 기원이 되는 특정 배엽세포로의 분화를 촉진하므로, 세포 치료제로서 줄기세포의 효율성 및 유용성을 높일 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 5/067 (2013.01)

C12N 5/0676 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014060949

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술 개발사

연구과제명 인간 역분화 줄기세포의 완전한 무지지세포 배양을 위한 표준화 인간세포 유래 조건화 배
지 생산 및 기전 규명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

전분화능 줄기세포를 CXCR2 발현 억제제로 처리하거나, CXCR2 길항제(antagonist)를 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로 분화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CXCR2 발현 억제제는 CXCR2의 mRNA에 특이적인 shRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 1 내지 3으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CXCR2 길항제(antagonist)는 SB225002 또는 SB265610인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 내배엽은 AFP, GATA4, ZO1, SOX17 및 CXCR4로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 중배엽은 T, Snail2, Myocardin, twist1 및 mixl1로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 인간 유래 배아줄기세포 또는 인간 유래 iPS(induced pluripotent stem) 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

CXCR2 길항제(antagonist)를 유효성분으로 함유하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로의 분화유도용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 CXCR2 길항제(antagonist)는 SB225002 또는 SB265610인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 내배엽은 AFP, GATA4, ZO1, SOX17 및 CXCR4로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 중배엽은 T, Snail2, Myocardin, twist1 및 mixl1로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 인간 유래 배아줄기세포 또는 인간 유래 iPS(induced pluripotent stem) 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CXCR2 억제제를 통한 인간 전분화능 줄기세포의 내배엽 및 중배엽 분화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인간 전분화능 줄기세포의 표면 수용체 CXCR2의 발현을 shRNA 기법을 통해 억제하여 내배엽 및 중배엽으로 분화를 촉진하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 최근에는 다양한 세포로 분화가 가능한 줄기세포를 이용하여 다양한 질환을 치료하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있고, 결국 줄기세포 연구의 궁극적인 목적은 원하는 종류의 세포나 조직을 만들어 세포 치료나 조직 공학 등의 기술에 활용하는데 있다.

[0004] 따라서, 줄기세포를 실제로 활용하기 위하여 해결해야 할 당면과제는 원하는 세포로 분화를 유도할 수 있는 기술의 개발이다. 이에 따라 줄기세포를 특정 세포로 분화시키고자 하는 연구들이 시도되고 있으며, 분화가 끝난 세포를 역분화를 통해 줄기세포로 만든 역분화 줄기세포(induced Pluripotent Stem Cell, iPS) 등이 세포분화에 사용되고 있다.

[0005] 일반적으로 줄기세포의 분화를 유도하는 방법으로는 분화 촉진제를 이용하는 방법들이 사용되고 있다. 대표적으로는 레티논산(retinonic acid)을 이용하여 배아줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법(*Dev. Dyn.* 236:3255-3266, 2007), 액티빈 A(activin A)를 이용하여 간세포로 분화시키는 방법(*Nat. Biotechnol.* 23:1534-1541, 2005), 아스코르브산(ascorbic acid)을 이용하여 심근세포로 분화시키는 방법(*Circulation* 107:1912-1916, 2003) 등이 있다. 그러나 종래의 기술은 사이토카인(cytokine)과 같은 고가의 시약을 사용하기 때문에 비용이 많이 든다는 단점뿐 아니라, 낮은 분화율 등의 한계점을 가지고 있다. 따라서 줄기세포를 다양한 분야에서 효과적으로 이용하기 위해서는, 줄기세포의 분화 효율을 높이고 원하는 특정 조직으로의 분화 (differentiation)를 유도할 수 있는, 저렴하고 용이한 분화 유도 방법을 개발할 필요가 있다.

[0006] 인간을 포함한 대부분의 척추동물은 초기배아(early embryo)의 장배형성과정(gastrulation)을 거쳐 초기 삼배엽성 세포, 즉 내배엽, 중배엽 그리고 외배엽을 형성하며, 상기 삼배엽성 세포로부터 인체조직을 구성하는 모든 세포들이 분화된다. 초기배아인 배반포(blastocyst)의 내세포괴(inner cell mass)를 추출하여 in vitro에서 확립된 배아 줄기세포(embryonic stem cell)의 경우, 이러한 장배형성과정과 유사한 현상이 배상체(embryoid body) 형성과정 동안 관찰된다. 따라서 배아줄기세포로부터 특정세포를 분화해 내기 위한 첫 번째 중요한 단계는, 분화해내고자 하는 목적 세포의 기원이 되는 특정 배엽세포를 증가시키는 것이며, 이로부터 원하는 세포를

분화해 내는 것이 가장 효율적인 분화방법이 될 것이다. 특히, 세포 치료제로서의 줄기세포의 유용성을 높이기 위해서는 줄기세포를 효율적으로 특정세포로 분화시키는 기술이 필요하다.

[0007] 최근, 인간 전분화능 줄기세포 유래 배아체의 mTOR(mammalian target of rapamycin)을 억제하여 분화를 촉진시키는 방법(Zhou J *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(19):7840-5, 2009) 및 인간 전분화능 줄기세포의 telomerase를 억제하여 분화를 촉진하는 방법(Yang C *et al.*, *Stem Cells.* 26(4):850-63, 2008)이 보고되었으나, mTOR 억제의 경우는 세포 수용체가 아닌 신호전달 단백질에 작용하는 기술이며 telomerase를 억제하는 경우에도 세포 수용체가 아닌 텔로미어 유지 효소에 작용하는 기술로 내배엽, 중배엽, 외배엽을 포함한 비특이적인 분화가 촉진된다. 인간 전분화능 줄기세포 유래 배아체의 분화를 조절하기 위해서는 세포수용체에 작용하는 기술을 개발하는 것이 가장 중요하다. 그 이유는 신호전달 단백질 혹은 효소에 작용하는 기술은 세포수용체에 작용하는 기술에 비하여 신호전달 혹은 효소작용에 영향을 미치는 세포 내 다른 인자들에 의해 영향을 받을 가능성이 보다 높을 뿐 아니라, 분화정도의 조절을 위한 조작에 있어서도 상대적으로 어려울 수 있기 때문이다. 하지만, 세포 수용체를 이용한 인간 전분화능 줄기세포 유래 배아체의 분화조절에 관한 것은 아직까지 알려진 바가 없었다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 세포 치료제로서의 줄기세포의 유용성을 높이기 위해서 원하는 특정 조직 또는 세포로의 분화를 유도하고자 예의 노력한 결과, CXCR2 수용체의 발현 억제를 통해 인간 전분화능 줄기세포의 내배엽 및 중배엽으로의 선택적 분화가 촉진된다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 전분화능 줄기세포를 CXCR2 발현 억제제로 처리하거나, CXCR2 길항제(antagonist)를 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로 분화시키는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 CXCR2 길항제(antagonist)를 유효성분으로 함유하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로의 분화유도용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전분화능 줄기세포를 CXCR2 발현 억제제로 처리하거나, CXCR2 길항제(antagonist)를 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로 분화시키는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, CXCR2 길항제(antagonist)를 유효성분으로 함유하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로의 분화유도용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 CXCR2 억제를 통한 인간 전분화능 줄기세포의 내배엽 및 중배엽 분화 방법은 특정 세포로 분화를 유도하기 위한 첫 번째 중요한 단계인 목적 세포의 기원이 되는 특정 배엽으로의 분화를 촉진하므로, 세포 치료제로서 줄기세포의 효율성 및 유용성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 (A) shRNA를 이용하여 CXCR2 유전자 발현억제 후, 인간 전분화능 줄기세포의 모습 (Magnification: 40X); (B) CXCR2 유전자 발현억제 후, 인간 전분화능 줄기세포의 표지유전자 (OCT4, SOX2, SSEA-4)들의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 결과; 및 (C) CXCR2 유전자 발현억제 후, 인간 전분화능 줄기세포의 분열능(Proliferation)을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 CXCR2 유전자 발현억제 후, 인간 전분화능 줄기세포의 표지유전자 (OCT4, NANOG, REX-1)의 발현을 실시간 중합효소 연쇄반응법 (Real-time quantitative PCR)으로 확인한 결과이다.

도 3은 Nestin, Sox1, Pax6 및 Prox1 등의 외배엽(Ectoderm) 유전자들의 발현을 실시간 중합효소 연쇄 반응으로 확인한 결과이다.

도 4는 AFP, GATA4, Z01, Sox17 및 CXCR4 등의 내배엽(Endoderm) 유전자들의 발현을 실시간 중합효소 연쇄 반응으로 확인한 결과이다.

도 5는 T, Snail2, Myocardin, Twist1 및 Mixl1 등의 중배엽(Mesoderm) 유전자들의 발현을 실시간 중합효소 연쇄 반응으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] 본 발명에서는 인간 전분화능 줄기세포를 표면 수용체 CXCR2의 mRNA에 특이적인 shRNA를 처리하여 CXCR2 유전자의 발현을 억제시킨 후, AFP, GATA4, Z01, SOX17 및 CXCR4 등의 내배엽 특이 유전자 및 T, Snail2, Myocardin, twist1 및 mixl1 등의 중배엽 특이 유전자의 발현을 실시간 중합효소 연쇄 반응을 통하여 분석한 결과, 인간 전분화능 줄기세포 CXCR2의 억제에 의해 내배엽 및 중배엽으로의 분화가 현저히 유도되는 것을 확인하였다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 일관점에서 전분화능 줄기세포를 CXCR2 발현 억제제로 처리하거나, CXCR2 길항제 (antagonist)를 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로 분화시키는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, CXCR2 발현 억제제는 CXCR2의 mRNA에 특이적인 shRNA인 것이 바람직하며, 상기 shRNA는 서열 번호 1 내지 3으로 구성된 군에서 선택되는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] RNA 간섭(RNA interference, RNAi)은 표적 유전자의 발현을 선택적으로 억제하는 메커니즘으로, 서열 특이적 mRNA 분해의 매개자는 보다 긴 dsRNA로부터 리보뉴클레아제 III의 절단에 의해 생산된 19~23 뉴클레오타이드의 작은 간섭 RNA이다. 세포질의 RISC(RNA-induced silencing complex)는 siRNA에 결합하고 그 siRNA 중 한가닥에 상보적인 서열을 포함하는 mRNA의 분해를 지시한다. 포유동물에서 RNA 간섭의 적용은 치료 유전자 침묵 (silencing)의 효능을 가지고 있다. siRNA의 장점에도 불구하고 siRNA는 시험관 내에서 제조되어야 하고 녹다운 유전자를 통상적으로 6 내지 10일 동안 일시적 형질감염에 의해 전달되어야 한다는 점에서 임상 적용하는데 제한이 있으므로, 본 발명의 shRNA(small-hairpin RNA) 시스템이 전술된 단점을 해결할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 CXCR2 발현을 억제하는 shRNA는 CXCR2 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, CXCR2 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 본 발명의 shRNA의 구체적인 예로는 하기 서열을 포함할 수 있다:
- [0026] 서열번호 1 : GTCTACTCATCCAATGTTATTCAAGAGATAACATTGGATGAGTAGAC
- [0027] 서열번호 2 : CCTCAAGATTCTAGCTATATTCAAGAGATATAGCTAGAACTCTTGAGG
- [0028] 서열번호 3 : GCCACTAAATTGACACTTATTCAAGAGATAAGTGCAATTTAGTGGC
- [0029] RNAi에 의해 CXCR2의 발현을 억제하는 물질은, 인공적으로 화학 합성하여도 좋고, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 DNA 서열을 역방향으로 연결한 헤어핀 구조의 DNA를 T7 RNA 폴리머라제에 의해 실험실 조건(in vitro)에서 RNA를 합성하여 제작하여도 무방하다. 실험실 조건에서 합성하는 경우, T7 RNA 폴리머라제 및 T7 프로모터를 이용하여, 주형 DNA로부터 안티센스 및 센스 RNA를 합성할 수 있다. 이들을 실험실 조건에서 어닐링한 후, 세포에 도입하면 RNAi가 유발되어, CXCR2 mRNA의 분해를 유도한다. 세포에의 도입은 인산칼슘법 또는 각종 트랜스펙션 시약(예를 들면, oligofectamine, lipofectamine 및 lipofection 등)을 이용한 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0030] RNAi에 의해 CXCR2의 발현을 억제하는 물질로서는, shRNA 또는 상기 DNA를 포함하는 발현벡터를 이용하여도 좋고, 상기 발현벡터를 함유하는 세포를 이용하여도 좋다. 상기 CXCR2 발현을 억제하는 shRNA 발현벡터 등 유전자

전달에 관해서는, 적용되는 세포 내에서 CXCR2 발현을 억제하는 shRNA 또는 shRNA 발현벡터를 발현시키는 한, 특별히 방법은 한정되지 않으나, 예를 들면, 바이러스 벡터, 리포좀을 이용한 유전자 도입을 이용하는 것이 가능하다. 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 (또는 바이러스 벡터)로는 렌티바이러스, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노부속바이러스 등이 바람직하다.

[0031] 본 발명은 다른 관점에서, CXCR2 길항제(antagonist)를 유효성분으로 함유하는 전분화능 줄기세포로부터 내배엽 또는 중배엽으로의 분화유도용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 CXCR2 길항제(antagonist)는 SB225002 또는 SB265610인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 내배엽은 AFP, GATA4, ZO1, SOX17 및 CXCR4(Kevin A D'Amour *et al.*, *nature biotech* 23:1534-1541, 2005; AKK Teo *et al.*, *Genes & Development* 25(3):238-250, 2011; C Verfaillie *et al.*, *Hematology* 10(S1):293-296, 2005; H Kaspi *et al.*, *Stem Cells* 31(10):2266-72, 2013; P Noisa *et al.*, *PLoS One* 7(5):e37129, 2012)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 것이 바람직하며, 상기 중배엽은 T, Snail2, Myocardin, twist1 및 mixl1(Kevin A D'Amour *et al.*, *nature biotech* 23:1534-1541, 2005; AKK Teo *et al.*, *Genes & Development* 25(3):238-250, 2011; C Verfaillie *et al.*, *Hematology* 10(S1):293-296, 2005; H Kaspi *et al.*, *Stem Cells* 31(10):2266-72, 2013; P Noisa *et al.*, *PLoS One* 7(5):e37129, 2012)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 특히, 내배엽성 유래 특정 세포 (예로, 내배엽 세포 유래 간세포 또는 췌장 세포)로는 중배엽 또는 외배엽성 유래 특정 세포들보다 분화를 유도하기가 어려운 반면, 당뇨병, 간경화 및 여러 난치성 질환의 세포치료에 요구되는 세포들 (간세포 혹은 인슐린 분비성 췌장 세포)은 내배엽성 세포에서 유래하기 때문에 내배엽성 세포로부터 특정 세포 (예로, 간세포 또는 췌장 세포)로의 분화유도에 관련된 많은 연구가 진행되었다 (Kubo *et al*, *Development*, 131:1651-1662, 2004; Tada *et al*, *Development*, 132:4363-4374, 2005; D'Amour *et al*, *Nat. Biotechnol.*, 23:1534-1541, 2005; Yasunaga *et al*, *Nat. Biotechnol.*, 23:1542-1550, 2006).

[0035] 하지만, 통상적으로 줄기세포를 내배엽성, 중배엽성 또는 외배엽성 세포로 분화시키기 위해서는 각 배엽 특이적으로 분화를 유도하는 생화학 물질을 이용하는 방법이 사용되고 있다. 즉, 기존의 방법들은 외배엽성 세포로의 분화에는 레티노산(retinoic acid), 염화리튬(lithium chloride), 섬유세포성장인자(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF) 등을 사용하고 있고, 내배엽성 세포로의 분화에는 베타셀룰린(betacellulin), 액티빈(activin), 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, shh) 등을 사용하고 있으며, 중배엽성 세포로의 분화에는 덱사메타손(dexamethasone), 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide), 섬유세포성장인자, 혈관내피세포성장인자(VEGF) 등을 사용하고 있는 것처럼, 분화의 방향에 따라 매우 다양한 약물을 사용하고 있으며, 이러한 분화유도용 생화학적 물질들의 다양한 조합을 사용하기도 한다. 그러나, 앞서 언급한 바와 같이, 이러한 다양한 생화학적 물질들의 사용에도 불구하고 낮은 분화율 및 종래의 방법에 의한 분화 방법은 대부분 장기간 동안 분화 과정이 진행되므로 분화과정 중 많은 양의 세포가 죽는 낮은 세포 생존율이 큰 문제가 되며, 상기 bFGF, FGF8, SHH, BDNF 등은 대단히 고가여서 경제적으로도 장점이 존재하지 않는다. 그러나, 본 발명의 CXCR2 억제를 통한 내배엽 및 중배엽으로의 분화유도는 인간 전분화능 줄기세포의 배양배지 조성(즉, bFGF 혹은 CXCR2 ligands 존재 여부)에 영향을 받지 않는다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 인간 유래 배아줄기세포 또는 인간 유래 iPS(induced pluripotent stem) 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 전분화능 줄기세포는 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 3배엽으로 분화가능한(pluripotency) 줄기세포를 의미하며, 배아줄기세포는 물론 유도다능성줄기세포(iPS, induced pluripotent stem cell), 성체줄기세포 중 그런 능력을 가진 세포들까지 포함하는 것이 바람직하다.

[0037] 줄기세포의 분화 연구과정에서 가장 많은 시간이 걸리는 단계는 특정한 배양 조건이 분화 유도에 미치는 효과를 분석하는 단계이므로, 줄기세포를 특정 배엽성 세포로 분화시킬 수 있는 효과적인 방법이 요구된다. 특히, 분화 유도 물질 등의 이용에 따른 타 물질에 의한 오염의 위험성을 배제하여, 세포 치료제로서의 줄기세포의 유용성을 높이기 위해서는 줄기세포를 효율적으로 특정세포로 분화시키는 기술이 필요하다.

[0039] [실시예]

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예 1: 인간 전분화능 줄기세포의 CXCR2 유전자 발현 억제

[0043] 인간 전분화능 줄기세포는 인체의 모든 세포로 분화할 수 있는데, 아직까지 특이적 분화유도(lineage-specific differentiation)에 대하여 많은 부분이 개발되어야 하는 실정이다. 인간 전분화능 줄기세포의 계열-특이적(lineage-specific) 분화유도에서 세포막 수용체인 CXCR2가 중요한 역할을 한다는 것을 발견하고 이를 조절함으로써 선택적 분화를 유도할 수 있었다.

[0045] 본 실시예에서는 CXCR2 유전자의 발현을 억제하여 내배엽(endoderm)과 중배엽(mesoderm)으로의 분화를 유도하기 위해, 유전자 조작 기법중 하나인 RNA 간섭 기법(RNA interference)을 사용하여 단백질 합성을 저해하고 유전자 기능을 억제하였다. 즉, short hairpin RNA (shRNA)를 벡터를 이용하여 세포로 도입하면, 타겟 유전자와 서열이 일치하는 부분을 가진 mRNA에 부착하여 그 mRNA를 절단시킴으로써 유전자 발현이 되지 않고 침묵(silence)이 일어나는 기술이다.

[0046] WiCell(<http://www.wicell.org/>)에서 구입한 인간 전분화능 줄기세포주(hPSCs: H1, iPSC)를 24-well 플레이트에 배양한 다음, 1×10^6 TU/ml 농도의 shCXCR2 lentiviral particle(sc-40028-V, Santa Cruz Biotechnology, USA) $10\mu\text{l}$ 를 polybrane $6\mu\text{g/ml}$ 에 첨가하여 18~20시간 처리하면서 infection 시켰다. shCXCR2 lentiviral particle는 서열번호 1 내지 3의 서열을 포함하는 3가지 다른 shRNA 플라스미드(sc-40028-VA, sc-40028-VB 및 sc-40028-VC, Santa Cruz Biotechnology, USA)의 pool로 이루어져 있다. 다음날 배양배지를 갈아준 다음, 첫 번째 infection보다 2배 높은 고용량의 바이러스를 사용하여 같은 방법으로 두 번째 infection을 진행하였다. 첫 번째 바이러스 infection 후 4~5일째부터 puromycin $1\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 non-infection 세포들을 8~10일까지 제거하였다.

[0048] 실시예 2: CXCR2 유전자의 발현 억제 및 미분화능 확인

[0049] CXCR2 유전자 발현 억제 후, 인간 전분화능 줄기세포의 표지유전자(OCT4, SOX2, SSEA-4)들의 발현을 면역형광 염색법 및 실시간 중합효소 연쇄반응법(Real-time quantitative PCR)으로 확인하였다.

[0050] 세포를 4% 포름알데하이드 용액으로 10분간 고정시켜 0.1% Triton X-100으로 permeabilize 및 0.3% serum 용액으로 blocking 한 후, 1:1000~2000까지 희석한 줄기세포 표지유전자(OCT4, SOX2, SSEA-4)의 1차 antibody(Cell Signaling Technology, Inc., USA)로 4℃에서 overnight incubation 하였다. 다음 날 1차 antibody를 1X PBS 용액으로 세척한 후, 형광다이가 부착된 2차 antibody를 상온에서 2시간 동안 incubation 해준 뒤 커버글라스에 고정하고 형광현미경(Olympus)을 이용하여 관찰하였다.

[0051] 또한, Qiagen RNeasy kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 CXCR2 유전자 발현이 억제된 세포로부터 RNA를 분리하고, $2\mu\text{g}$ 의 RNA, oligo(dT) 및 Superscript II reverse transcriptase (Gibco)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA에 줄기세포 표지유전자(OCT4, SOX2, SSEA-4)의 프라이머와 iQ SYBR Green qPCR Master Mix를 넣고 Bio-Rad iCycler iQ system(Bio-Rad Laboratories, USA) 기기를 사용하여 분석하였다. 분석값은 GAPDH 유전자를 이용하여 normalized 하였으며, 통계적으로 유의함을 나타내기 위하여 P Value 값을 사용하였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

[0052] 줄기세포 표지유전자들의 발현 분석을 위한 프라이머는 다음과 같다.

[0053] CXCR2: CAATGAATGAATGAATGGCTAAG (서열번호 4)/ AAAGTTTCAAGGTTTCGTCGTGTT (서열번호 5)

[0054] OCT4: TCTCGCCCCCTCCAGGT (서열번호 6)/ GCCCCACTCCAACCTGG (서열번호 7)

[0055] NANOG: AAGAATCTTCACCTATGCC (서열번호 8)/ GAAGGAAGAGAGAGACAGT (서열번호 9)

[0056] REX1: CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT (서열번호 10)/ GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA (서열번호 11)

[0057] GAPDH: GAGTCCACTGGCGTCTTCAC (서열번호 12)/ TTCACCCATGACGAACAT (서열번호 13)

- [0058] 그 결과, 대조군 세포에 비해 CXCR2 유전자 발현이 억제된 인간 전분화능 줄기세포의 줄기세포 표지유전자(OCT4, SOX2, SSEA-4)들의 발현이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있다(도 1B 및 도 2). 즉, 미분화를 유지하고 있는 인간 전분화능 줄기세포에 수용체 CXCR2의 발현을 shRNA기법을 통해 억제하면, 미분화능을 잃게 된다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0060] **실시예 3: 인간 전분화능 줄기세포의 분열능 (Proliferation) 확인**
- [0061] 인간 전분화능 줄기세포의 CXCR2 유전자 발현억제 후, 분열능 (Proliferation)을 확인하였다. 96-well plate에 인간 전분화능 줄기세포를 1×10^4 cell/well로 seeding 한 뒤, 48 시간부터 144시간까지 분석하였다. 정해진 시간(48, 72, 96, 120, 144h)에 CCK-8 (Dojindo Laboratories; Kumamoto, Japan) 용액 $10 \mu\text{l}$ 를 첨가해준 뒤, 3시간 incubation하고 450 nm에서 값을 측정하였다.
- [0062] 그 결과, 대조군에 비해 CXCR2 유전자 발현이 억제된 인간 전분화능 줄기세포의 세포 분열능이 현저히 감소한 것을 알 수 있었다(도 1C).
- [0064] **실시예 4: 실시간 연쇄증합효소 반응을 통한 내배엽 및 외배엽으로의 분화 확인**
- [0065] CXCR2 유전자 발현 억제를 통해 내배엽 및 중배엽으로 분화를 유도한 다음, 내배엽 특이 발현 마커인 AFP, GATA4, ZO1, SOX17 및 CXCR4 유전자와 중배엽 특이 발현 마커인 T, Snail2, Myocardin, twist1 및 mixl1 유전자의 발현 변화를 실시간 연쇄증합효소반응을 통하여 분석하였다.
- [0066] Qiagen RNeasy kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 분화 유도된 세포로부터 RNA를 분리하고, $2 \mu\text{g}$ 의 RNA, oligo(dT) 및 Superscript II reverse transcriptase (Gibco)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA에 표적 유전자의 프라이머와 iQ SYBR Green qPCR Master Mix를 넣고 Bio-Rad iCycler iQ system(Bio-Rad Laboratories, USA) 기기를 사용하여 분석하였다. 분석 값은 GAPDH 유전자를 이용하여 normalized 하였으며, 통계적으로 유의함을 나타내기 위하여 P Value 값을 사용하였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).
- [0067] 외배엽, 내배엽 및 중배엽 유전자들의 발현 분석을 위한 프라이머는 다음과 같다.
- [0068] (1) 외배엽 (Ectoderm) 유전자
- [0069] NESTIN: GCGTTGGAA CAGAGGTTGGA (서열번호 14)/ TGGGAGCAAAGATCCAAGAC (서열번호 15)
- [0070] SOX1: CACAACCTCG GAG ATC AGCAA (서열번호 16)/ GGTACTTGTAATCCGGGTGC (서열번호 17)
- [0071] PAX6: CTGGCTAGCGAAAAGCAACAG (서열번호 18)/ CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA (서열번호 19)
- [0072] PROX1: GCTCCAATATGCTGAAGACC (서열번호 20)/ ATCGTTGATGGCTTGACGTG (서열번호 21)
- [0073] (2) 중배엽 (Mesoderm) 유전자
- [0074] T(Brachyury): AATTGGTCC AGCCTTGAAT (서열번호 22)/ CGTTGCTCAGACCACA (서열번호 23)
- [0075] SNAIL2: ACAGCGAACTGGACACACAT (서열번호 24)/ GATGGGGCTGTATGCTCCT (서열번호 25)
- [0076] MIXL1: GGTACCCCGACATCCACTT (서열번호 26)/ GCCTGTTCTGGAACCATACCT (서열번호 27)
- [0077] TWIST1: AGCTACGCCTTCTCGGTCT (서열번호 28)/ CCTTCTCTGGAAACAATGACATC (서열번호 29)
- [0078] MYOCARDIN: TCACTTTCTGCCCTCATCCT (서열번호 30)/ TCGTGTGCTCCTGAGTTCTG (서열번호 31)
- [0079] Flt1: TCATGAATGTTTCCTGCAA (서열번호 32)/ GGAGGTATGGTGCTTCCTGA (서열번호 33)
- [0080] (3) 내배엽 (Endoderm) 유전자
- [0081] AFP: AGAACCTGTCAAGCTGTG (서열번호 34)/ GACAGCAAGCTGAGGATGTC (서열번호 35)
- [0082] GATA4: TCCCTCTCTCCCTCCTCAAAT (서열번호 36)/ TCAGCGTGTAAGGCATCTG (서열번호 37)
- [0083] CXCR4: CCTGCCTGGTATTGTCATCC (서열번호 38)/ AGGATGACTGTGGTCTTGAGG (서열번호 39)

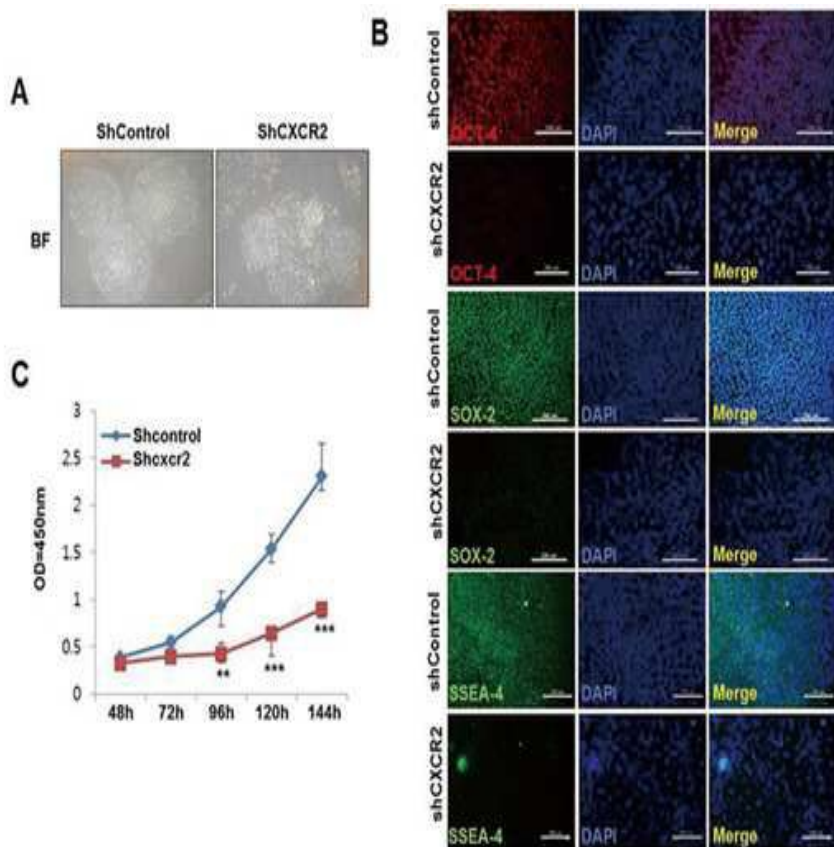
- [0084] Z01: GGTCAGAGCCTTCTGATCATTC (서열번호 40)/ CATCTCTACTCCGGAGACTGC (서열번호 41)
- [0085] SOX17: CAGACTCCTGGGTTTTTGTGTGCTG (서열번호 42)/ GAAATGGAGGAAGCTGTTTGGGACAC (서열번호 43)
- [0086] Foxa2: TTCTCCATCAACAACCTCATGTCC (서열번호 44)/ GTAGTGCATCACCTGTCGTAGG (서열번호 45)

[0087] 그 결과, 대조군 세포에 비해 CXCR2 유전자 발현이 억제된 인간 전분화능 줄기세포에서 상대적으로 외배엽 발현 마커에 비해 내배엽(AFP, GATA4, Z01, SOX17, CXCR4)과 중배엽 (T, Snail2, Myocardin, twist1, mixl1) 관련 유전자들의 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 4 및 도 5). 이러한 결과는 배양배지의 조성 차이와 관계 없이 모든 조건에서 동일하게 나타났다.

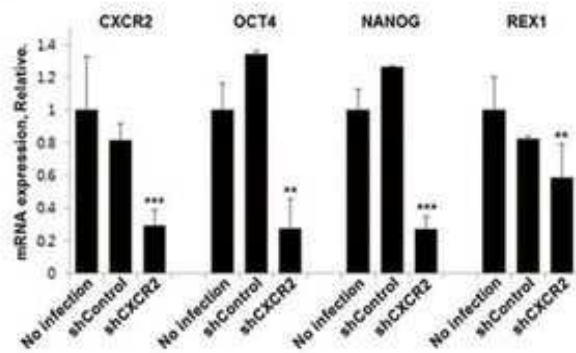
[0089] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

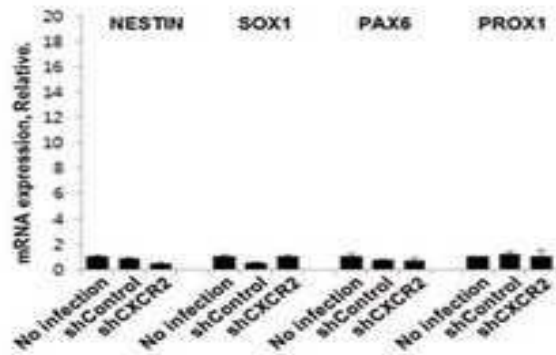
도면1



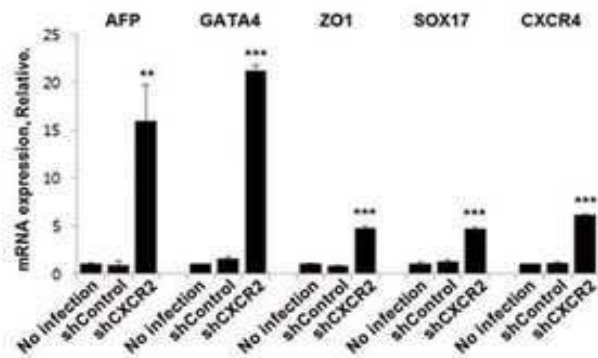
도면2



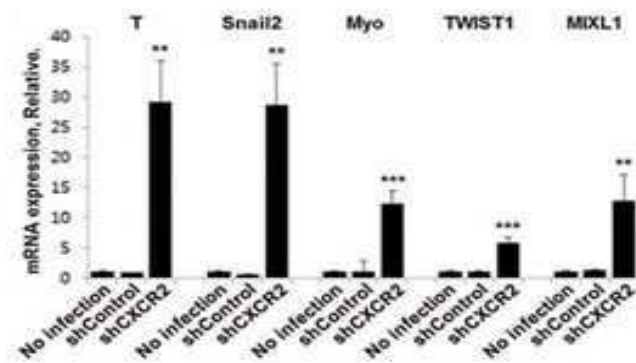
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Inducing Endodermal and Mesodermal Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells by CXCR2 Suppression
- <130> P15-B221
- <160> 45
- <170> KoPatent In 3.0

- <210> 1
- <211> 47
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA-1

<400> 1

gtctactcat ccaatgttat tcaagagata acattggatg agtagac 47

<210> 2

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA-2

<400> 2

cctcaagatt ctacttatat tcaagagata tagctagaat cttgagg 47

<210> 3

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA-3

<400> 3

gccactaat tgacattat tcaagagata agtgtcaatt tagtggc 47

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CXCR2-F

<400> 4

caatgaatga atgaatggct aag 23

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CXCR2-R

<400> 5

aaagttttca aggttcgtcc gtgtt 25

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCT4-F

<400> 6

tctcgcccc tccaggt 17

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCT4-R

<400> 7

gccccactcc aacctgg 17

<210> 8

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NANOG-F
 <400> 8
 aaagaatctt cacctatgcc 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NANOG-R
 <400> 9
 gaaggaagag gagagacagt 20
 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> REX1-F
 <400> 10
 cagatcctaa acagctcgca gaat 24

 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> REX1-R
 <400> 11
 gcgtacgcaa attaaagtcc aga 23
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH-F
 <400> 12
 gagtccactg gcgtcttcac 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH-R
 <400> 13
 ttcacacca tgacgaacat 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NESTIN-F
 <400> 14
 gcgttggaac agaggttgga 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NESTIN-R
 <400> 15
 tgggagcaaa gatccaagac 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOX1-F
 <400> 16
 cacaactcgg agatcagcaa 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOX1-R

<400>	17	
ggtacttgta atccgggtgc		20
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PAX6-F	
<400>	18	
ctggctagcg aaaagcaaca g		21
<210>	19	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PAX6-R	
<400>	19	
cccgttcaac atccttagtt tatca		25
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PROX1-F	
<400>	20	
gtccaatat gctgaagacc		20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PROX1-R	
<400>	21	
atcgttgatg gcttgacgtg		20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	T-F	
<400>	22	
aattggtcca gccttggaat		20
<210>	23	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	T-R	
<400>	23	
cgttgctcac agaccaca		18
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SNAIL2-F	
<400>	24	
acagcgaact ggacacacat		20
<210>	25	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SNAIL2-R	
<400>	25	
gatgggctg tatgctcct		19
<210>	26	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MIXL1-F	
<400>	26	
ggtaccccgga catccactt		19
<210>	27	
<211>	21	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIXL1-R
 <400> 27
 gcctgttctg gaaccatacc t 21
 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TWIST1-F
 <400> 28
 agctacgcct tctcggtct 19

 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TWIST1-R
 <400> 29
 ccttctcttg aaacaatgac atc 23
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYOCARDIN-F
 <400> 30
 tcactttctg ccctcatcct 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MYOCARDIN-R
 <400> 31
 tcgtgtgctc ctgagttctg 20

<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Flt1-F	
<400>	32	
	tcatgaatgt ttccctgcaa	20
<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Flt1-R	
<400>	33	
	ggaggtatgg tgcttcctga	20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AFP-F	
<400>	34	
	agaacctgtc acaagctgtg	20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AFP-R	
<400>	35	
	gacagcaagc tgaggatgtc	20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GATA4-F	
<400>	36	

tcctcttcc ctctcaaat	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GATA4-R	
<400> 37	
tcagcgtgta aaggcatctg	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CXCR4-F	
<400> 38	
cctgcctggg attgtcatcc	20
<210> 39	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CXCR4-R	
<400> 39	
aggatgactg tggctcttgag g	21
<210> 40	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Z01-F	
<400> 40	
ggtcagagcc ttctgatcat tc	22
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Z01-R

<400> 41

catctctact ccggagactg c 21

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX17-F

<400> 42

cagactcctg ggtttttgtt gttgctg 27

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX17-R

<400> 43

gaaatggagg aagctgtttt gggacac 27

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxa2-F

<400> 44

ttctccatca acaacctcat gtcc 24

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxa2-R

<400> 45

gtagtgcac accgtgtcgt agg 23