



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월13일

(11) 등록번호 10-2202533

(24) 등록일자 2021년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0662 (2013.01)

C12N 2501/734 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0098269

(22) 출원일자 2019년08월12일

심사청구일자 2019년08월12일

(56) 선행기술조사문헌

NATURE COMMUNICATIONS | 7:13594 | DOI:
10.1038/ncomms13594(2016)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이진우

서울특별시 서초구 방배로26길 Elle Ville 402호

박광환

서울특별시 강남구 논현로51길 25, 1동 1804호(도곡동, 현대그린아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 8 항

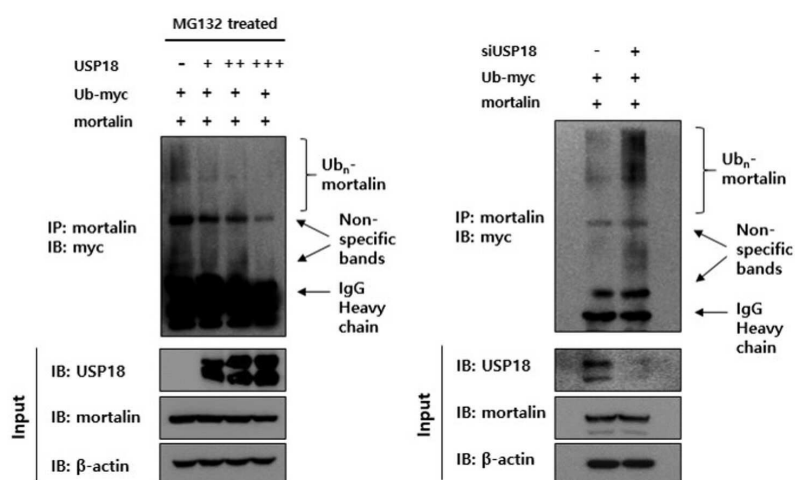
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 모르탈린(mortalin) 단백질을 이용하여 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 유지시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지시키는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 모르탈린(mortalin) 단백질의 발현을 조절하여 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 이를 통해 USP18-모르탈린 경로의 기전이 세포의 노화를 억제할 뿐 아니라, 세포의 성장 및 생존력을 증대시켜 중간엽 줄기세포를 대량으로 배양할 수 있게 함으로써, 인간 중간엽 줄기세포를 이용한 세포 치료제 개발에 중요한 역할을 하여 재생의학에 크게 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도12b



(52) CPC특허분류

C12N 2501/998 (2013.01)

(72) 발명자

천용민

서울특별시 서초구 서초대로 385, 6-302(서초동, 진흥아파트)

정민

서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 117동 1302호(남가좌동, DMC파크뷰자이)

김지현

인천광역시 남동구 논현로 235, 1006동 504호(논현동, 별빛마을웰카운티아파트)

이경미

경기도 고양시 일산동구 노루목로 80, 315동 402호(호수마을3단지아파트)

고은애

경기도 고양시 일산서구 강선로 70, 805동 104호(주엽동, 강선마을8단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1D1A1B07050973

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 탈유비퀴틴화 효소 USP18에 의한 인간 중간엽줄기세포의 노화 및 줄기세포능 조절기

전 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E8029722

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 유비퀴틴-프로테아솜 경로 조절을 통한 난치성 연골손상의 중간엽 줄기세포 치료제

개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 인비트로(in vitro) 상에서 줄기세포에 USP18의 발현 수준을 증가시키는 단계; 및
(b) 상기 USP18이 모르탈린(mortalin) 단백질과 유비퀴틴의 결합을 억제하는 단계;를 포함하는, 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 USP18은 모르탈린 단백질을 표적으로 하여 직접적인 결합을 유도하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 USP18의 발현 수준을 증가시키는 단계는, 상기 USP18을 줄기세포 내에 도입하는 방법, 상기 USP18을 암호화하는 유전자의 세포내 카피수를 증가시키는 방법, 상기 USP18을 암호화하는 염색체 상의 유전자의 발현조절 서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 USP18을 암호화하는 염색체 상의 유전자의 발현조절을 이보다 활성이 강한 서열로 교체하는 방법, 상기 USP18의 활성이 증가하도록 돌연변이된 유전자로, 염색체 상의 상기 USP18을 암호화하는 유전자를 대체하는 방법 및 상기 USP18의 활성이 강화되도록 상기 USP18을 암호화하는 염색체상의 유전자에 변이를 도입시키는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법에 의해 이루어지는 것인, 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포능은 자가 증식력(self-renewal), 또는 다분화능(multipotency)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

탈유비퀴틴화된 모르탈린(mortalin) 단백질을 유효성분으로 포함하고,
상기 탈유비퀴틴화는 탈유비퀴틴화 효소인 USP18로 유도되는, 줄기세포의 줄기세포능(stemness)유지용 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 9항에 있어서,
상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

제 9항에 있어서,
상기 줄기세포능은 자가 증식력(self-renewal), 또는 다분화능(multipotency)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모르탈린(mortalin) 단백질을 이용하여 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 유지시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 인간의 평균 수명이 늘어나면서 고령화로 인한 퇴행성 질환이 급격히 증가함에 따라 줄기세포를 이용한 세포 치료 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 중간엽 줄기세포는 1966년 Friedenstein 등에 의해 골수에서 처음 밝혀졌으며, 1970년 Caplan 등이 세포가 연골세포, 골세포, 근육세포로의 분화가 가능하다는 증거를 처음 제시하였고(Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol, 16:381-390, 1966.), 1990년대 초부터 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)란 용어가 사용되기 시작하였다. 중간엽 줄기세포들 중 골수 유래 중간엽 줄기세포가 처음으로 사용되었는데, 채취하기 쉽고 많은 양을 얻을 수가 있어서 현재 까지도 골수는 중간엽 줄기세포를 얻기 위해 가장 선호되는 조직이다. 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(human bone marrow stromal stem cells; hBMSC)는 자가 증식력(self-renewal)과 다분화능(multipotency)을 가지고 있는 것으로 잘 알려져 있으며, 이러한 특징을 통틀어 줄기세포능(stemness)이 있다고 표현한다. 이러한 특성 때문에 재생 의학 분야에서 각광을 받고 있다.

[0004] 성인 중간엽 줄기세포는 골수의 유헥세포에서 발견할 수 있고, 이들의 수는 배양된 중간엽 줄기세포와 비교하였을 때 매우 제한되어 있지만, 다양한 형태의 전구세포(cell progenitor type)가 존재하기에 조직 재생에 있어 긍정적인 영향을 줄 가능성이 있다고 보고되어 있다(Exp Hematol. 2002 Aug;30(8):896-904). 중간엽 줄기세포를 세포 치료에 사용하기 위해서는 장기간 체외 배양을 통한 대량 생산이 불가피하다. 이 과정에서 반복되는 계대 배양으로 인하여 줄기세포로서의 고유한 특성을 잃고, 동시에 분화된 세포로 그 특성이 변하게 되어 노화(senescence)하게 되고, 줄기세포능을 잃게 되는 문제점이 있다. 또한 배양을 통해서 세포를 증식시킬 때는 세균오염(bacterial contamination), 이종 위험(xenogenic risk), 또는 세포 변형(cellular transformation)의 위험에서 자유로울 수 없고, 중간엽 줄기세포의 분화능에 영향을 줄 수 있다. 이에 따라 공여자로부터 분리된 중

간엽 줄기세포가 세포 치료제로서 사용되기에는 많은 한계를 극복하여야 한다.

- [0005] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)의 경우 임상 적용을 위해서는 세포 배양을 통해 많은 양의 세포를 획득하는 것이 중요한 만큼, 이상적인 줄기세포 치료제를 개발하기 위해서는 미세 환경의 변화에 따라 세포 분화 능이 다르게 나타나는 특성을 고려한 각기 다른 분화 메커니즘에 대한 연구가 필수적으로 요구된다. 이러한 문제를 해결하고자 줄기세포의 특성을 유지시키기 위해 성장인자, 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor; FGF) 및 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF)를 성장매개체로 첨가하여 줄기세포능을 유지하는데 도움이 된다는 것을 밝혀냈으나, 그럼에도 FGF 존재하는 경우 hBMXC는 면역 거부를 증가시키는 문제점이 여전히 존재한다(Arthritis Rheum 2010;62:3815-25, stem Cells Transl Med 2012;1:771-82).
- [0006] 줄기세포의 분화를 조절할 수 있다면 해당 줄기세포나 그 줄기세포를 이용한 장기를 인공적으로 배양하여 신규 물질이나 제품의 안전성과 효능 실험 등을 효과적으로 수행할 수 있게 되며, 이는 동물들을 대상으로 실험하거나 일반인이나 환자들을 대상으로 임상 실험에 들어가는 시간과 비용을 줄일 수 있음을 의미하기에 본 발명의 연구 가치가 크다고 할 것이다. in vitro내 성공적인 줄기세포 배양을 위한 최적의 조건을 확립함과 동시에, 표준화된 방법을 제시하고자 본 발명의 발명자들은 중간엽 줄기세포의 분화 메커니즘의 단계에서 모르탈린(mortalin) 단백질의 발현을 조절하여 줄기세포능을 유지시키는 방법에 대하여 완성하기에 이르렀다.
- [0007] 따라서 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지시키는 방법에 관한 것이다. 이를 통하여 중간엽 줄기세포의 증식으로 충분한 수의 세포를 확보할 수 있게 하여, 향후 세포치료제 개발에 널리 활용되어 의학 및 보건 분야에서 크게 이용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지시키는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 모르탈린(mortalin) 단백질의 발현을 조절하여 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 유지시키는 방법에 관한 것이다. 이를 통해 세포의 노화를 억제할 뿐 아니라, 세포의 성장 및 생존력을 증대시켜 중간엽 줄기세포를 대량으로 배양할 수 있게 함으로써, 세포치료 또는 재생의학에 이용될 수 있다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0013] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서 "줄기세포(stem cell)"란, 미분화 세포로서 대칭 또는 비대칭적인 세포 분열 방식을 통해 특정한 기능을 가지는 세포로 분화 및 자가재생(self-renewal)을 유지할 수 있는 세포를 말한다. 태아의 발생 과정 중 모든 조직에 존재하고 성인에서는 골수, 상피조직 등 일부 조직에서 발견되고 있다. 줄기세포는 분화 가능한 세포의 종류에 따라 수정란이 첫 분열시 형성되는 전능성 줄기세포(totipotent stem cell)와, 초기 수정란세포가 분열하면서 여러 장기로 분화되기 전단계의 세포로서 태아나 성체의 모든 세포로 가는 만능성 줄기세포(pluripotent stem cell), 및 제한된 장기로만 분화가 가능한 다능성 줄기세포(multipotent stem cell)

로 분류된다.

- [0017] 본 발명의 일 구체예에서 "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)"란, 성체줄기세포의 한 종류로 다분화능을 가진 기질세포(가슴샘이나 골수 등의 기관에서 그 기능을 담당하는 세포나 조직(유조직)에 둘러싸고 지탱하는 세포)로 조골세포(뼈 세포), 연골세포, 근육세포, 지방세포(골수 지방 조직을 만드는 지방세포)를 포함한 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 지칭한다. 다시 말하면, 자기재생능력(self-renewal)과 줄기세포능(stemness)을 유지하면서 다양한 간엽 조직으로 분화할 수 있는 능력이 있는 세포를 말한다. 상기 줄기세포는 골수 외에 지방조직, 탯줄혈액(umbilical cord blood), 활막(synovial membrane), 활액(synovial fluid), 골막(periosteum), 진피(dermis), 골조직(trabecular bone), 슬개건하 지방부(infrapatellar fat pad), 그리고 근육 등에서도 추출이 가능하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 중간엽 줄기세포(MSC)는 혈액세포를 생성시키는 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell; HSC)와는 구별된다(Stem Cells Int.2016; 2016:3157365). 중간엽 줄기세포가 일차적으로 골수기질, 지방조직으로부터 유래하고, 분화될 계통이 정해진 세포(lineage-committed cells)로서 중간엽 계통(주로 지방세포, 연골세포, 골세포)으로 분화되는 것과 달리, 조혈줄기세포는 조직 특이적 줄기세포(조직 특이적 줄기세포는 제한된 분화능을 가지고 있으며 정상적으로는 해당 조직에 특이적인 한 종류의 세포 또는 몇 종류의 세포로만 분화함)의 한 특정 부류로서, 골수와 가슴샘에 존재하는 모든 조혈계통의 세포 즉, 골수성 세포와 림프구성 세포로 분화할 수 있다. 조혈줄기세포는 출산 시 태반과 제대혈에서 얻을 수 있고, 성인의 적골수(red bone marrow)에도 존재한다. 간, 비장, 근육 등 다른 조직에서도 낮은 빈도로 존재하지만, 이들의 기원과 정상적 조절작용과의 관련성에 대해서는 잘 알려져 있지 않다(줄기세포치료제 평가 가이드라인, 2014, 한국 식품의약품안전처).
- [0018] 상기 다양한 줄기세포들 각각은 비슷한 표현형(phenotype)을 가지고 있으나 증식 및 분화 잠재력에 있어서는 차이를 보일 수 있으며, 각 유래에서 줄기세포를 얻는 방법은 종래 당업계에 공지된 발명에 의할 수 있고 본 발명의 실시예의 방법에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에서 "인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(human bone marrow stromal stem cells; hBMSCs)"는 성체줄기세포의 일종으로 전체 골수 세포의 0.01%를 차지하고 있으며, 연골세포, 골격세포, 신경세포 등으로 분화를 할 수 있는 다능성(multipotency)세포를 말한다. 성인 공여자의 장골로부터 골수액을 얻은 후 추출할 수 있으며, 골수 유래 줄기세포를 얻는 방법은 종래 당업계에 공지된 발명에 의할 수 있고 본 발명의 실시예의 방법에 한정되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에서 "줄기세포능"이란, 조직에서 오랫동안 생존하며 자가 복제(self-renewal)하는 능력이 있고, 조직의 손상과 같은 상황에서 다시 분화 과정을 거쳐 필요한 세포군을 다시 만들 수 있는 분화 능력이 있음을 의미한다. 즉, 자가 증식력(self-renewal)과 다분화능(multipotency)을 가지고 있는 특성을 포괄하는 개념으로 줄기세포능(stemness)을 칭하며, 줄기세포의 자가 복제, 분화와 같은 과정은 세밀하게 조절된다.
- [0024] 본 발명은 USP18의 발현을 증가시킴으로써 모르탈린(mortalin) 단백질과의 직접적인 상호작용을 유도하여 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 유지시키는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에서 "유비퀴틴 프로테아좀 시스템(Ub-proteasome pathway; UPP)"이란, 생체 내 단백질 분해의 70-80%를 담당하는 시스템으로, 진핵세포 내에 존재하는 대부분의 단백질 분해를 조절함으로써, 단백질의 전환과 항상성을 담당한다. 뿐만 아니라, 세포 주기 진행, 스트레스에 대한 반응, 항원제시, 신호전달, 전사조절, DNA repair, 세포사멸, 그리고 세포 소 기관의 생합성 등 세포 내부의 조절 기능과 관련된 단백질의 분해를 선택적으로 중재함으로써 세포의 생리적 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 세 가지의 효소인 유비퀴틴 시작 효소(E1), 유비퀴틴 중합효소(E2), 유비퀴틴 결합효소(E3)에 의하여 분해하고자하는 단백질에 유비퀴틴이라는 단백질을 표지하게 되고, 표지된 단백질이 프로테아좀에 의해 분해되는 일련의 과정을 말한다. 이와 같은 기능으로 인하여, 중요한 역할을 하는 전사 인자 단백질을 탈유비퀴틴화 시킴으로써, 상기 전사 인자의 프로테아좀에 의한 분해를 억제할 수 있다. 또한, 상기 UPP는 표적 단백질로부터 유비퀴틴을 분해하여 표적 단백질을 안정화시키는 역할을 수행한다.
- [0028] 본 발명의 일 구체예에서 "탈 유비퀴틴화 효소(deubiquitinating enzymes; DUBs)"란, 유비퀴틴을 기질로부터 제거함으로써 프로테아좀의 작용을 종결시키는 효소를 말한다. 단백질로부터 모노유비퀴틴 또는 폴리유비퀴틴 체인을 제거하여 단백질과 다른 분자로부터 유비퀴틴을 분해함으로써, 단백질간 상호작용을 조절하는 프로테아제의 일종에 해당한다. 사람에게에는 대략 102개의 DUB 유전자가 있으며, 시스테인 프로테아제와 메탈로 프로테아제로 나뉜다. 그 중 시스테인 프로테아제에서 유비퀴틴 특이적 프로테아제인 USP(ubiquitin-specific peptidase)s는 현재 USP1 내지 USP54가 밝혀져 있다.

- [0030] 본 발명의 일 구체예에서 본 발명의 상기 USP18 단백질은 특이적 유비퀴틴 펩티다제(ubiquitin-specific peptidases)의 일종으로 UBP43으로도 불리우며, 유비퀴틴 부분을 가수분해할 수 있는 기능을 갖는 가수분해 효소(deubiquitinating enzymes; DUBs)이다. 기질에 결합된 유비퀴틴 분자를 가수분해하여 유비퀴틴 분자를 재사용하거나, 유비퀴틴 분자를 제거함으로써 기질의 프로테아솜(Proteasome)에 의한 분해를 방지하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에서 상기 USP18(ubiquitin specific peptidase 18) 단백질은 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 또는 상기 발현 벡터가 형질전환된 형질전환체를 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 USP18 단백질은 탈 유비퀴틴화 기능이 유지되는 경우라면 펩타이드 형태인 경우도 포함될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 아미노산 서열에 다른 아미노산, 펩타이드 등이 융합된 형태의 경우에도 USP18 단백질의 탈 유비퀴틴화 기능을 나타내는 한 모두 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서 상기 모르탈린 단백질(mortalin protein)은 HSPA9 (heat shock protein family A member 9), CSA, 포도당 조절 단백질(GRP75), 또는 펩타이드 결합 단백질 74 (PBP74)로도 알려져 있다. 모르탈린의 기능은 결합하는 단백질이 무엇인지에 의하여 혹은, 세포에서의 그 결합 위치에 의하여 결정되며, 일 예로 p53이 결합된 모르탈린은 p53의 핵으로의 전이를 억제함으로써 세포 사멸 유도제로서의 암억제기능을 비활성화시킨다. 모르탈린은 p21과 p53을 통해 세포 주기를 억제함으로써 세포 노화를 조절하기에 암 줄기 세포와 암 세포주에서 주로 연구되고 있다. 본 발명의 모르탈린 단백질은 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 또는 상기 발현 벡터가 형질 전환된 형질전환체를 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 단백질은 공지의 단백질 합성법 또는 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 상기 단백질을 형질전환된 숙주세포를 이용하는 경우, 본 발명의 상기 USP18 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조용 벡터를 숙주 세포에 형질도입하여 형질전환체를 제조한 뒤, 당업계에 공지된 임의의 방법을 적절하게 사용하여 상기 형질전환체를 배양할 수 있다. 이렇게 배양된 상기 형질전환체로부터 단백질은 당업계에서 공지된 원심분리, 크로마토그래피, 전기 영동 등의 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 아미노산 서열은 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들 조합에 의해 용이하게 변형될 수 있다. 따라서, 서열번호 1과 높은 상동성을 갖는 단백질, 예를 들면 상동성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상인 경우의 단백질도 본 발명의 상기 USP18 단백질에 모두 포함될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 상동성이란, 야생형(Wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열과 상기과 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(Bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용 가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드(Nucleotide) 단위체가 공유 결합에 의하여 길게 사슬모양으로 이루어진 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하는 것으로, 일정 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥을 지칭한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 USP18 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여 코딩 영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 상기 단백질과 동등한 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 적어도 하나의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구체예에서 "벡터"는, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 아데노바이러스

백터, 레트로바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터 같은 바이러스 백터 등이 포함된 군에서 선택된 하나 이상을 포함한다. 적합한 발현 백터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등과 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 상기 발현 백터는 목적하는 숙주세포에서 본 발명의 상기 USP18 단백질 또는 펩타이드가 발현되도록 할 수 있는 재조합 백터로서, 프로모터와 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하도록 연결되어 있을 수 있다. 상기 '작동 가능하도록 연결(Operably linked)'이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 이를 암호화하는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(Functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동 가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 백터와의 작동가능한 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다. 상기 발현 백터는 개시 코돈, 종결 코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현을 조절하는 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 암호화되는 서열과 함께 번역이 일어나는 서열인 인 프레임(In frame)에 위치하여야 한다. 본 발명의 상기 발현 백터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0050] 본 발명의 상기 발현 백터의 백본(Backbone)으로 사용할 수 있는 백터는 플라스미드 백터, 코즈미드 백터, 박테리오파지 백터 및 아데노바이러스 백터, 레트로바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터 같은 바이러스 백터 등이 포함된 군에서 선택된 하나 이상을 포함한다. 적합한 발현 백터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등과 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 상기 USP18 단백질을 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지는 않으며, 보다 구체적으로 플라스미드 DNA, 파아지 DNA, 상업적으로 개발된 플라스미드(pGEM® T 백터, pET22b, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pGEX-4T-1, pET, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 백터(레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백신니아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 백터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 상기 재조합 백터는 세포 내에 도입되어 단백질을 발현시키기 위한 수단으로서, 플라스미드 백터, 코즈미드 백터, 박테리오파지 백터 등 공지의 재조합 발현 백터를 사용할 수 있으며, 백터는 DNA 재조합 기술을 이용한 임의의 공지된 방법에 따라 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다.

[0054] 본 발명의 상기 형질전환은 DNA를 숙주 세포로 도입하여 DNA가 염색체 외의 인자로서 또는 염색체와 통합하여 완성됨으로써 복제 가능하게 되는 것을 지칭하는 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 상기 숙주 세포는 본 발명의 상기 발현 백터에 포함된 폴리뉴클레오티드에 의해 단백질을 생산할 수 있는 것이라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면, BL21 또는 DH5α 등의 대장균(E. coli), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포, 사카로마이세스 세레비자에, 스킴조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포, 피치야 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, 293 세포, 보우 멜라노마 세포, 줄기 세포 등의 동물 세포, 또는 식물 세포를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 중간엽 줄기 세포일 수 있고, 더욱 바람직하게는 골수 유래 중간엽 줄기 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명은 상기 재조합 백터와 모르탈린 단백질의 상호작용을 이용하여 중간엽줄기세포의 줄기세포능을 유지시키는 방법을 제공하여 세포치료제 연구를 위한 용도를 제공한다.

[0060] 본 발명의 일 구체예에서, 모르탈린(mortalin) 단백질과 유비퀴틴의 결합을 억제하는 단계;를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지하는 방법을 제공하고, 상기 억제는 탈유비퀴틴화 효소를 과발현시키는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공하며, 상기 탈유비퀴틴화 효소는 모르탈린 단백질을 표적으로 하여 직접적인 결합을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공하며, 상기 탈유비퀴틴화 효소는 USP 1 내지 USP 54로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 방법을 제공하며, 상기 탈유비퀴틴화 효소는 USP 18인 것을 특징으로 하는 방법을 제공하며, 상기 효소를 과발현시키는 단계는, 상기 탈유비퀴틴화 효소를 줄기세포 내에 도

입하는 방법, 상기 탈유비퀴틴화 효소를 암호화하는 유전자의 세포내 카피수 증가, 상기 탈유비퀴틴화 효소를 암호화하는 염색체 상의 유전자의 발현조절 서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 탈유비퀴틴화 효소를 암호화하는 염색체 상의 유전자의 발현조절을 이보다 활성이 강한 서열로 교체하는 방법, 상기 탈유비퀴틴화 효소의 활성이 증가하도록 돌연변이된 유전자로, 염색체 상의 상기 탈유비퀴틴화 효소를 암호화하는 유전자를 대체하는 방법 및 상기 탈유비퀴틴화 효소의 활성이 강화되도록 상기 탈유비퀴틴화 효소를 암호화하는 염색체상의 유전자에 변이를 도입시키는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법에 의해 이루어지는 것인 방법을 제공하며, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법을 제공하며, .상기 줄기세포는 자가 증식력(self-renewal), 또는 다분화능(multipotency)인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0062] 본 발명의 다른 구체예에서, 탈유비퀴틴화된 모르탈린(mortalin) 단백질을 유효성분으로 포함하는 줄기세포의 줄기세포능(stemness)유지용 조성물을 제공하고, 상기 탈유비퀴틴화는 탈유비퀴틴화 효소 USP 1 내지 USP 54로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 유도하는 것인 조성물을 제공하며, 상기 탈유비퀴틴화 효소는 USP 18인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공하며, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공하며, 상기 줄기세포는 자가 증식력(self-renewal), 또는 다분화능(multipotency)인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0063] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0065] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지시키는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 모르탈린(mortalin) 단백질 발현을 조절하여 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 USP18-모르탈린 경로의 기전을 이용하여 세포의 노화를 억제할 뿐 아니라, 세포의 성장 및 생존력을 증대시켜 중간엽 줄기세포를 대량으로 배양할 수 있게 함으로써, 세포치료 또는 재생의학에 크게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 각 유전자들의 발현 양상을 비교하는 Heat-map과 그 중 선별된 USP18 유전자의 P4, P7, P10에서의 발현양을 비교한 그래프를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, USP18의 mRNA 발현을 계대배양 후 비교하기 위하여 qRT-PCR 및 웨스턴블롯 분석을 통해 정량화한 결과를 나타낸다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른, hBMSCs에서 녹아웃시킨 shUSP18의 발현수준을 그 외 바이오마커들의 발현양상과 비교한 결과를 나타낸다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른, hBMSCs에서 과발현시킨 USP18의 발현수준을 그 외 바이오마커들의 발현양상과 비교한 결과를 나타낸다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 녹다운시킨 shUSP18이 hBMSC에서 미치는 자가재생능력(self-renewal ability) 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 과발현시킨 USP18이 hBMSC에서 미치는 자가재생능력(self-renewal ability) 촉진 효과를 확인한 결과이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군과 녹다운시킨 shUSP18군에서의 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율을 정량화하여시각화한 결과이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군과 녹다운시킨 shUSP18군에서의 유동계측법(flow cytometry)을 통한 세포사멸을 분석한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, P2 및 P6에서 줄기세포 마커의 발현양 비교를 통해 hBMSC의 노화에 USP18이 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, hBMSC의 세포 노화(cellular senescence)에 대한 USP18 발현수준에 따른 효과를 확인한 결과이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따른, shUSP18의 hBMSC의 골형성분화 억제효과를 확인한 결과이다.

도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 과발현 USP18의 hBMSC의 골형성분화 촉진효과를 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른, shUSP18의 hBMSC의 지방생성분화 억제효과를 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, shUSP18의 hBMSC의 연골분화 억제효과를 확인한 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른, 줄기세포능(stemness)에 직접적으로 관여하는지 규명하기 위하여 SDS-PAGE, LC-MS 분석 결과 USP18에 결합한 모르탈린 단백질을 확인한 결과이다.

도 12a는 본 발명의 일 실시예에 따른, USP18이 모르탈린에 직접적으로 물리적 결합하는 것을 확인하는 결과이다.

도 12b는 본 발명의 일 실시예에 따른, USP18의 발현수준에 따라 모르탈린 단백질의 탈유비퀴틴화가 일어나는지 여부를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0070] 실시예 1: 세포 배양(cell culture) - 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포(hBMSCs)

[0071] 본 발명의 발명자들은 연세대학교 의과대학 평가위원회 (Institutional Review Board, IRB)의 승인을 얻어 골수 천자액(bone marrow aspirates)을 성인 기증자의 후장골릉(posterior iliac crest)으로부터 얻었다. 상기 골수 천자액으로부터 플라스틱 세포배양플라스크에 흡착되는 능력을 기준으로 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(hBMSCs)를 선별하였다. 상기에서 선별된 hBMSCs를 배양 배지(10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 항생제-항진균제 용액(Gibco)이 포함된 DMEM-LG(low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco))에서 배양하였다. 37 °C 및 5 % CO₂ 조건에서 배양한 hBMSCs가 80 % 내지 90 %에 이르면 수확하고 1: 3의 비율로 계대 배양하였다. 여기서, 통상의 방법에 따른 유세포 분석에 의해 CD90 및 CD105가 양성인 반면, CD34 및 CD45가 음성인 것을 통해 hBMSCs의 특성이 확인된 세포만을 아래의 실험에서 사용하였다.

[0073] 실시예 2: mRNA 분석을 위한 qRT-PCR 프라이머의 제작

[0074] 세포의 mRNA 발현 분석 등을 위하여, 전체 RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다. 모든 RNA는 Omniscript kit (Qiagen)를 사용하여 역전사 하였다. qRT-PCR은 그룹 간의 mRNA 발현 변화를 측정하기 위해 수행되었다. 본 발명에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다. ALPL (P324388), PPAR γ (P102359) 및 NANOG (P255522) 프라이머 쌍은 Bioneer(Korea)로부터 구입하였다.

표 1

[0075]

Target gene	프라이머 시퀀스(primer sequence, 5'→3')
USP18	F: TGGACAGACCTGCTGCCTTAAC
	R: CTGTCCTGCATCTTCTTCAGCA
ISG15	F: CTCTGAGCATCTGGTGAGGAA
	R: AAGGTCAGCCAGAACAGGTCGT
P53	F: AAGTCTGTGACTGACGCTACTCC
	R: GTCATGTGCTGTGACTGCTTGRTAG
P21	F: GCCAGCTACTTCCTCCTC
	R: AAGAGGGAAAAGGCTCAA
CYCLIN D1	F: GCAATCTCCCTTGATT
	R: TCATCGGAACCGAACTTA
CYCLIN A2	F: GCTGCCTTTCATTTAGCA
	R: GTGTCTCTGGTGGGTTGA
RUNX2	F: TACAAACCATAACCCAGTCCCTGTTT
	R: AGTGCTCTAACCACAGTCCATGCA
SOX9	F: CGACTACGCTGACCATCAGA
	R: AGACTGGTTGTTCCAGTGC
AGGRECAN	F: CCTGGCCTGACATGGAGCTG
	R: GGAAGGGGAGACCTCGAA

SOX2	F: CAAAAATGGCCATGCAGGTT
	R: AGTTGGGATCGAACAAAAGCT
OCT4	F: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA
	R: ACACTCGGACCACATCCTTC
GAPDH	F: CTGCTGATGCCCCATGTTC
	R: ACCTTGGCCAGGGGTGCTAA
β-ACTIN	F: GTCCTCTCCCAAGTCCACACAG
	R: GGGCACGAAGGCTCATCATTC

[0077] 실시예 3: USP18(Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 18)의 선별

[0078] 계대 배양이 진행되는 동안 높게 발현되는 유전자를 찾기 위해 RNA 시퀀싱 분석(RNA sequencing analysis)을 수행하였다. 중간엽 줄기세포(hBMSC)는 계대 10에 도달할 때까지 계대 배양하였으며, hBMSC의 계대 4, 7 및 10을 수확하였다. 이들 샘플 (Macrogen, Korea)을 이용하여 RNA sequencing array를 수행하였다. 유비퀴틴 프로테아좀 시스템(ubiquitin proteasome pathway, UPP)에서 일정 역할을 하는 수많은 유전자들 중에서 오랜 시간 배양 동안 상당히 높게 발현되는 유전자를 선별할 수 있었다(도 1 참조). 이때 저발현하는 유전자와 과발현하는 유전자가 구분되도록 시각화하여 선별하였다. 이 중에서 선별된 USP18의 발현 수준을 보면, P4에 비하여 P7 및 P10에서 약 4.6 내지 4.7배 높게 발현되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 데이터를 바탕으로 in vitro상에서 USP18의 발현 수준을 측정된 결과를 도 2에 나타내었다. 이때 USP18의 mRNA 발현을 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하여 웨스턴블랏 분석을 통해 정량화하였다.

[0080] 실시예 4: hBMSCs에서의 USP18의 발현양상에 따른 효과 확인

[0081] USP18은 ISG15의 이소펩티다아제(isopeptidase)로 알려져 있으며 암세포 주에서 주로 세포 사멸과 증식 사이의 관계를 가지고 있기에 중간엽 줄기세포(hBMSC)에서의 효과 확인을 위해 실험을 수행하였다. 노화 및 세포사멸 관련 마커인 P53, P21과 세포주기 관련 마커인 CYCLIN D1, CYCLIN A2, 및 ISG15 발현 양상을 비교하기 위하여 USP18을 녹다운(knockdown)시키거나 과발현(overexpressing)시킨 시료로 qRT-PCR을 수행하여 확인하였다. 상기 녹다운은 렌티바이러스 벡터(pLKO.1-Puro Lentiviral Vector; Yonsei Genome Center, 한국)의 TRC2 위치에 USP18의 염기 서열의 일부에 상보적인 서열번호 2의 염기 서열을 삽입하여, pLKO.1-puro-shUSP18 (TRCN0000004193, Yonsei Genome Center, 한국)을 제작하였다. 여기서, 대조군의 경우, 상기 서열번호 2 대신에, 비-타겟 shRNA 염기 서열이 삽입된 대조군 벡터 (shScramble, SHC016, pLKO.1-puro (Yonsei Genome Center))를 사용하였다.

표 2

이름	번호	표적 염기서열
shUSP18	서열번호 2	5' - CCTCATGGCCTGGTTGGTTTA -3'

[0083] 바이러스 패키징 믹스(Sigma-Aldrich, 미국) 및 리포펙타민 LTX PLUS (Invitrogen, 미국)을 이용하여 상기 렌티바이러스 벡터를 Lenti-X-293FT(Clontech, 미국) 세포에 제조사에서 제공된 프로토콜에 따라 형질전환한 뒤, 상기 형질전환된 세포를 배양하고 상기 세포의 배양액으로부터 바이러스를 수득한 후, 상기 제조예의 hBMSCs에 상기 수득된 바이러스를 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 바이러스가 포함된 배양 배지를 제거하고, 10 μg/ml의 푸로마이신(puromycin) 항생제가 포함된 새로운 배양 배지에서 24시간 이상 배양하는 과정을 통해, 항생제에 저항성이 있는 세포만을 선택함으로써 shUSP18이 녹다운된 hBMSCs와 대조군 hBMSCs를 제작하는 방법으로 수행하였다.

[0084] 상기 USP18이 과발현된 세포는 과발현 벡터(pCMV · SPORT6-USP18 vector (clone ID: hMU001048); 한국인간유전자은행, 한국)를 리포펙타민을 사용하여 세포내로 도입시키는 방법으로 제작하였다. 대조군 벡터는 USP18 과발현 벡터에서 USP18을 제한효소로 제거하는 방법으로 제작하였다.

[0085] USP18을 녹다운(knockdown)시킨 경우에는 P53과 P21이 상향 조절된 반면, 세포주기 관련 마커인 ISG15, CYCLIN D1 및 CYCLIN A2는 하향 조절되었음을 확인할 수 있었다(도 3a 참조). USP18을 과발현(overexpressing)시킨 경우 그 반대의 결과가 도출되었다(도 3b 참조). 이 결과를 통하여 hBMSCs에서의 USP18 유전자가 세포 노화(senescence), 세포 사멸(apoptosis), 세포 증식(proliferation)에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였

다.

[0087] **실시예 5: USP18 발현수준에 따른 자가재생능력(self-renewal ability) 확인**

[0088] hBMSCs에서의 USP18의 발현 수준이 자가재생능력에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 대조군, shMock군, 및 shUSP18군을 100mm의 배양접시에 1×10^3 세포를 12일동안 배양하였다. hBMSCs의 콜로니 형성능(colony-forming ability)을 비교하기 위하여 크리스탈 바이올렛(CV)염색을 하여 관찰하였고, 콜로니의 수는 4명의 독립적인 관찰자에 의해 카운트되었다. 또한, P3와 P9에 있는 2개의 다른 도우너(donors)에서 증식능력(proliferative capacity)을 측정하였다(도 4a 참조).

[0089] 대조군, pCMV군, 및 USP18군도 상기와 동일한 방법으로 100mm의 배양접시에 1×10^3 세포를 12일동안 배양한 후 크리스탈 바이올렛(CV) 염색하여 관찰한 후 콜로니 수를 카운트하였으며, 증식능력을 측정하였다(도 4b 참조). 이러한 결과를 토대로 Nick아웃된 USP18의 경우 대조군 및 shMock군에 비하여 콜로니 형성능이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, 이와는 반대로 과발현시킨 USP18의 경우 대조군 및 pCMV군에 비하여 콜로니 형성능이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 4a 및 4b 참조). 이를 통하여 과발현시킨 USP18이 중간엽 줄기세포의 자가재생능력을 향상시킨다는 것을 알 수 있으며, USP18이 중간엽 줄기세포의 자가재생능력을 유지하는데 중요한 의미를 갖는 것을 확인하였다.

[0091] **실시예 6: USP18 발현수준에 따른 세포사멸(cell-death) 유도 여부 확인**

[0092] 실시예 4에서의 결과를 바탕으로 Nick다운시킨 shUSP18이 노화 및 세포사멸 바이오마커인 P53과 P21을 상향 조절한다는 것(도 3a 참조)에 근거하여 USP18이 중간엽 줄기세포의 사멸 과정에 관여하는지를 확인하기 위하여 추가적으로 유동 세포 계측법(flow cytometry)에 의하여 분석하였다. 도 5a를 참조하면 녹색형광 시그널은 살아있는 세포를 나타내고, 빨간색 형광 시그널은 죽은 세포를 나타내며, 생존세포와 사멸세포의 수를 정량 분석하여 증가 또는 감소한 비율을 시각화한 결과를 나타내었다. Annexin V 신호는 세포사멸을 검출하는데 사용한 반면, 7-AAD는 피사되거나 후기 사멸세포를 검출하는데 사용하였다. 도 5b를 보면, 세포의 두 그룹으로 annexin V-FITC 및 7-AAD로 표지하였다. 대조군과 Nick아웃 shUSP18군에서 세포사멸의 총 백분율(Q2+Q3)이 각각 약 14.8%, 약 33.6% 정도로 나타났다. 여기서 Q2는 후기사멸세포를 나타내고, Q3는 초기사멸세포를 나타낸다. 이를 통하여 USP18을 Nick아웃시킬 경우 중간엽 줄기세포의 세포사멸(cell death)을 촉진시킨다는 것을 알 수 있다.

[0094] **실시예 7: P2와 P6에서의 USP18 발현수준에 따른 줄기세포 마커 확인**

[0095] 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)에 대한 USP18의 효과를 보여주기 위하여 줄기세포 마커인 SOX2, OCT4, 및 NANOG를 확인하여 줄기세포능 유지 여부를 측정하고, P2와 P6에서의 발현 수준을 비교하였다(도 6 참조). 줄기세포능 유지에 USP18이 필요하다는 것을 보여주기 위하여 렌티바이러스 쇼트 헤어핀 RNA(lentivirus short hairpin RNA; shRNA)에 의해 USP18을 Nick다운시킨 중간엽 줄기세포의 초기배양단계(P2)를 만든 후, 상기 유전자가 결핍된 세포들을 P6에 도달할 때까지 배양하였다. 줄기세포능의 변화를 보다 효과적으로 비교하기 위하여 P2와 P6에서의 발현량을 비교하였으며, qRT-PCR 결과, 도 6을 참조하면 P2 단계에서는 줄기세포 마커인 SOX2, OCT4, 및 NANOG가 대조군(shMock) 및 shUSP18군에서 눈에 띄는 차이가 나타나지 않았음을 확인할 수 있었다. 반면, P6 단계에서는 이와 달리 P6의 대조군(shMock)에 비하여서 노화 단계에 들어간 P6의 shUSP18군에서 더 낮은 mRNA 발현양이 확인되었다.

[0097] **실시예 8: USP18 발현수준에 따른 hBMSCs의 세포노화(cellular senescence) 확인**

[0098] 세포 노화 여부를 확인하기 위하여 베타-갈락토시다아제(SA- β -gal) 염색을 통해 세포 노화 정도를 비교하였다. SA- β -gal 분석은 제조사의 지시에 따라 세포 노화 측정 키트 (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 수행하였으며, hBMSC를 24 웰 플레이트에서 3×10^4 세포 밀도로 파종하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 실온에서 10 분간 1x 고정용액으로 고정 후, 준비한 1x SA- β -gal 검출 용액으로 CO₂ 대기가 없는 37 °C의 어두운 곳에서 4시간동안 세포를 염색하였다.

[0099] 그 결과, 초기 배양단계(P2)에서는 USP18이 하향 조절될 때 SA- β -gal 활성이 증가하였다. 한편, USP18을 과발현하는 hBMSC에서는 P11 pCMV군에 비하여 덜 노화가 된 것을 확인할 수 있었다(도 7 참조). 또한, 노화 관련 마커인 P53이 USP18이 Nick다운되었을 때 증가한 것을 확인함으로써, hBMSCs가 노화함에 따라 USP18이 노화를 억제하는데 필수적이며, 상기 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 유지하는데 도움이 된다는 것을 알 수 있었다. 위와 같은 데이터는 웨스턴블랏을 이용하여 정량화하였으며, GAPDH로 표준화하였다.

- [0101] **실시예 9: USP18 발현수준에 따른 hBMSCs의 다분화능(multipotency) 확인**
- [0102] hBMSCs의 분화와 관련하여 USP18의 잠재적인 역할을 확인하기 위해 렌티바이러스(lentivirus)를 사용하여 shRNA를 통해 안정적으로 발현하는 중간엽 줄기세포를 제작하였다. 중간엽 줄기세포의 다분화능의 예로써, 골형성 분화, 지방형성 분화, 및 연골분화에 대하여 실험하였다.
- [0103] **9.1 골형성분화능(osteogenic differentiation)의 비교**
- [0104] 먼저, 골형성 분화와 관련하여 살펴보기 위하여 5일 동안 골 형성 분화시킨 후 hBMSCs는 구연산 버퍼:아세톤(2 : 3) 고정 솔루션으로 고정하였다. 알칼리성 염색 용액 (Sigma)을 사용하여 ALP (alkaline phosphatase)를 염색하였으며 이 과정은 어두운 곳에서 30 분 동안 진행했다. 그 후 증류수로 세척하고, ALP 활성을 측정하기 위해 증류수, 0.5M Na₂CO₃, 0.5M NaHCO₃, 1M MgCl₂ 및 포스파타제 기질 (Sigma)로 구성된 기질 용액을 만들어 각 웰에 첨가하였다. 기관의 색이 황색으로 변하면, 405 nm 및 450 nm의 흡광도를 측정하였다. 이 ALK 포스파타아제 값을 Alamar blue 값으로 나누어 ALP 활성을 얻었다. alizarin red S 염색의 경우, 새로 준비한 3 % alizarin red S 용액 (Sigma)을 첨가하고 5 내지 30분 동안 배양하였으며, 10 % 세틸피리디늄 클로라이드로 탈색시키고 595 nm에서 흡광도를 측정한 후 활성을 측정하였다.
- [0105] 그 결과 대조군과 비교하여 shUSP18 세포군에서 유의하게 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 15일 동안 골형성 분화 자극을 준 후, 세포 외기질의 무기질화(mineralization)되었는지를 살펴보았다. 정량 분석을 위해 595nm에서의 흡광도를 측정하였다. 그 결과 shUSP18 군에서 낮은 무기질화가 나타났다. 상대적 mRNA 발현양을 비교하기 위하여 골형성 3일차에 qRT-PCR 분석 결과 USP18이 결핍된 세포에서 RUNX2 및 ALP와 같은 골형성 인자의 발현 수준이 낮아지는 것으로 나타났다. 웨스턴 블랏 분석 결과 또한 RUNX2 및 ALP 단백질 발현양 수준이 감소하였음을 확인할 수 있었다. 도 8a를 참조하면 USP18의 녹다운은 중간엽 줄기세포(hBMSCs)의 골형성 분화를 억제하는 것을 알 수 있다(도 8a 참조).
- [0106] 이와는 반대로, 같은 방식으로 과발현 USP18 세포군의 활성도를 측정하였다. 결과에 따르면 대조군과 비교하여 ALP 활성이 유의하게 증가하였음을 확인할 수 있으며, 10일동안 골 형성 유도 후 USP18의 과발현 중간엽 줄기세포주에서 증가된 무기질화가 관찰되었다. 또한, qRT-PCR 분석 결과, 골형성 인자인 RUNX2 및 ALP의 mRNA 발현 수준도 상향 조절되었음을 확인할 수 있다. 따라서 이를 통하여 USP18의 과발현은 hBMSCs의 골 형성 분화를 촉진한다는 것을 알 수 있다(도 8b 참조).
- [0107] **9.2 지방세포 분화능(adipogenic differentiation)의 비교**
- [0108] 지방생성 과정에서 USP18이 영향을 미치는지를 확인하기 위해 오일 레드 오(oil red o)염색 방법을 이용하였다. 지방세포 분화 21일 후 세포를 PBS로 세척하고 3,7% 포르말데하이드 처리를 하였다. 그 후 0.18% 오일레드오 솔루션 1ml를 첨가하여 30분동안 인큐베이션 시킨 후 분석을 시행하였으며 정량분석을 위하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다. USP18이 결핍된 중간엽 줄기세포가 지질자극시 대조군세포에서 형성되는 것에 비하여 지질 생성양(lipid droplets)이 더 적게 나타난 것을 확인할 수 있었다.
- [0109] 또한, PPAR γ 의 상대적 mRNA 발현양을 비교한 결과 USP18이 결핍된 경우에 감소한 것을 확인할 수 있었다. USP18과 PPAR γ 의 상대적 발현은 지방생성 분화 4일차에 qRT-PCR에 의하여 측정하였다. 이를 통하여 녹다운된 USP18은 중간엽 줄기세포의 지방형성 분화를 억제하는 것을 알 수 있다(도 9 참조).
- [0110] **9.3 연골 분화능(chondrogenic differentiation)의 비교**
- [0111] 연골 분화와 관련된 USP18의 효과를 비교하기 위하여 추가로 실험을 수행하였다. 체외에서 연골 분화를 위해 마이크로매스 배양(micromass culture)을 실시하였다. 마이크로매스(micromass)의 실제 형태를 현미경으로 관찰한 결과를 도 10에 나타내었다. 지방생성 분화 7일째에 qRT-PCR에 의해 USP18, SOX9 및 AGGRECAN의 상대적 mRNA 발현양을 측정하였다. 그 결과 연골 형성 유도 후 USP18이 결핍된 중간엽 줄기세포에서 SOX9 및 AGGRECAN과 같은 연골 형성 마커의 발현 수준이 낮게 나타난 것을 확인하였다(도 10 참조).
- [0112] 상기 실험에 의한 결과를 종합해보면, USP18를 녹다운시키는 경우 hBMSCs의 골형성, 지방생성, 연골형성분화를 억제한다는 것을 보여준다.
- [0114] **실시예 10: USP18에 직접적으로 결합하는 모르탈린(mortalin) 단백질의 확인**
- [0115] 상기 데이터들을 조합하면 중간엽 줄기세포(hBMSCs)의 줄기세포능(stemness) 유지에USP18가 필수요소인 것을 확인할 수 있었고, 보다 구체적인 조절 메커니즘을 찾기 위해 USP18에 결합하는 단백질을 검출하기 위한 면역침전

(immune-precipitation; IP) 실험을 수행하였다(도 11 참조). Lipofectamine LTX & Plus 시약 (Invitrogen)을 사용하여 pCMV-GFP, USP18-GFP 및 모르탈린(Mortalin)으로 hBMSC를 형질 감염시켰으며, 모르탈린(HSPA9) 클론은 한국생명공학연구원 인간유전자은행(Korea Human Gene Bank, Medical Genomics Research center; KRIIBB)으로부터 제공받았다. 배양 4 내지 5 시간 후, MG-132 (proteasome inhibitor [Sigma]) 10 μ M을 혼합 한 DMEM-LG를 첨가하였다. 수득한 세포를 용해시키고, 용해물을 USP18 항체와 함께 인큐베이션 하였다. hBMSCs의 샘플에 단백질 A / G 아가로오스 비즈, USP18 항체를 이용하였으며, 상층액을 제거하고 10% SDS-PAGE로 로드하고 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인으로 옮기고 쿠마시 블루로 염색하였다. USP18에 직접적으로 결합하는 타겟 단백질을 찾기 위해 2개의 레드박스라벨된 밴드를 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC-MS/MS)을 이용하여 분석하였다. 결과에 따르면, 열충격 동족체 71kDa 단백질(heat shock cognate 71 protein; HSPA8)과 열충격 70kDa 단백질(heat shock 70 protein; mortalin)단백질이 확인되었다. 그러나, HSPA8은 pCMB와 USP18군 모두에서 확인되었기에 HSPA8은 제외시켰다. 이를 통하여 모르탈린을 USP18에 결합하는 단백질을 확인할 수 있었다(도 11 참조).

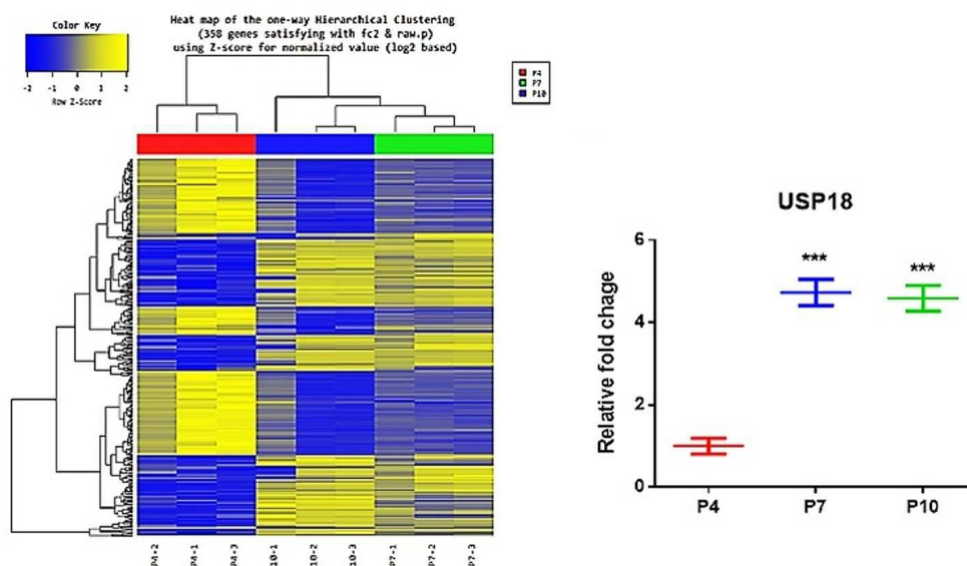
[0117] **실시예 11: USP18과 모르탈린 단백질의 상호작용 기전을 이용한 줄기세포능(stemness) 조절 가능성 확인**

[0118] 세포내 프로테아좀 변형(proteasome degradation)이 일어나는지 알아보기 위해 유비퀴틴화 assay(ubiquitination assay)하였다. HeLa 세포에는 ubiquitin-myc(ub-myc), 모르탈린 및 USP18과 USP18 스몰 인히비토리 RNA(siRNA; Bioneer, Korea)를 함께 형질 감염시켰다. 24시간 트랜스펙션 한 후, 세포를 10 μ M의 프로테아좀 인히비터 (proteasome inhibitor)인 MG132 (EMD Millipore)로 4 내지 5시간 동안 처리하였다. 세포용해액을 면역침전시킨 후 USP18항체와 모르탈린 항체를 이용하여 면역 블롯팅 하였다. 도 12a를 참조하면, 과발현시킨 USP18의 모르탈린 유비퀴틴화가 현저히 억제되는 것을 확인할 수 있다. 반면, USP18 녹다운시킨 경우 모르탈린의 유비퀴틴화 진행이 증가되었음을 알 수 있다(도 12b 참조). 이를 통하여 USP18이 모르탈린으로부터 유비퀴틴을 분해하는 작용을 하는 것을 확인하였다. 모르탈린은 USP18의 발현수준에 따라 유비퀴틴화를 조절함으로써 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 조절하기에 이러한 기전을 이용함으로써 세포치료제 개발에 있어 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

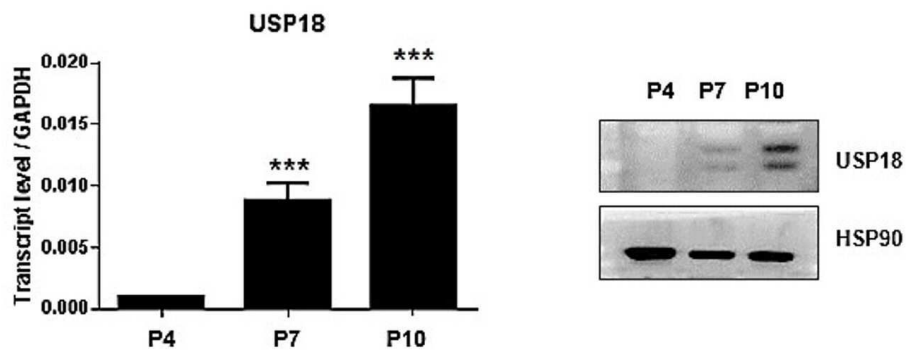
[0120] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

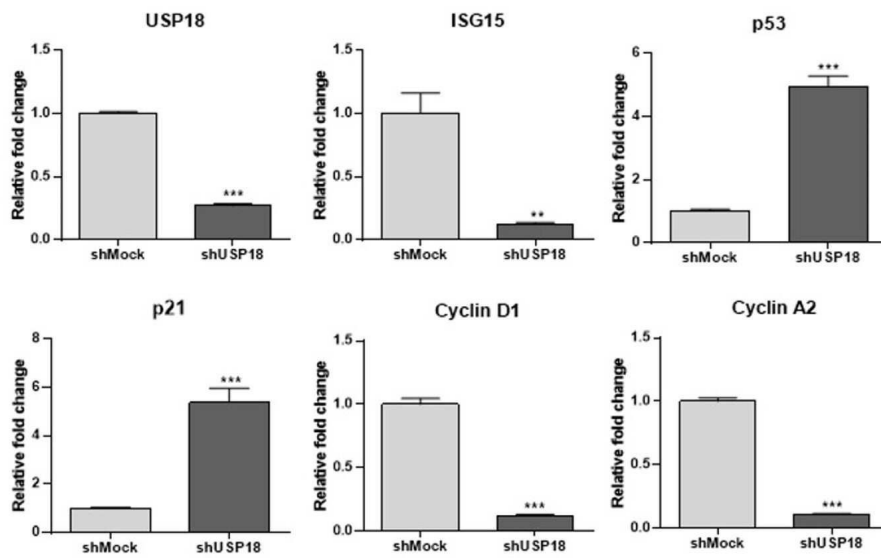
도면1



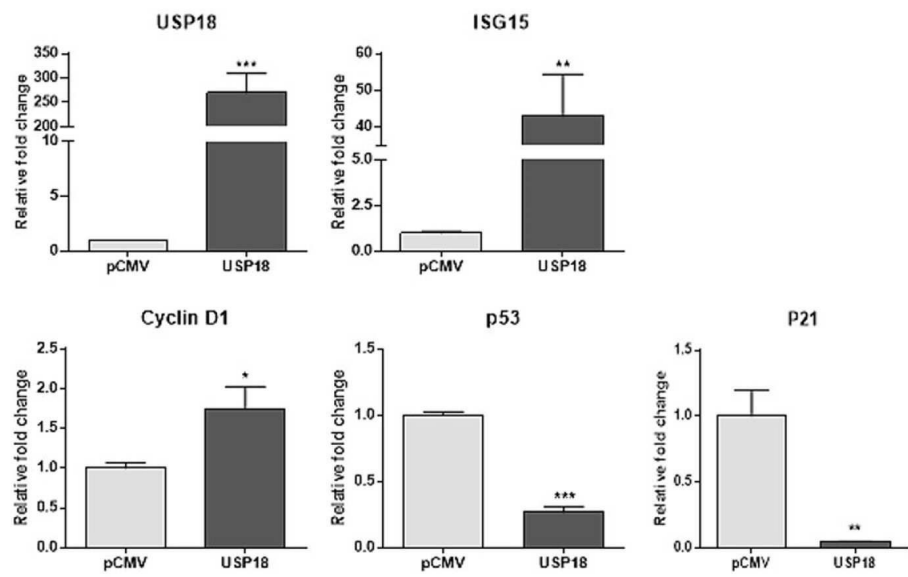
도면2



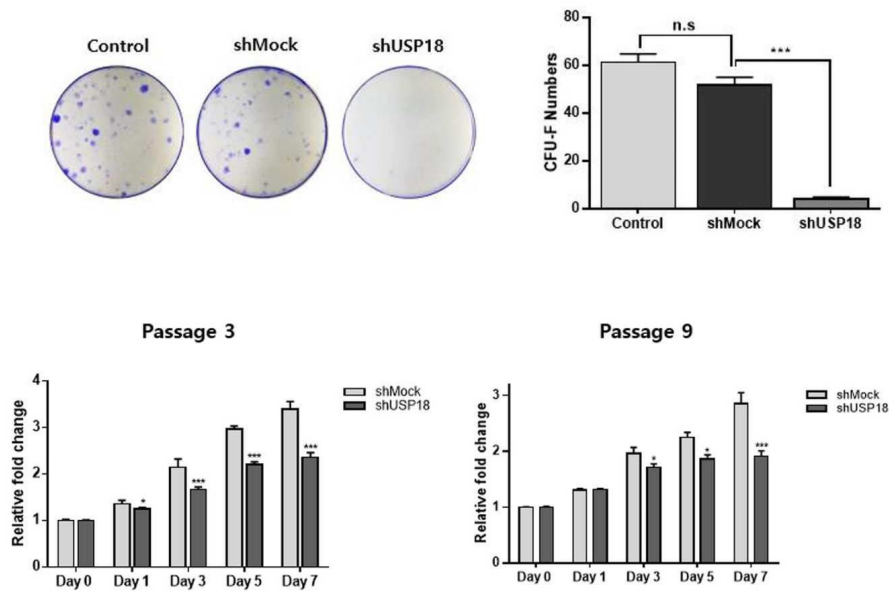
도면3a



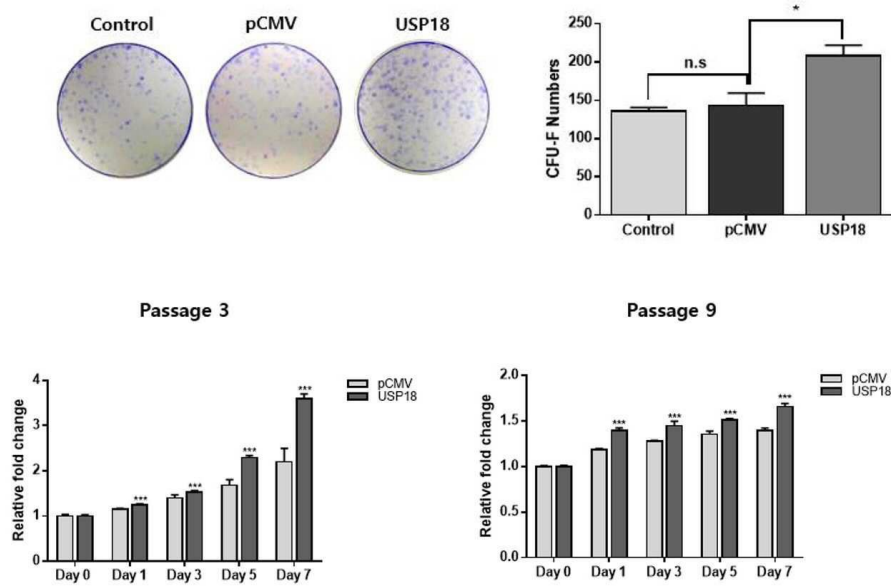
도면3b



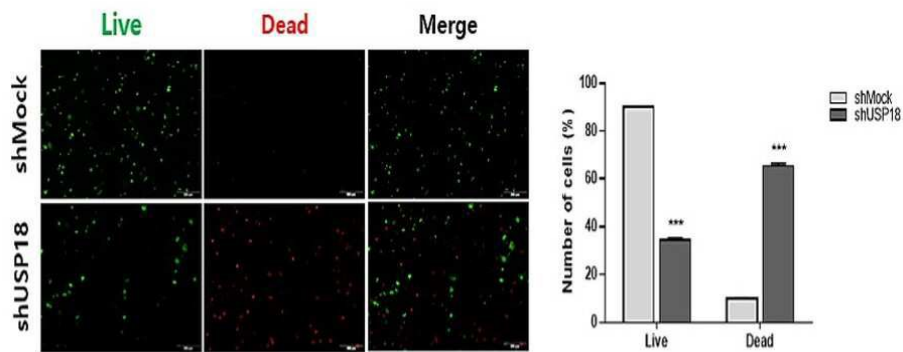
도면4a



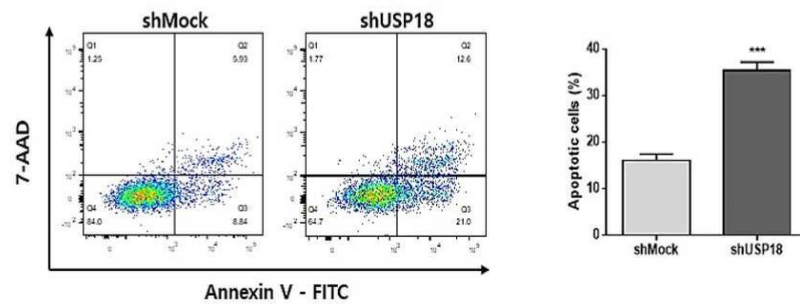
도면4b



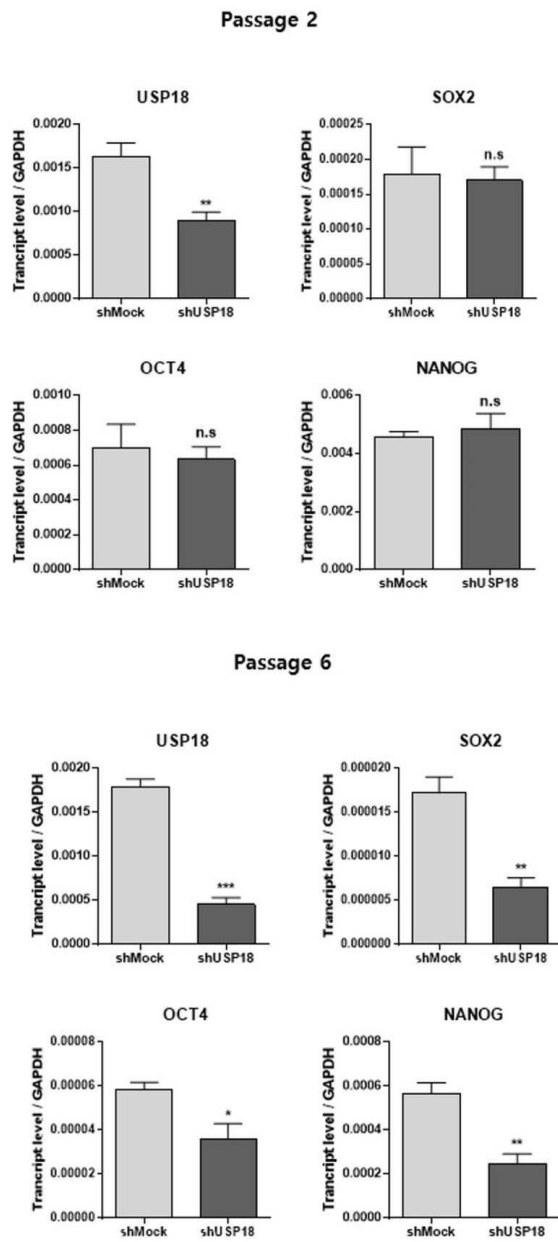
도면5a



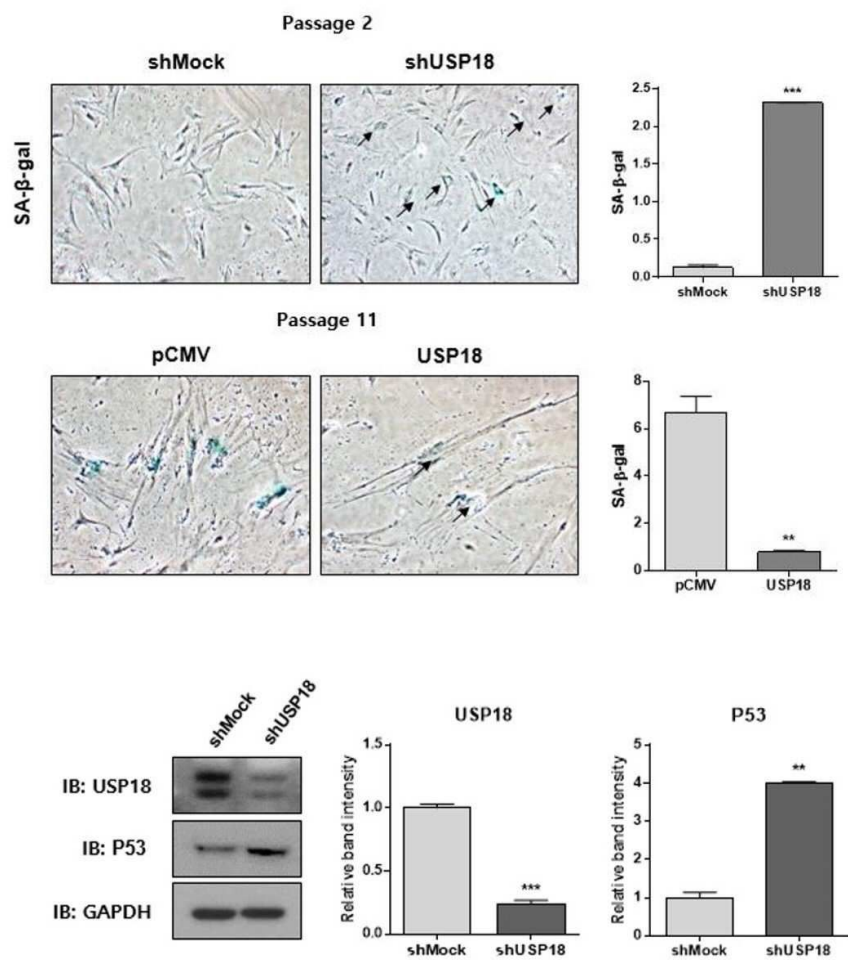
도면5b



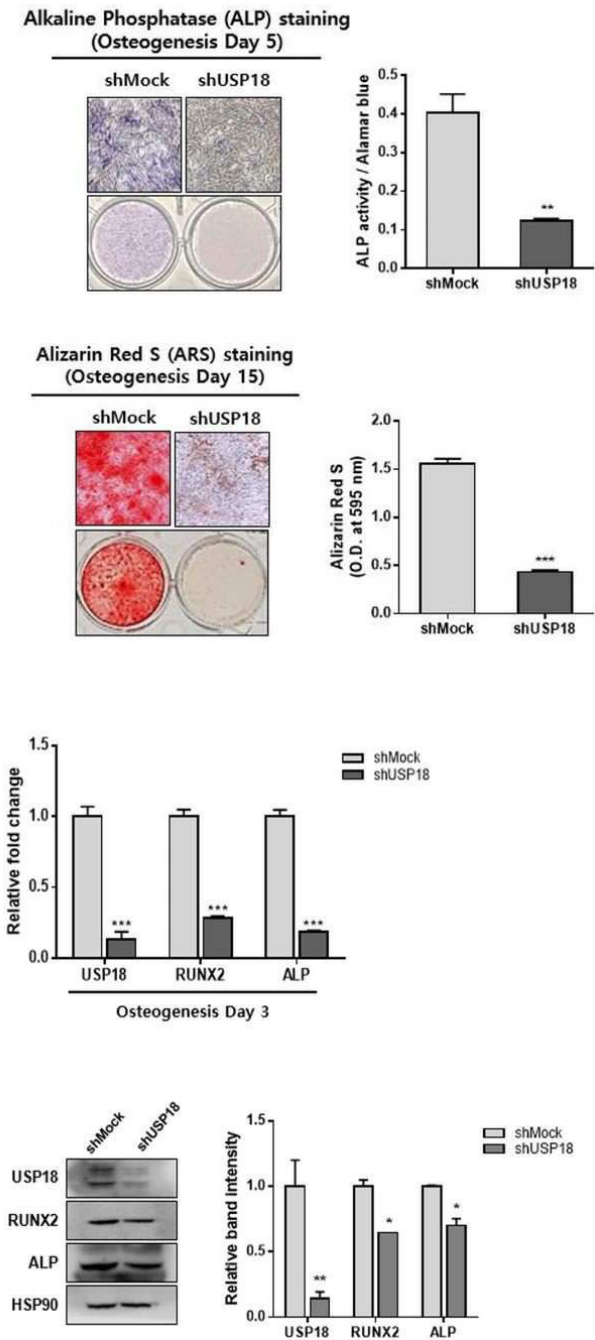
도면6



도면7

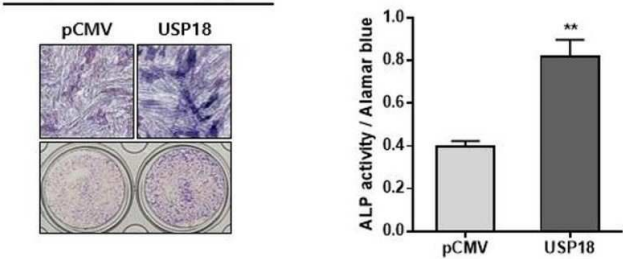


도면8a

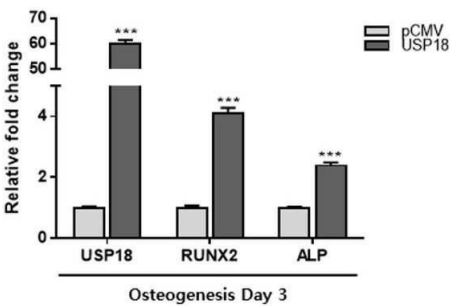
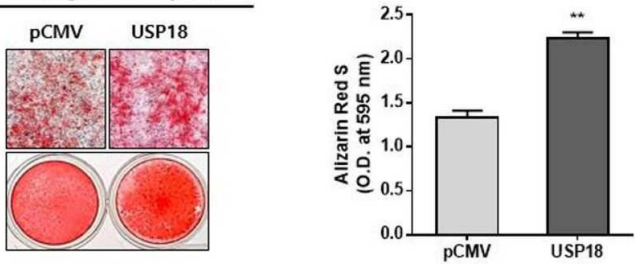


도면8b

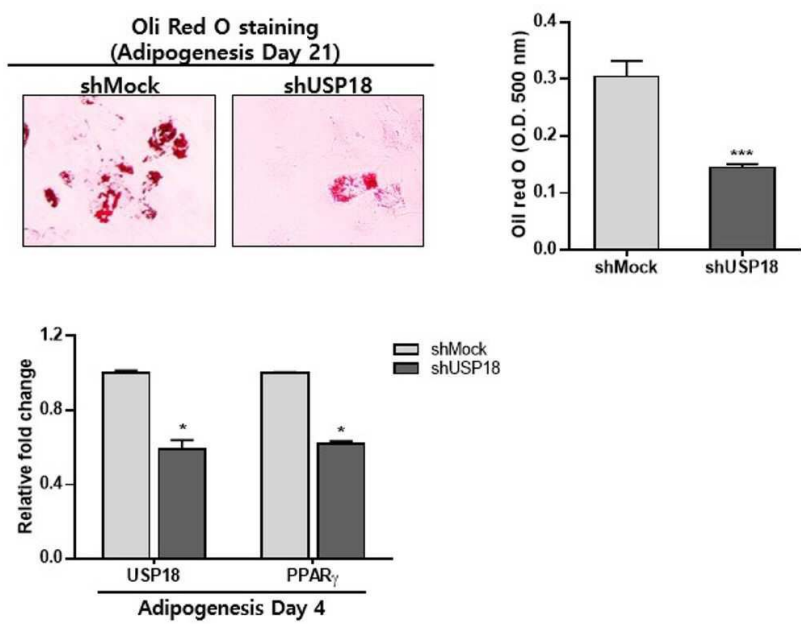
Alkaline Phosphatase (ALP) staining
(Osteogenesis Day 5)



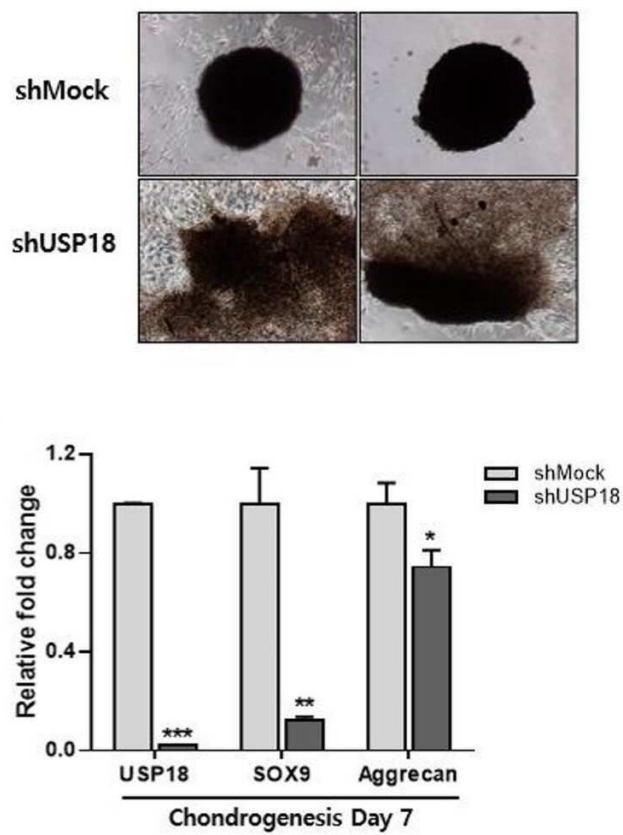
Alizarin Red S (ARS) staining
(Osteogenesis Day 10)



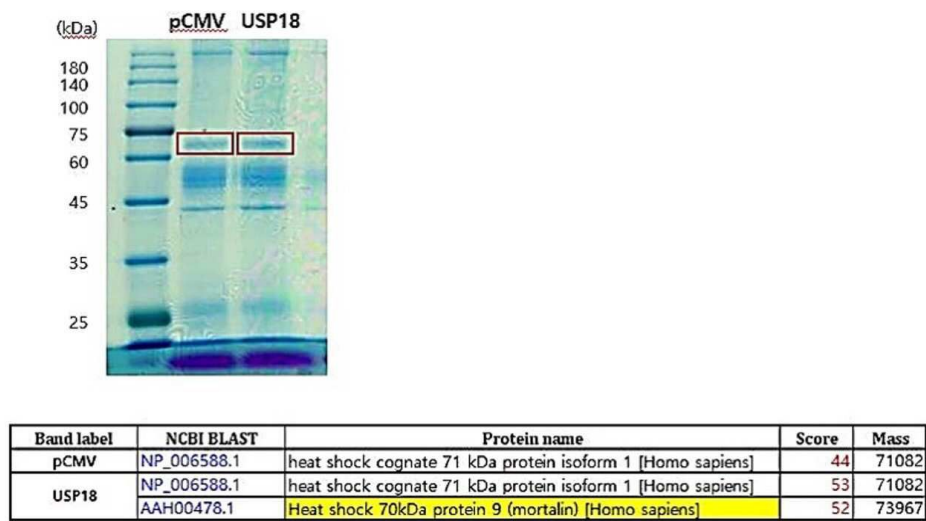
도면9



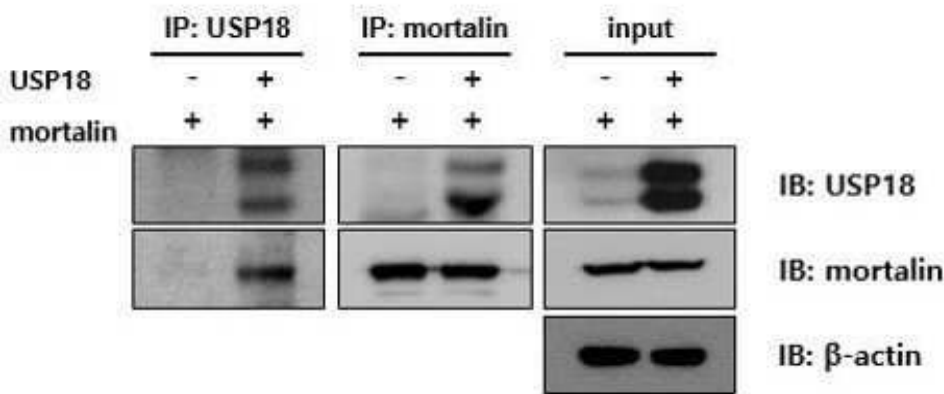
도면10



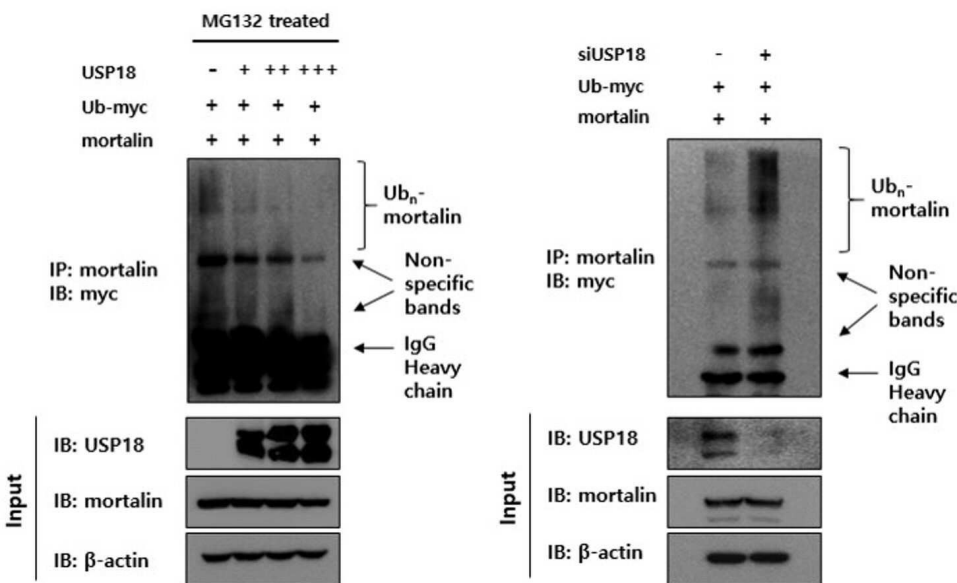
도면11



도면12a



도면12b



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
 <120> Method for maintaining stemness in mesenchymal stem cells by
 mortalin protein
 <130> PDPB194140
 <160> 2
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Ser Lys Ala Phe Gly Leu Leu Arg Gln Ile Cys Gln Ser Ile Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Ser Ser Gln Ser Pro Ala Asp Leu Glu Glu Lys Lys Glu Glu
 20 25 30

Asp Ser Asn Met Lys Arg Glu Gln Pro Arg Glu Arg Pro Arg Ala Trp
 35 40 45

Asp Tyr Pro His Gly Leu Val Gly Leu His Asn Ile Gly Gln Thr Cys
 50 55 60

Cys Leu Asn Ser Leu Ile Gln Val Phe Val Met Asn Val Asp Phe Thr
 65 70 75 80

Arg Ile Leu Lys Arg Ile Thr Val Pro Arg Gly Ala Asp Glu Gln Arg
 85 90 95

Arg Ser Val Pro Phe Gln Met Leu Leu Leu Leu Glu Lys Met Gln Asp
 100 105 110

Ser Arg Gln Lys Ala Val Arg Pro Leu Glu Leu Ala Tyr Cys Leu Gln
 115 120 125

Lys Cys Asn Val Pro Leu Phe Val Gln His Asp Ala Ala Gln Leu Tyr
 130 135 140

Leu Lys Leu Trp Asn Leu Ile Lys Asp Gln Ile Thr Asp Val His Leu
 145 150 155 160

Val Glu Arg Leu Gln Ala Leu Tyr Thr Ile Arg Val Lys Asp Ser Leu
165 170 175

Ile Cys Val Asp Cys Ala Met Glu Ser Ser Arg Asn Ser Ser Met Leu
180 185 190

Thr Leu Pro Leu Ser Leu Phe Asp Val Asp Ser Lys Pro Leu Lys Thr
195 200 205

Leu Glu Asp Ala Leu His Cys Phe Phe Gln Pro Arg Glu Leu Ser Ser
210 215 220

Lys Ser Lys Cys Phe Cys Glu Asn Cys Gly Lys Lys Thr Arg Gly Lys
225 230 235 240

Gln Val Leu Lys Leu Thr His Leu Pro Gln Thr Leu Thr Ile His Leu

245 250 255

Met Arg Phe Ser Ile Arg Asn Ser Gln Thr Arg Lys Ile Cys His Ser
260 265 270

Leu Tyr Phe Pro Gln Ser Leu Asp Phe Ser Gln Ile Leu Pro Met Lys
275 280 285

Arg Glu Ser Cys Asp Ala Glu Glu Gln Ser Gly Gly Gln Tyr Glu Leu
290 295 300

Phe Ala Val Ile Ala His Val Gly Met Ala Asp Ser Gly His Tyr Cys
305 310 315 320

Val Tyr Ile Arg Asn Ala Val Asp Gly Lys Trp Phe Cys Phe Asn Asp
325 330 335

Ser Asn Ile Cys Leu Val Ser Trp Glu Asp Ile Gln Cys Thr Tyr Gly
340 345 350

Asn Pro Asn Tyr His Trp Gln Glu Thr Ala Tyr Leu Leu Val Tyr Met
355 360 365

Lys Met Glu Cys
370

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> USP18 target shRNA artificial sequence

<400> 2

cctcatggcc tggttggttt a

21