(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0036620
(43) 공개일자 2018년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/483 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/4833 (2013.01)
C12Q 1/6851 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0127832
(22) 출원일자 2017년09월29일
심사청구일자 2017년09월29일
(30) 우선권주장
1020160126699 2016년09월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
신동명
서울특별시 강동구 고덕로131, 139동 602호
임지선
경기도 하남시 신장로 104 성원상떼빌 910호
이승운
서울특별시 광진구 면목로5길 46-3, 201호
(74) 대리인
특허법인태백

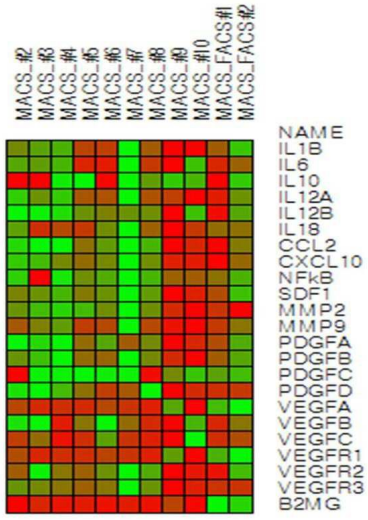
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **숙주에 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포의 분리 및 단일세포 분석방법**

(57) 요 약

본 발명은 줄기세포가 이식된 숙주로부터 분리된 세포를 대상으로 MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행하고, 이로부터 수득한 극미량 생착 세포의 특성을 단일세포 발현체 분석법을 활용하여 분석하는 단계를 포함하는 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 방법을 사용하면, 줄기세포가 이식된 숙주에서 상기 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포를 높은 회수율로 수득할 수 있을 뿐만 아니라, 숙주로부터 유래된 세포의 오염을 최소화할 수 있으므로, 생체내에서 줄기세포의 작용 및 효과를 분석하는 연구에 크게 이바지할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3b



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6881 (2013.01)
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 35/0098 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C3339
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발사업
연구과제명 단일세포 오믹스 분석법을 활용한 줄기세포 치료제 품질 평가법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2014.12.01 ~ 2018.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 자성나노입자로 표지된 분리된 줄기세포를 이식한 숙주로부터 수득한, 분리된 단일세포를 대상으로 MACS(magnetic activated cell sorting) 분리법을 수행하여, 자성나노입자를 포함하는 단일세포를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 수득한 자성나노입자를 포함하는 단일세포를 대상으로 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 분리법을 수행하여, 자성나노입자를 포함하면서도 살아있는 단일세포를 수득하는 단계를 포함하는, 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 자성나노입자는 Fe_2O_3, Fe_3O_4, FePt, CoPt, $MnFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$, $NiFe_2O_4$, $ZnFe_2O_4$ 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 자성물질로 이루어진 나노입자인 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 줄기세포는 골수, 지방조직, 치아, 치아조직, 혈액, 제대혈, 간장, 피부, 위장관, 태반, 자궁 및 태아로 구성된 군으로부터 선택되는 원천으로부터 유래한 줄기세포인 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 단일세포는, 상기 숙주로부터 적출된 줄기세포 이식 조직에 콜라게나아제 또는 트립신을 처리하여 수득하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에 의하여 수득한 자성나노입자를 포함하면서도 살아있는 단일세포는 상기 숙주에 이식된 줄기세포로부터 분화된 세포인 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 방법은 (b) 단계에서 수득한 살아있는 세포로부터 총 RNA를 추출하고, 상기 총 RNA를 역전사시켜서 cDNA를 수득한 후, 이를 증폭하여 목적하는 유전자를 대상으로 정성분석 또는 정량분석을 수행하는 단일세포 분석법을 수행하는 단계(c)를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 숙주에 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포의 분리 및 단일세포 분석방법에 관한 것으로 보다 구체적으로 본 발명은 줄기세포가 이식된 숙주로부터 분리된 세포를 대상으로 MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행하고, 이로부터 수득한 극미량 생착 세포의 특성을 단일세포 발현체 분석법을 활용하여 분석하는 단계를 포함하는 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재, 세계 줄기세포 시장의 60% 이상을 차지하는 성체줄기세포 (adult stem cell, ASC)는 계대 계통 내의 다양한 세포로 분화할 수 있는 다분화성 능력을 가지고 있으며, 배아 줄기세포에 비해 윤리적인 논란이나 안전성에 관한 문제점이 없다는 점에서 매우 효과적인 연구수단으로 인식되고 있다. 상기 성체줄기세포는 환자 조직에서 바로 분리할 수 있어 환자맞춤형 줄기세포치료제로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 생체 내에 이식된 후 장기 특성에 맞게 분화하는 장기 특이적 분화능을 나타내고, 다른 종류의 장기세포로 교차분화(trans-differentiation) 할 수 있는 특성을 나타내는 등의 특징으로 인하여, 많은 종류의 치료 기술 개발이 시급한 희귀질환 및 난치성 질환들에서 성체줄기세포를 통한 세포치료의 가능성과 적용범위가 확대 되고 있는 실정이다.

[0003] 그러나, 단순 배양된 성체줄기세포를 사용하는 1세대 치료제들은 저조한 치료 효능과 생착률, 비효율적 ex vivo expansion의 기술적 난관들로 인하여, 본견적인 줄기세포치료제의 임상 적용 연구들이 지연되고 있으며, 줄기세포치료제의 임상 적용을 촉진시키기 위하여, 적용 질환 확대 연구와 함께 치료 유효성 및 안전성 강화, 이식한 줄기세포의 생체 내 동태 분석과 줄기세포 치료제의 치료 유효성 기전(MOA) 분석 기법 적용 등의 분야에서 활발한 연구가 수행되고 있다.

[0004] 최근에는, 이러한 줄기세포 관련 연구결과를 효과적으로 모니터링하는 방법론으로서 영상의학 분야에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 영상의학은 의료기술의 발전으로 정확한 질병의 진단과 편리하게 영상을 획득할 수 있는 다양한 장비의 개발로 인하여 빠르게 발전하고 있으며, 주로 해부학적 형태의 변화와 일부 핵의학 영상이나 자기공명영상에서 기능적 정보를 영상화하고 이를 바탕으로 질병의 진단에 이용되고 있다. 이러한 영상의학은 주로 암의 조기진단, 새로운 의약품의 개발, 유전자치료, 질병치료 예후 예측 등 임상에 사용되어 왔으나, 최근에는 줄기세포 연구 및 치료에도 점차 적용되고 있다. 즉, 최근 분자영상기법의 발전으로 인하여, 생체 내에서 주입한 줄기세포의 이동 경로와 분포에 관한 정보를 실시간으로 생체조직을 손상시키지 않고 비침습적인 방법으로 판정할 수 있게 되었으며, 이를 통하여 세포수준의 기초연구를 임상에 쓰일 수 있게 하는 중개연구에서 그 역할이 확대되고 있으며, 이를 활용하여 줄기세포 치료 효능을 정량적으로 분석하는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2012-0124290호에는 X-GFP 리포터 시스템을 이용한 유도 배반엽상피줄기세포가 직접적인 교차 분화를 통하여 생성된 것을 확인하는 방법이 개시되어 있고, 한나 발리(Hanna Valli) 등은 FACS 및 MACS 분리법을 이용하여 인간 정원줄기세포(spermatogonial stem cell)를 효과적으로 분리 및 농축할 수 있다고 보고하였다(Fertil Steril. 102(2):566-580, 2014).

[0005] 현재, 바이오이미징 기법들과 줄기세포 특이적 생체표지분자들을 이용하여, 줄기세포 주입 후 생체 내에서 일어나는 분자 및 세포학적 현상들과 구성 성분들의 상호 작용 및 이동을 광학적인 영상을 통하여 일시적으로 지속가능하게 관찰 할 수 있으므로, 줄기세포 치료 효능을 정량적으로 분석하고자 하는 연구들이 전 세계적으로 시도되고 있다. 이러한 줄기세포 치료제 임상 연구에서 생체 내에서 주입한 줄기세포의 이동 경로와 분포에 관한 정보는 줄기세포 치료 효과 판정에 매우 중요하며, 줄기세포 치료법의 치료 시기와 방법을 결정하는데 매우 중요하므로, 전임상 결과로 임상시험을 디자인 하거나 임상적 유용성을 확보할 수 있는 최소 이식 세포 수를 예측하는 자료로 활용될 가능성이 매우 높다.

[0006] 상기 줄기세포를 이용한 치료술의 개발 및 실용화를 연구하는 방향의 하나로서, 줄기세포를 생체내에 이식한 후, 이식된 줄기세포가 목적하는 세포 또는 조직으로 분화되었는지를 확인하는 방법론의 개발이 필요하다. 즉, 줄기세포를 in vitro 조건에서 분화시킬 경우에는 분화여부를 직관적으로 확인할 수 있으나, 생체내에 줄기세포를 이식할 경우에는 이식된 줄기세포가 생체내에서 사멸되었는지 생착하여 목적하는 조직으로 분화되었는지를 직관적으로 확인할 수 없어, 현재로서는 이식한 생체로부터 줄기세포가 이식된 부위의 조직을 적출한 다음, 적출된 조직을 분석하여 줄기세포로부터 분화된 세포가 존재하는지의 여부를 확인하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 상기 적출된 조직으로부터 줄기세포 유래 세포를 분리하는 효율이 매우 낮아서, 이식된 줄기세포가 분화

되었는지의 여부를 확인하기 위하여는 대량의 시료를 사용하여 얻어진 결과를 통계처리하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 그러나, 생체조건에 따라 통계의 오차범위가 크기 때문에, 보다 효과적으로 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 공지된 MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행할 경우, 숙주에 이식된 줄기세포가 분화되었는지의 여부를 효과적으로 검증할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 줄기세포를 생체에 이식할 경우, 이식된 줄기세포가 생체내에서 정상적으로 분화되는지의 여부를 확인하는 방법을 을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 이식된 줄기세포의 분화여부를 쉽게 확인할 수 있는 방법을 개발하였다.

[0010] 구체적으로, 조직에 줄기세포를 이식하면, 상기 조직에는 원래의 조직세포와 줄기세포로부터 분화된 세포가 함께 존재한다. 상기 조직에서 줄기세포로부터 분화된 세포를 확인하기 위하여는, 상기 조직을 단일세포로 분리한 후, 분리된 단일세포를 개별적으로 확인하여야 한다. 이때, 사용되는 방법으로는 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 분리법, MACS(magnetic activated cell sorting) 분리법 등을 들 수 있다.

[0011] 그러나, 생체조직을 대상으로 FACS 분리법을 사용할 경우에는 선행되어야 하는 면역염색 과정 중에서 비특이적인 면역염색에 의하여 목적하는 단일세포를 확인 성공율이 매우 낮은 수준을 나타낸다는 단점이 있었다. 즉, 사용되는 세포가 일정한 수준의 동질성을 나타내는 in vitro 실험과는 달리, in vivo 실험시에 사용되는 세포는 상호 이질성이 높기 때문에, 생체조직을 대상으로 할 경우, 마커의 면역염색을 통해 수행되는 FACS 분리법은 매우 높은 수준의 오류를 나타낸다는 것이다.

[0012] 또한, 자성나노입자가 표지된 세포를 이용하여 수행되는 MACS 분리법은 세포에 표지된 자성나노입자가 다른 세포로 전달될 수 있다는 단점이 있었다. 즉, 상기 자성나노입자로 표지된 세포가 사멸하거나 또는 사멸된 세포로부터 생성된 잔류물이 다른 세포에 흡수 또는 포식될 경우, 상기 자성나노입자는 죽은 세포에 표지되어 있거나 또는 다른 세포로 전달될 수 있고, 이로 인하여 MACS 분리법은 오류를 나타낼 수 있다는 것이다.

[0013] 아울러, 분리된 단일세포는 그 양이 매우 적어서, 종래기술로는 상기 세포의 유전적 특성을 규명하기 어렵다는 기술적 한계를 가지고 있다.

[0014] 본 발명자들은 상술한 공지기술의 단점을 극복하기 위하여, MACS 분리법과 FACS 분리법을 조합하여 수행하는 기술을 개발하였다. 즉, FACS 분리법은 비특이적 면역염색으로 인하여 목적하는 세포가 아닌 다른 세포를 분리할 수 있다는 단점이 있는 반면, 살아있는 세포를 분리할 수 있다는 장점이 있다. 또한, MACS 분리법은 자성나노입자를 포함하기만 하면, 세포의 손상 또는 생존여부에 상관없이 분리한다는 단점이 있는 반면, 상기 자성나노입자를 포함하기만 한다면 빠트림 없이 모두 분리할 수 있다는 장점이 있다. 따라서, 상기 FACS 분리법과 MACS 분리법의 장점을 조합하여, 상기 자성나노입자를 포함하는 세포를 1차 분리한 후, 이 중에서 살아있는 세포를 2차 분리한다면, 상기 이식된 줄기세포로부터 분화된 세포를 효과적으로 분리하는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대하였다.

[0015] 실제로, 방광통증 증후군 방광염 모델 백서의 방광에 인간의 지방조직 유래 중간엽 줄기세포(hAD-MSC)를 이식한 후, 상기 방광조직으로부터 분리된 단일세포를 대상으로 MACS 분리법과 인간유래 줄세세포에 특이적인 항원을 이용한 FACS 분리법을 순차적으로 수행한 결과, 상기 이식된 hAD-MSC가 모델 백서의 방광에 생착한 후, 분화된 세포를 효과적으로 분리할 수 있고, 분리된 극미량의 생착세포를 단일세포 분석법을 통해 유전적 특성을 genomewide 수준에서 분석할 수 있음을 확인하였다.

[0016] 이처럼, 줄기세포가 이식된 모델 숙주에서 상기 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포를 효과적으로 분리하기 위하여, MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행하는 방법은 지금까지 전혀 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법을 제공한다.

[0018] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법은 (a) 자성나노입자로 표지된 분리된 줄기세포를 이식한 숙주로부터 수득한, 분리된 단일세포를 대상으로 MACS(magnetic activated cell sorting) 분리법을 수행하여, 자성나노입자를 포함하는 단일세포를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 수득한 자성나노입자를 포함하는 단일세포를 대상으로 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 분리법을 수행하여, 자성나노입자를 포함하면서도 살아있는 단일세포를 수득하는 단계를 포함한다.

[0019] 본 발명의 용어 "자성나노입자(magnetic nanaoparticle)"란, 자성을 가진 금속 나노 복합체를 의미하며, 자성나노입자인 금속, 자성물질, 또는 자성 합금으로 이루어질 수 있다. 자성나노입자는 자성나노입자를 구성할 수 있는 물질은 제한 없이 포함될 수 있으나, 일 예로 스피넬 구조 (spinel structure) 또는 역스피넬 구조 (inverse spinel structure)를 가지는 나노입자로서 자성을 가진 물질을 사용할 수 있고, 다른 예로서 산화 철(Fe_2O_3, Fe_3O_4), 합금(FePt, CoPt) 또는 페라이트($MnFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$, $NiFe_2O_4$ 또는 $ZnFe_2O_4$)등의 자성물질을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 또 다른 예로서 산화 철을 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 자성나노입자는 줄기세포에 표지되어, MACS 분리법으로 줄기세포로부터 유래된 세포를 분리하는 매개체로서 사용될 수 있는데, 상기 자성나노입자의 크기는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 1 내지 200 nm의 직경을 갖을 수 있고, 다른 예로서, 12 nm의 균일한 직경을 갖을 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어 "줄기세포"란, 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 분화능에 따라 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multpotent stem cells)로 분류할 수 있고, 줄기세포의 유래조직에 따라 성체줄기세포, 배아줄기세포 및 역분화줄기세포로 분류할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 자성나노입자로 표지된 후, 숙주의 생체내에 이식되어 생착될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 골수, 지방조직, 치아, 치아조직, 혈액, 제대혈, 간장, 피부, 위장관, 태반, 자궁, 태아로부터 유래한 줄기세포일 수 있고, 다른 예로서 성체 줄기세포일 수 있으며, 또 다른 예로서 인간유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어 "숙주(host)"란, 상기 자성나노입자가 표지된 줄기세포가 이식되는 대상 개체를 의미하는데, 줄기세포로부터 분화된 조직을 포함하고, 상기 줄기세포가 이식되어 생착될 수 있는 조직을 포함하는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 조직의 분화가 수행되는 어류 이상의 고등동물이 될 수 있고, 다른 예로서, 줄기세포의 분리 및 이식이 용이하고, 분화된 줄기세포를 대량으로 수득할 수 있는 포유동물이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 또 다른 예로서, 인간을 포함하거나 또는 인간을 제외한 포유동물이 될 수 있다

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 숙주에 자성나노입자가 표지된 줄기세포를 이식하면, 이식된 줄기세포의 전체 또는 일부가 숙주의 이식된 조직에 생착한 후, 이식된 조직을 구성하는 세포와 유사한 세포로 분화될 수 있는데, 상기 분화된 세포는 여전히 자성나노입자가 표지된 상태를 유지하게 되므로, 상기 표지된 자성나노입자를 통해 상기 분화된 세포를 분리할 수 있다. 일 예로서, 상기 분화된 세포를 분리하는 방법으로는 줄기세포가 이식된 숙주의 조직을 적출하고, 적출된 조직에 다양한 효소(콜라게나아제, 트립신 등)를 처리하여 상기 조직을 단일세포로 분리한 다음, 분리된 단일세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여, 자성나노입자로 표지된 세포를 1차 선별한 다음, 1차 선별된 세포를 대상으로 FACS 분리법을 수행하여 상기 자성나노입자로 표지된 세포 중에서 살아있는 세포를 2차 분리함으로써, 최종적으로 줄기세포가 이식된 숙주에서 상기 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포를 분리할 수 있다. 이때, 줄기세포가 이식된 조직을 적출하는 시간은 이식된 조직과 줄기세포의 종류에 따라 달라지며, 이는 당업자가 목적에 따라 설정할 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어 "MACS(magnetic activated cell sorting) 분리법"이란, 상기 자성나노입자로 표지된 세포를 포함하는 세포군집을 대상으로 자성을 가하여 자성나노입자로 표지된 세포를 분리하는 방법을 의미한다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 MACS 분리법은 숙주에 이식된 줄기세포 중에서, 숙주에 생착되어 분화된 세포를 분리하는 방법에 사용되는데, 상기 MACS 분리법을 단독으로 사용할 경우, 상기 자성나노입자를 포함하기만 하면, 살아있는 세포와 죽은세포 또는 세포잔류물을 구별하지 않고 모두 분리한다는 단점이 있다.

[0027] 상기 MACS를 수행하기 위한 대상이 되는 자성나노입자로 표지된 분리된 줄기세포를 이식한 숙주로부터 수득한 분리된 단일세포를 수득하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 줄기세포가 숙주에 이식된 조직을 숙주

로부터 적출한 다음, 상기 적출된 조직을 단일세포로 분해하는 방법을 사용할 수 있다.

[0028] 상기 조직을 단일세포로 분해하는 방법은 조직을 구성하는 세포간의 결합을 분해할 수 있는 한 당업계에 공지된 방법을 제한없이 사용할 수 있는데, 일 예로서, 단백질 분해효소를 처리하는 방법을 사용할 수 있고, 다른 예로서, 단백질 분해효소 중에서도 세포간의 결합을 분해하는데 사용될 수 있는 콜라게나아제, 트립신 등을 사용하는 방법을 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "FACS(Fluorescence activated cell sorter) 분리법"이란, 살아있는 단일세포를 각각 분석하여 목적하는 세포를 선별한 후, 분리하는 방법을 의미한다. 대체로, 배양되거나 생체에서 수득한 조직을 분해하여 단일세포를 수득하고, 상기 수득한 단일세포에 포함된 표적항원을 형광표지한 후, 이들 형광표지된 단일세포를 흘려주면서, 각 세포에서 발현되는 형광을 분석하여, 형광표지여부에 따라 세포를 분리한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 FACS 분리법은 숙주에 이식된 줄기세포 중에서, 숙주에 생착되어 분화된 세포를 분리하는 방법에 사용되는데, 상기 FACS 분리법을 단독으로 사용할 경우, 비특이적인 형광표지로 인하여, 줄기세포로부터 유래된 세포 뿐만 아니라, 숙주 자체의 세포도 함께 분리한다는 단점이 있다.

[0031] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 줄기세포가 이식된 숙주에서 상기 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포를 분리하는 방법을 수행할 경우, MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행하게 되는데, 이처럼 MACS 분리법과 FACS 분리법을 수행하는 순서는 매우 중요하다. 즉, MACS 분리법을 사용하면 자성나노입자를 포함하는 세포를 모두 분리할 수 있는데, 이처럼 분리된 세포에는 순수하게 자성나노입자로 표지된 줄기세포로부터 분화된 세포 뿐만 아니라, 상기 자성나노입자로 표지된 줄기세포 중에서 생착하지 못하고 죽은세포, 상기 죽은세포로부터 분리된 세포 잔류물 등도 함께 포함한다.

[0032] 이처럼 MACS 분리법으로 분리된 단일세포를 대상으로 FACS 분리법을 추가로 수행하면, 상기 자성나노입자를 포함하는 단일세포 중에서 살아있는 단일세포만을 추가로 분리하게 되므로, 결과적으로는 상기 숙주에 이식된 자성나노입자로 표지된 줄기세포로부터 분화된 세포만을 분리할 수 있다.

[0033] 예를 들어, 자성나노 입자로 표지된 인간유래의 줄기세포를 모델 백서에 이식하고, 상기 모델 백서에 생착되어 분화된 세포를 분리하기 위하여는, MACS 분리법으로 자성나노입자를 포함하는 세포를 1차로 분리하고, 1차 분리된 세포 중에서 인간유래 줄기세포 특이적인 항원을 이용한 FACS 분리법을 추가로 수행하여, 상기 모델 백서에 이식된 인간유래 줄기세포 중에서 체내에 생착되어 분화된 세포를 분리할 수 있다.

[0034] 만일, 본 발명에서 제공하는 방법과는 달리, FACS 분리법과 MACS 분리법을 순차적으로 수행한다면, FACS 분리법을 통해 숙주에 생착 및 분화되어 생존하는 줄기세포로부터 유래된 세포의 일부만을 선별한 후, 선별된 세포 중에서 자성나노입자를 포함하는 세포를 분리하게 되므로, 최종적인 분리효율의 측면에서 매우 낮은 수준을 나타낼 수 밖에 없다. 실제로, 본 발명의 실시예 1에서는 폐기종 모델 마우스에 생착된 인간유래 줄기세포를 대상으로 한 FACS 분리법의 효율을 분석한 실험결과가 개시되어 있는데, 줄기세포를 이식하지 않은 모델 마우스의 폐조직에서도 FACS 분리법을 통해 양성신호가 나타나는 세포가 분리됨을 확인하였다. 이처럼, FACS 분리법을 먼저 수행할 경우, 분리된 세포의 신뢰성이 매우 낮기 때문에, 이후에 MACS 분리법을 수행한다 하여도 목적하는 세포를 확인할 수는 없다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 폐기종 모델 마우스의 폐조직에 인간유래 줄기세포를 이식하고, 이식된 폐조직내에서 수득한 세포를 대상으로 FACS 분리법을 수행한 결과, 상기 줄기세포를 주사하지 않은 폐기종 모델 마우스의 폐조직에서도 형광신호가 검출되었고(도 1), 방광통증 증후군 모델 백서의 방광에 인간유래 줄기세포를 이식하고, 이식된 방광조직내에서 수득한 세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행한 결과, 분리된 세포에서는 모두 인간의 GAPDH가 발현되었으나(도 2a), 동시에 방광통증 증후군 모델 백서로부터 유래된 B2MG도 발현되었고(도 2b), 인간유래 줄기세포를 이식한 후, 다양한 기간이 경과된 후에도 유사한 결과를 얻을 수 있었다(도 2c). 그러나, 방광통증 증후군 모델 백서의 방광에 인간유래 줄기세포를 이식하고, 이식된 방광조직내에서 수득한 세포를 대상으로 MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행한 결과, MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포의 일부 세포에서만 mVenus 유래 형광발색이 확인되었고(도 3a), 상기 1차 분리된 세포를 대상으로 FACS 분리법을 수행한 경우, 모델 백서로부터 유래된 B2MG가 발현되지 않음을 확인하였다(도 3b).

[0036] 한편, 본 발명에서 제공하는 숙주에 이식된 줄기세포의 분화여부를 확인하는 방법의 유효성을 검증하기 위하여, 방광통증 증후군(Interstitial cystisis, IC) 동물모델의 방광에 줄기세포를 주입한 후, 본 발명에서 제공하는 방법을 이용하여 생착되기 이전의 세포와 생착된 이후의 세포를 각각 분리하고, 분리된 각 세포의 특성을 단일세포 발현체 분석법으로 분석한 결과, 생착 이전 세포와 생착 이후 세포는 발현체 간에 완전히 상이한 유전자

발현 패턴을 보이는 것을 확인하였으며(도 4a), 생착된 이후의 단일세포는 크게 3가지 패턴의 유전자 발현 형태(패턴I : Engraft_#4, 패턴II: Engraft_#1,2, 패턴III : Engraft_#3,5,6,7)를 보임을 확인하였다(도 4b).

[0037] 또한, 상기 생착 이전 세포와 생착 이후 세포를 대상으로 분류 분석을 수행한 결과, 대부분의 유전자 세트들은 생착된 세포에서 그 발현이 감소됨을 확인하였고, 생착 후 단일세포 발현체에서 높게 발현되는 유전자 세트 중에서 FDR 0.25 미만의 유전자 세트는 오직 4개만이 확인되었다(도 5). 상기 확인된 4개 유전자 세트를 대상으로 유효성을 분석한 결과, 각 유전자 세트별로 유효성 수준에 차이를 나타내기는 하였으나, 모두 유효성을 나타내었으므로, 상기 4개 유전자 세트는 모두 생착된 세포에서 발현이 증가됨을 알 수 있었다(도 6a 내지 6d).

[0038] 아울러, 본 발명에서 제공하는 방법으로 분리된 세포의 유전적인 특성을 분석하여, 상기 분리된 세포가 생착후 분화된 세포인지의 여부를 검증하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 단일세포 분석법을 사용할 수 있다.

[0039] 예를 들어, 상기 (b) 단계에서 수득한 살아있는 세포를 대상으로 총 RNA를 추출하고, 상기 총 RNA를 역전사시켜서 cDNA를 수득한 후, 이를 증폭하여 목적하는 유전자가 발현되었는지(정성분석) 또는 유전자의 발현수준이 어느 정도 인지(정량분석)를 분석하는 단일세포 분석법을 수행하는 단계(c)를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 상기 추가된 (c) 단계를 통하여, 상기 (b) 단계에서 분리된 자성나노입자를 포함하면서도 살아있는 단일세포의 유전적인 특성을 분석함으로써, 상기 분리된 단일세포가 숙주에 이식된 줄기세포로부터 분화된 것인지의 여부를 확인할 수 있다. 예를 들어, 백서에 사람의 줄기세포를 이식하고, 상기 (a) 및 (b) 단계를 수행하여 자성나노입자를 포함하면서도 살아있는 단일세포를 수득한 경우, 상기 단일세포로부터 백서로부터 유래된 B2MG가 발현되지 않으면, 상기 단일세포가 백서에 이식된 사람의 줄기세포로부터 분화된 것이라 확인할 수 있다.

[0041] 상기 단일세포 분석법은 상기 줄기세포의 이식목적에 따라, 다양하게 활용될 수 있다. 예를 들어, 감염성 질환에 의해 손상된 조직을 치료 및 복구하기 위한 세포 치료제로서 사람의 줄기세포를 이식하는 경우, 상기 세포치료제로서 VEGF, IL-10 등의 사이토카인을 생성하도록 형질전환된 사람의 줄기세포를 개발하는 단계에서 상기 줄기세포의 효능을 평가하는 방법으로서 상기 단일세포 분석법을 사용할 수 있다. 즉, 상기 형질전환된 사람의 줄기세포를 백서에 이식하고, 이식 후 생착된 단일세포를 본 발명의 방법으로 분리하며, 분리된 단일세포에서 VEGF, IL-10 등의 사이토카인을 코딩하는 유전자가 발현되는지의 여부를 단일세포 분석법으로 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에서 제공하는 방법을 사용하면, 줄기세포가 이식된 숙주에서 상기 이식된 줄기세포로부터 유래된 세포를 높은 회수율로 수득할 수 있을 뿐만 아니라, 숙주로부터 유래된 세포의 오염을 최소화할 수 있으므로, 생체 내에서 줄기세포의 작용 및 효과를 분석하는 연구에 크게 이바지할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 tdTomato를 발현하는 hAD-MSC를 주사하거나 또는 주사하지 않은 폐기종 모델 마우스의 폐조직을 대상으로 FACS 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 hAD-MSC를 도입한 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포가 상기 hAD-MSC로부터 유래된 것인지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 2b는 hAD-MSC를 도입한 1일이 경과된 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포에 상기 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있는지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 도표이다.

도 2c는 hAD-MSC를 도입하고 3일, 5일 또는 7일이 경과된 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포에 상기 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있는지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 도표로서, 시료번호 D3_1 내지 D3_8은 hAD-MSC를 도입하고 3일이 경과된 모델 백서의 방광세포시료를 나타내고, D5_5는 hAD-MSC를 도입하고 5일이 경과된 모델 백서의 방광세포시료를 나타내며, D7_6은 hAD-MSC를 도입하고 7일이 경과된 모델 백서의 방광세포시료를 나타낸다.

도 3a는 mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC를 주사한 방광통증 증후군 모델 백서의 방광조직유래 세포로부터 MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포를 대상으로 mVenus 유래 형광발색 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC를 도입하고 3일이 경과된 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포와 상기 1차 분리된 세포를 대상으로 FACS 분리법을 수행하여 2차 분리된 세포에 상기 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있는지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 도표로서, 시료번호 MACS_#2 내지 MACS_#10은 1차 분리된 세포시료를 나타내고, MACS_FACS#1 및 MACS_FACS#2는 2차 분리된 세포시료를 나타낸다.

도 4a는 전사체 분석결과를 나타내는 히트맵(heatmap) 분석결과이다.

도 4b는 생착 전(Pre)과 생착 후(Engraft) 단일세포 발현체를 유전자 발현 특성을 PCA 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 생착 전(Pre)과 생착 후(Engraft) 단일세포 발현체를 대상으로 분류 분석을 수행한 결과를 나타낸다.

도 6a는 세포 생착 관련 유전자(ANKYRINS) 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타낸다.

도 6b는 LSD1(Lysine-specific histone demethylase 1) 타겟 유전자 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타낸다.

도 6c는 기저세포암(Basal cell carcinoma) 타겟 유전자 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타낸다.

도 6d는 수상돌기(Dendrite) 형성 관련 유전자 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1: 폐기종 모델 마우스에 생착된 인간유래 줄기세포를 대상으로 한 FACS 분리법의 효율분석**

[0046] 먼저, 인간의 지방조직 유래 중간엽 줄기세포(hAD-MSC)는 invitrogen 사에서 상업적으로 판매중인 줄기세포(StemPro Human Adiposed-Derived Stem Cells, #R7788-115)를 사용하였다. 상기 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 2mM L-글루타민, 20mM HEPES (pH7.3), MEM 비필수아미노산 용액, 페니실린/스트렙토마이신, 1㎍/㎖ 아스코르빈산, 2% FBS, 5ng/mL hEGF, 10ng/mL bFGF 및 50㎍/㎖ Long R3-인슐린 유사 성장인자-1을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 상기 배양된 hAD-MSC에 형광단백질인 tdTomato를 코딩하는 유전자를 포함하는 렌티바이러스를 감염시키고, 감염된 세포에서 발색되는 형광수준을 비교하여, tdTomato를 발현하는 hAD-MSC를 제작하였다.

[0047] 다음으로, C57BL/6 마우스의 기관(trachea)에 돼지의 췌장유래 엘라스타제를 직접 주사하여 폐기종 모델 마우스를 제작하였다. 상기 폐기종 모델 마우스를 7일 동안 사육한 다음, 상기 제작된 tdTomato를 발현하는 hAD-MSC(2.5×10^5개)를 정맥주사하였다. 3일이 경과된 후, 마우스로부터 폐조직을 적출하고, 적출된 폐조직을 저삼투성 염화암모늄 용액으로 세척하여 적혈구를 제거하였다. 그런 다음, 상기 조직에 트립신을 처리한 후, 이를 70 μM strainer에 여과하여 단일세포를 분리하였다. 분리된 단일세포를 FACS 완충액(2% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, MEM nonessential amino-acid 및 페니실린/스트렙토마이신 용액을 포함하는 DMEM-고농도 글루코스 배지)에 현탁시켰다. 현탁된 세포를 human HLA-A,B,C에 대한 APC/Cy7 형광표지된 단클론항체를 사용하여 염색한 후, 죽은세포와 살아있는 세포를 구별하기 위하여 1 ㎍/㎖ 7-AAD(7-aminoactinomycin)를 가하였다. 이어, BD FACSARIA III sorter를 이용하여 FACS 분리법을 사용하여, 상기 정맥주사된 MSCs로부터 유래되어 모델 마우스의 폐에 생착된 세포를 분리하였다(도 1).

[0048] 도 1은 tdTomato를 발현하는 hAD-MSC를 주사하거나 또는 주사하지 않은 폐기종 모델 마우스의 폐조직을 대상으로 FACS 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1에서 보듯이, hAD-MSC를 주사하지 않은 모델 마우스의 폐조직 세포에서도 형광신호가 검출됨을 확인하였다.

[0049] 또한, 상기 FACS로 분리된 16개의 세포를 이용하여 단일세포 발현체 라이브러리를 제작하고, 상기 라이브러리를 분석하여 인간 지방조직 유래줄기세포로부터 유래된 발현체의 비율을 분석하였다. 대략적으로, 상기 FACS로 분리된 세포를 96웰 플레이트에 웰당 20개씩 분주하여 총 16개의 실험군을 수득하고, 상기 각 실험군의 세포를 파쇄한 후, 파쇄된 세포에 존재하는 총 RNA를 이용한 역전사를 수행하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 증폭시켜서, 각각의 단일세포 발현체 라이브러리를 제작하였다. 상기 제작된 각각의 단일세포 발현체 라이브러리를 대상으로, 인간 지방조직 유래줄기세포(hAD-MSC)에 의해 유래된 인간의 GAPDH 유전자의 발현비율을 분석하였다. 그 결과, 16개의 라이브러리 중에서 2개의 라이브러리에서만 인간의 GAPDH 유전자가 발현됨을 확인하였고, 나머지 대부분의 라이브러리에서는 마우스의 GAPDH 유전자가 발현됨을 확인하였다. 이같은 결과는, 상기 FACS 분리

법을 수행하기 위한 면역염색 과정 중에서 비특이적인 면역염색에 의하여 목적하는 세포의 분리효율이 저하되었기 때문인 것으로 분석되었다.

[0050] 따라서, FACS 분리법으로는 마우스에 생착된 줄기세포로부터 유래된 세포를 효율적으로 분리할 수 없음을 알 수 있었다.

[0051] **실시예 2: 방광통증 증후군(Interstitial cystisis, IC) 모델 백서에 생착된 인간유래 줄기세포를 대상으로 한 MACS 분리법의 효율분석**

[0052] 상기 실시예 1의 결과로부터, FACS 분리법으로는 마우스에 생착된 줄기세포로부터 유래된 세포를 효율적으로 분리할 수 없음을 확인하였으므로, FACS 분리법과 비교하여 비교적 간단하며 살아 있는 세포에 대한 특이성이 우수하다고 알려진 MACS(magnetic activated cell sorting) 분리법을 이용하여 생체내에 생착된 줄기세포로부터 유래된 세포를 효율적으로 분리할 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0053] 먼저, 상기 실시예 1에서 사용된 hAD-MSC에 5 ㎍/㎖ protamine sulfate를 이용하여 2.4 X 10^6 hAD-MSC를 500 ㎍/㎖ Resovist(magnetic nanoparticle 계열 자가공명영상 조영제)로 14시간 동안 표지하였다. 그런 다음, 상기 hAD-MSC에 자성을 가하여, Resovist로 표지된 hAD-MSC를 제작하였다.

[0054] 한편, 20마리의 10주령 자성 SD 랫트의 방광에 26-게이지 앤지오카테터를 이용하여 요도를 통해 0.1 M HCl를 10분 동안 주입한 다음, 중화시키고, 생리식염수로 세척하여 방광통증 증후군 모델 백서를 제작하였다. 상기 제작된 모델 백서를 1주일 간 사육한 다음, 복부를 절개하여 500 ㎛ 주사기와 26-게이지 니들을 사용하여 방광의 앞쪽 벽과 돔부분의 점막하부층에 상기 제작된 Resovist로 표지된 hAD-MSC(1 X 10^6)를 주사하였다. hAD-MSC를 주사하고 1일 후에, 상기 모델 백서로부터 방광조직을 적출하고, 적출된 방광조직을 저삼투성 염화암모늄 용액으로 세척하여 적혈구를 제거하였다. 그런 다음, 상기 방광조직에 트립신을 처리한 후, 이를 70 ㎛ strainer에 여과하여 단일세포를 분리하였다. 분리된 단일세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 상기 주사된 hAD-MSC로부터 유래된 이식세포를 분리하였다.

[0055] 상기 분리된 세포를 96웰 플레이트에 웰당 20개씩 분주한 다음, 상기 실시예 1의 방법을 이용하여 이들 분주된 세포로부터 단일세포 발현체 라이브러리를 제작하고, 상기 라이브러리에서 발현되는 유전체인 인간의 GAPDH의 발현여부를 분석하여, 상기 분리된 세포가 hAD-MSC로부터 유래된 것인지를 확인하였다(도 2a).

[0056] 도 2a는 hAD-MSC를 도입한 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포가 상기 hAD-MSC로부터 유래된 것인지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 2a에서 보듯이, 상기 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포는 모두 인간의 GAPDH를 발현할 수 있음을 확인하였다.

[0057] 따라서, MACS 분리법을 이용할 경우, 방광통증 증후군 모델 백서에 생착된 줄기세포로부터 유래된 세포를 효과적으로 분리할 수 있음을 확인하였다.

[0058] 한편, 상기 MACS 분리법을 이용하여 분리된 세포에 hAD-MSC로부터 유래된 세포가 아닌 방광통증 증후군 모델 백서 자체로부터 유래된 세포가 포함되어 있는지를 확인하고자, 상기 제작된 단일세포 발현체 라이브러리를 대상으로 방광통증 증후군 모델 백서로부터 유래된 B2MG(beta 2 microglobin)의 발현여부를 분석하였다(도 2b).

[0059] 도 2b는 hAD-MSC를 도입한 1일이 경과된 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포에 상기 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있는지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 도표이다. 도 2b에서 보듯이, 상기 hAD-MSC를 도입한 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포에서는 방광통증 증후군 모델 백서로부터 유래된 B2MG가 발현됨을 확인하였다.

[0060] 이처럼, 방광통증 증후군 모델 백서에 hAD-MSC를 주사하고 1일이 경과된 후 얻어진 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포에 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있음을 확인하였으므로, 상기 hAD-MSC를 주사하고 3일, 5일 또는 7일이 경과된 후 얻어진 방광세포를 대상으로 상기와 동일한 실험을 수행하였다(도 2c).

[0061] 도 2c는 hAD-MSC를 도입하고 3일, 5일 또는 7일이 경과된 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 얻어진 세포에 상기 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있는지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 도표로서, 시료번호 D3_1 내지 D3_8은 hAD-MSC를 도입하고 3일이 경과

된 모델 백서의 방광세포시료를 나타내고, D5_5는 hAD-MSC를 도입하고 5일이 경과된 모델 백서의 방광세포시료를 나타내며, D7_6은 hAD-MSC를 도입하고 7일이 경과된 모델 백서의 방광세포시료를 나타낸다. 도 2c에서 보듯이, hAD-MSC를 도입한 3일, 5일 또는 7일이 경과된 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 세포를 분리한 경우에도, 모델 백서 자체의 세포가 포함됨을 확인하였다. 이처럼, MACS 분리법을 수행할 경우, 모델 백서에 생착된 hAD-MSC로부터 유래된 세포와 모델 백서 자체의 세포가 함께 분리되는 이유는 모델 백서에 생착되지 못하고 사멸된 hAD-MSC 세포의 잔류물을 포식한 모델 백서의 세포가 MACS 분리법으로 분리되었을 가능성이 있는 것으로 분석되었다.

[0062] 따라서, MACS 분리법을 수행할 경우, 모델 백서에 생착된 hAD-MSC로부터 유래된 세포를 효과적으로 분리할 수 있다는 점에서, FACS 분리법 보다는 분리효율이 상대적으로 우수하였으나, 모델 백서 자체의 세포를 배제하지 못한다는 점에서 낮은수준의 분리효율을 나타냄을 알 수 있었다.

[0063] **실시예 3: 방광통증 증후군 모델 백서에 생착된 인간유래 줄기세포를 대상으로 한 MACS-FACS 순차적 분리법의 효율분석**

[0064] 상기 실시예 2의 결과에서 보듯이, MACS 분리법을 수행할 경우 hAD-MSC로부터 유래된 세포와 모델 백서 자체의 세포가 함께 분리된다는 단점이 있고, 이러한 단점의 이유가 모델 백서에 생착된 hAD-MSC로부터 유래된 세포와, 모델 백서에 생착되지 못하고 사멸된 hAD-MSC 세포의 잔류물을 포식한 모델 백서의 세포를 구별할 수 없었기 때문인 것으로 분석되었다. 이같은 상기 MACS 분리법의 단점을 극복하기 위하여는, hAD-MSC로부터 유래된 살아있는 세포를 선별할 수 있는 별도의 단계가 필요할 것으로 예상되었는 바, 상기 별도의 단계로서 FACS 분리법을 사용할 수 있는지를 방광통증 증후군 모델 백서를 대상으로 확인하였다.

[0065] 먼저, 상기 실시예 1의 방법을 사용하여 형광 단백질인 mVenus를 발현하는 hAD-MSC를 제작한 다음, 상기 mVenus를 발현하는 hAD-MSC를 대상으로 실시예 2의 방법을 수행하여 Resovist를 표지하여, mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC를 제작하였다.

[0066] 다음으로, 방광통증 증후군 모델 백서를 제작하고, 상기 제작된 모델 백서를 1주일 간 사육한 다음, 복부를 절개하여 500 μm 주사기와 26-게이지 니들을 사용하여 방광의 앞쪽 벽과 돔부분의 점막하부층에 상기 제작된 mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC(1×10^6)를 주사하였다. 상기 mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC를 주사하고 3일 후에, 상기 모델 백서로부터 방광조직을 적출하고, 적출된 방광조직을 저삼투성 염화암모늄 용액으로 세척하여 적혈구를 제거하였다. 그런 다음, 상기 방광조직에 트립신을 처리한 후, 이를 70 μM strainer에 여과하여 단일세포를 분리하였다. 분리된 단일세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포를 수득한 다음, 상기 1차 분리된 세포를 대상으로 mVenus의 형광을 검출하였다(도 3a).

[0067] 도 3a는 mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC를 주사한 방광통증 증후군 모델 백서의 방광조직유래 세포로부터 MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포를 대상으로 mVenus 유래 형광발색 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a에서 보듯이, MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포의 일부 세포에서만 mVenus 유래 형광발색이 확인되었다.

[0068] 한편, 상기 수득한 1차 분리된 세포를 FACS 완충액에 현탁시키고, 현탁된 세포를 human HLA-A,B,C에 대한 APC/Cy7 형광표지된 단클론항체를 사용하여 염색한 후, 죽은세포와 살아있는 세포를 구별하기 위하여 1 ㎍/㎖ 7-AAD(7-aminoactinomycin)를 가하였다. 이어, BD FACSARIA III sorter를 이용하여 FACS 분리법을 수행하여, 상기 1차 분리된 세포 중에서 hAD-MSC로부터 유래되어 모델 백서의 방광에 생착된 세포를 분리하여 2차 분리된 세포를 수득하였다.

[0069] 이어, 상기 2차 분리된 세포를 96웰 플레이트에 웰당 20개씩 분주한 다음, 상기 실시예 1의 방법을 이용하여 이들 분주된 세포로부터 단일세포 발현체 라이브러리를 제작하고, 상기 라이브러리에서 발현되는 방광통증 증후군 모델 백서로부터 유래된 B2MG의 발현여부를 분석하였다(도 3b). 이때, 대조군으로는 1차 분리된 세포로부터 제작된 단일세포 발현체 라이브러리를 사용하였다.

[0070] 도 3b는 mVenus를 발현하면서도 Resovist로 표지된 hAD-MSC를 도입하고 3일이 경과된 방광통증 증후군 모델 백서의 방광세포를 대상으로 MACS 분리법을 수행하여 1차 분리된 세포와 상기 1차 분리된 세포를 대상으로 FACS 분리법을 수행하여 2차 분리된 세포에 상기 모델 백서 자체의 세포가 포함되어 있는지를, 단일세포 발현체 라이브러리를 통해 확인한 결과를 나타내는 도표로서, 시료번호 MACS_#2 내지 MACS_#10은 1차 분리된 세포시료를 나타내고, MACS_FACS#1 및 MACS_FACS#2는 2차 분리된 세포시료를 나타낸다. 도 3b에서 보듯이, MACS 분리법 만을 수행하여 1차 분리된 세포(MACS_#2 내지 MACS_#10)에서는 모델 백서 자체의 세포로부터 유래된 B2MG가 발현되었

으나, MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행하여 2차 분리된 세포(MACS_FACS#1 및 MACS_FACS#2)에서는 모델 백서 자체의 세포로부터 유래된 B2MG가 발현되지 않음을 확인하였다.

[0071] 상기 결과를 종합하면, 모델 동물에 인간유래 줄기세포를 이식하고, 상기 이식된 줄기세포가 모델 동물의 체내에 생착된 후, 이로부터 유래된 세포를 모델 동물로부터 효과적으로 분리하기 위하여는 MACS 분리법과 FACS 분리법을 순차적으로 수행함이 바람직함을 알 수 있었다.

[0072] **실시예 4: 유효성 검증**

[0073] **실시예 4-1: 줄기세포 배양**

[0074] 먼저, H9-hESC로부터 분화된 M-MSC를, 래트 꼬리 제1형 콜라겐(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 코팅된 플레이트상에서 EGM2-MV 배지(Lonza, San Diego, CA)에 접종한 후 배양하였다.

[0075] 또한, UC 유래의 MSC(UC-MSCs)를 저당 DMEM 배지(10% heat-inactivated FBS, 5 ng/㎖ hEGF, 10 ng/㎖ bFGF 및 50 mg/㎖ long-R3 IGF-1)에서 배양하였다

[0076] 상기 각 SC는 37℃에서 5% CO_2로 가습된 환경에서 배양하였다.

[0077] GFP 또는 CREB1 단백질을 안정하게 발현하는 M-MSC 세포주는 제조된 GFP 또는 CREB1를 발현하는 렌티 바이러스를 감염시켜서 제작하였다.

[0078] **실시예 4-2: 방광통증 증후군(Interstitial cystisis, IC) 동물모델의 제작**

[0079] IC를 유도하기 위해, 10 주령의 암컷 SD 랫트 20 마리의 방광에 26 게이지 혈관 내시경을 사용하여 요도를 통해 0.1M HCl를 10 분간 주입 한 후, 중화시키고 식염수로 세척 하였다.

[0080] 위약군(n = 15)의 경우 HCl 대신에 PBS를 주입하였다.

[0081] HCl 주입 후 1 주일이 경과된 시점에서, 상기 랫트의 복부를 절개하고 1 x 10^6개의 MSC를 500 ㎛ 주사기와 26 게이지 바늘을 사용하여 방광 앞쪽방벽의 점막하층과 방광 돔의 점막하층에 주사하였다.

[0082] MSC 주사 후 1 주일이 경과된 시점에서, 상기 랫트를 희생시키고 이식된 MSC를 방광조직에서 추출하였다.

[0083] **실시예 4-3: 단일 세포 라이브러리의 전사체 마이크로어레이 분석**

[0084] 간질성방광염 백서 모델에 줄기세포를 이식후 생착된 세포를 대상으로 상기 실시예 3에서 확인된 방법을 수행하여 단일세포 발현체를 제작하였으며, 이 중 생착 전 샘플 3개(Pre_#1~3)와 생착 후 분리한 단일세포 발현체 7개(Engraft_#1~7)의 전사체 분석을 실시하였다(도 4a 및 4b). 상기 전사체 분석은 마이크로어레이 분석을 통해 수행하였는데, 대략적으로, 공지된 방법에 따라, 바이오틴 표지된 aRNA를 포함하는 단일 세포 전사체 cDNA 라이브러리를 제작하고; 상기 바이오틴 표지된 aRNA를 단편화하고 GeneChip 3' 인간 게놈 u133 plus 2.0 어레이(Affymetrix)에 혼성화한 다음; PCA(principal component analysis)과 같은 모든 마이크로 어레이 데이터 처리 및 클러스터링 분석은 Macrogen Inc에 의뢰하여 분석결과를 수득하였다.

[0085] 도 4a는 전사체 분석결과를 나타내는 히트맵(heatmap) 분석결과이고, 도 4b는 생착 전(Pre)과 생착 후(Engraft) 단일세포 발현체를 유전자 발현 특성을 PCA 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0086] 도 4a 및 4b에서 보듯이, 생착 전(Pre)과 생착 후(Engraft) 단일세포 발현체 간에 완전히 상이한 유전자 발현 패턴을 보이는 것을 확인하였으며, 생착 후 단일세포는 크게 3가지 패턴의 유전자 발현 형태 (패턴I : Engraft_#4, 패턴II: Engraft_#1,2, 패턴III : Engraft_#3,5,6,7)를 보임을 확인하였다.

[0087] **실시예 4-4: 전사체 데이터베이스 분석**

[0088] 상기 실시예 4-3에서 수득한 단일세포 발현체를 대상으로 유전자 집합 농축 분석(GSEA, Broad Institute, Cambridge, MA) 마이크로 어레이 소프트웨어를 사용하여, 분류 분석 (classification)을 수행하였다(도 5).

[0089] 도 5는 생착 전(Pre)과 생착 후(Engraft) 단일세포 발현체를 대상으로 분류 분석을 수행한 결과를 나타낸다.

[0090] 도 5에서 보듯이, 생물학적 특성을 모두 포함하는 3674 유전자셋 중에 생착 전 단일세포 에서 높게 발현되는 유전자 셋이 1975개이며 False discovery rate (FDR) 0.25 미만 (gene set의 유효성 인정 값)의 유전자셋이 681개로 확인되었다. 특히, 빨간색 밑줄 표시의 유전자셋은 Cancer 관련 유전자셋으로서, 생착 후 단일세포 발현체에서 생착 전 단일세포 발현체에 비해 높게 발현됨을 확인하였는데, 이들 유전자 그룹 내에는 간질성방광염 타

겟 줄기세포 치료 효능 기전을 담당하는 WNT 유전자와 IGF와 EGF 성장 인자 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.

[0091] 그러나, 생착 후 단일세포 발현체에서 높게 발현되는 유전자 세트는 1699개 이며 이중 FDR 0.25 미만의 유전자 세트는 오직 4개만이 확인되었으므로, 대부분의 유전자 세트(geneset)들은 생착된 세포에서 그 발현이 감소되어 있음을 확인하였다.

[0092] 상기 생착 후 단일세포 발현체에서 높게 발현되는 것으로 확인된 4개 유전자 세트를 대상으로 NES(normalized enrichment score) 값을 측정하고, 이에 의하여 유효성을 분석하였다(도 6a 내지 6d).

[0093] 도 6a는 세포 생착 관련 유전자(ANKYRINS) 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타내고, 도 6b는 LSD1(Lysine-specific histone demethylase 1) 타겟 유전자 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타내며, 도 6c는 기저세포암(Basal cell carcinoma) 타겟 유전자 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타내고, 도 6d는 수상돌기(Dendrite) 형성 관련 유전자 세트의 유효성을 분석한 결과를 나타낸다.

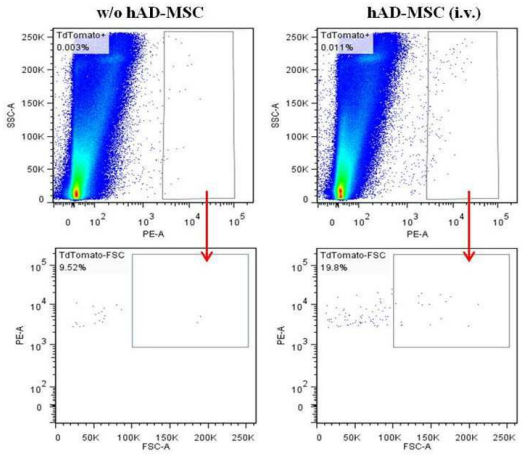
[0094] 도 6a 내지 6d에서 보듯이, 세포 생착 관련 유전자 세트는 상대적으로 가장 높은 유효성(FDR 0.048; NES -1.90)을 나타내었고; LSD1 타겟 유전자 세트는 두 번째로 높은 유효성(FDR 0.213; NES -1.77)을 나타내었으며; 기저세포암 타겟 유전자 세트는 세 번째로 높은 유효성(FDR 0.158; NES -1.76)을 나타내었고; 수상돌기 형성 관련 유전자 세트는 가장 낮은 유효성(FDR 0.178; NES -1.74)을 나타냄을 확인하였다.

[0095] 따라서, 상기 4개 유전자 세트는 생착된 세포에서 발현이 증가됨을 알 수 있었다.

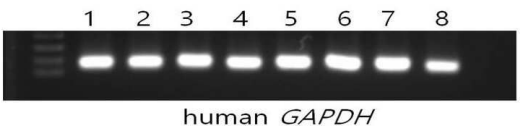
[0096] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

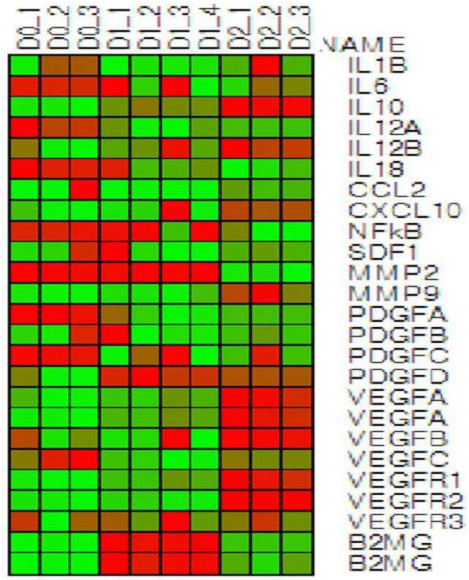
도면1



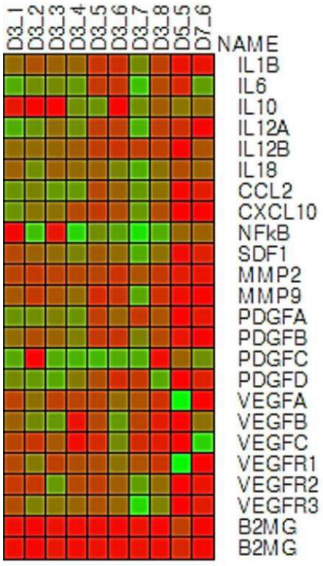
도면2a



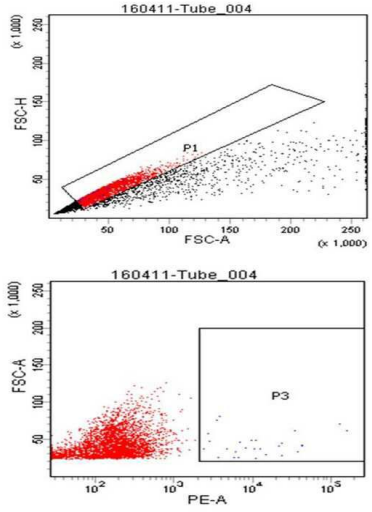
도면2b


D0_1
D0_2
D0_3
D1_1
D1_2
D1_3
D1_4
D2_1
D2_2
D2_3
NAME
IL1B
IL6
IL10
IL12A
IL12B
IL18
CCL2
CXCL10
NFkB
SDF1
MMP2
MMP9
PDGFA
PDGFB
PDGFC
PDGFD
VEGFA
VEGFB
VEGFC
VEGFR1
VEGFR2
VEGFR3
B2MG
B2MG

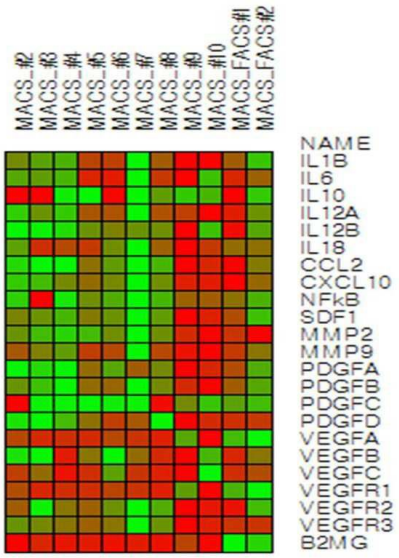
도면2c


D3_1
D3_2
D3_3
D3_4
D3_5
D3_6
D3_7
D3_8
D5_5
D7_6
NAME
IL1B
IL6
IL10
IL12A
IL12B
IL18
CCL2
CXCL10
NFkB
SDF1
MMP2
MMP9
PDGFA
PDGFB
PDGFC
PDGFD
VEGFA
VEGFB
VEGFC
VEGFR1
VEGFR2
VEGFR3
B2MG
B2MG

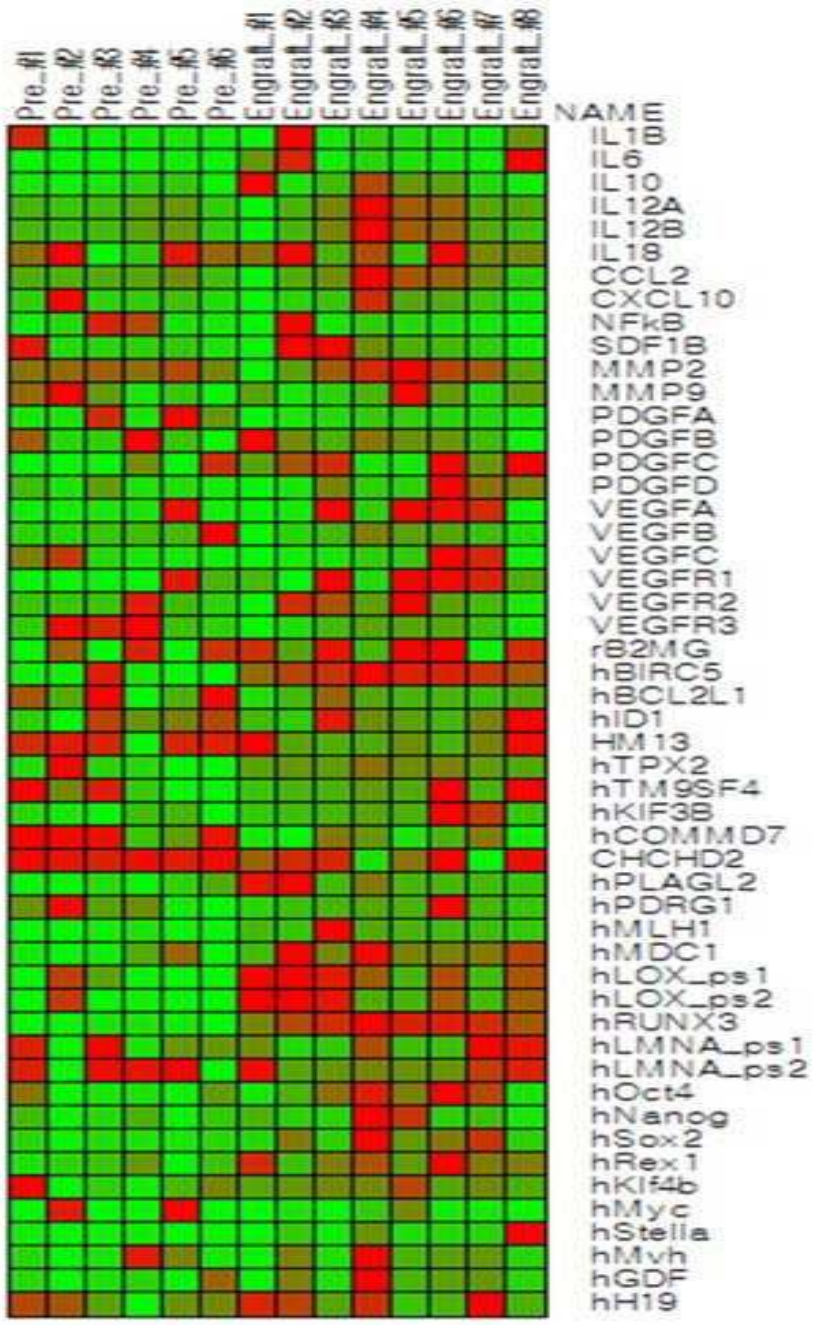
도면3a


160411-Tube_004
FSC-H
(x 1,000)
P1
FSC-A
(x 1,000)
160411-Tube_004
FSC-A
(x 1,000)
P3
PE-A

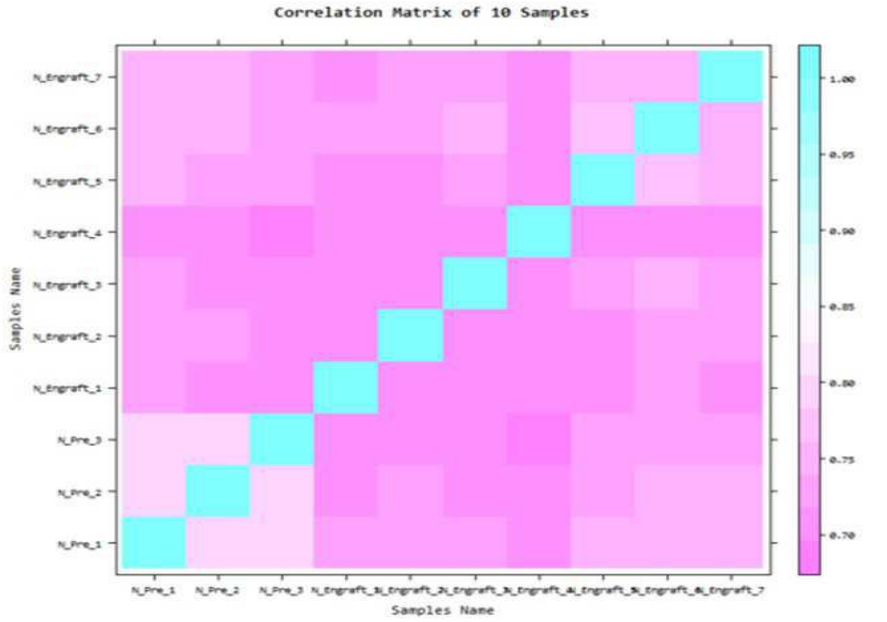
도면3b

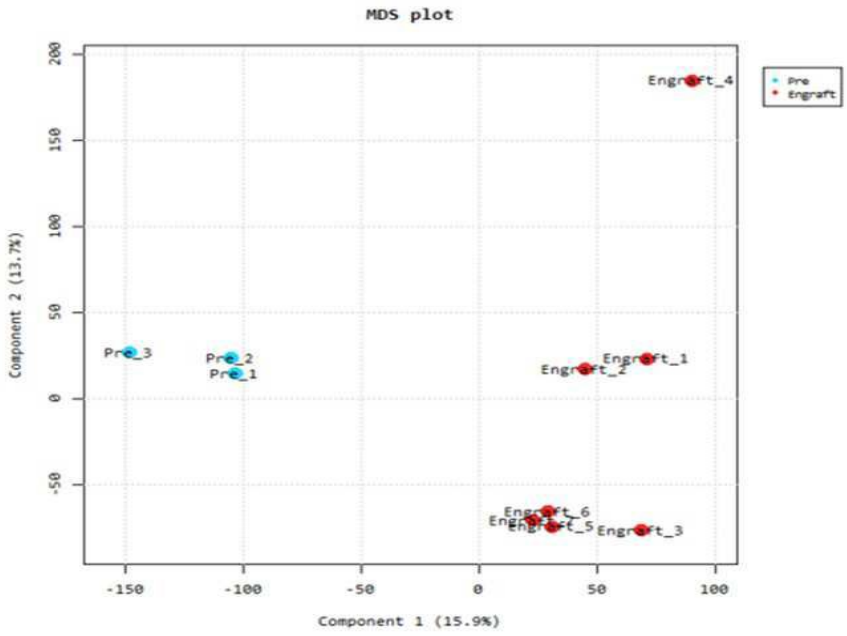

MACS_#2
MACS_#3
MACS_#4
MACS_#5
MACS_#6
MACS_#7
MACS_#8
MACS_#9
MACS_#10
MACS_FACS#1
MACS_FACS#2
NAME
IL1B
IL6
IL10
IL12A
IL12B
IL18
CCL2
CXCL10
NFkB
SDF1
MMP2
MMP9
PDGFA
PDGFB
PDGFC
PDGFD
VEGFA
VEGFB
VEGFC
VEGFR1
VEGFR2
VEGFR3
B2MG

도면4a


Pre_#1
Pre_#2
Pre_#3
Pre_#4
Pre_#5
Pre_#6
EngraL_#1
EngraL_#2
EngraL_#3
EngraL_#4
EngraL_#5
EngraL_#6
EngraL_#7
EngraL_#8
NAME
IL1B
IL6
IL10
IL12A
IL12B
IL18
CCL2
CXCL10
NFkB
SDF1B
MMP2
MMP9
PDGFA
PDGFB
PDGFC
PDGFD
VEGFA
VEGFB
VEGFC
VEGFR1
VEGFR2
VEGFR3
r82MG
hBIRC5
hBCL2L1
hID1
HM13
hTPX2
hTM9SF4
hKIF3B
hCOMMD7
CHCHD2
hPLAGL2
hPDRG1
hMLH1
hMDC1
hLOX_ps1
hLOX_ps2
hRUNX3
hLMNA_ps1
hLMNA_ps2
hOct4
hNanog
hSox2
hRex1
hKlf4b
hMyc
hStella
hMvh
hGDF
hH19

도면4b


Correlation Matrix of 10 Samples
Samples Name
Samples Name


MDS plot
Pre
Engraft
Component 2 (13.7%)
Component 1 (15.9%)

도면5

Enrichment in phenotype: Cultured (3 samples)

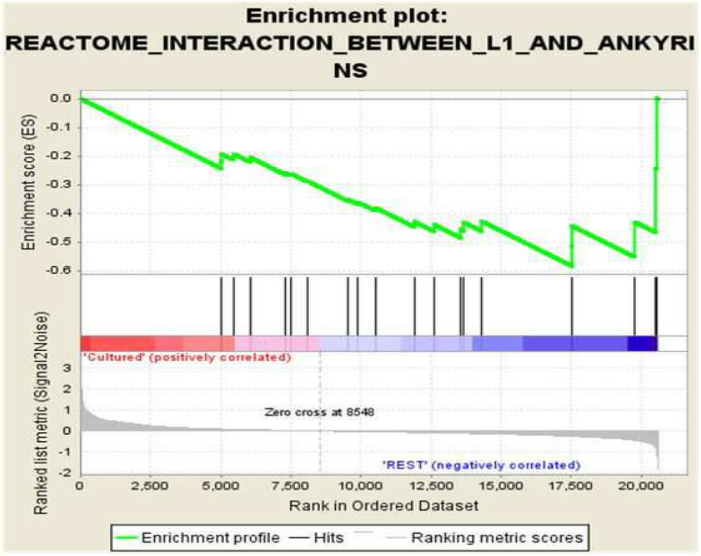
- 1975 / 3674 gene sets are upregulated in phenotype **Cultured**
- 681 gene sets are significant at FDR < 25%
- 431 gene sets are significantly enriched at nominal pvalue < 1%
- 655 gene sets are significantly enriched at nominal pvalue < 5%
- Snapshot of enrichment results
- Detailed enrichment results in html format
- Detailed enrichment results in excel format (tab delimited text)
- Guide to interpret results

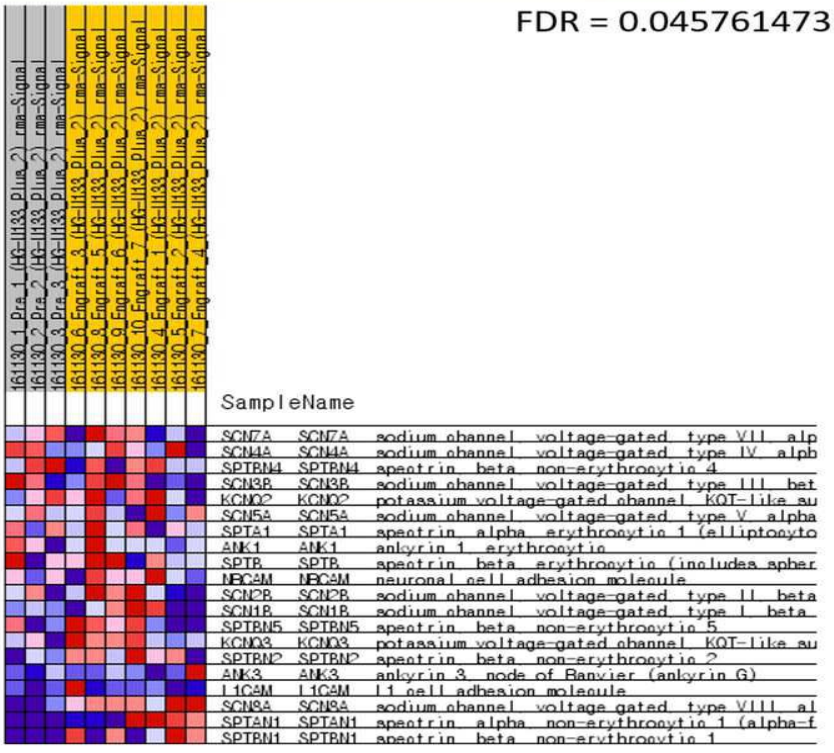
Enrichment in phenotype: REST (7 samples)

- 1699 / 3674 gene sets are upregulated in phenotype **REST**
- 4 gene sets are significantly enriched at FDR < 25%
- 34 gene sets are significantly enriched at nominal pvalue < 1%
- 127 gene sets are significantly enriched at nominal pvalue < 5%
- Snapshot of enrichment results
- Detailed enrichment results in html format
- Detailed enrichment results in excel format (tab delimited text)
- Guide to interpret results

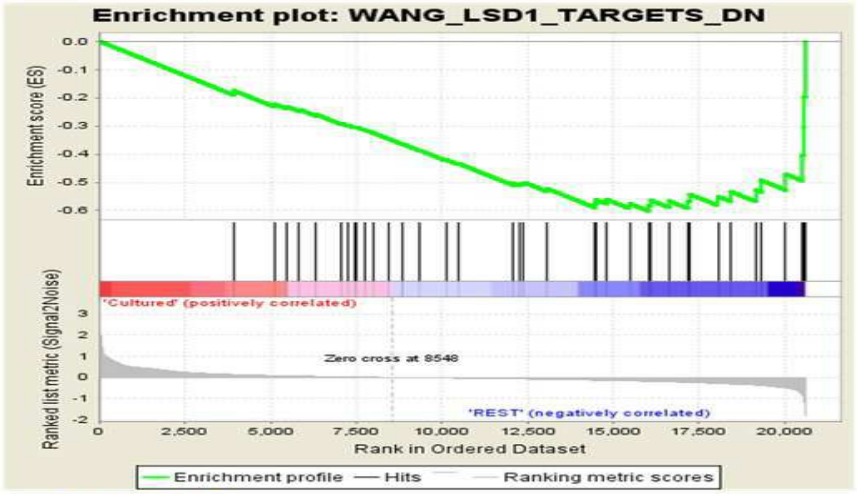
	NAME	GS f	GS DETAIL	SIZE	ES	NES	NOM p-va	FDR q-val	FWER p-va	RANK AT	LEA
2	REACTOME_INTERACTION_BETWEEN_L1_AND_ANKYRINS	REACTOM	Details ...	20	-0.58465	-1.89923	0	0.045761	0.042	3066	tag
3	WANG_LSD1_TARGETS_DN	WANG_LS	Details ...	39	-0.60149	-1.76764	0	0.212958	0.332	4583	tag
4	KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	KEGG_BA	Details ...	53	-0.56539	-1.76304	0	0.157941	0.352	3315	tag
5	LEIN_LOCALIZED_TO_DISTAL_AND_PROXIMAL_DENDRITES	LEIN_LOC	Details ...	15	-0.70181	-1.74523	0	0.177812	0.454	2475	tag
6	AMIT_EGF_RESPONSE_40_MCF10A	AMIT_EGF	Details ...	18	-0.7078	-1.68879	0	0.322142	0.777	684	tag
7	REACTOME_NCAM1_INTERACTIONS	REACTOM	Details ...	37	-0.64814	-1.67969	0	0.307075	0.795	3597	tag
8	MISHRA_CARCINOMA_ASSOCIATED_FIBROBLAST_UP	MISHRA_C	Details ...	23	-0.60769	-1.65905	0.008457	0.361966	0.891	1764	tag
9	REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	REACTOM	Details ...	83	-0.52233	-1.65137	0.039256	0.346485	0.899	1458	tag
10	REACTOME_NCAM_SIGNALING_FOR_NEURITE_OUT_GROWTH	REACTOM	Details ...	61	-0.54512	-1.63721	0	0.381035	0.921	3774	tag
11	REACTOME_TERMINATION_OF_O_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	REACTOM	Details ...	18	-0.4705	-1.63585	0	0.347414	0.921	7787	tag
12	ASGHARZADEH_NEUROBLASTOMA_POOR_SURVIVAL_DN	ASGHARZ	Details ...	38	-0.5416	-1.6177	0	0.406466	0.984	6278	tag
13	KEGG_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	KEGG_NO	Details ...	41	-0.57049	-1.58305	0	0.581904	1	2516	tag
14	SHIPP_DLBCL_CURED_VS_FATAL_UP	SHIPP_DL	Details ...	38	-0.49578	-1.57958	0.034623	0.558976	1	4235	tag
15	KANG_AR_TARGETS_UP	KANG_AR	Details ...	17	-0.6545	-1.57894	0.063655	0.523228	1	846	tag
16	WEST_ADRENOCORTICAL_TUMOR_MARKERS_DN	WEST_ADI	Details ...	19	-0.56176	-1.57241	0	0.5274	1	1759	tag
17	CLASPER_LYMPHATIC_VESSELS_DURING_METASTASIS_DN	CLASPER_	Details ...	33	-0.56711	-1.57014	0	0.511006	1	2729	tag
18	REACTOME_COLLAGEN_FORMATION	REACTOM	Details ...	56	-0.57654	-1.56595	0.039175	0.504435	1	3086	tag
19	PID_TCR_CALCIUM_PATHWAY	PID_TCR_(	Details ...	26	-0.54945	-1.56572	0.060852	0.478419	1	619	tag
20	THEODOROU_MAMMARY_TUMORIGENESIS	THEODOR	Details ...	29	-0.4989	-1.55821	0.012281	0.492002	1	4057	tag

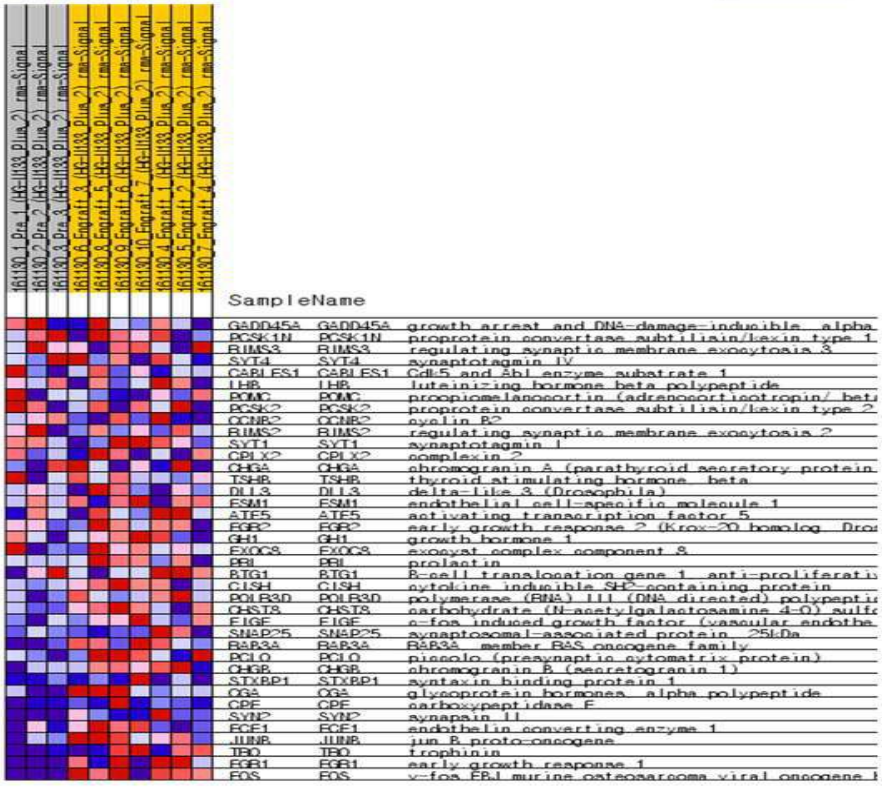
도면6a


Enrichment plot:
REACTOME_INTERACTION_BETWEEN_L1_AND_ANKYRINS
Enrichment score (ES)
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
Ranked list metric (Signal2Noise)
'Cultured' (positively correlated)
3
2
1
0
-1
-2
Zero cross at 8548
'REST' (negatively correlated)
0
2,500
5,000
7,500
10,000
12,500
15,000
17,500
20,000
Rank in Ordered Dataset
Enrichment profile
Hits
Ranking metric scores

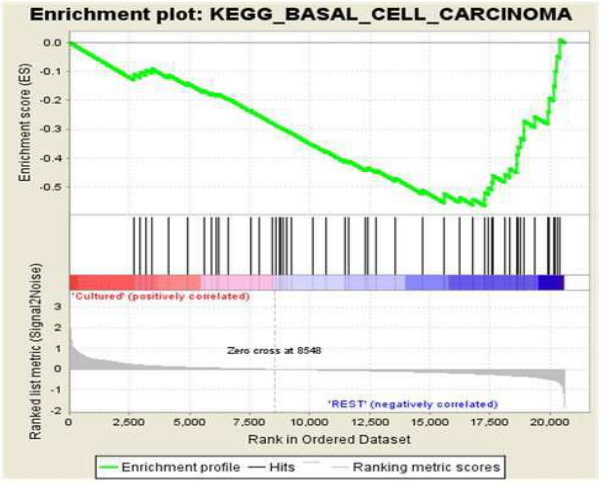

FDR = 0.045761473
SampleName
SCN7A SCN7A sodium channel, voltage-gated, type VII, alp
SCN4A SCN4A sodium channel, voltage-gated, type IV, alph
SPTBN4 SPTBN4 spectrin, beta, non-erythrocytic 4
SCN3B SCN3B sodium channel, voltage-gated, type III, bet
KCNQ2 KCNQ2 potassium voltage-gated channel, KQT-like su
SCN5A SCN5A sodium channel, voltage-gated, type V, alpha
SPTA1 SPTA1 spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocyto
ANK1 ANK1 ankyrin 1, erythrocytic
SPTB SPTB spectrin, beta, erythrocytic (includes spher
NRCAM NRCAM neuronal cell adhesion molecule
SCN2B SCN2B sodium channel, voltage-gated, type II, beta
SCN1B SCN1B sodium channel, voltage-gated, type I, beta
SPTBN5 SPTBN5 spectrin, beta, non-erythrocytic 5
KCNQ3 KCNQ3 potassium voltage-gated channel, KQT-like su
SPTBN2 SPTBN2 spectrin, beta, non-erythrocytic 2
ANK3 ANK3 ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
L1CAM L1CAM L1 cell adhesion molecule
SCN8A SCN8A sodium channel, voltage-gated, type VIII, al
SPTAN1 SPTAN1 spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-f
SPTBN1 SPTBN1 spectrin, beta, non-erythrocytic 1

도면6b

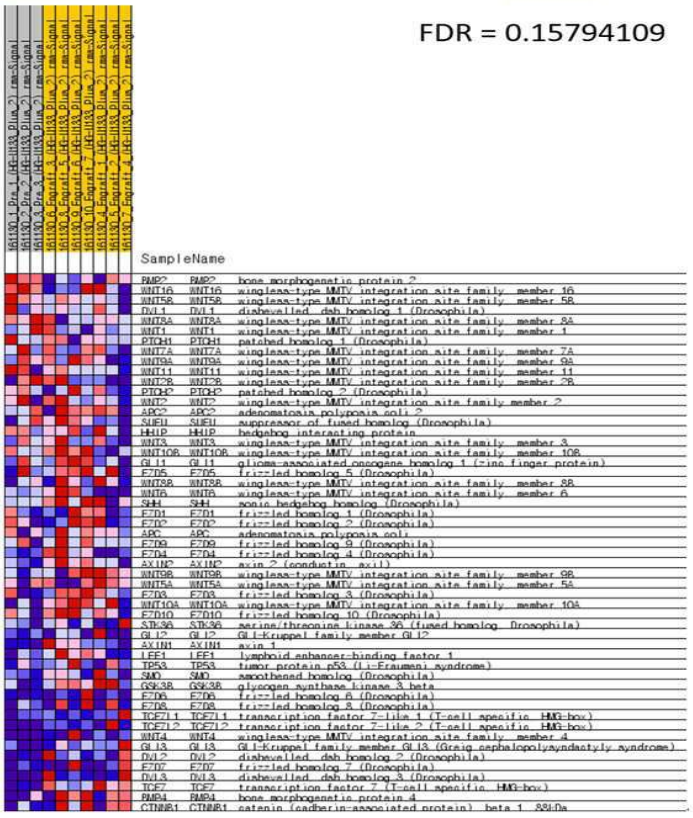

Enrichment plot: WANG_LSD1_TARGETS_DN
Enrichment score (ES)
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
'Cultured' (positively correlated)
Ranked list metric (Signal2Noise)
3
2
1
0
-1
-2
Zero cross at 8548
'REST' (negatively correlated)
0
2,500
5,000
7,500
10,000
12,500
15,000
17,500
20,000
Rank in Ordered Dataset
Enrichment profile
Hits
Ranking metric scores


SampleName
GADD45A GADD45A growth arrest and DNA-damage-inducible alpha
PCSK1N PCSK1N proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
RIMS3 RIMS3 regulating synaptic membrane exocytosis 3
SYT4 SYT4 synaptotagmin IV
CABLES1 CABLES1 Cdk5 and Abl enzyme substrate 1
LHB LHB luteinizing hormone beta polypeptide
POMC POMC proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ beta
PCSK2 PCSK2 proprotein convertase subtilisin/kexin type 2
CCNB2 CCNB2 cyclin B2
RIMS2 RIMS2 regulating synaptic membrane exocytosis 2
SYT1 SYT1 synaptotagmin I
CPLX2 CPLX2 complexin 2
CHGA CHGA chromogranin A (parathyroid secretory protein
TSHB TSHB thyroid stimulating hormone beta
DLL3 DLL3 delta-like 3 (Drosophila)
ESM1 ESM1 endothelial cell-specific molecule 1
ATF5 ATF5 activating transcription factor 5
EGR2 EGR2 early growth response 2 (Krox-20 homolog Dro
GH1 GH1 growth hormone 1
EXOC8 EXOC8 exocyst complex component 8
PRL PRL prolactin
BTG1 BTG1 B-cell translocation gene 1 anti-proliferati
CISH CISH cytokine inducible SH2-containing protein
POLR3D POLR3D polymerase (RNA) III (DNA directed) polypepti
CHST8 CHST8 carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfo
FIGF FIGF c-fos induced growth factor (vascular endothe
SNAP25 SNAP25 synaptosomal-associated protein 25kDa
RAB3A RAB3A RAB3A member RAS oncogene family
PCLO PCLO piccolo (presynaptic cytomatrix protein)
CHGB CHGB chromogranin B (secretogranin 1)
STXBP1 STXBP1 syntaxin binding protein 1
CGA CGA glycoprotein hormones alpha polypeptide
CPE CPE carboxypeptidase E
SYN2 SYN2 synapsin II
ECE1 ECE1 endothelin converting enzyme 1
JUNB JUNB jun B proto-oncogene
TRO TRO trophinin
EGR1 EGR1 early growth response 1
FOS FOS v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene

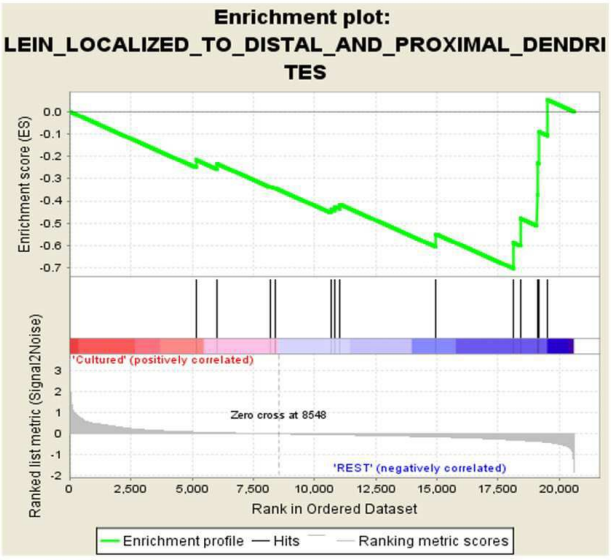
도면6c

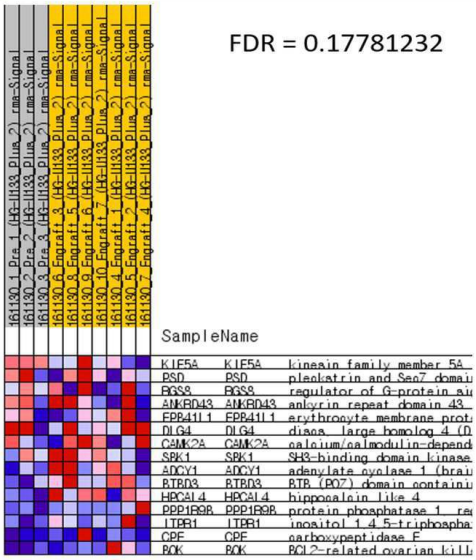


FDR = 0.15794109



도면6d


Enrichment plot:
LEIN_LOCALIZED_TO_DISTAL_AND_PROXIMAL_DENDRITES
Enrichment score (ES)
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
-0.7
'Cultured' (positively correlated)
Ranked list metric (Signal2Noise)
3
2
1
0
-1
-2
Zero cross at 8548
'REST' (negatively correlated)
0
2,500
5,000
7,500
10,000
12,500
15,000
17,500
20,000
Rank in Ordered Dataset
Enrichment profile
Hits
Ranking metric scores


FDR = 0.17781232
SampleName
KIF5A
PSD
RGS8
ANKRD43
EPB41L1
DLG4
CAMK2A
SPK1
ADCY1
BTBD3
HPCAL4
PPP1R9B
ITPR1
CPE
BOK