

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0076264 (43) 공개일자 2011년07월06일
(51) Int. Cl. <i>C12N 5/0735</i> (2010.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0132928 (22) 출원일자 2009년12월29일 심사청구일자 2009년12월29일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김병수 서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 201-603 박용 서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 102동 404호 최인영 서울특별시 강남구 일원본동 상록수아파트 209-402 (74) 대리인 구현서	

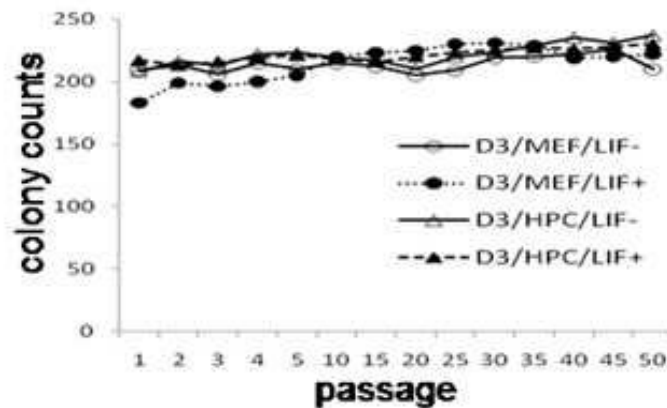
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 인간 태반 유래 지지 세포를 이용한 생쥐 배아줄기세포의 배양 방법 및 그 배양 배지

(57) 요약

본 인간 태반 유래 지지 세포를 이용한 생쥐 배아줄기세포의 배양 방법 및 그 배양 배지에 관한 것이다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K000216

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 Telomerase 조작 및 인간유래지시세포를 이용한 줄기세포 증식 조절 신기술개발

기여율

주관기관 고려대학교

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

생쥐 배아 줄기 세포를 배양하는 방법에 있어서, 지지세포(feeder cell)로 인간 태반-유래 세포(HPC)를 사용하는 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 2

- a) 인간 태반으로부터 인간 태반-유래 지지세포(HPC)를 제조하는 단계;
- b) 생쥐 배아 줄기세포를 상기 제조된 지지세포 상으로 트랜스퍼하는 단계; 및
- c) 이들을 백혈병 저해 인자(LIF)를 공급하지 아니하고 배양하는 단계를 포함하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 인간 태반-유래 섬유세포-유사세포인 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 용모막판(chorionic plates)으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 배양방법은 배양 배지에 백혈병 저해 인자(LIF)를 공급하지 아니하는 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 배양 배지는 혈청, 머캅토에탄올, 비-필수 아미노산, 및 항생물질로 구성된 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 12세대까지 배양하는 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 CD 29 및 CD 44의 포지티브 발현 및 CD 34의 네가티브 발현을 나타내는 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법.

청구항 9

생쥐 배아 줄기 세포 배양 배지에 있어서, 백혈병 저해 인자(LIF)가 보충되지 않은 배양 배지로 이루어진 생쥐 배아 줄기 세포 배양 배지;

단 여기서 지지세포(feeder cell)로 인간 태반-유래 세포(HPC)를 사용.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 배지는 혈청, 머캅토에탄올, 및 항생물질을 더욱 포함하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양 배지.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 태반 유래 지지 세포를 이용한 생쥐 배아줄기세포의 배양 방법 및 그 배양 배지에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 배아줄기세포는 1981년 생쥐의 배아줄기세포가 처음으로 시험관에서 배양이 가능해졌고, 1988년에는 생쥐 배아 줄기세포의 시험관 배양 기술이 유전자 적중 기술과 융합, 최초로 유전자 적중 생쥐가 만들어지게 되었다. 유전자 적중 마우스 기술은 이후 유전자의 기능 연구 및 인간의 질환 모델을 수립하는 데에 없어서는 안 될 중요한 기술로서, 생명과학/의학의 발달에 견인차 역할을 해왔다(Smith AG, Annu Rev Cell Dev Biol 17:435-62, 2001). 인간 배아 줄기세포의 시험관 배양이 가능해진 것은 마우스에 비하여 17년이나 늦은 1998년으로, 위스콘신대학의 톰슨박사가 인간 배아줄기세포주를 처음으로 수립하였다(Thomson JA, Science 282(5391): 1145-7, 1998). 마우스 배아줄기세포에 비하여 인간 배아줄기세포는 시험관 배양이 더욱 어렵고 조작이 불편하여 세포를 대량 배양하여 유전자 조작 혹은 시험관 조작하여 세포 치료제로 이용하거나 연구를 하는 데에 많은 어려움을 안고 있다. 따라서 조작이 용이하고 대량 배양이 가능하며 특정세포로의 분화가 가능한 배양 기술의 수립이 절실하다.
- [0003] 현재까지, 미분화 상태에서 무한정 배양될 수 있는 안정한 포유류 배아 줄기세포(ESC)주는 단지 세가지 종으로부터만 생산되어 진다: 마우스, 원숭이, 및 인간. 물론 생쥐[(mouse)ESC; 이하, mESC라 함] 및 인간 ESC (이하, 'hESC'라 함) 세포주들이 가장 널리 사용되어진다. hESCs는 초기 인간 발생의 인 비트로 모델을 확립하는 기초를 제공하고 세포 대체 치료에서 분화된 세포 타입의 가능한 새로운 공급원으로 간주된다.
- [0004] 그러나 연구용으로 hESCs의 사용은 통상적으로 엄격한 윤리적인 제한을 가진다. mESCs는 이러한 제한으로부터 자유롭고 mESCs의 배양이 hESCs의 배양보다 더 쉽기 때문에, 연구자들은 mESCs를 사용하여 더 용이하게 ESCs의 면역학적 및 생리학적인 접근을 할 수 있다. 또한 mESCs의 조작은 형질전환 마우스의 개발에 필수적이다.
- [0005] ESCs를 사용한 연구를 수행하기 위하여, 미분화 상태에서 ESCs의 유지 및 무한정 증식이 요구된다. 지지세포 층 상에서 ESCs의 동시배양(coculture)이 가장 널리 사용되어지는 방법이다. 생쥐 배아 섬유세포(MEF)는 mESC에 대하여 가장 널리 사용되어지는 지지세포이다. 그러나 지지세포로 MEF를 사용하는 배양 시스템은 일부 단점을 가진다.
- [0006] 첫 번째, MEF는 종종 배아 13.5일에서 생쥐 배아로부터 유래한 섬유세포로 종종 만들어져서 그들이 성장(senescence)하기 전에 단지 약 7-12세대 동안만 증식할 수 있고(Kim H., You S., Farris J., Kong B.W., Christman S.A., Foster L.K., and Foster D.N. (2002). Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere-regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells. *Exp Cell Res*, 272, 199-208); 지지세포로 단지 초기 세대(p4에서 p6)세포만이 사용되어지며(Conley B.J., Denham M., Gulluyan L., Olsson F., Cole T.J., and Mollard R. (2005). Mouse embryonic stem cell derivation, and mouse and human embryonic stem cell culture and differentiation as embryoid bodies. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 23, Unit 23 2). MEF 지지세포를 사용하는 배양 시스템에서 많은 생쥐 배아의 연속적인 회생이 필요하고, 그것은 매우 비용이 많이 들고 다른 윤리적인 문제도 관련된다. mESCs 배양과 관련된 일부 문제는 해결될 필요도 있다. MEF 지지세포 상에서 mESCs를 유지하기 위한 배양 시스템은 인간의 입장에서 보면 완전하게 외래환경(xenoenvironment)이다. 이 시스템의 사용으로부터 나온 결과는 hESCs의 실제 생리적 및 면역학적 특징과 괴리가 있을 수 밖에 없다. hESC의 연구 유발하는 많은 지적인 추진력이 mESC 연구 결과로부터 유래한 것을 고려하면, 이러한 상황은 현재 바람직하지 아니하다.
- [0007] 또한 MEF를 사용하는 mESC 배양에서 mESC 분화의 저해제(Gough N.M., Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stahl J., Gearing D.P., Nicola N.A., and Metcalf D. (1989). LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev*, 1, 281-8; Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A., and Gough N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-687)인 백혈병 저해 인자(leukemia inhibitory factor; LIF)의 필요성이 현재로서는 명확하지 않다.
- [0008] 즉 많은 연구자들은 원하지 않는 mESC 분화의 잠재적인 위험을 회피하기 위하여 MEF 지지세포 상에서 mESC를

배양하는 배지에 LIF를 첨가한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 LIF를 첨가하지 않으면서도 성공적으로 생쥐 줄기 세포를 미분화상태로 유지시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 LIF를 첨가하지 않으면서도 성공적으로 생쥐 줄기 세포를 미분화상태로 유지시키는 배지를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 생쥐 배아 줄기 세포를 배양하는 방법에 있어서, 지지세포(feeder cell)로 인간 태반-유래 세포(HPC)를 사용하는 것을 특징으로 하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 a) 인간 태반으로부터 인간 태반-유래 지지세포(HPC)를 제조하는 단계; b) 인간 배아 줄기세포를 상기 제조된 지지세포 상으로 트랜스퍼하는 단계; 및 c) 이들을 백혈병 저해 인자(LIF)를 공급하지 아니하고 배양하는 단계를 포함하는 생쥐 배아 줄기 세포 배양방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 인간 태반-유래 섬유세포-유사세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0014] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 융모막판(chorionic plates)으로부터 유래한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 발명의 배양방법에 있어서, 상기 인간 태반-유래 세포(HPC)는 12세대까지 배양하고 저장(stock)된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또한 본 발명은 백혈병 저해 인자(LIF)가 보충되지 않은 배양 배지로 이루어진 인간 배아 줄기 세포 배양 배지를 제공한다(단 여기서 지지세포(feeder cell)로 인간 태반-유래 세포(HPC)를 사용).
- [0017] 또한 본 발명의 배양 배지는 혈청, 머캅토에탄올, 및 항생물질을 더욱 포함한다.
- [0018] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0019] 본 발명의 실험은 고려대학교 줄기세포연구소에서 진행되었다.
- [0020] 포유류 배아의 초기 발생은 배아와 모친을 연결하는 일시적인 기관인 태반에 의하여 유지된다.
- [0021] 본 발명자들은 본 발명을 통하여 통상적으로 포유류 배아줄기세포의 미분화 증식용 지지세포로 사용되는 MEF와 같이 HPC도 일반적인 지지세포로 사용될 수 있는지를 확인하였다. 따라서 본 발명은 널리 사용되는 mESC 세포주인 D3 및 CE3에 적용하고, 그것은 MEF 지지세포 상에서 전에 증식되어졌다.
- [0022] 본 발명에서 HPC 지지세포는 인간 태반의 융모막판(chorionic plate)으로부터 유래하였다. 본 발명은 MEF 지지세포 상에서 전에 유지되어온 mESCs의 미분화 증식을 유지하기 위하여 HPC 지지세포의 가능성을 나타낸 첫 번째 보고서이다.
- [0023] 본 발명자들은 HPC 지지세포 상에서 통상적으로 사용되는 mESC 세포주인 D3 및 CE3를 성공적으로 배양할 수 있었다. 그리고 MEF 및 HPC 군 사이에서의 배양 결과에는 큰 차이가 없었다.
- [0024] 또한 배양 결과는 MEF 및 HPC 지지세포 모두 LIF의 첨가에 의하여 영향을 받지 않았다.
- [0025] 또한 MEF와 비교하여, HPC는 부가적인 유리한 효과를 제공한다. 마우스 배아의 추가적인 희생을 요하고 단지 초기 계대(p4-6) 동안만 지지세포로 사용되어지는(Kim H., You S., Farris J., Kong B.W., Christman S.A., Foster L.K., and Foster D.N. (2002). Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere-regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells. *ExpCellRes*, 272, 199-208) MEF와 다르게 HPC 지지세포는 공여자에게 추가적인 위험성이 없이 출산 또는

치료적인 낙태 후에 용이하게 얻을 수 있고 35th 계대까지 증식될 수 있다. 이러한 발견은 mESC 배양의 전체 비용을 절감할 수 있는 MEF에 대한 HPC의 상대적인 유리한 점을 제안할 수 있다.

[0026] 본 발명은 mESC 배양의 다른 특징에 대한 암시를 가진다.

[0027] 본 발명자들은 처음으로 LIF없이 HPC 지지세포 상에서 미분화된 mESC의 성공적인 증식을 나타내었다.

[0028] LIF의 비용을 고려할 때, HPC 지지세포를 사용하는 배양 시스템은 mESC 배양 동안에 상당한 유지 비용을 절약할 수 있다.

[0029] 두 번째, 본 발명에서는 LIF과 무관하게(D3/MEF/LIF- vs. D3/MEF/LIF+, CE3/MEF/LIF- vs. CE3/MEF/LIF+) MEF 지지세포 상에서 mESC의 결과에는 차이가 없었다.

[0030] 마지막으로 mESC의 배양시에 MEF 대신에 HPC 지지세포를 사용하여서, 완전한 외래환경(xenoenvironment)에 대한 문제점을 부분적으로 완화될 수 있다. 따라서 그것은 mESC 및 hESC에 대한 연구의 결과 사이의 차이를 HPC와 같은 인간 기원 지지세포를 사용하여서 감소시킬 수 있는 효과를 기대할 수 있다.

[0031] 본 발명은 mESC 배양에 대하여 HPC 지지세포의 효과를 나타내는 첫번째 연구이다.

[0032] 본 발명의 실시예에 있어서, 분자 생물학이나 재조합 DNA 기술 등의 유전자 공학 방법, 일반적인 세포생물학 방법 및 종래 기술에 대해, 실시자는 특별히 기재하지 않으며, 당해 분야의 표준적인 참고서적을 참조할 수 있다. 그 예로, Molecular Cloning : A Laboratory Manual 제3판(Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Current Protocols in Molecular biology(Ausubel et al.편, John Wiley & Sons, 1987); Methods in Enzymology 시리즈(Academic Press); PCR Protocols: Methods in Molecular Biology(Bartlett & Striling편, Humana Press, 2003); Animal Cell Culture: A Practical Approach 제3판(Masters편, Oxford University Press, 2000); Antibodies : A Laboratory Manual(Hatlow et al. & Lane편, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987) 등을 참조할 수 있다.

[0033] 또한, 본 명세서에서 참조되는 세포 배양, 세포 생물학 실험을 위한 시약 및 키트류는 Sigma사나 Aldrich사, Invitrogen/GIBCO사, Clontech사, Stratagene사 등의 시판사로부터 입수가능하다.

[0034] 또한, 다능성 줄기세포를 이용한 세포 배양, 및 발생·세포 생물학 실험의 일반적 방법에 대해, 실시자는 상기 분야의 표준적인 참고서적을 참조할 수 있다. 그 예로, Guide to Techniques in Mouse Development(Wasserman et al.편, 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 et al.편, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994); Embryonic Stem Cells(Turksen편, Humana Press, 2002)이 포함된다. 본 명세서에서 참조되는 세포 배양, 발생·세포 생물학 실험을 위한 시약 및 키트류는 Invitrogen/GIBCO사나 Sigma사 등의 시판사로부터 입수가능하다.

[0035] 마우스 및 인간의 다능성 줄기세포의 제작, 계대, 보존법에 대한 표준적인 프로토콜이 이미 확립되고 있어, 실시자는 전술한 참고서적에 추가로, 복수의 참고 문헌(Matsui et al., Cell 70: 841, 1992; Thomson et al., 미국 특허 제 5,843,780호; Thomson et al., Science 282: 114, 1998; Shablott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726, 1998; Shablott et al., 미국 특허 제 6,090,622호; Reubinoff et al., Nat. Biotech. 18: 399, 2000; 국제 공개번호 제 00/27995호) 등을 참조함으로써, 이들 다능성 줄기세포를 사용할 수 있다. 또한, 그 밖의 동물종에 관해서도, 예로 원숭이(Thomson et al., 미국 특허 제 5,843,780호; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7844, 1996)이나 랫(Iannaccone et al., Dev. Biol. 163:288, 1994; Loring et al., 국제 공개번호 제 99/27076호), 닭(Pain et al., Development 122: 2339, 1996; 미국 특허 제5,340,740호; 미국 특허 제5,656,479호), 돼지(Wheeler et al., Reprod. Fertil. Dev. 6: 563, 1994; Shim et al., Biol.Reprod. 57: 1089, 1997) 등에서의 ES 세포 또는 ES형 세포의 수립 방법이 알려져 있어, 각 기재의 방법을 따라, 본 발명에 이용할 수 있는 ES 세포를 제작할 수 있다.

[0036] ES 세포는 배반포기 배아의 내부에 있는 내부 세포 덩어리(inner cell mass)라고 하는 세포 집괴(cell clump)를 시험관내 배양으로 옮겨, 세포 덩어리의 해리와 계대를 반복함으로써, 미분화 줄기세포 집단으로서 분리시킨 다능성 줄기세포이다. 마우스 유래 ES 세포로는 E14, D3, CCE, R1, J1, EB3 등의 여러가지가 알려져 있으며, 일부는 American Type Culture Collection사나 Cell & Molecular Technologies, Thromb-X사 등으로부터 구입할 수 있다. 인간 유래 ES 세포는 현재, 전세계적으로 50종 이상이 수립되어 있으며, 미국 국립위생연구소(NIH)의 리스트(<http://stemcells.nih.gov/registry/index.asp>)에는 20종 이상의 세포주가 등록되어 있

다. 그 일부는 ES Cell International사나 Wisconsin Alulmi Research Foundation으로부터 구입할 수 있다.

[0037] ES 세포는 일반적으로 초기 배아를 배양하여 수립하지만, 체세포의 핵을 핵이식한 초기 배아에서 ES 세포를 제작할 수도 있다(Munsie et al., Curr. Biol. 10: 989, 2000; Wakayama et al., Science 292: 740, 2001; Hwang et al., Science 303: 1669, 2004). 또한, 이종 동물의 난세포 또는 탈핵한 난세포를 수개로 분할한 세포 소포(세포질체(cytoplast) 또는 오픈플라스토이드(ooplastoid)라 함)에, 원하는 동물의 세포핵을 이식하여 배반포기 배아의 세포 구조체를 제작하고, 그것을 기초로 ES 세포를 제작하는 방법도 고안되어 있다(국제 공개번호 제 99/45100호; 제 01/46401호; 제 01/96532호; 미국 특허 공개 제 02/90722호; 제 02/194637호). 또한, 단성생식(parthenogenesis) 배아를 배반포기와 동등한 수준의 단계까지 발생시킨 후 ES 세포를 제조하는 시도(미국 특허 공개 제 02/168763호; Vrana K et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 100: 11911-6)나, ES 세포와 체세포를 융합시킴으로써 체세포 핵의 유전 정보를 가진 ES 세포를 만드는 방법도 보고되어 있다(국제 공개번호 제 00/49137호; Tada et al., Curr. Biol. 11: 1553, 2001). 본 발명에서 사용되는 ES 세포는 이러한 방법들에 의해 제조된 ES 세포 또는 ES 세포의 염색체상의 유전자를 유전자 공학 방법으로 변형시킨 세포도 포함한다.

효 과

[0038] 상기의 과제해결수단 및 하기 실시예를 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 HPC를 feeder로 사용하여 생쥐 배아줄기세포를 배양할 경우에는 MEF를 생산하는데 필요한 비용을 절감할 수 있고 또 기존의 배양기법과 비교하여 LIF를 전혀 첨가하지 않아도 배양결과에 전혀 영향을 미치지 않으므로 엄청난 양의 비용을 절감할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 실험실 환경이 아닌 상업적인 목적을 위해 배아줄기세포의 대량배양이 이루어질 경우에는 비용절감의 효과가 매우 클 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0040] 참고로 본 발명의 프로토콜은 고려대학교 의학 센터의 연구윤리심의위원회의 승인을 받았고, 태반도 서면 통지된 동의서를 받은 후에 사용하였다.

[0041] 실시예 1: 태반 및 MEF 세포들로부터 지지세포의 제조

[0042] 임신 6-8 주에 낙태한 건강한 여성의 융모막판(chorionic plates)을 수술적으로 분리하여, 다지고 37℃에서 30 분간 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 그 후에 그 세포들을 20% fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc, Logan, UT), 100 U/ml penicillin, 및 100 µg/ml streptomycin를 가지는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 에서 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도 조건에서 배양하였다. 그 배지를 삼 계대(passage)까지 매 3-4 일마다 교환하였다. 배양 동안에, 본 발명자들은 배양 배지에서 떠 오르는 세포 찌꺼기를 제거하고, 그 판에 부착된 태반-유래 섬유세포-유사 세포를 발견하였다. 접종 약 2 주에, 그 판에 부착된 섬유세포-유사 세포의 콜로니를 형성하였다(도 1). HPC에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSC)의 존재는 CD 29 및 CD 44의 포지티브 발현 및 CD 34의 네가티브 발현을 나타내는 유세포분석(flowcytometric analysis)에 의하여 동정되었다.

[0043] 초기 10 태반으로부터 유래한 HPC의 일차 배양에서, HPCs는 종종 젊어지고 20th~25th 계대 후에 안정성을 잃었고, 13th~17th 계대 후의 HPCs는 H1 및 HSF6 hESCs의 미분화 성장을 유지할 수 없었다. 따라서 HPCs는 12th 계대까지 배양하고, 이들 세포 모두를 hESC 배양을 위하여 저장(stock)하였다. 냉동 스톱을 트립신처리 및 조사(1500 cGy)로 하비스트한 후에 크라이오바이알(cryovial) 당 1 x 10⁶ 세포의 양으로 수행하였다. hESC 배양을 위해서, 스톱된 HPCs를 해동하고 hESCs와 공동배양(coculture)하기 위하여 1 x 10⁶ cells/well으로 0.1% 젤라틴-코팅된 35-mm 웰 플레이트 상에 시딩하였다. 태반에 통상적으로 감염되는 병원체들은 스톱으로 냉동하기 전에 RT-PCR에 의하여 테스트하였다. 이들은 cytomegalovirus, herpes simplex virus types 1 및 2, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia spp*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, 및 *Ureaplasma ureaticum*을 포함한다. 공개된 포프라이머 서열(Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. Fertil Steril. 2005;83:1517-1529; McDonagh S, Maidji E, Ma W, et al. Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. J Infect Dis. 2004;190:826-834)을 사용하였다. 병원성에 대하여 포지티브인 HPC는 폐기하였다. 그 MEF 세포

주들은 Millipore (MA, USA)로부터 구입하였다. MEF는 10% FBS가 보충된 DMEM에서 대략 90% 컨플루언스로 배양하였다; 전형적으로, MEF는 5th-7th 계대 후에 증식될 수 없고, 4th-5th 계대 후에 hESC의 미분화 성장을 유지할 수 없다. 따라서, MEF는 3rd 계대까지 배양하고 ESC 배양을 위해 저장하였다. MEF는 플레이트로 트랜스퍼되기 전에 10 µg/ml mitomycin으로 90 분간 배양하여 제조되었다. 이들 두 지지세포(HPC, MEF)를 hESC 및 mESC의 시딩 전에 24시간 동안 부착하게 하였다.

[0044] 실시예 2: 마우스 ESC 배양

[0045] D3 및 CE3 mESC 세포주들을 ATCC (Manassas, USA)로부터 구입하여서, 초기에 공급자의 지시에 따라서 MEF 상에서 배양하였다. 5 계대 동안 MEF 지지 세포 상에서 유지한 후, mESC의 콜로니를 새롭게 제조된 HPC 및 MEF 지지세포 상으로 트랜스퍼하였다. 공급자의 가이드라인에 따라, D3 mESC 및 지지세포의 동시배양(coculture)을 20% fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc, Logan, UT), 0.1 mM β-mercaptoethanol, 및 1% penicillin-streptomycin (Sigma)가 보충된 DMEM에서 수행하였다. CE3 세포주에 대한 배양 배지는 DMEM 대신에 ES-DMEM (ATCC)을 제외하고는 D3 세포주의 것과 동일하였다. 두 mESC 세포주를 LIF 존재 또는 부존재 조건에서 지지세포 상에서 증식하였다(도 2).

[0046] 그 배양 배지는 매 48시간마다 교환하였다. mESC를 기계적인 분리를 통하여 매주 계대한 후 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 배양하고 각각 플레이트 당 4 x 10⁴의 밀도로 각 계대에서 시드하였다. 배양 동안, 본 발명자들은 첫 다섯 계대 동안에는 각 계대에서, 그 후에는 매 다섯 계대마다 ESC 콜로니들을 카운트하였다. 본 발명자들은 그리드 및 헤모사이토미터를 사용하여 120-300 ESCs를 포함하는 각 코로니를 카운트하였다.

[0047] 실시예 3:인간 태반 유래 지지세포 상에서 적응된 hESC 및 mESC의 특성화

[0048] mESC의 미분화상태를 동정하기 위하여, HPC 상에서 배양된 mESC의 형태, 줄기세포성 마커의 발현 및 분화능력을 조사하였다. 세포 형태는 매일 도립 현미경(inverted microscope) 하에서 관찰하였고, 줄기세포성 마커의 발현은 alkaline phosphatase (ALP), Oct-4, Nanog, stage specific embryonic antigen (SSEA)-4, 및 SSEA-1에 대한 면역염색, 및 Oct-4에 대한 RT-PCR(프라이머는 서열번호 1 및 2에 기재)에 의하여 테스트하였다. mESC의 특성화는 매 10th 계대에서 수행되었다(도 2).

[0049] 면역조직화학(immunocytochemistry)에 사용된 동시배양은 6-웰 플레이트에서 확립되었다. 분석 전에, 부착 세포 층(adherent cell layers)을 상온에서 10% 포르말린의 첨가에 의하여 고정하고(15 분), 10분 동안 0.1% Triton X-100/PBS를 투과시키고 4°C에서 일차 항체로 오버나잇 배양하였다. SSEA-1 및 SSEA-4에 대한 일차 항체는 Hybridoma Bank (Hybridoma Bank, IA)에서 구입하였고, 다른 항체들은 Chemicon (Chemicon, CA)으로부터 구입하였다. ALP 활성은 상업적 키트(Sigma)를 사용하여 검출하였다.

[0050] 줄기세포성 마커에 대한 RT-PCR도 수행하였다. 전체 RNA는 QIAGEN RNeasy 키트(Qiagen-Hilden, Germany)를 사용하여 제조하였고, 역전사는 AMVreverse transcriptase (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 사용하는 랜덤 헥사머로 500 ng의 토털 RNA를 프라이밍하여서 수행하였다. PCR을 수행한 후, 그 산물들을 1.5% 아가로스 젤 상에서 분석하고 ethium bromide로 시각화하였다.

[0051] RT-PCR에 사용된 프라이머들은 다음과 같다;

표 1

	Gene	Forward	Reverse	Size (bp)
<i>Human</i>				
Control	Beta -actin	ACC CAG ATC ATG TTT GAG AC	GGA GTT GAA GGT AGT TTC GT	486
	GAPDH	GTG GAC CTG ACC TGC CGT CT	GGA GGA GTG GGT GTC GCT GT	154
Stemness	Oct-4	CGA CCA TCT GCC GCT TTG AG	CCC CCT GTC CCC CAT TCC TA	577
	Nanog	AAA GAA TCT TCA CCT ATG CC	GAA GGA AGA GGA GAG ACA GT	149
	Rex-1	CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT	GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA	306
Ectoderm	Sox-1	CAC AAC TCG GAG ATC AGC AA	GGT ACT TGT AAT CCG GGT GC	132
	Nestin	GCG TTG GAA CAG AGG TTG GA	TGG GAG CAA AGA TCCAAG AC	326
Mesoderm	Brachyury	AAT TGG TCC AGC CTT GGA AT	CGT TGC TCA CAG ACC ACA	111
	Hnf3-b	GGA GCG GTG AAG ATG GAA	TAC GTG TTC ATG CCG TTC AT	121
Endoderm	AFP	AGA ACC TGT CAC AAG CTG TG	GAC AGC AAG CTG AGG ATG TC	675
	Sox-17	CTC TGC CTC CTC CAC GAA	CAG AAT CCA GAC CTG CAC AA	101
<i>Mouse</i>				
Control	Beta -tubulin	GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC	TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC	317
	GAPDH	TTG TCA TTG AGA GCA ATG CC	ACC TCA ACT ACA TGG TCT AC	801
Stemness	Oct-4	GAG GAG TCC CAG GAC ATG AA	CCT GGG AAA GGT GTC CTG TA	520
Ectoderm	Sox-1	CAC AAC TCG GAG ATC AGC AA	GAG TTG GAG ATG GGG CTG TA	556
	Nestin	CCA GAG CTG GAC TGG AAC TC	TTG GGA CCA GGG ACT GTT AG	369
Mesoderm	Brachyury	CCG GTG CTG AAG GTA AAT GT	ATT GTC CGC ATA GGT TGG AG	701
	Hnf3-b	CTC TTC CGT GAG CAA CAT GA	GGC ACC TTG AGA AAG CAG TC	587
Endoderm	AFP	AGG AGG AGT GCT TCC AGA CA	TGC GTG AAT TAT GCA GAA GC	358
	Sox-17	GTT GAC CTT GGC AGA GAA GC	AGT CCG AGA CTG GAG CGT AA	451

[0052]

[0053]

[0054]

표 1은 본 발명의 RT-PCR에 사용된 프라이머 서열이고, 아랫 쪽의 서열들이 마우스에 대한 프라이머 서열이다.

실시예 4: 핵형(Karyotype) 분석

[0055]

염색체 안정성을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 매 10^{th} 계대마다 배양된 mESCs의 핵형 분석을 수행하였다(도 2). mESCs는 0.1 μ g/ml colcemid로 3-4 시간동안 배양되고, 트립신처리된 후 37℃에서 20분 동안 0.075 M KC l로 배양되었다. 3:1 메탄올/아세트 산으로 고정 후, ESCs의 핵형을 550-밴드 레벨의 해상(resolution)으로 분석하였다.

[0056]

실시예 5: 계열(lineage)-특이적 마커에 대한 RT-PCR 분석 및 배아체(embryoid bodies)의 형성

[0057]

장 시간 인 비트로 유지 동안에 분화 능력을 결정하기 위하여 매 10^{th} 계대에서 배양된 ESCs로부터 배아체(EB) 형성을 유도하였다(도 2). EB 형성을 유도하기 위하여 정해진 시기에서 콜로니들을 하비스트한 후 EB 배양 배지로 트랜스퍼하였다. 형성된 EB 내에서 삼 배엽층(germ layer)의 존재를 검출하기 위하여 본 발명자들은 21일에 배아체의 RT-PCR 분석을 수행하였다. 그 분석을 위한 프라이머들은 표 1에 기재된 것과 같다;

[0058]

즉 각각의 배엽 특이적인 forward primer 및 reverse primer는 Sox-1, (서열번호 3 및 4), Brachyury, (서열번호 5 및 6), AFP(서열번호 7 및 8)이고 그 서열은 괄호 안에 기재된 번호와 같다.

[0059]

실시예 6: 통계분석

[0060]

각 mESC 군(D3/MEF/LIF+, D3/MEF/LIF-, D3/HPC/LIF+, D3/HPC/LIF- 및 CE3/MEF/LIF+, CE3/MEF/LIF-, CE3/HPC/LIF+, CE3/HPC/LIF-)는 다섯 배양 디쉬를 가졌다; 각 군에 대한 값들은 다섯 디쉬의 평균 값이었다.

[0061]

본 실험은 10회 반복하였고 결과들을 두 다른 전문가에 의하여 검증하였다. 모든 정량적인 데이터는 평균 $\pm$

SEM로 나타내었다. 결과들은 p 값이 0.08 이하이면 유의적이라고 간주하였다.

[0062]

본 발명의 전체 발명의 개략도는 도 2에 기재한다.

[0063]

상기 실시예의 결과는 다음과 같다.

[0064]

콜로니 카운트의 비교

[0065]

5 계대에서 D3/MEF/LIF+, D3/MEF/LIF-, D3/HPC/LIF+, and D3/HPC/LIF- 군에서, 콜로니의 평균 숫자는 각각 210 ± 15 , 205 ± 21 , 223 ± 23 , 및 221 ± 15 이었다. 모든 군 사이에도 큰 차이가 없었다. 네 다른 배양 조건 하에서 D3 mESC의 증식도 50th 계대까지 가능하였다(도 3). CE3 mESC 세포주로부터 온 결과는 D3 mESC 세포주의 것들과 동일한 경향을 나타내었다.

[0066]

네 다른 조건 하에서 CE3 mESC 배양의 증식 및 모든 CE3 군 사이에는 큰 차이가 없었고, 증식도 50th 계대까지 가능하였다(도시 안 함)

[0067]

각 측정에서 콜로니의 수는 각각 D3 군 및 CE3 군에서 5번째 계대의 결과와 유사하였다.

[0068]

12th 계대까지 배양된 모든 HPC는 양 mESC 세포주 모두의 미분화 성장을 유지할 수 있었다. 그것은 3rd 계대까지 배양된 모든 MEF에 대한 것과 동일하였다.

[0069]

인 비트로 배양 동안에 mESCs 및 hESCs의 염색체 안정성 및 미분화 상태

[0070]

본 발명자들은 네 가지 다른 조건(LIF 존재/부존재의 MEF 지지세포 및 LIF 존재/부존재의 HPC 지지세포를 포함하는) 하에서 50th 계대 후에 D3 mESCs의 배양을 증식시킬 수 있었다. mESCs의 콜로니들은 LIF와 무관하게 각 지지세포를 가지는 인 비트로 동시배양에서 잘 유지되었다.

[0071]

형태학적으로 네 조건 사이에 mESC 콜로니들에서 큰 차이가 없었다(도 4 A1-4). ALP 염색은 모든 군에서 강하게 포지티브이었다(도 4 A5-8). 줄기세포성 마커들에 대한 면역조직화학 염색은 지지세포 타입 또는 LIF와 무관하게 50 계대 넘어서도 모든 군들에서 D3 mESCs의 잘 보존된 줄기세포성을 나타내었다. Oct-4 (도 4 A9-16), Nanog (도 4 A17-24), 및 SSEA-1 (도 4 A25-32)는 강하게 발현되었고, 모든 군으로부터 SSEA-4는 D3 mESCs에서 발현되지 않았다.

[0072]

줄기세포성은 또한 Oct-4에 대한 RT-PCR에 의하여 매 10번째 계대에서 측정하였다. Oct-4의 발현은 매 측정마다 지지세포 타입 또는 LIF와 무관하게 모든 군으로부터 온 D3 mESCs에서 동정되었다(도 4B).

[0073]

매 10번째 계대에서 mESC 핵형(karyotype)의 결정은 모든 군에서부터 온 mESCs에서 핵형 비정상성을 나타내지 않았다(D3/HPC/LIF- 군에 대한 도 5C 참조).

[0074]

CE3 mESCs으로부터 온 결과는 D3 mESCs 세포들의 것과 동일하였다. 줄기세포성은 지지세포 타입 또는 LIF와 무관하게 CE3 mESCs에서 잘 보존되었다(도 5).

[0075]

계열-특이적 마커들의 동정 및 EB 형성

[0076]

D3 mESCs에서, 5번째 계대에서 D3/MEF/LIF+, D3/MEF/LIF-, D3/HPC/LIF+, 및 D3/HPC/LIF-에서 형성된 배아체(EB)의 평균 퍼센테이지는 각각 $79.1 \pm 2.7\%$, $80.5 \pm 1.5\%$, $77.3 \pm 3.2\%$, 및 $78.7 \pm 0.7\%$ 이었다. 모든 mESC 군들 사이에는 큰 차이가 없었다. 이 경향은 매 10 계대에서 각 측정마다 유지되었다. 형성된 EB 내의 삼 배엽의 존재는 RT-PCR에 의하여 동정되었다. 외배엽 마커(Sox-1), 중배엽 마커(Brachyury), 및 내배엽 마커(AFP)의 발현은 지지세포 타입 또는 LIF와 무관하게 모든 군으로부터 형성된 EB에서 동정되었다(도 4B).

[0077]

이들 경향은 CE3 mESCs에서도 나타났다.

[0078]

5번째 계대에서 CE3/MEF/LIF+, CE3/MEF/LIF-, CE3/HPC/LIF+, 및 CE3/HPC/LIF-에서 형성된 배아체(EB)의 평균 퍼센테이지는 각각 $82.1 \pm 1.9\%$, $81.6 \pm 2.2\%$, $80.8 \pm 3.1\%$, 및 $81.4 \pm 2.4\%$ 이었다.

[0079]

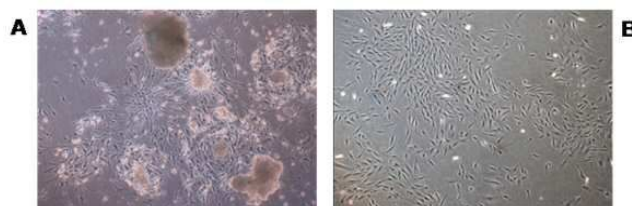
모든 계열-특이적인 마커들도 또한 지지세포 타입 또는 LIF와 무관하게 동정되었다(도 5B).

도면의 간단한 설명

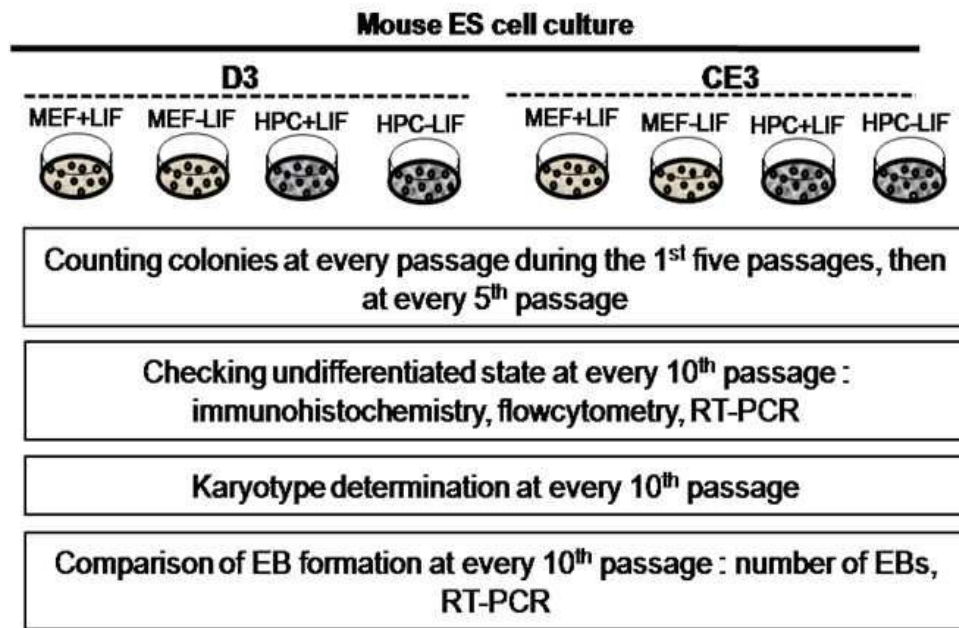
- [0080] 도 1은 태반 유래 세포의 형태를 나타내는 사진이다. (A) 접종 4일 후: 콜로니들은 이종의 형태(heterogenous morphology)를 보이는 세포로 구성되었다. (B) 접종 후 2 주 후: 그 콜로니들은 섬유세포 유사 형태를 가지는 세포들로 동질성있게 구성되었다. 배율(A-B): X40
- [0081] 도 2는 본 발명의 개략도이다. MEF, 마우스 배아 섬유세포(fibroblast), HPC, 인간 태반 유래 섬유아세포(fibroblast-like cell), LIF, 백혈병 저해 인자, +LIF, LIF를 가지는, -LIF, LIF를 공급하지 않은.
- [0082] 도 3은 계대 후의 mESC의 콜로니 카운트의 결과를 나타내는 그래프이다. 지지세포 타입 및 LIF에 따른 네 가지 다른 조건하에서 D3 mESC의 콜로니 카운트이다.
- [0083] 도 4는 50th 계대에서 각 군의 D3 mES 세포 배양의 결과를 나타낸다. 4a는 (A) : 각 컬럼은 동일한 군(D3/MEF/LIF+, D3/MEF/LIF-, D3/HPC/LIF+, D3/HPC/LIF-)의 결과이고 각 행(row)은 mESC 콜로니들의 형태(1-4), ALP(5-8), Oct-4(9-16), Nanog (17-24), 및 SSEA-1 (25-32)의 면역염색의 결과, 및 배아체의 형태(33-36)를 나타낸다. 상단 행(청색)인 9에서 32까지는 DAPI 염색을 나타내고 하단 행(녹색)은 각 마커에 대한 염색의 결과를 나타낸다. 배율(1-4): X40 (5-36): X100.
- [0084] 4b는 (B) : 각 군에서 배아체의 배양 마커 및 ES 세포의 줄기세포성 마커에 대한 RT-PCR 결과를 나타낸다.
- [0085] 4c는 (C) : D3/HPC/LIF- 군에서 mESC의 핵형 결과를 나타낸다.
- [0086] 도 5는 50th 계대에서 각 군의 CE3 mES 세포 배양의 결과를 나타낸다. 5a는 (A) : 각 컬럼은 동일한 군(CE3/MEF/LIF+, CE3/MEF/LIF-, CE3/HPC/LIF+, CE3/HPC/LIF-)의 결과이고 각 행(row)은 mESC 콜로니들의 형태(1-4), ALP(5-8), Oct-4(9-16), Nanog (17-24)의 면역염색의 결과, 및 배아체의 형태(25-28)를 나타낸다. 상단 행(청색)인 9에서 24까지는 DAPI 염색을 나타내고 하단 행(적색)은 각 마커에 대한 염색의 결과를 나타낸다. 배율(1-4): X40 (5-36): X100.
- [0087] 5b는 (B) : 각 군에서 배아체의 배양 마커 및 ES 세포의 줄기세포성 마커에 대한 RT-PCR 결과를 나타낸다.
- [0088] 5c는 (C) : CE3/HPC/LIF- 군에서 CE3 mESC의 핵형 결과를 나타낸다. 배율 (A-P): X100

도면

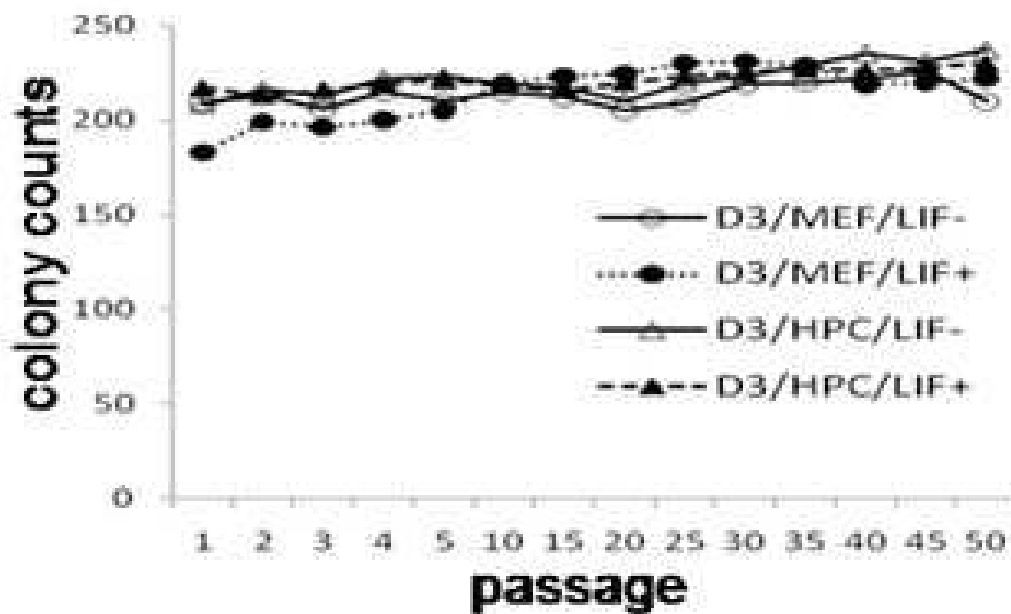
도면1



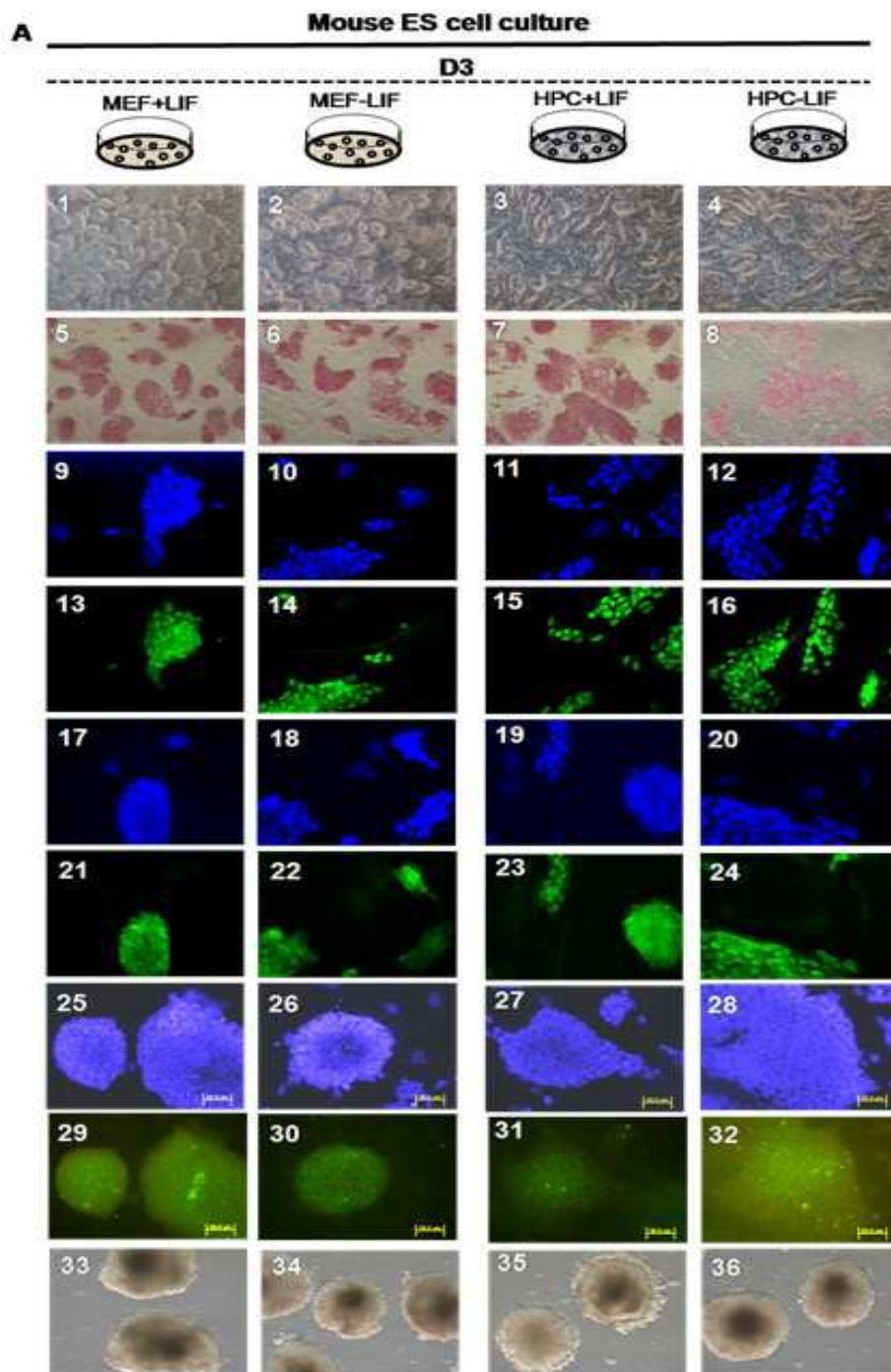
도면2



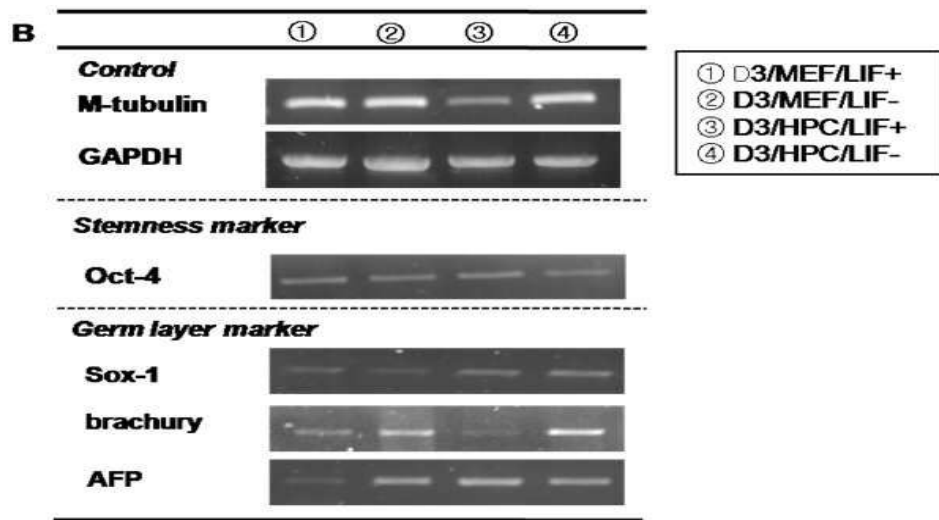
도면3



도면4a



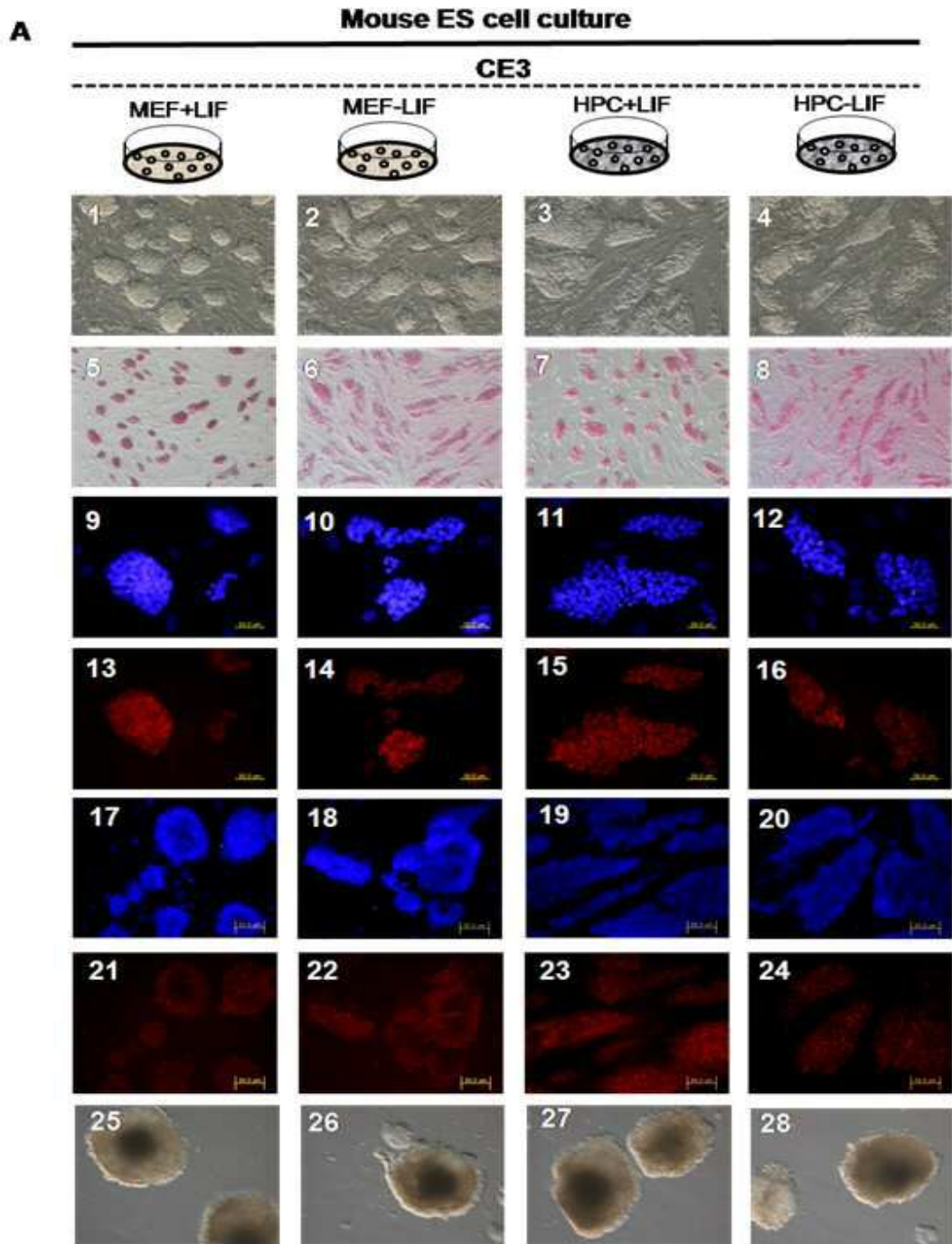
도면4b



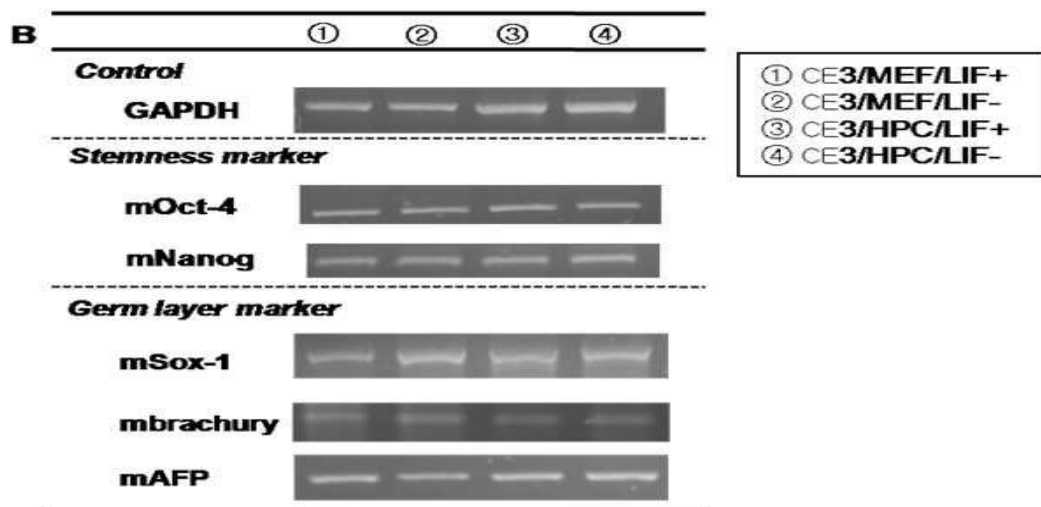
도면4c



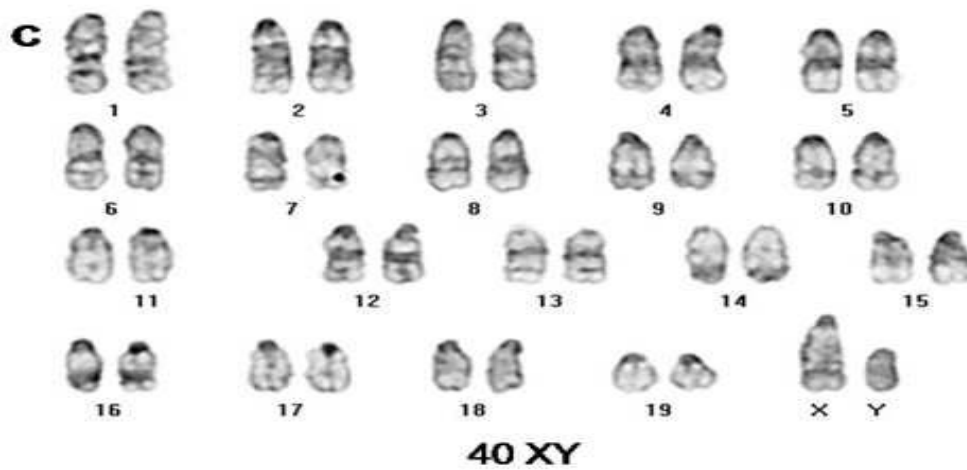
도면5a



도면5b



도면5c



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> A CULTURE METHOD OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELL USING A HUMAN
 PLACENTA-DERIVED FEEDER CELL AND A CULTURE MEDIA THEREOF

<160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

gaggagtccc aggacatgaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

cctgggaaag gtgtcctgta

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

cacaactcgg agatcagcaa

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gagttggaga tggggctgta 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 5
 ccggtgctga aggtaaatgt 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6
 attgtccgca taggttgag 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 aggaggagtg cttccagaca 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

tgcgtgaatt atgcagaagc

20