



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0124282

(43) 공개일자 2012년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) C07K 16/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0042089
(22) 출원일자 2011년05월03일
심사청구일자 2011년05월03일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
(72) 발명자
한동욱
서울특별시 광진구 아차산로 263, 동물생명과학대학 409호 (화양동, 건국대학교)
(74) 대리인
구현서

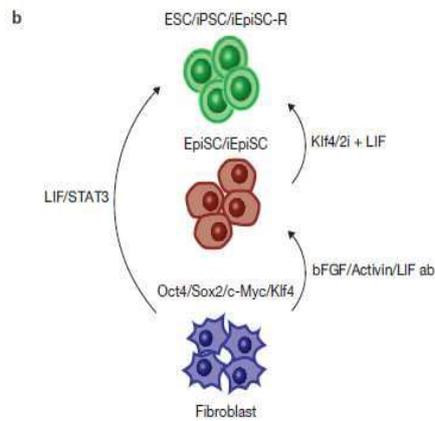
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 체세포에서 배반엽 상피 세포의 줄기세포로의 직접 교차분화 방법

(57) 요약

본 발명은 체세포에서 배반엽 상피 세포의 줄기세포로의 직접 교차분화 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4b



특허청구의 범위

청구항 1

체세포를 Oct-4, Sox2, c-Myc, 및 Klf4를 처리하고,

염기성섬유아세포생장인자(bFGF), 액티빈(Activin), 및 백혈병 억제인자(LIF)에 대한 항체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 처리하는 단계를 포함하는

체세포로부터 유도 배반엽 상피 줄기세포(induced EpiSCs;iEpiSCs)의 직접 교차분화 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 체세포로부터 유도 배반엽 상피 줄기세포(induced EpiSCs;iEpiSCs)의 직접 교차분화 방법.

청구항 3

Oct-4, Sox2, c-Myc, 및 Klf4 유전자;와

염기성섬유아세포생장인자(bFGF), 액티빈(Activin), 및 백혈병 억제인자(LIF)에 대한 항체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 체세포로부터 유도 배반엽 상피 줄기세포(induced EpiSCs;iEpiSCs)의 직접 교차분화용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 체세포에서 배반엽 상피 세포의 줄기세포로의 직접 교차분화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포(Stem Cell)는 미분화된 세포로서 모든 다세포 생물에 존재하며, 무한 증식이 가능한 자가 재생산 능력과 정상 염색체 유지 및 다양한 세포로의 분화 능력을 가지고 있으며, 1960년대에 캐나다 Ontario Cancer Institute의 Ernest A. McCulloch와 James E. Till에 의해 발견된 이후, 특히 신체 210여개의 장기를 구성하는 조직의 어떠한 세포로도 분화 할 수 있다는 만능(Totipotent) 잠재력으로 인해 인체의 마스터 세포(Master cell)로 알려져 왔다.

[0003] 줄기세포의 발견 및 연구를 통해 다양한 질환이나 상처들의 결손 된 세포, 혹은 상처 입은 세포들을 대체할 수 있다는 희망을 가지게 되었고, 재생 치료 의학에 있어 줄기세포를 이용하는 새로운 혁신적인 방법의 장(場)을 열수 있게 되었다. 이러한 과정은 장기 이식 과정의 개념과 비슷할 수 있으나 장기 대신 세포 자체를 이용한다는 점에서 차이점을 가진다.

[0004] 현재 줄기세포는 불치병 혹은 만족스러운 수준으로 치료되지 못하고 있는 만성적인 질환들에 대해 보다 효과적인 치료 방법을 제시해 줄 수 있는 수단으로 평가받고 있으며, 특별한 유전적 이상으로 인한 몇몇 질환들에 대해서는 실제 적용이 가능한 것으로 보고되고 있다. 2007년 후반의 통계에 따르면 성체 줄기세포에 기초를 둔 줄기세포 치료제 개발을 위해 미국에서만 700여개의 연구가 진행 중이었다고 한다.

[0005] 1. 세포 치료제(Cell Therapy Products)

[0006] 세포 치료제란 환자에게서 추출한 세포를 특정 환경에서 배양 및 조작하여 환자에게 다시 주입하거나, 세포로 인체 조직을 만들어 치료용으로 사용하는 기술을 말한다. 백혈구와 같은 면역 세포를 이용해 암을 치료하거나, 줄기세포를 이용해 연골이나 심장 근육을 재생하는 것과 같은 기술이 대표적인 세포 치료의 분야라고 할 수 있다.

[0007] 세포 치료제의 종류

[0008] 세포 치료제는 사용하는 세포의 종류 및 분화 정도에 따라 크게 체세포 치료제와 줄기세포 치료제로 나눌 수 있으며, 줄기세포 치료제는 다시 배아 줄기세포 치료제, 성체 줄기세포 치료제로 분류할 수 있다.

- [0009] (1) 체세포(Somatic cell) 치료제
- [0010] 체세포를 이용한 치료로는 자가 연골 세포를 이용한 관절 연골 재생, 표피 세포를 이용한 피부 재생, Islet 세포를 이용한 당뇨병 치료, 파킨슨씨 질환(Parkinson's disease) 치료를 위한 Fetal neuronal 세포이용, 암 및 면역 질환에 있어 자연 살해 세포(Natural killer cell, NK cell) 이용, 각막 이식용 세포 등의 방법이 있다.
- [0011] (2) 줄기세포(Stem cell) 치료제
- [0012] 줄기세포 치료제의 한 분류로, 줄기세포를 사람으로부터 분리, 분화와 증식을 거쳐 손상된 장기 또는 조직의 기능 회복을 도울 수 있는 신경, 혈관, 근육 세포와 같은 기능성 세포 치료제와 단순 골수 이식이나 항암 면역 치료제로 수지상 세포(Dendritic cell)를 이용하는 성체 줄기세포 치료제가 있다. 또 다른 방법으로 배아 줄기세포를 이용한 치료제가 있는데 이 경우 세포의 대량 증식과 신체 모든 세포로 분화가 가능하다는 이점이 있으나 분화 조절이 어렵고, 암 발생 등의 문제점이 있다.
- [0013] 줄기세포의 종류
- [0014] 위와 같은 능력을 가진 줄기세포는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포, 제대혈 줄기세포와 같이 크게 3가지의 형태로 나누어 설명할 수 있다.
- [0015] (1) 배아 줄기세포(Embryonic Stem Cell, ES cell)
- [0016] 배아 줄기세포(ES cell)는 배아(Embryo)의 초기 발생 단계 중 하나인 포배(Blastocyst) 단계의 내부세포괴(Inner cell mass, ICM)에서 유래한다. 포배 단계에서의 배아는 수정 후 4 ~ 5일 정도 된 상태로, 50 ~ 150여 개의 세포들을 가지고 있으며, 이 세포들은 더 많은 줄기세포로 분열하거나 삼배엽 세포로 분화할 수 있는 만능성(Pluripotent) 분화 능력을 가진 줄기세포들이다.
- [0017] 이러한 특성으로 인해 배아 줄기세포들은 성인 신체를 구성하는 200여개 이상의 세포 형태로 적절한 자극에 의해 분화할 수 있는 능력을 가지게 되며, 그 사용에 있어서도 무궁무진한 가능성을 지니고 있다고 할 수 있다.
- [0018] 그러나 인간 배아 줄기세포의 사용 문제는 줄기세포를 얻는 과정에서 포배 단계의 배아가 파괴된다는 점 때문에 윤리적으로 매우 심각한 논란을 야기시킬 수 있다. 보통 줄기세포를 얻는 배아의 경우 in vitro 수정을 통해 생산이 되고, 더 이상 원치 않는 혹은 필요 없다는 이유로 인해 여성의 자궁으로 이식되지는 않는다. 상당수 사람들은 수정란 상태의 착상 전 인간 배아도 인간(Human)이라고 여기며, 태어날 수 있는 능력과 가능성을 결과적으로 끝내버리는 어떠한 행위도 도덕적으로 잘못된 것이라고 생각한다. 그러나 또 다른 사람들은 포배 단계의 경우, 특별한 도덕적 혹은 법률적인 상태가 아닌, 단순한 세포들의 집합체라고 여기기도 한다. 현재 이러한 다양한 의견들에 의한 논란으로 인해 일부 국가들에 따라 그 사용과 금지가 나뉘고 있는 실정이다.
- [0019] 배아 줄기세포를 서로 다른 많은 형태의 세포들로 정확하고 정교하게 분화시키기 위해서는 특별한 신호 메커니즘과 그 메커니즘을 조절할 수 있는 능력이 필요하다. 이러한 점에 대한 고려 없이 인체 내에 직접 주사했을 경우에는 기형종(Teratoma)의 발생 같은 문제점이 생길 수 있다. 따라서 이러한 배아 줄기세포들의 무제한적 분열 능력과 만능성(Pluripotent) 특성이라는 복합적인 능력을 살려, 이식 거부 반응을 피하면서 사용 가능한 세포로 배아 줄기세포를 분화시키는 것이 중요한 도전 과제로 제시되고 있다.
- [0020] (2) 성체 줄기세포(Adult Stem Cell, AS)
- [0021] 성체 줄기세포(AS cell)는 아이와 성인 모두를 포함해 발달된 기관에서 발견되는 세포들이기 때문에 'Adult Stem Cell'이란 용어 자체는 일부 잘못된 의미와 해석을 가질 수도 있다.
- [0022] 체세포(Somatic cell)로 알려진 성체 줄기세포는 대부분이 다분화성(Multipotent) 능력을 지니고 있어 계대에 있어 제한적이고, 모든 형태의 세포를 생산하지도 못하는 한계점을 지녀 배아 줄기세포에 비해 질환 치료에 있어 그 사용 가능성이 제한되어 왔다. 그러나 성체 줄기세포는 배아 줄기세포에 비해 윤리적인 논란에서 비교적 자유로운 이점을 가진다.
- [0023] 성체 줄기세포는 지속적인 세포 교체를 반복하는 기관에서 발견되며, 이러한 기관들에는 피부의 표피층, 소장(Small intestine)의 내막, 골수(Bone marrow), 뇌, 힘줄 등이 있다.
- [0024] 골수의 경우 혈액과 면역계의 모든 세포 형태로 분화가 되는 조혈 줄기세포(Hematopoietic Stem cell, HS cell)가 존재하며, 위치한 환경의 성장 인자에 따라 서로 다른 종류의 세포들로 분화가 된다. 또한 근육, 뼈,

지방 등의 중간엽 조직으로 분화되는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem cell, MSC)도 골수에 존재하여 신경, 피부와 같은 세포들로 분화가 될 수 있다.

- [0025] 이러한 분화 특성들이 알려지면서 다양한 기관들에 대한 세포 치료제로서 성체 줄기세포의 사용 가능성이 제기되었고, 이러한 가능성은 윤리적인 배경 하에 배아 줄기세포의 사용을 반대해왔던 사람들에게 특히 환영을 받았으나, 배아 줄기세포에 비해 수명이 짧고 얻을 수 있는 양이 적어 실제 임상적으로 적용하기에는 어려운 단점을 가지고 있다.
- [0026] (3) 제대혈 줄기세포(Cord Blood Stem Cell)
- [0027] 제대혈(Umbilical cord blood)이란 태반(Placenta)과 태아의 제대(Umbilical cord)로부터 나온 혈액을 말한다. 제대혈에는 줄기세포가 다량 존재하고 있어 줄기세포를 얻기 위한 공급원으로 이용 될 수 있으며, 또한 제대혈 줄기세포의 경우 골수 유래 줄기세포에 비해 증식(Proliferation)이 더 강한 특성을 가지고 있다.
- [0028] 1978년도에 처음으로 인간 제대혈에서 조혈 줄기세포가 분리 된 이후로 1980년대 후반에는 혈연간 이식이 성공적으로 이루어졌으며, 백혈병(Leukemia), 림프종(Lymphoma) 및 60여개 이상의 유전적 이상 질환의 환자들에게 11,000회 이상 조혈 줄기세포 이식이 이루어진 것으로 보고되고 있다.
- [0029] 한편 성체 줄기세포에 덧붙여, 조직의 더 많은 형태로 분화할 수 있는 능력을 가진 줄기세포들이 제대혈에 존재할 수도 있다고 한다. 2005년도에 영국 Kingston 대학 연구자들에 의해 제대혈에서 CBEs(Cord-Blood-derived Embryonic-like stem cells)라는 이름으로 3번째 종류의 줄기세포가 발견되었다는 연구 결과가 보고된 바 있는데, 연구 결과에 의하면, 간(Liver) 세포로 CBEs를 이식한 이후에 성체 줄기세포보다 더 많은 종류의 조직 형태로 세포들이 분화되었다고 한다. 또한 CBEs는 배아 줄기세포의 표지자로 생각되는 대부분의 표면 단백질들을 가졌으며, 배아 줄기세포에 의해 형성되는 특징적인 세포 응집 현상인 'Embryonic bodies' 역시 형성되었다고 한다.
- [0030]
- [0031] 줄기세포를 이용한 약물 개발
- [0032] 현재 줄기세포는 줄기세포 자체를 이용하는 치료제로서의 연구 이외에도 약물 개발 과정에서 새로운 물질의 스크리닝(Screening)을 위한 기술로서 그 가능성을 인정받고 있다. 동물 시험에서 발견하지 못한 부작용 또는 약물 효과의 유효성 부족으로 인해 임상 시험에 진입한 약물 중 90% 이상이 시장 진입에 실패를 하고 있는 현실로 미루어 볼 때, 화합물에 대한 문제점을 보다 효과적으로 스크리닝할 수 있는 시험 시스템 개발에 대한 가치와 중요성이 높아지고 있는 것이다.
- [0033] 글로벌 다국적 제약 기업인 GlaxoSmithKline(GSK), AstraZeneca와 Roche는 실험 의약품에 대한 안전성 시험에 있어 줄기세포를 사용하는 'Stem Cells for Safer Medicines Ltd.'란 이름의 새로운 벤처 회사 설립을 2007년 8월 발표한 바 있다. 이 회사의 경우 줄기세포 자체를 가능성 있는 치료제로 개발하기보다는, 인간 배아 줄기세포를 사용하여 임상 시험 진입 전에 새로운 약물에 있어 잠재적인 가능성이 있는 부작용을 스크리닝할 수 있는 효과적인 방법 개발을 목표로 하고 있다. 또한 2007년 9월 EU 펀드에 의해 설립된 'Stem Cell Sciences'라는 이름의 회사는 자체 특허가 있는 신경 줄기세포(Neural Stem cell, NS)를 이용한 신약 개발의 스크리닝 과정 개발에 다국가적인 노력을 기울이고 있다. 'NEUROscreen'이란 이름의 이 프로젝트는 신경 줄기세포를 기반으로 하는 생물학적 분석 방법 개발을 통해 암(Cancer), 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease), 뇌졸중(Stroke), 간질(Epilepsy) 등의 치료에 있어 신약 후보 물질 발굴을 목표로 하고 있다.
- [0034]
- [0035] 질환별 줄기세포 치료제
- [0036] 현재 사용 또는 승인된 줄기세포 치료제의 경우 대부분이 백혈병(Leukemia), 다발성 골수종(Multiple myeloma), 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma)과 같은 암(Cancer) 관련 질환과 재생 불량성 빈혈(Aplastic anemia), 면역 결핍증, 루프스(Lupus)와 같은 질환들에 국한되어 있으며, 치료법 역시 골수(Bone marrow) 또는 혈액 내 줄기세포를 이용한 줄기세포 이식술의 형태로 대부분 진행되고 있다.
- [0037] 모든 백혈병 형태의 치료 방법은 골수 및 전신병(Systemic disease) 조절을 위해 일반적으로 화학 요법을 사용하게 된다. 병의 진행 단계와 환자의 상태에 따라 줄기세포 이식술 역시 고려할 수 있으며, 이 경우 암(Cancer) 세포를 가지고 있는 비정상 골수의 파괴 현상을 대치할 수 있게 된다. 정상 줄기세포가 이식되면, 정상적인 세포들의 생산이 재개되고, 이식 된 세포들의 면역 인자에 의해 골수에 남아 있던 암세포들이 사멸

하게 된다. 화학 요법에도 불구하고 백혈병이 재발한 환자의 경우에도 줄기세포 이식술을 생각할 수 있으며, 특히 급성 림프구성 백혈병 재발의 경우에는 화학 요법 후 동종 골수 이식술(Allogenic bone marrow transplant)이 추천된다. 만성 골수성 백혈병 환자의 경우에는 질환을 일으키는 염색체상의 이상(Abnormality)을 제거할 수 있는 동종 골수 이식술에 의해 효과를 볼 수 있으며, 매우 고농도의 화학 요법과 방사선 치료 후에 공여자의 골수 이식이 이어지게 된다.

[0038] 다발성 골수종(Multiple myeloma)에 대한 치료는 질환의 확대를 막고 억제시키는데 초점을 두고 있으며, 소아 환자의 경우에는 고용량의 화학 요법과 연이은 두 번의 자가(Autologous) 줄기세포 이식술이 매우 효과적일 수 있다. 자가 줄기세포 이식술에 대한 대체 방법으로 현재 비골수과괴성(Nonmyeloablative) 동종(Allogenic) 줄기세포 이식술이 연구되고 있으나, 치료 효과에 비해 치료 과정에서의 사망률이 5 ~ 10%에 달한다는 점이 문제점으로 인식되고 있다.

[0039] 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin 's lymphoma)의 치료는 질환의 단계, 관련된 세포들의 형태 및 종류, 세포의 공격성 정도, 환자의 나이와 일반적인 건강 상태에 따라 달라 질 수 있다. 보통 화학 요법, 방사선 치료의 단독 또는 복합 치료가 사용되며, 비호지킨 림프종의 재발성 또는 위험도가 높은 경우 골수 이식술이 사용될 수 있다.

[0040] 또 재생 불량성 빈혈은 항흉선세포 글로불린(Anti-thymocyte globulin), 시클로스포린(Cyclosporin), 화학 요법 등과 같은 약물 제제의 사용으로 면역계 억제를 통해 치료하며, 좀 더 심한 상태의 경우 골수 이식술을 고려할 수 있다. 이식된 골수는 환자에서 기능 이상이 있는 골수 세포들을 대체하여 새로운 골수의 줄기세포로부터 적혈구, 백혈구, 혈소판의 세 가지 모든 혈액 세포들을 재생산하게 된다.

[0041] 면역 결핍증의 예방을 위해서는 감염원에 대한 노출을 줄이고, 예방적 항생제(Prophylactic antibiotics)를 사용하는 것을 추천하며, 기타 치료법으로는 항체 결핍증의 경우 정맥 투여용 면역 항체 글로불린(Intravenous Immunoglobulin, IVIG)을 사용하거나 SCID의 경우 조혈 줄기세포 이식술을 이용하는 방법 등이 있다. 또한 유전자 치료 방법으로서 선천성 면역 결핍증 환자의 비정상 질환 유전자를 대체/복구하기 위해 환자의 혈액 또는 골수로부터 면역계 관련 세포를 채집하여 정상 유전자를 삽입하고 실험실적 조건에서 증식 시킨 후 환자에게 다시 세포를 수혈하는 방법이 있을 수 있으며, 환자의 비정상적인 유전자를 세포 내에서 복구하는 방법도 있을 수 있다. 다만 유전자 치료에 대한 심각한 부작용들이 보고되고 있어 향후 일반적인 사용 승인을 위해서는 추가적인 연구와 임상 시험이 필요할 것으로 보인다.

[0042] 또 최근에는 루푸스 환자 치료법의 하나로 자가(Autologous) 줄기세포 이식술이 고려되고 있는데, 2006년 1월 Journal of the American Medical Association(JAMA)에 발표 된 연구 결과에 의하면 Northwestern Medical Hospital의 병세가 심한 48명 루푸스 환자에게서 긍정적인 결과를 보였다고 한다.

[0043] 또한 겸형 세포 이상을 가진 환자의 치료법으로는 인간 체대혈 줄기세포를 이용한 치료법이 수년간 성공적인 결과를 보이고 있으며, 형제자매의 체대혈 줄기세포를 겸형 세포 빈혈증을 가진 아이에게 성공적으로 이식한 사례가 2000년도 Journal of Pediatric Hematology and Oncology에 실린바 있다. 또한 2007년도 9월 'ViaCell'의 리포트에 의하면, Children's Hospital & Research Center Oakland에서 형제자매의 체대혈 줄기세포를 이용해 겸형 세포 질환 및 지중해 빈혈(Thalassemia)을 가진 어린이를 성공적으로 치료했다는 보고가 있었다.

[0044] 한편, 종래의 다능성 줄기세포는 난자와 정자의 수정에 의해서 만들어지는 수정란 배아에서 유래된 수정란배아 줄기세포가 있었다. 또 다른 종래 기술로는 난자의 핵을 체세포의 핵으로 치환시켜서 만들어지는 복제 배아를 이용하여 만들어지는 복제배아 줄기세포가 있었다. 이러한 복제배아 줄기세포에는 난자 제공자의 체세포를 공여 핵 원으로 하는 자가 체세포 복제배아 줄기세포와 난자 제공자와는 다른 사람인 타인(환자)의 체세포를 공여 핵 원으로 하는 타가 복제 배아 줄기세포가 있었다.

[0045] 또 다른 만능성의 종래배아 줄기세포 주로는 난자 단독으로 처녀생식 방법으로 만들어진 배아로부터 유래된 처녀생식 배아 줄기세포가 있었다.

[0046] 상기한 수정란배아 줄기세포나, 또는 복제 배아 줄기세포는 다양한 세포로 분화가 가능하고, 또한 분화된 세포가 자연적인 발생학적 과정과 유사하기 때문에 보다 안전한 분화 세포를 제공할 수 있는 장점이 있다. 하지만 배아 줄기세포를 만들기 위하여 배반포를 파괴하여 내세포괴(ICM)를 추출하는 과정을 거치게 되어 있어서 생명체의 시발점인 배아 파괴라는 윤리적인 문제를 안고 있는 단점이 있었다.

[0047] 수정란배아 줄기세포 주는 현재 인간의 수정란을 이용한 배아 줄기세포까지 완성된 상태이고, 현재 상용화된

상태이며, 여러 가지 세포로 분화를 유도하기 위한 연구를 현재 진행 중이며, 원하는 특정 세포로 분화를 유도했다는 보고가 있기도 하다. 또한 복제배아 줄기세포는 쥐를 대상으로 한 경우엔 이미 성공한 상태이며, 영장류인 원숭이의 복제배아 줄기세포도 성공된 상태이고, 현재 인간을 대상으로 하는 복제배아 줄기세포는 성공했다는 보고가 있었기도 했지만 아직 과학계에서 인정받지는 못한 상태이며(사이언스 2004에 게재 후 취소 상태),

[0048] 따라서 현재 여러 과학자들이 이를 연구 중에 있다. 수정란 배아 줄기세포나 복제배아 줄기세포의 윤리 문제를 회피할 수 있는 처녀생식 배아 줄기세포는 이미 인간을 대상으로 하는 처녀생식 배아 줄기세포 주가 성공된바 있다. 하지만 수정란 배아 줄기세포이던, 복제 배아 줄기세포이던, 처녀생식 배아 줄기세포이던 인간의 치료에 사용하기 위해서는 난자를 사용해야 한다는 난자 윤리 문제도 가지는 단점이 있었다.

[0049] 배아 파괴에 따른 생명 윤리와 난자 사용에 따른 난자 윤리 문제를 극복할 수 있는 새로운 방법으로써 체세포를 역 분화시켜서 만들어지는 유도 만능 줄기세포가 제안되고 있다.(cell, 2007. 11. Shinya Yamanaka, Science.2007 11. James A. Thomson)

[0050] 세포 분화다능성의 유도는 ESCs의 확립(Evans, M. J. & Kaufman, M. H. *Nature* 292, 154-156 (1981); Gardner, R. L. & Rossant, J. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 52, 141-152 (1979)) 또는 교차분화 인자의 투입을 통한 체세포의 교차분화(Takahashi, K. & Yamanaka, S. *Cell* 126, 663-676 (2006))에 의하여 이루어진다. 비록 ESCs 및 EpiSCs 모두는 다능성을 나타내지만 ESC와 다르게 EpiSCs는 테라토마를 용이하게 형성하지만 키메라는 거의 형성하지 아니한다(Brons, I. G. *et al. Nature* 448, 191-195 (2007); Tesar, P. J. *et al. Nature* 448, 196-199 (2007)). 따라서 ESCs의 분화다능성 상태(pluripotent state)를 'naive'로 명명하고, EpiSCs의 것을 'primed'로 명명한다(Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487-492 (2009)). 전사인자 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*의 트랜스덕션을 통한 체세포의 직접 교차분화에 의한 성숙도가 높은(primed) 다능성의 확립은 현재까지 알려지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0051] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 체세포로부터 유도 배반엽 상피 줄기세포(induced EpiSCs;iEpiSCs)의 직접 교차분화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0052] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 체세포를 *Oct-4*, *Sox2*, *c-Myc*, 및 *Klf4*를 처리하고, 염기성섬유아 세포생장인자(bFGF), 액티빈(Activin), 및 백혈병 억제인자(LIF)에 대한 항체로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 처리하는 단계를 포함하는 체세포로부터 유도 배반엽 상피 줄기세포(induced EpiSCs;iEpiSCs)의 직접 교차분화 방법을 제공한다.

[0053] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0054] 또 본 발명은 *Oct-4*, *Sox2*, *c-Myc*, 및 *Klf4* 유전자;와

[0055] 염기성섬유아세포생장인자(bFGF), 액티빈(Activin), 및 백혈병 억제인자(LIF)에 대한 항체로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 체세포로부터 유도 배반엽 상피 줄기세포(induced EpiSCs;iEpiSCs)의 직접 교차분화용 조성물을 제공한다.

[0056] 이하 본 발명을 설명한다.

[0057] 착상 후 배아로부터 유래한 배반엽 상피 줄기세포(Epiblast stem cells;EpiSCs)는 분화다능성(pluripotent)이고 테라토마 어세이에서 모두 3개의 배엽층이 생기게 할 수 있다(Brons, I. G. *et al. Nature* 448, 191-195 (2007); Tesar, P. J. *et al. Nature* 448, 196-199 (2007)). 체세포로 네 전사 인자 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*의 투입은 배아줄기세포와 매우 유사한 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells;iPSCs)을 생성하는 것을 나타내었다. 그러나 이들 전사인자들을 사용한 체세포의 직접교차분화(direct reprogramming)에 의한 EpiSCs의 생성은 아직 알려지지 않았다.

- [0058] 본 발명에서 본 발명자들은 이들 전사인자들을 EpiSC 배양 조건 하에서 직접적으로 유도 배반엽 상피 줄기 세포(induced EpiSCs; iEpiSCs)를 생성할 수 있는데 사용될 수 있다는 것을 입증하였다. iEpiSCs는 형태, 유전자 발현패턴, 후생유전적 상태(epigenetic status) 및 키메라 형성능에서 배반엽 상피 줄기세포와 닮았다. 본 발명은 전사인자 매개된 교차분화에서 배양 환경이 교차분화된 세포의 운명을 결정한다는 것을 나타낸다.
- [0059] 따라서 본 발명자들은 단순히 배양 조건을 변화시켜서 직접적으로 교차분화된 세포의 아이덴티티(identity)를 만드는 것이 가능하다고 생각된다.
- [0060] *Klf4* 는 EpiSCs에서 매우 약하게 발현되기 때문에, 본 발명자들은 *Klf4*가 아니라 *Oct4*, *Sox2*, 및 *c-Myc*를 발현하는 레트로바이러스로 세포의 감염은 EpiSC-유사 세포의 생성을 야기할 수 있을 것이라 가설하였다. 그 세 인자들로 약 3주의 교차분화 후, 본 발명자들은 콜로니 형성 세포를 얻었고, 그것의 약 5%는 홀마크 마우스 ESC 마커인 SSEA-1에 대하여 양성이었다(도 5a). 그러나 본 발명자들은 *Klf4* 부존재하에서는 진짜(*bona fide*) ESCs 또는 EpiSC-유사 세포를 확립하는데 실패하였고, 이것은 *Klf4*가 *Oct4* 및 *Sox2*와 협동하여 다운스트림 다능성 조절자의 활성화를 시작한다는 것을 예측한다. 따라서 본 발명자들은 다음으로 EpiSC-유사 iPSCs가 네 인자 모두를 발현하는 레트로바이러스로 세포의 감염 및 조건화된 배지에서 배양의 수반에 의하여 생성될 수 있는지를 조사하였다(도 5b). 본 발명자들은 GOF18ΔPE 마우스16으로부터 유래한 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts ;MEFs)를 사용하였고, 거기에는 GFP 전이유전자(transgene)가 *Oct4* 원거리 인핸서(distal enhancer)에 의해 구동된다.
- [0061] 본 발명자들은 MEFs를 ESC 배지(ESM)에서 배양할 때, *Oct4*-GFP-양성 ESC-유사 콜로니가 형성된다는 것을 발견하였다(도 1a). 반대로, MEFs를 조건화 배지에서 배양할 때, ESCs 또는 iPSCs의 형태와는 다른 EpiSCs의 형태와 유사한 형태를 가지는 iPSC 콜로니가 형성되었다(도 5c). 흥미롭게도, ESM에서 성장시킨 세포와 비교하면 심지어 초기 시간에 조건화된 배지 조건에서 더 많은 콜로니가 형성되었다(도 6a).
- [0062] 또한, bFGF(basic fibroblast growth factor)로 보충은 MEFs의 증식을 증가시켜 iPSC 생성 효율을 크게 증가시켰다(도 6d, e). EpiSCs의 특징은 *Oct4*-GFP 리포터(GOF18ΔPE)의 사이렌싱(silencing)이다. 그러나 모든 EpiSC-유사 iPSC 콜로니는 심지어 LIF활성을 중화하기 위하여 첨가된 LIF(leukaemia inhibitory factor) 항체의 존재하에서도 콜로니의 중심부에 *Oct4*-GFP-양성 세포 클러스터를 가졌다(도 5d).
- [0063] 이것은 EpiSC-유사 iPSC 콜로니가 아마 *Oct4*-GFP-양성 ESC-유사 iPSCs로부터 간접적으로 생성된다는 것을 나타내었다. As MEFs가 배지의 조건화 동안에 내생적 LIF를 생성할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 다음으로 ESC-유사 iPSCs의 형성을 억제하기 위하여 더 엄격한 조건, 즉 화학적으로 정의된 배지(CDM; FGF2, Activin A, 및 LIF 항체를 함유)를 사용하였다. 이들 조건 하에서, *Oct4*-GFP-양성 세포들이 iPSC-생성 전체 과정 동안에 형성되지 않았다(도 1b). 조건화된 배지와 대조적으로, ESM와 비교할 때 CDM에서 세포를 배양할 때 콜로니들이 거의 관찰되지 않았고, CDM에서 성숙한 EpiSC-유사 콜로니의 형성이 ESM에서 iPSC콜로니의 약 1-2와 비교하여 약 3-5주 가량 소요되었다(비록 형태적 변화가 ESM에서 보다는 CDM에서 더 일찍 관찰되지만;도 6f, g).
- [0064] 따라서 본 발명의 데이터는 비록 EpiSCs가 발생학적으로 체세포와 더 밀접하지만 EpiSC 운명(fate)의 획득은 ESC 운명의 획득보다 더 느리다는 것을 제한한다. EpiSCs는 인간 ESCs 또는 iPSCs와 많은 특성을 공유하고, 인간 섬유아세포는 마우스 섬유아세포에 비하여 다능성 상태를 달성하기 위하여 일반적으로 더 긴 시간을 요한다. 따라서, EpiSC-유사 iPSCs를 생성의 더 느린 과정은 EpiSC-유사 iPSCs는 인간 iPSCs와 유사하고 EpiSC-유사 iPSCs로 교차분화 과정은 더 많은 시간을 요한다는 것을 나타낸다.
- [0065] 콜로니의 출현 직후, 벌크 배양의 유전자 발현 패턴을 결정하였다. 이 배양은 ESC-특이적인 *Oct4*-GFP 발현의 완전한 부존재에 의하여 예시된(도 1b) 전체 EpiSC-특이적인 유전자 발현 패턴을 보였다(도 7a). 이것은 CDM에서 배양된 세포인 EpiSC-유사 iPSCs(유도 EpiSCs; iEpiSCs로 명명된)는 ESC-유사 중간체를 통하지 아니하고 직접적으로 MEFs로부터 형성된다는 것을 암시한다. CDM에서 *Oct4*-GFP-양성 세포의 부존재는 형광-활성화된 세포 분류(FACS;도 7b)에 의하여 확인하였다. 본 발명자들은 LIF 항체 없는 CDM에서 배양된 세포로부터(전체 다른 세 실험으로부터) 수백개의 콜로니 중 하나의 *Oct4*-GFP-양성 콜로니를 관찰하였고 이것은 LIF 활성의 저해가 iEpiSCs의 형성에 유리할 수 있다는 것을 나타낸다(데이터 도시 안함).
- [0066] CDM에서 배양된 세포로부터 양성 *Oct4*-GFP 신호의 부존재는 iEpiSCs가 일시적인 ESC-유사 iPSC 군의 분화에 의하여 생성될 수 있다는 가능성을 확실하게 배제하지 않았다. 따라서, iEpiSCs가 직접적인 교차분화를 통하여 생성되었다는 것을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 GFP 전이유전자(transgene)을 운반하는 X염색체를 함

유한 세포를 사용한 X-GTP 리포터 시스템을 사용하였다(도 7c).

[0067] 본 발명자들은 FACS에 의하여 X-GFP-음성 MEFs를 분리한 후 세포 교차분화를 유도하였다. naive 다능성의 유도는 X-염색체 재활성화(reactivation)을 야기하기 때문에, 본 발명자들은 만약 iEpiSCs가 ESC-유사 iPSCs로부터 간접적으로 유래된다면, 본 발명자들은 심지어 EpiSC 상태로 전환된 후에도 약 절반의 군에서 GFP 발현의 유지를 가지는 X-GFP의 재활성화를 관찰할 수 있다고 가정하였다(도 7c). ESM에서 배양된 거의 모든 iPSC 콜로니들은 네 전사인자로 트랜스덕션 2-3주 후 GFP에 대해서 양성인 반면, CDM에서 배양된 세포로부터는 GFP-양성 콜로니는 관찰되지 않았다(도 1c). GFP-양성 세포의 부존재는 FACS에 의하여 검증하였다(도 1d).

[0068] 이상의 결과로부터, 본 발명의 결과는 iEpiSCs는 *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* 및 *Klf4*로 세포의 트랜스덕션하고 세포들을 엄격한 EpiSC 배양 조건하에서 배양을 통해서 MEFs로부터 직접적으로 교차분화할 수 있다는 것을 나타낸다. 이들 조건 하에서 그 세포들은 일시적인 ESC-유사 중간체를 거쳐야하는 것이 아니었다. 중요하게도 iEpiSCs는 성체 섬유아세포로부터 생성될 수 있다(도 8).

[0069] iEpiSCs의 상세한 특성화는 그들이 EpiSC-유사 세포를 나타낸다 것을 나타내었다. iEpiSCs는 형태적으로 EpiSCs와 구별되지 않았지만 행태적으로 ESC-유사 iPSCs와 명백하게 차이가 있었다(도 1e). iEpiSCs는 매우 약한 alkaline phosphatase 활성을 나타내었지만, *Oct4*, *Sox2* 및 *Nanog*를 발현하였다(도 1f, g). *Nanog* 및 *Sox2*의 수준은 iPSCs와 비교하면 iEpiSCs에서 약간 낮다(도 1g). iEpiSCs의 전체 유전자 발현 프로파일은 독립적으로 유래된 EpiSCs의 것과 거의 동일하나, MEFs 및 ESCs의 것과는 다르다(도 2a, b 및 도 9a). 독립적으로 유래된 EpiSC 라인에서 차별적 유전자 발현 범위 내인 대략 750-850 유전자들이 iEpiSCs 및 EpiSCs에서 차별적으로 발현되었다는 것을 발견하였다(도 2c 및 도 9b). iEpiSCs는 EpiSCs의 것과 유사한 후성적 표시(EpiSCs에서와 같이 *Oct4-GFP* 전이유전자 및 *Stella* gene유전자 모두 완전하게 메틸화)를 가졌다(도 2d). iEpiSCs는 테라토마를 용이하게 형성할 수 있었고 모두 세 개의 배엽층으로 분화를 명확하게 나타내었다(도 2e 및 도 10a, b). 키메라 기여(chimaeric contribution)에 대한 불능이 EpiSCs의 표시이기 때문에, 본 발명자들은 이것이 iEpiSCs에도 적용되는지를 조사하였다. 비록 일부 iEpiSCs가 상실배 응집(morula aggregation)에 내부 세포괴(inner cell mass; ICM)로 통합될 수 있지만, 재구축된 배아 중 *LacZ* 염색의 분포 및 GFP PCR에 의하여 확인된 것과 같이 키메라 기여를 가지는 것은 없었다(iEpiSCs는 *LacZ*에 대하여 강하게 양성 염색; 도 2f, g). 이들 결과들은 iEpiSCs가 형태, 유전자 발현 패턴, 후성적 특징 및 기능적 다능성에서 EpiSCs를 닮았다는 것을 나타낸다.

[0070] EpiSCs는 naive 다능성을 가지는ESC-유사 상태로 복귀할 수 있는 능력을 가진다. 이것은EpiSCs에서 발현되지 않는 주된 전사인자를 투여하거나 배양 조건을 변화시켜서 달성될 수 있다. 본 발명자들은 미토젠-활성화된 protein kinase 신호전달 및 글리코겐 synthase kinase-3 (GSK3)의 듀얼 저해를 가지며, 또한 LIF (2i + LIF)를 함유하는 ESC 배지에서 세포를 배양하였지만, 이것은 iEpiSCs의 복귀(reversion)을 유도하는데 충분하지 않았다(데이터 도시 안함). 다음으로, 본 발명자들은 2A 펩타이드 및 Td-Tomato를 코딩하는 서열을 가지는 *Klf4*인-프레임을 함유하는 벡터로 세포를 트랜스덕션시켜서 *Klf4*를 과발현시켰다. 2i + LIF를 가지는 배지에서 이들 세포의 배양은 iEpiSCs의 ESC-유사 상태로 효과적인 복귀를 야기하였다(도 3a, 상단 및 도 10c). 그 복귀된 세포들(iEpiSC-R)은 전형적인 ES 세포 배지에서 유지될 수 없었으나, 2i + LIF를 가지는 배지에서는 안정적이었다(도 3b, 상단). 본 발명자들은 Cre의 과발현에 의하여 iEpiSC-Rs로부터 *loxP*-flanked *Klf4*-2A-Tomato를 제거하는 것을 시도하였다. 효과적인 *Klf4* 제거를 위하여, 본 발명자들은 Td-Tomato 발현(Tomato 발현은 사진 과노출로만 검출될 수 있어 적은 수의 카피라는 것을 나타냄; 도 3a)을 나타내는 EpiSC-R 라인을 선택해서 이들 세포를 Cre를 코딩하는 lentiviral 벡터로 트랜스덕션하였다. 일부의 그 결과인 iEpiSC-R 라인(iEpiSC-RC)은 Tomato 발현의 완전한 상실을 나타내었다(도 3c). Tomato 발현의 부존재는 FACS (도 3d) 및 역전사 효소 PCR (RT-PCR; 도 10d)에 의하여 확인하였다. 그러나, iEpiSC-RC 세포들은 콤팩트 형태 및 *Oct4*-GFP 발현의 손실이 없이 2i+LIF를 가지는 배지에서 안정되게 유지될 수 있었다(도 3b 하단, c). iEpiSC-RC 세포는 심지어 *Klf4* 전이유전자 제거후에도 ESC-특이적인 유전자 발현(도 3f) 및 정상 핵형을 가지는 후성적 마커(도 3e) 를 유지하였다(도 10e). 상실배 응집에서, iEpiSC-RC 세포는 ICM으로 효과적으로 통합되어 효율적인 체세포 및 생식계열(germline) 기여를 나타내었다(도 3g, h 및 도 10f). 따라서, EpiSCs와 유사하게 iEpiSCs는 naive 다능성 상태로 복귀될 수 있다. 그러나 그 복귀는 부가적인 lentiviral *Klf4*의 존재 하에서만 관찰; 본 발명자들은 iEpiSCs의 생성을 위해서 이미 retroviral *Klf4*를 소개한 것을 참고)되었다. 따라서 다음으로 본 발명자들은 iEpiSCs에서 레트로바이러스 전이유전자의 발현을 분석하기 위하여 정량적인 RT-PCR (qRT-PCR)를 수행하였다. 비록 *Oct4*, *Sox2*, 및 *c-Myc*를 코딩하는 전이유전자가 iEpiSCs에서 완전하게 사일러스되었지만, 본 발명자들은 심지어 많은 계대 후 여전히 낮은 수준의 *Klf4* 발현이 관찰될 수 있었다(도 10g). 이들 데이터는 iEpiSCs에서 잔류 *Klf4* 레벨이 부가적인 *Klf4* 투여없이 iEpiSCs의 ESC-유사 상태로 복귀를 지시

할 수 없으므로 일정 수준의 *Klf4* 이 ESC-유사 상태로 복귀에 절대적일 수 있다는 것을 암시한다. iEpiSCs가 ESC-유사 상태로 2i+LIF 배지 기반된 복귀에 불응(refractory)하는 이유를 알기 위해서, 본 발명자들은 두 독립적인 EpiSC 라인 및 iEpiSCs에서 마커 유전자의 발현 레벨을 비교하였다.

[0071] 유전자 *Dkk1*, *Gata6*, *Sox17* 및 *Cer1*이 EpiSCs의 마커이고, ESCs에서는 발현되지 않는다고 알려졌다. 그러나 이들 유전자들은 중내배엽(mesendodermal) 유도와 기능적으로 관련이 있다고도 알려졌다. 사실, 본 발명자들은 이들 유전자 및 다른 중내배엽 마커들이 iEpiSCs에서 상당한 수준으로 발현되는 것을 발견하였다. 그러나 iEpiSCs에서 레벨은 동일한 조건 하에서 배양된 E3 EpiSCs 및 T9 EpiSCs 모두와 비교하였을 때 현저하게 더 높았다. 흥미롭게도, iEpiSCs에서 중내배엽 유전자들의 발현은 ESC-유사 상태로 세포의 2i+LIF-기반된 가역성과 네가티브적으로 상관관계를 나타내었다(도 4a). 이들 상관관계 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 본 발명의 iEpiSCs가 EpiSC 라인과 비교하여 다소 늦은 발생학적 단계의 세포에 해당하고 그것은 단지 엄격한 배지를 사용하여 용이하게 ESC-유사 상태로 복귀시킬 수 있다는 결론을 얻었다. 본 발명자들은 유전자 발현 및 복귀 능력에서의 그러한 차이는 다른 연구실로부터 유래한 독립적인 EpiSC 라인에서도 관찰될 수 있고 따라서 ESC-유사 상태로 복귀되어지는 일부 라인에 대한 추가적인 유전자 조작의 필요성이 설명된다는 것을 추측한다.

발명의 효과

[0072] 본 발명은 전사인자의 발현에 의하여 ESCs이외에 다른 줄기세포로 섬유아세포의 직접 전환을 기재한다. 따라서 직접 교차분화에서, 그 교차분화된 세포의 운명은 상당히 유동적으로 나타난다. 그러나, 네 인자 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*을 사용하여 본 발명은 직접 교차분화는 naive 또는 primed 다능성 상태를 야기하고, 그것의 결과는 배양조건에 의하여 지시될 수 있다는 것을 제안한다(도 4b). 이 결과는 이들 두 다능성 상태는 동등하게 '유효(valid)'하고 안정적이라는 가설을 지지할 수 있다. iEpiSCs에서 ESC-유사 iPSCs로의 추후 복귀는 교차분화 동안 EpiSC 배양 조건의 적용이 primed 상태에서 세포를 '정지(arrest)'하는 작용한다는 것을 예상한다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 섬유아세포의 iEpiSCs로 직접 교차분화를 나타낸 그림. (a, b) GOF18 ΔPE 섬유아세포로부터 iEpiSCs의 생성을 나타냄. 세포를 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*을 발현하는 레트로바이러스로 감염시켜서, ESM에서 배양하여 iPSC 콜로니를 형성(a)하거나 CDM에서 배양하여 iEpiSC 콜로니를 형성(b). 좌측 및 우측, 명시야(brightfield) 현미경 이미지; 중앙, 형광 현미경 이미지. (c) X-GFP 섬유아세포로부터 iEpiSCs의 생성. GFP를 발현하지 않는 X-GFP 섬유아세포는 FACS에 의하여 분리되고, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*을 발현하는 레트로바이러스로 감염시켜서, ESM(좌) 또는 CDM(우측)에서 배양하였다. 상단, 명시야 현미경 이미지; 하단, 형광 현미경 이미지. (d) c에서와 같이 처리된 세포에서 GFP의 FACS 분석. GFP-양성 세포는 CDM 내 iEpiSCs(좌측) 및 ESM 내에서 iPSCs(우측)로부터 FACS-분류되었다. SSC-A; side scatter area). (e) iEpiSCs는 EpiSCs와 같은 형태를 나타냄. 명시야 현미경에 의하여 평가된 iPSCs(좌측), iEpiSCs(중앙), 및 EpiSCs(우측)의 형태. (f) EpiSCs, iEpiSCs 및 iPSCs를 alkaline phosphatase 활성에 대해 측정. (g) *Oct4*, *Sox2* 및 *Nanog*에 대한 항체를 사용하여 iEpiSCs, EpiSCs 및 iPSCs의 면역형광 현미경 이미지를 나타냄. 스케일 바, 100 μm.

도 2는 iEpiSCs의 특성을 나타내는 그림. (a) MEFs, ESCs, EpiSCs, 네 iEpiSC 라인, iEpiSC-Rs 및 Cre recombinase를 과발현하는 두 iEpiSC-R 라인(iEpiSC-RCs)에서 전체 유전자 발현 패턴을 나타내는 마이크로어레이 데이터로부터 온 히트 맵(Heat map). 상단에서 색깔 바는 log2 스케일에서 유전자 발현을 나타냄. 적색 및 청색은 각각 더 높고 더 낮은 유전자 발현을 나타냄. (b) a에서 유전자 발현 프로파일에 기반한 세포주의 계통도 클러스터링. (c) ESCs(상단) 및 T9 EpiSCs(하단)을 가지는 두 iEpiSC 라인(iEpiSC C1 및 iEpiSC L7)의 전체 유전자 발현 프로파일의 산포도 비교. 검은 선은 유전자 발현에서 2배 차이의 경계를 나타낸다. 다능성 및 상배엽(epiblast) 마커들을 오렌지로 나타냄. 우측에 바는 산포 밀도를 나타냄; 산포 밀도가 더 높을수록, 청색이 더 진해짐. 유전자 발현 수준은 log2 스케일에 대해서 묘사. 차별적으로 발현된 유전자들의 수를 각 산포도 하에서 나타냄. (d) iEpiSCs에서 내생적 *Oct4*, *Oct4-GFP*, *Nanog* 및 *Stella* 유전자의 프로모터 부위를 bisulphite 시퀀싱 PCR에 의하여 분석. Open 및 filled 서클은 각각 비메틸화 및 메틸화된 CpGs를 나타냄. (e) 테라토마. iEpiSCs (1×10^6 세포)를 SCID 마우스에 피하주사하였다. 모두 삼배엽으로 주사된

iEpiSCs의 분화를 haematoxylin 및 eosin 염색의 현미경 분석에 의하여 평가하였다. (f) iEpiSCs의 키메라 기여를 embryonic day (E)12.5에서 태아의 *LacZ* 염색에 의하여 평가하였다. (g) GOF18ΔPE/Rosa26 더블 형질전환 마우스로부터 분리된 iEpiSCs는 *LacZ*-양성이었다. 스케일 바, 100 μm.

도 3는 iEpiSCs에서 naive 다능성의 유도를 나타낸 그림. (a) 상단: iEpiSCs를 *Klf4*-2A-Td-Tomato (*Klf4*의 과발현을 야기; Tomato high)를 함유하는 벡터로 트랜스덕션시키고 2i + LIF를 가지는 ESC 배지에서 배양하여, iEpiSCs의 복귀를 야기(GFP high). 하단: GFP를 발현하나, 낮은 Tomato 발현을 가지는(적은 수의 바이러스 삽입을 나타냄) 세포를 Cre-매개된 *Klf4* 제거(excision)에 대하여 분류. Tomato의 약한 발현은 단지 사진 과노출에서만 검출가능(삽도). (b) 형태 및 alkaline phosphatase 활성에 의하여 결정된 것과 같이, iEpiSC-Rs 및 iEpiSC-RCs 모두 2i + LIF 배지에서는 안정적으로 유지되나, LIF-유일 배지에서는 그러하지 않음. (c) 완전한 Tomato 발현의 결손을 가지는 세포를 나타내는 Cre recombinase를 과발현하는 iEpiSC-Rs(iEpiSC-RCs)의 현미경 이미지. (d) iEpiSC-RCs (좌측) 및 iEpiSC-Rs (우측)에서 Td-Tomato 및 GFP 발현의 FACS분석. (e) iEpiSC-RCs에서 내생적 *Oct4*, *Oct4*-GFP, *Nanog* 및 *Stella* 유전자의 프로모터 부위를 시퀀싱 PCR에 의하여 분석하였다. Open 및 filled 서클은 각각 비메틸화 및 메틸화된 CpGs를 나타냄. (f) ESCs를 가지는 iEpiSC-Rs (좌측) 또는 iEpiSC-RCs (중앙), 및 iEpiSC-RCs를 가지는 ESC(우측)를 비교하는 전체 유전자 발현 프로파일의 산포도, iEpiSC-RCs (middle) 검은 선은 유전자 발현에서 2-배 차이의 경계를 나타낸다. 다능성 및 상배엽(epiblast) 마커들을 오렌지로 나타냄. 우측에 바는 산포 밀도를 나타냄; 산포 밀도가 더 높을수록, 청색이 더 진해짐. 유전자 발현 수준은 log2 스케일에 대해서 묘사. 차별적으로 발현된 유전자들의 수를 각 산포도 하에서 나타냄. (g) iEpiSC-RCs는 용이하게 키메라에 기여할 수 있다는 것을 보여주는 그림. E13.5 태아(좌측) 및 어덜트 마우스(우측)에서 체세포 기여를 *LacZ* 염색의 분포에 의하여 확인하였고 각각 코트 칼라에 의하여 나타냄. (h) E13.5 배아의 생식샘에서 *Oct4*-GFP의 발현에 의하여 나타낸 것과 같이 iEpiSC-RCs의 생식선 기여. 스케일 바, 100 μm.

도 4는 배양 조건에 의존하는 섬유아세포에서 4 인자들이 naive 또는 primed 다능성 상태를 유도한다는 것을 나타내는 그림. (a) 두 EpiSC 라인 및 두 iEpiSC 라인에서 마커 유전자들의 발현 레벨. 중내배엽 유전자들의 발현 수준과 ESC-유사 상태에 대한 배지-기반 가역성 사이에 역 상관관계를 주목. 데이터는 마이크로어레이 교잡으로부터 얻었다. 모든 세포들은 동일한 배양 조건에서 성장시킴(MEF 상 CDM). 데이터는 평균 ± s.e.m. (에러 바는 각 어레이 상 복제 어레이 스팟 사이에 변수). (b) 섬유아세포에서 naive 다능성을 유도할 수 있는 4 인자 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*은 또 특정 배양 조건(LIF 활성의 저해를 가지는 Activin A 및 bFGF의 존재하에서 iEpiSCs 및 LIF/STAT3 경로 하에서 iPSCs) 하에서 섬유아세포에서 primed 다능성을 유도할 수 있다. primed 다능성은 4 인자들에 의하여 섬유아세포로부터 달성되고 EpiSC 조건은 2i의 존재하에서 *Klf4* 과발현에 의하여 naive 다능성 상태로 더 교차분화될 수 있다.

도 5는 CM에서 iPSCs의 생성을 나타낸 그림. a. iPSCs는 *Klf4*없이 달성되지 않음. MEFs는 형질전환 효과를 나타냈고 심지어 일부는 콜로니-유사 구조를 형성함. SSEA-1-양성 세포(5%)의 존재에도 불구하고, iPSCs는 이 클로스터로부터 달성되지 않음. b. 실험 디자인의 도식적인 설명. GOF18ΔPE/Rosa26 더블 형질전환 마우스로부터 온 MEF를 4 전사 인자 *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, 및 *Klf4*.로 감염시킨 후 MEFs를 LIF 항체의 부존재 또는 존재 하에서 ESM, CM, 및 CDM에서 배양함. c. CM에서 4-인자 iPSC의 형태. d. CM 조건에서 iPSCs에서 *Oct4*-GFP (GOF18ΔPE) 발현 및 형태. Both 4- 및 3-인자(즉 *c-Myc*을 뺀)-처리된 iPSCs는 EpiSC-유사 형태를 보이지만, 심지어 LIF 항체의 존재하에서도 CM에서 거의 모든 콜로니들이 콜로니의 중앙에 *Oct4*-GFP-양성 세포 클러스터를 가졌다. 모든 스케일 바, 100 μm.

도 6은 다른 배양 조건에서 iPSC 생성의 효율의 비교 그림. a. ESM과 비교하여 CM 조건에서 더 많은 iPSC 콜로니를 얻었다. ESM 및 CM 모두에서 초기 iPSC 콜로니들의 수를 바이러스 감염 2 주 후에 카운트하였다. b. bFGF로 처리는 iPSC 콜로니 출현의 개수를 감소시킴. c. Alkaline phosphatase (AP)-양성 초기 iPSCs는 다른 조건: ESM 및 ESM plus bFGF 하에서 얻었다. 더 많은 수의 AP-양성 콜로니들을 ESM과 비교하여 ESM plus bFGF에서 얻었다. d. bFGF의 존재하에서 *Oct4*-GFP MEFs의 교차분화 효율을 나타냄. ESM 및 ESM plus bFGF에서 *Oct4*-GFP-양성 세포를 FACS로 측정함. 약 6-배 이상의 수의 *Oct4*-GFP-양성 세포들을 bFGF가 공급된 ESM에서 얻었다. e. bFGF 공급은 MEFs의 증식을 증가시켜서 iPSC생성의 효율을 증가시킴. 다른 조건(ESM 및 ESM plus bFGF)으로부터 온 4 인자 처리된 MEFs의 전체 수는 바이러스 감염 5일 후 FACS에 의하여 측정하였다. f. iPSC 콜로니는 ESM과 비교하여 CDM에서 덜 효과적이고 더 늦은 형태로 형성되었다. 더 적은 수의 iPSC 콜로니가 ESM과 비교하여 CDM에서 생성됨. ESM 및 CDM 모두에서 초기 iPSC 콜로니의 수를 각각 바이러스 감염 3주 및 5주에서 카운트하였다. g. 형태적 변화는 ESM과 비교하여 CDM에서 더 초기에 일어남. 바이러스 감염 6일 후, ESM에서가 아니라 CDM에서 MEFs는 형태적 변화가 용이하게 관찰됨. 이것은 bFGF의 존재에 의해서 설명될 수

있음; 유사한 초기 변화가 ESM과 비교하여 CM에서 관찰됨(데이터 도시 안함). 모든 스케일 바, 100 μ m.

도 7은 초기 iEpiSCs의 특성을 나타낸 그림. **a.** CDM \pm LIF Ab에서 초기 iEpiSCs의 유전자 발현 패턴. CDM \pm LIF Ab에서 초기 iEpiSCs에서 EpiSC 마커 *Fgf5* 및 *Klf4*, *Rex1*, 및 *Esrrb*와 같은 ESC 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 ESC에서의 것들과 비교하였다. 모든 데이터를 Bact 발현으로 표준화하고 대조군 EpiSCs에 조정하였다, 그것의 발현을 모든 유전자에 대해서 1로 셋팅하였다. **b.** iEpiSCs는 *Oct4*-GFP-양성 세포가 아니다. FACS 분석은 iEpiSC 군에서 *Oct4*-GFP-양성 세포의 부존재를 보인다. **c.** X-GFP 리포터 시스템을 사용한 교차분화 전략의 도식적인 설명. 이중 X^{GFP}/X MEFs 세포를 준비하였다. 랜덤 X 염색체 비활성화로 인하여, female X-GFP MEFs는 GFP-양성 및 -음성 세포의 혼합물을 포함한다. GFP-음성 MEFs를 일련의 FACS 분류에 의하여 수집하고, 4-인자 처리 후 ESM 또는 CDM에서 배양하였다. GFP 발현을 형광 현미경 하에서 매일 모니터링하였고, 그 결과물 iPSCs 또는 iEpiSCs를 GFP-양성 세포의 존재 또는 부존재를 결정하기 위하여 FACS-분류하였다.

도 8은 어덜트 섬유아세포로부터 iEpiSCs의 생성 및 특성을 나타낸 그림. **a.** 어덜트 섬유아세포로부터 생성된 iEpiSCs의 형태는 GOF18 Δ PE 마우스의 꼬리 끝으로부터 얻었다. **b.** 어덜트 섬유아세포로부터 온 iEpiSCs는 MEF에서 온 iEpiSCs와 같이 AP에 약 양성임. **c.** 어덜트 섬유아세포로부터 온 iEpiSCs에서 *Oct4*, *Sox2*, 및 *Nanog*에 대한 면역염색. 모든 스케일 바, 100 μ m. **d.** 어덜트 섬유아세포로부터 온 iEpiSCs에서 *Oct4*-GFP 및 *Stella* 유전자의 프로모터 부위는 MEF에서 온 iEpiSCs와 EpiSCs와 같이 많이 메틸화됨.

도 9는 EpiSCs 및 iEpiSCs의 전체 유전자 발현 분석. **a.** MEFs, ESCs, EpiSCs, 네 iEpiSC 라인에서 recombinase를 과발현하는 두 iEpiSC-R 라인(iEpiSC-RCs)에서 전체 유전자 발현 패턴을 나타내는 마이크로어레이 데이터로부터 온 히트 맵(Heat map). 상단에서 색깔 바는 log2 스케일에서 유전자 발현을 나타냄. 적색 및 청색은 각각 더 높고 더 낮은 유전자 발현을 나타냄. ESC 및 EpiSC 마커 유전자들의 발현 수준을 보여주는 히트 맵. **b.** 독립적으로 추출된 EpiSC 라인에서 차이를 보여주는 산포도(Scatter plot). 차별적으로 발현된 유전자들을 각 산포도 하에서 나타냄.

도 10은 iEpiSCs의 특성을 나타낸 그림. **a.** 6 라인의 iEpiSCs를 SCID 마우스에 주사하였고 모든 라인은 테라토마를 형성하였다. **b.** iEpiSCs로 생성된 모든 테라토마 절편으로부터 온 이미지. 그 이미지들은 테라토마 절편에서 다중 조직의 존재를 보여줌. **c.** 2i+LIF에 과발현된 *Klf4*의 첨가에 의한 iEpiSCs에서 ESC-유사 세포로의 복귀. 2i+LIF에서 4일 후 iEpiSCs (좌측) 및 대조군 EpiSCs (우측)로부터 온 복귀된 세포의 형태. 스케일 바, 100 μ m. **d.** iEpiSC-RCs에서 토마토 발현의 부존재. Tomato 발현의 부존재를 RT-PCR에 의하여 확인함. OG2 ESCs 및 iEpiSC-Rs를 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용. Tomato 발현은 iEpiSC-RC 라인 1에서 검출되지 않음. **e.** iEpiSC-RCs는 정상 핵형을 보임. 두 라인의 iEpiSC-RCs를 전형적인 metaphase spread 프로토콜에 의하여 핵형을 분석하였다. 토마토 발현의 부존재를 보인 iEpiSC-RC1는 정상 핵형(100%)을 나타내었고, 60%의 iEpiSC-RC2는 정상 핵형을 나타내었다. **f.** iEpiSC-RCs의 ICM 삽입. iEpiSC-RCs는 ICM로 효과적으로 통합됨. 재구축된 배반포는 *Oct4*-GFP 발현을 보이나, Tomato 발현은 보이지 않음. **g.** iEpiSCs에서 4 인자 전이유전자의 상대적 발현. iEpiSCs에서 각 전이유전자의 발현 수준을 4 인자 감염된 MEFs와 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0075] 실시예 1:마우스 및 섬유아세포의 추출

[0076] 사용된 모든 마우스들은 Max Planck Institute (MPI)의 마우스 시설에서 교배되거나 사육되거나 Harlan 또는 Jackson laboratories로부터 구입하였다. 동물 취급은 MPI 동물 보호 가이드라인 및 독일 동물보호법에 따랐다. GOF18 Δ PE/Rosa26 섬유아세포는 GOF18 Δ PE 및 Rosa26 마우스의 이중교배로부터 제조되었고, X-GFP 섬유아세포는 X-GFP 이중 마우스들로부터 얻었다. 섬유아세포들은 E14.5로부터 추출되었고, 성체 섬유아세포들은 1-월령 마우스의 꼬리 끝으로부터 추출하였다.

[0077] 실시예 2:iPSCs 및 iEpiSCs의 생성

[0078] iPSCs 및 iEpiSCs를 생성하기 위하여, 양 GOF18 Δ PE (*Oct4*-GFP)/Rosa26 (Neomycin 및 *LacZ*) Rosa26 및 X-GFP 마우스로부터 온 섬유아세포(5×10^4 세포)를 전사인자들 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 및 *c-Myc*를 발현하는 pMX 벡터를 운반하는 레트로바이러스로 감염시켰다. 4 또는 3 인자들로 감염된 세포들을 표준 ESM, MEF-조건화된 배지, 또는 화학적으로 정의된 배지(CDM)에서 LIF 항체 (200 ng/ml, R&D systems)의 존재 또는 부존재하에서 48

시간 동안 배양하였다. 첫번째 성숙 콜로니를 관찰한 후, 양 iPSCs 및 iEpiSCs 모두를 feeder 세포 위로 옮겼다. MEF-조건화된 배지를 제조하기 위하여 조사된 MEFs를 cm^2 당 5×10^4 세포의 밀도로 시딩하였고, EpiSC 배지에서 24시간 배양하였다. 조건화된 배지를 여과하고, bFGF (10 ng /mL, PeproTech)를 첨가하였다. CDM은 0.05% bovine serum albumin (BSA) fraction V (Gibco-BRL), $1 \times$ 비필수 아미노산(Gibco-BRL), $1 \times$ penicillin/streptomycin/glutamine (Gibco-BRL), N2 및 B27 보충물(Gibco-BRL), bFGF (10 ng/ml, PeproTech), 및 Activin A (20 ng/ml, PeproTech)를 함유하였다. iEpiSCs를 계대하기 위하여, 콜로니들을 collagenase IV (Invitrogen)로 37 °C에서 20분간 처리하고 혈청-함유 배지로 세척하여서 수집하였다. 세포 덩어리를 조사된 feeders 상에 다시 플레이트하였고 배지는 24시간마다 바꾸었다.

[0079] 실시예 3:전체-지놈 발현 분석

[0080] 마이크로어레이 상에서 분석되어지는 RNA 샘플은 온-컬럼 DNA 소화를 가지는 QIAGEN RNeasy 컬럼을 사용하여 제조되었다. 총 RNA (샘플 당 500 ng)를 T7-링크된 이중 가닥 cDNA의 합성 및 12시간의 *in-vitro* 전사 incorporating 바이오틴 표지된 뉴클레오타이드가 관여하는 선형 증폭 프로토콜(Ambion)에서 인풋 RNA로 사용하였다. 정제 및 표지된 cRNA를 제조업자의 프로토콜에 따라서 18시간 동안 MouseRef-8 v2 발현 BeadChips (Illumina) 상에서 교잡하였다. 세척 후에, 칩들을 streptavidin-Cy3 (GE Healthcare)으로 염색하고 iScan 리더(Illumina) 및 관련 소프트웨어를 사용하여 스캐닝하였다. 샘플들을 생물학적 복제(replicate)로 교잡하였다. 그 비드 강도를 BeadStudio 3.2 (Illumina)를 사용하여 유전자 정보로 맵핑하고, 배경 보정을 Affymetrix Robust Multi-array Analysis (RMA) 백여 보정 모델을 사용하여 수행하였으며, 분산 안정화(variance stabilization)는 log2 스케일링을 사용하여 수행하였고, 유전자 발현 표준화는 R-Bioconductor의 lumi 패키지에서 고안된 quantile 방법을 사용하여 계산하였다. 데이터 후속 가공 및 그래픽은 Matlab에서 인 하우스로 개발된 함수를 사용하여 수행하였다. 유전자의 계통도 클러스터링은 원 마이너스 샘플 보정 미터법 및 UPGMA(unweighted pair-group method using average) 링키지 방법을 사용하여 수행되었다.

[0081] 실시예 4:Accession numbers

[0082] 마이크로어레이 결과는 accession number GSE21516를 가지고 GEO 데이터베이스에서 접근가능하다.

[0083] 실시예 5:DNA 메틸화 분석

[0084] iEpiSCs의 DNA 메틸화의 상태를 결정하기 위하여, 지놈 DNA를 제조업자의 지시에 따라서 EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN)를 사용하여, 모든 비메틸화된 사이토신 잔기를 우라실 잔기로 전환하기 위하여 sodium bisulphite를 처리하였다. 다음 선택된 모든 유전자 부위를 증폭하였다. 요약하면, PCR 증폭은 전체 25 μ l 부피에서 SuperTaq polymer-ase (Ambion)를 사용하여 수행되었고, 전체 40 사이클의 변성(94 °C, 30 s), 각 타겟 부위에서 적절한 온도로 30 s 동안 어닐링, 확장(72 °C, 30 s), 94 °C에서 5분간의 첫 번째 변성 및 72 °C에서 10분간의 최종 확장으로 구성되었다. 프라이머 서열 및 어닐링 온도는 다음과 같다: 내생적 *Oct4* 첫 번째 센스: 5'-TTTGTTTTTTATTATTATTAGGGG-3', 내생적 *Oct4* 첫 번째 안티센스: 5-ATCCCAATACCTCTAACCTAATC-3' (299 bp, 45 °C); 내생적 *Oct4* 두 번째 센스: 5' -GGGTTAGAGGTTAAGGTTAGAGG-3' , 내생적 *Oct4* 두 번째 안티센스: 5' -CCCCACCTAATAAAAAATAAAAAA-3' (161 bp, 55 °C); *Oct4-GFP* 첫 번째 센스: 5' -GTTTTTTTATTATTATTAGGGG-3' , *Oct4-GFP* 첫 번째 안티센스: 5' -AAATAAACTTCAAAATCAACTTACC-3' (334 bp, 45 °C); *Oct4-GFP* 두 번째 센스: 5' -GGGGTTAGAGGTTAAGGTTAGAGG-3' , *Oct4-GFP* 두 번째 안티센스: 5' -ACCAAAATAAACACCACCC-3' (216 bp, 55 °C); *Stella* 첫 번째 센스: 5' -TTTTTTTATTTTGTGATTAGGGTTG-3' , *Stella* 첫 번째 안티센스: 5' -CTTCACCTAAACTACCTTTAAAC-3' (161 bp, 45 °C); *Stella* 두 번째 센스: 5' -TTTGTTTTAGTTTTTTGGAATTGG-3' , *Stella* 두 번째 안티센스: 5' -CTTCACCTAAACTACCTTTAAAC-3' (116 bp, 55 °C); *Nanog* 첫 번째 센스: 5' - TTTGTAGGTGGGATTAATTGTGAA-3' , *Nanog* 첫 번째 안티센스: 5' -AAAAAATTTTAAACAACAACCAAAAA-3' (312 bp, 45°C); *Nanog* 두 번째 센스: 5' - TTTGTAGGTGGGATTAATTGTGAA-3' , *Nanog* 두 번째 안티센스: 5' -AAAAAACAAAACCAACCAAAAT-3' (188 bp, 55 °C).

[0085] 각 프라이머 세트에 대하여, 3 μ l의 첫번째 라운드의 PCR로부터 온 산물을 두번째 라운드의 PCR에 사용하였다. 증폭된 산물을 1% 아가로스 젤 상에서 전기영동에 의하여 확인하였다. PCR 산물들을 제조업자의 지시에 따라 PCR 2.1-TOPO 벡터 (Invitrogen)를 사용하여 서브클로닝하였다. 재구축된 플라스미드는 QIAprep Spin Miniprep 키트(QIAGEN)를 사용하여 정제하였고 개별 콜로니들을 시퀀싱하였다(GATC-biotech). 적어도 90% 사이토신 전환이 있으면 콜론을 받아들였고, 모든 가능한 클론성(clonalities)은 BiQ Analyzer 소프트웨어(Max Planck Society)로부터 온 기준에 기반하여 배제되었다.

[0086] 실시예 6:투명대 제거 배아를 갖는 응집 및 테라토마 어셈블리

[0087] iEpiSCs (1 × 106)를 중증 복합 면역결핍(SCID) 마우스에 주사하고 4주 후에 테라토마 조직을 얻었다. iEpiSCs의 모두 삼배엽 세포로의 분화를 확인하기 위하여 haematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 수행하였다.

[0088] 세포들을 응집하였고 denuded post-compacted 8-세포 마우스 배아로 배양하였다. 요약하면, 8-세포 상실배를 2.5 days postcoitum (dpc)에서 암 배아(B6C3F1 female × CD1 male)로부터 플러쉬(flush)하였고 M2 배지에 위치하였다 30-50의 배아 배치를 그들의 투명대(zonae pellucidae)의 용해때까지 산성화된 Tyrode's 용액에 잠시 배양하였다. 각 배아를 광유 하에서 10% fetal calf serum (FCS)를 가지는 마이크로드롭의 KSOM배지에 위치시켰다. iEpiSCs 또는 iEpiSC-RCs의 콜로니들을 유리 피펫을 사용하여 작은 조각들로 나누었다. 10-15 세포의 덩어리를 마이크로드롭으로 전달하였다;각 덩어리는 디프레션(depression)에서 배아의 정상에 위치하였다. iEpiSCs 또는 iEpiSC-RCs를 배아로 넣기 위해서 모든 응집체를 이 형태로 결합하여 37 °C, 5% CO2에서 24 시간 동안 배양기에 유지하였고 최종적으로 2.5-dpc 가임신 대리모(CD1 female × 수정관제거된 CD1 male)의 자궁각으로 옮겼다.

[0089] 실시예 7:백터 구축 및 lentivirus 백터로 트랜스덕션

[0090] pLVTHM-Klf4-2A-Tomato를 2A 펩타이드 및 Td-tomato를 코딩하는 서열로 인 프레임 마우스 Klf4 cDNA (종결코돈을 배제)로 Plvthm 내 GFP 서열을 대체하여서 구축하였다. 사용된 그 프라이머 서열은 다음과 같다: 2AF: 5' -

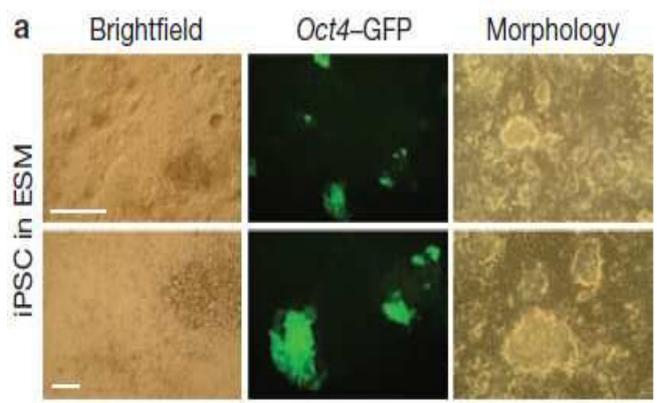
ACGCGTAAAATTGTCGCTCCTGTCAAACAACTCTTAACCTTTGATTTACTCAAAGTGGCTGGGGATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCAGTTAACA-3' ;
 2AR: 5' - GTTAACTGGACCTGGATTGCTTTCTACATCCCCAGCCAGTTTGAGTAAATCAAAGTTAAGAGTTTGTGGACAGGAGCGACAATTTTACGCGTA-3' ;
 TomatoF: 5' -GTTAACATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' ; TomatoR: 5' -ACTAGTTTACTGTACAGCTCGTCCATGCCGTACAG-3' ;
 mouse Klf4F: 5' -GGGGTTTAAACACATGGCTGTACGCGACGC-3' ; mouse Klf4R: 5' -ACGCGTAAAGTGCTCTTCATGTGT-3' .
 loxP pBOB-CAG-iCRE-SD lentiviral 백터(Addgene 12336)를 loxP-flanked Klf4-2A-Tomato 서열을 제거하기 위하여 사용하였다. 바이러스 생산 및 감염과정은 22에 기재되었다. pLVTHM 및 패키지 플라지미드는 D. Trono (Geneva, Switzerland)로부터 제공받았다.

[0091] 실시예 8:면역조직화학

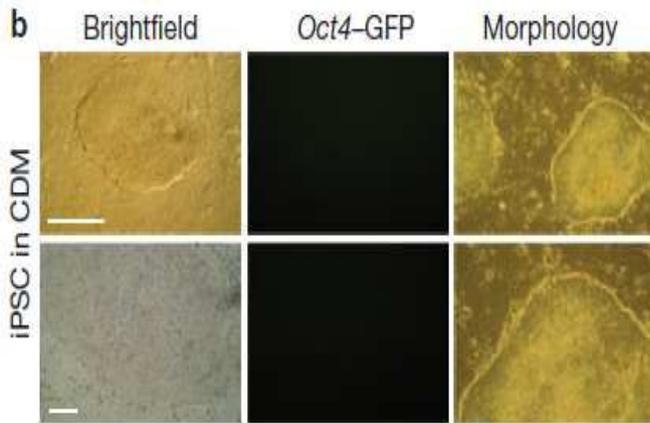
[0092] 항-Nanog (Cosmo Bio, REC-RCAB0002PF, 1:200), 항-Sox2 (Abcam, ab59776, 1:200), 및 항-Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8628, 1:100) 일차 항체를 면역조직화학에 사용하였다.

도면

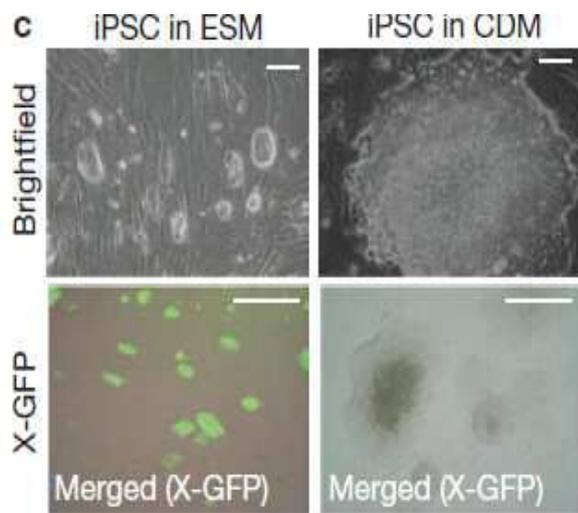
도면1a



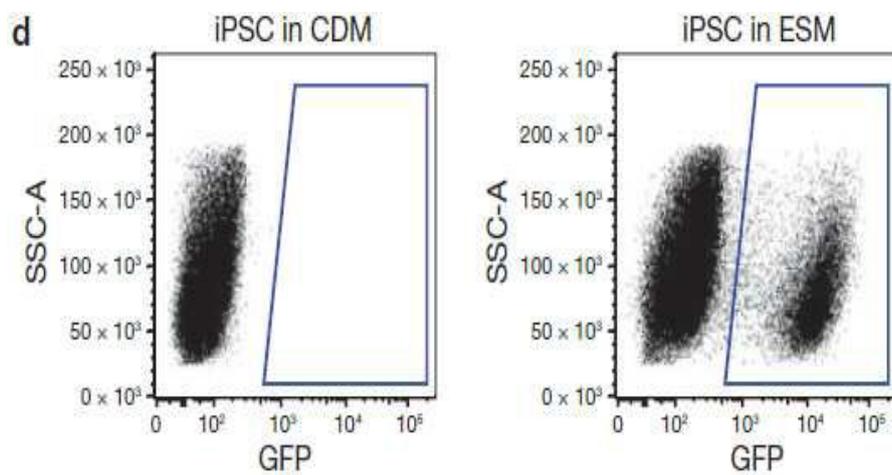
도면1b



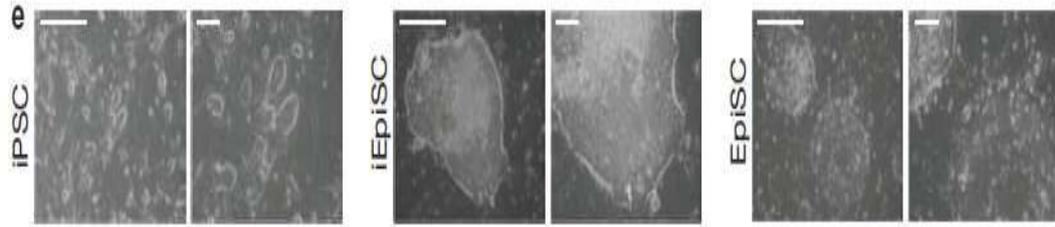
도면1c



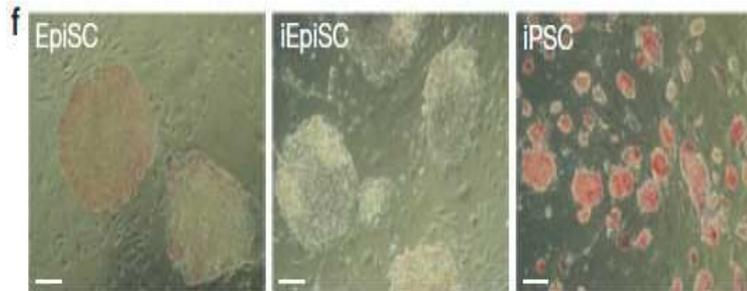
도면1d



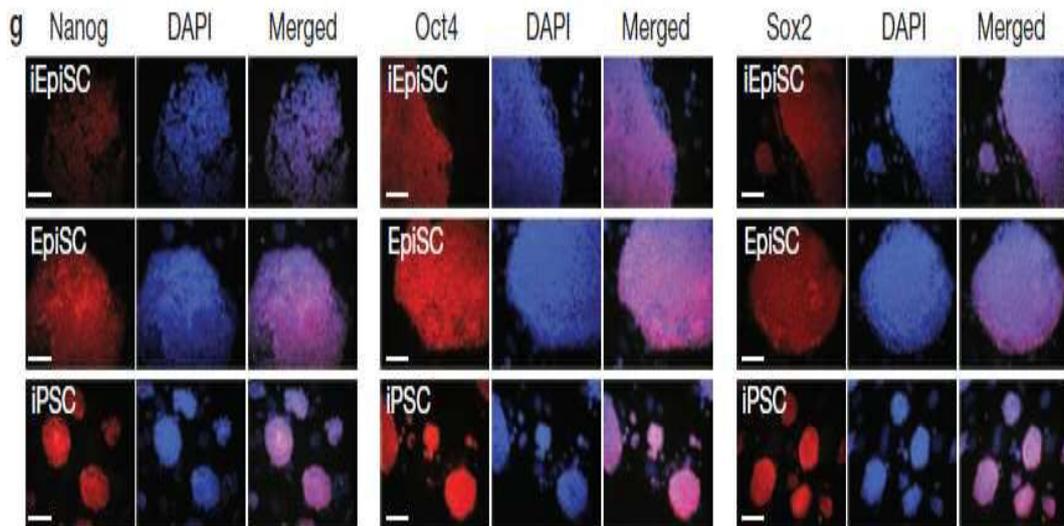
도면1e



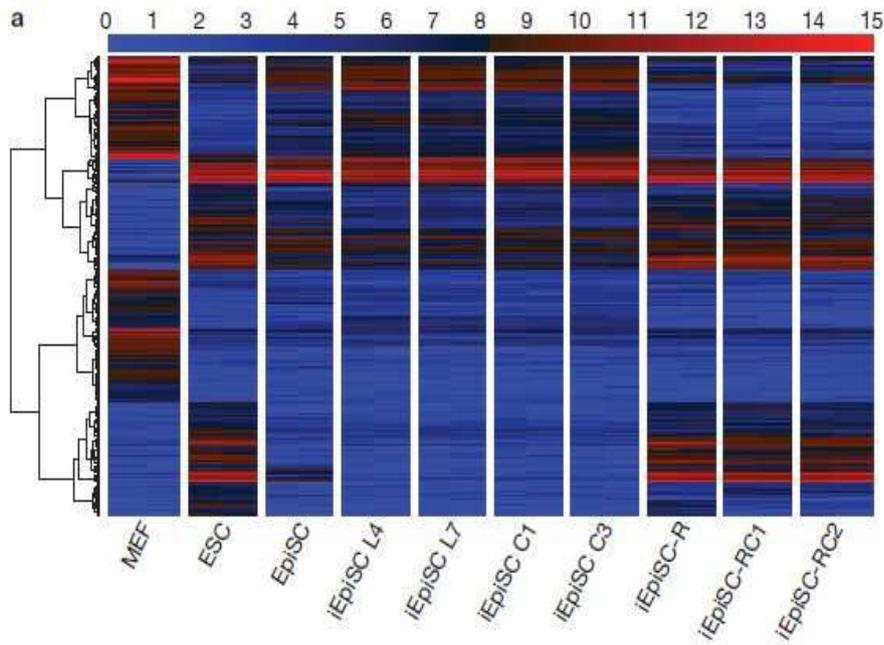
도면1f



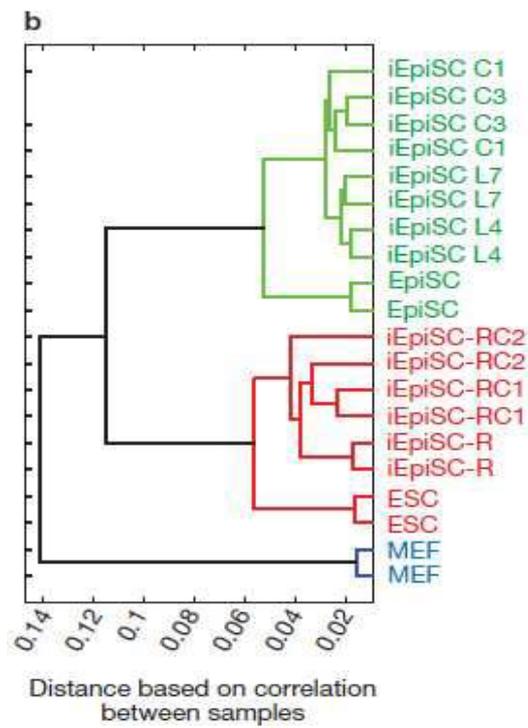
도면1g



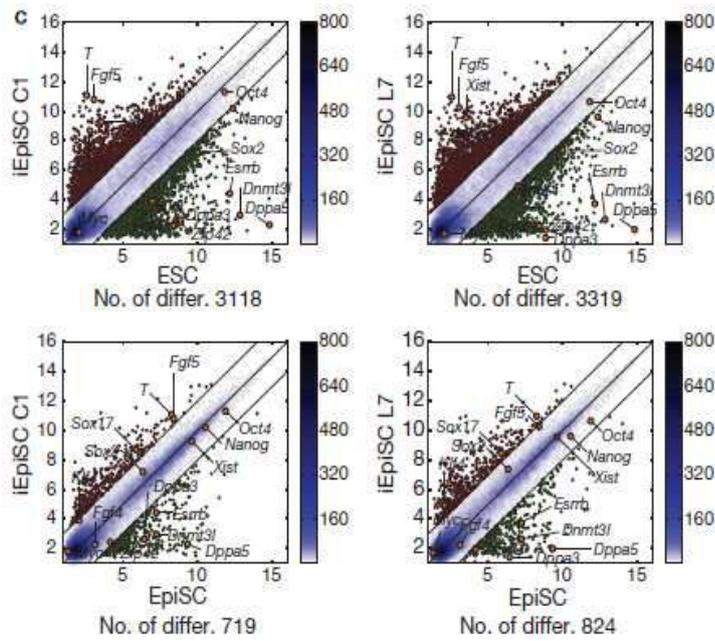
도면2a



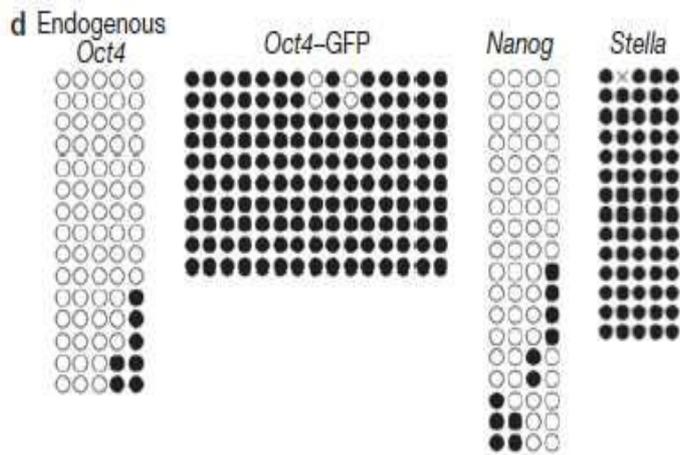
도면2b



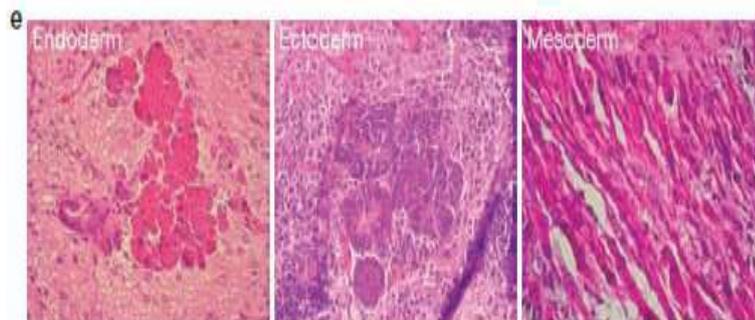
도면2c



도면2d



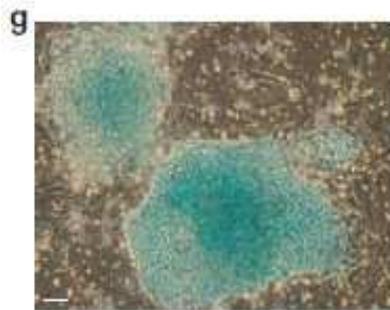
도면2e



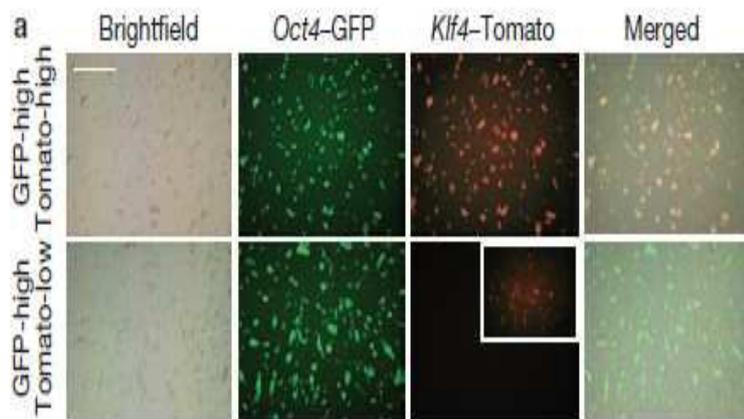
도면2f



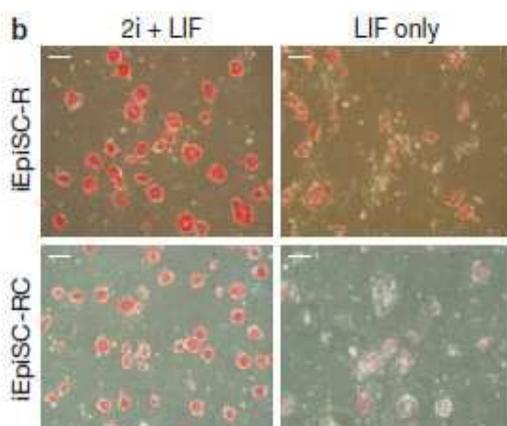
도면2g



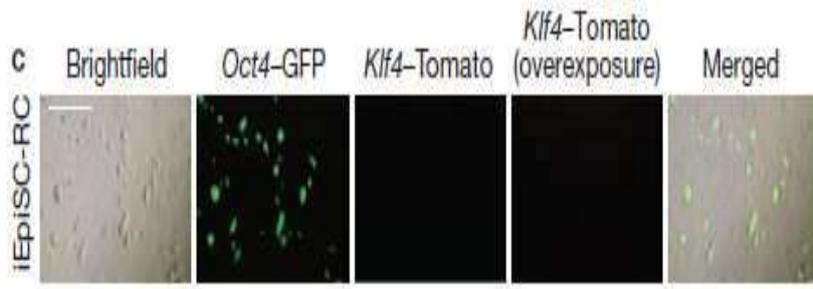
도면3a



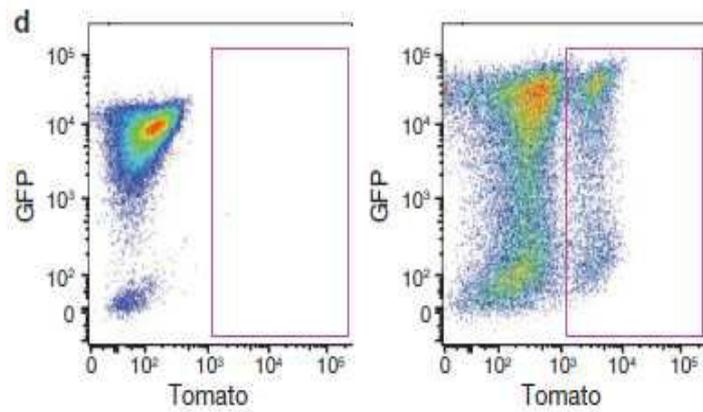
도면3b



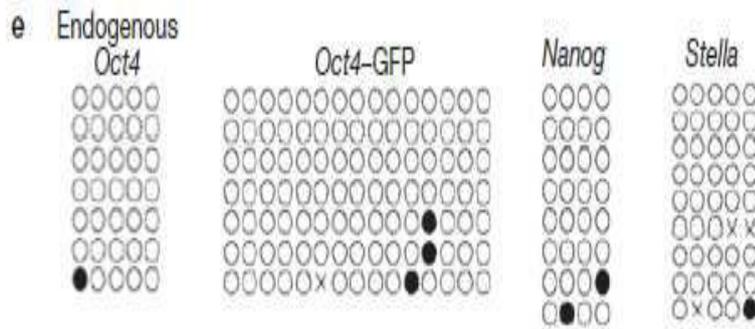
도면3c



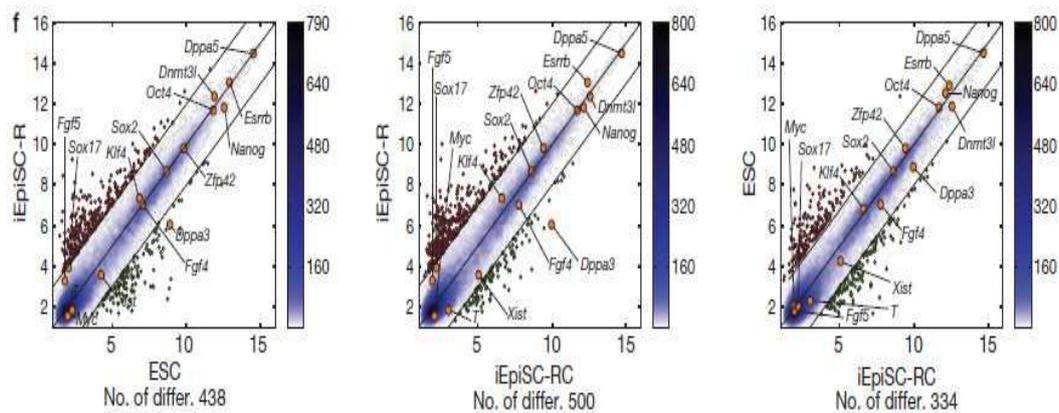
도면3d



도면3e



도면3f



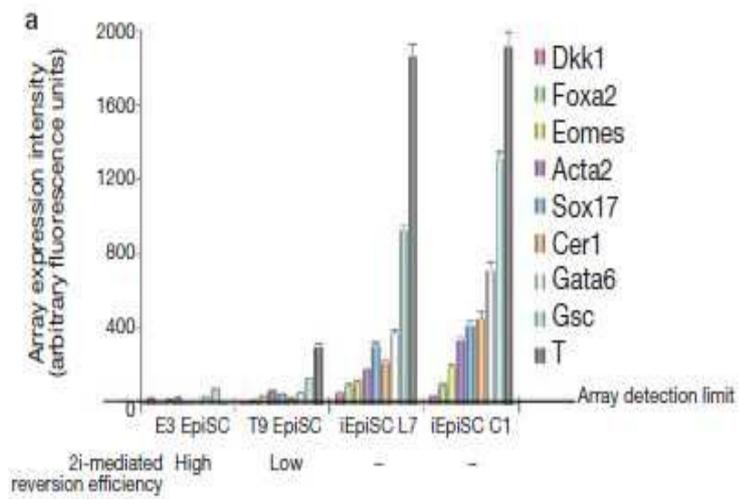
도면3g



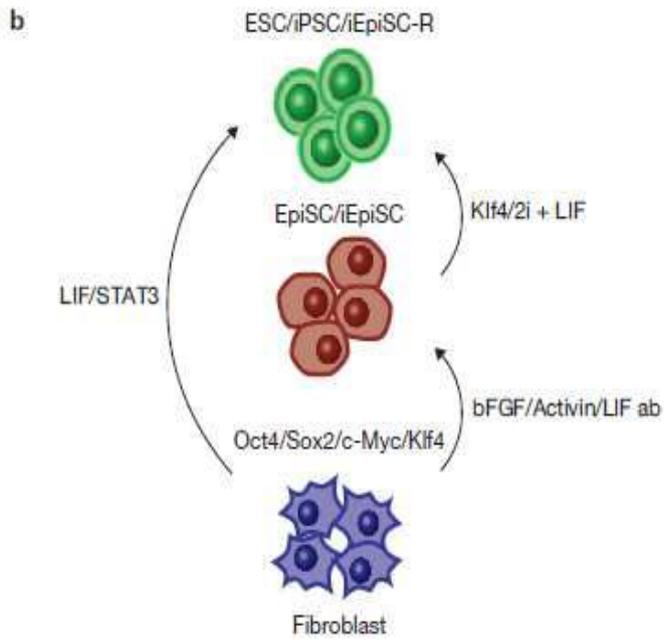
도면3h



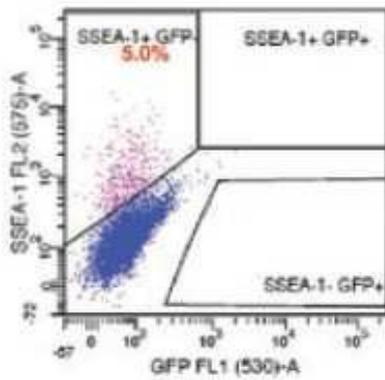
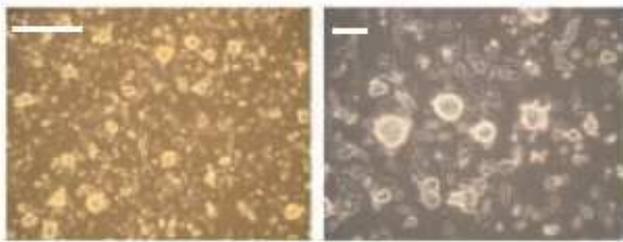
도면4a



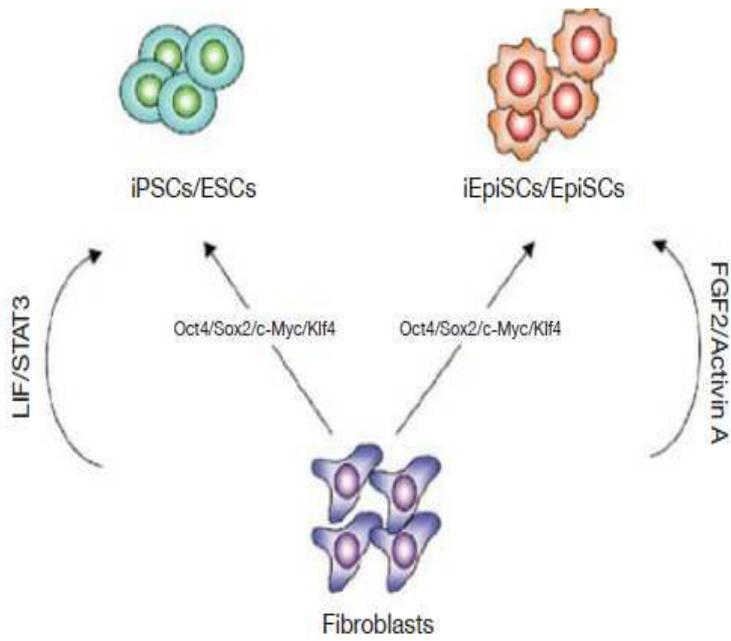
도면4b



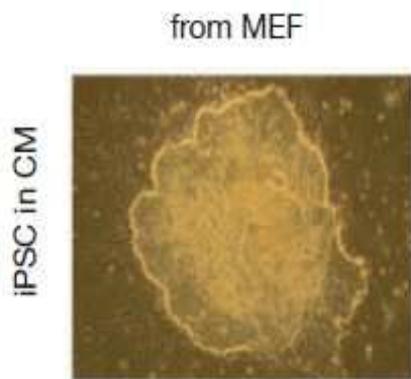
도면5a



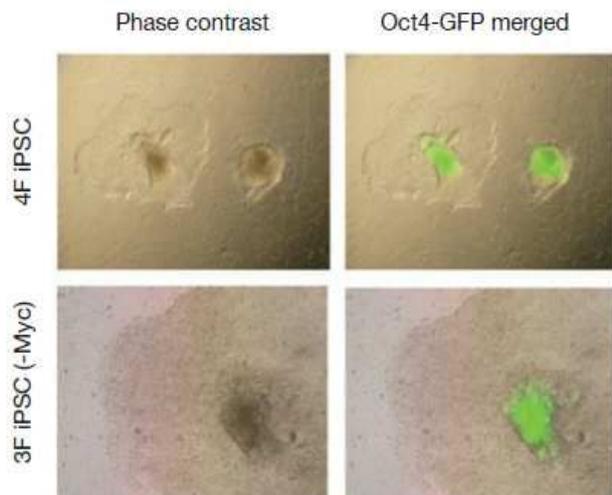
도면5b



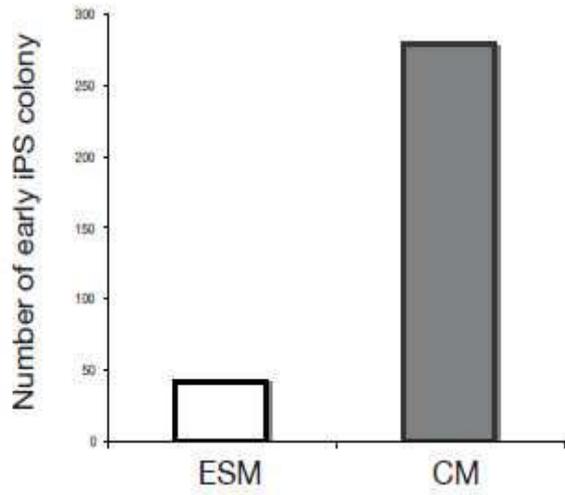
도면5c



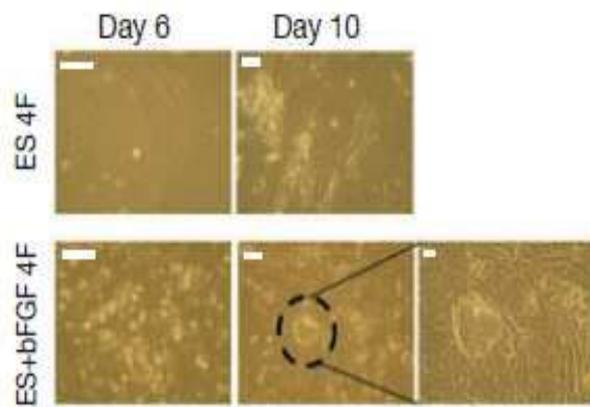
도면5d



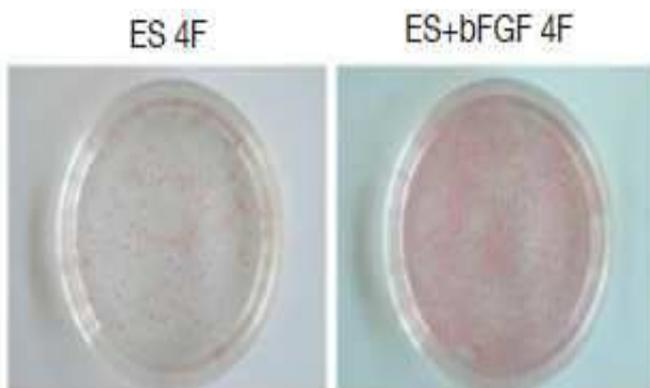
도면6a



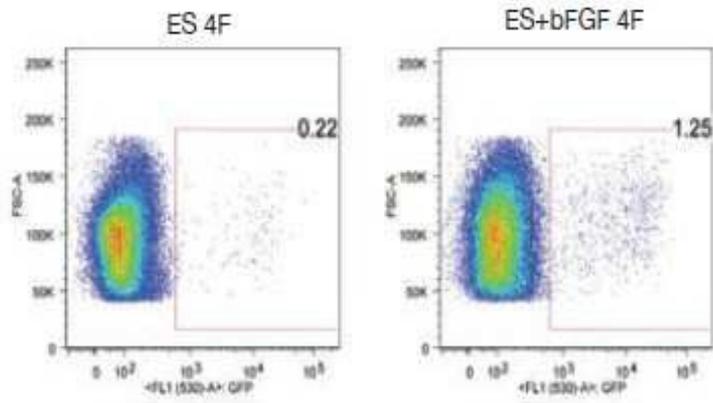
도면6b



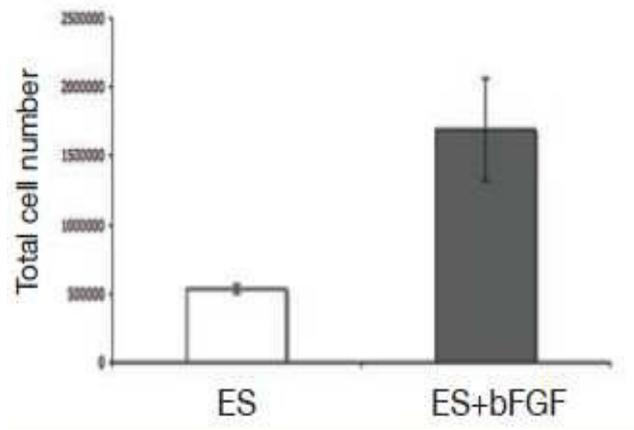
도면6c



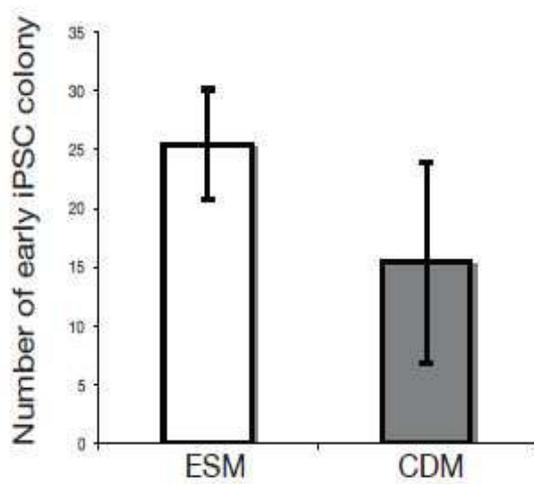
도면6d



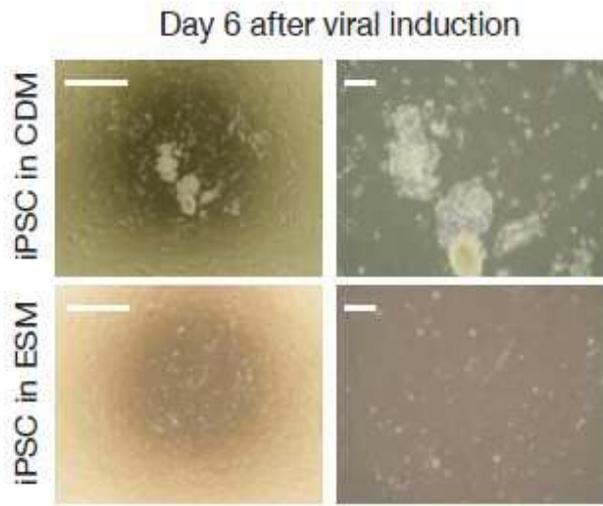
도면6e



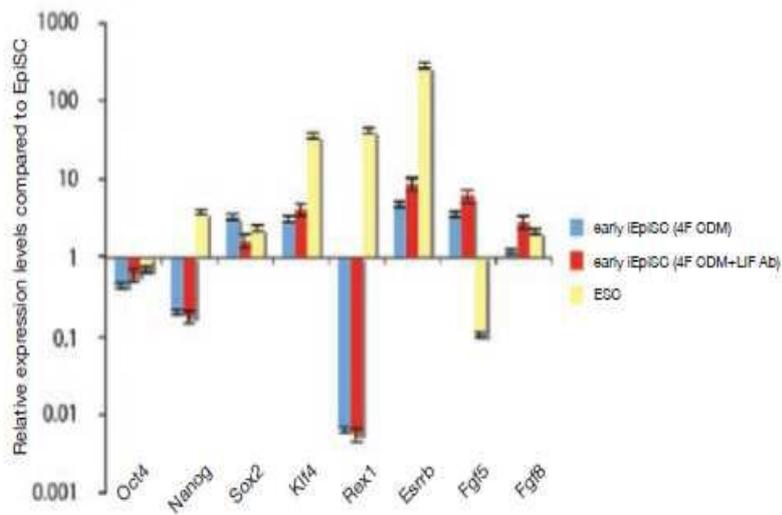
도면6f



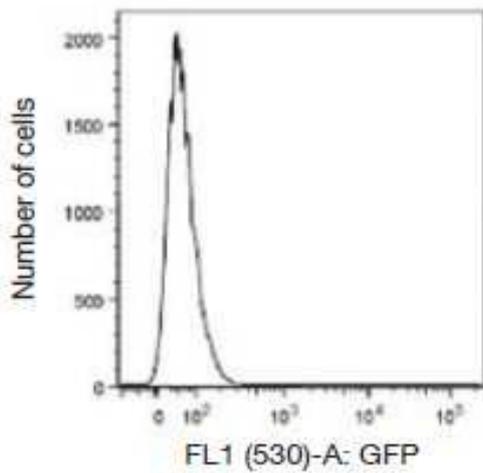
도면6g



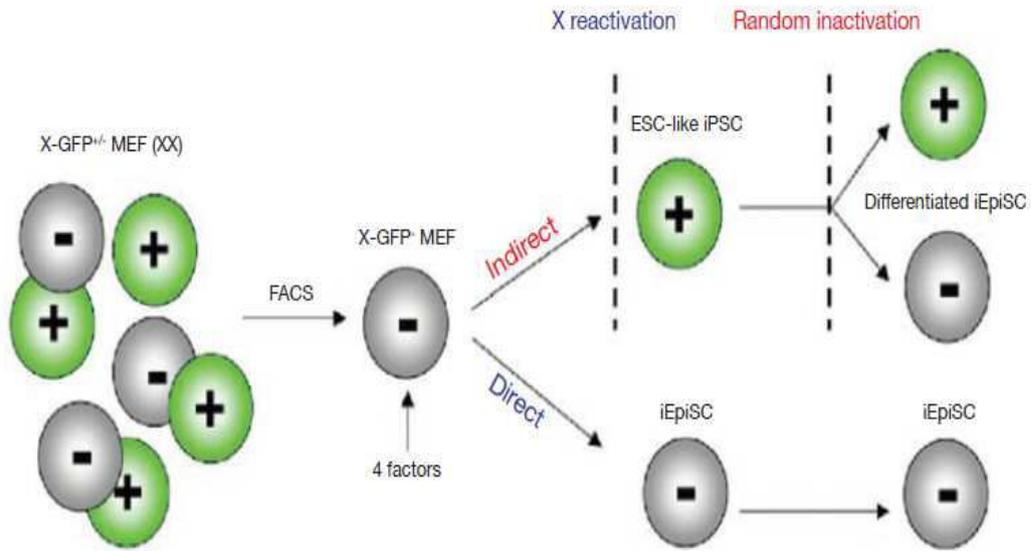
도면7a



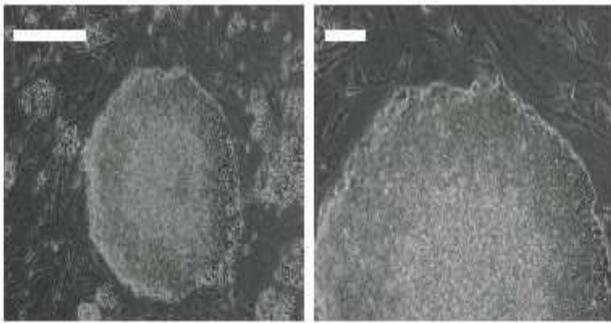
도면7b



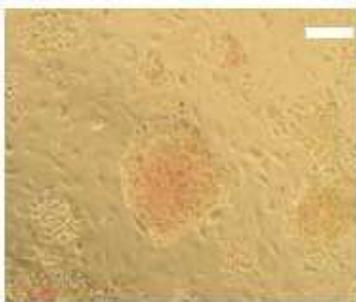
도면7c



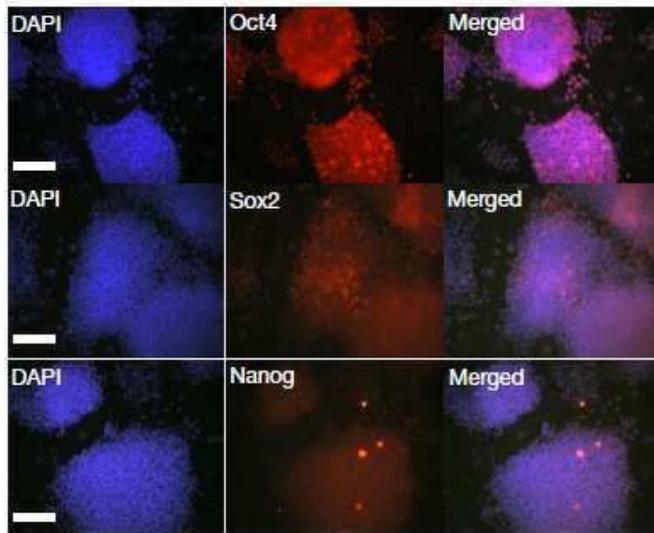
도면8a



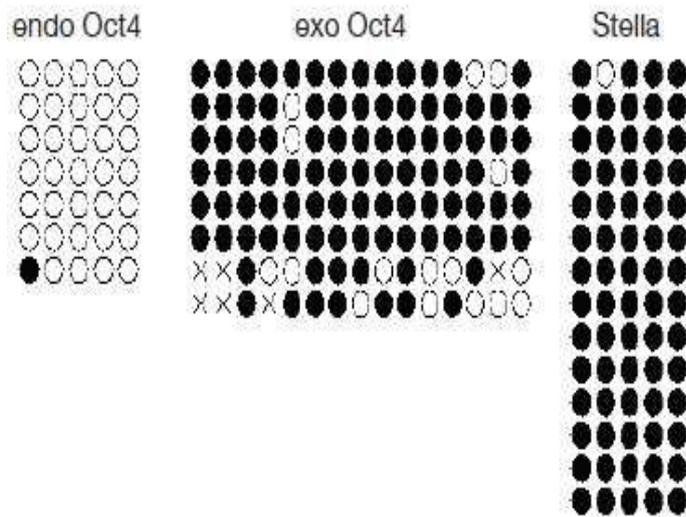
도면8b



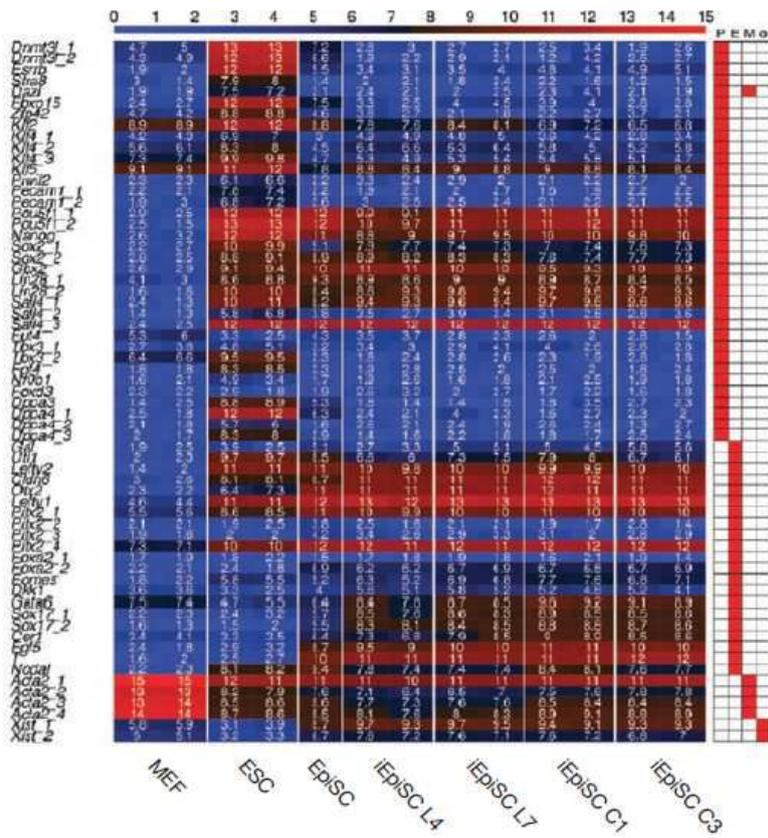
도면8c



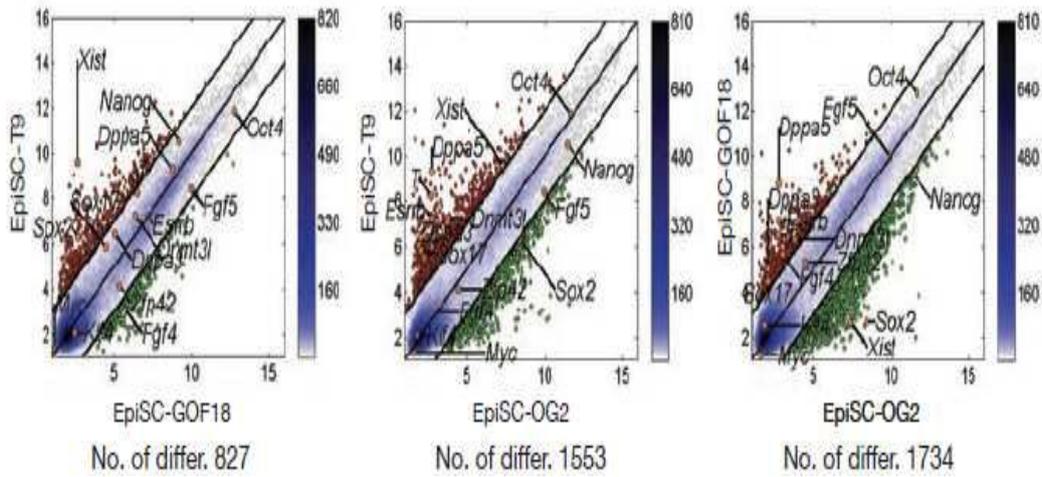
도면8d



도면9a



도면9b



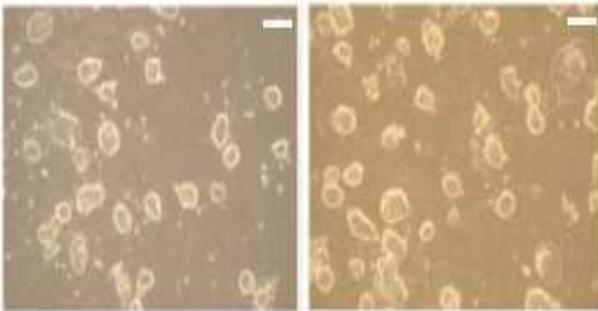
도면10a



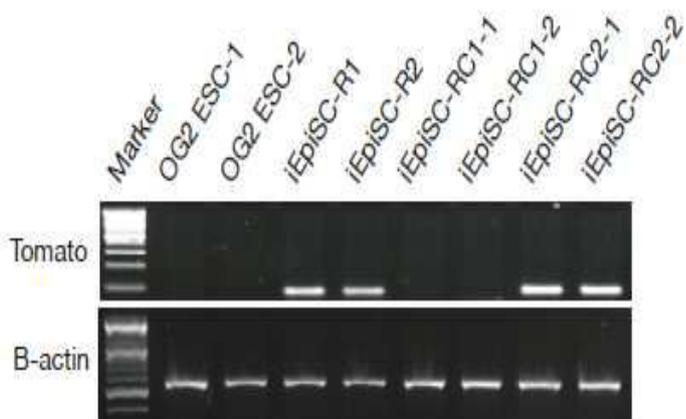
도면10b



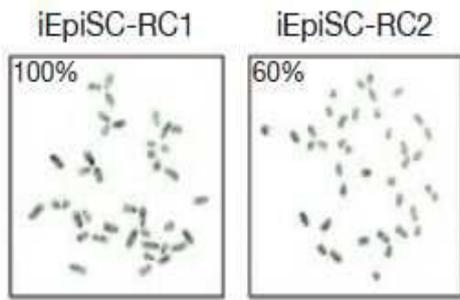
도면10c



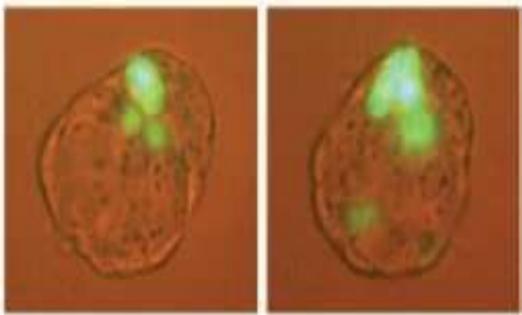
도면10d



도면10e



도면10f



도면10g

