



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052587
(43) 공개일자 2012년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0113816

(22) 출원일자 2010년11월16일

심사청구일자 2010년11월16일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

주식회사 휴림바이오셀

서울특별시 강서구 허준로 217, 802호 (가양동, 가양테크노타운)

(72) 발명자

김중훈

서울특별시 용산구 녹사평대로 286, 주공아파트 108동 301호 (이태원동)

우동훈

서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 서관 305호 줄기세포실험실 (안암동5가, 고려대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김선애

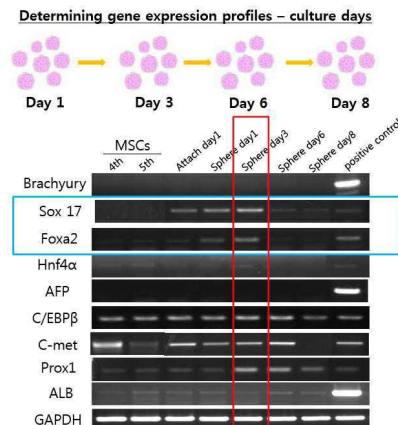
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 중간엽 줄기세포의 내배엽성 세포로의 교차분화 방법

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포를 단일세포(single cell)로 분리하고, 분리한 단일세포 집단으로부터 구체(sphere)를 형성하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 교차 분화 방법을 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 중배엽성 세포인 다양한 중간엽 줄기세포들로부터 완벽한 기능을 하는 간세포 또는 췌장세포를 포함한 내배엽성 세포로의 분화를 유도할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

안수연

서울특별시 중랑구 면목로39길 23 (면목동)

장유진

서울특별시 성동구 고산자로2가길 26 (행당동)

한지유

경기도 의정부시 통일로 451-25, 장암현대1차아파트 102동 1402호 (신곡동)

도병록

서울특별시 양천구 목동중앙남로 100, 101동 604호 (목동, 성원아파트)

김지향

서울특별시 강서구 양천로 590, 등촌 103동 608호 (등촌동, 태영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1003359420101210031001391810033737201012

부처명 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업원천기술개발사업

연구과제명 치료용 제대줄기세포를 이용한 간질환 세포치료제 개발(제대줄기세포의 능동적 분화유도를 통한 기능성 간질환 세포치료제 개발)

주관기관 주식회사 휴림바이오셀

연구기간 2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

중간엽 줄기세포를 단일세포(single cell)로 분리하고, 분리한 단일세포 집단으로부터 구체(sphere)를 형성하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 교차 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 구체 형성 방법은 DMEM-로우 글루코즈(DMEM-low glucose) 배지에 B27을 첨가하고 배양하여 구체를 형성하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 교차 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 구체에 오카다산(okadaic acid; OA)을 처리하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 교차 분화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 교차 분화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 간세포 분화 제제를 첨가하고 배양하여 간세포로 분화하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 6

중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체에 오카다산(okadaic acid; OA)을 처리하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 촉진하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 오카다산(okadaic acid; OA)를 5nM로 처리한 후 추가로 2일간 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 촉진하는 방법.

청구항 8

DMEM-로우 글루코즈(DMEM-low glucose) 배지에 B27을 첨가한 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 배지는 오카다산(okadaic acid; OA)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 조성물.

청구항 10

제5항의 방법에 의해 분화된, 세포, 이의 자손, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 내배엽성 세포 유래 장기의 질환 치료를 위한 세포 치료제 조성물.

명세서

기술 분야

본 발명은 중간엽 줄기세포의 내배엽성 세포로의 교차 분화(transdifferentiation) 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게 본 발명은 완벽한 기능을 하는 간세포 등 내배엽성 세포 생산을 위해, 구체 형성을 통해 중배엽성 유래 세포인 중간엽 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 방법 및 이를 이용한 세포치료제 조

[0001]

성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 성체줄기세포의 하나인 중간엽 줄기세포는 성체의 골수, 제대혈을 포함한 말초혈액, 근육, 지방조직 등에서 분리되며 연구 결과에 의하면 중간엽 줄기세포가 중배엽성 유래의 연골, 뼈, 지방세포로도 분화할 수 있고 이들 중배엽성 조직외에도 외배엽성의 신경세포 및 내배엽성의 간장세포로도 분화한다는 사실들이 확인되었다.
- [0003] 이러한 제대 유래 줄기세포를 포함한 중간엽 줄기세포는 배아줄기세포에 반해, 윤리적인 문제 및 면역 거부반응 없이 세포치료제로써 이용할 수 있기에, 여러 질환에 대한 세포치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 하지만, 중간엽 줄기세포는 그 유래가 중배엽성 세포이기 때문에, 간질환, 췌장질환을 포함한 내배엽성 세포 유래 장기의 질환 치료를 위하여, 중간엽 줄기세포로부터 간세포, 췌장 세포를 생산하기 위해서는 중배엽성 세포인 중간엽 줄기세포를 내배엽성 세포로 유도하는 교차분화(transdifferentiation)가 선행되어야 한다. 그러나, 중간엽 줄기세포를 이용하여, 간세포 또는 췌장세포 등 내배엽성 세포를 분화 유도하는데에 이러한 과정이 생략되어 있어, 일부 간세포 및 췌장세포의 특성을 가지고는 있지만, 완벽한 기능을 하는 기능성 간세포 및 췌장세포의 분화 유도를 할 수 없는 문제점이 있다.
- [0005] 한편, 내배엽성 유래 세포 중, 간은 다른 기관에 비해 현저하게 높은 재생능력을 갖는다. 그러나 간질환 환자들에게 일반적으로 행해지는 현재의 간 이식 기술은 면역거부반응, 공여자의 희소성 그리고 높은 수술비용 등의 많은 문제점으로 인해 그 수혜자가 극히 제한적이다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 간 이식의 대체물(alternative source)로 떠오르는 것이 줄기세포를 이용하여 분화시킨 간세포의 이식이다. 줄기세포의 경우 무한 증식능력을 갖기 때문에 그 분화 기작이 규명된다면 세포 대체 치료법 (cell replacement therapy)의 무한한 소스가 될 것이며, 따라서 설치류 배아 줄기세포로부터 간세포를 분화시키는 기작을 규명하려는 많은 연구가 이루어지고 있으나 그 결과는 만족스럽지 못한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 완벽한 기능을 할 수 있는 내배엽성 유래 간세포 등의 생산을 위하여, 제대 유래 줄기세포를 포함한 중배엽성 세포인 중간엽 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 교차 분화 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 중간엽 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 생산된 내배엽성 세포를 포함하는 간질환 또는 췌장질환을 포함한 내배엽성 세포 유래 장기의 질환 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 단일세포(single cell)로 분리하고, 분리한 단일세포 집단으로부터 구체(sphere)를 형성하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 교차 분화 방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 '구체 (sphere)'는 줄기세포의 분화 초기에 줄기세포들이 뭉쳐 동그란 공 모양의 세포덩어리인 응집체를 의미한다.
- [0012] 본 발명의 분화 방법에 있어서, 줄기세포로부터의 구체의 형성은 일반적으로 사용되는 공지의 부유 응집배양법, 현적 (hanging drop) 배양법 및 영양세포(feeder)를 이용한 공배양법 (co-incubation method) 등을 통해 당업자에게 잘 알려진 방법을 통해 이루어질 수 있다.

- [0013] 바람직하게는 상기 구체 형성 방법은 DMEM-로우 글루코즈(DMEM-low glucose) 배지에 B27을 첨가하고 배양하여 구체를 형성하는 것을 특징으로 한다. 이 때 부유 배양(suspension culture)을 할 경우, 인접한 세포들 사이에 활발한 상호작용으로 인해 세포의 분화 유도에 이점이 있다. 상기 DMEM-로우 글루코즈(DMEM-low glucose) 배지는 바람직하게는 5-10mM의 포도당을 함유하며, 더욱 바람직하게는 7-8mM의 포도당을 함유한다. 또한, 바람직하게 B27은 0.5 - 1%로 첨가된다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 구체에 오카다산(okadaic acid; OA)을 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이런 구성에 의해 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0015] 바람직하게는 미분화 줄기세포를 1-3일간 배양하여 구체를 형성한 후, 여기에 오카다산을 1-3일간 처리하여 줄기세포를 분화하는 방법을 제공한다. 더욱 바람직하게는 미분화 줄기세포를 1일간 배양하여 구체를 형성한 후, 여기에 오카다산을 2일간 처리하여 줄기세포를 분화하는 방법을 제공한다. 상기 방법에서 오카다산은 배양액에 1-15nM의 농도, 바람직하게는 5nM 농도로 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명에서, 상기 '중간엽 줄기세포'는 이에 한정되는 것은 아니나 골수, 제대혈을 포함한 말초혈액, 근육 및 지방조직 등에서 분리되는 것을 포함한다. 바람직하게는 제대 유래 중간엽 줄기세포이다. 상기 제대혈 줄기세포는, 다른 배아 줄기세포처럼 인체 내에서 기형종이나 기형암을 발생시킬 가능성이 없다는 장점이 있으므로 대중화 요법에 유리하다.
- [0017] 본 발명에서, 상기 '내배엽 세포'는 완전 내배엽(definitive endoderm, DE) 세포를 의미한다. 완전 내배엽이란 분화 발달 과정에 따라 나누어지는 Visceral Endoderm, primitive endoderm, mesoendoderm 및 definitive endoderm의 하나로써 갑상선, 흉선, 췌장, 간, 폐, 호흡기관 및 소화기관의 내막으로 분화할 수 있는 내배엽 세포를 의미한다. 따라서, 본 발명의 내배엽 세포는 간세포나 인슐린을 생산하는 베타세포로 분화될 수 있다(Wei Jiang, et al., Cell Research (2007) 17: 333-344).
- [0018] 본 발명은 또한 간세포 분화 제제를 첨가하고 배양하여 간세포로 분화하는 단계를 더 포함하는 방법을 제공한다.
- [0019] 상기 '간세포 분화 제제'는 줄기세포의 분화에 의해 획득되는 내분비 세포를 간세포 및/또는 간세포 전구세포로 분화촉진하는 생물학적 또는 합성 화합물(예로, 펩티드, 올리고당 등)을 의미한다. 예로, 간세포 계통 세포의 성장을 촉진할 수 있는 가용성 성장 인자(펩티드 호르몬, 시토카인, 리간드-수용체 복합체 등)가 있다. 가용성성장 인자의 예로는 표피 성장 인자(epidermal growth factor, 이하 "EGF"로 약칭함), 인슐린, 형질 전환 성장인자(transforming growth factor, 이하 "TGF"라 약칭함)- α , TGF- β , 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, 이하 "FGF"라 약칭함), 헤파린, 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor, 이하 "HGF"로 약칭함), 덱사메타존(dexamethazone) 존재하의 온코스타틴 엠(oncostatin M, 이하 "OSM"으로 약칭함), 인터류킨(interleukin, 이하 "IL"이라 약칭함)-1, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자(insulin-like growth factor, 이하 "IGF"라 약칭함)-I, IGF-II, 헤파린-결합 성장 인자(heparin-binding growth factor, 이하 "HBGF"라 약칭함)-1 및 글루카곤(glucagon)이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 간세포 분화 제제로는 코르티코이드(corticoid), 특히 당질코르티코이드(glucocorticoid)가 있다. 상기 화합물은 스테로이드 또는 스테로이드 모방제(steroid mimetic agents)로 중간대사, 특히 간의 글리코겐(glycogen) 축적 및 염증 억제에 영향을 미친다. 코르티솔(cortisol)로 예시되는 천연 생성 호르몬 및 합성 글루코코르티코이드, 예컨대 덱사메타존(dexamethazone)(미국 등록특허 US 3,007,923) 및 그 유도체, 프레드니손(prednisone), 메틸프레드니손(methylprednisone), 히드로코르티손(hydrocortisone) 및 트리암시놀론(triamcinolone)(미국 등록특허 US 2,789,118) 및 그 유도체가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 간세포 분화 제제로는 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, 이하 "DMSO"라 약칭함)와 같은 유기 용매로, 디메틸아세트아미드(dimethylacetamide, 이하 "DMA"라 약칭함), 헥사메틸렌 비스아세트아미드(hexamethylene bisacetamide, 이하 "HMB"라 약칭함)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명에 따라 제조된 내배엽 전구세포(SOX17+)는 종래 알려진 방법(Evert Kroon, et al., NATURE BIOTECHNOLOGY (2008); 26_4_443)에 따라 레티노산과 니코틴산을 포함하는 배양액에서 배양함으로써 내분비세포를 거쳐 베타세포로 분화될 수 있다. 분화된 베타세포는 인슐린을 분비할 수 있으므로 당뇨병 치료를 위한

세포 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

- [0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체에 오카다산(okadaic acid; OA)을 처리하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0022] 바람직하게는 상기 오카다산(okadaic acid; OA)을 배양액에 1-15nM의 농도로 1-3일간 처리하여 내배엽성 세포로의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다. 더욱 바람직하게는 상기 오카다산을 5nM로 처리한 후 추가로 2일간 배양한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 DMEM-로우 글루코즈(DMEM-low glucose) 배지에 B27을 첨가한 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포에서 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는 조성물을 제공한다. 상기 DMEM-로우 글루코즈(DMEM-low glucose) 배지는 바람직하게는 5-10mM의 포도당을 함유하며, 더욱 바람직하게는 7-8mM의 포도당을 함유한다. 또한, 바람직하게 B27은 0.5 - 1%로 첨가된다.
- [0024] 바람직하게는 상기 배지는 오카다산(okadaic acid; OA)를 더 포함한다. 상기 오카다산에 의해 내배엽성 세포로의 분화가 촉진된다. 오카다산은 단백질 포스파타제 2A(protein phosphatase: PP2A) 억제제로 c-myc의 분해를 억제하여 안정성을 증가시킨다고 보고되었으나(Yeh E et al. Nat Cell Biol 2004,6:308-318), 중간엽 줄기세포의 분화와 관련하여 알려진 바는 없다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 분화 방법에 의해 분화된, 세포, 이의 자손, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 내배엽성 세포 유래 장기의 질환 치료를 위한 세포 치료제 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 이에 한정되는 것은 아니나 내배엽 세포는 간질환 또는 췌장질환 치료용 세포 치료제 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 바람직하게는 급성, 만성 또는 유전적간 기능 손상의 치료에 필요한 간기능 회복을 위한 치료용 조성물, 더욱 바람직하게는 유전적 간 기능 손상을 위한 치료용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 간 기능 손상에는 간염, C형 간염(hepatitis C), 유육종증, 약물 알레르기, 지방간, 알코올성 간질환, 간암, 간경변증, 임신 중독증, 비호지킨 림프종, 라이 증후군, 기타 신생아 황달, 가와사키병, 루푸스, 칸디다증, 말라리아, 렙토스피라증, 탕기열, 간흡충증, 급성 간경화, 만성 간경화, 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases), 및 담관질환(bile duct disease) 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases)에는 윌슨병(wilson disease), 타이로신혈증 (tyrosinemia), 혈색소침착증(hemochromatosis), 당원병(glycogen storage disease)를 포함되나 이에 한정되지 않으며, 상기 담관질환(bile duct disease)에는 담도폐쇄(biliary atresia), 원발성 담즙성 경화(primary biliary cirrhosis(PBC)), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis (PSC))이 포함되나 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 치료용 조성물은 투여 방식에 따라 허용 가능한 담체를 포함하여 적절한 제제로 제조될 수 있다. 담체(들)는 제형의 다른 성분들과 양립하고, 이것의 수용자에게 무해해야 한다는 점에서 허용될 수 있어야 한다. 투여 방식에 적합한 제제는 공지되어 있으며 전형적으로 막을 통과하는, 이동을 용이하게 하는 제제를 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 치료용 조성물은 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구용 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 또는 동결건조제, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 또는 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 또는 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0032] 또한, 본 발명의 치료용 조성물을 이용하여 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상을 치료하는 방법은 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질이 도입되는 일반적 경로를 통하여 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 투여 방법으로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러나 경구 투여시, 세포가 소화될 수 있으므로 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서 분해되는 것을 보호하기 위해 제형화 하는 것이 바람직하다.
- [0033] 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제 또는 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액 또는 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르2(예로, 올레인산에칠 등), 알코올류(예로, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜 또는 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제 (예로, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예로, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약제학적 담체를 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 치료용 조성물을 이용하여 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상을 치료하는 방법은, 본 발명의 치료용 조성물을 약학적으로 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 약학적 유효량은 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0034] 한편, 본 발명의 투여량은 바람직하게는 사람 간의 1~4% mass에 해당하는 $10^7 \sim 10^{10}$ 개의 세포이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 실시예 있어서, 줄기세포를 이용한 세포 배양 및 발생, 세포 생물학 실험의 일반적 방법에 대해 당업계의 표준적인 참고서적을 참조할 수 있다. 그 예로는, Guide to Techniques in Mouse Development (Wasserman등 편저, Academic Press, 1993); Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro (M. V. Wiles, Meth.Enzymol. 225:900, 1993); Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual (Hogan 등 편저, ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1994); Embryonic Stem Cells (Turksen 편저, Humana Press, 2002)가 포함된다.
- [0036] 이하, 본 발명에 대해서 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 설명한다.
- [0037] 본 발명은 제대로부터 추출한 중간엽 줄기세포(Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UCDSCs)를 단일세포(single cell)로 분리하여, 분리한 단일세포 집단으로부터 구체(sphere)를 형성하여, 중배엽성의 제대 유래 줄기세포에서 내배엽성 세포로 분화 유도 하였으며, 형성된 구체에 세포의 발생과정에서 세포 증식 및 분화 조절에 관여하는 protein phosphatase 1 (PP1), protein phosphatase 2A (PP2A) 및 protein phosphatase 2B (PP2B)를 억제할 수 있는 오카다산(okadaic acid (OA))를 처리하여, 내배엽성 세포로의 교차분화를 촉진하는 단계로 구성된다.
- [0038] 본 발명의 기술에서 사용된 제대 유래 중간엽 줄기세포는 분화를 유도하지 않았을 시 내배엽성 세포 분화에 절대적인 역할을 하는 유전자인 Foxa2 및 Sox17을 발현하지 않았으며 (도 1), Foxa2 및 Sox17 단백질 표지 인자 또한 발현하지 않고 있음을 확인하였다(도 2).
- [0039] 본 발명에 있어서 사용한 내배엽성 세포 유도 방법은 제대 유래 중간엽 줄기세포를 단일 세포(single cell)로 분리하여, 구체(sphere)를 형성하는 것으로 구성된다(도 3). 단일세포의 제대 유래 중간엽 줄기세포를 DMEM-LG (DMEM low glucose) 배지에 1XB27을 첨가하여 배양시, 인접한 단일 세포의 제대 유래 줄기세포들이 모여 구체를 형성한다. 일반 부착 배양법(attached monolayer culture)와는 다르게 구체를 형성하여 부유 배양(suspension culture)을 할 경우에는 인접한 세포들 사이에 활발한 상호작용으로 인해 세포의 분화 유도에 이점이 있다. 이렇게 형성된 구체를 지속적으로 DMEM-LG + B27 배양액에 배양 시, 배양 3일 후에 분화를 유도하지 않은 제대 유래 중간엽 줄기세포에서는 발현하지 않았던 Foxa2 및 Sox17 유전자가 발현이 증가함을 확인하였다(도 4).

[0040] 본 발명에 있어서 사용한 내배엽성 세포 유도 방법은 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체에 Okadaic acid (OA)를 처리함으로써, 내배엽성 세포 분화 유도에 중요한 역할을 하는 유전자의 발현을 증가 시키는 것으로 구성된다. 분화를 유도하지 않은 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 구체를 형성하여, 배양 1일째에 5nM, 10nM, 15nM 및 20nM OA를 각각 처리하여, 2일간 추가 배양시, 구체의 형태는 지속적으로 유지되는 동시에(도 5), 5nM OA를 처리했을 때, OA를 처리하지 않고 배양한 구체에 비하여, 내배엽성 세포 분화 유도에 중요한 역할을 하는 Foxa2 및 Sox17 유전자가 현저히 증가함을 확인하였다(도 6).

발명의 효과

[0041] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 구체 형성을 통한 내배엽성 세포로의 교차 분화 유도 방법은 중배엽성 세포인 다양한 중간엽 줄기세포들로부터 완벽한 기능을 하는 간세포 또는 체장 세포를 포함한 내배엽성 세포로의 분화를 유도할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

[0042] 즉 본 발명은 기능성을 지닌 진정한 내배엽성 유래 세포 분화 유도 방법 및 내배엽성 세포 유래 장기의 질환 치료를 위한 세포치료제 개발에 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 제대 유래 중간엽 줄기세포의 유전자 발현 특성 분석에 관한 도면이다. 제대로부터 줄기세포를 분리 후, 4번째 계대와 5번째 계대의 세포의 전분화능 관련 유전자(nanog, oct4), 내배엽성 세포 관련 유전자(Brachyury, Mixl 1, Sox17, Foxa2) 및 외배엽성 세포 관련 유전자(pax6, sox1, nestin)의 발현을 확인한 결과, 내배엽성 세포의 특성을 대변하는 brachyury, foxa2 및 sox17은 발현하지 않고 있음을 확인하였다.

도 2는 제대 유래 중간엽 줄기세포의 단백질 표지 인자 발현 특성 분석에 관한 도면이다. 제대로부터 줄기세포를 분리 후, 4번째 계대와 5번째 계대의 세포의 내배엽성 세포 관련 단백질 표지 인자(Brachyury, foxa2 및 sox17)의 발현 양상 및 초기 간세포 관련 표지인자(AFP)의 발현 양상을 분석한 결과, 도 1의 유전자 분석 결과와 마찬가지로, 내배엽성 세포 관련 단백질 표지 인자 및 초기 간세포 관련 표지인자를 발현하지 않고 있음을 확인하였다.

도 3은 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 구체(sphere)를 형성하여 배양하는 방법에 관한 도면이다. 제대 유래 중간엽 줄기세포를 단일 세포(single cell)로 분리(A)하여, DMEM-low glucose (DMEM-LG)에 1X B27을 첨가하여 1일간 배양하여 구체를 형성하였고(B), 형성된 구체는 DMEM-LG + B27 배지에서 3일간 그 형태를 유지하여 배양됨을 확인하였다.

도 4는 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체의 배양 기간에 따른, 내배엽성 세포 관련 유전자(Brachyury, foxa2 및 sox17) 및 초기 간세포 분화 관련 유전자(Hnf4a, AFP, C/EBP β , c-met, prox1, 및 ALB)의 발현 양상을 분석한 도면이다. 그 결과 구체 형성 후 3일째에 내배엽성 세포 분화에 절대적인 영향을 미치는 foxa2 및 sox17이 다른 배양기간에 비해 증가함을 확인하였다.

도 5는 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체에 오카다산(okadaic acid (OA))를 농도별로 처리하였을 때의 구체 형태를 보여주는 도면이다. 구체 형성 1일째에 5nM OA (A), 10nM OA (B), 15nM OA (C) 및 20nM OA (D)를 처리하여, 2일간 추가 배양시에도 구체의 형태가 계속 유지됨을 확인하였다.

도 6은 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체에 오카다산(okadaic acid (OA))를 처리한 구체의 전분화능 관련 유전자(oct4), 내배엽성 세포 관련 유전자(Brachyury, Mixl1, foxa2 및 sox17) 및 초기 간세포 분화 관련 유전자(Hnf4a, AFP, C/EBP β , c-met, prox1, 및 ALB)의 발현 양상을 분석한 도면이다. 그 결과 5nM OA를 2일간 처리하였을 때, 내배엽성 세포 분화에 절대적인 영향을 미치는 foxa2 및 sox17이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0045] 실시예 1: 제대 유래 중간엽 줄기세포의 구체 형성

[0046] 부착배양(attached monolayer culture)한 제대 유래 중간엽 줄기세포에 0.5% 트립신(trypsin)을 처리하여, 단일 세포(single cell)로 분리한 후, 단일 세포 중간엽 줄기세포 집단을 부유 배양접시에 옮겨, DMEM low glucose (DMEM-LG, GIBCO에서 구입)에 1XB27 (GIBCO에서 구입)을 첨가한 배지에 1일간 배양하여, 구체 (sphere) 형성을 유도 하였다.

[0047] 실시예 2: 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체의 배양 및 내배엽 분화 분석

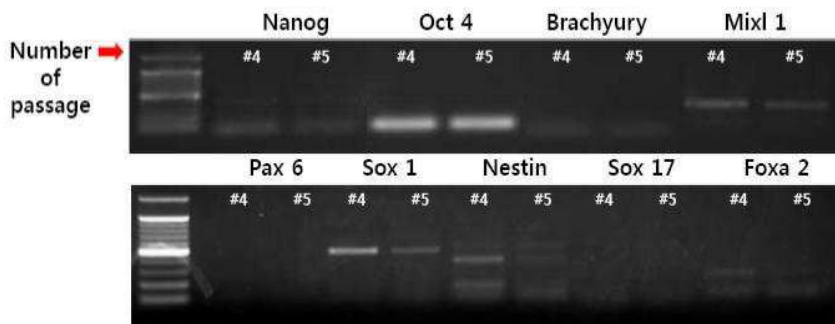
[0048] 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체를 구체를 형성한 동일한 배지(DMEM-LG + B27)에 3일, 6일, 8일간 추가 배양하여, PCR을 통해 내배엽성 관련 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

[0049] 실시예 3: 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체의 내배엽성 분화 촉진

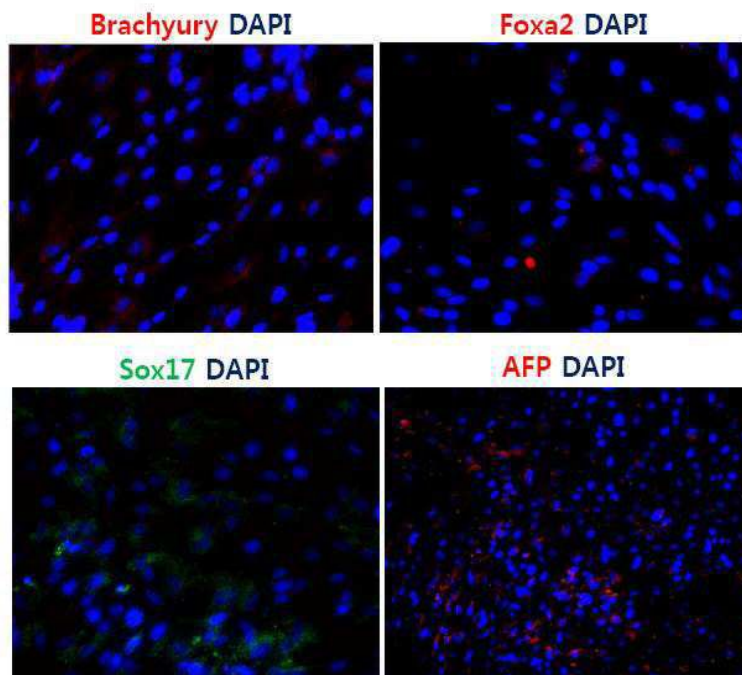
[0050] 제대 유래 중간엽 줄기세포로부터 형성된 구체 형성 1일째에, 5nM 오카다산(okadaic acid (OA)), 10nM OA, 15nM 5A 및 20nM OA가 첨가된 DMEM-LG + B27 배지에 2일간 추가 배양하여, 제대 유래 중간엽 줄기세포의 내배엽으로의 분화를 촉진하였고, PCR을 통해 확인하였다.

도면

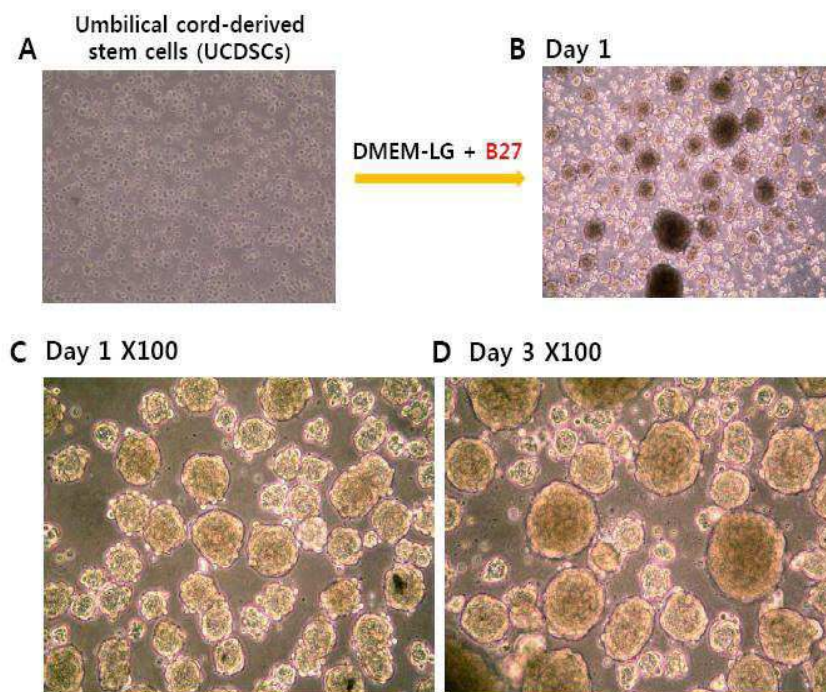
도면1



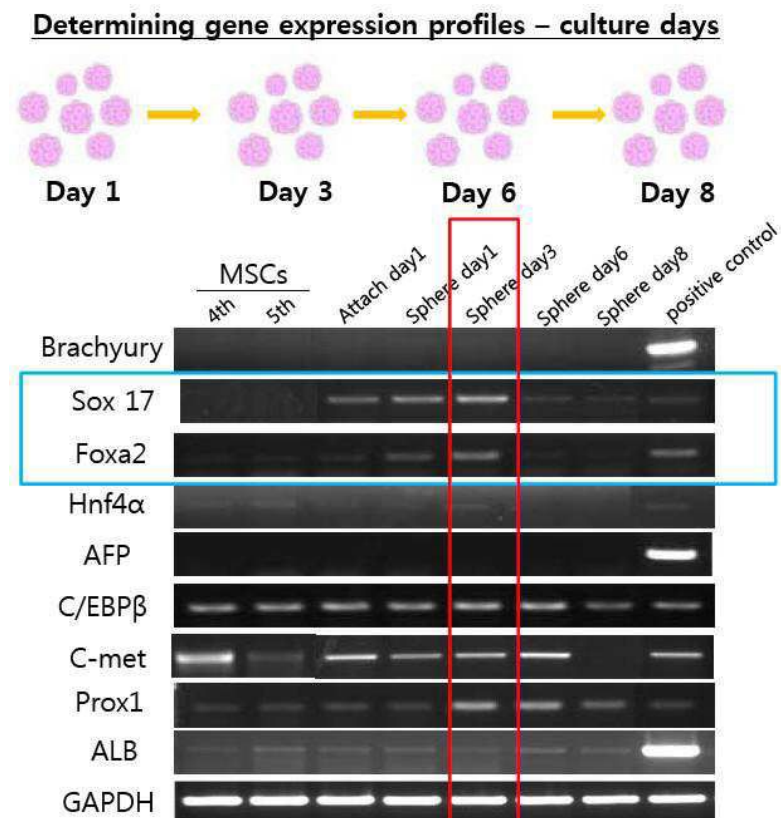
도면2



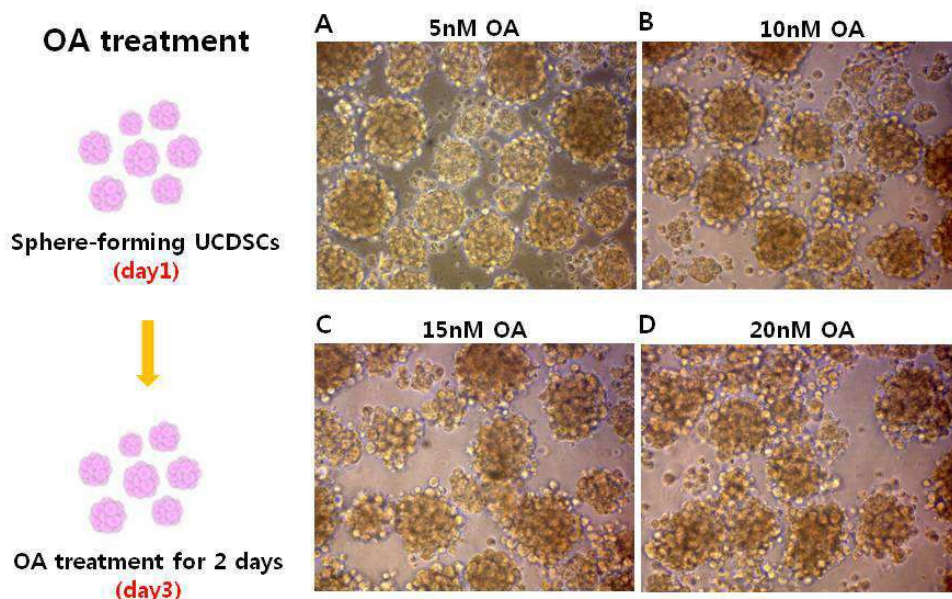
도면3



도면4



도면5



도면6

