(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[8]
C12N 5/08 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0015350
(43) 공개일자 2006년02월16일

(21) 출원번호 10-2006-0009913
(22) 출원일자 2006년02월02일

(71) 출원인 김병수
서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

(72) 발명자 김병수
서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

심사청구 : 있음

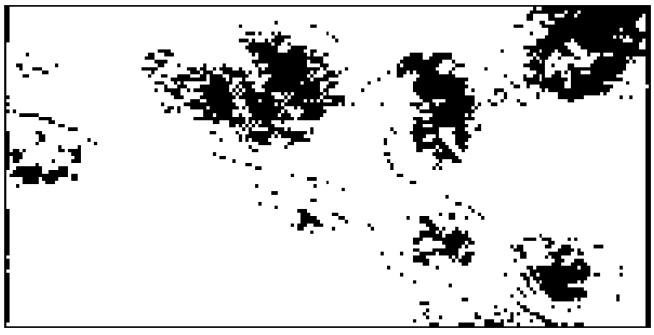
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 SC2220
부처명 과학기술부
연구사업명 뉴프론티어세포응용사업
연구과제명 Telomerase 조절 및 인간유래지지세포를 이용한 줄기세포증식 신기술 개발
주관기관 세포응용사업단
연구기간 2005년 4월 1일 -2008년 3월 31일

(54) 인간 배아줄기세포의 배아체 분화를 위한 인간태반기질세포 생산 및 배아체 분화배양 기술

요약

본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 배아체(embryoid bodies) 생산을 목적으로 분화배양 시 지지세포(feeder cells)로 인간 태반기질세포(human placenta stromal cells)를 적용시키는 기술에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 배아체 생산을 위한 지지세포로 인간 태반기질세포를 사용한 경우 기존의 쥐 유래 지지세포(STO cells)를 적용한 경우보다 그 증식배양 효율은 비슷하거나 매우 양호함을 증명함으로써 인간 배아줄기세포로부터 배아체 생산을 위한 분화 배양을 위하여 인간 태반 기질세포를 적용시키는 본 기술은 인간 배아 줄기세포 분화배양 산물들의 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

대표도



색인어

인간태반기질세포, 인간배아줄기세포, 배아체 분화배양

명세서

도면의 간단한 설명

도 1: 인간 태반기질세포의 모습 (X 40) (위: V9 염색, 아래: 지방세포 분화)

도 2: 인간 태반기질세포 배양 인간 배아줄기세포의 배아체 생산 효율

도 3: 인간 태반기질세포 배양 인간 배아줄기세포 생산 배아체 면역화학염색 모습 (내배엽) (AFP)

도 4: 인간 태반기질세포 배양 인간 배아줄기세포 생산 배아체 면역화학염색 모습 (중배엽) (Hnf3b)

도 5: 인간 태반기질세포 배양 인간 배아줄기세포 생산 배아체 면역화학염색 모습 (외배엽) (Nestin)

도 6: 인간 태반기질세포 배양 인간 배아줄기세포 생산 배아체의 염색체 모습

도 7: 인간 태반기질세포 배양 인간 배아줄기세포 생산 배아체의 유전자 지문 모습

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 배아체(embryoid bodies) 생산을 목적으로 분화배양 시 지지세포(feeder cells)로 인간 태반기질세포(human placenta stromal cells)를 적용시키는 기술에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 배아줄기세포로부터 배아체 생산을 위한 지지세포로 인간 태반기질세포를 사용한 경우 기존의 쥐 유래 지지세포(STO cells)를 적용한 경우보다 그 증식배양 효율은 비슷하거나 매우 양호함을 증명함으로써 인간 배아줄기세포로부터 배아체 생산을 위한 분화 배양을 위하여 인간 태반 기질세포를 적용시키는 본 기술은 인간 배아 줄기세포 분화배양 산물들의 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

인간 배아 줄기세포는 내배엽, 중배엽, 외배엽 분화가 모두 가능한 전분화능(totipotency)을 지니고 있기 때문에 난치병 치료를 위한 중요한 연구대상으로 현재 주목을 받고 있다. 그런데, 현재까지 이와 같은 배아 줄기세포의 분화배양을 위해서는 배아체의 생산이 필수적이다. 그런데 인간 배아줄기세포로부터 배아체로의 분화배양을 위한 지지세포로 쥐 등의 동물에서 유래된 기질세포들이 사용되어 왔으며, 이는 인간 배아 줄기세포 분화배양 산물의 실제 임상 적용을 어렵게 하는 요인으로 작용하고 있는 실정이다. 그러므로, 인간 배아 줄기세포의 분화배양을 위하여 인간 유래 기질세포를 적용하는 기술개발이 필요하며 이에 관련된 연구 및 기술 개발이 전세계적으로 진행이 되고 있다..

본 기술 또한 인간 배아 줄기세포로부터 배아체 생산을 위한 분화배양을 위하여 적용 가능한 인간 유래 기질세포를 탐색하는 과정에서 개발된 것으로, 본 발명과 같이 인간 배아 줄기세포의 분화배양을 위하여 인간 태반기질세포를 적용하여 그 효과를 증명한 내용은 아직 국내외적으로 보고되거나 개발된 바 없었다.

현재, 인간 배아 줄기세포로부터 배아체로의 분화배양은 쥐의 섬유아세포(fibroblast) 및 이를 세포주(cell line)으로 확립한 STO 세포 등 동물 유래 기질세포와의 복합배양 기법을 근간으로 하고 있다.

본 기술은 1998년 인간 배아 줄기세포의 증식 배양이 처음으로 발명된 1998 년 Thomson 등에 의하여 보고된 바 이후 현재까지 표준기술로 자리매김을 하고 있으나 이는 연구목적일 경우에는 모르겠으나 직접 인체에 적용을 하기 위한 목적으로 사용하기에는 문제(인간 배아 줄기세포와 동물 기질세포의 상호 작용 속에서 유전자적으로 변형된 인간 배아 줄기세포의 생산, 동물 유래 병원균의 침범 등)가 있을 수 있다고 여겨진다.

이에 인간 유래 지지세포를 개발하고자 하는 여러 연구(피하 섬유아세포, 자궁내막, 우방 기질세포 등)들이 있었으나 아직 대중적으로 상용화할 수 있는 기술이 개발되지 못하고 있는데, 그 이유는 현재까지 개발된 기술이 다음의 요건을 만족시키지 못하고 있기 때문이다.. 우선 인간 유래 지지세포를 공급하는 사람은 정상인이어야 하고 그 채집과정 중에 심각한 문제를 제공자에게 일으키지 말아야 한다. 또한 인간 유래 지지세포의 공급이 충분하면서도 원활하여야 할 뿐만 아니라 비용-효과 면에서도 적절하여야 한다. 마지막으로 인간 배아 줄기세포의 증식배양 효과가 동물 유래 지지세포와 비견되거나 우월하여야 한다.

본 출원인 등은 인간 배아 줄기세포 및 그 산물을 인간 유래 지지세포와 복합 배양하는 기술을 꾸준히 개발하고 있으며 인간 배아 줄기세포로부터 비롯한 배아체를 인간 골수기질세포와 복합배양하여 조혈모세포의 생산효율이 쥐 유래 기질세포에 비견할 만큼 효과적이었음을 증명한 결과를 국외내 저명학술지에 발표한 바 있었다 (김석진 등, 2004, Kim SJ *et al*, 2005).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 기술개발의 목적은 정상 산모로부터 정상 분만 후 제공자에 해가 없이 채집 가능하면서 추가적 비용 없이 충분한 공급이 가능한 인간 태반기질세포를 지지세포로 이용하여 인간 배아 줄기세포로부터 배아체로의 분화배양 효과가 동물 유래 지지세포와 비견되거나 우월함을 증명함으로써 보다 안전하고 효율적으로 인체에 적용할 수 있는 인간 배아 줄기세포로부터 배아체 생산기술을 개발함에 있다. 이를 위하여 출원인 등은 인간 태반기질세포를 지지세포 적용한 인간 배아 줄기세포로부터 배아체 생산을 시도하면서 그 효과를 쥐 유래 STO 세포를 지지세포로 분화배양한 인간 배아줄기세포와 비교하고 면역화학염색, RT-PCR, 그리고 염색체, 유전자 지문 분석 등을 통하여 증명하였다.

본 기술 발명을 통하여 인간 배아 줄기세포로부터 생산된 배아체를 실제 인간의 세포치료를 위하여 매우 유용하게 응용될 수 있다

발명의 구성 및 작용

본 기술은 인간 배아줄기세포로부터 배아체로의 생산을 위한 인간 태반 기질세포의 정제 생산 및 그의 인간 배아 줄기세포로부터 배아체로의 분화배양에 적용 등 크게 2단계로 이루어 진다.

먼저 정상 분만 후 채집된 태반으로부터 인간 배아줄기세포로부터 배아체 생산을 분화배양을 통하여 속진시키기 위한 인간 태반기질세포의 정제 생산과정은 다음과 같다. 인간 유래지지세포로 사용하는 정상 태반은 분만 후 태반으로부터 융모막 세포를 채취하여 이를 dPBS에 3번 washing하고 수술용 가위로 충분히 잘게 잘라진 조직을 25m^2 flask에 넣고 DMEM 배양액을 2일에 한번 교체해주며 일주일간 배양한다. 본 조직에서 자라나온 태반 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 계대시행 위해 새로운 flask에서 배양한다. 이렇게 만들어진 태반 세포는 mitomycin-C를 처리하여 배양 지지세포로 사용하고 나머지는 계대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장한다. 인간 태반 지지세포 준비는 배양 하루 전에 이루어진다. 0.1% gelatin으로 30분간 coating된 35mm 배양접시에 각각의 세포를 깔고 다음 날 transfer하기 직전에 배양액을 교체한다. 인간 태반 기질세포들이 올바르게 정제, 분리되었는지를 확인하기 위하여 중간엽세포(mesenchymal cells)의 증명을 위한 V9 면역화학염색 및 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)의 증명을 위한 지방세포(adipocyte)분화배양을 실시한다. 본 과정을 통하여 확립된 인간 태반기질세포의 현미경적 모습(X40), V9 면역화학염색 모습(X40), 그리고 지방세포 분화 배양 모습(X40)은 도1과 같다.

본 출원인은 과학기술부 세포응용사업단에서 공인한 배아줄기세포주인 SNUhES-3 (46 X,Y)를 사용하며 SNUhES-3 인간 배아줄기세포로부터 배아체로의 배양기법은 다음과 같다. 우선 SNUhES-3 인간 배아 줄기세포의 배양을 위하여 약 150-300 세포 정도로 구성된 인간 배아 줄기세포 종괴(clump)를 쥐 배아 섬유아세포로 이루어진 지지세포(STO cell, ATCC, USA) 위에 접종한다. 접종된 인간 배아 줄기세포를 DMEM/F-12(GIBCO, USA), 20% Knockout SR(GIBCO, USA), 0.1 mM nonessential amino acid(GIBCO, USA), 0.1 mM β- mercaptoethanol(Sigma, USA), 100 U/ml penicillin G(Sigma, USA), 100 g/mL streptomycin((Sigma, USA), 4 ng/mL recombinant human βFGF(invitrogen, USA)으로 구성된 인간 배아 줄기세포 배양액을 well 당 0.8 mL 를 첨가하여 37℃, 5% CO_2, 습도 95%의 조건에서 배양한다. 배양 48 시간 후 인간 배아 줄기세포가 지지세포 위에 정착하였음을 확인한 후 배양용기로부터 배양액을 제거하고 serum 이 제거된 인간 배아 줄기세포 배양액으로 세척한 다음 다시 인간 배아 줄기세포 배양액을 well 당 0.8 mL 를 첨가한다. 이러한 과정으로 배양액을 48시간마다 교환하였다. 약 6-7 일이 경과하면 인간 배아 줄기세포 종괴가 커지면서 내부에서는 분화가 발생하기 시작하기 때문에 지속적인 현미경 육안 관찰을 통하여 종괴의 크기가 충분히 커지고 내부에

서 분화가 시작되는 증거가 관찰되면 미분화된 인간 배아 줄기세포 종괴를 물리적인 방법으로 분리하여 다시 계대배양을 시행한다. 그리고 배양된 인간배아 줄기세포 종괴는 ALP 염색 및 SSEA 면역화학법으로 배아 줄기세포 주의 성상을 유지하고 있음을 확인한다(도 2). 배아 줄기세포로부터 배아체 분화, 형성을 위하여 배아 줄기세포 종괴를 계대 배양할 때의 크기보다 3-4 배정도 크게 분리한다. 분리된 종괴를 배양액(DMEM-F12, FBS, βFGF, GIBCO BRL, USA)에서 1시간 동안 응집시킨 후 다시 βFGF가 없는 DMEM-F12 배지에 혼합한다. 이를 48시간동안 incubator 에서 배양한 후 pasteur pipette 과 spoid 를 사용하여 종괴를 둥글게 조작하면서 배지를 1/2 정도 교환시켰다. 이런 방법으로 5 일 간 배양하여 배아체를 형성시킨다.

인간 배아줄기세포로부터 배아체로의 분화배양을 위하여 인간 태반 기질세포를 사용한 경우에는 쥐 배아 섬유아세포 대신 인간 태반기질세포를 대신 사용하였을 뿐 나머지 기법은 모두 동일하다. 인간 태반기질세포를 지지세포로 사용하여 인간 배아줄기세포로부터 생산된 배아체의 모습은 요약서의 대표도와 같다.

인간 배아줄기세포로부터 배아체로의 분화배양을 위한 지지세포로 쥐 배아 섬유아세포를 사용한 경우와 본 특허 출원대상인 인간 태반기질세포를 사용한 경우와의 인간 배아줄기세포 증식배양효율을 비교, 분석한다. 그 결과 50 회의 계대배양까지 인간 태반기질세포를 지지세포로 사용한 인간 배아줄기세포로부터 배아체로의 분화배양 효과가 쥐 배아 섬유아세포를 지지세포로 사용한 인간 배아 줄기세포로부터 배아체로의 분화배양 효과보다 더 우수함을 확인할 수 있었다 (도 2)

그리고 생산된 배아체 내에 분화를 위한 외배엽, 중배엽, 내배엽이 다 존재하는지를 확인하기 위한 면역화학염색 결과 모두 양성으로 다분화능을 지니고 있음을 확인한다. 그 결과 인간 태반기질세포를 지지세포로 사용한 인간 배아줄기세포로부터 생산된 배아체에서 3배엽 모두 면역화학염색에 강하게 발현됨을 확인함으로써 생산된 배아체가 다분화능을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. (도 3,4,5) 또한 본 기술의 염색체 및 유전자적 안정성을 확인하기 위하여 시행한 염색체 karyotype 및 유전자 지문 DNA finger print 검사를 시행한다. 그 결과 모두 정상임을 확인함으로써 염색체 및 유전자적으로도 본 기술이 안전함을 확인할 수 있었다. (도 ,76).

이하, 본 발명을 실시 예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시 예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 인간 배아줄기세포 배아체 생산을 위한 인간 태반기질세포 제조 및 배양 기술

본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 배아체 생산을 위한 분화배양을 위한 지지세포로의 역할을 수행할 수 있는 인간 태반기질세포를 제조하기 위한 기술에 관한 것이다.

우선 인간 유래지지세포로 사용하는 정상 태반은 분만 후 태반으로부터 융모막 세포를 채취하여 이를 dPBS에 3번 washing하고 수술용 가위로 충분히 잘게 잘라진 조직을 25m^2 flask에 넣고 DMEM 배양액을 2일에 한번 교체해주며 일주일간 배양한다. 본 조직에서 자라나온 태반 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 계대 시행 위해 새로운 flask에서 배양한다. 이렇게 만들어진 태반 세포는 mitomycin-C를 처리하여 배양 지지세포로 사용하고 나머지는 계대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장한다. 인간 태반 지지세포 준비는 배양 하루 전에 이루어진다. 0.1% gelatin으로 30분간 coating된 35mm 배양접시에 각각의 세포를 깔고 다음 날 transfer하기 직전에 배양액을 교체한다. 인간 태반 기질세포들이 올바르게 정제, 분리되었는지를 확인하기 위하여 중간엽세포(mesenchymal cells)의 증명을 위한 V9 면역화학염색 및 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)의 증명을 위한 지방세포(adipocyte)분화 배양을 실시한다. (도1) 그리고 인간 배아줄기세포와 인간 태반기질세포와의 배양으로 생산된 배아체의 모습을 관찰한다. (도 2) 그 결과 인간 태반기질세포가 V9염색에 양성이고 지방세포로의 분화가 됨을 확인함으로써 인간 태반기질세포의 정제, 분리가 양호하였음과 인간 배아줄기세포와 인간 태반기질세포와의 배양으로 생산된 배아체의 모양이 쥐 배아 섬유아세포의 그 것과 차이가 없음을 관찰함으로써 인간 태반기질세포가 배아체 생산을 위한 인간 배아줄기세포의 지지세포로 양호한 기능을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

실시예 2: 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄기세포로부터 배아체 생산 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 태반기질세포와 인간 배아줄기세포와의 분화배양시 배아체 생산 효율을 증명하기 위하여 인간 배아줄기세포와 쥐 배아 섬유아세포와의 배양에서의 배아체 생산효율과 비교하여 분석하였으며 본 실험은 총 7회 반복되었다..

그 결과 50 회의 계대배양 동안 인간 태반기질세포를 사용한 경우의 배아체 생산효율은 85.4%으로 쥐 배아 섬유아세포를 사용한 81.5% 보다 약간 더 우수하였음을 확인할 수 있었다. (도 2)

실시예 3: 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄기세포 생산 배아체의 다분화능 증명

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄기세포 생산 배아체의 다분화능을 확인하기 위하여 AFP, Sox17 (내배엽), Nestin (외배엽), Hnf3b (중배엽) 면역화학염색을 실시하였다.

그 결과 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄기세포 생산 배아체에서 AFP, Sox17 (내배엽), Nestin (중배엽), Hnf3b (내배엽) 면역화학염색에서 모두 강양성을 보임을 관찰함으로써 인간 배아 줄기세포로부터 비롯한 다분화능을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. (도 3,4,5)

실시예 4: 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄기세포 생산 배아체의 염색체, 유전자 적 안정성 유지 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄기세포 생산 배아체의 염색체, 유전자 적 안정성 유지 확인을 위하여 염색체 karytype 분석과 DNA finger printing 검사(9 short tandem repeat (STR) loci D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S137, D18S51, D21S11, FGA, and VWA)를 실시하였다.

그 결과 인간 태반기질세포와 배양된 인간 배아줄세포 생산 배아체에서 정상 46XY 소견을 보이고 있고 DNA finger printing 검사에서도 기존의 양상과 일치되는 소견을 관찰함으로써 염색체 및 유전자 적으로 안전하게 생산되었음을 확인할 수 있었다. (도 6,7)

발명의 효과

본 발명으로 정상 인간 태반기질세포가 인간 배아줄기세포로부터 분화배양을 통한 배아체생산을 위한 지지세포로 탁월한 기능을 나타냄을 확인할 수 있다. 또한 상기 인간 태반기질세포는 기존 기술인 쥐 배아 섬유아세포를 이용하는 경우보다 안전하면서도 효율적으로 인체에 적용할 수 있는 인간 배아줄기세포 유래 배아체를 생산할 수 있으리라고 기대된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

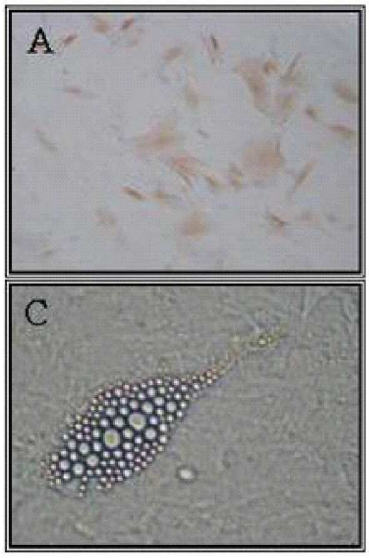
인간 배아줄기세포로부터 배아체 분화를 위한 인간 태반기질세포의 생산

청구항 2.

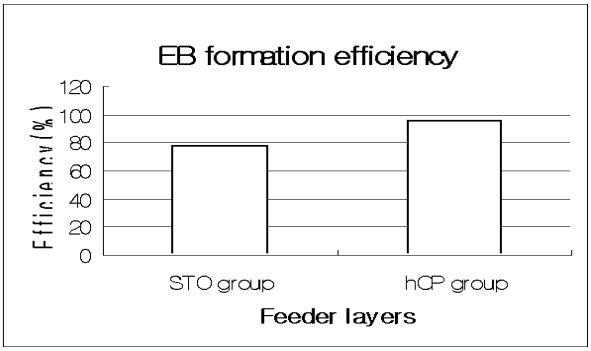
인간 태반기질세포를 이용한 인간 배아줄기세포로부터 배아체 분화배양

도면

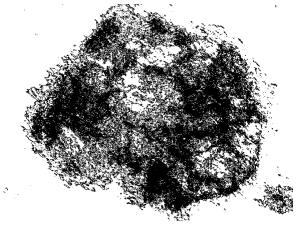
도면1



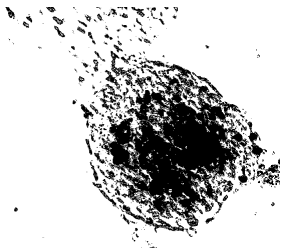
도면2



도면3



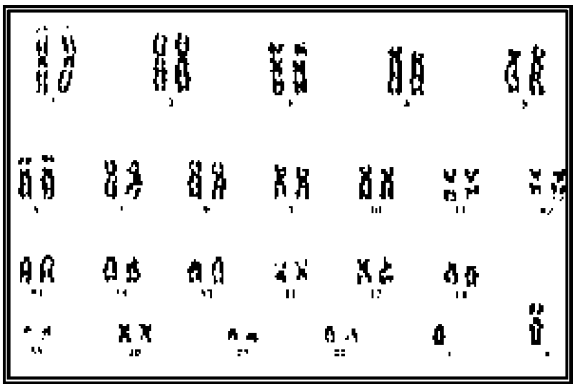
도면4



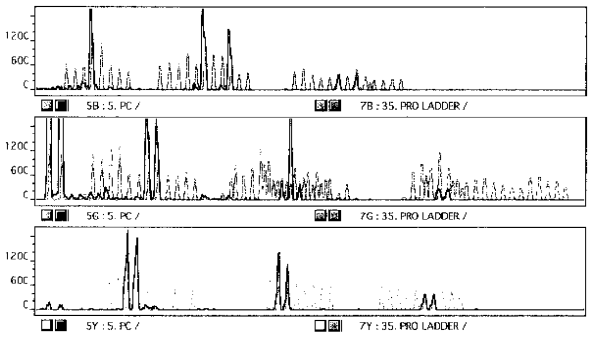
도면5



도면6



도면7


120C
60C
C
5B : 5. PC /
7B : 35. PRO LADDER /
120C
60C
C
5G : 5. PC /
7G : 35. PRO LADDER /
120C
60C
C
5Y : 5. PC /
7Y : 35. PRO LADDER /