



유전자 편집된 세포 선별 방법

서울대학교 - 차혁진 교수님

기술 분류	BT(LC0317. 세포/조직치료제)
기술 분야	질병 모델링 및 약물 스크리닝 관련 기초 연구
적응증	치료 효과·진단에 이용하기 위한 임상시험 및 신약개발을 위한 약동학적 평가 등에 적용 가능
기술 완성도 (TRL)	<input type="checkbox"/> 아이디어 단계 <input type="checkbox"/> 연구개발 진행단계 (추가실험 필요한 단계) <input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 완료단계 (충분한 실험 데이터가 확보된 단계) <input type="checkbox"/> 전임상 단계 <input type="checkbox"/> 초기 임상(P1/2a) <input type="checkbox"/> 후기 임상(P2b/3)
관련특허	I. 미분화 만능 줄기세포로부터 유전자 편집된 세포의 선별 방법 (출원번호: 10-2020-0000780) -PCT 출원 (PCT/KR2020/000078)

01 기술 개요

기술 개요	미분화 만능 줄기세포 유래 유전자 편집 세포 농축 선별 방법
기술 특성	<p>본 기술은 미분화 만능 줄기세포로부터 유전자 편집된 세포의 선별 방법에 관한 것으로, 유전자 편집으로 인한 일시적 녹다운에 의해 유도된 YM155 저항성을 이용하여 유전자 편집된 세포를 농축 선별할 수 있는 방법임</p> <p>병리를 모방한 특정 유형의 세포(질병 모델링)의 지속적 공급을 가능하게 하여 약물 스크리닝 및 기초 연구에 활용될 수 있음</p> <p>1. 미분화만능줄기세포 선택적 세포사멸 원인 유전자 - 미분화 만능 줄기세포는 SLC35F2 유전자의 고발현으로 YM155 에 선택적인 세포사멸이 일어나고, 분화세포는 SLC35F2 의 발현이 낮아 YM155 에 영향을 받지 않고 생존하여, 분화세포만을 안전하게 선별 가능.</p> <p>2. 유전자 편집 과정에서 SLC35F2 유전자의 일시적 녹다운으로 YM155 처리 후 유전자 편집 세포만을 농축 선별</p>

	- SLC35F2 일시적 녹다운과 유전자편집을 동시에 진행 - YM155 처리를 통해 유전자편집 미분화만능줄기세포만을 선별
기술 적용(활용) 가능분야	'질병 모사 세포 확립', '약물 스크리닝(신약 개발 기술)', '약물 독성평가', '세포 치료제' 기술 등에 적용하여 활용될 수 있음

02 기존 기술의 문제점

[인간미분화만능줄기세포 (hPSC) 유전자 편집의 필요성과 기술적 한계]

<ol style="list-style-type: none"> hPSC 유전자 편집의 필요성 <ul style="list-style-type: none"> : 질환 모사 세포 무한 공급 : 유전질환 환자의 질환 유전자 수정 : 리포터를 통해 특정 분화 세포의 선별 hPSC 유전자 편집의 기술적 한계 <ul style="list-style-type: none"> : 유전자편집의 낮은 효율 : 유전자편집의 장기간 시간과 고비용 	⇒ 인간만능줄기세포의 유전자편집의 필요성에도 낮은 효율의 기술적 한계로 기술 대중화의 어려움
---	---

**출처: www.takara.co.kr

[인간미분화만능줄기세포 유전자 편집의 낮은 효율 개선법]

<ol style="list-style-type: none"> 유도성 Cas9 시스템 <ul style="list-style-type: none"> : 효율성 낮고, 의도치 않은 곳을 절단하게 될 가능성 있음 퓨로마이신 선별법 자기 복제형 에피소말 벡터 RNP 와 바이러스 기반 기술 	⇒ 외부 유전자의 삽입 등 원치 않는 부작용 발생 가능성 高, 유전자 편집에 고비용
--	--

- 즉 추가적으로 제조되는 원치 않는 부작용을 최소화하기 위한 방법 마련이 필요하고, 동시에 저비용 & 고효율 접근법이 필요함

03 기존 기술 대비 우수성

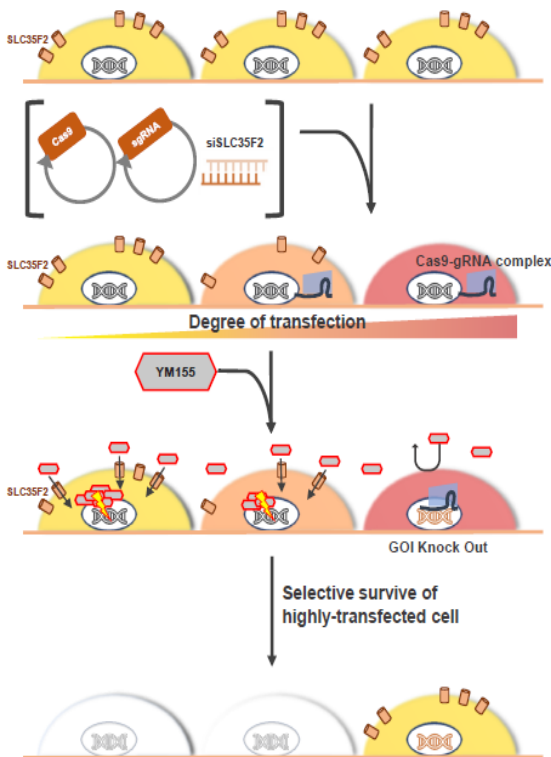
◇ 본 기술은 미분화 만능 줄기세포로부터 유전자 편집된 세포의 선별 방법에 관한 것으로, 유전자 편집과정에 YM155 에 의한 미분화만능줄기세포의 특이적 세포사멸의 원인 유전자

(SLC35F2)의 일시적 녹다운에 의해 유도된 YM155 저항성을 이용하여 유전자 편집된 세포를 농축 선별할 수 있는 방법임

◇ 본 기술의 방법은 기존의 세포 수득 방법과 대비하여 약 10 배의 효율성을 가지는 것으로, 저비용·고효율로 세포를 수득하여 이를 활용할 수 있는 방법임

◇ 본 기술은 병리를 모방한 특정 유형의 세포(질병 모사 세포)의 지속적 공급을 가능하게 하여 질환 특성을 갖는 세포의 특성 기반 약물 탐색 및 질환 기전 기초 연구에 활용될 수 있음

1. 미분화 만능줄기세포 특이적 세포사멸 유도를 이용한 세포 선별방법



① 세포 내 유전자 편집
: 일시적 녹다운에 의한 SCL35F2 유전자 발현 억제와 유전자 편집 동시 진행

② YM155 처리

③ 세포 사멸 및 세포 생존
: 세포 사멸-SCL35F2 고발현군
(유전자편집용 유전자 미도입 세포)

: 세포 생존-SCL35F2 발현 억제군
(유전자편집용 유전자 도입 세포)

④ 생존 세포 선별 (유전자편집 세포의 농축 선별)

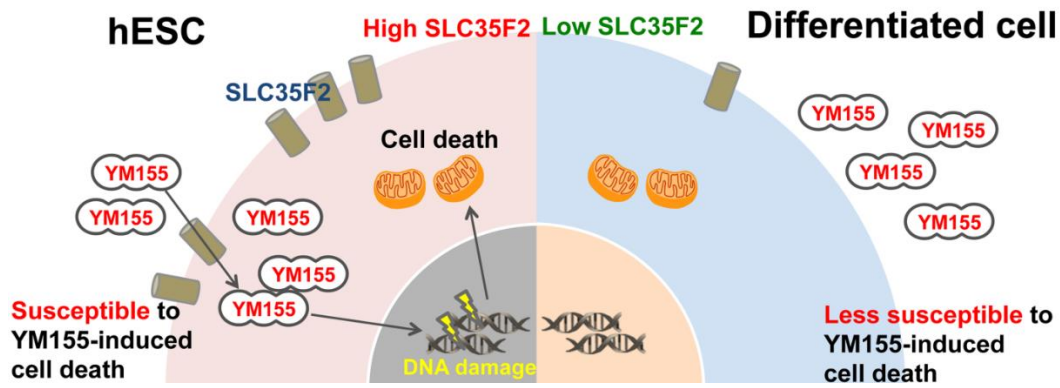
[미분화 만능줄기세포 특이적 세포사멸 유도를 이용한 세포 선별방법 기본 개념도]

2. YM155 와 SLC35F2 의 상관관계(1)

- SLC35F2 는 YM155 의 세포 내 흡수를 담당하는 막 수송체로서 YM155 약물의 세포내 유입을 담당하며, YM155 는 DNA 손상에 의한 세포사멸을 유도함

- YM155 에 의한 세포사멸의 선택적 유도는 미분화만능줄기세포에 SLC35F2 의 고발현으로 인한 약물의 선택적 세포 흡수로 인한 것 임

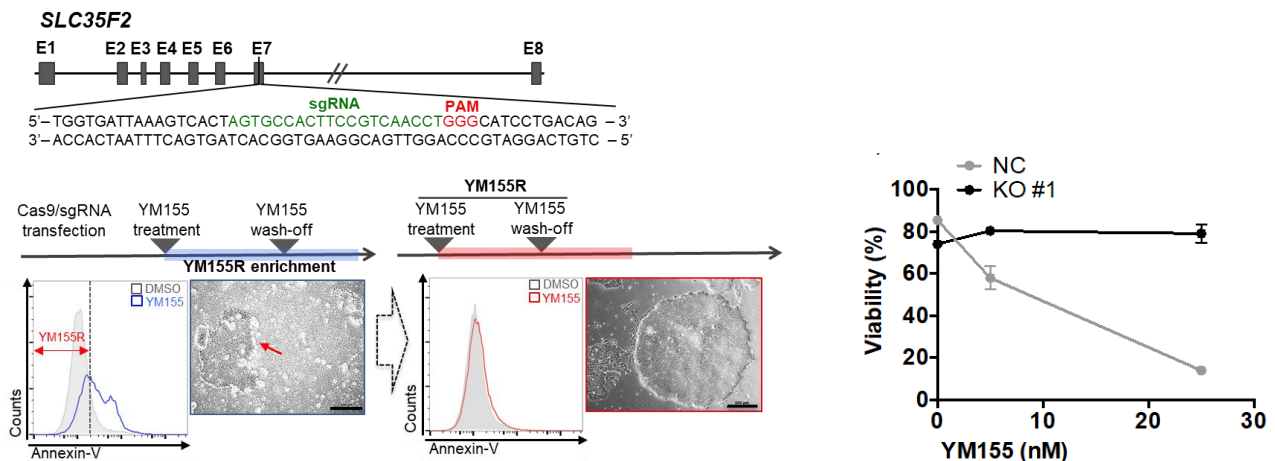
⇒ SLC35F2 고발현 세포의 경우 YM155 에 대한 세포 독성 발생이 예측됨



[YM155 로 인한 세포 사멸 및 SCL35F2 발현]

3. YM155 와 SLC35F2 의 상관관계(2)

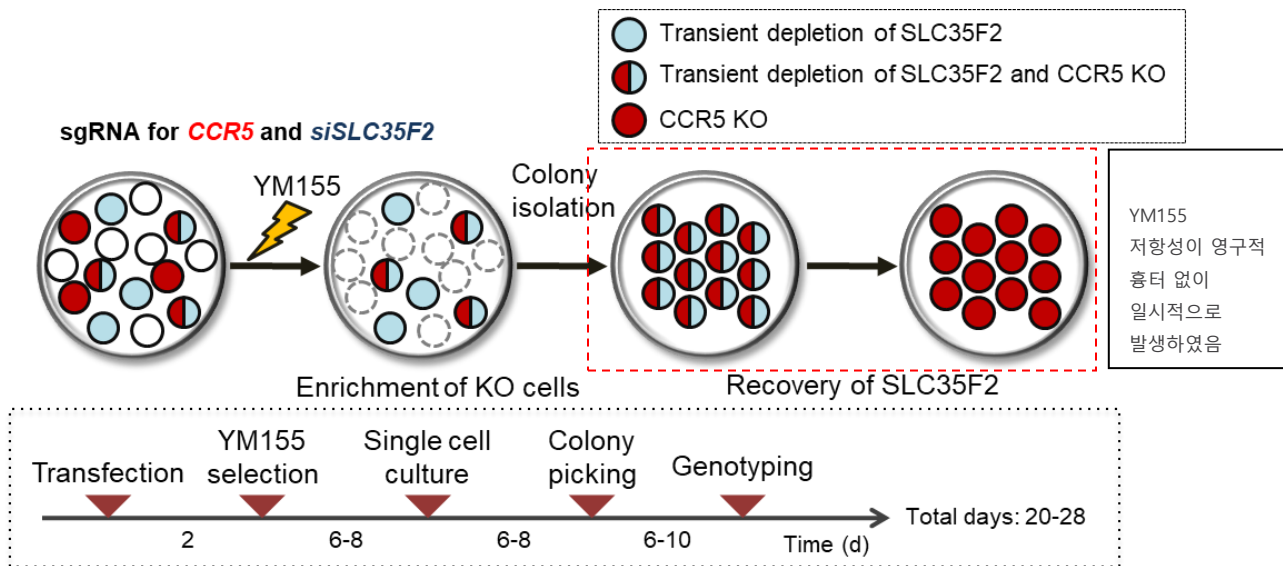
- YM155 의 선택적 세포 독성과 이들 세포에서의 SLC35F2 의 발현 사이의 상관관계 확인
- : YM155 에 의한 세포사멸의 선택적 유도가 SLC35F2 매개인지 확인하고자 SLC35F2 이 녹아웃을 유도하여, YM155 저항성이 획득됨을 확인함
- ⇒ SLC35F2 가 녹아웃된 클론(YM155R, SLC35F2 KO hESCs : KO #1)은 YM155 에 의해 유도되는 세포사멸에 저항성을 가지는 것이 확인됨



[SLC35F2 녹아웃 YM155R 의 YM155 저항성]

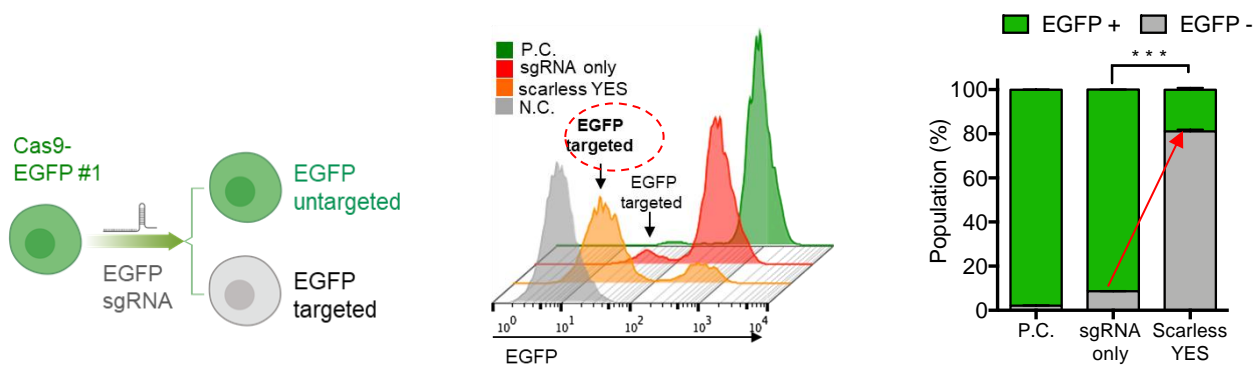
4. 인간 미분화만능줄기세포의 고효율 유전자 편집 기술

- SLC35F2 가 관심 유전자(GOI)와 동시에 표적화된 경우, 유전자 편집된 인간미분화만능줄기세포에 YM155 저항성을 부여하여 YM155 처리를 통한 유전자 편집 세포 농축 선별을 수행함
- 그러나 영구적 녹아웃으로 인해 발생할 수 있는 부작용을 고려하여 일시적 녹다운을 통한 YM155 저항성을 유도할 필요성을 확인함
- 이에 특정 유전자 (예. CCR5)를 표적 하는 sgRNA 및 SLC35F2 표적 siRNA 를 도입하는 방법으로 SLC35F2 고갈에 의한 일시적 YM155 저항성을 유도함



5. 외부유전자 도입이나 내부 유전자 변이 없는 (Scarless) 고효율 선별법 (흉터 없는 YES 접근법)

- SLC35F2 유전자 녹아웃 이후 YM155 를 이용한 유전자 편집 세포의 선별법 (Scarless YES 접근법)으로 선별한 세포들의 유전자 편집 효율이 일반적인 유전자 편집 효율 대비 월등히 증가함을 녹색형광 단백질 (EGFP) 발현 유전자를 이용한 녹아웃 효율 비교를 통해 증명하였음

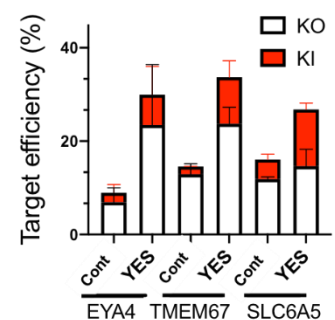
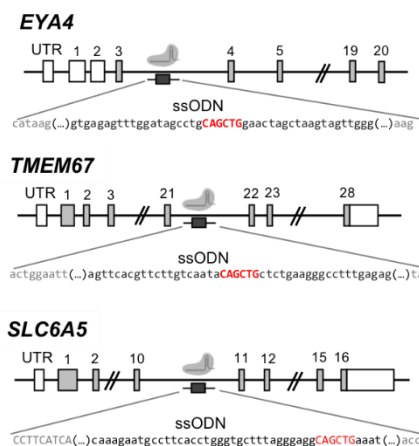


[흉터 없는 YES 접근법 선별 세포의 타겟팅 효율]

6. 유전자 녹인 (Knock-In) 인간 미분화만능줄기세포 고효율 선별

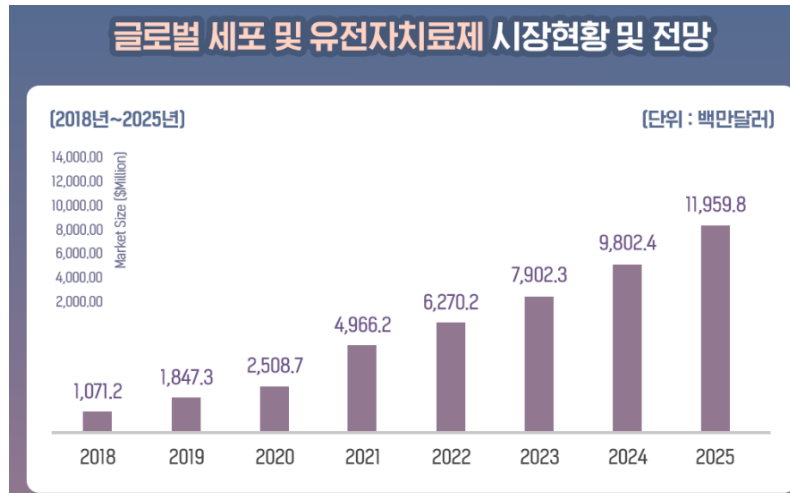
- EYA4, TMEM67, SLC6A5 유전자에서 외부 유전자를 원하는 위치에 삽입하는 녹인 (Knock-In) 방법은 약 0.5 - 1%의 효율을 나타냈으며, YES 접근법을 통해 녹인 효율을 10% 내외로 약 10 배 가량 높일 수 있었음

- 유전질환의 환자 유래 유도만능줄기세포의 유전질환 원인 유전자의 정상 염기 치환이 가능할 것으로 기대함



04 시장 현황

◇ 세포 및 유전자치료제 시장 전망



**출처: BIS Research, Global cell and Gene Therapy Market, 2019.07 & 대응제약 뉴스

- 식품의약품안전처에 따르면, 세포치료제는 '살아있는 자가, 동종, 이종 세포를 체외에서 배양·증식하거나 선별하는 등 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 조작하여 제조하는 의약품'임. 즉, 손상되었거나 질병이 있는 세포나 조직을 회복시키기 위해 살아있는 세포를 사용해 재생을 유도하는 의약품임
- 유전자치료제는 결핍 및 결함 유전자가 교정되도록 하여 질병을 치료하는 치료제로 식약처에 따르면, '유전물질 발현에 영향을 주기 위하여 투여하는 유전물질' 또는 '유전물질이 변형되거나 도입된 세포', 중 어느 하나를 포함한 의약품임
- 본 기술은 주요 내용이 세포 선별 방법이나, 방법이 적용되거나 제품으로 생산될 경우 적용될 시장을 세포 및 유전자치료제로 목표하고 있음
- 글로벌 세포 및 유전자치료제 시장은 **2018년 기준으로 10.7억 달러(약 1.2조 원) 규모를 형성**하고 향후 **연평균 41.2%로 성장하여 2025년에는 119.6억 달러(약 13.9조 원) 규모로 확대**될 것으로 전망되고 있음
- 한국을 포함한 아시아·태평양 지역은 북아메리카나 유럽에 비해 시장 규모는 작지만, **한국과 중국이 세포 및 유전자치료제 시장의 주요 업체들을 보유하고 있어 향후 북아메리카와 유럽보다 더 빠르게 성장할 것으로 전망**되고 있음

05 기술 문의처

구분	기관명	담당자	직급	연락처	e-mail
연구자	서울대학교	차혁진	교수	02-880-7877	hycha93@snu.ac.kr
기술권리자	서울대학교 산학협력단	박지영	변리사	02-880-2038	jypat@snu.ac.kr