



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0115764
(43) 공개일자 2016년10월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/55 (2015.01)
C07K 14/635 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
A61K 35/55 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0034484
(22) 출원일자 2016년03월23일
심사청구일자 2016년03월23일
- (30) 우선권주장
1020150042774 2015년03월26일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- 고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
조인호
충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센터)
- 박윤신
서울특별시 구로구 새말로 31, 110동 402호 (구로동, 롯데구로아파트)
- (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 16 항

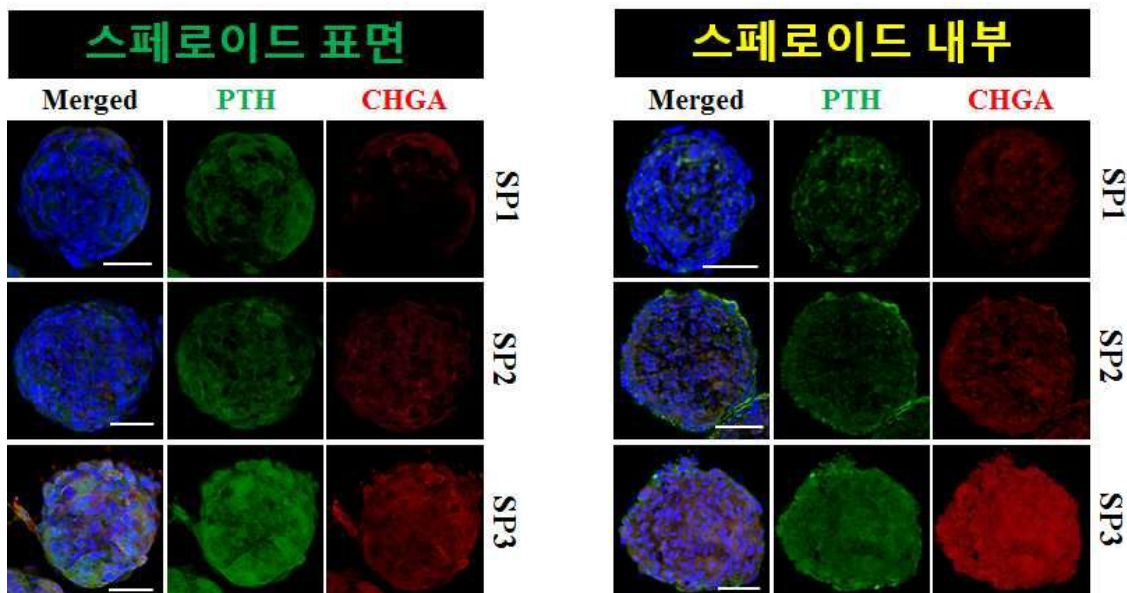
(54) 발명의 명칭 분화촉진 및 지속형 스페로이드 형태의 편도 유래 줄기세포의 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 줄기세포의 성장 및 분화 효율을 증진시킨 스페로이드형 편도 유래 줄기 세포 제조 방법 및 이로부터 스페로이드형 부갑상선 호르몬의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 스페로이드형 편도 유래 줄기세포 제조방법은 편도 유래 줄기세포를 스페로이드형으로 배양함으로써 줄기세포 자체의 증식율을 증진시키고 부갑상선 세포로의 분화능을 현저히 증가시킴으로써, 편도 유래 줄기세포의 성장 및 부갑상선 세포 등으로의 분화에 현저한 효과를 가진다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C07K 14/635 (2013.01)

C12N 5/0617 (2013.01)

C12N 2501/16 (2013.01)

C12N 2501/41 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

(72) 발명자

이상훈

서울특별시 성북구 북악산로 828, 101동 1408호 (정릉동, 정릉스카이쌍용아파트)

황지영

서울특별시 성북구 솔샘로1길 19, 604호 (정릉동)

전예슬

서울특별시 송파구 송이로17길 49, 4층 (가락동)

진윤미

서울특별시 중랑구 신내로3길 8-1 (신내동)

김경아

경기도 안양시 동안구 경수대로 430, 103동 204호 (호계동, 호계e-편한세상아파트)

김하영

경기도 성남시 수정구 수정로154번길 24 (신흥동)

김한수

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 112동 310호 (목동, 한신청구아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049728

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)-바이오의료기술개발사업-세포재생기술개발사업

연구과제명 BINT 융합기술기반 분화유도 시스템에 의한 줄기세포 기능 규명

기 여 율 21/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A3007591

부처명 미래창조과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업, 여성과학자

연구과제명 펩타이드수송체와 화학적으로 결합된 세포투과형 hypoxia inducible factor 1 α 의 제작 및 이를 이용한 부갑상선호르몬 발현 및 분비조절

기 여 율 21/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1557

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발사업, 줄기세포 재생의료분야

연구과제명 편도줄기세포의 부갑상선조직 분화능 및 부갑상선호르몬 분비 조절인자 탐색

기 여 율 21/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2016.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A09004998

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(도약)

연구과제명 신경계와 연결된 바이오장기 개발 및 응용 (약물 스크리닝/질병 모델)

기 여 율 37/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계를 포함하는 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이크로웰은 폴리디메틸실록산로 경화된 것인 편도 유래 줄기세포의 3차원 배양방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 마이크로웰은 너비 100 내지 1000 μ m 및 깊이 60 내지 600 μ m로 제조된 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 배양은 1일 내지 20일 동안 수행되는 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배양은 Fetal bovine serum 및 항생제를 포함하는 DMEM-HG(Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose) 배지에서 수행되는 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법.

청구항 6

- (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 마이크로웰은 폴리디메틸실록산로 경화된 것인 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 1 내지 20 일동안 수행되는 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 액티빈 A는 50 ng/ml 내지 300 ng/ml의 농도 및 상기 소닉 헤지호그는 50 ng/ml 내지

300 ng/ml의 농도로 포함되는 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법.

청구항 10

- (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리 이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계; 및
- (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함하는, 편도 유래 줄기세포로부터 부갑상선 호르몬을 생산 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (c) 단계 후 배양액의 칼슘 농도를 조절하여 부갑상선 호르몬을 세포 밖으로 분비시키는 단계를 더 포함하는, 편도 유래 줄기세포로부터 부갑상선 호르몬을 생산 방법.

청구항 12

- (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 해지호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화 시키는 단계;
- (b) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리 이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 상기 (a) 단계의 세포 현탁액을 투여하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 세포 현탁액에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 스페로이드형 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법.

청구항 13

- (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 해지호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화 시키는 단계;
- (b) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리 이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 상기 (a) 단계의 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계의 세포 현탁액에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 스페로이드형 부갑상선 세포로 분화시키는 단계; 및
- (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함하는, 부갑상선 호르몬을 생산 방법.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 스페로이드(Spheroid)형 편도 유래 중간엽 줄기세포의 분화 방법에 따라 제조된 스페로이드(Spheroid)형 편도 유래 중간엽 줄기세포.

청구항 15

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 분화 방법에 따라 제조된 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포.

청구항 16

제15항에 따른 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포를 포함하는 부갑상선 기능저하증 또는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스페로이드 형태 편도 유래 줄기세포의 제조 및 이의 부갑상선 세포 분화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되고, 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있는 특성이 있으며, 분화 자극에 따라 상이한 세포로도 분화될 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0003] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포이며, 일부 줄기세포는 다분화능 또는 단분화능의 잠재력을 지닌다.

[0004] 상기 줄기세포들이 가지는 분화능을 기초로 세포 치료제로 이용과 관련된 연구 개발이 활발히 진행 중이다. 하지만, 배아 줄기세포를 이용한 세포 치료제의 경우 윤리적 문제나 조직 적합성 불일치 문제가 제기되고 있으며, 역분화 줄기세포를 세포 치료제로 사용할 경우 종양 발생 가능성의 문제가 있다.

[0005] 이에 따라, 분화능이 낮은 것으로 알려져 있지만 상대적으로 안전한 중간엽줄기세포를 이용한 연구가 많이 진행되고 있다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)는 성체 골수 등에 있는 multi-potential non-hematopoietic progenitor cell로서 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 이러한 중간엽 줄기세포를 이용하여 다양한 조직 재생을 위한 임상 연구가 진행되고 있으며, 장기 이식 분야에도 적용가능성을 보이고 있다.

[0006] 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수 채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 증식능력이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0007] 또한, 대부분의 성체 줄기세포는 중배엽 기원의 조직으로는 분화능이 좋은 편이지만, 외배엽과 내배엽 기원의 조직으로 분화가 용이하지 않기 때문에, 분화 제한성 문제의 극복이 필요하다.

[0008] 한편, 부갑상선 호르몬(PTH)은 부갑상선에서 분비되는 84개의 아미노산으로 이루어진 호르몬으로서, 생체내에서 칼슘농도를 조절하는 주요 호르몬이며, 부갑상선기능저하증 및 골다공증 등의 치료제로서 사용될 수 있어 부갑상선 호르몬에 대한 수요는 증가하고 있으나, 아직까지 부갑상선 호르몬을 효과적으로 생산할 수 있는 방법은 개발되지 않은 상태이다. 특히, 부갑상선 조직은 내배엽 기원의 기관으로써, 성체 유래 줄기세포로부터 분화가 매우 어려울뿐더러, 그 효율 역시 실제 상업적으로 이용하기에 부족한 면이 있다.

[0009] 이에 따라, 지속적이고 분화 효율이 높은 줄기세포의 최적의 분화 방법에 관한 연구 개발을 통해, 인체 적용에 적합한 줄기세포 및 분화된 세포를 확보하는 방안에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0130159호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0135263호

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허공보 제10-1282926호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계; 및
- [0012] (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계를 포함하는 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, (a)표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- [0014] (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계; 및
- [0015] (c) 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- [0017] (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계;
- [0018] (c) 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계; 및
- [0019] (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함하는, 부갑상선 호르몬을 생산 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 해지호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화시키는 단계;
- [0021] (b) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 상기 (a) 단계의 세포 현탁액을 투여하는 단계; 및
- [0022] (c) 상기 (b) 단계의 세포 현탁액에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 스페로이드형 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한, (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 해지호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화시키는 단계;
- [0024] (b) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 상기 (a) 단계의 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- [0025] (c) 상기 (b) 단계의 세포 현탁액에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 스페

로이드형 부갑상선 세포로 분화시키는 단계; 및

- [0026] (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함하는, 부갑상선 호르몬을 생산 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 편도 유래 줄기세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 편도 유래 줄기 세포를 제공한다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 부갑상선 세포를 제공한다.
- [0029] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 편도 유래 줄기 세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 편도 유래 줄기 세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 부갑상선 세포를 포함하는 부갑상선 기능저하증 또는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0031] 본 발명자들은 지속적이고 분화 효율이 높은 편도 유래 줄기세포의 배양 방법에 대해 연구하던 중, 편도 유래 줄기 세포를 스페로이드(Spheroid) 형태의 편도 유래 줄기 세포로 배양하고 이로부터 부갑상선 세포를 분화시켜, 이의 분화 효율이 현저함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 편도 유래 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 부갑상선 세포란 갑상선에 부착하여 있는 내분비기관인 부갑상선을 구성하는 세포를 의미하며, 부갑상선 호르몬(PTH)을 분비하며, 혈액의 칼슘과 인의 대사를 조절한다. 본 발명에서는 부갑상선 호르몬을 분비하는 한, 부갑상선 세포에 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 스페로이드형 또는 스페로이드 형태란 대체적으로 단면이 원형 또는 타원형으로 보일 수 있을 정도로 세포가 응집되어 있는 입체 구조를 의미하며, 세포 또는 세포응집체의 특성을 고려해 판단되어야 한다. 본 발명에 있어서 스페로이드형 또는 스페로이드 형태는 완전한 구형 또는 스페로이드형을 의미하는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명은 (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane), 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계; 및
- [0036] (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계를 포함하는 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명에 따른 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법에 의하면 배양이 진행될수록 세포집합체의 직경이 줄어들다가 일정 수준으로 유지되면서 세포집합체의 표면에 울퉁불퉁한 형태들이 점차 상대적으로 매끈한 상태로 바뀌게 되며, 전체적으로 본 발명에서 말하는 스페로이드형 입체 형태를 가지게 된다. 상기 세포집합체는 세포집합체 내의 세포들의 활성이 유지되면서 삼차원의 형태를 유지할 수 있는 정도의 크기로 예컨대, 직경이 250 μm 이하인 것일 수 있으며, 바람직하게 80 내지 250 μm 일 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 스페로이드형 편도 유래 중간엽 줄기세포는 서로 이웃하는 세포들 사이의 세포 연결(junctional complex)과 세포외기질(extracellular matrix, ECM)에 의하여 세포 간의 집합 경계가 적어 비교적 매끈한 외면을 갖는다.
- [0039] 본 발명의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법은 편도 유래 줄기세포를 스페로이드형으로 배양함으로써 줄기세포 자체의 증식율을 증진시키고, 부갑상선 세포등의 다양한 세포로의 분화능을 현저히 증가시킴으로써, 편도 유래 줄기세포 배양에 따른 줄기세포의 성장 및 분화에 현저한 효과를 가진다. 즉, 물리적 배양 환경을 액상 폴리머로 경화된 반구형 마이크로웰로 설정함으로써, 편도 유래 줄기세포 자체의 증식율을 증가시

킬 뿐만아니라 세포 분화시에 분화 유도제의 사용기간을 현저히 단축시킬 수 있으며, 나아가 2차원에서의 사전 분화기간을 생략함으로써 시약 사용의 절감효과 및 인건비 절감, 작업시간의 단축 등 경제적 효과에도 크게 기여한다.

- [0040] 본 발명의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법은 (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기세포 현탁액을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 반구형 마이크로웰의 제조에 관하여 대한민국 등록 특허 10-1282926호(표면장력을 이용한 반구형 마이크로웰의 제조 및 이를 이용한 세포 집합체의 형성)에 기술된 내용이 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0042] 본 발명에 있어 스페로이드형 편도 유래 줄기 세포 제조를 위한 마이크로웰은 편도 유래 줄기 세포의 배양시 스페로이드 형태의 세포 집합체를 형성할 수 있도록 사용하는 Concave 구조를 가지는 몰드에 포함되는 마이크로웰일 수 있다.
- [0043] 마이크로웰은 표면 장력에 의해 마이크로웰 내에 메니스커스를 형성할 수 있는 정도의 적절한 양의 상기 액상의 폴리머가 주입되고 이를 열 또는 UV에 의해 경화하여 제조될 수 있으며, 액상의 폴리머의 주입은 메니스커스를 형성하기 위한 적절한 양으로 주입되거나 마이크로웰의 상당 부분 이상을 채운 후 이를 제거하는 방법으로 주입 및 제거 될 수 있다.
- [0044] 마이크로웰은 바람직하게 Polydimethylsiloxane (PDMS)의 액상 폴리머로 경화된 오목한 구조를 가지며, 수개 내지 수천 개의 마이크로웰이 하나의 몰드(Multiple-concave형 몰드)에 포함될 수도 있다. 본 발명의 실시양태에 따른 몰드의 대략적인 구조는 도 1에 나타내었다.
- [0045] 마이크로웰은 그 너비가 100 내지 1000 μ m, 예컨대 300 내지 600 μ m일 수 있고, 깊이가 60 내지 600 μ m, 예컨대, 200 내지 400 μ m일 수 있다.
- [0046] 마이크로웰은 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 경화되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게 폴리디메틸실록산으로 경화될 수 있다. 즉, 상기 액상 폴리머는 표면장력을 통해 마이크로웰 내에 메니스커스를 형성하며, 메니스커스를 형성한 액상 폴리머를 경화시켜 편도 유래 줄기 세포의 스페로이드형 세포로 배양에 적합한 환경을 부여한다.
- [0047] 상기 마이크로웰은 세포 투여 전에 웰의 반구형 표면의 세포부착을 막기 위한 코팅이 실시될 수 있으며, 예를 들어 소혈청 알부민으로 위의 세포집합체 배양용 웰을 코팅하는 등의 처리를 할 수도 있다.
- [0048] 상기 편도 유래 줄기세포 현탁액은 1×10^2 개 내지 1×10^5 개 바람직하게, 5.0×10^2 내지 1×10^4 개의 세포까지 하나의 마이크로웰(즉, 웰당 세포수)에 포함될 수 있다.
- [0049] 편도 유래 줄기세포 현탁액은 당업계에서 일반적으로 사용되는 줄기세포 배양액을 포함할 수 있으며, 바람직하게 Fetal bovine serum 및 항생제를 포함하는 DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose) 배지를 사용할 수 있고, 상기 항생제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 스트렙토마이신, 암피실린 등이 될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법은 (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계를 포함한다. 편도 유래 줄기 세포를 배양하는 단계는 상기 줄기세포 배양액을 이용하여 수행될 수 있으며, 바람직하게 1 내지 20일 동안, 보다 바람직하게 1 내지 14일 동안, 보다 바람직하게 2 내지 7일동안 수행할 수 있다. 상기 배양기간이 바람직하기는 하나, 스페로이드형 세포의 형성 과정을 살펴면서 원하는 크기 내지 세포 형태에 도달하는 경우, 배양 기간을 조정함으로써 원하는 스페로이드형 세포의 제조가 가능하다.
- [0051] 본 발명에 따른 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법은 상기 제조된 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 회수하는 단계는, 위의 과정으로 제조한 스페로이드형 편도 유래 중간엽 줄기세포를 회수하는 과정이다. 회수되는 스페로이드형 편도유래 중간엽 줄기세포(세포집합체)의 크기는 위의 마이크로웰의 직경과 깊이를 조절하는 방법으로 조절될 수 있으며 실질적으로 균일한 크기로 세포

집합체를 제조할 수 있다.

- [0053] 예를 들어, 평균 직경이 약 500 μm 인 마이크로웰을 이용하여 세포집합체를 제조하는 경우, 투여 직후 자기조립이 진행 중 스페로이드형 편도 유래 중간엽 줄기세포가 대략 250 μm 정도의 직경을, 배양이 진행되면서 비교적 매끄러운 외형의 세포집합체를 형성이 완성될 경우에는 대략 150 μm 정도의 직경의 세포집합체가 제조된다.
- [0054] 예를 들어, 평균 직경이 약 300 μm 인 웰을 이용하여 세포집합체를 제조하는 경우, 투여 직후 자기조립이 진행 중인 스페로이드형 편도 유래 중간엽 줄기세포의 경우 대략 100 μm 정도의 직경을, 배양이 진행되면서 비교적 매끄러운 외형의 세포집합체를 형성이 완성될 경우에는 대략 80 μm 정도의 직경을 가지는 세포집합체를 제조할 수 있다.
- [0055] 본 발명은 또한, (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- [0056] (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계; 및
- [0057] (c) 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법은 스페로이드형으로 제조된 편도 유래 줄기세포를 부갑상선 세포로 분화시킴으로써 분화능이 현저히 증가함과 동시에, 부갑상선 호르몬의 분비가 크게 증가하고, 부갑상선 세포로의 분화를 위한 시간을 기존보다 크게 단축시킨다. 즉, 세포 분화시에 분화 유도제의 사용기간을 현저히 단축시킬 수 있으며, 2차원에서의 사전 분화 기간을 생략하여 분화 방법으로써 현저한 효과를 지닌다.
- [0059] 상기 (a) 단계 및 (b) 단계는 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포 제조 방법에서 언급된 내용이 적절히 변형되어 적용될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법은 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 본 발명의 방법에 있어서, 액티빈 A (Activin A) 는 TGF- β 슈퍼패밀리의 구성원으로서, 중배엽 유도, 신경세포 분화, 골 리모델링, 조혈작용 등의 광범위한 생물학적 활성을 갖는 물질이다. 본 발명에 있어서 액티빈 A는 50 ng/ml 내지 300 ng/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게 80 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0062] 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, shh)는 헤지호그로 불리는 포유류 시그널링 경로 패밀리 내의 3가지 단백질 중 하나로서, 그 농도에 따라 발생 중인 배(embryo)의 세포에 상이한 영향을 미치는 몰포젠 (morphogen)의 일종이며, 또한 성체 줄기세포의 세포 분열을 제어할 수 있다. 본 발명에 있어서 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, shh)는 50 ng/ml 내지 300 ng/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게 80 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 부갑상선 세포로 분화 단계는 바람직하게 3 내지 15일 동안, 보다 바람직하게 4 내지 10일 동안 수행될 수 있다. 상기 배양 기간이 바람직하기는 하나, 부갑상선 세포로의 분화 정도에 따라 배양 기간을 조정함으로써 원하는 스페로이드형 세포의 제조가 가능하다. 이러한 분화 단계는 기존에 알려진 2차원 배양방법과 대비하여 현저하게 분화 기간을 단축시키면서도 분화 효율을 증진시킨 것이다. 발명의 방법에 있어서, 분화 유도시 사용되는 배지는 줄기세포의 배양을 위해 이용될 수 있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들면, DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), Keratinocyte-SFM (Keratinocyte serum free medium), RPMI-1640 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 DMEM 배지를 사용할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 사용되는 편도세포의 분리 및 부갑상선 세포로 분화방법에 관하여 각각 대한민국 등록 특허 10-1508413호 (키메라 중간엽 줄기세포군 및 그의 제조방법) 및 10-1520531호 (편도줄기세포를 이용하여 부갑상선 호르몬을 생산하는 방법)에 기술된 내용이 본 명세서에 참조로 포함된다.

- [0065] 본 발명은 또한, (a) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 편도 유래 줄기 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- [0066] (b) 상기 (a) 단계의 편도 유래 줄기 세포를 반구형 마이크로웰에서 배양하여 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포를 제조하는 단계;
- [0067] (c) 상기 (b) 단계의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 부갑상선 세포로 분화시키는 단계; 및
- [0068] (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함하는, 부갑상선 호르몬을 생산 방법을 제공한다.
- [0069] 본 발명의 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법은 편도 유래 줄기세포를 스페로이드 형태로 제조하여 부갑상선 세포로 분화시킴으로써 분화능이 현저히 증가함과 동시에, 부갑상선 호르몬의 분비가 크게 증가하고, 부갑상선 세포로의 분화를 위한 시간을 기존보다 크게 단축시킨다. 즉, 세포 분화시에 분화 유도제의 사용기간을 현저히 단축시킬 수 있으며, 2차원에서의 사전 분화 기간을 생략하여 분화 방법으로써 현저한 효과를 지닌다.
- [0070] 본 발명에 따른 부갑상선 호르몬 생산 방법은 분비능이 증진된 스페로이드형 부갑상선 세포로부터 부갑상선 호르몬을 제조함으로써, 기존에 알려진 방법과 대비하여 부갑상선 호르몬의 생산량이 크게 증가하며, 세포 분화시 걸리는 시간이 감소되어 부갑상선 호르몬 생산에 현저한 효과를 가진다.
- [0071] 상기 (a), (b) 및 (c) 단계는 앞서 부갑상선 세포의 제조 방법에서 언급된 내용이 적절히 변형되어 적용될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 부갑상선 호르몬을 생산하는 방법은 상기 (d) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0073] 배양액 또는 세포용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계는 단백질의 분리 및 정제에 이용될 수 있는 일반적인 방법을 이용하여 실시될 수 있으며, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 공침전 등의 방법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 통상의 기술자가 적절히 선택하여 실시할 수 있다.
- [0074] 부갑상선 호르몬은 부갑상선 세포 내에서 생산된 후 분비 과립 형태로 세포 내에서 존재하게 되며, 세포 외부 칼슘 농도에 따라 세포 밖으로의 분비 여부가 결정된다. 따라서, 편도줄기세포로부터 유도된 부갑상선 조직세포에서 생산된 부갑상선 호르몬의 세포 밖으로의 분비를 촉진하여 부갑상선 호르몬의 분리를 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 방법은 상기 (c) 단계 후 배양액의 칼슘 농도를 조절하여 부갑상선 호르몬을 세포 밖으로 분비시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0075] 바람직하게는, 부갑상선 세포로부터 부갑상선 호르몬의 분비를 촉진하기 위하여, 배양액의 칼슘 농도를 1.5 mM 미만, 바람직하게는 1.0 mM 미만이며, 보다 바람직하게는 0.5 mM 미만이며, 가장 바람직하게 0.1 mM 미만으로 조절할 수 있다.
- [0076] 본 발명은 또한, (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 해지호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화시키는 단계;
- [0077] (b) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 상기 (a) 단계의 세포 현탁액을 투여하는 단계; 및
- [0078] (c) 상기 (b) 단계의 세포 현탁액에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 해지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 스페로이드형 부갑상선 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법은 2차원 조건의 분화 조건에서 사전 분화처리된 세포를 3차원 조건에서 스페로이드형으로 배양함으로써 부갑상선 세포로 분화능을 현저히 증가함과 동시에, 부갑상선 호르몬의 분비가 크게 증가시키며 부갑상선 세포로의 분화를 위한 시간을 기존보다 크게 단축시킨다.
- [0080] 상기 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법은 (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 해지

호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화 시키는 단계를 포함한다.

- [0081] 본 발명에 있어서 액티빈 A는 50 ng/ml 내지 300 ng/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게 80 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 포함될 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, shh)는 50 ng/ml 내지 300 ng/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게 80 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0082] 본 발명에 있어서, 부갑상선 세포로 분화 단계는 스페로이드형 세포로의 분화 방법 및 분화 기간에 따라 배양 기간이 조정 가능하며, 바람직하게는 1일 내지 20일 간 2차원으로 배양이 가능하다. 발명의 방법에 있어서, 분화 유도시 사용되는 배지는 줄기세포의 배양을 위해 이용될 수 있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들면, DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), Keratinocyte-SFM (Keratinocyte serum free medium), RPMI-1640 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 DMEM 배지를 사용할 수 있다.
- [0083] 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 앞서 편도 유래 줄기세포로부터 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법의 (a) 단계 및 (c) 단계가 당업자의 적절한 판단 범위 내에서 본 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법에서도 적용이 가능하다.
- [0084] 본 발명은 또한, (a) 편도 유래 줄기 세포에 액티빈 A 및 소닉 헤지호그를 처리하여 편도 유래 줄기 세포를 분화 시키는 단계;
- [0085] (b) 표면 장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하는 폴리디메틸실록산, 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄 중 선택된 어느 하나 이상의 액상 폴리머가 반구형 마이크로웰 형태로 경화된 반구형 마이크로웰에 상기 (a) 단계의 세포 현탁액을 투여하는 단계;
- [0086] (c) 상기 (b) 단계의 세포 현탁액에 액티빈 A(Activin A) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)를 첨가하여 스페로이드형 부갑상선 세포로 분화시키는 단계; 및
- [0087] (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 배양액 또는 세포 용해액으로부터 부갑상선 호르몬을 분리하는 단계를 포함하는, 부갑상선 호르몬을 생산 방법을 제공한다.
- [0088] 본 발명에 따른 부갑상선 호르몬 생산 방법은 분비능이 증진된 스페로이드형 부갑상선 세포로부터 부갑상선 호르몬을 제조함으로써, 기존에 알려진 방법과 대비하여 부갑상선 호르몬의 생산량이 크게 증가하며, 세포 분화시 걸리는 시간이 감소되어 부갑상선 호르몬 생산에 현저한 효과를 가진다.
- [0089] 상기 (a), (b) 및 (c) 단계는 앞서 스페로이드형 부갑상선 세포의 제조 방법에서 언급한 바와 같다. 또한, 상기 (d) 단계는 앞서 부갑상선 호르몬을 생산 방법에서 제시된 (d) 단계의 내용이 적용 가능하다.
- [0090] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 편도 유래 줄기세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 편도 유래 줄기 세포를 제공한다. 본 발명의 스페로이드(spheroid)형 편도 유래 줄기세포는 줄기세포 자체의 증식율이 증진되며, 부갑상선 세포 등의 다양한 세포로의 분화능을 현저히 증가되는 장점을 지닌다.
- [0091] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 부갑상선 세포를 제공한다.
- [0092] 본 발명에 따른 스페로이드형 부갑상선 세포는 일반적인 2차원 배양을 통해 제조된 부갑상선 세포와 대비하여 부갑상선 호르몬의 생산이 현저히 증가하고, 부갑상선 조직에 특이적인 GCM2(glial cells missing homolog2), CaSR(calcium sensing receptor), CCL21(chemokine(C-C motif) ligand 21), CHGA (Chromogranin A) 등의 유전자 발현을 크게 증가시킨다. 이에 따라, 부갑상선 호르몬 생산 및 세포치료제로써 현저한 효과를 지닌다.
- [0093] 본 발명은 또한, 상기 스페로이드(Spheroid)형 부갑상선 세포의 제조 방법에 의해 제조된 스페로이드형 부갑상선 세포를 포함하는 부갑상선 기능저하증 또는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0094] 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 부갑상선 기능저하증 또는 골다공증에 사용될 수 있다.
- [0095] 상기 부갑상선 기능저하증 또는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 부갑상선 기능저하증 또는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로

허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0096] 본 발명의 스페로이드형 편도 유래 줄기세포 제조방법은 편도 유래 줄기세포를 스페로이드형으로 배양함으로써 줄기세포 자체의 증식율을 증진시키고 부갑상선 세포로의 분화능을 현저히 증가시킴으로써, 편도 유래 줄기세포의 성장 및 부갑상선 세포 등으로의 분화에 현저한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0097] 도 1은 폴리디메틸실록산 (PDMS) 경화된 Multiple-concave형 몰드를 이용한 스페로이드형 세포의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 스페로이드형 세포의 제조를 위한 2차원 및 3차원 배양 과정 기간에 대한 설명을 나타내는 도이다.

도 3은 SP1 스페로이드형 세포의 제조 과정 동안의 형태, 크기 및 세포 생존 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 SP2 스페로이드형 세포의 제조 과정 동안의 형태, 크기 및 세포 생존 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 SP3 스페로이드형 세포의 제조 과정 동안의 형태, 크기 및 세포 생존 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 2차원 배양 및 스페로이드형 3차원 배양을 통한 편도 유래 줄기세포 및 분화 세포의 부갑상선 호르몬 유전자 발현 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 SP1, SP2 및 SP3의 스페로이드형 세포의 스페로이드 표면 및 내부에서의 부갑상선호르몬 (PTH) 및 Chromogranin A (CHGA) 단백질의 발현 및 분포를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 2차원 배양 및 스페로이드형 3차원 세포 배양을 통한 편도 유래 줄기세포 및 분화 세포에서 분비되는 부갑상선 호르몬의 농도 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 SP3의 스페로이드형 세포가 주입된 부갑상선 절제 래트의 3개월간 생존 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 10은 SP3의 스페로이드형 세포가 주입된 부갑상선 절제 래트의 3개월 경과 후 형태 및 외관 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0099] <실시예 1> 편도 유래 줄기세포의 배양

[0100] 이화여자대학교 목동병원 이비인후두경부외과의 환자중에서 10세 미만의 6명의 환자 (남아 5인, 여아 1인, 평균 연령 7.2세)를 대상으로 편도선 절제술을 시행하였다. 본 연구수행은 임상윤리위원회의 심의를 통과하였다 (ECT 11-53-02). 적출된 편도조직의 3분의 2는 임상조직검사에 사용하였으며, 나머지 3분의 1을 본 실험에 사용하였다.

[0101] 채취한 편도조직을 생리식염수로 세척한 후, 효소혼합액 210 U/ml의 콜라겐분해효소 I(collagenase type

I)(Invitrogen)과 10 μ g/ml DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)가 혼합된 세포배양액 RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)에서 37 °C의 조건하에서 30분 동안 편도 조직 내의 결합조직을 분쇄하였다. 부유된 조직을 원심분리, 여과하여 세포를 획득하였다. 획득한 세포를 RPMI 1640/20% NHS (normal human serum) (PAA Laboratories, GmbH, Paching, Austria)로 2회 세척하고, RPMI 1640/10% NHS로 1회 세척하였다. 세척된 세포를 Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 구매 원심분리에 적용하여 단핵 세포들을 수득하였다. 상기 단핵세포 10⁸개를 10% 우태혈청(Fetal bovine serum, FBS, Invitrogen), 100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 100U/ml 암피실린을 함유하는 DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose) (Invitrogen)매지에 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 부착되지 않은 세포는 제거하고, 편도조직 유래 줄기세포 (tonsillar mesenchymal stem cells, T-MSC)로 간주되는 부착된 세포는 4주에 걸쳐 3-5세대까지 계대 배양하여 본 실험에 사용하였다.

[0102] <실시예 2> Concave mold를 사용한 편도 유래 줄기세포(TMSC)의 3차원 스페로이드 배양

[0103] 상기 실시예 1에서 획득한 편도 유래 줄기세포의 3차원 배양 방법은 도 1의 구조를 가지는 Mold에서 수행되었다. 3차원의 스페로이드 구조를 형성하도록 유도하기 위해서 사용한 몰드는 500 μ m의 너비 및 300 μ m의 깊이를 가지는 마이크로 웰을 포함하며 폴리디메틸실록산 (Polydimethylsiloxane, PDMS)으로 제작된 오목한 구조를 가지는 몰드이다. 본 몰드는 스페로이드형 구조로 세포 응집체를 형성하여 세포가 자라는데 최적의 마이크로웰 너비 및 깊이를 가지는 것이며, Multiple-concave형 몰드로, 수 백개 내지 수 천개의 스페로이드형 세포의 제조가 가능한 장점을 가진다.

[0104] 구체적으로, 대한민국 등록특허 제10-1282926호에 설명된 바와 같이, 소프트 리소그래피(soft lithography techniques)와 PDMS 프리폴리머(polydimethylsiloxane prepolymer)의 메니스커스(meniscus)를 이용하여 플레이트의 단위 cm²당 100 wells의 밀도로 배열되도록 제조하였고, 세포부착을 막기 위하여 3% (w/v) BSA(bovine serum albumin)으로 코팅하여 실험에 사용되었다.

[0105] 상기 Concave 몰드를 이용하여, 미분화 상태의 편도 유래 줄기세포 또는 편도 유래 줄기세포로부터 분화된 부갑상선 세포를 도 2에 기재된 조건과 같이 3 종류로 구분하여 스페로이드형 세포를 제조하였다.

[0106] 첫 번째 스페로이드형 세포 (SP1)는 미분화 상태의 세포를 2차원 상태에서 7일간 상기 실시예 1의 편도 유래 줄기세포의 배양 조건에서 배양한 후, 트립신으로 떼어낸 뒤, 3차원 스페로이드형 세포 유도용 concave 몰드에 옮겨 동일 배지 조건 하에, 추가로 14일간 배양한 것이다.

[0107] 두 번째 스페로이드형 세포 (SP2)는 2차원 상태에서 7일간 5% FBS, 액티빈 A (activin A, 100 ng/ml, R&D System, Inc. Minneapolis)와 sonic hedgehog (Shh, 100ng/ml, R&D Systems)를 포함하는 DMEM 배지에서 편도 유래 줄기세포를 배양하여 부갑상선 세포로의 분화를 유도한 후, 이를 트립신으로 떼어낸 뒤, 3차원 스페로이드형 세포 유도용 concave 몰드로 옮겨 추가 14일간 동일 배지 조건 상태에서 배양한 것이다.

[0108] 세 번째 스페로이드형 세포 (SP3)는 2차원 상태에서 7일간 상기 실시예 1의 편도 유래 줄기세포의 배양 조건에서 배양한 후, 이를 트립신으로 떼어낸 뒤, 3차원 스페로이드형 세포형제작용 concave 몰드로 옮겨 7일 동안 동일 배지 조건하에 분화 조건을 부여하지 않고 배양하여 스페로이드형을 형성하는 과정에 우선 방향성을 갖도록 유도한 후, 스페로이드 형태가 형성된 것을 확인한 후에 추가 7일간 분화용 배지인 5% FBS, 액티빈 A (activin A, 100 ng/ml, R&D System, Inc. Minneapolis)와 sonic hedgehog (Shh, 100ng/ml, R&D Systems)를 포함하는 DMEM 분화배지로 배양한 것이다.

[0109] 스페로이드형 세포의 제조과정에서 각 웰당 1 $\times$ 10³개의 세포가 하나의 concave well에 들어가도록 세포를 seeding되었으며, 상기 미분화 또는 분화 배양 배지는 2-3일 간격으로 교환되었다.

[0110] <실시예 3> 스페로이드형 세포의 모양, 세포의 크기 및 세포 생존 변화 확인

[0111] 상기 SP1, SP2 및 SP3의 세 가지 종류로 제작한 스페로이드형 세포의 모양 및 크기는 배양기간에 따라 현미경으로 관찰하였으며, 각각의 스페로이드형 세포의 크기를 현미경내의 scale bar로 대비하여 측정하였다.

[0112] 또한, 세포 생존 여부 변화를 확인하기 위하여, SP1, SP2 및 SP3의 세 가지 종류로 제작한 스페로이드형 세포의 생존 상태를 확인하였다. 이를 위해서 LIVE/DEAD[®] assays kit (Invitrogen)를 이용하여 스페로이드 제조 과정 동안 살아있는 세포 (녹색)와 죽은 세포 (적색)의 존재를 확인하였다. 이는 살아있는 세포에서 세포간 esterase 활성이 있음을 반영하는 green-fluorescent calcein-AM 염색과 죽은 세포에서 감지되는 혈장막의 integrity가

손실된 경우에 나타나는 red-fluorescent ethidium homodimer-1 염색을 동시에 실시해 죽은 세포와 살아있는 세포를 신속하게 구분하는 원리에 의한 것이다.

[0113] 상기 실험 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었다.

[0114] 도 3은 SP1의 스페로이드형 세포, 도 4는 SP2의 스페로이드형 세포 및 도 5는 SP3의 스페로이드형 세포의 실험 결과를 나타낸다.

[0115] 도 3은 SP1의 스페로이드형 세포의 실험 결과를 나타낸다.

[0116] 도 3의 A는 배양하는 과정동안 1일째, 3일째 및 7일째의 스페로이드형 세포의 모양을 나타내며, 도 3의 B는 세포의 크기를 나타낸다. SP1의 스페로이드형 세포 크기는 237.44 μm 의 스페로이드를 처음 형성한 후, 7일째에는 138.17 μm 크기의 스페로이드로 작고 응축된 형태의 스페로이드형 세포가 제조되는 것이 확인되었다. 또한, 스페로이드형 세포를 제조하는 과정에서의 생존율 변화를 도 3의 C에 나타내었다. 도 3의 C에 나타난 바와 같이 7일째까지 녹색으로 염색된 생존한 세포의 빈도가 매우 높았으며, 적색으로 염색된 죽은 세포의 빈도는 거의 나타나지 않음을 확인하였다.

[0117] 도 4는 SP2의 스페로이드형 세포의 실험 결과를 나타낸다.

[0118] SP2의 스페로이드의 모양 변화는 도 4의 A와 같으며, 크기 변화는 도 4의 B에 나타내었다. 크기는 278.88 μm 크기의 스페로이드로 SP1보다 다소 큰 형태의 스페로이드를 처음 형성한 후, 점차 감소하여 7일째에는 177.88 μm 크기의 스페로이드가 형성된 것을 확인하였다. 즉, SP2는 SP1보다 크고 덜 응축된 형태의 스페로이드형 세포가 형성되었음을 확인하였다. 또한, SP1과 다르게, SP2 스페로이드의 주변으로 스페로이드 내에 존재하는 세포가 스페로이드 바깥쪽으로 뿔어나가는 이동현상이 확인되었고, 이는 향후 스페로이드형 세포의 생체 내 생착과 관련성이 높음을 알 수 있다. 도 4의 C는 SP2 스페로이드형 세포의 viability를 보여주며, 7일째까지도 녹색으로 염색된 생존 세포가 대다수인 높은 생존율을 보임을 확인하였다.

[0119] 도 5는 SP3의 스페로이드형 세포의 실험 결과를 나타낸다.

[0120] SP3의 스페로이드의 모양 변화는 도 5의 A와 같으며, 크기 변화는 도 5의 B와 같다. 1일차의 세포 크기는 255.78 μm 로 SP1과 SP2 스페로이드의 중간정도 크기였으며, 스페로이드 형성 기간이 경과함에 따라 7일째에는 152.89 μm 크기로 응축된 것을 확인하였다. 또한, SP3 스페로이드 주변으로 세포가 뿔어나가는 이동현상이 SP2보다 더 높은 빈도로 확인되었다. 도 5의 C는 SP3 편도 유래 줄기세포의 viability을 나타내며, 배양 7일까지도 높은 생존율을 보임을 확인하였다.

[0121] <실시예 4> 스페로이드형 편도 유래 줄기세포의 부갑상선 세포로의 분화 확인

[0122] 스페로이드형 세포를 완성한 후, 스페로이드를 만들지 않고 2차원 배양만을 수행한 편도 유래 줄기세포군 및 부갑상 세포 분화군을 비교군으로 하여, 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone, PTH)의 유전자 발현 변화를 확인하였다.

[0123] Trizol 시약을 이용하여 세포내에 존재하는 총 RNA를 추출하였으며, 인간형 부갑상선 호르몬 유전자에 상응하는 primer를 제작하여 정량적 Real time PCR(Quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)방법으로 유전자 발현 정도를 조사하였다. 동시에 비교정량용으로 사용한 대조유전자는 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate)이며, 사용한 프라이머는 다음과 같다.

[0124] ● 부갑상선 호르몬 (Parathyroid hormone)

[0125] Forward: 5'-GAG TAG AAT GGC TGC GTA AGA AG-3' (서열번호 1)

[0126] Reverse: 5'-TTC ATG GCT CTC AAC CAA GAC-3' (서열번호 2)

[0127] ● GAPDH

[0128] Forward: 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3' (서열번호 3)

[0129] Reverse: 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3' (서열번호 4)

[0130] 상기 실험 결과를 도 6에 나타내었다.

[0131] 도 6에 나타난 바와 같이, 미분화 편도줄기세포에서의 부갑상선호르몬의 발현율을 기준으로 부갑상선 호르몬 발현율을 확인한 결과, 2차원 배양에서 분화 시킨 실험군, SP2 군 및 SP3 군은 미분화 편도줄기세포에서의 부갑상

선호르몬의 발현을 기준으로 하여 각각 2.3배, 5.2배, 및 4.3배의 증가된 mRNA 발현량을 나타내었다. 특히, 2차원 배양에서 분화시킨 세포에서의 발현량과 대비하더라도, SP2 및 SP3는 각각 2.2배 및 1.9배의 mRNA 발현량 증가가 확인되었다. 즉, 스페로이드형으로 배양이 분화 효율 면에서 2차원 배양과 대비하여 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

[0132] 이를 토대로 2차원 배양방법보다 3차원 배양의 경우에서 더욱 효과적으로 부갑상선 호르몬 유전자를 발현을 유도함이 조사되었다. 이는 동일한 유전자 발현 효과를 유도하는 데에도 물리적 배양환경을 액상 폴리머로 경화된 오목한 구조의 마이크로웰 조건 하에서 배양법 사용을 통해 분화 유도제의 사용기간을 현저히 단축시킬 수 있으며, 나아가 2차원에서의 사전 분화기간역시 불필요하고, 부갑상선 호르몬 발현 및 분비 유도 방법을 효율적으로 단순화시킬 수 있음을 보여준다.

[0133] <실시예 5> 스페로이드형 편도 유래 줄기세포의 부갑상선 세포로의 분화 확인

[0134] 상기 SP1, SP2, SP3의 스페로이드형 세포를 형성하는 과정동안 배양기간별로 스페로이드 형성을 완료한 후, 부갑상선조직으로 분화되는 과정동안 스페로이드형으로 제조된 편도 유래 줄기세포의 표면과 스페로이드 내부에 존재하는 세포에서의 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 호르몬(PTH) 분비 관련단백질인 CHGA (Chromogranin A)의 발현 여부를 공초점현미경 (Confocal Lazer Scanning Microscope, LSM-5 Pascal EXCITER, Carl Zeiss)을 이용하여 조사하였다.

[0135] 스페로이드 형성 완료 후, 스페로이드형 세포를 PBS로 세포표면을 세척한 후, 10% 포르말린용액으로 세포를 고정하였다. 고정된 세포는 2% BSA (bovine serum albumin)용액으로 비특이적인 단백질을 불활성화 시킨 후, 1차 항체 (PTH, CHGA, Cyr61)를 넣은 2% BSA용액을 각 세포에 처리하여 37 °C에서 4시간동안 반응시켰다. 1차 항체와의 반응 후, 반응하지 않은 항체를 PBS로 2회 세척한 후, 1차 항체에 상응하는 형광이 달린 2차 항체 (mouse IgG-FITC, rabbit-IgG-Rhodamine, Invitrogen)가 포함된 2% BSA용액을 37 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 핵에 특이적으로 염색되는 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Molecular Probes®)를 첨가하여 각 세포내의 핵을 동시에 염색하였다. 2차 항체와의 반응 종료 후, 세포표면을 다시 PBS로 2회 세척한 후, 세포가 부착되어 있는 커버글래스를 떼어내고, 형광현미경용 글래스에 얹은 뒤, mounting 용액으로 글래스에 부착시킨 뒤, 형광현미경상에서의 각각 항체의 발현 및 세포내 분포양상을 조사하였다.

[0136] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0137] 도 7에 나타난 바와 같이, 스페로이드형 세포를 형성한 세 종류의 세포를 이용하여 스페로이드형 세포의 표면과 내부에 존재하는 세포에 생성된 부갑상선 호르몬(PTH)의 존재를 확인하였다. 부갑상선 호르몬 특이 항체를 이용한 면역염색화확법으로 SP1, SP2 및 SP3에서의 부갑상선 호르몬과 부갑상선 호르몬 분비관련단백질인 CHGA의 존재여부를 확인한 결과, SP1의 경우 스페로이드 표면이나 내부에서의 PTH와 CHGA의 현저한 발현분포는 나타나지 않았다. 반면, SP2의 경우는 스페로이드 표면과 내부 모두 SP1보다 유의적으로 높은 발현양상이 조사되었다. SP3의 경우는 SP2보다도 표면과 내부에서 모두 현저히 높은 발현분포가 나타났다. 상기 실험 결과를 통해, SP3의 스페로이드형 세포가 PTH 및 CHGA의 발현에서 가장 유리한 배양조건임을 확인하였다. 특히, SP3의 경우 분화 유도를 단지 7일 밖에 진행하지 않았는데도 현저한 PTH와 CHGA의 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 기존에 알려진 방법에서 분화유도가 대략 3주 이상 걸리는 것과 대비하여 기간을 현저히 단축한 것이다.

[0138] <실시예 6> 스페로이드형 편도 유래 줄기세포의 부갑상선 세포로의 분화 확인

[0139] SP1, SP2 및 SP3의 스페로이드형 세포를 형성하는 과정동안 배양기간별로 분화유도제가 함유된 세포배양액으로 교환해줄 때마다 분화 또는 미분화배지를 모아서 세포외부로 분비되는 부갑상선 호르몬의 농도를 분석하였다. 각 시기별로 모은 세포배양액을 0.45 μ m크기의 syringe filter로 여과하여 세포부유물이나 세포파편 등을 제거한 뒤, 여과된 세포배양액을 동결건조기 (Freeze Dryer, Operon)를 사용하여 동결건조, 농축하였다.

[0140] 동결건조한 파우더형태의 시료는 Phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 재현탁하여 PTH 단백질에 대한 항체와의 결합력을 이용한 Electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA)방법으로 배출되는 PTH농도를 조사하였다.

[0141] 상기 PTH 농도 실험을 기초로 2차원에서 분화 유도제를 처리하여 배양한 비교 실험군과 SP3의 비교 실험 결과를 도 8에 나타내었다.

[0142] SP3의 경우 16.1-59.8 pg/ml 농도범위의 높은 농도분비한 PTH 농도인 18.0-35.6 pg/ml 농도범위보다 현저히 높은 농도의 분비량인 것으로 조사되었다. SP3의 경우 분화 유도를 단지 7일 밖에 진행하지 않았는데도 현저한

PTH 발현 농도를 보이고 있으며, 이는 기존에 알려진 방법에서 분화유도가 대략 3주 이상 걸리는 것과 대비하여 시간을 현저히 단축시키면서도 높은 수준의 PTH를 분비하는 본원 발명의 효과를 보여주는 것이다.

[0143] <실시예 7> 스펜로이드형 편도 유래 줄기세포의 부갑상선 세포로의 분화 확인

[0144] SP3의 스펜로이드형 세포의 생체 내 활성을 조사하기 위해 부갑상선 전절제 동물모델인 parathyroidectomy 래트 (PTX-rat)를 사용하였다.

[0145] PTX 동물 모델은 부갑상선 조직을 특이적으로 염색하는 형광색소인 5-ALA (5-Aminolevulinic acid hydrochloride)를 래트에 주입 2시간 후에 목부위를 열어 부갑상선 조직을 감지 및 외과적 수술로 제거하여 PTX 동물모델을 수립하였다.

[0146] 실험동물 군은 PTX 래트 모델에 SP3 스펜로이드형 세포를 주입한 군으로 PTX-SP3으로 명명하였고, 10수를 사용하였다. 스펜로이드형 세포 (SP3)은 래트 한 마리당 1000개씩 1회 경피주입되었으며, 주입 후 3개월 간 주기적으로 생존여부 확인 및 쥐들의 행동생태가 조사되었다. 양성대조군으로는 PTH 약물을 정상생리적인 농도로 매일 복강주사하는 군 (PTX-rhPTH)과 수술하지 않은 정상 래트 각각 10수씩을 사용하였다.

[0147] 상기 실험 결과를 도 9 및 도 10에 나타내었다.

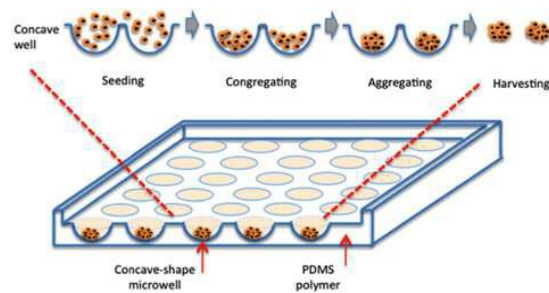
[0148] 도 9는 스펜로이드형 세포 투여에 따른 생존율 변화를 나타낸다. 실험 결과, 양성 대조군으로 사용되는 PTH 약물 자체보다는 다소 효과가 떨어지지만 SP3 스펜로이드형 세포 투입에 따라 생존율이 증가된 것이 확인되었으며, 90일 간 지속된 실험에서도 세포 투여에 따른 효과를 유지하여 지속성 면에서도 SP3가 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

[0149] 또한, 스펜로이드가 경피 주입된 래트의 행태와 외관을 도 10에 나타내었다. 체중감소, 털의 모양 및 걷는 행동 등의 행태 측면에서 양성 대조군과 유사한 정도의 행태를 보여주었으며, 체중 변화도 양성 대조군과 유사한 정도의 효과가 있음이 확인되었다.

도면

도면1

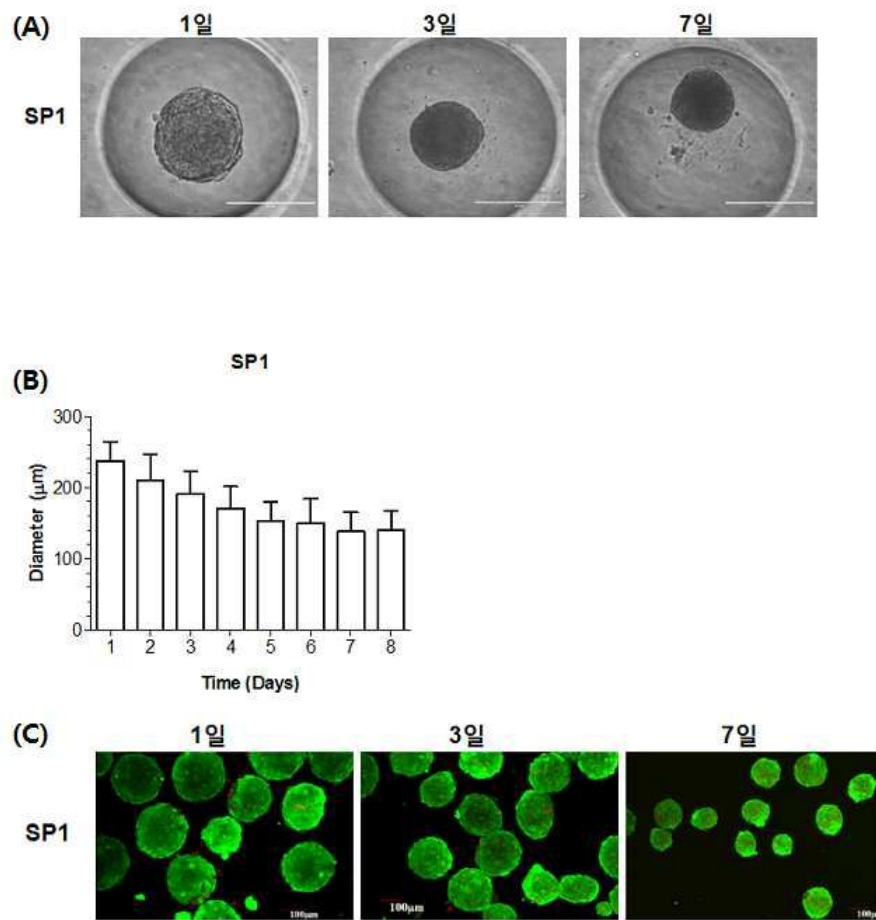
We established a new cell cultivation system for size-controllable and functional islet spheroids by using poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-based concave patterned-films.



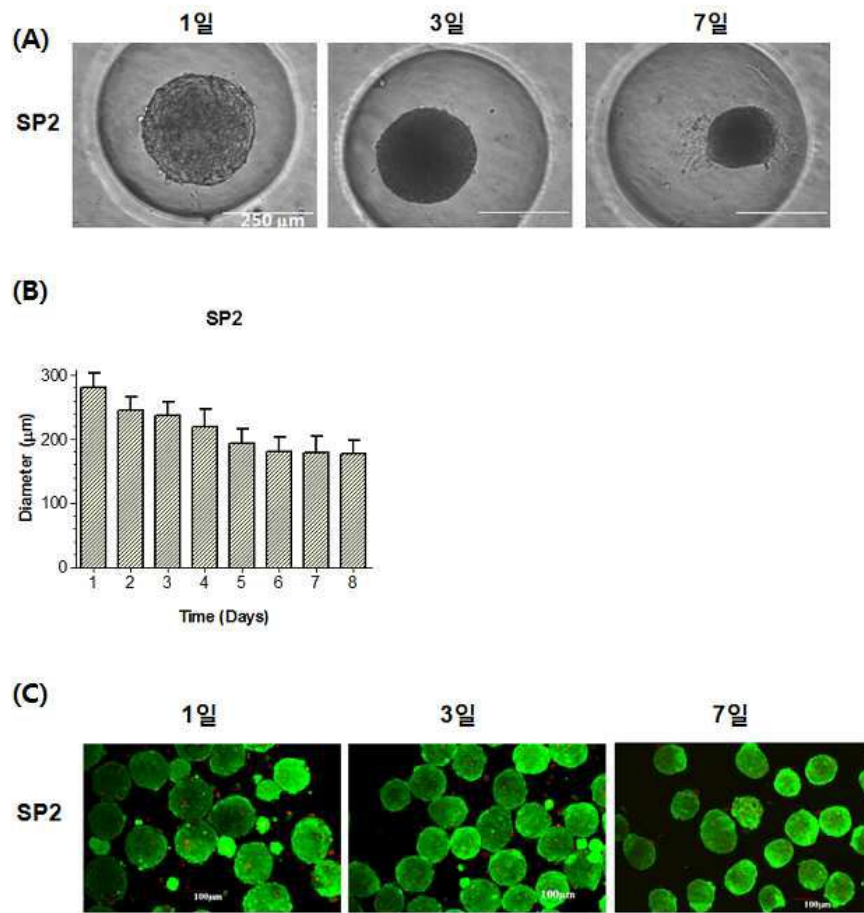
도면2



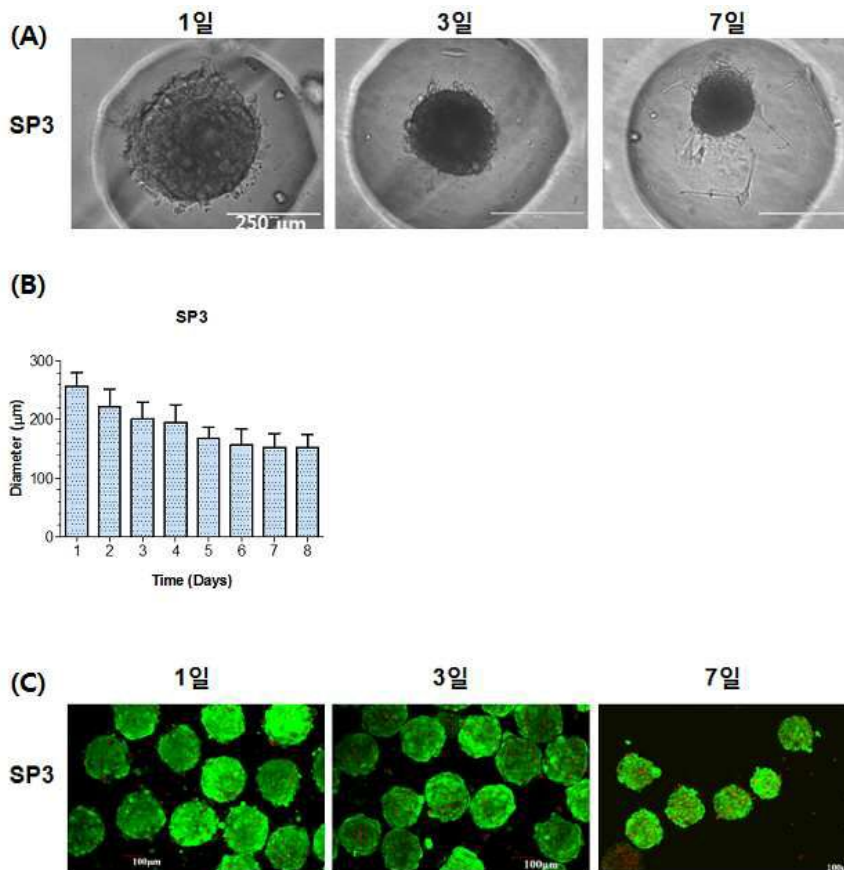
도면3



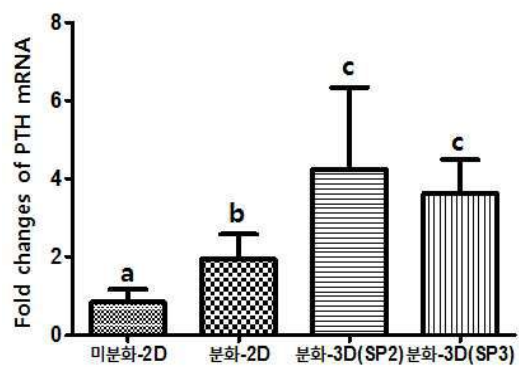
도면4



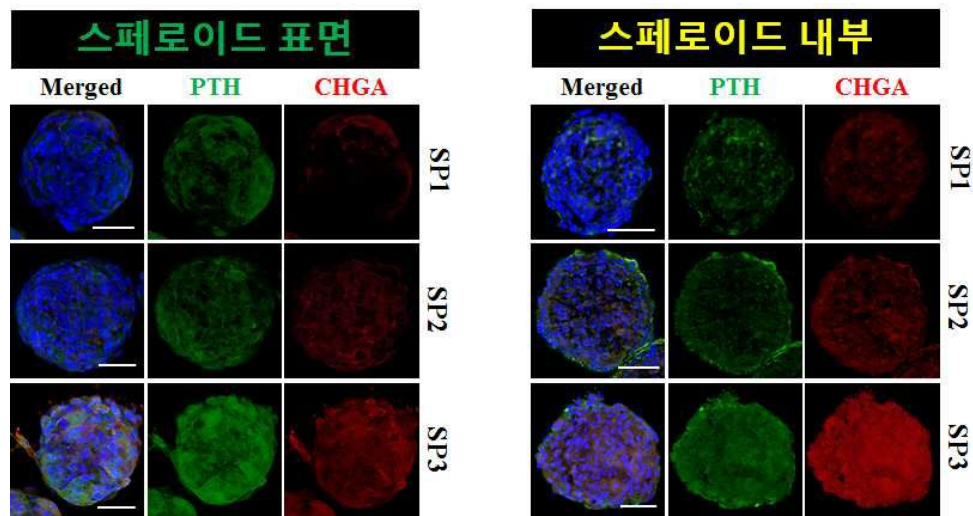
도면5



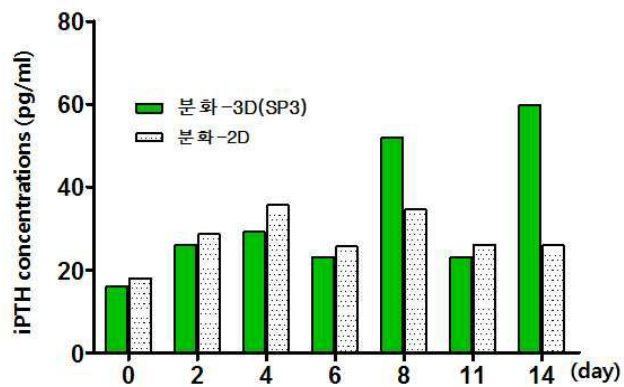
도면6



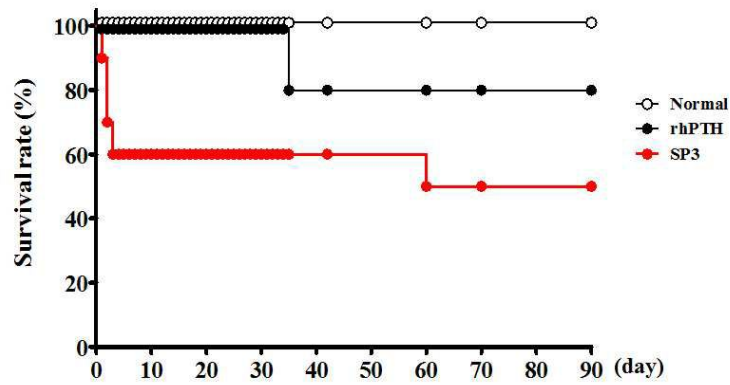
도면7



도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
Korea University Research and Business Foundation
- <120> Spheroidal culture method of tonsil-derived mesenchymal stem cells for accelerating differentiation efficacy and maintenance of stemness
- <130> P15-051-REA-EWAH
- <150> KR 2015/0042774
- <151> 2015-03-26
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward primer for parathyroid hormone

- <400> 1
gagtagaatg gctgcgtaag aag 23
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Reverse primer for parathyroid hormone
- <400> 2
ttcatggctc tcaaccaaga c 21
- <210> 3

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for GAPDH

<400> 3
 ggagcgagat ccctcaaaa t 21

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for GAPDH

<400> 4
 ggctgtgtgc atacttctca tgg 23