(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0067277
(43) 공개일자 2010년06월21일

(51) Int. Cl.
C12N 5/07 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0125758
(22) 출원일자 2008년12월11일
심사청구일자 2008년12월11일

(71) 출원인
피더블유제네틱스코리아 주식회사
경기도 평택시 청북면 율북리 1026 어연한산산업단지 4-4
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
노규진
경상남도 진주시 평거동 190 들말 대경아파트 107동 1501호
박봉욱
경상남도 진주시 가좌동 제1풍경체 아파트 105동 503호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정승훈, 권혁성, 안미정

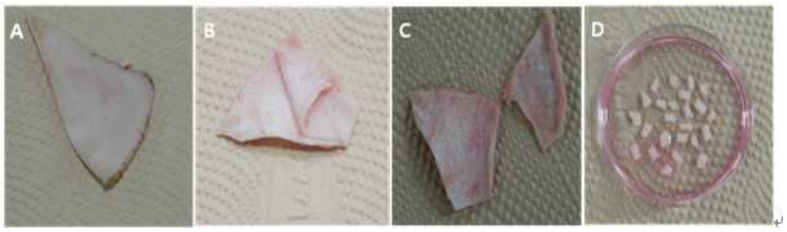
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 포유동물 피부유래 줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법

(57) 요 약

본 발명은 포유동물의 피부 줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법에 대한 것이다. 좀더 구체적으로 본 발명은 i)포유동물의 피부에서 성체 줄기세포를 분리하는 단계; ii)상기 줄기세포를 배양하는 단계; 및 iii)상기 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 베타글리세로인산나트륨(sodium β-glycerophosphate) 및 아스코브산(ascorbic acid)을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 배양하여 골세포 분화를 유도하는 단계;를 포함하는 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 얻어진 골세포는 골 결손부 시술에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강은주

경상남도 진주시 가좌동 660 가좌주공아파트 201동 703호

류 토마스

미국 뉴저지 엣지워터 시티 피엘 6113

특허청구의 범위

청구항 1

ⅰ)포유동물의 피부에서 성체 줄기세포를 분리하는 단계;

ii)상기 줄기세포를 배양하는 단계; 및

iii)상기 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 베타글리세로인산나트륨(sodium β-glycerophosphate) 및 아스코브산(ascorbic acid)을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 배양하여 골세포 분화를 유도하는 단계;

를 포함하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기세포를 분리하는 단계는 피부 표면의 털을 제거하는 단계; 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 세척하는 단계; 진피층과 표피층을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 줄기세포를 배양하는 단계는 우태혈청(Fetal Bovine Serum; FBS), 내피성장인자(endothelial growth factor;EGF), 기본 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 암포테리신 비(Amphotericin B)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)-F12에 배양시키는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 줄기세포를 배양하는 단계는 38.5℃, 5% CO_2 과포화상태에서 배양하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 줄기세포를 배양하는 단계는 배양 2일째 계대배양하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 계대배양은 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid :EDTA)을 이용하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 골세포 분화를 유도하는 단계는 상기 줄기세포를 배양하는 단계에 있어서, 세 번째 계대단계의 70% confluence된 상태의 줄기세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 덱사메타손(dexamethasone)은 10 ~ 100 nM 만큼 사용하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 베타글리세로인산나트륨(sodium β-glycerophosphate)은 10 mM만큼 사용하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 아스코브산(ascorbic acid)은 50 uM만큼 사용하는 것을 특징으로 하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 조직공학은 생명과학과 공학의 기본개념과 기술을 통합 응용하여 생체 조직의 구조와 기능 사이의 상관 관계를 이해하고 나아가서 생체 조직의 대용품을 만들어 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 응용학문이다.

[0002] 조직공학 중에서도 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 담체를 생체 조직에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 형성하게 하는 일련의 기법을 생체조직공학이라고 한다. 생체 조직공학은 세포 배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합이다. 이와 같은 생체 조직공학은 오늘날 다방면으로 연구되어 인체의 특정부위에 손상을 입은 환자의 치료에 유용하게 활용되고 있다.

[0003] 최근에는 환자의 자가세포로부터 줄기세포를 채취하여, 손상된 조직으로 재생하는 조직공학적 치료방법이 각광을 받고 있다. 환자의 자가세포로부터 채취한 줄기세포를 배양하고 특정조직으로 분화를 유도하여 이를 환자의 결손부 조직에 이식할 경우, 이식거부반응이 없어 유용하다.

배 경 기 술

[0004] 사람간의 최초의 성공적인 장기 이식은 1954년 조셉 머레이(Josep Murray)에 의하여 시도된 일란성 쌍생아 형제간의 신장이식이었다. 그 후 많은 발전을 거듭한 끝에 사람의 장기 이식은 1970년대 후반부터는 새로운 면역 억제제의 개발과 마취 및 수술 기법의 발달로 심장, 간, 췌장 및 폐 등의 인간 장기 모든 분야에까지 확대되고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 이식수술의 발전은 인류의 건강 증진에 매우 중요한 역할을 하였으나 점차 필요로 하는 장기의 수보다 기증되는 장기의 수가 현저히 부족하게 되어 한계에 다다랐고, 이러한 문제점을 해결하고자 동물의 장기를 사람에게 이식하는 소위 이종 이식을 연구하여 보기도 하였으나 오랜 시간 사용시 거부반응과 감염 등의 문제가 발생하여 자주 교환하여 주어야 하고, 거부반응이나 감염 등의 문제가 없다 하더라도 기능상으로 생명을 유지하기에는 현저히 뒤떨어지는 문제가 있었다.

[0006] 이러한 문제점을 해결하고자 인체 내에 거부 반응이 전혀 없는 생체 적합성이 뛰어난 생체 재료를 개발하거나 환자 자신의 세포로부터 손상된 장기를 대체하려는 생체 조직 공학적인 접근 방법이 연구되고 있다.

[0007] 먼저 생체 적합성이 뛰어난 인공 생체 재료에는 인체 내에서 존재하거나 자연에서 얻을 수 있는 천연 재료가 있고 각종 폴리머로 대표되는 인공 재료가 있다. 천연 재료에는 키틴이나 키토산 등이 있고 인공재료에는 폴리우레탄과 실리콘 고무 등의 합성 고분자가 있는데 이들 재료는 물리 화학적 표면 성질 또는 기계적 성질을 다양하게 변화시킬 수 있다는 장점이 있으나 시간이 흐름에 따라 혈액 등의 응고가 일어나 영구적으로 인체 내에서 사용할 수 없다는 단점을 지니고 있다. 따라서 이를 보완하기 위하여 환자 자신의 세포로부터 손상된 장기를 대체하려는 생체 조직 공학적인 방법이 많이 연구되고 있다.

[0008] 골이식술의 가장 이상적인 치유양상은 이식재의 완전한 숙주골화다. 그러나 이식재의 기원이나 처리과정에 따라 골의 치유 양상이 다른 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 조직 재생과정에서 생체 내 이식 후 특정 조직 및 장기 특이적으로 분화할 수 있는 능력이 있고, 또한 본래 세포 특성과 다르게 타 조직의 세포로 전이 분화할 수 있는 성체 줄기세포의 이용에 관심이 모아지고 있다.

[0009] 줄기세포(Stem cell)는 인간의 몸을 구성하는 서로 다른 세포나 장기가 성장하는 일종의 모세포로, 간세포라 불리기도 한다. 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포(Embryonic stem cell)와 혈구세포를 끊임없이 만드는 골수세포와 같은 성체 줄기세포(Adult stem cell)가 있다. 배아줄기세포는 인체를 이루는 모든 세포와 조직으로 분화할 수 있지만 윤리적인 이유로 사용이 제한되어 있는 반면, 성체 줄기세포는 제대혈이나 다 자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출한 것으로, 간엽 줄기세포와 조혈 줄기세포로 존재한다. 성체 줄기세포는 생체 내 이식 후에 특정 조직 및 장기 특이적으로 분화할 수 있고, 본래 세포의 특성과는 다른 타 조직의 세포로 전이 분화할 수 있는 분화 유연성을 가지는 세포로서, 윤리적인 제한 없어 조직공학에 널리 사용되고 있다.

[0010] 이미 인간과 동물을 대상으로 한 연구에서 성체 줄기세포 중 골수 유래 줄기세포가 골형성 세포로 분화되는 것이 확인되었고(Friedenstein A.J. et al., Transplantation., 6:230-247, 1968), 최근 연구에서는 골수로부터 분리한 줄기세포를 배양하여 골아세포로 분화 증식시키는 방법에 진전이 있으며 이를 통한 임상적용의 가능성이 높아지고 있다(Ohgushi H. et al., J Biomed Mater Res.,48:913-927, 1999). 최근에는 간엽줄기세포로부터 골세포를 분화시키는 방법이 주도적으로 연구되고 있는 실정이다.

[0011]

[0012] 그러나, 자가 골이식은 기본적인 신체의 체력 및 면역력이 저하된 환자로부터 골채취를 하여야 하는바 골채취 부위의 감염, 동통, 혈종과 같은 합병증이 발생할 수 있는 문제점이 있었고, 이를 극복하기 위해 이식거부반응이 없는 공여자로부터 골채취를 하는 것을 고려한다 하더라도 이러한 골수 공여자의 수는 제한적일 수밖에 없는 문제점이 존재한다. 따라서 환자의 다른 신체부위로부터 취한 줄기세포를 골세포로 분화시키기는 방법의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 포유동물의 피부유래 줄기세포를 골세포로 분화시키는 골세포 분화 유도제 및 그 방법을 제공함을 목적으로 한다. 피부는 골수와 달리 환자에게 침습적 요소를 줄이며 줄기세포의 채취가 가능한 부위이고, 환자의 신체 전 범위에서 얻을 수 있는 부위이다. 따라서 피부에서 채취한 줄기세포를 골세포로 분화시킬 수 있다면 종래 골수로부터 채취한 줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법에 따른 문제들을 해결할 수 있다.

과제 해결수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 i)포유동물의 피부에서 성체 줄기세포를 분리하는 단계;ii)상기 줄기세포를 배양하는 단계; 및 iii)상기 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 베타글리세로인산나트륨(sodium β-glycerophosphate) 및 아스코브산(ascorbic acid)을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 배양하여 골세포 분화를 유도하는 단계;를 포함하는 포유동물 피부 유래의 성체줄기세포를 골세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[0015] 상기 i)줄기세포를 분리하는 단계는 피부 표면의 털을 제거하는 단계; 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 세척하는 단계; 진피층과 표피층을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 여기서 상기 페니실린(penicillin)은 100U/㎖ 만큼 사용하는 것이 바람직하며, 상기 스트렙토마이신(streptomycin)은 100㎍/㎖ 만큼 사용하는 것이 바람직하다.

[0016] 상기 방법에 의해 피부로부터 줄기세포를 분리한 후, 이를 배양하여야 한다. 상기 ii)줄기세포를 배양하는 단계는 우태혈청(Fetal Bovine Serum; FBS), 내피성장인자(endothelial growth factor; EGF), 기본 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 암포테리신 비(Amphotericin B)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)-F12에 배양시키는 것이 바람직하다. 여기서 상기 줄기세포를 배양하는 단계는 38.5℃, 5% CO_2 과포화상태에서 배양하는 것이 바람직하며, 상기 우태혈청(Fetal Bovine Serum; FBS)은 10%, 상기 내피성장인자(endothelial growth factor; EGF)는 10 ng/ml, 상기 기본 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF)는 10ng/ml, 상기 페니실린(penicillin)은 100U/ml, 상기 스트렙토마이신(streptomycin)은 100㎍/㎖, 상기 암포테리신 비(Amphotericin B)는 0.25㎍/㎖ 만큼 사용하는 것이 바람직하다.

[0017] 또한, 상기 ii)줄기세포를 배양하는 단계는 배양 2일째 계대배양 하는 것이 바람직하며, 여기서 계대배양은 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid; trypsin-EDTA)을 이용하는 것이 바람직하고, 상기 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid; trypsin-EDTA)은 0.25%를 사용하는 것이 바람직하다.

[0018] 또한, 상기 iii)골세포 분화를 유도하는 단계는 상기 줄기세포를 배양하는 단계에 있어서, 세 번째 계대단계의 70% confluence된 상태의 줄기세포를 이용함이 바람직하다. 상기 덱사메타손(dexamethasone)은 기존의 논문들을 통하여 조골세포의 분화에 결정적인 영향을 미친다고 보고되어 온 물질로서, 통상적으로 간엽줄기세포로부터 조골세포의 분화시 10^{-5} M을 사용하는 것과 달리 본 발명에서는 10 ~ 100 nM의 덱사메타손(dexamethasone)을 사용하는 것을 특징으로 한다. 피부에서 추출한 줄기세포의 경우 상기 덱사메타손(dexamethasone)을 상기 10 ~ 100 nM이상의 농도로 사용했을 경우 지방으로 분화되는 경향이 있었고, 상기 10 ~ 100 nM 이하의 농도로 사용할 경우 골세포분화 유도제로서의 유효한 효과를 볼 수 없었다. 따라서 본 발명의 골세포 유도 단계에 있어서는 10 ~ 100nM 농도의 덱사메타손(dexamethasone)을 사용함이 바람직하다. 그 외 상기 베타글리세로인산나트륨(sodium β-glycerophosphate)은 10 mM, 상기 아스코브산(ascorbic acid)는 50 uM만큼 사용하는 것이 바람직하고, 상기 골세포 분화를 유도하는 단계는 3주간 이루어지며, 배양액교환은 주2회의 빈도로 실시하는 것이 바람직하다.

효 과

[0019] 본 발명에 따른 골세포 분화 유도제 및 골세포 분화방법을 사용할 경우 피부유래 줄기세포를 골세포로 분화시킬 수 있으므로, 종전 골이식술을 위하여 줄기세포를 장골(ilaic bone)과 경골(tibia) 등에서 채취함에 따른 이차적인 창상의 형상과 수술 후 통증이 수반되는 문제를 해결할 수 있다. 아울러, 피부는 골수와 달리 환자의 신체 전 범위로부터 얻을 수 있는 것인바 더욱 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 상기의 목적을 구체적으로 실현할 수 있는 본 발명의 바람직한 실시예를 첨부한 도면을 참조하여 설명한다.

[0021] **1.재료 및 방법**

[0022] (1)실험동물

[0023] 6개월에서 1년 정도 된 체중 25kg 성숙 미니돼지(PWG)의 귀 피부를 이용하였다.

[0024] (2)화학제품, 시약 및 배지

[0025] 모든 화학제품과 시약은 Sigma에서 구입하였고, 모든 배지는 Invitrogen에서 구입하였다.

[0026] **2.피부에서 줄기세포의 분리**

[0027] 미니돼지를 4 mg/Kg 아자페론(azaperone; Stresnil™ JANSSEN, BELGIUM)으로 진정시킨 후 10 mg/Kg tiletamine-zolazapam (Zoletil™ Virbac, France)로 마취를 유도하였다. 귀피부를 베타딘과 70% 알코올을 이용하여 소독한 후 2% 염산리도카인(lidocaine HCL) with 1:100,000 에피네프린(epinephrine)으로 국소 마취한 후 피부를 절개하였다.

[0028] 도 1(A;귀를 절개 소독함, B,C;진피 위쪽 면을 분리해냄, D;2mm^2정도 씩 조각내어 0.1% 겔라틴 코팅 세포배양 접시에 배양함)에서 나타내는 바와 같이 실온에서 채취한 피부표면에 털을 제거하고 100 U/ml 페니실린 및 100 ug/ml 스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS)로 씻은 후 모낭과 피지선을 포함하는 진피층과 표피층을 분리하여, 1-3 mm^2 너비로 자른 다음 35 mm 또는 60 mm tissue culture plates (NUNC™, Denmark)에 부착하였다. 10 % 우태혈청(Fetal Bovine Serum; FBS), 10 ng/ml 내피성장인자(endothelial growth factor; EGF), 10 ng/ml 기본 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 100U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 ug/ml 스트렙토마이신과 0.25 ug/ml 암포테리신B(Amphotericin B)가 포함된 1 ml 또는 2 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-F12을 38.5°C, 5 % CO_2, 과포화 상태에서 배양시켰다. 배양 2일째 조직을 떼어내었다. 이후 일주일에 2회 배양액을 교체해 주었다. 계대배양은 0.25% 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid :EDTA)을 이용하였다.

[0029] **3. 골세포분화**

[0030] 골세포로 분화는 피부유래의 줄기세포 3번째 계대 단계를 이용하였으며 70% confluence된 상태에서 골세포분화 배양액인 10 ~ 100 nM 덱사메타손, 10 mM 베타글리세로인산나트륨(sodium β-glycerophosphate) 및 50 uM 아스코브산(ascorbic acid)이 첨가된 2 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 이용하였다. 배양액 교환은 주 2회 실시하였으며, 3주 후 분화된 세포를 조직화학적 염색과 RT-PCR로 확인하였다.

[0031] **4. 조직화학 염색**

[0032] 골형성 유무를 확인하기 위해 본 코사(Von Kossa) 염색으로 미네랄화된 기질을 염색하였다. 골세포로 분화된 조직을 인산완충식염수(Phosphate Buffered Saline;PBS)로 씻은 후 4 % 중성 포름알데히드(neutral buffered formaldehyde)로 30분 동안 고정시켰다. 고정액을 제거하고 증류수로 씻은 후 5 % 질산은 용액(silver nitrate solution)에 한 시간 정도 밝은 곳에 놓아두었다. 증류수로 씻은 후 관찰하였다.

[0033] **5. RNA 추출과 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) 분석**

[0034] 전체 RNA는 Rneasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 추출하였고, cDNA합성은 Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen)와 oligo-dT primer을 사용하여 30분 동안 55° C에서 합성하였다. PCR증폭은 Maxime PCR Premix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 실시하였다. 사용된 프라이머는 osteocalcin(205 bp) F, CTGGACCAACATCTTGAGCA and R, ACCCCTTTGGTGGTGTTGTA Osteonectin(189 bp) F; TCCGGATCTTTCCTTTGCTTTCTA R; CCTTCACATCGTGGCAAGAGTTTG이다. house keeping gene으로서 GAPDH(230 bp)는 F, 5'-GGGCATGAACCATGAGAAGT-3'와 R, 5'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3' 을 사용하였다. PCR 은 35에서 40 사이클 동안 수행하였으며 그 조건은 95° C 에 3 분 동안 변성(denaturation)시켰고, 60° C 에 30초 동안 풀림(annealing)과정을 거쳤으며, 72° C 에 45초 동안 신장(elongation)과정을 거치고, 72° C에 10분 동안 final extension으로 실시하였다. PCR 결과물은 1% 아가로스젤과 1 ug/ml 에티듐 브로마이드를 이용하여 로딩 분리하였고 자외선 아래에서 측정하였다.

[0035] **6. 결과**

[0036] (1)조직화학 염색결과

[0037] 도 2에서 나타나는 바와 같이, A)귀에서 분리한 줄기세포 부분이 섬처럼 증식되고 있음을 확인할 수 있었고, B) A에서 분리한 세포를 계속해서 계대 배양할 때 나타나는 세포모양을 관찰할 수 있었으며, C) 2주 동안 분화시킨 후 Von Kossa염색을 하였을 때 미네랄 기질이 검은색으로 염색됨을 확인할 수 있었다.(배경은 H&E를 대조 염색한 것이다.)

[0038] (2)RT-PCR분석 결과

[0039] 도 3에서 나타나는 바와 같이, 골세포로 분화 2주 후 전체 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였을 때 골세포 분화 유전자인 Osteocalcin과 Osteonectin이 발현됨을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

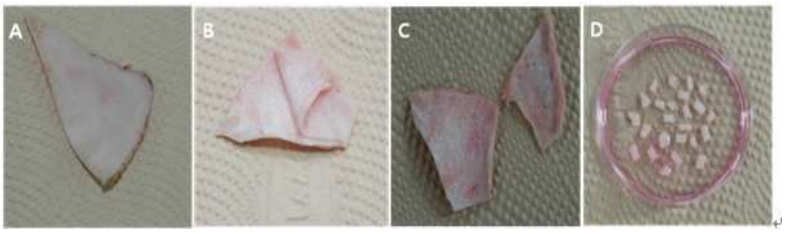
[0040] 도 1은 귀조직에서 줄기세포를 분리하는 과정을 나타낸 것이다.

[0041] 도 2는 골형성 유무 확인을 위하여 조직화학 염색을 한 결과를 나타낸 것이다.

[0042] 도 3은 골형성 유무 확인을 위하여 RT-PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

