



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0101756
 (43) 공개일자 2007년10월17일

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0007139

(22) 출원일자 2007년01월23일

심사청구일자 2007년01월23일

(30) 우선권주장

1020060033325 2006년04월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 알엔엘바이오

서울 관악구 봉천동 1596-7

(72) 발명자

라정찬

경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을SK,
 한화아파트 626-701

김봉휘

경기도 용인시 수지구 풍덕천2동 신정마을 9단지
 1202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

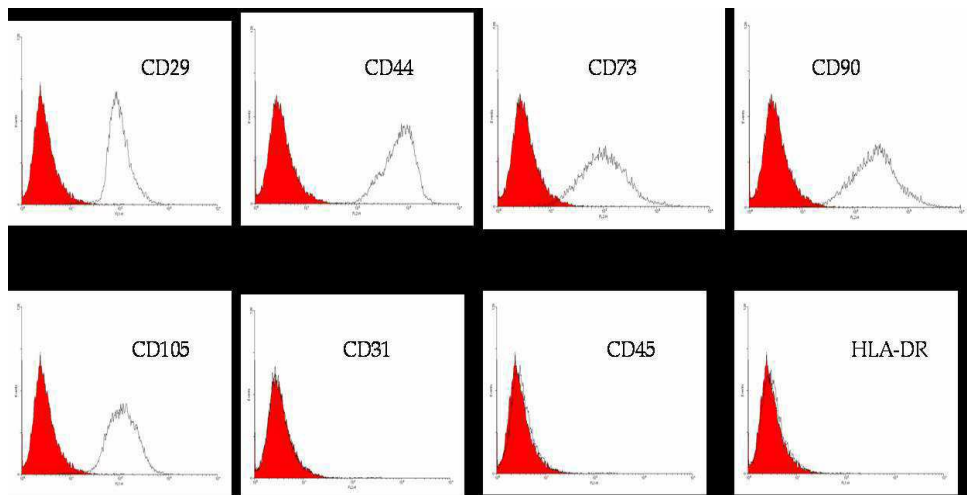
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 태반 조직 유래 다능성 줄기세포 및 이를 함유하는세포치료제

(57) 요약

본 발명은 태반 조직 유래 다능성 줄기세포 및 이를 함유하는 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 적절한 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 bFGF 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성(+)의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성(-)의 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성(+)의 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지(sphere-forming medium)에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 태반 줄기세포의 제조 방법 및 수득된 태반 줄기세포에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다능성 줄기세포는 근세포, 혈관내피세포, 골형성 세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 연골형성 세포, 골형성 세포, 또는 인슐린 분비 체장 베타세포로 분화하는 능력을 가지고 있어, 근질환, 골다공증, 골관절염, 신경질환, 당뇨병 등의 치료에 효과적이고, 유방 조직 형성에 유용하다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이항영

충북 청주시 흥덕구 사창동 현대아파트 102-307

우상규

경기도 안양시 동안구 호계동 1079-3번지 102호

박한나

제주도 제주시 연동 1399번지 대림아파트 104동
1502호

김효은

서울시 구로5동 롯데아파트 105동 601호

특허청구의 범위

청구항 1

인간 태반 조직의 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 bFGF함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, 다음과 같은 특성을 나타내는 성체 줄기세포의 제조방법::

- (a) CD29, CD44, CD54, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄;
- (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄;
- (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및
- (d) 증배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

청구항 2

제1항의 방법에 의해 수득한, 다음과 같은 특성을 나타내는 태반 줄기세포:

- (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄;
- (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄;
- (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및
- (d) 증배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 증배엽 유래 세포는 근세포, 골형성 세포, 연골세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 인슐린 분비 세포 또는 혈관내피세포(endothelial cell)인 것을 특징으로 하는 태반 줄기세포.

청구항 4

제2항의 태반 줄기세포를 하루 동안 아자사이티딘(azacytidine)을 전처리 한 후 SKBM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 근세포로 분화시키는 방법.

청구항 5

제4항의 방법에 의해 분화된 근세포를 유효성분으로 함유하는 근질환 치료용 세포 치료제.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는, 태반 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법:

- (a) 제2항의 태반 줄기세포를 BME 및 FBS를 함유한 DMEM 배지에 전배양 하는 단계; 및
- (b) 상기 전배양액을 DMSO 및 BHA로 처리하여 신경분화를 유도하는 단계.

청구항 7

제6항의 방법에 의해 분화된 신경세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.

청구항 8

제2항의 태반 줄기세포를 TCP(Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 골형성 세포로 분화시키는 방법.

청구항 9

제8항의 방법에 의해 분화된 골형성세포를 유효성분으로 함유하는 골다공증 치료용 세포 치료제.

청구항 10

제2항의 태반 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한 α -MEM배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 지방세포로 분화시키는 방법.

청구항 11

제10항의 방법에 의해 분화된 지방세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.

청구항 12

제2항의 태반 줄기세포를 MSCGM 및 TGF-베타-3을 함유한 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법.

청구항 13

제12항의 방법에 의해 분화된 연골세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.

청구항 14

다음의 단계를 포함하는 태반 줄기세포를 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화시키는 방법:

(a) 제2항의 태반 줄기세포를 염기성 섬유아세포 성장인자와 트랜스포밍 성장 인자 베타-1으로 보충된 DMEM/20% CBS에서 배양하는 단계; 및

(b) 네스틴(nestin)-양성 신경단위 세포 배양물로부터 온 조건화된 배지를 50/50 농도로 배지에 첨가하여 배양하는 단계.

청구항 15

제14항의 방법에 의해 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.

청구항 16

근세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 근질환 치료용 세포 치료제.

청구항 17

신경세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.

청구항 18

연골세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.

청구항 19

골형성 세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골다공증 치료용 세포 치료제.

청구항 20

지방세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.

청구항 21

인슐린 분비 체장 베타세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <13> 본 발명은 태반 조직 유래 다능성 줄기세포 및 이를 함유하는 세포치료제에 관한 것으로, 본 발명은 (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성인 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 특성을 나타내는 태반 줄기세포에 관한 것이다.
- <14> 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.
- <15> 이에 줄기세포연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근본적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 또한, 많은 과학자가 인체의 거의 모든 장기 재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해 왔다.
- <16> 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전능성(전분화능) 줄기세포(pluripotent stem cells), 다능성(다분화능) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.
- <17> 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. 다능성(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관을 형성하는 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포이다.
- <18> 다능성 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang et al., *Nature*, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 소스이지만, 다능성 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma et al., *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaoli et al, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직내의 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들을 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.
- <19> 이에 대해, 최근, 지방 조직이 다능성 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, 지방흡입(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, 줄기세

포의 새로운 소스로서 두각을 나타내고 있다.

<20> 최근 이러한 인간 줄기세포의 동정, 격리 및 발생에 대한 관심이 크다. 인간 줄기세포는 다양한 성인 세포 계통을 발생시킬 수 있는 전능성(totipotential) 또는 만능성(pluripotential) 전구체 세포이다. 이 능력은 기관 및 조직 발달에 필요한 세포의 분화와 특수화를 위한 기초로서 작용한다. 최근, 이러한 줄기세포 이식이 성공함에 따라, 질환, 독성 화학물질 및/또는 방사선으로의 노출로 인한 골융해(myeloablation) 이후 골수를 재구성하고/하거나 보충하는 신규한 임상 도구가 제공되었다. 줄기세포가 다수의 조직을 모두는 아니지만 재증식시키고 생리학 및 해부학적 기능을 회복시키는데 사용될 수 있음을 입증하는 추가의 증거가 존재한다. 또한, 조직 공학, 유전자 치료 분만 및 세포 치료제에서의 줄기세포의 적용이 급속도로 진행되고 있다. 따라서 현재 당업계에서는 줄기세포에 대한 관심이 증대되면서, 다양한 조직으로부터 줄기세포의 개발 및 제조가 절실히 요구되고 있는 상황이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<21> 이에 본 발명자들은 다양한 조직에서 줄기세포를 제조하고자 예의 노력한 결과, 태반 조직을 이용하여 태반 줄기 세포를 제조하는 경우, 기존의 지방 조직을 이용하여 줄기세포를 제조하는 것과 비교해서, 이하와 같은 면역학적 더 효율적으로 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

<22> 본 발명의 목적은 세절한 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근 형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 태반 줄기세포의 제조 방법 및 수득된 태반 줄기세포를 제공하는데 있다.

<23> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다능성 태반 줄기세포로부터 근세포, 신경세포, 골형성 세포, 지방조직세포, 연골 세포 및 췌장 베타세포로의 분화방법 및 상기 분화된 세포 또는 상기 태반 줄기세포를 함유하는 골관절염, 골다공증 및 당뇨병 등의 치료용 세포치료제와 유방 조직 형성용 세포 치료제를 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<24> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세절한 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 콜라게나아제 및 bFGF 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 단계를 포함하는, (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근 형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 특성을 나타내는 태반 줄기세포의 제조방법 및 이에 의해 수득되는 태반 줄기세포를 제공한다.

<25> 또한, 상기의 수득된 태반 줄기 세포로부터, 근세포, 골형성 세포, 신경세포, 지방세포, 연골세포 또는 췌장 베타세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

<26> 또한, 본 발명은 상기의 수득된 태반 줄기 세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효 성분으로 함유하는 세포치료제를 제공한다.

<27> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

1. 용어의 정의

<29> 본 발명에서 사용된 용어 '태반 줄기세포'는 포배낭의 내부 세포 덩어리로부터 유도되지 않은 세포를 지칭한다. 태반으로부터 수득될 수 있는 줄기세포는 태반 줄기세포, 만능성 세포, 다능성 세포 및 수임 전구(progenitor) 세포를 포함한다.

<30> 본 발명에서 사용된 용어 '다능성 세포'는 포유류 신체의 약 260개 세포 유형의 임의의 하위세트로의 성장능력을 갖는 세포를 지칭한다. 만능성 세포와 달리, 다능성 세포는 모든 세포 유형을 형성하려는 능력을 갖지 않는다.

- <31> 본 발명에서 사용된 용어 '전구세포'는 특정 유형의 세포로 분화되거나 특정 유형의 조직을 형성하도록 된 세포를 지칭한다.
- <32> 본 발명에서 사용된 용어 '줄기세포'는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래('전이(transit)') 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.
- <33> 본 발명에서 사용된 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다. 예를 들면, 개체발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리나 몸통 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포라든가 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어져 있는 상태를 분화라고 한다.
- <34> 본 발명에서 사용된 용어 '세포치료제'는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식·선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포치료제에 관한 것이다.
- <35> 2. 태반 줄기세포의 분리 및 정제
- <36> 태반(placenta)은 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 것으로 무게 500g, 지름 15~20cm, 두께 2~3cm 정도의 원반 형태로 되어있다. 태반의 한쪽은 모체와 닿아 있고 다른 한쪽은 태아와 맞닿아 있으며 그 사이 공간에 모체의 혈액이 담겨 있어 태아에게 영양분을 공급하게 된다. 태반은 양막, 장막, 탈락막의 3층으로 구성되어 있다. 또한, 양막은 태아를 둘러싸고 있는 얇고 투명한 막으로, 양수가 들어 있으며, 양막에는 태아의 줄기세포가 존재한다. 탈락막은 수정란이 자궁에 착상되기 위해 자궁의 상피세포가 변형되어 형성된 막으로써 모체의 줄기세포가 존재한다. 태반에 들어있는 줄기세포의 양은 아주 풍부하며 증식이 잘되고 다른세포로 분화도 가능하다.
- <37> 본 발명에 따른 인간 태반조직(human term placenta)에서 분리된 탈락막(decidua) 또는 양막(amnion) 유래 줄기세포는 성인의 자가성 성체줄기세포로 분류되고, 태반조직을 사용하므로 윤리적으로 문제가 되지 않는다.
- <38> 통상 다음과 같은 방법을 통하여, 태반 조직으로부터 다능성 줄기세포를 분리 및 정제한다. 본 발명은 포유류의 태반, 바람직하게는 인간의 태반에 관한 것으로, 이는 자궁으로부터의 만출 후, 처리 및 배양되어 다능성 줄기세포, 태반 줄기세포 및 다른 생체 물질을 생성한다. 태반 줄기세포는 자궁으로부터 만출된 태반으로부터 수득된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 성장 인자[예: bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) 및 EGF(Epidermal Growth Factor)]의 존재하에서 배양된다.
- <39> 본 발명에서는 우선, 태반을 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산 분만에서 수집하고, 다음과 같은 방법을 통하여, 인간 태반 조직으로부터 다분화능 줄기세포를 분리 및 정제하였다.
- <40> 인간 태반 조직샘플로부터 양막 및 탈락막을 분리하여 각각 PBS로 세척한다. 세척된 양막 및 탈락막 조직을 잘게 자른다. 잘게 자른 양막과 탈락막 조직은 100 ?? 디쉬로 옮긴후 콜라게나아제 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) 배지를 이용해 37℃에서 1시간 동안 화학적 분해 작업을 한다.
- <41> 화학적 분해된 조직들을 100μm 메쉬(mesh)에 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거후 1200rpm에서 1~10분간 원심분리하였다. 상층액은 석션(suction)하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1200rpm으로 1~10분간 원심분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 단일세포로 잘 부유시킨 후 bFGF가 함유되어 있는 DMEM 배지에서 배양한다. 이때, 중간엽 줄기세포의 경우는 바닥에 부착이 되고 이외의 세포들은 부유하여 있다.

- <42> 이러한 줄기세포는 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타낸다. 이들이 지난 후 디쉬 바닥에 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 배지를 2-3일마다 교체하면서 배양하여 인간 태반에서 분리한 양막 또는 탈락막 유래 다분화능 줄기세포액을 획득하였다.
- <43> 상기 분리된 태반 유래 다능성 줄기세포의 증식율을 조사하면, 계대수(passage number)가 12에 이르기까지, CPDL이 점진적으로 증가하여 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있다(도 11 및 12).
- <44> 획득한 줄기세포는 SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능하다(도 4). 본 발명에서 사용 가능한 SFM 배지의 하나로 10 μ M, 1 x antibiotic antimycotic solution, 1 μ g/ml hydrocortisone, 5 μ g/ml Insuline, 20 ng/ml EGF, 40 ng/ml FGF, B27, β -mercaptoethanol을 함유하는 MEBM (Mammary Epithelial Basal Medium) 배지를 들 수 있다.
- <45> 증식된 세포의 갯수 및 유형은 유동 세포측정, 세포 분류, 면역세포화학(예를 들어, 조직 특이성 또는 세포-표지 특이적 항체로 염색시킴), 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS), 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting, MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하는 형태 및 세포의 표면 표지에서의 변화를 측정하거나, 광학 현미경 또는 공초점(confocal) 현미경을 사용하여 세포의 형태를 검사하거나, 또는 PCR 및 유전자 발현 프로파일링(profiling)과 같이 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정함으로써 쉽게 모니터링될 수 있다.
- <46> 바람직한 실시양태에서, 태반에서 배양된 세포는 당해 분야에 공지된 기법, 예를 들어 밀도 구배 원심 분리, 자석 세포분리, 유세포분석기, 또는 다른 세포 분리법을 사용하여, 또는 당해 분야에 공지된 분류 방법을 사용하여 분류된다.
- <47> 일례로, 획득한 태반 유래 줄기세포액으로부터 목적의 표면항원을 발현하고 있는 다능성 줄기세포를 획득하는 방법으로서의 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 다능성 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법(*J. Immunol.*, 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 대량의 배양액 등으로부터 다능성 줄기세포를 획득하는 방법으로서, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.
- <48> 플로우 사이토미터 소팅 방식으로서, 수직하전 방식, 셀캡처 방식 등을 들 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 표면 표지-특이적 항체 또는 리간드는 분명한 형광 라벨로 표지된다. 세포는 세포 분류기를 통해 처리되어 그들의 사용된 항체에 대한 결합능력에 기초하여 세포가 분리된다. FACS-분류된 입자는 96웰 또는 384웰 플레이트의 개별 웰(well)내에 직접 침착되어 분리 및 클로닝을 촉진시킬 수 있다.
- <49> 어떠한 방법으로도 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-phycoyanin), TR(TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.
- <50> 본 발명에서 사용 가능한 하나의 방법인 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서, 상기에서 획득한 줄기세포 용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과 한번 적당한 배지에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다. 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 세포 샘플을 혼합하고, 얼음 위에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않은 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.
- <51> 3. 태반으로부터 획득된 태반 줄기세포의 특성
- <52> 태반으로부터 단리된 줄기세포는 균질하고 멸균성이다. 또한, 줄기세포는 인간에게 투여되기 적합한 형태(즉, 약학적 등급)로 용이하게 획득된다.
- <53> 장기간 배양 후 세포들을 표면 CD 시리즈 항원 마커들, 예를 들어 CD29 (mononuclear cell marker),

CD31(endothelial cell and stem cell marker), CD34, CD44(hematopoietic cell marker), CD90(mononuclear stem cell marker), CD73(T-cell and B-cell marker) CD105(endothelial cell marker), CD45(hematopoietic cell marker), 들로 캐릭터라이제이션하여 FACS 분석에 적용할 수 있다.

<54> 본 발명의 방법에 의해 수득된 배반 줄기세포는 하기 세포 표면 표지의 존재에 의해 규명될 수 있다: CD29, CD44, CD54, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성인 면역학적 특성을 나타낸다. 이러한 세포 표면 표지는 당해 분야에 익히 공지된 방법에 따라, 예를 들어 유세포분석기에 의해 일괄적으로 측정된 후 세척하고, 항-세포 표면 표지 항체로 착색된다.

<55> 또한, 본 발명의 배반 줄기세포는 미분화상태의 세포 마커라고 할 수 있는 Oct4 또는 SSEA4의 마커를 이용하여 확인할 수 있다(도 9). Oct4는 줄기세포에서 미분화상태 표지인자로서 잘 알려져 있고, 기술분야에서는 대한민국특허출원 제10-2004-0105716호 "인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체", 대한민국특허출원 제10-2004-0096780호 "포유류 배아 및 줄기세포의 미분화 상태 유지 Oct4 유전자 발현 억제용 이중나선 RNA", 대한민국특허출원 제10-2006-0092128호 "과골세포 기반 적소 유사 구조에 의해 증식능이 증가된 인간 제대혈 유래 다분화능 줄기 세포 및 그 제조방법" 등에서 나타난 바와 같이, 미분화상태의 줄기세포임을 입증하기 위한 실험으로 Oct4 발현 실험을 하는 것이 통상이다. 또한, SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4)가 인간 배아줄기세포의 표면에 존재한다는 것도 당업자에게 이미 알려져있는 사실이다.

<56> Oct4 및 SSEA4의 발현은 RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 이용한다. RT-PCR의 방법은 당분야에 공지되어 있는 기술이다. RT-PCR은 특정 부위의 RNA를 주형(template)로 하여 이에 상응하는 cDNA를 합성한 다음, 이를 이용하여 PCR 증폭을 시행하는 기술이며, 실험과정은 (1) 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 RNA로부터 cDNA를 제조하는 과정과 (2) cDNA를 이용하여 특정부위를 증폭시키는 과정으로 이루어지며 (2)과정은 게놈(genomic) DNA로부터 특정 유전자 부위를 증폭시키는 방법과 같다. 이 방법은 노던 블롯 하이브리다이제이션과 같은 방법을 통해 가능하던 RNA 분석보다 실험방법이 더욱 간단할 뿐만 아니라, 유전자의 염기서열 결정이 가능하기 때문에 주로 mRNA의 염기서열 및 전사량을 연구할 때 크게 도움이 되는 기술이다.

<57> 본 발명의 배반 줄기세포는 Oct4와 SSEA4의 발현에 대해 양성 반응을 나타낸다(도 9).

<58> 4. 배반 줄기세포의 분화

<59> 본 발명의 방법에 의해 수득된 배반 줄기세포는 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지고 있다. 지방세포분화, 연골세포 분화, 골아세포 분화, 조혈세포 분화, 근세포 분화, 혈관세포 분화, 신경세포 분화, 간세포 분화를 비롯한, 특정 세포 계통을 따라 분화하도록 유도될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 수득된 배반 줄기세포는 이식 및 생체의 처리 프로토콜에서의 사용을 위해 분화하도록 유도된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 수득된 배반 줄기세포는 특정 세포 유형으로 분화하도록 유도되고 치유 유전자 생성물을 제공하도록 유전자적으로 설계된다.

<60> 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 의해 수득된 배반 줄기세포는 분화되도록 유도되는 생체의 화합물과 함께 항온 처리된 후 분화된 세포는 실험대상으로 직접 이식된다. 따라서, 본 발명은 표준 배양 매지를 사용하여 인간 배반 줄기세포를 분화시키는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 다능성 배반 줄기세포는 근세포, 신경세포, 성상세포, 골형성세포, 연골세포, 지방세포 및 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화시키는 방법을 포함한다.

<61> 줄기세포의 특정 세포 유형으로의 분화 측정은 당해 분야에 익히 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들어, (1) 배반 줄기세포를 하루 동안 아자사이티딘(azacytidine)을 전처리 한 후 SKBM 배지(cambrex, co.)에서 근세포로의 분화를 유도할 수 있고, (2) 배반 줄기세포를 BME (beta-mercaptoethanol) 및 FBS(Fetal Bovine Serum)를 함유한 DMEM 배지에 전배양 하고, 상기 전배양액을 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 및 BHA(Butylated hydroxyanisole)로 처리하여 신경분화를 유도할 수 있고, (3) 배반줄기세포를 TCP(Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하여 골형성 세포로 분화시킬 수 있고, (4) 배반 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)를 함유한 α -MEM배지에 배양하여 지방세포로 분화시킬 수 있다.

<62> 또한, 상기 분화들은 유세포 분석 또는 면역세포화학과 같은 기법을 사용하여 세포 표면 표지(예를 들어 조직-특이적 또는 세포-표지 특이적 항체로 세포를 염색함) 및 형태의 변화를 측정하면서, 광학 현미경 또는

공초점 현미경을 사용하여 세포의 형태를 조사함으로써, 또는 PCR 및 유전자-발현 프로파일과 같은 당해 분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.

<63> **6. 태반 줄기세포 및 이의 분화세포의 이용**

<64> 본 발명의 태반 줄기세포는, 신체의 조직 또는 기관이 목적하는 세포 군집, 예를 들어 줄기세포 또는 유래세포군집의 생착, 이식 또는 주입에 의해 강화, 치료 또는 대체되는 다양한 종류의 치료 프로토콜에 사용될 수 있다. 상기 본 발명의 태반 줄기세포는 존재하는 조직을 대체 또는 강화시켜, 새롭거나 변화된 조직이 되게 하거나 생물학적 조직 또는 구조와 결합시킬 수 있다. 또한, 전형적으로 배아 줄기세포가 사용되는 치료 프로토콜에서 배아 줄기세포는 본 발명의 태반 줄기세포로 대체될 수 있다. 일례로, 본 발명의 태반 줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 함유하는 알츠하이머, 파킨슨씨 병 등의 신경질환, 진행성 근이영양증, 루게릭 병 등의 근질환, 골관절염, 골다공증의 골질환 및 당뇨병 등의 치료용 세포치료제와 유방 조직 형성용 세포 치료제 등에 사용될 수 있다.

<65> 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 태반으로부터의 태반 줄기세포 및 기타 줄기세포는 적합 및 부적합 HLA형조혈 이식을 포함하는, 자가 및 동종 조혈 이식에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 태반 줄기세포는 치료학적 이식 프로토콜, 예를 들어 간, 췌장, 신장, 폐, 신경계, 근육계, 뼈, 골수, 흉선, 비장, 점막질 조직, 생식선 또는 모발의 줄기세포 또는 유래세포를 강화 또는 대체시키는데 사용될 수 있다.

<66> 태반 줄기세포는, 전형적으로 유래세포가 사용되는 치료 또는 연구 프로토콜에서 특정한 부류의 전구세포 (예를 들어, 연골세포, 줄기세포, 조혈세포, 췌장 실질세포, 신경줄기세포 및 근육 유래세포 등) 대신 사용될 수 있다.

<67> 본 발명의 태반 줄기세포는 연골, 건 또는 인대의 강화, 치료 또는 대체에 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서는, 인공보철물(예를 들어, 둔부 인공보철물)이 본 발명의 태반 줄기세포로부터 성장한 대체 연골조직 구조물로 피복된다. 다른 실시양태에서는, 관절(예를 들어, 무릎)이 태반 줄기세포로부터 성장한 연골조직 구조물로 재구성된다. 또한, 연골조직 구조물은 주로 상이한 유형의 관절의 재구성 수술에 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Resnick, D. *et al*, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2d, 1988]에서의 프로토콜).

<68> 본 발명의 태반 줄기세포는 질병으로부터 야기된 조직 및 기관의 손상을 복구하는데 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서는, 환자에게 태반 줄기세포가 투여되어 질병의 결과로서 손상된 조직 또는 기관을 재생 또는 회복시킬 수 있다(예를 들어, 화학요법 또는 방사선 이후의 면역계를 향상시키고, 심근경색 이 후의 심장조직을 복구한다).

<69> 또한 본 발명의 태반 줄기세포는 주사가능물질(예를 들어, 본원의 참조문헌으로 인용되는 국제특허 공개공보 제 W0 96/39101 호)로서 제형화될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포 및 조직은 미국특허 제 5,709,854 호; 제 5,516,532 호; 제 5,654,381 호(모두 본원의 참조문헌으로 인용됨)에 기술된 바와 같은 중합성 또는 가교성 하이드로겔을 사용하여 제형화될 수 있다

<70> 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.

<71> **실시예 1: 태반 조직의 준비 및 분리**

<72> 태반은 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산분만에서 수집되어 연구용으로 사용하였다. 태반 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수에 넣어서 연구실까지 옮겼다.

<73> 연구실로 옮긴 태반 조직은 PBS를 이용하여 세척하여 혈구세포들과 여러 조직의 잔해들을 제거하거나 조직을 용혈버퍼(hemolysis buffer)를 이용하여 혈구세포들을 제거 하거나 태반을 구성하고 있는 양막(amnion), 장막(chorion), 기저탈락막(decidua) 및 태반(placenta bad)조직을 각각 포셋을 이용하여 조심스럽게 분리하였다.

<74> **실시예 2: 태반 유래 줄기세포의 분리 및 배양**

<75> 분리된 각각의 조직들은 100 μ 디쉬에 놓고 멸균된 메쉬를 이용해 1~2mm 크기로 잘게 세절하였다. 그 후, 콜라게나제가 포함된 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 최소 1 시간에서 최대 4시간 동안 반응시킨 다음 100 μ l 와이어 직물체를 이용해 콜라게나제가 처리된 조직을 걸렀다. 이렇게 분리한 세포들은 100mm 디쉬에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조

건하 DMEM배지에서 배양하였다.

<76> **비교예 1: 태반 조직 및 지방 조직 유래 줄기세포 배양 효율 비교**

<77> 5g의 지방 조직으로부터 줄기세포를 분리, 배양할 경우 두 번의 계대 배양 후 천만개 이상의 세포를 획득할 수 있었으나 약 3g의 태반 조직의 경우 최초의 계대 배양 후 천만개 이상의 세포를 획득할 수 있었다. 이를 통해, 태반 조직을 이용하여 줄기세포를 배양하는 경우, 기존의 지방 조직을 이용하여 줄기세포를 배양하는 경우보다 훨씬 효율적인 것을 알 수 있었다.

<78> **실시예 3: 태반조직 유래 줄기세포의 증식율 조사**

<79> 상기 분리된 인간 태반 조직 유래 다능성 줄기세포의 증식방법에 따라 수득된 줄기세포의 증식율을 조사하였다. 각각 다른 인간 개체의 태반조직 샘플로부터 가져온 태반 줄기세포를 실시예 1 내지 3과 같은 분리방법을 거쳐 얻은 후, 75-flask에 2×10^5 씩 씨딩(seeding)하였다.

<80> CPDL(cumulative population doubling level)은 세포의 증식율을 나타내는 지수로서,

<81> $CPDL = \ln(N_f/N_i) / \ln 2$

<82> (N_i =초기 seeding한 세포수, N_f =최종 세포수)

<83> 의 식으로 나타낼 수 있다.

<84> 기저탈락막 유래 줄기세포 및 양막 유래 줄기세포의 CPDL을 계대수(passage number)에 따라 관찰한 결과 계대수가 12일때 약 30에 달하는 CPDL 값을 나타낸다 (도 11 및 12). 이러한 CPDL 값은 인간 지방 조직 유래 줄기세포 (Lin et al., stem cells and development, 14:92, 2005; Zuk et al., Tissue eng., 7:211, 2001)의 그 값과 유사하며 이 결과로부터 본 발명에 따른 성체 줄기세포는 증식율이 매우 우수하다는 것을 알 수 있었다.

<85> **실시예 4: 태반 유래 다능성 줄기세포의 면역학적 특성**

<86> 실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 5% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 샘플수 만큼 1×10^5 cell을 분주하였다. 각 웰(well)에 항체(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 얼음에 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션후에 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 1% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)을 넣어서 싱글(single)화 하고, 플로우 사이토미터를 이용해 분석하였다. 그 결과, 아래에 표 1에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 태반조직 유래 태반 줄기세포는 CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄을 알 수 있었다.

【표 1】

<87> 태반유래 줄기세포의 표면항원분석(FACS analysis)

Antigen	AD-MSCs
CD29	+
CD31	-
CD44	+
CD90	+
CD105	+
CD34	-
CD45	-
CD73	+
CD34	-
HLA-DR	-

<88> **실시예 5: 태반 유래 다능성 줄기세포의 Oct4 및 SSEA발현 분석**

<89> 상기 실시예 3에서 수득된 태반 유래 줄기세포를 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, Blocking buffer (5% goat serum)를 처리하여 4 °C에서 한 시간 동안 반응시키고, 일차항체를 함유한 Blocking buffer에 하룻밤동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 이차항체로 암실에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후, mounting하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 분화능 줄기세포는 인간 배아 줄기세포의 마커인 Oct4와 SSEA에 대하여 양성반응을 나타내었다(도 10).

<90> 또한, RT-PCR을 이용하여 Oct4의 발현을 확인하였다, RT-반응은 37°C에서 50분간, 70°C에서 10분간 행하였으며, PCR-반응은 95°C에서 5분간, 그리고 95°C에서 30초/ 58°C에서 40초/72°C에서 1분으로 40회의 사이클(cycles)을 행한 후, 72°C에서 10분간 수행하였다. 그 결과, 도 9에 나타나 있는 것처럼 기저탈락막 유래 줄기세포 및 양막 유래 줄기세포의 경우 800bp에서 발현되어 있음을 확인할 수 있었다.

<91> **실시예 6: 태반조직 다능성 줄기세포의 근세포로의 분화**

<92> 실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 10 ng/ml 피브로넥틴(fibronectin)이 코팅되어 있는 플라스크에 분주한 후 10 μm 5'-아자사이티딘(azacytidine)을 이용하여 24시간 동안 전처리를 한다. 전처리 후 SKBM 배지(Cambrex, Co.)를 이용하여 10 일 동안 배양한 후 면역염색을 실시하였다.

<93> 그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포는 근육세포의 특이항원인 미오신에 대하여 양성반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포가 근육세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다

<94> **실시예 7: 태반조직 다능성 줄기세포의 신경세포로의 분화**

<95> 실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 1mM BME 및 10% FBS 를 첨가한 DMEM 배지를 사용해 1일 동안 전배양(preincubation)하였다. 전배양 후 1% DMSO 및 100 μM BHA를 함유한 신경세포 분화 유도 배지에서 신경세포로의 분화를 유도하였다. 신경분화유도 배지를 첨가하고 9일 후, 면역염색을 실시하였다.

<96> 그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포는 신경계 정상세포의 특이항원인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 대하여 양성반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포가 신경세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 6).

<97> **실시예 8: 태반 유래 다능성 줄기세포의 골형성 세포로의 분화**

<98> 실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 태반 줄기세포를 골형성 유도 배지 (0.1 μmol/L dexamethasone, 0.05 mmol/L ascorbic acid-2- phosphate, 및 10 mmol/L beta-glycophosphate, 5 ~ 30 % 인간 혈청 또는 플라즈마)에 희석하여 세포수를 센 다음, 플라스크에서 배양 (5% CO2, 37, 배지는 3 ~4일에 한번씩 교체)하여 골형성 세포로 분화를 유도하였다. 배양 시작 후 14일때 Alizalin red S 염색법을 이용하여 태반 유래 다능성 줄기세포가 골형성 세포로 분화되었음을 확인하였다. (도 7).

<99> **실시예 9: 태반조직 다능성 줄기세포의 지방세포로의 분화**

<100> 실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 5% FBS, 1 μM Dexamethasone, 200 μM Indomethacin, 10 μg/μl Insulin, 0.5mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)을 함유한 α-MEM 배지에서 2주 동안 배양하여 다능성 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반 조직 유래 다능성 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 8).

발명의 효과

<101> 이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명에 따른 태반 조직을 이용한 태반 줄기세포의 제조방법은 기존의 다른 조직으로부터 줄기세포를 제조하는 것과 비교해서, 더 효율적으로 생산할 수 있고, 본 발명에 따른 다능성 줄기세포는 근세포, 혈관내피세포, 골형성 세포, 신경세포, 정상세포, 지방세포, 연골형성 세포, 골형성 세포, 또는 인슐린 분비 췌장 베타세포 등으로 분화하는 능력을 가지고 있어, 간경변, 골다공증, 골관절염, 신경질환, 당뇨병 등의 치료에 효과적이고, 지방 조직 형성에 유용하다.

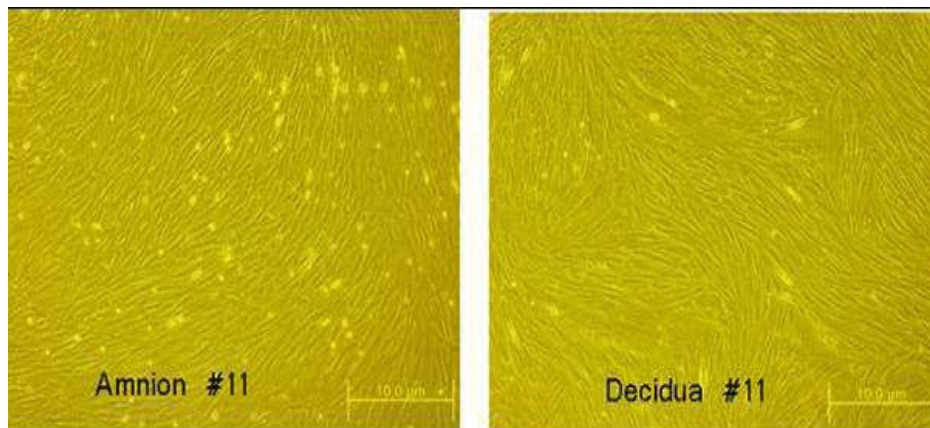
<102> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

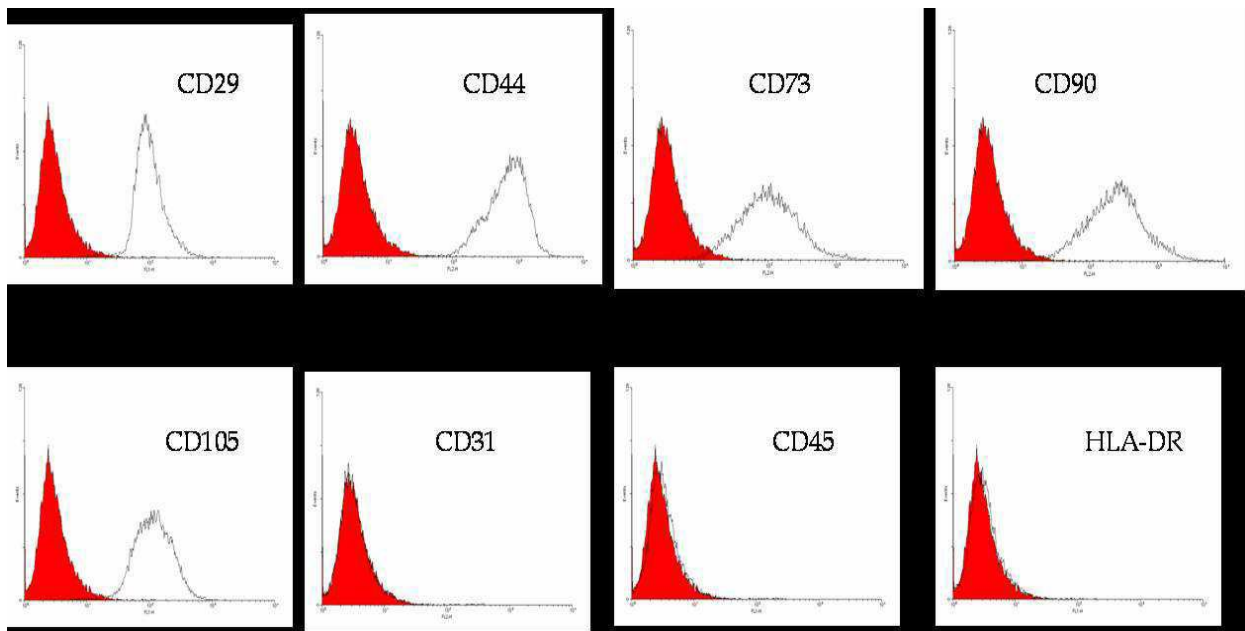
- <1> 도 1은 태반 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 형태(morphology)에 대한 현미경 사진이다.
- <2> 도 2는 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 기저탈락막 유래 MSC의 표면항원들을 분석한 결과이다.
- <3> 도 3은 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 양막 유래 MSC의 표면항원들을 분석한 결과이다.
- <4> 도 4의 A는 SFM배지에서 3일간 배양한 1세대째 양막의 스피어 형성사진이고, B는 SFM배지에서 7일간 배양한 1세대째 기저탈락막의 스피어 형성사진이다.
- <5> 도 5는 근세포로의 분화(Myogenesis)에 있어서, MM-3160배지(근육세포 분화용 배지)에서 10일간 유도한 양막(A) 및 기저탈락막(B) 유래 줄기세포에 대한 면역조직화학검사(αMyosin-FITC)의 현미경 사진이다
- <6> 도 6은 신경세포로의 분화(Neurogenesis)에 있어서, NM3229배지(신경세포 분화용 배지)에서 10일간 유도한 양막(A) 및 기저탈락막(B) 유래 줄기세포에 대한 면역조직화학검사(αGFAP-FITC)의 현미경 사진이다.
- <7> 도 7은 골세포로의 분화(Osteogenesis)에 있어서, 양막(B) 및 기저탈락막(C) 유래 줄기세포에 대하여 Alizarin red S염색법으로 염색한 사진이다[A:대조군; B:골세포 분화조건 하의 양막 유래 줄기세포; C:골세포 분화조건 하의 기저탈락막 유래 줄기세포].
- <8> 도 8은 지방조직세포로의 분화(Adipogenesis)에 있어서, 양막(B) 및 기저탈락막(A) 유래 줄기세포에 대하여 Oil red O 염색법로 염색한 사진이다
- <9> 도 9는 OCT4에 대한 RT-PCR결과이다[레인 1:마커; 레인 2: RT-reaction control; 레인 3: 양막 줄기세포; 레인 4:기저탈락막 줄기세포; 레인 5:PCR-reaction control].
- <10> 도 10은 각각에 표기된 특정 항체를 이용한 면역조직화학검사 결과사진이다[A:OCT4; B:SSEA4; C:CD44, CD54 및 대조군].
- <11> 도 11은 기저탈락막 유래 줄기세포에 대한 계대수에 따른 축적집단 배가정도(cumulative population doubling level, CPDL)를 나타낸 그래프이다.
- <12> 도 12는 양막 유래 줄기세포에 대한 계대수에 따른 축적집단 배가정도(CPDL)를 나타낸 그래프이다.

도면

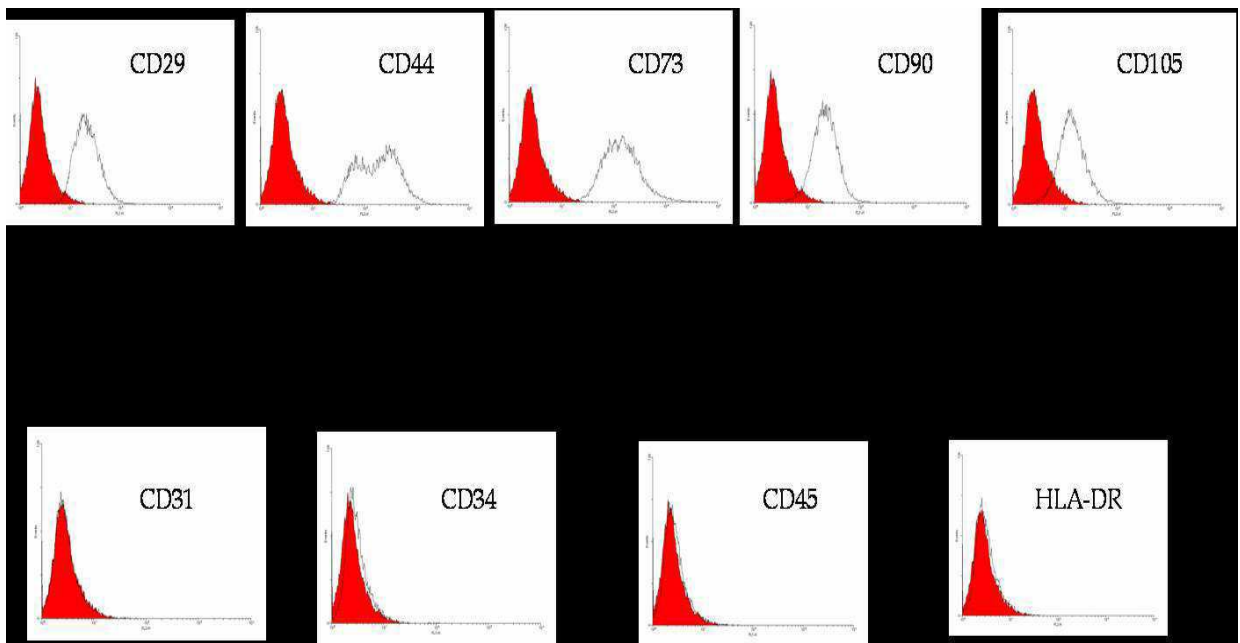
도면1



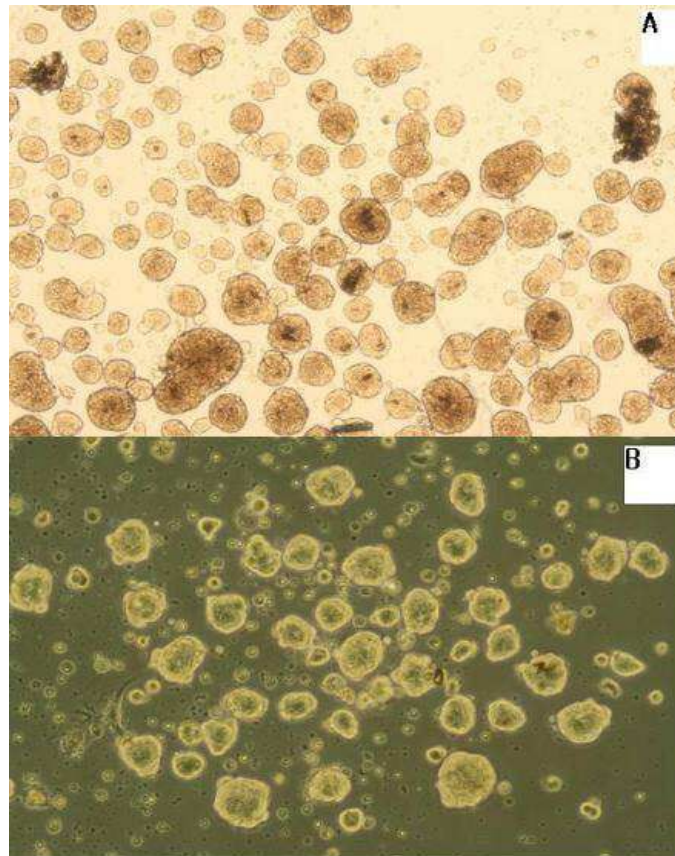
도면2



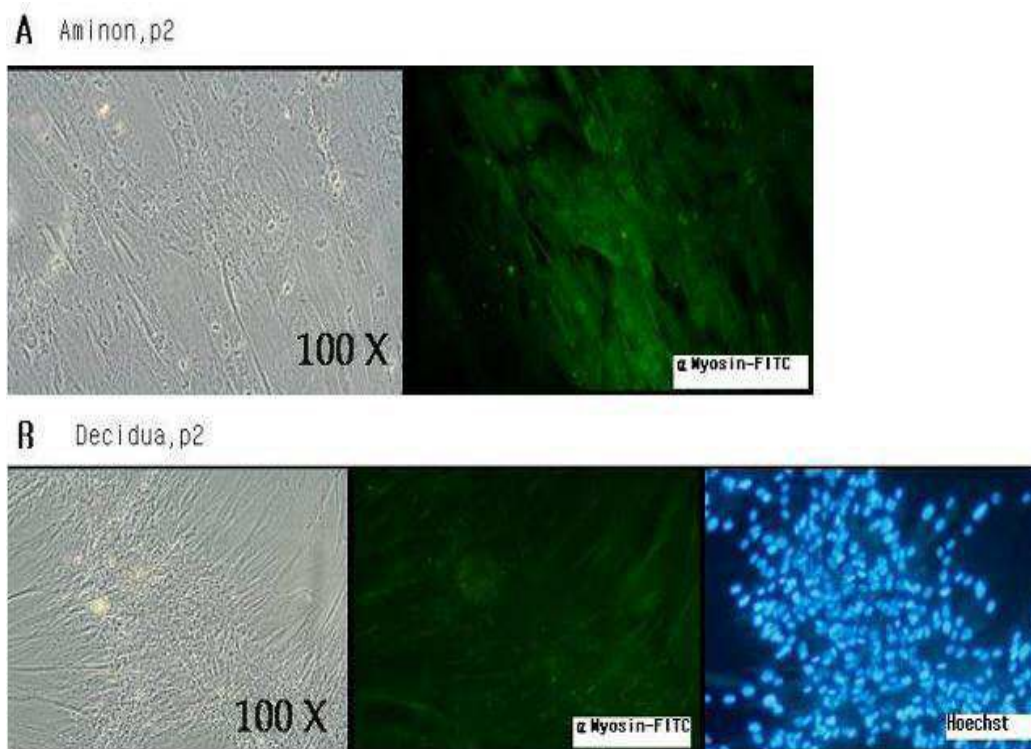
도면3



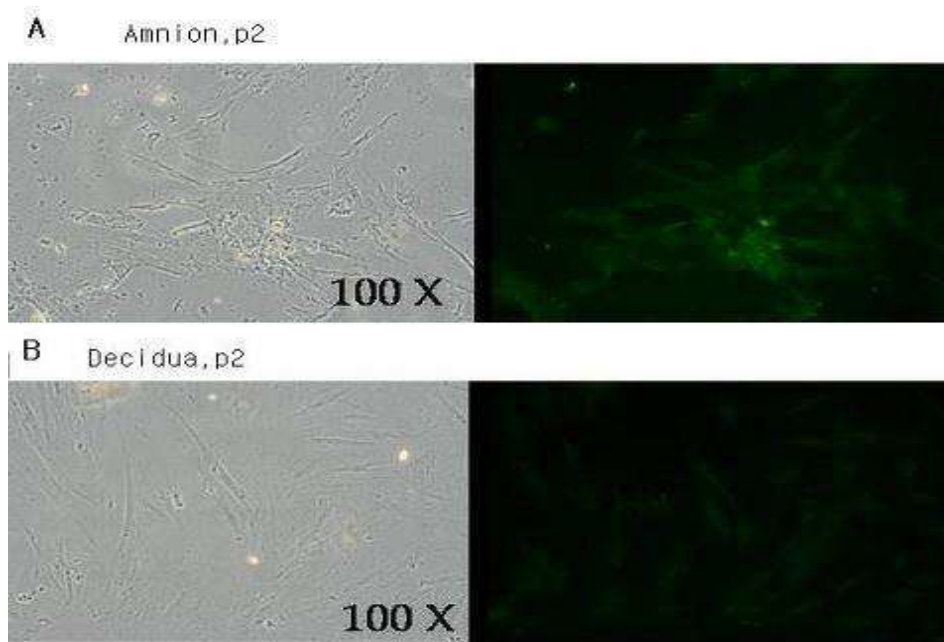
도면4



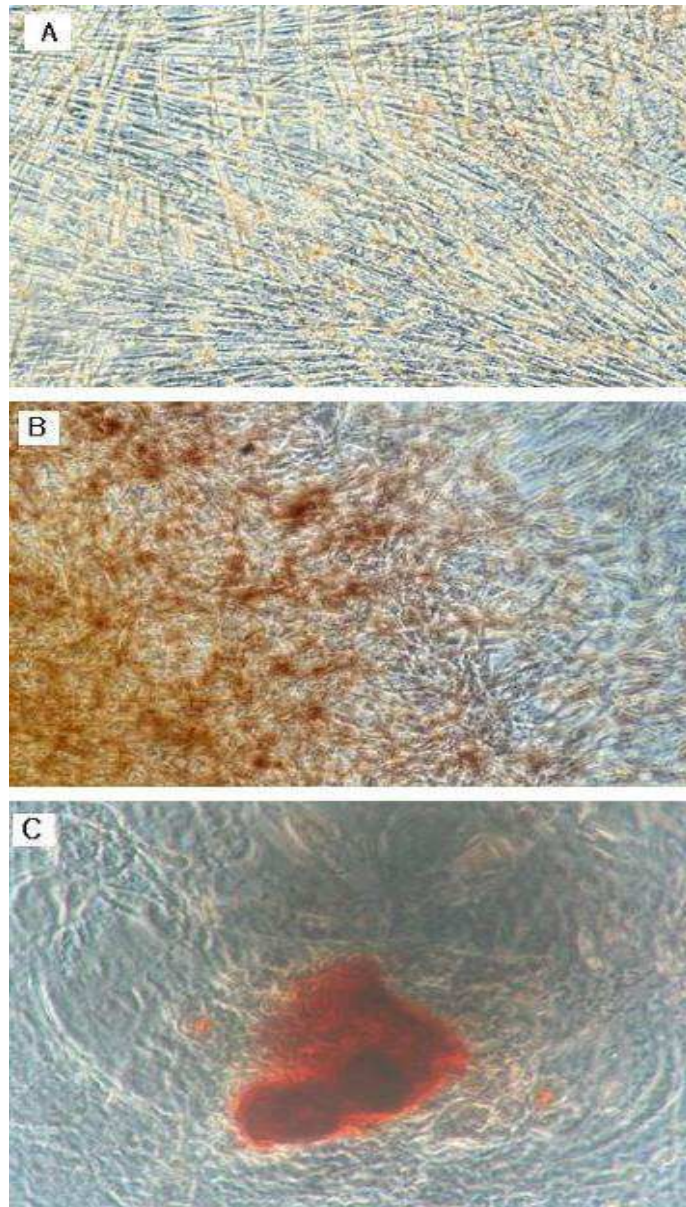
도면5



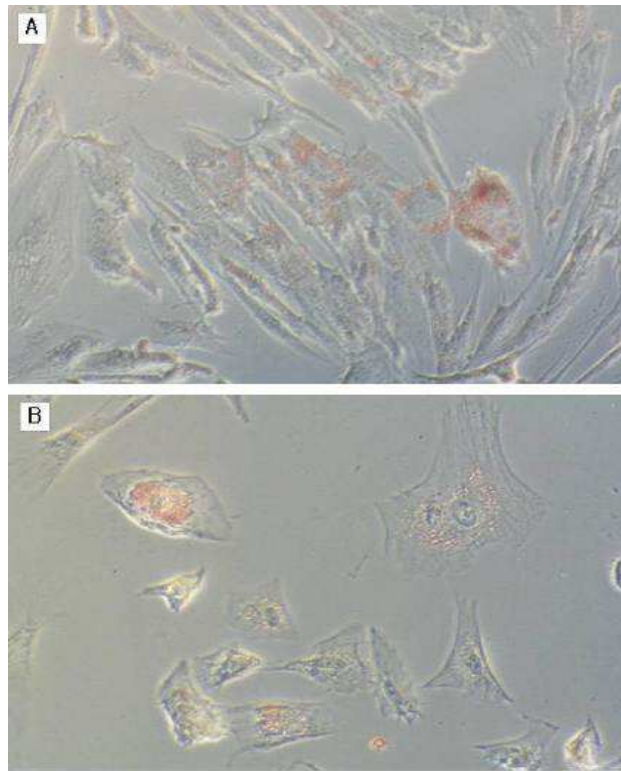
도면6



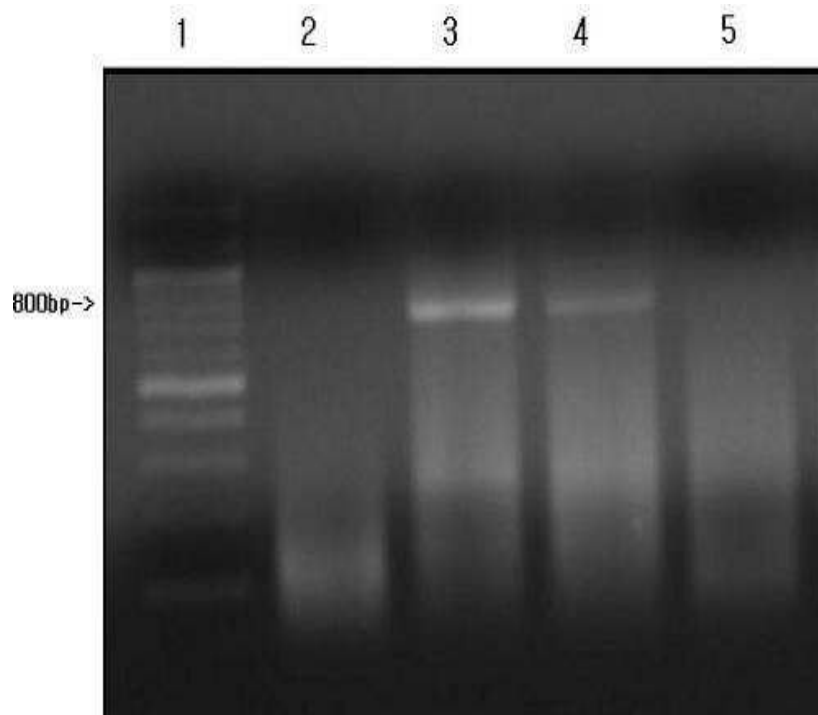
도면7



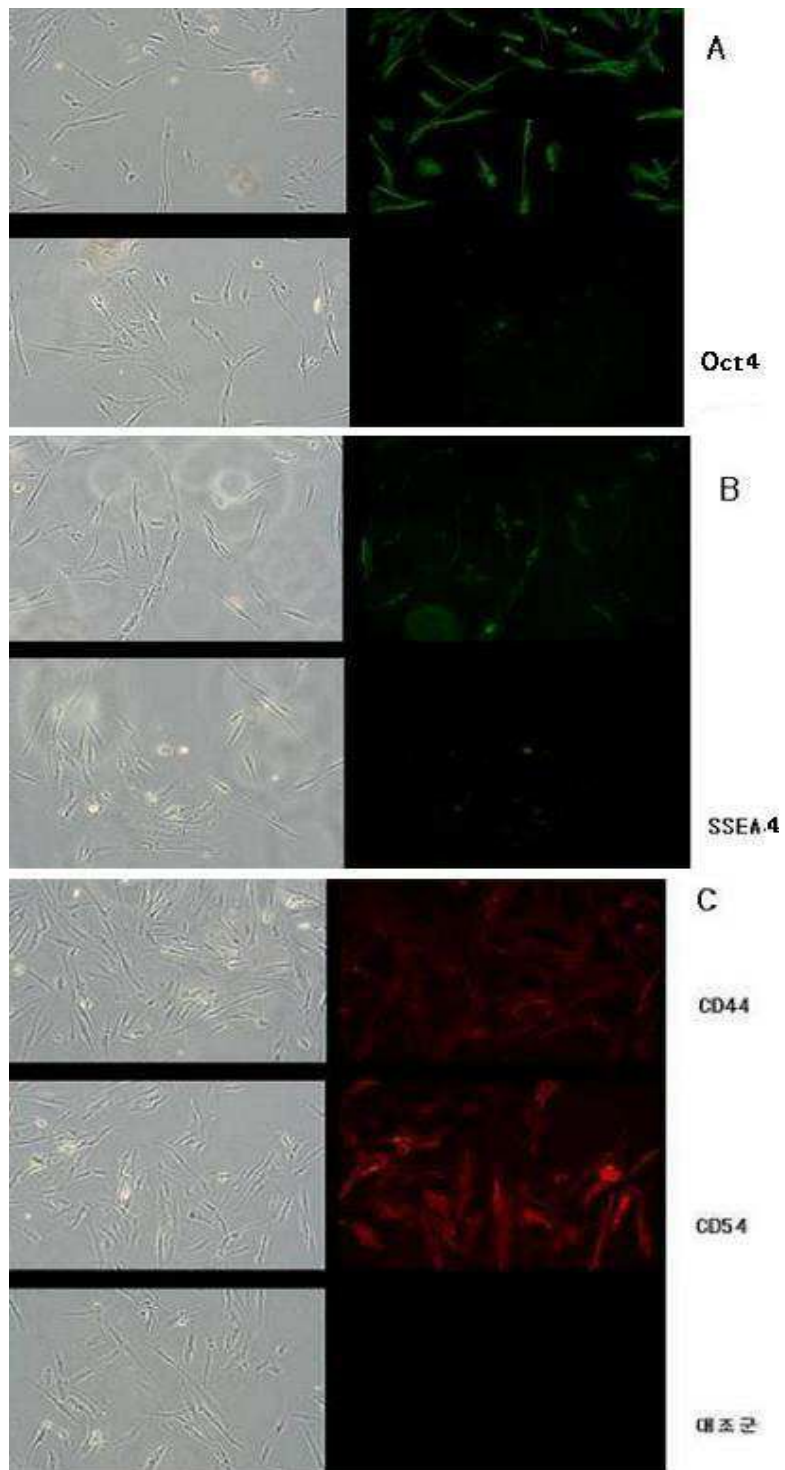
도면8



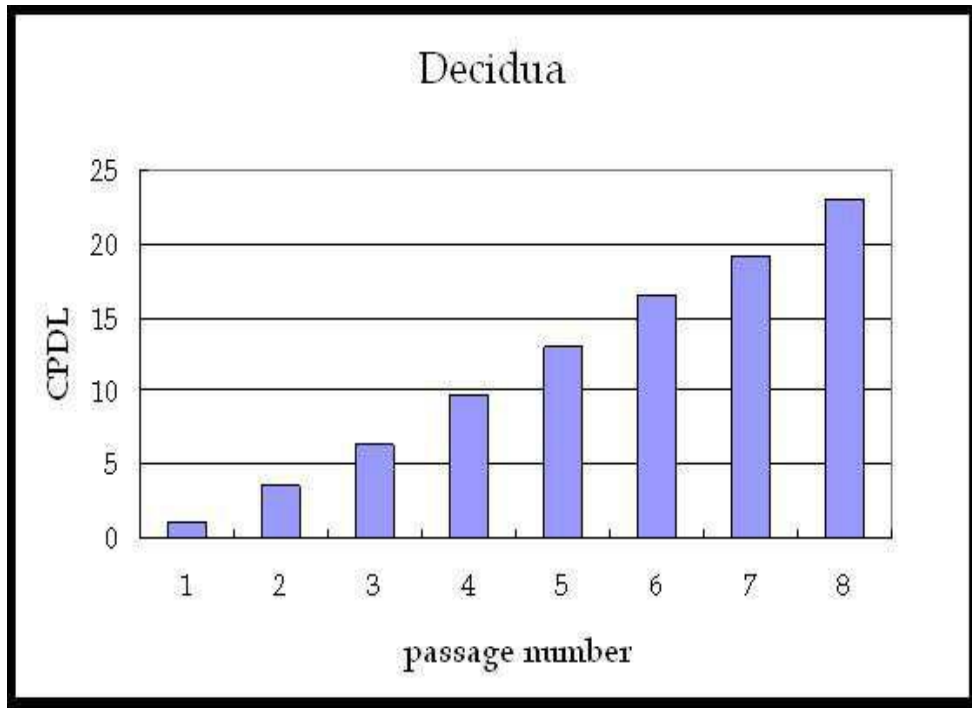
도면9



도면10



도면11



도면12

