



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월28일
(11) 등록번호 10-1587231
(24) 등록일자 2016년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0146227
(22) 출원일자 2014년10월27일
심사청구일자 2014년10월27일
(56) 선행기술조사문헌
Nature protocol, Vol. 9, pages 871-881
(2014.03.20)
Nature, Vol. 475(7356), pages 390-393
(2011.06.29)

(73) 특허권자
건국대학교 글로컬산학협력단
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로컬캠퍼스)
(72) 발명자
한동욱
서울 용산구 이촌로87길 13, 102동 802호 (이촌동, 강촌아파트)
임경태
경기도 안양시 동안구 흥안대로 446-20 인덕원대림2차아파트 205-202
(74) 대리인
이은철

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 정의준

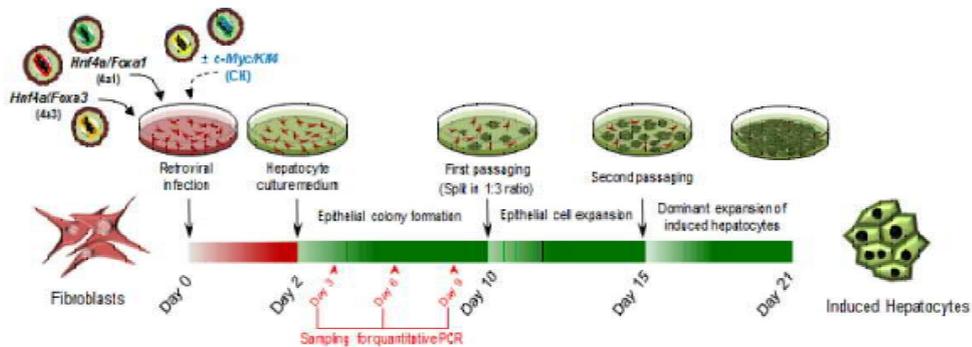
(54) 발명의 명칭 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 체세포에서 간세포로의 직접교차분화에 관한 것으로서, 유도간세포로 직접교차분화를 유도하기 위하여 기존에 사용된 전사인자 조합에 역분화 과정을 유도하는 유전자 중에 하나이자 MET과정을 촉진하는 유전자로 알려진 전사인자를 추가로 조합하여 체세포에 도입함으로써, 기존의 체세포에서 간세포로의 직접교차분화를 촉진하여 그 효율성을 향상시키기 위한 조성물 및 방법을 포함한다.

상기와 같은 본 발명에 따르면, 유도간세포의 직접교차분화 효율성이 향상되어, 보다 짧은 시간 동안 많은 수의 간세포를 생성함으로써, 향후 간세포를 이용한 세포치료제 개발의 가속화와 간세포를 매개로 하는 신약물질의 독성 검증 시스템 구축 및 환자 특이적인 간세포의 효율적인 대량생산 등을 가능하게 하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013A0080069

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 (3차년도)형질전환 돼지 유래 전분화능 줄기세포 생산을 통한 다중 유전자 제어 시스템의 구축

기 여 율 70/100

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014A4230036

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단(과학재단)

연구사업명 원천기술개발사업(바이오·의료기술개발사업)

연구과제명 (4차)체세포에 줄기세포 특성을 부여하는 기초연구를 통한 특정 체세포로의 직접 리프로그래밍 기술의 개발

기 여 율 30/100

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

cMyc 및 Klf4 유전자를 포함하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 체세포는 섬유아세포인 것을 특징으로 하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 직접교차분화 촉진용 조성물을 포함하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 직접교차분화용 조성물은 Hnf4a, Foxa1, cMyc 및 Klf4 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 직접교차분화용 조성물은 Hnf4a, Foxa3, cMyc 및 Klf4 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화용 조성물.

청구항 6

체외에서 체세포에 cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 포함하는, 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법.

청구항 7

체외에서 체세포에 Hnf4a, Foxa1, cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 특징으로 하는 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법.

청구항 8

체외에서 체세포에 Hnf4a, Foxa3, cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 특징으로 하는 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 유전자의 도입은 레트로바이러스 벡터를 이용하는 것을 특징으로 하는 체세포를간세포로 직접교차분화시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 체세포에서 간세포로의 직접교차분화에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유도만능줄기세포의 제조과정에서 역분화 과정을 유도하는 유전자 중에 하나이자 MET(Mesenchymal-to-epithelial transition)과정을 촉진하는 유전자로 알려진 전사인자를 추가로 조합하여 체세포에 도입함으로써, 체세포에서 간세포로의 직접교차분화를 촉진하여 그 효율을 향상시키기 위한 조성물 및 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 분화가 가능한 전능성 배아줄기세포의 상태로 역분화 시킨 세포를 말한다.

[0003] 그러나 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 같은 전능성을 가진다는 장점에도 불구하고, 특정 세포로 분화시키는 특수한 배양조건 하에서 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 장애를 가지고 있다.

[0004] 한편, 최근 줄기세포 연구 분야에 있어서 분화가 완전히 진행된 체세포에 최소한의 전사인자 조합을 도입하여, 전혀 다른 종류의 특성을 가진 체세포 또는 성체줄기세포(somatic stem cells)로 전환, 즉 직접교차분화(direct conversion)시키는 연구가 전 세계적으로 이슈화된 상황이다.

[0005] 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 기술이다.

[0006] 2011년 중국 연구팀은 일반 체세포를 이용, 간세포 특이적인 총 14개의 전사인자 가운데, 최종적으로 Foxa3, Hnf1a, Gata4 라는 총 3가지의 전사인자가 간세포로의 직접교차분화시 필수적임을 밝혔다 (Huang et al., Nature 2011).

[0007] 같은 해, 2011년 일본 연구진 역시 생쥐 배아 유래 체세포를 이용, 간세포 특이적인 총 12개의 전사인자 가운데, 최종적으로 Hnf4a 와 Foxa1, Foxa2, 또는 Foxa3 등 전사인자 조합이 간세포로의 직접교차분화시 필수적임을 보고하였다 (Sekiya & Suzuki., Nature 2011).

[0008] 하지만 상기 중국 및 일본 연구진에 의해 보고된 체세포에서 간세포로의 직접교차분화의 효율은 상당히 낮은 수치를 보인다. 두 연구진 모두 간세포 특이적 전사인자 도입 후 약 2 내지 3 주 후에 상피세포 모양의 군체(epithelial colony)가 형성되었고, 특히 일본 연구진은 약 0.3%의 분화 효율을 나타내는 것으로 보고하였다 (Willenbring et al., Cell Stem Cell 2011).

[0009] 이와 같이 직접교차분화를 통해 일반 체세포를 신경세포, 심장세포, 혈액세포, 간세포 등으로 유도하는 것에는 성공하였지만 상기의 유도된 세포들은 이미 분화가 완료되어 자기재생능력이 없으므로, 분화의 효율성 향상이 수반되지 않고서는 실제 임상적으로 적용하기 어려운 문제점이 있다.

[0010] 이에 따라 본 발명자들은 체세포에서 간세포로의 낮은 직접교차분화 효율성을 제고하기 위하여 유도만능줄기세포의 제조 과정에서 역분화를 유도하는 유전자인 cMyc과 Klf4를 4a1(Hnf4 a /Foxa1) 과 4a3(Hnf4 a /Foxa3)의 간세포 특이적 유전자 조합에 추가로 조합 하여 체세포에 도입함으로써, 유도간세포(induced hepatocyte)로의 직접교차분화 효율이 월등히 향상된 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물 및 방법에 관한 발명을 완성하였다.

[0011] 관련 종래기술로는 미국공개특허 US2013/0071365A1(Induced hepatocytes), 미국공개특허

US2013/0022583A1(Direct conversion of cells to cells of other lineages) 등이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은, 체세포에서 간세포로 직접교차분화를 유도하기 위하여 기존에 사용된 전사인자 조합인 4a1(Hnf4 α /Foxa1)과 4a3(Hnf4 α /Foxa3)에 유도만능줄기세포의 제조과정에서 MET 과정을 촉진하는 유전자인 cMyc과 Klf4를 추가로 조합하여 체세포에 도입함으로써, 체세포에서 간세포로의 직접교차분화를 촉진하여 그 효율성을 향상시키기 위한 조성물 및 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 cMyc 및 Klf4 유전자를 포함하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 체세포는 섬유아세포인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 직접교차분화 촉진용 조성물을 포함하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화용 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 직접교차분화용 조성물은 Hnf4a 및 Foxa1 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 직접교차분화용 조성물은 Hnf4a 및 Foxa3 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 체세포에 cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 포함하는, 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법을 제공한다.

[0019] 상기 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법은 체세포에 Hnf4a, Foxa1, cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법은 체세포에 Hnf4a, Foxa3, cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 유전자의 도입은 레트로바이러스 벡터를 이용하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 유도간세포로의 직접교차분화 효율을 최소 약 89배 이상 증진시킬 수 있기 때문에 체세포에서 간세포로 직접교차분화시 기존보다 빠른 시간 안에 많은 수의 세포를 유도함으로써, 향후 간세포를 이용한 세포 치료제 가속화 및 간세포를 이용한 신약물질의 독성 검증, 환자 특이적인 간세포의 효율적인 대량생산 등을 가능하게 하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 체세포에서 간세포로 직접교차분화를 통한 유도간세포 형성을 위한 실험적 과정에 대한 모식도 이다.

도 2는 본 발명에서 체세포에 도입한 각 전사인자(Hnf4 α, Foxa1, Foxa3, cMyc, Klf4)의 체세포 내 도입 효율을 나타낸 것이다.

도 3은 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 메커니즘을 이해하기 위하여, 간세포 특이적인 전사인자 조합인 4a3(Hnf4a/Foxa3) 을 체세포에 도입 후, (1) fibroblast 특이적인 유전자, (2) MET(mesenchymal to epithelial transition) 관련 유전자, (3) 간세포 특이적인 유전자의 발현 정도를 측정한 것이다.

도 4는 체세포에 cMyc과 Klf4의 추가 도입으로 인한 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 유도과정의 단축 및 가속화를 나타낸 것이다.

도 5는 체세포에 cMyc과 Klf4의 추가 도입으로 인한 유도간세포 형성 효율의 증가를 나타낸 것이다.

도 6은 체세포에 cMyc과 Klf4의 추가 도입 후 유도된 간세포(4a1CK, 4a3CK)의 형태 및 유전자 발현 양상을 나타낸 것이다.

도 7은 체세포에 cMyc과 Klf4의 추가 도입 후 유도된 간세포(4a1CK, 4a3CK)의 체내 유래 간세포와 유사한 분자적, 기능적 특성을 가지고 있음을 확인하는 것이다.

도 8은 체세포에 cMyc과 Klf4의 추가 도입 후 유도된 간세포(4a1CK, 4a3CK)의 체내 유래 간세포와 유사한 분자적, 기능적 특성을 가지고 있음을 확인하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 cMyc 및 Klf4 유전자를 포함하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 체세포는 섬유아세포인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 직접교차분화 촉진용 조성물을 포함하는, 체세포의 간세포로의 직접교차분화용 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 직접교차분화용 조성물은 Hnf4a 및 Foxa1 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 상기 직접교차분화용 조성물은 Hnf4a 및 Foxa3 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 체세포에 cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 포함하는, 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법을 제공한다.
- [0031] 상기 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법은 체세포에 Hnf4a, Foxa1, cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 특징으로 한다.
- [0032] 상기 체세포를 간세포로 직접교차분화시키는 방법은 체세포에 Hnf4a, Foxa3, cMyc 및 Klf4 유전자를 도입하는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 상기 유전자의 도입은 레트로바이러스 벡터를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 상기의 과정을 보다 상세히 기술하면, pMX-레트로바이러스를 매개로, 간세포 특이적인 전사인자 조합인 4a1(Hnf4a/Foxa1)과 4a3(Hnf4a/Foxa3)에 cMyc과 Klf4를 추가로 조합(4a1CK(Hnf4a/Foxa1/cMyc/Klf4), 4a3CK(Hnf4a/Foxa3/cMyc/Klf4))하여 최초 5만개의 일반 체세포(MEFs, murine embryonic fibroblasts)에 처리하였다.
- [0035] 처리 48시간 후, 간세포 특이적인 배양액(hepatocyte culture medium; HCM)으로 전환하여 배양을 지속하였다.
- [0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0037] **실시예 1. 섬유아세포의 분리 및 배양**
- [0038] 수정후 13.5 일(E13.5) 초기 배아에서 간을 비롯한 각종 장기들 및 머리 부위(두부)를 완전히 제거한 뒤, 나머지 부위들을 분리 및 single cell 단위로 분해(dissociation)시켜 FBS 10%, 1X penicillin/streptomycin가 함유된 High glucose DMEM 배지에서 배양을 진행하였다. 이어 세 차례 계대배양한 후 사용하였다.
- [0039] **실시예 2. 섬유아세포에 전사인자 도입**
- [0040] 최초 5×10^4 개의 섬유아세포를 20 ng/ml 농도의 Type I collagen으로 코팅한 3.5 cm 배양접시에 seeding 하였다. 이후, 각각의 전사인자 (Hnf4a, Foxa1, Foxa3, cMyc, Klf4)를 encoding하고 있는 pMX-레트로바이러스(viral particle)를 동일한 양으로 각기 실험군 별로 조합하여 처리하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 때 배지는 섬유아세포가 분열 및 증식하기 적합한 FBS 10%, 1X penicillin/streptomycin가 함유된 High glucose DMEM 배지를 사용하였다.
- [0041] **실시예 3. 전사인자 도입 후 세포 배양 및 배지 조성물**
- [0042] 48시간 동안 pMX-레트로바이러스를 처리한 후, 기존의 배지를 제거하고 간세포 특이적 배지인 간세포배양액(HCM; hepatocyte-culture medium)으로 전환하여 배양을 지속하였다. 간세포배양액의 조성은 하기와 같다.

- [0043] ※ 간세포배양액의 조성: DMEM/F-12 supplemented with 10% FBS (Biowest), 0.1 μM dexamethasone (Sigma), 10 mM nicotinamide (Sigma), 1% ITS (insulin-transferrin-selenium) premix (Gibco), and penicillin/streptomycin/glutamine (Invitrogen), 10 ng/ml fibroblast growth factor 4 (Peprotech), and both hepatocyte growth factor (Peprotech) and epidermal growth factor (Peprotech).
- [0044] 10일 후 세포가 증식하여 배양접시 표면의 90% 이상 자란 후, 세포를 trypsin/EDTA로 떼낸 뒤 다시 20 ng/ml 농도의 Type I collagen으로 코팅한 6 cm 배양접시로 1:3의 비율로 seeding 하였다. 이후 5일 뒤 다시 세포가 증식하여 배양접시 표면의 90% 이상 자란 후 다시 위와 동일한 방법으로 계대배양을 진행하여 배양하였다.
- [0045] **실험예 1. 간세포 특이적인 전사인자인 Hnf4 α, Foxa1, Foxa3와 역분화 유전자인 cMyc과 Klf4의 체세포 내 도입 효율(transduction efficiency) 측정**
- [0046] 최초 5 x 10⁴ 개의 섬유아세포에 각각의 전사인자 (Hnf4 α, Foxa1, Foxa3, cMyc, Klf4)를 encoding하고 있는 pMX-레트로바이러스(viral particle)를 독립적으로 동일량 처리한 후 3일 뒤, 각각의 도입된 전사인자의 발현을 인지할 수 있는 항체를 이용하여 면역형광염색법을 실시하였다. 대조염색은 DAPI(파란색 형광)로 진행하였다.
- [0047] 염색을 진행한 후, 전체 세포의 수(DAPI발광 세포수) 대비 각각의 전사인자를 발현하고 있는 세포의 수(녹색형광 세포수)의 비율을 산출하여 각 전사인자별 섬유아세포로의 도입효율(transduction efficiency)을 계산하였다. 그 결과는 표 1 및 도 2와 같다.

표 1

전사인자의 체세포 내 도입효율

전사인자	체세포 내 도입효율 (transduction efficiency)
Foxa1	91.6±2.5%
Foxa3	67.3±3.9%
Hnf4a	49.4±4.6%
cMyc	91.0±1.8%
Klf4	85.3±4.0%

- [0048]
- [0049] **실험예 2. 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 메커니즘 이해를 위한 real time PCR 분석**
- [0050] 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 메커니즘을 이해하기 위하여, 체세포에 간세포 특이적인 전사인자 조합인 4a3(Hnf4 α/Foxa3) 도입 후 3, 6, 9일에 세포를 실험군 별로 수거하여 total RNA를 추출, cDNA를 합성한 후, 특정 유전자들의 발현 양상을 real time PCR 기법을 이용하여 분석하였다.
- [0051] 그 결과 도 3에서 알 수 있듯이, 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 과정은 가장 먼저 (1) fibroblast 특이적인 유전자의 발현이 3일째 감소하고, (2) MET 과정 관련 유전자의 발현이 6일째 증가하며, 마지막으로 (3) 간세포 특이적인 유전자의 발현이 9일째 순차적으로 증가하는 순서를 보이는 것으로 확인하였다.
- [0052] **실험예 3. 유도간세포로의 직접 교차분화 효율 향상을 위해 cMyc과 Klf4(CK) 추가 도입(4a1CK, 4a3CK) 후 real time PCR 분석**
- [0053] 상기 실험예 2의 real time PCR 분석을 통한 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 메커니즘에 대한 이해를 바탕으로, 간세포로의 직접교차분화 효율을 향상시키기 위하여 기존의 전사인자 조합 4a1과 4a3에 유도만능줄기세포의 제조과정에서 역분화 유도인자로 사용되고, MET과정을 촉진 및 활성화 시키는 전사인자로 알려진 cMyc과 Klf4 (CK)를 추가로 도입(4a1CK, 4a3CK)하여, 유도 과정상 특정 유전자의 발현 양상을 real time PCR 기법을 이용하여 분석하였다.

- [0054] 그 결과, 도 4에서 알 수 있듯이 기존 조합에 비해 전반적으로 (1) fibroblast 특이적인 유전자의 발현량 감소 폭이 3일째 가파르게 감소하였고, (2) 대부분의 MET 관련 유전자의 발현은 6일째 매우 급격하게 증가하였으며, 또한 (3) 간세포 특이적인 유전자 가운데 일부가 6일째 큰 폭으로 증가, 9일째에 대부분 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 cMyc과 Klf4를 이용하여, 체세포에서 간세포로의 직접교차분화 유도과정(the entire reprogramming kinetics)이 전반적으로 빠르게 단축 및 가속화됨을 알 수 있다.
- [0055] **실험예 4. cMyc과 Klf4의 추가 도입으로 인한 유도간세포 형성 촉진으로 인한 효율 증가 확인**
- [0056] 유도간세포로의 직접교차분화 효율을 측정하기 위하여, 전사인자 도입 후 5, 7, 10일에 걸쳐 형성된 간세포 특이적인 특성의 상피세포 모양의 군체의 수(도 5a, b)와, 도입 후 15일째 면역형광염색법을 통하여 간세포 특이적인 유전자인 E-cadherin 양성 반응을 보이는 군체의 수(도 5c, d)를 각 실험군 별로 측정하였다.
- [0057] 그 결과, 기존 조합인 4a1/4a3에서와 달리 cMyc과 Klf4를 추가 도입한 경우, epithelial colony의 발생이 5일째부터 일찍 나타났고, 그 수 또한 기존에 비하여 유의적으로 증가하였다(도 5a, b).
- [0058] 상기 실험예 1에서 측정된 전사인자의 체세포 내 도입효율을 기반으로 각 조합(4a1, 4a3, 4a1CK, 4a3CK)별 도입효율을 계산하여 최초 5만개의 체세포 중에 도입된 전사인자들을 동시에 모두 발현하는 세포 수를 계산하였다.
- [0059] 그 결과, cMyc과 Klf4 추가에 의해 유도간세포 형성의 효율이 기존에 비하여 최소 약 89배 이상(표 2에서 4a1CK/4a1 = 96.7, 4a3CK/4a3 = 89.2) 증가함을 확인할 수 있었다(표 2).

표 2

유도간세포 형성의 효율 증가 확인

Combinations	% of Multiple factors transduction (전사인자 도입효율)	No. of multiple factors-transduced cells	No. of epithelial colonies (Day 10 postinfectoin)	Reprogramming efficiency
4 a 1	45.3	22,625	0.8	0.003
4 a 3	33.2	16,623	1.0	0.006
4 a 1CK	35.1	17,562	51.0	0.290
4 a 3CK	25.8	12,903	69.0	0.535

- [0060]
- [0061] 또한, 전사인자 도입후 15일에 상피세포 모양의 군체를 면역형광염색법을 이용하여 E-cadherin positive colony의 수를 측정한 결과, 위의 결과와 유사한 양상으로 cMyc과 Klf4가 첨가된 경우, 기존에 비해 약 8 내지 12배에 해당하는 상피세포 모양의 군체의 수가 증가된 양상을 확인하였다(도 5c, d).
- [0062] 이러한 결과는 유도간세포를 형성하는데 필수적인 전사인자의 조합에 cMyc과 Klf4를 추가로 조합하여 도입하였을 경우, 일반체세포에서 간세포로의 직접교차분화하는데 걸리는 시간이 단축되었고, 이로 인한 직접교차분화 효율이 유의적으로 크게 향상되었음을 의미한다.
- [0063] **실험예 5. cMyc과 Klf4 유전자가 추가 도입 된 유도간세포의 형태 및 유전자 발현 양상 확인**
- [0064] 기존의 조합에 의한 유도간세포(4a3)와 cMyc과 Klf4의 추가 도입 후 확립된 유도간세포(4a1CK, 4a3CK)의 형태를 비교 하기 위하여 현미경을 통해 관찰한 결과, 도 6에서 보여지듯이 4a3와 4a1CK 및 4a3CK는 동일한 형태학적 특성을 보였다.
- [0065] 또한, 기존의 조합에 의한 유도간세포(4a3)와 cMyc과 Klf4의 추가 도입 후 확립된 유도간세포(4a1CK, 4a3CK) 및 체내 유래의 간세포의 유전자 발현 양상을 비교 확인하기 위하여 간세포 특이적인 유전자(hepatocyte

markers)와 체세포 특이적인 유전자(fibroblast marker)의 발현을 real time PCR을 통하여 확인하였다.

[0066] 그 결과, 도 6에서 알 수 있듯이 유도간세포는 체내 유래의 간세포와 유사한 양상의 간세포 특이적 유전자를 발현함과 동시에, 유도간세포(4a3,4a1CK 및 4a3CK) 및 체내 유래의 간세포 모두 체세포 특이적인 유전자(fibroblast markers)의 발현은 silencing 되거나, 발현량이 현저하게 줄어드는 것을 확인하였다.

[0067] **실험예 6. 본 발명의 유도간세포의 분자적 특성 검증**

[0068] 본 발명에서 유도된 간세포(4a1CK, 4a3CK)가 체내 유래 간세포와 유사한 분자적 특성을 가지고 있는지 확인하기 위하여 면역형광염색법을 이용하여 albumin, CK18, CYP1a2 와 같은 간세포 특이적인 유전자의 발현을 조사하였고, 세포간 강한 접착성을 매개로 간세포 특유의 모양을 유지하는데 중요한 역할을 하는 E-cadherin과 ZO-1 의 발현 양상을 조사하였다.

[0069] 그 결과, 도 7a에서 보여지듯이 유도간세포는 albumin, CK18, CYP1a2와 같은 간세포 특이적인 유전자를 강하게 또는 일부 발현하였고, 체내 유래의 간세포와 같이 E-cadherin과 ZO-1을 발현하였다.

[0070] **실험예 7. 본 발명의 유도간세포의 기능성 검증**

[0071] 본 발명의 유도간세포의 기능성 검증을 위하여 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 통해 세포질 내 글리코겐 저장능 및 indocyanine green (ICG)처리능을 확인하였다. 그 결과, 체내 유래의 간세포와 같이 글리코겐 저장능이 가능하고, 외래물질의 흡수 및 방출의 능력이 있음을 확인하였다(도 7b).

[0072] 또한, Dil-Ac-LDL uptake assay를 수행하여 지질대사능을 확인하였는데, 그 방법은 하기와 같다.

[0073] Dil-Ac-LDL (Acetylated Low Density Lipoprotein, labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate)은 Dil이라는 적색계열의 형광물질을 Ac-LDL에 표지시킨 물질로서 간세포의 경우 이러한 지질을 대사할 수 있는 능력을 가진다. 유도간세포에 10 mg/ml의 Dil-Ac-LDL을 처리 후, 4시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그 후 세포를 4% PFA (paraformaldehyde)로 고정한 뒤 DAPI로 세포 핵을 대조염색하여 관찰하였다.

[0074] 또한, Oil-red-O은 neutral triglycerides와 lipids를 대사하는 지질대사능을 확인하는 염색법으로 간세포에 처리할 경우 적색의 spot들을 볼 수 있다. 배양중인 유도간세포를 10% formalin으로 고정한 뒤, 60% isopropanol에 5분간 처리하였다. 그 후 Oil-red-O를 상온에서 10분간 처리한 후 완전히 제거 및 3차 증류수를 이용하여 세척한 뒤 관찰하였다.

[0075] 상기와 같이 Dil-Ac-LDL uptake assay 및 Oil-red-O 염색 여부를 확인한 결과 유도된 간세포는 체내 유래의 간세포와 같이 지질대사능을 지니고 있음을 확인할 수 있었다(도 7b).

[0076] 또한, albumin 및 urea secretion assay를 통하여 본 발명의 유도간세포가 albumin 및 urea 분비능을 가지는지 확인한 결과, 체내 유래 간세포와 유사한 양상의 albumin 및 urea 분비능을 보이고 있음을 확인하였다(도 8a, 8b).

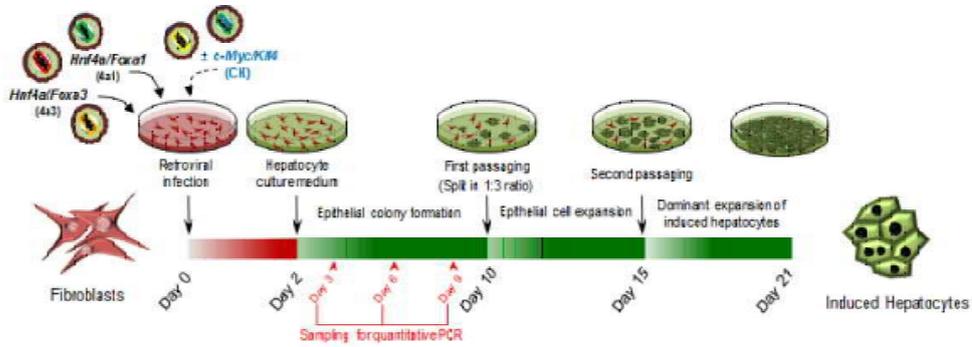
[0077] 그리고, Microarray 분석을 통하여 본 발명의 유도간세포의 유전자 발현 양상을 살펴 본 결과 전체 유전체 발현 양상이 시작세포인 MEFs과 다르고, 체내 유래 간세포와 더욱 유사함을 확인하였다 (도 8c).

[0078] 상기의 결과를 종합하여 볼 때, cMyc과 Klf4의 추가 도입하여 확립된 유도간세포 역시 체내 유래 간세포와 유사한 분자적, 기능적 특성을 가지고 있음을 알 수 있다.

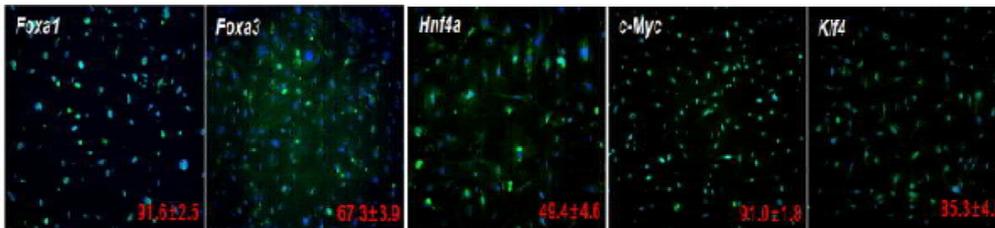
[0079] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

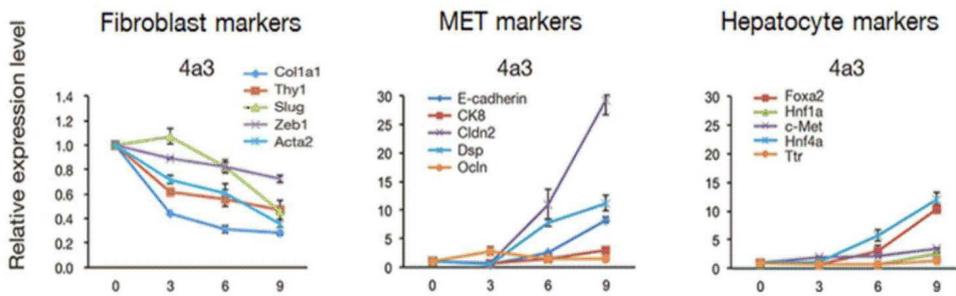
도면1



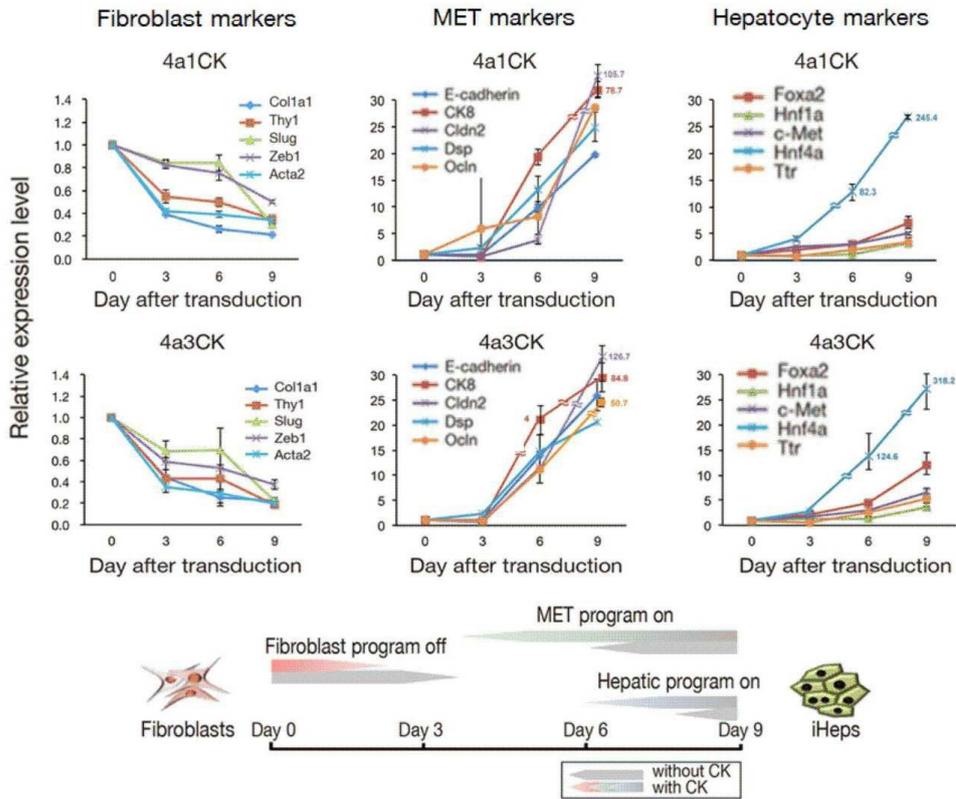
도면2



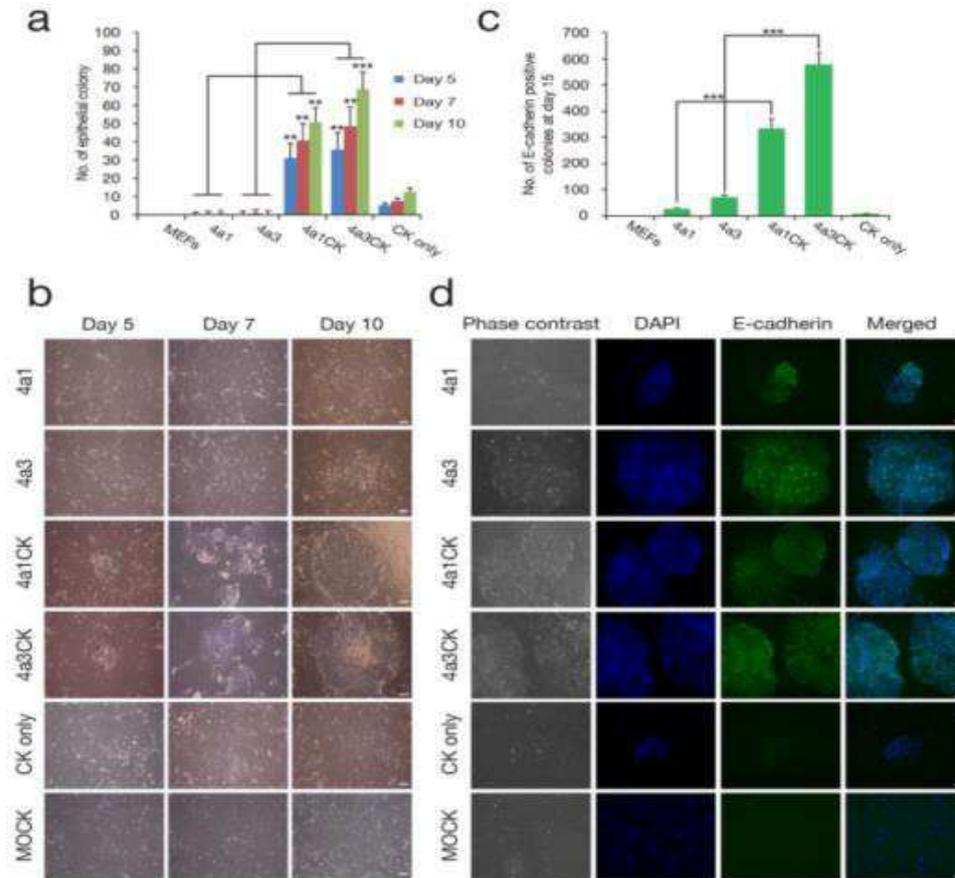
도면3



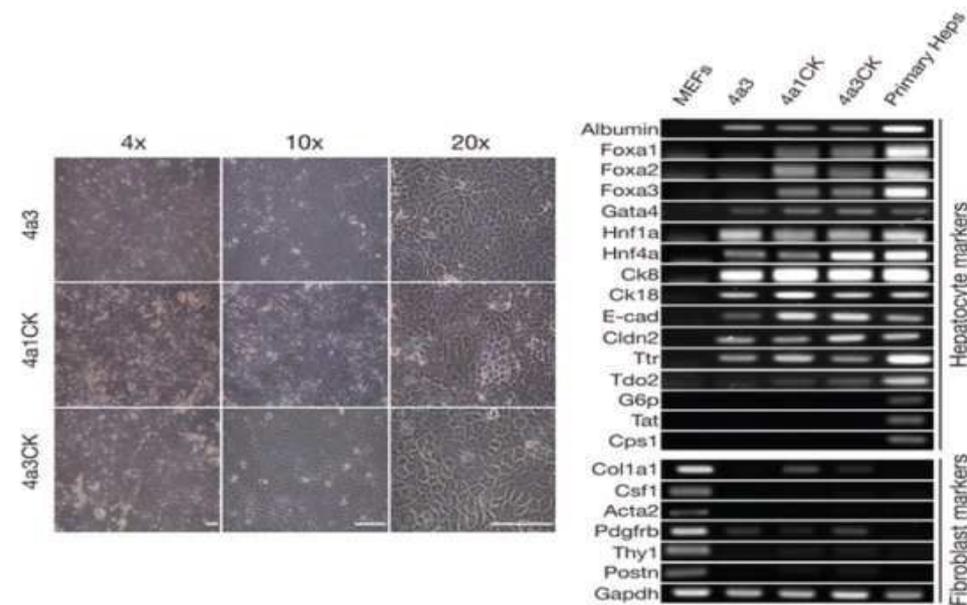
도면4



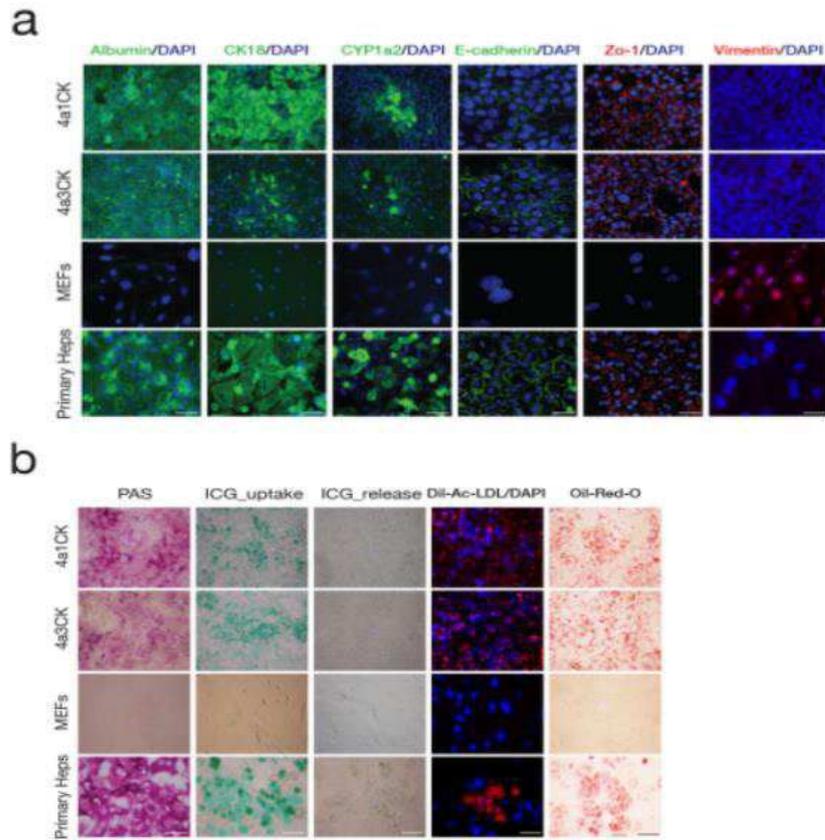
도면5



도면6



도면7



도면8

