

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0010507 (43) 공개일자 2014년01월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 5/10</i> (2006.01) <i>C12N 5/0797</i> (2010.01) <i>C12N 5/095</i> (2010.01) <i>C12N 15/86</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0076195 (22) 출원일자 2012년07월12일 심사청구일자 2012년07월12일	(71) 출원인 중앙대학교 산학협력단 서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동) 중앙대학교 산학협력단 서강대학교 산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 김승엽 경기도 수원시 영통구 망포동 488 늘푸른벽산APT 114-201 이흥준 경기도 안산시 단원구 원선로 50 (원곡동, 벽산블루밍아파트) 110동 1706호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김승진, 이희숙, 김석만

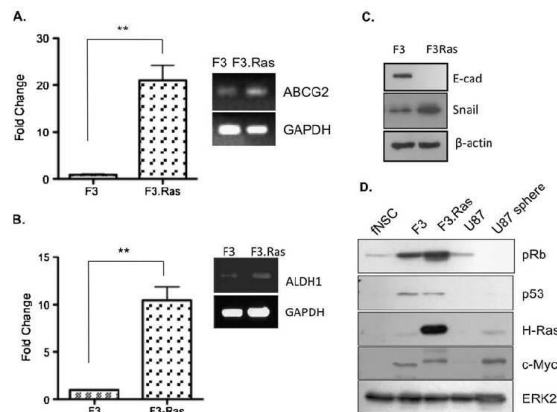
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 암줄기세포 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 암줄기세포 특성을 갖는 유전적으로 변형된 신경줄기세포, 상기 신경줄기세포의 제조방법 및 상기 신경줄기세포를 이용하여 암치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 v-myc 유전자 및 구성적 활성형 H-Ras 유전자를 신경줄기세포에 발현가능한 형태로 도입시키는 방법에 의해 암세포 및 줄기세포의 특성을 동시에 보유하는 암줄기세포를 용이하게 제조할 수 있다. 본발명의 암줄기세포 특성을 갖는 신경줄기세포는 암 발생 과정의 연구 및 암치료제 후보물질을 스크리닝하는데 매우 유용하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

차혁진

서울특별시 강남구 선릉로130길 19 (삼성동, 서광
아파트) 101동 106호

이지선

서울특별시 용산구 효창원로 88 (용문동, 브라운스
톤 용산) 103동 1004호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0001357

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자 지원사업

연구과제명 스트레스 환경에서의 뇌신경 줄기세포의 노화 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0820310

부처명 보건복지부

연구사업명 암정복추진연구개발사업

연구과제명 인간 신경줄기세포주 HB1.F3를 이용한 뇌암 자살유전자 치료법

기 여 율 1/2

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

(i) v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터; 및 (ii) 구성적 활성형(constitutively active form) H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제2의 벡터로 형질전환되어, 상기 v-Myc 단백질 및 구성적 활성형 H-Ras 단백질을 발현하는 신경줄기세포로서, 상기 신경줄기세포는 암줄기세포(cancer stem cell) 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 초대배양 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 인간 태아로부터 분리된 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 v-Myc 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 구성적 활성형 H-Ras 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, SV 40 벡터, 폴리오마 바이러스 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, 피카르노바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 또는 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 네스틴 (Nestin), ABCG2 (ATP-binding cassette transporter), Sox2 (SRY box-containing gene 2) 및 ALDH 1 (aldehyde dehydrogenase 1)의 마커 단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는, 상기 v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터만으로 형질전환된 신경줄기세포와 비교하여, E-캐드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현수준이 감소되어 있는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 8

(i) v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터; 및 (ii) 구성적 활성형 H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제2의 벡터로 신경줄기세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는 암줄기세포의 제조방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 초대배양 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 인간 태아로부터 분리된 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 v-Myc 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 구성적 활성화형 H-Ras 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, SV 40 벡터, 폴리오마 바이러스 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, 피카르노바이러스 벡터, 벡시니아 바이러스 벡터 또는 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는 암 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법:

- (a) 상기 청구항 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 암줄기세포 특성을 나타내는 신경줄기세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 후보물질 처리한 신경줄기세포의 생존율을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 후보물질 처리한 신경줄기세포의 생존율이 후보물질을 처리하지 않은 신경줄기세포의 생존율과 비교하여 감소된 경우, 상기 후보물질을 암 치료제 후보물질로 판정하는 단계.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 암줄기세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

완전히 분화된 신경아교세포의 종양성 형질전환이 신경교종발생의 주요한 원인이라고 여겨져 왔다[1]. 이러한 생각은, SV40 T/t-Ag, H-ras, 및 hTERT와 같은 다수의 종양유전자를 이소성 발현시키면 정상인 인간성상세포로부터 신경교종이 형성될 수 있다는 것을 보고하는 연구결과에 의해 뒷받침되고 있다[2]. 일반적으로 성인의 신경아교세포만이 출생 후 뇌에서 분열하는 유일한 세포로 인정되고 있으므로, 이미 생쥐 모델 연구에서 입증된 바와 같이 뇌암에서 자주 변이를 일으키는 다양한 종양유전자 p53, PTEN, NF1, EGFR, ERBB2, 및 RB1의 변이에 의해 종양발생 형질전환에 대한 공격받기 쉬운 타겟 세포가 될 수 있다[3, 4]. 그러나, 최근의 연구결과에 의하면, 증식능을 가진 신경줄기세포 및 신경아교세포 전구세포가 생후의 뇌의 여러 부분에서 검출되었다[1, 5, 6]. 따라서, 뇌암의 세포 기원에 대한 고전적인 이론은 다시 점검되어야 한다. 이러한 관점에서 생후 뇌암으로서

빈번하게 발생하는 교모세포종(glioblastoma) 및 수모세포종(medulloblastoma)과 같은 뇌암은 신경줄기세포로부터 유래하였다고 보고되고 있다[7, 8]. 뇌실의 밑부분(subventricular zone)내에 위치하고 있는 신경 줄기세포/전구세포내에서 p53, NF1, 및 PTEN을 포함하는 몇 개의 종양 억제자를 불활성화시키면 악성 성상세포종(astrocytoma)이 형성되는 결과를 가져온다[9]. 이전의 연구결과들에 의하면, 신경 줄기세포/전구세포들이 악성 형질전환에 더욱 취약하다는 점들이 입증되고 있다[7, 9].

[0003] 흥미롭게도, 성상세포와 같은 인간 체세포가 이들의 본질적인 종양 억제 메커니즘 때문에 쥐과의 체세포와 비교하여 종양성 형질전환에 더욱 저항성을 갖는다고 간주되어 왔다[10]. 인간 체세포의 경우 세포 형질전환을 위해서는 적어도 3개의 유전적 이벤트가 요구된다: 불사멸화(immortalization), 자급자족적 성장 조절(self-sufficient growth control), 및 종양 억제 메커니즘의 중지(abrogation of the tumor-suppressive mechanism)[11]. p53 종양 억제자에 의해 자주 지배되는 종양 억제 메커니즘은 정상 세포가 종양세포로 형질전환되는 것을 막는 중요한 기작이다. 인간 신경교종 대부분에서 비정상적 활성화 신호(Ras 및 텔로머라아제)와 함께 종양-억제 기작(p53 및 Rb 경로)의 손상이 존재한다는 것이 입증되어 있다[12].

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0121410호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) PNAS, November 10, 2009, vol. 106, no. 45, 19035-19039.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 줄기세포의 암화에 대한 연구를 진행하였고, 이러한 연구의 결과로써, 신경줄기세포에 v-myc 유전자와 구성적 활성형 H-Ras 유전자를 동시에 발현가능한 형태로 도입하면, 신경줄기세포가 암줄기세포(cancer stem cell)의 특성을 갖게 된다는 것을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 암줄기세포 특성을 나타내는 유전적으로 변형된 신경줄기세포를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 암줄기세포 특성을 나타내는 신경줄기세포의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 암줄기세포 특성을 나타내는 신경줄기세포를 이용하여 암 치료제 후보물질을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (i) v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터; 및

(ii) 구성적 활성형(constitutively active form) H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제2의 벡터로 형질전환되어, 상기 v-Myc 단백질 및 구성적 활성형 H-Ras 단백질을 발현하는 신경줄기세포로서, 상기 신경줄기세포는 암줄기세포(cancer stem cell) 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포를 제공한다.

- [0013] 본 발명자들은 줄기세포의 암화에 대한 연구를 진행하였고, 이러한 연구의 결과로써, 신경줄기세포에 v-myc 유전자와 구성적 활성형 H-Ras 유전자를 동시에 발현가능한 형태로 도입하게 되면, 신경줄기세포가 암줄기세포(cancer stem cell)의 특성을 갖게 된다는 것을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 본 명세서에서 사용되는 용어 “v-myc” 유전자는 최초로 조류의 레트로바이러스 M29 유래의 암유전자로서 조류의 골수세포종증(myelocytoma)을 일으키는 것으로 알려진 유전자이다. v-Myc 단백질은 상기 v-myc 유전자에 의해 코딩되는 단백질로서, v-myc 유전자 및 이 유전자가 코딩하는 v-Myc 단백질에 대한 내용은 Oncogene, 1999 May 13;18(19):2997-3003 에 상세히 기술되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 v-Myc 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이다.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 “H-Ras 단백질”은 세포내에서 성장인자(growth factor) 자극에 반응하여 세포분열을 조절하는데 관여하는 GTPase을 의미한다. H-Ras 단백질 및 H-Ras 유전자에 대한 내용은 문헌 Mol. Reprod. Dev. 42 (4): 5006. 및 Mol. Membr. Biol. 17 (2): 6573에 상세히 기술되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 “구성적 활성형(constitutively active form) H-Ras 단백질”은 상기 H-Ras 단백질의 아미노산 잔기 변이에 의해 성장인자의 자극에 의하지 않고도 활성 상태를 영구적으로 유지하는 H-Ras 단백질을 의미하며, 예컨대, 이 단백질의 12번째 아미노산인 글라이신(glycine)이 발린(valine)으로 치환된 변이형 H-Ras^{G12V} 단백질을 들 수 있다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 구성적 활성형 H-Ras 단백질”은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “줄기세포”는 증식을 계속하는 능력, 즉 자가재생(self-renewal)능력을 가지고 있으며, 다양한 타입의 특정 세포 타입으로 분화할 수 있는 분화능을 갖는 세포를 의미한다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 “신경줄기세포”는 상기한 줄기세포로서 중추신경계를 구성하는 신경세포(neuronal cell), 성상교세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 등의 세포로 분화할 수 있는 다분화능력을 가진 미분화 세포를 의미한다.
- [0021] 신경줄기세포의 구체적인 분리 방법은 미국등록특허 5,654,183에 개시되어 있고, 이 문헌은 본 명세서 참조로써 삽입된다. 신경줄기세포는 bFGF (basic fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), 또는 FGF (fibroblast growth factor)의 성장 인자를 적합한 농도 범위 예컨대 5-100 ng/ml의 범위로 배지에 첨가하여 배양할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 신경줄기세포는 조직으로부터 분리 및 배양된 초대 배양 줄기세포(primary cultured neural stem cell)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간의 태아로부터 분리되어 배양된 신경줄기세포이다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 “암줄기세포(cancer stem cell)”는 정상 줄기세포의 특성인 자가 재생 능력을 보유하며 아주 적은 수의 세포로도 고효율적으로 종양을 형성할 수 있는 능력을 갖는 암세포를 의미한다. 다양한 종류의 암줄기세포에 대한 내용은 문헌 Cancer Research 63 (18): 58218 (September, 2003); Nature 445 (7123): 10610 (January, 2007); Cancer Research 68 (11): 431120 (June 2008); J. Clin. Oncol. 26 (17): 286270 (June, 2008)에 상세히 설명되어 있으며, 이 문헌들은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [0024] 본 발명의 신경줄기세포는 줄기세포의 특성과 함께 암세포의 특성을 동시에 갖는 암줄기세포의 특성을 보유한다.
- [0025] 본 발명의 신경줄기세포는 네스틴 (Nestin), ABCG2 (ATP-binding cassette transporter), Sox2 (SRY box-containing gene 2)의 줄기세포 마커 단백질을 발현하며, 동시에 ALDH 1 (aldehyde dehydrogenase 1)의 암세포 마커 단백질을 발현하므로, 이들 마커 단백질의 확인에 의해 동정될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 신경줄기세포는, 상기 v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터만으로 형질전환된

신경줄기세포와 비교하여, E-케드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현수준이 감소되어 있으며, Snail 단백질의 발현수준이 증가되어 있다. 이는 본 발명의 신경줄기세포에서 EMT (epithelial mesenchymal transition; 상피세포의 간질세포로의 변이)가 진행되었음을 암시하며, EMT 진행은 본 발명의 신경줄기세포가 암줄기세포의 특성을 갖는 점을 더욱 뒷받침한다.

- [0027] 본 명세서 하기 구체적인 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, 본 발명의 암줄기세포 특성을 갖는 신경줄기세포를 생쥐에 주입한 경우 생쥐내에서 효과적으로 종양을 형성하였다.
- [0028] 본 발명의 암줄기세포 특성을 갖는 신경줄기세포는 v-Myc 단백질을 구성적 활성형 H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터로 형질전환되어 유전적으로 변형(genetically modified)된 신경줄기세포이다.
- [0029] 본 발명에서 v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 구성적 활성형 H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 신경줄기세포안으로 도입시키는데 사용되는 벡터는 바람직하게는 다음의 벡터가 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다: (i) 아데노바이러스 벡터; (ii) 레트로바이러스 벡터; (iii) 아데노-연관 바이러스 벡터; (iv) 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터; (v) SV 40 벡터; (vi) 폴리오마 바이러스 벡터; (vii) 파필로마 바이러스 벡터; (viii) 피카르노바이러스 벡터; (ix) 벡시니아 바이러스 벡터; (x) 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터.
- [0030] 본 발명의 벡터에 포함되는 진핵세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, Adeno 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 벡터에 사용될 수 있는 프로모터는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 벡시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있고, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열이 포함되며, 예를 들어 SV40 polA 서열 및 BGH polA 서열 등이 있다.
- [0032] 본 발명에서 이용되는 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 앰피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신, 푸로마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0033] 본 발명의 벡터를 신경줄기세포내로 운반하는 방법은 공지된 트랜스펙션(transfection) 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 미세 주입법 (Capecchi, M.R., Cell 22, 479 (1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology 52, 456 (1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., EMBO J. 1, 841 (1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., Gene, 10, 87 (1980)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, Mol. Cell Biol. 5, 1188-1190 (1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9568-9572 (1990)) 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 상기 벡터의 도입에 의해 형질전환된 줄기세포를 선별하는 단계는 상술한 선택표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 용이하게 실시할 수 있다. 예컨대, 상기 선택표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 (i) v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터; 및 (ii) 구성적 활성형 H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제2의 벡터로 신경줄기세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는 암줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 제조방법에서 상기 신경줄기세포는 초대배양 신경줄기세포이며, 보다 바람직하게는 상기 신경줄기세포는 인간 태아로부터 분리된 신경줄기세포이다.
- [0037] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 상기 v-Myc 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 구성적 활성형 H-Ras 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 암 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다: (a) v-Myc 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제1의 벡터; 및 구성적 활성형 (constitutively active form) H-Ras 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제2의 벡터로 형질전환되어 암줄기세포 특성을 나타내는 신경줄기세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질 처리한 신경줄기세포의

생존율을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 후보물질 처리한 신경줄기세포의 생존율이 후보물질을 처리하지 않은 신경줄기세포의 생존율과 비교하여 감소된 경우, 상기 후보물질을 암 치료제 후보물질로 판정하는 단계.

[0039] 본 발명의 방법은 다양한 스크리닝 방법을 적용하여 행할 수 있으며, 특히 고속 대용량 스크리닝(HTS, high-throughput screening)에 적합하다.

[0040] 본 발명에서 암 치료제 후보물질은 천연물 또는 화학적 합성 방법 및 조합에 의해 생산한 화합물의 라이브러리를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-펩타이드성 유기분자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 당, 호르몬, 핵산분자, 소분자(small molecule) 라이브러리가 포함된다.

[0041] 본 발명의 스크리닝 방법의 실시는 달리 지적되지 않는 한, 당해 분야에 속하는 세포 생물학, 세포 배양학, 분자 생물학, 유전자 도입 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학에 관한 통상의 기술을 사용할 것이다.

[0042] 본 발명의 상기 암줄기세포의 제조방법 및 암치료제 후보물질의 스크리닝 방법 중에서, 암줄기세포 및 이의 제조방법에 관한 내용은 상술된 암줄기세포 특성을 갖는 유전적으로 변형된 신경줄기세포에서 설명된 내용과 동일하므로, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 설명하지 않는다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 암줄기세포 특성을 갖는 유전적으로 변형된 신경줄기세포, 상기 신경줄기세포의 제조방법 및 상기 신경줄기세포를 이용하여 암치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 신경줄기세포에 v-myc 유전자 및 구성적 활성화형 H-Ras 유전자를 발현 가능한 형태로 도입시키는 방법에 의해 암세포 및 줄기세포의 특성을 동시에 보유하는 암줄기세포를 제조할 수 있다. 본발명의 암줄기세포 특성을 갖는 신경줄기세포는 암 발생 과정의 연구 및 암치료제 후보물질을 스크리닝하는데 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1a 내지 도 1e는 v-myc 및 H-Ras 유전자 도입에 의해 hfNSCs가 종양으로 형질전환된다는 것을 보여준다.

도 1a는 hfNSCs 및 v-myc-발현 hfNSCs (F3 세포)의 형태를 광학현미경으로 관찰한 결과이다(왼쪽 패널). 신경줄기세포 마커, hNestin(녹색),은 ftNSCs 및 F3 세포 모두에서 발현되었다. DAPI(파란색)은 핵을 대비 염색하기 위해 사용하였다. 또 다른 신경줄기세포 마커인 Sox2는 RT-PCR 분석을 통해 검출하였다. GAPDH는 동일한 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 1b는 광학현미경으로 F3. pBabe 세포 및 F3.Ras 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과를 보여준다.

도 1c는 면역블로팅 분석을 통해, 공백터를 갖는 F3 불사멸화 신경줄기세포(F3.pBabe)에서의 phospho-ERK 및 phospho-Akt와 같은 유사분열성 신호를 HRas-발현 F3 세포(F3. Ras)와 비교한 결과를 보여준다. β -액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 1d는 F3.pBabe 세포 및 F3 세포와 비교한 F3.Ras 세포에서의 증식율의 증가를 각 지정된 날에 세포를 계수하여 그래프로 나타내었다(왼쪽 패널). F3.Ras 세포에서 사이클린 B1, 사이클린 E, 및 phospho-Rb와 같은 다양한 종류의 세포 주기 조절자들의 수준을 면역블로팅 분석을 통해 측정하였다(오른쪽 패널).

도 1e는 소프트 아가(soft agar)에서 각 지정된 세포의 콜로니 형성 수준을 콜로니 수를 세어 측정하였고(왼쪽 패널), 이를 그래프로 나타내었다(오른쪽 패널). E1a/Ras MEF를 양성대조군으로 사용하였다.

도 2는 F3.Ras 세포가 신경줄기세포 특성을 보유한다는 것을 보여준다. 패널 A는 신경줄기세포 마커인 hNestin(붉은색) 및 Sox2(녹색)이 F3 세포 및 F3.Ras 세포에서 공동 발현된다는 것을 보여준다. 인간 중간엽줄기세포(hMSCs)를 Nestin 및 Sox2 염색에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 패널 B는 F3 세포 및 F3.Ras 세포에서 Sox2 유전자 및 Nestin 유전자에 대한 RT-PCR 분석을 행한 결과를 보여준다. GAPDH를 DNA 로딩 대조군으로 사용하였다. 패널 C는 F3 세포 및 F3.Ras 세포에서 Sox2 및 Nestin의 수준을 면역블로팅 분석을 통해 측정한 결과이다. β -액틴을 단백질 로딩 대조군으로 사용하였다. 패널 D는 F3.pBabe 세포 및 F3.Ras 세포 간의 신경구(Neurosphere)의 형성을 비교한 결과이다. F3.pBabe 세포 및 F3.Ras 세포의 12개 이상의 신경구의 직경을 측정하고 그 평균값을 그래프로 나타내었다.

도 3은 F3.Ras 세포가 신경 암줄기세포의 특성을 갖는 것을 보여준다. 패널 A는 ABCG2의 mRNA 수준을 실시간 PCR (왼쪽 패널) 및 RT-PCR (오른쪽 패널)을 통해 측정된 결과이다(**, $p < 0.05$). 패널 B는 ALDH1의 mRNA 수준을 실시간-PCR (왼쪽 패널) 및 RT-PCR (오른쪽 패널)로 측정된 결과이다(**, $p < 0.05$). 패널 C는 면역블로팅을 통해 F3 세포 및 F3.Ras 세포에서의 E-cadherin 및 Snail의 수준을 측정된 결과를 보여준다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. 패널 D는 면역블로팅 분석을 통해 hfNSC, F3, F3.Ras, U87 및 U87 구(sphere)에 대해 c-myc, Ras, pRB 및 p53의 수준을 측정된 결과이다. ERK2를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 4는 F3.Ras 세포가 생쥐에서 종양을 형성한다는 결과에 관한 것이다. 패널 A는 6주령의 NOD/SCID 수컷 생쥐에 1×10^6 의 F3.pBabe 세포(왼쪽 대퇴부: 점선) 또는 F3.Ras 세포(오른쪽 대퇴부: 실선)를 근육내 주사하고, 6주 후에 종양의 형성을 평가한 결과이다. F3.Ras 세포로 주사한 오른쪽 대퇴부에서의 종양 덩어리를 분리하고 조직학적 분석을 수행하였다. 패널 B는 종양 덩어리로부터 분리한 조직을 헤마톡실린 및 에오신(H/E)으로 염색하여 종양을 확인한 결과이다. 패널 C는 종양조직을 증식 마커(phospho-히스톤 H3)와 정상세포 특이적 세포 마커(GFAP)로 면역염색을 행한 결과이다. 막대는 100 μ m를 나타낸다. 패널 D는 종양조직을 증식마커(Ki-67) 및 신경줄기세포에 대한 세포 타입 특이적 마커(hNestin)으로 면역염색을 행한 결과이다. 아래쪽 패널은 H/E 염색 사진이다. 패널 E는 생쥐 종양 조직상에 대해 인간 염색체 프로브로 FISH를 행한 결과이다(붉은색은 LSI21이고, 녹색은 CEP18이다). DAPI는 핵 대비 염색을 행한 결과이다.

도 5는 F3.Ras 세포가 생쥐에서 뇌 종양을 형성하는 것을 보여준다. 패널 A는 F3.Ras 세포의 뇌안으로 주입에 의해 뇌 종양이 형성된 결과를 보여준다. 패널 B는 표시된 영역(i 및 ii)을 고배율로 확대하여 H/E 염색한 결과를 보여준다. 패널 C는 hNestin, GFAP 및 MAP2를 면역염색한 결과이다. 인간 세포 유래 암 영역을 확인하기 위해 인간 핵에 대한 염색(hNuA)을 행하였다. 막대: 100 μ m. 흰색 박스(오른쪽 아래 패널)은 고 배율로 확대하였다.

도 6은 F3 세포에서 p53 반응이 손상되어 있음을 보여준다. 패널 A는 Multiple signaling changes in F3.Ras 세포에서 다양한 신호전달 변화를 인산-키나아제 프로파일러 어레이 키트(phospho-kinase profiler array kit)를 사용하여 평가하였다. F3 세포 (위쪽 패널) 및 F3.Ras 세포(아래쪽 패널)내에서 세린 46 (i) 및 세린 15 (ii)상에서의 p53 인산화 수준과, 세린 473상에서의 AKT의 인산화 수준 (iii)을 측정하였다. *는 시료를 동일하게 로딩한 것에 대한 양성 대조군이다. 패널 B는 F3.pBabe 세포와 비교하여 F3.Ras 세포에서 13개의 p53-의존성 유전자들의 mRNA 수준의 배수 변화를 그래프로 나타낸 결과이다(Y 축 : log 10). 패널 C는 각 세포에 대해 10 J/m²의 UVC로 자극한 후, Gadd45a mRNA 수준을 실시간 PCR 분석으로 측정된 결과와 이를 그래프로 나타낸 결과이다. 평균 및 SEM을 3회의 독립된 실험으로부터 계산하였다. 패널 D는 면역블로팅 분석을 통해 nutlin3 처리한 후 24 시간 시점에서 p53 및 p21 단백질 수준을 측정된 결과이다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 7은 F3.Olig2 세포와 비교하여 F3 세포의 종양 발생 감수성이 상이함을 보여준다. 패널 A는 F3 세포와 F3.Olig2 세포를 hNestin (녹색, 위쪽 패널), 인간 CNPase (녹색, 아래쪽 패널)으로 면역염색하고, DAPI (청색)으로 대비 염색한 결과이다. 합쳐진 이미지를 왼쪽의 패널에 나타내었다. 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblasts, hDFs), F3 세포 및 F3.Olig2 세포로부터의 Sox2 수준은 RT-PCR 분석을 통해 측정하였다. GAPDH를 동일한 로딩 대조군으로 사용하였다(오른쪽 패널). 패널 B는 F3 세포 및 F3.Olig2 세포에 H-Ras를 도입한 후에 보여지는 형태학적 변화를 나타내었다(위쪽 패널: 100X, 아래쪽 패널: 200X). phospho ERK, H-Ras 및 사이클린 B1 수준을 면역블로팅 분석을 통해 측정하였다. β -액틴을 대조군으로 사용하였다. 패널 C는 각 세포의 소프트-아가(soft-agar)에서의 콜로니 형성 수준을 콜로니를 계수하여 측정된 결과이다. 오른쪽 패널에는 이를 그래프로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046]

실시예

[0047] 실험방법 및 재료

[0048] 1. v-myc 발현 인간 태아 신경 줄기세포의 제조

[0049] 암포트로픽 복제 불능성 레트로바이러스 벡터 pLSN.v-myc를 사용하여 15주의 태아 뇌로부터 분리한 인간 뇌세포를 감염시켰다. pLSN.v-myc 벡터는 v-myc을 인코딩하는 동중지향성 바이러스 벡터를 사용하여 hfNSCs (human fetal neural stem cells) 세포주를 제작하였던 방법과 유사한 방법을 통해 제조하였다[1618]. PA317 암포트로픽 패키징 세포주를 pLSN.v-myc 벡터로 감염시키고, 성공적으로 감염된 감염세포를 선별하여 증폭시켰다. PA317 생성 세포주(PASK1.2)로부터 생성된 상층액에는 G-418 저항성에 의해 관찰되는 바와 같이, hfNSCs를 효율적으로 감염할 수 있는 암포트로픽 엔벨로프를 갖는 복제불능의 레트로바이러스 입자가 포함되어 있었다. 패키징 세포주의 배양 상등액 2 ml 및 8 µg/ml의 폴리브렌(polybrene)을 6웰 플레이트의 뇌세포에 첨가하여 37°C에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 배지는 신선한 성장 배지로 연속적으로 교체하고, 감염 과정은 24시간 및 48시간 후에 반복하여 진행하였다. 3번째 감염을 행하고 72시간 후에 감염된 세포를 G-418 (200 µg/ml)으로 14일 동안 선별하고, 세포의 무리를 개별적으로 분리하고 폴리-L-리신으로 코팅된 접시에서 배양하였다. 개별 클론(n=3)을 제한된 희석을 통해 선별하고 더 증식시켰다. 제조한 v-myc 발현 hfNSCs를 HB1.F3으로 명명하고 이하 실험에서 사용하였다. 10 µg/ml 인슐린, 10 µg/ml 트랜스페린, 30 nM 소듐 셀레네이트, 50 nM 하이드로코르티손, 및 0.3 nM T3를 포함하고 고농도의 글루코코스를 갖는 DMEM으로 구성된 무혈청 배지(DM4)내에서 F3 NSCs를 배양하였다. DM4에는 통상적인 배지 급여 동안에 재조합 인간 염기성 섬유모세포생장인자(bFGF, 10 ng/ml; PeproTech, Stem Cell Rev and Rep Rocky Hill, NJ)을 보충하였다. bFGF를 제외한 모든 화합물들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)으로부터 구입하였다. F3 NSCs는 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum) 및 20 µg/mL의 젠타마이신(Sigma)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 습화된 5% CO₂ 인큐베이터내에서 유지하였다.

[0050] 2. H-Ras 도입을 통한 암화성 신경 줄기세포의 제조

[0051] HB1.F3 (F3) 세포에 대해 pBabe-HRas G12V 레트로바이러스 벡터로 추가 형질도입하여 v-myc 및 Ras 모두를 인코딩하는 새로운 인간 신경줄기세포주 HB1.F3.Ras (F3.Ras)를 제조하였다. 간략하게 설명하면, 각 바이러스 플라스미드(20 µg, pBabe (Cont), 및 pBabe-H-Ras G12V를 Lipofectamine 2000(Invitrogen, #11668-027)을 사용하여 Phoenix Amphor 바이러스 패키징 세포(5 X 10⁶)에 트랜스펙션하였다. 48 시간 후에, 바이러스를 포함하는 배양 배지를 트랜스펙션된 Phoenix 세포로부터 수득하고 여과하였다(0.45 µm 필터, Millipore). 8 X 10⁵의 밀도의 타겟 F3 세포를 바이러스를 포함하는 배지에서 4 µg/ml의 폴리브렌(Sigma)의 존재하에서 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 감염 과정은 24시간 및 48시간 후에 반복하였다. 세 번째 감염 과정 후 72시간 시점에서 감염된 세포군을 배지에 0.5 µg/ml의 푸로마이신을 첨가하여 선별하였다. 3개의 큰 세포 콜로니를 각각 분리하고 제한된 희석을 통해 배양한 후 추가 증식시켰다.

[0052] 3. 시약

[0053] 네스틴(Nestin)에 대한 1차 항체(10c2: sc-23927), H-Ras에 대한 1차 항체(c-20: sc520), 사이클린 B1에 대한 1차 항체(GNS1: sc-245), 사이클린 E에 대한 1차 항체(sc-198), ki-67에 대한 1차 항체(H-300: sc-15402), β-액틴에 대한 1차 항체(sc-47778), 및 GFAP 에 대한 1차 항체(sc-9973)는 Santa Cruz Biotechnology으로부터 구입하였다. 인산화된 Rb에 대한 1차 항체(pRb, ser795: # 9301), 인산화된 Akt에 대한 1차 항체(pAkt, ser473: # 4060X), 인산화-히스톤 H3에 대한 1차 항체(Ser10: # 9706), 인산화된 p42/44에 대한 1차 항체(ppERK, # 9106), 및 E-cadherin에 대한 1차 항체(# 4065)는 Cell Signaling Technology (Danver, MA)으로부터 구입하였다. Snail에 대한 1차 항체 (# ab17732), 및 Sox2 에 대한 1차 항체 (# ab15830)는 Abcam (Cambridge, MA)으로부터 구입하였다. 2차 항체 Alexa 594-컨주게이트된 염소 항-생쥐 IgG는 Molecular Probes (Eugene, OR)으로부터 구입하였고, Cy2-컨주게이트된 염소 항-토끼 IgG는 Jackson ImmunoResearch (Wes Grove, PA)으로부터 구입하였다.

[0054] 4. 종양구의 생성

[0055] 종양구(tumorsphere)는 2% B27, 8 mM HEPES, 100 U/mL의 페니실린, 100 µg/mL의 스트렙토마이신 및 20 ng/mL의 bFGF(invitrogen, Carlsbad, CA)가 첨가된 DMEM/F12에서 F3 세포 및 F3.Ras 세포를 7일간 배양하여 생성시켰다.

[0056] 5. 면역블로팅

[0057] 세포를 얼음 냉각된 PBS (phosphate buffered saline)으로 세척한 후에, 300 µl의 조직 용해 완충액으로 세포를 용해시킨 후, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 용해물들을 제거하였다. 약 20 µg의 총 단백질을 SDS-PAGE를 통해서 분리하였다. 분리한 단백질을 PVDF 멤브레인으로 옮기고, TBS (Tris-buffered saline)내의 5% 탈지유 및 0.1% Tween-20 (TBS-T)으로 1 시간 동안 블로킹한 후에, 1% BSA 용액을 포함하는 TBS내의 적합한 1차 항체와 함께 1-16 시간 동안 인큐베이션하였다. 멤브레인을 TBS-T 용액내에서 수차례 세척하고, HRP-컨주게이트된 2차 항체(0.1 µg/ml; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)와 함께 인큐베이션하였다. 면역반응성은 ECL (enhanced chemiluminescence) 검출시스템 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 사용하여 검출하였다.

[0058] 6. 면역형광

[0059] 세포들을 둥근 유리 커버슬립상에서 배양하고, 0.1 M 포스페이트 완충액(pH 7.2)내의 4% 파라포름알데히드로 10분간 고정시키고, PBS내의 0.1% Triton X-100을 처리하여 5분간 투과화시켰다. 고정된 세포를 블로킹을 위해 3% BSA를 포함하는 TBS내에서 30분간 인큐베이션하고, 특정의 1차 항체와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 TBS-T 용액내에서 3회 세척하고, Alexa 594-컨주게이트된 염소 항-생쥐 또는 Cy2-컨주게이트된 염소 항-토끼 IgG와 함께 인큐베이션하였다. 세포핵은 PBS내에서의 4',6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI, 0.2 µg/ml)을 사용하여 반대염색을 행하였다.

[0060] 7. 면역조직화학

[0061] F3.Ras를 피부에 주입한 생쥐로부터의 종양 조직과 U373 인간 신경아교세포를 포스페이트 완충된 10% 포르말린 내에서 고정하고, 조직 샘플을 파라핀내에서 봉매하였다. 파라핀 절편에서 파라핀을 제거하고, 재수화시키고, 시트레이트-기초 항원 회수 과정을 행하였다. GFAP, 네스틴(Nestin), ki-67, 및 phospho-히스톤 H3에 특이적인 1차 항체를 사용하였다. 면역형광에서 사용한 2차 항체는 Alexa 594-컨주게이트된 염소 항-생쥐 또는 Cy2-컨주게이트된 염소 항-토끼 IgG 이었고, HRP 염색에 대해서는 ABC 키트 (Vector Laboratory)를 사용하였다. 조직병리학적 분석을 위해 절편을 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 행하였다.

[0062] 8. RNA 분리 및 정량적 실시간 PCR 분석

[0063] 제조자의 지시서에 따라, 총 RNA를 TRIzol 시약 (Invitrogen)을 사용하여 세포로부터 추출하고, DNase I을 처리하였다. Trizol은 클로로포름을 첨가하여 제거하였고, mRNA는 이소프로판올을 첨가하여 침전시켰다. RNA 침전물은 75% 에탄올로 세척하였다. RNA의 양 및 순도는 UV 분광기를 사용하여 260 nm 및 280 nm에서 광학밀도를 측정하여 평가하였으며, RNA의 안정성 여부는 아가로스 젤 전기영동을 통해 확인하였다. 사용된 특정 유전자를 증폭하기 위한 특이 프라이머의 염기서열은 다음과 같다: 인간 Sox2 [정방향: 5' -ATGCACCGCTACGACGTGA-3' (서열번호 3), 역방향: 5' -CTTTGCACCCCTCCATT-3' (서열번호 4)]; hNestin [정방향: 5' -AGAAGAGGACCAGATATTGTGAG-3' (서열번호 5), 역방향: 5' -TCCGTCGTGTTGAGTCTC-3' (서열번호 6)]; 인간 ABCG2 [(정방향: 5' -TTAAGTGGAACTGCTGCTTTAGGT-3' (서열번호 7), 역방향: 5' -TCGGTCTTAACCAAGGCTCA-3' (서열번호 8)] 및 하우스 키핑 유전자 GAPDH. 모든 증폭은 500 nmol/l의 유전자 특이 프라이머 및 2 ml의 주형을 포함하는 프리-혼합물(20 µl)내에서 다음의 열 사이클 조건하에서 행하였다: 95°C에서 1분간 변성; 95°C에서 30초, 58°C에서 30초 및 72°C에서 30초의 30 사이클 및 72°C에서 5분간 최종 연장. PCR에 의한 증폭이 적합하게 수행되었는지 확인하기 위해, 증폭산물을 2% 아가로스 젤상에서 분리하여 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색을 행하여 시각에 의해 관찰하였다. p53 의존성 유전자 발현은 제조자의 지시서에 따라 RT² profiler PCR array human p53 Signaling Pathway에 의해 검증하였다. 반응은 Applied Biosystems 7500 Fast-Real Time PCR

System (Applied Biosystems, Foster City, CA)에 의해 수행하였다.

9. 소프트 아가 분석(Soft Agar Assay)

6웰-플레이트의 각 웰을 3 ml의 바닥 아가 혼합물(DMEM, 10% FBS, 및 0.6% 아가)으로 코팅하였다. 바닥층이 고형화된 후에, 5×10^5 세포를 포함하는 2 ml의 탑 아가 혼합물(DMEM, 10% FBS, 및 0.3% 아가)을 각 웰에 첨가하고, 배양액을 5% CO₂ 분위기하의 37°C에서 배양하였다. 매 5일마다, 정상외의 성장 배지를 배양물위에 살짝 덮어 놓았다. 콜로니 형성에 대해서는 광학현미경을 사용하여 매일 관찰하였다. 소프트 아가(soft agar)상에 형성된 콜로니는 배양 14일후에 디지털 카메라로 사진을 찍었다.

10. FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

FISH는 2개의 인간 염색체-특이 프로브, LSI 21 (Spectrum Orange, Abbott Laboratories, Chicago, IL) 및 CEP18 (Spectrum Green, Abbott)를 사용하여 행하였다. 슬라이드 및 프로브는 일반적인 FISH 프로토콜에 따라 제조하였다. 프로브 혼성화는 Hybrite system (Abbott)을 사용하여 37°C에서 16 시간 동안 행하였다. 혼성화후 세척을 행한 후에, 슬라이드는 DAPI(4' 6' -diamino-2-phenylindole dihydrochloride)으로 대조염색을 행하였다. FISH 신호는 Cytovision system v3.6 (Applied Imaging, London, UK)을 사용하여 캡처하였다.

11. F3 세포 또는 F3.Ras 세포의 생쥐 근육 및 뇌로의 이식

6 주령의 NOD/SCID 수컷 생쥐의 대퇴부 근육에 1×10^6 F3.pBabe 또는 F3.Ras 세포를 피하 주입한 후, 6주 후에 종양의 발생을 모니터링하였다. F3.Ras 세포를 주입한 오른쪽 대퇴부위로부터 종양 덩이를 분리하여 조직학검사를 위해 처리하였다. 분리한 종양 조직을 0.1 M 포스페이트 완충액 (pH 7.4)내의 4% 파라포름알데히드내에서 고정하고, 파라핀 절편으로 만들어 헤마톡실린 및 에오신(H/E)염색을 행하였다. 종양조직절편에 대해서는 증식 마커(phospho-히스톤 H3) 및 정상세포에 대한 세포 타입-특이적 마커(GFAP), 증식 마커(Ki-67) 및 신경줄기세포에 대한 세포 타입-특이적 마커(hNestin)를 검출하기 위한 면역염색을 행하였다. 유사한 방식으로, F3 세포 및 F3.Ras 세포를 NOD/SCID 생쥐의 뇌실안으로 주입하였다. 생쥐의 뇌로부터 제작한 파라핀 절편을 H/E, phospho-히스톤 H3, hNestin, GFAP, 및 Ki-67 염색을 위해 처리하였다.

실험결과

1. v-myc 및 Ras를 인코딩하는 인간 신경줄기세포의 제작

hfNSCs 내에서 v-myc을 안정하게 발현시킨 경우에 모세포인 hfNSCs와 비교하여 세포 형태 혹은 염색체 형태가 뚜렷하게 변화된 점은 발견되지 않았다(도 1a). v-myc이 발현된 이후에서도, 인간 네스틴(hNestin) 또는 Sox2 발현 수준은 모세포 hfNSCs와 비견할만한 수준이었으며, 그러나 인간 피부 섬유아세포(hDFs)에서는 발현되지 않았다(도 1a 참조). 이후부터, v-myc-발현 hfNSCs (F3) 세포에 대해 추가적인 유전적 변형을 행하였다. 상기 실험 방법에서 설명된 바와 같이, H-Ras의 구성적 활성 형태(constitutively active form)를 F3 세포에서 안정하게 발현시켜 F3.Ras 세포를 제조하였다. 모세포 hfNSCs의 형태를 유지하고 있는 F3 세포와 다르게, F3.Ras 세포는 형태적으로 상당히 변화되어 있었다(도 1b). F3.Ras 세포의 형태는 이미 보고되어 있는 바와 같은 형질 전환된 세포의 전형적인 형태(세포질의 압축, 초점 형성, 접촉 억제 특성의 소멸)와 매우 유사하였다[19]. H-Ras의 효과를 평가하기 위해, ERK 및 Akt 활성화와 같은 H-Ras 활성화의 특징적인 신호를 면역블로팅을 통해 평가하였다. 예상한 바와 같이, F3.Ras 세포내에서 H-Ras가 안정하게 발현되면서 인산화된 ERK 및 Akt가 고수준으로 및 구성적으로 활성화되었다(도 1c). 분열촉진 신호 또는 종양 신호에 의해 유도되는 ERK 및 Akt 활성화가 F3 및 F3.pBabe 세포와 비교하여 증가된 증식의 원인이라는 점은 비교적 잘 알려져 있다(도 1d의 왼쪽 패널). F3.Ras 세포의 증식은 사이클린 B1 및 사이클린 E, 및 후속의 Rb 과인산화와 같은 다양한 세포 주기 조절자들의 상향 조절과 관련되어 있다(도 1d의 오른쪽 패널). 세포 형질전환에 대한 분석으로서, 부착-독립적 성장(anchorage-independent growth)을 소프트 아가(soft agar)상에서의 성장율을 평가하여 측정하였다. 대조군인 E1a/Ras 마우스 배아 섬유아세포(MEF)와 비교하여 소프트 아가 상에서 성장한 F3.Ras 콜로니의 수가 E1a/Ras

MEF의 수와 비슷하였으며, 이는 F3.Ras 세포가 실제로 형질전환되었음을 지시하는 것이다(도 1e).

2. F3.Ras 세포는 신경줄기세포에 대한 세포 타입 특이적 마커를 보유하였다.

F3 세포는 hfNSCs의 특징적 형질을 발현하고, 네스틴(hNestin) 및 ABCG2 (ATP-binding cassette transporter)와 같은 특징적인 NSC 마커도 발현한다(도 1a, 오른쪽 패널)[20]. 따라서, H-Ras를 F3 세포에 도입한 경우에 F3 세포의 신경줄기세포 특성을 변경시키는 지에 대해 조사하였다. 먼저, 신경 줄기세포 또는 신경 전구세포의 확인용으로 광범위하게 사용되는 hNestin 및 Sox2(SRY box-containing gene 2)의 수준을 측정하였다[21]. 도 2의 패널 A에서 보여지는 바와 같이, hNestin 및 Sox2는 F3 세포 및 F3.Ras 세포 모두에서 명확히 염색되었으나, 인간 골수유래 중간엽줄기세포(hMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells)에서는 염색되지 않았다. 이와 유사하게, Sox2 및 hNestin의 mRNA는 F3 세포 및 F3.Ras 세포 모두에서 발현되었다(도 2의 패널 B). 흥미롭게도, F3.Ras 세포에서의 Sox2 및 hNestin 단백질의 수준은 F3 세포에서 관찰되었던 수준과 비교하여 약간 증가한 것처럼 나타났다(도 2의 패널 C). 따라서, F3.Ras 세포는 형질전환 이후에도 F3 세포와 유사하게 신경 줄기세포 특징을 유지하고 있었다. 신경구(neurosphere)형성 배양 조건하에서, F3.Ras 세포는 대조군 F3 세포 보다 큰 크기의 구를 형성하였다(도 2의 패널 D).

3. F3.Ras 세포는 암 줄기세포의 특성을 갖는다.

F3.Ras 세포가 성인 또는 소아의 뇌암으로부터 분리한 신경 암 줄기세포와 공통되는 특성[22-24]을 갖는지를 조사하기 위해, 먼저 뇌 종양 줄기세포에서 다량 발현되는 ABC 트랜스포터(transporter)의 한 종류인 ABCG2의 발현 수준을 비교하였다[25, 26]. F3.Ras 세포에서 ABCG2 mRNA의 수준은 현격하게 상향 조절되었다(도 3의 패널 A). ALDH 1 (aldehyde dehydrogenase 1)가 유방암, 폐암, 대장암, 두경부암 및 혈액순환성 종양세포에서 분리된 다양한 종양-유사 암세포의 확인에 유용한 새로운 암 줄기세포 마커로 인정되고 있다[27, 28, 29, 30, 31]. 예상한 바와 같이, ALDH1 mRNA의 수준이 F3.Ras 세포에서 현저하게 높게 나타났다(도 3의 패널B). 다음으로, 암 줄기세포의 원인이거나 또는 결과 중에 어느 하나로 인정되어 온 EMT (epithelial mesenchymal transition; 상피세포의 간질세포로의 변이)를 평가하기 위해 E-cadherin 단백질의 수준을 측정하였다[32-35]. 도 3의 패널 C의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, F3.Ras 세포는 F3 세포와 비교하여 E-cadherin의 소실이 눈에 띄게 나타났는데, 이로써 F3.Ras 세포가 EMT가 진행되고 있음을 알 수 있었다. 흥미롭게도, F3.Ras 세포에서는 E-cadherin 발현을 억제하는 것으로 알려진 Snail의 발현이 상당한 정도로 상향 조절되었다(도 3의 패널 C의 중간 패널). 또한, F3 세포 및 F3.Ras 세포는 태아 NSC, U87 신경교종세포주 및 U87 구형 줄기세포성 암세포와 유사하였다. 예상한 바와 같이, F3 세포가 태아 신경 줄기세포(fNSCs)에 v-myc 유전자를 도입하여 제작하였기 때문에 c-myc 발현은 F3 세포 및 F3.Ras 세포 모두에서 발견되었고, F3.Ras 세포에서만 강한 H-Ras 발현이 발견되었다. 이와 일치하게, 높은 phospho-Rb 수준이 F3.Ras 세포에서 관찰되었는데, 이는 증식능이 활성화 상태에 있음을 지시하는 것이다. 주목할만하게, p53 단백질 수준이 F3 세포 및 F3.Ras 세포에서 모두 높게 나타났는데, 이는 v-myc 발현에 의해 유도된 것이다(도 3의 패널 D).

4. F3.Ras 세포는 생쥐에서 중추 신경교종(glial tumor)을 형성하였다.

F3.Ras 세포가 인 비모 조건하에서 종양을 형성시킬 수 있는 지를 조사하였다. F3 세포를 실험 생쥐의 오른쪽 허벅지에, F3.Ras 세포를 실험 생쥐의 왼쪽 허벅지안으로 주입한 후 6주 시점에서, F3.Ras 세포가 주입된 왼쪽 허벅지 부분(도 4 패널 A에서 직선으로 표시된 부분)에서 종양이 형성되었다. 종양 덩어리를 외과적으로 적출한 후에 관찰한 결과, F3 세포 및 F3.Ras 세포로부터 생성된 종양 덩어리 사이에는 명확한 차이가 관찰되었다(도 4 패널 A의 아래 쪽 패널).

도 4 패널 B에서 보여지는 바와 같이, F3.Ras 세포로 주입된 생쥐에서의 종양 형성이 명확하게 나타났다. F3.Ras-유도된 종양의 전체적인 외관은 분화되지 않았거나 또는 거의 분화되지 않은 신경상피세포로 구성된 부드러운 폴립 종양의 모습이었다. 종양을 현미경 관찰한 결과 원섬유성 세포질이 부족한 작고 균일한 세포와 유사분열이 자주 발생하는 타원형의 핵으로 구성된 세포 종양의 모습이 관찰되었다. 종양 세포는 분산된 장미꽃 모양을 갖는 소엽에 배열되어 있었다(도 4 패널 B).

종양 조직에 대한 특성을 더욱 상세히 분석하기 위해, Ki-67, hNestin, 및 GFAP에 대한 항체를 사용하여 면역조

직화학 연구를 수행하였다. 테스트한 전체 종양 조직의 작은 부분이 hNestin에 대해 양성을 나타냈는데 이는 감염된 F3.Ras 세포의 신경 줄기세포특성이 종양 발달 단계에서 소실되어 버렸다는 것을 암시한다. 증식성 항원인 Ki-67에 대해 양성인 세포는 비교적 적게 나타났는데, 이는 매우 적은 수의 F3.Ras 세포만이 암으로 발전된 후에도 증식능을 유지한다는 것을 시사하는 것이다(도 4 패널 C). 이와 같은 결과들은 유사분열 마커인 phospho-H3에 대해 염색한 면역조직화학적 이미지와 일치하는 결과들이다. 매우 극소수의 세포들이 phospho-H3에 대해 양성 결과를 보였으며, 이는 Ki-67 면역조직화학적 결과와 일치하는 결과이었다(도 4 패널 D). 매우 적은 수의 종양세포에서 발현되는 hNestin와는 다르게, 신경아교세포 분화의 세포 특이 마커로 광범위하게 사용되는 GFAP에 대해서는 보다 광범위하게 양성을 나타내었다(도 4 패널 C 및 패널 D). 이와 대조적으로, U373 인간 신경교종 세포를 주입한 종양 조직은 Nestin 양성 세포가 없는 GFAP 및 Ki-67 양성 세포로 구성되어 있었다. 인간 프로브를 갖는 FISH (fluorescent in situ hybridization) 분석의 결과 종양조직이 F3.Ras 세포가 주입된 인간 세포로부터 유래된 것이라는 점이 입증되었다(도 4 패널 E). 이러한 결과들은 F3.Ras 세포가 주로 GFAP-양성 신경아교세포로 구성되고 추가적으로 비분화된 hNestin-양성 신경 줄기세포를 소수 포함하는 신경아교세포 종양을 형성한다는 점을 입증한다.

[0081] **5. F3.Ras 세포는 생쥐 뇌에서 뇌 종양으로 발전한다.**

[0082] F3.Ras 세포를 뇌안으로 주입한 후에, 세포성 종양세포들이 뇌 반구의 많은 부분에 위치하였다(도 5의 패널 A 및 B). 이들 종양들은 비-분화 또는 거의 분화되지 않은 신경상피세포들로 구성되어 있었다. 종양세포들은 뚜렷이 눈에 띄는 핵이 없이 달걀모양의 형태를 하고 있었으며 유사분열이 빈번하게 나타났다. 이러한 종양내에서 지리적 응고괴사도 관찰되었다. 종양 세포들이 인간으로부터 유래된 것인지를 확인하기 위해 생쥐의 뇌에서의 종양 덩어리를 hNuA (human nuclear antigen)에 대한 특이 항체를 사용하여 면역염색을 행하였다. 종양 부분은 양성 hNuA 염색에 의해 명확하게 구분되었다(도 5의 패널 C 아래 오른쪽 패널). F3.Ras 세포로부터의 종양 모델에서와 같이(도 4c 및 도 4d), hNestin 및 GFAP가 종양 조직내에서 발현되었으나, MAP2는 발현되지 않았는데, 이는 F3.Ras 세포가 암세포성의 줄기세포 (Nestin 양성) 또는 정상세포성 세포(GFAP 양성) 중의 어느 하나로 비대칭적인 자기-복제 과정을 거치지만, 신경세포로는 전환되지 않는다는 것을 암시한다(도 5c). 네스틴(hNestin) 양성 세포가, F3.Ras 세포로 주입된 대퇴근육에서 보다 F3.Ras 세포가 이식된 뇌에서 더 많이 존재한다는 점은 주목할만하다(도 4c).

[0083] **6. p53 종양-억제 특성의 손상**

[0084] 정상의 초대 배양된 인간 세포는 다양한 종양 억제 메커니즘을 갖추고 있고 H-ras와 같은 종양성 스트레스에 내성을 갖기 때문에, 종양-억제 메커니즘 특히 p53을 포함하는 메커니즘의 손상이 H-Ras에 의한 세포변형의 선결 조건으로 간주된다[10, 36]. F3.Ras 세포 제조하는 경우에서, 모세포인 v-myc 발현 hFNSC (F3) 세포는 p53을 손상시키는 추가적인 유전적 변형 없이도 H-Ras의 도입만으로도 종양성 형질전환이 수행되었다. 따라서, F3 세포는 p53 종양-억제 메커니즘 활성도가 낮을 것으로 추측된다. F3 세포 및 F3.Ras 세포에 대해 H-Ras 도입에 의해 신호전달이 변경되었는지를 평가하기 위해, 인산-키나아제 프로파일러 어레이(phospho-kinase profiler array)를 수행하였다. F3.Ras 세포내에서의 AKT 인산화(세린 473) 및 MEK1/2 인산화 (세린 218/222, 세린 222/226)의 고-인산화가 나타난다는 점을 고려하여(도 6의 패널 D), 프로파일러 어레이를 평가하였다. F3.Ras 세포 용해물내에서 p53의 활성화 또는 안정성의 증가를 암시하는 p53의 고-인산화 수준이 확인되었다(i: 세린 46, ii: 세린 15). 이러한 결과는 H-Ras를 F3 세포에 도입하면 p53 인산화가 시작되고 이는 추가적으로 p53-의 종성 종양 억제 메커니즘을 활성화시킨다는 것을 입증하는 것이다. H-Ras 도입후에 p53 의존성 유전자들의 변형된 프로파일을 모니터링하기 위해서, F3 세포에 대해 p53 신호전달 경로 PCR 어레이를 행하였다 [37]. 테스트한 13개의 포지티브 유전자들중에서, CDKN1A 및 NF1을 포함하여 11개 유전자들은 H-Ras 도입한 후에도 F3 세포와 비교하여 현저하게 감소하였다(도 6의 패널 B). 특히, 신경교종 발생 동안 또는 신경교종내에서 자주 억제되어 있거나 변이되어 있는 neurofibromin 1(Nf1)을 인코딩하는 종양 억제 유전자 NF1 [38, 39]은 H-Ras 도입후에 매우 낮은 수준인 것으로 검출되었다. F3.Ras 세포에서 낮아진 Nf1 수준은 면역블로팅 분석을 통해서도 확인되었다. 마지막으로 F3 및 F3.Ras 세포를 자외선 C (UVC) 조사하여 자극하고, p53 전사 활성화 및 밀접하게 대응하는[40] Gadd45a mRNA 수준을 측정하였다. p53이 없는 HCT116 세포와 유사하게, F3 및 F3.Ras 세포는 Gadd45a 을 유도하지 않는 반면, p53 야생형 HCT116 세포는 UVC 조사 스트레스에 노출시킨 후에 Gadd45a mRNA 를 유도하였다(도 6의 패널 C). nutlin3 (p53 축적을 일으키는 mdm2의 억제자)으로 처리한 후의 F3 세포 및 F3.Ras 세포에서의 p21의 단백질 수준은 HCT116 야생형 세포에서의 검출된 수준 보다 현저히 낮았다(도 6의 패널 D). 이러한 결과들은 F3 세포가 p53 활성이 손상되어 있으며, 이는 H-Ras를 도입한 후에 관찰되는 F3 세포

의 종양발생 감수성의 원인이 될 수 있다.

[0085] **7. F3 세포의 종양발생 자극에 대한 감수성**

[0086] F3 세포에서의 p53-의존성 전사 활성이 낮은 것은 H-Ras 도입의 단일한 종양발생 자극의 결과와 같이 종양 발생 능과 관련되어 있을 것이다. 이를 평가하기 위해, F3 세포를 희돌기교세포 계열 전사 인자 Olig2 유전자로 형질도입하여 희돌기교세포를 생성시켰다(도 7의 패널 A). F3 세포로부터 유래된 희돌기교세포(F3.Olig2)에는 각각 면역조직화학 및 RT-PCR을 통해 확인되는 바와 같이 hNestin (도 7 패널 A의 왼쪽 패널)과, Sox2(도 7 패널 A의 오른쪽 패널)에 대해 음성을 나타내었으나, 희돌기교세포 마커인 CNPase는 매우 높은 양성 반응을 나타내었다(도 7 패널 A의 아래쪽 패널). 종양발생 감수성을 비교하기 위해, H-Ras를 도입한 후에 F3 세포의 콜로니 형성을 관찰하였다. 도 7의 패널 B에서 보여지는 바와 같이, F3 세포에 H-Ras를 도입한 경우 형질전환된 세포의 특징적인 형태를 가진 세포의 콜로니 형성을 유도하였으나, F3.Olig2 세포에서는 H-Ras가 안정적으로 발현되고 F3 세포에서와 마찬가지로 후속적으로 ERK 활성화가 일어났음에도 F3.Olig2 세포에서는 이와 같은 형질전환된 형태의 세포 콜로니가 형성되지 않았다. F3 세포 또는 F3.Olig2 세포를 형질전환시키는 H-Ras의 능력을 확인하기 위해, H-Ras 도입후에 동일한 수의 세포를 소프트 아가(soft agar)에 접종하였다. 예상된 바와 같이, H-Ras를 도입한 경우에 소프트 아가에서 F3 세포의 경우 콜로니가 형성되었으나, F3.Olig2 세포는 콜로니가 형성되지 않았다(도 7의 패널 C). 이러한 결과는 F3 세포의 분화된 형태인 F3.Olig2 세포는 H-Ras 매개된 종양발생 자극에 감수성을 갖지 않는다는 것을 입증한다.

[0087] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

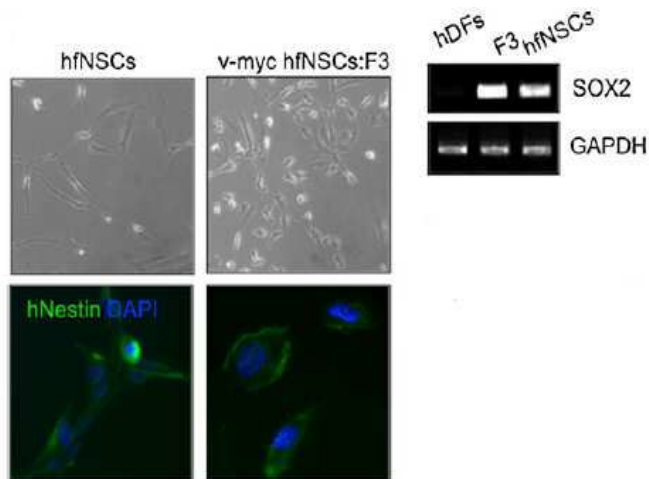
[0088] **참고문헌**

- [0089] 1. Sanai, N. et al.(2005). The New England Journal of Medicine, 353, 811822.
- [0090] 2. Rich, J. N. et al., (2001). Cancer Research, 61, 3556-3560.
- [0091] 3. Zhu, Y., et al. (2005). Cancer Cell, 8, 119-130.
- [0092] 4. Kwon, C. H. et al., (2008). Cancer Research, 68, 3286-3294.
- [0093] 5. Doetsch, F., et al. (1999). Cell, 97, 703-716.
- [0094] 6. Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). Neuron, 41, 683-686.
- [0095] 7. Alcantara Llaguno, S. R. et al. (2009). Clinical Cancer Research, 15, 7124-7129.
- [0096] 8. Fan, X., & Eberhart, C. G. (2008). Journal of Clinical Oncology, 26, 28212827.
- [0097] 9. Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C., et al. (2009). Cancer Cell, 15, 45-56.
- [0098] 10. Hahn, W. C., et al. (1999). Nature, 400, 464-468.
- [0099] 11. Hahn, W. C. (2002). Molecules and Cells, 13, 351-361.
- [0100] 12. Rasheed, B. K., et al. Current Opinion in Oncology, 11, 162-167.
- [0101] 13. Chen, Z., et al. (2005). Nature, 436, 725-730.
- [0102] 14. Ferbeyre, G., et al. (2002). Molecular and Cellular Biology, 22, 3497-3508.
- [0103] 15. Reilly, K. M., et al., (2000). Nature Genetics, 26, 109-113.
- [0104] 16. Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., et al. (1998). Nature Biotechnology, 16, 1033-1039.
- [0105] 17. Satoh, J. I., et al. (2010). Cellular and Molecular Neurobiology, 30, 415426.

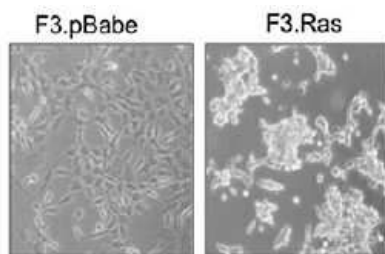
- [0106] 18. Kim, S. U., Nagai, A., Nakagawa, E., et al. (2008). *Methods in Molecular Biology*, 438, 103-121.
- [0107] 19. Arnold, R. S., Shi, J., Murad, E., et al. (2001). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5550-5555.
- [0108] 20. Kim, S. U., Park, I. H., Kim, T. H., et al. (2006). *Neuropathology*, 26, 129-140.
- [0109] 21. Cai, J., Wu, Y., Mirua, T., et al. (2002). *Developmental Biology*, 251, 221-240.
- [0110] 22. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., et al. (2004). *Nature*, 432, 396-401.
- [0111] 23. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., et al. (2003). *Cancer Research*, 63, 5821-5828.
- [0112] 24. Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., et al. (2003). *PNAS*, 100, 15178-15183.
- [0113] 25. Bleau, A., Hambarzumyan, D., Ozawa, T., et al. (2009). *Cell Stem Cell*, 4, 226-235.
- [0114] 26. Patrawala, L., et al., *Cancer Research*, 65, 6207-6219.
- [0115] 27. Ginestier, C., et al. (2007). *Cell Stem Cell*, 1, 555-567.
- [0116] 28. Jiang, T., et al. (2009). *Cancer Research*, 69, 845-854.
- [0117] 29. Huang, E. H., et al. (2009). *Cancer Research*, 69, 3382-3389.
- [0118] 30. Chen, Y. C., et al. (2009). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385, 307-313.
- [0119] 31. Theodoropoulos, P. A., et al. (2010). *Cancer Letters*, 288, 99-106.
- [0120] 32. Mani, S., et al. (2008). *Cell*, 133, 704-715.
- [0121] 33. Morel, A., et al. (2008). *PloSOne*, 3, e2888.
- [0122] 34. Kabashima, A., et al. (2009). *International Journal of Cancer*, 124, 2771-2779.
- [0123] 35. DiMeo, T., et al. (2009). *Cancer Research*, 69, 5364-5373.
- [0124] 36. Mizumoto, Y., et al. (2006). *Oncogene*, 25, 5673-5682.
- [0125] 37. Brockschmidt, C., et al. (2008). *Gut*, 57, 799-806.
- [0126] 38. McGillicuddy, L. T., et al. (2009). *Cancer Cell*, 16, 44-54.
- [0127] 39. Li, Y., et al. (1992). *Cell*, 69, 275-281.
- [0128] 40. Kastan, M., et al. (1992). *Cell*, 71, 587-597.
- [0129] 41. Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2002). *The New England Journal of Medicine*, 347, 1593-1603.
- [0130] 42. Lundberg, A. S., et al. (2002). *Oncogene*, 21, 4577-4586.
- [0131] 43. Eliyahu, D., et al. (1989). *PNAS*, 86, 8763-8767.
- [0132] 44. Kim, H. S., et al. (2001). *Experimental & Molecular Medicine*, 33, 293-298.
- [0133] 45. Hermeking, H., & Eick, D. (1994). *Science*, 265, 2091-2093.
- [0134] 46. Yu, K., et al. (1997). *Cell Growth & Differentiation*, 8, 731-742.
- [0135] 47. Ahn, S. M., et al. (2008). *PloS One*, 3, e3917.
- [0136] 48. Gupta, P. B., et al. (2009). *Cell*, 138, 645-659.
- [0137] 49. Shieh, S. Y., et al. (1997). *Cell*, 91, 325-334.
- [0138] 50. D'Orazi, G., et al. (2002). *Nature Cell Biology*, 4, 11-19.
- [0139] 51. Tang, Y., et al. (2008). *Cell*, 133, 612-626.
- [0140]

도면

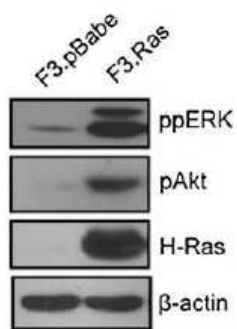
도면1a



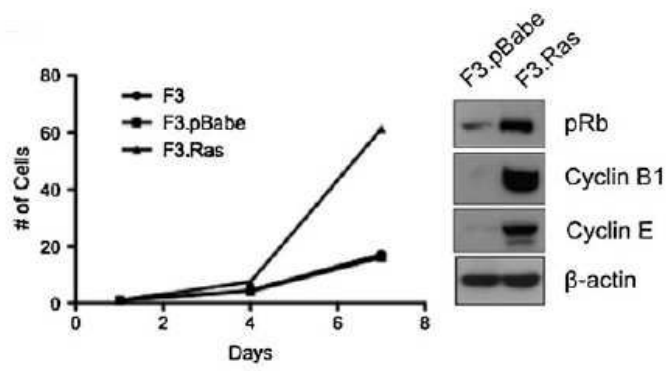
도면1b



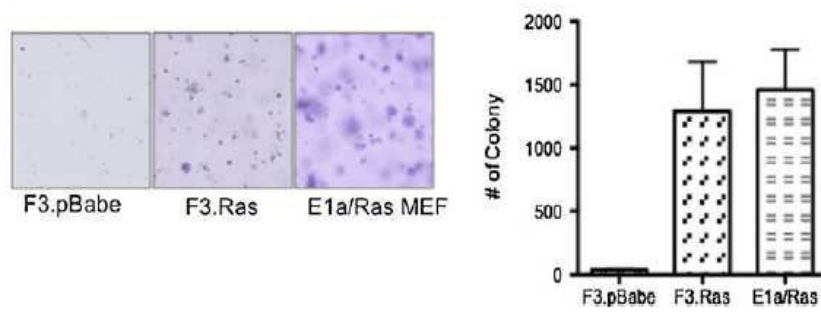
도면1c



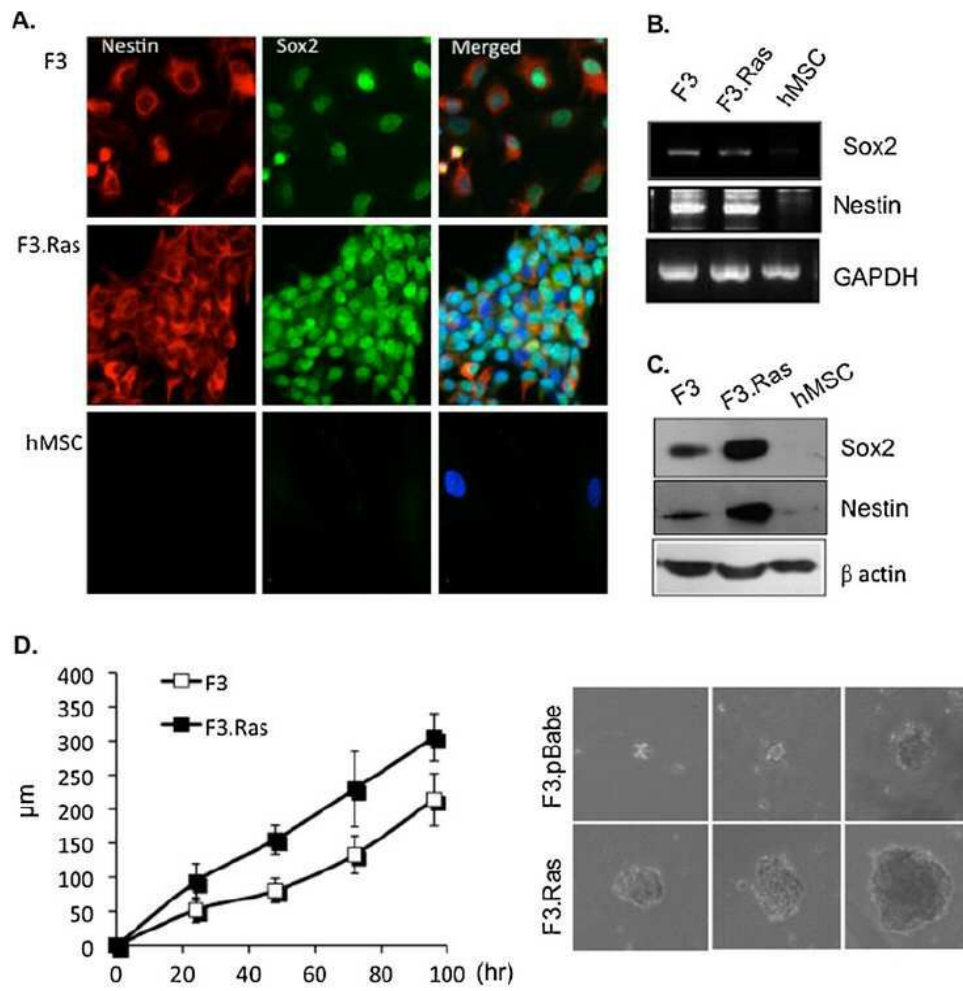
도면1d



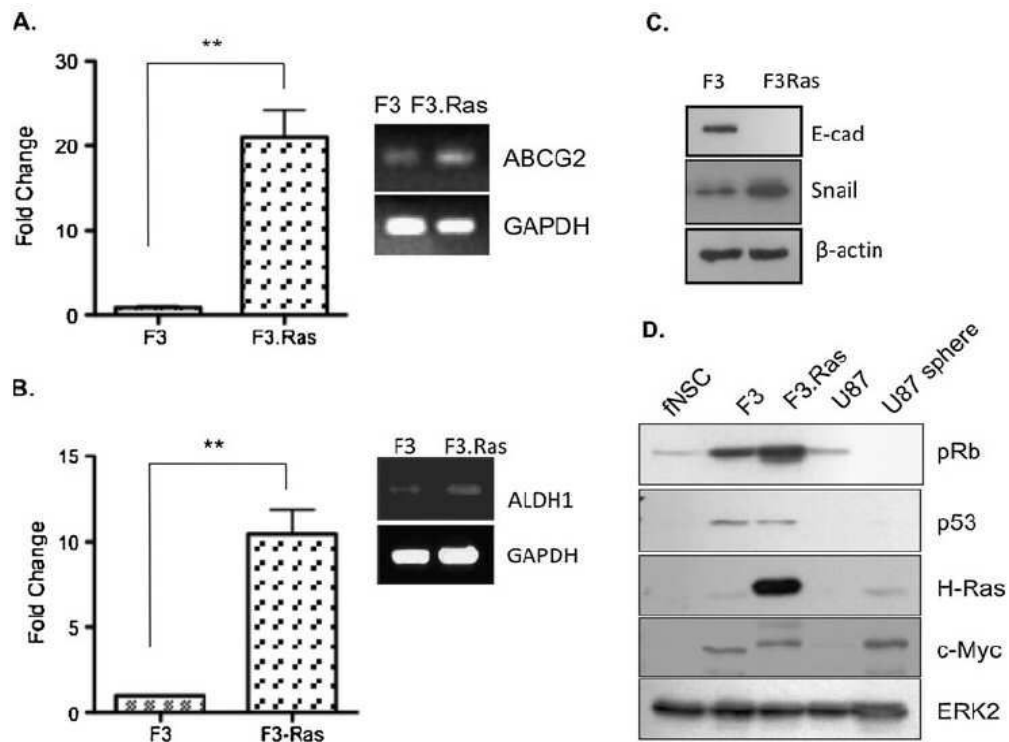
도면1e



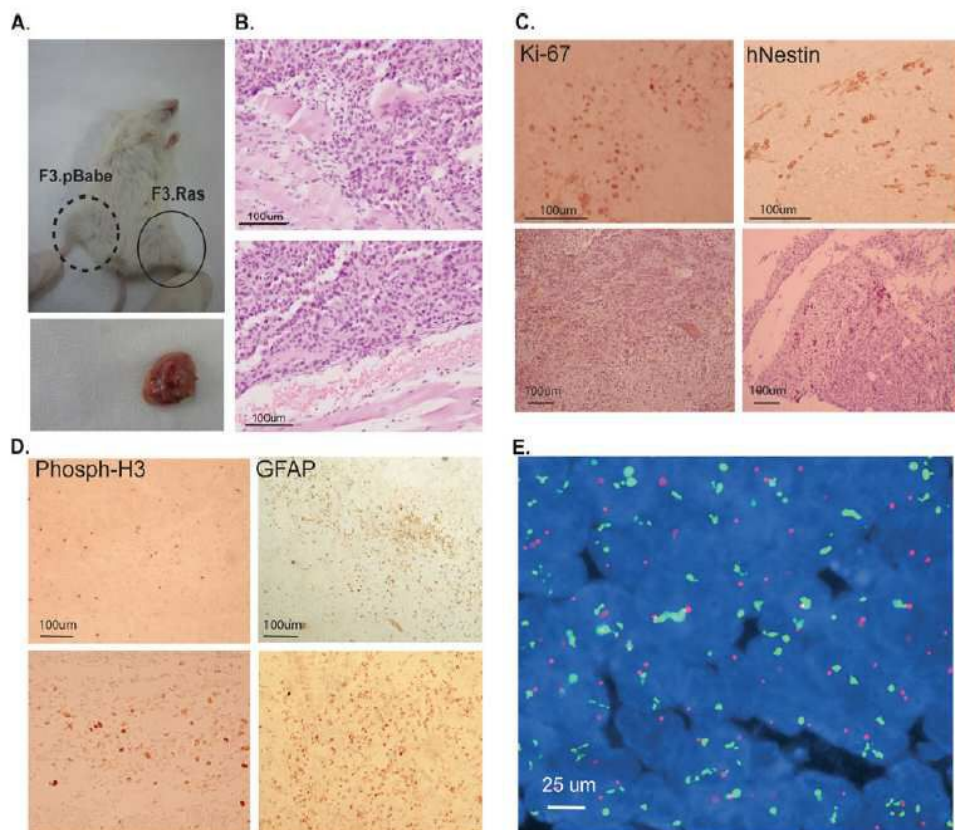
도면2



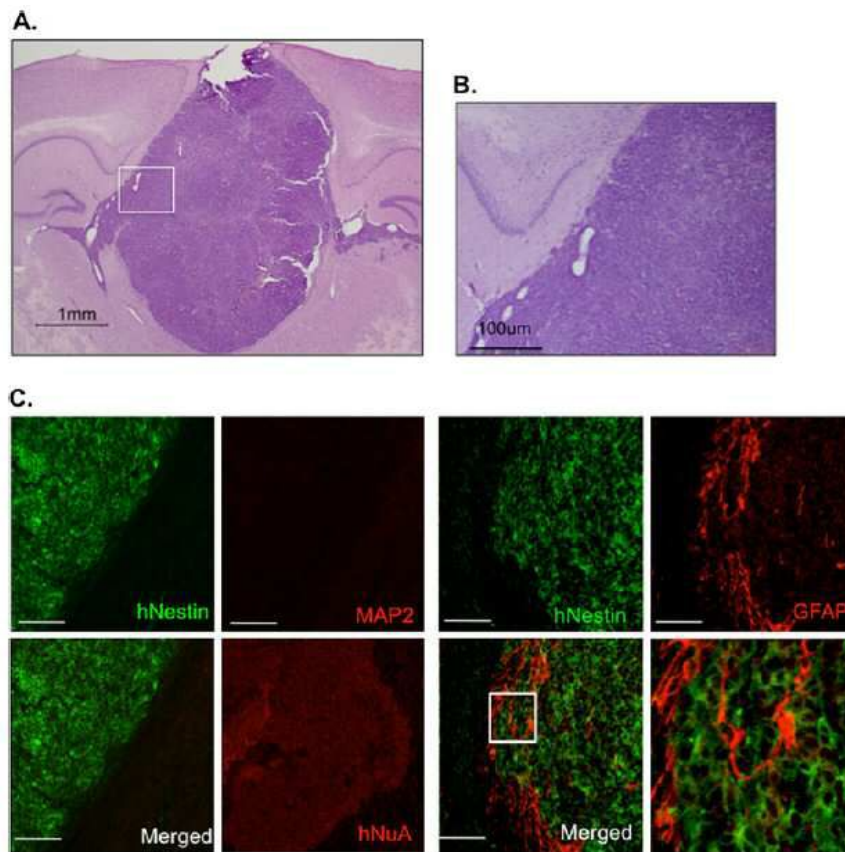
도면3



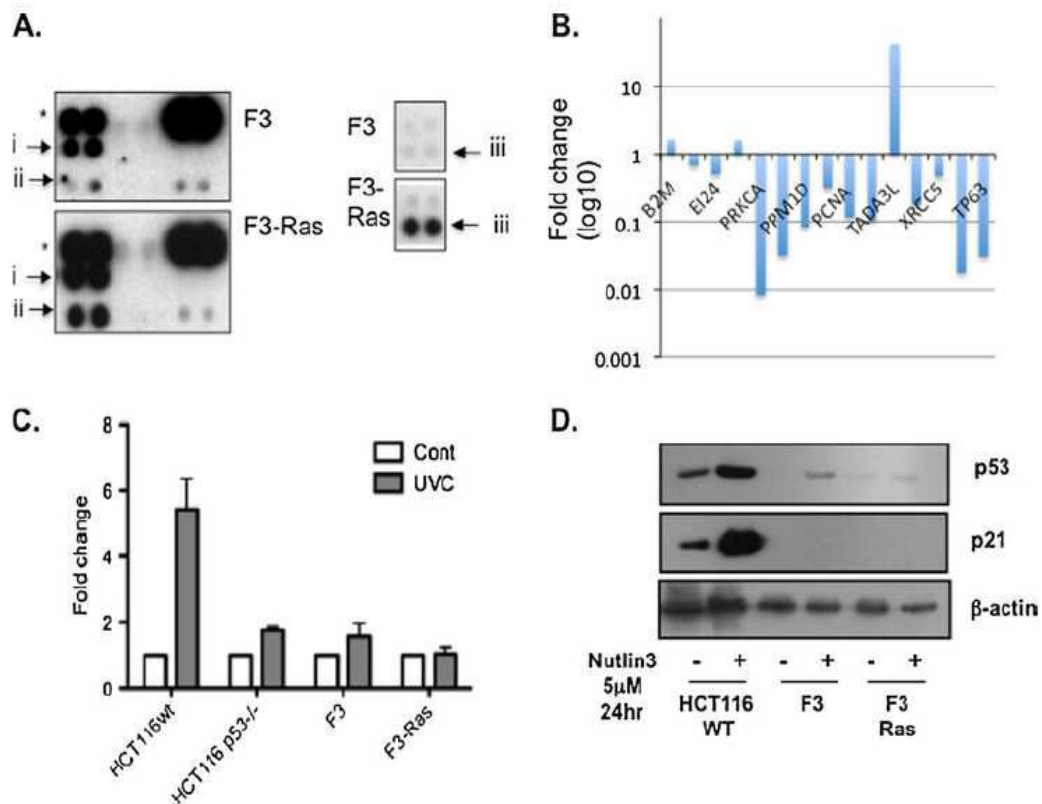
도면4



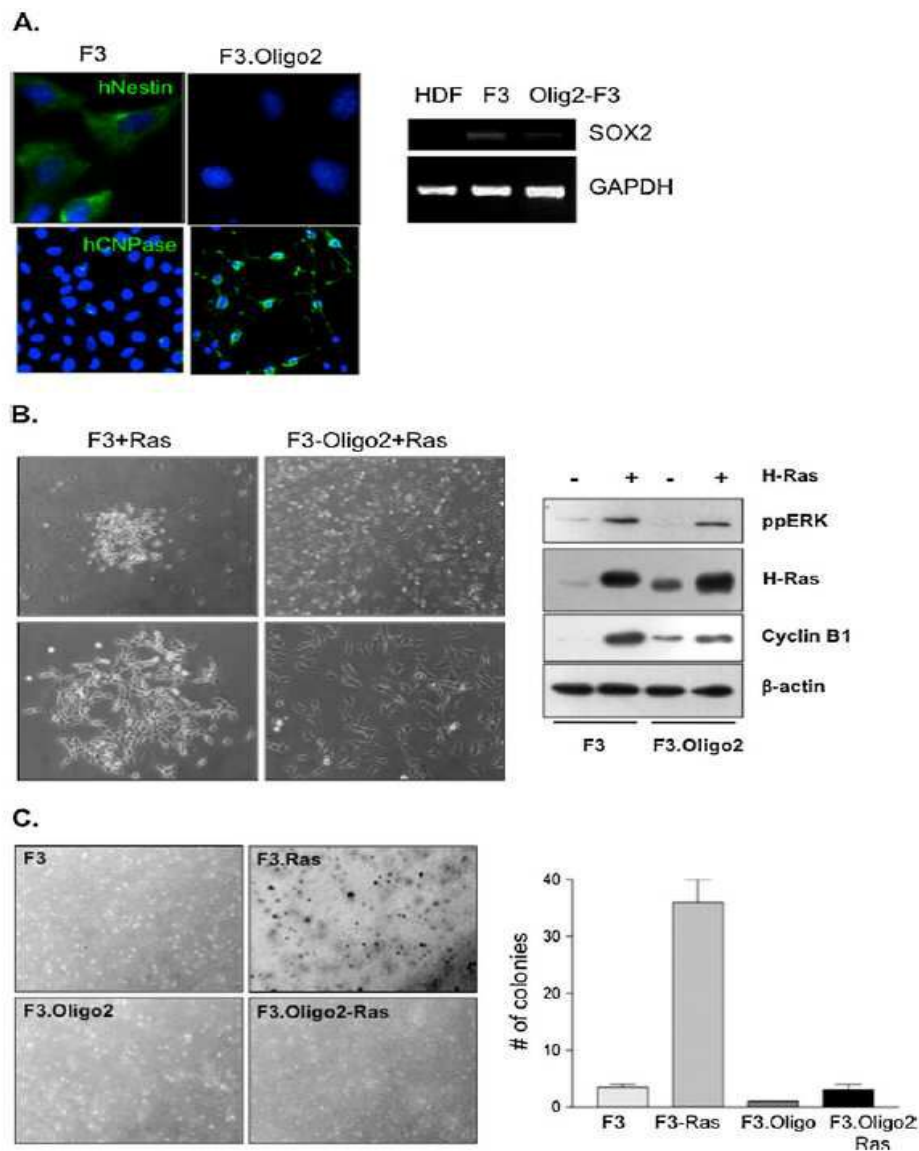
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> CHUNG-ANG University Industry Academic Cooperation Foundation

Sogang University Industry Academic Cooperation Foundation

<120> Cancer Stem Cell and The Method of Preparing the Same

<160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 416

<212> PRT

<213> Retro-virus

<400> 1

Met Pro Leu Ser Ala Ser Leu Pro Ser Lys Asn Tyr Asp Tyr Asp Tyr

1 5 10 15
 Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Phe Glu Glu Glu Glu Glu Asn Phe

 20 25 30
 Tyr Leu Ala Ala Gln Gln Arg Gly Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro
 35 40 45
 Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu
 50 55 60
 Ser Pro Ser Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Ser Cys Phe Pro Ser
 65 70 75 80
 Thr Ala Asp Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met
 85 90 95

 Val Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Ser Phe Val Lys
 100 105 110
 Ser Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala
 115 120 125
 Lys Leu Glu Lys Val Val Ser Glu Lys Leu Ala Thr Tyr Gln Ala Ser
 130 135 140
 Arg Arg Glu Gly Gly Pro Ala Ala Ala Ser Arg Pro Gly Pro Pro Pro
 145 150 155 160
 Ser Gly Pro Pro Pro Pro Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ser Ala Gly Leu

 165 170 175
 Tyr Leu His Asp Leu Gly Ala Ala Ala Ala Asp Cys Ile Asp Pro Ser
 180 185 190
 Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Ser Glu Arg Ala Pro Arg Ala Ala Pro
 195 200 205
 Pro Gly Ala Asn Pro Ala Ala Leu Leu Gly Val Asp Thr Pro Pro Thr
 210 215 220
 Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Glu Asp Glu Glu Ile Asp
 225 230 235 240

 Val Val Thr Leu Ala Glu Ala Asn Glu Ser Glu Ser Ser Thr Glu Ser
 245 250 255

Ser Thr Glu Ala Ser Glu Glu His Cys Lys Pro His His Ser Pro Leu
260 265 270

Val Leu Lys Arg Cys His Val Asn Ile His Gln His Asn Tyr Ala Ala
275 280 285

Pro Pro Ser Thr Lys Val Glu Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Leu Lys Leu
290 295 300

Asp Ser Gly Arg Val Leu Lys Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Ser

305 310 315 320

Ser Pro Arg Thr Ser Asp Ser Glu Glu Asn Asp Lys Arg Arg Thr His
325 330 335

Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Leu Ser Phe Phe
340 345 350

Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Val Ala Asn Asn Glu Lys Ala Pro
355 360 365

Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Glu Tyr Val Leu Ser Ile Gln
370 375 380

Ser Asp Glu His Arg Leu Ile Ala Glu Lys Glu Gln Leu Arg Arg Arg
385 390 395 400

Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Asn Ser Arg Ala
405 410 415

<210> 2

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr

50	55	60	
Ser Ala Met Arg Asp Gln			
65	70		
<210>	3		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PCR primer for Sox2 gene		
<400>	3		
atgcaccgct acgacgtga		19	
<210>	4		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PCR primer for Sox2 gene		
<400>	4		
cttttgcacc cctcccat		20	
<210>	5		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PCR primer for hNestin gene		
<400>	5		
agaagaggac cagagtattg tgag		24	
<210>	6		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PCR primer for hNestin gene		
<400>	6		
tccgtcgtg ttgagtctc		19	
<210>	7		
<211>	25		

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for human ABCG2 gene

<400> 7

ttaagtggaa actgctgctt taggt 25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for human ABCG2 gene

<400> 8

tcggtcttaa ccaaagctc a 21