

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/074 C12N 5/02
Published Date	20080117
Registration No.	1007957080000
Registration Date	20080111
Application No.	1020070114451
Application Date	20071109
Priority Claims	1020060134241 20061226 KR
Requested Date of Examination	20071109
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	RA, Jeong Chan Shin, Il Seob Kang, Sung Keun Woo, Sang Kyu
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

발명의 명칭

인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 분리 및 배양방법

Title of Invention

The separation and culture method of the human amnion cell originated adult stem cell.

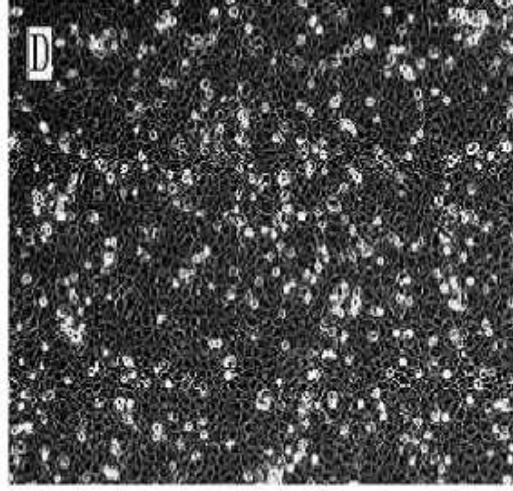
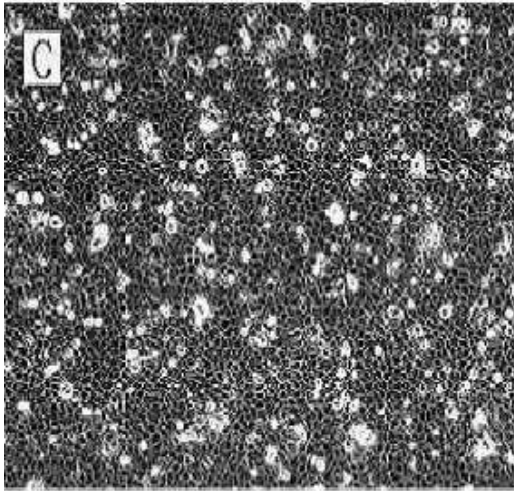
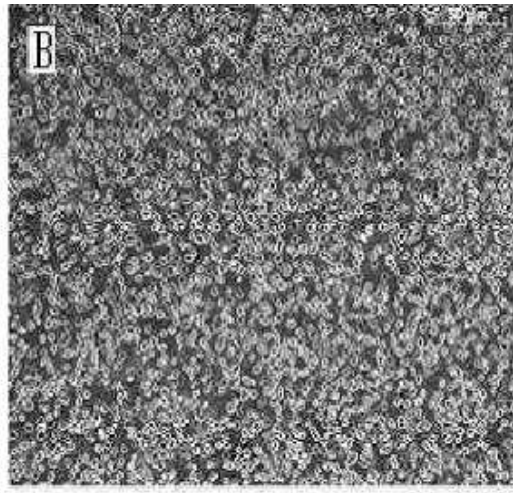
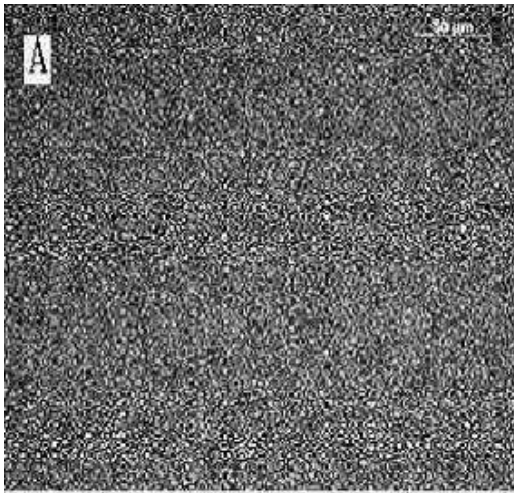
요약

본 발명은 향상된 인간의 양막 유래 성체 줄기세포를 분리하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 인간의 양막조직으로부터 DTT(Dithiothreitol) 및 저농도의 트립신 처리를 통해 단일 세포인 양막 상피세포를 수득하고, 상기 양막 상피세포 배양시 ROCK(Rho-associated kinase) 저해제를 첨가하여 다량의 성체 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 인간 양막 상피세포 유래 줄기세포는 기존 제대혈, 골수 등의 치료용 줄기세포보다 채취가 쉽고, DTT 처리, ROCK 저해제 첨가 또는 배지 교환으로 수득률 및 증식률을 현격히 증가시킴으로써, 성체 줄기세포를 제조하는데 효율적인 방법을 제공한다. 양막 상피세포, 디티오프레이톨(DTT), ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)

Abstract

The invention relates to a method for producing a large amount of adult stem cell the ROCK (Rho-associated kinase) inhibitor is added in the amnion cell cultivation the amnion cell called the single cells through the trypsinization of the DTT (Dithiothreitol) and low concentration are obtained from the amnion organization of human more detailed as the method of separating the amnion originated adult stem cell of the improved human. As to the human amnion cell originated stem cell according to the present invention, picking is easy than the stem cell for the treatment including the existing umbilical cord blood, the bone marrow etc. The yield and growth rate are markedly increased to the DTT processing, and the ROCK inhibitor addition or the medium exchange. In that way the adult stem cell is manufactured but the efficient method is provided. The amnion cell, the dithiothreitol (DTT), and the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) .

대표도면 (Representative drawing)



DTT 처리함

DTT처리하지않음

청구의 범위

청구 1항:

인간 양막 조직을 DTT(dithiothreitol)로 처리하는 단계; 및 상기 DTT 처리된 인간 양막 조직을 0.025%~0.125%의 트립신으로 처리하는 단계를 포함하는, 양막 상피세포(amniotic epithelial cell)의 분리방법.

청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 트립신 처리된 인간 양막 조직을 볼텍싱(vortexing) 하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분리방법.

청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 DTT(Dithiothreitol)의 농도는 5mM~50mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구 4항:

제1항의 방법에 의해 분리된 인간 양막 상피세포를 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 배

Scope of Claims

Claim 1:

The separation method of the amnion cell (amniotic epithelial cell) including the step of processing as the DTT (dithiothreitol) the human amnion organization and step of processing as the trypsin of 0.025%~0.125% the human amnion organization handled with DTT.

Claim 2:

As for claim 1, the separation method which further comprises the step the trypsinized human amnion organization as described above the vortexing.

Claim 3:

As for claim 1, the method called the concentration of the DTT (Dithiothreitol).

Claim 4:

The manufacturing method which is the step of collecting the stem cell from the culture fluid it cultivat

양한 다음, 상기 배양액으로부터 줄기세포를 회수하는 단계인 것을 특징으로 하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 제조방법.

청구 5항:

제4항의 방법에 의해 제조된 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 계대 배양하는 것을 특징으로 하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식#183#유지 방법.

청구 6항:

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 ROCK 저해제의 농도는 10nM~100#956#M인 것을 특징으로 하는 방법.

청구 7항:

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 ROCK 저해제는 하기 구조식으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 방법:.

청구 8항:

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 배지는 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 또는 K-SFM(keratinocyte serum free medium) 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구 9항:

제8항에 있어서, 상기 배지는 1차 계대 배양시 DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) 배지에서 K-SFM(keratinocyte serum free medium) 배지로 교체하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구 10항:

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 배지는 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 및 F-12(nutrient mixture)가 1:1로 혼합되어 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구 11항:

제10항에 있어서, 상기 배지는 아스코르브산, 표피성장인자, 인슐린, 항생제 및 FBS(Fetal bovine serum)를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구 12항:

제5항에 있어서, 상기 계대 배양시에 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 배지상에 리씨딩(reseeding)하면서 ROCK 저해제를 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구 13항:

제4항의 방법에 의해 제조되고, 다음과 같은 특성을 가지는 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포: (a) 둥근 모양의 직육면체 형태(simple-cuboidal)의 형태학적 특성을 나타냄; (b) C

es in the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) the human amnion cell which the method divides-added culture medium of claim 1 of the human amnion cell originated adult stem cell.

Claim 5:

The proliferation · keeping method for subculturing in the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) the human amnion cell originated adult stem cell, manufactured by the method-added culture medium of claim 4 of the human amnion cell originated adult stem cell.

Claim 6:

As for claim 4 or 5, the method in which the concentration of the ROCK inhibitor is 10nM~100μM.

Claim 7:

As for claim 4 or 5, the method for being the compound represented by the ROCK inhibitor is the Below-mentioned structure: .

Claim 8:

As for claim 4 or 5, the method called the culture medium is the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) or the K- SFM (keratinocyte serum free medium) culture medium.

Claim 9:

As for claim 8, the method which the culture medium replaces with the K- SFM (keratinocyte serum free medium) culture medium in the first subculture in the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) culture medium.

Claim 10:

As for claim 4 or 5, the method in which the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) and F- 12 (nutrient mixture) are mixed to 1:1 and the culture medium is comprised.

Claim 11:

As for claim 10, method of additionally containing the culture medium is the ascorbic acid, epidermal growth factor, insulin, antibiotic and FBS (Fetal bovine serum).

Claim 12:

As for claim 5, the method with the ROCK inhibitor the human amnion cell originated adult stem cell is in the subculture on the culture medium the Lee seeding (reseeding).

Claim 13:

The human amnion cell originated adult stem cell which is manufactured by the method of claim 4 ; and has the property as follows: the morphology of the cuboidal t

D9, CD29, CD49f, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 CD133에 대하여 음성의 면역학적 특성을 가짐; (c) SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60 및 Tra-1-81이 발현됨. (d) Cytokeratin 및 E-cadherin이 발현됨.

청구 14항:

제13항의 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 세포 치료제.

기술분야

본 발명은 높은 수율로 인간의 양막 유래 성체 줄기세포를 분리 및 배양하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 인간의 양막 조직으로부터 DTT(Dithiothreitol) 및 저농도의 트립신 처리를 통해 양막 상피세포를 고수율로 수득하고, 상기 양막 상피세포 배양시 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가하여 다량의 성체 줄기세포를 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

21세기의 생명공학은 인간복지를 최종목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 최근에 줄기세포의 이용기술은 난치병 치료의 새로운 장으로 떠오르고 있다. 이전까지는 인간의 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역거부와 공급 장기 부족, 백터개발이나 질환유전자에 대한 지식부족으로 효율적인 실용화가 미진하였다.

이에 줄기세포연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근원적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 또한, 많은 과학자가 인체의 거의 모든 장기 재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상 등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해 왔다.

줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다.

만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며

type (simple-cuboidal) of (a) illusion is shown the bisexual person immunological characteristic is shown about (b) CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90 and CD105 ; and it has the immunological characteristic of voice about the CD31, the CD34, and the CD45 and CD133 : (c) SSEA 4, the Oct-4, and the Tra-1-60 and Tra-1-81 are revealed. (d) The Cytokeratin and E-cadherin are revealed.

Claim 14:

The cell therapy product for the wound treatment containing human amnion cell originated adult stem cell as an active ingredient of claim 13.

Technical Field

The invention relates to the method obtaining the amnion cell by the high yield as the method of cultivating with the separation the amnion originated adult stem cell of the high yield human from the amnion organization of more detailed human through the trypsinization of the low concentration and DTT (Dithiothreitol) and for adding the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) in the amnion cell cultivation and obtaining a large amount of adult stem cell.

Background Art

The genetic engineering of 21 intensity presents the possibility of the new solution the human welfare as the final target to the capacity for eating, the environment, and the health problem. And the utilizing technology of the stem cell rises to the sky as the new field of the incurable disease treatment. The organ transfer or the gene therapy etc. were presented for the incurable disease treatment of human to the previous. But the efficient put to practical use was incomplete to the immunological rejection and supply long-term shortage, and the knowledge deficit to the vector development or the causative gene.

Thus, it was recognized that pluripotent stem cell having the capability in which the concern about the stem cell research is increased and forming all boilers through proliferation and differentiation fundamentally could solve the long-term damage as well as the most of treatment of illnesses. Moreover, until many scientist nearly told of the human body to the treatment including the parkinson's disease, which was the intractable disease as well as all long-plaies all kinds of the cancers, the diabetes and spinal cord injury etc. it was various the applicability of the stem cell had been being presented.

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability. And it can classify into the pluripotent stem cell (totipotent stem cell), the pluripotent stem cell, and the Multipotent stem cell.

The pluripotent stem cell (totipotent stem cell) has the property thereafter that the cell to 8 cell group is like that with the correction of one complete entity the cell

이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기 세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.

성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다.

상기 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang et al., Nature, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, Trends Cell Biol., 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 소스이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma et al., Nat. Cell Biol., 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al., Science, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., Exp. Hematol., 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직 내에 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들은 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

한편, 태아 조직(fetal tissue)에서 중간엽 줄기세포의 분리를 연구한 결과, 풍부한 중간엽 줄기세포가 있음이 밝혀졌으나, 세포치료제를 목적으로 태아 조직의 사용은 윤리적으로 제한이 있기 때문에 세포치료제로 사용하기 위한 한계가 있었다. 태아 중간엽 줄기세포(fetal MSC)에 대한 소스로서 제대혈(Umbilical cord blood, UCB)에서도 중간엽 줄기세포를 분리하였지만, 그 수가 매우 작았고, 증식이 잘 되지 않는 문제점이 있었다.

반면 최근 뛰어난 분화능력과 안전성으로 각광을 받는 태반 줄기세포는 제대혈에 비해 100배 더 많은 양의 중간엽 줄기세포를 추출할 수 있을 뿐만 아니라 사용 가능 회수에서도 제대혈이 1회에 한정하고 15세 이상이 되면 타인의 제대혈을 보충해야 하지만, 태반 줄기세포는 여러 번 사용할 수 있어 성인이 되어서도 사용 가능하다. 또한, 태반 줄기세포는 보다 다양한 질환에 이용될 수 있다. 제대혈의 조혈모세포는 주로 혈액 질환에

having the property of the pluripotent which can be generated the ovum and correct letter. And if this cell is separated and it transplants to the womb it can be generated as one complete entity. The pluripotent stem cell is that the new life it is derived from the positioned in inner cell mass it is this specialized to various other histiocytes is formed in the inside of the blastocyst which is the cell which can be generated by the ectoderm, the mesoderm, and the various cells and organization of the endoderm layer originated and shows up after the correction 4~5. The fetal life, and the regeneration in the maintenance of homeostasis of the adult tissue as well as the growth of each organization of the new-born baby and adult phase and long-term and development and tissue injury it is the stem cell specializing in the cell specific for the organization containing the Multipotent stem cell is this cell and boiler may be referred to the adult stem cell while engaging in the function of inducing tissue specific pluripotent cells are called collectively.

There can be the specialized characteristic as the specific tissue the stem cell is developed the cell in which the adult stem cell already exists in all kinds of the long-terms of the human body is picked. But recently, the adult stem cell is used. The experiment let differentiate as all kinds of different organization including the interstitial cell etc. gets the success and the experiment is watched.

In the Multipotent stem cell is the adult bone marrow, it was separated. Thereafter it was confirmed in the other different adult tissue (C.M. Verfaillie, Trends Cell Biol., 12:502, 2002). In other words, the bone marrow is the source of the most widely known stem cell. And the Multipotent stem cell was confirmed from skin, the blood vessel, and the muscle and brain (J.G. Toma et al., Nat. Cell Biol., 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al., Science, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., Exp. Hematol., 30:896, 2002). But the stem cell very rarely exists within the adult tissue like the bone marrow. It is difficult to these cells be not issued with differentiation induction and cultivate. It is difficult to cultivate the cells if there are no culture mediums which the specifically are screened. That is, it has the disadvantage that it is very difficult to stem cells separate and preserve in vitro.

In the meantime, there can be the limit for using as the cell therapy product because the limit ethically has the use of the embryo tissue as the purpose the cell therapy product the separation of the mesenchyme stem cell was studied in the embryo tissue (fetal tissue). There is a problem that in the umbilical cord blood (Umbilical cord blood, UCB) as the source about the fetus mesenchyme stem cell (fetal MSC), the mesenchyme stem cell was separated. However the number was very small. Proliferation does not go well.

On the other hand, recently, in addition if the placental stem cell which is in the spotlight as the excellent differentiation ability and safety can extract the mesenchyme stem cell of the hundredfold more amount in comparison with the umbilical cord blood the umbilical cord blood limits to 1 time in the use possible frequency and it becomes over 15 years old the others' umbilical cord blood

사용되나, 태반 줄기세포는 세포손상 질환에 사용에 유리하여 향후 심장마비, 뇌졸중, 당뇨병, 골다공증, 퇴행성 관절염 등 많은 질병에 이용할 수 있다.

그러나, 성체 줄기세포의 소스(source)로 태반을 이용하는 데 있어서, 분만 직후의 태반 조직을 필요한 순간마다 바로 제공받기는 어려운 실정이며, 실제로 태반조직의 산업적 이용(태반주사, 태반화장품류)은, 분만 후의 태반조직을 냉장 보관하였다가 사용하고 있다. 미분화 상태로 존재하는 태반 유래 줄기세포는 분만 직후의 태반에서부터만 많은 양으로 수득할 수 있을 뿐, 분만 후 몇 시간이 경과되거나 특히, 오랜 시간 동안 냉장 보관되어 있던 태반 조직으로부터는 다량의 성체 줄기세포를 수득하는 것이 매우 어렵다.

그렇기 때문에 현시점에서 태반 유래 성체 줄기세포를 산업적으로 이용할 수 있기 위해서는 무엇보다도, 냉장 보관되어 있는 태반 조직 등으로부터 대량으로 성체 줄기세포를 제조할 수 있는 방법이 절실히 요구되고 있다. 그 중에서도 배아 줄기세포의 특성과 가장 유사한 특성을 보유하여 여러 가지 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으면서, 배아줄기세포와 달리 체내 이식시 암을 발생시키지 않아 임상적으로 안전한 것으로 알려져 있는 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포 (Toshio Miki, et al., STEM CELL, 23:1549, 2005)는, 다른 태반 조직 유래 성체 줄기세포와 달리 단일세포 배양 및 계대 배양시 세포사멸(Apoptosis)과정으로 진행되기 더욱 쉬워 기존의 배양 방법으로는 미분화 상태의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 대량으로 증식하는 것이 곤란하였다 (<http://www.cellapplications.com/HumanCells/HPIEpC.htm>).

이에 본 발명자들은 양막 상피세포 유래의 미분화 상태의 성체 줄기세포를 대량으로 제조하여 실용화 하기 위해 예의 노력한 결과, DTT 및 ROCK 저해제를 양막 상피세포의 분리 및 배양에 이용하고, 배양 배지의 조성을 바꿔줌으로써 양막 상피세포 유래 줄기세포를 냉장 보관된 태반조직으로부터 대량 수득할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하고자 하는 과제

본 발명의 목적은 인간 양막 조직으로부터 양막 상피세포를 고수율로 분리하는 방법 및 상기 분리된 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의하여 제조된, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 제공하는데 있다.

ood has to be supplemented. However even by the placental stem cell many times using and becoming an adult it is usable. Moreover, the placental stem cell can be used for more various disease. The hematopoietic stem cell of the umbilical cord blood is mainly used for the blood disease. But it is advantageous for the cell damage disease for the use and the placental stem cell can use only in many with heart attack, stroke, diabetes, osteoporosis, the degenerative arthritis etc disease in the future.

But the using the source of the adult stem cell the placenta is the difficult actual condition to immediately receive the placenta tissue of the immediately parturition at the necessary moment. And it kept in refrigeration in the placenta tissue after the childbirth and industrial use (the placenta injection, and the placenta toiletry) of the placenta tissue use in fact. The placenta originated stem cell existing as the undivided condition can obtain by many amount in the placenta of the immediately parturition. The childbirth is difficult that several hours go by after the childbirth or a large amount of adult stem cell is obtained from the placenta tissue frozen and kept for especially, the long time.

Because of that, method of manufacturing the placenta tissue etc., massively, the adult stem cell is above anything else frozen and kept in order to industrial use are desperately required. Among them, it was difficult to be more easy to the other placenta tissue originated adult stem cell in the single cell culture and subculture to be progressed as the apoptosis process and massively increase the amnion cell originated adult stem cell of the undivided condition to the existing culture method (<http://www.cellapplications.com/HumanCells/HPIEpC.htm>).

Thus, it was to the inventors manufacture the adult stem cell of the undivided condition of the amnion cell originated with the large amount and do with put to practical use and it made many efforts. Then DTT and ROCK inhibitor were used for the separation and cultivation of the amnion cell. It confirmed to could obtain the large amount from the placenta tissue which was frozen and kept the amnion cell originated stem cell by changing the composition of the culture medium. The invention was completed.

Summary of Invention

Problem to be solved

The manufacturing method of the amnion cell originated adult stem cell separated with method of separating according to the high yield this Purpose of the invention is the amnion cell from the human amnion organization and above is to be provided.

It is another object of the present invention to provide the human amnion cell originated adult stem cell manufactured by the method.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 세포 치료제를 제공하는데 있다.

It is still another object of the present invention to provide the cell therapy product for the wound treatment containing the adult stem cell as an active ingredient.

과제해결 수단

Means to solve the problem

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 양막 조직을 DTT(Dithiothreitol)으로 처리하는 단계 및 상기 DTT 처리된 인간 양막 조직을 0.025% ~ 0.125%의 트립신으로 처리하는 단계를 포함하는, 양막 상피세포(amniotic epithelial cell) 분리 방법을 제공한다.

To accomplish the above objects, the invention provides the amnion cell (amniotic epithelial cell) separation method including the step of processing as the DTT (Dithiothreitol) the human amnion organization and step of processing as the trypsin of 0.025% ~ 0.125% the human amnion organization handled with DTT.

본 발명은 또한 상기 방법에 따라 분리된 인간 양막 상피세포를 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 배양하여 줄기세포를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포 제조 또는 증식방법 및 상기 방법에 의해 수득된 인간 양막 상피조직 유래 성체 줄기세포를 제공한다.

The invention provides the human amnion cell originated adult stem cell manufacture or the propagating method and the human amnion epithelial tissue originated adult stem cell obtained with the method including the step of collecting the stem cell it cultivates in the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) the human amnion cell separated according to moreover, the method-added culture medium.

본 발명은 또한 상기 방법에 따라 수득된 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 체내 또는 체표면의 창상 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides the cell therapy product for the wound treatment of the internal containing the human amnion cell originated adult stem cell obtained according to the method as an active ingredient or the body surface.

발명의 효과

Effects of the Invention

본 발명에 따른 인간 양막 상피세포 유래 줄기세포는 기존 제대혈, 골수 등의 치료용 줄기세포보다 채취가 쉽고, DTT 처리로 인한 초기 수득률 향상 및 ROCK 저해제 첨가 배지에서의 배양으로 증식률을 현격히 증가시킴으로써 세포치료제로 유용한 성체 줄기세포를 효율적으로 제조하는데 유용하다.

The human amnion cell originated stem cell according to the present invention efficiently manufactures the cell therapy product the growth rate is markedly increased to the cultivation at the initial seeding modulus improvement due to the DTT processing and ROCK inhibitor medium supplement picking is easy than the stem cell for the treatment including the existing umbilical cord blood, the bone marrow etc useful as the cell therapy product the growth rate is markedly increased to the cultivation at the initial seeding modulus improvement due to the DTT processing and ROCK inhibitor medium supplement picking is easy than the stem cell for the treatment including the existing umbilical cord blood, the bone marrow etc but it is useful.

상세설명

Detailed Description

본 발명은 일 관점에서, 인간 양막 조직을 DTT (Dithiothreitol) 및 저농도의 트립신으로 처리하여 인간 양막 상피세포를 고수율로 분리#183#수득하는 방법에 관한 것이다.

The invention relates to the method for processing the human amnion organization as the trypsin of the low concentration and DTT (Dithiothreitol) in consistency and obtaining the human amnion cell by the high yield with the separation .

본 발명에서는 태반으로부터 분리한 양막조직 전체에서 추출되는 여러 종류의 세포를 사용하는 것이 아니라 양막상피세포만을 추출하여 분리한다.

In the present invention, it is not to use the cell of the various kind extracted from the amnion organization whole separated from the placenta but it extracts only the amnion cell and it separates.

양막 상피세포(amniotic epithelial cell)는 태반을 구성하는 양막 상피 조직중 배 형성 이전 또는 수정 후 8일된 외배엽으로

With developing from the ectoderm which becomes among the amnion epithelial tissue in which the amnion

부터 발달한 것으로 배 형성 전 배아세포의 유연성을 유지하고 있는 것을 특징으로 하고 있다. 따라서 상기 양막 상피 세포의 표면 마커펠 배아에서 발현되는 것과 동일한 것으로 확인되었고, 면역조직화학적 분석 및 유전학적 분석에 의하여 양막 상피 세포 유래 성체 줄기세포가 내배엽, 중배엽, 외배엽 유래 세포로 모두 분화가능한 능력을 가지고 있으며 체내에서 암 발생을 일으키지 않는 것으로 확인되었다(Toshio Miki, et al., STEM CELL, 23:1549, 2005).

그러나, 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포는 다른 태반 유래 성체 줄기세포와 달리 단일세포 배양 및 계대 배양시 세포사멸(Apoptosis)과정으로 진행되기 쉬워 기존의 배양 방법으로는 미분화 상태의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 대량으로 증식하는 것이 곤란했던 문제점이 있어왔다. 즉, 미분화 상태로 존재하는 양막 상피세포 유래 줄기세포는 분만 직후의 태반에서부터만 많은 양으로 수득할 수 있을 뿐, 분만 후 몇 시간이 경과되거나 특히, 오랜 시간 동안 냉장 보관되어 있던 태반 조직으로부터는 다량의 성체 줄기세포를 수득하는 것이 매우 어렵다. 이는 이하 기재하는 참고예 1의 표1에서 확인할 수 있다. 따라서, 상기 문제점으로 인해 양막 상피세포를 초기에 대량으로 수득하거나 배양시 세포사멸로의 진행을 억제시킬 필요성이 존재한다.

또한, 통상적으로 태반에서 분리된 양막은 혈액과 점액질 등으로 표면이 둘러싸이게 된다. 이러한 점액질 등은 양막으로부터 단일 세포를 분리하는 데 장애가 되는 요소로서 종래 트립신 처리에 따른 효과를 감소시키는 역할을 해왔다. 이에 트립신 처리 전에 점액질 등의 불순물을 제거하여 단일세포의 분리에 사용되는 트립신의 효과를 극대화시킬 수 있는 환경 조성의 필요성 역시 요구되고 있다.

본 발명은 양막 상피세포를 수득하는 과정에 있어서 트립신 처리 전에 DTT(Dithiothreitol)를 처리하는 방법을 사용함으로써 양막 상피세포를 초기에 대량으로 수득하며, 분리된 세포의 세포 사멸을 억제하여 대량으로 배양을 시킬 수 있는 방법에 관한 것으로서, 상기 문제점을 해결하고 있다.

DTT는 하기 구조식 1으로 표시되는 물질로서, 통상적으로 단백질의 이황화결합(disulfide bond) 제거 및 DNA 이합체(dimer) 형성억제, 점액질 제거, 데브리스(debris)나 연결조직 제거 등에 사용하는 물질로서, 많은 생물학 실험 조성물에 들어가는 시약이나, 지금까지 줄기세포 추출과정에 사용된 바 없었다.

[구조식 1]

본 발명에서는 단일세포 분리의 통상적 절차인 트립신 전처리를 DTT처리로 대신함으로써 과도한 세포파괴를 막고 이후 처리할 트립신효과를 방해하는 점액질을 제거하여 단일세포의 수

cell (amniotic epithelial cell) organizes the placenta after the embryogenesis previous or the correction with 8 the flexibility of the embryogenesis former blastocyte is maintained. Therefore, the surface marker of the amnion cell has the immunohistochemical analysis and the capability in which the amnion cell originated adult stem cell can do all with the genetic analysis to the endoderm, the mesoderm, and the ectoderm cellular origin it was confirmed it was identical it was revealed in the embryo bud. And confirmed that the carcinogenesis was not caused in vivo (Toshio Miki, et al., STEM CELL, 23:1549, 2005).

But there can be the problem difficult to be easy to be progressed and massively increase the amnion cell originated adult stem cell of the undivided condition to the existing culture method as the amnion cell originated adult stem cell is the apoptosis process in the single cell culture unlike the other placenta originated adult stem cell and subculture. That is, the amnion cell originated stem cell existing as the undivided condition can obtain by many amount in the placenta of the immediately parturition. The childbirth is difficult that several hours go by after the childbirth or a large amount of adult stem cell is obtained from the placenta tissue frozen and kept for especially, the long time. It can confirm in the table 1 which hereinafter this describes of the reference example 1. Therefore, the amnion cell is obtained by the massively in the initial or the necessity to suppress the progressing to the apoptosis exists due to the problem in cultivation.

Moreover, generally, as to the amnion, separated from the placenta surface is surrounded by blood and mucilage etc. This mucilage etc. served to reduce the effect according to the conventional trypsinization as the element which was impeded to separate the single cells from the amnion. Thus, the necessity of the environment development maximizing the effect of the trypsin used in the separation of the single cells the impurity including mucilage etc. is removed before the trypsinization is required.

The invention relates to the method it obtains the amnion cell by the massively in the initial by using the method of processing the DTT (Dithiothreitol) before the trypsinization as to a process of obtaining the amnion cell and for controlling the apoptosis of the separated cell and massively culturing. And the problem is solved.

As the material represented by DTT is the Below-mentioned structure 1, it was so far used for the stem cell extracting procedure as material which can be used in generally, the disulfide bond removal and DNA dimer formation inhibition of the protein, the mucilage removal, the debris or the connective tissue removal etc as the reagent entering many biology experiment composition.

[Structural formula 1]

In the present invention, the mucilage obstructing the trypsin effect which prevents the excessive cell disruption by replacing the DTT processing with the trypsin pr

득률을 증가시킨다.

이 때 사용하는 DTT처리 농도는 5mM~50mM 가 바람직하며, 가장 바람직하게는 8mM ~ 15mM 이다. 본 발명의 일 구체예에서는 10mM을 사용하였다. 5mM 미만의 농도로 DTT를 처리할 경우에는 높은 수율로 단일 세포를 수득하기 어렵고, 50 mM 초과 농도로 DTT를 처리할 경우에는 과도한 단백질 분해로 인해 세포 사멸이 발생할 수 있다.

인간 양막 조직에 상기 DTT처리 후, 양막 상피세포를 분리해 내기 위하여 저농도의 트립신을 처리한다. 바람직한 트립신의 농도는 0.025%~0.125%이고, 보다 바람직하게는 0.05%~0.10%이다.

양막 조직을 구성하는 다양한 종류의 세포들을 분리해 내기 위해서는 각각 그에 상응하는 적절한 농도의 트립신 처리가 요구되고, 특히, 양막 상피세포는 저농도의 트립신 처리에 의하여 수득된다. 그러나, 종래에는 양막 조직을 덮고 있는 점액질 등의 불순물의 방해로 인해 저농도의 트립신으로는 효과적으로 상피세포를 분리해낼 수 없었기 때문에, 대부분 고농도의 트립신이나 콜라게나아제 등으로 분리 가능한 간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell, MSC)를 사용해왔다.

그러나, 본 발명은 인간 양막 조직에 상기 DTT를 처리하여 점액질 등을 제거함으로써 저농도의 트립신으로도 효과적으로 양막 상피세포를 분리해낼 수 있게 하였다. 즉, 본 발명에서는 종래 사용하던 고농도의 0.25%~0.5% 트립신이 아니라, 저농도의 0.025%~0.125% 트립신을 처리하여 양막 상피세포를 고수율로 분리하는 방법을 제공한다.

이 때, 트립신 처리 직후에 추가로 2500~3000rpm으로 30~60초동안 볼텍싱(vortexing) 함으로써 물리적인 전단력(shear force)을 가하여 세포의 수득률을 높일 수 있다. 이러한 추가 공정을 통해서 상대적으로 트립신 처리 시간을 단축시킴으로써 트립신으로 인한 세포손상을 줄이는 장점이 있다.

양막 조직에 상기 트립신 처리 및 볼텍싱(vortexing) 처리를 한 후, 수득되는 물질을 걸러 목적하는 양막상피세포를 얻는다. 이 때, 바람직하게는 1차적으로 1~2 mm mesh에 먼저 걸러 줌으로써, 100um 여과기(strainer)를 처음부터 사용했을 경우에 비해 분리된 세포의 체외 노출 시간을 줄여 세포의 생존능을 증가시키고 세포분리에 걸리는 시간을 더 절약할 수 있으며, 100um cell strainer의 사용량을 줄일 수 있어 비용 절감에도 도움이 된다.

상기의 방법에 의해 분리된 양막상피세포를, 이하의 방법으로 배양하여 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 수득할 수 있다.

eprocessing called the ordinary procedure of the single cells separation and thereafter it processes is removed and the yield of the single cells is increased.

At this time, the DTT process density using may be 5mM~50mM is the be desirable, more preferably, 8mM ~ 15mM. In one embodiment of the present invention, 10mM was used. It is difficult to obtain the single cells by the high yield in case of processing DTT as less than 5mM concentration. In case of processing DTT as 50 mM excess density the apoptosis can be generated due to the excessive proteolysis.

The trypsin of the low concentration is processed in the human amnion organization in order to separate the amnion cell after the DTT processing. The concentration of the trypsin done with desirable may be 0.05%~0.10% it is 0.025%~0.125%.

The trypsinization of the corresponding proper concentration is required from the respective that in order to separate the cells of the various kind comprising the amnion organization. Especially, the amnion cell is obtained with the trypsinization of the low concentration. But the disturbance of the impurity including mucilage etc. was received and put on the amnion organization the epithelial cell was effectively separated according to the trypsin of the low concentration. Therefore the separable mesenchymal stem cell (Mesenchymal Stem Cell, MSC) had been being used as trypsin or the collagenase of the high concentration etc.

But by the invention processing DTT in the human amnion organization and removing mucilage etc. the amnion cell was effectively separated through the trypsin of the low concentration. That is, in the present invention, the method of separating according to the high yield the amnion cell it processes is provided.

At this time, by the additionally being done by 2500~3000rpm after the trypsinization work for 30~60 second with the vortexing (vortexing) the physical shear force is added and the cellular number yield can be enhanced. It has the advantage of decreasing the cell damage due to trypsin relatively the trypsinization time is shortened through this additional process.

The intended the amnion cell the obtained material is filtered it processes in the amnion organization with the trypsinization and vortexing (vortexing) may be obtained. At this time, preferably, firstly it selects with the primary through 1~2 mm mesh. In that way the time to cut down in vitro exposure time of the cell which compares in case of from the first time using 100um filter (strainer) and is separated and increase the viable of the cell and it take time on the cell sorting can be more saved. And the used amount of 100um cell strainer can be reduced and it is helpful to the cost down.

The amnion cell which the method described in the above divides is cultivated to the method of less than and the amnion cell originated adult stem cell can be obtained.

다른 관점에서, 본 발명은 상기 분리된 양막 상피 단일세포를 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 배양하여 줄기세포를 회수하는 단계를 포함하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포 제조방법에 관한 것이다. 나아가, 수득된 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 계대 배양하는 것을 특징으로 하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포 증식#183#유지방법에 관한 것이다.

본 발명의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 배양에 사용하는 배지는 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 배지 및 K-SFM(Keratinocyte serum free medium) 배지를 포함한 통상적인 배지를 사용할 수 있다. 그리고, 상기 배지에는 아스코르브산, 표피성장인자(EGF), 인슐린, 항생제 및 FBS(Fetal bovine serum) 등을 첨가하여 사용할 수 있다. 상기 항생제는 공지된 통상적인 것을 사용할 수 있으며, 예를 들어 Antibiotic-Antimycotic(Gibco)가 있다.

상기 배양 배지로서, 예를 들어 FBS(Fetal bovine serum), 아스코르브산, 표피성장인자, 비 필수아미노산 및 항생제를 첨가한 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 배지를 사용하거나, FBS, 아스코르브산, 하이드로코티손, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 및 항생제를 첨가한 K-SFM(Keratinocyte serum free medium) 배지를 사용하여 양막 상피 줄기세포를 배양할 수 있다. 이 때, DMEM 배지에서 배양시 성체 줄기세포의 증식이 상기 K-SFM 배지에서의 증식 정도보다 다소 높게 나타난다 (도 6).

특히, 상기 배지와 관련하여, 본 발명자들은 DMEM과 K-SFM 배지의 교환 실험을 통하여 증식능을 확인한 결과, DMEM 배지에서 K-SFM 배지로 교체한 경우가 DMEM 또는 K-SFM 배지만을 계속 사용한(교체하지 않은) 경우보다 성체 줄기세포의 증식능이 더욱 향상됨을 확인하였다(도 7). 이 과정에서, DMEM 배지에서 K-SFM 배지로의 교체는 성체 줄기세포의 1차 계대배양시에 이루어지는 것이 바람직하다.

그러나, 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 배양 배지로서 가장 바람직한 것은, DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)과 F-12(nutrient mixture)를 1:1로 혼합한 배지(Gibco)이다. 이때에도, 상기 혼합 배지에 아스코르브산, 표피성장인자(EGF), 인슐린, 항생제 및 FBS(Fetal bovine serum)를 첨가하여 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 항생제로서 antimycotic-antibiotics(Gibco)를 사용하였다.

분리한 양막 상피 단일세포를, ROCK(Rho-associated kinase) 저해제를 첨가한 상기 배지에서 1차 배양하여 성체 줄기세포를 회수하고, 이어서, 계대배양시에도 계속 ROCK 저해제 존재 하에서 배양하여 성체 줄기세포가 미분화상태를 유지

In the other point of view. And the invention relates to the human amnion cell originated adult stem cell manufacturing method comprising the step of collecting the stem cell it cultivates the separated Amniotic epithelium single cells as described above in the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor)-added culture medium. Furthermore, it is about the human amnion cell originated adult stem cell proliferation · keeping method subcultured in the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) the obtained human amnion cell originated adult stem cell-added culture medium.

The culture medium which can be used in cultivation of the amnion cell originated adult stem cell of the present invention may be formed of the conventional culture medium including the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) culture medium and the K-SFM (Keratinocyte serum free medium) culture medium. And in the culture medium, the ascorbic acid, the epidermal growth factor (EGF), insulin, the antibiotic and FBS (Fetal bovine serum) etc. are added and it can use. The it is known to have conventional can be used. And it has for example, the Antibiotic-Antimycotic (Gibco).

The DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) culture medium with the culture medium, for example, the FBS (Fetal bovine serum), ascorbic acid, epidermal growth factor, non essential amino acid and antibiotic the Amniotic epithelium stem cell can be cultivated using the K-SFM (Keratinocyte serum free medium) culture medium with the FBS, ascorbic acid, hydrocortisone, NAC (N-acetyl-L-cysteine), insulin and antibiotic it uses. At this time, in the DMEM medium, the proliferation of the adult stem cell a bit high shows up in cultivation than the proliferating rate at the K-SFM culture medium (fig. 6).

Particularly, the inventors confirmed the reproductive integrity through the exchange experiment of the K-SFM culture medium and DMEM in connection with the culture medium. Then the reproductive integrity confirmed that the reproductive integrity of the adult stem cell was more improved than the case in which the case of replacing with the K-SFM culture medium in the DMEM medium continuously used only DMEM or the K-SFM culture medium (it does not replace) (fig. 7). In this process, the replacement to the K-SFM culture medium in the DMEM medium may be the be desirable it is comprised of the first subculture of the adult stem cell.

But the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) and F-12 (nutrient mixture) it most does as the culture medium of the amnion cell originated adult stem cell with desirable may be referred to the culture medium (Gibco) mixed to 1:1. Even in this case, the ascorbic acid, the epidermal growth factor (EGF), insulin, the antibiotic and FBS (Fetal bovine serum) are added in the mixed medium and it can use. In one embodiment of the present invention, the antimycotic-antibiotics (Gibco) was used as the antibiotic.

In the culture medium with the ROCK (Rho-associated kinase) inhibitor the Amniotic epithelium single cells separated is added, it cultivates with the first and the adult stem cell is collected. It continuously cultivates unde

하도록 한다.

ROCK 저해제 (Rho-associated kinase inhibitor)는 세포사멸(apoptosis)을 억제하는 기능을 하는 물질로서, 신경돌기의 재생, 미오신 인산화 및 평활근 수축에 있어 작용-유도성 Ca²⁺ + 증감(agonist-induced Ca²⁺ sensitization)의 억제 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 보다 구체적으로, ROCK 저해제는 고혈압과 천식을 일으키는 근육 세포의 비정상적 구조를 경감시켜주는 것으로 알려져 있으며 시신경유두의 혈액 흐름을 증가시키고 안압을 지속적으로 감소시키는 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 생물학적으로는 세포의 사멸과정(Apoptosis)을 억제하고 미분화상태를 유지하는 기능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 ROCK 저해제를 이용해 분리된 인간 배아 줄기세포의 생존을 증가시키는 연구가 이루어졌었다(Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007).

그러나 배아 줄기세포와 성체 줄기세포는 명백히 구별되는 별개의 줄기세포로서 각각의 소스(source) 및 분화능이 확연히 다른 별개의 고유한 특징이 있음이 자명한 사실이고 지금까지 ROCK 저해제를 이용하여 성체 줄기세포의 증식률의 증가를 확인한 바 없었으나, 본 발명에서는 성체 줄기세포의 분리 배양에서도 ROCK 저해제에 의해 증식능이 증가하는지 확인하였고, 양막 상피세포 유래 줄기세포의 증식 및 유지에 있어서도 ROCK 저해제에 의해 더욱 효율이 증가되는 사실을 확인하였다.

상기 Watanabe 등의 연구에서는 배아 줄기세포의 배양에 있어서, 계대 배양시 배지를 옮겨 리씨딩(reseeding) 하기 전에 ROCK 저해제를 처리하는 방법을 사용하고 있다. 즉, 상기 ROCK 저해제가 처리된 배아 줄기 세포를 새로운 배지로 리씨딩(reseeding) 한 후에는 ROCK 저해제를 처리하지 않은 채 배양시켰다(Kiichi Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007).

이에 반하여, 본원 발명에서는 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 배양에 있어서, 계대 배양시 배지를 옮겨 리씨딩(reseeding) 한 후에 ROCK 저해제를 처리하여 계대 배양 중에도 ROCK 저해제가 계속 존재하는 환경을 설정하였다.

본 발명에서 사용가능한 대표적인 ROCK 저해제로서는, Y-27632, HA-1077, Y-39983, Wf-536 등이 있고, 본 발명의 일 구체예에서는 그 중에서 Y-27632(Calbiochem 또는 Sigma)를 사용하였다. Y-27632(Calbiochem 또는 Sigma)의 구조식은 하기와 같다.

[구조식 2]

본 발명에 사용한 ROCK 저해제의적정 처리농도는 100nM~100#956#M이다. 100nM 미만의 농도로 ROCK 저

the presence of the ROCK inhibitor and subsequently the adult stem cell maintains the undivided condition in the subculture.

As the material in which the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) functions to control the apoptosis, it is known that it functions as to the regeneration of the neurite, and the myosin phosphorylation and smooth-muscle contraction of the suppression of the action - inductiveness Ca²⁺ + sensitization (agonist-induced Ca²⁺ sensitization) etc. More specifically, the structure is known that the structure is known that it abnormal of the muscular cell in which the ROCK inhibitor causes hypertension and asthma the structure is reduced and the structure has and the structure has the function of increasing the blood flow of the optic disk and continuously reducing the ocular pressure. Moreover, the of biologically controlling the death process (Apoptosis) of the cell and maintaining the undivided condition function was known that it had the function. And the research increasing the alive of the human embryonic stem cell which recently, using the ROCK inhibitor, was separated was accomplished (Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007).

But fact with an increased efficiency it was the fact that the fact was obvious that the fact had the inherent characteristic in which each source and blastogenesis were sharply different as the separate stem cell in which the embryonic stem cell and adult stem cell were clearly distinguished and because of confirming the increase of the growth rate of the adult stem cell using the ROCK inhibitor the increase there was no were confirmed.

The method of processing the ROCK inhibitor in the Lee seeding (reseeding) below former it moves is used. That is, with noted processing the ROCK inhibitor as the new culture medium in the Lee seeding (reseeding) the embryonic stem cell in which the ROCK inhibitor was handled was cultured (Kiichi Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007).

On the contrary, in the present invention, as to the cultivation of the human amnion cell originated adult stem cell, the culture medium was moved in the subculture and the ROCK inhibitor was processed in the Lee seeding (reseeding) and the environment in which the ROCK inhibitor continuously existed among the subculture was set up.

In the present invention, as the usable and representative ROCK inhibitor, it had Y-27632, HA-1077, Y-39983, the Wf-536 etc. The Y-27632 (the Calbiochem or the Sigma) was among them used in one embodiment of the present invention. The structural formula of the Y-27632 (the Calbiochem or the Sigma) does it is the same.

[Structural formula 2]

The ROCK inhibitor used in the present invention may be 100nM~100#956#M. In case of processing the ROCK inhibitor

해제를 처리할 경우 성체 줄기세포의 미분화능이 장기간 유지되기 어려우며, 100#956#M 초과 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 세포의 변형이 일어나고 분화단계로 접어드는 현상이 발생할 수 있다.

또다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법으로 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포에 관한 것이다. 상기 방법에 따라 수득된 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 형태학적 및 면역학적 특성을 이하에 설명한다.

(1) 형태학적 특성

양막 조직으로부터 분리한 양막 상피 단일세포는 직육면체 형태 또는 주사위꼴 형태의 약간 둥근형의 전형적인 상피세포(Epithelial cell)의 형태를 가지고 있으며, 배양시 세포의 크기(직경)는 약 5~10#956#m 정도이다. 통상적으로, 양막 상피세포는 배양조건에 따라 세포 크기가 커지면서 cytosol 이 확장되어 Trophoblastic 하게 변형이 이루어지거나 세포형태가 중간엽줄기세포(MSC) 형태로 변해가는 EMT(Epithelio-Mesenchymal transition) 현상을 겪는 등의 변형이 쉽게 일어나지만(도 10), 본발명의 DTT 처리 및 ROCK inhibitor 함유 배지에서 정상적으로 배양된 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포는 simple cuboidal 형태를 계속 유지하고 있다(도 10의 제일 아래 사진).

(2) 면역학적 특성

유세포 분석기를 사용하여 본발명의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 분석한 결과, CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90, 및 CD105에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 CD133에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타내었다(도 8a 및 8b).

(3) 줄기세포능(stemness) 등

본발명의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포에서는 상피세포의 특성을 나타내는 사이토케라틴(Cytokeratin) 및 E(epithelium)-카드헤린(Cadherin)이 발현됨이 확인되었고, 전능성을 띠는 줄기세포 마커로서 공지되어 있는 SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60 및 Tra-1-81도 발현하였다(도 9).

또한, 줄기세포로서의 분화능과 관련하여, 이미 공지된 바와 같이 양막 상피세포는 태아의 배아줄기세포와 가장 유사한 특성을 지니고 있으므로, 상기 양막 상피세포로부터 유래한 본 발명의 성체 줄기세포 역시 배아줄기세포와 유사한 분화능력, 즉 내#183#중#183#외배엽 유래 세포로의 분화능력을 가지고 있고, 실제로 중배엽 유래의 지방세포, 골세포 및 근세포로의 분화 및 외배엽 유래의 신경세포로의 분화능을 실시예 6에서 확인하였다.

inator as less than 100nM concentration it is difficult that the long term the U.S. blastogenesis of the adult stem cell is maintained. And the phenomenon that the deformation of the cell occurs in case of processing the ROCK inhibitor as 100µM excess density and enters the specialization step can be generated.

In another point of view. And the invention relates to the amnion cell originated adult stem cell obtained by the method. It morphologicals of the amnion cell originated adult stem cell obtained according to the method the immunological characteristic is explained in less than.

(1) Morphology.

The Amniotic epithelium single cells separated from the amnion organization may be the size (diameter) of the cell in cultivation is about 5~10µm a little bit has of the cuboidal type or the dice every form with the form of the typical epithelial cell of the bulbous. Generally, according to the amnion cell is the condition of culture, the deformation of the etc. which deformation is made to be extended with the cytosol this while the cell size be enlarged and do or experiences the EMT (Epithelio-Mesenchymal transition) phenomenon in which the cell morphology changes in the form of the mesenchyme stem cell (MSC) easily occur (the drawing 10)s. However the amnion cell originated adult stem cell normally cultivated in the DTT processing and the ROCK inhibitor contained culture medium of the present invention continuously maintains the simple cuboidal form (fig. 10 the , best, the bottom photograph).

(2) Immunological characteristic.

The amnion cell originated adult stem cell of the present invention was analyzed using the Flow Cytometer. Then the bisexual person immunological characteristic was shown about the CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90 and CD105. The immunological characteristic of voice was shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and CD133 (figures 8a and 8b).

(3) The stem cell activity (stemness) etc.

In the amnion cell originated adult stem cell of the present invention, showed the property of the epithelial cell E (epithelium) - cadherin were confirmed that the cytokearatin and E (epithelium) - cadherin which were revealed. The SSEA 4, the Oct-4 , and the Tra-1-60 and Tra-1-81 which as the stem cell marker showing the totipotency was known were revealed (fig. 9).

Moreover, as is well known, the amnion cell already most carried the similar characteristic in connection with the blastogenesis as the stem cell with the embryonic stem cell of the fetus. Therefore it had the differentiation ability to the ectoderm cellular origin in the differentiation ability, which the adult stem cell of the present invention derived from the amnion cell was similar to the embryonic stem cell in other words, the inside with 183. The fat cell of the mesoderm originated, and the blastogenesis to the nerve cell of the differentiation of the bone cell and modern times captive and ectoderm

originated were confirmed in the embodiment 6 in fact.

본 발명은 또 다른 관점에서, 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 체내 및 체표면의 창상 치료용 세포 치료제에 관한 것이다.

The invention relates to and, the cell therapy product for the wound treatment of the internal and the body surface containing the adult stem cell as active ingredient in the other point of view.

이때 창상이란 외부로부터 어떠한 힘에 의하여 파열된 상패를 의미하는 것으로, 특히 피부, 점막, 뼈 조직의 파괴, 절단 또는 파열된 상태 등을 모두 포함한다.

At this time, the wound means the medal bursting from the outside with any power. Especially, skin, the mucous membrane, the break down of the osseous tissue, and the cut or the indicating light bursting is altogether included.

본 발명의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 세포 치료제는 임상투여시에 근육 또는 정맥 주사제와 같은 형태의 비경구 투여 뿐 아니라 직접 질환 부위에 투여할 수 있다. 본 발명의 세포치료제는 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

The adult stem cell of the present invention is to the active ingredient the cell therapy product for the wound treatment done can administer to not only the parenteral administration of the form like the muscle or the venous injection agent but also the direct disease part in the clinical medication. It can be injected through the different route that the cell therapy product of the present invention includes hard husk, subcutaneousness, and the vein or the muscle.

비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

The agent for the parenteral administration includes the sterilized aqueous solution, the non-aqueous solvent, the suspension agent, the emulsion etc. The propylene glycol, the polyethylene glycol, the vegetable oil like the olive oil, the ester like the ethyl oleate etc. can be used as the non-aqueous solvent, and the suspension solvent it can scan.

사람의 경우, 세포치료제의 통상적인 투여량은 10⁴~10¹⁰ cells/body, 바람직하게는 10⁶~10⁸ cells/body, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다

In case of human, it divides into 10⁶ ~ 10⁸ cells / body, 1 time or the several occasions and the conventional amount of administration of the cell therapy product can administer with 10⁴ ~ 10¹⁰ cells / body.

그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

But it has to be understood that the disease, the administration route, the age of the patient, and sex, weight and severe disease of the disease which the actual dose of the active ingredient cures light to the different related element of the etc. and it has to be determined. And therefore the amount of administration does not limit the scope of the present invention through any method.

창상 치유 등의 조직 회복에 있어서, 본발명의 성체 줄기세포가 유용하게 사용될 수 있다. 배아 줄기세포와 유사한 특성을 보유하고 있는 본 발명의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포는 내배엽, 중배엽 및 외배엽으로의 분화능을 모두 가지고 있기 때문에, 창상 치유와 조직 회복 및 교체 뿐만 아니라 골, 연골, 힘줄, 인대 및/또는 신경 조직으로의 분화, 증식 및 재생이 가능하므로 유용한 세포치료제가 될 수 있다.

As to the tissue rejuvenation including the wound healing etc, the adult stem cell of the present invention can be usefully used. The amnion cell originated adult stem cell of the present invention holding the embryonic stem cell and similar characteristic become the useful cell therapy product it is possible to the differentiation to not only the wound healing and tissue rejuvenation and replacement but also the valley, the cartilage, the tendon, the ligament and/or the neural system, and proliferation and regeneration it altogether has the endoderm, and the blastogenesis to the mesoderm and ectoderm.

실시예

Embodiment .

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 해석되

Hereinafter, the invention tries to be more particularly explained through the embodiment. These embodiments only exemplify the invention. Therefore it has to a pers

지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

on skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry not to be interpreted that the scope of the present invention is limited by these embodiments.

이하 실시한 실시예에서 사용한 각종 배지 및 시약의 입수처는 하기 표에 기재된 바와 같다.

Hereinafter, the place of acquisition of all kinds of the culture mediums and the reagent used in the embodiment performed are same as those of as described in the diagram below.

Items	Brand	Catalogue No.		Items	Brand	Catalogue No.	
Media	DMEM/F-12	Gibco	11320	Media	DMEM/F-12	Gibco	11320
EGF	Sigma	E 9644		EGF	Sigma	E 9644	
Peprotech	100-15			Peprotech	100-15		
Gibco	13247-051			Gibco	13247-051		
FBS	Gibco	16000		FBS	Gibco	16000	
Insulin	Sigma	I 1882		Insulin	Sigma	I 1882	
Ascorbic acid	Sigma	A 8960		Ascorbic acid	Sigma	A 8960	
Antibiotic-antimycotic	Gibco	15240		Antibiotic-antimycotic	Gibco	15240	
ROCK inhibitor	Y-27632	Calbiochem	CNB 688000	ROCK inhibitor	Y-27632	Calbiochem	CNB 688000
Sigma	Y 0503			Sigma	Y 0503		
Trypsin solution	Trypsin-EDTA	Gibco	15400	Trypsin solution	Trypsin-EDTA	Gibco	15400
L/G DMEM	Gibco	11885		L/G DMEM	Gibco	11885	
Buffer solution	HBSS	Gibco	14175	Buffer solution	HBSS	Gibco	14175
Subculture	TrypLE-Express	Gibco	12604	Subculture	TrypLE-Express	Gibco	12604
DTT	DTT	Gibco	15508-013	DTT	DTT	Gibco	15508-013

실시예 1: 양막 조직으로부터 DTT(Dithiothreitol) 및 Trypsin 처리에 따른 양막 상피줄기세포의 분리

embodiment 1: the separation of the Amniotic epithelium stem cell according to DTT (Dithiothreitol) from the amnion organization and Trypsin processing.

양막은 고려대학교병원 임상실험윤리위원회 지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산 분만에서 수집되어 연구용으로 사용하였다.

According to the amnion is the Korea university hospital clinical test Ethics Advisory Board tutorial, it was collected by the eutocia and the premature birth childbirth and it used in the Korea university annex Kuro hospital for the research.

실험에 필요한 양막조직은 태반으로부터 분리하였으며, 분리된 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수 또는 DMEM배지에 넣어 연구실까지 옮겼다.

The amnion organization necessary for experiment put into saline solution containing the organization which separated from the placenta and is separated. Is the antibiotic or the DMEM medium and it moved to the laboratory.

양막 조직을 5g 정량하여 HBSS로 세척하였다. 양막 상피세포의 안정적인 분리를 위해 일반적인 PBS 보다는 인간 생체구성성분과 더욱 유사한 HBSS 버퍼로 대체하여 세척에 사용하였다. 세척된 양막 조직을 50ml 튜브로 옮겨 10 mM DTT를 첨가하였다. 30분간 DTT처리 후 상등액을 버리고 양막 조직을 잘게 자르고, 잘게 자른 양막 조직을 새로운 0.05% Trysin-EDTA에서 37℃에서 교반 하면서 42분 동안 trypsin처리하여 화학적 분해작업을 하였다. 화학적 분해된 조직을 1분 동안 vortexing한 후 1mm mesh에 1차 필터링하고 100µm mesh에 2차 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거하고 1800rpm에서 10분간 원심분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 단일세포로 잘 부유시켜 양막 상피세포를 수득할 수 있었다. Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue dye법으로 현미경 상에서 육안으로 관찰되는 살아있는 세포들을 계수하였으며, 분리 직후 세포수를 확인한 결과 3.72 X 10⁷ 개였다(도 1의 B). 도 1의 D는 이 세포들을 배양한지 3일 후의 사진이다.

It was 5g fixed quantity and the amnion organization was washed to HBSS. It replaced with the HBSS buffer which was more similar to the human organism component and it used for the stable separation of the amnion cell than the general PBS in washing. The washed amnion organization was moved to 50ml tube and 10mM DTT was added. The supernatant was thrown away after 30 min. DTT processing and the amnion organization was small pieces cut. While agitating the amnion organization which it small pieces cut in the new 0.05% Trysin-EDTA in 37℃ it did for 42 minutes with the trypsin in processing and the chemical decomposition task was done. The tissue which the first filtered the chemical disassembled organization in 1mm mesh for 1 minutes after doing the vortexing and filtered the second in 100µm mesh and was not disassembled was removed and it centrifuged in 1800rpm. The pellet which was in the bottom surface was floated

in the well at single cells and the amnion cell could be obtained. Alive cells which are by the naked eye observed through the Trypan Blue dye method using the Hemocytometer on the microscope may be referred to 3.72×10^5 the separation immediately after cell number is confirmed it succeeded (b of fig. 1). D of fig. 1 is these cells may be referred to the photograph after 3 it cultivates.

참고예 1: 시간 경과에 따른 줄기세포의 수득률

하기 표 2에, 채취한 태반 조직으로부터 시간이 경과함에 따라 수득할 수 있는 줄기세포의 정도가 감소함을 나타내었다. 하기 표 2에서 알 수 있는 것처럼, 미분화 상태로 존재하는 양막 상피세포 유래 줄기세포는 분만 직후의 태반에서부터만 많은 양으로 수득할 수 있을 뿐, 분만 후 몇 시간이 경과되거나 특히, 1일(24시간)이 경과된 태반 조직으로부터는 성체 줄기세포를 수득하는 것이 50%에 지나지 않았다. 즉, 양막 상피세포 유래 줄기세포를 얻기 위한 태반 조직은 분만 후 시간이 경과함에 따라 그 활용도가 급격히 낮아지므로, 냉장 보관되어 있는 태반 조직 등으로부터 대량으로 양막 상피세포 유래 줄기세포를 수득하는 일이 어려운 일임을 알 수 있다.

reference example 1: the yield of the stem cell according to the time-out.

In the table 2 below, it showed that the extent of the stem cell which it could obtain as time passed from the placenta tissue collected decreased. As it could know at the table 2 below. The amnion cell originated stem cell existing as the undivided condition could obtain by many amount in the placenta of the immediately parturition. It did not pass by through 50% that several hours went by after the child birth or the adult stem cell was obtained from the placenta tissue in which especially, 1 (24 hours) passed. That is, as time as to the placenta tissue, for obtaining the amnion cell originated stem cell passes after the childbirth the availability is decreased. Therefore it can know from the placenta tissue etc. frozen and kept that the task obtained is massively the amnion cell originated stem cell the difficult task.

	실험시도	성공횟수	성공률
12 시간 이내	10	9	90%
12~24 시간	65	38	59%
24 시간 초과	18	9	50%

	Attempt of an experiment	Success frequency	Successing yield
12 hours within	10	9	90%
12~24 hours	65	38	59%
24 over time	18	9	50%

비교예 1: 양막 조직으로부터 Trypsin처리만에 의한 양막 상피줄기세포의 분리

세척된 양막 조직을 50ml 튜브로 옮겨 0.05% Trypsin-EDTA를 첨가하였다. 10분간 trypsin 처리한 후 상등액을 버리고 양막 조직을 잘게 자르고 잘게 자른 양막 조직을 새로운 0.05% Trypsin-EDTA에서 37℃에서 교반 하면서 42분 동안 trypsin 처리하여 화학적 분해작업을 하였다. 화학적 분해된 조직을 1분 동안 vortexing한 후 1mm mesh에 1차 필터링하고 100µm mesh에 2차 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거한 후 1800rpm에서 10분간 원심분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 잘 부유시켜 단일 세포를 수득하였다. Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue dye법으로 현미경 상에서 육안으로 관찰되는 살아있는 세포들을 계수하였으며, 분리 직후 세포수를 확인한 결과 9.25×10^5 cells개였다(도 1의 A). 도 1의 C는 이 세포들을 배양한지 3일 후의 사진이다.

comparative example 1: the separation of the Amniotic epithelium stem cell which Trypsin processing is according to from the amnion organization.

The washed amnion organization was moved to 50ml tube and 0.05% Trypsin-EDTA was added. While agitating the amnion organization it threw the supernatant away after treating with for 10 minutes trypsin and which small pieces cut the amnion organization and which it small pieces cut in the new 0.05% Trypsin-EDTA in 37℃ it processed for 42 minutes with trypsin and the chemical decomposition task was done. After removing the tissue which the first filtered the chemical disassembled organization in 1mm mesh for 1 minutes after doing the vortexing and filtered the second in 100µm mesh and was not disassembled it centrifuged in 1800rpm. The pellet which was in the bottom surface the well was floated and single cells were obtained. Alive cells which are by the naked eye observed through the Trypan Blue dye method using the Hemocytometer on the microscope may be referred to 9.25×10^5 cells the separation immediately after cell number is confirmed it succeeded (a of fig. 1). C of fig. 1 is these cells may be referred to the photograph after 3 it cultivates.

상기 실시예 1에서 DTT 및 트립신을 처리하여 분리한 양막 상피세포의 개수 및 이를 배양한 후의 개수를, DTT 처리 없이 트립신만을 처리하여 분리한 양막 상피세포의 경우와 비교하여 보면, 도 1에서 알 수 있는 바와 같이 그 차이는 현저하였다. 즉, DTT 처리로 과도한 세포파괴를 막고 이후 처리할 트립신효과를 방해하는 점액질을 제거하여 양막 상피세포의 수득률을 더욱 높일 수 있음을 확인하였으며, 초기 수득률이 높아진 만큼 이를 배양하여 수득할 수 있는 성체 줄기세포의 양도 현저히 증가하였다.

When DTT and trypsin in the embodiment 1 are compared with the amnion cell, which processes the number of amnion cell which processes and separated and number of cultivation these without the DTT processing only trypsin and separated in that case, as shown in Figure 1, the difference was significant. That is, it confirmed to remove the mucilage obstructing the trypsin effect which prevented the excessive cell disruption and which thereafter it processed as the DTT processing and more could enhance the yield of the amnion cell. And amount of the adult stem cell which it cultivated this as much as the initial seeding modulus was enhanced and it could obtain remarkably increased.

실시예 2: 분리한 양막 상피세포의 ROCK 저해제 존재하에서의 배양

embodiment 2: the cultivation of ROCK inhibitor of the amnion cell separated.

2-1 분리된 양막 상피줄기세포의 배양

The cultivation of the Amniotic epithelium stem cell separated with 2-1.

상기 수득한 양막 상피세포를, DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 및 F-12(nutrient mixture)가 1:1로 혼합된 배지(Gibco)에 이하 표3에 기재된 농도의 FBS, 아스코르브산, 표피성장인자, 인슐린, 항생제 및 10#956#M의 ROCK 저해제 Y-27632를 첨가하여 배양하였다.

The FBS, ascorbic acid, epidermal growth factor, insulin, antibiotic of concentration described in the culture medium (Gibco), in which the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) and F- 12 (nutrient mixture) are mixed to 1:1 hereinafter, the table 3 and ROCK inhibitor Y-27632 of 10 μ M were added and the obtained amnion cell as described above was cultivated.

조성물	농도	조성물	농도
Basal Media	DMEM/F-12 1:1 혼합물	Insulin	5ug/ml
FBS	10% (v/v)	Ascorbic acid	0.2mM
EGF	20ng/ml	Antibiotic-antimycotic	1 X

Composition	Concentration	Composition	Concentration
Basal Media	DMEM / F-12 1:1 mixture	Insulin	5ug/ml
FBS	10% (v/v)	Ascorbic acid	0.2mM
EGF	20ng/ml	Antibiotic-antimycotic	1 X

3일 후, 배양된 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 HBSS버퍼에 세척한 후 TrypLE-Express(Gibco) 또는 0.25% Trypsin-EDTA를 넣고 37℃에서 10분간 반응시켰다. FBS가 함유된 배지를 넣어 트립신을 불활성화시킨 후 수득한 양막 상피세포 유래 줄기세포 5x10⁶개를 새로운 배지에 씨딩(seeding)하여 계대배양하였다. 계대배양 시 리씨딩(reseeding)할 때마다 각각의 새로운 배지에 10 #956#M의 ROCK 저해제를 첨가하였다.

The TrypLE- Express (Gibco) or 0.25% Trypsin-EDTA was put into the HBSS buffer after doing was and the cultivated amnion cell originated adult stem cell for 10 minutes was reacted at 37℃ after 3. It was the amnion cell originated stem cell 5x 10⁶ at the new culture medium with the seeding (seeding) and it obtained after filling the culture medium in which FBS was contained and inactivating trypsin it subcultured. The ROCK inhibitor of 10 μ M was added in the new culture medium whenever it did in the subculture with the Lee seeding (reseeding).

상기 과정에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포 배양 결과는 도 2에 나타내었다. 각 사진은 양막 상피세포 분리 직후, 분리 후 4일째 ROCK 저해제를 투여하기 직전, ROCK 저해제 투여 후 배양된 1일째 및 3일째 성체 줄기세포 증식 사진이다.

The amnion cell originated adult stem cell culture result according to the process showed in fig. 2. Each photograph is the amnion cell separation immediately after, and 4th day ROCK inhibitor after the separation may be referred to 1st day and 3rd day adult stem cell proliferation photograph administering and is cultivated with the ROCK inhibitor post-administration.

2-2. ROCK 저해제 농도별 줄기세포 증식능 비교

2-2. ROCK inhibitor density stem cell reproductive integrity comparison .

ROCK 저해제의 농도에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식능을 확인하기 위하여, 실시예 1에서 수득한 양막 상피세포를 FBS, 아스코르브산, 표피성장인자, 인슐린 및 항생제를 첨가한 DMEM/F-12 배지에 ROCK 저해제 Y-27632를 각각 100#956#M, 10#956#M, 1#956#M, 100nM 및 10nM로 첨가하여 성체 줄기세포를 계대 배양하였다. 계대 배양 1일 후 및 4일 후를 각각 확인하여 성체 줄기세포의 배양에 최적화된 ROCK 저해제 Y-27632의 농도를 확인하였다 (도 3a 및 3b).

The ROCK inhibitor Y-27632 was added in DMEM / F-12 medium with the FBS, ascorbic acid, epidermal growth factor, insulin and antibiotic the amnion cell which in order that it confirms the reproductive integrity of the amnion cell originated adult stem cell according to the concentration of the ROCK inhibitor the reproductive integrity obtains in the embodiment 1 to the respective 100µM, 10µM, 1µM, 100nM and 10nM and the adult stem cell was subcultured. The subculture 1 Witterung and 4 Witterung were confirmed and the optimized concentration of the ROCK inhibitor Y-27632 was confirmed in the cultivation of the adult stem cell (figures 3a and 3b).

도 3a 및 도 3b에서 확인되는 바와 같이, 10nM 농도 이하의 ROCK 저해제를 처리한 경우는, ROCK 저해제를 처리하지 않은 세포의 증식도와 크게 차이가 없었고, 100#956#M 농도 이상에서는 세포의 증식이 현저하게 향상되는 것은 확인되지만 세포변형이 일어나거나 분화되는 현상이 나타나므로, 결론적으로 ROCK 저해제의 가장 바람직한 농도는 약 10#956#M인 것으로 확인되었다.

The case as shown in it is confirmed in figures 3a and 3b of processing the ROCK inhibitor less than 10nM concentration was big with the proliferating rate of the cell which did not process the ROCK inhibitor there was no difference. The phenomenon was confirmed in the above, that 100µM chest the proliferation of the cell was remarkably improved but that the cell modification occurred or that was specialized was shown. Therefore the concentration of the ROCK inhibitor which the case as shown in it is confirmed in figures 3a and 3b of processing the ROCK inhibitor less than 10nM concentration did with desirable was about 10µM and the phenomenon was confirmed.

비교예 2: ROCK 저해제 첨가 유무에 의한 줄기세포 증식능 촉진 효과

comparative example 2: the stem cell reproductive integrity promotion effect by ROCK inhibitor addition existence and nonexistence.

ROCK 저해제의 효과를 알아보기 위해, 실시예 1에서 수득한 양막 상피세포를 4x10⁶ 세포수로 넣고 DMEM/F-12 배지에 FBS, 아스코르브산, 표피성장인자, 인슐린 및 항생제를 첨가하여 4일간 계대 배양한 후, 10#956#M의 ROCK 저해제 Y-27632를 첨가한 배지 및 첨가하지 않은 배지로 각각 씨딩하여 1일, 2일 및 3일 후에 확인하였다 (도 4).

It seeded the respectively with the culture medium which it did not add with culture medium with the ROCK inhibitor Y-27632 of 10µM after doing 4 days subculture, effect of the ROCK inhibitor is noticed the FBS, ascorbic acid, epidermal growth factor, insulin and antibiotic are added in the DMEM / F-12 medium and it confirmed after 1, 2 and 3 (fig. 4).

도 4에서 확인한 바와 같이, 수득한 양막 상피세포를 ROCK 저해제 없이 배양한 결과 세포사멸과정으로 인해 성체 줄기세포의 증식이 매우 느렸으나, ROCK 저해제를 넣어 배양한 경우에는 양막 상피세포의 세포사멸이 억제되면서 성체 줄기세포의 증식이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

As shown in it confirmed in fig. 4 as a result of cultivating the obtained amnion cell without the ROCK inhibitor the proliferation of the adult stem cell was very slow due to the apoptosis. But it could confirm that the proliferation of the adult stem cell remarkably increased while the apoptosis of the amnion cell was suppressed in case of the ROCK inhibitor being put and cultivating.

계대 배양시 통상적으로 사용하는 트립신 처리는 트립신에 의한 독성으로 배양 효율이 떨어지는 문제점이 있었으나, ROCK 저해제를 첨가함으로써 트립신 처리에 따른 세포사멸을 막고 분화를 억제함으로써 성체 줄기세포의 증식을 활성화하는 한편, 미분화 성체 줄기세포의 안정적인 증식에 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

It had the problem that as to the trypsinization, which generally it used in the subculture the culture efficiency fell down to the toxicity by trypsin. But by adding the ROCK inhibitor the apoptosis according to the trypsinization being prevented and controlling the specialization the proliferation of the adult stem cell was activated. It could confirm to contribute to the stable proliferation of the proliferation adult stem cell.

실시예 3: ROCK 저해제의 첨가시기에 의한 줄기세포 증식능 비교

embodiment 3: the stem cell reproductive integrity comparison by the addition time of ROCK inhibitor.

실시에 1에 따라 수득한 양막 상피세포에 대하여, ROCK 저해제를 이용한 성체 줄기세포의 증식능을 더욱 향상하기 위해 배아 줄기세포 연구(Kiichi Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007)에서 사용한 방법과 배양시 ROCK 저해제를 첨가하는 방법을 비교하였다

도 5의 Control은 ROCK 저해제 없이 Reseeding한 결과이고, A는 Reseeding 전에만 ROCK 저해제를 처리하고 Reseeding한 이후는 ROCK 저해제를 처리하지 않는 방법으로 배양한 결과이며, B는 Reseeding한 이후의 배양시에도 계속 ROCK 저해제를 첨가하여 배양한 결과이다.

그 결과, Reseeding전에만 ROCK 저해제를 처리한 A는 ROCK 저해제를 사용하지 않은 대조군(control)과 비교하면 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식능이 명확히 증가하였으나, Reseeding 배양과정에 지속적으로 ROCK 저해제를 처리한 B와 비교하여서는 성체 줄기세포의 증식능이 그다지 우수하지 못함을 확인할 수 있었다. 결론적으로, Reseeding한 이후의 배양시에도 계속 ROCK 저해제를 첨가하여 배양한 B의 경우에 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식능이 가장 현저히 증가하였다.

실시에 4: 양막 상피세포 배양시 배지 교체에 따른 줄기세포 증식능 증가

실시에 1에 따라 수득한 양막 상피세포를, DMEM 배지 및 K-SFM 배지에서 배양하여 3일, 6일 및 8일 후 각각 확인하였다 (도 6).

DMEM 배지에는 FBS, 표피성장인자, 아스코르브산, 비필수아미노산 및 항생제를 첨가하여 사용하였으며, K-SFM 배지에는 FBS, 표피성장인자, 아스코르브산, 하이드로코티존, NAC, 인슐린 및 항생제를 첨가하여 사용하였다. 그 결과, 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포가 K-SFM 배지보다 DMEM배지에서 증식능이 더 높은 것을 확인하였다.

나아가 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 대량 생산을 위해서 다각적인 실험을 한 결과, 1차 계대 배양시 DMEM 배지에서 K-SFM 배지로 교체하는 방법이 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식을 향상시키는 것을 확인할 수 있었다. 4일간 상기 성체 줄기세포를 DMEM 배지에 배양하여 확인한 결과 거의 비슷한 속도로 줄기세포가 증식하였고, 1차 계대 배양을 한 4일째 DMEM 배지에서 K-SFM 배지로 배지를 교체하여 2일간 배양 후 확인한 결과, 배지의 교체 없이 DMEM 배지에서만 배양한 성체 줄기세포에 비해, K-SFM 배지로 교체한 경우의 성체 줄기세포가 더

The method used in order to improve the reproductive integrity of the adult stem cell using the ROCK inhibitor about the amnion cell, obtained according to the embodiment 1, the embryonic stem cell research (Kiichi Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25:681, 2007) and method with the ROCK inhibitor in cultivation were compared.

A is the ROCK inhibitor before the Reseeding the Control of fig. 5 is the Reseeding one result without the ROCK inhibitor may be referred to the result which it is the result cultivated to the method of not processing the Reseeding one after is the ROCK inhibitor it processes and B continuously adds the ROCK inhibitor in the cultivation of the Reseeding one after and it cultivates.

Consequently, a processing the ROCK inhibitor before the Reseeding the reproductive integrity could confirm that the reproductive integrity of the adult stem cell was unable to be particularly excellent compared to B which when the ROCK inhibitor is compared with the control group which it does not use, the reproductive integrity of the amnion cell originated adult stem cell specifically increased and but continuously processes the ROCK inhibitor in the Reseeding cultivation process. In conclusion, the reproductive integrity of the amnion cell originated adult stem cell most remarkably increased in case of B which continuously added the ROCK inhibitor in the cultivation of the Reseeding one after and cultivated.

embodiment 4: the stem cell reproductive integrity increase according to the culture medium replacement in the amnion cell cultivation.

It cultivated in the DMEM medium and K-SFM culture medium and the obtained amnion cell was confirmed according to the embodiment 1 after 3, 6 and 8 (fig. 6).

In the DMEM medium, the FBS, epidermal growth factor, ascorbic acid, non essential amino acid and antibiotic were added and it used. And the FBS, epidermal growth factor, ascorbic acid, hydrocortisone, NAC, insulin and antibiotic were added in the K-SFM culture medium and it used. Consequently, in the amnion cell originated adult stem cell is the DMEM medium than the K-SFM culture medium, it confirmed that the reproductive integrity was much higher.

Furthermore, the proliferation could confirm that method of in the result which doing, and the DMEM medium in the first subculture, it replaces with the K-SFM culture medium the experiment many-sided for the mass production of the amnion cell originated adult stem cell improved the proliferation of the amnion cell originated adult stem cell. The stem cell increased to the speed which was nearly similar as a result of cultivating 4 days adult stem cell in the DMEM medium and confirming. The culture m

욱 높은 증식능을 보이는 것을 확인하였다(도 7).

edium was replaced with the K-SFM culture medium in one 4th day DMEM medium and the first subculture was confirmed after 2 days cultivation. Then it confirmed that the adult stem cell of the case of replacing with the K-SFM culture medium more showed the high reproductive integrity in comparison with the adult stem cell cultivated without the replacement of the culture medium in the DMEM medium (fig. 7).

실시에 5: 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 특성

embodiment 5: the property of the obtained amnion cell originated adult stem cell.

(1) 표면 항원 발현의 유세포분석 (Flowcytometryanalysis)

(1) The flowcytometry (Flow cytometry analysis) of the surface revelation of antigen.

실시에 2에서 배양된 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포들을 표면 CD 시리즈 항원 마커들로 캐릭터라이제이션하였다. CD9(Epithelial cell, adhesion), CD29 (mononuclear cell marker), CD31(endothelial cell and stem cell marker), CD34(hematopoietic stem cell marker), CD45(PTPR, ASV, Leukocyte marker), CD49f(Integrin alpha 6 marker), CD73, CD90(mononuclear stem cell marker), CD105(TGF beta 1 marker), CD133(hematopoietic stem marker) 들을 FACS 분석에 적용하였다

Amnion cell originated adult stem cells cultivated in the embodiment 2 were caricaturized to surface CD series antigen markers. It affected the FACS analysis of giving with the CD 9 (Epithelial cell, adhesion), the CD29 (mononuclear cell marker), CD 31 (endothelial cell and stem cell marker), the CD 34 (hematopoietic stem cell marker), the CD 45 (PTP R, ASV, Leukocyte marker), the CD49 f (Integrin alpha 6 marker), CD73, the CD 90 (mononuclear stem cell marker), the CD 105 (TGF beta 1 marker), the CD 133 (hematopoietic stem marker).

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1500rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 Blocking buffer 용액(5% serum(Normal goat serum + Normal horse serum)을 넣어서 4℃에서 60분간 반응시킨 후 1500rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 Negative Control 및 CD 항원 마커 수 만큼 1 x 10⁵ cell을 분주하였다. 각 웰에 항체 (R-phycoerythrin(PE) / FITC(Fluorescein Isothiocyanate)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 4℃에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 1500rpm으로 3분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1500rpm으로 3분동안 원심분리하였다. 그리고, 한번 더 상기 상층액 제거 후 PBS로 세척하고 1500rpm에서 3분동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 유세포분석기(플로우 사이토미터)를 이용해 분석하였다.

The amnion cell originated adult stem cell obtained in the embodiment 2 was washed to PBS. After trypsinizing the cell was taken away and it centrifuged at 1500rpm for 5 minutes. After after throwing the supernatant away the Blocking buffer solution (5% serum (Normal goat serum + Normal horse serum) being put and reacting for 60 minutes at 4℃ it centrifuged at 1500rpm for 5 minutes. After throwing the supernatant away the cell was floated in PBS and it was 1 x 10⁵ cell busy as the Negative Control and CD antigen marker number. The antibody (R-phycoerythrin(PE) / FITC(Fluorescein Isothiocyanate)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) was put into each well. It incubated in 4℃ for 40 minutes. It centrifuged at 1500rpm after incubation for 3 minutes. After removing the supernatant it washed to PBS and it centrifuged at 1500rpm for 3 minutes. And it washed to PBS and the process of centrifuging was once more repeated after the supernatant removal in 1500rpm for 3 minutes. Using the Flow Cytometer the supernatant is removed, it analyzed.

세포들을 FITC(fluorescein isothiocyanate)-결합된 항-인간 CD9(Becton-Dickinson), CD34(Becton-Dickinson), CD45(Becton-Dickinson), CD105(Becton-Dickinson) 그리고 PE(phycoerythrin)-결합된 항-인간 CD29(Becton-Dickinson), CD31(Becton-Dickinson), CD49f(Becton-Dickinson), CD73(Becton-Dickinson), CD90(Becton-Dickinson), CD133(Miltenybiotec),로 염색하였다. 특이성을 보기 위해, 염색하지 않은 대조군(unstained control)으로 복제 샘플(replicate sample)을 사용하였다.

Cells were dyed to the anti-human CD 9 (Becton-Dickinson), CD 34 (Becton-Dickinson), CD 45 (Becton-Dickinson), CD 105 combined with FITC (fluorescein isothiocyanate) - and the anti-human CD 29 (Becton-Dickinson), CD 31 (Becton-Dickinson), CD 49 f (Becton-Dickinson), CD 73 (Becton-Dickinson), CD 90 (Becton-Dickinson), the CD 133 (Miltenybiotec) combined with PE (phycoerythrin) -. It was to look at the specificity. The reproduced sample (replicate sample) was used as the control group (unstained control) which it did not dye.

그 결과, 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포들은 CD9,

Consequently, amnion cell originated adult stem

CD29, CD49f, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 CD133에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타내었다(도 8a 및 8b).

(2) 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 줄기세포능 등

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 PBS로 세 번 세척하고, 4% paraformaldehyde을 함유한 PBS로 실온에서 30분간 고정하였다. PBS로 세 번(3분/회) 세척한 후, 0.1% Triton-X100을 함유한 PBS로 실온에서 10분간 침투(permeabilization)시켰다. PBS로 세 번(3분/회) 세척한 후, Blocking buffer (2.5% serum solution, NSG+NHS)로 실온에서 30분 동안 반응시키고, 일차항체를 함유한 PBS에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회(5분/회) 세척하고, 이차항체로 실온에서 30분 동안 반응시켰다(in dark condition). PBS로 세 번 세척한 후, 마운팅(mounting)하였다. 이와 같이 수득한 세포들에 대하여, SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60, Tra-1-81, Cytokeratin 및 E-cadherin에 대한 특이성을 조사하였다.

그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 성체 줄기세포는 미분화상태의 세포 마커, 즉 줄기세포 마커라고 할 수 있는 SSEA 4, Oct-4, Tra-1-60 및 Tra-1-81에 대하여 양성반응을 나타내었고, 상피세포 마커라고 할 수 있는 Cytokeratin 및 E-cadherin에 대하여도 양성반응을 나타내었다.

(3) 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 형태학적 특성

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 배양중인 배양기에서 꺼내어 Zeiss Axiovert 200 형광현미경에서 100배의 배율로 관찰하고 장착되어 있는 AxioCam MRm CCD를 통하여 촬영하였다. 제공된 AxioVision ver. 4.5 프로그램을 이용하여 세포 직경을 측정하고 사진으로부터 세포의 크기 및 핵, 세포질의 크기를 확인함으로써 양막상피세포 유래 줄기세포의 형태를 확인하였다

그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 성체 줄기세포는 직육면체 형태 또는 주사위꼴 형태의 약간 둥근형의 전형적인 상피세포(Epithelial cell)의 형태를 유지하고 있으며, 배양시 세포의 크기(직경)는 약 5~10#956#m 정도였다.

실시에 6: 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 분화

cells represents the bisexual person immunological characteristic about the CD9, the CD29, the CD49f, the CD73, the CD90 and CD105. And the immunological characteristic of voice was shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and CD133 (figures 8a and 8b).

(2) including stem cell activity of the amnion cell originated adult stem cell etc.

The obtained amnion cell originated adult stem cell was washed in the embodiment 2 to PBS with the Severn. It fixed on 30 min. to PBS containing 4% paraformaldehyde in the room temperature. In PBS containing 0.1% Triton-X100 to PBS after doing the Severn (3 minutes the / time) washing the room temperature, it made with for 10 minutes penetration (permeabilization). In the Blocking buffer (2.5% serum solution, NSG+NHS) after doing PBS the Severn (3 minutes the / time) washing, the room temperature, it reacted for 30 minutes. It reacted at the room temperature in PBS containing the primary antibody for 1 hour. It washed to PBS with 3 times (5 minutes / time). It reacted in the room temperature by the second antibody for 30 minutes (in dark condition). It the mounting was done by PBS after doing the Severn washing. In this way, the specificity for the E-cadherin and SSEA 4, the Oct-4, the Tra-1-60, the Tra-1-81, the Cytokeratin was irradiated on obtained cells.

Consequently, as shown in figure 9, the adult stem cell according to the present invention represents the SSEA 4, which it can be called the cell marker of the undivided condition, in other words, the stem cell marker the Oct-4, and the positive reaction about the Tra-1-60 and Tra-1-81. And the positive reaction was shown about the number *** Cytokeratin and the E-cadherin which it was called the epithelial cell marker.

(3) The morphology of the amnion cell originated adult stem cell.

It took a picture through the AxioCam MRm CCD taking out of the culture medium cultivating the obtained amnion cell originated adult stem cell in the embodiment 2 and observed in the Zeiss Axiovert 200 fluorescent microscope to the magnification of the hundredfold and was mounted. By the cell diameter being measured using the provided AxioVision ver. 4.5 program and confirming size and nucleus of the cell, and the size of the cytoplasm from the photograph the form of the amnion cell originated stem cell was confirmed.

Consequently, as shown in figure 10, the adult stem cell according to the present invention is the cuboidal type or the dice every form, little, the form of the typical epithelial cell of the bulbous may be referred to the size (diameter) of the cell in cultivation is about 5~10µm it maintains.

embodiment 6: the differentiation of the amnion

cell originated adult stem cell.

(1) 지방세포로의 분화

(1) The differentiation to the fat cell.

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 지방세포분화유도배지(Nonhematopoietic AdipoDiff Medium, Miltenyi Biotec)에서 3주 동안 배양(37℃, 5% CO₂, 배지교환주기: 3~4일)하여 다능성 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, 배양 시작 후 21일(3주) 때 Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 11).

The amnion cell originated adult stem cell obtained in the embodiment 2 was done cultivation (37℃, 5% CO₂, and the medium exchange cycle : 3~4) in the inhibitory effects on adipocytes inducing medium (Nonhematopoietic AdipoDiff Medium, Miltenyi Biotec) for 3 weeks and the differentiation to the fat cell of the multipotent stem cells was induced. It burnt after the culture start with 21 (3 weeks) and it analyzed using the Oil red O dyeing method. Consequently, it could confirm that the amnion cell originated adult stem cell according to the present invention was specialized to the fat cell (fig. 11).

(2) 골형성 세포로의 분화

(2) The differentiation to the osteogenesis cell.

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 골형성 유도 배지(Nonhematopoietic OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec)에서 2주 동안 배양(37℃, 5% CO₂, 배지교환주기: 3~4일)하여 다능성 줄기세포의 골세포로의 분화를 유도하였다. 배양 시작 후 14일(2주) 때 Alizalin red S 염색법을 이용하여 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포가 골형성 세포로 분화되었음을 확인하였다(도 11).

It did cultivation (37℃, 5% CO₂, and the medium exchange cycle : 3~4) for 2 weeks and the amnion cell originated adult stem cell obtained in the embodiment 2 the differentiation to the bone cell of the multipotent stem cells was induced in the osteoconduction culture medium (Nonhematopoietic OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec). It burnt after the culture start with 14 (2 weeks) and it confirmed that the amnion cell originated adult stem cell was specialized using the Alizalin red S dyeing method to the bony osteogenesis cell (fig. 11).

(3) 근육세포로의 분화

(3) The differentiation to the muscular cell .

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 근육세포분화배지(Skeletal Muscle Cell Medium, LONZA)를 이용하여 3주 동안 배양(37℃, 5% CO₂, 배지교환주기: 3~4일)한 후, 배양 시작 후 21일(3주) 때 면역염색을 실시하였다.

It burnt after the culture start with 21 (3 weeks) and the obtained amnion cell originated adult stem cell the immunostaining was performed in the embodiment 2 using the muscular cell differentiation media (Skeletal Muscle Cell Medium, LONZA) for 3 weeks after doing cultivation (37℃, 5% CO₂, and the medium exchange cycle : 3~4).

그 결과, 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포는 근육세포의 특이항원인 미오신에 대하여 양성반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포가 근육세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 11).

Consequently, the amnion cell originated adult stem cell according to the present invention exhibits the positive reaction about the myosin called the special antigen of the muscular cell. It could confirm from this result that the amnion cell originated adult stem cell according to the present invention was specialized to the muscular cell (fig. 11).

(4) 신경세포로의 분화

(4) The differentiation to the nerve cell.

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 신경세포 분화 유도 배지(Neural Progenitor Media Systems, LONZA)에서 2주 동안 배양(37℃, 5% CO₂, 배지교환주기: 3~4일)하며 신경세포로의 분화를 유도하였다. 배양 시작 후 14일(2주) 때, 면역염색을 실시하였다.

While doing the amnion cell originated adult stem cell obtained in the embodiment 2 cultivation (37℃, 5% CO₂, and the medium exchange cycle : 3~4) in the nerve cell differentiation medium (Neural Progenitor Media Systems, LONZA) for 2 weeks the differentiation to the nerve cell was induced. The immunostaining was performed after the culture start in 14 (2 weeks).

그 결과, 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포는 신경계 성상세포의 특이항원인 GFAP(glial fibrillary acidic protein), O1(oligodendrocyte marker), MA

Consequently, the amnion cell originated adult stem cell according to the present invention exhibits the GFAP (glial fibrillary acidic protein), O 1 (olig

P2(microtubule associated protein)에 대하여 양성 반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포가 신경세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 12).

odendrocyte marker) called the special antigen of the nervous system astrocyte, and the positive reaction about the MAP 2 (microtubule associated protein). It could confirm from this result that the amnion cell originated adult stem cell according to the present invention was specialized to the nerve cell (fig. 12).

실시예 7: 창상 치유 효능 평가

embodiment 7: wound healing efficacy assessment .

무흉선 누드 마우스 창상모델을 이용하여 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 피내 투여한 후 창상 치유 능력을 식염수 대조군과 비교하였다.

The wound healing capability was compared with the saline solution comparative group after administering the amnion cell originated adult stem cell using the athymic nude mice lanceolate seta der with the intradermal.

실험동물은 4, 5주령의 수컷 Bald/c-nu Slc ((주)중앙실험동물, 한국) 무흉선 누드 마우스를 사용하였으며 표 4와 같이 시험군을 구성하였다.

As shown in table 4, the test group was organized while the experimental animals used 4, the male Bald / c-nu Slc ((main part) central lab animal of 5 age, and the Korea) athymic nude mice.

Group	Dosage	volume (μl)	No. of Animal	Route of Administration
Control	0	50 (saline)	6	intra dermis
AEpSC	2x10 ⁵ cells	50 (saline)	3	intra dermis

Group	Dosage	volume (μl)	No. of Animal	Route of Administration
Control	0	50 (saline)	6	intra dermis
AEpSC	2x10 ⁵ cells	50 (saline)	3	intra dermis

시험군을 상기 표 3과 같이 구분한 다음 사육 상자에는 개체식별카드를 부착하고, 사육 상자별로 1마리씩 개별 사육하여 개체를 식별하였다. 시험 물질은 시험 시작 30분 전에 클린벤치 안에서 각각 saline 50 μl, 2x10⁵ cells AEpSC 50 μl씩 29G 인슐린 주사기에 준비하였다.

The object identification card was asked for in the cage after classifying the test group like the table 3. It bred individually according to the cage 1 numbers and the individual was identified. The testing material prepared before the test beginning 30 minute in the clean bench in the respective saline 50 μl, and 2x 10 5 cells AEpSC 50 μl 29G insulin syringe.

각 시험 동물을 수술 1시간 전 체중을 측정 및 항생제를 투여하고 마취한 다음, 실험동물의 등쪽 중앙부위를 알코올 솜으로 소독한 후 직경 5 mm 바이오피 펀치를 이용하여 전층 창상을 유발하였다. 창상을 유발한 후 곧바로 준비된 시험물질을 창상 근처 피내 부위에 3군데로 나누어 총 50 μl를 주입하였다. 주입 위치는 창상면을 통한 시험물질 손실을 최소화하기 위하여 창상 가장자리로부터 약 1cm 정도 떨어진 자리를 선택하였다.

After the measurement and antibiotic were administered and each testing animal the operation 1 hour former weight was anesthetized the front layer wound the back core region of the experimental animals was caused to the alcohol cotton after doing the disinfection using the diameter 5 mm biopsy punch. The testing material which was immediately the wound prepared against after doing the induction was divided into 3 places in the wound vicinity intradermal site and the total 50 μl was injected. So that the pouring location minimize the testing material loss through the cut surface the place in which about 1cm gap fell down from the wounded edge was selected.

창상 치료효과를 확인하기 위해 매일 1회 이상 동물의 상태를 조사하고, 수술 직후, 3일, 6일, 7일, 9일 및 14일에 창상 부분을 사진 촬영하여 그 결과를 도시하였다 (도 13). 도 13은 창상 크기와 같은 크기의 circular filter paper를 창상 옆에 놓고 같이 촬영하여 reference pixel area로 활용하여 작성하였다.

Everyday the state of animal was irradiated over 1 time in order to ascertain the wound treatment effect. The wound part was photoed in the time right after surgery, 3, 6, 7, 9 and 14 and the result was shown (fig. 13). Fig. 13 placed the circular filter paper of the size like the wound size on the wound side and it together took a picture and the circular filter paper utilized as the reference pixel area and it prepared.

시험물질 주입 후 창상회복율을 시간경과에 따라 관찰한 결과에 따르면, 양막 상피세포를 투여한 군의 창상 회복속

According to the result observing the cut recovery rate after the testing material injection according to

도가 식염수를 투여한 군보다 빠른 것을 확인할 수 있었다. 창상 유발부가 모두 회복된 시점인 시술후 21일차에 실험동물을 부검하여 피부 조직검사를 실시하였다 (도 14).

창상 유발 후 회복된 피부를 각 군별로 조직 검사한 결과, 대조군 피부의 경우 섬유성 조직 덩어리만 존재하는데 반하여, 양막상피세포를 투여한 개체에서는 회복된 피부 조직에 모낭 및 땀샘 같은 피부세기관이 다량 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 사실들을 종합하여 볼 때, 양막상피세포는 피부조직의 재생피화 촉진 뿐 아니라 피부세기관의 재생을 도와주는 역할을 한다고 기대되어진다.

이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

면책안내

본 문서는 특허 및 과학기술문헌 전용의 첨단 자동번역 시스템을 이용해 생성되었습니다. 따라서 부분적으로 오역의 가능성이 있으며, 본 문서를 자격을 갖춘 전문 번역가에 의한 번역물을 대신하는 것으로 이용되어서는 안 됩니다. 시스템 및 네트워크의 특성때문에 발생한 오역과 부분 누락, 데이터의 불일치등에 대하여 본원은 법적 책임을 지지 않습니다. 본 문서는 당사의 사전 동의 없이 권한이 없는 일반 대중을 위해 DB 및 시스템에 저장되어 재생, 복사, 배포될 수 없음을 알려드립니다.

(The document produced by using the high-tech machine translation system for the patent and science & technology literature. Therefore, the document can include the mistranslation, and it should not be used as a translation by a professional translator. We hold no legal liability for inconsistency of mistranslation, partial omission, and data generated by feature of system and network. We would like to inform you that the document cannot be regenerated, copied, and distributed by being stored in DB and system for unauthorized general public without our consent.)

o the time-out, the fast thing could be confirmed than the group in which the cut recovery speed of the group administering the amnion cell administered the saline solution. The experimental animals was examined in 21 primary and the skin tissue inspection was performed after the time procedure in which the wound inducing portion was altogether recovered (fig. 14).

It could confirm that skin intensity pipe such as the hair follicle in the skin tissue which the skin recovered after the wound induction is texture inspected to each by groups and then the fiber tissue mass exists in case of the control group skin and whereas is recovered in the entity administering the amnion cell. And sweat gland were observed with large amount.

When this facts are put together it is expected that the amnion cell serves to help the regeneration of not only the reepithelization promotion of the skin tissue but also the skin intensity pipe.

The content of the present invention was particularly described to the or more. And the or more has to a person skilled in the art of the relevant industry. It is the embodiment which this concrete technology only does with desirable. And it will be clear the scope of the present invention is not limited by this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.