

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C12N 5/06  
A61K 35/28  
A61P 43/00  
G01N 33/15

(11) 공개번호 10-2005-0115926  
(43) 공개일자 2005년12월08일

(21) 출원번호 10-2005-7017825

(22) 출원일자 2005년09월23일

번역문 제출일자 2005년09월23일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/004090

(87) 국제공개번호 WO 2004/085632

국제출원일자 2004년03월24일

국제공개일자 2004년10월07일

(30) 우선권주장 JP-P-2003-00083106 2003년03월25일 일본(JP)  
JP-P-2003-00095242 2003년03월31일 일본(JP)

(71) 출원인 도쿠리쓰교세이호징 가가쿠 기주쓰 신코 기코  
일본 사이타마켄 가와구치시 혼쇼 4쵸메 1반 8고

(72) 발명자 오비나타 마스오  
일본 미야기켄 센다이시 아오바쿠 하치만 5쵸메 3방 10-402고  
스즈키 요시히사  
일본 미야기켄 센다이시 아오바쿠 고마즈시마 2쵸메 11방 7고

(74) 대리인 특허법인코리아나

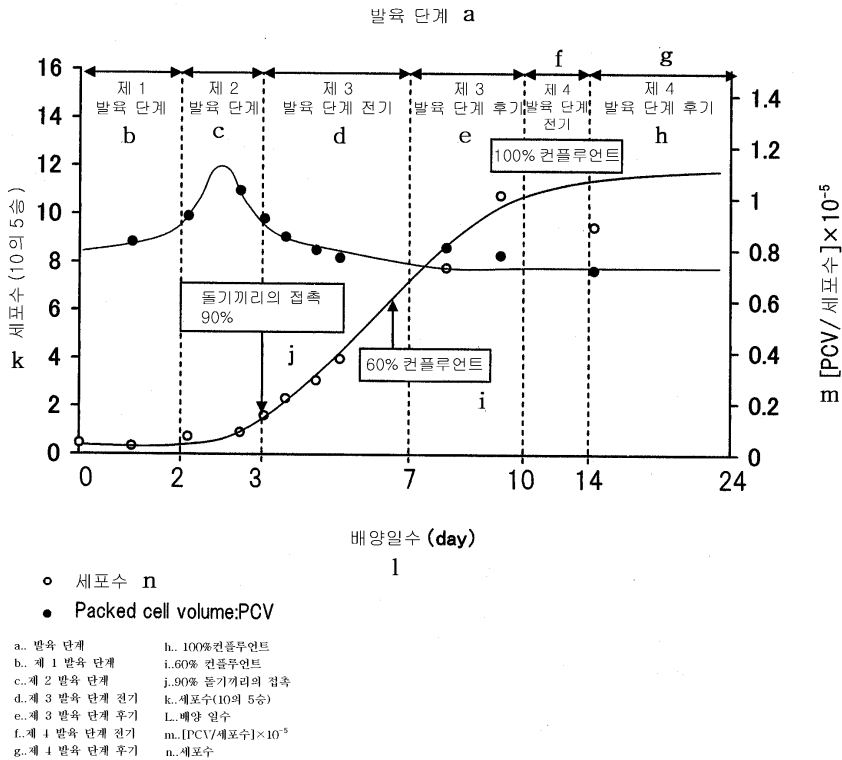
심사청구 : 없음

(54) 줄기 세포의 분화 유도 및 분화능의 제어

요약

동물 세포가 적절한 생육 페이즈에서만, 이 세포를 사이토카인과 접촉시키거나, 세포의 분화 유도 방법 동물 세포의 배양 또는 증식시에 2 종 이상의 사이토카인을 조합하여 사용하는, 동물 세포의 분화능을 제어하기 위한 계의 제공.

대표도



명세서

기술분야

본 발명은 동물 세포, 특히 다능성 줄기 세포의 배양, 유지, 증식 게다가 분화 유도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 재생 의료의 기술 분야에서 사용할 수 있는 기법에 관한 것이다.

배경기술

교통 사고나 부상으로 또는 질병으로 심장, 폐, 신장, 혈관, 소화관 나아가서는 신경 등의 조직이나 장기를 결손시켜 버린 경우, 타인의 장기에 의존하지 않고, 본인의 세포를 이용하고, 심장이나 혈관 등의 결손 조직 등으로 분화되는 기능을 갖는 줄기 세포나 기능 세포를 사용하여 원래의 장기로 재생시키는 재생 의료 기술의 개발이 요망되고 있다.

이러한 배경 하에서, 예컨대 심장에 관해서는, 심장의 발생·분화에 관여하는 중요한 유전자가 다수 단리되고 있다. 또, 배성(胚性) 줄기 세포(ES 세포) 등의 다분화능을 갖는 세포를 사용하여, 심근 세포의 발생·분화의 해석도 실시되고 있다. 게다가, 골수 세포를 포함한 줄기 세포가 여러 가지 세포로 분화되는 다분화능(또는, 다능성)을 갖는 것이 시사되어 있다. 그리고, 이러한 골수 유래 세포가 마우스의 생체에서도 상해 심근의 재생에 기여하여, 심 기능의 개선이 인정된다는 보고도 이루어지고 있다.

보다 구체적으로는, ES 세포의 발생·분화의 해석에 관하여, 미분화된 쥐 ES 세포를, 사이토카인, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta 1$  (TGF- $\beta$  슈퍼 패밀리의 구성원, 즉 TGF- $\beta$  및 BMP2) 으로 프라임하여 형성되는 배양체(embryoid body)는 현저히 증대된 박동 영역을 갖는 심근으로의 분화를 촉진한다는 것이 알려져 있다(예컨대, 하기의 비특허문헌 1 참조.). 이러한 증식, 분화의 중요한 제어 인자로서, 사이토카인의 각종 세포에 대한 작용도 조사되고 있다. 이렇게 하여, 사이토카인의 기능의 다양성 및 그 기능이 중복된다는 것도 알려져 있다.

한편, 골수 유래의 세포에 관하여, 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자의 트랜스제닉 마우스로부터 수립되고, 그리고 줄기 형성성, 골 형성성 및 지방 형성성 분화를 나타내는 골수 간질 세포주(TBR 세포주)가 있는 것은, 골격근으로 분화되고, 그리고 그 분화는 온코스타틴(oncostatin) M(OSM)에 의해 자극받지만, 다른 TBR 세포주의 평활근으로의 분화는 OSM에 의해 저해된다는 것이 보고되어 있다(예컨대, 하기의 비특허문헌 2 참조.). 또한, TBR 세포주의 일반적인 제조 방법 및 구체적인 주(株)에 대한 상세한 것도 공표되어 있다(예컨대, 하기의 특허문헌 1, 그리고 비특허문헌 3 및 4 참조.). 비특허문헌 3 및 4에는, TBR 세포주는 T 항원의 불활화나 증식 조건에 따라 표현형의 변화를 나타내어, 지방 전구

세포가 지방 세포 및 골 형성성 세포로 유도되고, 몇몇 지방 전구 세포 및 내피 세포주는 줄기 세포 및 지방 세포로 유도된다는 것도 기재되어 있다. 이러한 성질로부터 TBR 세포는 다능성 간엽계 줄기 세포 유래인 것이 시사되고 있다. 또, 간엽계 줄기 세포로부터, 골 세포, 연골 세포, 건 세포, 인대 세포, 골격근 세포, 지방 세포, 간질 세포 등으로 유도할 수 있는 것도 알려져 있다 (하기의 비특허문헌 5 참조.).

또한, 심근 세포로의 분화능을 갖는 골수 유래의 세포가 5-아자시티딘 등의 DNA의 탈메틸화제의 투여로 인하여, 확률적(stochastic)으로 심근 세포, 지방 세포 및 골격근 세포 계열로 분화된다는 것이 공표되어 있다 (예컨대, 하기의 특허문헌 2 참조.).

또, 특허문헌 2 에는, FGF-8, ET1, Midkine, 골 형성 인자-4 (BMP4)의 4 종류 중 1 종의 사이토카인과 5-아자시티딘을 조합하여 첨가함으로써 골수 유래의 세포에 심근 특이적인 유전자의 발현을 촉진할 수 있다는 것도 기재되어 있다. 또한 게다가, 특허문헌 2 에는, 심근 세포로의 분화능을 갖는 마우스 골수 세포를 미리 5-아자시티딘으로 처리한 후, 마우스에 이식하면, 심근 세포 및 혈관 세포에서 이식 세포로부터 유래하는 세포가 관찰된다는 것도 시사하고 있다.

특허문헌 1 : 일본 공개특허공보 평5-292958호

특허문헌 2 : 제01/48151호 팜플렛, 특히 4 페이지 2-11 행, 53 페이지-55 페이지

비특허문헌 1 : The FASEB J. 2002 ; 16 : 1558-1566, 요약부

비특허문헌 2 : In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 37 : 698-704 (2001)

비특허문헌 3 : J. Cellular Physiology 164 : 55-64 (1995)

비특허문헌 4 : Experimental Cell Research 218, 424-429 (1995)

비특허문헌 5 : Science 284, 143-147 (1999)

이상 서술한 바와 같이, 당해 기술 분야에서는, ES 세포 뿐만 아니라, 어느 일정한 골수 유래의 세포 (조혈 간세포를 제외함.)가 다분화능을 갖고, 특정한 분화 형질을 발현시켜, 기능적인 세포, 게다가 조직이나 기관이 된다는 것이 알려져 있으며, 그리고 특정한 형질 내지는 기능 또는 분화의 방향성이 변화될 수 있다는 것도 시사되어 있다. 또한, 특허문헌 2 에도, 사이토카인의 사용으로 인하여 분화의 방향성 (새로운 분화 형질의 발현성)을 변화시킬 수 있다는 것이 기재되어 있지만, 기재된 방법에서는, 원칙으로서, 5-아자시티딘 (생체 내에서 인산화되어 핵산으로 삽입되고, DNA 합성을 저해하는 작용을 가짐.)과의 병용이 필요하다. 또, 분화의 방향성을 더욱 정확하게 조절할 수 있는 수단을 제공할 수 있다면, 당해 기술 분야의 진보에 이바지할 수 있을 것이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 개시

본 발명자들은 다능성 줄기 세포의 분화의 방향성 및 분화의 정도에 사이토카인이 미치는 영향에 대하여 치밀하게 검토해 온 결과, 상기 기술한 바와 같은 사이토카인 기능의 다양성은, 다른 세포 뿐만 아니라, 동일한 계통의 세포의 다른 특정한 생육 페이즈 (phase) 에서도 관찰된다는 것을 발견했다. 또, 2 종 이상의 사이토카인을 조합하여 사용함으로써, 동물 세포의 분화의 방향성을 제어할 수 있다는 것을 발견했다. 본 발명은 이러한 지견에 기인하여 완성된 것이다.

따라서, 본 발명에 의하면, 다능성 줄기 세포를 발육시키는 과정에서 이 세포와 작용제의 접촉을 통한 이 세포의 분화 유도 방법으로서,

이 세포와 작용제의 접촉이, 이 세포의 i) 제 1 발육 단계, ii) 제 2 발육 단계, iii) 제 3 발육 단계 전기, iv) 제 3 발육 단계 후기, v) 제 4 발육 단계 전기 및 vi) 제 4 발육 단계 후기로 이루어지는 발육 페이즈의 최대 4 개의 페이즈에서 실시되고, 그리고,

이 작용제가 이 세포를 적어도 2 개의 방향으로의 세포의 분화를 촉진 및/또는 억제할 수 있는 물질인 것을 특징으로 하는 세포의 분화 유도 방법이 제공된다.

또, 다른 태양의 본 발명으로서, 상기 세포의 분화 유도 방법을 사용하는 후보 작용제에 대한 세포 분화의 촉진 또는 억제능의 평가 방법으로서, 이 후보 작용제 (또는, 피검 물질) 가 다능성 줄기 세포의 상기 발육 페이스의 최대 4 개의 페이스에 있어서, 이 세포와 접촉되는 것을 특징으로 하는 평가 방법이 제공된다. 이러한 평가 방법은 한정되지 않지만, 다능성 줄기 세포의 증식 및/또는 분화를 조절할 수 있는 후술하는 사이토카인과 동일하거나 또는 향상된 물질 (펩티드성 또는 비펩티드성) 의 스크리닝에 사용할 수 있다.

또한, 2 종 이상이 조합된 사이토카인을 유효 성분으로 하고, 또한

다능성 줄기 세포, 예컨대, 골수 간질 세포의 3 이상의 분화의 방향성의 결정과 방향성의 결정된 각 세포에 있어서의 분화의 정도를 제어할 수 있는 것을 특징으로 하는 포유 동물 세포의 분화를 제어하기 위한 사이토카인의 세트를 제공한다.

또, 이러한 사이토카인의 세트를, 인 비트로 (in vitro), 엑스 비보 (ex vivo) 및 인 비보 (in vivo) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 환경 하에서 사용할 수 있다. 이러한 사용 태양이 구체적인 것으로는, 상기의 성분으로도 이를 수 있는 사이토카인이나 그 밖의 동등인 작용을 갖는 작용제를 스크리닝하기 위한 방법, 또 직접 또는 간접적인 재생 의료, 예컨대, 다분화능을 갖는 세포를 생체에 이식할 때, 이들 세포와 조합해서 상기 사이토카인의 세트를 투여하거나, 또는 리시피언트 본인으로부터 채취한 세포를 미리 상기 사이토카인의 세트에서 처리하여, 원하는 분화 형질을 발현시키거나, 나아가서는 특정 기능의 세포 또는 조직까지 분화시킨 후, 생체에 이식하는 방법을 들 수 있다. 이 스크리닝 방법으로서의 바람직한 태양으로는, (A) 다능성 줄기 세포, 특히 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자를 담지하는 트랜스제닉 마우스 유래의 다능성의 골수 간질 세포를 준비하고,

(B) 이 세포를, 분화시킬 수 있는 능력을 가질 것이 기대되는 작용제의 존재 하에서 이 세포를 증식시킬 수 있는 배지에서 배양하고,

(C) 배양 세포의 분화의 방향성 또는 분화의 정도를 결정하고, 그리고

(D) 이렇게 결정된 분화의 방향성 또는 분화의 정도에 대한 결과를 이 작용제의 부존재 하에서의 이 세포의 배양 결과와 비교하여, 양 결과의 차이를 이 작용제가 골수 간질 세포의 분화능에 미치는 작용의 지표로 하는 것을 특징으로 하는 척추 동물 세포의 분화능을 갖는 약제의 스크리닝 방법이 제공된다.

더욱 바람직한 태양으로는, 상기의 BMP-2, BMP-4, OSM, GDF-5 및 TGF- $\beta$ 2 로부터 선택되는 사이토카인이 비교 작용제로서 사용되는 단계를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1(a) 는 TBR32-2 의 분화 유도의 결과를 나타내는 도면을 대신하는 세포의 사진이고, 도 1(b) 는 TBR10-1 의 분화 유도의 결과를 나타내는 도면을 대신하는 세포의 사진이다.

도 2 는 TBR32-2 의 증식 곡선과 발육 단계를 나타내는 그래프이다.

도 3 은 TBR10-1 의 증식 곡선과 발육 단계를 나타내는 그래프이다.

도 4(a) 는 예 1~5 및 비교예 1 에 대한, 그리고 도 4(b) 는 예 6~12 에 대한 겔 전기 영동 후의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타내는 도면을 대신하는 사진이다.

도 5(a) 는 예 13~17 및 비교예 2 에 대한, 그리고 도 5(b) 는 예 18~24 및 비교예 3 에 대한 겔 전기 영동 후의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타내는 도면을 대신하는 사진이다.

도 6 은 예 25 에 있어서의 WB 법의 결과 (SDS 폴리악릴아미드겔 전기 영동에 의해 단백질을 분리하고, 분리된 겔 상의 단백질을 멤브레인에 전사함) 를 나타내는 도면을 대신하는 사진이다. 상단 : 평활근 (smooth muscle), 하단 : 골격근 (skeletal muscle).

### 실시예

발명을 실시하기 위한 최선의 형태

본 발명에서 사용할 수 있는 다능성 줄기 세포는, 본 발명의 목적에 따르는 것이라면 ES 세포를 비롯하여, 어느 작용제에 의해, 원래 (native) 의 세포로부터 2 이상의 새로운 분화 형질이 발현되어, 기능적인 세포 또는 조직이나 기관이 될 수 있는 세포라면, 골수, 뇌, 간, 기타 장기로부터 단리할 수 있었던 세포, 계다가 이 세포의 초대 배양 세포, 계대 배양 세포, 분사화 세포 중 어느 것이어도 상관없다. 그러나, 바람직하게는, 골수 유래의 간엽계 세포인 줄기 세포를 사용할 수 있다. 또, 단리 또는 수립된 세포주로서, 예비적으로 골수 간질 세포나, 간엽계 줄기 세포로 일컬어지고 있는 것이라 하더라도, 본 발명의 목적에 따르는 한, 본 발명에서 말하는 다능성 줄기 세포에 포함된다.

따라서, 상기의 비특허문헌 3~4 에 기재된 다능성을 나타내는 세포를 보다 구체적인 것으로서 들 수 있다. 또, 이들에 기재된 세포와 분화의 방향성, 분화되는 정도 등에 대하여 동등한 특성을 갖고 있다면, 세포의 기원을 불문하고 사용할 수 있으며, 예컨대, 마우스, 래트, 모르모트, 토끼, 고양이, 개, 양, 염소, 말, 돼지, 소, 원숭이, 인간 등의 포유 동물 유래의 세포 일 수 있다. 한정되지 않지만, 본 발명의 작용, 효과를 확인하는 데에 적절한 다능성 줄기 세포로는, 상기 기술한 비특허문헌 3 또는 4 에 기재되어 있는 바와 같은, 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자의 트랜스제닉 마우스로부터 수립된 TBR 주 (또는, 계) 라고 일컬어지는 것을 들 수 있다. 또한, 이들 비특허문헌 3 및 4 는, 공저자로서, 본 발명자의 한 사람인 타테와 키 모리오 박사가 포함되어 있는 바와 같이, 상기 TBR 주의 특정한 주, 예컨대, TBR31-2, 동 10-1 등은, 샌다이시 야오 바쿠 세이료쇼 4-1 토호쿠 대학 가령 (加齢) 의학 연구소로부터 시험, 연구의 목적으로 사용하는 것을 전제로 제한 없이 분양된다.

이러한 다능성 줄기 세포를 발육시키는 과정은, 인 비트로 (in vitro), 엑스 비보 (ex vivo) 및 인 비보 (in vivo) 중 어느 하나의 발육 과정일 수 있지만, 특히, 전자의 두 가지에서의 발육 과정이 주시되고 있다. 이러한 발육 과정은, 세포의 인공적인 배양에 있어서의 세포의 각종 발육 단계 (또는, 발육 페이즈) 를 포함하며, 구체적으로는 이하의 단계로 이루어진다.

- i) 제 1 발육 단계 : 어리고 미숙한 세포의 돌기를 왕성하게 신장시키고 있으며, 또한 증식 단계에 들어가 있지 않은 세포가 관찰된다 ;
- ii) 제 2 발육 단계 : 세포수가 증대되기 직전의 단계에 있고, 또한 세포의 돌기를 왕성하게 신장시켜, 인접하는 세포의 돌기 끼리의 접촉이 일어나기 직전~직후에 있으며, 세포 체적의 팽창이 최대가 된 세포가 관찰된다 ;
- iii) 제 3 발육 단계 전기 : 대수 (對數) 증식적인 발육이 개시되어, 인접하는 세포의 돌기끼리의 접촉이 90% 이상 일어난 상태에 있는 세포로부터, 세포 본체끼리 완전히 접촉하여 증식되는 면적이 없는 상태를 100 으로 했을 때, 세포의 밀도가 60% 에 달한 상태에 있는 세포, 즉 60% 컨플루언트의 상태가 된 세포가 관찰된다 ;
- iv) 제 3 발육 단계 후기 : 대수 증식적으로 활발하게 증식되고 있는 60% 컨플루언트 상태의 세포로부터 증식이 멈춘 100 컨플루언트 상태를 향해 있는 세포이면서, 또한 성숙한 세포를 향해 가고 있는 세포가 관찰된다 ;
- v) 제 4 발육 단계 전기 : 100% 컨플루언트 상태에 있는 세포가, 아직도 조금 증식을 행하고 있어, 증식 정지 직전의 세포가 관찰된다 ; 및
- vi) 제 4 발육 단계 후기 : 세포의 증식 단계를 마친 성숙한 세포가 관찰된다. 도 2 및 도 3 도 참조할 것.

종래의 기술에 의하면, 사이토카인이 사용되는 경우에는, 세포의 배양은 배양 전 기간을 통해 사이토카인을 포함하는 배지에서 실시되기 때문에, 세포는 배양 초기부터 배양 종료까지 연속해서 사이토카인과 접촉 (또는, 노출) 되지만, 본 발명에서는, 상기의 i)~vi) 의 발육 페이즈 중, 최대 4 개의 페이즈에서 세포가, 적어도 2 개의 방향으로의 이 세포의 분화를 촉진 및/또는 억제할 수 있는 물질 (바람직하게는, 어느 하나의 사이토카인임.) 과 접촉되는 것이 중요하다. 이러한 접촉을 행할지의 여부는, 세포를 발육시키는 과정, 전형적으로는 세포의 배양 중, 예컨대, 2~4 일마다 배지의 교환이 행해지는데, 이 교환 배지에 상기 물질을 존재시키는지 여부에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 최대 4 개의 페이즈는, 예컨대, iii) 제 3 발육 단계 전기와 iv) 제 3 발육 단계 후기와 v) 제 4 발육 단계 전기와 vi) 제 4 발육 단계 후기 등으로 이루어질 수 있지만, i) 제 1 발육 단계와 ii) 제 2 발육 단계와 iii) 제 3 발육 단계 전기 등의 3 개의 페이즈, i) 제 1 발육 단계와 ii) 제 2 발육 단계, iv) 제 3 발육 단계 후기와 v) 제 4 발육 단계 등의 2 개의 페이즈, 게다가 상기 6 개의 페이즈 중 어느 하나의 페이즈까지도 포함한다.

본 발명에 따르면, 이러한 어느 페이지에서의 배지 중에, 생육되고 있는 세포로 분화 유도를 실시할 수 있는 농도에서, 바람직하게는 어떠한 사이토카인이 첨가된다. 이러한 사이토카인으로서는 한정되지 않지만, 온코스타틴 M (OSM), 골 형성 인자-2 (BMP-2), 골 형성 인자-4 (BMP-4), 그로스 디퍼렌시이션 팩터(growth differentiation factor)-5 (GDF-5) 및 트랜스포밍 증식 인자 (TGF- $\beta$ 2) 를 들 수 있다.

예컨대, 비특허문헌 2 에 의하면, 상기 TBR31-2 의 전체 배양 기간 (상기의 i)~vi) 의 발육 페이지) 을 통해 이 세포주를 연속해서 OSM 과 접촉시킨 경우에는, 상기 기술한 바와 같이, 골 형성성 분화가 자극 (또는, 골 형성 세포로의 분화 유도가 촉진) 된다. 그러나, 지방 생성성 분화는 억제 (또는, 지방 세포로의 분화 유도는 억제) 된다. 이에 반해, 본 발명에 의하면, OSM 을 상기의 iv)~vi) 의 발육 페이지 뿐만 아니라, 상기의 vi) 의 발육 페이지에만 존재하게 했을 때에서조차 TBR31-2 로부터 지방 세포로의 분화 유도는 억제된다. 게다가 중요한 지견은, 비특허문헌 2 에 기재된 바와 같이, TBR31-2 를, 상기의 i)~vi) 의 발육 페이지를 통해 OSM 의 존재 하에서 배양하면, 평활근으로의 분화 유도는 억제되는데 반해, 반대로 i)~iii) 의 발육 페이지, 또는 iii), iv) 및 v) 의 발육 페이지 중 어느 하나의 발육 페이지에서 OSM 의 존재 하에서 TBR31-2 를 배양하면, 평활근으로의 분화 유도는 촉진된다.

즉, 다능성 줄기 세포의 발육계에서, 이 세포에 대한 사이토카인의 작용을 평가하고자 하는 경우에는, 이 세포와 사이토카인의 접촉의 타이밍에 따라 분화 유도의 방향성이 반대가 되는 경우가 있다. 이렇게 하여, 다능성 줄기 세포에 대한 사이토카인 등의 작용제의 작용을 정확하게 확인하기 위해서는, 상기의 i)~vi) 의 6 개의 발육 페이지에서의 어느 적당한 1~4 의 발육 페이지에서, 이 작용제의 작용을 확인하는 것이 바람직하다.

그러므로, 본 발명에 따르는, 다능성 줄기 세포의 분화 유도 방법을, 이 세포에 대한 각종 후보 작용제 (또는, 피검 물질) 의 평가에 응용하면, 이러한 작용제의 정확한 분화 유도능에 대한 평가가 가능해진다. 이러한 평가 방법에서는, 배양이 용이하고, 배양 결과의 평가를 용이하게 실시할 수 있는, 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자를 담지하는 트랜스제닉 마우스 유래의 골수 간질 세포 (TBR 계 세포) 를 사용하는 것이 편리하다. 이러한 평가 방법의 바람직한 또는 보다 구체적인 태양은, 다음과 같이 기재할 수도 있다.

A) TBR 계 세포를 이들의 영양 배지에서 생육시킬 때, 생육 과정 또는 배양에서의 이 세포의 i) 제 1 발육 단계, ii) 제 2 발육 단계, iii) 제 3 발육 단계 전기, iv) 제 3 발육 단계 후기, v) 제 4 발육 단계 전기 및 vi) 제 4 발육 단계 후기로 이루어지는 발육 페이지의 최대 4 개의 페이지에 있어서, 적당한 농도의 피검 물질의 존재 하에서 배양하고,

B) 배양 세포가 어떠한 분화 형질을 갖는 세포로 전환되는지 여부 (또는, 배양 세포로 분화 유도가 생겼는지 여부) 를 검출하고,

C) 검출 결과에 기초하여, 피검 물질이 다능성 줄기 세포에 대한 분화 유도능 또는 세포의 분화의 촉진 또는 억제 작용을 갖는지 여부를 판단하는,

것을 특징으로 하는 평가 방법.

이러한 평가 방법에서는, 비교 또는 포지티브 대조로서, 피검 물질을 함유하지 않고, 골 형성 인자-2 (BMP-2), 골 형성 인자-4 (BMP-4), 온코스타틴 M (OSM), 그로스 디퍼렌시이션 팩터-5(GDF-5) 및 트랜스포밍 증식 인자 (TGF- $\beta$ 2) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 사이토카인의 존재 하에서 상기의 배양을 실시한 결과와 비교하는 공정을 포함시킴으로써, 피검 물질의 다능성 줄기 세포에 대한 작용을 보다 구체적으로 평가할 수 있다.

한편, 2 종 이상이 조합된 사이토카인을 유효 성분으로서 사용하는 본 발명에서는, 사이토카인의 사용은 동시, 또는 시간, 장소 등을 달리하여 개별적으로 사용하는 것이면 된다. 또, 조합하여 (또는, 세트) 사용하지만, 이러한 사용이 한번 이루어지면, 그 후에는, 어느 1 종만을 사용하는 경우에도, 본 발명의 사이토카인의 세트의 사용에 포함된다. 예컨대, 다능성 줄기 세포의 분화의 방향성을 결정하고, 그리고 방향성의 정도를 제어하는데 2 종 이상의 사이토카인을 사용한 후, 최종적인 목적을 따르도록, 분화된 특정한 세포를 얻을 목적에서, 1 종의 사이토카인으로 선택적으로 증식 분화시키는 경우라 하더라도, 이들 전체 단계는, 본 발명에 따르는 사이토카인의 세트의 사용에 상당하는 것이라고 이해되고 있다. 3 이상의 분화의 방향성이란, 다능성 줄기 세포를 증식시킨 경우에, 새로운 3 종 이상의 특성 (분화 형질) 이 발현되거나, 또는 기능적인 세포 또는 조직이나 기관을 지향하는 성질을 의미하며, 단적으로 말하면, 어느 기능 세포, 예컨대, 평활근 세포, 골격근 세포 등에 이르는 성향이다. 따라서, 각 분화의 정도란, 예컨대, 평활근 세포 또는 골격근 세포가 대조, 예컨대, 단리된 상태에 있는 사이토카인을 첨가하지 않고, 혈청의 존재 하에서의 각 분화 세포의 출현율과 비교한 경우의 출현율의 다소를 의미한다.

이러한 분화의 방향성은, 구체적으로는, 다능성 줄기 세포가 평활근 세포, 골격근 세포, 심근 세포, 내피 세포 또는 지방 세포 등의 각 분화 형질을 발현시켰거나, 또는 각 분화 세포에 이르는 성질을 의미하고 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 따르는, 2 이상의 사이토카인의 세트를 사용하면, 상기 각 분화 세포의 적어도 3 종에 다능성 줄기 세포를 지향하게 할 수 있으며, 그리고 지향시켜 얻어지는 각 분화 세포의, 분화 형질의 발현의 정도 또는 출현의 정도를 제어할 수 있다. 이들의 정도는, 다관능성 줄기 세포를 상기 사이토카인이 첨가되어 있지 않지만, 혈청이 보충되어 있는 것 이외에, 다른 배양 조성은 본질적으로 동일한 배지에서 배양했을 때에 관찰되는 각 분화 형질의 발현 정도 또는 각 분화 세포의 출현 정도와 비교하여 검출할 수 있을 정도로 촉진 (또는, 증가) 또는 억제 (또는, 감소) 되어 있는 것을 의미한다. 이 정도는, 상기 혈청의 존재 하에서 초래되는 분화 형질의 발현 또는 분화 세포의 출현과 비교하여, 적어도 10% 촉진 또는 억제되어 있는 것이 바람직하다. 이렇게 하여 본 발명에 의하면, 어느 특정한 분화 세포의 출현을 또는 존재의 비율을 선택적으로 높일 수 있다. 상기의 분화 형질의 발현 정도 및 분화 세포의 출현 정도를 검출하는 예는 후술하는 실시예에 특정한 것을 들지만, 당해 기술 분야에서 주지의 어떠한 기법에 따라도 된다.

본 발명에서는, 다능성 줄기 세포를 상기와 같이 유도할 수 있는 2 종 이상의 사이토카인의 조합 (또는, 세트) 을 구성하는 사이토카인은, 본 발명의 목적을 따르는, 예컨대, 직전에 기재한 바와 같은, 어느 특정한 분화 세포의 출현을 또는 존재의 비율을 선택적으로 높일 수 있는 것이라면 어떠한 사이토카인을 사용하고, 그것들을 어떻게 조합한 것이든 상관없다. 그러나, 이러한 사이토카인의 예로서, 한정되지는 않지만, 골 형성 인자-2 (BMP-2), 골 형성 인자-4 (BMP-4), 온코스타틴 M (OSM), 그로스 디퍼렌시이션 팩터-5 (GDF-5) 및 트랜스포밍 증식 인자 (TGF- $\beta$ 2) 등을 들 수 있다. 또, 이러한 사이토카인의 조합의 예로는, BMP-2 와 BMP-4, BMP-2 와 OSM, BMP-2 와 TGF- $\beta$ 2, BMP-2 와 BMP-4 와 OSM, OSM-BMP-4, OSM 과 TGF- $\beta$ 2, OSM 과 GDF-5, OSM 과 GDF-5 와 BMP-4, OSM 과 GDF-5 와 TGF- $\beta$ 2 와 BMP-4, BMP-2 와 OSM 과 GDF-5 와 BMP-4, 및 BMP-2 와 OSM 과 GDF-5 와 TGF- $\beta$ 2 와 BMP-4 를 들 수 있다. 예컨대, 어느 다능성 줄기 세포 (후술하는 실시예 참조) 는, BMP-2 와 OSM 의 조합 사용으로 인하여, 높은 출현율에서의 자율 박동하는 심근 세포로의 분화능 및 높은 출현율에서의 내피 세포로의 분화능을 갖는 것을 확인할 수 있는, 따라서, 목적에 따라, 이러한 다능성을 갖는 줄기 세포에 BMP-2 또는 OSM 을 적용하거나, 또는 BMP-2 및 OSM 을 적용할 수 있다.

상기 기술한 분화 유도 방법 및 평가 방법, 또는 2 이상의 사이토카인의 조합 사용에 관한 계에서는, TBR 계 세포주를 비롯한 동물 세포를 배양할 수 있는, 그 자체 공지된 배양 조건 그대로 또는 개량하여 사용할 수 있다. 예컨대, 배지로는, 기본적으로는, 필수 영양원이 첨가하여 있으며, 아미노산에서는, 동물 (포유류) 이 합성할 수 없는 필수 아미노산의 L-아르기닌, L-시스테인, L-티로신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-트레오닌, L-트립토판, L-발린, L-글루타민을 베이스에 첨가해 두고, 경우에 따라서는 생육을 좋게 할 목적에서, 비필수 아미노산의 L-글리신, L-세린도 첨가한 것이라면, 어떠한 배지라도 이용할 수 있다. 배양 온도 등의 기타 조건은, 온도 조건 등, 그 밖에, CO<sub>2</sub> 인큐베이터 중의 기상의 CO<sub>2</sub> 와 공동으로 배지의 pH 를 안정화시키기 위해 첨가하는 완충제로서 세포가 탄산수소이온을 필요로 한다는 점에서, 일반적으로는 탄산수소계의 중탄산나트륨 용액을 첨가하거나, 추가로 HEPES 등을 첨가하여, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 밖으로 꺼내도 pH 를 안정적으로 유지할 수 있도록 하면 된다. 또, 적절히 잡균의 오염을 방지하기 위해, 항생 물질을 첨가해도 된다. 본 발명에 따르면, 배지로부터 필요에 따라, 혈청 그 밖의 작용제를 제거하고, 사이토카인이 첨가된다. 한편, 인 비트로에서는, 생리학적 또는 사용하는 사이토카인에 악영향을 미치지 않는 매체 중에 사이토카인을 함유시킨 형태를 채용할 수 있다. 이러한 매체의 예로는 한정되지 않지만, 무균수, 생리 식염수, 인산 완충화 생리 식염수일 수 있다.

인 비트로 및 엑스 비보에서 사용하는 경우의 각 사이토카인의 사용량은, 후술하는 실시예에서의 사용량을 참조하여, 필요하면, 추가로 소실험을 실시하여 최적량을 결정하면 된다. 인 비보에서 사용하는 경우에는 통상적으로 0.1ng/ml ~ 20ng/ml 의 용량일 수 있다. 한편, 배양 온도는 33°C ~ 37°C 일 수 있다.

또, 분화 유도가 생긴 세포의 동종 방법은, 그 자체 공지된 방법에 따를 수 있으며, 구체예로는 후술하는 실시예에 기재된 방법에 따르면 된다.

더욱 다른 태양의 본 발명으로서, 상기의 분화 유도 방법에 따라 얻어진 분화 세포를 주체로 하는 재생 의료용 조제물도 제공할 수 있다. 이렇게 하여 본 발명에 의하면, 심장, 모세혈관, 동맥 및 정맥 등의 혈관계의 장기, 위, 식도, 결장, 직장, 소장, 대장 등의 소화기계의 장기, 손발의 근육, 기관, 자궁, 질이나 지방 조직 등의 재생 의료에 이용할 수 있는 수단을 제공할 수 있다.

또, 상기의 평가 방법에 의하면, 각 분화의 정도를 제어할 수 있는 작용제의 스크리닝계를 구축할 수 있다.

한편, 2 종 이상의 사이토카인의 세트는, 상기의 무균수, 생리 식염수, 인산 완충화 생리 식염수와 조합하거나, 또는 조합하지 않고, 생체에 악영향을 미치지 않는 물질의 매트릭스 중에 존재시켜, 서방성의 형태로 사용해도 된다. 이러한 매트릭스를 형성하는 물질로는, 폴리락트산 (다공체), 콜라겐, 콜라겐 스폰지, β-삼인산칼슘, 다공질 하이드록시아퍼타이트, 폴리락트산 마이크로스페이, 폴리락트산 코팅 젤라틴 스폰지, 락트산-에틸렌글리콜 공중합체, 아가로오스, 폴리비닐알코올, 아르긴산, 아가로오스/헤파린, 아밀로펙틴, 피브린 겔, 콜라겐 미니펠릿, 에틸렌-아세트산비닐 공중합체, 락트산-글리콜산 공중합체, 키토산, 락트산/글리콜산-에틸렌글리콜 공중합체, 티탄임블란트 등을 들 수 있다.

또, 인 비트로에서 2 종 이상의 사이토카인을 조합하거나, 또는 세트로 사용하는 경우에는, 특히 간편하게 사용, 조작할 수 있는 본 발명자의 일부에 의해 제공된, 상기의 TBR 간질 세포주를 이용하여, 다태양 줄기 세포의 분화의 방향성을 결정할 수 있으며, 게다가 방향성이 결정된 각 분화의 정도를 제어할 수 있는 작용제의 스크리닝계를 구축할 수 있다. 이러한 스크리닝계에 있어서, 본 발명에 따르는 사이토카인의 세트는, 비교 시료로서 사용할 수 있다. 예컨대, 스크리닝해야 하는 작용제의 후보 물질 (예컨대, TBR 주를 분화 유도할 수 있다는 것을 기대할 수 있는 후보 작용제) 의 존재 하에서 다태성 줄기 세포를 배양하는 대신, 상기의 사이토카인의 1 종 또는 2 종 이상의 존재 하에서의 배양 결과를, 이 후보 물질의 작용을 평가하는 데에 있어서의 표준 (또는, 기준) 으로 함으로써, 다태성 줄기 세포를 소기의 분화 방향으로 분화 유도하는데 도움이 되는 작용제를 효율적으로 스크리닝할 수 있다. 또한, 이러한 스크리닝계에서 사용할 수 있는 배양 조건은 상기 기술한 바에 기초할 수 있다.

이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들에 한정되지 않는다.

(1) : 분화 유도된 세포 또는 분화 세포의 동정 또는 검출

(1-1) 평활근 세포에 대해서는, 60mm 플라스틱 디쉬에 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 단핵이고 방추형 (spindle shape) 을 나타내는 세포를 관찰하여, 그 배양 세포 집단으로부터 추출한 단백질 혼합물로부터 평활근 세포에 특이적으로 발현되는 미오신 경쇄 키나아제 (sm-MLCK) 또는 α-액틴 (α-sm-Actin) 을 검출하기 위해, SDS 폴리아크릴아미드겔 전기 영동에 의해 단백질을 분리하고, 분리된 겔 상의 단백질을 멤브레인에 전사하고 (WB 법), 멤브레인 상의 sm-MLCK 에 특이적으로 반응하는 1 차 항체 (Sigma 제조, Monoclonal Anti-Myosin Light Chain Kinase, mouse IgG2b, clone K36, Product No. M7905) 또는 α-sm-액틴에 특이적으로 반응하는 1 차 항체 (Sigma 제조, Monoclonal Anti-α smooth Muscle Actin, mouse IgG2a isotype, clone 1A4, Product No. A2547) 와 이것을 검출하기 위한 호스레디쉬 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase) (HRP) 로 표식한 2 차 항체 (ICN 제조, Goat, anti-mouse IgG(ab')<sub>2</sub>, IgG, 카탈로그 No. 55553) 를 사용함으로써 동정하였다.

(1-2) 배양 디쉬 중의 세포핵의 관찰은 배양액의 제거 후, 농도 1μg/ml 로 조제한 염색액 요오드화 프로피디움 (PI) 을 첨가하고, 염색액과의 반응 처리를 실온에서 5 분간 실시하고, 염색액을 제거하고, 인산 완충액 (PBS) 을 사용하여 세정하였다. PBS 에 의한 세정 처리는 각각 5 분간, 3 회 실시하였다. (1-3) 골화 세포에 대해서는, 골아 세포에는 알카리 포스파타아제 (이하, ALP) 가 비교적 고농도로 존재하고, 또한 히드록시아퍼타이트의 형태를 취한 칼슘이 침착되어 있는 것이 알려져 있기 때문에, 전자의 ALP 염색법 및 후자의 코사 반응에 의해 골화 세포를 동정하였다. 이 HRP 표식의 2 차 항체의 검출은 화학 발광 검출 시약 (아마샤 제조, ECL Plus 웨스턴 블롯팅 검출 키트에 의한 화학 발광을 X 선 필름 (코닥 제조, XAR-5) 으로 실시하였다. 우선, ALP 법에 대하여, 60mm 플라스틱 배양 디쉬 중의 배양액을 제거하고, 디쉬 바닥에 부착된 세포를 PBS 로 3 분간씩 3 회 세정한 후, 70% 냉 (冷) 에탄올 용액을 사용하여 빙상에서 10 분간 정치하여 고정시키고, 이어서 증류수로 3 회 세정한 후에, 표-1 에 나타난 ALP 반응액을 주입 첨가하고, 37℃ 하에서 4 시간 정치하였다.

**[표 -1]**  
ALP 반응액

시약			
0.05M 트리스 염산 완충액 (pH 8.5)	A 액 : 0.2M 트리스 수용액	트리스 (히드록시메틸)아미노메탄 2.42g 을 증류수 100ml 에 용해시킨다.	A 액 50ml 와 B 액 19.2ml 를 혼합하여, 전량을 200ml 로 한다.
	B 액 : 0.2M 염산	염산 (36.7%, 비중 1.19) 1.68ml 를 증류수에 첨가하여 100ml 로 한다.	



반응액	기질의 나프톨 AS-BI 인산나트륨염 5.0mg 을 DMSO 0.25ml 에 용해시킨다. 여기에 증류수를 25ml 첨가하고, 0.05M 트리스 염산 완충액 (pH 8.5) 25ml 를 첨가하여 혼합하고, 이 용액에 퍼스트 레드 TB 염 30mg 을 용해시킨다.
-----	---

이 동안에, 현미경으로 핑크색으로 세포가 염색되어 있는지 관찰을 적당히 실시하였다. 증류수로 3 회 세정한 후, 마이어의 헤마톡실린 용액 (와코준야쿠 공업 주식회사 제조, 병리 연구용 No. 131-09665) 을 주입 첨가하고, 실온에서 5 분간 방치하여 핵 염색을 실시하였다. 가볍게 물로 세정하고, 미지근한 물에 침지하여 색을 빼내었다. 마지막으로 증류수로 3 회 세정하였다. 코사 반응에 대하여, 60mm 플라스틱 배양 디쉬 중의 배양액을 제거하고, 디쉬 바닥에 부착된 세포를 PBS 로 3 분간씩 3 회 세정한 후, 10% 냉포르말린 용액을 사용하여 빙상에서 10 분간 정치하여 고정시키고, 이어서 증류수로 2 회 세정하였다. 5% 질산은 용액을 주입 첨가하고, 방의 간접광 하에서 칼슘 침착부가 흑갈색이 될 때까지 반응시킨 후, 증류수로 3 회 세정하였다. 이어서, 5% 티오황산나트륨 용액에 주입 첨가하고, 3 분간 정치하여 정착 처리를 실시한 후, 증류수에 의한 세정을 3 회 실시하였다. 또한, 대비 염색을 위해, 표-2 에 나타난 켈른에피트로트액을 첨가하여 5 분간 정치한 후에, 증류수로 3 회 세정하였다. 골화 세포의 평가는 현미경에 의한 관찰에 의해 실시하였다.

**[표 -2]**  
코사 반응

시 약	조제 방법
5% 질산은액 (사용 직전에 조제)	질산은 5g 을 증류수 100ml 에 용해시킨다.
5% 티오황산나트륨액	티오황산나트륨 5g 을 증류수 100ml 에 용해시킨다.
켈른에피트로트액	켈른에피트로트 0.1g (메르크 (MERCK) 제조), 황산알루미늄 5g 을 각각 증류수 100ml 에 각각 펄펄 끓여 용해시키고, 냉각시켜 여과한다.

(1-4) 내피 세포에 대해서는, 35mm 플라스틱 디쉬에 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 포석 (cobblestone) 형상의 형태를 나타내는 세포를 관찰하여, 1,1'-디옥타데실-3,3,3'-테트라메틸인도카르보시아닌퍼클로레이트 표식 아세틸 저밀도 리포프로테인 (DiI-Ac-LDL : 제품 No. L-3484, Molecular Probes 제조, USA) 의 주입능을 확인함으로써 동정하였다. 구체적으로는 배양 디쉬 중의 배양액을 세포에 흡집을 내지 않도록 완전히 흡수해서 버리고, 무혈청 배지에서 10µg/ml 로 조제한 DiI-Ac-LDL 을 첨가하여 4 시간, 33°C 에서 배양하였다. PBS 로 5 분간 3 회 세정함으로써 주입되지 않은 DiI-Ac-LDL 을 제외하고, 3% 포르말데히드 용액을 첨가하고, 20 분간 실온에 방치하여 고정시켰다. 증류수로 세정한 후, 로다민 필터를 사용하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

(1-5) 지방 세포에 대해서는, 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 지방구를 가진 세포를 관찰하여, 오일 레드 염색법에 의해 동정하였다. 배양 디쉬 중의 배양액을 제거하고, 디쉬 바닥에 부착된 세포를 PBS 로 3 분간씩 3 회 세정한 후, 3% 의 포르말린 용액을 사용하여 10 분간 실온에 정치하여 고정시키고, 이어서 80% 의 이소프로판올에 의해 1 분간 치환하고, 37°C 에서 10 분간, 오일 레드로 염색하였다. 또한, 60% 이소프로판올을 사용하여 1 분간 분별한 후, 3 분간씩 2 회 세정하고, 마지막으로 핵 염색을 위해 마이어의 헤마톡실린 용액 (와코 제조) 에 의해 10 분간 처리하고, 2 분간 흐르는 물로 세정한 후에, 현미경학적으로 빨강계 물든 지방 세포를 확인하였다. 또, 이 지방 세포는 성숙되면 명확한 지방구를 가진 세포로 발육되기 때문에, 염색하지 않아도 지방 세포로서 용이하게 판정할 수 있었다.

(1-6) 세포의 측정에 대해서는, 배양액을 제거한 후에, 1ml 의 EDTA · 트립신 용액 (0.02g EDTA · 3Na/100ml 의 PBS 용액, 0.002g 트립신/100ml 의 PBS 용액) 을 첨가하여 세포를 세정하였다. 이 세정 조작은 세포가 박리되기 전에 신속하게 2 회 실시하지만, 트립신 용액을 첨가하여, 남김 없이 세포 표면에 펼쳐진 직후에 트립신 용액을 파스퇴르 피펫 (Pasteur pipette) 으로 신속하게 흡수하여 제거하였다. 이어서, 현미경으로 세포가 완전히 박리되어 있는 것을 확인한 후, RITC 배지 5ml 를 60mm 플러스 티슈에 첨가하고, 피펫을 넣고 빼어 세정하여 박리된 세포를 10ml 원침관으로 옮기고, 그 용액 중의 세포수를 60mm 디쉬당 수로 환산하였다. 세포수의 측정은 엘마의 빌켈츄르크 혈구 계산판을 사용하여 실시하였다.

세포의 체적 (packed cell volume ; PCV) 의 측정에 대해서는, 상기와 같이 하여 조제한 용액 중의 세포수를 4ml 당 수로 환산하였다. 그 후, 헤마토크리트 원침관 (1 메모리=1 $\mu$ l, 전체 용량 10 $\mu$ l) 에 그 용액 4ml 를 첨가하여, 1000rpm 으로 3 분간 원심하여 침하된 세포의 체적을 판독하여, 세포수 10<sup>5</sup> 개당 체적을 측정하였다. 사용한 원심기는 히타치 코기 (주) 제, CF7D 이다.

(2) : 세포의 배양

(2-1) 비교 배양

하기 표-3 에 나타내는 2% FBS 의 RITC80-7 배지 (이하, RITC 배지) 를 사용하여, 90mm 플라스틱 디쉬에서 세포끼리 서로 달라붙기 직전의 서브컨플루언트 상태 (80% 정도의 컨플루언트) 까지 배양하였다. 배양액을 제거한 후에, 1ml 의 EDTA · 트립신 용액 (0.02g EDTA · 3Na/100ml 의 PBS 용액, 0.002g 트립신/100ml 의 PBS 용액) 을 첨가하여 세포를 세정하였다. 이 세정 조작은 세포가 박리되기 전에 신속하게 2 회 실시하지만, 트립신 용액을 첨가하여, 남김 없이 세포 표면에 펼쳐진 직후에 트립신 용액을 파스퇴르 피펫으로 신속하게 흡수하여 제거하였다. 이어서, 현미경으로 세포가 완전히 박리되어 있는 것을 확인한 후, 다시 표-3 에 나타내는 RITC 배지를 첨가하여, 세포 농도를 1.2 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml 로 조제하였다. 이 세포 부유액 4.0ml 를 60mm 플라스틱 디쉬에 첨가하여, 세포를 균질하게 분산시킨 후, 33 $^{\circ}$ C 에서 배양하였다.

**[표 -3]**  
RITC80-7 배지

항 목	첨가량/밀리 Q 물 1000ml	비 교
수산화나트륨	0.3g	와코준야쿠 (특급)
중탄산나트륨 (특급)	1.4g	와코준야쿠 (특급)
HEPS	3.3g	시그마. No. H-3375
RITC80-7	9.83g	이와키 유리 (주) No. 99-591-PS
트랜스페린 (10mg/ml)	1ml	ITOHAM FOODS INC. No. 30601293
rh EGF (10 $\mu$ g/ml)	1ml	RSD. No. 236-EG-200
인슐린 (1mg/ml)	1ml	Shimizu Seiyaku Co. Ltd. Batch No.DC18B
FBS (소 태아 혈청)	20ml	Gibco. BRL. lot No. A0247611

세포의 분화능에 미치는 사이토카인류 첨가의 효과에 대하여, 세포 배양에는 표-3 에 나타낸 RITC 배지를 사용하여, 배양 개시 12 시간 후에 새 RITC 배지로 교환하였다. 배지 교환을 3 일 또는 4 일마다 실시하였다. 사이토카인류의 첨가는 배지 교환마다 실시하고, 그 양은 표-4 에 나타내는 바와 같다.

**[표 -4]**  
사이토카인의 첨가량

종 류	조제 농도	첨가량/4.0ml 배지	최종 농도	비 고
BMP-2	10 $\mu$ g/ml	8 $\mu$ l	(20ng/ml)	RSD 제조
OSM	25 $\mu$ g/ml	1.6 $\mu$ l	(10ng/ml)	상동
GDF-5	50 $\mu$ g/ml	0.8 $\mu$ l	(10ng/ml)	상동
TGF- $\beta$ 2	1 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ l	(5ng/ml)	상동
BMP-4	10 $\mu$ g/ml	8 $\mu$ l	(20ng/ml)	상동

또, 세포 분화의 판정은 이하에 기술하는 기준에 따라 실시하였다. 즉, 평활근에 대해서는, 현미경학적으로 단핵이고 방추형 (spindle shape) 을 나타내는 세포를 관찰하고, 또한 그 배양 세포 집단으로부터 추출한 단백질 혼합물로부터 평활근 세포에 특이적으로 발현되는 미오신 경쇄 키나아제 단백질 또는  $\alpha$ -액틴 단백질의 발현을 상기 기술한 WB 법으로 판정하였다. 지방 세포에 대해서는, 지방구를 형성하고 있는 단위당 (3.8mm<sup>2</sup>) 세포수를 측정하여, 그 평균값을 구하였다.

(2-2) 예 1~12 (예 1~5 는 참고예), 및 비교예 1~2 에 사용한 주화된 간엽계 줄기 세포 TBR31-2 는 상기 기술한 비특허 문헌 3 또는 4 에 기재된 바와 같이 1995 년에 수립되어, 지방 및 골 세포로의 분화능을 갖는 것이 나타났다. 본 발명자들은 동일한 주와 하기의 표-5 에 나타낸  $\alpha$ -MEM 배지와 높은 혈청 농도의 소 태아 혈청 (10% FBS) 을 사용하여 배양 조건을 상세하게 연구하여, 지방 및 골 세포에 평활근이나 내피 세포를 첨가한 4 개의 표현형으로 분화되는 능력을 갖는 줄기 세포인 것을 밝히고 (도 1a 및 표-6 참조), 또한 이들의 분화의 비율을, 무혈청 또는 저농도 혈청 0.7% FBS 의 RITC 배지와 사이토카인류에 따라 자유롭게 바꿀 수 있는 기술을 개발하였다 (예 1~5). 즉, 평활근 세포의 분화 마커인  $\alpha$ -액틴의 발현 (표-6 및 도 4(a) 참조) 과 지방 세포로의 분화의 결과가 나타내는 바와 같이 (예 1~5), 예 1 의 OSM 은 평활근 및 지방 세포로의 분화를 함께 억제하지만, 예 2 의 BMP-2 및 예 3 의 BMP-4 는 평활근 및 지방 세포로의 분화를 함께 촉진시킨다. 한편, 예 4 의 GDF-5 는 평활근으로의 분화를 억제하지만, 지방으로의 분화를 촉진시키고, 반대로 예 5 의 TGF- $\beta$ 2 는 평활근으로의 분화를 촉진시키지만, 지방 세포로의 분화를 억제한다.

**[표 -5]**  
 **$\alpha$ -MEM 배지**

항 목	첨가량/밀리 Q 물 1000ml	비 고
중탄산수소나트륨	2.2g	와코준야쿠 (특급)
$\alpha$ -MEM	10.1g	와코준야쿠 (특급)
2-메르캅토에탄올 (100mM)	0.25ml	시그마. No. M-6250
FBS (소 태아 혈청)	1.00ml	Gibco, BRL lot No. A0247611

**[표 -6]**

간엽계 줄기 세포 TBR 31-2 의 평활근, 골 및 지방 세포로의 분화에 미치는 사이토카인류의 영향(RITC 80-7, 37°C, 25 일간)

분화능	예 1	예 2	예 3	예 4	예 5	비교예 1
	OSM (10ng/ml) *	BMP-2 (20ng/ml)	BMP-4 (20ng/ml)	GDF-5 (100ng/ml)	TGF- $\beta$ 2 (10ng/ml)	
평활근 ( $\alpha$ -sm-Actin)	-	+++	+++	±	+++	++
지방 세포 **	0	413	689	117	0	15

\* : ( ) 안의 수치는 첨가한 배지 중의 최종 농도를 나타낸다.

\*\* : 3.8mm<sup>2</sup> 당 지방 세포수를 남김 없이 5 개소 측정하여, 그 평균값을 나타낸다.

기호 : 도 4(a) 에 의한, 평활근의 분화 마커  $\alpha$ -sm-액틴의 발현을 화학 발광에 의해 검출했을 때의 발현량의 정도를 나타낸다. ++++ : 상당히 강하게 발현, +++ : 강한 발현, ++ : 약간 강한 발현, + : 분명한 발현, ± : 약하지만 분명한 발현, - : 전혀 발현되어 있지 않다.

이와 같이, 분화의 방향을 사이토카인의 조합에 따라 자유롭게 제어할 수 있다. 표현법을 바꾸면, 미분화 상태에 있는 세포를 분화시키지 않고, 또는 기능적으로 분화된 세포라 하더라도 기능을 유지한 채 유지·증폭도 가능하다.

(2-3) 이들의 분화 제어는 연속적으로 사이토카인류를 공급한 것이지만, 반드시 연속적으로 사이토카인류를 공급할 필요가 없으며, 공급하는 타이밍을 선택하는 것에 의해서도 분화의 제어가 가능하다. 이에 대하여, TBR31-2 와 TBR10-1 주를 예로 구체적으로 서술한다.

(2-3-1) 이하에, TBR31-2 의 발육 단계를 도 2 에 따라 설명한다.

제 1 발육 단계 : 어리고 미숙한 세포의 돌기를 왕성하게 신장시키고 있으며, 또한 증식 단계에 들어가 있지 않은 세포.

제 2 발육 단계 : 세포수가 증대되기 직전의 단계에 있고, 또한 세포의 돌기를 왕성하게 신장시켜, 인접하는 세포의 돌기끼리의 접촉이 일어나기 직전~직후에 있으며, 세포 체적의 팽창이 최대가 된 세포.

제 3 발육 단계 전기 : 대수 증식적인 발육이 개시되어, 인접하는 세포의 돌기끼리의 접촉이 90% 이상 일어난 상태에 있는 세포로부터, 세포 본체끼리 완전히 접촉하여 증식되는 면적이 없는 상태를 100 으로 했을 때, 세포의 밀도가 60% 에 달한 상태에 있는 세포, 즉 60% 컨플루언트의 상태가 되는 세포.

제 3 발육 단계 후기 : 대수 증식적으로 활발하게 증식되고 있는 60% 컨플루언트 상태의 세포로부터 증식이 멈춘 100 컨플루언트 상태를 향해 가는 세포이면서, 또한 성숙한 세포를 향해 가고 있는 세포.

제 4 발육 단계 전기 : 100% 컨플루언트 상태에 있는 세포가, 아직도 조금 증식을 행하고 있어, 증식 정지 직전인 세포.

제 4 발육 단계 후기 : 세포의 증식 단계를 마친 성숙한 세포.

우선, 당해 주의 4 개의 발육 단계에 있어서의 OSM 의 평활근 및 지방 세포로의 분화에 미치는 영향에 대하여 서술한다. 평활근 및 지방 세포로의 분화 억제가 OSM 에 의해 일어난다는 것은 앞의 실시예 1 에서 나타난 바이지만, 평활근 세포와 골화 세포의 분화 억제는 발육 단계에서 다르다. 즉, 평활근 세포의 분화에 대하여, 24 일간 연속해서 OSM 을 공급하면, 평활근 세포로의 분화가 억제되지만 (예 6, 예 1 의 반복), 이 억제 효과는 제 3 발육 단계 후기 이후 중, 특히 제 4 발육 단계의 후기에만 공급했을 때에만 얻어진다 (예 8 과 12). 그러나, 제 1 내지 제 3 발육 단계 전기의 사이에서 연속적으로 OSM 을 공급하면, 평활근 분화가 역으로 촉진된다 (예 7). 한편, 지방 세포의 분화에 대하여, 24 일간 연속해서 OSM 을 공급하면, 지방 세포로의 분화가 억제되지만 (예 6), 이 억제 효과는 제 3 발육 단계 및 제 4 발육 단계 전기를 제외한 모든 발육 단계에서 억제된다 (예 7, 8, 9 및 12).

그러나, 제 3 발육 단계의 후기~제 4 발육 단계 전기에서 OSM 을 공급하면, 지방 세포로의 분화가 촉진된다 (예 10, 11).

이와 같이, 줄기 세포의 발육 단계에서의 평활근 세포로의 분화 억제는 증식 단계를 마친 성숙한 세포에서 일어나고 (제 4 발육 단계), 지방 세포로의 분화 억제는 증식을 마친 성숙한 세포에서 일어났다 (제 4 발육 단계 후기). 또, 평활근 세포로의 분화 촉진은 아직은 미숙한 상태에 있는 세포로부터 활발하게 증식되고 있는 대수 증식기에 있는 세포에서 일어나고 (제 1~3 발육 단계), 지방 세포로의 분화 촉진은 증식이 정지되기 직전의 성숙한 세포를 향해 가고 있는 세포에서 일어난다 (제 3 발육 단계 후기~제 4 발육 단계 후기). 결과는 표-7 (또는, 도 4(b)) 을 참조할 것.

[표 -7]

간엽계 줄기 세포 TBR31-2 의 평활근 및 지방으로의 분화에 미치는 OSM 의 효과 (RITC 80-7, 37℃, 24일간)

	발육 단계와 OSM 처리 (-)						분화능	
	제 1	제 2	제 3 전기	제 3 후기	제 4 전기	제 4 후기	평활근 ( $\alpha$ -액틴)	지방 세포
예 6							-	0 *
예 7							+++	8
예 8							+	2
예 9							++	1 2
예 10							++	1 9
예 11							++	3 0
예 12							+	5
비교예 2							++	1 6

\* : 3.8mm<sup>2</sup> 당 지방 세포수를 골고루 5 개소 측정하여, 그 평균값을 나타낸다.

기호 : 도 4(b) 에 의한, 평활근의 분화 마커  $\alpha$ -sm-액틴의 발현을 화학 발광에 의해 검출했을 때의 발현량의 정도를 나타낸다. +++ : 강한 발현, ++ : 약간 강한 발현, + : 분명한 발현, - : 전혀 발현되어 있지 않다.

이들의 결과가 나타내는 바와 같이, 줄기 세포의 발육 과정의 각 단계에 따라 사이토카인류의 효과가 다르고, 공급하는 타이밍을 선택함으로써 평활근 세포와 지방 세포로의 분화의 비율을 자유롭게 제어할 수 있다.

(2-3-2) 다른 세포주인 TBR10-1 을 예로 서술한다. 예 13~24 (예 13~17 은 참고예), 및 비교예 2 에서 사용한 주화된 간엽계 줄기 세포 TBR10-1 은 상기 기술한 비특허문헌 3 또는 4 에 기재되어 있는 바와 같은 것으로, 평활근 세포로 분화되는 것이 나타났다 (FEBS Letters 481 : 193-196, 2000). 본 발명자는 동일한 주와 표-5 에 나타내는  $\alpha$ -MEM 배지와 높은 혈청 농도의 소 태아 혈청 (10% FBS) 을 사용하여 배양 조건을 상세하게 연구하여, 평활근 세포 외에 골화 세포 및 내피 세포로 분화된다는 것을 발견하고, 3 개의 표현형으로 분화되는 능력을 갖는 다능성 줄기 세포라는 것을 밝혔다 (도 1-b 및 표-8 참조). 또한, 이들의 분화의 비율을, 무혈청 또는 저농도 혈청 0.7% FBS 의 RITC 배지와 사이토카인류에 따라 자유롭게 바꿀 수 있는 기술을 개발하였다.

[표 -8]

간엽계 줄기 세포 TBR 10-1 의 평활근, 골로의 분화에 미치는 사이토카인류의 영향 (RITC 80-7, 37℃, 14 일간)

분화능	예 13	예 14	예 15	예 16	예 17	비교예 3
	OSM (10ng/ml) *	BMP-2 (20ng/ml)	BMP-4 (20ng/ml)	GDF-5 (100ng/ml)	TGF- $\beta$ 2 (10ng/ml)	
평활근 (sm-MLCK)	-	++	++	++	-	±
골화 (AIP 활성의 세포%)	10	0	2	9	0	0

\* : ( ) 안의 수치는 첨가한 배지 중의 최종 농도를 나타낸다.

기호 : 도 5(a) 에 의한, 평활근의 분화 마커 sm-MLCK 의 발현을 화학 발광에 의해 검출했을 때의 발현량의 정도를 나타낸다. ++ : 약간 강한 발현, ± : 약하지만 분명한 발현, - : 전혀 발현되어 있지 않다.

즉, 평활근 세포의 분화 마커인 미오신 경쇄 키나아제 단백질의 발현과 골화 세포로의 분화의 결과가 나타내는 바와 같이 (예 13~17 ; 표-8 및 도 5(a) 참조), 당해 주의 평활근으로의 분화는 OSM 과 TGF- $\beta$ 2 에 의해 저해된다. 그러나, BMP-2, BMP-4 및 GDF-5 의 존재 하에서는, 평활근으로의 분화를 촉진시킨다. 한편, 골화 세포로의 분화는 OSM 과 GDF-5 의

존재 하에서 촉진된다. 특히, OSM 에 의해 평활근과 골화 세포로의 분화가 서로 역방향으로 유도된다는 점에서, 골 분화와 평활근 분화는 밀접한 관계로 제어되어 있는 것을 의미하며, 골화와 평활근화의 분화능을 달리 하는 줄기 세포의 분화 단계가 복수 존재할 가능성이 있다.

TBR10-1 주의 예에서는, 당해 줄기 세포의 발육 과정은 도 3 에 나타내는 바와 같이 크게 4 개의 단계로 나눌 수 있다. 이하, 각 생육상(相) 에 대한 상세는, TBR32-1 의 생육상에 대한 설명을 참조할 것.

예 18~24 (하기 표-9 및 도 5(b) 참조) 에 나타내는 바와 같이, TBR10-1 주의 발육 과정의 각 단계에 따라 사이토카인류를 공급하면, 연속해서 공급했을 때와 전혀 다른 분화 방향을 나타낸다. 즉, 연속해서 BMP-2 를 공급하면, 평활근 분화가 우위하게 진행된다. 또, BMP-2 에 의한 평활근 분화의 촉진 효과는, 반드시 연속해서 공급할 필요가 없으며, 세포 증식이 활발한 제 3 발육 단계로부터 성숙한 세포가 있는 제 4 발육 단계에서도 우위하게 인정된다. 미성숙한 세포가 있는 제 1~2 발육 단계에서는, BMP-2 에 의한 평활근으로의 분화 촉진 효과는 관찰되지 않는다 (예 19).

**[표 -9]**

간엽계 줄기 세포 TBR 10-1 의 평활근의 분화에 미치는 BMP-2 의 효과 (RTTC 80-7, 33℃, 15일간)

	발육 단계와 BMP-2 처리 (-)						분화능 평활근 ( $\alpha$ -MLCK)
	제 1	제 2	제 3 전기	제 3 후기	제 4 전기	제 4 후기	
예 18							+++
예 19							+
예 20							++
예 21							++
예 22							++
예 23							++
예 24							++
비교예 4							±

기호 : 도 5(b) 에 의한, 평활근의 분화 마커  $\alpha$ -sm-액틴의 발현을 화학 발광에 의해 검출했을 때의 발현량의 정도를 나타낸다. +++ : 강한 발현, ++ : 약간 강한 발현, + : 분명한 발현, ± : 약하지만 분명한 발현, - : 거의 발현되어 있지 않다.

이상으로부터, 본 발명에 따르면, 예컨대, OSM 의 지방 세포로의 분화에 대한 효과의 예 (예 6~12) 에 나타내는 바와 같이, 줄기 세포의 배양계를 마이크로웰 등을 사용하여 분화 유도 물질이나 억제 물질 등의 신약을 개발하는 경우, 줄기 세포의 어느 발육 단계를 선택하여 신약을 평가하는지가 중요하고, 선택하는 발육 단계에 따라, 스크리닝되는 검체의 평가가 전혀 반대의 결과가 된다. 또, 재생 의료 분야에 있어서의 세포 이식용으로서 세포를 제공하는 경우, 이들 사이토카인류의 종류의 선택이나 농도, 첨가의 타이밍을 제어하여 배양함으로써, 최적의 분화 단계에 있는 세포의 제공이 가능해진다. 예컨대, 혈관을 구성하는 내피 세포와 평활근으로의 적당한 분화도를 겸비하거나, 또는 내피 세포, 평활근 및 심근의 적당한 분화 정도를 겸비한 세포의 제공이 가능하다.

예 25 : 세포주 TBR52 가 다능성을 갖는지의 확인

(1) 본 실시예에서는 세포주 TBR52 (상기 기술한 비특허문헌 3 및 4 참조.) 를 사용하고, 배지는 하기의 표-10 에 나타나는 조성을 갖는  $\alpha$ -MEM 배지를 사용하였다.

**[표 -10]**

$\alpha$ -MEM 배지

항 목	첨가량/밀리 Q 물 1000ml	비 고
중탄산수소나트륨	2.2g	와코순야쿠 (특급)
$\alpha$ -MEM	10.1g	와코순야쿠 (특급)

2-메르캅토에탄올 (100mM)	0.25ml	시그마. No. V-6250
FBS (소 태아 혈청)	1.00ml	Gibco, BRL lot No. A0247611

(2) TBR52 의 분화능

이하에 기재하는 웨스턴 블로팅법 (WB), 면역 염색법 및 역전사 폴리머라아제 연쇄 반응 (RT-PCR) 법 등의 동종 방법의 조합에 따라 동정하였다. (2-1) 평활근 세포에 대해서는, 35mm 플라스틱 디쉬에 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 단핵이고 방추형 (spindle shape) 을 나타내는 세포를 관찰하여, 그 배양 세포 집단으로부터 추출한 단백질 혼합물로부터 평활근 세포에 특이적으로 발현되는 미오신 경쇄 키나아제 (sm-MLCK) 를 검출하기 위해, SDS 폴리알킬아미드겔 전기영동에 의해 단백질을 분리하고, 분리된 겔 상의 단백질을 멤브레인에 전사하고 (WB 법), 멤브레인 상의 sm-MLCK 에 특이적으로 반응하는 1 차 항체 (Sigma 제조, Monoclonal Anti-Myosin Light Chain Kinase, mouse IgG2b, clone K36, Product No. M7905) 와 이것을 검출하기 위한 호스래디쉬 퍼옥시다아제 (HRP) 로 표식한 2 차 항체 (ICN 제조, Goat, anti-mouse IgGF(ab)2, IgG, 카탈로그 No. 55553) 를 사용함으로써 동정하였다.

(2-2) 골격근 세포에 대해서는, 35mm 플라스틱 디쉬에 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 다핵이고 근관 (myotube) 형상, 또한 횡문근형 (橫紋筋型) 구조를 나타내는 세포를 관찰하여 확인하고, 상기 기술한 바와 동일한 방법에 따라 배양 세포 집단으로부터 추출한 단백질 혼합물로부터 골격근 세포에 특이적으로 발현되는 속근형 골격근 미오신 중쇄 II (skeletal Myosin Heavy Chain II, fast) 를 SDS 폴리알킬아미드겔 전기영동에 의해 단백질을 분리하고, 당해 미오신 중쇄 II 에 특이적으로 반응하는 1 차 항체 모노클로날 항-골격 미오신 (Monoclonal Anti-Skeletal Myosin) (fast) (Sigma 제조, mouse IgG, clone MY32, M4276) 와 이것을 검출하기 위한 호스래디쉬 퍼옥시다아제 (HRP) 로 표식한 항마우스의 2 차 항체 (ICN 제조, Goat, anti-mouse IgGF(ab)2, IgG, No. 55553) 를 사용함으로써 동정하였다. 배양 디쉬 중의 세포핵의 관찰은 배양액을 제거한 후, 농도 1g/ml 로 조제한 염색액 요오드화프로피디움 (PI) 을 첨가하여, 염색액과의 반응 처리를 실온에서 5 분간 실시하고, 염색액을 제거하여 인산 완충액 (PBS) 을 사용하여 세정하였다. PBS 에 의한 세정 처리는 각각 5 분간, 3 회 실시하였다.

또, 속근형 골격근 미오신 중쇄 II 단백질 발현의 확인은 통상적인 방법에 따라 면역 염색에 의해 실시하였다. 구체적으로는, 35mm 플라스틱 디쉬 내의 25mm 폴리-L 리신 (Poly-L lysine) 코트 커버 글라스 (4925-040, 아사히 테크노 글라스, 동경) 상에 배양한 세포 집단을 인산 완충액 (PBS) 을 사용하여 세정하고, 2.5% 파라포름알데히드를 1.5ml 사용하여, 4℃ 하에서 15 분간 고정시켰다. PBS 에 의해 5 분간, 3 회 세정한 후, 0.1% Triton X-100 을 포함하는 1.5ml 의 PBS 를 사용하여, 실온 하에서 3 분간의 천공 처리를 실시하였다. PBS 를 사용하여, 5 분간 3 회 세정한 후, 5% 탈지유를 포함하는 PBS (이하, 5% 탈지유-PBS 라고 기재함) 1.5ml 를 첨가하여, 4℃ 하에서 30 분간 처리하였다. 상기 기술한 속근형 골격근 미오신 중쇄 II 에 특이적으로 반응하는 항체 모노클로날 항-골격 미오신 (Monoclonal Anti-Skeletal Myosin (fast)) (Sigma 제조, mouse IgG1, clone MY32, Product No. M4276) 을 5% 탈지유-PBS 로 1:50 으로 희석하고, 이것을 1 차 항체로서 사용하였다. 앞의 30 분간 처리에서 사용한 5% 탈지유-PBS 1.5ml 를 이 1 차 항체 1.5ml 로 치환하고, 4℃ 하에서 약 14 시간 반응시켰다. 그 후, PBS 를 사용하여, 5 분간 3 회 세정하였다. 2 차 항체로는 5% 탈지유-PBS 를 사용하여, 플루오레신 이소티오시아네이트 (Fluorescein Isothiocyanate) (FITC) 표식의 항마우스 항체 (Sigma 제조, Goat, anti-mouse IgG-Fab, F8711) 를 1:200 으로 희석하였다. 이 2 차 항체 1.5ml 를 사용하여, 4℃ 하에서 30 분간 반응시키고, 이어서 PBS 를 사용하여 5 분간 3 회 세정한 후, 반전하여 VECTASHIELD (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) 를 사이에 두어 슬라이드 글라스 상에 마운트하였다. 도립 형광 현미경을 사용하여 속근형 골격근 미오신 중쇄 II 의 단백질 발현을 확인하였다.

(2-3) 심근 세포에 대해서는, 35mm 플라스틱 디쉬에 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 단핵이고 곤봉 형상 (rod shape) 의 형태를 가지며, 자율적으로 주기적인 수축 (박동) 을 하는 세포를 관찰하여, WB 법을 사용하여 상기 기술한 바와 동일한 순서에 따라, 심근 특이적인 코넥신 43 단백질의 발현을 확인하였다. 단, 1 차 항체로서 항코넥신 43 (Chemicon 제조, 제품 No. MAB3068) 을 사용하고, 2 차 항체로는 항마우스의 2 차 항체 (ICN 제조, Goat, anti-mouse IgG F(ab')2, 1gG No. 55553) 를 사용하였다. 또한, RT-PCR 법에 따라 Nk×2.5 유전자, α 미오신 중쇄 유전자의 발현을 확인함으로써 동정하였다.

그 수순은 RT-PCR 키트 (GibcoBRL 제조, 상품 No. 11904-018) 에 첨부된 매뉴얼에 따랐다. 배양 디쉬 중의 배양액을 제거하고, 디쉬 바닥에 부착된 세포를 PBS 로 3 회 세정하였다. 이 세정한 세포 중의 총 RNA 를, RNA 추출 시약 Isogen (닛폰진 제조) 을 사용한 티오시안산구아니딘 · 페놀 · 클로로포름법에 따라 회수하였다. 이어서, 회수한 2.5μg 의 토탈

RNA 를 RT-PCR 키트에 첨부된 매뉴얼에 따라, Oligo (dT) 법에 따라 cDNA 를 작성하고, DEPC 수 (水) 로 10 배로 조정하였다. 이 cDNA 1 $\mu$ l 를 주형으로 하여 10 배 PCR 완충액 1 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 1 $\mu$ l, 8mM dNTP 0.5 $\mu$ l, 포워드 프라이머 (Forward Primer) (10pmol/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, 리버스 프라이머 (Reverse Primer) (10pmol/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (어플라이드 바이오 시스템 제펜, 동경) 0.1 $\mu$ l, 및 DEPC 수 5.4 $\mu$ l 의 전량 10 $\mu$ l 의 반응액을 조제하여 유전자의 증폭 반응 (PCR) 을 실시하였다. PCR 은 GenAmp 9700 서멀 사이클러 (어플라이드 바이오 시스템 제펜, 동경) 을 사용하여, 95 $^{\circ}$ C 5 분 후의 사이클수는 30 회에서 각각의 조건으로 실시하였다. 그 후, 2% 아가로오스겔에 표준 마커와 함께 전기 영동하여, PCR 산물을 UV 광 아래에서 확인하였다. 유전자의 증폭 반응에 사용한 각각의 프라이머의 염기 서열은 하기와 같다.

유전자 포워드 프라이머 리버스 프라이머

Nk $\times$ 2.5 CCGCCGCCTCCGCCAACAGCAACT<sup>1)</sup>GGGTGGGTGGGCGACGGCAAGACA<sup>2)</sup>

$\alpha$  미오신 중쇄 GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG<sup>3)</sup>CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG<sup>4)</sup>

1) 서열 번호 : 1, 2) 서열 번호 : 2, 3) 서열 번호 : 3, 4) 서열 번호 : 4

(2-4) 내피 세포에 대해서는, 35mm 플라스틱 디쉬에 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 포석 (cobblestone) 형상의 형태를 나타내는 세포를 관찰하고, 1,1'-디옥타데실-3,3,3'-테트라메틸인도카르보시아닌퍼클로레이트 포식 아세틸화 저밀도 리포프로테인 (DiI-Ac-LDL : 제품 No. L-3484, Molecular Probes 제조, USA) 의 주입능을 확인함으로써 동정하였다. 구체적으로는, 배양 디쉬 중의 배양액을 세포에 흡집을 내지 않도록 완전히 흡수해서 버리고, 무혈청 배지에서 10 $\mu$ g/ml 로 조제한 DiI-Ac-LDL 을 첨가하여 4 시간, 33 $^{\circ}$ C 에서 배양하였다. PBS 로 5 분간 3 회 세정함으로써 주입되지 않은 DiI-Ac-LDL 을 제외하고, 3% 포름알데히드 용액을 첨가하여, 20 분간 실온에 방치하여 고정시켰다. 증류수로 세정한 후, 로다민 필터를 사용하여, 형광 현미경으로 관찰하였다.

(2-5) 지방 세포에 대해서는, 배양한 세포 집단 중에 현미경학적으로 지방구를 가진 세포를 관찰하고, 오일 레드 염색법에 따라 동정하였다. 배양 디쉬 중의 배양액을 제거하고, 디쉬 바닥에 부착된 세포를 PBS 로 8 분간씩 8 회 세정한 후, 3% 의 포르말린 용액을 사용하여, 10 분간 실온에 정치하여 고정시키고, 이어서 80% 의 이소프로판올에 의해 1 분간 치환하여, 37 $^{\circ}$ C 에서 10 분간, 오일 레드로 염색하였다. 또한, 60% 이소프로판올을 사용하여 1 분간 분별한 후, 3 분간씩 2 회 세정하고, 마지막으로 핵 염색을 위해 마이어의 헤마톡실린 용액 (와코 제조) 에 의해 10 분간 처리하고, 2 분간 흐르는 물로 세정한 후, 현미경학적으로 붉게 물든 지방 세포를 확인하였다. 또, 이 지방 세포는 성숙되면 명확한 지방구를 가진 세포로 발육되기 때문에, 염색하지 않아도 지방 세포로서 용이하게 판정할 수 있었다.

실시에 26~30 : 사이토카인에 의한 분화의 제어

시험해야 하는 사이토카인은, 하기의 표-11 에 나타나는 조성을 갖는 RITC80-7 배지에 첨가하여, 각 사이토카인의 첨가 효과를 확인하였다.

**[표 -11]**  
RITC80-7 배지

항 목	첨가량/밀리 Q 물 1000ml	비 고
수산화나트륨	0.3g	와코준야쿠 (특급)
중탄산나트륨 (특급)	1.4g	와코준야쿠 (특급)
HEPS	3.3g	시그마. No. H-3375
PITC80-7	9.83g	아사히 테크노 글라스 No.
트랜스페린 (10mg/ml)	1ml	ITOHAM FOODS INC.No. 30601293
rh EGF (10 $\mu$ g/ml)	1ml	RSP No. 236-EG-200
인슐린 (1mg/ml)	1ml	Shimizu Seiyaku Co. Ltd. Batch No. DC18B
FBS (소 태아 혈청)	20ml	Gibco, BRL lot No. A0247611



RITC80-7 배지를 사용하여, TBR52 를 90mm 플라스틱 디쉬에서 세포끼리 서로 달라붙기 직전의 서브컨플루언트 상태 (80% 정도의 컨플루언트) 까지 배양하였다. 배양액을 제거한 후에, 1ml 의 EDTA · 트립신 용액 (0.02g EDTA · 3Na/100 ml 의 PBS 용액, 0.002g 트립신/100ml 의 PBS 용액) 을 첨가하여 세포를 세정하였다. 이 세정 조작은 세포가 박리되기 전에 신속하게 2 회 실시하지만, 트립신 용액을 첨가하여, 남김 없이 세포 표면에 펼쳐진 직후에 트립신 용액을 파스퇴르 피펫으로 신속하게 흡수하여 제거하였다. 이어서, 현미경으로 세포가 완전히 박리되어 있는 것을 확인한 후, 표-10 에서 나타난 α-MEM 배지를 첨가하여, 세포 농도를 3×10<sup>5</sup>/ml 로 조제하였다. 이 세포 부유액 1.5ml 를 35mm 플라스틱 디쉬에 첨가하였다. 이 때, 35mm 플라스틱 디쉬에는, 25mm 폴리-L-리신(Poly-L lysine) 코트 커버 글라스 (4925-040, 아사히 테크노 글라스, 동경) 를 미리 깔아 두었다. α-MEM 배지를 첨가하고 24 시간 후에 새로운 α-MEM 배지로 교환하였다. 배지 교환은 2 일 또는 3 일마다 30 일간 실시하였다.

세포의 분화능에 미치는 사이토카인류의 첨가의 결과에 대하여, 세포 배양에는 α-MEM 배지를 사용하여, α-MEM 배지를 첨가하고 24 시간 후에 새 α-MEM 배지로 교환하였다. 배지 교환을 2 일 또는 3 일마다 30 일간 실시하였다. 사이토카인류의 첨가는 배지 교환시마다 실시하고, 그 양은 하기의 표-12 에 나타내는 바와 같았다.

**[표 -12]**  
사이토카인의 첨가량

종 류	조제 농도	첨가량/1.5ml	최종 농도	비 고
BMP-2	10μg/ml	3μl	(20ng/ml)	RSD 제조
OSM	25μg/ml	0.6μl	(10ng/ml)	상동
GDF-5	50μg/ml	0.3μl	(10ng/ml)	상동
TGF-β 2	1μg/ml	7.5μl	(5ng/ml)	상동
BMP-4	10μg/ml	3μl	(20ng/ml)	상동

또, 세포 분화의 판정은 이하에 기술하는 기준에 따라 실시하였다. 즉, 평활근에 대해서는, 현미경학적으로 단핵이고 방추형 (spindle shape) 을 나타내는 세포를 관찰하고, 단면적당 차지하는 면적을 육안으로 측정하여, 그 평균값을 % 로 나타냈다. 또한, 그 배양 세포 집단으로부터 추출한 단백질 혼합물로부터 평활근 세포에 특이적으로 발현되는 미오신 경쇄 키나아제 단백질의 발현을 상기 기술한 WB 법으로 판정하였다. 골격근에 대해서는, 현미경학적으로 다핵이고 근골 (myotube) 형상, 또한 횡문근형 구조를 나타내는 세포를 관찰하고, 단면적당 차지하는 면적을 육안으로 측정하여, 그 평균값을 % 로 나타냈다. 또한, 배양 세포 집단으로부터 추출한 단백질 혼합물로부터 골격근 세포에 특이적으로 발현되는 속근형 골격근 미오신 중쇄 II (skeletal Myosin Heavy Chain II, fast) 단백질의 발현을 상기 기술한 WB 법으로 판정하였다. 이들 WB 법의 결과를 나타내는 도면을 대신하여 사진을 도 6 으로서 나타낸다. 심근 세포에 대해서는, 현미경학적으로 단핵이고 곤봉형상 (rod shape) 의 형태를 갖고, 자율적으로 주기적인 수축 (박동) 을 하는 세포를 관찰하고, 단위 면적당 자율적, 주기적으로 박동하는 가늘고 긴 혼방 형상의 세포수를 계수하여, 그 평균값을 구하였다. 내피 세포에 대해서는, 현미경학적으로 포석 (cobblestone) 형상의 형태를 나타내는 세포를 관찰하고, 단면적당 차지하는 면적을 육안으로 측정하여, 그 평균값을 % 로 나타냈다. 지방 세포에 대해서는, 지방구를 형성하고 있는 단위당 세포수를 측정하여, 그 평균값을 구하였다. 결과를 표-13 및 표-14 에 정리하여 나타낸다.

**[표 -13]**  
다능성 줄기 세포의 분화능

분화능	실시에 2 BMP-2	실시에3 OSM	실시에 4 GDF-5	실시에 5 TCF-β 2	실시에 6 BMP-4	비교예
평활근 형상 세포 (%)	25	30	24	10	30	20
골격근 형상 세포	3.2	0	4.0	0	3.0	4.4
심근 (박동 세포수)	27.8	1.2	4.8	0	1.4	2.5
내피 (%)	32	76	67	73	74	75

지방 세포수	5.6**	0	14.0	0	101.8	8.2
--------	-------	---	------	---	-------	-----

단위 면적 : 3.8mm<sup>2</sup>, \*\*: 미성숙

**[표 -14]**  
WB 의 결과 (도면-1 의 전기)

분화능	실시에 2 BMP-2	실시에3 OSM	실시에 4 GDF-5	실시에 5 TCF-β 2	실시에 6 BMP-4	비교예
평활근 세포	++	++	++	±	+	++
골격근 세포	+++	-	+	++	±	++

표-13 및 표-14 로부터 명백한 바와 같이, 예 26 에서 배지에 BMP-2 를 첨가하면, 심근 세포로의 분화는 첨가하지 않는 비교예의 약 10 배까지 촉진되었다. 또, 골격근 세포로의 분화는 현미경학적인 형태 관찰에서는 심근 세포에 더이는 등 명확한 판정을 할 수 없었지만, WB 법의 분석 결과로부터 명백하게 촉진되었다. 평활근 및 내피 세포로의 분화는 BMP2 를 첨가해도 큰 영향을 받지 않았다. 지방 세포로의 분화는 세포수에서는 비교예와 거의 차이가 없지만, BMP2 를 첨가함으로써, 작은 지방구를 가진 미숙한 세포가 관찰되어 지방 세포로의 분화가 억제되어 있었다.

예 27 에 있어서, 배지에 OSM 을 첨가하면, 심근 세포로의 분화가 비교예의 1/2 까지 억제되었다. 또, 골격근 및 지방 세포로의 분화는 거의 완전히 억제되어, 현미경학적인 형태적 관찰로부터도 다핵이고 근관 (myotube) 형상인 골격근 및 지방구를 포함하는 지방 세포는 확인되지 않았다. 골격근 세포의 분화에 대한 이 억제 효과는 WB 법에 의한 속근형 골격근 미오신 중쇄 II 단백질 발현의 해석으로부터도 확인할 수 있었다. 지방 세포로의 분화도 OSM 의 첨가에 의해 억제되었다. 그러나, 평활근과 내피 세포로의 분화에 대하여는 거의 영향이 없었다.

예 28 에 있어서, 배지에 GDF5 를 첨가하면, 심근 세포 및 지방 세포로의 분화가 겨우 촉진되었다. 그러나, GDF5 의 첨가는 골격근 세포에 특이적인 속근형 골격근 미오신 중쇄 II 단백질 발현을 억제하였다. 평활근 및 내피 세포의 분화는, GDF5 의 첨가에 의해 영향받지 않았다.

또, 예 29 에 있어서, 배지에 TGF-β2 를 첨가하면, 평활근, 심근 및 지방 세포로의 분화는 억제되었지만, 내피 세포로의 분화는 영향받지 않았다. 골격근 세포로의 분화는, 현미경에 의한 형태학적 관찰로부터, 전혀 골격근 세포의 형태를 나타내는 세포를 관찰할 수 없었지만, 골격근 세포에 특이적인 속근형 골격근 미오신 중쇄 II 단백질 발현이 WB 법에서는 촉진적이었다. 그러나, 이 단백질 발현에 대하여는 현시점에서는 명확한 설명을 할 수 없지만, 골격근 세포로의 분화의 과정에서 일어나는 형태학적인 세포 융합과 골격근 분화의 초기 유도기의 관계를 밝히는 열쇠가 될지도 모른다.

또한, 예 30 에 있어서, BMP4 를 배지에 첨가하면, 무첨가의 비교예로부터 명백한 바와 같이, 지방 세포로의 분화가 10 배 이상의 비율로 촉진되었지만, 평활근 및 골격근 세포로의 분화는 WB 법에 의한 해석에 의해 억제된다는 것을 알 수 있었다. 또, 심근 세포의 특징인 자율적인 박동 세포수도 적어 심근 세포로의 분화는 억제되었다. 내피 세포로의 분화에 대한 BMP4 의 첨가는 거의 영향이 없었다.

이들의 결과는 다분화능을 갖는 줄기 세포에, 각종 사이토카인을 공급함으로써, 어느 특정한 세포로 분화의 방향을 우위하게 증폭시키거나 저감시킬 수 있는 것을 나타내며, 또한 첨가하는 사이토카인을 조합함으로써, 불필요한 세포를 억제하여, 목적으로 하는 세포만을 우위하게 증폭시키는 것이 가능하다는 것을 나타내고 있다.

**(57) 청구의 범위**

**청구항 1.**

다능성 줄기 세포를 발육시키는 과정에서, 이 세포와 작용제의 접촉을 통한 이 세포의 분화 유도 방법으로서,

이 세포와 작용제의 접촉이, 이 세포의 i) 제 1 발육 단계, ii) 제 2 발육 단계, iii) 제 3 발육 단계 전기, iv) 제 3 발육 단계 후기, v) 제 4 발육 단계 전기 및 vi) 제 4 발육 단계 후기로 이루어지는 발육 페이즈의 최대 4 개의 페이즈에서 실시되고, 그리고,

이 작용제가 이 세포를 적어도 2 개의 방향으로의 세포의 분화를 촉진 및/또는 억제할 수 있는 물질인 것을 특징으로 하는 세포의 분화 유도 방법.

## 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 다능성 줄기 세포가 골수 간질 세포인 세포의 분화 유도 방법.

## 청구항 3.

제 2 항에 있어서, 골수 간질 세포가, 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자를 담지하는 트랜스제닉 마우스 유래인 세포의 분화 유도 방법.

## 청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 세포의 분화가, 적어도 평활근 세포, 골 형성 세포 및 지방 세포 중 어느 2 개의 분화 세포를 향해 가는 세포의 유도 방법.

## 청구항 5.

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제가, 세포 분화의 촉진 또는 억제를 가져올 수 있는 사이토카인인 세포의 유도 방법.

## 청구항 6.

제 4 항에 있어서, 사이토카인이, 온코스타틴 M (OSM), 골 형성 인자-2 (BMP-2), 골 형성 인자-4 (BMP-4), 그로스 디퍼렌시이션 팩터-5 (GDF-5) 및 트랜스포밍 증식 인자 (TGF- $\beta$ 2) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 세포의 유도 방법.

## 청구항 7.

다능성 줄기 세포를 발육시키는 과정에서, 이 세포와 작용제의 접촉을 통한 이 세포의 분화 유도 방법을 사용하는 작용제에 대한 세포 분화의 촉진 또는 억제능의 평가 방법으로서,

이 세포와 작용제의 접촉이, 이 세포의 i) 제 1 발육 단계, ii) 제 2 발육 단계, iii) 제 3 발육 단계 전기, iv) 제 3 발육 단계 후기, v) 제 4 발육 단계 전기 및 vi) 제 4 발육 단계 후기로 이루어지는 발육 페이즈의 최대 4 개의 페이즈에서 실시되고, 그리고,

이 작용제가 이 세포를 적어도 2 개의 방향으로의 세포의 분화를 촉진 및/또는 억제하는 것이 기대되는 후보 작용 물질인 것을 특징으로 하는 평가 방법.

### 청구항 8.

제 7 항에 있어서, 다능성 줄기 세포가, 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자를 담지하는 트랜스제닉 마우스 유래인 평가 방법.

### 청구항 9.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 후보 작용제에 의한 이 세포 분화의 정도가, 다능성 줄기 세포를 발육시키는 과정에서 이 세포가 이 세포 분화의 촉진 또는 억제를 가져올 수 있는 사이토카인과 접촉되어 가져오는 분화의 정도와 비교되는 평가 방법.

### 청구항 10.

제 9 항에 있어서, 사이토카인이, 온코스타틴 M (OSM), 골 형성 인자-2 (BMP-2), 골 형성 인자-4 (BMP-4), 그로스 디퍼렌시이션 팩터-5 (GDF-5) 및 트랜스포밍 증식 인자 (TGF- $\beta$ 2) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 평가 방법.

### 청구항 11.

제 1 항, 제 2 항 및 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 세포의 유도 방법에 따라 유도된 세포를 주체로 하는 재생 의료용 조제물.

### 청구항 12.

제 11 항에 있어서, 세포가 포유 동물 유래인 조제물.

### 청구항 13.

2 종 이상이 조합된 사이토카인을 유효 성분으로 하고, 또한 골수 간질 세포를 포함하는 다능성 줄기 세포의 3 이상의 분화의 방향성의 결정과 방향성이 결정된 각 세포에서의 분화의 정도를 제어할 수 있는 것을 특징으로 하는 포유 동물 세포의 분화를 제어하기 위한 사이토카인의 세트.

### 청구항 14.

제 13 항에 있어서, 다능성 줄기 세포가 골수 간질 세포이고, 분화의 방향성이 3 이상인 사이토카인의 세트.

### 청구항 15.

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 상기 분화의 방향성이, 평활근 세포, 골격근 세포, 심근 세포, 내피 세포 및 지방 세포를 향해 가는 것으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 사이토카인의 세트.

### 청구항 16.

제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 분화의 정도가, 혈청의 존재 하에서 초래되는 분화 중 어느 하나에 비해 적어도 10% 촉진 또는 억제되는 사이토카인의 세트.

**청구항 17.**

제 13 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 2 종 이상이 조합된 사이토카인이, 골 형성 인자-2 (BMP-2) 골 형성 인자-4 (BMP-4), 온코스타틴 M (OSM), 그로스 디퍼렌시에이션 팩터-5 (GDF-5) 및 트랜스포밍 증식 인자 (TGF- $\beta$ 2) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 사이토카인의 세트.

**청구항 18.**

제 17 항에 있어서, 조합된 사이토카인이, BMP-2 와 BMP-4, BMP-2 와 OSM, BMP-2 와 TGF- $\beta$ 2, BMP-2 와 BMP-4 와 OSM, OSM-BMP-4, OSM 과 TGF- $\beta$ 2, OSM 과 GDF-5, OSM 과 GDF-5 와 BMP-4, OSM 과 GDF-5 와 TGF- $\beta$ 2 와 BMP-4, BMP-2 와 OSM 과 GDF-5 와 BMP-4, 및 BMP-2 와 OSM 과 GDF-5 와 TGF- $\beta$ 2 와 BMP-4 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 사이토카인의 세트.

**청구항 19.**

제 13 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 골수 간질 세포가, BMP-2 에 의한 자극에 의해 적어도 평활근 세포, 박동하는 심근 세포 및 내피 세포로 분화될 수 있는 다능성 성체 줄기 세포인 사이토카인의 세트.

**청구항 20.**

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 골수 간질 세포가 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자를 담지하는 트랜스제닉 마우스 유래인 사이토카인의 세트.

**청구항 21.**

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 골수 간질 세포의 분화가, 인 비트로 (in vitro), 엑스 비보 (ex vivo) 및 인 비보 (in vivo) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 환경 하에서 유도되는 사이토카인의 세트.

**청구항 22.**

제 13 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 엑스 비보 또는 인 비보에서의 골수 간질 세포의 분화가 재생 의료에 있어서의 세포 이식시에 이용되는 것인 사이토카인의 세트.

**청구항 23.**

제 20 항에 있어서, 인 비트로에서의 골수 간질 세포의 분화가, 이 세포를 분화시킬 수 있는 능력을 갖는 작용제를 스크리닝하는데 이용되는 것인 사이토카인의 세트.

**청구항 24.**

(A) 온도 감수성 SV-40 T 항원 유전자를 담지하는 트랜스제닉 마우스 유래의 다능성의 골수 간질 세포를 준비하고,

(B) 이 세포를, 분화시킬 수 있는 능력을 가질 것이 기대되는 후보 작용제의 존재 하에서 이 세포를 증식시킬 수 있는 배지에서 배양하고,

(C) 배양 세포의 분화의 방향성 또는 분화의 정도를 결정하고, 그리고,

(D) 이렇게 결정된 분화의 방향성 또는 분화의 정도에 대한 결과를 이 작용제의 부존재 하에서의 이 세포의 배양 결과와 비교하여, 양 결과의 차이를 이 작용제가 골수 간질 세포의 분화능에 미치는 작용의 지표로 하는 것을 특징으로 하는 척추 동물 세포의 분화능을 갖는 약제의 스크리닝 방법.

### 청구항 25.

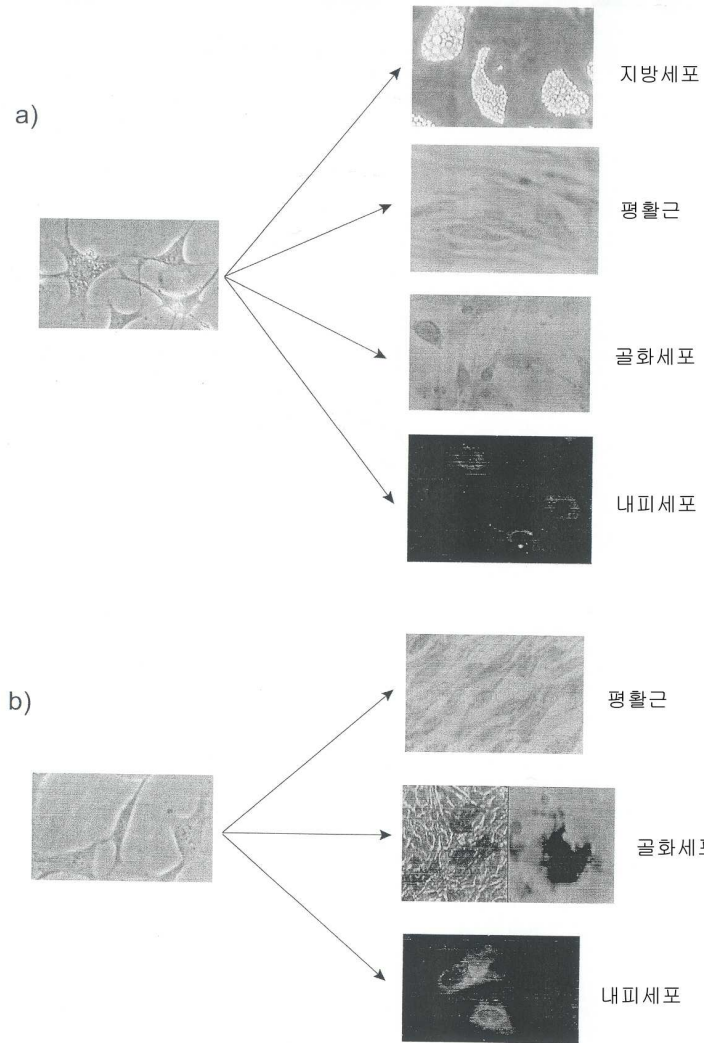
제 24 항에 있어서, 비교 작용제로서, BMP-2, BMP-4, OSM, GDF-5 및 TGF- $\beta$ 2 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2 종이 이용되는 방법.

### 청구항 26.

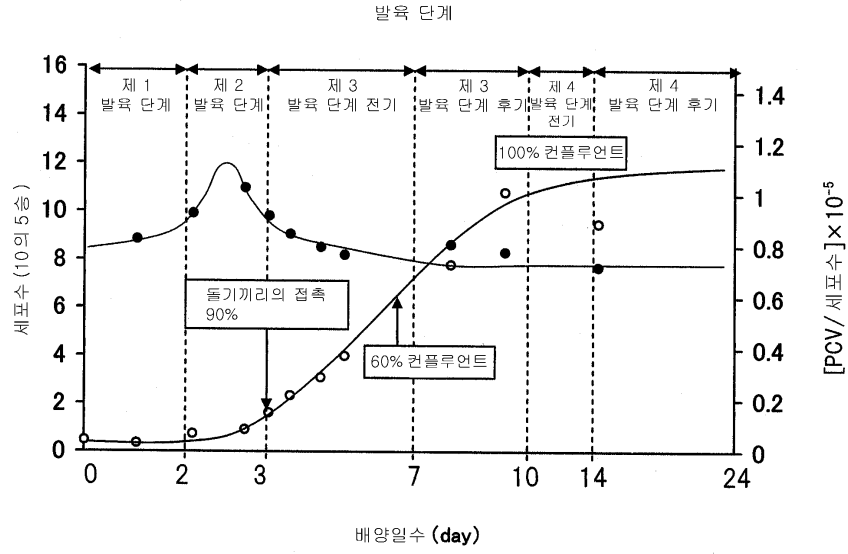
제 25 항에 있어서, 무혈청 배지에서 배양이 실시되는 스크리닝 방법.

도면

도면1

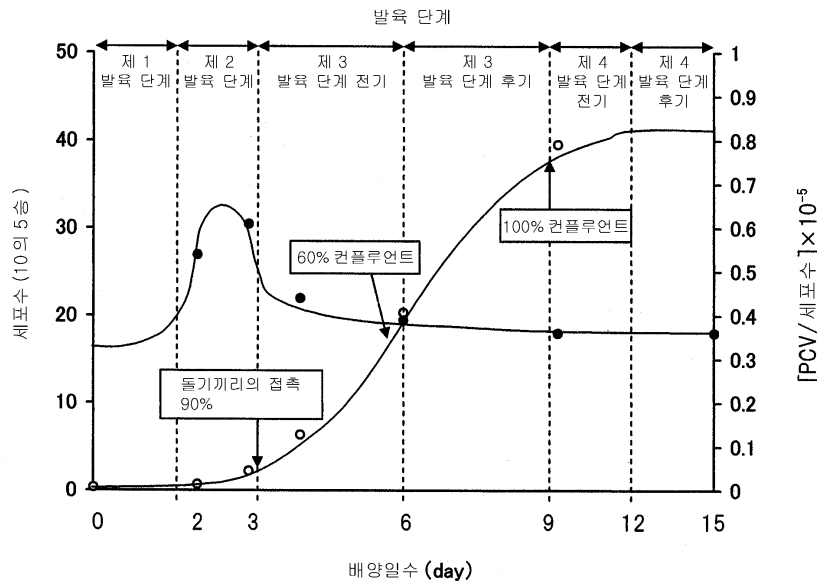


도면2



- 세포수
- Packed cell volume:PCV

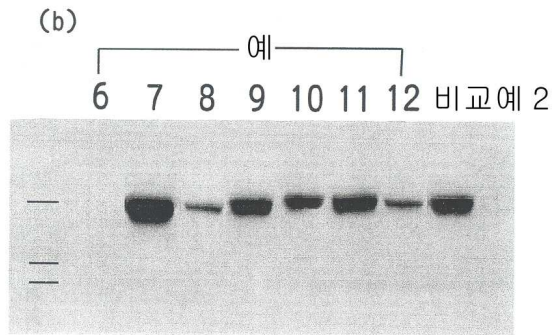
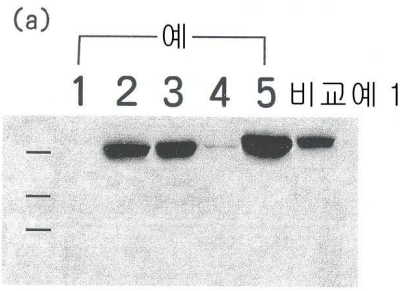
도면3



- 세포수
- Packed cell volume:PCV

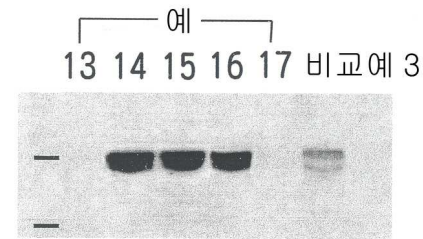


도면4

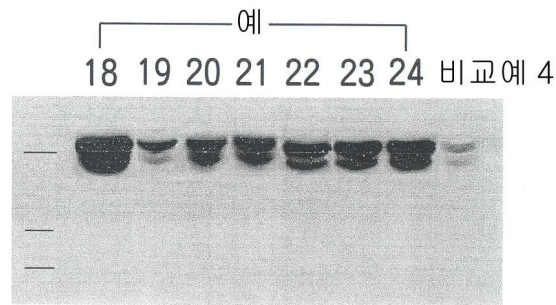


도면5

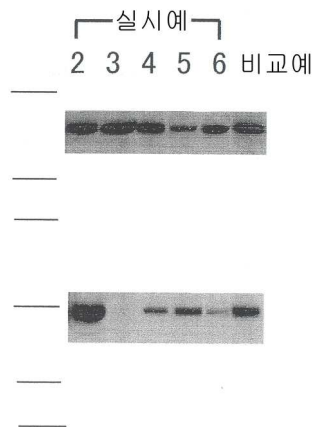
(a)



(b)



도면6



<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Control of stem cell differentiation induction and differentiation potency

<130> K-1JST-OS

<150> JP2003/83106

<151> 2003-03-25

<150> JP2003/95242

<151> 2003-03-31

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesis with reference to nucleotide sequence from 1108 to 1521 of mouse Nk X 2.5 gene

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223> NCBI Accession No.NM008700

<400> 1

ccgccgcctc cgccaacagc aact

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesis with reference to nucleotide requence from 1108 to 1521 of mouse Nk X 2.5 gene

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223> NCBI Accession No.NM008700

<400> 2

gggtgggtgg gcgacggcaa gaca

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesis with reference to nucleotide sequence from 5630 to 5931 of mouse gene encoding alpha Myosin heavy chain

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223> NCBI Accession No.M76601

<400> 3

ggaagagtga gcggcgcatac aagg

24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesis with reference to nucleotide sequence from 5630 to 5931 of mouse gene encoding alpha Myosin heavy chain

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(22)

<223> NCBI Accession No.M76601

<400> 4

ctgctggaga ggttattcct cg

22