

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/0775
Published Date	20070206
Registration No.	1006796420000
Registration Date	20070131
Application No.	1020050109502
Application Date	20051116
Requested Date of Examination	20051116
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	Kang, Kyung Sun Ra, Jeong Chan Park, Jung Ran
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

발명의 명칭

인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포 및 이를 함유하는 세포 치료제

Title of Invention

Human adipose tissue originated Multipotent stem cell and cell therapy product including the same.

요약

본 발명은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포인 다분화능 줄기 세포에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 스피어 형성을 통해 미분화 상태로 장기간 유지가 가능하고, 증식율이 우수한 인간 유방 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포 및 상기 성체 줄기 세포의 분리 및 유지 방법, 상기 다분화능 성체 줄기세포로부터 신경세포, 지방세포, 연골세포, 골형성세포 및 인슐린 분비 체장 베타 세포로의 분화방법 및 상기 분화된 세포 또는 상기 성체 줄기세포를 함유하는 골관절염, 골다공증 및 당뇨병 치료용 세포치료제와 유방 조직 형성용 세포 치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포는 성체 줄기세포임에도 불구하고, 골형성 세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 연골형성 세포, 골형성 세포, 또는 인슐린 분비 체장 베타세포로 분화하는 능력을 가지고 있어, 골다공증, 골관절염, 신경질환, 당뇨병 등의 치료에 효과적이고, 유방 조직 형성에 유용하다. 또한, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성함으로써 미분화 상태로 장기간 유지가 가능할 뿐만 아니라, 증식율이 매우 우수하여 세포 치료제로서 유용하다.

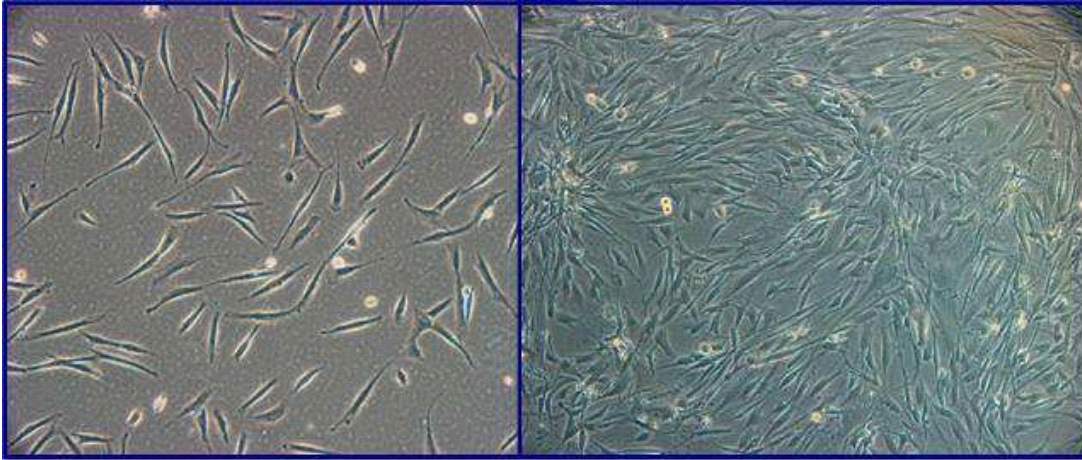
지방, 성체 줄기세포, 스피어, NAC, CORM-2

Abstract

The invention relates to the Multipotent stem cell called the human adipose tissue originated adult stem cell, and more specifically, to the osteoarthritis containing the differentiation method to the nerve cell, the fat cell, the cartilage cell, the bony osteogenesis cell and insulin secretion pancreatic beta cell and specialized cell as described above or the adult stem cell from the separation of the human breast adipose tissue originated multipotent adult stem cell with an excellent breeding ratio the long-term maintenance is possible through the undivided condition through the sphere formation and adult stem cell and keeping method, and the multipotent adult stem cell, and the cell therapy product for the osteoporosis and diabetes-curing cell therapy product and breast tissue formation.

The Multipotent stem cell according to the present invention is useful in the breast tissue formation it is effective for the treatment of the osteoporosis, the osteoarthritis, the neural disease, the diabetes etc it is the adult stem cell and in spite of that it has the capability specializing in the bony osteogenesis cell, the nerve cell, the astrocyte, the fat cell, the cartilage formatting cell, the bony osteogenesis cell or the insulin secretion pancreatic beta cell. Moreover, in the CORM-2 contained culture medium, the long-term maintenance is possible through the undivided condition by forming the sphere. In addition the breeding ratio is very excellent and it is useful as the cell therapy product.

대표도면 (Representative drawing)



Day 1

Day 4

청구의 범위

Scope of Claims

청구 1항:

Claim 1:

인간 지방조직 유래 펠릿을 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, 다음과 같은 특성을 나타내는 성체 줄기세포의 제조방법: (a) CD73, CD90, CD29, CD44 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (c) 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

The manufacturing method of the adult stem cell which it collects it cultivates the human adipose tissue originated pellet in the NAC (N-acetyl-L-cysteine) contained culture medium and which shows the property as follows: the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about (a) CD73, CD90, CD29, CD44 and CD105 ; the immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 and HLA-DR the immunological characteristic is adhered to : (b) plastic and the immunological characteristic grows ; the morphology of the line style (spindle-shape) is shown ; and the sphere is formed at the CORM-2 contained culture medium and the long-term maintenance is possible through the undivided condition CD105 have the capability specializing in : (c) and mesoderm cellular origin.

청구 2항:

Claim 2:

제1항에 있어서, 상기 NAC 함유 배지는 아스코르브산, 칼슘, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코르티손(hydrocortisone)을 추가로 함유하는 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

As for claim 1, method called the culture medium in which the NAC contained culture medium additionally contains the ascorbic acid, calcium, REGF, BPE, insulin and hydrocortisone.

청구 3항:

Claim 3:

제1항 또는 제2항의 방법에 의해 제조된 성체 줄기세포를 CORM-2 함유 배지에서 배양하여 스피어를 형성시키는 것을 특징으로 성체 줄기세포를 미분화상태로 유지하는 방법.

The method of maintaining with the undivided condition the characteristic the adult stem cell it forms of claim 1 or claim 2.

청구 4항:

Claim 4:

제3항에 있어서, 상기 CORM-2 함유 배지는 antibiotic antimycotic solution, 하이드로코르티손(Hydrocortisone),

As for claim 3, method called the invitrogen medium in which the CORM-2 contained culture medium additionall

인슐린, rEGF, FGF, B27 및 β -mercaptoethanol을 추가로 함유하는 무혈청 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구 5항:

제1항 또는 제2항의 방법에 의하여 제조되고, 다음과 같은 특성을 가지는 성체 줄기세포: (a) CD73, CD90, CD29, CD44 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (c) 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

청구 6항:

제5항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 미분화상태로 최소한 16계대이상 배양되는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포.

청구 7항:

제5항에 있어서, 중배엽 유래 세포는 연골세포, 골형성 세포, 신경 세포, 성상세포, 지방세포 및 인슐린 분비 체장 세포인 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포.

청구 8항:

다음의 단계를 포함하는 성체 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법: (a) 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 BME 및 FBS를 함유한 DMEM 배지에 전배양 하는 단계; 및 (b) 상기 전배양액을 DMSO 및 BHA로 처리하여 신경분화를 유도하는 단계.

청구 9항:

제8항의 방법에 의해 분화된 신경세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.

청구 10항:

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 TFG- β 1, L-ascorbate-2-phosphate 및 인슐린을 함유한 α -MEM 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법.

청구 11항:

제10항의 방법에 의해 분화된 연골세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.

청구 12항:

y contains the antibiotic antimycotic solution, hydrocortisone, insulin, REGF, FGF, B27 and β -mercaptoethanol.

Claim 5:

The adult stem cell which is manufactured by the method of claim 1 or claim 2 ; and has the property as follows: the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about (a) CD73, CD90, CD29, CD44 and CD105 ; the immunological characteristic of negativity is altogether shown about the CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 and HLA-DR it is adhered to : (b) plastic and it grows ; the morphology of the line style (spindle-shape) is shown ; and the sphere is formed at the CORM-2 contained culture medium and the long-term maintenance is possible through the undivided condition it has the capability specializing in : (c) and mesoderm cellular origin.

Claim 6:

As for claim 5, the adult stem cell in which the adult stem cell is cultivated to the undivided condition with at least 16 more than succeeding.

Claim 7:

As for claim 5, adult stem cell called the mesoderm cellular origin is the cartilage cell, bony osteogenesis cell, nerve cell, astrocyte, fat cell and insulin secretion pancreatic cell.

Claim 8:

The method of letting differentiate as the nerve cell the adult stem cell including the following step: the step of inducing the neuronal differentiation it processes a step of DMSO and BHA in the DMEM medium containing BME the adult stem cell of any one claim and FBS among (a) fifth claim to claim 7.

Claim 9:

The treatment of neurological disorder cell therapy product containing the nerve cell specialized with the method as an active ingredient of claim 8.

Claim 10:

The method of letting differentiate as the cartilage cell the adult stem cell cultivated in α -MEM culture medium containing the TFG- β 1 the adult stem cell of any one claim, and the L-ascorbate-2-phosphate and insulin among claim 5 to claim 7.

Claim 11:

The cell therapy product for the treatment of osteoarthritis containing the cartilage cell specialized with the method as an active ingredient of claim 10.

Claim 12:

<p>제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 TCP (Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 골형성 세포로 분화시키는 방법.</p>	<p>The method of differentiating the adult stem cell which is characterized to the bony osteogenesis cell the ectopic implantation is it mixes with the TCP (Tricalcium phosphate) among claim 5 to claim 7.</p>
<p>청구 13항:</p>	<p>Claim 13:</p>
<p>제12항의 방법에 의해 분화된 골형성세포를 유효성분으로 함유하는 골 결실 치료용 세포 치료제.</p>	<p>The cell therapy product for the valley deletion treatment containing the bony osteogenesis cell specialized with the method as an active ingredient of claim 12.</p>
<p>청구 14항:</p>	<p>Claim 14:</p>
<p>제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한 α-MEM배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 지방세포로 분화시키는 방법.</p>	<p>The method of letting differentiate as the fat cell the adult stem cell cultivated in α-MEM culture medium containing the dexamethasone the adult stem cell of any one claim, the indomethacin, and insulin and IBMX among claim 5 to claim 7.</p>
<p>청구 15항:</p>	<p>Claim 15:</p>
<p>제14항의 방법에 의해 분화된 지방세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.</p>	<p>The cell therapy product for the breast tissue formation containing the fat cell specialized with the method as an active ingredient of claim 14.</p>
<p>청구 16항:</p>	<p>Claim 16:</p>
<p>제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 니코틴 아마이드, β-머캅토에탄올, FBS 및 글루코오스 함유 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화시키는 방법.</p>	<p>Method of differentiating the adult stem cell which cultivates in nicotinamide, β-mercaptoethanol, and FBS and glucose compound DMEM medium to the insulin secretion pancreatic beta cell the adult stem cell of any one claim among claim 5 to claim 7.</p>
<p>청구 17항:</p>	<p>Claim 17:</p>
<p>제16항의 방법에 의해 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.</p>	<p>The diabetes-curing cell therapy product containing the insulin secretion pancreatic beta cell specialized with the method as an active ingredient of claim 16.</p>
<p>청구 18항:</p>	<p>Claim 18:</p>
<p>신경세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.</p>	<p>The treatment of neurological disorder cell therapy product containing the adult stem cell of any one claim as an active ingredient among claim 5 having the property of being specialized to the nerve cell to claim 7.</p>
<p>청구 19항:</p>	<p>Claim 19:</p>
<p>연골세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.</p>	<p>The cell therapy product for the treatment of osteoarthritis containing the adult stem cell of any one claim as an active ingredient among claim 5 having the property of being specialized to the cartilage cell to claim 7.</p>
<p>청구 20항:</p>	<p>Claim 20:</p>
<p>골형성 세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골 결실 치료용 세포 치료제.</p>	<p>The cell therapy product for the valley deletion treatment containing the adult stem cell of any one claim as an active ingredient among claim 5 having the property of being specialized to the bony osteogenesis cell to claim 7.</p>
<p>청구 21항:</p>	<p>Claim 21:</p>

지방세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.

청구 22항:

인슐린 분비 체장 베타세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.

배경기술

본 발명은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포인 다분화능 줄기세포에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 스피어 형성을 통해 미분화 상태로 장기간 유지가 가능하고, 증식율이 우수한 인간 유방 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포 및 상기 성체 줄기세포의 분리 및 유지 방법, 상기 다분화능 성체 줄기세포로부터 신경세포, 지방세포, 연골세포, 골형성세포 및 인슐린 분비 체장 베타 세포로의 분화방법 및 상기 분화된 세포 또는 상기 성체 줄기세포를 함유하는 골관절염, 골다공증, 당뇨병 치료용 세포치료제 및 유방 조직 형성용 세포 치료제에 관한 것이다.

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 과학자들이 인체의 거의 모든 장기 재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상등의 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 cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.

The cell therapy product for the breast tissue formation containing the adult stem cell of any one claim as an active ingredient among claim 5 having the property of being specialized to the fat cell to claim 7.

Claim 22:

The diabetes-curing cell therapy product containing the adult stem cell of any one claim as an active ingredient among claim 5 having the property of being specialized to the insulin secretion pancreatic beta cell to claim 7.

Background Art

The invention relates to the Multipotent stem cell called the human adipose tissue originated adult stem cell, and more specifically, to the osteoarthritis, containing the differentiation method to the nerve cell, the fat cell, the cartilage cell, the bony osteogenesis cell and insulin secretion pancreatic beta cell and specialized cell as described above or the adult stem cell from the separation of the human breast adipose tissue originated multipotent adult stem cell with an excellent breeding ratio the long-term maintenance is possible through the undivided condition through the sphere formation and a adult stem cell and keeping method, and the multipotent adult stem cell the osteoporosis, and the cell therapy product for the diabetes-curing cell therapy product and breast tissue formation.

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, the long-term damage 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 scientists 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 (pluripotent stem cells), and the Multipotent stem cell (multipotent stem cells).

만능 줄기세포(totipotent stem cells)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 cells)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 cells)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 성체줄기 세포를 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, *TrendsCellBiol.*, 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기세포의 소스이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma et al., *Nat. CellBiol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직내에 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들을 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

이에 대해, 최근, 지방 조직이 다분화능 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다(B.Cousin et al., *BBRC.*, 301:1016, 2003; A. Miranville et al., *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos et al., *J. CellPhysiol.*, 189:54, 2001; M.J.Seo et al., *BBRC.*, 328:258, 2005). 즉, 지방추출(liposuction)에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것은 in vitro상에서 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는 세포라는 사실이 보고되었다(P.A.Zuk et al., *TissueEng.*, 7:211, 2001; A.M Rodriguez et al., *B BRC.*, 315:255, 2004). 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할

The pluripotent stem cell (totipotent stem cells) has the property thereafter that the cell to 8 cell group is like that with the correction of one complete entity the cell 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 (pluripotent stem cells) is that the new life it is derived from the positioned 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 (multipotent stem cells) 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, *TrendsCellBiol.*, 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. CellBiol.*, 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 this 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 separate stem cells and preserve in vitro.

With respect to this, recently, the fact called the new source of the Multipotent stem cell cell having this is the fat cell on in vitro, the bony osteogenesis cell, and the blastogenesis to the sarcoblast and precartilage of the adipose tissue was reported (P.A.Zuk et al., *TissueEngineering.*, 7:211, 2001; A.M Rodriguez et al., *BBRC.*, 315:255, 2004). It has the advantage that this adipose tissue massively can extract. It paid attention to the source of the new stem cell complementing the existing disadvantage.

수 있다는 장점이 있어, 기존의 단점을 보완하는 새로운 줄기세포의 소스로 주목받고 있는 것이다.

또한, 최근 연구에서는 지방 조직 유래 세포가 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있음이 동물 모델 실험을 통하여 알려짐으로써, 줄기세포의 새로운 소스로서 두각을 나타내고 있다.

지금까지 알려진 지방 유래 줄기세포로는 상피세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기 세포(Martin Brzoska *et al.*, *BBRC*, 330:142, 2005), 골 형성 및 지방 세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포(Ying Cao *et al.*, *BBRC*, 332:370, 2005), 신경세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포(Kristine M. Safford *et al.*, *BBRC*, 294:371, 2005), 지방세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포(Rei Ogawa *et al.*, *BBRC*, 319:511, 2004), 골 형성 및 연골 형성세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포(Rei Ogawa *et al.*, *BBRC*, 313:871, 2004), 연골세포로 분화가능한 인간 지방 유래 줄기세포(Hani A. Awad *et al.*, *Biomaterials*, 25:3211, 2004), 신경 세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포(Juri Fujimura *et al.*, *BBRC*, 333:116, 2005) 및 골세포, 연골세포, 신경세포 또는 근육세포로 분화가능한 지방 유래 줄기세포(미국특허 공보 제6,777,231호) 등이 있다.

그러나, 현재까지 대부분의 지방 유래 줄기세포는 인간 이외의 동물 지방 조직 유래 줄기세포이거나, 인간 지방조직 유래 줄기세포라 하더라도, 복부 지방의 liposuction에 의해 얻어진 조직 유래로 한정되어 왔고, 줄기세포로부터 분화되는 세포의 종류도 제한적이었다. 특히 분리된 줄기세포의 증식율이 낮고, 미분화 상태로 장기간 유지하는 것이 곤란하여 그 응용에 제한이 되어왔다.

발명의 내용

발명의 효과

이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포는 성체 줄기세포임에도 불구하고, 기존의 지방 유래 성체 줄기세포에 비하여 보다 많은 세포로 분화가 가능하고, 특히 신경세포, 성상세포, 지방세포, 연골형성 세포, 골형성 세포, 또는 인슐린 분비 세포 베타세포로 분화하는 능력을 가지고 있으며, 골다공증, 골관절염, 신경질환, 당뇨병 등의 치료에 효과

Moreover, in the recent research, the adipose tissue cellular origin promotes the muscle play performance and vasa nervorum differentiation capability is known via the animal model experiment that it has the capability in which. In that way it distinguishes as the new source of the stem cell.

The so far known adipose derived stem cell may be the human fat originated adult stem cell (Martin Brzoska (I)et(/I)(I)(I)al(/I)., (I)BBRC(/I), 330:142, 2005), which is possible through the epithelial cell with differentiation on the human fat originated adult stem cell (Ying Cao (I)et(/I)(I)(I)al(/I)., (I)BBRC(/I), 332:370, 2005), which is possible through the osteogenesis and fat cell with differentiation the human fat originated adult stem cell (Kristine M. Safford (I)et(/I)(I)al(/I)(I)., (/I)(I)BBRC(/I), 294:371, 2005), which is possible through the nerve cell with differentiation the rat adipose derived stem cell (Rei Ogawa (I)et(/I)(I)al(/I)(I)., (/I)(I)BBRC(/I), 319:511, 2004), which is possible through the fat cell with differentiation the rat adipose derived stem cell (Rei Ogawa (I)et(/I)(I)(I)al(/I)(I)., (/I)(I)BBRC(/I), 313:871, 2004), which is possible through the osteogenesis and cartilage formatting cell with differentiation the human adipose derived stem cell (Hani A. Awad (I)et(/I)(I)(I)al(/I)., (I)Biomaterials(/I), 25:3211, 2004), which is possible through the cartilage cell with differentiation the rat adipose derived stem cell (Juri Fujimura (I)et(/I)(I)(I)al(/I)(I)., (/I)(I)BBRC(/I), 333:116, 2005) which is possible through the nerve cell with differentiation and adipose derived stem cell (US6,777,231 A) etc. is possible through the bone cell, the cartilage cell, and the nerve cell or the muscular cell with differentiation.

But most of adipose derived stem cells were the animal adipose tissue-originated stem cell except human or it till now said to be the human adipose tissue-originated stem cell. And yet it had been being restricted to the origin of organization obtained with the liposuction of the epididymal fat pad. The kind of the cell specialized from the stem cell was restrictive. Particularly, the breeding ratio of the separated stem cell was low. It was difficult to maintain the long term with the undivided condition and it had been being limited in the application.

Summary of Invention

Effects of the Invention

As described in detail in the above, the Multipotent stem cell according to the present invention has the capability is the adult stem cell and in spite of that in which the differentiation is possible through the cell which is more in comparison with the existing fat originated adult stem cell and specializing in especially,

적일 뿐만 아니라, 지방 조직 형성에도 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 성체 줄기세포는 스피어(sphere)를 형성함으로써 순수하게 지방유래 줄기세포를 분리하고, 미분화 상태로 장기간 유지하는 것이 가능하고, 증식율이 매우 우수하므로, 세포 치료제로서 유용하다.

기술적 과제

이에 본 발명자들은 증식율이 우수하고, 스피어를 형성하여 미분화상태로 장기간 유지되며, 보다 다양한 세포로 분화가 가능한 다분화능 성체 줄기세포를 개발하고자 예의 노력한 결과, 인간 지방조직으로부터 다분화능 줄기세포를 분리하고, 상기 분리된 성체 줄기세포가 골형성세포, 연골형성세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 인슐린 분비 췌장 베타세포 등 다양한 형태의 세포로 분화될 수 있을 뿐만 아니라, 매우 우수한 증식율을 가지고, 스피어 형성을 통해 미분화상태로 장기간 유지가 가능하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 목적은 증식율이 우수하고, 스피어를 형성하여 미분화상태로 장기간 유지가 가능한 인간 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 다분화능 줄기세포로부터 신경세포, 성상세포, 연골세포, 골형성세포, 지방세포 및 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화시키는 방법 및 상기 분화된 세포 또는 상기 성체 줄기세포들을 함유하는 세포 치료제를 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 인간 지방조직 유래 펠릿을 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, 다음과 같은 특성을 나타내는 성체 줄기세포의 제조방법을 제공한다:

(a) CD73, CD90, CD29, CD44 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄;

(b) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 선형대(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및

the nerve cell, the astrocyte, the fat cell, the cartilage formatting cell, the bony osteogenesis cell or the insulin secretion pancreatic beta cell. And effective for the treatment of the osteoporosis, the osteoarthritis, the neural disease, the diabetes etc. In addition it is useful in the breast tissue formation. Moreover, since the adult stem cell according to the present invention forms the sphere it is pure the adipose derived stem cell is separated. It is possible to maintain the long term with the undivided condition. The breeding ratio is very excellent. Therefore it is useful as the cell therapy product.

Technical Task

Thus, the inventors the breeding ratio was excellent. The sphere was formed and the long term was maintained by the undivided condition. And it made many efforts in order to develop the multipotent adult stem cell capable of differentiation as more various cell. Then the Multipotent stem cell was separated from the human adipose tissue. The separated adult stem cell as described above could be specialized to the cell of the bony osteogenesis cell, cartilage formatting cell, nerve cell, astrocyte, fat cell, the various types including the insulin secretion pancreatic beta cell etc. In addition it very had the excellent breeding ratio. It confirmed with the undivided condition through the sphere formation that the long-term maintenance was possible. The invention was completed.

The human adipose tissue originated multipotent adult stem cell capable of the undivided condition the long-term maintenance the sphere is formed this Purpose of the invention the breeding ratio is excellent and manufacturing method thereof are to be provided.

It is another object of the present invention to provide the cell therapy product containing the method for letting differentiate as the nerve cell, the astrocyte, the cartilage cell, the bony osteogenesis cell, the fat cell and insulin secretion pancreatic beta cell from the Multipotent stem cell and specialized cell as described above or adult stem cells.

Structure & Operation of the Invention

The manufacturing method of the adult stem cell which it collects after cultivating the human adipose tissue or ignited pellet in the NAC (N-acetyl-L-cysteine) contained culture medium and which shows the property as follows of the above is provided :

(a) The immunological characteristic of the positivity is altogether shown about the CD73, CD90, CD29, CD44 and CD105. The immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 and HLA-DR.

(b) It is adhered to plastic and it grows. And the morphology of the line style (spindle-shape) is shown. The sphere is formed at the CORM-2 contained culture medium and the long-term maintenance is possible through the undivided condition.

(c) 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

(c) It has the capability specializing in the mesoderm cellular origin.

본 발명에 있어서, 상기 NAC 함유 배지는 아스코르브산, 칼슘, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코르티손(hydrocortisone)을 추가로 함유하는 배지인 것을 특징으로 할 수 있다.

In the present invention, the NAC contained culture medium is the ascorbic acid, calcium, the rEGF, BPE, insulin and hydrocortisone may be referred to the culture medium which it additionally contains.

본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 성체 줄기세포를 CORM-2 함유 배지에서 배양하여 스피어를 형성시키는 것을 특징으로 성체 줄기세포를 미분화상태로 유지하는 방법을 제공한다.

The invention also provides the method of maintaining with the undivided condition the characteristic the adult stem cell it forms.

본 발명에 있어서, 상기 CORM-2 함유 배지는 antibiotic antimycotic solution, 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 인슐린, rEGF, FGF, B27 및 β -mercaptoethanol을 추가로 함유하는 무혈청 배지인 것을 특징으로 할 수 있다.

In the present invention, the CORM-2 contained culture medium is the antibiotic antimycotic solution, the hydrocortisone, insulin, the rEGF, FGF, the B27 and β -mercaptoethanol may be referred to the invitrogen medium which it additionally contains.

본 발명은 또한, 상기 방법에 의하여 제조되고, (a) CD73, CD90, CD29, CD44 및 CD105에 대하여 모두 양성 면역학적 특성을 나타내고, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성 면역학적 특성을 나타냄; (b) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 선형대(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (c) 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐을 특성으로 가지는 성체 줄기세포를 제공한다.

The invention provides (a) CD73 it is moreover manufactured by the method, the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about the CD90, the CD29, and the CD44 and CD105. The immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD33, the CD34, the CD45, the CD4, the CD31, the CD62p, the CD14 and HLA-DR it is adhered to (b) plastic and it grows. And the morphology of the line style (spindle-shape) is shown. The sphere is formed at the CORM-2 contained culture medium and the long-term maintenance is possible with the undivided condition, and the adult stem cell which has to property to have the capability specializing in (c) mesoderm cellular origin.

본 발명에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 미분화상태로 최소한 16세대 이상 배양되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 중배엽 유래 세포는 연골세포, 골형성 세포, 신경 세포, 성상세포, 지방세포 및 인슐린 분비 세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

In the present invention, the adult stem cell may be the mesoderm cellular origin is the cartilage cell, the bony osteogenesis cell, the nerve cell, the astrocyte, the fat cell and insulin secretion pancreatic cell it is cultivated to the undivided condition with at least 16 more than succeeding.

본 발명은 또한, (a) 상기 성체 줄기세포를 BME 및 FBS를 함유한 DMEM 배지에 전배양 하는 단계; 및 (b) 상기 전배양액을 DMSO 및 BHA로 처리하여 신경분화를 유도하는 단계를 포함하는, 성체 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법 및 상기 분화된 신경세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention provides method of letting differentiate as the nerve cell the adult stem cell and the above the treatment of neurological disorder cell therapy product containing the specialized nerve cell as an active ingredient including the step of inducing the neuronal differentiation it processes as DMSO and BHA in the DMEM medium containing moreover, BME (a) adult stem cell and FBS.

본 발명은 또한, 상기 성체 줄기세포를 TFG- β 1, L-ascorbate-2-phosphate 및 인슐린을 함유한 α -MEM 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는, 성체 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법 및 상기 분화된 연골세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention provides moreover, the TFG- β 1 the adult stem cell, the L-ascorbate-2-phosphate, and method of differentiating the adult stem cell which cultivates in α -MEM culture medium which contains to the cartilage cell insulin and the above the cell therapy product for the treatment of osteoarthritis containing the specialized cartilage cell as an active ingredient.

본 발명은 또한, 상기 성체 줄기세포와 TCP (Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 골형성 세포로 분화시키는 방법 및 상기 분화된 골형성세포를 유효성분으로 함유하는 골결실 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides method of differentiating the adult stem cell which is characterized to the bony osteogenesis cell the ectopic implantation is it mixes with the adult stem cell and TCP (Tricalcium phosphate) and the above the cell therapy product for the valley deletion treatment containing the specialized bony osteo

genesis cell as an active ingredient.

본 발명은 또한, 상기 성체 줄기세포를 덱사메타손 (dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한 α -MEM 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는, 상기 성체 줄기세포를 지방세포로 분화시키는 방법 및 상기 분화된 지방세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제를 제공한다.

The invention provides moreover, the dexamethasone the adult stem cell, the indomethacin, and insulin, and method of differentiating the adult stem cell which cultivates in α -MEM culture medium which contains to the fat cell IBMX and the above the cell therapy product for the breast tissue formation containing the specialized fat cell as an active ingredient.

본 발명은 또한, (a) 상기 성체 줄기세포를 니코틴아마이드, β -말캅토에탄올 및 FBS를 함유한 저농도의 글루코오스 함유 DMEM 배지에서 12~72시간동안 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포를 니코틴아마이드, β -말캅토에탄올 및 FBS를 함유한 고농도의 글루코오스 함유 DMEM 배지에서 약 4~7일동안 배양하는 단계를 포함하는 상기 성체 줄기세포를 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화시키는 방법 및 상기 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention provides method of letting differentiate as the insulin secretion pancreatic beta cell the adult stem cell and the above the diabetes-curing cell therapy product containing the specialized insulin secretion pancreatic beta cell as an active ingredient including the step of in the glucose compound DMEM medium of the high concentration containing nicotinamide, and β - mercaptoethanol and FBS, it cultivates for about 4~7 the step cultivated in the glucose compound DMEM medium for 12~72 hours and the cell cultivated with (b) the above of the low concentration containing moreover, nicotinamide (a) adult stem cell, and β - mercaptoethanol and FBS.

본 발명은 또한, 신경세포로 분화되는 특성을 가지는 상기 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides the treatment of neurological disorder cell therapy product which the adult stem cell having the property of being specialized to the nerve cell is to the active ingredient it does.

본 발명은 또한, 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화되는 특성을 가지는 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides the diabetes-curing cell therapy product which the adult stem cell having the property of being specialized to the insulin secretion pancreatic beta cell is to the active ingredient it does.

본 발명은 또한, 연골세포로 분화되는 특성을 가지는 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides the cell therapy product for the treatment of osteoarthritis which the adult stem cell having the property of being specialized to the cartilage cell is to the active ingredient it does.

본 발명은 또한, 골형성세포로 분화되는 특성을 가지는 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골결실 치료용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides the cell therapy product for the valley deletion treatment which the adult stem cell having the property of being specialized to the bony osteogenesis cell is to the active ingredient it does.

본 발명은 또한, 지방세포로 분화되는 특성을 가지는 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제를 제공한다.

The invention also provides the cell therapy product for the breast tissue formation which the adult stem cell having the property of being specialized to the fat cell is to the active ingredient it does.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

Hereinafter, the invention is particularly explained.

본 발명은 인간 유방의 지방 조직에서 분리된 다분화능 줄기세포에 관한 것이다.

The invention relates to the Multipotent stem cell separated from the adipose tissue of the human breast.

본 발명에서는 우선, 다음과 같은 방법을 통하여, 인간 유방의 지방조직으로부터 다분화능 줄기세포를 분리 및 정제하였다. 분리된 인간 지방조직을 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 collagenase type1 (1mq/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 이

In the present invention, firstly, the Multipotent stem cell was refined through the method as follows from the adipose tissue of the human breast with the separation. The separated human adipose tissue may be referred

용해 37℃에서 2시간동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μ m mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 인큐베이션하였다. 하룻밤 지난 후 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, K-NAC media(Keratinocyte-SFM media + 2mM NAC + 0.2mM ascorbic acid + 0.09mM calcium + 5ng/ml rEGF + 50 μ g/ml BPE + 5 μ g/ml insulin + 74ng/ml hydrocortisone)를 2일마다 교체하면서 배양하여 인간 유방의 지방조직 유래 다분화능 줄기세포액을 수득하였다.

상기 분리된 인간 유방의 지방조직 유래 다분화능 줄기세포의 증식율을 조사한 결과, 계대수(passage number)가 16에 이르기까지, CPDL이 점진적으로 증가하여 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있었다.

한편, 줄기세포의 sphere culture를 위하여, 분리된 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer) 10 μ M, B27, antibiotic antimycotic solution (100X) 5ml, hydrocortisone 1 μ g/ml, insulin 5 μ g/ml, EGF 20ng/ml, FGF 40ng/ml 및 β -mercaptoethanol을 함유한 MEMM 배지를 함유한 6well의 각 well에 5 \times 10⁴~1 \times 10⁵cells/ml의 세포를 seeding한 결과, 3일째부터 구(sphere)의 모양을 형성하기 시작하였다. 이로부터, 미분화 상태를 유지하며 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있었다.

상기에서 수득한 인간 지방조직 유래 줄기세포액으로부터 목적의 표면항원을 발현하고 있는 다분화능 줄기세포를 수득하는 방법으로서 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(Int. Immunol., 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 다분화능 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법(J. Immunol., 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 대량의 배양액 등으로부터 다분화능 줄기세포를 수득하는 방법으로서, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.

플로우 사이토미터 소팅 방식으로서, 수직하전 방식, 셀캡처 방식 등을 들 수 있다. 어떠한 방법도 세포의 표면항원을 특이적으로 인식하는 항체를 형광으로 표지하고, 표지된 항체와 항원의 결합체에 대한 형광을 측정하여 형광 강도를 전기 신호로 변환함으로써 세포의 항원 발현량을 정량할 수 있다. 또한, 사용하는 형광물질의 종류를 조합함으로써, 복수의 표면 항원을 발현하고 있는 세포를 분리하는 것도 가능하다. 여기에 사용가능한 형광물질로는, FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin), APC(allo-phycoerythrin), TR(TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.

ed to using the DMEM medium with the collagenase type 1 (1mg/ml) the organization is small pieces cut it washes to PBS, the digestion for 2 hours in 37 $^{\circ}$ C. In 1000rpm after PBS washing, it centrifuged at for 5 minutes. The pellet in which the supernatant remained in the suction and bottom surface centrifuged for 5 minutes at 1000rpm to PBS after doing washing. After filtering in 100 μ m mesh and removing the debris it washed to PBS. It incubated in the DMEM (10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) culture medium. Cells which did not stick after passing one night washed to PBS. While replacing the K-NAC media (Keratinocyte-SFM media + 2mM NAC + 0.2mM ascorbic acid + 0.09mM calcium + 5ng/ml rEGF + 50 μ g/ml BPE + 5 μ g/ml insulin + 74ng/ml hydrocortisone) at 2 it cultivated and the adipose tissue originated Multipotent stem cell liquid of the human breast was obtained.

The breeding ratio of the adipose tissue originated Multipotent stem cell of the separated human breast as described above was irradiated. Then until the passage number told to 16 it could know CPDL gradually increasing and having the excellent breeding ratio.

In the meantime, the cell of 5 \times 10⁴~1 \times 10⁵ cells/ml the shape of the globe (sphere) began to be formed on each well of 6well containing MEMM culture medium containing the CORM-2 (Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer) 10 μ M, B27, antibiotic antimycotic solution (100X) 5ml, hydrocortisone 1 μ g/ml, insulin 5 μ g/ml, EGF 20ng/ml, FGF 40ng/ml the adipose tissue originated Multipotent stem cell separated for the sphere culture of the stem cell and β -mercaptoethanol from the seeding one result, and 3rd day. From this, it could know while maintaining the undivided condition having the excellent breeding ratio.

In the above case, it has the flow cytometer having sorting function the method using the FACS method (Int. Immunol., 10(3):275, 1998), magnetism biz used, the panning (J. Immunol., 141(8):2797, 1998) etc. as the method of obtaining the Multipotent stem cell which is revealed the surface antigen of the purpose from the obtained human adipose tissue-originated stem cell liquid. Moreover, as the method of obtaining the Multipotent stem cell including the culture fluid of bulk etc, it has the method of using as the column the singleness or this the antibody which specifically recognizes clearly it assembles.

As the flow cytometer sorting mode, the number dropping front type, the cell capture mode etc. can be given. Any method notes antibody which specifically recognizes clearly the surface antigen of the cell by fluorescence. The fluorescence about the corporate body of the marked antibody and antigen are measured and the fluorescence intensity is converted into the electric signal antibody has the revelation of antigen amount of the cell. Moreover, the kind of the fluorescent material used is assembled the kind is possible to separate the cell expressing multiple surface antigens. Here, the usable fluorescent material may be the FITC, the PE (phycoerythrin), the APC (allo-phycoerythrin), the TR (TexasRed), the Cy3, the CyChrome, the Red613, the Red670,

the TRI-Color, the QuantumRed etc.

플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서는, 상기에서 수득한 줄기세포용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과 한번 적당한 배지 중에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다. 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 세포생물을 혼합하고, 얼음 위에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않는 경우에는 세정 후 일차 항체에 대해서 결합 활성을 갖는 형광 표지된 이차 항체와 일차 항체가 반응한 세포를 혼합하고, 다시 얼음물에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 세정 후, 일차 항체와 이차 항체에서 염색된 세포를 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다.

As the FACS method using flow cytometer, the method of dyeing the antibody it performs can be used. The primary antibody and the target cell sample in which firstly the dyeing of the cell recognizes clearly the surface antigen are mixed. It incubates in 30 minutes to 1 hour in ice. The separation is performed after washing to the flow cytometer in case the primary antibody is marked by fluorescence. The cell in which the second antibody labeled by fluorescence and the primary antibody having the bonding activity about the primary antibody after washing the primary antibody is not labeled by fluorescence react is mixed. It the again incubates in the iced water with 30 minutes to 1 hour. The cell dyed in the primary antibody and the second antibody the separation is performed after washing to the flow cytometer.

각종 표면 항원으로는 조혈관련항원, 중간엽계 세포의 표면 항원 또는 신경계 뉴런의 특이항원 등을 들 수 있다. 상기 조혈관련 항원으로는 CD34, CD45 등이 있고, 중간엽계 세포의 표면 항원으로는 SH-2, SH-3 등을 들 수 있으며, 신경계 뉴런의 특이항원으로는 NSE, GFAP 등을 들 수 있다. 전술한 각종 표면 항원을 인식하는 항체를 단독 혹은 조합하여 사용함으로써, 목적하는 세포를 취득할 수 있다.

The hematopoiesis related item circle, the special antigen of the surface antigen of the lobus medius cell or the nervous system neuron etc. can be given as all kinds of the surface antigens. It has the CD34, the CD45 etc. to the hematopoiesis related antigen. The SH-2, the SH-3 etc. can be given about the surface antigen of the lobus medius cell. And NSE, GFAP etc. can be given about the special antigen of the nervous system neuron. The antibody recognizing clearly all kinds of the surface antigens is assembled as the singleness and it uses the intended cell can be acquired.

상기 분리된 본 발명에 따른 다분화능 성체 줄기세포를 플로우 사이토미터를 이용하여 분석한 결과, CD73, CD90, CD29, CD44, CD105에 대해서는 양성반응을 보였다. 또한, 다른 항원에 대한 면역표현형을 확인한 결과, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내었다.

The multipotent adult stem cell according to the separated invention as described above was analyzed using the flow cytometer. Then the positive reaction was shown as shown on the CD73, CD90, CD29, CD44, CD105. Moreover, the immunophenotype about the other antigen was confirmed. Then the immunological characteristic of voice was shown about the CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 and HLA-DR.

또한, 상기 분리된 본 발명에 따른 다분화능 성체 줄기세포는 신경세포, 성상세포, 골형성세포, 연골세포, 지방세포 및 인슐린 분비 체장 베타세포로 분화가 가능한 다분화능 줄기세포라는 것을 확인할 수 있었다.

Moreover, called multipotent stem cell capable of the multipotent adult stem cell is the nerve cell, astrocyte, bony osteogenesis cell, cartilage cell, fat cell and insulin secretion pancreatic beta cell the differentiation according to the separated invention as described above could be confirmed.

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 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

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

실시예 1 : 지방조직에서 다분화능 줄기세포의 분리

embodiment 1: the separation of multipotent stem cell in the adipose tissue.

서울대학교 유방암센터에서 분양받은 여성의 유방조직에서 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 collagenase type1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37℃에서 2시간동안 digestion하였다. 다음으로, PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심 분리 하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은

The adipose tissue in the breast tissue of the female lotted out in the Seoul National University breast cancer center may be referred to using the DMEM media with the collagenase type1 (1mg/ml) the organization is small pieces cut it separates and it washes to PBS, the digestion for 2 hours in 3

PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μ m mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 인큐베이션하였다. 하룻밤 지난 후 볼지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng/ml rEGF, 50 μ g/ml BPE, 5 μ g/ml 인슐린 및 74ng/ml hydrocortisone를 함유한 Keratinocyte-SFM media을 2일마다 교체하면서 배양하여 다분화능 줄기세포를 분리하였다. 도 1은 상기 방법으로 분리된 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 100배 배율로 촬영한 사진이다.

실시에 2: 지방조직 유래 줄기세포의 증식을 조사

실시에 1과 같은 분리방법을 통해 각각 다른 인간 개체의 유방조직 샘플로부터 지방조직을 거쳐 얻은 후, 상기 분리된 인간 유방의 지방조직 유래 다분화능 줄기세포의 증식율을 조사하기 위하여, 75-flask에 2#215#105씩 seeding한 다음, 계대수에 따라 CPDL(cumulative population doubling level) 값을 조사하였다. CPDL은 세포의 증식율을 나타내는 지수로서, 다음과 같은 식으로 표현된다.

삭제

$$CPDL = \ln(Nf/Ni) / \ln 2$$

(Ni: 초기 seeding한 세포수; Nf: 최종 세포수)

그 결과, 도 2의 A-1 및 A-2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 성체 줄기세포(hMAD-MSC1 및 hMAD-MSC2)는 계대수(passage number)가 16일 경우, CPDL값이 거의 50을 나타냈다.

한편, 도 2의 B 및 C는 종래 인간 지방 조직 유래 줄기세포(Lin et al., Stem Cells and Development, 14:92, 2005; Zuk et al., Tissue Eng., 7:211, 2001)의 계대수에 따른 CPDL 값을 나타낸 것으로, CPDL 값이 각각 계대수 7 및 13에서 30~35 및 21을 나타냈다.

이 결과로부터 본 발명에 따른 성체 줄기세포의 증식율이 매우 우수하다는 것을 알 수 있었다.

삭제

실시에 3: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 면역학적 특성

7 $^{\circ}$ C. Next, in 1000rpm after PBS washing, it centrifuged at for 5 minutes. The pellet in which the supernatant remained in the suction and bottom surface centrifuged for 5 minutes at 1000rpm to PBS after doing washing. After filtering in 100 μ m mesh and removing the debris it washed to PBS. It incubated in the DMEM (10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) culture medium. While replacing the Keratinocyte-SFM media containing 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng / ml rEGF, 50 μ g / ml BPE, 5 μ g / ml insulin cells which pass one night wash to PBS and 74ng / ml hydrocortisone at 2 it cultivated and the Multipotent stem cell was separated. Figure 1 is a photograph taking a photograph the human adipose tissue originated Multipotent stem cell with the hundredfold magnification being separated into the method.

embodiment 2: breeding ratio investigation of the adipose tissue-originated stem cell.

After it obtained from the breast tissue sample of the respective other human individual through the separation method like the embodiment 1 after the adipose tissue in order that the breeding ratio of the adipose tissue originated Multipotent stem cell of the separated human breast as described above was irradiated the CPDL (cumulative population doubling level) value was irradiated in 75-flask according to 2 \times 10⁵ seeding one next, and the passage number. As the index in which CPDL shows the breeding ratio of the cell, it is expressed as the equation as follows.

Deletion .

$$CPDL = \ln(Nf/Ni) / \ln 2$$

(Ni: initial seeding one cell number Nf: final cell number)

consequently, as shown in the A-1 of fig. 2 and A-2, adult stem cell (the hMAD-MSC1 and hMAD-MSC2) according to the present invention exhibit 50 the passage number is 16.

In the meantime, B of fig. 2 and C show the CPDL value according to the passage number of conventional human adipose tissue-originated stem cell (Lin (I)et al., (I)Stem Cells and Development, (I) 14:92, 2005; Zuk (I)et al.(I), (I)Tissue Eng.(I), 7:211, 2001). And in the CPDL value is the respective passage number 7 and 13, 30~35 and 21 were shown.

It could know from this result that the breeding ratio of the adult stem cell according to the present invention was very excellent.

Deletion .

embodiment 3: the immunological characteristic of the fat originated multipotent stem cell.

실시에 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 2% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 sample수 만큼 1 #215#105 cells을 분주하였다. 각 well에 antibody(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 얼음에 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거 후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 1% paraformaldehyde를 넣어서 single화 하고, 플로우 사이토미터를 이용해 분석하였다.

The adipose tissue originated Multipotent stem cell obtained in the embodiment 1 was washed to PBS. After trypsinizing the cell was taken away and it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes. After throwing the supernatant away the mixed solution of PBS and 2% FBS was filled and it centrifuged at 1000rpm after doing washing for 5 minutes. After throwing the supernatant away the cell was floated in PBS and it was 1×10^5 cells busy as the sample number. The antibody (R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) was put into each well. It incubated in ice for 40 minutes. It centrifuged at 1000rpm after incubation for 5 minutes. After removing the supernatant it washed to PBS and it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes. Again, it washed to PBS and the process of centrifuging was repeated after the supernatant removal in 1000rpm for 5 minutes. Using single and flow cytometer 1% paraformaldehyde is put after removing the supernatant, it analyzed.

삭제

Deletion

지방유래 줄기세포의 표면항원분석(FACS analysis)

Antigen	AD-MSCs
CD73	±
CD90	±
CD29	±
CD44	±
CD105	±
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

The surface antigen analysis of the adipose derived stem cell(FACS analysis)

Antigen	AD-MSCs
CD73	±
CD90	±
CD29	±
CD44	±
CD105	±
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

그 결과, 표 1에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 지방조직 유래 성체 줄기세포는 CD73에 대해서는 91%, CD90에 대해서는 97%, CD29에 대해서는 96%, CD44에 대해서는 83%, CD105에 대해서는 80%의 양성반응을 보였다. 또한, 다른 항원에 대한 면역표현형을 확인한 결과, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내었다.

Consequently, it shows up in the table 1, The adipose tissue originated adult stem cell of the present invention is 91% about the CD73, 97% about the CD90, 96% about the CD29, 83% about the CD44, The positive reaction of 80% was shown on the CD105. Moreover, The immunophenotype about the other antigen is confirmed, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, The immunological characteristic of voice was altogether shown about the CD14 and HLA-DR

실시에 4: 지방조직 다분화능 줄기세포의 스피어 (sphere) 형성

embodiment 4: sphere formation of the adipose tissue multipotent stem cell.

실시에 1에서 수득된 인간 유방의 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 $10 \mu\text{M}$, antibiotic antimycotic solution (100X) 5ml, hydrocortisone $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, insulin $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, EGF 20ng/ml, FGF 40ng/ml, B27 및 β -mercaptoethanol을 함유한 MEMB 배지를 함유하는 6well의 각 well에 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/ml의 세포를 seeding한 결과, 3~7일째부터 스피어(sphere)의 모양을 형성하기 시작하였고, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 7~10일째에도 줄기세포가 증식해서 스피어(sphere)를 형성하였다.

The cell of $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells / ml the shape of the sphere began to be formed on each well of 6well containing MEMB culture medium containing the CORM-2 $10 \mu\text{M}$, antibiotic antimycotic solution (100X) 5ml, hydrocortisone $1 \mu\text{g} / \text{ml}$, insulin $5 \mu\text{g} / \text{ml}$, EGF 20ng / ml, FGF 40ng / ml, B27 the adipose tissue originated Multipotent stem cell of the human breast obtained in the embodiment 1 and β -mercaptoethanol from the seeding one result, and 3~7 day. As shown in figures 3 and 4, the stem cell increased in 7~10 day and the sphere was formed.

또한, 본 발명에 따른 줄기세포를 한천에서 배양한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 스피어를 형성하였다.

한편, 실시예 1에서 수득된 줄기세포

5#215#104cells/ml을 24 well의 각 well에 seeding한 다음, 계대 횟수에 따라 sphere 수를 조사하였다 (표 2). 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, sphere를 계대함으로써 장기간 증식 및 유지가 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, Oct4가 양성 발현하는 것으로 보아 미분화 상태를 유지하며 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있었다.

<u>계대수 (Passage number)</u>	<u>스피어 수</u>
1	270
2	260
3	271

실시예 5: 지방조직 유래 줄기세포의 면역염색분석

상기 실시예 4에서 수득된 지방조직 유래 줄기세포 스피어를 PBS로 세 번 세척하고, 4% paraformaldehyde을 함유한 PBS로 30분간 고정하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 0.1% Triton- X100을 함유한 PBS로 10분간 침투 (permeabilization)시킨다. PBS로 세 번 세척한 후, 10% NGS로 1시간동안 반응시키고, 1차항체를 함유한 PBS에 하룻밤동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 2차항체로 암실에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후, mounting하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 스피어는 신경 전구세포의 마커라고 할 수 있는 Nestin, 미분화상태의 세포 마커라고 할 수 있는 Oct4 및 중간엽 줄기세포의 마커인 SH2(CD105), SH3/4(CD73)에 대하여 양성반응을 나타내었다.

실시예 6: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 신경 및 성상세포로의 분화

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 1mM BME 및 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용해 24시간 전배양 (preincubation)하였다. 전배양 후 1% DMSO 및 100#956#M BHA (butylated hydrxylanisole)를 함유한 신경세포 분화 유도 배지에서 90분동안 배양하여 신경세포로의 분화를 유도한 다음, 면역염색을 실시하였다(도 6). 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포는 신경계 성상세포의 특이항원인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)와 신경세포 특이물질인 MAP2(microtubule-associated protein2)에 대하여 양성반응을 나타냈다.

Moreover, the stem cell according to the present invention was cultivated in agar. Then as shown in figure 4, the sphere was formed.

In the meantime, the obtained stem cell 5× 10⁴ cells / ml the sphere number was irradiated in the embodiment 1 in each well of 24 well according to the seeding one next, and the passage times (table 2). Consequently, as shown in the above table 2, the sphere could be confirmed as the passage box that the long term proliferation and maintenance were possible. Moreover, as shown in figure 5, it looked at that the Oct4 was revealed with positivity and it could know while maintaining the undivided condition having the excellent breeding ratio.

<u>Passage number(Passage number)</u>	<u>Sphere number</u>
1	270
2	260
3	271

embodiment 5: the immunostaining analysis of the adipose tissue-originated stem cell.

The obtained adipose tissue-originated stem cell sphere was washed in the embodiment 4 to PBS with the Severn. It fixed on 30 min. to PBS containing 4% paraformaldehyde. 0.1% Triton- X100 is forced in PBS after doing the Severn washing through PBS contained with for 10 minutes penetration (permeabilization). It reacts by 10% NGS to PBS after doing the Severn washing for 1 hour. It reacts in PBS containing the primary antibody for one night. It washed to PBS with 3 time. It reacted in the dark room by the secondary antibody for 1 hour. PBS should be the mounting after doing the Severn washing.

Consequently, as shown in figure 5, the Multipotent stem cell sphere according to the present invention exhibits the SH 2 (CD105) called the marker of the mesenchyme stem cell and the Oct4 which it can be called the Nestin which it can be called the marker of the neural progenitor cell, and the cell marker of the undivided condition, and the positive reaction about the SH 3/4 (CD73).

embodiment 6: the differentiation to the nerve of the fat originated multipotent stem cell and astrocyte.

Using DMEM medium with 1mM BME and 10% FBS the adipose tissue originated Multipotent stem cell obtained in the embodiment 1, it did with 24 hours pre-cultivation (preincubation). In the nerve cell differentiation medium containing 1% DMSO after the pre-cultivation and 100µM BHA (butylated hydrxylanisole), after it cultivated for 90 minutes and the differentiation to the nerve cell was induced the immunostaining was performed (fig. 6). Consequently, as shown in figure 6, the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention exhibits the positive reaction abo

도 6에서, 첫번째 줄의 사진은 분화된 세포 자체에서는 FITC, TRITC 형광을 나타내지 않는다는 것을 나타낸 음성대조군이다. 두번째 줄에서 왼쪽 MAP2 사진은 TRITC의 붉은 형광을 띠므로, MAP2가 발현되었다는 것을 나타내며, 오른쪽 phase contrast 사진과 Merge한 사진으로부터, 이 붉은 형광이 MAP2가 발현된 세포로부터 나오는 형광임을 확인할 수 있었다. 또한, 세번째 줄의 왼쪽 GFAP 사진은 FITC의 녹색형광을 띠고, 오른쪽 phase contrast 사진과 Merge한 사진으로부터, 이 녹색형광이 GFAP가 발현된 세포로부터 나오는 형광임을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 신경세포 및 성상세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

실시예 7: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 5% FBS, 1#956#M dexamethasone, 200#956#M indomethacin, 10 μ g/ml insulin, 0.5mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)을 함유한 α -MEM 배지에서 2주동안 배양하여 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

실시예 8: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 연골세포로의 분화

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 줄기세포 107 cells/ml을 24well plate의 중심에 10 μ 씩 분주한 다음, 5% FBS, TFG- β 1 10ng/ml, L-Ascorbate-2-phosphate 50#956#M 및 인슐린 6.25 μ g/ml을 함유한 α -MEM 배지에 2주동안 배양하여 다분화능 줄기세포의 연골세포로의 분화를 유도하고, 연골세포로의 분화여부를 Alcian blue 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 연골세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

실시예 9: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 골형성 세포로의 분화

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 성체 줄기세포 107

ut the MAP 2 (microtubule-associated protein2) which is the GFAP (glial fibrillary acidic protein) and the nerve cell specific material which are the special antigen of the nervous system astrocyte.

FITC in the cell itself in which the photograph of the first row is specialized in fig. 6, and the TRITC fluorescence may be referred to the negative control group which shows not showing. The thing the left MAP2 photograph had the red fluorescence of TRITC in the second line and therefore that the MAP2 was as revealed are shown. And it could confirm from the right phase contrast photograph and Merge one photograph to be the fluorescence in which the red fluorescence came from the cell in which the MAP2 was revealed. Moreover, the left GFAP photograph of the third line had the green fluorescence of FITC. It could confirm from the right phase contrast photograph and Merge one photograph to be the fluorescence in which this green fluorescence came from the cell in which GFAP was revealed. It could confirm from the result that the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention was specialized to the nerve cell and astrocyte.

embodiment 7: the differentiation to the fat cell of the fat originated multipotent stem cell.

The adipose tissue originated Multipotent stem cell obtained in the embodiment 1 was cultivated in α -MEM culture medium containing 5% FBS, 1 μ M dexamethasone, 200 μ M indomethacin, 10 μ g / ml insulin, 0.5mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) for 2 weeks and the differentiation to the fat cell of the Multipotent stem cell was induced. It analyzed using the Oil red O dyeing method. Consequently, as shown in figure 7, it could confirm that the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention was specialized to the fat cell.

embodiment 8: the differentiation to the cartilage cell of the fat originated multipotent stem cell.

It cultivated in α -MEM culture medium containing 5% FBS, the TFG- β 1 10ng / ml, and the L-Ascorbate-2-phosphate 50 μ M at the center of 24well plate the adipose tissue originated Multipotent stem cell 107 cells / ml obtained in the embodiment 1, it is busy with 10 μ and insulin 6.25 μ g / ml for 2 weeks and the differentiation to the cartilage cell of the Multipotent stem cell was induced. The differentiation whether or not to the cartilage cell was analyzed using the Alcian blue dyeing method. Consequently, as shown in it showed up in fig. 8 it could confirm that the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention was specialized to the cartilage cell.

embodiment 9: the differentiation to osteogenesis cell of the fat originated multipotent stem cell.

After the obtained adipose tissue originated adult

cells/ml을 TCP(tricalcium phosphate)와 혼합하여 개의 피하에 이소이식한 다음, 14일후에 상기 조직을 처리하여 H&E stain법으로 분석하였다. 그 결과, 도 9에서 나타난 바와 같이, TCP 단독 처치군(A)에서는 TCP 주위로 염증세포의 침윤이 확인되었고, TCP와 골수 줄기세포 혼합군(B)에서는 TCP 주위로 염증 반응이 그래도 남아있었으나, TCP와 지방유래 줄기세포 혼합군(C)에서는 TCP가 대부분 흡수되고, 전형적인 초기 골형성이 관찰되었고, 골아세포양 세포와 다핵을 가진 파골세포양세포 및 골기질도 관찰되었다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 골형성 세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

실시에 10: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 인슐린 분비
체장 베타세포로의 분화

실시에 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 10mmol/L nicotinamide, 1mmol/L β -mercaptoethanol을 함유하고, 10% FBS를 첨가한 low glucose DMEM 배지에서 24시간동안 배양한 후, 10mmol/L nicotinamide, 1mmol/L β -mercaptoethanol 및 5% FBS를 첨가한 high glucose DMEM에 5일동안 배양하여 인슐린 분비 체장 베타세포로의 분화를 유도하였다. 분화유도 후 면역염색을 통해 확인한 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이, 세포 내에 C-peptide 및 insulin이 존재하였다. 인슐린 분비 체장 베타세포에서 인슐린의 원형인 proinsulin이 생성되고, 이것은 인슐린과 C-peptide로 나누어지는 바, 상기 결과로부터 본 발명에 따른 지방 조직 유래 다분화능 줄기세포가 인슐린 분비 체장 베타세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면에 대한 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 100배 배율로 촬영한 사진이다.

도 2는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포의 CPDL(cumulative population doubling level)을 나타낸 것이다 (A-1 및 A-2: 본 발명에 따른 지방조직 유래 성체 줄기세포; B 및 C: 종래 지방 유래 줄기세포)

stem cell 10 7 cells / ml was mixed in the embodiment 1 with the TCP (tricalcium phosphate) and it was the ectopic implantation at the subcutaneousness of dog the organization was processed after 14 and it analyzed to the H&E stain method. Consequently, as shown in it showed up in fig. 9 the infiltration of the inflammation cell was confirmed as the TCP surrounding in the TCP random group (A). The inflammation nevertheless remained as the TCP surrounding in TCP and bone marrow stem cell mixed group (B). But TCP was mostly absorbed in TCP and adipose derived stem cell mixed group (C). The typical initial osteogenesis osteoclast pilocytic and bone matrix having the osteoblastoid cell and multicore it was observed were observed. It could confirm from this result that the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention was specialized to the bony osteogenesis cell.

embodiment 10: the differentiation to the insulin secretion pancreatic beta cell of the fat originated multipotent stem cell.

In the low glucose DMEM medium with 10% FBS the obtained adipose tissue originated Multipotent stem cell 10mmol / L nicotinamide, 1mmol / L β -mercaptoethanol is contained in the embodiment 1, it cultivated in high glucose DMEM with 10mmol / L nicotinamide after doing the cultivation, 1mmol / L β -mercaptoethanol and 5% FBS for 5 and the differentiation to the insulin secretion pancreatic beta cell was induced for 24 hours. It confirmed after the differentiation induction through the immunostaining. Then as shown in it showed up in fig. 10 the C-peptide and insulin existed within the cell. The proinsulin called the circular form of the insulin in the insulin secretion pancreatic beta cell was generated. This could confirm from the divided into insulin and C-peptide, and the result that the fat origin of organization Multipotent stem cell according to the present invention was specialized to the insulin secretion pancreatic beta cell.

The specific part of the invention content 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 the scope of the present invention is not limited by this. It is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph taking a photograph the human adipose tissue originated Multipotent stem cell with the hundredfold magnification according to the invention.

Figure 2 shows the CPDL (cumulative population doubling level) of the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention (the A-1 and A- 2: with the adipose tissue)

포).

도 3은 본 발명에 따른 인간 지방의 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 sphere 배양한 다음, 7일 후에 형성된 sphere를 200배 배율로 나타낸 것이다.

도 4는 한천에서 하나의 줄기세포가 증식해서 스피어를 형성한 모습을 200배 배율로 나타낸 사진이다.

도 5는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 함유 MEBM 배지에서 sphere culture 한 후 면역염색을 이용하여 Nestin, Oct4, SH2, SH3/4가 발현한 결과를 100배 배율로 나타낸 사진이다.

도 6은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 신경세포와 성상세포로 분화된 것을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 지방세포를 200배 배율로 나타낸 것이다 (A: 분화된 상태의 phase contrast, B: Oil Red O 염색법으로 염색한 것).

도 8은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 연골세포를 100배 배율로 나타낸 것이다 (A: 분화된 상태의 phase contrast, B: 연골세포로 분화된 상태를 Alcian blue 염색법으로 확인한 것).

도 9는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 골형성세포를 나타낸 것이다 (A: TCP 단독 처치군; B: TCP와 골수 줄기세포 혼합군; 및 C: TCP와 지방유래 줄기세포 혼합군).

도 10은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 면역염색을 통해 확인한 것이다.

ue originated adult stem cell according to the present invention: B C: conventional adipose derived stem cell).

After fig. 3 cultivates the adipose tissue originated Multipotent stem cell of the human breast according to the present invention with sphere the sphere formed after 7 is shown in terms of 200 ship magnification.

Figure 4 is a photograph showing the display forming the sphere the stem cell increases in terms of 200 ship magnification of one in agar.

Figure 5 is a photograph showing the result that the Nestin, the Oct4, the SH2, the SH3/4 reveals the human adipose tissue originated Multipotent stem cell in the CORM-2 containing MEBM culture medium after doing the sphere culture using the immunostaining in terms of the hundredfold magnification according to the invention.

Figure 6 shows the thing in which the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention is specialized to the nerve cell and astrocyte.

The fat cell specialized from the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention is shown fig. 7 in 200 ship magnification (a: it dyes to the phase contrast of the specialized state, and the B: Oil Red O dyeing method).

The cartilage cell specialized from the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention is shown fig. 8 in the hundredfold magnification (a: of the specialized state phase contrast, B: confirms the state specialized to the cartilage cell as the Alcian blue dyeing method).

Figure 9 shows the bony osteogenesis cell specialized from the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention (the A: TCP random group; B: TCP, the bone marrow stem cell mixed group.; the C: TCP and adipose derived stem cell mixed group).

The insulin secretion pancreatic beta cell specialized from the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention is confirmed fig. 10 through the immunostaining.

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 법적인 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.)

