

명세서

발명의 명칭: 합성 메신저 RNA를 이용하여 소변세포를 신경줄기세포로 직접 역분화하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 소변세포로부터 신경줄기세포로의 직접 역분화 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 직접 역분화된 신경줄기세포를 포함하는 신경손상 질환의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 줄기 세포(stem cell)란 무한 자가 증식 능력 및 신체 내에서 필요로 하는 특정 세포 및 조직으로의 분화능을 가지고 있는 세포를 뜻한다. 줄기 세포는 그 종류를 3가지로 분류하고 있으며, 그 종류로는 초기 배아에서 분리한 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ES 세포), 배아의 원시 생식세포에서 분리한 배아 생식세포(embryonic germ cell, EG 세포), 및 다능성 성체 줄기세포(multipotent adult progenitor cell, MAPC 세포)가 있다.
- [3] 줄기세포는 특화된 기능을 가지는 세포로 분화하는 잠재력을 가지고 있으므로, 각종 장기의 기능회복을 위한 세포치료제로서의 연구대상이 되고 있으며, 최근에는 성형과 미용에 이르기까지 그 활용범위가 확대되고 있는 추세다.
- [4] 성체줄기세포의 체내에서의 역할은 크게 두 가지로 요약할 수 있는데 첫째는, 줄기세포 자체가 우리 몸에서 손상된 조직과 세포들로 분화되어 다시 재생시키는 역할이며, 두 번째는 일생동안 지속적으로 성장인자 및 사이토카인 등의 단백질을 분비하여 인근 세포의 성장 및 재생을 돕는 역할을 수행한다.
- [5] 직접 역분화(direct reprogramming) 방식은 체세포를 원하는 다른 타입의 세포로 전환할 수 있는 기술이다. 일본의 야마나카 교수의 역분화(reprogramming)와는 달리 만능성 줄기세포 상태를 거치지 않기 때문에 적은 시간과 높은 효율을 보이는 동시에 만능성 줄기세포의 종양발생 위험이나 추가분화 비용 등을 해결할 수 있다. 그러나, 현재 수행되고 있는 직접 역분화 방식은 세포원으로 마우스 세포를 주로 이용하여 인간 체세포에서 동일하게 재현될 확률이 높지 않다. 또한 인간의 체세포 중에서는 흔히 피부세포(섬유아세포)를 사용하지만, 이 경우 침습적 방식의 세포원 채취 방법이 필요하여 공여자의 고통, 안전성 위험을 초래하며 편이성이 떨어진다. 또한, 직접 역분화시에 요구되는 역분화 인자(유전자) 도입 방식으로 주로 바이러스를 이용하고 있어 임상적 이용이 어려우며 바이러스를 이용한 유전자 삽입 시스템(integration-system)의 경우 유전체에 무분별한 삽입을 통한 변이를 유발하기 때문에 치료용으로 적합하지 않다.
- [6] 이에 본 발명자들은 세포원으로 채취가 용이한 인간 소변유래 세포를 이용하고, 역분화 인자의 세포 도입에 합성 mRNA의 트랜스펙션(transfection)을

이용함으로써 상기 문제를 해결하였으며, 소변세포로부터 신경줄기세포로 고효율의 직접 역분화에 요구되는 최적의 배양 조건을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[7] [선행기술문헌]

[8] 한국 공개 특허 제10-2013-0087020호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 소변세포로부터 신경줄기세포로의 역분화를 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 소변세포로부터 신경줄기세포로의 역분화를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 소변세포로부터 역분화된 신경줄기세포를 유효성분으로 신경손상 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명은

[13] (i) Oct4 단백질을 코딩하는 핵산;

[14] (ii) Sox2 단백질을 코딩하는 핵산;

[15] (iii) Klf4 단백질을 코딩하는 핵산; 및

[16] (iv) Glis1 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는, 소변세포로부터 신경줄기세포로의 직접 역분화를 유도하는 조성물을 제공한다.

[17] 본 발명에서 용어, "역분화 신경줄기세포"란 분화된 세포에 역분화기술을 이용하여 신경줄기세포와 유사 또는 동일한 다분화능(multi-potent)을 가진 미분화 상태의 줄기세포를 확립하는 방식으로 만들어진 세포들을 포함한다. 유도 신경줄기세포는 신경줄기세포와 동일 또는 유사한 특성을 가지고 있는데, 구체적으로는 비슷한 세포형태를 보여주고, 유전자 및 단백질 발현 패턴이 유사하며, 생체 내에서 다분화능을 가질 수 있다. 따라서 본 발명의 역분화 신경줄기세포는 신경세포(뉴런), 별아교세포, 희소돌기아교세포, GABA성 신경 세포 또는 도파민성 신경 세포 등으로 분화가능한 것일 수 있다.

[18] 본 발명에서 용어, "소변세포(Urine cells; UCs)"는 소변에서 아무런 불편과 고통 없이 언제든지 용이하게 반복적으로 얻을 수 있는 체세포로 알려져 있다.

[19] 본 발명자는 소변세포에서 역분화 인자인 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1을 발현시킬 경우, 이미 분화된 세포 타입인 소변세포가 분화능을 가지는 신경줄기세포로 역분화(de-differentiation)되는 것을 발견하였다.

[20] 상기 용어, "역분화 인자"는 2006년 Yamanaka 교수팀에 의해 도입된 개념인 역분화(Reprogramming)에서부터 시작되었다. 성체의 모든 세포는 정상 발달 과정을 거치면서 분화되지 않은 상태에서 점차적으로 분화되어 각 기능이

전문화된 세포로 변화한다. 그 중 수정란의 세포들은 전능성(Totipotent)을 가지고 있고 이 후 발달 단계가 진행되면서 배반포가 되면 내부 세포괴(inner cell mass)와 바깥쪽 세포들로 구분이 가능하게 이때의 내부 세포괴 세포들이 배아 세포와 생식 세포로 발생할 수 있으며 이를 만능성(pluripotent)라 부른다. 이 배아 줄기세포는 만능성 특유의 유전자 발현 양상을 보여주는데 그 대표적인 예가 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 등 이다. 역분화는 체세포에 이러한 특이적인 유전자 발현을 유도하여 배아 줄기세포 및 성체 줄기세포 등 미분화 세포와 유사한 성질로 되돌리는 기술이라 할 수 있다. Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 는 역분화 관련 일련의 연구들에서 사용되어 왔던 다양한 인자들 중의 일부로써 소변세포로부터 신경줄기세포로 역분화 시키는데 본 발명자들이 이용하였다.

- [21] 본 발명의 조성물에 사용되는 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 은 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1을 포함하며, 바람직하게는 인간 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 이다. 또한, 신경줄기세포로의 역분화에 사용되는 본 발명의 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질은 이의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질의 변이체를 포함할 수 있다.
- [22] 구체적인 일 실시예에서, 상기 역분화에 처음 사용된 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1의 유전자 서열은 Nature. 2011 Jun 8;474(7350):225-9에 개시된 것을 사용하였다.
- [23] Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질의 변이체란 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있다. 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체이다.
- [24] 상기 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산으로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [25] 상기 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에서, Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질을 코딩하는 핵산은 합성 메신저 RNA(mRNA)를 이용하였고, 상기 합성 메신저 RNA는 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1를 발현하는 DNA를 도입한 합성 mRNA 발현 벡터를 이용하여 제조될 수 있다.
- [26] 본 발명은 소변세포에 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질 또는 상기 단백질을

코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는 소변세포를 신경 줄기세포로 직접 역분화를 유도하는 방법을 제공한다.

- [27] 보다 구체적으로,
- [28] (a) 소변으로부터 소변세포를 분리 배양하는 단계;
- [29] (b) 상기 배양한 소변세포에 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및
- [30] (c) 상기 조성물이 도입된 소변세포를 신경줄기세포 유도 배지에서 배양하여 신경줄기세포로 직접 역분화를 유도하는 단계;
- [31] (d) 상기 신경줄기세포로 직접 역분화를 유도한 세포에서 신경줄기세포의 특징 가지고 있는 신경줄기세포주를 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [32] 상기 단계 (a)에서 소변세포의 배양은 FBS(fetal bovine serum) 및 bFGF(basic fibroblast growth factor), EGF (epithelial growth factor) 함유 배지에서 이루어질 수 있다.
- [33] 본 발명에서 사용된 용어, "배지(culture medium)"는 *in vitro* 상에서 세포들의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 소변세포 및 역분화 신경줄기세포 유도 및 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지 및 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium; CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예들 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α MEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), 및 IMEM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin) 또는 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 소변에서 분리한 세포들을 FBS, bFGF 및 EGF를 함유하는 기본 배지에서 배양함으로써 수득할 수 있으며, 구체적으로 FBS가 포함된 하이 글루코즈 DMEM 및 REGM(Renal Epithelial Cell Growth Medium) 배지에 bFGF 및 EGF를 첨가하여 배양함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 더 구체적으로, 상기 하이 글루코즈 DMEM 및 REGM 배지는 L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신을 추가로 포함할 수 있다.
- [35] 상기 (b) 단계에서, 역분화 인자를 소변세포에 도입하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 세포에 핵산분자 또는 단백질을 제공하는 방법을 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 역분화 인자를 분화된 세포의 배양액에 투여하는 방법 또는 역분화 인자를 분화된 세포에 직접 주입하는 방법을 사용할 수 있으며, 이 때 사용되는 역분화 인자는 해당인자의 유전자를 삽입한 바이러스 벡터로 형질감염시킨 패키징 세포로부터 수득한 바이러스,

시험관내 전사 (in vitro transcription)에 의해 생산한 메신저 RNA, 또는 다양한 세포주 내에서 생산된 단백질 등의 형태로 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 소변세포로의 상기 역분화 인자의 도입은 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1를 코딩하는 DNA의 전사에 의해 생산된 메신저 RNA를 사용하였다.

- [36] 상기 전사 합성된 메신저 RNA를 분화된 세포에 직접 주입하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 선택하여 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 직접근육주입법, 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존을 이용한 방법 중에서 적절하게 선택하여 적용할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 실시예에서 역분화 인자의 메신저 RNA는 전기천공법을 이용하여 소변세포에 도입되었다.
- [37] 상기 단계 (c)에서 Oct4, Sox2, Klf4 및 Glis1 단백질을 코딩하는 핵산이 도입된 소변세포들을 신경줄기세포로 유도하는 배지(신경줄기세포 유도 배지)는 DMEM/F12 배지와 Neurobasal 배지를 1:1 부피비로 섞고 상기 배지 혼합물에 1xN2, 1xB27, human LIF, TGF-beta inhibitor 및 GSK3-beta inhibitor를 첨가한 배지일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 배지는 Shh agonist, adenylyl cyclase activator, histone deacetylase inhibitor 및 ascorbic acid 2-phosphate 중 하나 이상을 추가로 더 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, Shh agonist, adenylyl cyclase activator, histone deacetylase inhibitor 및 ascorbic acid 2-phosphate를 모두 첨가한 배지에서의 신경줄기세포 전환률이 가장 우수함을 확인하였다.
- [38] 또한, 상기 배지에서의 소변세포 배양은 저 산소(O_2 hypoxia) 조건에서 수행하는 경우 유도 효율이 증가할 수 있다.
- [39] 상기 단계 (d)에서 유도된 신경줄기세포들의 선별은 상기 단계 (C)를 수행한 후 생성된 신경줄기세포 콜로니를 채취하는 것이며, 상기 선별된 신경줄기세포는 신경줄기세포 배지에서 배양할 수 있다. 상기 신경줄기세포 배지는 DMEM/F12 배지와 Neurobasal 배지를 1:1 부피비로 혼합한 배지에 1xN2, 1xB27, human LIF, TGF-beta inhibitor 및 GSK3-beta inhibitor를 첨가한 배지일 수 있다. 추가로, 상기 유도된 신경줄기세포는 0.5mM EDTA 용액 혹은 Accutase 용액을 이용하여 계대 배양할 수 있다.
- [40] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 유도된 신경줄기세포를 유효성분으로 포함하는 신경손상 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [41] 신경줄기세포는 신경세포(뉴런), 별아교세포, 희소돌기아교세포, GABA성 신경 세포 또는 도파민성 신경 세포 등으로 분화가능한 다분화능을 가진 세포로, 상기 손상되거나 소실된 신경세포들을 복구할 수 있어, 상기 신경 세포들의 손상 또는 소실로 인해 발생하는 질환을 제한없이 치료가 가능하다.
- [42] 구체적으로, 상기 신경세포 손상으로 발생하는 질환은 파킨슨병, 알츠하이머, 피크병(Pick's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌질환(stroke),

탈수초질환(demyelinating disease), 다발성 경화증, 간질, 퇴행성 신경질환 및 척추 손상(spinal cord injury)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [43] 본 발명은 인간 소변유래 세포를 세포원으로 활용하여 세포원 확보의 편의성을 극대화하며 합성 mRNA를 이용한 non-integration 방식의 직접적 역분화 방법으로 임상적 이용 가능성을 높인 기술이다.

도면의 간단한 설명

- [44] 도 1은 OCT4, KLF4, SOX2 및 GLIS1 유전자의 합성 mRNA를 제조하기 위한 T7-VEE-OKS-iG 벡터 모식도이다.
- [45] 도 2는 GFP(형광 유전자)가 결합된 OCT4, KLF4, SOX2 및 GLIS1 유전자의 합성 mRNA의 소변세포로의 도입여부를 FACS 분석을 통해 확인한 결과이다.
- [46] 도 3은 소변세포를 직접 역분화 기술을 이용하여 유도된 신경줄기세포의 콜로니를 얻기까지의 전체 공정을 도식한 것이다.
- [47] 도 4는 H9 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포를 positive control로 한 RT-PCR를 통한 mRNA 수준 분석을 통하여 유도된 신경줄기세포가 SOX1, SOX2, PAX6 및 PLZF와 같은 신경줄기세포 마커 유전자를 발현하는지 여부를 확인한 결과이다.
- [48] 도 5는 면역분석법을 통하여 단백질 수준에서 유도된 신경줄기세포가 SOX1, NESTIN, SSEA1, SOX2, PAX6 및 PLZF와 같은 신경줄기세포 마커 유전자를 발현하는지 여부를 확인한 결과이다.
- [49] 도 6은 Ki67의 면역염색을 통해서 유도된 신경줄기세포가 분화능력을 갖는지 여부를 확인한 결과이다.
- [50] 도 7은 qRT-PCR을 통한 mRNA의 양적 분석을 통하여 H9 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포 대비 유도된 신경줄기세포가 SOX1, SOX2, PLZF, PAX6와 같은 신경줄기세포 마커 유전자를 발현하는지 여부를 확인한 결과이다.
- [51] 도 8은 RT-PCR을 통한 mRNA 수준 분석을 통하여 유도된 신경줄기세포가 발달학상 전뇌(forebrain), 중뇌(midbrain), 후뇌(hindbrain) 및 척수(spinal cord) 특이적인 마커 유전자를 발현하는지 여부를 확인한 결과이다.
- [52] 도 9 및 도 10은 total RNA 시퀀싱(sequencing)을 통해 전체 유전자 발현 수준(global gene expression level)에서 유도된 신경줄기세포가 본래의 소변유래 세포보다 H9 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포와 유사한 mRNA 및 lnc-RNA(long non-coding - RNA) 발현 패턴을 보이는지 여부를 확인한 결과이다.
- [53] 도 11은 VEE 유전자의 RT-PCR 및 게놈 DNA PCR 분석을 통해 유도된 신경줄기세포 내에 도입시킨 합성 mRNA가 숙주 내 잔존하는지 여부 및 숙주 유전체에 삽입(integration)되는지 여부를 확인한 결과이다.
- [54] 도 12는 유도된 신경줄기세포가 인간 소변세포로부터 유도된 것이 맞는지 STR analysis를 통해 확인한 결과이다.

- [55] 도 13은 유도된 신경줄기세포가 정상적인 염색체를 보존하고 있는지 여부를 핵형 분석을 통해 확인한 결과이다.
- [56] 도 14는 유도된 신경줄기세포가 신경세포로의 분화능력을 검증하기 위해 신경세포 유전자 마커인 TUJ1, MAP2의 발현을 면역검색법을 통해 확인한 결과이다.
- [57] 도 15는 유도된 신경줄기세포가 GABA신경세포, 운동신경세포 및 도파민신경세포로 분화할 수 있다는 것을 면역염색법을 통해 확인한 결과이다.
- [58] 도 16은 유도된 신경줄기세포가 신경교세포인 성상세포로의 분화능력을 검증하기 위한 마커인 S100beta, GFAP의 발현을 면역검색법을 통해 확인한 결과이다.
- [59] 도 17은 유도된 신경줄기세포가 신경교세포인 희소돌기아교세포로의 분화능력을 검증하기 위한 마커인 PDGFR, OLIG2, O4의 발현을 면역검색법을 통해 확인한 결과이다.
- [60] 도 18은 소변세포로부터 신경줄기세포로 유도하는 과정에서 날짜별 OCT4, REX4 및 NANOG의 상대적인 mRNA 발현량을 확인한 결과이다.
- [61] 도 19는 H9배아줄기세포와 유도된 신경줄기세포의 만능성 단계 마커 유전자들의 발현여부를 확인한 결과이다.
- [62] 도 20은 소변유래 세포를 저산소 조건(5% hypoxia)에서 신경줄기세포로 유도하는 경우의 전환율을 기본 조건(21% O₂)을 대조군으로 하여 비교한 결과이다.
- [63] 도 21은 DMEM/F12 배지와 Neurobasal 배지를 1:1 부피비로 섞고 상기 배지 혼합물에 1xN2, 1xB27, human LIF, TGF-beta inhibitor 및 GSK3-beta inhibitor를 첨가한 배지에서 Shh agonist, adenylyl cyclase activator, histone deacetylase inhibitor 및 ascorbic acid 2-phosphate 중 하나 이상을 추가로 더 포함하였을 때 신경줄기세포의 유도 효율이 증가하는 것을 확인한 결과이다. Shh agonist, adenylyl cyclase activator, histone deacetylase inhibitor 및 ascorbic acid 2-phosphate를 모두 첨가한 배지에서의 신경줄기세포 전환률이 가장 우수함을 확인하였다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [64] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [65] **실시예 1: 소변으로부터 소변세포(Urine cell)의 분리**
- [66] 1972년 영국의 Sutherland와 Bain가 개발한 기술을 기본으로 하며 구체적으로는 다음과 같다. 먼저 공여자에게 제공받은 소변을 1000g에 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거 후 하층에 남은 펠릿을 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B 항생제가 포함된 PBS 용액 20ml에

회석시켰다. 다음 회석된 PBS+펠릿 용액을 1000g에 10분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거 후 하층에 남은 펠릿을 gelatin이 코팅된 12 well cell culture dish에 기본배지 (DMEM/F12를 기본으로 하여 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B 항생제, 1% L-glutamine, 10% FBS가 포함된 배지) 1ml로 회석하여 시딩하였다. 이후 3일간 기본배지를 1ml씩 첨가하여 배양한 후 성장배지 (DMEM과 REGM을 1:1로 섞은 배지를 기본으로 하여 1% Penicillin/Streptomycin 항생제, 1% L-glutamine, 5% FBS, 10ng/ml bFGF, 10g/ml EGF을 포함한 배지)로 변경하여 배양하였다.

[67]

[68] 실시예 2: 전기천공법을 이용한 소변세포로의 역분화 인자 도입

[69] 실시예 1에서 배양된 소변유래 세포를 전기천공법 (electroporation)을 통해 합성 mRNA를 도입시키는 방법으로 구체적으로는 다음과 같다. 합성 mRNA의 경우 통상적인 시험관 전사(in vitro transcription) kit (RiboMAX[®] Large Scale RNA Production Systems, Promega)을 통해 합성되며 합성되는 mRNA의 백본 (backbone)이 되는 DNA는 T7-VEE-OKS-iG (Steven Dowdy, Addgene)로, OCT4, KLF4, SOX2 및 GLIS1의 유전자를 포함하고 있다(도 1). 상기 OCT4, KLF4, SOX2 및 GLIS1 유전자들의 서열은 Nature. 2011 Jun 8;474(7350):225-9. 에 개시된 것을 사용하였고, 해당 유전자 서열과 mRNA 적용법은 Cell Stem Cell. 2013 Aug 1;13(2):246-54 및 미국특허 US 9,862,930 B2 를 참고하였다.

[70] 합성된 mRNA는 0.5 μ g을 1시간동안 0.2ug/ml의 B18R 단백질로 전처리된 1×10^6 개의 소변유래 세포에 1600V, 10ms, 3회의 전기천공법으로 처리함으로써 도입하였다. 도입된 소변유래 세포는 0.2ug/ml의 B18R protein이 포함된 성장배지에서 2일간 배양하였다.

[71] 본 발명자들은 전기천공법을 통한 도입의 효율을 가시화하여 판단, 검증하기 위해 GFP 형광 유전자를 포함하는 합성 mRNA의 도입을 동시에 진행하여 GFP 형광 단백질을 발현하는 인간 소변유래 세포의 효율을 FACS 분석을 통해 검증하였다. 상기 검증을 통해 전기천공법을 통한 합성 mRNA의 인간 소변유래 세포 도입 효율이 처리 후 48시간 경 72.2%에 달하는 것을 확인하여 다음 단계인 신경줄기세포 유도 실험을 진행하기에 충분하다고 판단하였다 (도 2).

[72]

[73] 실시예 3: 소변유래 역분화 신경줄기세포 유도

[74] 매트릭셀(Matrigel[™])이 코팅된 세포 배양 접시에 mRNA가 도입된 소변유래 세포를 시딩한 후 신경줄기세포 배지 (DMEM/F12 배지와 Neurobasal (Gibco) 배지를 1:1 로 섞고 1xN2(Gibco), 1xB27(Gibco), 10ng/ml의 인간 LIF, 2uM의 SB431542 (TGF-beta inhibitor)와 3uM의 CHIR99021 (GSK3-beta inhibitor)를 첨가한 배지)를 기본으로 0.5uM의 purmorphamine (Shh agonist), 10uM의 forskolin (adenylyl cyclase activator), 100uM의 sodium butyrate (histone deacetylase inhibitor)와 64ug/ml의 ascorbic acid 2-phosphate를 첨가한 신경줄기세포 유도

배지로 7-10일간 배양하였다. 유도 완료 시 신경줄기세포 콜로니의 발생을 확인할 수 있었다 (도 3).

- [75] 또한, 추가적으로 1xN2, 1xB27, human LIF, TGF-beta inhibitor 및 GSK3-beta inhibitor를 첨가한 배지에서 Shh agonist, adenylyl cyclase activator, histone deacetylase inhibitor 및 ascorbic acid 2-phosphate 중 하나 이상을 추가로 더 포함하였을 때 신경줄기세포의 유도 효율에 미치는 영향을 확인하였다. Shh agonist, adenylyl cyclase activator, histone deacetylase inhibitor 및 ascorbic acid 2-phosphate를 모두 첨가한 배지에서의 신경줄기세포 전환률이 가장 우수함을 확인하였다(도 21).
- [76] 상기 유도된 신경줄기세포 콜로니를 채취하여 Matrigel이 코팅된 세포 배양 접시에 신경줄기세포 배지를 넣어 배양한다. 유도된 신경줄기세포는 이후 0.5mM EDTA 용액 혹은 Accutase 용액을 이용하여 계대 배양할 수 있고, 이 후 다음의 실시예에서 상기 유도된 신경줄기세포의 다양한 특성을 검증하는 실험을 진행하였다.
- [77]
- [78] **실시예 4: 유도된 신경줄기세포의 분자생물학적 특성 분석**
- [79] 본 발명으로부터 유도된 신경줄기세포의 분자생물학적 특성을 검증하기 위한 실험을 진행하였다.
- [80] **<4-1>**
- [81] H9 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포를 positive control로 한 RT-PCR를 통한 mRNA 수준 분석을 통하여 유도된 신경줄기세포가 SOX1, SOX2, PAX6, PLZF와 같은 신경줄기세포 마커 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다 (도 4). 본 실험에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다:
 SOX1(forward-ACACTTGAAGCCCAGATGG; 서열번호 1, reverse-ATAGGCTCACTTTTGGACGG); 서열번호 2,
 SOX2(forward-TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGA; 서열번호 3, reverse-CCGCCGCCGATGATTGTTATTA; 서열번호 4), PAX6 (forward-GGCTCAAATGCGACTTCAG; 서열번호 5, reverse-CCCTTCGATTAGAAAACCATACC; 서열번호 6), PLZF (forward-TATACAGCCACGCTGCAAGCCA; 서열번호 7, reverse-TGGTCTCCAGCATCTTCAGGCA; 서열번호 8).
- [82] **<4-2>**
- [83] 면역염색법을 이용한 단백질 수준 분석을 통해서도 유도된 신경줄기세포가 SOX1, NESTIN, SSEA1, SOX2, PAX6 및 PLZF와 같은 신경줄기세포 마커 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다 (도 5). 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다: SOX1 (AF3369, R&D Systems), NESTIN (MAB5326, Millipore), SSEA1 (MAB4301, Millipore), SOX2 (SC-20088, Santacruz), PAX6 (PAX6, DSHB), PLZF (AF2944, R&D Systems).

- [84] **<4-3>**
- [85] Ki67의 면역염색을 통해서 유도된 신경줄기세포가 분열능력을 가지고 있음을 확인하였다 (도 6). 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다. Ki67 (Ab9260, Millipore)
- [86] **<4-4>**
- [87] qRT-PCR을 통한 mRNA의 양적 분석을 통해서도 H9 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포 대비 유도된 신경줄기세포가 SOX1, SOX2, PLZF, PAX6와 같은 신경줄기세포 마커 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다 (도 7).
- [88] **<4-5>**
- [89] RT-PCR을 통한 mRNA 수준 분석을 통해 유도된 신경줄기세포가 발달학 상 forebrain, midbrain, hindbrain, spinal cord 특이적인 마커 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다 (도 8). 본 실험에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: EMX1 (forward-CAGGCCAGGTAGTTCAATGGG; 서열번호 9, reverse-GCTCAGCCTTAAGCCCTGTCTC; 서열번호 10), FOXG1 (forward-ACCCGTCAATGACTTCGCAGAG; 서열번호 11, reverse-AGGGTTGGAAGAAGACCCCTGA; 서열번호 12), OTX1 (forward-CTCAAACAACCCCCATACGGCA; 서열번호 13, reverse-GGTAGCGAGTCTTGCGCAAGAG; 서열번호 14), OTX2 (forward-TTCAGGGCTGTGTGAATTGTGTGA; 서열번호 15, reverse-CAGAGGTGGAGTTCAAGGTTGCAT; 서열번호 16), EN1 (forward-GAGTTCCAGGCAAACCGCTACA; 서열번호 17, reverse-GTTGTACAGTCCCTGGGCCATG; 서열번호 18), GBX2 (forward-CGGTTAGCAGCCACCTTTCCAT; 서열번호 19, reverse-GACGTGCTTCACATGGCTCAGA; 서열번호 20), HOXB2 (forward-GAGACCCAGGAGCCAAAAGC; 서열번호 21, reverse-GAAGGAGACGTGGCGGATTG; 서열번호 22), HOXB4 (forward-CTGAGGGCCAGAATGACTGCTC; 서열번호 23, reverse-CAGAACTCAACTGGCCCCCTCAC; 서열번호 24).
- [90] **<4-6>**
- [91] total RNA sequencing을 통해 global gene expression level에서 유도된 신경줄기세포가 본래의 소변유래 세포보다 H9 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포와 유사한 mRNA 및 lnc-RNA 발현 패턴을 보임을 확인하였다 (도 9, 10).
- [92] **<4-7>**
- [93] VEE 유전자의 RT-PCR 및 genomic DNA PCR 분석을 통해 유도된 신경줄기세포 내에 도입시킨 합성 mRNA가 더 이상 잔존하지 않으며 host 유전체에 integration되지 않았음을 확인하였다 (도 11). 본 실험에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: VEE (forward-ACGAAGGGCAAGTCGCTGTT;

서열번호 25, reverse-TTTCGTCGGCCCCAGTTGGTA; 서열번호 26).

- [94] **<4-8>**
- [95] STR analysis를 통해 인간 소변유래 세포와 유도된 신경줄기세포가 동일한 개체에서 유래하였음을 확인하였다 (도 12).
- [96] **<4-9>**
- [97] 핵형분석을 통해 유도된 신경줄기세포가 정상적인 염색체를 보존하고 있음을 확인하였다 (도 13).
- [98]
- [99] **실시예 5: 유도된 신경줄기세포의 분화능력 분석**
- [100] **<5-1> 신경세포로의 분화능력 분석**
- [101] 유도된 신경줄기세포를 신경세포로 분화할 시 신경세포 마커 유전자인 TUJ1, MAP2를 발현하고 있음을 면역염색법을 통해 확인하였다 (도 14). 신경세포 분화법은 다음과 같다. 신경줄기세포를 DMEM/F12 배지에 1xN2, 1xB27, 300ng/ml의 cAMP, 0.2mM의 vitamin C, 10ng/ml의 BDNF와 10ng/ml의 GDNF를 첨가한 신경세포 분화배지에 14일간 배양한 후 분석한다. 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다. Tuj1 (801202, BioLegend), MAP2 (AB5622, Millipore)
- [102] 또한, 유도된 신경줄기세포는 GABA신경세포, 운동신경세포, 도파민신경세포로 분화할 수 있다는 것을 면역염색법을 통해 각각 GABA, HB9, TH를 염색하여 확인할 수 있었다 (도 15). 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다: GABA (A2052, Sigma), HB9 (81.5C10, DSHB), TH (AB152, Millipore).
- [103] **<5-2> 신경교세포로의 분화능력 분석**
- [104] 면역염색법을 통한 S100beta, GFAP 염색을 통해 유도된 신경줄기세포가 신경교세포 중 하나인 성상세포로 분화할 수 있음을 확인하였다 (도 16). 성상세포의 분화법은 다음과 같다. DMEM/F12 배지에 1xN2와 1xB27가 포함된 배지에 2.5% FBS 또는 20ng/ml의 CNTF와 10ng/ml의 BMP4를 첨가한 성상세포 분화배지에 14일 이상 배양한 후 분석한다. 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다: S100beta (S2535, Sigma), GFAP (SAB4501162, Sigma).
- [105] 면역염색법을 통한 PDGFR, OLIG2, O4 염색을 통해 유도된 신경줄기세포가 신경교세포 중 하나인 희소돌기아교세포로 분화할 수 있음을 확인하였다 (도 17). 희소돌기아교세포의 분화법은 다음과 같다. DMEM/F12 배지에 1xN2, 1xB27, 25ug/ml의 insulin, 1uM의 Shh agonist와 100nM의 retinoic acid가 첨가된 배지에 5일 이상 배양한 후 DMEM/F12 배지에 1xN2, 1xB27, 25ug/ml의 insulin, 100ng/ml의 biotin, 60ng/ml의 T3, 10ng/ml의 PDGF-AA, 10ng/ml의 IGF-1, 5ng/ml의 HGF, 10ng/ml의 NT-3와 1uM의 cAMP가 첨가된 배지에 7일 이상 배양한 후 분석한다. 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다: PDGFR (SC338, Santacruz), OLIG2 (AB9610, Millipore), O4 (MAB345, Millipore).
- [106]
- [107] **실시예 6: 만능성 단계를 거치지 않는 신경줄기세포 유도 방법 검증 및 분석**

- [108] 본 발명에 사용된 역분화 인자인 OCT4, SOX2, KLF4, GLIS1 유전자의 조합은 특정 조건 하에서 유도만능줄기세포를 확립할 수 있음이 알려져 있다 (미국 특허 제09862930호).
- [109] 하지만 본 발명에서 유도된 신경줄기세포가 만능성 단계를 거치지 않는다는 것을 다음과 같은 이유로 검증하였다.
- [110] 첫째로, 본 발명에서는 인간 유도만능줄기세포를 확립하는데 필수적으로 알려진 bFGF 및 내재 유전자의 mRNA의 발현에 필요한 B18R 단백질을 배제한 신경줄기세포 유도배지를 사용하였으므로 현재까지 보고된 연구결과에 따른 경우 인간 유도만능줄기세포를 확립하는 것이 불가능하다.
- [111] 둘째로, 본 발명에서 유도된 신경줄기세포가 형성되는 시기는 프로토콜상 유도 과정 후 8일 전후로 (도 3), 알려진 인간 유도만능줄기세포가 형성되는 시기는 유도 과정 후 3주 이상이 필요하기 때문에 만능성 단계를 거쳤다고 보기에는 시간적으로 짧다.
- [112] 셋째로, 날짜별 qRT-PCR 분석을 통해 보았을 때 만능성 단계 마커 유전자인 OCT4, REX1 및 NANOG의 발현이 0일차에서 12일차에 걸쳐 낮은 발현을 유지하고 있었다 (도 18). 본 실험에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다. OCT4 (forward-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG; 서열번호 27, reverse-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC; 서열번호 28), REX1 (forward-CTGAAGAAACGGGCAAAGAC; 서열번호 29, reverse-GAACATTCAAGGGAGCTTGC; 서열번호 30), NANOG (forward-CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC; 서열번호 31, reverse-GGAAGGTTCCCAGTCGGGTTCACC; 서열번호 32).
- [113] 넷째로, 유도된 신경줄기세포를 면역염색법을 통해 검증하였을 때 H9 배아줄기세포와는 달리 OCT4 및 NANOG의 발현이 감지되지 않았음을 확인하였다 (도 19). 본 실험에 사용된 항체의 경우 다음과 같다: OCT4 (SC5279, Santacruz), NANOG (AF1997, R&D systems).
- [114] 상기와 같은 근거에 따라, 본 발명의 방법은 소변세포가 만능성 줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 신경줄기세포로 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [115]
- [116] **실시예 7: 신경줄기세포로의 유도 효율 증가 실험**
- [117] 소변세포로부터 신경줄기세포로의 전환 효율을 향상시킬 수 있는 배양 조건 등을 추가로 확인하였다.
- [118] 일반적인 산소 조건 (21% O₂)을 대조군으로 하여 산소의 농도를 조절하여 유도를 실시하였다. 구체적으로, 1x10⁵개의 소변유래 세포를 각각 기본 조건 (21% O₂)과 저산소 조건 (5% hypoxia)에서 신경줄기세포 유도 방법을 실시한 후, 면역염색법을 이용하여 신경줄기세포 마커 유전자 SOX1, PLZF 에 positive한 콜로니의 수를 셈으로써 저 산소 조건에서 약 2배의 전환 효율 증가를 보이는 것을 확인하였다 (도 20).

[119]

[120]

[121]

[122]