



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2008년01월17일  
 (11) 등록번호 10-0795708  
 (24) 등록일자 2008년01월11일

(51) Int. Cl.  
 C12N 5/08 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)  
 C12N 5/00 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2007-0114451  
 (22) 출원일자 2007년11월09일  
 심사청구일자 2007년11월09일  
 (30) 우선권주장  
 1020060134241 2006년12월26일 대한민국(KR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Stem Cells, 2005 Nov-Dec;23(10):1549-59. Epub  
 2005 Aug 4.  
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
**주식회사 알앤엘바이오**  
 서울 관악구 봉천동 1596-7  
 (72) 발명자  
**라정찬**  
 경기 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을 SK한화  
 아파트 626동701호  
**신일섭**  
 서울 관악구 봉천2동 동아아파트 107동 1108호  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**이처영**

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 조경주

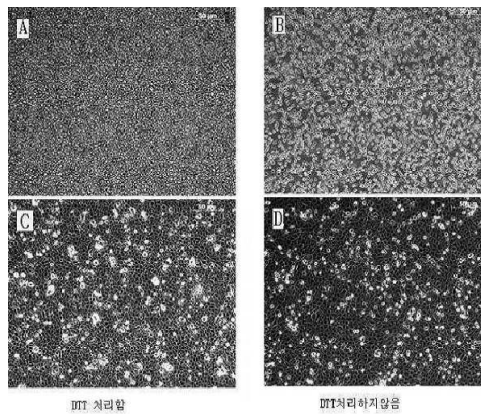
**(54) 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 분리 및 배양방법**

**(57) 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 체대혈, 골수 등의 치료용 줄기세포보다 채취가 쉽고, DTT 처리, ROCK 저해제 첨가 또는 배지 교환으로 수득물 및 증식률을 현저히 증가시킴으로써, 성체 줄기세포를 제조하는데 효율적인 방법을 제공한다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**강성근**

서울 관악구 봉천동 1712번지 관악드림타운 129동  
903호

**우상규**

경기 안양시 동안구 호계동 1079-3번지 102호

(56) 선행기술조사문헌

Br J Ophthalmol. 2003 Dec;87(12):1509-14.

Tissue Eng. 2004 Jul-Aug;10(7-8):1136-47.

Artif Organs. 2006 Jun;30(6):424-31.

KR1020040064004 A

KR1020050002906 A

EP 1288293A1

US 2005/0124003A1

US 7101710B2

JP2006197867A

Am J Obstet Gynecol. 2006 Mar;194(3):664-73

Stem Cells Dev. 2006 Dec;15(6):905-19

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

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.

**청구항 2**

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

**청구항 3**

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

**청구항 4**

제1항의 방법에 의해 분리된 인간 양막 상피세포를 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 배양한 다음, 상기 배양액으로부터 줄기세포를 회수하는 단계인 것을 특징으로 하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 제조방법.

**청구항 5**

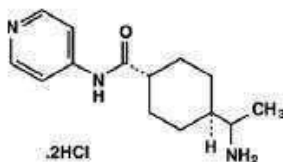
제4항의 방법에 의해 제조된 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 배지에서 계대 배양하는 것을 특징으로 하는, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식·유지 방법.

**청구항 6**

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

**청구항 7**

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



**청구항 8**

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

**청구항 9**

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.

**청구항 10**

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.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 배지는 아스코르브산, 표피성장인자, 인슐린, 항생제 및 FBS(Fetal bovine serum)를 추

가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

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

**청구항 13**

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) CD9, 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.

**청구항 14**

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

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술 분야**

<1> 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 획득하고, 상기 양막 상피세포 배양시 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가하여 다량의 성체 줄기세포를 획득하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

<2> 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.

<3> 이에 줄기세포연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근본적으로 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.

<4> 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.

<5> 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 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.

- <6> 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.
- <7> 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.
- <8> 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 세포치료제에 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.
- <9> 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 사용되나, 태반 줄기세포는 세포손상 질환에 사용에 유리하여 향후 심장마비, 뇌졸중, 당뇨병, 골다공증, 퇴행성 관절염 등 많은 질병에 이용할 수 있다.
- <10> 그러나, 성체 줄기세포의 소스(source)로 태반을 이용하는데 있어서, 분만 직후의 태반 조직을 필요한 순간마다 바로 제공받기는 어려운 실정이며, 실제로 태반조직의 산업적 이용(태반주사, 태반화장품류)은, 분만 후의 태반 조직을 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.
- <11> 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 안정한 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>).
- <12> 이에 본 발명자들은 양막 상피세포 유래의 미분화 상태의 성체 줄기세포를 다량으로 제조하여 실용화 하기 위해 예의 노력한 결과, DTT 및 ROCK 저해제를 양막 상피세포의 분리 및 배양에 이용하고, 배양 배지의 조성을 바꿔 줌으로써 양막 상피세포 유래 줄기세포를 냉장 보관된 태반조직으로부터 다량 수득할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

- <13> 본 발명의 목적은 인간 양막 조직으로부터 양막 상피세포를 고수율로 분리하는 방법 및 상기 분리된 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.
- <14> 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의하여 제조된, 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 제공하는데 있다.
- <15> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 세포 치료제를 제공하는

데 있다.

**과제 해결수단**

- <16> 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.
- <17> 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.
- <18> 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 수득된 인간 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 체내 또는 체표면의 창상 치료용 세포 치료제를 제공한다.

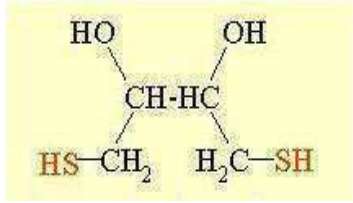
**효과**

- <19> 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.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- <20> 본 발명은 일 관점에서, 인간 양막 조직을 DTT(Dithiothreitol) 및 저농도의 트립신으로 처리하여 인간 양막 상피세포를 고수율로 분리·수득하는 방법에 관한 것이다.
- <21> 본 발명에서는 태반으로부터 분리한 양막조직 전체에서 추출되는 여러 종류의 세포를 사용하는 것이 아니라 양막상피세포만을 추출하여 분리한다.
- <22> 양막 상피세포(amniotic epithelial cell)는 태반을 구성하는 양막 상피 조직중 배 형성 이전 또는 수정 후 8일 된 외배엽으로부터 발달한 것으로 배 형성 전 배아세포의 유연성을 유지하고 있는 것을 특징으로 하고 있다. 따라서 상기 양막 상피 세포의 표면 마커는 배아에서 발현되는 것과 동일한 것으로 확인되었고, 면역조직화학적 분석 및 유전학적 분석에 의하여 양막 상피세포 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).
- <23> 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.
- <24> 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.
- <25> 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.
- <26> 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 바는 없었다.

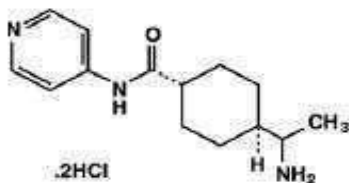
<27> [구조식 1]



- <28>
- <29> 본 발명에서는 단일세포 분리의 통상적 절차인 트립신 전처리를 DTT처리로 대신함으로써 과도한 세포파괴를 막고 이후 처리할 트립신효과를 방해하는 점액질을 제거하여 단일세포의 수득률을 증가시킨다.
- <30> 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, 50mM 초과 농도로 DTT를 처리할 경우에는 과도한 단백질 분해로 인해 세포 사멸이 발생할 수 있다.
- <31> 인간 양막 조직에 상기 DTT처리 후, 양막 상피세포를 분리해내기 위하여 저농도의 트립신을 처리한다. 바람직한 트립신의 농도는 0.025%~0.125%이고, 보다 바람직하게는 0.05%~0.10%이다.
- <32> 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 인하여 저농도의 트립신으로는 효과적으로 상피세포를 분리해낼 수 없었기 때문에, 대부분 고농도의 트립신이나 콜라게나아제 등으로 분리 가능한 간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell, MSC)를 사용해왔다.
- <33> 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.
- <34> 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.
- <35> 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.
- <36> 상기의 방법에 의해 분리된 양막상피세포를, 이하의 방법으로 배양하여 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 수득할 수 있다.
- <37> 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·유지방법에 관한 것이다.
- <38> 본 발명의 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 배양에 사용한 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.
- <39> 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, 하이드로코티존, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 및 항생제를 첨가한 K-SFM(Keratinocyte serum free medium) 배지를 사용하여 양막 상피줄기세포를 배양할 수 있다. 이 때, DMEM 배지에서 배양시 성체 줄기세포의

증식이 상기 K-SFM 배지에서 증식 정도보다 다소 높게 나타난다 (도 6).

- <40> 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.
- <41> 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.
- <42> 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 유지하도록 한다.
- <43> ROCK 저해제 (Rho-associated kinase inhibitor)는 세포사멸(apoptosis)을 억제하는 기능을 하는 물질로서, 신경돌기의 재생, 미오신 인산화 및 평활근 수축에 있어 작용-유도성  $Ca^{2+}$  증감(agonist-induced  $Ca^{2+}$  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).
- <44> 그러나 배아 줄기세포와 성체 줄기세포는 명백히 구별되는 별개의 줄기세포로써 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.
- <45> 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).
- <46> 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.
- <47> 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.
- <48> [구조식 2]



- <49>
- <50> 본 발명에 사용한 ROCK 저해제의 적정 처리농도는 100nM~100 μM이다. 100nM 미만의 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 성체 줄기세포의 미분화능이 장기간 유지되기 어려우며, 100 μM 초과 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 세포의 변형이 일어나고 분화단계로 접어드는 현상이 발생할 수 있다.

- <51> 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.
- <52> (1) 형태학적 특성
- <53> 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 $\mu$ 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).
- <54> (2) 면역학적 특성
- <55> 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).
- <56> (3) 줄기세포능(stemness) 등
- <57> 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).
- <58> 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·중·외배엽 유래 세포로의 분화능력을 가지고 있고, 실제로 중배엽 유래의 지방세포, 골세포 및 근세포로의 분화 및 외배엽 유래의 신경세포로의 분화능을 실시예 6에서 확인하였다.
- <59>
- <60> 본 발명은 또 다른 관점에서, 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 체내 및 체표면의 창상 치료용 세포 치료제에 관한 것이다.
- <61> 이때 창상이란 외부로부터 어떠한 힘에 의하여 파열된 상태를 의미하는 것으로, 특히 피부, 점막, 뼈 조직의 파괴, 절단 또는 파열된 상태 등을 모두 포함한다.
- <62> 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.
- <63> 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- <64> 사람의 경우, 세포치료제의 통상적인 투여량은 10<sup>4</sup>~10<sup>10</sup> cells/body, 바람직하게는 10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> cells/body, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다
- <65> 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.
- <66> 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.
- <67> **실시예**

<68> 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 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<69> 이하 실시한 실시예에서 사용한 각종 배지 및 시약의 입수처는 하기 표에 기재된 바와 같다.

**표 1**

<70>

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

<71> **실시예 1: 양막 조직으로부터 DTT(Dithiothreitol) 및 Trypsin 처리에 따른 양막 상피줄기세포의 분리**

<72> 양막은 고려대학교병원 임상실험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산 분만에서 수집되어 연구용으로 사용하였다.

<73> 실험에 필요한 양막조직은 태반으로부터 분리하였으며, 분리된 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수 또는 DMEM배지에 넣어 연구실까지 옮겼다.

<74> 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 10mM 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 10<sup>7</sup> 개였다(도 1의 B). 도 1의 D는 이 세포들을 배양한지 3일 후의 사진이다.

<75> **참고예 1:시간 경과에 따른 줄기세포의 수득률**

<76> 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.

표 2

<77>

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

<78>

**비교예 1: 양막 조직으로부터 Trypsin 처리만에 의한 양막 상피줄기세포의 분리**

<79>

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 원심 분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 잘 부유시켜 단일세포를 수득하였다. Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue dye법으로 현미경 상에서 육안으로 관찰되는 살아있는 세포들을 계수하였으며, 분리 직후 세포수를 확인한 결과  $9.25 \times 10^5$  cells개였다(도 1의 A). 도 1의 C는 이 세포들을 배양한지 3일 후의 사진이다.

<80>

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 배양 하여 수득할 수 있는 성체 줄기세포의 양도 현저히 증가하였다.

<81>

**실시예 2: 분리한 양막 상피세포의 ROCK 저해제 존재하에서의 배양**

<82>

**2-1 분리된 양막 상피줄기세포의 배양**

<83>

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 µM의 ROCK 저해제 Y-27632를 첨가하여 배양하였다.

표 3

<84>

| 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    |

<85>

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  $5 \times 10^6$  개를 새로운 배지에 씨딩(seeding)하여 계대배양하였다. 계대배양시 리씨딩(reseeding)할 때마다 각각의 새로운 배지에 10 µM의 ROCK 저해제를 첨가하였다.

<86>

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 투여후 배양된 1일째 및 3일째 성체 줄기 세포 증식 사진이다.

<87>

**2-2. ROCK 저해제 농도별 줄기세포 증식능 비교**

<88>

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 µM, 10 µM, 1 µM, 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).

<89>

도 3a 및 도 3b에서 확인되는 바와 같이, 10nM 농도 이하의 ROCK 저해제를 처리한 경우에는, ROCK 저해제를 처

리하지 않은 세포의 증식정도와 크게 차이가 없었고, 100 μM 농도 이상에서는 세포의 증식이 현저하게 향상되는 것은 확인되지만 세포변형이 일어나거나 분화 되는 현상이 나타나므로, 결론적으로 ROCK 저해제의 가장 바람직한 농도는 약 10 μM인 것으로 확인되었다.

**<90> 비교예 2: ROCK 저해제 첨가 유무에 의한 줄기세포 증식능 촉진 효과**

**<91>** ROCK 저해제의 효과를 알아보기 위해, 실시예 1에서 수득한 양막 상피세포를  $4 \times 10^6$  세포수로 넣고 DMEM/F-12 배지에 FBS, 아스코르브산, 표피성장인자, 인슐린 및 항생제를 첨가하여 4일간 계대 배양한 후, 10 μM의 ROCK 저해제 Y-27632를 첨가한 배지 및 첨가하지 않은 배지로 각각 씨딩하여 1일, 2일 및 3일 후에 확인하였다 (도 4).

**<92>** 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.

**<93>** 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.

**<94> 실시예 3: ROCK 저해제의 첨가시기에 의한 줄기세포 증식능 비교**

**<95>** 실시예 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

**<96>** 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.

**<97>** 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.

**<98> 실시예 4: 양막 상피세포 배양시 배지 교체에 따른 줄기세포 증식능 증가**

**<99>** 실시예 1에 따라 수득한 양막 상피세포를, DMEM 배지 및 K-SFM 배지에서 배양하여 3일, 6일 및 8일 후 각각 확인하였다 (도 6).

**<100>** DMEM 배지에는 FBS, 표피성장인자, 아스코르브산, 비 필수아미노산 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.

**<101>** 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 더욱 높은 증식능을 보이는 것을 확인하였다(도 7).

**<102> 실시예 5: 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 특성**

**<103> (1) 표면 항원 발현의 유세포분석(Flow cytometry analysis)**

**<104>** 실시예 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

- <105> 실시예 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  $1 \times 10^5$  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.
- <106> 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(Miltenyi biotec),로 염색하였다. 특이성을 보기 위해, 염색하지 않은 대조군(unstained control)으로 복제 샘플(replicate sample)을 사용하였다.
- <107> 그 결과, 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포들은 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).
- <108> **(2) 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 줄기세포능 등**
- <109> 실시예 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.
- <110> 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 있는Cytokeratin 및 E-cadherin에 대하여도 양성반응을 나타내었다.
- <111> **(3) 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 형태학적 특성**
- <112> 실시예 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 배양중인 배양기에서 꺼내어 Zeiss Axiovert 200 형 광현미경에서 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
- <113> 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  $\mu\text{m}$  정도였다.
- <114> **실시예 6: 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 분화**
- <115> **(1) 지방세포로의 분화**
- <116> 실시예 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 지방세포분화유도배지(Nonhematopoietic AdipoDiff Medium, Miltenyi Biotec)에서 3주 동안 배양(37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 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).

**(2) 골형성 세포로의 분화**

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 골형성 유도 배지(Nonhematopoietic OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec)에서 2주 동안 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 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).

**(3) 근육세포로의 분화**

실시에 2에서 수득한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 근육세포분화배지(Skeletal Muscle Cell Medium, LONZA)를 이용하여 3주 동안 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 배지교환주기: 3~4일)한 후, 배양 시작 후 21일(3주) 때 면역 염색을 실시하였다.

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).

**(4) 신경세포로의 분화**

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

그 결과, 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포는 신경계 성상세포의 특이항원인 GFAP(glial fibrillary acidic protein), O1(oligodendrocyte marker), MAP2(microtubule associated protein)에 대하여 양성반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포가 신경세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 12).

**실시에 7: 창상 치유 효능 평가**

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

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

**표 4**

| Group   | Dosage                  | volume (μl) | No. of Animal | Route of Administration |
|---------|-------------------------|-------------|---------------|-------------------------|
| Control | 0                       | 50 (saline) | 6             | intra dermis            |
| AEpSC   | 2x10 <sup>5</sup> 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, 2x10<sup>5</sup> cells AEpSC 50 μl씩 29G 인슐린 주사기에 준비하였다.

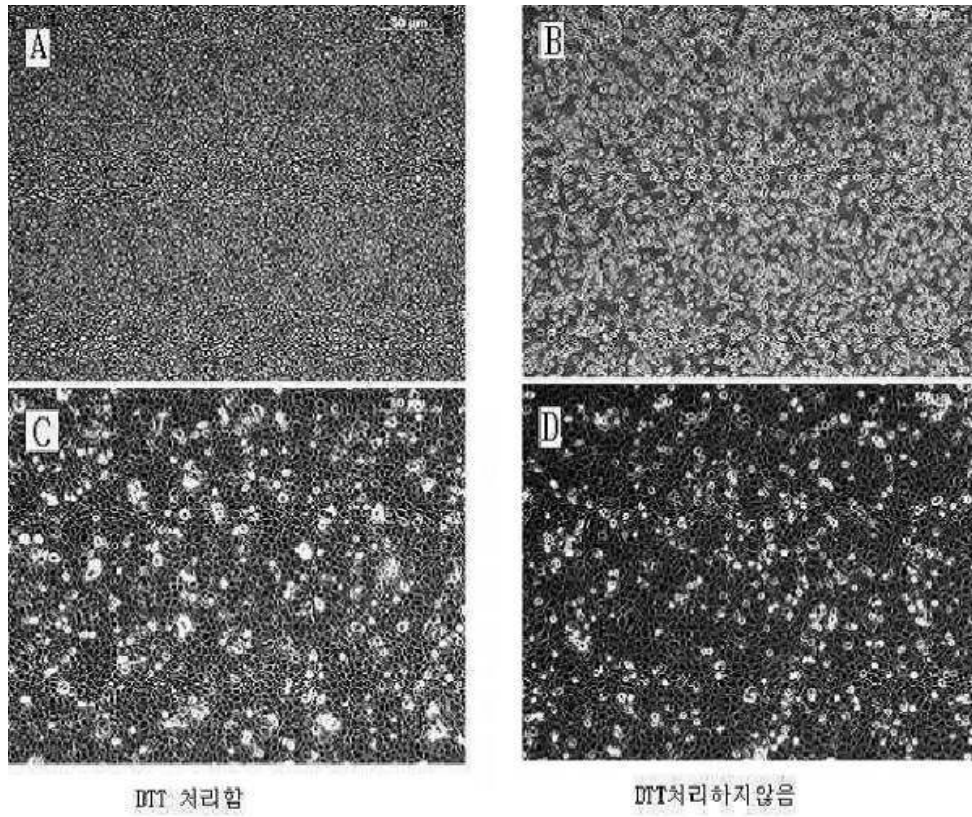
각 시험 동물을 수술 1시간 전 체중을 측정 및 항생제를 투여하고 마취한 다음, 실험동물의 등쪽 중앙부위를 알코올 솜으로 소독한 후 직경 5 mm 바이오피스 펀치를 이용하여 전층 창상을 유발하였다. 창상을 유발한 후 곧바로 준비된 시험물질을 창상 근처 피내 부위에 3군데로 나누어 총 50 μl를 주입하였다. 주입 위치는 창상면을 통한 시험물질 손실을 최소화하기 위하여 창상 가장자리로부터 약 1cm 정도 떨어진 자리를 선택하였다.

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.

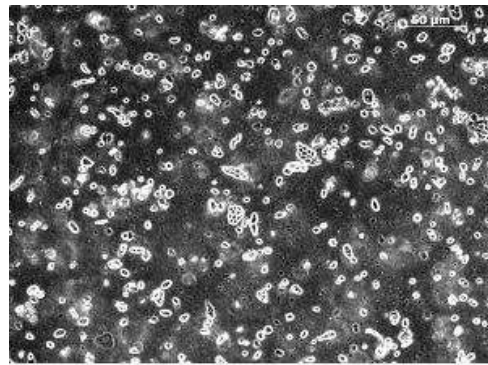
- <133> 시험물질 주입 후 창상회복율을 시간경과에 따라 관찰한 결과에 따르면, 양막 상피세포를 투여한 군의 창상 회복속도가 식염수를 투여한 군보다 빠른 것을 확인할 수 있었다. 창상 유발부가 모두 회복된 시점인 시술후 21일 차에 실험동물을 부검하여 피부 조직검사를 실시하였다 (도 14).
  - <134> 창상 유발 후 회복된 피부를 각 군별로 조직 검사한 결과, 대조군 피부의 경우 섬유성 조직 덩어리만 존재하는데 반하여, 양막상피세포를 투여한 개체에서는 회복된 피부 조직에 모낭 및 땀샘 같은 피부세기관이 다량 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.
  - <135> 이러한 사실들을 종합하여 볼 때, 양막상피세포는 피부조직의 재생피화 촉진 뿐 아니라 피부세기관의 재생을 도와주는 역할을 한다고 기대되어진다.
  - <136> 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 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.
- 도면의 간단한 설명**
- <137> 도 1은 DTT(Dithiothreitol)처리 유무에 의한 양막 상피세포 수득물을 비교한 결과를 나타낸 것이다 (A: DTT처리 및 트립신 처리로 수득한 양막 상피세포, B: 트립신처리만으로 수득한 단일세포, C: A의 배양된 성체 줄기세포, D: B의 배양된 성체 줄기세포).
  - <138> 도 2는 ROCK 저해제 존재 하에 배양한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포 배양 결과를 나타내는 사진이다.
  - <139> 도 3a 및 3b는 ROCK 저해제의 농도별 성체 줄기세포 증식능 향상 효율을 비교한 결과이다(4a:ROCK 저해제의 처리 직후의 사진, 4a:ROCK 저해제의 처리 1일 후의 사진, 4b:ROCK 저해제의 처리 4일 후의 사진).
  - <140> 도 4는 ROCK 저해제 첨가 유무에 의한 줄기세포 증식능을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
  - <141> 도 5는 ROCK 저해제의 처리 시기에 의한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포증식능 비교사진으로 ROCK 저해제를 Reseeding 전에 처리한 경우와 Reseeding 후에 처리한 경우의 증식능을 비교한 결과이다 (Control: ROCK 저해제를 처리하지 않고 1일 배양한 결과, A: Reseeding전에 ROCK 저해제를 처리하고 Reseeding에는 ROCK 저해제를 처리하지 않고 1일 배양한 결과, B: Reseeding에 ROCK 저해제를 처리하여 1일 배양한 결과).
  - <142> 도 6은 DMEM 배지와 K-SFM 배지에 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포를 3일, 6일 및 8일간 배양하여 증식능을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
  - <143> 도 7은 DMEM 배지와 K-SFM 배지 교체에 의한 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 증식능의 향상을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
  - <144> 도 8a 및 8b는 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 유세포 분석 결과이다.
  - <145> 도 9은 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 SSEA4, Oct-4, Cytokeratin 및 E-cadherin에 대한 반응 결과를 나타내는 사진이다.
  - <146> 도 10은 양막 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 형태학적 특성을 확인할 수 있는 광학현미경 사진이다.
  - <147> 도 11은 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 골세포로의 분화(Osteogenesis), 골세포로의 분화(Osteogenesis) 및 근세포로의 분화(Myogenesis)를 나타내는 사진이다.
  - <148> 도 12는 양막 상피세포 유래 성체 줄기세포의 신경세포로의 분화(Neurogenesis)를 나타내는 사진이다.
  - <149> 도 13은 동물 창상 모델에서의 창상 회복율을 시기별로 관찰한 그래프이다.
  - <150> 도 14는 대조군과 양막 상피세포 투여군의 회복된 창상 피부 조직을 **HE** 염색을 실시한 사진이다.

도면

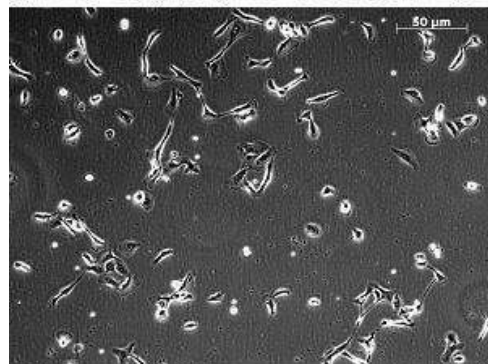
도면1



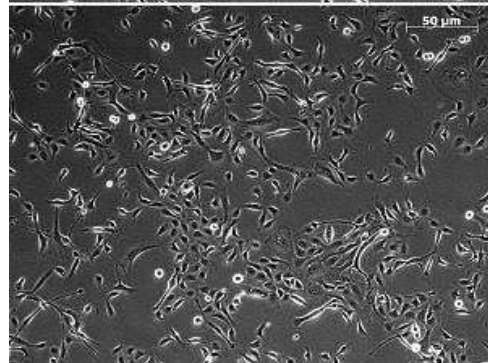
도면2



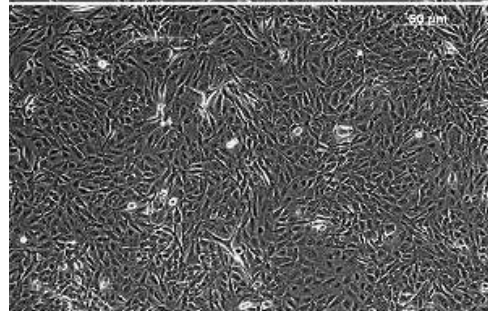
분리



분리 후 4일째  
ROCK저해제 투여

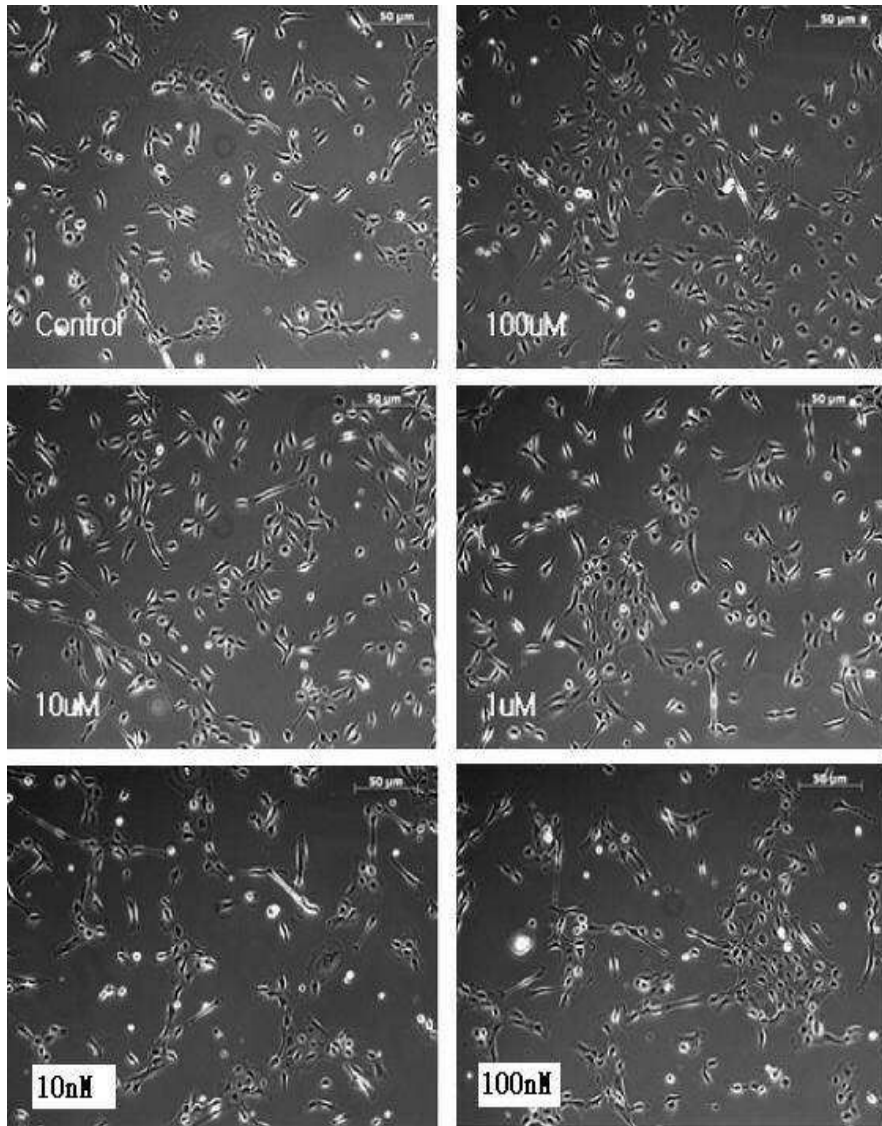


ROCK저해제 투여  
후 1일째

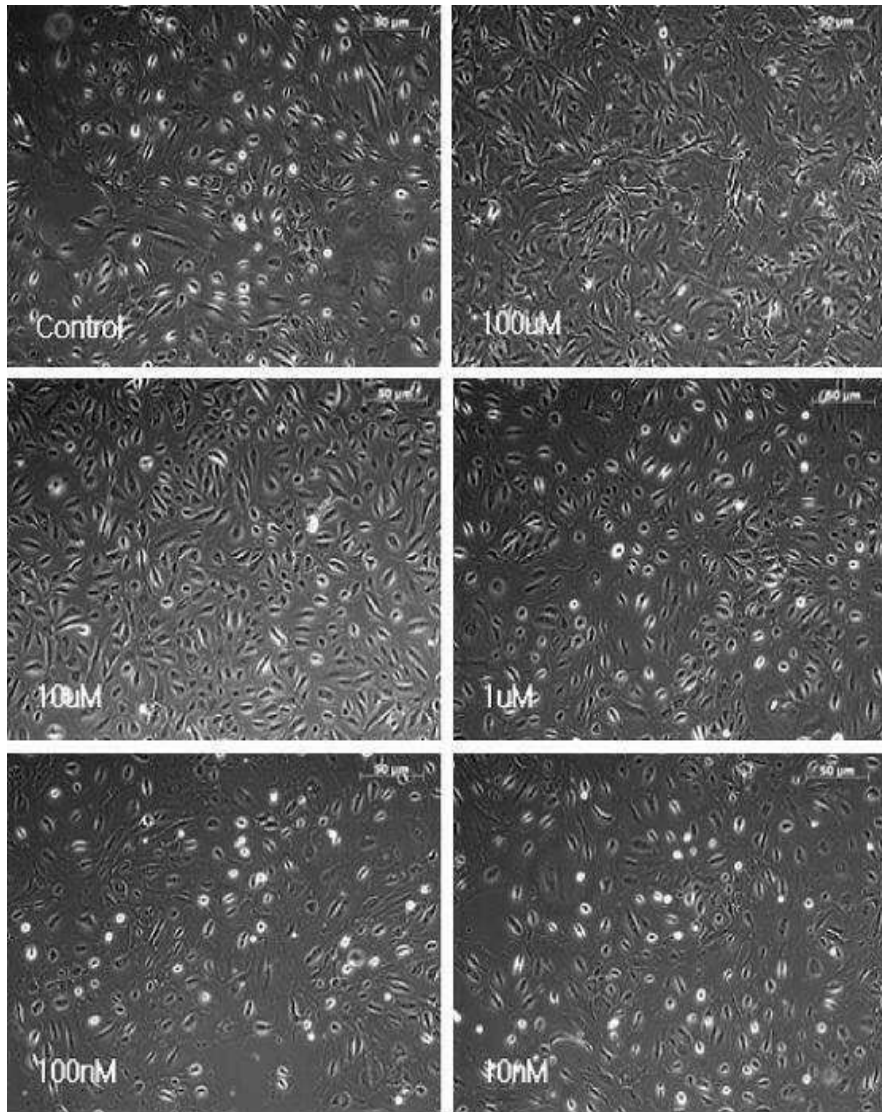


ROCK저해제 투  
여 후 3일째

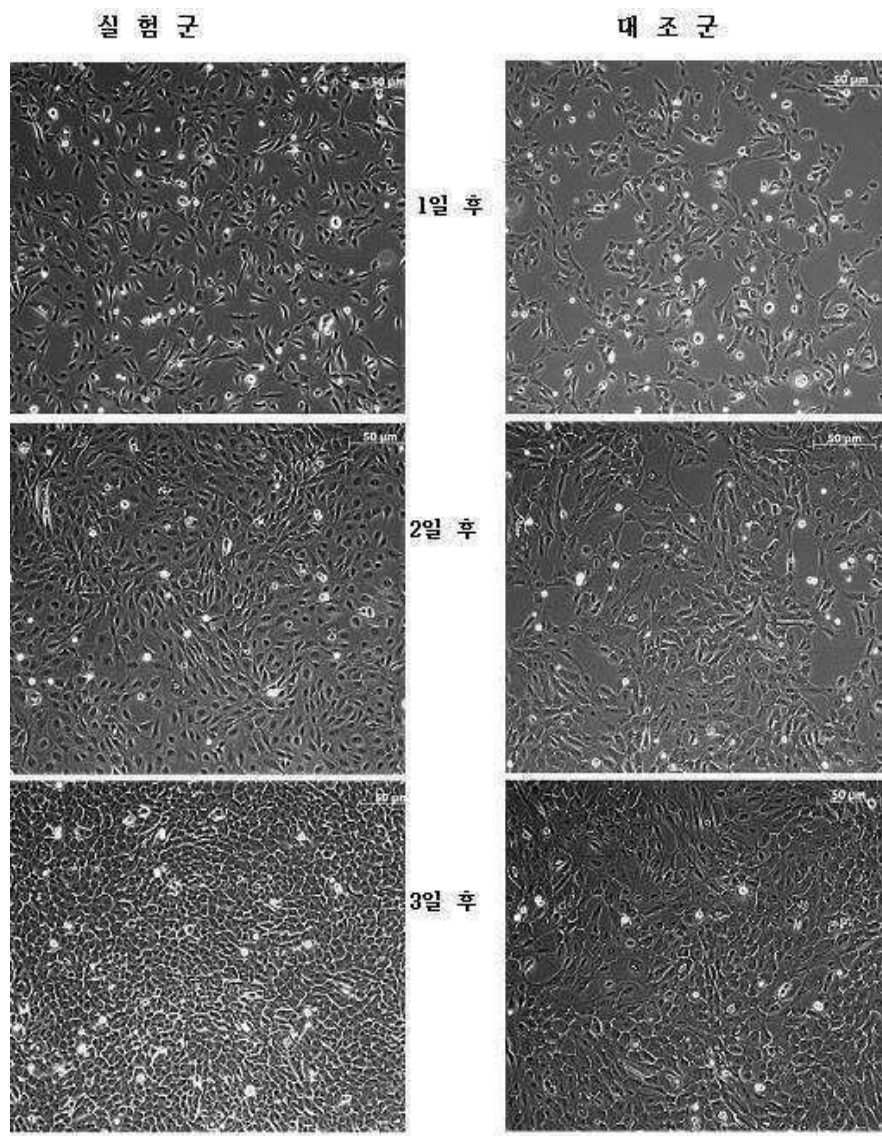
도면3a



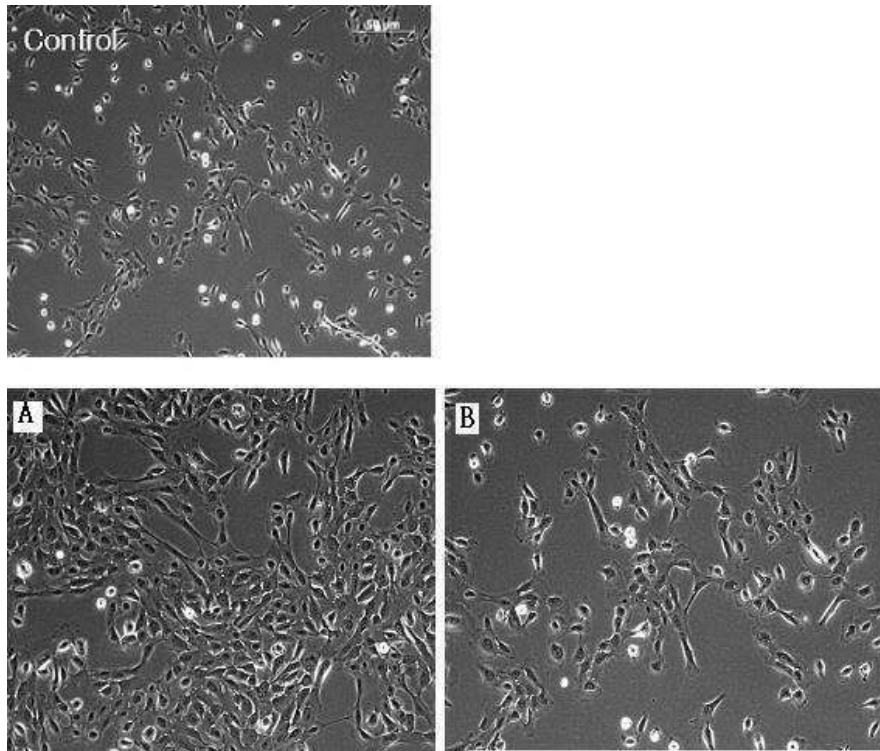
도면3b



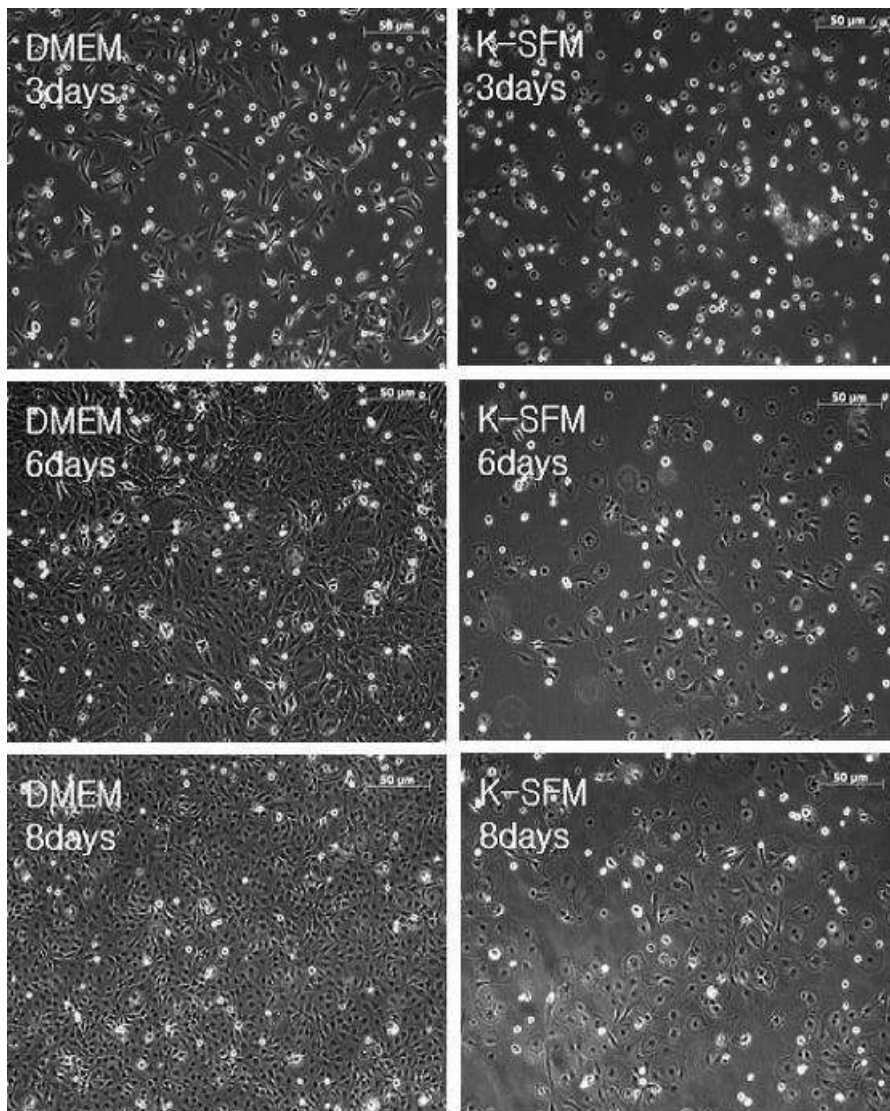
도면4



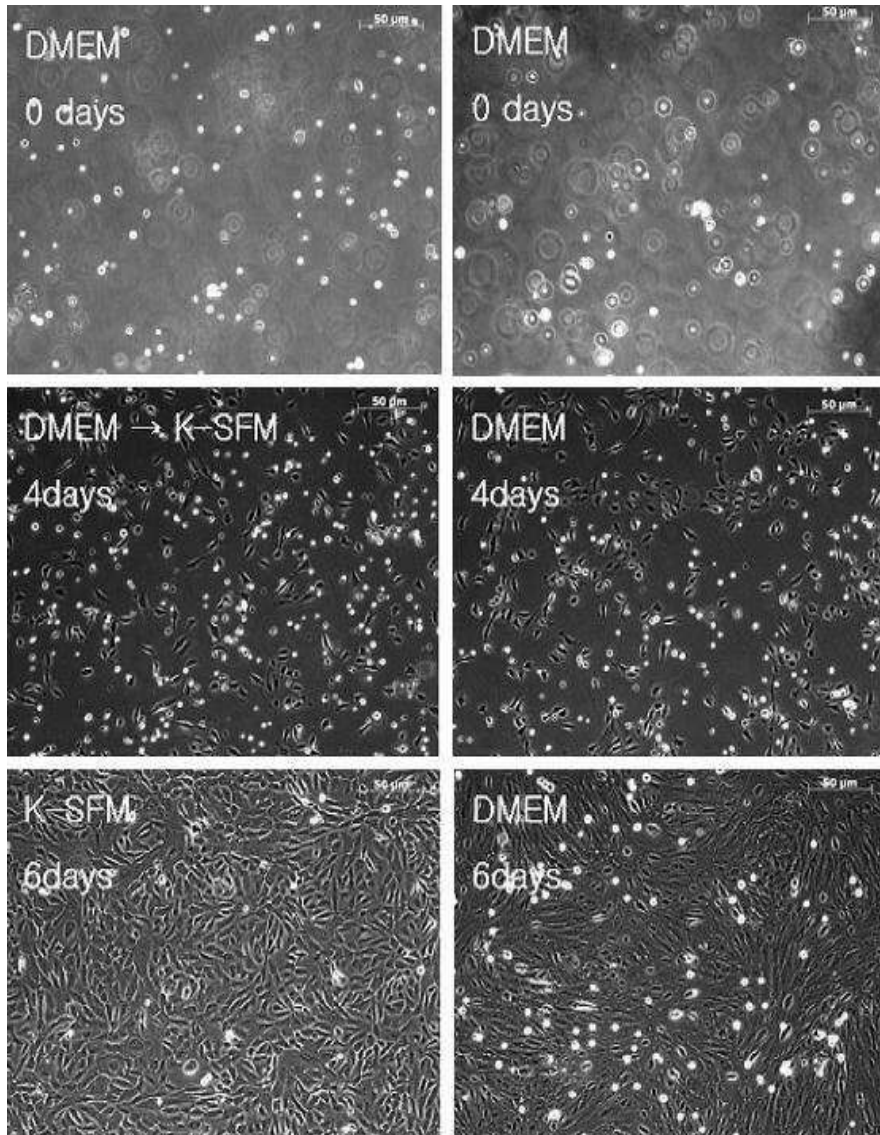
도면5



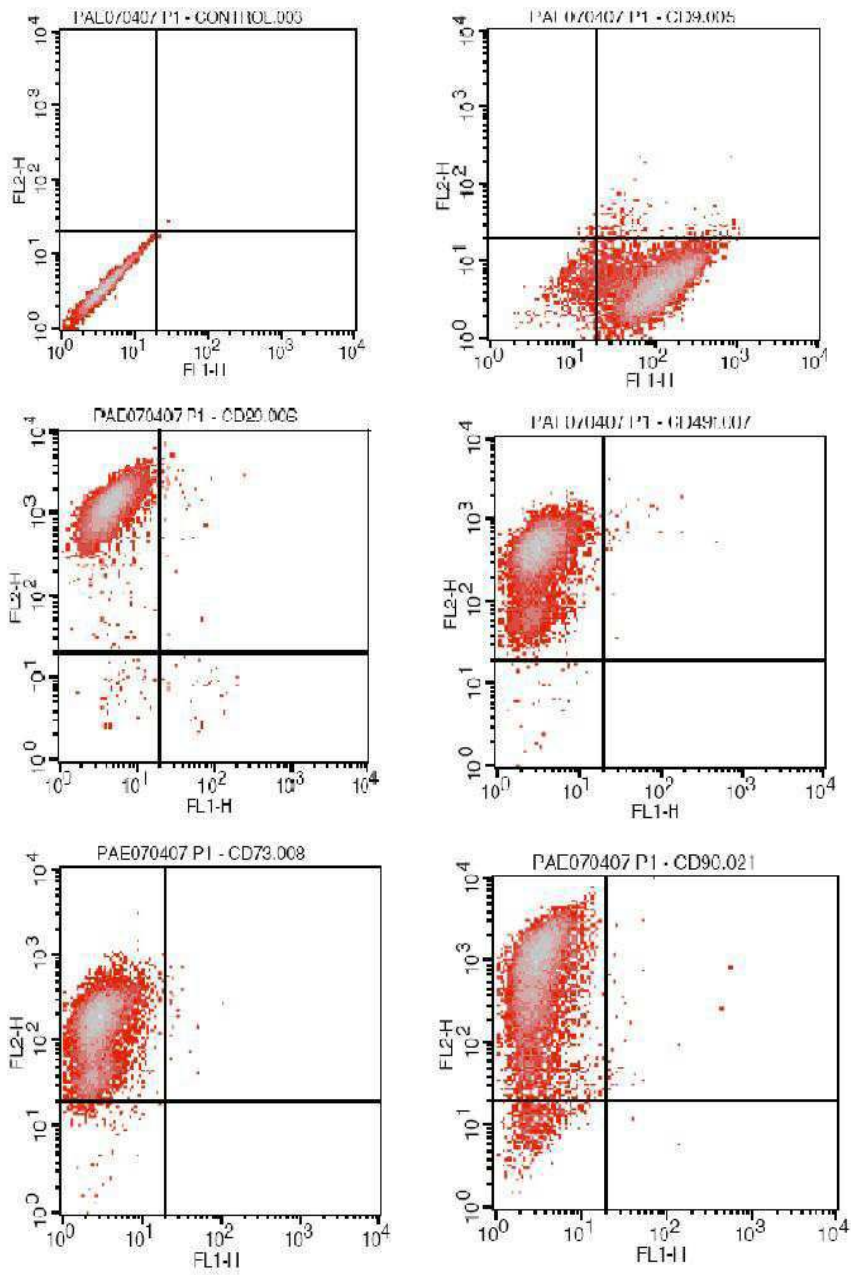
도면6



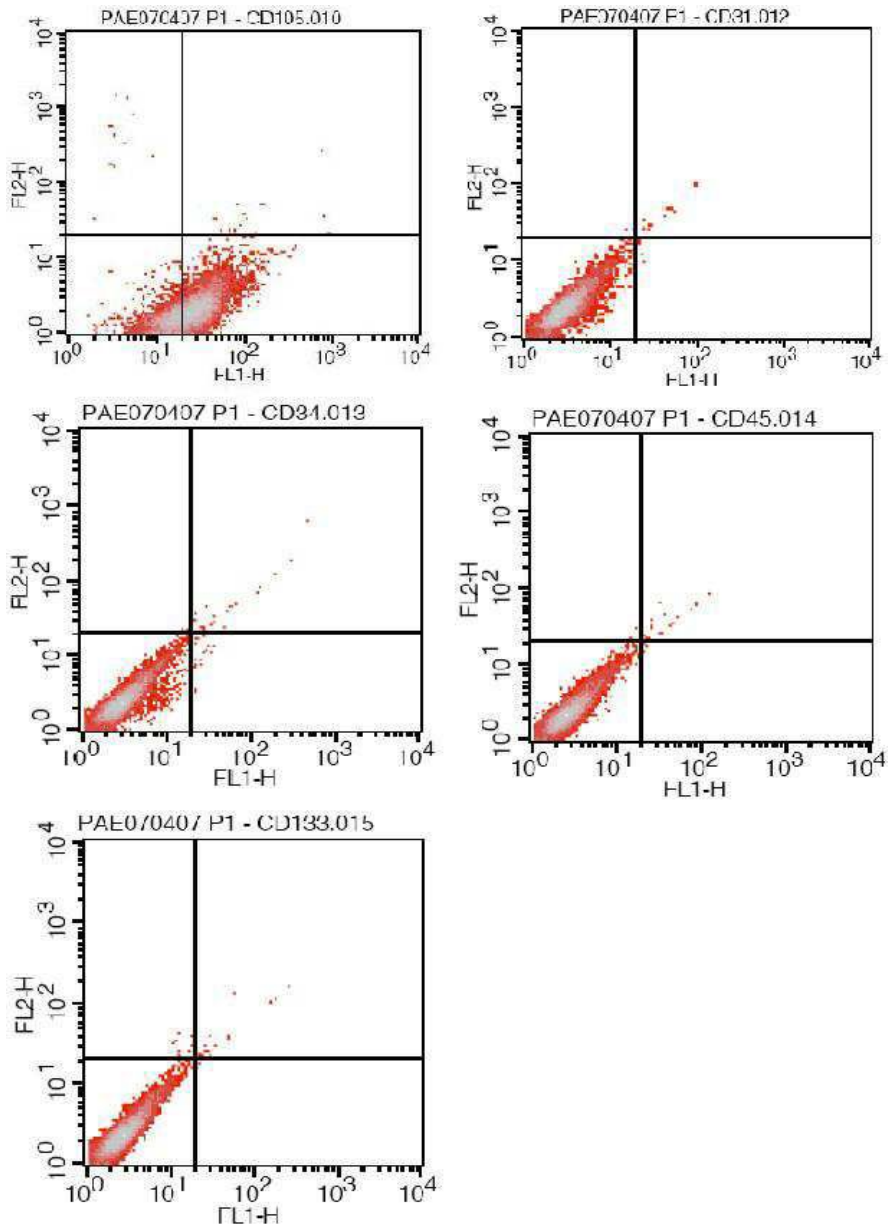
도면7



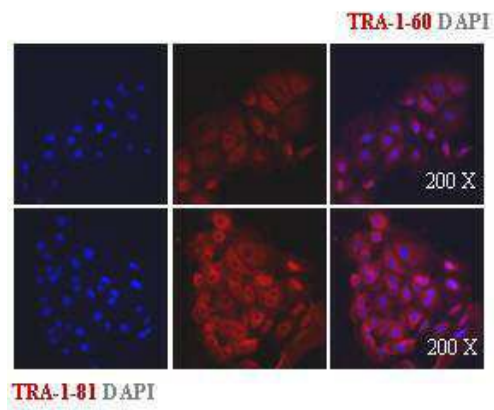
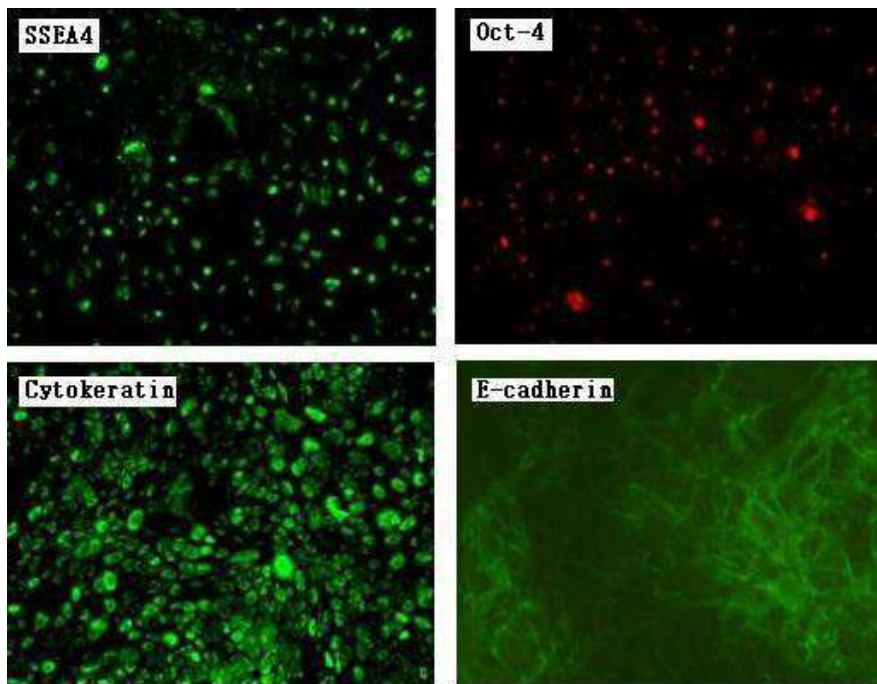
도면8a



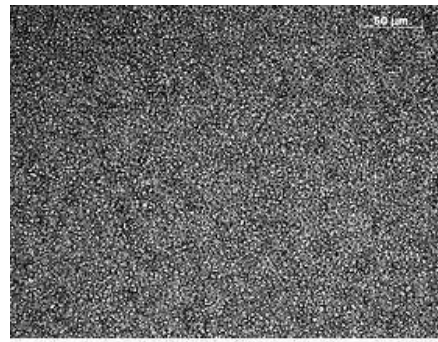
도면8b



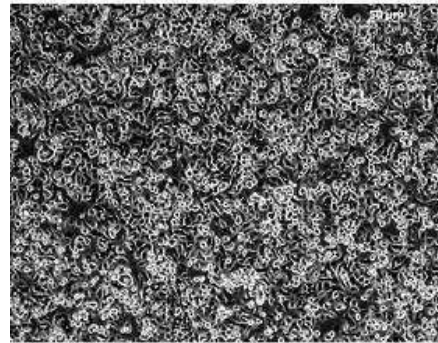
도면9



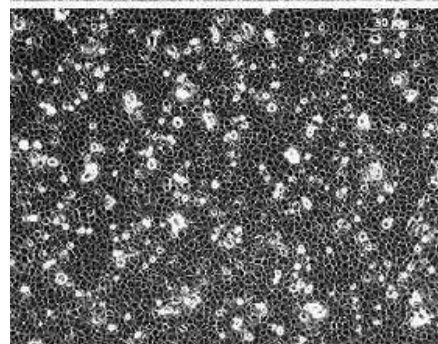
도면10



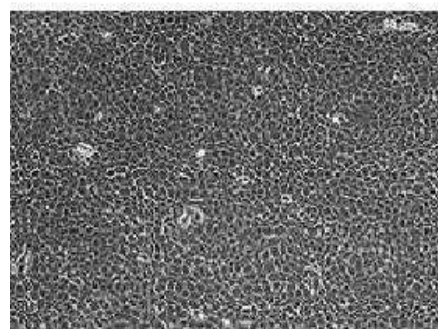
분리직후  
(0 day)



1-day

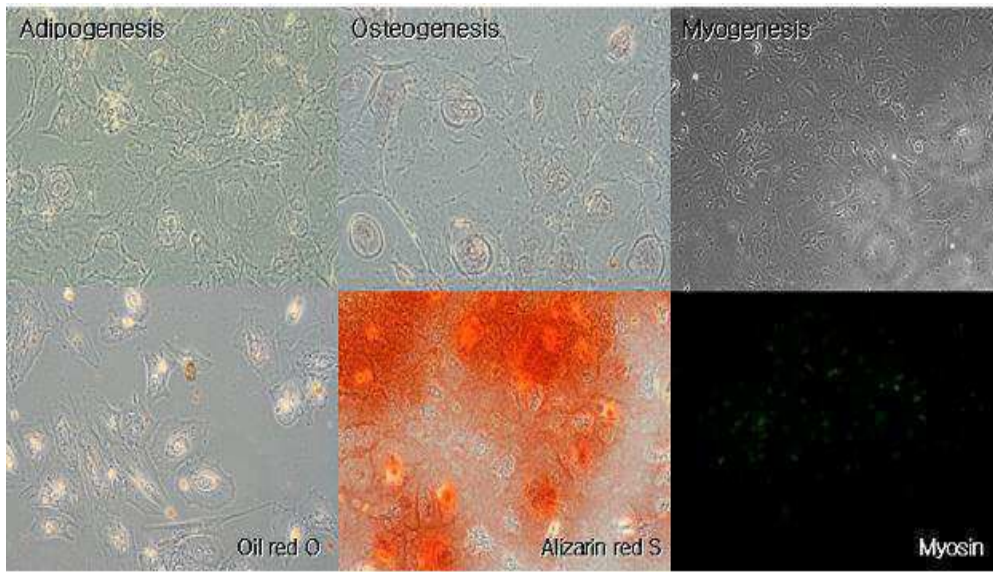


3-days

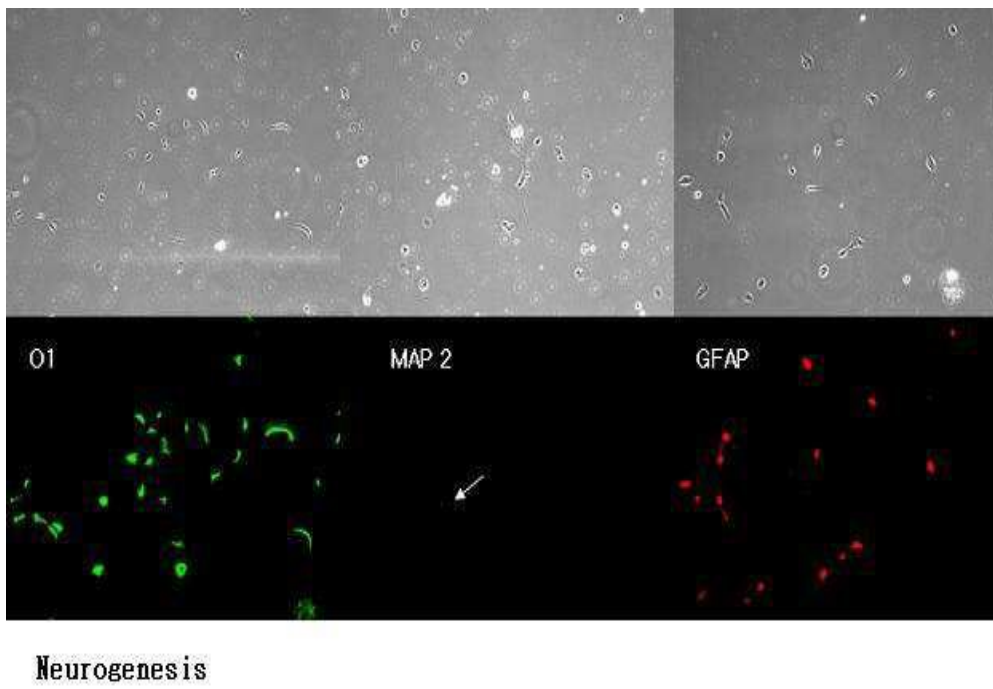


분리명 의 피관포  
양상용기세포

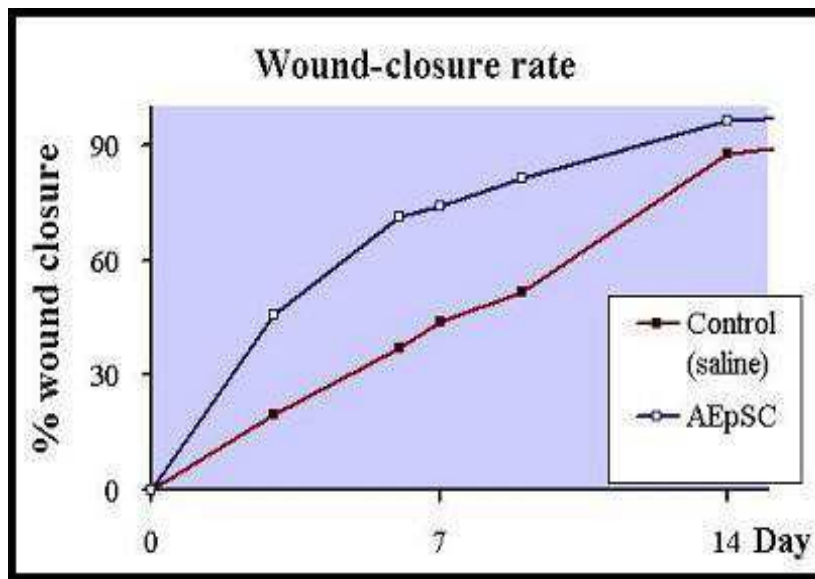
도면11



도면12



도면13



도면14

