



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월05일
(11) 등록번호 10-1743284
(24) 등록일자 2017년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/067 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0147402
(22) 출원일자 2015년10월22일
심사청구일자 2015년10월22일
(65) 공개번호 10-2017-0047022
(43) 공개일자 2017년05월04일

(56) 선행기술조사문헌
Cell Stem Cell*

KR1020140063501 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

건국대학교 글로컬산학협력단

충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로벌캠퍼스)

(72) 발명자

한동욱

서울특별시 용산구 이촌로87길 13, 102-802(이촌동, 강촌아파트)

임경태

경기도 의왕시 덕장로 76, 408동 1203호(청계동, 휴먼시아아파트)

(74) 대리인

김정수

전체 청구항 수 : 총 1 항

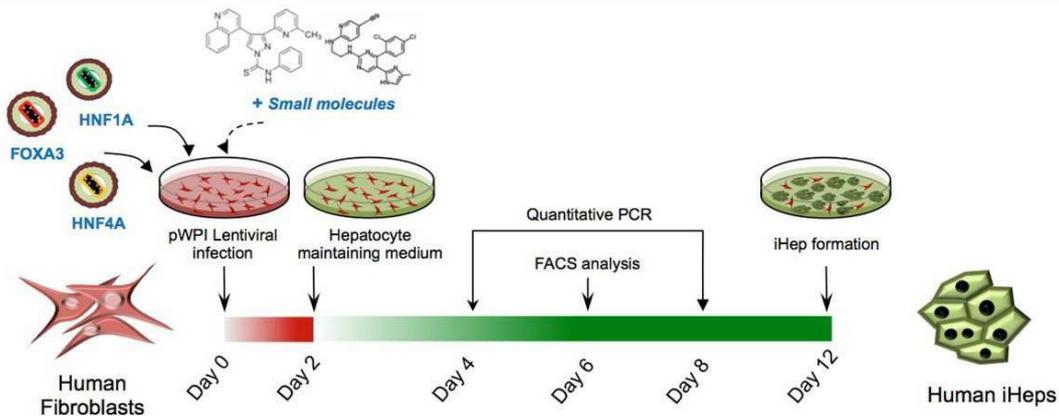
심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 소분자화합물을 이용한 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법

(57) 요약

본 발명은, (a) 체세포에 *FOXA3*, *HNF1A* 및 *HNF4A*를 포함하는 전사 유전자를 도입하여 배양하는 단계; 및 (b) 상기 전사 유전자가 도입된 체세포를 소분자 화합물을 포함하는 배양액에서 배양하여 체세포를 간세포로 직접교차분화(direct reprogramming)시키는 단계;를 포함하는 인간 체세포가 간세포로 직접교차분화 효율 향상 방법을 제(뒷면에 계속)

대표도



공한다.

본 발명에 따른 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법에 따르면, 체세포에서 간세포로의 낮은 직접교차분화 '효율성'을 제고하기 위하여 *FOXA3*, *HNFI1A*, *HNF4A* 조합으로 처리된 체세포를 Tgf β 신호전달(signaling)을 차단 및 억제하는 소분자화합물(A-83-01)과 세포의 증식을 유도하는 Wnt 신호전달활성화 소분자화합물(CHIR99021)로 처리하여 체세포에서 유도간세포(induced hepatocytes)로의 직접교차분화 효율을 5배 이상 증진시킬 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 2506/1307 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0013885
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 신진연구자지원
 연구과제명 체세포를 신경줄기세포로의 직접 리프로그래밍 기술 개발
 기여율 20/100
 주관기관 건국대학교 GLOCAL(글로벌)캠퍼스
 연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0019490
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발
 연구과제명 체세포에 줄기세포 특성을 부여하는 기초연구를 통한 특정 체세포로의 직접 리프로그래밍 기술의 개발
 기여율 30/100
 주관기관 건국대학교 GLOCAL(글로벌)캠퍼스
 연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011311
 부처명 농촌진흥청
 연구관리전문기관 동물바이오신약장기개발사업단
 연구사업명 차세대바이오그린21
 연구과제명 교차분화 기반 이중간 장기이식 효능 및 안전성 평가 시스템 구축
 기여율 50/100
 주관기관 건국대학교 GLOCAL(글로벌)캠퍼스
 연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 인간 유래의 섬유아세포(human fibroblast)인 체세포에 *FOXA3*, *HNF1A* 및 *HNF4A*를 포함하는 전사 인자를 도입하여 48 시간 동안 배양하는 단계; 및

(b) 상기 전사 인자가 도입된 체세포를 A-83-01 및 CHIR99021을 포함하는 소분자 화합물을 포함하는 배양액에서 96 시간 이상 배양하여 체세포를 간세포로 직접교차분화(direct reprogramming)시키는 단계;를 포함하는 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소분자화합물을 이용하여 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)란 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc*이라는 4가지의 외래 유전자를 일반 체세포에 도입하여 체내 모든 세포로 분화(differentiation)가 가능한 전능성 배아줄기세포의 상태로 역분화(de-differentiation)시킨 세포를 말한다.

[0003] 그러나, 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 같은 전능성(pluripotency)를 가진다는 장점에도 불구하고, 특정 세포로 분화시키는 특수한 배양조건하에서 충분히 분화되지 못한 소량의 '미분화 상태의 세포'가 잔존할 가능성이 있어, 체내 이식시 종양(기형종, teratoma)을 형성할 가능성을 가지고 있으므로 사람을 대상으로 하는 임상연구 적용에 큰 장애가 되고 있다.

[0004] 최근 줄기세포 연구 분야에 있어서 분화가 완전히 진행된 체세포에 최소한의 전사인자 조합을 도입하여, 전혀 다른 종류의 특성을 가진 체세포 또는 성체줄기세포(adult stem cells)로의 전환, 즉 직접교차분화(direct reprogramming)시키는 연구가 전세계적으로 이슈화된 상황이다. 여기서 직접교차분화란, 임의의 체세포(cell type A)를 모든 세포로 분화가 가능한 유도만능줄기세포로 역분화시킨 후 다시 하위로 분화시키는 과정(re-differentiation)을 거치지 않고, '직접' 원하는 특정 세포(cell type B)로 전환시키는 기술로 풀이할 수 있다.

[0005] 지난 2014년 중국 연구팀은 인간 유래의 체세포를 이용, 간세포 특이적인 총 8개의 전사인자를 선정, 이후 최종적으로 *FOXA3*, *HNF1A*, *HNF4A*라는 최소 3가지의 전사인자를 이용하여 인간 체세포를 간세포로 직접교차분화하는데 성공 및 발표하였다.

[0006] 같은 해, 또 다른 중국 연구진 역시 *p53* siRNA과 *C-MYC*를 처리하여 증식이 가능하도록 유전적인 변형을 가한 인간 체세포를 이용, 최대 6개의 추가적인 간세포 특이적인 전사인자(*HNF1A*, *HNF4A*, *HNF6*, *CEBPA*, *PROX1* 및 *ATF5*)조합을 이용하여 인간 간세포로의 직접교차분화하는데 성공하였다.

[0007] 그럼에도 불구하고, 기존에 보고된 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율은 상당히 낮은 수치를 보인다. 비특허문헌 1에 보고에 따르면 전사인자 도입후 약 12일 후 상피세포 모양의 군체(epithelial-like colony)가 형성되어 약 10 내지 20%의 ALB/AAT양성의 세포가 생성되었고, 비특허문헌 2의 보고에 의하면 30일이 지나서야 ALB 양성반응을 보이는 세포의 수의 비율이 91%, AAT 양성반응을 보이는 세포수의 비율은 99%을 나타내는 등, 양측 연구진 모두 간세포로의 직접교차분화 효율이 낮아 이를 보완할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0050961호 (공개일 : 2015.05.11)
 (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1158402호 (공개일 : 2011.07.07)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Huang et al., Cell Stem Cell 2014.
 (비특허문헌 0002) Du et al., Cell Stem Cell 2014.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 체세포에서 간세포로의 낮은 직접교차분화 '효율성'을 향상시킨 소분자화합물을 이용한 인간 체세포로부터 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법에 관한 기술 내용을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기한 바와 같은 기술적 과제를 달성하기 위해서 본 발명은, ((a) 체세포에 *FOXA3*, *HNF1A* 및 *HNF4A*를 포함하는 전사 유전자를 도입하여 배양하는 단계; 및 (b) 상기 전사 유전자가 도입된 체세포를 소분자 화합물을 포함하는 배양액에서 배양하여 체세포를 간세포로 직접교차분화(direct reprogramming)시키는 단계;를 포함하는 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 상기 체세포는 인간 유래의 섬유아세포(human fibroblast)인 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한, 상기 단계 (a)는 48 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 상기 소분자 화합물은 A-83-01 및 CHIR99021을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 상기 단계 (b)는 96 시간 이상 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기에 기재된 방법을 통해 체세포에서 직접교차분화된 간세포를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 인간 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법에 따르면, 체세포에서 간세포로의 낮

은 직접교차분화 '효율성'을 제고하기 위하여, *FOXA3*, *HNFI1A*, *HNF4A* 조합으로 처리된 체세포를 Tgfβ 신호전달 (signaling)을 차단 및 억제하는 소분자화합물(A-83-01)과 세포의 증식을 유도하는 Wnt 신호전달활성화 소분자 화합물(CHIR99021)로 처리하여 체세포에서 유도간세포(induced hepatocytes)로의 직접교차분화 효율을 5배 이상 증진시킬 수 있다.

[0018] 따라서, 본 발명에 따른 방법을 이용하면 간세포로의 직접교차분화 효율성이 향상되어 향후 간세포를 이용한 세포치료제 개발의 가속화 및 간세포를 이용한 신약물질의 독성 검증, 환자 특이적인 간세포의 효율적인 대량생산 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에 따른 인간 체세포의 간세포로의 직접교차분화 효율 향상 방법을 모식적으로 나타낸 개념도이다.

도 2는 실시예 및 비교예에 따른 방법에 의해 전사인자 도입후, 4일 및 6일 경과한 시점에서 세포의 형태학적 변화 양상을 확인한 실제 이미지이다.

도 3은 실시예 및 비교예에 따른 방법에 의해 전사인자 및 소분자화합물 도입후, 6일 경과한 시점의 Wild type HFF 및 HFF^{LT} 세포와 대조군의 Wild type HFF 및 HFF^{LT} 세포에서 ALB 또는 AAT 항체에 양성 반응을 보이는 세포의 수를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 실시예 및 비교예에 따른 방법에 의해 전사인자 및 소분자화합물 도입후, 6일 경과한 시점의 Wild type HAF 및 HAF^{LT} 세포와 대조군의 Wild type HAF 및 HAF^{LT} 세포에서 AAT 항체에 양성 반응을 보이는 세포의 수를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 실시예에 따른 방법에 의해 전사인자 및 소분자화합물을 도입한 체세포에서 간세포로의 직접교차 분화시 유전자 발현양상 변화를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명하도록 한다.

[0021] 도 1은 본 발명에 따른 인간 체세포가 간세포로 직접교차분화 효율 향상 방법을 모식적으로 나타낸 개념도이다.

[0022] 도 1에 나타낸 바와 같이, 체세포를 간세포로 직접교차분화 시키고, 교차분화의 효율을 향상시키기 위해 본 발명은, (a) 체세포에 *FOXA3*, *HNFI1A* 및 *HNF4A*를 포함하는 전사 인자를 도입하여 배양하는 단계; 및 (b) 상기 전사 인자가 도입된 체세포를 소분자 화합물을 포함하는 배양액에서 배양하여 체세포를 간세포로 직접교차분화 (direct reprogramming)시키는 단계;를 포함하는 인간 체세포가 간세포로 직접교차분화 효율 향상 방법을 제공한다.

[0023] 상기 단계 (a)는 체세포에 간세포로 전사를 유도하는 전사인자인 *FOXA3*, *HNFI1A* 및 *HNF4A*를 포함하는 전사 유전자를 도입한 후, 배양하는 단계이다.

[0024] 본 단계에서는 pWPI 렌티바이러스를 매개로 체세포에 상기 전사 유전자를 도입하는 방법(pWPI Lentiviral infection)을 통해 체세포내 상기 전사 유전자를 도입하여 체세포를 간세포로 직접교차분화를 유도할 수 있다.

[0025] 보다 상세히 설명하면, 젤라틴-코팅된 플레이트에서 pWPI 렌티바이러스를 매개로 체세포에 상기 전사 유전자를 형질도입한 후, 48 시간이 경과하면 HMM (Hepatocyte Maintenance Medium) 배지로 교체, 배양하여 체세포를 간세포로 직접교차분화 시키도록 구성할 수 있다.

[0026] 상기 체세포는 섬유아세포 유래의 세포를 사용하는 것이 바람직하며, 체내 유래의 인간 태아 섬유아세포(wild type human fetal fibroblasts, HFFs), 체내 유래 인간 성체 섬유아세포(wild type human adult fibroblasts, HAFs), SV40 large T 항원이 도입된 야생형 인간 태아 섬유아세포(HFF^{LT}) 및 SV40 large T 항원이 도입된 야생형 인간 성체 섬유아세포(HAF^{LT})를 대표적인 예로 들 수 있다.

[0027] 상기 단계 (b)에서는 상기와 전사 유전자가 도입되어 직접교차분화가 유도된 체세포에 직접교차분화 효율을 향상시킬 수 있도록, 상기 체세포를 소분자 화합물을 포함하는 배양액에서 배양하여 체세포를 간세포로 직접교차분화시켜 직접교차분화 효율을 향상시키도록 구성할 수 있다.

- [0028] 이를 위해, 소분자화합물을 간세포 특이적인 배양액에서 상기 전사 유전자가 도입된 체세포를 96 시간 이상 배양하도록 구성할 수 있으며, 상기 배양액은 간세포 특이적인 배양액(hepatocyte maintaining medium, HMM)을 사용할 수 있다.
- [0029] 본 단계에서는 상기와 같이 체세포가 간세포로의 직접교차분화되는 배양과정 중에 직접교차분화 효율을 향상시킬 수 있도록 소분자 화합물을 배양액에 첨가하여 직접교차분화 효율이 향상되도록 구성할 수 있다.
- [0030] 상기 소분자 화합물은 Tgfβ 신호전달(signaling)을 차단 및 억제하는 소분자화합물(A-83-01)과 세포의 증식을 유도하는 Wnt 신호전달활성화 소분자화합물(CHIR99021)을 포함할 수 있다.
- [0031] 상기와 같은 소분자화합물을 배양액에 첨가하여 상기 체세포에 상기 소분자화합물을 처리하면, 상기 체세포가 유도간세포(induced hepatocytes)로의 직접교차분화가 증가하여 직접교차분화 효율이 5배 이상 증진될 수 있다.
- [0032] 따라서, 본 발명에서는 상기와 같은 방법을 통해 체세포에서 직접교차분화된 간세포를 제공한다.
- [0033] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하도록 한다.
- [0034] 제시된 실시예는 본 발명의 구체적인 예시일 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다.
- [0035] <실시예>
- [0036] pWPI 렌티바이러스를 매개로, 간세포 특이적인 전사인자 조합인 *FOXA3*, *HNFI1A*, *HNFI4A*(3F)을 최초 7만개의 일반 체세포에 도입하였다. 간세포로의 직접교차분화에 사용한 체세포의 유형은 하기의 표 1에 나타낸 바와 같은 세포를 사용하였다.

표 1

세포 타입	설 명
HFFs	야생형 인간 태내의 섬유아세포(wild type human fetal fibroblast)
HAFs	야생형 인간 성체의 섬유아세포(wild type human adult fibroblast)
HFF^{LT}	SV40 <u>Large T</u> 항원을 도입하여 증식능을 부여한 인간 태내의 섬유아세포
HAF^{LT}	SV40 <u>Large T</u> 항원을 도입하여 증식능을 부여한 인간 성체의 섬유아세포

- [0037]
- [0038] 표 1에 나타낸 바와 같은 4종류의 체세포에 간세포 특이적인 전사인자를 도입한 후, 48시간 경과한 시점의 간세포 특이적인 배양액(hepatocyte maintaining medium; HMM)에 두 가지 소분자화합물(AR)을 첨가하여 배양하여 교차분화를 유도하였다(3F/AR). 두 가지 소분자화합물은 Tgfβ 신호전달(signaling)을 차단 및 억제하는 소분자화합물 A-83-01(2 μM)과 세포의 증식을 유도하는 Wnt signaling을 활성화시키는 소분자화합물 CHIR99021(3 μM)을 사용하였다.
- [0039] <비교예>
- [0040] 두 가지 소분자화합물(AR)을 첨가하여 배양하지 않은 것을 제외하고는 실시예와 동일한 방법으로 pWPI 렌티바이러스를 매개로, 표 1에 나타낸 바와 같은 4종류의 체세포에 전사인자 조합인 *FOXA3*, *HNFI1A*, *HNFI4A*(3F)을 도입한 후, 배양하였다(3F).
- [0041] <실험예 1> 유전자 발현 효율의 산출
- [0042] 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 유도과정시 유전자의 발현 효율을 산출하기 위하여, 실시예(3F/AR) 및 비교예(3F)에 따른 방법에 의해 전사인자 도입후, 4일 및 6일경과한 시점에서 간세포 특이적인 상피세포 모양의 군체(epithelial colony) 수를 육안으로 확인하였으며, 전사인자 도입후 4일 및 6일 경과한 시점에서 세포의 형태학적 변화 양상을 확인하여 도 1에 나타내었다.

- [0043] 도 1에 나타난 바와 같이, 실시예에 따른 방법을 통해 전사인자 도입된 실험군과 비교예에 따른 방법을 통해 전사인자 도입된 실험군을 비교한 결과, 비교예 1의 실험군과 달리 실시예의 실험군에서는 wild type HFFs 에서 6 일째, 그리고 HFF^{LT}에서 4일째 이미 상피세포 유사 세포(epithelial-like cells)가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(도 1 화살표 및 표 2 참조).
- [0044] 또한, 실시예 및 비교예에 따른 방법에 의해 전사인자 도입 6일 경과한 시점의 Wild type HFF 및 HFF^{LT} 세포와 전사인자를 도입하지 않은 대조군의 Wild type HFF 및 HFF^{LT} 세포(Mock)에 각각 간세포 특이적인 표지인자인 AAT(human A1AT) 또는 ALB(human albumin) 항체를 이용하여 각 표지인자 양성반응을 보이는 세포수 비율을 측정(FACS analysis)하여 유전자 발현 효율을 산출하였으며, 세포수 측정결과를 도 3에 나타내었다.
- [0045] 도 3에 나타난 바와 같이, Wild type HFF 및 HFF^{LT} 세포의 각 표지인자 양성반응을 보이는 세포의 수를 측정하여 효율을 비교한 결과, wild type HFFs에 도입한 경우 비교예에 따른 방법에 의해 처리된 세포군 비교할 때, 실시예에 따른 방법에 의해 처리된 세포군에서 최대 5배정도의 ALB 양성반응을 보이는 세포의 수가 관찰되었다(12.9% vs. 68.5%, 도 3 참조).
- [0046] 또한, 실시예 및 비교예에 따른 방법에 의해 전사인자 도입 6일 경과한 시점의 Wild type HAF 및 HAF^{LT} 세포와 전사인자를 도입하지 않은 대조군의 Wild type HAF 및 HAF^{LT} 세포(Mock)에 각각 간세포 특이적인 표지인자인 AAT 항체를 이용하여 각 표지인자 양성반응을 보이는 세포수 비율을 측정(FACS analysis)하여 유전자 발현 효율을 산출하였으며, 세포수 측정결과를 도 4에 나타내었다.
- [0047] 도 4에 나타난 바와 같이, 비교예에 따른 방법에 의해 처리된 세포군 비교할 때, 실시예에 따른 방법에 의해 처리된 세포군에서 AAT 양성반응을 보이는 세포의 수가 더욱 높은 것으로 확인되었다.
- [0048] 상기한 결과를 이용하여 각 체세포 유형별 전사인자 도입후, 직접교차분화에 걸리는 시간 및 효율을 산출하였으며, 산출 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

		비교예	실시예	
리프로그래밍 시간	HFFs	12 days ~	6 days	
	HFFs ^{LT}	6 days	4 days	
리프로그래밍 효율	HFFs	ALB+	12.9 %	68.5 %
		AAT+	60.6 %	72.0 %
	HFFs ^{LT}	ALB+	32.1 %	42.4 %
		AAT+	31.0 %	56.4 %
	HAFs	AAT+	41.0 %	57.8 %
	HAFs ^{LT}	AAT+	22.8 %	48.4 %

- [0049]
- [0050] 표 2에 나타난 바와 같이, 실시예에 따른 방법으로 처리된 세포군의 리프로그래밍 시간 및 효율이 더욱 우수한 것을 확인할 수 있으며, 직접교차분화 효율이 높음을 확인할 수 있다.
- [0051] 이외에도 일관성 있게 실시예 및 비교예에 따른 방법에 의해 처리된 세포군을 비교하면, 실시예의 세포군에서 더 많은 양의 세포가 간세포 특이적인 마커를 발현하고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0052] <실험예 2> 유전자 발현 양상 검증
- [0053] 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 유도과정시 유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여, 실시예(3F/AR)에 따른 방법에 의해 교차분화가 유도된 4종류의 체세포로부터 배양 4일과 8일 경과한 시점의 세포를 실험군 별로 수거하여 total RNA를 추출하고, cDNA를 합성한 후, 특정 유전자들의 발현 양상을 정량적 중합효소 연쇄반응(quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 기법을 이용하였다.
- [0054] 또한, 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 유도과정시 두 종류의 소분자화합물(AR)을 처리하여 배양하였을 때

더 빠르게 직접교차분화가 mRNA수준에서도 반영 및 진행되는지 확인하기 위해 전사인자 도입후 4일 및 8일 경과한 시점의 세포에서 특정 유전자들의 발현 양상을 분석하였으며, 분석결과를 도 1에 나타내었다.

[0055] 도 1에 나타난 바와 같이, 실시예 및 비교예를 각각 비교하였을 때, 실시예에 따른 방법에 의해 배양된 세포군에서 (1) 체세포 특이적인 유전자의 발현이 더욱 빠르게 감소하고, 전반적으로 (2) 중간엽 세포에서 내배엽 세포로의 전이(mesenchymal to epithelial transition, MET) 과정 관련 유전자와 (3) 간세포 특이적인 유전자의 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 인간 체세포의 간세포로의 직접교차분화 시 AR을 함께 처리할 경우 전체적인 직접교차분화 과정이 단축 및 가속화됨을 확인하였다.

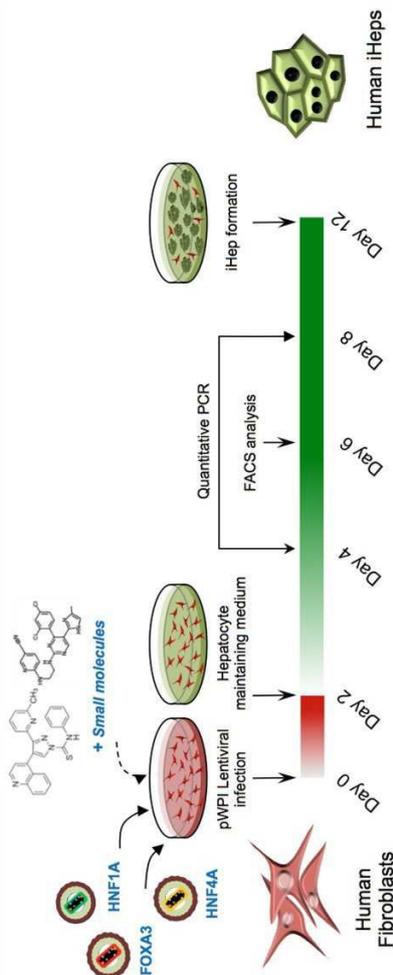
[0056] 이러한 결과는 기존의 알려진 간세포를 유도하는데 필수적인 전사인자의 조합 도입후, 소분자화합물을 첨가 및 배양하였을 경우, 일반체세포에서 간세포로의 직접교차분화 하는데 걸리는 시간이 단축되었고, 이로 인한 직접교차분화 효율이 유의적으로 크게 향상되었음을 의미한다.

[0057] 상기한 결과를 통해 종래에 보고된 간세포로의 직접교차분화 효율성을 최대 약 5배 이상 향상시켜 효율성을 재고하였고, 기존의 간세포 특이적인 전사인자의 도입과 함께 소분자화합물을 첨가하였을 경우, 간세포로의 직접교차분화 하는데 걸리는 시간이 단축 및 가속화되는 것을 최종 확인하였다.

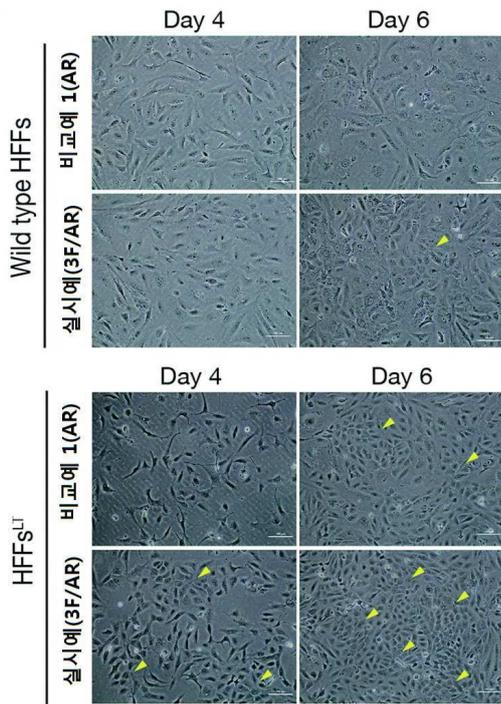
[0058] 따라서, 본 발명에 따른 방법은 향후 간세포를 이용한 세포치료제 개발의 가속화 및 간세포를 매개로 하는 신약물질의 독성 검증 시스템 구축, 환자 특이적인 간세포의 효율적인 대량생산 등에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

도면

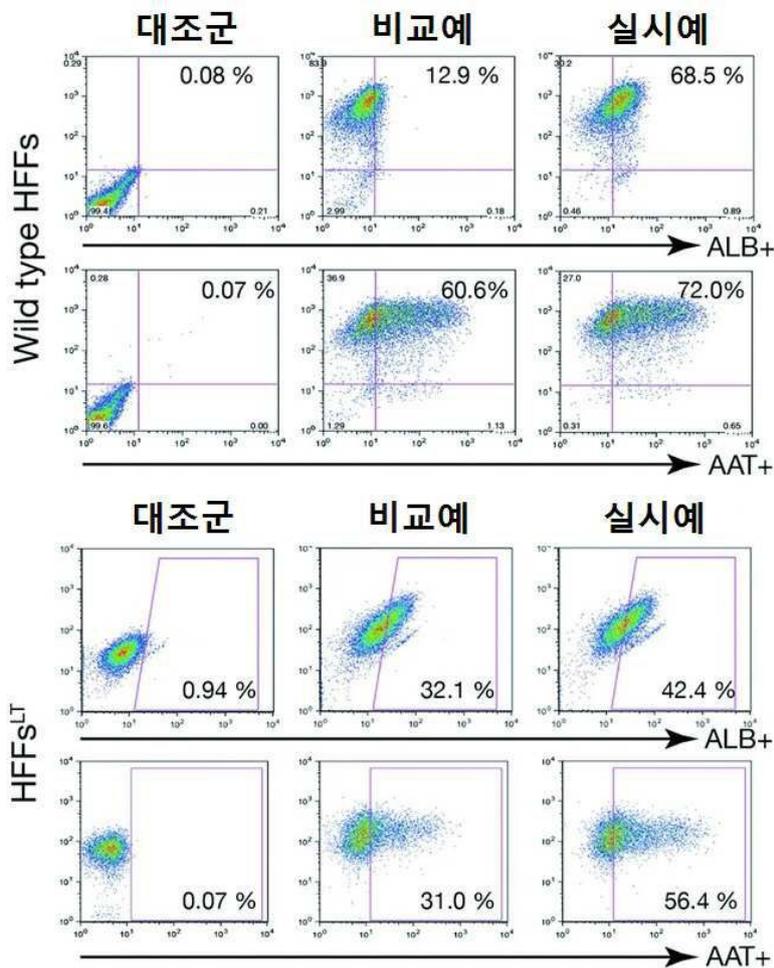
도면1



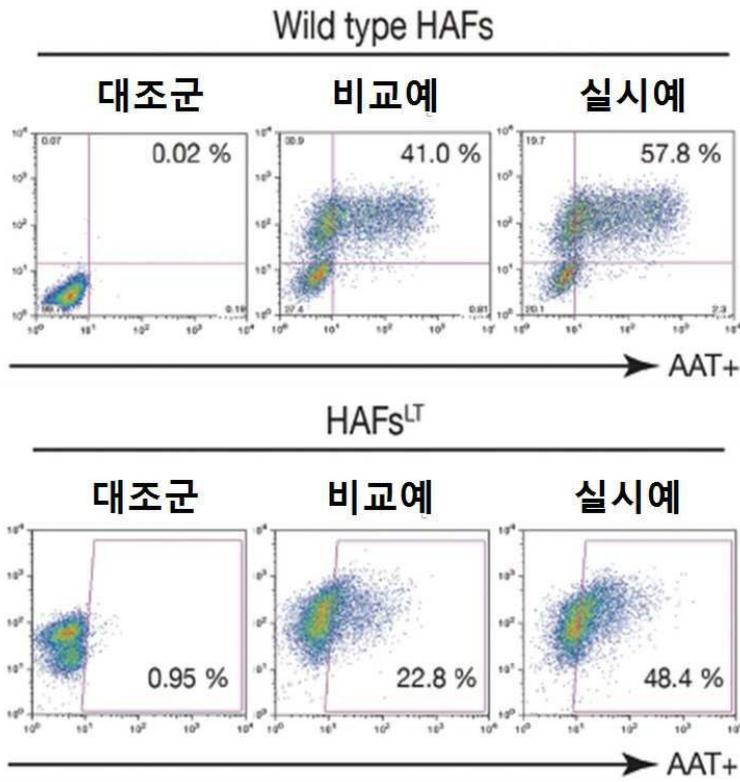
도면2



도면3



도면4



도면5

