



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0047565
(43) 공개일자 2020년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0663 (2013.01)
C12N 5/0634 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7006812
(22) 출원일자(국제) 2018년09월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년03월06일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/033110
(87) 국제공개번호 WO 2019/049957
국제공개일자 2019년03월14일
(30) 우선권주장
62/555,913 2017년09월08일 미국(US)

(71) 출원인
가부시키가이샤 오츠카 세이야쿠 고조
일본국 도쿠시마켄 나루토시 무야초 다테이와 아
자 구구하라 115번지
(72) 발명자
니시무라 마스히로
일본국 7728601 도쿠시마켄 나루토시 무야초 다테
이와 아자 구구하라 115, 가부시키가이샤 오츠카
세이야쿠 고조 내
후지타 야스타카
일본국 7728601 도쿠시마켄 나루토시 무야초 다테
이와 아자 구구하라 115, 가부시키가이샤 오츠카
세이야쿠 고조 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

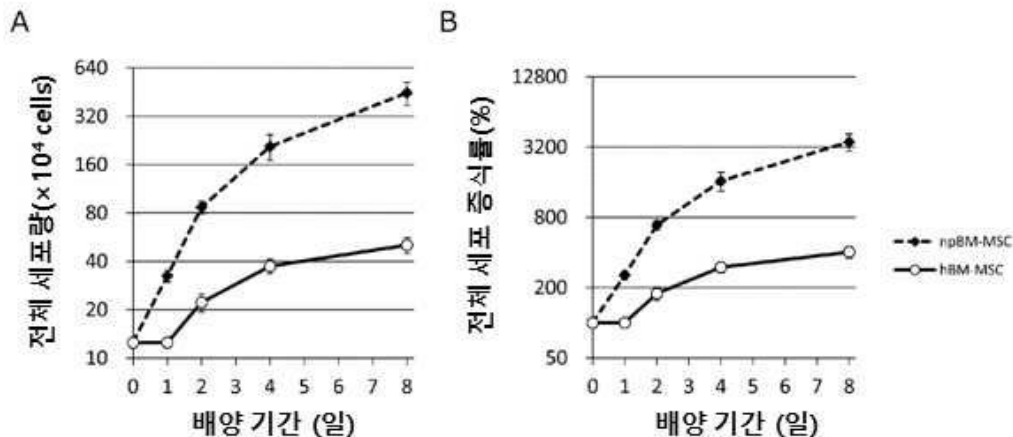
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 어린 돼지 유래 줄기 세포 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 뛰어난 증식능 및 분화능을 가진 줄기 세포를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 어린 돼지로부터 단리된 줄기 세포 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0676 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

(72) 발명자

와타나베 나츠키

일본국 7728601 도쿠시마켄 나루토시 무야초 다테
이와 아자 구구하라 115, 가부시키가이샤 오즈카
세이야쿠 고쥬 내

누엔 루안

일본국 7728601 도쿠시마켄 나루토시 무야초 다테
이와 아자 구구하라 115, 가부시키가이샤 오즈카
세이야쿠 고쥬 내

마츠모토 신이치

일본국 7728601 도쿠시마켄 나루토시 무야초 다테
이와 아자 구구하라 115, 가부시키가이샤 오즈카
세이야쿠 고쥬 내

명세서

청구범위

청구항 1

어린 돼지로부터 분리된, 줄기 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 평균 직경이 17 μm 이하인, 줄기 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 대수 증식기에서의 배가 시간이 36시간 이하인, 줄기 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 간엽계 줄기 세포인, 줄기 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 어린 돼지가 인간에게 세포 이식할 수 있는 어린 돼지인, 줄기 세포.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 어린 돼지의 골수 또는 채도로부터 분리된, 줄기 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 이식용 줄기 세포인, 줄기 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 인간 이식용 줄기 세포인, 줄기 세포.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 피더 세포용 줄기 세포인, 줄기 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 인간 이식용 줄기 세포를 증식하기 위한 피더 세포용 줄기 세포인, 줄기 세포.

청구항 11

어린 돼지로부터 세포를 분리하는 공정을 포함하는, 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 줄기 세포를 파종 후 3 내지 12일 후에 계대하는 공정을 포함하는, 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 어린 돼지로부터 분리하는 세포가 단핵구 세포 분획 세포인, 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 어린 돼지로부터의 세포 단리가 어린 돼지의 골수 또는 채도로부터

터의 세포 단리인, 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 단리한 단핵구 세포 분획의 세포를 동결하는 공정을 포함하는, 줄기 세포의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 어린 돼지 유래 줄기 세포 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 지방 세포, 골 세포, 연골 세포로 분화 가능한 어린 돼지 유래의 간엽계 줄기 세포 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근의 간엽계 줄기 세포를 비롯한 체성 줄기 세포 연구의 진보에 따라 체성 줄기 세포의 임상 응용은 이미 기초적인 연구 단계에서 개발 단계로 이행하고 있다. 체성 줄기 세포는 크게 세 가지 기능(다분화능, 면역 조절능, 세포외 환경의 리모델링능)을 가져 난치성 질환의 치료용 세포로 기대되고 있다.

[0003] 첫 번째 다분화능에 대해서는 체성 줄기 세포가 직접 골, 연골 등으로 분화하는 능력이며 투여된 체성 줄기 세포가 상실된 세포를 보완하거나 기능이 부족한 세포에 치환되거나 함으로써 치료 효과를 발휘한다.

[0004] 두 번째 면역 조절능은 체성 줄기 세포로부터의 항염증성 사이토카인, 케모카인, 엑소좀 등의 분비를 통해, 또는 세포간 접촉 인자 등을 통해 환자의 면역 담당 세포에 작용하여 염증이나 이식 반대 숙주병 등의 면역 반응을 억제함으로써 치료 효과를 발휘한다.

[0005] 세 번째 세포외 환경의 리모델링능에 대해서는 허혈성 질환에서의 경색 부위나 염증으로 인해 발생한 섬유화 부위 등에 대해 체성 줄기 세포로부터의 혈관 유도 인자, 성장 인자, 항섬유화 인자 등의 분비를 통해 치료 효과를 발휘하는 것이다.

[0006] 간엽계 줄기 세포는 포유류의 골수, 지방, 췌도, 체대혈 등에 존재하며 중배엽성 조직(간엽)에서 유래한 체성 줄기 세포이며, 간엽계에 속하는 세포로의 분화능을 가진다. 최근 이식 반대 숙주병, 심혈관 장애, 자가 면역 질환, 변형성 관절증, 골형성 부전, 간 장애, 호흡기 질환, 척수 손상, 뇌경색, 신부전 등의 질환에 대해 임상 치험이 이루어지고 있다(비특허문헌 1).

[0007] 간엽계 줄기 세포는 다양한 임상 응용이 기대되고 있지만 기증자 확보, 기증자에 대한 침습, 기증자별 바이러스 부정 검사 등의 안전성 보장 등의 과제가 있다. 또한 얻어지는 간엽계 줄기 세포의 효력은 기증자나 그 연령 등의 조건에 따라 크게 변동되어 치료용 세포의 안정적인 품질 확보도 큰 과제이다. 환자의 골수 등 유래 간엽계 줄기 세포를 채취에서 증식시켜 동일 환자에게 그 세포를 이용해 치료하는 기술은 기증자 부족으로 문제가 되고 있는 조직·장기 이식의 대체 치료법이 될 수 있다. 그러나 세포의 증식능, 분화능에는 개인차가 있어 모든 환자 유래 세포가 같은 거동을 보이지 않는다(비특허문헌 2). 이상과 같이 치료에 충분한 줄기 세포를 준비하려면 기증자 확보, 안전성 확인, 줄기 세포의 뛰어난 증식, 분화능이 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Lemos NE, de Almeida Brondani L, Dieter C, Rheinheimer J, Boucas AP, Bauermann Leitao C, Crispim D, Bauer AC. Islets. 2017 Jul 5:e1335842. doi:10.1080/19382014.2017.1335842

(비특허문헌 0002) 오오구시 하지메, 생화학, 제81권 제2호, 99 내지 104쪽, 2009년 2월

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기와 같이 재생 치료에 줄기 세포를 사용할 경우 기증자 확보, 안전성 확인, 줄기 세포의 뛰어난 증식, 분화

능이 요구되지만 줄기 세포는 몇 계대를 거치면 그 증식능·분화능이 저하되기 때문에 치료에 충분한 줄기 세포를 만들기 위해서는 비용 및 시간이 필요하다는 문제가 있다. 따라서 본 발명은 안정 공급이나 병원체 관리가 가능한 어린 의료용 돼지를 도너 소스로 하여 뛰어난 증식능 및 분화능을 가진 줄기 세포를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 어린 돼지 골수로부터 제조한 간엽계 줄기 세포는 기존의 간엽계 줄기 세포에 비해 현저히 증식 속도가 빠르고 증식능이 뛰어나며 세포 크기가 작다는 우수한 특성을 가지고 있다는 것을 발견하고 본 발명을 완성했다.
- [0011] 즉, 본 발명은 아래에 관한 것이다.
- [0012] 1. 어린 돼지로부터 분리된 줄기 세포
- [0013] 2. 평균 직경이 17 μm 이하인 상기 1에 기재된 줄기 세포.
- [0014] 3. 대수 증식기에서의 배가 시간이 36시간 이하인 상기 1 또는 2에 기재된 줄기 세포.
- [0015] 4. 간엽계 줄기 세포인 상기 1 내지 3 중 어느 하나에 기재된 줄기 세포.
- [0016] 5. 어린 돼지가 인간에게 세포 이식할 수 있는 어린 돼지인 상기 1 내지 4 중 어느 하나에 기재된 줄기 세포.
- [0017] 6. 어린 돼지의 골수 또는 체도로부터 분리된 상기 1 내지 5 중 어느 하나에 기재된 줄기 세포.
- [0018] 7. 이식용 줄기 세포인 상기 1 내지 6 중 어느 하나에 기재된 줄기 세포.
- [0019] 8. 인간 이식용 줄기 세포인 상기 7에 기재된 줄기 세포.
- [0020] 9. 피더 세포용 줄기 세포인 상기 1 내지 6 중 어느 하나에 기재된 줄기 세포.
- [0021] 10. 인간 이식용 줄기 세포를 증식하기 위한 피더 세포용 줄기 세포인 상기 9에 기재된 줄기 세포.
- [0022] 11. 어린 돼지로부터 세포를 분리하는 공정을 포함하는 줄기 세포의 제조 방법.
- [0023] 12. 줄기 세포를 파종 후 3 내지 12일 후에 계대하는 공정을 포함한 상기 11에 기재된 줄기 세포의 제조 방법.
- [0024] 13. 어린 돼지로부터 분리하는 세포가 단핵구 세포 분획의 세포인 상기 11 또는 12에 기재된 줄기 세포의 제조 방법.
- [0025] 14. 어린 돼지로부터의 세포 단리가 어린 돼지의 골수 또는 체도로부터의 세포 단리인 상기 11 내지 13 중 어느 하나에 기재된 줄기 세포의 제조 방법.
- [0026] 15. 단리한 단핵구 세포 분획의 세포를 동결하는 공정을 포함한, 상기 13 또는 14에 기재된 줄기 세포의 제조 방법.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 줄기 세포는 기존의 줄기 세포와 비교하여 증식 속도가 현저히 빠르고 증식능이 뛰어나며 세포 크기가 작다는 이점을 가진다. 본 발명에서의 줄기 세포는 증식 속도가 현저히 빠름으로써 단시간 또한 저렴하게 이식용·피더 세포용 등의 용도로 이용하는 줄기 세포를 대량으로 취득할 수 있다. 또한 줄기 세포 투여로 인해 해당 줄기 세포가 폐에 막혀 폐색전을 일으키는 경우가 있는데, 본 발명의 줄기 세포는 세포 크기가 작음으로써 이러한 폐색전의 형성을 방지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1의 도 1A는 본 발명의 줄기 세포를 배양했을 때의 특정 배양 기간(일)에서의 전체 세포량을 나타내는 도면이다. 도 1B는 본 발명의 줄기 세포를 배양했을 때의 특정 배양 기간(일)에서의 전체 세포 증식률을 나타내는 도면이다. 도 1A 및 도 1B에서 점선 및 검은색 동그라미는 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)를, 실선 및 흰색 동그라미는 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC)를 나타낸다.
- 도 2의 도 2A 및 도 2B는 각각 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC) 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대한 지방 세포로의 분화를 나타내는 도면이다.

도 3의 도 3A 및 도 3B는 각각 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC) 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대한 골 세포로의 분화를 나타내는 도면이다.

도 4의 도 4A 및 도 4B는 각각 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC) 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대한 골 세포로의 분화를 나타내는 도면이다.

도 5의 도 5A 및 도 5B는 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대한 연골 세포로의 분화를 나타내는 도면이다.

도 6은 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD44를 이용하여 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)의 세포 표면 항원 해석을 한 결과를 나타내는 도면이다.

도 7은 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD90를 이용하여 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)의 세포 표면 항원 해석을 한 결과를 나타내는 도면이다.

도 8의 도 8A 내지 도 8D는 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD29를 이용하여 어린 돼지 췌도 유래 간엽계 줄기 세포(npISLET-MSC)의 세포 표면 항원 해석을 한 결과를 나타내는 도면이다. 도 8A는 샘플 11(췌도 제조 직후의 동결 없음), 도 8B는 샘플 12(췌도 제조 직후의 동결 있음), 도 8C는 샘플 13(췌도 제조 후 배양 3일째의 동결 없음), 도 8D는 샘플 14(췌도 제조 후 배양 3일째의 동결 있음)의 결과를 나타낸다.

도 9의 도 9A 내지 도 9D는 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD44를 이용하여 어린 돼지 췌도 유래 간엽계 줄기 세포(npISLET-MSC)의 세포 표면 항원 해석을 한 결과를 나타내는 도면이다. 도 9A는 샘플 11(췌도 제조 직후의 동결 없음), 도 9B는 샘플 12(췌도 제조 직후의 동결 있음), 도 9C는 샘플 13(췌도 제조 후 배양 3일째의 동결 없음), 도 9D는 샘플 14(췌도 제조 후 배양 3일째의 동결 있음)의 결과를 나타낸다.

도 10의 도 10A 내지 도 10D는 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD90를 이용하여 어린 돼지 췌도 유래 간엽계 줄기 세포(npISLET-MSC)의 세포 표면 항원 해석을 한 결과를 나타내는 도면이다. 도 10A는 샘플 11(췌도 제조 직후의 동결 없음), 도 10B는 샘플 12(췌도 제조 직후의 동결 있음), 도 10C는 샘플 13(췌도 제조 후 배양 3일째 동결 없음), 도 10D는 샘플 14(췌도 제조 후 배양 3일째 동결 있음)의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명의 줄기 세포는 어린 돼지로부터 단리된 줄기 세포이다. 또한 후술하는 실시예에 기재된 줄기 세포는 어린 돼지의 골수 또는 췌도로부터 분리되었는데 예를 들어 어린 돼지의 피부, 지방 등 유래의 줄기 세포도 본 발명에 포함된다.
- [0030] 본 발명에서 "어린 돼지"란 태아로부터 생후 1개월 미만, 또는 생후 25일 미만의 돼지를 가리킨다. 어린 돼지는 의료용인 것이 바람직하고, 인간에게 세포 이식을 할 수 있는 어린 돼지인 것이 보다 바람직하다. 돼지의 종류는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 란드레이스종(예를 들어 덴마크·란드레이스종, 아메리칸·란드레이스종, 브리티시·란드레이스종, 네덜란드·란드레이스종, 스웨디시·란드레이스종), 대 요크셔종, 버크셔종, 듀록종, 햄프셔종, 중 요크셔종, 미니 돼지를 들 수 있으며, 그 중에서도 란드레이스종이 바람직하다.
- [0031] 일반적으로 "줄기 세포"란 자기 복제능 및 분화·증식능을 가진 미숙한 세포를 뜻한다. 줄기 세포에는 분화 능력에 따라 다능성 줄기 세포(pluripotent stem cell), 복능성 줄기 세포(multipotent stem cell), 단능성 줄기 세포(unipotent stem cel) 등의 아집단이 포함된다.
- [0032] 다능성 줄기 세포란 그 자체로는 개체가 될 수 없지만 생체를 구성하는 모든 조직이나 세포로 분화 가능한 능력을 가진 세포를 뜻한다. 복능성 줄기 세포란 모든 종류는 아니지만 여러 종류의 조직이나 세포로 분화 가능한 능력을 가진 세포를 뜻한다. 단능성 줄기 세포란 특정 조직이나 세포로 분화 가능한 능력을 가진 세포를 뜻한다.
- [0033] 본 발명의 줄기 세포로서는 복능성 줄기 세포가 바람직하다. 복능성 줄기 세포로서는 예를 들어 간엽계 줄기 세포, 조혈계 줄기 세포, 신경계 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 생식 줄기 세포 등의 체성 줄기 세포 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 간엽계 줄기 세포이다.
- [0034] 본 발명의 줄기 세포는 어린 돼지로부터 단리된 줄기 세포라면 그 초대 배양 세포, 해당 초대 배양 세포를 계대 배양한 세포이며, 각종 분화 마커를 발현하는 각종 세포를 생성할 수 있는 줄기 세포도 본 발명의 줄기 세포에

포함된다. 또한, 본 발명에서의 줄기 세포가 간엽계 줄기 세포인 경우에는 세포 마커인 CD44 및 CD90이 모두 60% 이상 양성인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상 양성이다. 또 세포 마커인 CD29가 60% 이상 양성인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상 양성이다.

[0035] 본 발명의 줄기 세포는 대수 증식기에서의 배가 시간이 36시간 이하인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 32시간 이하, 더욱 바람직하게는 28시간 이하, 특히 바람직하게는 24시간 이하, 가장 바람직하게는 20시간 이하이다. 또 대수 증식기에서의 배가 시간은 14시간 이상인 것이 바람직하고, 16시간 이상인 것이 보다 바람직하다.

[0036] 본 발명의 줄기 세포의 대수 증식기에서의 배양은, 예를 들어 후술하는 비타민 C를 함유하는 배지(예를 들어 MSC 배지)에 본 발명의 줄기 세포를 파종하고 37℃에서 5% CO₂ 존재 하에서 배양용 인큐베이터에서 배양함으로써 행할 수 있다. 대수 증식기에서의 배가 시간이 짧을수록, 단시간 또한 저렴하게 대량의 줄기 세포를 제조하는 것이 가능해진다.

[0037] 본 발명의 줄기 세포는 평균 직경이 17 μm 이하인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 16.5 μm 이하이며, 더욱 바람직하게는 16 μm 이하이며, 특히 바람직하게는 15.5 μm 이하이며, 가장 바람직하게는 15 μm 이하이다. 평균 직경은 10 μm 이상인 것이 바람직하며 12 μm 이상인 것이 보다 바람직하다. 평균 직경이 작을수록 줄기 세포 투여로 인한 폐색전의 형성을 방지할 수 있다. 평균 직경은, 예를 들어 Nucleo Counter NC-200(상표)을 이용해 측정할 수 있다. 여기서 평균이란 상가 평균을 의미한다.

[0038] 본 발명의 간엽계 줄기 세포에서 지방 세포로의 분화는 예를 들어 인슐린, MCGS(혈청 성분, Mesenchymal Cell Growth Supplement), 텍사메타존, 인도메타신, 이소부틸메틸크산틴 등의 존재 하에서 본 발명에서의 간엽계 줄기 세포를 배양함으로써 지방 세포로 분화 유도할 수 있다.

[0039] 지방 세포로의 분화 및 유지를 위해서는 시판 중인 키트 또는 배지 등을 이용해도 되며, 예를 들어 Lonza Walkersville사제 hMSC differentiation Bullet Kit(상표)-adipogeni(PT-3004), Lonza Walkersville사제 hMSC adipogenic induction medium(PT-3102B), Lonza Walkersville사제 hMSC adipogenic maintenance medium(PT-302) 등을 들 수 있다. 간엽계 줄기 세포로부터 지방 세포로의 분화는 시판 중인 키트를 이용해 확인할 수 있으며, 예를 들어 Lonza사제 AdipoRed(상표) assay reagent를 들 수 있다.

[0040] 본 발명의 간엽계 줄기 세포로부터 골 세포의 분화는 예를 들어 텍사메타존, 아스코르브산염, MCGS, β-글리세로인산 등의 존재 하에서 본 발명의 간엽계 줄기 세포를 배양함으로써 골 세포로 분화 유도할 수 있다. 또한, 시판 중인 키트를 이용해도 좋으며, 예를 들어 Lonza Walkersville사제 hMSC differentiation BulletKit(상표)-osteogenic, PT-3004 등을 들 수 있다. 간엽계 줄기 세포로부터 골 세포로의 분화는 시판 중인 알칼리포스파타아제 염색 키트(예를 들어 코스모·바이오사제 등), 시판 중인 석회화 염색 키트(예를 들어 코스모·바이오사제 등) 등에 의해 확인할 수 있다.

[0041] 본 발명의 간엽계 줄기 세포로부터 연골 세포로의 분화는, 예를 들어 TGF-β3, 텍사메타존, 인슐린-트랜스페린-아세렌산(ITS), 피루브산나트륨, 프롤린, 아스코르브산염, 의 존재 하에서 본 발명의 간엽계 줄기 세포를 배양함으로써 연골 세포로 분화 유도할 수 있다. 또한, 시판 중인 키트를 이용해도 좋고, 예를 들어 Lonza Walkersville사제 hMSC differentiation BulletKit(상표)-condrogenic, PT-3003등을 들 수 있다. 간엽계 줄기 세포로부터 연골 세포로의 분화는 알시안 블루(Alcian Blue) 염색 등을 통해 확인할 수 있다.

[0042] 줄기 세포의 이식은 줄기 세포의 부유액을 숙주체에 주입함으로써 쉽게 할 수 있다. 주입은 재생 치료하고자 하는 장기 또는 그 근방 또는 정맥 내 등에 대하여 실시할 수 있다. 또한 주입하는 줄기 세포의 수는 특별히 한정되지 않고 증상, 숙주의 체중 또는 투여 방법 등에 따라 적절히 선택할 수 있지만 보통 10² 내지 10¹⁰ 개 정도로 한다.

[0043] 본 명세서에서 "피더 세포(feeder cell)"란 증식이나 분화를 일으키려는 목적의 세포 배양조건을 갖추기 위해 이용하는 보조 역할을 하는 다른 세포종을 나타낸다.

[0044] 피더 세포로서 이용하는 경우에는 통상 증식하지 않도록 미리 감마선 조사나 항생 물질로 처리해 두는 것이 바람직하다. 줄기 세포의 피더 세포로서는 주로 마우스 태아 유래의 섬유 아세포가 이용되는데, 실험의 목적이나 세포에 따라 3T3이나 SNL 등의 섬유 아세포 등 여러 세포종이 피더 세포로서 이용되고 있다. 본 발명의 줄기 세포는 바람직하게는 인간에게 세포 이식을 할 수 있는 어린 돼지로부터 단리함으로써 인간 이식용 줄기 세포의 피더 세포로서 이용할 수 있다.

- [0045] 본 발명의 줄기 세포 제조 방법은 어린 돼지로부터 세포를 단리하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 줄기 세포 제조 방법의 실시 양태로서는 예를 들어 다음과 같은 공정을 포함하는 방법을 들 수 있다.
- [0046] (1) 어린 돼지로부터 세포를 채취하는 공정
- [0047] (2) 공정 (1)에서 채취한 세포를 배양하여 어린 돼지 유래 줄기 세포를 제조하는 공정
- [0048] 이하, 각 공정에 대해서 설명한다.
- [0049] (1) 어린 돼지로부터 세포를 채취하는 공정
- [0050] 공정 (1)에서는 어린 돼지의 골수, 지방, 피부, 췌장 등으로부터 세포를 채취한다.
- [0051] 구체적으로는 예를 들어 어린 돼지 골수에서 세포를 채취할 경우 어린 돼지의 대퇴골, 장골 및 흉골 등에서 골수 세포를 채취할 수 있다. 예를 들어 어린 돼지로부터 대퇴골을 회수하고 양끝을 절단하여 바늘을 삽입하고 해파린을 첨가한 생리적 완충액(예를 들어 인산 완충액, 이후 PBS라고도 함)으로 씻어낸 후 반대편 장소에서 유출액을 골수액으로서 회수한다. 유출액의 양이 감소하면 골을 거꾸로 해서 바늘을 반대편에 삽입하고 PBS로 다시 씻어내 세포 함유 용액인 골수액을 제조한다.
- [0052] 또한, 상기에서 제조한 세포 함유 용액을 통상 원심 분리함으로써 어린 돼지 유래 단핵구 세포 분획을 단리해오 된다. 상기에서 제조한 세포 함유 용액을 PBS 등으로 희석하여 인간 림프구 분리용 매체(예를 들어 GE 헬스케어 라이프사이언스사제 Ficol-Paque PLUS 등)를 넣은 튜브 내의 해당 매체층 위에 희석한 세포 함유 용액을 넣는다.
- [0053] 상기 튜브를 원심 분리하여 분층시켜 어린 돼지 유래 단핵구 세포를 포함하는 층을 회수한다. 회수한 용액을 다시 원심 분리하여 상층을 제거한 후 PBS 등으로 희석하여 다시 원심 분리하고 단핵구 세포 분획을 단리한다. 이와 같이 하여 단리된 단핵구 세포 분획 세포는 배양 전에 동결 보존해도 된다. 단리된 어린 돼지 유래 단핵구 세포 분획의 세포를 동결함으로써 동결 용해의 영향을 받기 어려운 세포를 선택적으로 제조할 수 있다. 배양 전에 동결 보존할 경우, 온도는 -80°C 이하인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 -150°C 이하이다.
- [0054] 또한, 예를 들어 어린 돼지 췌장에서 세포를 채취할 경우, 어린 돼지로부터 췌도를 회수하고, 다시 경우에 따라서는 그 췌도를 부유 배양함으로써 줄기 세포를 제조할 목적으로 접착 배양에 사용하는 세포피를 제조한다.
- [0055] 또, 예를 들어 어린 돼지 지방으로부터 세포를 채취할 경우 어린 돼지에게서 지방을 채취해 가위로 잘게 썬 후 효소 처리를 한다. 셀 스트레이너(cell strainer)로 필터를 걸어 저속으로 원심 분리를 한다. 튜브 바닥에 침강된 세포를 배양에 이용한다. 또, 예를 들어 어린 돼지 피부(털 포함)로부터 세포를 채취하는 경우, 어린 돼지로부터 피부를 채취하여 효소 처리를 한다. 효소 처리 후 피부에서 털을 뽑아 Bulge 부분을 채취하여 배양에 이용한다. 배양을 실시할 때는 3T3 피더 세포를 이용한다.
- [0056] (2)공정 (1)에서 채취한 세포를 배양하여 어린 돼지 유래 줄기 세포를 제조하는 공정
- [0057] 상기 공정 (1)에서 채취한 세포, 세포 분획 또는 세포피에는 줄기 세포 이외의 목적 외의 세포가 많이 포함된다. 일반적으로 이들 목적외 세포의 생존에 필수적인 비타민 C를 포함하지 않는 기초 배지(예를 들어 후술하는 MSC 기초 배지)를 이용함으로써 이들 세포를 제거하는 배양 방법이 이용되고 있다.
- [0058] 본 발명 공정 (2)에서는 상기 공정 (1)에서 채취한 세포, 세포 분획 또는 세포피를 바람직하게는 35 내지 39°C , 보다 바람직하게는 36 내지 38°C , 가장 바람직하게는 37°C 에서, 바람직하게는 4 내지 6%의, 보다 바람직하게는 4.5 내지 5.5%의, 가장 바람직하게는 5%의, CO_2 존재 하에서 배양용 인큐베이터에서 배양함으로써 줄기 세포 이외의 목적 외의 세포를 제거함과 동시에 본 발명의 줄기 세포를 증식시킨다.
- [0059] 본 발명의 줄기 세포는 증식 속도가 현저히 빠르기 때문에 상기의 목적 외의 세포를 제거하는 배양을 위해 비타민 C를 포함하지 않는 기초 배지를 이용하지 않고 비타민 C를 포함한 배지(예를 들어 후술하는 MSC 배지)만을 이용해도 본 발명의 줄기 세포를 제조할 수 있다. 또한 상기 목적 외의 세포를 제거하기 위하여 비타민 C를 포함하지 않는 기초 배지를 이용하여 배양한 후 비타민 C를 포함한 배지로 교환하여 본 발명의 줄기 세포를 증식시킴으로써 본 발명의 줄기 세포를 제조할 수도 있다.
- [0060] 본 발명의 줄기 세포는 구체적으로는 예를 들어 다음과 같은 방법으로 배양한다. 젤라틴으로 코팅한 배양용 용기(예를 들어 0.1% 젤라틴으로 코팅한 플레이트) 또는 젤라틴 코트 없는 배양용 용기(예를 들어 플레이트)를 이용하여 비타민 C를 포함하지 않는 기초 배지(예를 들어 후술한 MSC 배지)를 이용하고, 바람직하게는 5.0×10^5 개

내지 5.0×10^7 개의 세포/ 9.6cm^2 를 파종하고, 예를 들어 37°C 에서 5% CO_2 , 90% 습도의 조건하에서 인큐베이팅하여 초대 배양 세포를 얻는다. 초대 배양 세포를 얻기 위한 배양 기간은 파종 후 바람직하게는 3 내지 12일, 보다 바람직하게는 3 내지 11일, 가장 바람직하게는 3 내지 10일이다. 초대 배양 세포는 계대해도 된다. 계대하여 얻은 줄기 세포를 계대 배양 세포라고도 한다. 초대 배양 세포 또는 계대 배양 세포의 계대는 줄기 세포를 파종 후, 바람직하게는 2 내지 6일 후, 보다 바람직하게는 2 내지 5일 후, 더욱 바람직하게는 2 내지 4일 후, 가장 바람직하게는 3일 후에, 줄기 세포가 30% 내지 100% 콘플루언트에, 바람직하게는 50% 내지 95% 콘플루언트에, 더욱 바람직하게는 60% 내지 90% 콘플루언트에, 가장 바람직하게는 70% 내지 85% 콘플루언트에 도달한 이후에 한다. 줄기 세포의 파종은 젤라틴으로 코팅한 배양용 용기(예를 들어 0.1% 젤라틴으로 코팅한 플레이트) 또는 젤라틴 코트 없는 배양용 용기(예를 들어 플레이트)를 이용하여 비타민 C를 포함한 배지(예를 들어 후술하는 MSC 배지)를 이용하여, 바람직하게는 5.0×10^5 개 내지 5.0×10^7 개의 세포/ 9.6cm^2 를 파종한다. 줄기 세포의 배양은, 예를 들어 37°C 에서 5% CO_2 , 90% 습도의 조건하에서 배양한다. 줄기 세포의 배양 동안, 필요에 따라 배지 교환하여 본 발명의 줄기 세포를 증식시킨다.

[0061] MSC 기초 배지 및 MSC 배지로서는 기존에 알려진 것을 이용할 수 있으며 시판되는 것을 이용해도 된다. MSC 기초 배지로서는 예를 들어 500mL의 Gibco사제 MEM α(Nucleosides, no Ascorbic acid)에 55mL의 Gibco사제 Fetal bovine serum(FBS) 및 5.5mL의 Sigma-Aldorich사제 Penicillin-Streptomycin을 첨가한 배지를 들 수 있다. 또한 MSC 배지로서는 예를 들어, 500mL의 Gibco사제 MEM(nucleosides)에 55mL의 Gibco사제 Fetal bovine serum(FBS), 5.5mL의 Sigma-Aldorich사제 Penicillin-Streptomycin 및 22.2μL의 Sigma-Aldorich사제 FGF-Basic, recombinant, expressed in E.coli, suitable for cell culture (final concentration : 1ng/mL)을 첨가한 배지를 들 수 있다.

[0062] 계대는 적어도 1회 이상 실시하는 것이 바람직하다. 계대 횟수는 본 발명에서의 줄기 세포를 얻을 수 있는 한 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1 내지 3회이며, 보다 바람직하게는 1 내지 20회이다.

[0063] 본 발명의 줄기 세포는 동결 보존이 가능하다. 동결 보존 타이밍은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 계대 1 내지 20회 후이며, 보다 바람직하게는 계대 2 내지 10회 후이다. 동결 보존 및 해동 방법은 기존에 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[0064] 줄기 세포의 동결 보존 방법으로서의 구체적으로는 예를 들어 동결 보존액에 분산시키고 필요할 때까지 냉동고에서 -80°C 이하 또는 액체 질소 안에서 동결 보존할 수 있다. 동결 보존액으로서 예를 들어 OPF-301[3% 트레할로오스 및 5% 텍스트란을 함유하는 젖산 링거액(국제 공개 제 2014/208053호)]과 디메틸설폭사이드(DMSO)를 9:1의 비율로 혼합한 용액, 동물 세포의 동결 보존에 사용할 수 있는 혈청 함유 또는 무혈청 보존액, 또는 시판 중인 세포 동결 보존용 시약[바람직하게는 다카라바이오사 제조 CELLBANKER(등록 상표) 등의 셀뱅크]를 들 수 있다.

[0065] [실시예]

[0066] 시험예 1

[0067] [어린 돼지 유래 골수 세포의 회수]

[0068] 어린 돼지 대퇴골에서 골수를 채취했다. 어린 돼지(생후 23일의 의료용 랜드레이스종 돼지)로부터 대퇴골을 회수하고 양끝을 절단하여 12G 바늘을 삽입하고 50mL의 헤파린 처리한 PBS(3mL의 헤파린(1000U/mL), 47mL의 PBS)으로 씻어내고 반대편 장소에서 50mL의 골수 유출액(이하 골수액이라고도 한다)을 회수하였다. 유출액의 양이 감소하면 골을 거꾸로 해서 바늘을 반대편에 삽입한 뒤 PBS로 다시 씻어내고 골수액을 수집했다. 카운트용 15mL 코니컬 튜브로 1950μL의 PBS(40배 희석)에 50μL의 샘플을 채취하고 셀 카운터로 세포 수를 측정했다.

[0069] [어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNC) 분획의 단리]

[0070] 상기 절차로 얻어진 골수액을 조용히 재현탁했다. 골수액 전체를 50mL 튜브 4개에 각 10mL씩 나누어 각각 PBS로 30mL로 희석하고 세포가 튜브에 부착되지 않은 것을 확인하여 잘 혼합하였다. 10mL의 Ficoll-Paque PLUS(GE 헬스케어 라이프 사이언스사제)를 4개의 새로운 50mL 튜브에 첨가하고 Ficoll-Paque PLUS층 위에 PBS와 혼합한 30mL의 골수액을 넣었다.

[0071] 상기 튜브를 20°C 에서 30분간 $400 \times g$ 으로 원심 분리하고 천천히 브레이크 없이 가속시켜(폴 스피드의 1/3), 3개의 다른 층을 형성시켰다. 단핵구 세포 분획은 부유 백색 링에 배치되어 있기 때문에 백색 링 전체를 25mL의

PBS를 포함한 50mL 튜브(×4)에 회수했다. 실온에서 400×g으로 7분간 원심 분리하여 상청을 제거했다. PBS를 40mL까지 추가하고 실온에서 400×g으로 7분간 다시 원심 분리했다. 상기와 마찬가지로 세포 수를 측정한 결과, 골수 세포 전체 중 25 내지 30%의 세포가 단핵구 세포 분획으로서 각각(20 내지 30)×10⁶개 단리되었다.

[0072] [어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNC) 분획 세포 동결 보존]

[0073] 단리된 단핵구 세포 분획의 세포를 10⁷세포/mL의 DMSO를 혼합한 FBS(90% FBS와 10% DMSO)를 포함한 크라이오바이얼(cryovial)에 넣고 세포 현탁액의 전체 용량을 1mL로 만들었다[세포 수/10×10⁶=DMSO를 혼합한 FBS의 용량(mL)으로 하였다]. 크라이오바이얼을 -20℃에서 1시간 동안 보존하고 이어 -80℃에서 24시간 보존한 후 최종적으로 장기 보존용 액체 질소 탱크에 옮겼다.

[0074] [어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNC) 분획의 세포 배양 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MS) 제조]

[0075] 37℃의 수욕에서 크라이오바이얼에 냉동 보존하고 있던 어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNCs) 분획의 세포를 포함하는 세포 현탁액을 빠르게 해동하고 마이크로 피펫을 이용하여 해동한 세포 현탁액을 30mL의 온도 평형(37℃)으로 조정된 MSC 기초 배지[500mL의 Gibco사제 MEM α(Nucleosides, no Ascorbic acid)에 55mL의 Gibco 사제 Fetal bovine serum (FBS) 및 5.5mL의 Sigma-Aldorich 사제 Penicillin-Streptomycin을 첨가한 배지, 이하 같음]에 조용히 첨가하였다. 실온에서 5분간, 500×g으로 원심 분리해, 펠렛을 4 mL의 온도에서 평형화한 MSC 기초 배지에 재현탁하고 상하로 부드럽게 피펫팅했다. 총세포 수 및 생세포 수를 측정한 결과, 총세포 수 4.18×10⁶개, 생세포 수 6.6×10⁵개, 생존율:15.8%였다.

[0076] 0.1% 젤라틴으로 6웰 플레이트를 코팅하고 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 속에 10 내지 15분간 정치 후 사용 전에 젤라틴을 제거하였다. 제조한 각 0.1% 젤라틴 피복 6-웰 플레이트에 세포 현탁액을 첨가하고 부드럽게 요동시켜 증식 표면(젤라틴 코트) 상에 세포 현탁액을 분산시켜 2mL의 MSC 기초 배지 중에 2.09×10⁶개의 세포/1웰을 파종했다. CO₂ 인큐베이터 안에서 37℃에서 5% CO₂, 90% 습도의 조건 하에서 배양하고, 3일 후에 MSC 배지[500mL의 Gibco사제 MEM α(nucleosides)에 55mL의 Gibco사제 Fetal bovine serum(FBS), 5.5mL의 Sigma-Aldorich사제 Penicillin-Streptomycin 및 22.2μL의 Sigma-Aldorich 사제 FGF-Basic, recombinant, expressed in E. coli, suitable for cell culture (final concentration : 1ng / mL)을 첨가한 배지, 이하 같음]로 교환하여 세포를 증식시키고, 그 후, 3 일 동안에 1 회, MSC 배지를 교환했다. 10일 후에 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MS)가 콘플루언트가 되었다. 또한 젤라틴 코트가 없는 플레이트를 이용했을 경우에 대해서도 마찬가지로 10일 후에 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MS)가 콘플루언트가 되었다.

[0077] [계대]

[0078] 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MS)가 거의 100% 콘플루언스에 도달한 후 2웰에서 세포를 회수하고 0.1% 젤라틴 코트 있음 또는 없음으로 T75 플라스크에 그것들을 재파종했다.

[0079] 2mL의 PBS(칼슘 및 마그네슘 불포함)로 세포를 세정하고 1웰당 0.25% 트립신 320 μL를 첨가하여 인큐베이터에 몇분간 정치했다가 세포가 벗겨지면 1680 μL의 MSC 배지에서 중화했다. 1mL 피펫을 이용하여 세포 현탁액을 50mL 튜브에 채취하고, 16mL(8mL×2웰)의 MSC 배지를 첨가한 후 실온에서 5분간 500×g으로 원심 분리했다. 피펫을 이용하여 얻어진 펠렛을 온도 평형화한 MSC 배지(2 mL)에 온화하게 재현탁했다. 총세포 수 및 생세포 수를 측정한 결과, 총세포 수 2.05×10⁶개, 생세포 수 2.02×10⁶개, 생존율: 98.5%였다.

[0080] MSC 배지를 0.1% 젤라틴 코트 있음 및 없음의 T75 플라스크에 첨가하고, 4.5×10⁵ 생세포/플라스크 T75 플라스크가 되도록 재파종하여 CO₂ 인큐베이터 안에서 37℃에서 5% CO₂, 90% 습도의 조건 하에서 배양하였다. 이러한 세포를 제1계대로 했다. 제1계대를 파종하고 3일 후에 0.1% 젤라틴 코트의 유무에 관계없이 100% 콘플루언트에 도달했다.

[0081] [어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MS) 제조]

[0082] 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MS)가 거의 100% 콘플루언스에 도달한 후 0.1% 젤라틴 코트를 포함하거나 포함하지 않는 T75 플라스크의 2개의 플라스크에서 세포를 회수했다. 8mL의 PBS(-)로 세포를 세정하고 1웰당 0.25%의 트립신 2.4mL를 첨가하여 인큐베이터에 몇 분간 정치했다가 세포가 벗겨지면 12.6mL의 MSC 배지

로 중화했다. 세포 현탁액을 50mL 튜브에 모으고, 실온에서 5분간, $500\times g$ 으로 원심 분리했다.

[0083] 얻어진 펠렛에 온도 평형화된 MSC 배지(10mL)를 첨가하고 피펫으로 상하로 조용히 재현탁하여 총세포 수 및 생 세포 수를 측정한 결과는 다음과 같다.

[0084] 0.1% 젤라틴 코팅된 플라스크($\times 2$)로부터의 세포:총세포 수 1.62×10^7 개, 생세포 수 1.60×10^7 개, 생존율:98.8%

[0085] 젤라틴 코트 없음의 플라스크($\times 2$)로부터의 세포:총세포 수 1.48×10^7 개, 생세포 수 1.46×10^7 개, 생존율:98.6%

[0086] [어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)의 동결 보존]

[0087] 상기의 배양과는 별도로, 조기 계대의 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)를 동결하여 세포 스톱을 제작하였다. 원하는 농도의 CELLBANKER(등록 상표) 1 또는 OPF-301[3% 트레할로스 및 5% 텍스트란을 함유하는 젖산 링거액(국제 공개 제2014/208053호)]과 DMSO를 9:1의 비율로 혼합한 용액 중에서 트립신 처리한 npBM-MSC 펠렛을 재현탁하여 1.5×10^6 세포/1mL/바이얼로 만들었다. 바이얼을 바이셀에 넣어 -80°C 에서 24시간 보존한 후 세포를 -80°C 에서 액체 질소로 옮겨 장기 보존했다.

[0088] [CFU 어세이]

[0089] 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)(P2)를 21cm^2 배양 디쉬(젤라틴 코트 없음 또는 0.1% 젤라틴 코트)에 630세포를 $30\text{세포}/\text{cm}^2$ 밀도로 파종하여 MSC 배지 속에서 배양하였다. MSC 배지는 3일마다 교환했다. 6일간 배양 후 접착 세포를 4mL의 PBS로 2회 세정하고 4mL의 빙랭 메탄올로 4°C 에서 15분간 고정하였다. 콜로니를 가시화하기 위해 인산 완충액으로 1:19로 희석한 4mL 김자로 30분간 세포를 염색한 후 실온(RT)에서 세정하고, H_2O 로 2회 세정하였다.

[0090] 이어 50개가 넘는 세포의 콜로니 수를 측정해 세포의 콜로니 형성 효율을 계산했다. 세포의 콜로니 형성 효율은 1디쉬당 콜로니 수를 1디쉬당 파종한 세포 수(630개)로 나눴으로써 계산했다. 결과를 표 1에 나타낸다. 또한, 표 1의 값은 평균값 $\pm$ SD(n=3)를 나타낸다.

표 1

[0091] 세포의 콜로니 형성 효율(%)

0.1% 젤라틴 코트	21.1 ± 3.3
젤라틴 코트 없음	23.1 ± 3.7

[0092] 표 1에 나타난 바와 같이 CFU 어세이 결과, 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)는 젤라틴 코트의 유무에 관계없이 콜로니를 형성할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0093] [세포의 평균 직경]

[0094] 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC, 계대 횟수 P4) 및 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대하여 세포의 평균 직경을 측정한 결과를 표 2에 나타낸다. 세포의 평균 직경은 Nucleo Counter NC-200(상표)을 이용해 측정해, 평균값(n=3)을 산출했다.

표 2

[0095] 세포의 평균 직경

npBM-MSC	$13.2\ \mu\text{m}$
hBM-MSC	$17.5\ \mu\text{m}$

[0096] 표 2에 나타난 바와 같이, 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)는 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포와 비교하여 평균 직경이 작다는 것을 알 수 있었다.

[0097] [증식 속도의 평가]

[0098] 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC) 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대하여 세포를 T25 플라스크 안에서 5000세포/cm² (1.25×10⁵ 세포/플라스크)의 밀도로 파종하고 MSC 배지를 이용하여 배양하였다. MSC 배지는 3일마다 교환했다. 배양 개시로부터 1, 2, 4 및 8일 후에 생존 가능한 세포 및 죽은 세포의 총 수를 세었다. 결과를 표 3 및 표 4, 그리고 도 1A 및 도 1B에 나타낸다. 또한, 표 3 및 표 4의 값은 평균값 ± SD(n=4)이다.

표 3

[0099] 전체 세포량(×10⁴ 세포)

군	현탁 직후	1일째	2 일째	4 일째	8 일째
npBM-MSC	12.7	32.5±2.7	86.9±7.7	207.9±38.2	448.0±73.6
hBM-MSC	12.5	12.5±0.8	22.3±2.9	37.4±3.8	50.5±5.7

[0100]

표 4

[0101] 전체 세포 증식률(%)

군	현탁 직후	1일째	2 일째	4 일째	8 일째
npBM-MSC	100	257±22	687±61	1643±302	3542±581
hBM-MSC	100	100±7	178±23	299±31	404±46

[0102] 표 3 및 표 4, 그리고 도 1A 및 도 1B에 나타내는 바와 같이, 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)는 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포와 비교하여 세포의 증식 속도가 현저히 빠르다는 것을 알 수 있었다.

[0103] [지방 세포로의 분화]

[0104] 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC) 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대해 hMSC differentiation BulletKit(상표)-adipogeni, PT-3004(Lonza Walkersville 사제)를 이용하여 프로토콜에 따라 지방 세포로의 분화를 유도하였다. 유도 개시 후 17일째에 Sigma-Aldorich 사제 Oil Red를 이용하여 염색한 결과를 각각 도 2A 및 도 2B에 나타냈다.

[0105] 도 2A 및 도 2B에 나타내는 바와 같이, 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)는 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포와 마찬가지로 지방 세포로 분화할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0106] [골 세포로의 분화]

[0107] 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포(hBM-MSC) 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대해 hMSC differentiation BulletKit(상표)-osteogenic, PT-3002(Lonza Walkersville 사제)를 이용하여 프로토콜에 따라 골 세포로의 분화를 유도하였다. 유도 개시 후 14일째에 코스모·바이오사제 알칼리포스파타아제 염색 키트를 이용하여 염색한 결과를 각각 도 3A 및 도 3B에, 코스모·바이오사제 석회화 염색 키트를 이용하여 염색한 결과를 각각 도 4A 및 도 4B에 나타낸다.

[0108] 도 3A 및 도 3B 그리고 도 4A 및 도 4B에 나타내는 바와 같이, 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)는 인간 골수 유래 간엽계 줄기 세포와 마찬가지로 골 세포로 분화할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0109] [연골 세포로의 분화]

[0110] 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)에 대해 hMSC differentiation Bullet Kit(상표)-chondrogenic, PT-3003(Lonza Walkersville 사제)을 이용하여 프로토콜에 따라 골 세포로의 분화를 유도하였다. 유도 개시 후 19일째에, HE 염색한 결과 및 알시안 블루 염색 결과를 각각 도 5A 및 도 5B에 나타낸다.

[0111] 도 5A 및 도 5B에 나타내는 바와 같이, 얻어진 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)는 연골 세포로

분화할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

- [0112] 시험예 2
- [0113] [어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNC) 분획의 세포 배양 및 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC) 제조]
- [0114] MSC 기초 배지 또는 MSC 배지는 사용 전에 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 안에 10 내지 15분간 정치했다. 시험예 1과 마찬가지로 37℃의 수욕에서 크라이오바이알에 냉동 보존하고 있던 어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNC) 분획의 세포를 포함하는 세포 현탁액을 재빨리 해동했다. 마이크로피펫을 이용하여, 해동한 세포 현탁액을 30 mL의 온도 평형(37℃) MSC 기초 배지에 조용히 첨가하고 50 mL의 튜브 2개에 15 mL씩 분주했다.
- [0115] 실온에서 5분간, 500×g로 원심 분리하고, 펠렛을 2 mL의 온도 평형 MSC 기초 배지 또는 MSC 배지에 재현탁해, 상하로 부드럽게 피펫팅 했다. 총세포 수 및 생세포 수를 측정한 결과를 하기에 나타낸다.
- [0116] 2mL의 MSC 기초 배지: 총세포 수 2.60×10^6 개, 생세포 수 4.8×10^5 개, 생존율 18.5%
- [0117] 2mL의 MSC 배지: 총세포 수 2.55×10^6 개, 생세포 수 4.5×10^5 개, 생존율 17.6%
- [0118] 파종 세포 수가 하기와 같이 되도록 계산된 양의 세포 현탁액을 각 웰에 대해 아래와 같은 배지를 넣은 6웰 플레이트(젤라틴 코트 없음)에 첨가하여 부드럽게 흔들어 증식 표면 상에 세포 현탁액을 분산시켰다.
- [0119] 2mL의 MSC 기초 배지: 2.60×10^6 개/1웰의 세포를 파종
- [0120] 2mL의 MSC 배지: 2.55×10^6 개/1웰의 세포를 파종
- [0121] CO₂ 인큐베이터에 넣고 37℃에서 5% CO₂, 90% 습도의 조건 하에서 인큐베이팅했다. 파종하고 3일 후 및 6일 후에 MSC 배지에서 배지 교환하여 세포를 증식시키고, 파종 후 8일째에 계대하였다.
- [0122] [계대]
- [0123] 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)가 거의 50 내지 60% 콘플루언트에 도달한 후 1웰에서 세포를 회수하고 젤라틴 코트 없이 T75 플라스크에 그것들을 재파종했다.
- [0124] 2mL의 PBS(-)로 세포를 세정하고 1웰당 0.25% 트립신을 320 μL 첨가하여 인큐베이터에 몇분간 정치했다가 세포가 벗겨지면 1680 μL의 MSC 배지로 중화하였다. 세포 현탁액을 50 mL 튜브에 모아 8 mL의 MSC 배지를 첨가하여 실온에서 5분간, 500×g로 원심 분리했다.
- [0125] 얻어진 펠렛에 온도 평형화된 MSC 배지(2mL)를 첨가하여 피펫으로 상하로 부드럽게 재현탁하여 총세포 수 및 생세포 수를 측정한 결과를 하기에 나타낸다.
- [0126] P0 파종 시에 MSC 기본 배지의 군: 총 세포 수 5.0×10^5 개, 생세포 수 5.0×10^5 개, 생존율: 100%
- [0127] P0 파종 시에 MSC 배지의 군: 총 세포 수 3.3×10^5 개, 생세포 수 3.3×10^5 개, 생존율: 100%
- [0128] 15 mL의 MSC 배지를 T75 플라스크(젤라틴 코트 없음)에 첨가하고, 하기 세포 수가 되도록, 어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)를 재파종한, 인큐베이터에서 배양했다. 이러한 세포를 제1계대로 했다.
- [0129] P0 파종 시에 MSC 기초 배지의 군: 생세포 수 5.0×10^5 개/플라스크
- [0130] P0 파종 시에 MSC 배지의 군: 생세포 수 3.3×10^5 개/플라스크
- [0131] [어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)의 제조]
- [0132] 상기 절차에 따라 재파종한 세포가 거의 80 내지 90%의 콘플루언스에 도달한 후 T75 플라스크(젤라틴 코트 없음)의 1 플라스크로부터 세포를 모았다. 8mL의 PBS(-)로 세포를 세정하고 0.25mL/1웰의 트립신 2.4mL를 첨가하여 인큐베이터에 몇분간 정치했다가 세포가 벗겨지면 12.6mL의 MSC 배지로 중화시켰다. 세포 현탁액을 50mL 튜브에 모으고, 실온에서 5분간, 500×g로 원심 분리했다.
- [0133] 얻어진 펠렛에 온도 평형화한 MSC 배지(5mL)를 첨가하고 피펫으로 상하로 조용히 재현탁하여 총세포 수 및 생세포 수를 측정한 결과를 하기에 나타낸다.

포 수를 측정한 결과를 하기에 나타낸다.

- [0134] 1개의 플라스크로부터의 세포(P0의 파종 후 3일간의 MSC 기초 배지):총세포 수 5.12×10^6 개, 생세포 수 5.09×10^6 개, 생존율:99.5%
- [0135] 1개의 플라스크로부터의 세포(P0의 파종시부터 MSC 배지):총세포 수 4.76×10^6 개, 생세포 수 4.73×10^6 개, 생존율:99.4%
- [0136] [어린 돼지 골수 유래 간엽계 줄기 세포(npBM-MSC)의 동결 보존]
- [0137] 상기의 배양과는 별도로 시험예 1과 동일하게 하여 초기 계대의 세포를 동결하여 세포 스톱을 제작했다.
- [0138] 시험예 3
- [0139] 시험예 1 및 시험예 2에서 제조한 어린 돼지 유래 단핵구 세포(npMNC)의 세포 표면 항원을 해석하였다. 해석에 이용한 각 샘플의 제조 방법에 대해 표 5에 나타낸다. 표 5에서 "Switch"란 초기 배양 시에는 MSC 기초 배지(비타민 C 프리)를 이용하고 증식 배양 시에는 증식 배지인 MSC 배지(비타민 C 함유)로 변경하여 배양한 것을 나타낸다.

표 5

- [0140] 각 샘플의 제조법

샘플 No.	배지	0.1% 젤라틴 코트		동결 조건
		초기 배양시	증식 배양시	
1	Switch	○	○	CELLBANKER(등록 상표)
2	Switch	○	○	OPF-301(10% DMSO)
3	Switch	○	-	CELLBANKER(등록 상표)
4	Switch	○	-	OPF-301(10% DMSO)
5	Switch	-	-	OPF-301(10% DMSO)
6	MSC 배지만	-	-	OPF-301(10% DMSO)

- [0141] [세포 표면 항원의 해석]
- [0142] 각 세포 샘플을 액체 질소 탱크에서 꺼내 뚜껑을 열고 압을 뺀 뒤 다시 뚜껑을 닫고 37℃로 미리 가온해 둔 항온조에서 1 내지 2분간 가볍게 교반하면서 용해했다. Stain Buffer(BD사제) 5mL를 넣은 15mL 원심관에 용해시킨 각 세포를 옮겨, 4℃에서 500×g, 5분간 원심하여, 상청을 제거했다. 5mL의 Stain Buffer를 넣고, 4℃에서 500×g, 5분간 원심하여 2회 세정했다.
- [0143] 2mL의 Stain Buffer(BD사제)로 재현탁해, 생세포 수를 카운트했다. 재원심(500×g, 5분간, 4℃)을 실시하여 세포 수 1×10^7 개/mL가 되도록 Stain Buffer(BD사 제품)로 재현탁하고, 20 μL(세포 수 2×10^5 개)씩 1.5mL 튜브로 분주하여 비염색 컨트롤, CD44, CD90, 이소타입 컨트롤(Isotype Control)의 총 4개씩 제조하였다.
- [0144] 4 μL의 Anti-CD44, Mouse(MEM-263), PE(GeneTex사 제품), 1 μL의 PE Mouse Anti-Human CD90(BD사 제품)(돼지와 교차성 있음), 4 μL의 PE Mouse IgG1, κ 이소타입 컨트롤(Isotype Control)(BD사 제품)을 각각의 튜브에 첨가하고 차광병상에서 45분간 인큐베이팅했다. 비염색 컨트롤도 병상에서 보관했다.
- [0145] 각 튜브에 Stain Buffer(BD사제)를 1 mL씩 넣고, 4℃에서 500×g로 5분간 원심하여 2회 세정했다. 세포 펠렛을 태핑해서 풀고, 500 μL의 Stain Buffer(BD사 제품)로 재현탁해, 해석 직전에 필터를 통해 플로우사이트용의 테스트 튜브로 옮겼다. 해석까지의 기간 동안은 차광병 상에서 보관하고, 플로우사이트메트리를 이용해 해석했다. CD44의 결과를 도 6에, CD90의 결과를 도 7에 나타낸다.
- [0146] 도 6 및 도 7에 나타내는 바와 같이 모든 샘플에서 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD44 및 CD90이 양성이었다. 또한 초기 배양 시에 젤라틴에 의한 코팅을 하지 않아도 목적으로 하는 간엽계 줄기 세포를 수립할 수 있었다고 생각된다. 또한, 어느 경우도 이소타입 컨트롤(Isotype Control)의 측정에서는 비특이적인 반응은 볼 수 없었다.
- [0147] 시험예 4

[0148] [어린 돼지 췌도 유래 간엽계 줄기 세포의 제조]

[0149] 어린 돼지로부터 췌도를 회수하여 부유 배양함으로써 세포괴를 제조한 후 시험에 1과 동일하게 하여 냉동 보존했다. 37℃의 수욕에서 크라이오바이얼에 냉동 보존하고 있던 어린 돼지 췌도를 재빨리 해동했다.

[0150] 마이크로피펫을 이용해, 해동한 췌도 현탁액을 30 mL의 온도 평형(37℃)으로 조정된 MSC 기초 배지에 조용히 첨가했다. 4℃에서 1분간 210×g으로 원심 분리했다. 또한, 췌도를 동결하지 않을 경우에는 실온에서 자연 낙하로 췌도가 침전 후 상청을 제거했다. 펠렛을 4mL 온도에서 평형화한 MSC 기초 배지에 재현탁해 상하로 부드럽게 피펫팅했다.

[0151] 6-웰 플레이트에 췌도 현탁액을 첨가하여 부드럽게 요동시켜 증식 표면(젤라틴 코트 없음) 상에 세포 현탁액을 분산시키고, 2mL의 MSC 기초 배지 중에 1650IEQ 내지 2125IEQ 범위의 췌도/1웰을 파종하였다.

[0152] CO₂ 인큐베이터 중 37℃에서 5% CO₂, 90% 습도의 조건하에서 배양하고, 3일 후에 MSC 배지로 교환해 세포를 증식시키고, 그 후 3일간 1회 MSC 배지를 교환했다. 표 6에 샘플의 제조 조건을 나타낸다. 초기 동결 여부에 관계없이 파종한 지 6일 후에 100% 콘플루언트에 도달했다.

표 6

샘플 No.	유래	조건	P0에서의 동결*	동결 시의 계대 횟수*	액량(mL)	세포 농도 (×10 ⁶ total cells/mL)
7	췌도	췌도 제조 당일(day 1)	없음	P2(OPF-301)	1	2.23
8	췌도	췌도 제조 후 3일째(day 4)	없음	P2(OPF-301)	1	1.22
9	췌도	췌도 제조 당일(day 1)	있음(OPF-301)	P2(OPF-301)	1	3.25
10	췌도	췌도 제조 후 3일째(day 4)	있음(OPF-301)	P2(OPF-301)	1	2.3

[0154] *괄호 안은 10% DMSO 용액의 종류

[0155] [계대]

[0156] 어린 돼지 췌도 유래 간엽계 줄기 세포(npISLET-MSC)가 약 80% 내지 거의 95% 콘플루언스에 도달한 후 2웰로부터 세포를 회수하고 젤라틴 코트 없이 T75 플라스크에 그것들을 재파종하였다.

[0157] 2mL의 PBS(칼슘 및 마그네슘 불포함)로 세포를 세정하고 1웰당 0.25% 트립신 320 μL를 첨가하여 인큐베이터 내에 몇분간 정치했다가 세포가 벗겨지면 1680 μL의 MSC 배지에서 중화했다. 1mL 피펫을 이용하여 세포 현탁액을 50mL 튜브에 채취하고, 16mL(8mL×2웰)의 MSC 배지를 첨가한 후 실온에서 5분간 500×g으로 원심 분리했다. 피펫을 이용하고, 얻은 펠렛을 온도 평형화한 MSC 배지(2 mL)에 부드럽게 재현탁했다.

[0158] [세포 평균 직경]

[0159] 20mL의 상기 MSC 배지를 젤라틴 코트 없는 T75 플라스크에 첨가하여 재파종하고 CO₂ 인큐베이터 안에서 37℃에서 5% CO₂, 90% 습도의 조건 하에서 배양했다. 이러한 세포를 제1계대로 했다. 제1계대를 파종한 지 3일 후에 초기 동결 여부에 관계없이 100% 콘플루언트에 도달했다. 이로 인해 어린 돼지의 췌도로부터 제조한 간엽계 줄기 세포의 증식 속도는 어린 돼지의 골수로부터 제조한 간엽계 줄기 세포의 증식 속도와 같은 정도임을 알 수 있었다. 얻어진 어린 돼지 췌도 유래 간엽계 줄기 세포의 평균 직경을 표 7에 나타낸다.

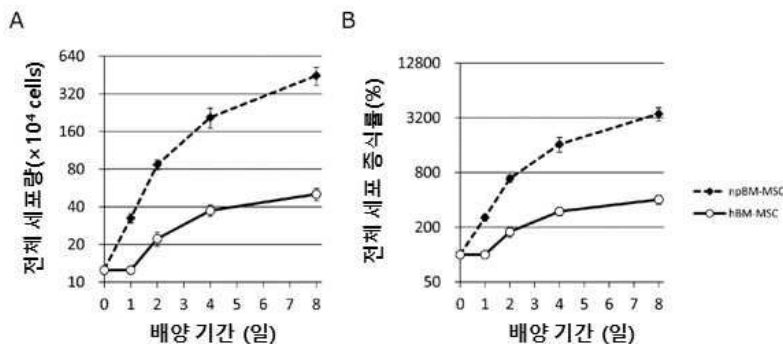
표 7

샘플 No.	11	12	13	14
제조 조건	췌도 제조 직후의 동결 없음	췌도 제조 직후의 동결 있음	췌도 제조 후 배양 3일째의 동결 없음	췌도 제조 후 배양 3일째의 동결 있음
동결시 10% DMSO 용액의 종류	-	OPF-301	-	OPF-301
평균 직경	12.1 μm	12.2 μm	12.0 μm	12.3 μm

- [0161] 표 7에 나타난 바와 같이 채도의 제조에서의 동결 조건에 관계없이 어린 돼지 채도 유래 간엽계 줄기 세포를 제조할 수 있으며, 동결 있음의 경우, 동결 없음 경우에 관계없이 평균 직경은 동일한 정도임을 알 수 있었다.
- [0162] [세포 표면 항원의 해석]
- [0163] 각 세포 샘플을 액체 질소 탱크에서 꺼내 뚜껑을 풀고 압을 뺀 뒤 다시 뚜껑을 닫고 37℃로 미리 가온해 둔 항온조에서 1 내지 2분간 가볍게 교반하면서 용해했다. Stain Buffer(BD사제) 5mL를 넣은 15mL 원심관에 용해시킨 각 세포를 옮겨, 4℃에서 500×g, 5분간 원심하여, 상청을 제거했다. 5mL의 Stain Buffer를 넣고, 4℃에서 500×g, 5분간 원심하여 2회 세정했다.
- [0164] 2mL의 Stain Buffer(BD사제)로 재현탁해, 생세포 수를 카운트했다. 재원심(500×g, 5분간, 4℃)을 실시하여 세포 수 1×10^7 개/mL가 되도록 Stain Buffer(BD사 제품)로 재현탁하고, 20 μ L(세포 수 2×10^5 개)씩 1.5mL 튜브에 분주하여 비염색 컨트롤, CD29, CD44, CD90의 총 4개씩 제조하였다.
- [0165] 1 μ L의 Mouse Alexa Fluor 647 Mouse Anti-Pig CD29(BD사 제품), 4 μ L의 Anti-CD44, Mouse(MEM-263), PE(GeneTex사 제품), 1 μ L의 PE Mouse Anti-Human CD90(BD사 제품)(돼지와 교차성 있음)을 각각의 튜브에 첨가하고 차광병 상에서 45분간 인큐베이팅했다. 비염색 컨트롤도 병상에서 보관했다.
- [0166] 각 튜브에 Stain Buffer(BD사제)를 1 mL씩 넣고, 4℃에서 500×g으로 5분간 원심하여 2회 세정했다. 세포 펠렛을 태핑하여 풀고, 500 μ L의 Stain Buffer(BD사 제품)로 재현탁해, 해석 직전에 필터를 통해 플로우사이트용의 테스트 튜브에 옮겼다. 해석까지의 동안은 차광병상에 보관하고, 플로우사이토메트리를 이용해 해석했다.
- [0167] CD29의 결과를 도 8A 내지 도 8D에, CD44의 결과를 도 9A 내지 도 9D에, CD90의 결과를 도 10A 내지 도 10D에 나타낸다. 도 8A, 도 9A, 도 10A는 샘플 11(채도 제조 직후의 동결 없음); 도 8B, 도 9B, 도 10B는 샘플 12(채도 제조 직후의 동결 있음); 도 8C, 도 9C, 도 10C는 샘플 13(채도 제조 후 배양 3일째의 동결 없음); 도 8D, 도 9D, 도 10D는 샘플 14(채도 제조 후 배양 3일째의 동결 있음)의 결과를 나타낸다.
- [0168] 도 8A 내지 도 10D에 나타난 바와 같이 모든 샘플에서 간엽계 줄기 세포의 마커인 CD29, CD44 및 CD90에 대해 높은 양성률이 관찰됐다. 또 초기 배양 시에서의 동결 유무에 관계없이 목적으로 하는 간엽계 줄기 세포를 수립할 수 있었다고 생각된다.
- [0169] 본 발명을 특정 양태를 참조해 상세하게 설명했지만, 본 발명의 정신과 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경 및 수정이 가능하다는 것은 당업자에게 있어서 명백하다. 또한 본 출원은 2017년 9월 8일자로 출원된 미국 가출원(US62/555,913)에 기초하고 있고, 그 전체가 인용에 의해 인용된다. 또, 여기에 인용되는 모든 참조는 전체적으로 받아들여진다.

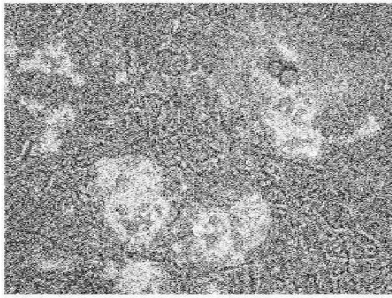
도면

도면1



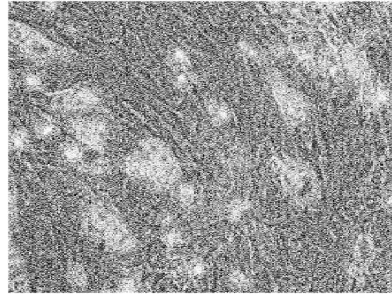
도면2

A. hBM-MSC



50μm

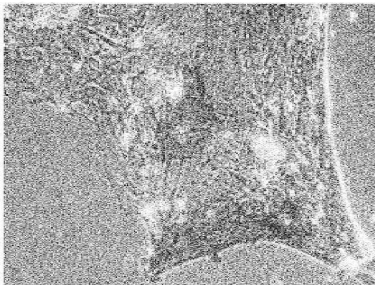
B. npBM-MSC



50μm

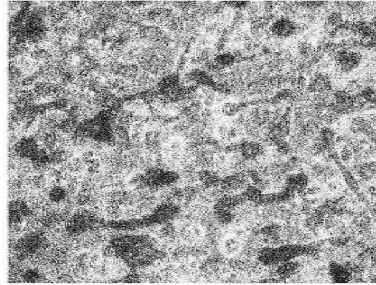
도면3

A. hBM-MSC



50μm

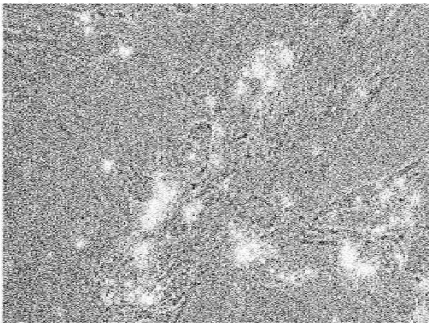
B. npBM-MSC



50μm

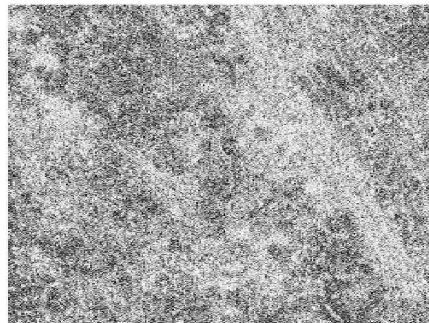
도면4

A. hBM-MSC



50μm

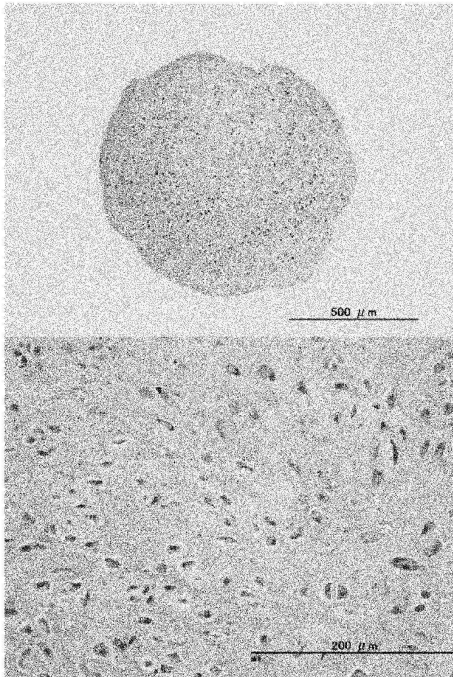
B. npBM-MSC



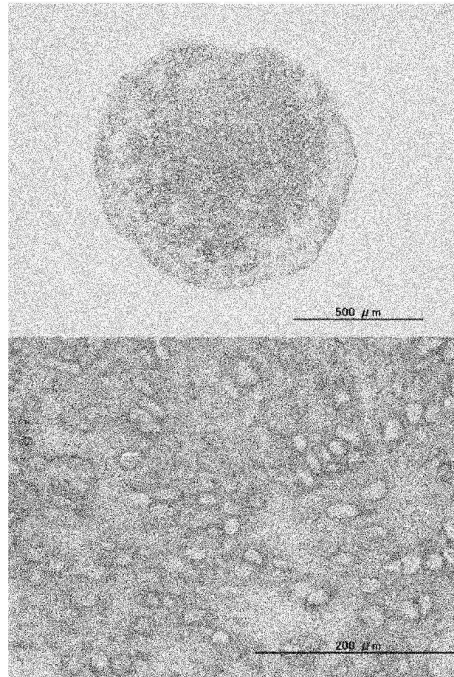
50μm

도면5

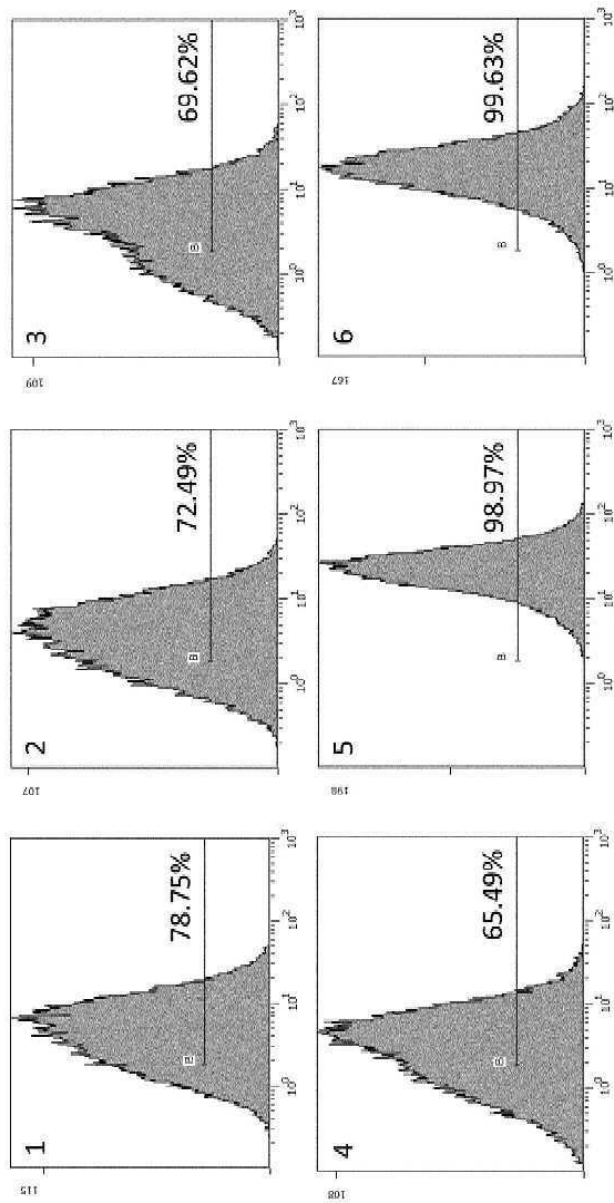
A. HE



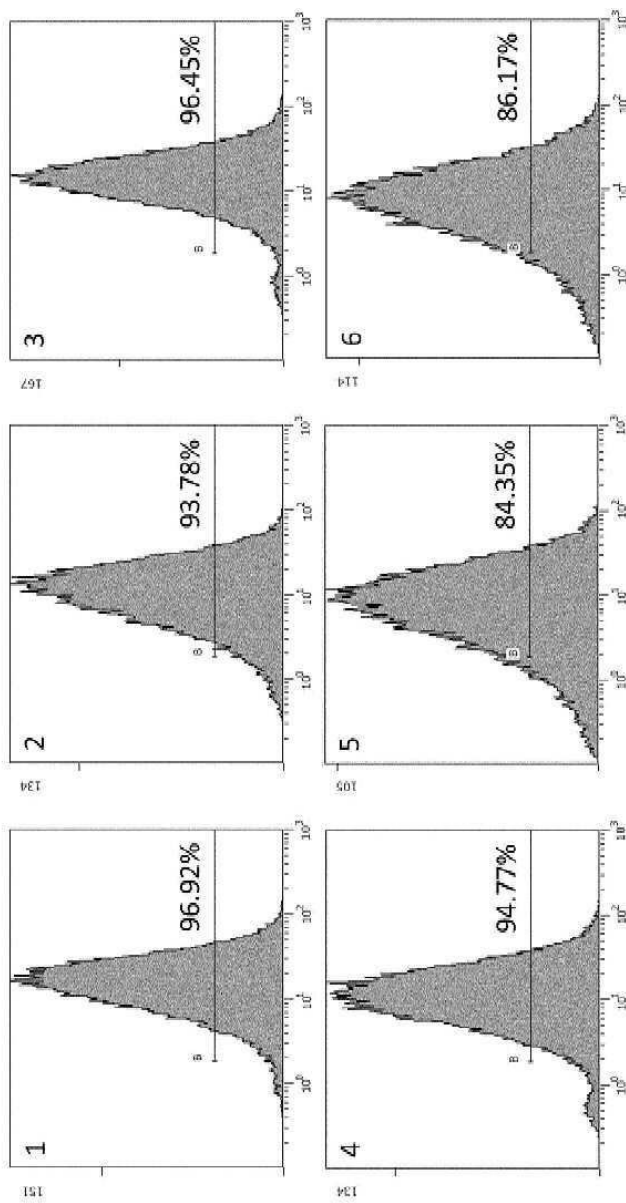
B. 알시안 블루



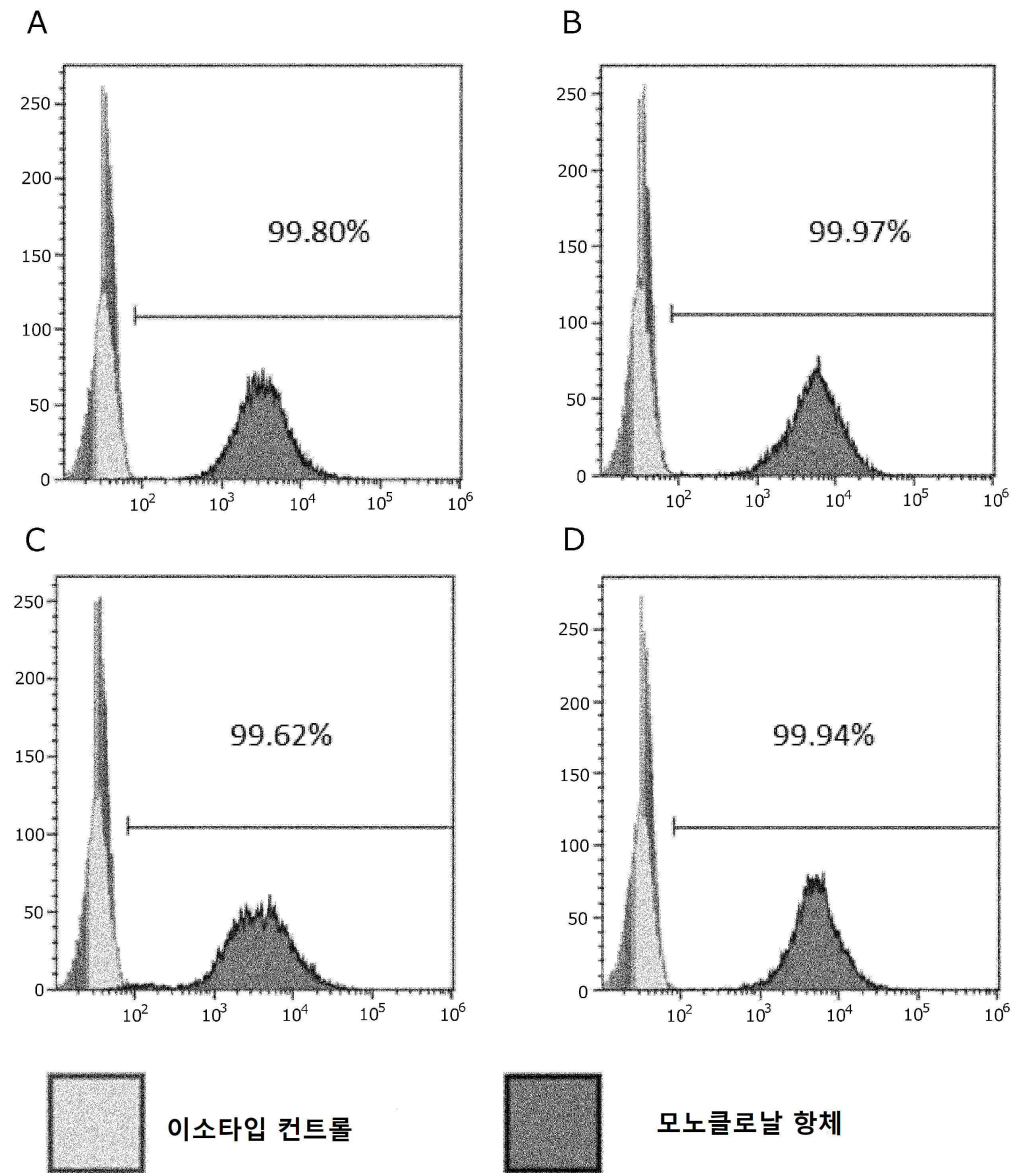
도면6



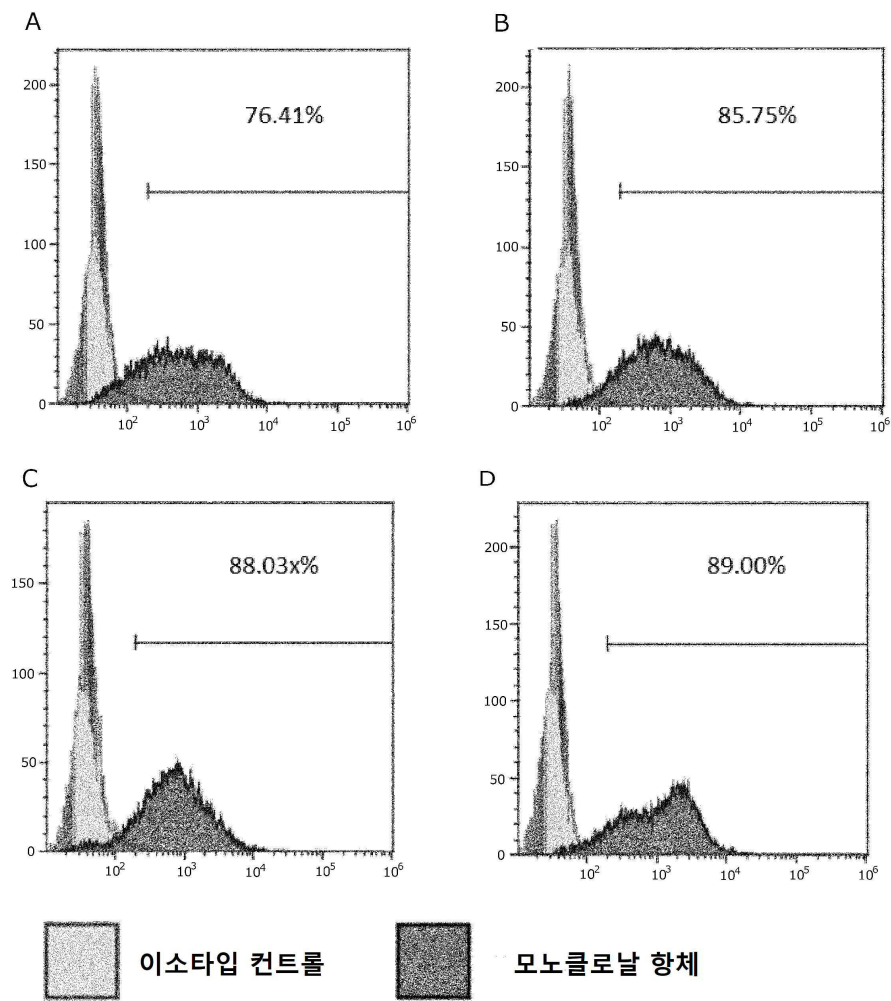
도면7



도면8



도면9



도면10

