



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0116213
(43) 공개일자 2013년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
A61K 35/12 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0041022
 (22) 출원일자 2013년04월15일
 심사청구일자 없음
 (30) 우선권주장
 1020120038828 2012년04월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
라정찬
 충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
 (72) 발명자
라정찬
 충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
강성근
 서울특별시 관악구 성현로 80 관악드림타운아파트
 116동 504호
신일섭
 서울특별시 관악구 관악로 285 동아아파트 107동
 1108호
 (74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 14 항

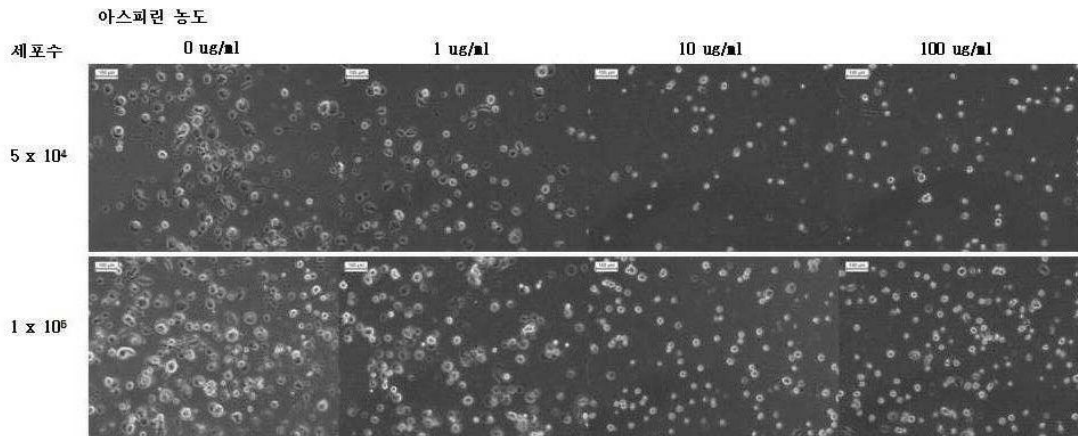
(54) 발명의 명칭 **줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법 및 조성물**

(57) 요약

본 발명은 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 이송이나 보관 중 세포의 파쇄 및 응집을 방지할 수 있어, 투여된 줄기세포가 안정적으로 표적 조직에 도달하여 활성을 나타내는 효능을 보다 효율적으로 높일 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아스피린은 이소소르비드 기재 아스피린 또는 니코틴산 기재 아스피린 화합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아스피린 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

청구항 7

줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 아스피린은 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구항 11

줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 아스피린 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 이송/보관 중 세포가 깨지거나 세포 간 응집 (aggregation)을 형성하지 않도록 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지하는 방법에 관한 것이다.

[0002]

배경기술

[0003] 줄기세포(stem cell)는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 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.

[0004] 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. 특히, 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복을 위해 세포를 적극적으로 활용하여 실시하는 치료법인 재생 의료에 있어서, 환자 본인으로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하는 단계, 시험관 배양으로 세포 증식 및/또는 분화를 유도하는 단계, 및 선택된 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포를 착상에 의해 환자 자신의 몸에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이처럼, 기존의 고전적인 약물치치나 수술적 방법을 통한 질병치료가 손상된 세포·조직·장기를 건강한 것으로 바꾸는 세포·조직 대체치료법으로 대체될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

[0005] 이에, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 세포치료기술이 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 개선하기 위한 기술이 개발되고 있다 (WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호).

[0006] 그러나 신체 내 투여에 적합한 안전성이 우수한 줄기세포를 제조하는 방법에 대한 기술은 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 경우, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지가 가능하다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 혈관 투여용 줄기세포 조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따르면, 이송이나 보관 중 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지할 수 있어, 신체 내 투여에 적합한 안전성이 우수한 줄기세포를 얻을 수 있으므로 줄기세포의 투여에 의한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 다양한 농도의 아스피린에 24시간 동안 노출시킨 줄기세포의 응집 정도를 관찰한 사진이다.
- 도 2는 다양한 농도의 아스피린에 72시간 동안 노출시킨 줄기세포의 응집 정도를 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0017] 본 발명에서 사용하는 용어 "줄기세포(stem cell)"란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, "성체 줄기세포"는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 사용하는 용어 "중간엽 줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 신경 유래 중간엽 줄기세포, 피부 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용하는 용어 "지방 조직 유래 중간엽 줄기세포"란 지방조직에서 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에 축약하여 "지방 유래 성체 줄기세포", "지방 줄기세포" 또는 "지방 유래 줄기세포"라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통하여 획득할 수 있는데, 그 분리 방법은 예를 들어 다음과 같을 수 있다. 즉, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접 회수하거나 하는 방법 등을 통해 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다.

- [0020] 본 발명에서, "이송"이란 줄기세포 자체 또는 줄기세포를 함유하는 용액을 담은 용기 등을 자동차 등의 교통 수단에 의하여 운송하는 것을 의미하며, "보관"이란 실온에서 보관하는 것 이외, 냉장에서의 보관도 포함한다.
- [0021] 본 발명에서, "줄기세포의 파쇄 및 응집 방지"는 단세포 형태의 줄기세포가 깨지거나 응집됨 없이 그 형태를 유지하는 것을 의미하는 것으로, 일 예로 이송이나 보관 중 줄기세포의 세포막이 깨지거나 세포 간 응집 (aggregation)이 형성되지 않고 단세포 (single cell) 형태를 유지하는 것을 의미할 수 있다.
- [0022] 줄기세포는 다양한 방법, 예를 들면, 정맥내, 동맥내 또는 복강내 투여 등의 방법으로 신체 내로 투여될 수 있는데 그 중에서도 정맥 내 투여는 외과적 수술 없이도 간편하면서도 안전하게 질병을 치료할 수 있어 유용하다. 그러나 정맥 내로 투여된 줄기세포가 실제로 표적 부위에 안정적으로 도달하여 목적하는 치료효과를 나타내기 위해서는 여러 가지 요건이 만족되어야 한다. 먼저, 줄기세포는 단세포 형태로 혈관 내에 투여되어야 한다. 신체 내 투여를 위하여 줄기세포에 트립신 등을 처리하여 단세포 형태로 제조할 수 있지만 단세포 형태로 제조된 줄기세포라 하더라도 이송이나 보관 중 세포막이 깨지거나 세포 간 응집 (aggregation)이 형성되는 문제점이 있다. 단세포 (single cell) 형태가 아닌 응집된 줄기세포 또는 깨진 세포는 정맥 내 투여 등의 방법으로 신체에 투여되는 경우, 혈관 내피세포나 혈소판 등과 부착하여 혈류 속도를 감소시키거나 혈액 순환을 방해할 수 있으며 심지어 미세피관이나 혈관 등의 폐색을 초래할 수도 있다 (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 혈관 내로 투여되기 전 세포의 파쇄나 응집 (aggregation)이 형성되지 않아야 하며, 혈관 내로 투여된 후에도 단일 세포 (single cell)로서 세포의 파괴나 응집의 형성 없이 표적 부위에 안정적으로 도달하여야 한다. 또한, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않도록 혈관 내 투여에 적합한 크기여야 한다. 뿐만 아니라, 표적 부위에 도달한 줄기세포가 목적하는 치료효과를 나타내도록 일정 농도 이상의 세포 투여가 전제되어야 한다. 상기 여러 요건 중, 본 발명은 혈관 내로 투여되기 전 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지하여 신체 내 투여에 적합한 안전성이 우수한 줄기세포를 제공하기 위한 것이다.
- [0023] 본 발명은 일 관점에서, 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명에서 "아스피린 함유 용액"은 아스피린 화합물을 함유하는 용액을 의미하는 것으로, 용매로는 바람직하게는 생리식염수를 사용할 수 있으나 그 외에도 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline) 등 당업계에서 일반적으로 사용하는 기체라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제 뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아세틸살리실산 (Sigma; A5376), 알타질주 (Arthalgyl Injection) 또는 아스피린리신 (신풍제약)을 생리식염수에 첨가하여 아스피린 함유 용액을 제조하였다. 이때, 첨가되는 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것이 바람직하다. 첨가되는 아스피린의 양이 그보다 많으면 세포의 생존률이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 파괴나 응집 억제 효과가 미비할 수 있다.
- [0025] 줄기세포를 상기 아스피린 함유 용액에 부유시키면 이송이나 보관 중 줄기세포의 파쇄 및 응집 (aggregation)이 나타나지 않으므로 이러한 줄기세포는 신체 내 투여에 바로 적용할 수 있으므로 유용하다. 따라서, 바람직하게는 혈관 투여시 사용되는 줄기세포는 아스피린 함유 생리식염수에 부유시킨 후 이용할 수 있다.
- [0026] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또 다른 관점에서, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 줄기세포는 바람직하게는 성체 줄기세포, 그 중에서도 지방조직, 또는 모낭·양막 등 상피조직에서 얻어지는 성체 줄기세포를 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는 지방 조직 유래 성체 줄기세포를 사용할 수 있다. 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)를 사용할 수 있고, 특히 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다.
- [0029] 상기 지방 또는 상피조직은 포유류 유래인 것이 바람직하고, 그 중에서도 인간 유래인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)를 사용하였다.
- [0030] 상기 줄기세포의 획득에 사용되는 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져있는 통상적인 배

지를 사용할 수 있는데, 예를 들어 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이용되는 배지이면 족하다. 바람직하게는, M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지 (GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO) 및 K-SFM로 구성된 군에서 선택된 것을 사용할 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.

[0031] 상기 줄기세포의 획득에 사용되는 배지는 당 업계에 공지된, 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

[0032] 또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나, 너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제 (anti-clumping agent), 예컨대 Invitrogen이 판매하는 것들(Cat # 0010057AE)을 포함하는 것이 유익할 수 있다.

[0033] 그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:

[0034] · 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제

[0035] · 다른 티로신 키나아제 관련 수용체, 예컨대 혈소판-유도된 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF), 대식세포 콜로니-자극 인자, Flt-3 리간드 및 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를 위한 리간드

[0036] · 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포로스콜린

[0037] · gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

[0038] · 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

[0039] · 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF β 1

[0040] · 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

[0041] 특히, 본 발명의 일 구체예에서 사용되는 지방 줄기세포를 수득하기 위한 배지는 NAC, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손, 항산화제를 함유하는 것을 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는, FBS, NAC, 칼슘, rEGF, 인슐린, 하이드로코티손 및 항산화제 중 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지를 사용할 수 있다. 상기 항산화제는 셀레늄 (selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexanoic acid) 등에서 선택한 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 셀레늄을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 항산화제로서 셀레늄을 사용하였으며, 사용되는 셀레늄의 양은 0.5 내지 10 ng/ml 인 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에서는 상기와 같은 조성의 배지에서 지방 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 우선, 지방흡입술(Liposuction) 등에 의해 복부로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐 분해 효소를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 분해 후, PBS로 세척하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 100 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 K-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 그러나 이 외에도 당업계에 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

[0043] 상기 조성의 배지에서 배양한 줄기세포에 트립신을 처리하면 단세포 형태의 줄기세포를 얻을 수 있는데, 이때 트립신은 세포 간의 응집을 억제하여 세포가 단세포 (single cell)의 형태를 갖도록 처리되는 것으로, 세포 간의 응집 형성을 억제할 수 있는 물질이면 대체하여 사용할 수 있다.

[0044] 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.

[0045] 실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

[0046] 지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 분리된 지방조직을 PBS로 세척한 다음, 지방조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 타입 1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37℃에서 2시간 동안 조직을 분해시켰다. 콜라게나아제 처리된 조직을 PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, 펠렛을 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0047] 하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5ng/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 하이드로코티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 Keratinocyte-SFM media(K-SFM)을 2일마다 교체하면서 계대배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

[0048] 실시예 2: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

[0049] 1-1: 줄기세포의 단일세포 (single cell) 유지 능력

[0050] (1) 아세틸살리실산을 농도별로 첨가한 생리식염수로 처리

[0051] 실시예 1에서 분리된 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 아세틸살리실산 (Acetylsalicylic acid) (Sigma; A5376)을 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12시간, 24시간에서의 생존률을 관찰하였다. 상기 아세틸살리실산을 첨가한 생리식염수는, 생리식염수에 아세틸살리실산을 농도별로 첨가하여 37℃에서 30분 동안 sonication하여 제조하였다.

표 1

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
	0	1	2	5
12 hours	85%	50%	20%	10%
24 hours	70%	10%	10%	5%

[0053] 실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 아스피린의 첨가량이 1.0mg 이상인 경우에는 세포 독성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0054] (2) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수로 처리

[0055] 실시예 1에서 분리된 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12h, 24h, 48h 및 72h 에서의 생존률을 관찰하였다.

표 2

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
	0	0.001	0.01	0.1
12 hours	95%	91%	90%	90%
24 hours	90%	87%	85%	84%
48 hours	85%	80%	77%	74%
72 hours	65%	63%	61%	61%

[0057] 실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 아스피린의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우에는 지방줄기세포의 생존에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 지방줄기세포를 아스피린 부유액에 부유시 72시간까지 정치 가능하나, 종기로는 24 시간 이내로 처리하는 것이 좋았다.

[0058] (3) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 증식력

[0059] 실시예 1에서 분리된 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 24시간 후의 생존률을 관찰하였다.

표 3

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
	0	0.001	0.01	0.1
24 hours	95%	92%	91%	91%

[0061] 실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 알타질주의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우, 지방줄기세포의 증식력에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

[0062] 또한, 상기 부유시킨 세포 1.0×10^6 cells를 7일간 배양한 뒤의 세포 수와 생존률을 관찰한 결과, 표4에 나타난 바와같이 86~90%의 생존률을 나타냈고 표5에 나타난 바와같이, 0.001~0.1 mg/10ml 의 아스피린 첨가에 의해 세포수의 변화는 거의 없었다.

표 4

[0063] <아스피린 농도 별 24시간 후 생존률 (n=3)>

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
	0	0.001	0.01	0.1
LM091936 P3	90%	90%	85%	87%
LM091951 P3	91%	90%	89%	86%
LM091954 P3	92%	90%	90%	88%
평균	91±1%	90±0%	88±2.6%	87±1%

표 5

[0064] <아스피린 농도별 24시간 부유후, 배양시 증식력에 미치는 영향 (n=3)>

세포수	아스피린 농도 (mg/10ml)			
	0	0.001	0.01	0.1
LM091936 P3	8.0×10^3	7.6×10^3	8.2×10^3	7.8×10^3
LM091951 P3	1.18×10^7	1.32×10^7	1.1×10^7	1.12×10^7
LM091954 P3	1.02×10^7	1.0×10^7	1.3×10^7	1.02×10^7

[0065] (4) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 응집

[0066] 실시예 1에서 분리된 지방유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 부유시킨 후, 24시간 및 72시간 후의 응집 정도를 관찰하였다.

[0067] 그 결과, 24시간 후 대조군에서 가장 많은 응집이 관찰 되었고 알타질주의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우, 지방줄기세포의 응집이 감소함을 확인할 수 있었다 (도 1). 저농도 (5×10^4 cells) 뿐만 아니라 고농도 (1×10^5 cells)의 줄기세포 실험군에서도 아스피린의 응집 방지 효과를 확인하였다.

[0068] 72시간 후의 응집정도를 확인한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군과 1 μ g/ml 아스피린 처리군에서 응집현상과 함께 세포의 사멸이 관찰되었지만 10 μ g/ml 이상 처리군에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다 (도 2).

[0069] (5) 아스피린리신 (신풍제약)을 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 특성

[0070] 실시예 1에서 분리된 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 아스피린리신 (신풍제약)을 농도별로 첨가한 생리식염수에 줄기세포를 1.0×10^6 cells 농도로 부유시킨 후, 5일간 배양하여 세포수를 측정하였다. 그리고 24시간 냉장 보관 후 FACS를 측정하여 세포특성을 확인하였다.

표 6

발현률	아스피린 농도 (mg/10ml)	
	0	0.1
CD29	99.97%	99.97%
CD31	0%	0.21%
CD44	99.45%	99.25%
CD45	0.19%	0.17%

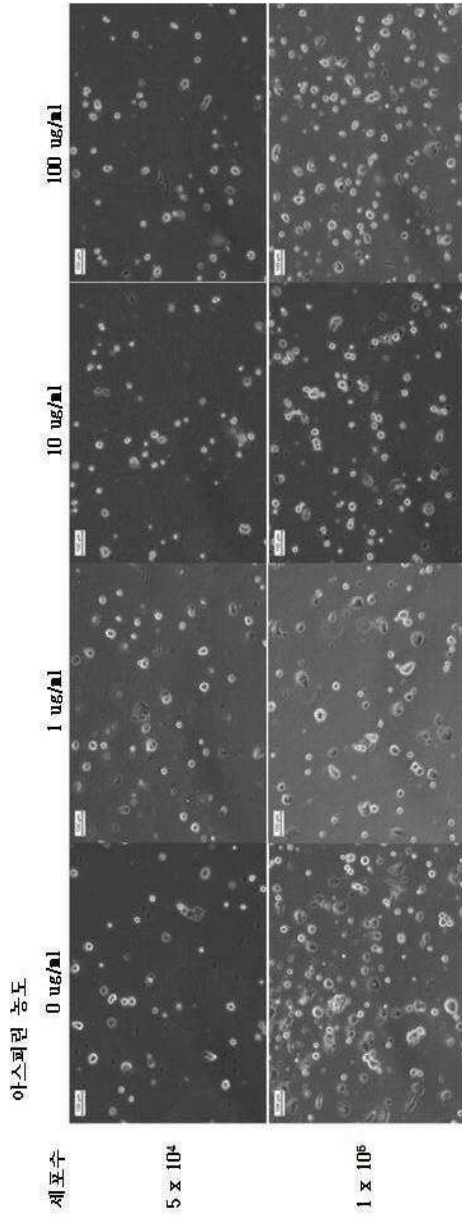
[0072] 실험 결과, 아스피린리신 농도에 의한 세포 생존률은 다소 감소하나 유의적이지 않았으며 5일간 배양한 후의 세포수 역시 개체 차이는 있으나 농도별 차이는 거의 없었다. 24시간 동안 아스피린이 첨가된 생리식염수에 부유한 후 24시간 냉장 보관한 지방유래 중간엽 줄기세포의 특성도 아스피린 농도에 의한 영향은 없는 것으로 관찰되었다.

[0073] 실험 결과, 생존률에 대한 아스피린리신의 세포독성은 나타나지 않았고, 아스피린이 첨가된 생리식염수에 지방 유래 중간엽 줄기세포를 보관 할 경우 세포의 특성 변화없이 응집이 방지됨을 관찰하였다.

[0074] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2

