

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011년 8월 25일 (25.08.2011)



PCT



(10) 국제공개번호
WO 2011/102680 A2

(51) 국제특허분류:

C12N 5/074 (2010.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001103

(22) 국제출원일: 2011년 2월 18일 (18.02.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0014771 2010년 2월 18일 (18.02.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 강스템홀딩스 (KANG STEM HOLDINGS CO., LTD) [KR/KR]; 서울시 관악구 신림동 산 56-1 서울대학교 105 동 유전공학연구소 창업보육센터 406 호, 151-742 Seoul (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 강경선 (KANG, Kyung Sun) [KR/KR]; 서울 서초구 방배 3 동 방배래미안타워 102-1601, 137-935 Seoul (KR). 유경록 (YU, Kyung Rok) [KR/KR]; 서울 강남구 역삼 2 동 역삼아이파크아파트 206 동 302 호, 135-795 Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공향타워 6 층 한일국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

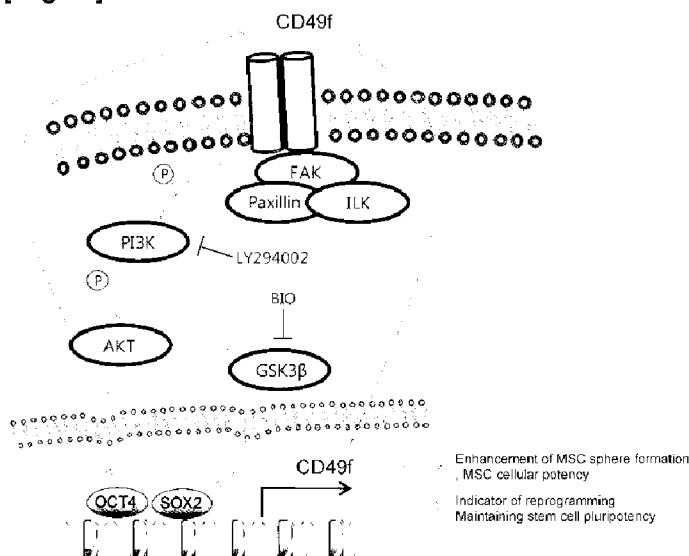
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CD49F PROMOTING PROLIFERATION, MULTIPOTENCY AND REPROGRAMMING OF ADULT STEM CELLS THROUGH PI3K/AKT/GSK3 PATHWAY

(54) 발명의 명칭: PI3K/AKT/GSK3 경로를 통해 성체줄기세포의 증식, 다분화능 및 재프로그래밍을 촉진하는 CD49F

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining adult stem cells, which have a surface antigen of CD49f, excellent formation of spheres due to sphere formation and high expression of OCT4 and SOX2, from a cell source including stem cells, and a cell therapeutic agent containing adult stem cells obtained by the method or cells differentiated therefrom as an active ingredient. According to the present invention, adult stem cells derived from spheres are suitable for mass culture of adult stem cells because of more rapid growth thereof compared with stem cells obtained by a known adhesion culture method, have a specific surface antigen so as to be homogeneously obtained by using the specific surface antigen, and are useful for preparing a cell therapeutic agent using the same because of excellent differentiation thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 줄기세포를 포함하는 세포원으로부터 CD49f의 표면항원을 가지며 구형 성장(Sphere formation)에 의해 스피어(Sphere) 형성능이 우수하고, OCT4 및 SOX2 고발현능을 가지는 성체줄기세포를 획득하는 방법, 및 상기 방법으로 획득된 성

체줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따라 스피어 유래의 성체줄기세포는 종래 부착 배양 방법으로 획득한 줄기세포보다 성장이 빠르기 때문에, 성체줄기세포의 대량 배양에 적합하며, 특정 표면항원을 가지기 때문에, 이를 이용하여 균질하게 획득이 가능하고, 분화능이 우수하여 이를 이용한 세포치료제 제조에 유용하다.

WO 2011/102680 A2



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: PI3K/AKT/GSK3 경로를 통해 성체줄기세포의 증식, 다분화능 및 재프로그래밍을 촉진하는 CD49F

기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포를 포함하는 세포원으로부터 CD49f의 표면항원을 가지며 구형 성장(Sphere formation)에 의해 스피어(Sphere) 형성능이 우수하고, OCT4 및 SOX2 고발현능을 가지는 성체줄기세포를 수득하는 방법, 및 상기 방법으로 수득된 성체줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 배아 줄기세포(embryonic stem cells)는 삼배엽에서 유래하는 모든 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서 수정이 이루어진 후 약 4~5일 뒤 형성된 포배(blastocyst)의 ICM(inner cell mass)에서 얻기 때문에 윤리적인 문제를 가지고 있다. 그리고 전분화능(pluripotency)을 가지므로 증식력이 좋고 다양하게 분화되지만, 조절이 어렵고 암세포화될 수 있다는 문제점이 있다.
- [3] 반면, 성체줄기세포(adult stem cells)는 골수나, 제대혈, 지방조직 등에서 얻을 수 있어, 윤리적인 문제를 피할 수 있으며, 배아줄기세포보다 분화능은 떨어지나 내피, 뼈, 근육, 신경 세포등의 여러 세포로 분화할 수 있는, 다분화능을 가진다는 것이 증명되었다.
- [4] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)는 성체줄기세포의 일종으로 조혈계통 세포를 비롯하여, 근육, 신경, 뼈, 지방 등의 조직으로 다분화능을 가지는 줄기세포이다. 일반적으로 골수에서 흡입을 통하여 얻을 수 있으며, 그 외 성인의 체내 여러 곳에서 얻을 수 있다. 골수에서 유래한 성체줄기세포는 분화능력이나 증식능력이 다른 줄기세포에 비하여 많이 떨어지고, 채취과정이 침습적이라는 단점을 가지고 있기 때문에, 최근 골수를 대체할 수 있는 성체줄기세포 source로서 제대혈(Umbilical cord blood)이 주목을 받고 있다. 제대혈 유래 줄기세포의 특징은 골수유래 중간엽 줄기세포와 거의 유사한 특징을 가지나, 골수유래보다 분화능력이나 증식능력은 더 뛰어난 특징을 가진다.
- [5] 한편, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)는 세포 배양기의 표면에 부착되어 자라는 특징을 가지는 성체줄기세포로서, 적절한 배양 조건 하에서 지방세포, 연골세포 및 모골세포 등으로 분화될 수 있음이 입증되어 있다 (Erickson *etal.*, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 290:763, 2002; Halvorsen *etal.*, *Tissue Eng.*, 7:729, 2001; Wickham *etal.*, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 412:196, 2003; Dragoo *etal.*, *J. Bone Joint Surg., Br.*, 85:740, 2003). 또한, 지방세포, 근육세포, 골세포, 연골세포 등의 중배엽성 세포로 분화하는 능력을 가질 뿐만 아니라, 비중배엽성 세포인

체장내분비세포, 간세포, 혈관내피세포 및 심근세포로 분화할 수 있음이 보고되면서, 자가 이식에 의한 세포치료제나 유전자 치료제의 도구로 사용하고자 하는 노력이 활발하다(정진섭, *JKoreanSocTransplant*, 22:183-196, 2008).

- [6] 성체줄기세포를 세포 치료제로 사용하기 위해서 현 기술단계에서는 미분화 상태가 유지될 수 있는 배양 조건이 규격화되어야 하며, 이와 더불어, 조직으로부터 분리한 성체줄기세포는 다종의 세포가 혼합된 상태이기 때문에, 균질의 성체줄기세포를 다량 배양할 수 있는 기술도 해결해야 할 문제점 중에 하나이다.
- [7] 특히 조직 또는 혈액으로부터 성체줄기세포를 분리하는 방법은 통상적으로 다수의 표면항원에 대한 항체를 이용한 Cell sorting을 예로 들 수 있다. 상기 방법은 성체줄기세포의 표면항원을 파악하고 있어야 한다는 한계가 있으며, 문제는 성체줄기세포 공통의 표면항원(이하, 마커)이 밝혀지지 않았고, 또한 성체줄기세포 마커가 다양하게 개발되어 있지 않은 상태이며, 알려진 마커도 분화상태에 따라서 발현 정도가 다르며, 특히 Sorting하는 장비가 고가라는 점에서 활용하는데 제약이 많다.
- [8] 성체줄기세포를 대량으로 얻기 위해서, 상기 세포가 세포 배양용기에 부착되는 특성을 이용하여, 다분화능을 유지시키면서 시험관 내에서 배양시키는 기술이 보편적으로 이용되고 있다.
- [9] 상기 방법은 골수 또는 혈액에 대해 Ficoll-Paque를 이용한 Density gradient centrifugation으로 단핵구 세포를 제거하고, 혈장이 함유된 배양액에서 배양용기에 부착된 성체줄기세포를 선택배양함으로써 이루어진다. 상기 과정으로 얻어진 세포는 성체줄기세포뿐만 아니라, 기타 단핵세포 및 타 줄기세포가 함께 혼합되어 있을 가능성이 있으며, 이러한 혼합된 세포배양 조건에서는 양분(nutrient)의 분배 정도가 달라질 수 있으며, 이로 인하여 세포의 분화상태에 비균질성을 야기할 수 있다. 결국, 균질한 세포군으로 제조할 수 없다는 문제는 치료제로서 사용할 경우 예상하는 효과와 다르게 나타날 수 있다는 치명적인 단점으로 작용하기 때문에, 균질한 성체줄기세포를 다량 얻을 수 있는 효과적인 배양 기술의 개발이 시급한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에, 본 발명자들은 제대혈, 지방조직(hAD-MSC) 및 골수(hBM-MSC)로부터 채취한 성체줄기세포를 배양하여 증폭하는 과정에서, 스피어 형성능(Sphere formation)이 우수하고, 배양속도가 빠른 성체줄기세포가 특정 표면항원을 가지며, 분화능이 우수하다는 점을 발견하였다.
- [11] 또한, 본 발명자들은 CD49f가 PI3K/AKT/GSK3 경로를 통해 줄기세포의 증식, 다분화능 및 재프로그래밍을 촉진하는 것을 발견하였다.

[12] 본 발명은 이러한 발견에 기초한 것이다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명은 (a) 성체줄기세포들을 비부착성 배양 조건하에 배양하는 제1단계; 및 (b) 구형 성장에 의해 스피어(Sphere) 형성하는 세포군집으로부터 성체줄기세포를 분리하는 제2단계를 포함하여, 세포표면마커인 CD49f 양성의 특징을 가지고 배양전 줄기세포들보다 균질화도가 향상된 성체줄기세포를 제조하는 제1 방법을 제공한다.

[14] 1주일 동안 제1단계를 수행한 후, 성체줄기세포 스피어의 개수는 1×10^4 세포 당 30 내지 50개의 스피어이고, 스피어의 평균 직경은 100 내지 150 μm 일 수 있다.

[15] 본 발명의 제1방법은, 제1단계 및 제2단계를 2회 이상 반복하며, 제2단계 이후 제1단계 수행하기 이전 스피어(Sphere) 형성하는 세포군을 단일 세포로 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[16] 또한, 본 발명은 (a) 줄기세포를 포함하는 세포원을 준비하는 제1단계; 및 (b) 상기 세포원으로부터 CD49f 양성의 성체줄기세포를 분리하는 제2단계를 포함하여 균질의 성체줄기세포를 제조하는 제2 방법을 제공한다.

[17] 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 제1방법 또는 제2방법에 의해 제조되고 분리된 CD49f 양성의 성체줄기세포를 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 제1방법 또는 제2방법에 의해 제조되고 분리된 CD49f 양성의 성체줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제를 제공한다.

[19] 본 발명에서 제공되는 세포치료제는 골격계 질환, 조직재건, 순환계 질환, 신경계 질환 및 면역질환에 대한 치료능을 가질 수 있으며, CD49f 양성의 특징을 가지는 균질한 성체줄기세포를 유효성분으로 함유하고 있기 때문에 세포의 분화상태를 균질하게 조절할 수 있다.

[20] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 제1방법 또는 제2방법에 의해 제조되고 분리된 CD49f 양성의 성체줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 성체줄기세포의 증식방법을 제공한다.

[21] 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 제1방법 또는 제2방법에 의해 제조되고 분리된 CD49f 양성의 균질한 성체줄기세포를 분화시키는 단계를 포함하여, 성체줄기세포로부터 분화된 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[22] 또한, 본 발명은 CD49f를 포함하는 전분화능 세포로의 재프로그래밍 마커를 제공한다.

[23] 나아가, 본 발명은 분석대상 세포에서 CD49f 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 것이 특징인, 분석대상 세포에서 전분화능이 재프로그래밍되었는지 여부 또는 분석대상세포가 전분화능을 유지하는지 여부를 확인하는 방법을 제공한다. 더 나아가, 본 발명은 CD49f의 발현을 유지시켜 줄기세포의 다분화능을 증진시키는 방법을 제공한다. 이때, CD49f는

CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 신호전달에 의해 중개되는 다분화능을 증진시킬 수 있다.

- [24] 또한, 본 발명은 줄기세포들을 비부착성 배양 조건하에 배양하여 스피어 형성(Sphere formation)을 통해 세포가 CD49f의 발현을 높은 수준으로 유지시키는 것이 특징인 줄기세포의 다분화능 유지 방법을 제공한다.
- [25] 나아가, 본 발명은 CD49f의 발현을 억제 또는 녹다운시켜 줄기세포를 특정세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [26] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.
- [27] 골수(bone marrow, BM), 지방 조직(adipose tissue, AD), 및 제대혈(umbilical cord blood, UCB)로부터 유래될 수 있는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 치료 목적(therapeutic purpose)의 줄기세포 공급원 중 하나이다.
- [28] MSCs는 시험관내 실험에서 중배엽 뿐만 아니라 외배엽성 신경 세포 및 내배엽성 간세포로의 분화가 가능한, 다양한 계통(multi-lineage) 분화능을 의미하는 다분화능(multipotent)을 가진다.
- [29] 그러나, MSCs는 주로 비균질의 세포군집(heterogeneous population)으로 배양된다. 증식하는 동안에 세포군집은 자가재생(self-renewal) 및 분화능(plasticity) 측면에서 다양해진다. 따라서, 더 균질한 세포 군집(homogenous cell population)을 분리하는 것이 필요하다.
- [30] 비균질적인 세포군집 중 더 높은 다분화능을 갖는 조직 특이적인 성체줄기세포의 마커들을 찾는 것은 중요한 연구대상이나, 아직까지 성체줄기세포를 분리하는 정확한 마커들은 없었다. 본 발명자들은 더 높은 다분화능을 갖는 성체줄기세포를 선별하는 방법을 찾던 중 CD49f가 다분화능 세포의 자가재생과 분화능을 증진 시키고, 다분화능 세포를 전분화능 세포로 재프로그래밍하고 유지하는 중요한 신규 마커임을 확인하였다.
- [31] "부착 비의존성(Anchorage independence)"이란, 플라스틱 배양 용기 또는 마이크로캐리어 비드(micro-carrier bead)와 같은 고형의 하층(solid substratum)에 부착하지 않는 3차원적 진핵세포(eukaryotic cell) 성장을 의미한다. 비-형질전환된 체세포는 부착 및 생존을 위한 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 필요로 한다. 그렇지 않으면, 세포는 anoikis라 불리는 세포사멸 과정을 겪게 된다. 반면, 종양성 및 전이성이 큰 암 세포는 고체 표면(solid surface)에 접촉하지 않고도 생존하는 경향이 있다. 부착-비의존 성장은 종종 "스피어(spheres)"로서 불리는 3차원 유기관(organoids)을 형성시킨다.
- [32] 본 발명자들은 제대혈, 지방조직(hAD-MSC) 및 골수(hBM-MSC)로부터 채취한 성체줄기세포를, 세포의 Anchorage Dependent한 특성을 이용한 통상의 부착 배양방법이 아닌, 줄기세포가 세포 배양용기 바닥에 부착되지 않도록 배양용기 바닥에 한천(Agar) 또는 agarose을 코팅하여 사용한 비부착성 배양 접시에서 배양하여, 성체줄기세포도 비부착성 배양 조건에서 스피어들을 형성할 수 있으며, 성체줄기세포 스피어 형성 후에도 성체줄기세포의 특성을 유지하는

것을 확인하였다.

- [33] 자손 세포들이 정해진 계통으로 시험관내 분화될 수 있는 능력을 의미하는 조직 분화능(tissue plasticity)은 줄기세포의 중요한 특징이다. 본 발명자들은 통상적으로 단층배양된 성체줄기세포 및 sphere-유래의 성체줄기세포에서 모두 지방세포, 골세포 계통으로 분화될 수 있다는 것은 조직-특이적 염색법 및 마커 발현을 통해(도 4), 확인하였다. 놀랍게도, 성체줄기세포 스피어 유래의 세포가 단층 배양된 성체줄기세포보다 지방세포 및 골세포로의 분화 능력이 더 컸다. 나아가, 성체줄기세포 스피어 유래의 세포들은 단층배양된 성체줄기세포 보다 증식 속도가 더 높았다.
- [34] 본 발명자들은 성체줄기세포 스피어 형성의 새로운 메카니즘을 밝혀냈으며, 특정 인테그린인 CD49f가 PI3K/AKT/GSK3 β 활성화에 영향을 미침으로써 세포 증식 및 분화를 조절할 수 있다는 것을 밝혔다. 또한, CD49f는 hESCs 및 hiPSCs의 전분화능의 유지에 관여하며 재프로그래밍 과정(reprogramming process) 동안에 전분화능 마커인 OCT4, SOX2 및 CD49f 사이에는 상호소통(crosstalk)이 있었다. 즉, 본 발명자들은 성체줄기세포 스피어에서 증식능 및 다분화능(multipotency)이 더 높은 것은 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 신호전달에 의존적이라는 것을 발견하였다(도 1 참조).
- [35] 일반적으로, 인테그린(integrin)은 세포 표면 마커로서, 세포외기질(ECM) 구성성분들의 대응성분들(counterparts)이고, FAK(focal adhesion kinases) 및 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/AKT 경로와 같은, 세포 생존 및 증식과 관련된 일련의 신호전달 경로들에 신호를 보낸다. PI3K/AKT 신호전달을 하향조절하면 hESCs의 분화가 유도되기 때문에, PI3K/AKT 신호전달은 hESCs의 전분화능(pluripotency) 유지에 중요하다. 인테그린과 ECM사이의 상호작용에 의해 시작되는 신호전달 경로들은 상승작용에 의해 성장인자 수용체 신호전달들과 상호소통하여 세포주기 장치를 작동시킨다.
- [36] 분자 신호 전달 캐스케이드(molecular signal transduction cascades)와 관련하여, PI3K 및 이의 하류 단백질 키나제(예, AKT 및 GSK3 β)가 단층 배양된 세포보다 성체줄기세포 스피어에서 증가하였다.
- [37] PI3K 신호는 성체줄기세포 스피어 형성에 중요하다는 것을 확인하기 위해, PI3K 에 대한 화학적인 억제제 및 PI3K의 하류 이펙터인 GSK3 β 에 대한 화학적인 억제제를 사용하였다. GSK3 β 의 억제제인 BIO는 성체줄기세포 스피어들의 개수 및 크기 모두 증가시켰다. 반면, PI3K 신호전달 억제제인 LY294002로 배양한 경우 스피어들의 갯수가 감소하였다. 이러한 결과는 인테그린-PI3K/AKT-GSK3 β 신호 전달이 MSC 스피어들의 형성에 중요하다는 것을 보여준다.
- [38] PI3K/AKT 생존 신호가 스피어 형성과 관련된 세포-세포 상호작용에 중요하다는 가설에 기초하여, 인테그린 발현 수준들을 분석하였다. 인테그린은 알파 서브유닛 및 베타 서브유닛 간의 이질성 이량체 복합체를 형성하는 세포

부착 관련 패밀리에 속한다. 인테그린들 중 CD49f(알파6) 및 CD104(베타 4)가 스피어 유래의 세포들에서 상향조절되었다는 것을 면역세포화학(immunocytochemistry) 및 FACS 분석법을 통해 확인하였다.

- [39] 인테그린 알파 6/베타 4 복합체는 라미닌 및 칼리닌(부착 필리멘트 단백질)과의 상호작용을 통한 PI3K/AKT 활성화 및 세포증식에 중요하다. 인테그린의 하류 신호 전달체, 예컨대 FAK 및 PAXILLIN은 스피어 세포에서 활성화되었다. 이는 인테그린 신호가 PI3K/AKT 신호 경로를 촉발하는데 충분하다는 것을 의미한다. 게다가, 스피어-형성 효율 및 스피어 크기는 CD49f음성 세포군에 비해 CD49f 양성 세포에서 상당히 증가하였다는 것을 확인하였으며, 이는 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 신호전달이 부착-비의존성 성장 조건하 성체줄기세포의 생존 및 증식에 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명은 CD49f-양성 세포군이 훨씬 풍부해진 스피어유래의 세포들을, 성체줄기세포의 비균질성 세포군집으로부터 증식능 및 분화능이 더 높은 상대적으로 균질한 세포군을 선별하는 신규 타겟으로 한다.

[40]

- [41] 또한, 본 발명자들은 CD49f는 성체줄기세포 증식 및 분화를 직접적으로 조절할 수 있다는 것을 확인하였다.

- [42] 인테그린은 세포가 세포에 부착하는 것 또는 세포가 세포외기질(ECM)에 부착하는 것을 중개하는 주요 수용체이다. 인테그린들과 성장인자 경로 사이의 강화된 상호소통(crosstalk)을 통해 세포 주기 진행을 자극하는데 인테그린들이 필요하다고 알려져 있다. 게다가, CD49f가 풍부한 성체줄기세포가 그렇지 않는 성체줄기세포보다 더 효율적으로 분화될 수 있고 콜로니형성능력이 더 우수하다고 알려져 있다.

- [43] 이러한 연구결과들과 일치하여, 본 발명은 실험을 통해, CD49f 과발현 성체줄기세포의 경우 증식 능력, 스피어 형성 능력 및 지방세포, 골세포 계통으로의 분화능이 향상되었다는 것을 확인하였다.

- [44] 성체줄기세포 스피어 유래의 세포들이 세포 분화능(cellular potency)면에서 상대적으로 높은 활성을 보여주기 때문에, 본 발명자들은 CD49f 과발현이 성체줄기세포에서 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 활성화시킨다는 가설을 세웠다. 비록 세포암(carcinoma cells)에서 CD49f가 PI3K/AKT 경로를 활성화한다는 것이 알려져 있으나 (Gambaletta et al., 2000; Trusolino et al., 2001), 줄기세포 증식 및 다분화능과 관련된 신호전달 사건에서는 연결된 바 없다. 이러한 연결을 확인하기 위해, 본 발명자들은 웨스턴 블롯팅 및 신호전달 억제제를 CD49f 과발현된 성체줄기세포에 사용하였다. 흥미롭게도, CD49f 및 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 활성화하면 성체줄기세포의 증식 및 스피어 형성을 향상조절하였다. 스피어 형성 효율이 성체줄기세포의 증식 및 다분화능과 일치하는 바와 같이, 스피어 형성 효율은 성체줄기세포의 세포 분화능을 대표할 수 있다.

- [45] PI3K/AKT 네트워크가 골형성 분화 및 뼈성장에 중요하다고 언급한 다른

연구결과들 (Fujita et al., 2004; Mukherjee and Rotwein, 2009) 과 결합하면, CD49f에 의한 PI3K/AKT/GSK3 β 경로의 활성이 성체줄기세포의 골세포로의 분화 유도를 촉진하는 것처럼 보인다. 게다가, 본 발명자들은 GSK3의 억제제인 BIO로 처리한 성체줄기세포의 경우 생존능력에 악영향을 주지않고 이들의 골세포 성향이 증가하였다는 것을 확인하였다.

- [46] 지속적으로(constitutively) 활성화된 PI3K/AKT는 자발적인 지방세포 분화를 유도하였으나(Kohn et al., 1996; Xu and Liao, 2004), GSK3의 억제는, 지방세포화의 주요 조절자인 PPAR γ 을 억제함으로써 지방세포로의 분화를 억제한다 (Kang et al., 2007). 이와 일치하여, BIO가 존재하면 골세포형성 마커 유전자를 상향조절하는데 반해, 지방세포형성 마커 유전자는 현저히 감소하였다. 본 실시예들은 CD49f 에 의해 조절되는 신호전달이 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 활성화함으로써 성체줄기세포의 세포분화 능력을 자극할 수 있는 선택적인 능력과 관련있음을 입증하고 있다.
- [47]
- [48] 또한, 본 발명자들은 CD49f가 전분화능을 제프로그래밍하고 유지하는데 중요한 신규 마커임을 확인하였다.
- [49] 최근 연구에 따르면, 전분화능 마커 유전자인 OCT4는 MSC의 증식 능력, 콜로니 형성 및 계통적인 분화능력을 조절할 수 있다(Greco et al., 2007; Liu et al., 2009; Tondreau et al., 2005). OCT4 및 SOX2는 미분화된 배아 줄기세포(ESC)의 자기재생능(self-renewal capacity) 유지에 필수적인 전사인자이다. 배아줄기세포 및 MSCs와 같은 조직-특이적 성체줄기세포에서 발현되는 이러한 유전자들은 미분화 상태를 유지하고, 분화되지 않도록 도와준다. 또한, 최근의 연구들에 의하면, 분화된 세포도 OCT4 및 SOX2와 같은 외래(exogenous) 전분화능 유전자를 형질도입(transduction)하면, 전분화성 상태(pluripotent state)로 갈 수 있다는 것이 입증되었다.
- [50] hUCB-MSC 스피어 유래의 세포에서 증식 및 분화 능력이 현저하게 상향조절되었기 때문에, 본 발명자들은 스피어 유래의 세포에서의 전분화능 마커 발현 수준을 단층 배양된 hUCB-MSC의 수준과 비교하였다. hUCB-MSC 스피어 유래의 세포는 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 발현 수준이 더 높았다(도 11). 이러한 결과는 스피어 형성이 전분화능 마커 발현을 상향조절하여 다분화능을 증가시켜 자가 재생 능력 및 분화 능력 모두를 강화할 수 있다는 것을 의미한다.
- [51] 게다가, 본 발명자는 OCT4 or SOX2 를 침묵시켜 CD49f 의 활성을 하향조절하기도 하고, OCT4 및 SOX2의 발현을 강화시켜 CD49f의 내인성 전사체 및 단백질을 활성화시키기도 하였다. OCT4 및 SOX2에 의한 CD49f의 조절이 직접적인 결합에 의한 것인지를 확인하기 위해, 염색질 면역침전법(chromatin immunoprecipitation)을 수행하였다. OCT4 및 SOX2에 특이적인 항체를 사용하여, ChIP에 의해 이들 2개의 전사 인자들이 CD49f의

추정 프로모터 영역에 결합하는 것을 확인하였다(도 11). OCT4 및 SOX2와 CD49f 사이의 상호작용은 PI3K/AKT/GSK3 β 을 통한 전사 조절 루프로 기술될 수 있다(도 1).

- [52] 흥미롭게도, CD49f의 발현은 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 과발현된 성체줄기세포에서 현저히 향상되었다. 이전 연구들에서 4개의 전사인자들(OCT4/SOX2/LIN28/NANOG or OCT4/SOX2/CMYC/KLF4)이 분화된 세포를 비분화된 전분화능 줄기세포(iPSCs)로 재프로그래밍하는데 충분하다고 보고되었다 (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). CD49f의 상향조절된 발현과 일치하여, 외인성의(ectopic) OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 과발현된 MSCs는 강력한 AP 활성을 보여주었으며, hESC-유사 콜로니로의 모폴로지(morphology) 변화를 보여주었다. 또한, 상향조절된 내인성 CD49f 발현은 hiPSCs 및 hESCs에서 EB(embryoid body) 형성 유도가 진전됨에 따라 상당히 감소하였다. 이러한 결과들은 내인성 CD49f 발현이 재프로그래밍 상태를 나타낼 수 있고, 재프로그래밍 마커로 사용될 수 있다는 것을 의미한다.
- [53] 내인성 CD49f의 녹다운은 hESCs의 분화를 유도하였으며, 내인성 *OCT4*, *SOX2* 및 *NANOG*의 수준을 감소시켰다. 이에 더해, CD49f의 차단은, hESCs에서 전분화능 및/또는 생존능의 유지에 핵심인 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 억제하였다. hESCs에 특이적인 PI3K 억제제인 LY294002를 처리하면 투여량에 종속적으로 *NANOG* 및 *CD49f*의 발현을 억제하였다. 도 1은 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 경로의 개략도를 보여주고 있다. 이와 함께, 이러한 발견들은 재프로그래밍과정에서 CD49f이 OCT4 및 SOX2와 상호 소통하고, CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 신호전달에 의해 중개되는 전능성을 유지하는데 CD49f가 기여할 수 있다는 것을 보여주고 있다.
- [54] OCT4, SOX2 및 NANOG는 자신의 프로모터 뿐만 아니라 서로의 프로모터에 결합할 수 있다. 이러한 autoregulatory circuitry 은 hESCs 및/또는 hiPSCs의 전분화성 상태 및 유전자 발현을 안정화시킨다. 다른 인자들과 함께 도입된 OCT4 및 SOX2는 autoregulatory loop를 공점유(cooccupy)하고 활성화시키며, 그 결과 내인성 전분화능 마커를 활성화시키고 전분화능의 유도를 야기할 수 있다. 본 발명자들은 OCT4 및 SOX2의 autoregulatory circuit에 의해 CD49f가 조절될 수 있다는 것을 입증하였다.
- [55]
- [56] 본 명세서에서 구형 또는 스피어는 완전 구형 뿐만 아니라 타원체를 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 '스피어 형성(Sphere formation)'은 배양시 성체줄기세포 중에서 바닥에 부착되지 않아도 성장이 가능한 일부 세포가 다수 응집된 스피어를 형성하는 특징을 말한다.
- [57] 본 명세서에서 '성체줄기세포'는 연골, 뼈, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등에 존재하며, '중간엽 기질세포', '중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells)', 또는 '기질세포'로 혼용될 수 있다.

[58]

[59] 본 발명의 제1방법 또는 제2방법에 의해 수득되는 '성체줄기세포'는 스피어(Sphere) 형성능을 가지고, 지방조직, 골수, 제대혈 유래의, 바람직하게는 제대혈 유래의, 성체줄기세포 중에서 CD49f양성의 특성을 가지며, 만능줄기세포(pluripotent stem cells)의 표지인자인 OCT4 및 SOX2 고발현능을 가지는 아군(sub-population)의 줄기세포이다.

[60] 본 발명의 제1방법 또는 제2방법에 의해 수득되는 성체줄기세포는 배양 시에는 세포 군체의 형태를 가진 스피어 상태로 존재하지만, 효소처리 또는 물리적 방법과 같은 당업자에게 용이하게 선택될 수 있는 통상의 방법으로 단일의 줄기세포로 분산이 가능하다.

[61] 제1방법에 의해 제조되는 성체줄기세포는 ZNF281, c-MYC 또는 둘다를 발현할 수 있다. 본 발명의 성체줄기세포가 Oct-4, Sox-2, c-myc, ZNF281을 발현한다는 것은 미분화 상태가 유지되고 있음을 의미한다.

[62] 본 발명의 제2방법에 따라 수득된 CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포는 구형 성장에 의해 스피어 형성능을 가지고, OCT4 및 SOX2 고발현능을 가질 수 있다.

[63] 또한, 본 발명의 성체줄기세포는 세포배양기에 부착되어 배양된 선형 형태(Spindle-shaped) 성체줄기세포에 비하여, *c-myc*, *paxillin*, *ilk*, *pl3K* 및 *nanog*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 고발현능을 가지며, 이와 더불어 PI3K 및 GSK3 β 가 고인산화된 특징을 갖는다.

[64] 본 발명에서 '고발현'을 판단하는 기준은 통상의 세포배양 방법인 세포 배양기 바닥에 부착시켜 배양된 선형 형태(Spindle-shaped)의 성체줄기세포와 본 발명에 따라 비부착성 배양에 의해 수득된 스피어 유래의 성체줄기세포에 대해 동일 특성을 비교하여 고발현 여부를 결정하였으며, 본 발명의 성체줄기세포에서 OCT4는 약 9배, SOX2는 약 7배 이상 발현이 증가한 것으로 나타났다.

[65] 본 발명에서 '줄기세포를 포함하는 세포원'은 배양된 성체줄기세포뿐만 아니라, 성체줄기세포를 포함하는 지방조직, 골수, 말초혈액, 제대혈 등일 수 있으며, 제대혈을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 지방조직, 골수, 제대혈 유래의 세포원은 중간엽 줄기세포뿐만 아니라, 혈구세포, 섬유아세포, 내피세포, 지방전구세포 등의 세포 혼합상태일 수 있다.

[66] 한편, 특정한 세포표면항원적, 면역학적 특징을 가지는 성체줄기세포의 분리는 에컨대 항체 처리에 의한 분리, 형광, 자석, 나노 입자의 검출수단을 이용할 수 있다.

[67] 상기 형광, 자석, 나노 입자의 검출수단은 항체에 부착되어, 형광이용세포분류기 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 또는 MACS(Magnetic Activated Cell Sorter) 등의 세포의 면역학적 특성을 이용한 방법으로 분리할 수 있으며, 이에 한정되는 것이 아니며, 해당 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.

- [68] 본 발명의 제1방법 또는 제2방법에 의해 수득되는 성체줄기세포는 우수한 분화능을 가지므로, 골격계 질환, 조직재건, 순환계 질환, 신경계 질환 및 면역질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환에 대한 치료능을 가진 세포 치료제로 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 세포치료제의 유효성분은 미분화 상태의 줄기세포 또는 특정 세포로 분화된 상태로 이용할 수 있다.
- [69] 본 발명의 세포 치료제의 유효성분으로서의 성체줄기세포는 중간엽 줄기세포의 아군(sub-population) 세포이기 때문에, 중간엽 줄기세포와 동일한 방법으로 분화가 가능하다.
- [70] 중간엽 줄기세포는 dexamethasone, ascorbic acid phosphate, β -glycerophosphate 등의 첨가로 시험관 내에서도 뼈모세포로 분화시킬 수 있으며, 이러한 분화능을 이용하여 세포 단독 혹은 담체와 함께 광범위한 골절치유가 가능하다는 것이 알려져 있다. 특히 중간엽 줄기세포를 손상된 영역에 이식하여 직접 분화에 의한 효과를 얻을 수도 있지만, type I 아교질 생성장애를 특징으로 하는 선천성 질환인 불완전골생선증(Osteogenesis imperfecta) 환자의 경우 혈류를 통한 동종 줄기세포의 전신적인 이식으로 치료효과를 얻을 수 있는 것이 확인되었다.
- [71] 또한, insulin, transferrin, selenous acid 등을 포함하는 연골 유도 배양액을 사용하여 중간엽 줄기세포를 용이하게 연골조직으로 분화시킬 수 있으며, 이러한 분화능을 이용하여 약물 치료로 한계가 있는 관절염이나 사고로 인한 관절연골의 손상에 대해 PCL, PLA, fibrin gel 등의 담체와 함께 이식하여 연골조직을 복원할 수 있음이 알려져 있다.
- [72] 중간엽 줄기세포는 시험관 내에서 dexamethasone, indometacin, isobutylxanthin, insulin 등을 사용하여, 지방세포로 분화될 수 있으며, 이러한 분화능을 이용하여, 지방세포를 이용하는 성형외과 영역에서의 조직재건 등과 관련하여 활용이 점점 높아지고 있다.
- [73] 그 밖에, 중간엽 줄기세포는 5-azacytidine을 처리하면 심근세포로 분화할 수 있으며, 중간엽 줄기세포를 뇌에 주사할 경우, 전두엽과 소뇌로 이동할 뿐만 아니라, neurofilament 양성반응을 보이는 것으로 알려져 있어, 신경조직 재생능이 있는 것으로 확인되었으며, 따라서 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머 증후군, 다발성 경화증 등의 퇴행성 신경질환, 척수손상 등의 치료제로서 적용할 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [74] 이와 더불어, 중간엽 줄기세포는 MHC I+, MHCII-, CD40-, CD80-, CD86-로 표현되는데, MHC I에 의해 T세포를 활성화시킬 수 있으나, Costimulatory factor가 없어 T세포에 의한 면역반응을 유발하지 못하는 특징이 있다. 따라서, 동종 이식의 경우, 면역억제제의 투여가 필요없는 것으로 알려져 있으며, 뿐만 아니라 dendritic cell의 분화와 기능을 억제하고, B 세포의 증식, 분화 및 화학주성(chemotaxis)을 억제하는 특징이 있다. 이러한 중간엽 줄기세포의 면역억제기능을 이용하여 류마티스 관절염, 급성염증을 포함하는 면역질환에 대한 치료 가능성이 확인되어 있다.

[75]

[76] 본 발명은 또한 본 발명의 제1방법 또는 제2방법에 의해 제조되고 CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 성체줄기세포의 증식방법을 제공한다.

[77] 본 발명의 증식방법에서 상기 성체줄기세포의 배양은 부유배양 또는 부착배양일 수 있다.

[78] 상기 부유 배양은 줄기세포가 세포 배양용기 바닥에 부착되지 않도록, 배양용기 바닥에 한천(agarose)을 코팅하여 사용할 수 있으며, 상기 부착배양은 통상의 세포 배양방법에 의한 것일 수 있다.

[79] 통상적으로 세포배양 용기는 세포부착을 유도하기 위하여, 특수 처리가 되어 있으므로, 1% 내지 10% 한천 코팅의 방법 외에 세포 부착이 되지 않는, 예를 들면 미생물 배양용 petri dish, 유리 재질의 용기와 같이, 세포의 부유배양이 가능한 배양용기를 사용하여 배양할 수 있으며, 상기 한천의 농도 및 배양용기의 선택은 당업자에게는 용이하게 선택될 수 있다.

[80] 본 발명의 증식방법에 사용되는 배지는 상기 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함하며, 가장 바람직하게는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 사용할 수 있다. 또한, 상기 기본 배지에 항생물질, FBS(fetal Bovine serum) 및 성장인자를 첨가할 수 있으며, 이와 더불어 배양온도 및 배양기간 등의 배양 조건에 대해서도 당업자에게 용이하게 선택될 수 있다.

[81] 본 발명의 증식방법에 사용되는 배지에 첨가할 수 있는 성장인자는 BMPs(Bone Morphogenetic Proteins), EGF Family, GDFs(Growth Differentiation Factors), IGF Family, VEGF/PDFG Family 등을 사용할 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[82] 본 발명의 증식방법은 세포 치료제와 같은 용도로 다량의 줄기세포가 필요할 때, 상기 세포를 증폭시키기 위해 이용할 수 있다.

[83] 본 발명은, CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포를 분리하여, 이를 배양하기 때문에, 균질한 세포학적 특성을 갖는 줄기세포를 다량 확보할 수 있다.

[84] 또한, 본 발명의 증식방법에 의하여 줄기세포를 증폭시킬 경우, CD49f음성의 줄기세포보다 세포 성장이 빠르기 때문에, 본 발명의 세포를 배양했을 경우, 종래의 방법보다 신속하게 다수의 성체줄기세포를 얻을 수 있다.

발명의 효과

[85] 본 발명에 따라 스피어 유래의 성체줄기세포는 종래 부착 배양 방법으로 수득한 줄기세포보다 성장이 빠르기 때문에, 성체줄기세포의 대량 배양에 적합하며, 특정 표면항원을 가지기 때문에, 이를 이용하여 균질하게 수득이 가능하고, 분화능이 우수하여 이를 이용한 세포치료제 제조에 유용하다.

[86]

도면의 간단한 설명

- [87] 도 1은 MSC 스피어 및 제프로그래밍에 대한 CD49f의 역할을 나타내는 개략도이다. 성체줄기세포에서 CD49f의 역할을 요약한 것으로, CD49f 활성화가 어떻게 PI3K/AKT의 인산화를 야기하는지, MSC 스피어 형성 및 MSC 세포 분화능(cellular potency)의 증진에 관여하는지 보여준다.
- [88] 도 2는 각 조직으로부터 배양에 의해 얻어진 스피어(Sphere) 및 상기 스피어(Sphere)에 존재하는 줄기세포마커를 확인한 결과이다. 도 2A는 제대혈(hUCB-MSC), 지방조직(hAD-MSC) 및 골수(hBM-MSC)로부터 배양된 성체줄기세포의 현미경 사진이다. 도 2(B)는 FACS에 의해 측정된 단층 배양된 성체줄기세포 및 성체줄기세포 유래의 스피어에서의, CD44(upper panel) 및 CD90(lower panel)과 같은, 성체줄기세포 양성 표면 마커의 발현 양상이다. 도 2(C)는 FACS에 의해 측정된 단층 배양된 MSC 및 MSC-유래의 스피어에서의 조혈세포-특이적 마커인 CD34 및 CD117의 발현 양상이다.
- [89] 도 3(A)는 단층 배양된 세포(비교예 1) 및 스피어-유래의 세포(실시에 1)의 세포증식능(CPDL)을 도시한 그래프이다 (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 3(B)는 단층 배양된 세포(비교예 1) 및 스피어-유래의 세포(실시에 1)의 유전자 발현변화를 나타낸 것이다.
- [90] 도 4(A)는 비교예 1(부착배양-단층 형성) 및 실시에 1(비부착배양-스피어 형성)에서 배양된 성체줄기세포의 위상차 이미지(phase contrast image)이다. 평균적으로, 배지 1ml 당 15,000 세포를 접종하였다. Scale bar = 100 μ m.
- [91] 도 4(B-E)는 구체적인 조직으로의 유도 후 단층 세포(왼쪽 패널) 및 스피어-유래의 세포(오른쪽 패널)의 위상차 이미지이다. 분화된 세포에서의 지방방울 축적(lipid droplet accumulation)은 지방세포 유도 3주 후 oil red O 염색을 통하여 시각화되었다 (B, C). 골세포 유도 3주 후 Alizarin Red S를 이용해 미네랄 퇴적(deposition)을 염색하였다 (D, E). 도4(F)는 Oil red O가 염색된 염료를 100% 이소프로판올로 용출하였고, 500 nm 파장에서 흡광도를 측정한 것이다 (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도4(G)는 전체 100 nM cetylpyridinium chloride를 Alizarin red S dye의 용출에 사용하였고, 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도4 (H)는 지방세포 분화 효율을 C/EBP β , AP2, PPAR γ , 및 LEPTIN와 같은 지방세포 마커 유전자 발현에 의해 측정하였다. 도 4(I)은 골세포 유도 효율을 결정하기 위하여 골-특이적 OSTEOCALCIN 및 골아세포-특이적 전사인자인 RUNX2의 발현 수준을 확인하였다.
- [92] 도 5는 비교예 1(부착배양-단층 형성)와 실시에 1(비부착배양-스피어 형성)에서 배양된 성체줄기세포의 신경세포로의 분화능을 나타낸 결과이다.
- [93] 도 6 (A)는 스피어 배양 7일 후 웨스턴 블롯 분석을 수행한 것으로, 40 μ m strainer를 이용해 MSC 스피어를 수거하여 두 번 세척하였고, 단층세포, 스피어, 0.2 μ M BIO를 처리한 스피어 및 30 μ M LY294002를 처리한 스피어에서 PI3K와

이것의 순차적인 하류 이펙터(sequential downstream effector)인 AKT 및 GSK3 β 의 인산화 수준을 분석한 것이다. 도 6(B)는 0 uM, 0.2 uM, 또는 0.5 uM 농도로 GSK3 저해제인 BIO를 포함하는 성장 배지에서 배양한 MSC 스피어의 수치이다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 6(C)는 표시된 농도의 BIO에서 배양된 MSC 스피어의 위상차 이미지이다. 도 6(D)는 0 uM, 10 uM, 30 uM, 또는 50 uM 농도의 PI3K 저해제인 LY294002를 포함하는 성장 배지에서 배양된 MSC 스피어의 수치이다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 6(E)는 표시된 농도의 LY294002에서 배양된 MSC 스피어의 위상차 이미지이다.

[94] 도 7은 부착배양-단층 형성(비교예 1)과 스피어-유래의 세포(실시예 1)의 인테그린 관련 표면항원 발현을 관찰한 결과이다. FACS에 의해 측정된 MSC 스피어-유래의 세포(실시예 1) 및 단층 배양된 MSCs(비교예 1)에서의 CD49a, CD49b, CD49e, 및 CD104의 발현 수준을 나타낸 것이다. FACS 분석을 세 번 실시한 후에 결과를 차트화하였다. (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$)

[95] 도 8(A)는 단층 배양된 성체줄기세포(비교예 1) 및 스피어-유래의 성체줄기세포(실시예 1)에서 CD49f 발현을 면역세포화학 분석한 것이다. 단층 MSCs 및 분리된 MSC 스피어를 4-well chamber slide에 동일한 초기 수량(same starting number)으로 접종하였다. 3일 후, 세포를 고정하여 표시된 항체를 이용하여 분석하였다. Scale bar = 100um. 도 8(B)는 CD49f의 발현 수준을 FITC-conjugated 항체를 이용해 FACS로 분석한 것이다. 측정은 세 번 반복하였다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 8(C)는 FAK 및 PAXILLIN와 같은 인테그린의 하류 신호전달자의 활성(Activities of downstream signal transducers)을 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다. 도 8(D)는 성체줄기세포를 CD49f 음성 및 CD49f 양성 세포군으로 FACS sorting한 것이다. 도 8(E)는 CD49f 음성 및 CD49f 양성 세포군 모두에 대하여 RT-PCR을 수행하여 인테그린과 관련된 마커인 CD49f, PAXILLIN, FAK, ILK의 발현 수준을 분석한 것이다. 도 8(F)는 유세포 분석기로 CD49f 음성 및 양성 세포를 sorting 한 후, 각 세포군의 스피어-형성 효율성을 확인한 것이다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 8(G)는 CD49f-음성 및 -양성 세포군에서 스피어 크기를 측정한 것이다. 스피어-크기를 측정하기 위하여, 15개 스피어를 임의로 선택하여 통계적으로 분석하였다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 8(H)는 CD49f-음성 또는 -양성 세포로부터 유래된 하나의 대표적인 스피어의 위상차 이미지이다.

[96] 도 9(A)는 CD49f, LY294002, BIO의 존재 및 부재시에 대하여 MTT 세포 증식 분석을 실시한 결과물이다. 세포를 24-well 플레이트에 접종하고, 24시간, 48시간에 광학 밀도(optical density)를 측정하였다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 9(B)는 CD49f, LY294002, BIO의 존재 및 부재시에 대하여 스피어 수치를 측정한 것이다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 9(C)는 PI3K/AKT/GSK3 β 에 대한 웨스턴 블롯 분석을 실시한 것이다. 세포에 CD49f 발현 백터를 형질도입하였고, LY294002 및 BIO를 처리하였다. 각각의 단백질에 대한 phospho-특이적 항체를 이용하여

웨스턴 블롯을 통해 단백질 키나아제의 인산화 수준을 확인하였다. 각각의 well에 20 μ g의 단백질 용해물(lysate)을 로딩(loading)하였다.

- [97] 도 10(A)는 CD49f, LY294002, BIO의 존재 및 부재시 성체줄기세포를 골세포 컨디션드 배지(osteogenic conditioned media)에서 배양한 것이다. alizarin red S 염색을 통해 골형성(Osteogenesis)을 확인하였다. 도 10(B)는 Alizarin red S가 염색된 용기를 cetylpyridinium chloride와 함께 배양하고, 용출된 alizarin red S solution을 570 nm에서 ELISA로 확인한 것이다 (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 10(C)는 골세포 분화 효율을 BGLAP, VDR, MSX2, Osteocalcin, RUNX2와 같은 골세포 마커 유전자의 발현으로 확인한 것이다. 도 10(D)는 CD49f, LY294002, BIO의 존재 및 부재시 지방세포 유도 배지에서 성체줄기세포를 배양하고, 유도 2주 후, Oil Red O 염색을 통해 세포질 내 지방방울의 축적을 시각화한 것이다. 도 10(E)는 Oil Red O을 100% 이소프로판올로 용출시키고, 500 nm에서 광학적으로 흡광도를 측정한 것이다 (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 10(F)는 지방세포 분화 효율을 CEBP- β , AP2, PPAR- γ , LEPTIN와 같은 지방세포 마커 유전자의 발현을 통해 확인한 것이다.
- [98] 도 11(A)는 실시간 PCR로 확인한 mRNA 발현의 정량적 측정한 것이다. 단층 세포(비교예 1) 및 MSC 스피어(실시에 1)에서의 전분화능 마커의 상대적인 mRNA 발현 수준이 제시되어 있다. 모든 분석은 세 번 반복하였고, 내인성 β -ACTIN으로 정규화하였다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 11(B, C)는 성체줄기세포를 OCT4 또는 SOX2를 표적으로 하는 siRNAs로 형질도입하고, OCT4 및 SOX2의 발현 수준을 실시간 PCR로 분석한 것이다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 비-표적화 siRNA(siCON)를 대조군으로 사용하였다. 도 11(D)는 형질도입 48시간 후, 세포를 수거하여 실시간 PCR을 통해 CD49f 발현을 확인한 것이다. 도 11(E)는 siRNA가 형질도입된 세포 및 대조군이 형질도입된 세포에서의 스피어-형성 효율을 측정한 것이다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$). 도 11(F)는 항-OCT4, 항-SOX2 항체를 이용하여 염색질 면역침전을 수행한 것이다. CD49f 프로모터의 세 개의 영역을 표적으로 하는 특이적인 프라이머 세트가 표 1에 나열되어 있다. 도 11(G)는 대조군 바이러스 및 OCT4, SOX2 바이러스로 감염된 세포에 대하여 CD49f, OCT4, SOX2의 면역세포화학 분석을 실시한 것이다. Hoechst (Blue)로 핵을 염색하였다. Scale bar = 50 μ m. 도 11(H)는 FACS를 이용하여 콘트롤 및 OCT4, SOX2가 과발현된 세포에서의 CD49f 양성 세포군을 확인한 것이다. 도 11(I)는 대조군과 비교하여 CD49f mRNA 발현을 정량적으로 측정한 것이다. OCT4, SOX2, LIN28, NANOG가 과발현된 세포의 조합으로 표시되었다. 도 11(J)는 바이러스로 감염된 세포의 표시된 조합 사이의 CD49f 단백질 발현을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 실시한 것이다.
- [99] 도 12는 GFP 발현에 의해 결정된 바이러스 감염 효율을 나타낸 것이다. 충분한 감염 효율은 iPSCs을 생성하는데 필수이다. 신호전달 효율은 GFP 바이러스를 이용하여 결정되었다.

- [100] 도 13(A)은 표시된 유전자의 조합으로 성체줄기세포를 감염시킨 것이다. Bright-field images 및 alkaline-phosphate reactivity가 표시되어있다. 도 13(B)는 외배엽(Neural epithelium, Neural rosette), 중배엽(Smooth muscle), 내배엽(Adipose tissue, Gut epithelium)의 조직학적 개요(histological overview)를 나타내는 iPSCs-유래 테라토마의 Hematoxylin 및 eosin 염색 결과이다. 도 13(C)는 RT-PCR을 이용한 전분화능 마커 유전자 및 CD49f, β -ACTIN의 발현 수준을 분석한 것이다. 도 13(D)는 CD49f, 전분화능 마커 및 si콘트롤, siCD49f가 형질도입된 hESC의 삼배엽성 마커의 발현 수준을 나타낸 것이다. 도 13(E)는 hESC를 비-표적화 siRNA 및 CD49f를 표적으로 하는 siRNA로 형질도입하고, 연속해서 세 번 형질도입 후, 세포 용해물을 수거하여 PI3K/AKT/GSK3 β 에 대한 웨스턴 블롯 분석한 것이다. 도 13(F)는 PI3K 저해제인 LY294002를 표시된 농도로 hESC에 처리하고, 실시간 PCR을 이용해 NANOG 및 CD49f 발현을 측정하는 것이다.
- [101] 도 14(A)는 인간 iPSCs 및 hESC의 위상차 이미지이다. 자연적인 분화를 위하여, hiPSCs 및 hESC를 8일 동안 부유배양함으로써 배상체(EBs)를 형성하였다. 추가적인 분화를 수행하기 위하여, EBs를 젤라틴-코팅된 용기에 transfer하여 8일 동안 유지하였다. 도 14 (B)는 콘트롤 siRNA 및 CD49f를 표적으로 하는 siRNA로 형질도입된 hESC의 위상차 이미지이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [102] 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.

[103]

[104] 제조예 1: 제대혈에서 MSCs 분리

- [105] 보라매병원 산하 임상시험심사위원회(Institutional Review Board, IRB) 및 산모의 동의를 받은 후, 출산 이후에 얻어진 hUCB로부터 성체줄기세포를 추출하였다. UCB 샘플을 HetaSep 용액(Stem Cell Technology, Vancouver, Canada)과 5:1 비율로 혼합하였고, 적혈구가 제거될 때까지 실온에서 배양하였다. 상층액을 수거하여 2,500 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 Ficoll 밀도구배를 수행하였다. 단핵세포를 수득하여 정상적인 배양 조건에서 배양 접시에 접종하였다.

- [106] 성장 배지는 10% FBS, 10 ng/ml의 bFGF, 5 ng/ml의 EGF, 20 ng/ml의 long R3-IGF1, 및 1 ug/ml의 아스코르브산을 포함하는 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, USA)이었다. 모든 절차는 서울대학교 IRB(IRB No. 0603/001-002-07C1)에 의해 승인되었다.

[107] 제조예 2: 인간 배아줄기세포 준비

[108] 인간 배아줄기세포(hESCs)는 물질 양도 동의 하에 CHA stem cell research laboratory로부터 얻었다. hESCs 및 인간 유도 전능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, hiPSCs)는 mitomycin C가 처리된 STO 배양보조세포(feeder cell)에서 인간 ES/iPS 세포 배지를 이용하여 유지하였다. 문헌 (Cowan et al., 2004)에 기재된 대로, Knockout DMEM에 20% knockout serum replacement, 20ng/ml bFGF, 1% nonessential amino acids, 1% GlutaMAX, 1% penicillin/streptomycin, 0.1mM β -mercaptoethanol를 첨가하였다. 모든 절차는 서울대학교 IRB(IRB No. 1008/001-001)에 의해 승인되었다.

[109]

[110] 실시에 1: 제대혈 유래 성체줄기세포 스피어 형성

[111] 세포가 플라스틱 용기의 바닥에 부착되는 것을 방지하여 성체줄기세포 스피어를 형성하기 위하여, 1% 아가로스로 코팅된 100mm 배양 용기(Nunc, Rochester, NY)를 사용하고 제조예 1에 기재된 성장 배지에서 1.5×10^5 성체줄기세포를 배양하였다. 1 ml의 배지당 전체 15,000 세포를 접종하였고, 1주일 동안 성체줄기세포 스피어를 배양하였다. 세포 손실을 방지하기 위하여, 일주일에 두 번만 부분적으로 배양액을 교체하였다. 7일 후, 40um pore cell strainer를 이용하여 성체줄기세포 스피어를 수거하였다. 수거한 성체줄기세포 스피어는 PBS로 세척하였고, 추가적인 실험을 하기 전에 부드럽게 원심분리(800 rpm/5 min)하였다.

[112]

[113] 실시에 2: 지방조직 및 골수 유래의 성체줄기세포의 스피어 형성

[114] hUCB 유래 성체줄기세포 대신 지방조직 및 골수에서 유래된 성체줄기세포를 사용한 것을 제외하고는 실시에 1과 동일한 방법으로 성체줄기세포 스피어를 수거하였다.

[115]

[116] 비교예 1: 제대혈 유래 성체줄기세포의 단층 배양

[117] 제조예 1에서 수득한 세포를 플라스틱 배양 디쉬(plastic culture dish)에서 단층 배양하였다.

[118]

[119] 실험예 1: 성체줄기세포 스피어의 표면항원 확인

[120] 비교예 1과 같이 단층 배양할 경우에는 성체줄기세포가 평평하고(flattened) 방추형 모양(spindle-shaped)의 모폴로지를 나타내나, 실시에 1 및 2와 같이 비부착배양할 경우에는 부유하는 회전타원체 콜로니(성체줄기세포 스피어)를 형성하였다. 비교예 1과 실시에 1 및 2에서 수거한 성체줄기세포 스피어에서 얻어진 세포로부터 성체줄기세포의 특성을 나타내는 표면항원을 확인하기 위해 각각의 세포를 원심분리로 수거한 다음, monoclonal mouse anti-human fluorochrome-conjugated antibody인 CD44-FITC, CD90-Alexa Fluor 647, CD34-PE 및 CD117-PE(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 처리하여 염색하고,

FACSAria(BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 및 FACSDiva software(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하여, 세포 표면마커에 대한 분석을 수행하였다.

[121] 수행결과 스피어 상태로 배양되어도 줄기세포의 표면항원에 변화가 없음을 확인하였다(도 2).

[122] FACS 분석을 통해, 성체줄기세포 유래의 단층 배양된 세포 및 성체줄기세포 유래의 스피어에서 표면에 MSC 마커가 발현하는지 여부를 확인하였다. 도 2B에 나타난 바와 같이, 단층 배양된 세포 및 MSC 스피어 모두 MSC 마커에 양성이었지만(CD44 및 CD90), 조혈줄기세포 마커인 CD34 및 CD117에 대해서는 음성이었다 (도 2C).

[123]

[124] 실험예 3: 성체줄기세포 스피어의 세포분열능력

[125] 실시예 1에서 수거한 스피어를 단일세포화 한 후에 비교예 1의 성체줄기세포와 함께 10% FBS 함유 배지에서 유지하였고, 매주 간격으로 계대배양하였다. 증식능 추정치(estimated proliferation potential)는 문헌(Park et al., 2009, Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. Cell Prolif42,711-720.)에 기재된 아래의 방정식을 이용하여 CPDL(cumulative population doubling level)을 결정함으로써 측정되었다.

[126] $CPDL = \ln(N_f/N_i) / \ln 2$

[127] 상기 N_i 및 N_f 각각은 초기 및 최종 세포 갯수이다. 총 50,000 세포는 초기에 6-well 배양 용기(Nunc, Rochester, NY)에 플레이팅하였고, 주당 한 번 계수하였다.

[128] CPDL을 평가하여, 단층 배양된 세포(비교예 1)와 스피어-유래의 세포(실시예 1)의 증식능을 비교하였다. 2주 후 CPDL 7.7에서 스피어-유래의 세포는 단층 배양된 세포에 비해 빠르게 세포증식하였다 (도 3A). 이러한 데이터는 성체줄기세포 스피어는 성체줄기세포와 면역학적 특성을 공유하고, 스피어-유래의 세포는 단층 배양된 세포에 비해 좀 더 격동적으로 분열한다는 것을 입증하였다.

[129]

[130] 실험예 4: 성체줄기세포 유래 스피어를 구성하는 세포의 유전자 발현변화

[131] 실시예 1과 동일한 방법으로 성체줄기세포를 비부착성 배양하고, 배양 개시 후 7일째에 이로부터 얻어진 스피어를 수거하여, 40 μ m의 cell strainer에 통과시키고, PBS로 세척한 후, 원심분리하여 1차 스피어(sphere)를 수득하였다. 상기 1차 스피어(P6)에 대해 trypsin-EDTA로 세포를 단일상태로 분리하고, agarose가 코팅된 새 배양용기에 옮겨, 2차 스피어(P12)를 제조하였다.

[132] 상기 스피어(sphere(P6) 및 sphere(P12)) 및 비교예 1에서 수거한 단층 배양된 성체줄기세포로부터 제조사가 권장하는 방법에 따라 Trizol Reagent™(Invitrogen,

USA)를 사용하여 전체 RNA를 추출하고, 여기에 oligo dT primer 및 Accupower RT premix(Bioneer, Korea)를 혼합하여 cDNA를 합성하였으며, 상기 cDNA를 주형으로 하여 Accupower PCR premix(Bioneer, Korea)를 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 따라 PCR을 수행하였다.

[133] 그 결과, 단층 배양방법보다 비부착성 배양으로 얻어진 1차 및 2차 스피어에서 OCT4, SOX2 및 NANOG의 발현이 향상된 것이 확인되었으며, 또한 ZNF281 및 c-MYC의 발현은 변화가 없는 것으로 나타났다(도 3B).

[134]

[135] 실시에 3: 성체줄기세포 유래 스피어의 세포 분화능의 확인

[136] 단층 배양된 세포(비교예 1)와 스피어-유래의 세포(실시에 1)에 대해서 지방조직, 골조직 및 신경조직으로의 분화능을 관찰하였다.

[137]

[138] 3-1. 지방조직으로의 분화

[139] 단층 배양된 세포(비교예 1)와 스피어-유래의 세포(실시에 1)에 대해 5% FBS, 1 uM dexamethasone, 10 uM insulin, 200 uM indomethacin, 0.5 mM isobutylmethylxanthine을 함유하는 DMEM을 사용하여 지방조직으로 분화를 유도하기 위한 세포배양을 수행하였다.

[140] 세포 내에 존재하는 지방축적 여부로 분화정도를 파악하기 위하여, 배양된 세포에 Oil Red O 염색하고, 100% isopropyl alcohol을 사용하여, 세포에 침투된 Oil Red O를 다시 추출하여, 이를 OD 500에서 ELISA plate reader(EL800, Bio-Tek Instruments, USA)로 정량하였다. 또한, RT-PCR을 사용하여, 지방조직 세포 특이적 유전자인 C/EBP β , AP2, PPAR γ 의 발현을 조사하였다.

[141] 그 결과, 스피어에서 Oil Red O 염색비중이 더 높았으며, 특히 지방조직세포 특이 유전자인 C/EBP β , AP2, PPAR γ 및 Leptin의 유전자 발현이 단층배양한 MSC보다 스피어에서 훨씬 높았다. (도 4C, 4F, 및 4H). 이는 MSC 스피어-유래의 세포는 지방세포 계열로의 분화능력이 더 높다는 것을 보여준다.

[142]

[143] 3-2. 골조직으로의 분화

[144] 단층 배양된 세포(비교예 1)와 스피어-유래의 세포(실시에 1)에 대해 5% FBS, 50 uM L-ascorbate-2-phosphate, 0.1 uM dexamethasone, 10 uM glycerophosphate를 함유하는 DMEM을 사용하여 세포배양을 수행하여 골조직으로의 분화를 유도하였다. Calcium에 특이적인 Alizarin Red Stain을 한 후, 상기 염색약을 100 mM의 cetylpyridinium chloride(Sigma-Aldrich)를 1 시간 동안 처리하여 용출하고 정량분석에 사용하였다. 분광광도계를 이용하여 570 nm에서 solubilized alizarin red S의 방출을 측정하였다.

[145] 또한, RT-PCR을 사용하여, 골조직 세포 특이적 유전자인 OSTEONUCALIN 및 RUNX2의 발현을 조사하였다.

[146] Alizarin red S 염색을 통해, 스피어-유래의 MSC는 골세포 분화에 더

효과적임을 확인하였다. 스피어-유래의 세포는 또한 골세포 유도 후에 OSTEOCALCIN 및 RUNX2의 발현 수준이 증가하였다(도 4E, 4G 및 4I). 이는 MSC 스피어-유래의 세포는 골세포 계열로의 분화능력이 더 높다는 것을 보여준다.

[147]

[148] 3-3. 신경조직으로의 분화

[149] 단층 배양된 세포(비교예 1)와 스피어-유래의 세포(실시에 1)에 대해, 배양 초기에는 5% FBS 및 10ng/ml β FGF를 함유하는 DMEM의 분화 전 배지(pre-induction medium)에서 유지하다가 신경세포로 분화되도록 100 μ M BHA, 50 μ M forskolin, 2% DMSO, 25 mM KCl, 2 mM valproic acid, 1X B27 supplement, 10ng/ml β FGF 및 10 ng/ml PDGF를 함유하는 DMEM을 사용하여 24시간 동안 세포배양을 수행하였다.

[150] 상기 방법으로 분화된 세포로부터 RNA를 추출하여 이를 주형으로 RT-PCR을 수행하였으며, 신경세포 특이적 유전자인 MAP2, TUJ-1 및 PAX6의 발현을 조사하였다.

[151] 그 결과, 신경세포 특이적 유전자인 MAP2, TUJ-1 및 PAX6이 단층 배양된 세포에서 분화된 세포보다 스피어-유래의 세포에서 분화된 세포에서 발현이 크게 증가한 것으로 나타났다(도 5).

[152]

[153] 실험예 5: 성체줄기세포 스피어는 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 통하여 MSC 스피어의 세포증식 및 생존을 조절함.

[154] GSK3 및 PI3K 신호전달이 스피어 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 저해 실험을 실시하였다. 0 μ M, 0.2 μ M, 또는 0.5 μ M의 GSK3 저해제인 BIO(Sigma-Aldrich) 또는 0 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 또는 50 μ M의 PI3K 저해제인 LY294001(Calbiochem, La Jolla, CA)를 처리한 후에 성체줄기세포 스피어 형성이 관찰되었다. 성체줄기세포 스피어의 수는 배양 7일 후 계수하였다.

[155] PI3K, AKT, GSK3 β 에 대한 웨스턴 블롯 분석은 문헌(Park et al., 2009)에 따라 수행하였다. 단층 또는 스피어로서 배양된 성체줄기세포를 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM antipain, 및 0.1 mM sodium orthovanadate가 첨가된 1% Triton X-100, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS를 포함하는 50 mM Tris-HCl buffer에서 파쇄시켰다. DC assay kit(Bio-Rad, USA)를 이용해 단백질 함량을 확인하였고, 10~15%의 Polyacrylamide gel에 일정량의 단백질을 Loading하여 SDS-PAGE를 수행하였으며, 단백질을 50 V, 350 mA에서 5시간 동안 nitrocellulose membrane로 전사시켰다. 모든 항체는 제조업체의 지시에 따라 사용하였고, enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용해 단백질 밴드를 확인하였다.

[156] 도 6A에 나타난 바와 같이, 단층 배양된 성체줄기세포에 비해, BIO를 처리 및

비처리한 성체줄기세포 스피어에서 phospho-PI3K 및 phospho-AKT가 증가하였지만, LY294002로 처리하였을 때는 본질적으로 활성상태인 GSK3 β (Ser9)의 탈인산화를 야기하였다.

- [157] 이어서, PI3K/AKT/GSK3 β 경로가 성체줄기세포스피어 형성과 관련이 있는지 확인하기 위하여, BIO 또는 LY294002로 처리한 후의 스피어 형성 효율을 평가하였다. 7일 후, 0.2 μ M 내지 0.5 μ M 농도로 BIO를 처리한 군에서는 형성된 스피어의 개수뿐만아니라 스피어의 크기가 상당히 증가하였고, 이것은 GSK3 β 활성이 스피어 형성에 저해적이라는 것을 제시한다 (도 6B 및 6C). 반면에, 30 μ M 내지 50 μ M 농도로 LY294002를 처리한 군에서는 성체줄기세포 스피어의 갯수 및 크기가 상당히 감소하였다 (도 6D 및 6E). 이와 더불어, 이러한 결과는 PI3K/AKT/GSK3 β 신호전달 경로는 스피어 형성에 필수적이고, anchorage-independent 생존을 촉진한다는 것을 의미한다.

[158]

[159] 실험에 6: 성체줄기세포 유래 sphere의 표면마커의 발현변화

- [160] 단층 배양된 세포(비교예 1)와 스피어-유래의 세포(실시에 1)로부터, 표면마커의 발현을 정량적으로 분석하기 위하여, 각각의 세포를 원심분리 후 수거한 다음, monoclonal mouse anti-human fluorochrome-conjugated antibody인 CD49a-PE, CD49b-PE, CD49f-FITC, CD49e-PE, CD104-PE(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 처리하여 염색하고, FACS Aria(BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 및 FACSDiva software(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하여, 세포 표면마커에 대한 분석을 수행하였다.

- [161] 상기 FACS 분석의 결과, 스피어-유래의 세포(실시에 1)가 단층 배양된 세포(비교예 1) 보다 CD49f 및 CD104의 발현이 높은 것으로 확인되었다(도 7). 상기 실험은 동일 조건으로 세 번 반복하였으며, 그 평균값으로 결론을 도출하였다.

[162]

[163] 실험에 7: CD49f의 상향조절은 FAK/Paxillin의 인산화를 통하여 성체줄기세포 스피어 형성에 기여함.

- [164] 인테그린은 세포의 기질과 상호작용하는 중요한 분자 중 하나이며, FAK 및 Paxillin을 포함하는 local protein kinase을 통하여 PI3K/AKT와 같은 생존- 및 성장-연관된 신호전달 경로를 개시한다. 따라서, FACS 분석을 실시하여, 단층 배양된- 성체줄기세포 (비교예 1) 및 스피어-유래의 성체줄기세포 (실시에 1) 모두에서 인테그린의 발현 프로필을 확인하였다.

- [165] CD49f에 대한 면역세포화학 분석은 다음과 같이 수행하였다. 단층 배양된 세포 및 스피어-유래의 MSCs 를 4% paraformaldehyde에서 고정하였고, 0.2% Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA)에서 투과되었다. 세포를 10% normal goat serum(Zymed Laboratories Inc., USA)과 함께 배양하였고, 일차 항체로 표지한 후, Alexa 488-labeled 이차 항체(1:1000; Molecular Probes, USA)와 함께 1시간 동안

배양하였다. Hoechst 33258 (1 μ g/ml; 10 min)로 핵을 염색하였다. 공초점 현미경(Nikon, Eclipse TE200, Japan)으로 세포 이미지를 캡처하였다.

- [166] CD49a 및 CD49b의 발현 수준은 두 조건들 간에 큰 차이가 없었지만, CD49e는 MSC 스피어에서 크게 감소하였다. 하지만, 이종이량체(heterodimer)를 형성하는 CD49f 및 CD104는 성체줄기세포 스피어-유래의 세포에서 상향조절되었다 (도 8B, 도 7). CD49f-양성 세포의 빈도(frequency)는 플라스틱 배양용기에서 자란 성체줄기세포에 비해 성체줄기세포 스피어에서 167% 더 높았다. 면역세포화학(Immunocytochemistry) 결과는 FACS 분석 결과와 일치하였다. 단층 배양된(normal cultured) 성체줄기세포에 비해 스피어-유래의 성체줄기세포에서 CD49f 발현 증가 및 이러한 마커에 양성인 세포수의 증가가 관찰되었다 (도 8A). 웨스턴 블롯 분석을 통하여, 성체줄기세포 스피어에서 phospho-Paxillin 및 phosphor-FAK의 단백질 수준이 증가하였고, CD49f 단백질 수준이 증가하였음이 관찰되었다 (도 8C).
- [167] 인테그린 발현이 스피어 형성 효율에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 전체 MSC 세포군 중 CD49f-양성 세포군을 수집(gating)하여 CD49f 발현 프로필을 토대로 FACS sorting 하였다 (도 8D). hUCB-MSCs 및 성체줄기세포 스피어를 수거하여 trypsin-EDTA를 이용해 단일 세포화하였다. 세포 표면 마커가 재-발현되도록 하기 위하여 트립신화된 세포(trypsinized cell)를 5% FBS가 첨가된 PBS에 10분 동안 위치하였다. 이후, 원심분리를 통해 세포를 수거하여 단일클론 마우스 항-인간 fluorochrome-conjugated 항체(CD49a-PE, CD49b-PE, CD49f-FITC, CD49e-PE, CD104-PE, CD34-FITC, 및 CD44-FITC, all from BD Bioscience, San Jose, CA; CD90-Alexa Fluor 647 및 CD117-PE, both from BioLegend)로 표지하였다. FACSDiva software(BD Biosciences)를 이용하여 형광표지세포분리기(fluorescence-activated cell sorter)인 FACS Aria (BD Biosciences)로 표지된 세포를 sorting 및 분석하였다.
- [168] Integrin signaling에 관여하는 OCT4, C-MYC, CD49b, CD49f, Paxillin, FAK 및 ILK의 발현정도를 RT-PCR로 확인하였다.
- [169] 인테그린의 하류(downstream) 티로신 키나아제인 Paxillin, FAK 및 ILK의 mRNA 수준은 CD49f-양성 세포군에서 증가하였다 (도 8E). CD49f-양성 세포는 스피어 형성에 좀 더 효율적이었고, 스피어 직경은 CD49f-음성 세포의 스피어 직경에 비해 약 2.2배 증가하였다 (도 8F, 8G 및 8H). 이러한 결과들로부터, CD49f 발현 수준의 증가가 인테그린 신호들의 활성화와 관련이 있고, 성체줄기세포가 부착-비의존성 성장(anchorage-independent growth)에서 생존할 수 있게 한다는 것을 추론할 수 있다.
- [170]
- [171] 실험예 8: CD49f의 과발현은 PI3K/AKT/GSK3 경로를 활성화시킴으로써 세포 증식 및 분화를 조절함
- [172] CD49f 유전자 발현이 PI3K/AKT/GSK3 경로의 활성화에 의존적인지 여부를

추가로 확인하기 위하여, CD49f를 과발현하는 성체줄기세포에 LY294002 또는 BIO를 24 및 48 시간 동안 처리하였다.

- [173] 세포의 증식능은 살아있는 세포가 tetrazolium salt를 purple formazan으로 바꾸는 능력을 바탕으로 하는 MTT 분석을 통해 측정하였다. 성체줄기세포는 콘트롤 벡터 또는 CD49f 발현 벡터 중 어느 하나로 형질도입하였다. 형질도입 24시간 후, 24-well 플레이트에 세포를 접종하였고, LY294002 및 BIO가 포함된 배지로 배양하였다. 24, 48시간 배양 후, 각각의 well에 50 ml의 MTT stock solution(5 mg/ml, Sigma)을 첨가하였고, 37°C에서 4시간 동안 좀 더 배양하였다. 상층액을 제거한 후, 불용성 purple formazan crystals이 물에 녹을 수 있도록 각각의 well에 DMSO 200 ml을 첨가하였다. 이후, 96-well microplate로 transfer하여 reading 하였다. EL800 microplate reader(BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, U.S.A.)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 측정은 세 번 반복하였다.
- [174] CD49f를 과발현하는 성체줄기세포에서, MTT 분석을 통해 BIO를 처리하지 않은 성체줄기세포에 비해 처리한 성체줄기세포에서 성장률이 좀 더 높았지만, LY294002는 세포 증식을 저해하였음을 확인하였다 (도 9A). 이와 일치하여, 스피어 형성 분석(assay)에서, BIO는 성체줄기세포 스피어 갯수를 증가시켰지만, LY294002는 CD49f를 과발현하는 성체줄기세포의 스피어 형성을 저해하였다 (도 9B). 웨스턴 블롯 분석을 통해, CD49f 과발현은 성체줄기세포에서 PI3K, AKT 및 GSK3 β 의 인산화 수준을 증가시켰음을 확인하였다. BIO 처리는 AKT 및 GSK3 인산화를 유도하였지만, LY294002 처리는 CD49f를 과발현하는 성체줄기세포에서의 AKT 인산화를 억제하였다 (도 9C). 이러한 데이터로부터, CD49f의 상향조절은 세포 증식 매개시 PI3K/AKT/GSK3 경로를 활용한다는 것을 추론할 수 있다.
- [175] 이어서, 성체줄기세포의 골세포 분화 및 지방세포 분화에 있어서 CD49f 발현이 PI3K/AKT/GSK3 경로에 의해 조절되는지 여부를 확인하였다. CD49f가 과발현된 성체줄기세포에 LY294002 및 BIO를 처리하고, 각각을 골세포- 및 지방세포 배지에서 배양하여, 골세포 및 지방세포 계열로 분화시켰다.
- [176] Alizarin Red 염색법을 통해, 골세포로 유도된 세포에서 CD49f는 미네랄 증착을 증가시키고, CD49f가 과발현된 MSCs에 BIO를 처리한 경우 미네랄 증착이 더 증가된 반면, CD49f가 과발현된 MSCs에 LY294002를 처리한 경우 미네랄 증착 수준이 상당히 감소된 것을 확인하였다 (도 10A 및 10B). 이와 일치하여, RT-PCR을 통해 확인한 결과, 골세포 특이적 마커인 BGLAP, VDR, MSX2, OSTEOCALCIN 및 RUNX2의 mRNA 수준은 CD49f 과발현에 의해 증가하였으며, BIO를 처리한 성체줄기세포에서 더 증가하였지만, LY294002 처리한 경우 골세포 특이적 마커의 mRNA 수준이 감소하였다(도 10C).
- [177] 지방세포 분화에서, CD49f가 과발현된 세포는 지질 수준이 상당히 증가하였지만, BIO 및 LY294002는 미처리한 대조군에 비해 지질 축적을

억제하였다는 것을 Oil Red O 염색을 통해 확인하였다 (도 10D 및 10E). RT-PCR에서, 주요 지방세포 전사 인자인 C/EBP β , aP2, PPAR γ , 및 LEPTIN의 mRNA 수준은 CD49f 과발현시 증가하였지만, BIO 및 LY294002는 지방세포 전사 인자들의 mRNA 수준을 억제하였다 (도 10F). 이러한 데이터로부터, PI3K/AKT/GSK3 경로의 상향조절은 CD49f가 과발현된 성체줄기세포에서 지방세포 분화 보다 특이적으로 골세포 분화를 촉진한다는 것을 알 수 있다.

[178]

[179] 실험에 9: OCT4 및 SOX2는 CD49f에 결합하고 CD49f 프로모터 영역을 통하여 CD49f 전사를 조절함

[180] CD49f 발현은 성체줄기세포 스피어 형성 동안 인테그린 신호들의 상향조절과 관련이 있음을 확인하였기 때문에, 본 발명자들은 CD49f가 줄기세포의 전분화능(pluripotency)에 필수적인지 여부를 조사하였다.

[181] 제조업체의 지시에 따라 TRIzol reagent™ (Invitrogen)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 제조업체의 지시에 따라 SuperScript iii First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)를 이용하여 정제된 RNA 및 oligo-dT 프라이머를 혼합하여 cDNA를 합성하였다. Accupower PCR premix (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea)를 이용해 PCR을 수행하였다. 본 연구에서 사용한 프라이머 세트는 표 1에 나열되어있다. 모든 PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔과 ethidium bromide 염색을 통해 겔 전기영동으로써 분석하였고, Bio-Rad GelDoc XR system(Bio-Rad)을 이용하여 fluorescence digitization 하였다. cDNA, 각각에 대한 프라이머, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 혼합하여 실시간 PCR을 수행하였다. 제조업체의 지시에 따라, 제공된 소프트웨어(Applied Biosystems)와 ABI 7300 sequence detection system을 이용하여 유전자 발현을 정량화하였다. 각각의 유전자는 housekeeping 컨트롤인 β -actin 또는 RPL13A에 의해 정상화 되었다. 각각의 유전자에 대하여 최소 세 번 반복실험 하였다.

[182] 우선, 성체줄기세포 스피어에서 전분화능 마커들의 발현을 확인하였다. 인간 체세포를 만능 줄기세포(pluripotent stem cells)로 재프로그래밍할 수 있는 OCT4, SOX2, NANOG 및 LIN28의 mRNA 수준은 단층 배양 성체줄기세포에 비해 성체줄기세포 스피어에서 증가하였다 (도 11A).

[183] OCT4 및 SOX2가 CD49f에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 성체줄기세포 에 siOCT4 및 siSOX2를 형질도입 하였다.

[184] 특이적으로 OCT4, SOX2 및 CD49f를 저해하기 위하여, OCT4, SOX2, CD49f를 표적으로 하는 상업적인 siRNA(Dharmacon, ON Target plus SMART pool, OCT4: Cat# L-019591-00, SOX2: Cat# L-011778-00, CD49f: Cat# L-007214-00-0005)와 non-targeting siRNA(Dharmacon, ON Target plus SMART pool, Cat# D-001810-01)를 이용하여 siRNA 녹다운 연구를 수행하였다. 제조업체의 지시에 따라 siRNA를 형질도입하였다. 간략하게 말하자면, 5×10^4 /well농도로 세포를

접종하고, 세포가 50% 컨플루언스(confluence)에 도달하면 siRNA-포함하는 배지(항생제 불포함)를 첨가하였다. mRNA 발현을 증진시키기 위하여 48시간 동안, 단백질 발현을 증진시키기 위하여 72시간 동안 세포를 100 nM siRNA와 배양하였다. 이와 같은 배양 후, 유전자 및 단백질을 분석하기 위하여 RNA 및 단백질을 추출하였다.

- [185] OCT4 및 SOX2 siRNA 처리는 특이적으로 OCT4 및 SOX2 mRNA 발현을 차단하였다 (도 11B 및 11C). 또한, OCT4 및 SOX2를 표적으로 하는 siRNA는 CD49f mRNA 발현을 상당히 하향조절하였고, 성체줄기세포 스피어의 개수를 감소시켰으며, 이는 스피어 형성 분석을 통해 확인하였다 (도 11D 및 11E). OCT 및 SOX2가 CD49f 발현을 어떻게 조절하는지 확인하기 위하여, 성체줄기세포에 OCT4 및 SOX2를 과발현하는 렌티바이러스(lentivirus)를 감염(infection)시켰고, OCT4, SOX2 및 CD49f 발현을 면역세포화학 분석법을 통해 확인하였다. OCT4 및 SOX2 모두를 과발현하면 CD49f 발현이 증가하였다 (도 11G). 성체줄기세포에서 CD49f의 과발현은 또한 FACS 분석을 통해 단백질 수준에서 확인하였다.
- [186] 도 11H에 나타난 바와 같이, OCT4 및 SOX2를 과발현시키면 CD49f-양성 아-세포군(sub-population)을 증가시켰다. OCT4, SOX2 활성이 CD49f 발현을 어떻게 조절하는지 확인하기 위하여, OCT4 및 SOX2에 특이적인 항체를 이용하여 CD49 프로모터 부위에 대한 ChIP을 수행하였다. 항체에 결합한 절편화된 DNA를 RT-PCR에 사용하였으며, 이때 CD49f 프로모터 부위를 표적화하는 프라이머를 설계하여 사용하였다. 도 11F에 나타난 바와 같이, CD49f 프로모터 내 특정 영역이 OCT4 및 SOX2 단백질과 함께 증가하였고, 이것은 OCT4 및 SOX2가 CD49f 프로모터에 결합하고 CD49f의 발현을 활성화시킨다는 것을 제시한다. 이어서, 성체줄기세포에서 CD49f 발현이 OCT4, SOX2, LIN28 및 NANOG에 의해 조절되는지에 대하여 실험하였다. 성체줄기세포에 OCT4, SOX2, LIN28 및 NANOG에 대한 렌티바이러스를 감염시켰고, 실시간 PCR을 이용하여 CD49f의 mRNA 수준을 확인하였다. OCT4/SOX2 및 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG이 과발현된 경우 CD49f의 mRNA 수준을 상당히 증가되었다 (도 11H). 웨스턴 블롯 분석에서, 성체줄기세포에서 CD49f의 단백질 수준, FAK의 인산화가 Oct4/Sox2 및 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG의 과발현과 함께 증가하였다 (도 11I). 따라서, 이러한 데이터는 OCT4, SOX2, LIN28 및 NANOG는 성체줄기세포에서 인테그린 신호 경로를 향상시키는 양성 피드백 루프(positive feedback loop)를 가진다는 것을 제시한다.

- [187] 표 1

Names and sequences of the primers for RT-PCR and qRT-PCR assays		
Gene name	Primer sequence	
<i>β-ACTIN</i>	Forward:	AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC
	Reverse:	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
<i>C/EBP-β</i>	Forward:	GCG CGC TTA CCT CGG CTA CC
	Reverse:	TGG CCT TGT CGC GGC TCT TG
<i>AP2</i>	Forward:	GGG TCA CAG CAC CCT CCT GA
	Reverse:	GGT TTG GCC ATG CCA GCC AC
<i>PPAR-γ</i>	Forward:	CCT CCG GGC CCT GGC AAA AC
	Reverse:	CTC CTG CAC AGC CTC CAC GG
<i>LEPTIN</i>	Forward:	GAA GAC CAC ATC CAC ACA CG
	Reverse:	AGC TCA GCC AGA CCC ATC TA
<i>OSTEOCALCIN</i>	Forward:	CCT ATT GGC CCT GGC CGC AC
	Reverse:	GAC ACC CTA GAC CGG GCC GT
<i>RUNX2</i>	Forward:	CTT GAC CAT AAC CGT CTT CA
	Reverse:	GTC ATC AAT CTT CTG TCT GT
<i>Paxillin</i>	Forward:	AAC TGG TTG AAG GGT GTT GC
	Reverse:	AGG TTC AGT GGG TTC ACA GG
<i>FAK</i>	Forward:	CGA GAG ATT GAG ATG GCA CA
	Reverse:	TAC TCT TGC TGG AGG CTG GT
<i>ILK</i>	Forward:	AAG GTG CTG AAG GTT CGA GA
	Reverse:	ATA CGG CAT CCA GTG TGT GA
<i>VDR</i>	Forward:	CGG CCG GAC CAG AAG CCT TT
	Reverse:	CTG GCA GTG GCG TCG GTT GT
<i>MSX2</i>	Forward:	CCC TGG AGC GCA AGT TCC GT
	Reverse:	GGC GGG ATG GGA AGC ACA GG
<i>CD49f</i>	Forward:	TCA TGG ATC TGC AAA TGG AA
	Reverse:	AGG GAA CCA ACA GCA ACA TC
<i>OCT4</i>	Forward:	GTG GAG GAA GCT GAC AAC AA
	Reverse:	ATT CTC CAG GTT GCC TCT CA

<i>SOX2</i>	Forward:	TGG CGA ACC ATC TCT GTG GT
	Reverse:	CCA ACG GTG TCA ACC TGC AT
<i>LIN28</i>	Forward:	GGG GAA TCA CCC TAC AAC CT
	Reverse:	CTT GGC TCC ATG AAT CTG GT
<i>NANOG</i>	Forward:	ACC TTG GCT GCC GTC TCT GG
	Reverse:	AGC AAA GCC TCC CAA TCC CAA
<i>CMYC</i>	Forward:	AAG ACA GCG GCA GCC CGA AC
	Reverse:	TGG GCG AGC TGC TGT CGT TG
<i>KLF4</i>	Forward:	GGC TGC ACA CGA CTT CCC CC
	Reverse:	GGT GGC GGT CCT TTT CCG GG
<i>CK18</i>	Forward:	AAT GGG AGG CAT CCA GAA CGA GAA
	Reverse:	GGG CAT TGT CCA CAG TAT TTG CGA
<i>FOXA2</i>	Forward:	TGG GAG CGG TGA AGA TGG AA
	Reverse:	TCA TGC CAG CGC CCA CGT AC
<i>PEPCK</i>	Forward:	TTA GAT GGG ACA AAG CCT G
	Reverse:	GCA AGA CGG TGA TTG TAA CT
<i>HNF4a</i>	Forward:	GGA ACA TAT GGG AAC CAA CG
	Reverse:	AAC TTC CTG CTT GGT GAT GG
<i>AFP</i>	Forward:	GAA TGC TGC AAA CTG ACC AC
	Reverse:	TGG CAT TCA AGA GGG TTT TC
<i>TUJ-1</i>	Forward:	CAG TGA CCT GCA ACT GGA GA
	Reverse:	GAT TGG CCA AAC ACG AAG TT
<i>MUSASHI</i>	Forward:	GCC CAA GAT GGT GAC TCG
	Reverse:	ATG GCG TCG TCC ACC TTC
<i>NESTIN</i>	Forward:	AAC AGC GAC GGA CTG TCT CTA
	Reverse:	TTC TCT TGT CCC GCA GAC TT
<i>MAP2</i>	Forward:	CCA ATG GAT TCC CAT ACA GG

	Reverse:	TCT CCG TTG ATC CCA TTC TC
<i>PAX6</i>	Forward:	ACC CAT TAT CCA GAT GTG TT
	Reverse:	ATG GTG AAG CTG GGC ATA GG
<i>MSX1</i>	Forward:	CGA GAG GAC CCC GTG GAT GC
	Reverse:	GGC GGC CAT CTT CAG CTT CT
<i>BRACHYURY</i>	Forward:	GCC CTC TCC CTC CCC CTC CAC
	Reverse:	GGC GCC GTT GCT CAC AGA CC
<i>Col1A2</i>	Forward:	CTG GTG CTG CTG GCC GAG TC
	Reverse:	GGG ACC AGG GGG ACC ACG TT
Names and sequences of the primers for ChIP assays		
CD49f primer-1	Forward:	AGAACAACGGGCTCATTTCAG
	Reverse:	CGACAGGTAGAGCAAGCACA
CD49f primer-2	Forward:	TAGGAAAGAACGGCATCGTC
	Reverse:	CTAGGATTTTGCCCAGGTGA
CD49f primer-3	Forward:	AACCCCTGCAGGATAAGGTT
	Reverse:	AGTTGTGGGGAGAACTGCTG
CD49f primer-4	Forward:	TGATGTTACGCAGCTTTTC
	Reverse:	GGAATCTGACATCCCTGCAT
CD49f primer-5	Forward:	ACATGGGGATATCCAAGCAG
	Reverse:	TGCCCTTAGTTCCTCACAGG
CD49f primer-6	Forward:	CTGGCCAAACTTGATGGTT
	Reverse:	CCATCGCAAATGGAAACTT

[188]

[189] 실험예 10: CD49f 는 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 통하여 iPSCs 및 hESC의 전분화능을 유지시킴

[190] CD49f가 전분화능 마커와 밀접하게 관련이 있다는 것을 확인하였기 때문에, 전분화성 상태의 줄기세포에서 CD49f 역할에 대하여 조사하였다.

[191] 인간 섬유아세포를 전분화성 줄기세포로 재프로그래밍하는데 효율적인 OCT4, SOX2, LIN28 및 NANOG를 발현하는 렌티바이러스(Addgene(Cambridge, USA)의 플라스미드 pSin-EF2-Oct4-Pur, pSin-EF2-Sox2-Pur, pSin-EF2-Nanog-Pur 및 pSin-EF2-Lin28-Pur13로부터 생성된 바이러스)로 성체줄기세포를 감염시켰다.

- [192] 바이러스 생성(viral production) 및 형질도입 과정(transduction process)은 문헌(Yu et al., (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920)에 기재된 대로 수행하였다.
- [193] iPSCs를 생성하기 위해서는 GFP 바이러스를 이용한 감염 효율이 50% 이상이어야만 한다. 전체 세포들 중 약 50 내지 70%의 GFP 양성 세포가 관찰되었다 (도 12). OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 바이러스로 감염된 성체줄기세포를, STO 피더세포(feeder cell)을 갖는 hES 배지에 옮겼다.
- [194] 10 내지 20일 이내 hESC 유사 콜로니가 나타났고, 높은 수준의 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 활성이 관찰되었다. 최소한으로 분화된 성체줄기세포 유래의 iPSCs(유도만능줄기세포) 클론 두 개를 선별하여 추가적으로 분석하였다. iPSCs은 전형적인 hESC 콜로니 모폴로지를 나타내었고, 4주간의 추가적 증식(additional expansion) 후 AP 염색법에서 양성을 나타내었다. OCT4 및 SOX2 만으로 감염된 성체줄기세포는 약한 AP 활성을 보여주었으나, ES-유사 콜로니를 형성하지 못했다 (도 13A). iPSCs의 전분화능을 확인하기 위하여, 테라토마(teratoma) 형성 분석을 실시하였다.
- [195] STO 피더세포에서 자란 인간 iPS 세포를 수거하여 non-obese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) 마우스의 피하에 주입하였다. 6 내지 8주 후, 테라토마가 관찰되었다. 종양 샘플을 수거하여 다음과 같은 표준 절차에 따라 paraffin embedding 및 hematoxylin 및 eosin 염색을 수행하였다.
- [196] Hematoxylin 및 eosin 염색을 통하여 신경 상피(neural epithelium), 신경 로제트(neural rosette), 평활근(smooth muscle), 지방 조직 및 내장 상피(gut epithelium)을 포함하는 삼배엽(embryonic germ layers)에서 발생하는 대표 조직로 분화되었다는 것을 확인하였다 (도 13B). RT-PCR 분석법을 통해, OCT4, SOX2, NANOG 및 CD49f과 같은 전분화능 마커 유전자의 내인성 mRNA 발현 수준이 hESCs와 유사하였으며, 모계인(parental) 성체줄기세포에 비해 상당히 증가하였다는 것을 알 수 있었다. hESCs 및 hiPSCs를 8일 동안 부유 배양하여 배상체(embryoid bodies, EBs)를 형성하였고, 분화를 위하여 젤라틴-코팅된 용기에 부착하여 8일 동안 추가 배양하였다 (도 14A). 전분화능 마커 및 CD49f 발현은 분화기간 동안 감소하였고, 이것은 CD49f 발현이 전분화능과 밀접하게 연관되어 있다는 것을 제시하는 것이다. 대조적으로, CMYC 및 KLF4 발현은 분화기간 동안 영향을 받지 않았다 (도 13C).
- [197] 이어서, hESCs에서 CD49f 녹다운(knockdown) 시켜, 전분화능에 대한 CD49f의 역할을 조사하였다. 100nM의 siCD49f를 hESCs에 3일 동안 두 번 형질도입하였고, RT-PCR을 수행하여 전분화능 마커 및 계열 마커를 분석하였다. siCD49f가 형질도입된 hESCs는 부분적으로 분화된 형태를 나타내었고(도 14B), 전분화능 마커 유전자는 상당히 감소하였다. 반면에, siCD49f가 형질도입된 hESCs에서, 계열 특이적인 마커 유전자는 상향조절되었고, 이는 CD49f가 hESCs의 전분화능 유지에 중요한 역할을 한다는

것을 입증하였다(도 13D). 도 6 및 8는, 성체줄기세포 스피어에서 PI3K/AKT/GSK3 β 경로가 활성화되고, CD49f 양성 세포의 군집이 풍부해진다는 것을 보여준다. 성체줄기세포 스피어와 일치하여, CD49f 녹다운은 hESCs에서 PI3K/AKT/GSK3 β 경로의 저해를 유도하였다 (도 13E). PI3K 경로를 통한 CD49f가 hESCs의 미분화 상태 유지에 필요한지 여부를 추가로 확인하기 위하여, PI3K/AKT의 선택적 차단제인 LY294002를 처리하였다. PI3K/AKT 저해는 NANOG 및 CD49f 모두의 발현을 상당히 감소시켰다 (도 13F). 이러한 발견들은 CD49f가 PI3K/AKT/GSK3 β 경로를 통하여 hiPSCs 및 hESCs의 재프로그래밍 및 유지에 기여한다는 것을 의미한다.

[198]

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

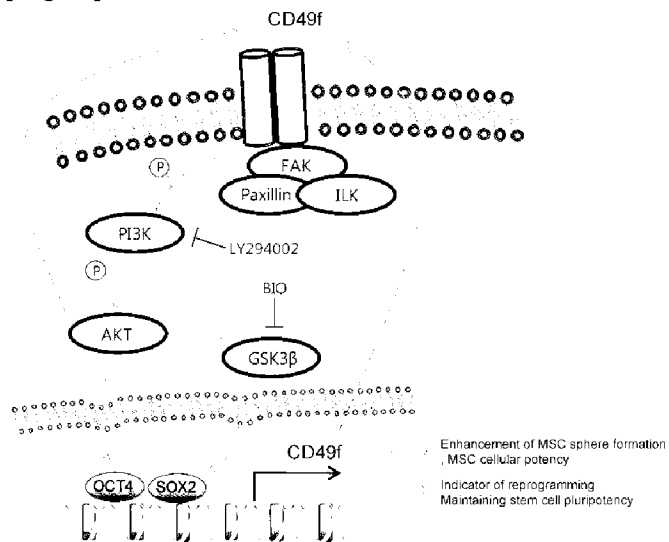
[200]

청구범위

- [청구항 1] (a) 성체줄기세포를 비부착성 배양 조건하에 배양하는 제1단계; 및
(b) 구형 성장에 의해 스피어(Sphere) 형성하는 세포군집으로부터 성체줄기세포를 분리하는 제2단계를 포함하여,
CD49f양성의 특징을 가지고 배양전 줄기세포들보다 균질화도가 향상된 성체줄기세포를 제조하는 방법.
- [청구항 2] (a) 줄기세포를 포함하는 세포원을 준비하는 제1단계; 및
(b) 상기 세포원으로부터 CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포를 분리하는 제2단계를 포함하여
균질의 성체줄기세포를 제조하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 1주일 동안 제1단계를 수행한 후, 성체줄기세포 스피어의 개수는 1×10^4 세포 당 30 내지 50개의 스피어이고,
스피어의 평균 직경은 100 내지 150 μm 인 것이 특징인 제조 방법
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 제2단계에 분리된 성체줄기 세포는 부착성 배양 조건에서 배양한 성체줄기세포 보다 CD49f의 발현 수준이 동일 또는 상승된 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 제1단계의 성체줄기세포는 세포원으로부터 CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포를 분리한 것이 특징인 제조 방법
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 제1단계 및 제2단계를 2회 이상 반복하며,
제2단계 이후 제1단계 수행하기 이전 스피어(Sphere) 형성하는 세포군을 단일 세포로 분리하는 단계를 더 포함하는 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 제1단계는 CD49F가 발현 또는 과발현되도록 PI3K/AKT/GSK3 β 을 조절하여 세포를 배양하는 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 제1단계에서, GSK3 β 저해제를 첨가하여 세포를 배양하는 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 제1단계는 OCT4, SOX2, LIN28 및 NANOG 중 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 조건하에서 배양하여,
CD49f의 발현 수준을 증가시키는 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 10] 제1항 또는 제2항에 있어서, 제2단계에서 분리된 성체줄기세포는 동일 유래의 세포원을 부착성 배양 조건에서 배양하여 수득한 성체줄기세포 보다 OCT4, SOX2 또는 둘다의 발현능이 높은 것이 특징인 제조 방법.
- [청구항 11] 제1항 또는 제2항에 있어서, 제2단계에서 분리된 CD49f의 표면항원을 인지하는 항체를 사용하는 것이 특징인 제조 방법.

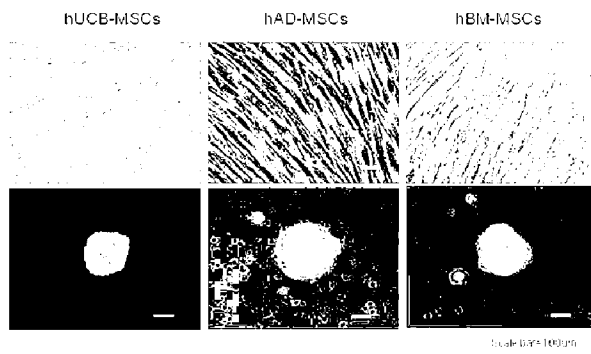
- [청구항 12] 제1항 또는 제2항의 방법으로 수득된, CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 동일 유래의 세포원으로부터 부착 배양에 의해 얻은 선형 행태(Spindle-shaped) 성체줄기세포에 비하여, *OCT4*, *SOX2*, *c-myc*, *paxillin*, *ilk*, *pl3K* 및 *nanog*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나이상의 유전자에 의해 코딩되는 단백질이 고발현된 것이 특징인 성체줄기세포.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 동일 유래의 세포원으로부터 부착 배양에 의해 얻은 선형 행태(Spindle-shaped) 성체줄기세포에 비하여, PI3K 및 GSK3 β 가 고인산화된 것이 특징인 성체줄기세포.
- [청구항 15] 제1항 또는 제2항에 기재된 방법에 의해 제조되고 CD49f양성의 특징을 가지는 성체줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 골격계 질환, 조직재건, 순환계 질환, 신경계 질환 및 면역질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환에 대한 치료능을 가지는 것이 특징인 세포 치료제.
- [청구항 17] 제1항 또는 제2항에 기재된 방법에 의해 제조되고 CD49f양성의 특징을 가지는 균질한 성체줄기세포를 분화시키는 단계를 포함하여, 성체줄기세포로부터 분화된 세포를 제조하는 방법.
- [청구항 18] 분석대상 세포에서 CD49f 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 것이 특징인, 분석대상 세포에서 전분화능이 재프로그래밍되었는지 여부 또는 분석대상세포가 전분화능을 유지하는지 여부를 확인하는 방법.
- [청구항 19] CD49f를 포함하는 전분화능 세포로의 재프로그래밍 마커.
- [청구항 20] CD49f의 발현을 유지시켜 줄기세포의 다분화능을 증진시키는 방법.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, CD49f는 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 신호전달에 의해 중개되는 다분화능을 증진시키는 것이 특징인 방법.
- [청구항 22] 줄기세포들을 비부착성 배양 조건하에 배양하여 스피어(Sphere) 형성을 통해 세포가 CD49f의 발현을 유지시키는 것이 특징인 줄기세포의 다분화능 유지 방법.
- [청구항 23] CD49f의 발현을 억제 또는 녹다운시켜 줄기세포를 특정세포로 분화시키는 방법
- [청구항 24] 제1항 또는 제2항에 기재된 방법에 의해 제조되고 CD49f양성의 특징을 가지는 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 증식방법.
- [청구항 25] 제24항에 있어서, 상기 배양은 부유배양 또는 부착배양인 것이 특징인 줄기세포의 증식방법.

[Fig. 1]

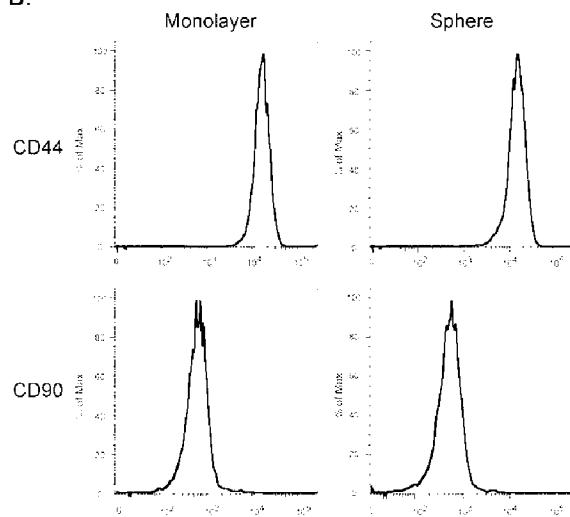


[Fig. 2]

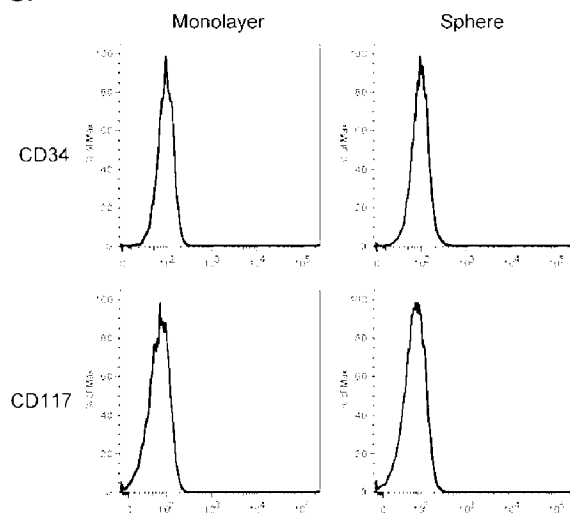
A.



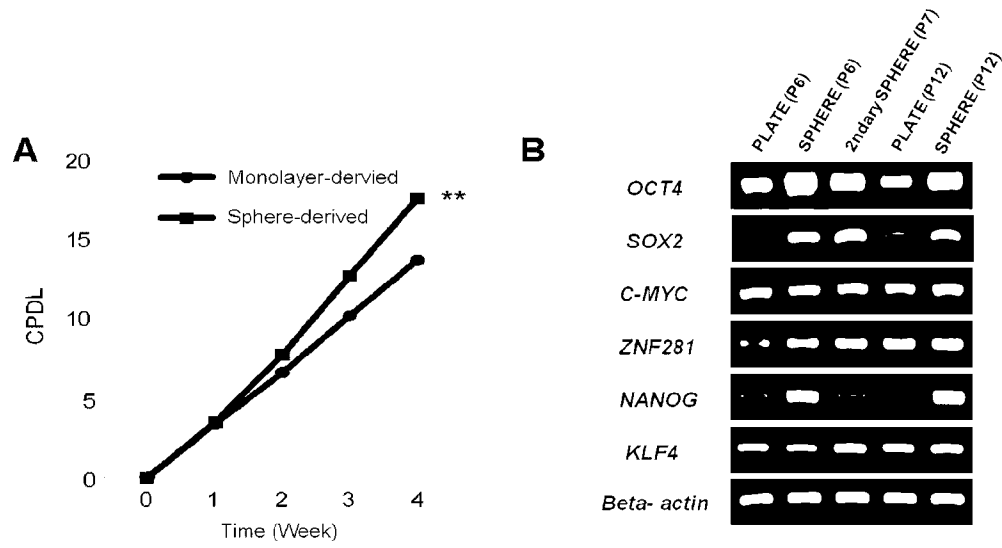
B.



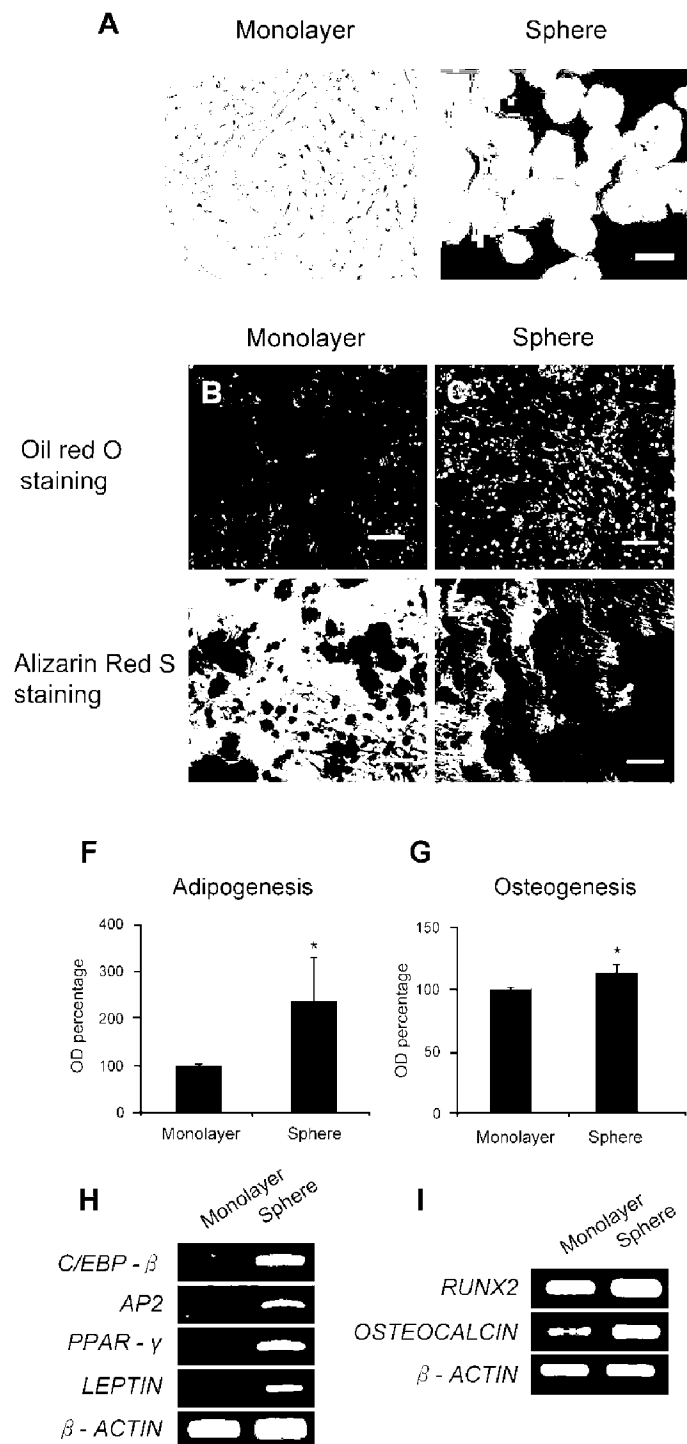
C.



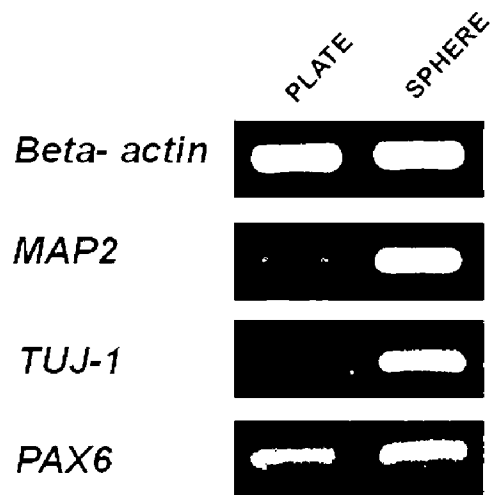
[Fig. 3]



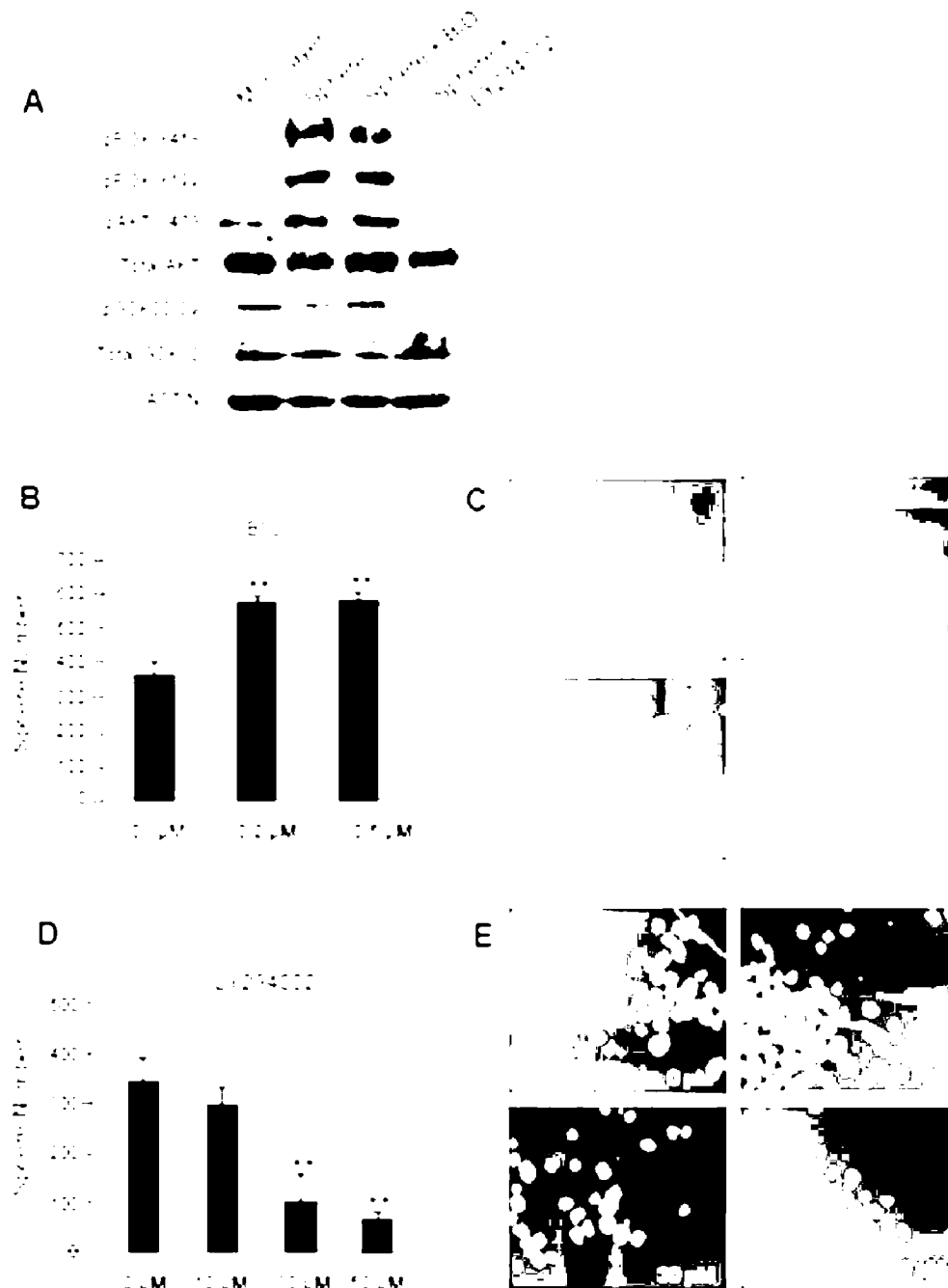
[Fig. 4]



[Fig. 5]

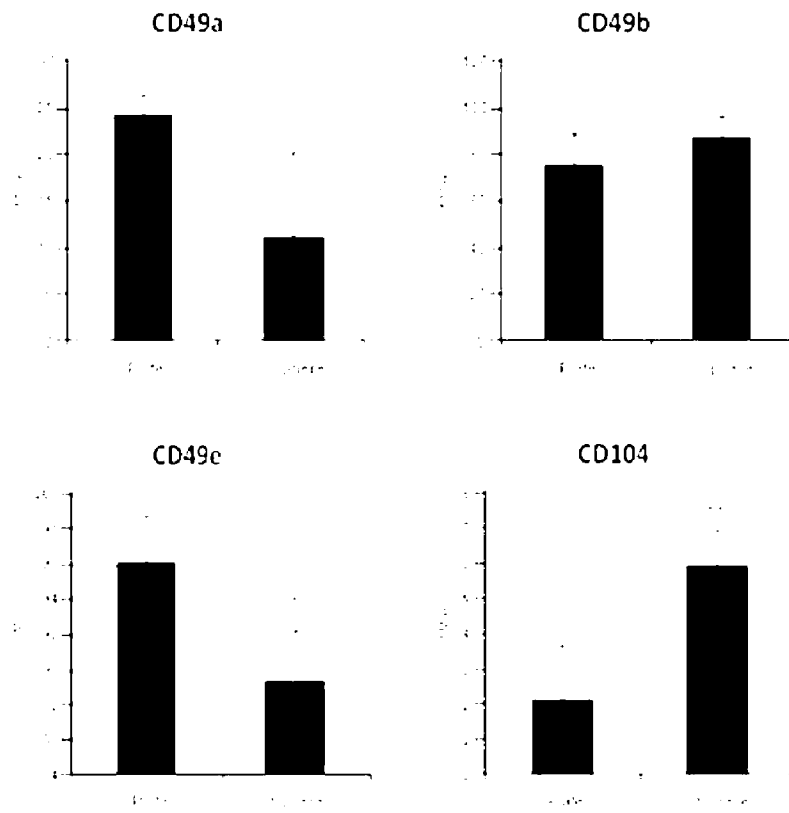


[Fig. 6]

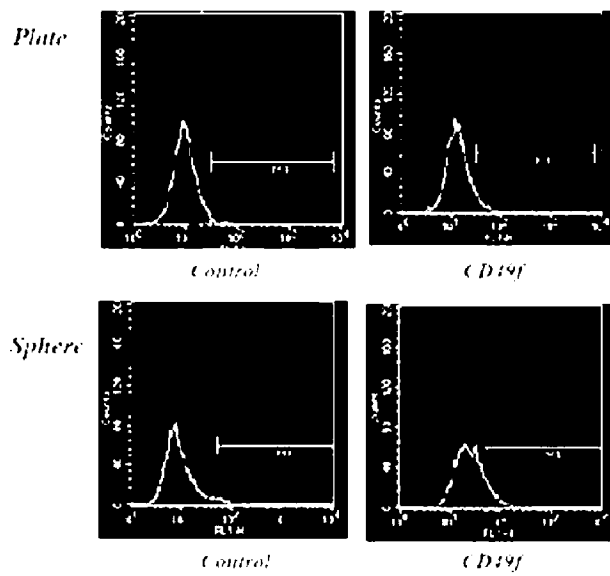


[Fig. 7]

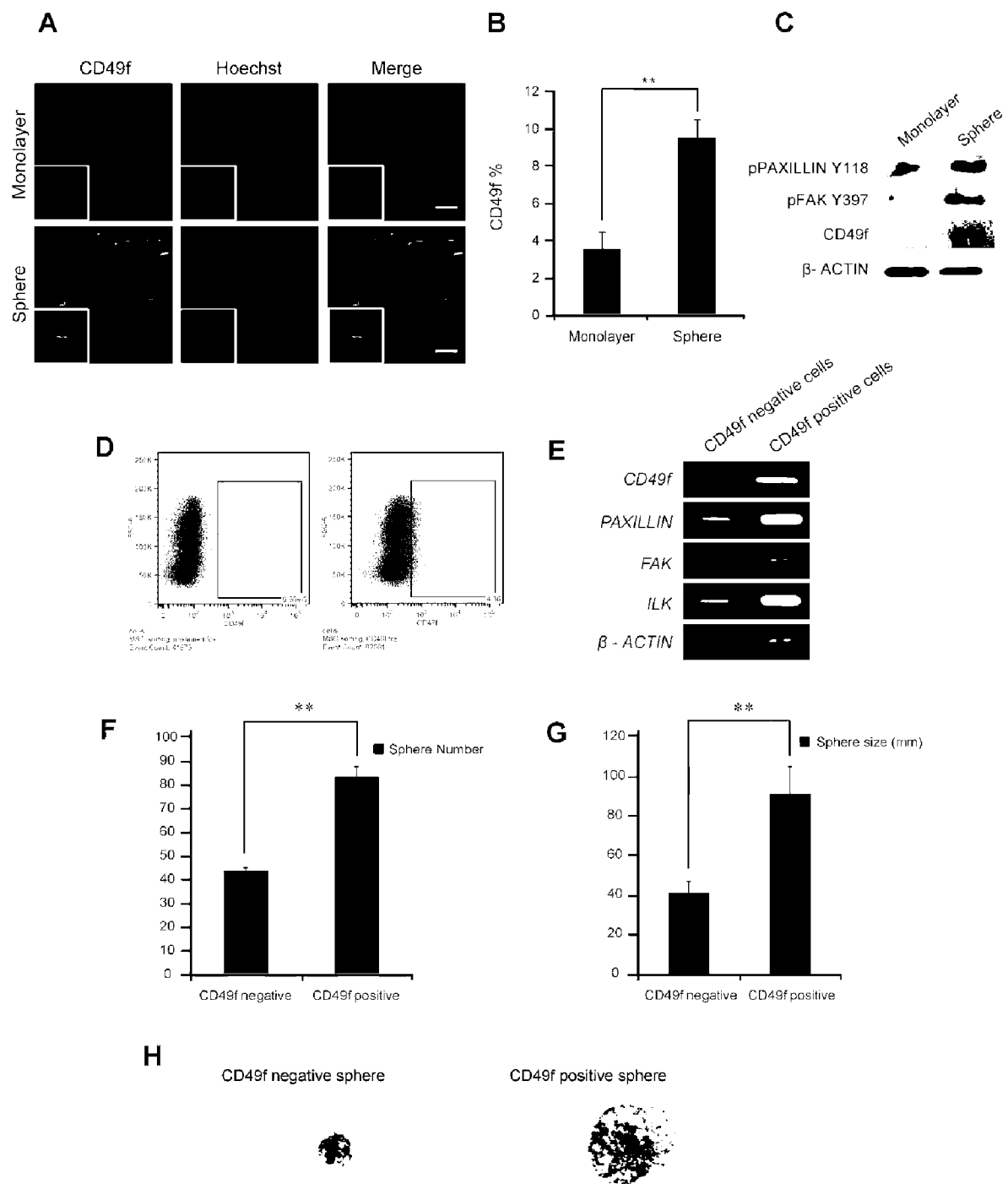
A



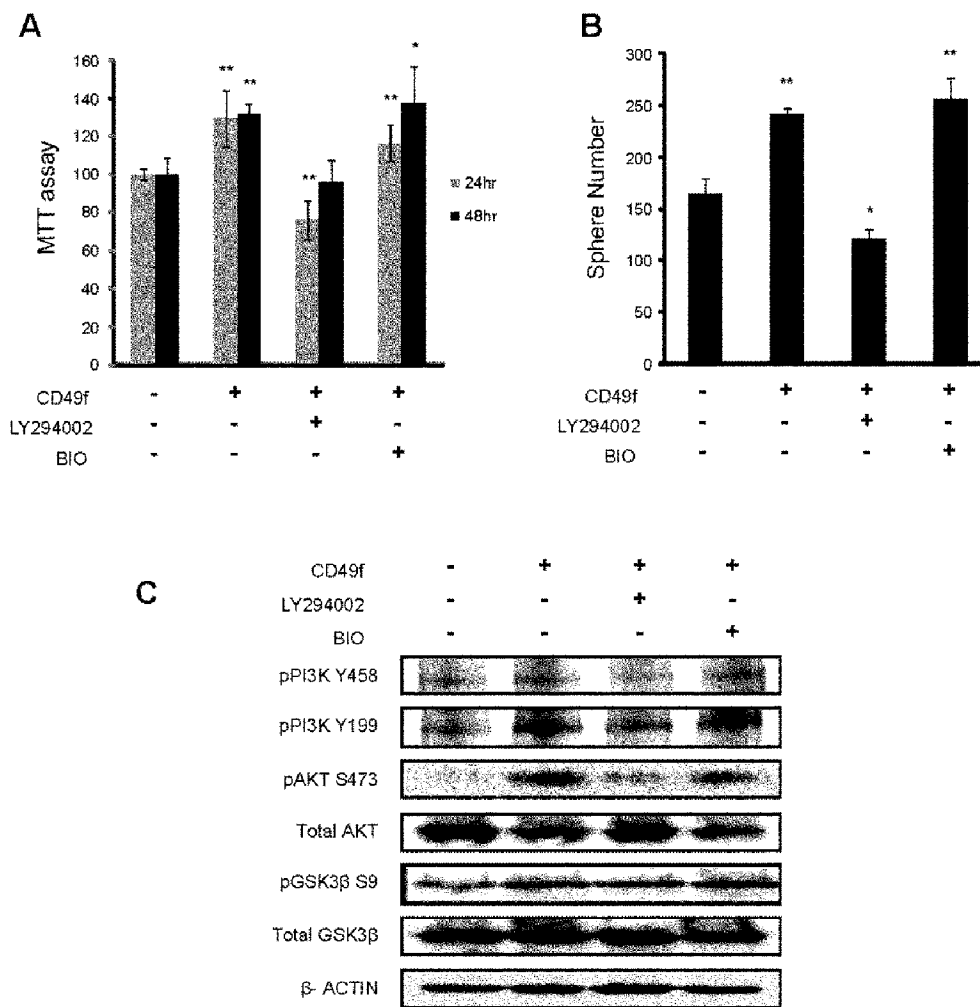
B



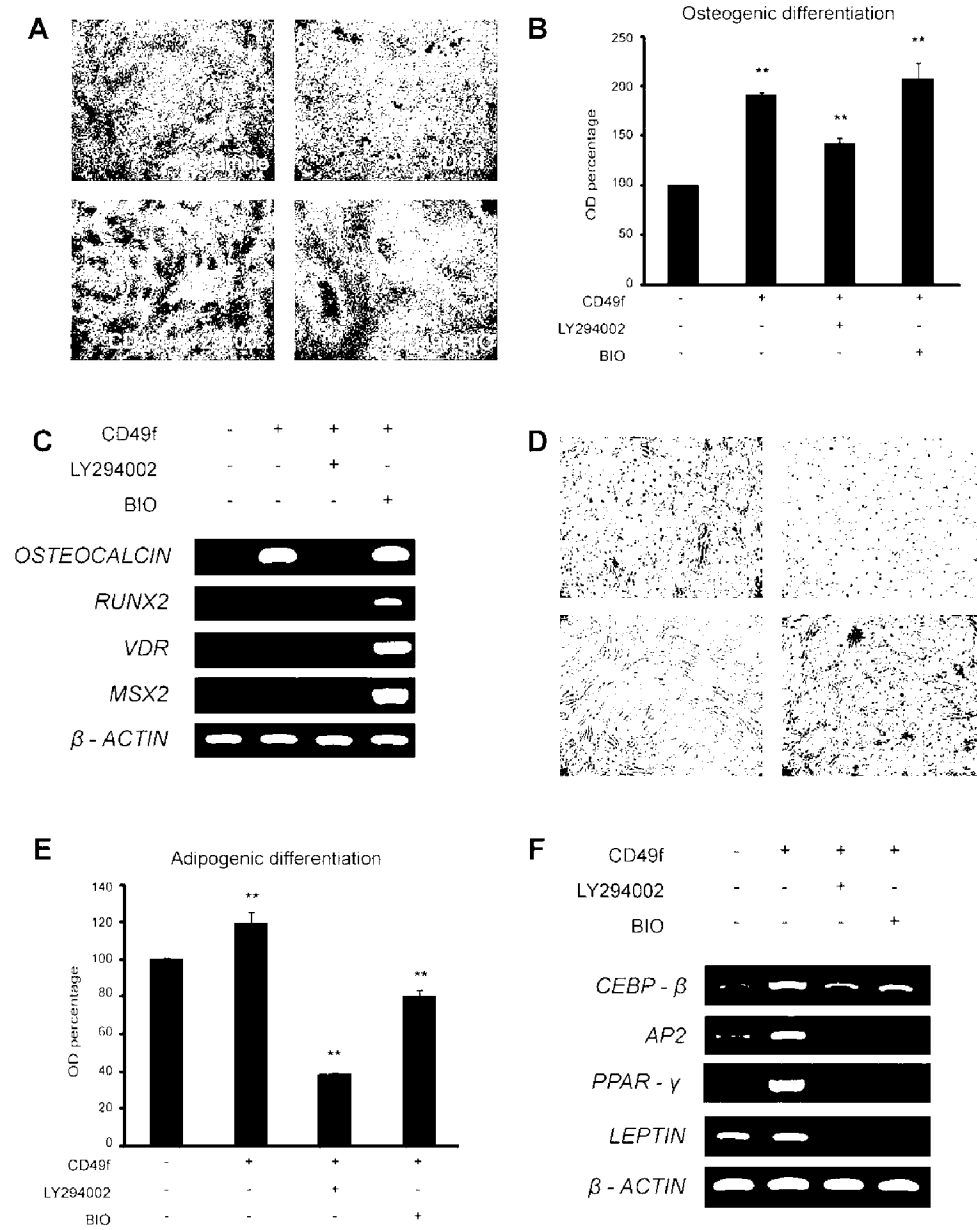
[Fig. 8]



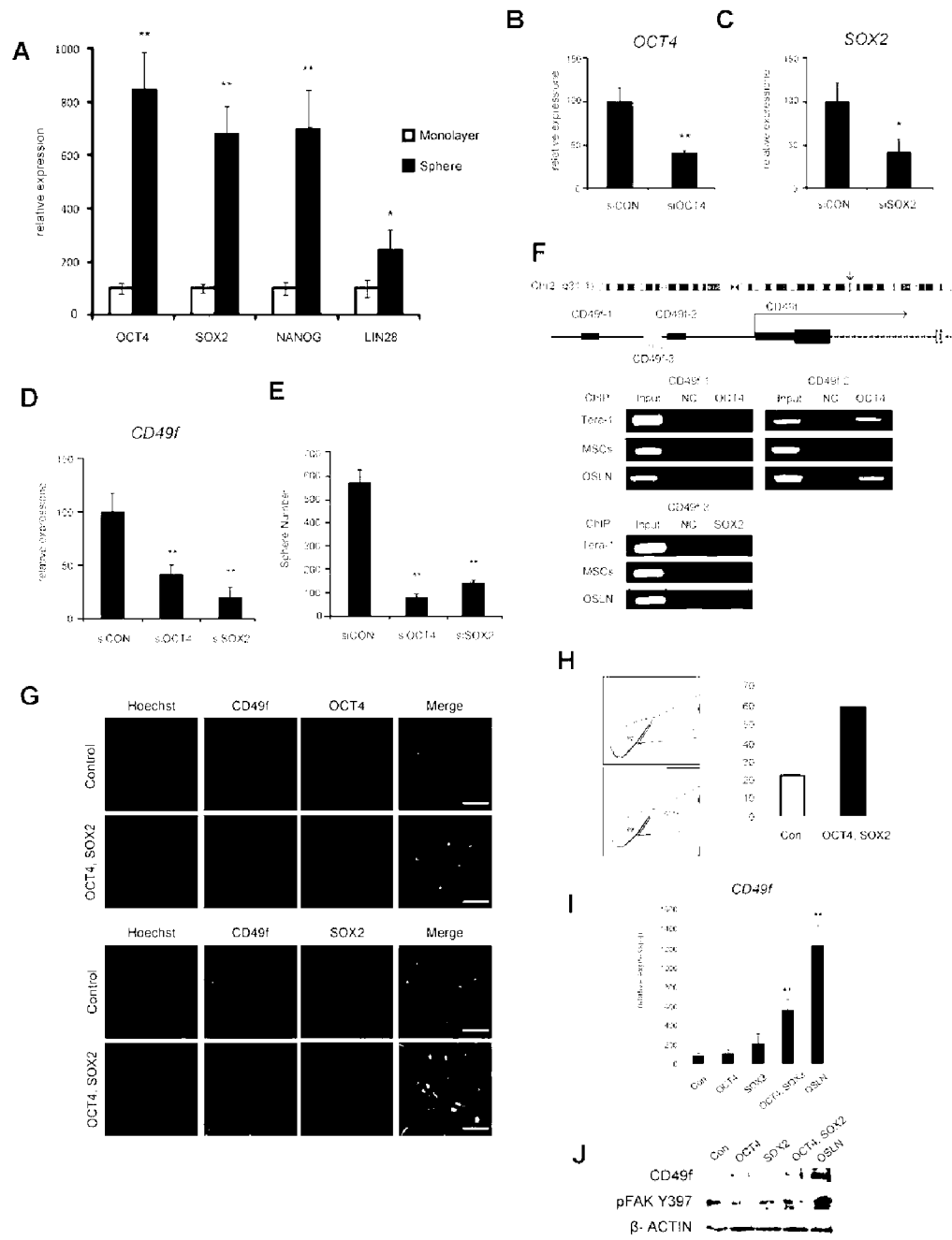
[Fig. 9]



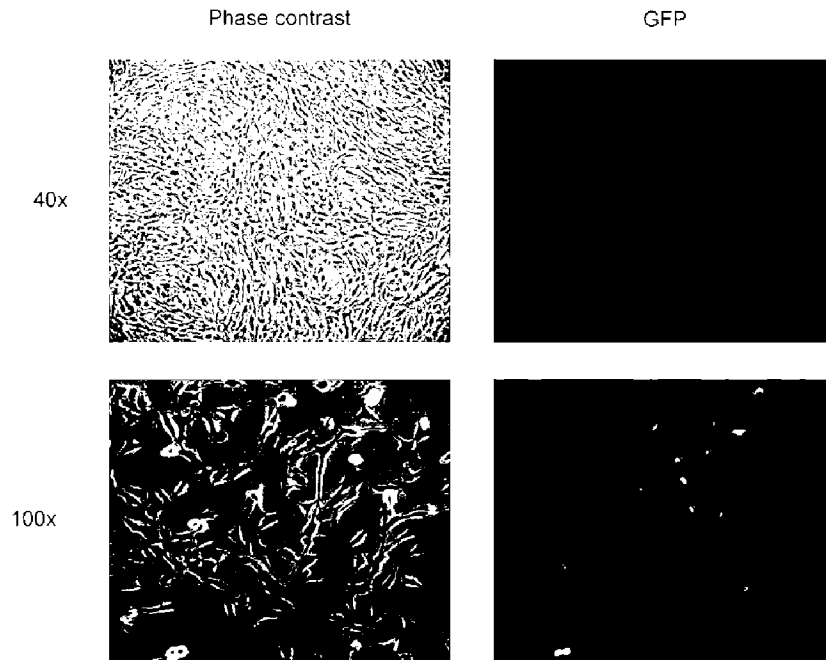
[Fig. 10]



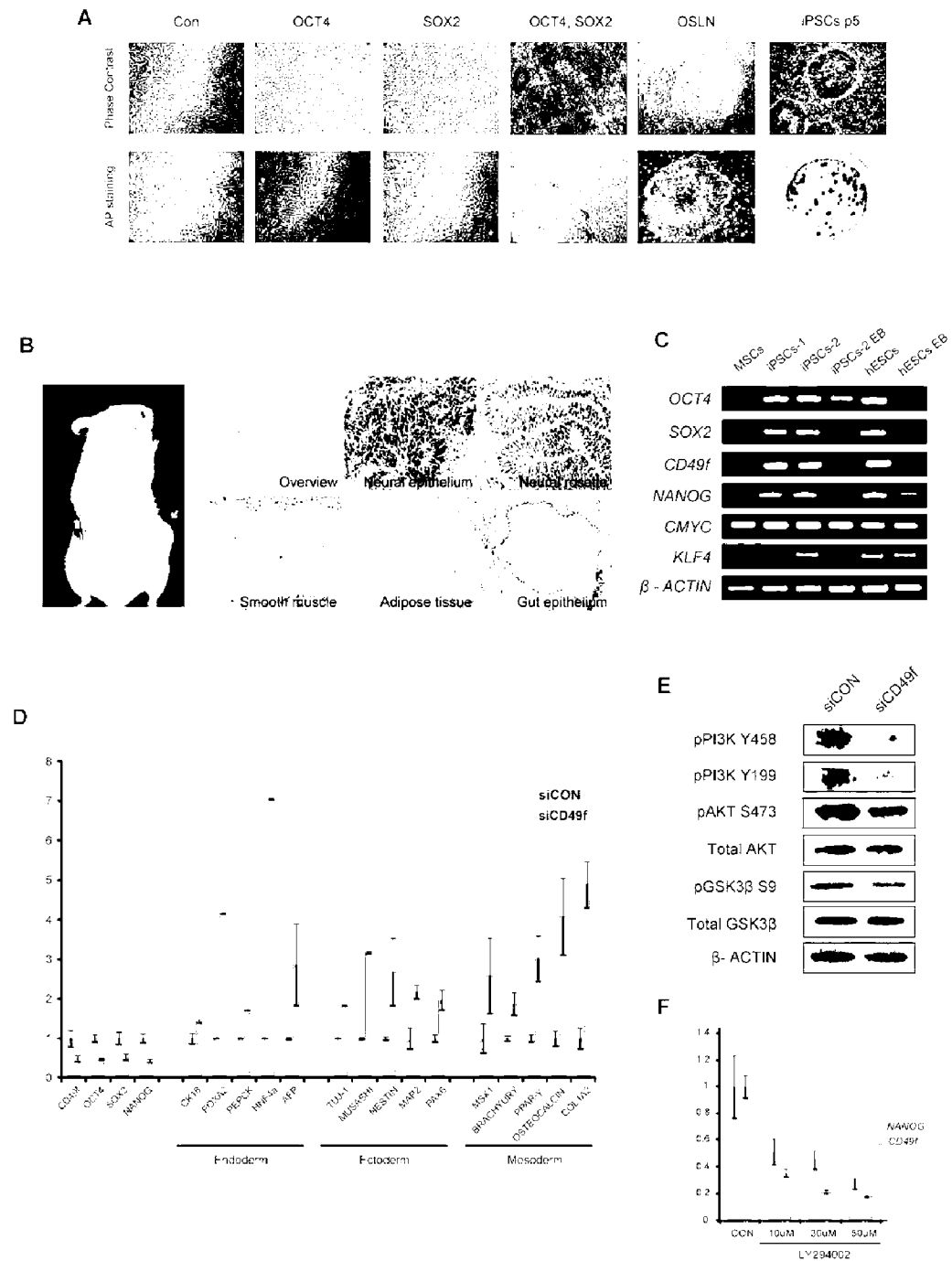
[Fig. 11]



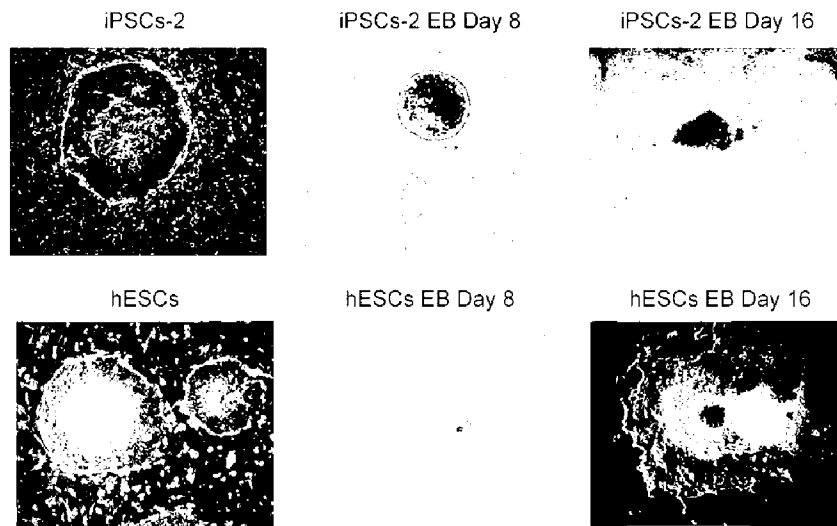
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]

A**B**