



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년12월12일  
 (11) 등록번호 10-1211610  
 (24) 등록일자 2012년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)  
 C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2010-0043695  
 (22) 출원일자 2010년05월10일  
 심사청구일자 2010년05월10일  
 (65) 공개번호 10-2011-0124101  
 (43) 공개일자 2011년11월16일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US20090047263 A1

(73) 특허권자  
 주식회사 스템폰즈  
 서울특별시 영등포구 여의도동 15-24 익스콘빌딩 606  
 (72) 발명자  
 유승권  
 경기도 용인시 처인구 양지면 새실로 43-3  
 문재희  
 서울특별시 노원구 하계동 한신아파트 1동 206호  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 김선애

전체 청구항 수 : 총 2 항

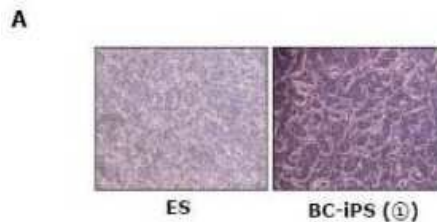
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **Bmi1, MEK 억제제와 GSK 억제제를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 a) Bmi1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) 단백질 또는 Bmi1 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 b) MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase) 억제제와 GSK (glycogen synthase kinase) 억제제를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 기존의 역분화 유도 주요인자인 4개 유전자 (Oct4, Sox2, Klf4, and C-Myc/Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) 외에 새로운 인자인 Bmi1 유전자 하나만을 도입하고 저분자성 화학물질인 PD0325901 (MEK inhibitor)과 CHIR99021 (GSK3β inhibitor)을 처리하여 상대적으로 간단한 방법으로 역분화 유도 인자의 수를 최소화하면서 전분화능을 갖는 배아줄기세포 유사세포를 제공할 수 있는 이점이 있다.

**대표도** - 도2a



(72) 발명자

**김준성**

경기도 구리시 체육관로 45, 우성한양아파트 105동 701호 (교문동)

**윤병선**

서울특별시 광진구 아차산로51길 96 (구의동)

**이중환**

경기도 안양시 만안구 박달동 벽산아파트 104동 802호

**전은경**

경기도 성남시 중원구 중동 3587번지 2층

**허준석**

서울특별시 중랑구 봉화산로 130, 쌍용아파트 130 4동 303호 (상봉동)

**김지현**

서울특별시 강동구 암사동 433-58 102호

**황지혜**

경기도 부천시 원미구 중2동 1184-6 그린 성우아파트 1328동 901호

**권수현**

경기도 부천시 원미구 중동로 108, 119동 304호 (중동, 팰리스카운티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K001179

부처명 한국과학재단

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 [협동] 체세포에서 역분화된 만능줄기세포로의 유도기술 개발 및 특성 규명[세포응용연구사업단]

주관기관 서울대학교

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

- a) Bmi1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) 단백질 또는 Bmi1 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및
- b) MEK (mitogen-activated protein kinase) 억제제인 PD0325901와 GSK (glycogen synthase kinase) 억제제인 CHIR99021로 이루어진, 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물.

**청구항 2**

- i) Bmi1(B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) 단백질 또는 Bmi1 단백질을 코딩하는 핵산분자를 체세포에 도입하는 단계;
- ii) bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)를 포함하는 신경줄기세포 배양배지에서 배양하는 단계;
- iii) Oct4가 발현된 세포를 선별하는 단계; 및
- iv) MEK (mitogen-activated protein kinase) 억제제인 PD0325901와 GSK (glycogen synthase kinase) 억제제인 CHIR99021를 처리하는 단계를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 Bmi1, MEK 억제제와 GSK 억제제를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물 및 이를 이용한 배아줄기세포 유사세포의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 Bmi1 유전자를 도입하고 저분자성 물질 MEK 억제제와 GSK 억제제를 처리하여 체세포로부터 리프로그래밍 과정을 통해 배아줄기세포와 같은 세포를 유도하는 새로운 조성물 및 이를 이용한 역분화를 위한 새로운 배아줄기세포 유사세포 제조방법을 제시하는 것이다.

**배경기술**

[0002] 줄기세포는 정상적인 체세포와 다르게 무한히 분열할 수 있는 능력을 가지며 적합한 환경 조건 아래에서 특정 세포로 분화하는 능력을 가진다. 그 분화 능력은 줄기세포의 특성에 따라 전분화능(pluripotency), 다분화능(multipotency), 또는 단일분화능(unipotency) 으로 정의되어진다. 따라서 줄기세포를 배양을 통해 증식시킨 후 특정 세포로 분화를 시키는 기술은 세포 치료라는 측면에서 여러 질병을 치료할 수 있는 잠재력을 가지고 있다 할 수 있다.

[0003] 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell), 골수줄기세포(bone marrow stem cell), 신경 줄기세포(neural stem cell) 등의 줄기세포는 성체에서도 존재하므로 환자 본인으로부터 추출할 수 있어 질병 치료 시 면역 거부반응이라는 문제점을 극복할 수 있는 장점이 있다. 이러한 장점은 기존의 장기이식에서 장기 제공자의 확보가 어려웠던 부분을 극복할 수 있다.

[0004] 하지만, 지금까지 알려진 견해에 따르면 성체줄기세포는 단지 다분화능으로, 분화할 수 있는 능력에 한계를 가진다. 이는 곧 조직 특이줄기세포는 같은 조직유형의 세포로만 분화할 수 있다는 것인데, 중추신경계(central nervous system) (Science 255, 1707-1710 1992; Science 287, 1433-1438 2000), 골수(bone marrow) (Science 276, 71-74, 1997; Science 287, 1442-1446, 2000; Science 284, 143-147, 1999), 망막(retina) (Science 287, 2032-2036, 2000)와 골격근(skeletal muscle) (Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 14482-14486, 1999;

Nature 401, 390-394, 1999)에서 분리된 줄기세포는 분화능력 역시 유사조직 계통으로만 분화가 가능하다는 것을 의미한다. 그 예로 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)는 혈액에 관련된 세포로, 신경줄기세포(neural stem cell)는 신경세포(neuron) 또는 신경아교세포(glia cell)로, 골수줄기세포(bone marrow stem cell)는 중배엽세포(mesodermal cell)로 분화가 가능하다. 뿐만 아니라 이론적으로 무한히 증식 가능한 성체줄기세포이지만, 현재까지의 보고로는 이러한 성체줄기세포를 인 비트로(in vitro) 상에서 증식시키는데 어려움이 있으며 실제 환자로부터 많은 양의 세포를 분리해 내는 것 또한 어렵다.

[0005] 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 앞에서 열거한 성체줄기세포가 가지고 있던 여러 가지 단점들을 극복해 줄 수 있는 훌륭한 자원이다. 이 세포는 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화가 가능하며 인비트로(in vitro) 상에서 무한히 증식이 가능하다. 현재까지 알려진 전분화능 줄기세포로는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 배아생식세포(embryonic germ cell), 배아종양세포(embryonic carcinoma cell)가 있으며 그 중 배아줄기세포는 가장 많은 연구가 이루어져 특정 세포들로의 분화 방법 및 동물질병 모델 연구한 기능성 검증과 임상 이용시 다양한 질병들에 대한 치료 가능성을 보여주었다.

[0006] 하지만 이러한 배아줄기세포 역시 성체줄기세포처럼 임상이용을 위해 극복해야만 하는 단점들이 존재한다. 우선, 배아줄기세포를 얻기 위해서는 수정된 배아를 파괴해야 하므로 윤리적인 문제점을 가지고 있으며 배아줄기에서 분화된 세포를 환자에 이식했을 경우 면역 거부반응이 일어난다는 문제점을 가지고 있다.

[0007] 때문에 배아줄기세포의 이러한 문제점들을 극복하기 위해서 다양한 접근 방법이 시도되었는데 그 중 가장 각광을 받은 것이 분화된 세포에서 미분화된 세포로의 역분화 유도 (reprogramming)이다. 역분화는 분화된 세포를 이용하여 배아줄기세포와 같은 전분화능 줄기세포를 만들어내는 것을 총칭하며, 이러한 방법으로는 1) 핵치환(nuclear transfer), 2) 핵융합(cell fusion), 3) 세포추출물 처리(cell extract treatment), 그리고 4) 유전자 도입을 통한 역분화(induced pluripotent stem cell; iPS cell) 기술이 있다 (Cell 132, 567-582, 2008).

[0008] iPS cell 기술은 현재까지 연구되어 오던 어떤 기술보다 배아줄기세포에 가까운 세포를 만들어 내는데 성공했으며 이러한 결과와 기작을 증명하기 위해 처음 기술이 발표되었던 2006년 이후 현재까지 수많은 연구 논문들이 쏟아져 나오고 있는 실정이다. 기본적으로는 마우스 또는 인간의 체세포에 4개의 유전자 (역분화 유도인자; Oct4, Sox2, Klf4, and C-Myc/Oct4, Sox2, Nanog, Lin28)를 도입한 후 배아줄기세포 배양조건에서 장기간 배양했을 경우 배아줄기세포와 유사한 특성의 줄기세포가 확립될 수 있었으며 이는 배아줄기세포와의 유전자발현(gene expression), 후성학적 특성(epigenetics), 인 비트로/인 비보(in vitro/in vivo)에서의 삼배엽성 분화 능력(three germ layer differentiation), 테라토마(teratoma) 형성 능력, 키메라 마우스 생성(chimeric mouse generation) 그리고 키메라 마우스의 생식 가능(germline transmission) 등의 특성이 상당히 유사한 것으로 증명되었다 (Cell 126, 663-676, 2006; Science 318, 1917-1920, 2007).

[0009] 하지만, 이러한 역분화 과정의 기작은 역분화 유도를 위해 사용된 유전자의 수가 너무 많아 자세한 기작을 규명하기 어렵기 때문에 현재까지 밝혀진 수준이 미미한 상태이다. 또한, 역분화 유도기술이 확립이 되었음에도 실제 치료적용을 위해서는 기술적으로 간편하고 효율이 높은 방법을 계속해서 개발해야만 하고 이렇게 개발된 기술들은 모두 효율과 안전성 측면에서 평가되어야 한다.

[0010] 최근 발표된 연구 결과에 따르면, 암억제 유전자인 p53의 비활성화(inactivation)는 iPS 세포의 생성 효율을 증가시킨다고 보고되었다 (Nature 460, 1132-1135, 2009). p53유전자는 Ink4a/Arf locus에 의해 조절되는데 이 locus는 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 발현이 조절되며 Arf에 의해 생성된 p19<sup>Arf</sup>는 p53 유전자를, Ink4a에 의해 생성된 p16<sup>Ink4a</sup>는 Rb 유전자의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이 두 가지 유전자 p16<sup>Ink4a</sup>와 p19<sup>Arf</sup>의 발현을 억제 시킨 경우 p19<sup>Arf</sup>만을 억제시킨 경우 보다 iPS 생성 효율이 증가되었다는 보고도 있다 (Nature, 460, 1140-1144, 2009).

[0011] Polycomb group(PcG) 단백질은 후생유전학적 유전자 억제자(epigenetic gene silencer)로써 PcG 단백질의 하나인 Bmi1은 p16<sup>Ink4a</sup>와 p19<sup>Arf</sup>의 발현을 억제시킴으로써 p53과 Rb의 발현을 억제시킨다고 보고 되어있다 (Genes Dev, 2678-2690, 1999). 또한 Bmi1은 염색질(chromatin)의 구조를 변화시켜 타겟 유전자의 발현을 억제한다고 알려져 있으며 이러한 특성으로 인해 신경줄기세포(neural stem cell) 및 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)의 자가재생(self-renewal)에서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 이에 따라 본 발명자들의 기존 연구에서는 마우스의 성상세포(astrocyte)에 Bmi1을 과발현(overexpression) 시켜 신경줄기세포(neural stem cell)로의 역분화에 성공했음을 보고 하였으며 이렇게 역분화된 신경줄기세포의 특성은 실제 마우스에서 분리한

신경줄기세포와 상당 부분 유사하였는데 그 중 역분화 유도인자 중 하나이자 신경줄기세포의 자가재생에 중요한 역할을 하는 유전자인 Sox2의 발현이 증가됨을 확인하였다 (Biochem Biophys Res Commun. 371, 267-272, 2008).

[0012] 일반 체세포의 경우 역분화를 하기 위해서는 4개 (Oct4, Sox2, Klf4, C-Myc) 혹은 3개 (Oct4, Sox2, Klf4)의 유전자가 필요하지만 이 유전자를 내재적으로 발현(endogenously expression) 하는 세포에 한해서는 유전자의 도입이 추가적으로 필요하지는 않은 것으로 알려져 있다. 그중 대표적인 것이 마우스/사람의 신경줄기세포에 Oct4 유전자 하나만을 도입하여 역분화줄기세포를 확립했다는 연구 결과이며 이는 신경줄기세포가 내재적으로 Sox2, Klf4, C-Myc을 발현하기 때문이다 (Nature, 461, 649-653, 2009).

[0013] 또한, 역분화 유도 과정 중에 중간단계 (intermediate state)인 pre-iPS cells의 경우에 PD0325901 (MEK inhibitor)과 CHIR99021 (GSK3β inhibitor)을 처리함으로써 완전히 리프로그래밍된 세포 (fully reprogrammed cells)로의 유도가 가능하였다는 것이 보고된 바 있다 (PLoS One, 6, 2237-2247, 2008).

[0014] 그러나 아직까지 Bmi1 유전자 도입과 화학물질 처리에 의해서 역분화 유도가 가능하고 이를 이용하여 전분화능을 가진 배아줄기세포 유사세포를 제조하는 방법은 알려진 바가 없다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0015] 따라서 본 발명자들은 상기와 같은 점을 감안하여 마우스의 체세포에 Bmi1 유전자를 도입하고 배양 조건을 조절하여 상배엽 줄기세포 유사세포 (epiblast stem cell like cells)로의 유도가 가능하다는 것을 확인하였다. 이 때 형성된 세포의 경우 Oct4 프로모터 GFP를 도입하여 GFP로 선발 (selection)을 하였을 때 배아줄기세포와 유사한 세포가 형성이 되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이와 같이 형성된 세포는 pre-iPS와 비슷한 특성을 함께 보이고 있어서 현재까지 보고된 저분자성 물질 중에 PD0325901과 CHIR99021을 처리하고 마우스 배아줄기세포 배양 조건에서 배양을 한 결과 배아줄기세포와 유사한 특성을 지니는 역분화 줄기세포주가 형성이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 하여, Bmi1 유전자만이 도입된 세포에 저분자성 물질, PD0325901과 CHIR99021을 처리하고 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양한 결과 배아줄기세포와 유사한 형태의 세포군을 확립할 수 있었으며 이렇게 확립된 세포군은 유전자발현 (gene expression), 후성학적 특성 (epigenetics), 테라토마 (teratoma) 형성 능력이 마우스 배아줄기세포와 매우 유사함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0016] 따라서 본 발명은 Bmi1 유전자 및 저분자성 물질인 MEK 억제제와 GSK 억제제를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 Bmi1 유전자 및 저분자성 물질인 MEK 억제제와 GSK 억제제를 이용하여 체세포로부터 배아줄기세포와 유사한 특성을 지니는 전분화성 역분화 줄기세포를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 방법으로 생산된 배아줄기세포 유사세포를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

#### 과제의 해결 수단

[0020] 본 발명자들은 마우스 체세포에 Bmi1 유전자가 도입되고 배양조건을 조절하여 형성된 상배엽 줄기세포 유사세포 (epiblast stem cell like cells)에 Oct4-프로모터 GFP로 GFP 포지티브 (positive)한 세포를 선별하였고, 이에 저분자성 물질 (PD0325901 and CHIR99021)의 처리한 후 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양할 경우, 이미 분화된 세포 타입인 체세포가 전분화능을 가지는 배아줄기세포 유사세포로 역분화 (de-differentiation) 되는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0021] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 a) Bmi1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) 단백질 또는 Bmi1 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 b) MEK/ERK 억제제와 GSK 억제제를 포함하는 체세포로부터 배아줄기세포 유사세포로의 역분화를 유도하는 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 i) Bmi1(B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) 단백질 또는 Bmi1 단백질을 코딩하는 핵산분자를 체세포에 도입하는 단계; ii) bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)를 포함하는 신경줄기세포 배양조건에서 배양하는 단계; iii) Oct4가 발현된 세포를 선별하는 단계; 및 iv) MEK/ERK 억제제와 GSK 억제제를 처리하는 단계를 포함하여 구성되는 체세포로부터 배아

줄기세포 유사세포를 제조하는 방법을 제공한다.

- [0023] 본 발명에서 용어, "배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC) 유사 세포"는 전분화성을 가지는 세포를 의미하며, 형질전환 없는 증식, 무한증식, 자가-재생산 및 3종류의 모든 배아 층으로부터 유래된 어떠한 세포로 발달할 수 있는 능력을 포함하는 배아줄기세포의 특성을 의미하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 배아 줄기세포 유사세포는 배아줄기세포, 유도된 전분화성 줄기세포, 또는 유도 만능 줄기세포로도 기술되기도 한다.
- [0024] 본 발명의 배아줄기세포 유사세포를 유도함에 있어서, 출발 체세포의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 임의의 체세포를 이용할 수 있다. 예를 들어, 태아기(embryonic period)의 체세포 이외에 성숙한(matured) 체세포를 이용해도 된다. 배아줄기세포 유사세포를 질병의 치료에 이용하는 경우에는 환자로부터 분리된 체세포를 이용하는 것이 바람직하며, 예를 들어, 질병에 관여하는 체세포나 질병치료에 관여하는 체세포 등을 이용할 수 있다. 바람직하게는 상기 체세포는 섬유아세포이며, 본 발명에서 섬유아세포는 인간과 마우스, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 섬유아세포를 포함한다.
- [0025] 섬유아세포 세포는 배지에서 배양한 후 사용될 수 있는데, 상기 섬유아세포를 배양하는 배지는 당해 분야에서 섬유아세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM (high glucose, w/o sodium pyruvate) + 10% FBS (Fetal bovine serum) + 0.1mM non-essential amino acid + 1% penicilin/streptomycin + 0.1mM  $\beta$ -mercaptoethanol 배지에서 배양하였다.
- [0026] 본 발명의 Bmi1은 단백질 또는 이의 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공된다. 본 발명의 Bmi1은 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 Bmi1를 포함하며, 바람직하게는 인간 Bmi1이다. 또한, 배아줄기세포 유사세포로의 역분화에 사용되는 본 발명의 Bmi1 단백질은 이의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 Bmi1 단백질의 변이체를 포함한다.
- [0027] 상기 Bmi1 단백질의 변이체란 Bmi1의 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.
- [0028] 바람직하게는, Bmi1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산의 형태로 제공된다.
- [0029] 상기 Bmi1을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 Bmi1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0030] 상기한 Bmi1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(계놈, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0031] 상기 Bmi1 단백질을 코딩하는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 도입하거나(Wolff et al. Science,1990: Wolff et al. J Cell Sci. 103:1249-59, 1992), 리포솜(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer)등을 이용하여 세포내로 도입될 수 있다. 리포솜은 유전자 도입을 위하여 DOTMA 나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체가 형성된다.
- [0032] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0034] 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하기

나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

- [0035] 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 HIV(Human immunodeficiency virus) MLV(Murine leukemia virus) ASLV(Avian sarcoma/leukosis), SNV(Spleen necrosis virus), RSV(Rous sarcoma virus), MMTV(Mouse mammary tumor virus) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, Bmi1 유전자의 경우 MLV-기반-바이러스 벡터 (Moloney leukemia virus based virusvector)로 푸로마이신에 대한 선별마커를 포함하는 pBabe puro 벡터를 이용하였다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, pBabe puro 벡터에 Bmi1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(NCBI accession No. L13689)을 삽입하여 제조한 벡터(pBabe puro Bmi1)를 광범위한 포유류 숙주세포에 감염이 가능한 고역가바이러스를 생성하는 패키징 세포인 PT67 세포에 형질전환시켜 Bmi1 단백질을 발현하는 바이러스를 제조하여 섬유아세포를 감염시켰다.
- [0037] 상기 방법의 (ii) 단계의 신경줄기세포 배양 조건은 당해 분야에서 신경줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 다만 bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 EGF (Epidermal Growth Factor)을 제외하고 bFGF만을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM/F12 + B27 + N2 + 1% penicillin/streptomycin + 20 ng/ml bFGF를 이용하였다. 상기 배양조건에서 배양하였을 때, 생식세포(germ cell)와 같은 세포가 형성된다 (도 1a 및 도 1b 참조).
- [0038] 구체적인 일 양태에 의하면, 본 발명은 상기 단계 ii)에서 7일 이상 배양하는 것을 특징으로 한다. 상기 배양기간을 거쳐야 배아줄기세포에서 발현되는 주요 유전자들의 발현과 유사한 발현양상을 보이고 세포치료 등으로 사용시 분화효율을 높일 수 있다.
- [0039] 상기 단계 iii)와 같이 Oct4가 발현된 세포를 선별하면 배아줄기세포 유사세포를 세포치료에 이용할 때 분화효율을 보다 높일 수 있는 이점이 있다. 상기 Oct4가 발현된 세포를 선별하는 방법은 다양한 공지의 방법을 이용할 수 있으나, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 Oct4- $\oplus$ -GFP를 도입하고 GFP가 발현되는 세포를 선별하는 과정을 거쳐 Oct4-포지티브 (Oct4-positive)한 역분화 줄기세포를 확립하였다 (참고문헌 Nature 448, 318-324).
- [0040] 상기 단계 iv)에서 "MEK/ERK 억제제"란 MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase) 신호전달과정에 관여하는 ERK1/2 및 ERK1/2의 업스트림 (upstream) 분자인 MEK1/2를 표적으로 하는 물질들을 의미한다.
- [0041] 상기 MEK (mitogen-activated protein kinase)는 세포질 내의 MAP 카이네이즈 신호전달계 말단에 작용하는 효소로서 세포 밖의 신호를 핵 내부로 전달하는 중요한 매개체 역할을 하며, 미엘린 기저 단백질 (myelin basic protein)의 트레오닌(Thr) 잔기를 시험관 내에서 인산화 (phosphorylation)시킨다. ERK는 고등생물에 존재하는 대표적인 MAP 카이네이즈로서 외부 신호에 의해 트레오닌 (Thr)과 티로신 (Tyr) 잔기를 인산화시킨다. 이와 같은 트레오닌과 티로신 잔기의 인산화는 MAP 카이네이즈 활성화에 결정적인 역할을 하므로, 이들 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환될 경우에는 효소가 활성화되지 않는다는 것이 보고되었다.
- [0042] 본 발명의 조성물에 포함되는 MEK/ERK 억제제는 바람직하게는 PD0325901 또는 U0126를 의미한다. 상기 U0126은 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene으로 표시된다. 그러나, 상기 화합물 외에도 모든 MEK/ERK 신호전달 억제제가 본 발명의 범주에 속하게 됨은 당업자에게 있어서 자명하다. ERK1/2는 MEK 1/2에 의해서 활성화되며 MEK 1/2의 활성을 억제하면 ERK1/2의 활성이 곧바로 억제되므로, MEK 1/2는 ERK1/2의 직접적인 상위 신호전달분자가 된다.
- [0043] 본 발명에서 "GSK 억제제"란 GSK (glycogen synthase kinase) 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림 (upstream) 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질들을 의미한다. 본 발명에서 GSK는 바람직하게는 GSK3 $\beta$ 를 의미

한다. 본 발명의 구성물에 포함되는 GSK 억제제는 바람직하게는 CHIR99021을 의미한다. 상기 CHIR99021은 아미노피리미딘(aminopyrimidine)으로 표시된다. 그러나 상기 화합물 외에도 모든 GSK 억제제가 본 발명의 범주에 속하게 됨은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0044] 상기 저분자성 물질 MEK/ERK 억제제와 GSK 억제제는 시중에서 구입하여 사용하거나 제조하여 사용할 수 있으며 상기 억제제 처리에 의해 pre-iPS 세포를 완전히 역분화된 세포로 유도가능하다 (PLoS One, 6, 2237-2247).

[0045] 상기 MEK/ERK 억제제와 GSK 억제제는 배지에 처리하면 된다. 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 PD0325901 0.5 μM과 CHIR99021 3 μM의 양으로 처리하였다.

[0046] 본 발명의 구체적인 양태로서, 상기 방법은 v) 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 배아줄기세포 배양 조건은 당해 분야에서 배아줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 지지세포가 있는 조건에서 하이 글루코오즈 DMEM에 15% FBS (Fetal bovine serum) + 1 % nonessential amino acid +1% penicillin/streptomycin + 0.1mM β-mercaptoethanol + 1000 unit/ml mouse LIF (leukemia inhibitory factor)의 배양액에서 배양하면서 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 하였다.

[0047] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 배아줄기세포 유사세포를 제공한다.

[0048] 본 발명의 역분화 방법으로 제조된 배아줄기세포 유사세포는 유전자발현 (gene expression), 후성학적 특성 (epigenetics), 인 비트로/인 비보 (in vitro/in vivo)에서의 삼배엽성 분화 능력 (three germ layer differentiation), 테라토마 (teratoma) 형성 능력, 키메라 마우스 생성(chimeric mouse generation)이 마우스 배아줄기세포와 매우 유사한 것을 확인하였다.

[0049] 본 발명의 배아줄기세포 유사세포는 다양한 타입의 세포를 제공하는 좋은 소스(source)이다. 예를 들면, 상기 배아줄기세포 유사세포는 세포 분화를 위한 조건의 배지에서 배양하여 조혈세포, 신경세포, 베타세포, 간세포, 연골세포, 상피세포, 요로 세포 및 이의 유사 세포로 분화 유도될 수 있다.

[0050] 배아줄기세포 유사세포가 분화하기 위한 배지 조건 및 방법은 Palacios, et al., PNAS. USA, 92:7530-7537(1995), Pedersen, J. Reprod. Fertil. Dev., 6:543-552(1994), 및 Bain et al., Dev. Biol, 168:342-357(1995)에 개시되어 있다. 상기 배아줄기세포 유사세포는 이식을 통해서 수많은 치료에 응용될 수 있다. 상기 배아줄기세포 유사세포는 당뇨병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 암, 척수 손상, 다발성 경화, 근위축성 측삭 경화증 (루게릭병), 근이영양증, 간 질환, 고 콜레스테롤 혈증, 심장 질환, 연골 대체, 창상, 족부 궤양, 위장병, 혈관 질환, 신장 질환, 요로 질환, 노화관련 질환 및 상태와 같은 수많은 질병 또는 질환 치료에 응용할 수 있다. 그 외, 본 발명의 배아줄기세포 유사세포는 약물개발 시 평가 등에도 응용될 수 있다.

**발명의 효과**

[0051] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 Bmi1을 도입하고 저분자성 물질 MEK/ERK 억제제와 GSK 억제제(PD0325901 및 CHIR99021)를 처리하여 체세포를 전분화능을 가진 역분화 줄기세포로 유도할 수 있다. 본 발명에 의해 역분화된 배아줄기세포 유사세포는 예를 들어, 심근세포, 인슐린 생산세포, 또는 신경세포 등의 세포로 분화하여 심부전, 인슐린의존성 당뇨병, 파킨슨병이나 척수손상 등 다양한 질환에 대한 줄기세포 이식요법에 이용할 수 있으며, 사람배아를 이용하는 윤리적 문제나 이식 후의 거부반응을 회피할 수 있으므로 극히 유용하다. 또한, 유도 전분화성 줄기세포를 분화시켜서 생기는 각종 세포(예를 들어, 심근세포, 간세포 등)는 화합물, 약제, 독물 등의 약효나 독성을 평가하기 위한 시스템으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 기존의 유도인자 유전자 도입 없이 Bmi1이라는 하나의 유전자의 도입과 저분자성 화학물질 처리라는 상대적으로 간단한 방법만으로 역분화 배아줄기세포 유사세포를 제조할 수 있어, 유전자 도입 없는 세포주를 확립하는데 기반이 되는 기술을 제공하는 줄기세포분야에 매우 유용한 발명이라고 할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**



[0053] 도 1은 본 발명에 의해 Bmi1 유전자가 도입된 마우스 체세포의 배양 조건을 바꾸어 주었을 때 생식세포 (germ cell)와 같은 세포가 형성되는 것을 나타내는 도면이다.

도 1a는 본 발명에 의해 Bmi1 유전자가 도입된 마우스 체세포의 배양 조건을 바꾸어 주었을 때 생식세포 (germ cell)와 같은 세포의 모양이 형성되는 것을 나타내는 도면이다.

도 1b는 본 발명에 의해 Bmi1 유전자가 도입된 마우스 체세포의 배양 조건을 바꾸어 주었을 때 생식세포 (germ cell)와 같은 유전자 발현을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

도 2는 마우스 체세포에 Bmi1 유전자를 도입하고, 배양 조건을 조절하여 형성된 상배엽 줄기세포 유사세포에 Oct4 프로모터 GFP를 도입하여 GFP 선발 (selection)을 한 세포에 PD0325901 0.5 μM과 CHIR99021 3 μM을 처리하여 역분화 줄기세포로의 유도가 가능하다는 것을 증명한 결과를 나타내고 있다.

도 2a는 마우스 체세포에 Bmi1 유전자를 도입하고 Oct4-프로모터 GFP가 도입된 세포를 배양 조건을 조절하여 상배엽 줄기세포 유사세포 (epiblast stem cell like cells)로의 유도한 후 이 세포에 PD0325901과 CHIR99021을 처리하고 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양을 한 결과 배아줄기세포와 유사한 세포가 형성된 것을 나타내고 있다 (이와 같이 형성된 세포를 BC-iPS①로 명명함).

도 2b는 본 발명에 의해 형성된 세포에서 배아줄기세포의 특이적 발현 마커들이 발현이 되고 있는 것을 면역화학염색법을 통해 확인한 결과를 보여주고 있다. 이 때 AP stain을 했을 때 포지티브 (positive)한 결과를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다.

도 2c는 본 발명에 의한 역분화 줄기세포에서 배아줄기세포의 대표적인 유전자들이 발현되는 것을 웨스턴 블롯 (western blot) 분석 방법을 통해 확인한 결과를 보여준다.

도 3은 본 발명에 의해 확립된 역분화 줄기세포에서 배아줄기세포의 자가재생 능력 유지에 중요한 Oct4와 Nanog의 프로모터 부위가 탈메틸화 (demethylation) 되어 있는 결과를 보여주고 있다.

도 4는 본 발명에 의한 역분화 줄기세포가 배아줄기세포와 같이 자연발생적 분화 유도를 하였을 때 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로의 분화가 유도되는 지를 확인한 결과를 나타내고 있다.

도 5는 본 발명에 의한 역분화 줄기세포가 배아줄기세포와 같이 테라토마 (teratoma)를 형성하고 있는 것을 확인한 결과를 나타내고 있다. Balb/c 누드마우스의 신장 (kidney)에 캡슐 (capsule) 형태로 세포를 주사 (injection)하고 8-10주 후에 테라토마 (teratoma)가 형성된 것을 prep하고 H&E 염색방법을 통해 염색을 하여 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로 분화가 된 것을 확인한 결과를 보여주고 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1. 마우스 체세포의 배양 및 Bmi1 유전자 도입**

[0056] 배아줄기세포 유사세포를 제조하기 위해, 마우스 체세포 중 마우스 섬유아세포를 이용하였다. 마우스 섬유아세포는 CF1 스트레인 마우스(CF1 strain mouse)가 임신한지 13.5일째가 되었을 때의 배아(embryo)를 준비하고 DMEM (high glucose, w/o sodium pyruvate) + 10% FBS (Fetal bovine serum) + 0.1mM non-essential amino acid + 1% penicilin/streptomycin + 0.1mM β-mercaptoethanol 배지의 조직배양 플라스크(tissue culture flask)에서 배양을 한 후에 3 계대 (3rd passage)가 되었을 때 2 X 10<sup>5</sup>의 세포를 6 웰플레이트(well plate)에 접종 (seeding)을 하였다.

[0057] 레트로 바이러스로 유전자를 도입하는 방법을 사용하기 위해, 바이러스 파티클 (virus particles)을 PT67 패키징 세포주를 이용하여 준비하였다. 보다 구체적으로 pBabe puro 벡터에 인간 Bmi1 (NCBI accession No. L13689) 유전자를 삽입하여 제조한 pBabe puro Bmi1 (from Dr.G.P.Dimri, Evanston Northwestern Healthcare Research Institute, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Evanston, IL 60201, USA)를 PT67 패키징 세포주(packagingcell line, Clontech)에 터보팩트(Turbofect, Fermentas)를 이용하여 트랜스펙션 (transfection)을 한 후 푸로마이신(puromycine, 3 μg/ml)(BD bioscience)으로 선별하였다. PT67 패키징 세포

주는 광범위한 포유류 숙주세포에 감염이 가능한 고역가 바이러스를 생성하는 세포이다.

[0058] 각각의 유전자의 발현을 RT-PCR의 방법을 통해 확인한 후에, 이와 같이 만들어진 세포주가 80% 정도 되었을 때 상등액 (supernatant)을 취하여 0.45 μ m (Millipore) 필터로 필터링 (filtering)을 하여 세포 파편 (cell debris)을 제거한 후에 폴리브렌 (polybrene, 6 μ g/ml)(sigma)을 첨가하여 12시간 간격으로 분리한 마우스 섬유아세포에 3회 반복해서 감염 (infection)시켰다.

[0059] **실시예 2. Bmi1 유전자가 도입된 체세포를 배양 조건을 조절했을 때 생식세포 (germ cell)와 같은 세포로의 유도**

[0060] 도 1은 마우스 체세포에 레트로바이러스를 이용하여 Bmi1 유전자를 도입하고 배양 조건을 EGF를 제외하고 신경줄기세포의 배양 조건 (DMEM/F12 + B27 + N2 + 1% penicillin/streptomycin + 20 ng/ml bFGF)에서 배양하였을 때, 스피어 (spheres)와 같은 모양의 세포가 형성되었고, 이를 더 배양하였을 때 생식세포 (germ cell)와 같은 세포가 형성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1a). 이때의 세포에서 유전자 발현을 RT-PCR의 방법을 통해 확인한 결과 생식세포 (germ cell)에서 발현되는 유전자들이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1b).

[0061] **실시예 3. Oct4-프로모터-GFP를 이용하여 Oct4 포지티브 (Oct4 positive)한 세포 선별 및 저분자성 물질 처리를 통한 역분화 줄기세포로의 유도 및 배아줄기세포의 특성 분석**

[0062] 상기 실시예 2의 결과에서 확립된 역분화 줄기세포가 키메라 형성하지 않는 것을 보고, 이에 대한 보완을 하기 위해 Oct4-<sup>+</sup>GFP (참고문헌 Nature 448, 318-324)를 도입하고 GFP를 통해 Oct4 포지티브 (Oct4 positive)한 세포들을 선별하였다.

[0063] 이렇게 선별된 세포들은 키메라 (chimera)까지 형성이 가능한 세포로의 유도가 가능하였다. 그러나, 배아줄기세포와 유전자 발현 정도에 차이를 보이고 있어서 완전히역분화된 세포 (fully reprogrammed cells)라고 할 수 없었다.

[0064] 이에 대한 보완을 위해 저분자성 물질을 PD0325901 0.5 μ M과 CHIR99021 3 μ M를 처리하여 마우스 배아줄기세포의 배양 조건에서 배양을 한 결과 역분화 줄기세포주를 확립할 수 있었다. 이와 같이 형성된 세포를 BC-iPS<sup>+</sup>로 명명하였다. 마우스 배아줄기세포의 배양 조건은 지지세포가 있는 조건에서 하이 글루코오즈 DMEM에 15% FBS (Fetal bovine serum) +1% nonessential amino acid +1% penicillin/streptomycin + β-mercaptoethanol + 1000 unit/ml mouse LIF (leukemia inhibitory factor)의 배양액에서 배양하면서 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 하였다.

[0065] 저분자성 물질의 처리를 한 세포를 피더 (feeder) 위로 옮긴 후에 배양을 하면서 콜로니의 형성을 관찰하였고, 이와 같은 방법을 통해 확립된 세포가 형태 (morphology) 측면에서 배아줄기세포와 유사한 것을 도 2a의 결과를 통해 확인할 수 있었다.

[0066] 이와 같은 방법을 통해 형성된 역분화 줄기세포가 AP stain을 했을 때 포지티브 (positive)한 결과를 보이며, 배아줄기세포에서 특이적으로 발현되는 마커들이 발현이 되고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 2b).

[0067] 또한, 웨스턴 블롯 (western blot) 분석 방법을 통해 배아줄기세포에서 발현되는 주요 유전자들의 발현이 배아줄기세포와 같이 발현이 되고 있는 것을 확인할 수 있었고, 배아줄기세포의 대표적인 표지인자로 알려진 SSEA1도 함께 발현이 되고 있는 것을 유세포 분석 방법을 통해 확인할 수 있었다 (도 2c). 이와 같은 결과를 통해 마우스 체세포에 Bmi1 유전자 도입과 저분자성 물질의 처리를 통해 역분화 줄기세포로의 유도가 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0068] **실시예 4. 역분화 줄기세포의 주요 유전자들의 프로모터의 메틸화 (methylation) 상태를 배아줄기세포와 비교 분석**

[0069] 역분화 줄기세포에서 배아줄기세포의 자가재생 능력의 유지에 중요한 유전자들의 프로모터 부위를 분석하기 위해서, 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing) 방법을 도입하여, Oct4와 Nanog의 프로모터 부위의 메틸화 (methylation) 유무를 분석하였다. 그 결과 역분화 줄기세포의 경우 배아줄기세포와 같이 프로모터 부위가 탈메

틸화 (demethylation) 되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 3). 대부분 메틸화 (methylation)되어 있는 마우스 체세포와는 상이한 결과를 나타내고 있고, 역분화 과정을 통해 확립된 세포가 배아줄기세포와 같은 특성을 지니고 있는 것을 확인한 결과를 나타내고 있다.

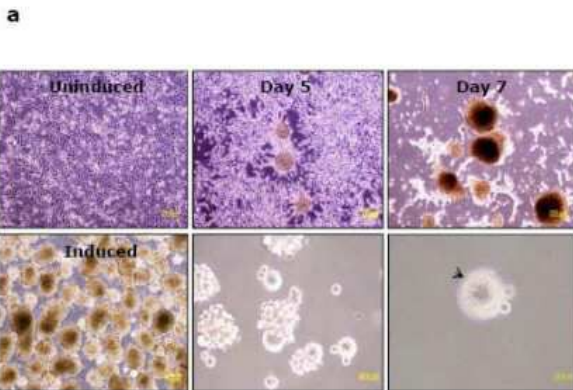
[0070] 실시예 5. 역분화 줄기세포의 분화 능력 확인

[0071] 인 비트로에서 분화 능력을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위해서 0.1% 젤라틴 코팅 플레이트 (gelatin coated plate)에 배아체 (embryonic bodies; EB)를 접종 (seeding)하고 EB 배지 (EB media)에서 7일 동안 자연발생적 분화 유도를 하였다. 삼배엽에 해당하는 대표적인 세포로의 분화가 가능한 것을 확인할 수 있었다. 면역화학 염색법으로 대표적인 마커들의 발현을 확인하여 이를 증명하였다 (도 4).

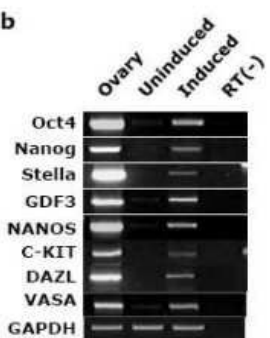
[0072] 또한, 인 비보에서 분화 능력을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위해서 테라토마 (teratoma) 형성이 가능한지를 실험하였다.  $10^6$ 의 세포를 8000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하고 배아줄기세포 배양액에서 펠릿 (pellet) 배양을 24시간 동안 한 후에 6주령 Balb/c 누드마우스 (nude mouse)의 신장 (kidney)에 캡슐 (capsule) 형태로 주사 (injection)하였다. 8-10주 후에 신장 (kidney)을 분리하여 삼배엽으로 분화되었는지 여부를 파라핀 블록 (paraffin block)을 만들고 H&E 염색을 하여 확인하였다. 그 결과 삼배엽에 해당하는 세포로 분화가 된 것을 확인할 수 있었다 (도 5). 이와 같은 결과를 통해 역분화 줄기세포가 배아줄기세포와 같이 테라토마 (teratoma)를 형성하는 것을 확인할 수 있었고, 배아줄기세포와 유사한 세포가 형성된 것을 위의 실험 결과를 통해 증명할 수 있었다.

도면

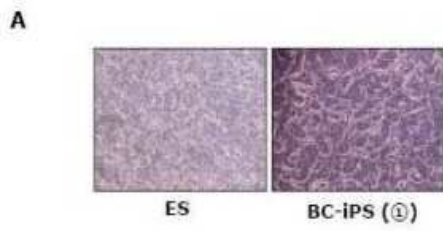
도면1a



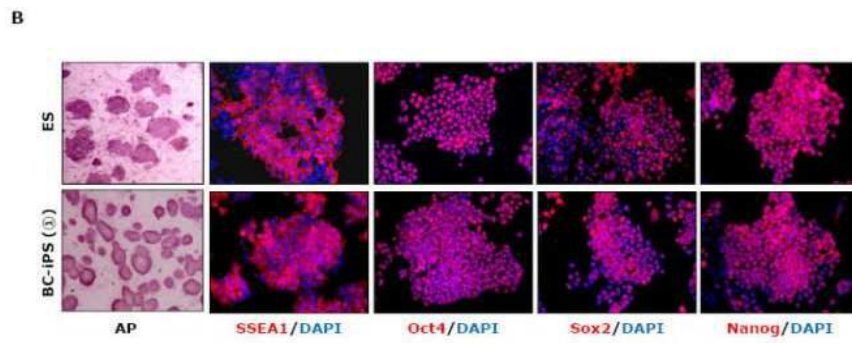
도면1b



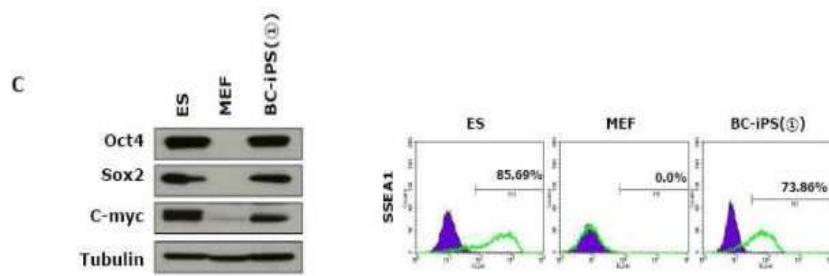
도면2a



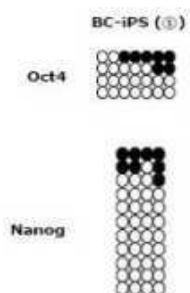
도면2b



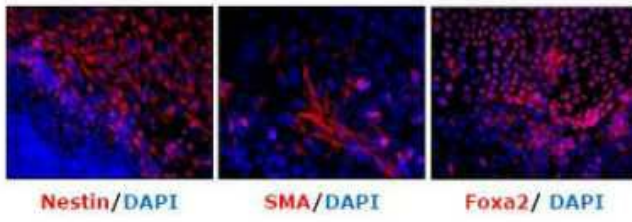
도면2c



도면3



도면4



도면5

