



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월05일
(11) 등록번호 10-0773253
(24) 등록일자 2007년10월30일

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0029479

(22) 출원일자 2007년03월26일

심사청구일자 2007년05월01일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050090542 A

KR1020060058476 A

US5436151 A

(73) 특허권자

주식회사 알앤엘바이오

서울 관악구 봉천동 1596-7

(72) 발명자

라정찬

경기 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을 SK한화아파트 626동701호

김봉휘

경기 용인시 기흥구 상갈동 금화마을주공아파트 501동 2001호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이치영

전체 청구항 수 : 총 8 항

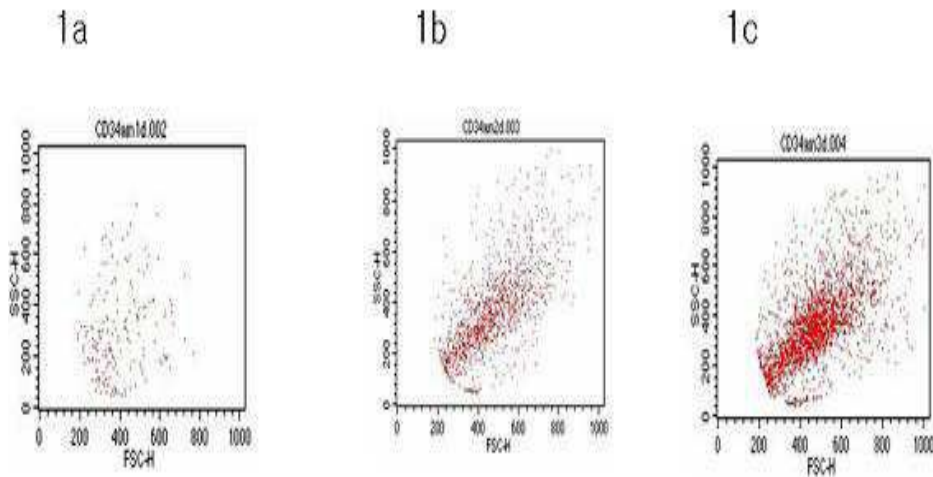
심사관 : 안규정

(54) 성체줄기세포와의 공동배양을 통한 조혈모세포의 배양 및 증식방법

(57) 요약

본 발명은 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 인간 말초혈액, 골수 및 체대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음 단층 배양하고, 상기 단층배양된 단핵세포구를 성체줄기세포 존재하에서 공동배양함을 특징으로 하는 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
조정윤
서울 송파구 오금동 131-17번지

김은옥
인천 동구 화수2동 미룡아파트 104동 205호

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법:

(a) 냉동 보관 중인 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음, 단층 배양하는 단계; 및

(b) 상기 단층 배양된 단핵세포구를 인간 조직 유래 성체줄기세포 존재 하에공동 배양하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단핵세포구는 냉동 보관 중인 인간 제대혈 유래인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인간 조직 유래 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택된 인간조직 유래 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 무혈정 또는 혈청배지에서 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 성체줄기세포: 단핵세포구의 비율이 1-5:1인 것을 특징으로 하는 방법

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 1 내지 180시간 동안 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 공동배양은 24내지 168시간 동안 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조혈모세포 또는 전구세포는 CD34+, Thy1.1+, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-의 면역학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음 단층 배양하고, 상기 단층배양된 단핵세포구를 성체줄기세포 존재하에서 공동배양함을 특징으로 하여 상기 조혈모세포 또는 전구세포의 증폭을 촉진시키는 배양 및 증식 방법에 관한 것이다.
- <3> 조혈모세포(hematopoietic stem cell) 또는 전구세포(progenitor cell)는 제대혈에서 유래하며, 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 혈구세포로 분화될 수 있는 세포로서, 줄기세포의 특징인 자가복제능력, 다세포분열능, 다분화 잠재능 등을 지니고 있다(van der Kooy D., science, 287, pp 1439-1441, 2000).
- <4> 현재 제대혈을 이용한 조혈모세포 또는 전구세포의 이식은 임상적으로 활성화되어 있고, 특히 고용량의 화학적 요법 후의 암환자가 악성조혈상태일 때 만약 자기 조직의 세포가 적합하지 않고 성인의 공여자가 없을 때 조혈모세포 또는 전구세포는 이식의 중요한 공급원으로서 인정되며, 여러 가지 질병들이 조혈모세포 또는 전구세포

이식을 통하여 치료되어 지고 있다. 그 예로서 급만성 백혈병, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 다발성 골수종, 악성 림프종 등 주로 혈액암 관련 질환에서 완치를 위한 치료로 시도되어져 왔고 최근에는 유방암, 난소암, 신장암, 소세포성폐암등 고형암과 불응성 전신성 홍반성 낭창, 불응성 류마티스 관절염 등 악성 자가 면역 질환에도 좋은 치료 성적을 거두고 있다(Lennard, et al., BMJ, 321, pp 433-437, 200; Ikehare, Experimental Hematology, 29, pp661-669, 2001).

- <5> 그러나 이러한 조혈모세포 또는 전구세포는 탯줄의 제대혈로부터 적은 양의 혈액만을 수집할 수밖에 없으므로, 결과적으로 적은수의 세포만을 얻는다는 단점이 있다. 조혈모세포 또는 전구세포의 증폭이 안 된 상태에서의 이식은 대개 아동 환자들에게 한정된다. 그리하여 지난 십년 동안, 골수에서 뿐만 아니라 제대혈에서의 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 시험관내 증폭에 대한 관심이 증가 되고 있다 (Cairo M. S., et al., Blood, 90, pp 4665-4678, 1997; Mayani H., et al., Stem cells, 16, pp153-165, 1998). 또한 최근 보고에서 냉동 보관되어 있던 제대혈의 경우 해동시켜 조혈모세포의 활성을 살펴보았을때 그들의 생리적 생존율이 상당히 낮음을 보고한 바가 있다(Shim J S., et al., Br J Haematol., 135, pp210-213, 2006)
- <6> 따라서 조혈모세포 또는 전구세포의 이식을 위해서는 우리가 필요로 하는 조혈모세포 또는 전구세포를 대량으로 얻는 기술의 개발이 매우 유용하다. 따라서 이러한 조혈모세포 또는 전구세포를 대량으로 증폭하여 수득하기 위하여, 여러 가지 방법 및 최적의 배양조건의 개발이 시도되어져 왔다.
- <7> 현재까지 알려진 대표적인 배양방법으로, 체외에서 여러 가지 재조합 자극성 사이토카인(recombinant stimulatory cytokine)을 배지에 첨가하여 배양하는 방법들이 있었다(Metcalf D., et al., Biomed Pharmacother, 55, pp 75-78, 2001; Ian McNiece, et al., Experimental Hematology, 29,pp3-11, 2001). 어떤 연구에서는 조혈 저해자(hematopoietic inhibitor)에 대한 항체를 사용했고, 다른 연구에서는 다른 기질 세포주를 조혈세포의 배양에 이용하였다(Yamaguchi M., et al., Exp. Hematol., 29, pp 174-182, 2001).
- <8> 조혈모세포 또는 전구세포 배양시 사용되는 사이토카인은 임상적으로 이식 시 여러 가지 문제점을 나타내고, 그 부작용으로 인하여 감염의 위험성이나 종양발생에 대한 우려가 있다. 가령 IL-2의 사용은 심한 저혈압 증세 유발과 모세혈관 유출 증후군 등과 같은 심각한 부작용을 발생시키므로 그 사용이 제한 받고 있다. 모세혈관 유출 증후군은 조직의 모세혈관으로부터 흘러나온 조직액이 축적되는 현상이다(Rosenstein M., et al., J. Immunol., 137, pp1735-1742, 1986).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <9> 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자는 증식을 위한 배양 이전에 CD34⁺ 조혈모세포 또는 전구세포를 분리하지 않고, 또한 사이토카인이나 혈청 등 인위적인 호르몬을 사용하지 않고, 성체줄기세포와 공동 배양함으로써 단기간에 효과적으로 증폭시키고, 이식과정에서의 정착을 위한 미세환경을 제공하는 새로운 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <10> 본 발명의 주된 목적은 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 수득한 단핵세포구와 성체줄기세포와 공동 배양하여 조혈모세포 또는 전구세포의 수를 증폭시키는 배양 및 증식 방법을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음, 단층 배양하는 단계; 및 (b) 상기 단층 배양된 단핵세포구를 인간 조직 유래 성체줄기세포 존재 하에공동 배양하는 단계 포함하는 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법을 제공한다.
- <12> 특히, 상기 단핵세포구는 냉동 보관 중인 인간 제대혈 유래이고, 상기 인간 조직 유래 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또한, 상기 방법에 따른 조혈모세포 또는 전구세포는 CD34⁺, Thy1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻의 면역학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- <13> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <14> 용어의 정의

- <15> 본 발명에서 사용된 용어 '조혈모세포'는 적혈구·백혈구·혈소판을 만드는 미분화된 골수조혈세포의 조상세포를 지칭한다. 정상인의 골수혈액에는 모든 혈액세포를 만들어낼 수 있는 능력을 지닌 세포(CD34 양성 세포)가 약 1% 존재하는데 이를 조혈모세포라고 한다. 피를 만드는 어머니세포라는 뜻으로 온 몸에서 발견되지만 특히 골수에서 대량으로 생산된다. 이 세포로부터 피를 구성하는 세포에 해당하는 적혈구·백혈구·혈소판이 분화되어 만들어진다. 아울러 똑같은 자신을 만들어낼 수 있는 자가복제 기능도 가지고 있으며, 골수의 총조혈모세포 중 0.05~0.25% 정도를 차지한다. 말초혈액 조혈모세포는 골수에서 유래하며 혈류를 순환하는 조혈모세포로서 자가복제 및 성숙된 세포로 분화하는 성질을 가지고 있다.
- <16> 본 발명에서 사용된 용어 '전구세포'는 특정 유형의 세포로 분화되거나 특정 유형의 조직을 형성하도록 된 세포를 지칭한다.
- <17> 본 발명에서 사용된 용어 '줄기세포'는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래('전이(transit)') 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.
- <18> 본 발명에서 사용하는 용어 "성체 줄기세포"란 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체 단계에서 나타나는 줄기세포를 의미하며, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다
- <19> 본 발명의 성체 줄기세포는 이미 공지되어 있는 유방, 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁 등으로 구성된 군에서 유래된 성체 줄기세포로부터 분리, 사용할 수 있다.
- <20> 성체 줄기세포는 성체세포로 분화할 수 있는 신경줄기세포, 골수세포로 분화할 수 있는 조혈모 세포, 뼈, 연골, 지방, 근육 등으로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포, 간세포로 분화할 수 있는 간줄기세포 등이 있다. 그 중에서도 중간엽 줄기세포는 골세포뿐만 아니라 연골세포, 지방세포, 근육세포, 섬유세포 등 여러 가지 근골격계 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 세포이다.
- <21> 중간엽 줄기세포는 제대혈(탯줄)과 골수 등에 존재하므로 세포 분리도 다른 성체조직보다 용이하며 중간엽 줄기세포를 이러한 근골격계 질환뿐 아니라 다른 질환의 치료에 이용하고자 하는 노력들이 행하여지고 있다. 그 이유는 다른 줄기세포와는 달리 골수에서 쉽게 배양 증폭되며, 기존에 알려져 왔던 바와는 달리 중간엽 유래 세포뿐만 아니라, 내배엽 혹은 외배엽 유래의 세포로 분화가 가능하며, 자가의 세포를 이용하므로 면역에 의한 거부반응이 없으며, 배아줄기세포와 달리 원하는 방향으로 분화되지 않은 세포가 암을 유발할 가능성이 매우 희박하여 임상적으로 매우 중요한 장점을 갖고 있기 때문이다.
- <22> 특히, 본 발명의 일 구체예로서, 윤리학적 문제가 없고 줄기세포를 얻기 용이하며 다분화능을 가진 제대혈에서 유래한 줄기세포를 사용할 수 있다.
- <23> 제대혈은 최근에 많은 양의 줄기세포를 가지고 있는 것으로 알려지면서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 제대혈이 조혈모세포의 풍부한 원천으로 알려진 이후, 임상적으로 제대혈 이식을 통해 혈액관련 질환을 치료하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 자가이식 치료를 위하여 제대혈을 냉동시켜 수년 후 사용가능한 상태로 보존하는 제대혈 은행이 국내에서도 활성화되고 있다. 제대혈은 골수와는 달리 분만과정에서 버려지는 제대(umbilical cord)에서 간단한 기술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있다. 또한, 제대혈 이식시 나타날 수 있는 이식편대숙주반응이 골수 이식에 비해 상당히 적어 제대혈에 포함되어 있는 줄기세포의 성장 확인 및 그의 임상예의 응용 확대를 위한 연구가 전 세계적으로 이루어지고 있다. 또한, 제대혈에 중간엽(간엽) 줄기세포의 존재(Erices A, et al., Br. J. Haematol. 109: 235-242, 2000; Lee OK, et al., Blood 103: 1669-1675, 2004)가 보고되고 있다.
- <24> 본 발명에서 사용하는 용어 '배양'이라는 용어는 생물체(주로 미생물 및 발생중인 동식물의 배)나 생물체의 일부(기관·조직·세포 등)를 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 일을 의미한다. 이 경우 외적 조건으로 온도·습도·빛·기체상의 조성(이산화탄소나 산소의 분압) 등이 중요하며, 그 밖에 배양되는 생물체에 가장 중요한 직접적인 영향을 주는 것은 배지(培地)이다. 배지는 배양기라고도 하며, 그 생물체의 직접적인 환경인 동시에 생존이나 증식에 필요한 각종 영양소의 공급장이다. 배지가 액체인 경우를 액체배지라 하고, 액체배지에 한천·젤라틴을 가한 것을 고형배지라고 한다. 배양하는 생물체의 종류에 따라 각종 영양물질이나 삼투압·pH 등을 달리하는, 인공적으로 각종 성분을 조합시켜서 만든 배지를 합성배지(合成培地:synthetic medium)라고 한다.

<25> 본 발명에서 사용하는 "증식(proliferation)"이라는 용어는 세포가 분열되어 동질의 것이 불어나는 것으로서 보통 다세포생물의 체내에서 세포수가 증가되어 가는 것을 말한다. 세포수가 증식되어 어느 시기에 이르면, 형질이 변화(분화)되어 가는 것과 동시에 제어되고 있는 것이 보통이다. 체내에서 세포가 증가되어 가는 것과, 또 세포 내에서 세포질이 신생(新生)되어 가는 경우에는 생장으로 구별하는 경우가 많다. 그러나 생물학적으로 세포수가 증가된다는 점에서 보면, 다세포생물의 발생기에서 분화가 일어나지 않는 시기는 증식으로 보는 것이 정당하다

<26> 본 발명의 인간 조혈모세포 또는 전구세포는 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상에서 유래될 수 있고, 이하에서는 그 중에서 특히 제대혈 유래 조혈모세포 또는 전구세포를 중심으로 기술한다.

<27> 본 발명의 조혈모세포 또는 전구세포 배양 및 증식 방법은 냉동 보관된 제대혈을 해동하여 수득한 단핵구를 단층 배양하는 제 1단계: 태반을 비롯한 인체 조직 유래의 성체줄기세포를 분리 배양하는 제 2단계: 및 제 1단계에서 배양된 세포와 성체줄기세포와 공동 배양하여 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법을 포함함을 그 특징으로 한다. 본 발명의 전과정은 무균적 환경에서 이루어지는 것이 바람직하다.

<28> **1. 제대혈 유래 단핵세포구의 수득**

<29> 본 발명에서, 조혈모세포 또는 전구세포는 혈액을 구성하는 세포로 적혈구, 백혈구, 혈소판을 만드는 조혈세포를 말한다. 이 조혈모세포 또는 혈구세포는 혈액질환이나 면역질환, 암들을 치료하는데 중요한 역할을 하며, 이러한 조혈모세포 또는 전구세포는 골수, 말초혈액, 제대혈 등으로부터 분리 가능하다.

<30> 본 발명에서 일 태양으로 사용하는 제대혈은 인간을 포함한 포유동물에서 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취된 혈액으로 정의되며, 본 발명의 조혈모세포 또는 전구세포 배양 및 증식 방법에서는 인간의 제대혈을 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 본 발명의 구체예로 냉동 보관 되어 있던 인간 제대혈을 해동하여 그로부터 단핵세포구(peripheral mononuclear lymphocyte)를 수득한다.

<31> 제대혈은 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취, 냉동 보관하며, 제대혈로부터 단핵세포를 분리하기 위해서는 피콜-하이팩 밀도구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method)과 같은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

<32> 구체적으로, 냉동보관 되어 있던 제대혈을 해동하여 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)과 혼합하여 희석한 후, 희석된 제대혈과 동량의 피콜-하이팩 용액(Ficoll-Hypaque, 밀도; 1.077 g/ml)에 중첩시킨다. 이때, 피콜-하이팩 용액은 사용 전에 실온이 되도록 하며, 희석된 제대혈의 부피가 피콜-하이팩 용액 부피의 3배가 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 이를 원심분리하여 적혈구층, 단핵세포층 및 혈청층을 분리한다. 파스퇴르 피펫(pasteur pipette) 등을 이용하여 단핵세포층만을 새로운 튜브로 옮기고, PBS 등으로 세척하여 단핵세포층 채취시 혼입된 피콜-하이팩 용액이나 오염된 혈소판을 제거한다. 이와 같이 분리된 단핵세포는 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에 바로 이용하거나 초저온 냉동시켜 장기간 보관 후 사용할 수 있다.

<33> **2. 인체조직 유래 성체줄기세포의 분리 및 배양**

<34> 본 발명의 성체 줄기세포는 이미 공지되어 있는 유방, 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁 등의 인간 조직에서 유래된 성체 줄기세포로부터 분리, 사용할 수 있다.

<35> 특히, 본 발명에 일 태양으로 사용하는 인간 태반조직 유래 줄기세포는 성인의 자가성 성체줄기세포로 분류되고, 태반조직을 사용하므로 윤리적으로 문제가 되지 않는다.

<36> 태반(placenta)은 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 것으로 무게 500g, 지름 15-20cm, 두께 2-3cm 정도의 원반 형태로 되어있다. 태반의 한쪽은 모체와 닿아 있고 다른 한쪽은 태아와 맞닿아 있으며 그 사이 공간에 모체의 혈액이 담겨 있어 태아에게 영양분을 공급하게 된다. 태반은 양막, 장막, 탈락막의 3층으로 구성되어 있다. 또한, 양막은 태아를 둘러싸고 있는 얇고 투명한 막으로, 양수가 들어 있으며, 양막에는 태아의 줄기세포가 존재한다. 탈락막은 수정란이 자궁에 착상되기 위해 자궁의 상피세포가 변형되어 형성된 막으로써 모체의 줄기세포가 존재한다. 태반에 들어있는 줄기세포의 양은 아주 풍부하며 증식이 잘되고 다른세포로 분화도 가능하다.

<37>

<38> 통상 다음과 같은 방법을 통하여, 인간을 포함한 포유동물의 태반을 비롯한 인체조직으로부터 다능성 성체줄기세포를 분리 및 정제하여, 1차 배양함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 성체줄기세포는 공지의 세포배양 배지, 즉 DMEM, α-MEM, McCoys5A, Eagle's basal, CMRL, IMDM 배지 등 일반적으로 사용되는

세포배양용 배지 중 선택된 하나에, 인슐린, 트랜스페린, 셀레니움, 우혈청알부민, 리놀렌산 등을 첨가하여 사용하며, 특히 바람직하게는 DMEM 배지를 사용한다. 즉, 본 발명의 일 구체예로 성체줄기세포인 태반조직 중간엽 줄기세포의 1차 배양의 경우 FBS, FGF 가 포함된 DMEM 배지에서 배양하고, 상피모세포의 경우는 위와 동일한 배지를 사용하되 인슐린과 FGF 대신 EGF를, 포함된 배지를 사용하여 배양할 수 있다.

<39> 인간 태반 조직샘플을 분리하여 각각 PBS로 세척한다. 세척된 태반 조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) 배지를 이용해 37°C에서 1시간 동안 화학적 분해 작업을 한다. 화학적 분해된 조직들을 100 μ m 메쉬(mesh)에 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거후 1200rpm에서 1~10분간 원심분리하였다. 상층액은 석션(suction)하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1200rpm으로 1~10분간 원심분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 단일세포로 잘 부유시킨 후 bFGF가 함유되어 있는 DMEM 배지에서 1차 배양한다. 이틀이 지난 후 디쉬 바닥에 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 배지를 2~3일마다 교체하면서 배양하여 인간 태반에서 분리한 성체 줄기세포액을 수득하였다.

<40> **3. 제1단계에서 배양된 단핵세포구와, 제2단계에서 수득한 성체줄기세포의 공동 배양**

<41> 본 발명의 세포배양 및 증식 방법에서 제대혈 유래 단핵세포구 (CD34⁺, Thy 1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻ 세포군)와 성체줄기세포와의 공동 배양은, 상기에서 준비된 성체줄기세포에 제대혈 유래 단핵세포 (CD34⁺, Thy 1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻ 세포)를 접종하여 공동배양하는 것을 특징으로 한다.

<42> 바람직하게는 성체줄기세포: 단핵세포(예를 들어, CD34⁺세포)의 비율이 1-5:1에 해당한다.

<43> 또한, 상기 배양 및 증식 방법에서, 공동배양은 1 내지 180 시간 동안, 바람직하게는 12 내지 168 시간 동안, 보다 바람직하게는 24 내지 168 시간 동안 이루어지는 것이 바람직하다.

<44> 또한, 사용하는 배지로서, 무혈청 또는 혈청 배지를 사용할 수 있고, 바람직하게는 무혈청 배지에서 수행함이 바람직하다.

<45> 본 발명에서 사용하는 세포배양배지는 상기 성분이외에도 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 추가로 함유할 수 있다. 예를 들면, 말, 소 또는 사람의 혈청, 미생물의 오염을 막기 위해 페니실린, 스트렙토마이신 설페이트, 암포테리신 B, 젠타마이신, 또는 니스타틴 등의 항생제 및 항진균제등을 추가할 수 있다.

<46> 상기 공동배양과정은 세포이식을 위하여 사이토카인이나 혈청을 넣어주지 않고 수행되며, 성체줄기세포에서 분비되는 자극제의 영향으로 제대혈 유래 CD34⁺, Thy 1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻세포가 증식된다.

<47> **4. 조혈모세포 및 전구세포의 배양 및 증식 확인**

<48> 증식된 세포의 갯수 및 유형은 유동 세포측정, 세포 분류, 면역세포화학(예를 들어, 조직 특이성 또는 세포-표지 특이적 항체로 염색시킴), 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS), 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting, MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하는 형태 및 세포의 표면 표지에서의 변화를 측정하거나, 광학 현미경 또는 공초점(confocal) 현미경을 사용하여 세포의 형태를 검사하거나, 또는 PCR 및 유전자 발현 프로파일링(profiling)과 같이 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정함으로써 쉽게 모니터링될 수 있다.

<49> 바람직한 실시양태에서, 태반에서 배양된 세포는 당해 분야에 공지된 기법, 예를 들어 밀도 구배 원심 분리, 자석 세포분리, 유세포분석기, 또는 다른 세포 분리법을 사용하여, 또는 당해 분야에 공지된 분류 방법을 사용하여 분류된다.

<50> 일례로, 목적의 표면항원을 발현하고 있는 세포를 수득하는 방법으로서는 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 해당 세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법(*J. Immunol.*, 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.

<51> 플로우 사이토미터 소팅 방식으로서, 수적하전 방식, 셀캡처 방식 등을 들 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 표면 표지-특이적 항체 또는 리간드는 분명한 형광 라벨로 표지된다. 세포는 세포 분류기를 통해 처리되어 그들의 사용된 항체에 대한 결합능력에 기초하여 세포가 분리된다. FACS-분류된 입자는 96웰 또는 384웰

플레이트의 개별 웰(well)내에 직접 침착되어 분리 및 클로닝을 촉진시킬 수 있다.

- <52> 어떠한 방법으로도 세포의 표면항원을 특이적으로 인식하는 항체를 형광으로 표지하고, 표지된 항체와 항원의 결합체에 대한 형광을 측정하여 형광 강도를 전기 신호로 변환함으로써 세포의 항원 발현량을 정량할 수 있다. 또한, 사용하는 형광물질의 종류를 조합함으로써, 복수의 표면 항원을 발현하고 있는 세포를 분리하는 것도 가능하다. 여기에 사용가능한 형광물질로는, FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin), APC(allo-phycoyanin), TR(TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.
- <53> 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서는, 상기에서 수득한 줄기세포용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과 한번 적당한 배지 중에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다. 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 세포 샘플을 혼합하고, 얼음 위에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않는 경우에는 세정 후 일차 항체에 대해서 결합 활성을 갖는 형광 표지된 이차 항체와 일차 항체가 반응한 세포를 혼합하고, 다시 얼음물에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 세정 후, 일차 항체와 이차 항체에서 염색된 세포를 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다.
- <54> 상기 배양 및 증식된 세포의 확인은, 조혈모세포 또는 전구세포에서 발현되는 세포표면항원에 대한 항체중에서 선택된 하나 이상의 항체를 사용 가능하다. 즉, 상기 배양 및 증식 방법에서, 조혈모세포 또는 전구세포의 특이 항원에 대한 항체로서 CD34⁺, Thy 1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻를 사용 가능하고, 특히, 바람직하게는 항원인 CD34⁺에 대한 항체를 사용하는 것이다.
- <55> 또한, 상기 항체에 형광물질 또는 마그네틱 마이크로비드가 부착된 항체도 사용할 수 있는데, 바람직하게는 마그네틱 마이크로비드가 부착된 CD34⁺항체를 사용한다.
- <56> CD34 항원은 분자량 116 kDa의 글리코포스포프로테인으로, 1번 염색체의 장완에 그 유전자가 존재하고 있으며, 정상 골수 세포의 1~2% 정도에서 발현 되는데, 특히 초기 조혈 전구세포에서 흔히 발현된다. 최근 인간의 조혈 줄기세포의 표면형질 하나인 CD34 양성 세포가 베토 활성(veto activity)을 가진다는 것이 보고되었다. 베토 세포는 전통적으로 CD8 양성이면서, Fas 리간드와 class I MHC를 발현하는 세포로서, 동종 줄기 세포 이식에서 면역거부반응을 담당하는 T 임파구 클론에 대해 선택적으로 세포사를 유발함으로써 이식된 생착편의 생존을 증가시키는 기능을 가지는 세포라 하여 일명 촉진 세포(facilitating cell)라고 불리기도 하였다. 이러한 베토 세포 활성은 골수의 CD34 양성 줄기세포에 거의 편중되어 나타난다.
- <57> 상기 과정을 통해 수득 가능한 본 발명의 세포는 제대혈 유래 조혈모세포 (CD34⁺, Thy 1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻세포)이다. 즉, 본 발명의 방법에 따라 수득한 제대혈 유래 조혈모세포 또는 전구세포는 면역표현형 특성에 있어서, CD34, cd133, C-kit, CD117, CD45, Thy 1.1, 및 KDR에 대한 항체에 대해 양성 반응을 나타내며, CD38 및 lin에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타낸다.
- <58> 본 발명에서 수득한 제대혈 유래 CD34⁺, Thy 1.1⁺, CD45⁺, KDR⁺, CD38⁻, 및 lin⁻세포는, 인슐린, 트랜스페린, 셀레니움, 우혈청알부민, 리놀렌산 등을, 세포배양 배지, 즉 DMEM, α-MEM, McCoys5A, Eagle's basal, CMRL, IMDM 배지 등 일반적으로 사용되는 세포배양용 배지 중 선택된 하나에 첨가하여 사용할 수 있고, 바람직하게는 RPMI-1640 세포 배양액을 사용한다.
- <59> 또한 본 발명에서 사용하는 세포배양 배지 역시, 상기 성분 이외에도 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 추가로 함유할 수 있다. 예를 들어 말, 소 또는 사람의 혈청, 미생물의 오염을 막기 위해 페니실린, 스트렙토마이신 설페이트, 암포테리신 B, 젠타마이신, 또는 니스타틴 등의 항생제 및 항진균제등을 추가할 수 있다.

<60> **실시예**

- <61> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <62> 특히, 하기 실시예에서는 제대혈 유래 조혈모세포, 전구세포 및 태반 유래 성체줄기세포를 기술하고 있으나, 이 밖에도 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈 등에서 유래한 조혈모세포 및 전구세포, 그리고, 골수, 제대혈, 혈액,

간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁 등의 인간조직 유래 성체 줄기세포를 사용할 수 있는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<63> **실시예1 : 제대혈 유래 단핵세포구의 수득**

<64> (1) 제대혈 유래 단핵세포구 수집(cell collection)

<65> 제대혈은 위원회지침서에 따라 고려대학교 산부인과에서 정상 분만과 조산분만에서 수집하였다. 혈액은 시트르산-인산-덱스트로즈 항응혈제(citrate-phosphate-dextrose anticoagulant, CPDA)가 포함되어 있는 250 ml 표준혈액수집백(standard blood bag, 녹십자, 한국)에 수집되었다.

<66> 냉동 보관 되어 있던 제대혈을 37 °C 항온조에 넣어 천천히 흔들면서 해동시킨 후 50 ml 튜브로 옮겨, 1000 rpm, 3 min의 조건하에서 원심 분리하였다. 원심분리후 침전물로부터 적혈구를 제거 하기 위하여 적혈구 용해용 버퍼를 이용하여 적혈구를 용혈시킨 후 위와 동일한 조건으로 다시 한 번 원심분리를 실시하였다. 최종 침전물을 단핵세포구로 실험에 이용하였다.

<67> (2) CD34+ 세포의 정량

<68> 양성선별 후 즉시, CD34+ 세포들은 면역조직화학법에 의해 동정되고 정량화 되었다. 이것은 상용화 키트를 이용하여 CD34+ 항원을 지향하기 위한 특이 단일 클론 항체를 사용하였다. 40×10^3 개의 세포를 포함하고 슬라이드는 제조사의 지시에 따라 전과정을 시행하였다.

<69> **실시예 2 : 성체줄기세포의 수득**

<70> (1) 태반을 비롯한 조직의 준비

<71> 태반조직은 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산 분만에서 수집되었고, 지방의 경우 아산 병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 아산병원에서 수집되어 연구용으로 사용되었다. 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수에 넣어서 연구실까지 옮겼다.

<72> 연구실로 옮긴 조직은 PBS를 이용하여 세척하여 혈구세포들과 여러 조직의 잔해들을 제거하거나 조직을 용혈 버퍼(hemolysis buffer)를 이용하여 혈구세포들을 제거 하였다.

<73> (2) 태반조직 유래 줄기세포의 분리 및 배양

<74> 분리된 각각의 태반 조직들은 100Φ디쉬에 놓고 멸균된 메쉬를 이용해 1~2mm 크기로 잘게 세절하였다. 그 후, 콜라게나제가 포함된 배지에 놓고 37°C의 배양기에서 최소 1 시간에서 최대 4시간 동안 반응시킨 다음 100 와이어 직물체를 이용해 콜라게나제가 처리된 조직을 걸렀다. 이렇게 분리한 세포들은 100mm 디쉬에 37°C, 5% CO₂ 조건하 DMEM배지에서 배양하였다. 상피모세포의 경우에는 유사한 공정을 사용하되 트립신을 이용하여 분리 및 배양하였다.

<75> **실시예 3 : 제대혈 유래 단핵세포구와 성체줄기세포의 공동 배양**

<76> 6-웰 배양 플라스크에 2×10^6 개의 기질 세포를 플레이팅했고, 단핵세포구는 기질세포들이 90 % 의 컨플루언스 보다 훨씬 높아질 때 째 접종하였다.

<77> 공동배양하는 시점에서 성체줄기세포는 단핵세포구를 넣어주기 전에 다섯 번 PBS로 세척하였다. 미리 무혈청 RPMI-1640 배지에서 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 배양한 성체줄기세포의 단층에 1.0×10^5 개의 단핵세포구를 접종하였다.

<78> **실시예 4 : 조혈모세포의 증식 확인**

<79> 공동배양시 매일 비부착성/부착성 조혈세포는 조심스럽게 파이프팅을하여 수거하였다. 부유하여 있는 코블스톤-형성 조혈성 세포 밑에 위치하는 성체줄기세포는 배양 플라스크에 남겨지고, 수거된 조혈성 세포 중 생명력 있는 세포의 총 수는 트립판 블루 염색법과 형광면역세포분리기를 이용하여 혈구계수기를 통해 계수하였다.

<80> [표1]

	Adipose MSC	Amnion MSC	Decidua MSC	Epithelial cell
24 시간 배양	2×10^4	2×10^4	5×10^4	2.5×10^4
48 시간 배양	4.5×10^4	1×10^5	7×10^4	8×10^4
72 시간 배양	7×10^4	1.6×10^5	8×10^4	1.4×10^5

<81>

<82>

상기 표1은 본 발명의 단핵세포구를, 태반 조직 유래의 중간엽 줄기세포 또는, 중간엽 줄기세포와 다른 특성을 가지는 상피모세포와 각각 공동 배양한 후의 세포수에 대한 도표이다. 상기 표에서 확인 할 수 있는 것처럼, 조혈모세포는 성체줄기세포인 태반 유래 줄기세포 또는 상피모세포와 공동 배양한 때, 24시간, 48시간, 72시간 동안 증가한 양상을 나타내었다.

<83>

또한, 도 1a 내지 도 1c에서 알 수 있는 것처럼, 상기 수득된 $CD34^+$ 세포는 4일 동안 증가한 양상을 나타내었다. 즉, 기존의 성장인자를 넣어준 배양 방법, 공동 배양 이전에 조혈모세포를 선분리하여 배양한 방법보다, 본 발명의 단핵세포구의 형태로 성체줄기세포와의 공동배양하는 방법에서 조혈모세포 또는 전구세포는 더욱 뛰어난 증식효과를 나타내었다.

발명의 효과

<84>

상기에서 살핀 바와 같이, 본 발명의 세포 배양 및 증식 방법은 제대혈로부터 $CD34^+$ 조혈모세포 또는 전구세포를 분리하지 않고 단핵세포구의 상태로 성체줄기세포와 무혈청 또는 혈청배지에서 공동 배양하는 것으로, 이는 단시간에 경제적으로 $CD34^+/CD38^-$ 조혈모세포를 증식 시키는 것으로, 그리고 이식에 안전한 조혈모세포 또는 전구세포의 증식을 가증시키는 효과를 나타낸다. 특히, 조혈모세포의 이러한 높은 증식율때문에, 통상적으로 냉동 보관하고 있는 제대혈을 이용하여도 대량의 조혈모세포 및 전구세포를 수득할 수 있다. 따라서, 임상적으로 조혈모세포 또는 전구세포의 이식을 필요로하는 혈액암 등의 질환을 가진 환자의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

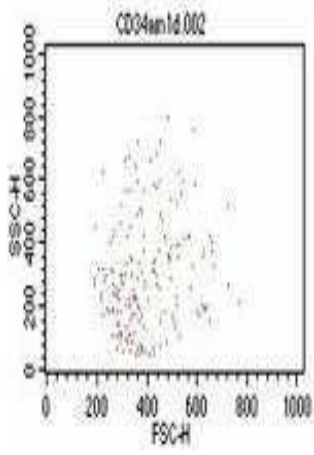
<1>

도 1a 내지 1c 는 제대혈 유래 단핵세포구 및 성체줄기세포와의 공동배양 후, 형광면역세포분리기에 의해 분리된 조혈모세포 $CD34^+$ 세포의 시간별 세포수 변화를 나타낸 그래프이다[도 1a: 24시간일 때의 $CD34^+$ 세포수; 도 1b: 48시간일 때의 $CD34^+$ 세포수; 도 1c: 72시간일 때의 $CD34^+$ 세포수].

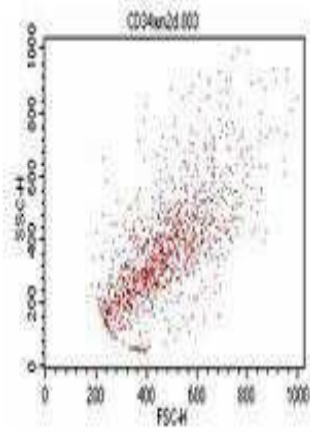
도면

도면1

1a



1b



1c

