(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12N 5/08 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년02월06일
(11) 등록번호 10-0679642
(24) 등록일자 2007년01월31일

(21) 출원번호 10-2005-0109502
(22) 출원일자 2005년11월16일
심사청구일자 2005년11월16일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 주식회사 알앤엘바이오
서울시 서초구 양재동 1-26 성문빌딩

(72) 발명자 강경선
서울시 관악구 신림11동 신림 푸르지오 113동 703호

라정찬
경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을 SK 한화 아파트 626동701호

박정란
서울시 관악구 봉천1동 리더스오피스텔 711호

(74) 대리인 이처영

(56) 선행기술조사문헌
US20010033834 A1
US6777231 B1
WO02029011 A2
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 안규정

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포 및 이를 함유하는세포치료제

(57) 요약

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 췌장 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 췌장 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.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

인간 지방조직 유래 펠렛을 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.

청구항 2.

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

청구항 3.

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

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 CORM-2 함유 배지는 antibiotic antimycotic solution, 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 인슐린, rEGF, FGF, B27 및 β-mercaptoethanol을 추가로 함유하는 무혈청 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

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.

청구항 6.

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

청구항 7.

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

청구항 8.

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.

청구항 9.

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

청구항 10.

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 TFG-β1, L-ascorbate-2-phosphate 및 인슐린을 함유한 α-MEM 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법.

청구항 11.

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

청구항 12.

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 TCP(Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하는 것을 특징으로 하는 성체 줄기세포를 골형성 세포로 분화시키는 방법.

청구항 13.

제12항의 방법에 의해 분화된 골형성세포를 유효성분으로 함유하는 골 결실 치료용 세포 치료제.

청구항 14.

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.

청구항 15.

제14항의 방법에 의해 분화된 지방세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.

청구항 16.

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.

청구항 17.

제16항의 방법에 의해 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.

청구항 18.

신경세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.

청구항 19.

연골세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.

청구항 20.

골형성 세포로 분화되는 특성을 가지는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 성체 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골 결실 치료용 세포 치료제.

청구항 21.

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

청구항 22.

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

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

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 췌장 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, 벡터개발이나 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.

만능 줄기세포(totipotent stem cells)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기 까지의 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, *Trends Cell Biol.*, 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. 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 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. Cell Physiol.*, 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., Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M Rodriguez *et al., BBRC.*, 315:255, 2004). 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 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 형성 세포로 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(미국특허공보 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.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명자들은 증식율이 우수하고, 스피어를 형성하여 미분화상태로 장기간 유지되며, 보다 다양한 세포로 분화가 가능한 다분화능 성체 줄기세포를 개발하고자 예의 노력한 결과, 인간지방조직으로부터 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

상기의 목적을 달성하기 위하여, 인간 지방조직 유래 펠렛을 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, 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.

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

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

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.

본 발명은 또한, 상기 방법에 의하여 제조되고, (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 가짐을 특성으로 가지는 성체 줄기세포를 제공한다.

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

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.

본 발명은 또한, 상기 성체 줄기세포를 TFG-β1, 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.

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

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.

본 발명은 또한, (a) 상기 성체 줄기세포를 니코틴아마이드, β-멀캅토에탄올 및 FBS를 함유한 저농도의 글루코오스 함유 DMEM 배지에서 12~72시간동안 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포를 니코틴아마이드, β-멀캅토에탄올 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.

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

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

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

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

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

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

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

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 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 이용해 37℃에서 2시간동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100㎛ mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 인큐베이션하였다. 하룻밤 지난 후 붙지않은 세포들은 PBS로 세척하고, K-NAC media(Keratinocyte-SFM media + 2mM NAC + 0.2mM ascorbic acid + 0.09mM calcium + 5ng/ml rEGF + 50㎍/ml BPE + 5㎍/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) 10μM, B27, antibiotic antimycotic solution (100X) 5ml, hydrocortisone 1㎍/ml, insulin 5㎍/ml, EGF 20ng/ml, FGF 40ng/ml 및 β-mercaptoethanol을 함유한 MEBM 배지를 함유한 6well의 각 well에 5×10^4~1×10^5cells/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 방법으로서는 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 방법으로서는, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.

플로우 사이토미터 소팅 방식으로서는, 수적하전 방식, 셀캡쳐 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 변환함으로서 세포의 항원 발현량을 정량할 수 있다. 또한, 사용하는 형광물질의 종류를 조합함으로서, 복수의 표면 항원을 발현하고 있는 세포를 분리하는 것도 가능하다. 여기에 사용가능한 형광물질로는, FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin), APC(allo-phycocyanin), TR(TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.

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 세포샘플을 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.

각종 표면 항원으로서는 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 사용함으로서, 목적하는 세포를 취득할 수 있다.

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.

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

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1 : 지방조직에서 다분화능 줄기세포의 분리

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 원심분리 하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100㎛ mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 인큐베이션하였다. 하룻밤 지난 후 붙지않은 세포들은 PBS로 세척하고, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng/ml rEGF, 50㎍/ml BPE, 5㎍/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.

실시예 2: 지방조직 유래 줄기세포의 증식율 조사

실시예 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 2×10^5씩 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

실시예 3: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 면역학적 특성

실시예 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 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 sample수 만큼 1×10^5 cells을 분주하였다. 각 well에 antibody(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 얼음에 40분동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션후에 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 1% paraformaldehyde을 넣어서 single화 하고, 플로우 사이토미터를 이용해 분석하였다.

삭제

[표 1]

지방유래 줄기세포의 표면항원분석(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.

실시예 4: 지방조직 다분화능 줄기세포의 스피어(sphere) 형성

실시예 1에서 수득된 인간 유방의 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 10μM, antibiotic antimycotic solution (100X) 5ml, hydrocortisone 1㎍/ml, insulin 5㎍/ml, EGF 20ng/ml, FGF 40ng/ml, B27 및 β-mercaptoethanol을 함유한 MEBM 배지를 함유하는 6well의 각 well에 5×10^4~1×10^5cells/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.

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

한편, 실시예 1에서 수득된 줄기세포 5×10^4cells/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.

[표 2]

계대수(Passage number)	스피어 수
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 하룻밤 동안 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. 전배양후 1% DMSO 및 100μM BHA (butylated hydrxyanisole)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.
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 contrast사진과 Merge한 사진으로부터, 이 붉은 형광이 MAP2가 발현된 세포로부터 나오는 형광임을 확인할 수 있었다. 또한, 세번째 줄의 왼쪽 GFAP사진은 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, 1μM dexamethasone, 200μM indomethacin, 10㎍/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 10^7 cells/ml을 24well plate의 중심에 10㎕씩 분주한 다음, 5% FBS, TFG-β1 10ng/ml, L-Ascorbate-2-phosphate 50μM 및 인슐린 6.25㎍/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 10^7 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 골 기질도 관찰되었다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 골형성 세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

실시예 10: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 인슐린 분비 췌장 베타세포로의 분화

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 10mmol/L nicotinamide, 1mmol/L β-mercaptoethanol을 함유하고, 10% FBS을 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 췌장 베타세포로의 분화를 유도하였다. 분화유도 후 면역염색을 통해 확인한 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이, 세포 내에 C-peptide 및 insulin이 존재하였다. 인슐린 분비 췌장 베타세포에서 인슐린의 원형인 proinsulin이 생성되고, 이것은 인슐린과 C-peptide로 나누어지는 바, 상기 결과로부터 본 발명에 따른 지방 조직 유래 다분화능 줄기세포가 인슐린 분비 췌장 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.

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 췌장 베타세포로 분화하는 능력을 가지고 있으며, 골다공증, 골관절염, 신경질환, 당뇨병 등의 치료에 효과적일 뿐만 아니라, 유방 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.

도면의 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).

도 3은 본 발명에 따른 인간 유방의 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 culture한 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).

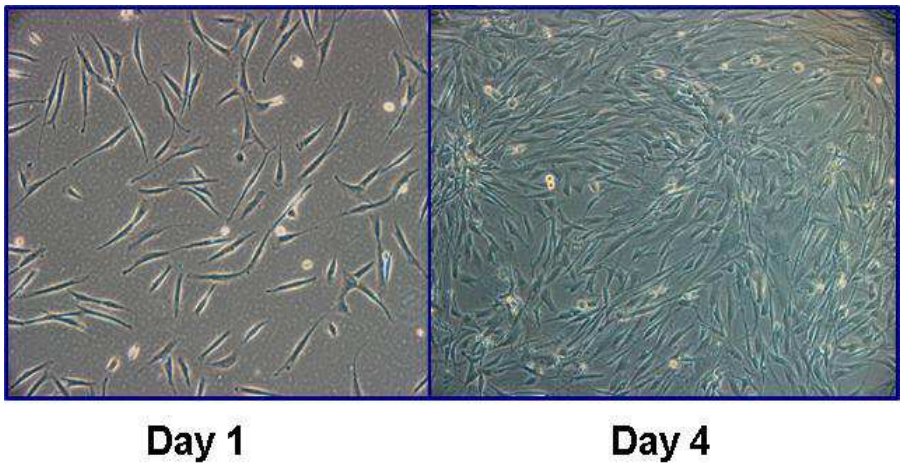
도 8은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 연골세포를 100배 배율로 나타낸 것이다 (A: 분화된 상태의 phase contrast, B: 연골세포로 분화된 상태를 Alcian blue 염색법으로 확인한 것).

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).

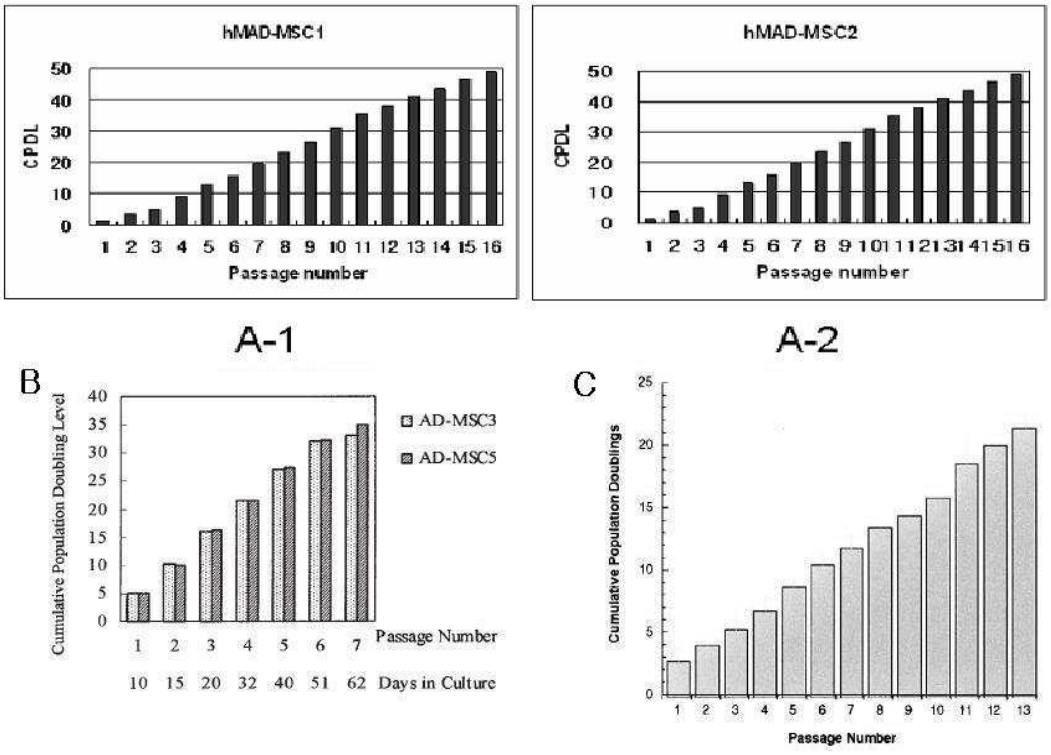
도 10은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 면역염색을 통해 확인한 것이다.

도면

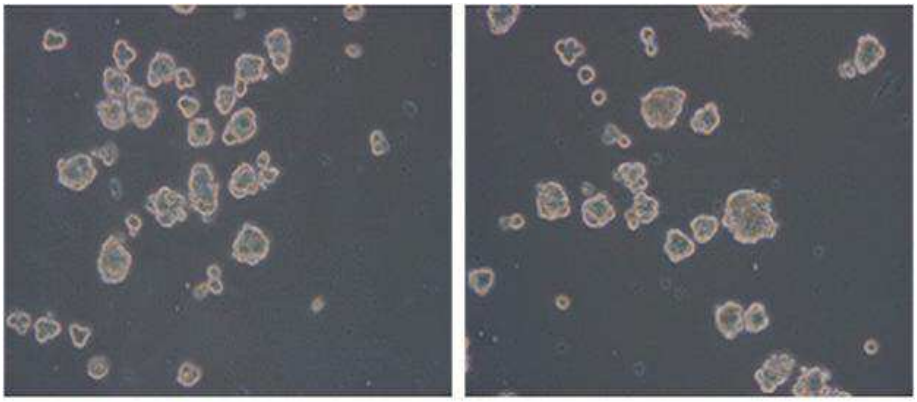
도면1


Day 1
Day 4

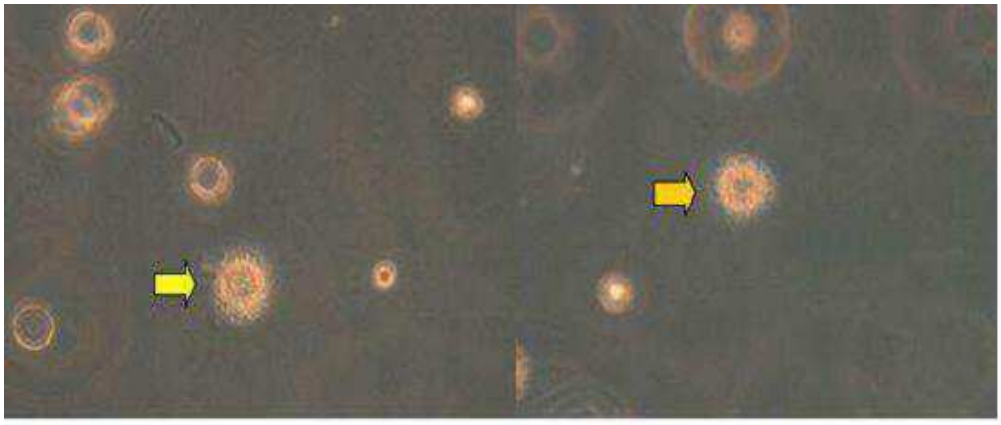
도면2


hMAD-MSC1
CPDL
Passage number
hMAD-MSC2
CPDL
Passage number
A-1
A-2
B
Cumulative Population Doubling Level
AD-MSC3
AD-MSC5
Passage Number
Days in Culture
C
Cumulative Population Doublings
Passage Number

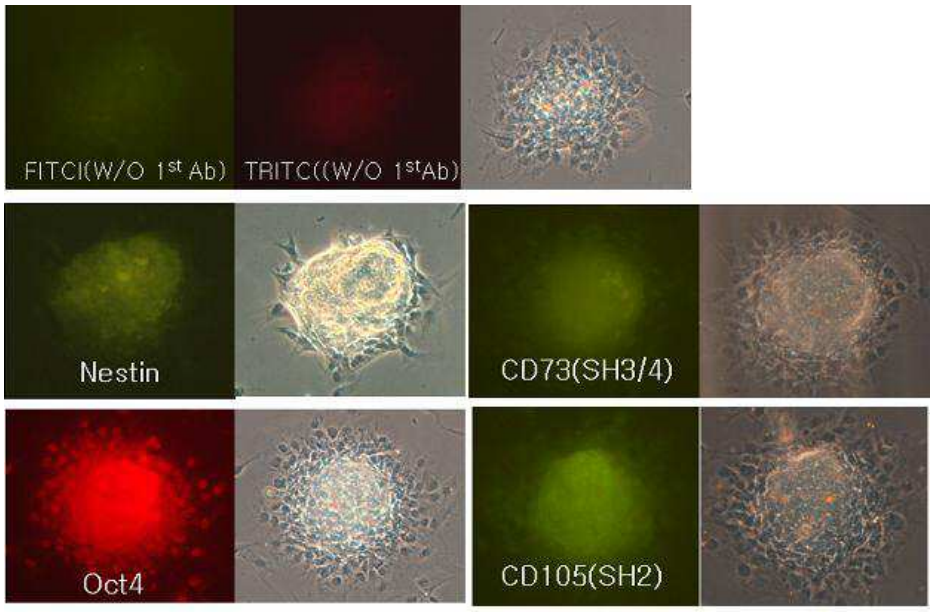
도면3


7 days

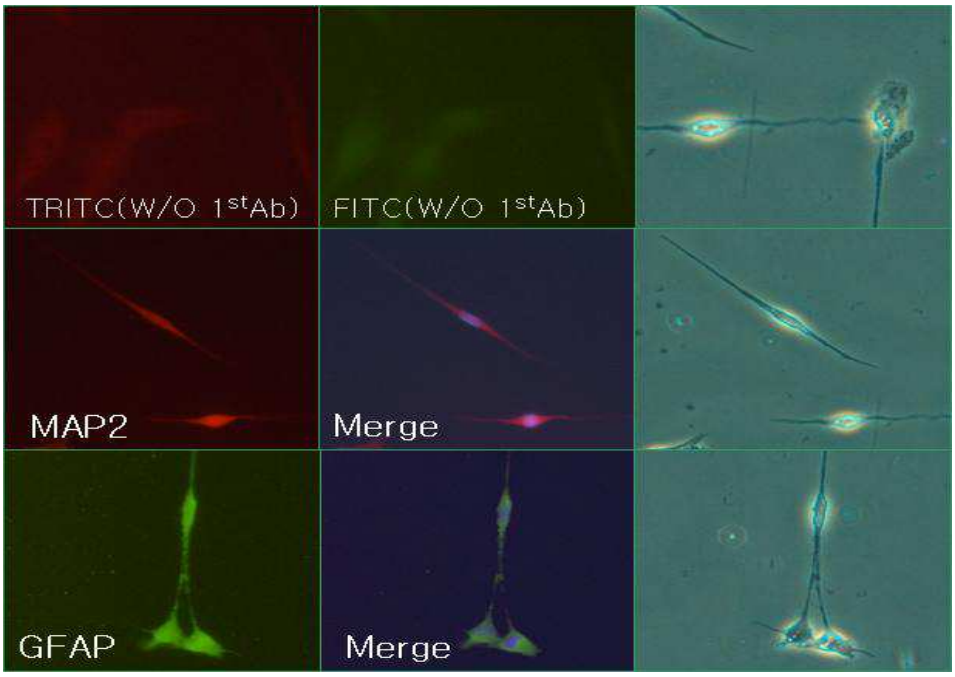
도면4


Day 12

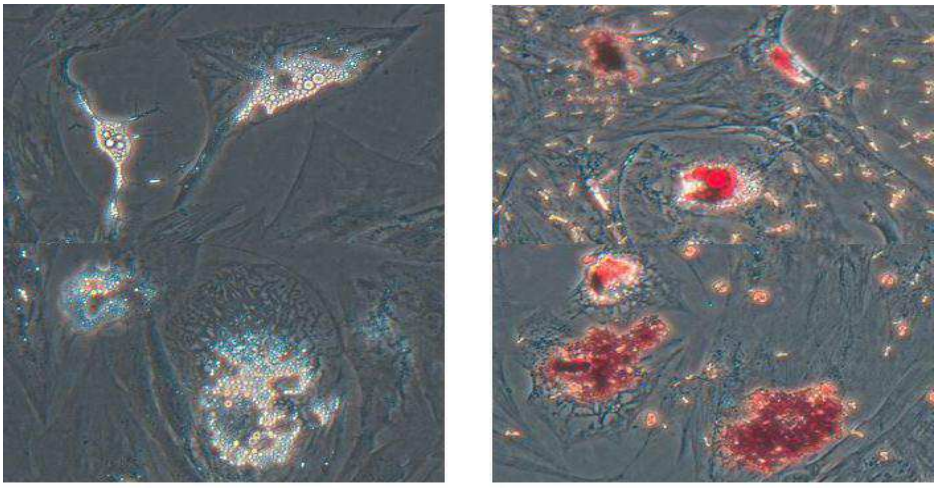
도면5


FITCI(W/O 1st Ab)
TRITC((W/O 1stAb)
Nestin
CD73(SH3/4)
Oct4
CD105(SH2)

도면6

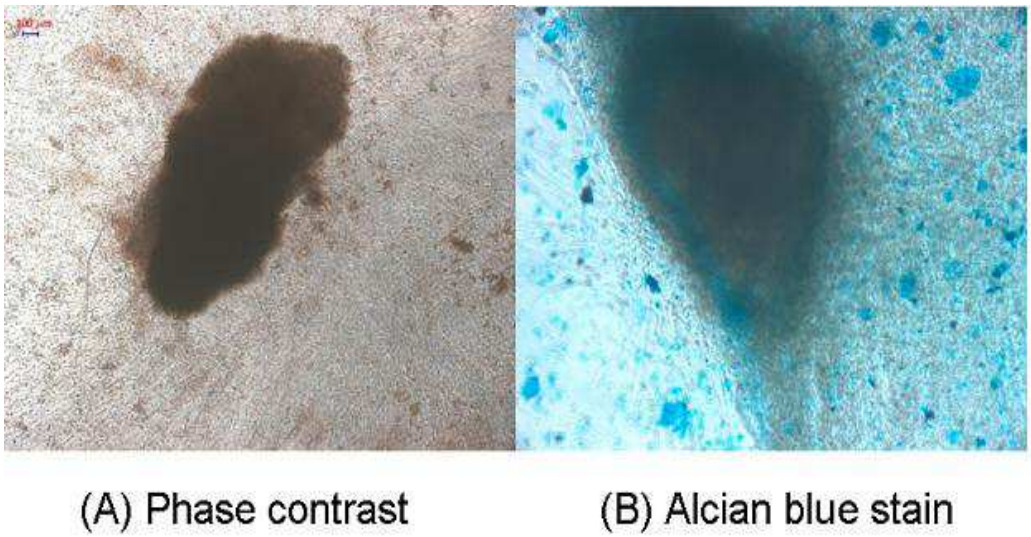


도면7

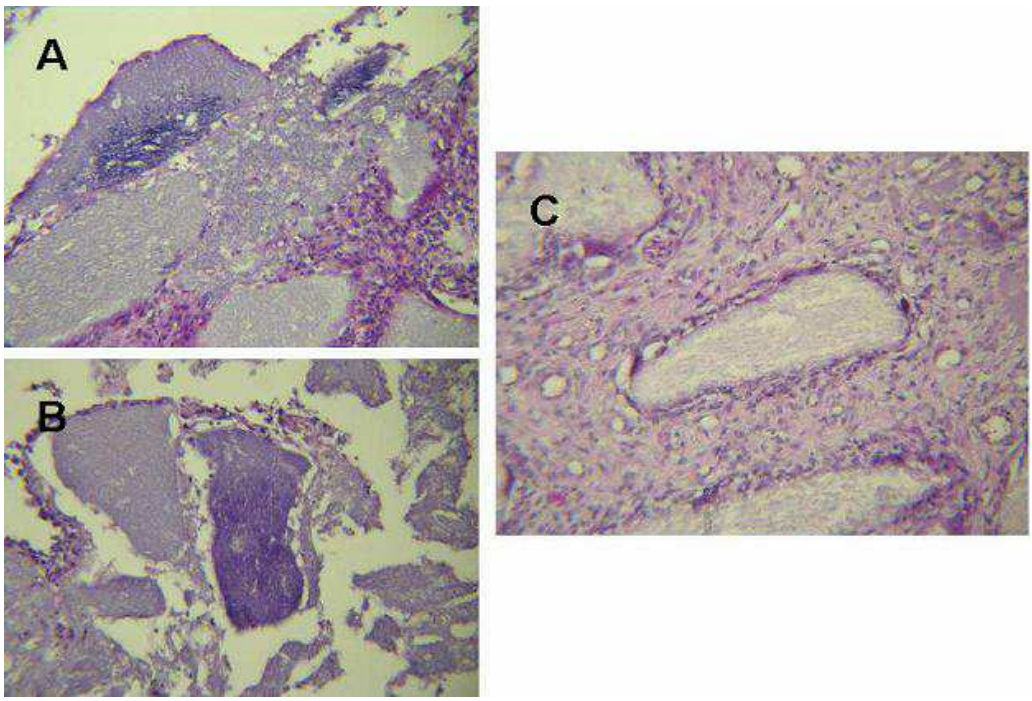


(A) Phase contrast (B) Oil Red O stain

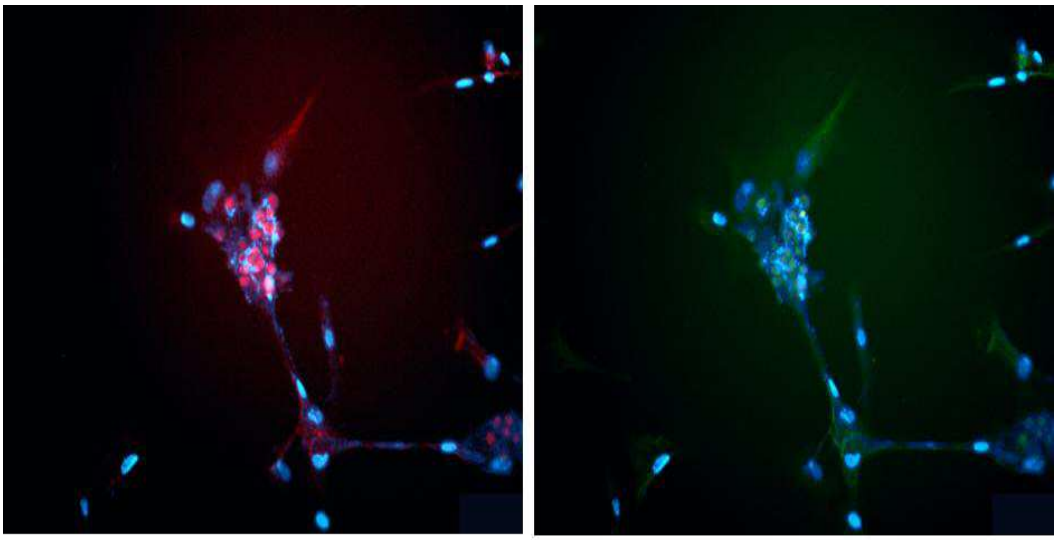
도면8



도면9



도면10



C-peptide

Insulin