



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월13일
 (11) 등록번호 10-1746552
 (24) 등록일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 5/0623 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0052198
 (22) 출원일자 2015년04월14일
 심사청구일자 2015년04월14일
 (65) 공개번호 10-2016-0122401
 (43) 공개일자 2016년10월24일
 (56) 선행기술조사문헌
 Lee, HS. et al., Investigative Ophthalmology
 & Visual Science, April 2014, vol.55, 5190
 (ARVO Annual Meeting Abstract)

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
 서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
 성의교정내 (반포동)
 (72) 발명자
주천기
 서울특별시 서초구 방배로 63, 201동 504호 (방배
 동, 방배현대멤피스 2)
이현수
 서울특별시 서초구 반포대로 275, 107동 1202호
 (반포동, 래미안퍼스티지아파트)
 (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 6 항

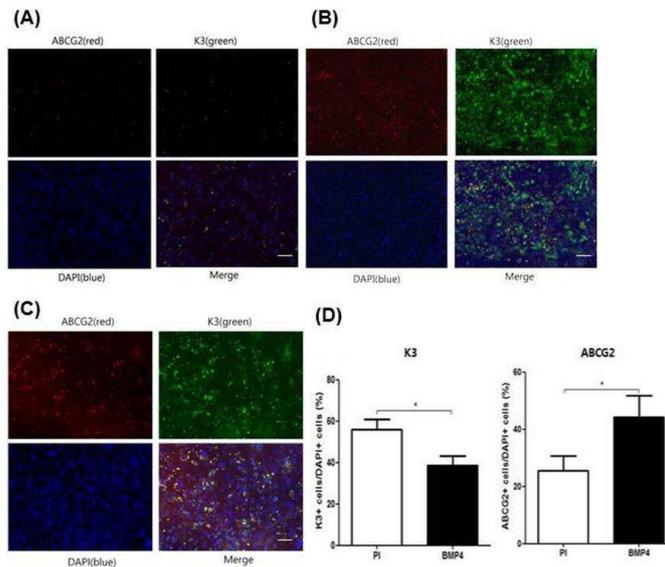
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **줄기세포로부터 각막윤부줄기세포를 분화시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은 줄기세포(stem cell)로부터 각막윤부줄기세포를 분화시키는 방법 및 이에 이용되는 배지 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분화된 각막윤부줄기세포를 유효성분으로 포함하는 각막 손상 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

- C12N 5/0696* (2013.01)
- C12N 2500/46* (2013.01)
- C12N 2501/11* (2013.01)
- C12N 2501/155* (2013.01)
- C12N 2501/33* (2013.01)
- C12N 2501/39* (2013.01)
- C12N 2506/45* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|----------|---------------------------------|
| 과제고유번호 | NRF-2012M3A9C6050207 |
| 부처명 | 미래창조과학부 |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 바이오의료기술개발사업_세포재생기술개발사업 |
| 연구과제명 | 각막상피재생을 위한 각막줄기세포주 구축 및 세포분화 연구 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 가톨릭대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2012.10.01~2017.09.30 |

명세서

청구범위

청구항 1

유도만능줄기세포를 BMP-4(Bone morphogenetic protein-4)가 첨가된 혼합배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 상기 혼합배지는, EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지와 FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium) 배지가 1:2 내지 2:1로 혼합된 것인, 유도만능줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배양 기간은 2일 내지 5일인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양된 세포를, EGF, 인슐린, 하이드로코르티손, 에탄올아민, 포스포에탄올아민 및 BPE를 포함하는 배지와 FBS가 보충된 IMDM 배지가 1:2 내지 2:1로 혼합되어 있는 혼합배지에서 15일 내지 30일 동안 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 BMP-4는 혼합배지에 100 내지 200 ng/ml로 포함된 것인, 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

BMP-4(Bone morphogenetic protein-4)가 첨가된 혼합배지를 포함하며, 상기 혼합배지는, EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지와 FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium) 배지가 1:2 내지 2:1로 혼합된 것인, 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화 유도용 배지 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 BMP-4는 배지 조성물에 100 내지 200 ng/ml로 포함된 것인, 배지 조성물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포(stem cell)로부터 각막윤부줄기세포를 분화시키는 방법 및 이에 이용되는 배지 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분화된 각막윤부줄기세포를 유효성분으로 포함하는 각막 손상 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)란 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 미분화 상태에서 무한 증식이 가능한 자가증식능과 특정 분화 자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재적 가능성인 다분화능을 가진 세포를 말한다. 즉, 배양을 계속하여도 자가증식 능력이 떨어지지 않고 유지되며, 여러 종류의 세포로 분화가 가능해야 한다. 줄기세포에는 배아줄기세포, 성체줄기세포 및 유도만능줄기세포(induced Pluripotent Stem cell; iPS cell) 등이 이에 포함된다.

[0003] 이 중, 유도만능줄기세포는 분화가 끝난 체세포를 분화 이전의 세포 단계로 되돌려 마치 배아줄기세포와 같이 세포 생성 초기의 만능세포 단계로 되돌아간 세포를 말한다. 유도만능줄기세포는 자신의 몸에서 분리한 체세포를 이용하여 유도하는 경우 이식 거부반응 문제가 없고, 난자나 배아를 이용하지 않아 윤리적 문제도 없는 점에서, 많은 과학자들이 다양한 질병 치료, 장기 훼손을 근원적으로 해결할 수 있을 것으로 인식되었다.

[0004] 이러한 점에서, 유도만능줄기세포를 이용하여 여러 세포를 분화시키는 방법 및 이를 이용하여 질병을 치료하는 기술이 개발되고 있으며, 국내공개특허 제2014-0125682호인 "인간 유도만능줄기세포로부터 분화된 신경전구세포를 포함하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물"이 알려져 있다.

[0005] 하지만, 줄기세포는 분화가 되지 않은 세포로서, 추후 어떠한 세포로 분화될지 누구도 알 수 없으며, 돌연변이나 유전적인 이상을 일으킬 수 있는 문제점이 있다. 따라서, 줄기세포를 이용하고자 하는 경우 특정 세포로 분화를 유도할 수 있는 기술이 요구된다.

[0006] 한편, 각막은 눈의 가운데 부위에 있는 안구 표면의 투명한 막으로 외부로부터 눈을 보호하는 기관이다. 각막의 가장 바깥쪽은 상피층으로 손상되더라도 재생되는 조직의 보호층이다. 하지만, 상피층 보다 안쪽에 존재하는 보우만막, 각막내피세포의 경우 한번 손상되는 경우 재생되지 않는다.

[0007] 따라서, 눈의 각막 중 상피층 안쪽이 손상되는 경우 재생되지 않으므로, 시력이 크게 감퇴하거나 실명에 이를 수 있다. 그에 따라, 각막에 대하여 외과적으로 치료가 이루어지거나 각막 이식 등을 통하여 각막의 교체가 이루어져야 할 필요가 있다.

[0008] 하지만, 각막 이식에 있어서, 유아의 경우 수술 후의 안정이 유지되기 어렵고 여러 가지 합병증을 동반할 수 있고, 타인의 각막을 이식하는 점에서 면역 거부 반응이 나타날 수 있고, 각막이영양증의 경우 각막 이식 후에도 재발할 수 있는 문제점이 있다. 나아가, 이러한 각막 이식을 수행하기 위한 기증 각막의 수 또한 턱없이 부족한 실정이다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 줄기세포로부터 각막 재생에 필수적인 각막윤부줄기세포로 분화를 유도하는 방법을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 줄기세포를 BMP-4가 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 방법으로 줄기세포로부터 분화된 각막윤부줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 각막 손상 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 BMP-4를 포함하는, 줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 줄기세포의 일종인 유도만능줄기세포를 BMP-4를 포함하는 분화 유도 배지에서 배양하여, 각막윤부줄기세포로 분화가 이루어지는지 확인하였다.

[0014] 그 결과, 세포의 형태가 각막윤부줄기세포와 같은 둥근 방추형이고, 상피세포의 마커인 K3은 감소하고, 각막윤부줄기세포의 마커인 ABCG2와 p63의 발현이 증가한 것을 확인하여, 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화가 이루어졌음을 확인하였다.

[0015] 이와 같이, 본 발명은 줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로 분화시킬 수 있음을 입증한 것으로, 분화된 각막윤부줄기세포는 손상된 각막의 회복에 사용할 수 있다.

[0016] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0017] 일례로, 본 발명은 줄기세포를 BMP-4가 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

[0018] 다른 예로, 본 발명은 BMP-4 를 포함하는, 줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 관한 것이다.

[0019] 다른 예로, 본 발명은 EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지, 및 FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium) 배지를 1:2 내지 2:1 로 혼합한 배지에 BMP-4가 첨가된 것을 특징으로 하는, 줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 관한 것이다.

[0020] 본 발명에서 용어, 줄기세포란, 동물의 내배엽 (endoderm), 중배엽 (mesoderm) 및 외배엽 (ectoderm) 유래의 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency), 또는 조직 또는 기능에 있어 밀접하게 관련된 세포로 분화할 수 있는 한정된 분화능 (multipotency)을 가지는 세포를 의미한다. 본 발명의 줄기세포는 제한 없이 포함되나, 구체적인 예시로는, 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell) 또는 배아줄기세포(embryonic stem cell; ESC)일 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, "유도만능줄기세포"란, 분화가 끝난 세포를 분화 이전의 세포 단계로 되돌려 배아줄기세포와 같이 전분화 능력(pluripotency)을 유지하면서 무한히 증식(self-renewal)할 수 있는 잠재력이 있는 세포를 의미한다. 본 발명에서 유도만능줄기세포는 다양한 세포에서 역분화된 줄기세포일 수 있으며, 예를 들어, 섬유모세포, 섬유아세포, 혈액세포 등 에서 역분화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 또한, 다양한 세포로부터 유도만능줄기세포로 역분화시키는 방법은 화합물 처리, 유전적 변환 또는 특정 조건으로 배양하는 방법 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이미 분화된 세포에 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 등 리프로그래밍 관련 유전자를 발현시킴으로써 역분화를 유도할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 또한, 배아줄기세포는 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 ICM(inner cell mass; 내세포괴)을 추출하여 체외에서 배양한 것으로 동물의 모든 세포로 분화할 수 있는 다능성(pluripotency)을 가지는 세포를 의미한다.

[0024] 본 발명에서 "BMP-4(Bone morphogenetic protein-4)"는, 뼈 형성 단백질 패밀리(bone morphogenetic protein family) 중 하나로 뼈(bone) 및 연골(cartilage)의 발달과 관계되어 있다. 또한, 연골성 뼈(endochondral bone), 근육 발달(muscle development), 골광화(bone mineralization), 요관썩 발달(ureteric bud development)과 관계된 것으로 알려져 있으나, 줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시키는 성분으로는 전혀 알려져 있지 않다.

[0025] 일례로, 본 발명은 줄기세포를 BMP-4가 포함된 배지에서 배양함으로써 줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시킬 수 있으며, BMP-4는 배지 조성물에 100 내지 200 ng/ml로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0026] 상기 BMP-4가 포함된 배지는, EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 예를 들어, 상기 배지는 EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지, 및 FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium) 배지를 1:2 내지 2:1로 혼합한 배지에 BMP-4를 첨가한 것일 수 있다.
- [0028] 또는, 상기 배지는 EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지, 및 FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium) 배지를 1:1로 혼합한 배지에 BMP-4를 첨가한 것일 수 있다.
- [0029] 일 구현예로, 본 발명은 줄기세포를, EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지, 및 10% FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 Iscove's modified Dulbecco's 배지를 1:2 내지 2:1로 혼합한 배지에 BMP-4를 첨가한 배지에서 줄기세포를 2일 내지 5일, 바람직하게는 2일 내지 3일 동안 배양하는 단계; 및
- [0030] 상기 배양된 세포를, EGF(Epidermal Growth Factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 에탄올아민(Ethanolamine), 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine) 및 BPE(bovine pituitary extract)를 포함하는 배지, 및 FBS(Fetal bovine serum)가 보충된 Iscove's modified Dulbecco's 배지를 1:2 내지 2:1로 혼합한 배지에서 15 내지 30 일 동안 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시킬 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 배지에 BMP-4가 포함되는 경우, BMP-4는 배지에 100 내지 200 ng/ml, 바람직하게는 100 내지 125 ng/ml 포함될 수 있다. 배지에 BMP-4의 농도가 상기 범위를 벗어나는 경우 줄기세포가 각막윤부줄기세포로 분화되지 않을 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "각막윤부줄기세포"란, 각막상피줄기세포가 있는 윤부에 존재하는 줄기세포로, 각막 조직의 유지 및 재생에 관여하는 줄기세포를 의미한다. 따라서, 각막의 손상으로 시력이 감퇴하거나 소실된 환자의 각막에 각막윤부줄기세포를 이식하는 경우 손상된 각막을 회복시키고 시력을 되찾을 수 있다.
- [0033] 이러한 점에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 줄기세포로부터 분화된 각막윤부줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 각막 손상 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 상기 각막 손상이란, 선천적으로 또는 후천적인 물리적 손상, 화학 화상, 병리적 또는 상해 등으로 부분적인 또는 전체적인 윤부 줄기세포의 결핍이나, 재생되지 않은 각막 손상 등으로 시력이 감퇴하거나 소실된 경우일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 병리적 원인으로 인한 시력의 감퇴 또는 소실을 스티븐슨-존슨 증후군(Stevens-Johnson Syndrome)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우, 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 약제학적으로 허용가능한 담체로서 혼합하여 사용할 수 있다. 주사제의 경우는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 국소 투여 시에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니며, 본 발명의 기술분야에 속하는 당업자라면 다양한 형태로 본 발명 각막 손상 치료용 약학 조성물을 제제화할 수 있으며, 다양한 담체나 첨가제들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 각막 손상 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 안구에 분화된 각막윤부줄기세포가 각막 조직의 유지 및 재생 기능을 수행할 수 있는 위치에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통해서도 투여될 수 있고, 예를 들어, 안구에 대한 국소적, 유리체내, 눈주변부, 각막, 결막, 전방내, 망막하, 결막하 또는 윤부 등에 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 각막 손상 치료용 약학 조성물의 치료학적 유효량은 각막 조직의 유지 및 재생 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 환자의 상태, 질환의 경중, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태,

식이, 조성물의 투여 시간 및 투여 방법, 투여 경로 및 배출 속도에 따라 조절될 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 각막 손상 치료용 약학 조성물의 투여는 이식을 의미할 수 있으며, 예를 들어, 각막윤부줄기 세포를 투여하는 것은 각막윤부줄기세포를 이식하는 것으로 이해될 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명은 줄기세포를 각막윤부줄기세포로 분화시키는 방법 및 분화된 각막윤부줄기세포를 유효성분으로 포함하는 각막 손상 치료용 조성물을 제공하고, 각막 손상으로 인하여 시력이 감퇴하거나 소실된 환자의 각막에 분화된 각막윤부줄기세포를 이식함으로써 시력을 회복하고 부족한 기증 각막의 문제점을 해결하여 기증각막에서의 윤부조직 이식을 대체할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명에 따라 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화를 유도하기 위한 배양 방법의 모식도를 나타낸다. "iPS media"는 유도만능줄기세포로 역분화된 세포를 배양하기 위한 배지, "PI media"는 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화를 유도하기 위한 배지를 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따라 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화를 유도한 후, 현미경으로 세포의 형태를 관찰한 결과를 나타낸다. (A)는 유도만능줄기세포(저배율, x100), (B)는 유도만능줄기세포(고배율, x200), (C)는 BMP-4가 첨가되지 않은 배지에 유도만능줄기세포를 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포(고배율, x200), (D)는 BMP-4가 첨가된 배지에서 유도만능줄기세포를 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포(고배율, x200)를 나타낸다.

도 3은 본 발명에 따라 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화를 유도한 후, 각막상피세포 마커 K3와 각막윤부줄기세포 마커 ABCG2의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다. (A)는 유도만능줄기세포, (B)는 BMP-4가 첨가되지 않은 배지에 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포, (C)는 BMP-4가 첨가된 배지에서 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포에서의 마커의 발현 변화를 확인한 면역조직화학염색 결과를 나타낸다. (D)는 BMP-4의 첨가 유무에 따른 마커의 발현 변화를 real time PCR로 확인한 결과를 나타내며, "PI"는 BMP-4가 첨가되지 않은 배지에 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포, "BMP4"는 BMP-4가 첨가된 배지에서 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포를 나타낸다.

도 4는 본 발명에 따라 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화를 유도한 후, 각막윤부줄기세포 마커인 ABCG2 및 p63의 발현 변화를 real time PCR로 확인한 결과를 나타낸다. "PI"는 BMP-4가 첨가되지 않은 배지에 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포, "BMP4"는 BMP-4가 첨가된 배지에서 배양한 후의 분화된 각막윤부줄기세포를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실시예 1. 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화 유도

[0043] 1-1. 분화 유도 배지

[0044] 사람 각막상피세포의 배지로 알려져 있는 Panserin 801 배지(PAN-Biotech GmbH, Germany)와 세포의 증식을 촉진하는 Iscove's modified Dulbecco's 배지(Welgene, Korea of Republic)를 혼합하고 뼈형성단백질-4(Bone morphogenetic protein-4, BMP-4)를 혼합한 배지를 분화 유도배지로 사용하였다. 구체적인 배지 제조방법은 아래와 같다.

[0045] 1) Iscove's modified Dulbecco's 배지 및 10% Fetal bovine serum를 혼합한 배지 제조

[0046] 2) Panserin 801 배지(Epidermal Growth Factor (EGF) + Insulin + Hydrocortisone + Ethanolamine + Phosphoethanolamine + Pituitary Extract) 제조

[0047] 3) 1)의 배지 및 2)의 배지를 1:1로 혼합한 배지 제조

[0048] 4) 3)의 배지에 BMP-4 를 100ng/ml의 농도로 첨가하여 분화 유도 배지 제조

[0049] 1-2. 배양 방법

[0050] 상기 1-1에서 제조한 4)의 분화 유도 배지에 유도만능줄기세포(Human iPS: HPS0002 : 253G1, Riken, Japan) 를 3일간 배양한 후, 4주 동안 실시예 1-1의 3)의 혼합배지에서 2일 마다 배지를 교체하면서 배양하였다. 비교 실험군으로, 유도만능줄기세포를 4주 동안 실시예 1-1의 3)의 혼합배지에서만 2일 마다 배지를 교체하면서 배양하였다.

[0051] 실시예 2. 유도만능줄기세포로부터 각막윤부줄기세포로의 분화 확인

[0052] 2-1. 세포 형태확인

[0053] 상기 실시예 1을 통하여, 유도만능줄기세포가 각막윤부줄기세포로 분화되었음을 확인하기 위하여, 현미경으로 분화 유도된 세포의 형태를 확인하였다.

[0054] 그 결과, 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 1-1의 3) 배지에서만 4주 배양하였을 때(도 2의 C) 보다 BMP-4를 첨가한 실시예 1-1의 4)의 분화 유도 배지에서 배양 한 후 3) 배지에서 4주 배양하였을 때(도 2의 D) 각막 윤부줄기세포와 같은 둥근 방추형으로 분화된 세포의 밀도가 증가한 것을 확인하였다.

[0055] 2-2. 상피세포 및 각막윤부줄기세포 마커 발현 변화 확인

[0056] 유도만능줄기세포가 각막윤부줄기세포로 분화되었음을 확인하기 위하여, 각막상피세포의 마커인 K3, 각막윤부줄기세포 마커인 ABCG2 및 p63의 발현변화를 real time PCR 및 면역조직화학 염색을 수행하였다.

[0057] 우선, real time PCR 을 수행하기 위하여, 배양 4주째 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 분리하여 Trizol 및 RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)을 통해 RNA를 분리하여 biophotometer로 정량화하였다. 각각의 mRNA의 발현을 RT-PCR 분석하기 위해 역전사 과정은 SuperScript IIITM reverse transcriptase (Invitrogen)를 이용하였다. RNA 2 µg을 random primer를 이용해 역전사 반응을 유도하고 25도에서 10분간 incubation한 후 다시 37도에서 120분간 시행하였다. cDNA 100 ng에 TaqMan Universal PCR MasterMix 12.5 µl, gene-specific primer/probe mix 1.25 µl (Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA), PCR grade water 6.25 µl를 더해 PCR 반응을 유도하였다. 이때 95도로 10분간 유지 후, 95도 40 cycle로 15초 그리고 60도 1분간 반응을 유지하였다. 각 mRNA의 발현은 ABI 7000 real-time sequence detection system (Applied Biosystems)으로 측정하였다. PI 배지에서 분화된 iPS 세포의 산물을 기준으로 BMP4를 추가한 iPS 세포의 산물을 상대적으로 비교해 mRNA 발현비를 산출하였는데 comparative CT (threshold cycle) 방법을 이용하였다. 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0058] K3-F: GGCA GAGA TCGA GGGT GTC (서열번호 1)

[0059] K3-R: GTCA TCCT TCGC CTGC TGTA G (서열번호 2)

[0060] ABCG2-F: ACCA TTGC ATCT TGGC TGTC (서열번호 3)

[0061] ABCG2-R: CGAT GCCC TGCT TTAC CAAA (서열번호 4)

[0062] p63-F: CAA CTG CTC AAA GGC ACA AA (서열번호 5)

[0063] p63-R: CCT CCC AGG AAA CAA CAG AA (서열번호 6)

[0064] 또한, 면역조직화학 염색을 수행하기 위하여, 배양 4주째 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 4% 파라포름알데하이드로 15분간 고정된 후 PBS로 세척하고, 비특이적 반응을 억제하기 위해 bovine serum을 30분간 적용하였으며, 혈청을 세척한 후 K3와 ABCG2에 대한 일차항체를 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 그 다음, 각 형광이 부착된 2차항체를 30분간 적용하고, PBS로 수세하였고, VECTASHIELD mounting medium with DAPI와 함께 세포를 커버글라스로 덮고 형광현미경 하에서 관찰하였다.

[0065] 그 결과, 도 3에서 알 수 있는 바와 같이 유도만능줄기세포(도 3의 A)로부터 실시예 1-1의 3) 배지에서만 4주 배양하였을 때(도 3의 B) 보다 BMP-4를 첨가한 실시예 1-1의 4)의 분화 유도 배지에서 배양한 후 3) 배지에서 4

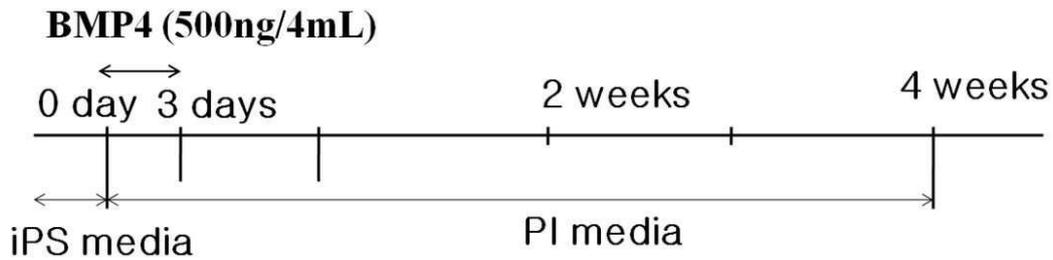
주 배양하였을 때(도 3의 C) 상피세포의 마커인 K3은 감소하고, 각막윤부줄기세포의 마커인 ABCG2 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0066]

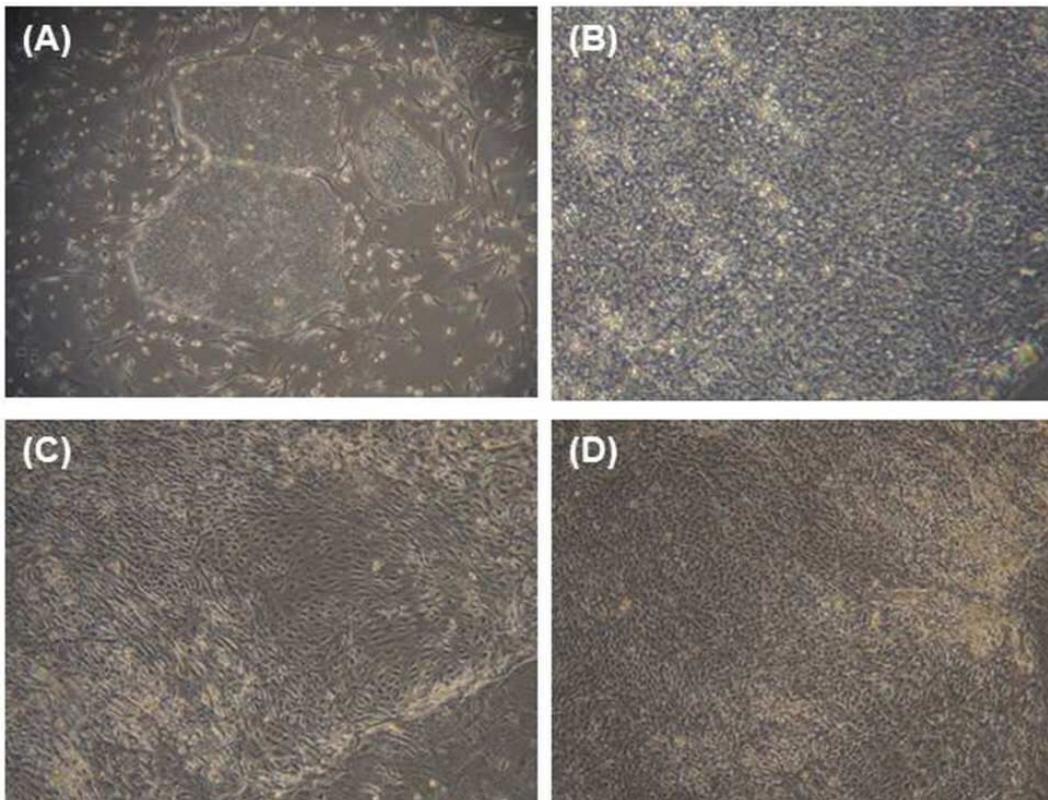
또한, 도 4에서 알 수 있는 바와 같이 유도만능줄기세포로부터 실시예 1-1의 3) 배지에만 4주 배양하였을 때(도 4의 PI) 보다 BMP-4를 첨가한 실시예 1-1의 4)의 분화 유도 배지에서 배양한 후 3) 배지에서 4주 배양하였을 때(도 4의 BMP4) 각막윤부줄기세포의 마커인 ABCG2와 p63의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

도면

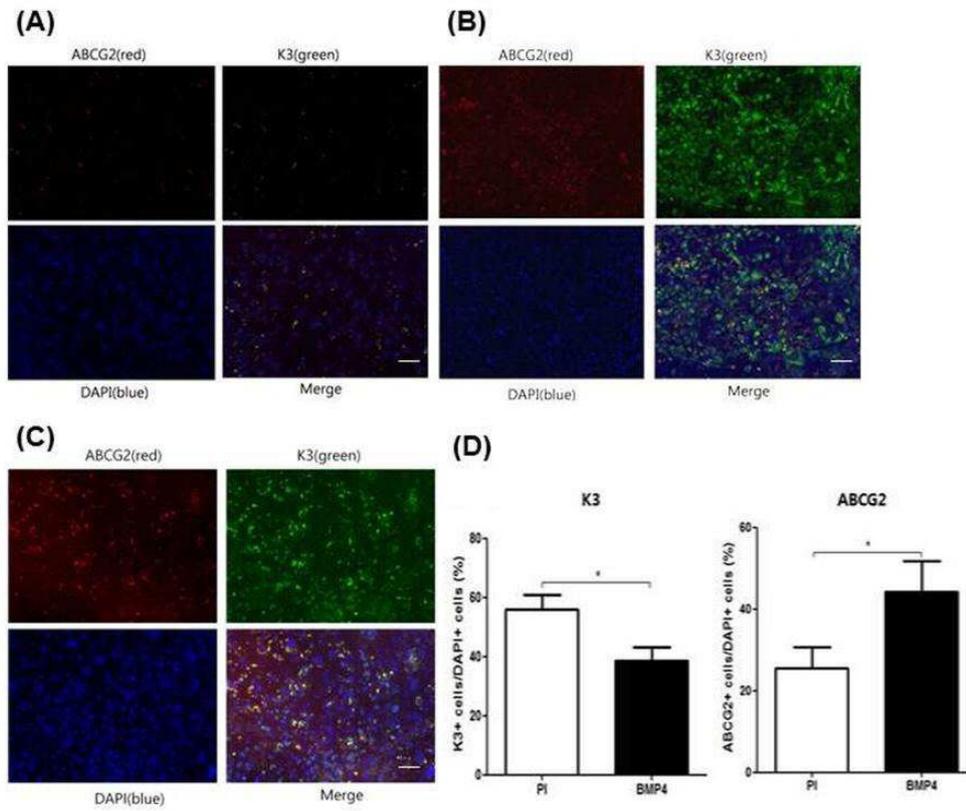
도면1



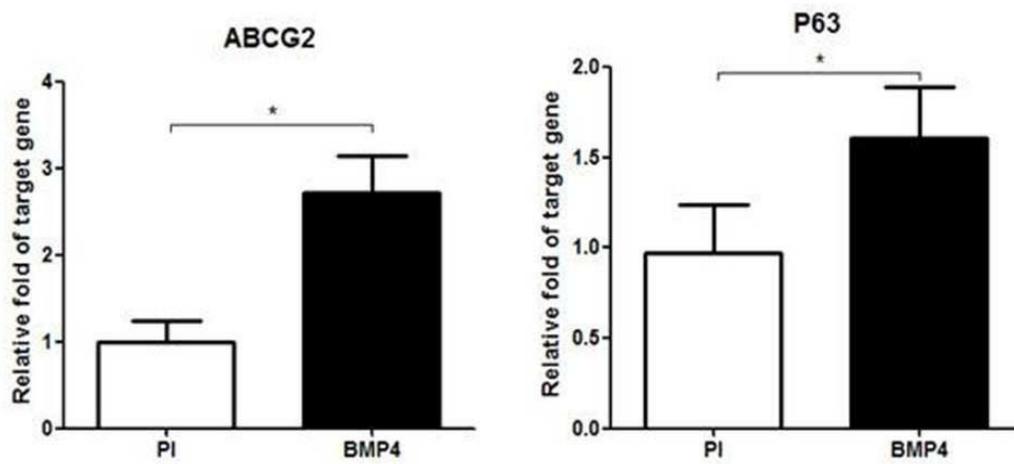
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> CATHOLIC UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Method of inducing differentiation of stem cell into corneal limbal stem cell
- <130> DPP20145260KR
- <160> 6

<170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K3-F primer
 <400> 1
 ggcagagatc gaggtgtc 19
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 K3-R primer
 <400> 2
 gtcaccttc gcctgctgta g 21
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABCG2-F primer
 <400> 3
 accattgcat cttggctgtc 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABCG2-R primer
 <400> 4
 cgatgcctg cttaccaa 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> p63-F primer

<400> 5

caactgctca aaggcacaaa

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p63-R primer

<400> 6

cctcccagga aacaacagaa

20