

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0082552 (43) 공개일자 2009년07월31일
(51) Int. Cl. C12N 5/08 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내	
(21) 출원번호 10-2008-0008364	(72) 발명자 최승철	
(22) 출원일자 2008년01월28일	서울 중구 신당2동 420-3 장충시스모빌 202호	
심사청구일자 2008년01월28일	최지현	
	서울 성북구 상월곡동 55-56 우남아파트 101-1207	
	임도선	
	서울 강남구 대치동 동부센트레빌 101-204	
	(74) 대리인	
	이문섭	

전체 청구항 수 : 총 11 항

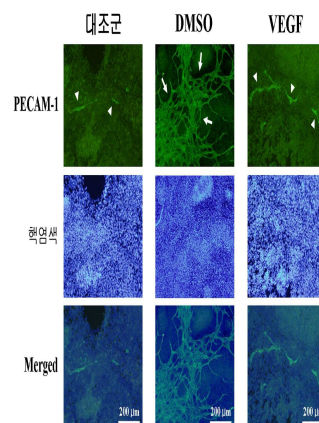
(54) 배아 암종 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 배아 암종 줄기세포를 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양하여 배상체를 형성하는 단계 및 상기 형성된 배상체에 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor)를 처리하여 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계를 포함하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 배아 암종 줄기세포가 혈관내피세포로 분화능이 있음을 혈관내피세포 마커를 사용한 면역염색법, 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)에 의한 혈관내피세포 마커들의 정량적 분석, 배양액 조성 및 우태아혈청 첨가 농도에 따른 혈관내피세포로의 분화율 비교, 유세포 분석을 통하여 정량적으로 입증하였으며, 이러한 결과를 토대로 배아 암종 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시켜 혈관내피세포를 대량으로 배양할 수 있다. 배아 암종 줄기세포는 유전자 도입이 쉽고, 세포 배양이 용이하며, 저비용으로 대량 배양이 가능한 장점을 가지고 있기 때문에 본 발명에 따라 생산된 혈관세포를 이용하여 혈관내피세포로의 분화 기전 연구, 심혈관 및 뇌혈관질환의 치료 연구, 신생혈관 차단에 의한 항암제 개발 연구 등에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10574
부처명	서울시정개발연구원
연구사업명	핵심 기반 기술 구축 사업(구 전략산업혁신클러스터육성지원)
연구과제명	분자영상기반 난치병 치료 신기술 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2005년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

배아 암종 줄기세포를 기본배지 및 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양하여 배상체를 형성하는 단계 및 상기 형성된 배상체에 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor)를 처리하여 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계를 포함하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배아 암종 줄기세포는 P19 배아 암종 줄기세포(ATCC 기탁번호 CRL 1825)인 것을 특징으로 하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양배지는 되먹임세포(feeder cell) 및 분화억제제가 첨가되지 않는 것을 특징으로 하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 배상체를 형성하는 단계의 혈청을 포함하는 배양 배지는 디메틸 설펍사이드(DMSO)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배상체를 형성하는 단계는 0.5 내지 5 %(v/v)의 디메틸 설펍사이드를 포함하는 배지에서 3 내지 6일간 배양하는 것을 특징으로 하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계는 10 내지 40 ng/ml의 혈관내피성장인자를 처리하여 7 내지 13일간 배양하는 것을 특징으로 하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계에서 혈청은 전체 배지 조성물의 0.5 내지 5 %(v/v)의 범위인 것을 특징으로 하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항의 어느 한 항에 의한 방법으로 분화된 혈관내피세포.

청구항 9

인간 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 수용체(Flk-1)의 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응시키기 위한 서열번호 1 및 서열번호 2의 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트.

청구항 10

CD31(PECAM-1) 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응시키기 위한 서열번호 3 및 서열번호 4의 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트.

청구항 11

Tie-1 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응시키기 위한 서열번호 5 및 서열번호 6의 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 배아 암종 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 배아 암종 줄기세포를 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양하여 배상체를 형성하는 단계 및 상기 형성된 배상체에 혈관내피 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor)를 처리하여 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계를 포함하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 전 세계적으로 뇌혈관질환, 고혈압성질환, 심장질환과 같은 순환기계 질환 및 악성 신생물(암)에 의한 사망이 성인의 주요 사망 원인을 차지하고 있다. 국내에서도 2006년 출생아의 경우 현재의 사망원인별 사망수준이 유지된다면, 향후 위암, 간암, 폐암과 같은 악성 신생물로 사망할 확률은 남자 27.6%, 여자 15.3%로 가장 높고, 뇌혈관질환, 고혈압성질환, 심장질환과 같은 순환기계 질환으로 사망할 확률은 남자 22.3%, 여자 27.5%로 이 두 가지 질환이 전체 사망 원인의 과반수를 차지하고 있다(2006년 통계청 생명표).
- <3> 미국과 유럽을 비롯한 서구에서뿐만 아니라 우리나라에서도 식습관의 변화 및 고령화 사회로의 진입에 따른 노년층의 증가 등으로 인해 순환기계 질환 및 악성 신생물에 의한 사망자수가 급격히 증가하는 추세에 있다. 그러나 약물치료, 화학요법 및 장기 이식에 의한 기존의 치료 방법으로는 치료에 한계가 있는 상황이다. 최근 인간 배아줄기세포(embryonic stem cells, ES cells)의 확립으로 인해 난치성 질환의 세포 치료 가능성이 대두되었다(Thomson JA 등 1998, Science 282:1145-1147). 더욱이 성인의 골수를 비롯한 제대혈, 지방조직과 같은 다양한 성체 조직 내에도 줄기세포가 존재한다는 연구 결과가 보고 되면서 줄기세포를 이용한 난치성 질환의 치료 가능성에 대한 관심이 고조되고 있다. 다양한 종류의 성체 줄기 세포를 동물 질환 모델내로 이식하거나 임상 연구 결과가 보고 되고 있지만 아직까지는 세포 치료 요법이 임상에 적용되기에는 치료 효과 및 안전성에 연구가 필요한 상황이다(Ratajczak MZ 등 2007, J Appl Genet 48:307-319; Harris DT 등 2007, Expert Opin Biol Ther 7:1311-1322; Helder MN 등 2007, Tissue Eng 13:1799-1808).
- <4> 특히 줄기세포 치료 요법은 골수 이식과 같이 병든 줄기세포를 건강한 세포로 대체시켜줄 뿐만 아니라 항암치료, 신경계질환, 심장 및 근육질환 등과 같은 난치성 질환 등의 치료에 효과적일 것으로 생각되고 있다. 세포 치료제는 미래의 개인 맞춤형학으로 난치병 치료의 대안으로 여겨지고 있으나, 줄기 세포를 이용한 손상된 장기의 재생은 기술 개발이 어렵고 투자비용이 많이 요구되는 분야이다. 줄기세포 관련 기술 및 치료 시장은 연평균 시장 성장률이 18.5%로 예측되는 등 급성장이 예측되어 줄기세포치료 요법과 관련 기술의 시장 규모는 2005년 20억 달러에 이르고 있으며, 2010년에는 30억 달러, 2020년에는 50억 달러에 이를 것으로 추정되고 있다(A Jain PharmaBiotech Report 2005; WHO Future Report, 2006). 현재 줄기세포 치료 분야는 바이오벤처를 중심으로 상업화 임상이 활발히 진행되고 있고, 최근에는 다국적 제약기업이 벤처간의 인수, 합병을 통한 세포 치료분야에 진출하고 있는 실정이다.
- <5> 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시키는 분화유도법의 개발은 뇌혈관질환, 심혈관질환의 세포 대체요법뿐만 아니라 신생혈관의 차단에 의한 항암제 개발 분야에 폭넓게 적용될 수 있을 것이다. 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시키는 기전 및 분화 유도법 개발과 관련한 다양한 선행 연구 들이 보고 되고 있다. 중간엽 줄기세포를 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 처리에 의해 혈관내피세포로 분화시키는 방법(CN1546656), 혈관 특이적인 유전자들을 활성화시키는 전사인자인 ELF-1을 이용하여 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 방법(US2004091468), 스케폴드에 배아줄기세포를 배양하여 생체 내 혈액의 전단력(shearing force)에 의해 혈관내피세포로 분화시키는 방법(특허 JP2006246770), 합성된 화합물을 사용하여 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시키는 방법(특허 JP2006083095), Notch ligand를 과발현하는 세포와 공배양 하여 혈관내피전구세포(endothelial progenitor cells, EPCs)로 분화시키는 방법(특허 JP2007089536), 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor, HGF)를 사용하여 골수 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시키는 방법(특허 US2007142279), 스텐트, 인공혈관 이식재 및 심장 판막재를 혈관전구세포와 결합하거나 상호 작용할 수 있는 항체 또는 항체 성분 등으로 코팅함으로써 혈관내피세포로의 부착, 성장 및 분화를 촉진시키는 방법(특허 US2007055367), 및 완전히 분화된 인간 섬유아세포 등을 디메틸레이션 인자인 5-아자시티딘(5-azacytidine) 처리에 의해 혈관내피세포 또는 혈액세포 계통으로 분화시키는 방법(특허 W02007016037) 등이 보고 되고 있다.
- <6> 배아줄기세포는 줄기세포의 특성을 유지하기 위해서는 마우스 배아 섬유아세포 또는 STO 세포와 같은 되먹임세포위에서 콜로니(colony)를 형성하는 조건하에 배양하거나 배양액 내에 백혈병 저해 인자(leukemia inhibitory factor, LIF)와 같은 분화억제제를 첨가한 조건에서 배양하여야 한다. 배아줄기세포가 다양한 세포로 분화될 수

있는 특성을 지니고 있음에도 불구하고, 개개의 세포가 아닌 콜로니 형태로 배양하여야 줄기세포의 역가를 유지할 수 있으므로 배아줄기세포내로 유전자를 도입하기가 쉽지 않다. 또한, 배아줄기세포의 특성을 유지하기 위해서는 일반 세포 배양에 이용되는 혈청대신 고가의 혈청을 사용해야 하고, 되먹임세포를 준비하거나 고가의 백혈병 저해 인자 성분 등을 첨가해 주어야 하므로 세포 배양이 용이하지 않고 많은 비용을 필요로 한다.

<7> P19 배아 암종 줄기세포는 배상체(embryoid body, EB) 형성 및 DMSO(dimethyl sulfoxide), 5-아자시티딘, 옥시토신(oxytocin) 처리에 의해 심근세포로 분화된다(Van der Heyden MA & Defize LH 2003, Cardiovasc Res 58:292-302; Choi SC 등 2004, Exp Mol Med 36:515-523; Paquin J 등 2002, Proc Natl Acad Sci 99:9550-9555). 또한, P19 세포는 레티노산(retinoic acid), 루틴(lutein) 또는 베타-카로틴(beta-carotene)에 의해 다양한 신경 외배엽성 세포 계통으로 분화될 수 있다(Bain G 등 1994, Bioessays 16:343-348; McBurney MW 1993, Int J Dev Biol 37:135-140; 특허 JP2005179257). P19 세포는 배아줄기세포와는 달리 일반 세포 배양 용기에 부착하여 자라나며, 되먹임세포나 분화억제제를 첨가하지 않아도 미분화능을 유지한다. 또한, P19 세포는 일반 세포 배양에 사용되는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 또는 α -MEM(α -Minimum Essential Medium) 같은 배양액에 일반 체세포 배양에 이용되는 우태아혈청을 사용하여 배양하기 때문에 저비용으로 대량 배양이 가능하다. 상기 기술한 바와 같이 P19 세포는 배아줄기세포와는 다른 장점을 가지고 있기 때문에 심근 및 신경 세포로의 분화 인자의 규명 및 관련 기전 연구에 유용하게 이용되어 왔다(McBurney MW 등 1982, Nature 299:165-167). 그러나, 현재까지 P19 세포의 혈관내피세포로의 분화능 및 분화유도법에 대한 연구 보고는 전무한 상태이다.

<8> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, P19 배아 암종 줄기세포를 디메틸 설펍사이드(DMSO)가 첨가된 기본배지 및 혈청을 포함하는 배양 배지에서 배양하여 배상체를 형성한 후 배상체에 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor)를 처리하는 경우, 심혈관 및 뇌혈관질환의 치료 연구, 신생혈관 차단에 의한 항암제 개발 연구 등에 유용하게 이용될 수 있는 혈관내피세포를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 따라서 본 발명의 주된 목적은 분화억제제를 첨가하지 않아도 되고, 유전자 도입이 쉬우며, 저가의 혈청을 사용하고, 되먹임세포나 고가의 백혈병 저해 인자를 첨가하지 않아도 세포 배양이 용이한 장점을 갖는 배아 암종 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법을 제공하는 데 있다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 상기 배아 암종 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법을 이용하여 분화된 혈관내피세포를 제공하는데 있다.

<11> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 P19 세포의 혈관내피세포로의 효과적인 분화 유도 조건을 확립하여, P19 세포를 혈관내피세포로의 분화 기전 연구를 위한 유용한 모델 시스템으로서의 이용 가능성을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<12> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 배아 암종 줄기세포를 기본배지 및 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양하여 배상체를 형성하는 단계 및 상기 형성된 배상체에 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor)를 처리하여 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계를 포함하는 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법을 제공한다.

<13> 본 발명의 혈관내피세포로의 분화유도방법에서, 상기 배아 암종 줄기세포는 되먹임세포(feeder cell)없이 일반 세포 배양 용기에 부착하여 배양가능하고, 분화억제제를 첨가하지 않아도 미분화능을 유지하며, 기본배지 및 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양 가능한 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는 P19 배아 암종 세포(ATCC #CRL-1825, Rockville, MD, USA)를 사용하여 혈관내피세포로 분화를 유도하였다.

<14> 본 발명의 혈관내피세포로의 분화유도방법에서, 상기 배상체를 형성하는 단계의 혈청을 포함하는 배양 배지는 디메틸 설펍사이드(DMSO)를 더 포함하는 것이 바람직하다.

<15> 본 발명의 혈관내피세포로의 분화유도방법에서, 상기 배상체를 형성하는 단계는 0.1 내지 5 % (v/v)의 디메틸 설펍사이드를 포함하는 배지에서 3 내지 6일간 배양하는 것이 바람직하고, 0.5 내지 2 % (v/v)의 디메틸 설펍사이드를 포함하는 배지에서 4 내지 5일간 배양하는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 실시예 1에서는 배아 암종 세

포에 1% 디메틸 설펍사이드를 포함하는 배지에서 4일 동안 배양하여 배상체 형성을 유도하였다.

- <16> 본 발명의 혈관내피세포로의 분화유도방법에서, 상기 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계는 10 내지 40 ng/ml의 혈관내피성장인자를 처리하여 7 내지 13일간 배양하는 것이 바람직하고, 15 내지 30 ng/ml의 혈관내피성장인자를 처리하여 9 내지 11일간 배양하는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 실시예 2에서는 형성된 배상체에 20 ng/ml의 혈관내피세포성장인자를 처리하여 10일 동안 배양하여 혈관내피세포로의 분화를 유도하였다.
- <17> 본 발명의 혈관내피세포로의 분화유도방법에서, 상기 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계에서 혈청은 전체 배지 조성물의 0.5 내지 5 %(v/v)의 범위인 것이 바람직하고, 전체 배지 조성물의 1 내지 3 %(v/v)의 범위인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 실시예 2에서는 배상체에서 혈관내피세포로의 분화 과정에서 2%의 혈청을 사용한 경우 분화 효율이 증가함을 확인할 수 있었다(도 5).
- <18> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 방법으로 분화유도 되어 제공되는 세포 및/또는 이의 자손, 구체적으로는 혈관내피세포를 제공한다.
- <19> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인간 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 수용체(Flk-1)의 유전자 서열을 증합효소 연쇄반응 시키기 위한 서열번호 1 및 서열번호 2의 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트를 제공한다.
- <20> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CD31(PECAM-1) 유전자 서열을 증합효소 연쇄반응 시키기 위한 서열번호 3 및 서열번호 4의 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트를 제공한다.
- <21> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 Tie-1 유전자 서열을 증합효소 연쇄반응 시키기 위한 서열번호 5 및 서열번호 6의 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 상기 프라이머 세트들은 염색체 DNA의 증폭에 의한 오류를 방지하기 위해 서로 다른 엑손(exon) 지역에서 선정된 서열을 갖고, 증합효소연쇄반응 후에 아가로스 젤 전기영동 분석에 의해서 예견된 크기의 단일 PCR 산물만을 증폭하며, 주형의 양을 연속적으로 희석하여 얻어진 싸이클 값(threshold cycle, Ct)이 주형의 양에 따라 비례적인 값을 나타내는 프라이머 세트만을 실험적으로 선택하여 얻어진 프라이머 세트들이다. 본 발명의 상기 혈관내피세포 분화 측정용 프라이머 세트를 이용하여 실시간 증합효소연쇄반응을 수행하는 경우 인간 배아 줄기세포, 배아 암종 줄기세포 뿐만 아니라 골수를 비롯한 말초혈액, 제대혈, 뇌, 심장, 간, 지방 조직 등에서 추출한 다양한 성체 줄기세포 등에서 혈관내피세포로의 분화를 확인하고 측정하는데 사용할 수 있다.
- <22> 본 발명에 있어서, "혈관내피세포"는 혈관의 내피를 구성하는 세포를 말하는 것으로, Tie-1, Tie-2, Flk-1, PECAM-1, CD34, VE-cadherin, eNOS 등의 마커를 발현시키는 세포를 말한다.
- <23> 또한, "배상체"라 함은 인간 배아 줄기세포가 분화되어 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 3가지 배아 배엽층(germ layer)으로 이루어진 덩어리를 의미한다. 얻어진 배상체는 적당한 배지 중에서 유지될 수 있다.
- <24> 본 발명에서 사용된 용어 "배지"는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외(in vitro)에서 줄기세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 말한다. 특히, 본 발명의 배지는 혈관내피세포로의 분화를 위한 배지이다.
- <25> 본 발명의 "기본배지"는 세포가 살아가기 위해 필요한 필수적인 당, 아미노산, 물 등이 포함된 혼합물로서, 혈청, 영양 물질 및 각종 중간엽 줄기세포 성장인자를 제외한 혼합물이다. 본 발명의 기본배지는 인위적으로 합성하여 제조하여 사용하거나 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 배지는 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), EDM(Endothelial differentiation medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <26> 혈청은 동물 또는 사람의 혈액으로부터 원심분리하여 얻을 수 있는 상층액이다. 상기 혈청은 세포의 성장 시 필요한 필수 영양소 이외에 성장에 필수적이나 명확히 규명되지 않은 각종 무기염, 폴리펩타이드성 성장인자, 및 폴리펩타이드성 호르몬 등의 각종 인자를 포함하는 미량원소가 포함된다.
- <27> 구체적 양태로서, 본 발명의 배양 배지는 영양혼합물(Nutrient Mixture)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 영양 혼합물은 세포배양에 일반적으로 사용되는 각종 아미노산, 비타민, 무기염 등을 포함하는 혼합물로서, 상기 아미노산, 비타민, 무기염 등을 혼합하여 제조하거나 상업적으로 제조된 영양혼합물을 사용할 수 있다. 상업적으

로 제조된 영양혼합물은 예를 들면, F-12, M199, MCDB110, MCDB202, MCDB302 등이 있다.

- <28> 이하, 본 발명의 P19 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다. P19 배아 암종 줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화유도의 모델을 확립하기 위하여 본 발명은 하기 단계로 수행되었다.
- <29> (a) 대조군, DMSO 및 VEGF 처리 조건하에서 P19 세포의 배상체 형성 단계;
- <30> (b) 면역염색법에 의한 P19 세포의 혈관내피세포로의 분화 검증 단계;
- <31> (c) 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 혈관내피세포 마커들의 정량적 분석 단계;
- <32> (d) P19 세포의 혈관내피세포로의 분화 최적 조건 확립 단계; 및
- <33> (e) 유세포 분석을 통한 혈관내피세포로의 정량적 분화수율 분석 단계.
- <34> 본 발명자들은 P19 세포가 혈관내피세포로의 분화능을 갖고 있는가를 확인하기 위하여 먼저 내배엽, 중배엽 및 외배엽성 계통으로 세포들을 분화시키기 위하여 배상체 형성을 유도하였다. P19 세포를 0.5 - 1% (v/v) DMSO 존재 하에 세포 표면이 코팅되지 않은 세포 용기(bacterial dishes)에서 부유 상태(suspension culture)로 4 - 5 일 동안 배양하여 배상체를 형성시켰다. 형성된 배상체는 심근세포로 분화할 수 있는 중배엽성 계통의 전구세포를 포함하는 것으로 알려져 있다. 또한, 배아 및 성체 줄기세포는 VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로 분화할 수 있는 역가를 가지고 있다. 혈관내피세포는 발생학적으로 중배엽성 조직에서 유래되기 때문에 본 발명자들은 1% DMSO 존재 하에 세포 용기 표면이 코팅되지 않은 세포 용기에서 부유 상태로 4일 동안 배상체 형성을 유도하여 중배엽성 세포 계통으로 분화를 유도하였다. 다음 단계로 1% DMSO 존재 하에 형성된 배상체를 세포 표면이 코팅된 세포 배양 용기내로 옮겨 부착시킨 후에, 20ng/ml VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로의 분화를 유도하였다. 또한, 본 발명자들은 배상체 형성 단계에서 1% DMSO 대신 대조군(미첨가군), 20ng/ml VEGF를 첨가하였을 때 P19 세포의 혈관내피세포로의 분화능을 1% DMSO 처리군과 비교 분석하였다.
- <35> 본 발명에서, P19 세포를 각각 대조군, 1% DMSO 처리군 및 20ng/ml VEGF 처리군으로 나누어 4일 동안 부유 상태로 배양하여 배상체 형성을 유도하였다. 각 처리 조건하에서 형성된 배상체를 세포 배양 용기로 옮겨 부착시킨 후 20ng/ml VEGF를 첨가하여 혈관내피세포로 분화를 유도하였고, 형태적인 차이를 도립현미경하에서 조사하였다. 배상체 형성 유도 후 4일째에, 각 처리군 간의 형태적 차이를 조사한 결과 1% DMSO를 처리하여 형성된 배상체는 대조군 및 20ng/ml VEGF가 첨가된 조건하에서 형성된 배상체와 비교할 때 보다 단단하고 치밀한 구조를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 1). 반면 대조군 및 20ng/ml VEGF를 처리하여 형성된 배상체는 형태적으로 느슨하게 세포들이 결합된 것이 관찰되었고, 세포 표면이 코팅되지 않은 세포 용기를 사용하여 배상체 형성을 유도하였음에도 불구하고 세포 표면에 일부 세포들이 부착되는 것을 발견되었다(도 1).
- <36> 본 발명에서, P19 세포를 대조군, 1% DMSO 처리군 및 20ng/ml VEGF 처리군으로 나누어 4일 동안 부유 상태로 배양하여 형성시킨 배상체를 세포 배양 용기에서 20ng/ml VEGF 존재 하에 10일 동안 처리 하였을 때 혈관내피세포로의 분화가 가능한가를 조사하였다. 이를 위해 혈관내피세포 마커인 PECAM-1 항체를 사용한 면역염색법을 실시하였다. 면역염색 실시 후, 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성시킨 처리군에서는 PECAM-1 항체에 양성 반응을 나타내는 세포들을 포함하는 유사 모세혈관 구조가 관찰되었다(도 2, arrows). 반면 대조군 및 20ng/ml VEGF를 처리하여 배상체가 형성된 군에서는 유사 모세혈관 구조가 관찰되지 않았고, 일부 세포만이 PECAM-1 양성 반응을 나타내었다(도 2, arrowheads). PECAM-1 항체를 사용한 면역염색법 결과는 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성한 처리군에서 혈관내피세포로의 분화가 효과적임을 알 수 있었다.
- <37> 본 발명에서, 각 처리군 간에 혈관내피세포 마커 분자들의 mRNA 발현 차이를 정량적으로 조사하기 위하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 각 처리군 간의 혈관내피세포로의 분화 차이를 명확히 규명하기 위하여 다음과 같은 기준으로 선발된 프라이머 쌍으로 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 실시하였다. 첫째 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 프라이머 쌍은 염색체 DNA의 증폭에 의한 오류를 방지하기 위해 서로 다른 엑손(exon) 지역에서 선정된 서열을 갖는다. 둘째 중합효소연쇄반응 후에 아가로스 젤 전기영동 분석에 의해서 예견된 크기의 단일 PCR 산물만을 증폭하여야 한다(도 3). 셋째 주형의 양을 연속적으로 희석하여 얻어진 싸이클 값(threshold cycle, Ct)이 주형의 양에 따라 비례적인 값을 나타내야 한다. 상기 조건을 충족하는 GAPDH 프라이머 쌍을 선발하여 혈관내피세포 마커들의 정량적인 분석을 위해 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였고, 얻어진 Ct 값을 기준으로 각 처리군 간의 혈관내피세포 특이적 분자들의 Ct 값을 비교, 분석하였다. 그 결과 면역염색법 결과와 유사하게 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성한 처리군에서 혈관내피세포 마커들(Tie-1, Tie-2, Flk-1, PECAM-1)의 발현이 가장 높은 것을 확인하였다(도 4). 혈관내피세포 분화 9일 째에 Tie-1 및 Tie-2 mRNA의

발현은 최대치를 나타내었으며 분화가 진행될수록 감소하는 양상을 나타내었다(도 4A, 도 4B). 비록 1% DMSO 처리군에서 Tie-2의 발현이 대조군 또는 20ng/ml VEGF 처리군에 비해 조사된 모든 시점에서 높았지만, 미분화 P19 세포에서의 Tie-2 mRNA의 발현이 분화된 처리군보다 높은 것을 관찰하였다(도 4B). 또한, Tie-1 분자의 발현도 Flk-1 및 PECAM-1 분자와는 달리 미분화 P19 세포에서 상당히 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다(도 4A). 이 같은 결과는 Tie-1 및 Tie-2 분자는 혈관내피세포로의 분화뿐만 아니라 암종 줄기세포의 미분화 유지를 위해서도 중요한 기능을 함을 나타낸다.

<38> 본 발명에서, Flk-1 mRNA의 발현은 대조군, 1% DMSO, 20ng/ml VEGF 처리군에서 분화 후 5일 째에 증가하는 양상을 나타내었다(도 4C). 1% DMSO 처리군에서 Flk-1 mRNA의 발현은 혈관내피세포로 분화 처리 후 9일 째에 최대치를 나타내었으며, 그 후 발현이 조금씩 감소하는 양상을 나타내었다(도 4C). 발생과정 동안 혈액세포 또는 혈관내피세포는 중배엽 세포 계통인 혈관아세포(hemangioblast)로부터 분화되는 것으로 알려져 있다(Lugus JJ 등 2005, Immunol Res 32:57-74). Tyrosine kinase 수용체인 Flk-1 분자는 혈관아세포의 마커로 알려져 있으며 중배엽 조직에서 혈액세포 또는 혈관내피세포로 분화하는 과정 중에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Lugus JJ 등 2005, Immunol Res 32:57-74). 본 발명의 결과는 배상체 형성 과정동안 1% DMSO 처리에 의해 Flk-1을 발현하는 혈관아세포를 포함한 중배엽 계통의 세포들로 효과적으로 분화함을 추정할 수 있다.

<39> 본 발명에서, PECAM-1 mRNA의 발현은 혈관내피세포로 분화 유도 후 9일 째에 1% DMSO 처리군에서 증진되었으며, 분화 후 14일 째에 최대치에 도달하였다(도 4D). 이러한 결과는 면역염색법에 의해 1% DMSO 존재 하에 배상체가 형성된 처리군에서만 PECAM-1 항체에 양성인 유사 모세혈관 구조가 발견된 것과 일치한다. PECAM-1 분자는 혈관내피세포에서 발현이 높으며, 혈관 기능의 유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Newman PJ 1997, J Clin Invest 100:S25-S29). 이전 연구 보고들(Edward MK 등 1983, Mol Cell Biol 3:2280-2286; McBurney MW 등 1982, Nature 299:165-167)과 유사하게, 본 발명에서 P19 세포의 배상체 형성 과정 동안 DMSO 분자는 중배엽 계통으로의 세포 분화에 중요한 역할을 수행함을 확인하였다. 반면 VEGF는 미분화 P19 세포를 중배엽 세포 계통으로 분화시키는 배상체 형성 과정 시에는 혈관내피세포로의 분화 유도에 영향을 끼치지 못하고, DMSO 처리 등에 의해 중배엽 세포 계통으로 분화된 세포들을 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계에서 주요한 기능을 수행함을 알 수 있다.

<40> 본 발명에서, P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도할 수 있는 효과적인 조건을 확립하기 위하여, 배양액 조성 및 배양액내 우태아혈청 농도가 P19 세포의 혈관내피세포로의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 혈관내피세포로 분화 유도 후 각각 9일 및 14일 째에 조사하였을 때, 비록 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지는 못하였지만 Flk-1 mRNA의 발현은 고혈청 조건(10% 우태아혈청)에서 보다 저혈청 조건(2% 우태아혈청)에서 증진됨을 나타내었다(도 5A). P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 9일 째에 조사하였을 때, Flk-1 mRNA의 발현은 EDM + 10% 우태아혈청 조건에서보다 DMEM + 10% 우태아혈청 조건하에서 유의적으로 증진됨을 확인하였다(도 5A).

<41> P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 9일 째에 조사하였을 때, PECAM-1 mRNA의 발현은 두 배양액 (DMEM 및 EDM) 모두에서 10% 우태아혈청에서보다 2% 우태아혈청 조건하에서 유의적으로 증진되어졌다(그림 5B). 또한, PECAM-1 mRNA의 발현은 DMEM + 10% 우태아혈청 처리군에서 EDM + 10% 우태아혈청 처리군에 비해 높은 양상을 나타내었다(도 5B). P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 14일 째에 조사하였을 때, PECAM-1 mRNA의 발현은 DMEM + 2% 우태아혈청 처리군에서 DMEM + 10% 우태아혈청 처리군에 비해 높은 양상을 나타내었다(도 5B). 또한, PECAM-1 mRNA의 발현은 DMEM + 2% 우태아혈청 처리군에서 EDM + 2% 우태아혈청 처리군에 비해 높은 양상을 나타내었다(도 5B).

<42> 본 발명의 결과는 P19 세포를 혈관내피세포로 효과적으로 분화 유도하기 위해서는 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성하여 중배엽성 계통의 세포로 분화를 유도하는 것이 효과적임을 나타낸다. 다음 단계로 DMSO 존재 하에서 형성된 배상체를 세포 배양 용기로 옮긴 후에 20ng/ml VEGF가 첨가된 DMEM + 2% 우태아혈청 배양액에서 배양함으로써 혈관내피세포로의 분화가 효과적으로 유도됨을 보여준다. 상기 조건하에서 P19 세포가 혈관내피세포로 분화하는 비율을 정량적으로 분석하기 위하여 유세포 분석을 실시한 결과, 약 4%의 P19 세포가 PECAM-1을 발현하는 것으로 확인하였다(도 6). 비록 P19 세포의 혈관내피세포로의 분화수율이 본 발명 조건하에서 약 4% 수준을 나타내었지만, P19 세포는 배아줄기세포와 달리 유전자 도입 및 분화된 세포의 선발이 용이하고, 대량으로 배양이 가능하다는 장점을 고려할 때 체외에서 혈관내피세포로의 분화 유도 물질 규명 및 관련 기전 연구를 위한 모델로서 유용하게 이용될 수 있을 것이다. P19 세포는 레티노산 처리에 의해 약 85%의 세포가 신경세포 마커를 발현하는 것으로 보고 되었다(McBurney MW 1993, Int J Dev Biol 37:135-140). 반면 P19 세포는 DMSO 처리 및 배상체 형성에 의해 심근세포로 분화되는 비율은 약 10% - 25% 수준으로 보고 되었다(McBurney MW 1993, Int J Dev Biol 37:135-140; Skerjanc IS 1999, Trends Cardiovasc Medicine 9:139-143). 또한, 본 발명자들

이 P19 세포를 5-아자시티딘 처리에 의해 심근세포로 분화를 유도한 결과, 전체 세포 중 약 6.5%의 세포가 심근 세포 마커인 α -actinin에 양성반응을 나타내었다(Choi SC 등 2004, Exp Mol Med 36:515-523). P19 세포가 신경세포로의 분화에 비해 심근세포로의 분화 비율이 낮은 것은 신경세포로 분화될 수 있는 외배엽성 세포 계통으로의 분화는 효과적으로 이루어진 반면 심근세포로 분화될 수 있는 중배엽성 세포 계통으로의 분화 유도 조건은 효과적이지 못하였음을 나타낸다. 혈관내피세포도 중배엽성 세포 계통인 혈관아세포로부터 분화되기 때문에 P19 세포를 중배엽성 세포 계통으로 분화 유도할 수 있는 인자의 규명 및 관련 기전 연구를 통해 차후 혈관내피세포로의 분화수율을 증진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

<43> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<44> 실시예 1. P19 세포의 배양 및 배상체의 형성

<45> P19 배아 암종 세포(ATCC #CRL-1825, Rockville, MD, USA)를 DMEM(Invitrogen, Grand Island, NY, USA) + 10% (v/v) 우태아혈청 + 100 U/ml 페니실린 + 100 μ g/ml 스트렙토마이신 배지에서 배양하였다. 배상체 형성을 위해 P19 세포를 세포 용기의 표면이 코팅되지 않은 35-mm 세포 용기(BD Bioscience, Franklin Lakes, NY, USA)에 1.5×10^5 세포 농도로 접종하였다. 혈관내피세포로의 분화 유도를 위해 대조군(무첨가군), 1% (v/v) DMSO (Sigma Chemical Co., MO, USA), 또는 20 ng/ml VEGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)의 존재 하에 96 시간 동안 DMEM + 10% 우태아혈청 + 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 함유한 배양액에서 배상체 형성을 유도하였다(도 1). 각 처리군 간의 형태적 차이를 조사한 결과 1% DMSO를 처리하여 형성된 배상체는 대조군 및 20ng/ml VEGF가 첨가된 조건하에서 형성된 배상체와 비교할 때 보다 단단하고 치밀한 구조를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 1). 반면 대조군 및 20ng/ml VEGF를 처리하여 형성된 배상체는 형태적으로 느슨하게 세포들이 결합된 것이 관찰되었고, 세포 표면이 코팅되지 않은 세포 용기를 사용하여 배상체 형성을 유도하였음에도 불구하고 세포 표면에 일부 세포들이 부착되는 것을 발견되었다(도 1).

<46> 실시예 2. P19 세포의 배양 및 배상체의 형성

<47> 각 처리군에서 형성된 배상체를 용기 당 약 30 개를 선택하여 24-well 세포 용기에 접종한 후 20 ng/ml VEGF의 존재 하에 10일 동안 배양하여 혈관내피세포로 분화시켰다. 배양액의 조성 차이가 혈관내피세포로의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 처리군에서 형성된 배상체를 DMEM 또는 EDM 배양액(endothelial differentiation medium, Reyes M 등 2002, J Clin Invest 109:337-346)에서 배양하여 혈관내피세포로 분화시켰다. EDM 배양액은 60% (v/v) DMEM (Invitrogen), 40% (v/v) MCDB-201(Sigma), 5 μ g/ml 인슐린(Sigma), 5 μ g/ml 트랜스페린(Sigma), 5 ng/ml 셀레니움(Sigma), 1% (v/v) 리노레익 산(Sigma), 10^{-8} M 텍사메타손, 10^{-4} M 아스코빅 산(Sigma), 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함한다. 또한, 우태아혈청의 농도가 혈관내피세포로의 분화에 미치는 영향을 분석하기 위해 각 처리군에서 형성된 배상체를 10% 또는 2% 우태아혈청을 포함한 배양액에서 배양하였다. 혈관내피세포로의 분화 유도를 위해 20 ng/ml VEGF를 함유한 배양액은 3일마다 교환하였다.

<48> 실시예 3. 면역화학염색법에 의한 혈관내피세포로의 분화 확인

<49> 대조군(무첨가군), DMSO 및 VEGF 존재 하에서 형성된 약 30 개의 배상체를 0.1% 젤라틴 코팅된 커버슬립이 놓인 24-well 세포 용기에 접종한 후, 10% 또는 2% 우태아혈청, DMEM 또는 EDM 배양액에서 20 ng/ml VEGF를 첨가한 후 10일 동안 배양하였다. 혈관내피세포로 분화 유도 처리된 P19 세포를 4% 파라포름알데히드로 10분 고정, PBS + 0.1% Tween20(PBST) 용액으로 세정, 0.1% Triton X-100 용액으로 30분 처리, PBST 용액으로 세정, 5% 염소 혈청으로 1시간 배양, PECAM-1 항체(1:200으로 희석, BD Bioscience)를 사용하여 1시간 반응시켰다. 그 후 PBST 용액으로 세정하였고, 2차 항체인 Alexa 488을 접합한 goat anti-rat IgG 항체(1:1000으로 희석, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)와 1시간 반응시켰다. PBST 용액으로 세정, 핵 염색을 위해 DAPI 용액과 15분 반응, PBST 용액으로 세정 단계를 거친 후 형광현미경하에서 분석하였다.

<50> 그 결과 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성시킨 처리군에서는 PECAM-1 항체에 양성 반응을 나타내는 세포들을 포함하는 유사 모세혈관 구조가 관찰되었다(도 2, arrows). 반면 대조군 및 20ng/ml VEGF를 처리하여 배상체가 형성된 군에서는 유사 모세혈관 구조가 관찰되지 않았고, 일부 세포만이 PECAM-1 양성 반응을 나타내었다(도 2, arrowheads). PECAM-1 항체를 사용한 면역염색법 결과는 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성한 처리군에서 혈관내

피세포로의 분화가 효과적임을 알 수 있었다.

<51> 실시예 4. 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 혈관내피세포 마커 분자들의 발현 조사

<52> 4-1. 마커 분자들의 발현 측정

<53> 본 발명자들은 P19 세포에서 분화 유도된 혈관내피세포를 대상으로 마커들의 발현을 정량적으로 분석하기 위하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다(도 4, 도 5). 세포내 total RNA는 Trizol 용액(Invitrogen)을 사용하여 분리하였다. 0.5 μ g total RNA는 염색체 DNA를 제거하기 위하여 1U DNase(Promega, Madison, WI, USA)로 37 °C에서 20분 동안 처리하였다. 상보적인 DNA(cDNA)의 합성을 위해 0.5 μ g DNase 처리된 total RNA, 0.5 μ g random hexamers(Invitrogen), 200 U moloney murine leukemia virus 역전사효소(Invitrogen)가 포함된 20 μ l의 용액에서 37 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 총 25 μ l의 반응 용액은 iQTM SYBER Green Supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 5 μ M의 정방향 프라이머, 5 μ M의 역방향 프라이머, 0.5 μ l cDNA를 포함한다. 실시간 중합효소연쇄반응을 위해 94°C에서 3분 동안 DNA를 변성시킨 후 94°C에서 15초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 중합 반응을 45회 반복하였다.

<54> 다음과 같은 서열번호 1에서 10까지의 프라이머 쌍을 사용하여 162 bp 크기의 Flk-1, 152 bp 크기의 PECAM-1, 160 bp 크기의 Tie-1, 138 bp 크기의 Tie-2, 236 bp 크기의 GAPDH PCR산물을 각각 증폭하였다(도 3).

<56> 마우스 Flk-1 정방향 프라이머 : 5'-GGCGGTGGTGACAGTATCTT-3' (서열 1)

<57> 마우스 Flk-1 역방향 프라이머 : 5'-GTCAGTGACAGAGGCGATGA-3' (서열 2)

<58> 마우스 PECAM-1 정방향 프라이머 : 5'-AGAGACGGTCTTGTCGCAGT-3' (서열 3)

<59> 마우스 PECAM-1 역방향 프라이머 : 5'-GTCAGTGACAGAGGCGATGA-3' (서열 4)

<60> 마우스 Tie-1 정방향 프라이머 : 5'-CAGGCACAGCAGGTTGTAGA-3' (서열 5)

<61> 마우스 Tie-1 역방향 프라이머 : 5'-GTGCCACCATTTTGACACTG-3' (서열 6)

<62> 마우스 Tie-2 정방향 프라이머 : 5'-AAGCATGCCCATCTGGTTAC-3' (서열 7)

<63> 마우스 Tie-2 역방향 프라이머 : 5'-GCCTGCCTTCTTTCTCACAC-3' (서열 8)

<64> 마우스 GAPDH 정방향 프라이머 : 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (서열 9)

<65> 마우스 GAPDH 역방향 프라이머 : 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (서열 10)

<66> 그 결과 면역염색법 결과와 유사하게 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성한 처리군에서 혈관내피세포 마커들(Tie-1, Tie-2, Flk-1, PECAM-1)의 발현이 가장 높은 것을 확인하였다(도 4). 혈관내피세포 분화 9일 째에 Tie-1 및 Tie-2 mRNA의 발현은 최대치를 나타내었으며, 분화가 진행될수록 감소하는 양상을 나타내었다(도 4A, 도 4B). 비록 1% DMSO 처리군에서 Tie-2의 발현이 대조군 또는 20ng/ml VEGF 처리군에 비해 조사된 모든 시기에서 높았지만, 미분화 P19 세포에서의 Tie-2 mRNA의 발현이 분화된 처리군보다 높은 것을 관찰하였다(도 4B). 또한, Tie-1 분자의 발현도 Flk-1 및 PECAM-1 분자와는 달리 미분화 P19 세포에서 상당히 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다(도 4A). 이 같은 결과는 Tie-1 및 Tie-2 분자는 혈관내피세포로의 분화뿐만 아니라 암종 줄기세포의 미분화 유지를 위해서도 중요한 기능을 가짐을 나타낸다.

<67> Flk-1 mRNA의 발현은 대조군, 1% DMSO, 20ng/ml VEGF 처리군에서 분화 후 5일 째에 증가하는 양상을 나타내었다(도 4C). 1% DMSO 처리군에서 Flk-1 mRNA의 발현은 혈관내피세포로 분화 처리 후 9일 째에 최대치를 나타내었으며, 그 후 발현이 조금씩 감소하는 양상을 나타내었다(도 4C). 실험 결과를 통하여 배상체 형성 과정동안 1% DMSO 처리에 의해 Flk-1을 발현하는 혈관아세포를 포함한 중배엽 계통의 세포들로 효과적으로 분화됨을 추정할 수 있다.

<68> PECAM-1 mRNA의 발현은 혈관내피세포로 분화 유도 후 9일 째에 1% DMSO 처리군에서 증진되었으며, 분화 후 14일 째에 최대치에 도달하였다(도 4D). 이러한 결과는 면역염색법에 의해 1% DMSO 존재 하에 배상체가 형성된 처리군에서만 PECAM-1 항체에 양성인 유사 모세혈관 구조가 발견된 것과 일치한다. P19 세포의 배상체 형성 과정 동안 DMSO 분자는 중배엽 계통으로의 세포 분화에 중요한 역할을 수행함을 확인하였다. 반면 VEGF는 미분화 P19 세포를 중배엽 세포 계통으로 분화시키는 배상체 형성 과정 시에는 혈관내피세포로의 분화 유도에 영향을 끼치

지 못하고, DMSO 처리 등에 의해 중배엽 세포 계통으로 분화된 세포들을 혈관내피세포로 분화 유도하는 단계에서 주요한 기능을 수행함을 알 수 있다.

<69> 4-2. 혈관내피세포로의 분화 시 혈청 농도 변화에 의한 마커 분자들의 발현량 변화

<70> 실시예 2에 기재된 바와 같이 각각 10% 및 2% 우태아혈청을 포함한 배양액에서 배양하여 분화 유도된 혈관내피세포를 대상으로 실시예 4-1과 같은 조건으로 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

<71> 혈관내피세포로 분화 유도 후 각각 9일 및 14일 째에 조사하였을 때, 비록 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지는 못하였지만 Flk-1 mRNA의 발현은 고혈청 조건(10% 우태아혈청)에서 보다 저혈청 조건(2% 우태아혈청)에서 증진됨을 관찰하였다(도 5A). P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 9일 째에 조사하였을 때, Flk-1 mRNA의 발현은 EDM + 10% 우태아혈청 조건에서보다 DMEM + 10% 우태아혈청 조건하에서 유의적으로 증진됨을 확인하였다(도 5A).

<72> P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 9일 째에 조사하였을 때, PECAM-1 mRNA의 발현은 두 배양액 (DMEM 및 EDM) 모두에서 10% 우태아혈청에서보다 2% 우태아혈청 조건하에서 유의적으로 증진되었다(그림 5B). 또한, PECAM-1 mRNA의 발현은 DMEM + 10% 우태아혈청 처리군에서 EDM + 10% 우태아혈청 처리군에 비해 높은 양상을 나타내었다(도 5B). P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 14일 째에 조사하였을 때, PECAM-1 mRNA의 발현은 DMEM + 2% 우태아혈청 처리군에서 DMEM + 10% 우태아혈청 처리군에 비해 높은 양상을 나타내었다(도 5B). 또한, PECAM-1 mRNA의 발현은 DMEM + 2% 우태아혈청 처리군에서 EDM + 2% 우태아혈청 처리군에 비해 높은 양상을 나타내었다(도 5B).

<73> 상기 결과는 P19 세포를 혈관내피세포로 효과적으로 분화 유도하기 위해서는 1% DMSO 존재 하에 배상체를 형성하여 중배엽성 계통의 세포로 분화를 유도하는 것이 효과적임을 나타낸다. 다음 단계로 DMSO 존재하에서 형성된 배상체를 세포 배양 용기로 옮긴 후에 20ng/ml VEGF가 첨가된 DMEM + 2% 우태아혈청 배양액에서 배양함으로써 혈관내피세포로의 분화가 효과적으로 유도됨을 보여준다.

<74> 실시예 5. 유세포분석에 의한 혈관내피세포로의 정량적 분화 확인

<75> 대조군(무첨가군), DMSO 및 VEGF 존재하에서 형성된 약 30 개의 배상체를 0.1% 젤라틴 코팅된 커버슬립이 놓인 24-well 세포 용기에 접종한 후 10% 또는 2% 우태아혈청, DMEM 또는 EDM 배양액에서 20ng/ml VEGF를 첨가한 후 10일 동안 배양하였다. 유세포 분석을 위해 혈관내피세포로 분화 유도된 P19 세포를 0.25% trypsin-EDTA(Invitrogen) 용액을 사용하여 개개의 세포로 분리한 후 2% 파라포름알데히드로 10분 고정, PBS + 2% 우태아혈청용액으로 2회 세정, PECAM-1 항체(1:100으로 희석, BD Bioscience)를 사용하여 30분 동안 반응, PBS + 2% 우태아혈청용액으로 2회 세정, 2차 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-접합된 goat anti-rat IgG 항체(1:1000으로 희석, Delta Bioscience, Monchengladbach, Germany)와 30분 반응, PBS + 2% 우태아혈청용액으로 2회 세정 후 유세포분석기(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)에서 약 10,000개의 세포를 분석하였다(도 6).

<76> 실시예 6. 통계 분석

<77> Student's t-test에 의해 통계 값을 분석하였으며, 각 처리군 간의 평균값이 신뢰수준 5% 보다 작은 값($p < 0.05$)을 나타낼 때 통계적으로 유의성이 있다고 표현하였다. 통계 수치는 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 표시하였다.

산업이용 가능성

<78> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 배아 암종 줄기세포가 혈관내피세포로의 분화능을 가지고 있음을 처음으로 규명한 의미를 갖는다. 배아 암종 줄기세포는 유전자 도입의 용이성, 세포 배양의 용이성, 저 비용으로 대량 배양이 가능한 장점을 가지고 있기 때문에 본 발명에서 확립된 배아 암종 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도법은 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 기전 연구에 크게 기여할 것으로 생각된다.

<79> 본 발명에서 개발된 조건을 이용하여 배아 암종 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시킨 후에 유세포 분석에 의해 혈관내피세포로 분화한 세포만을 선별하여 하지허혈(hind limb ischemic), 급성 심근경색(acute myocardial infarction) 또는 허혈성 뇌혈관 질환(ischemic cerebrovascular diseases) 동물모델내로 이식함으로써 세포 치료 연구에도 적용될 수 있을 것이다.

<80> 또한, 배아 암종 줄기세포는 배아 암종 조직에서 확립된 세포 계통이기 때문에 종양 조직의 혈관 신생성을 차

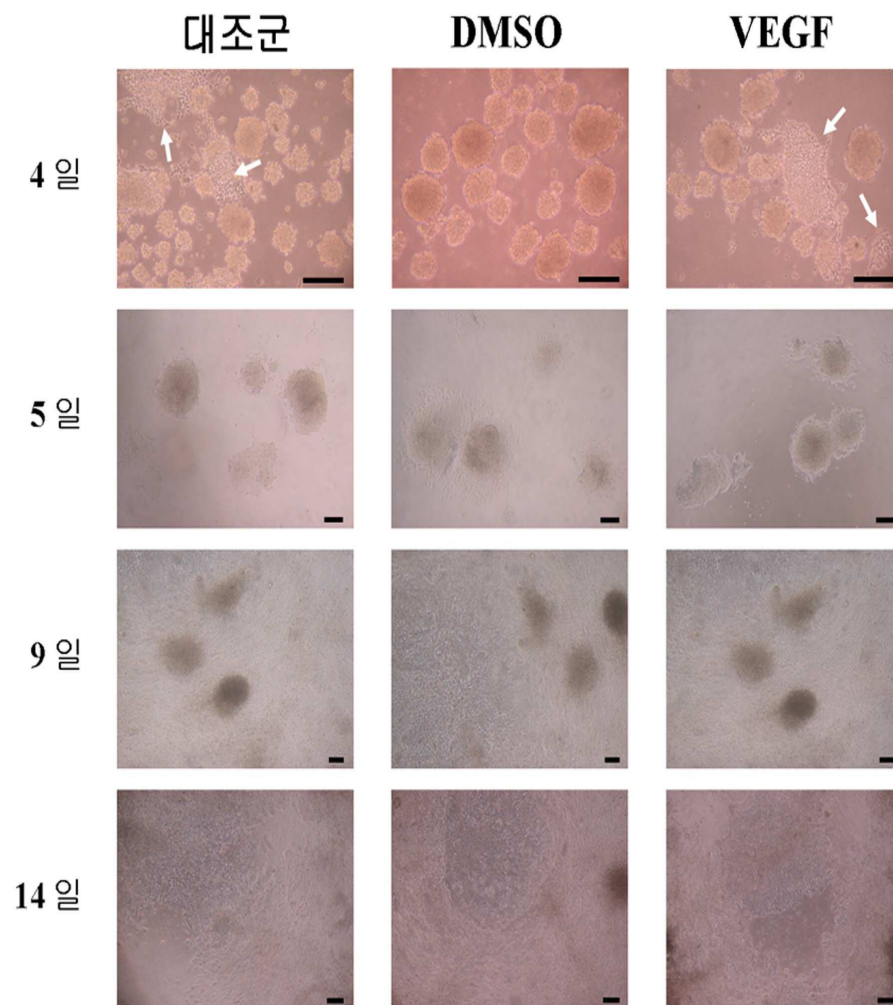
단할 수 있는 분자 및 관련 기전 연구를 통해 신생혈관 억제와 관련된 항암제 개발 연구에도 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

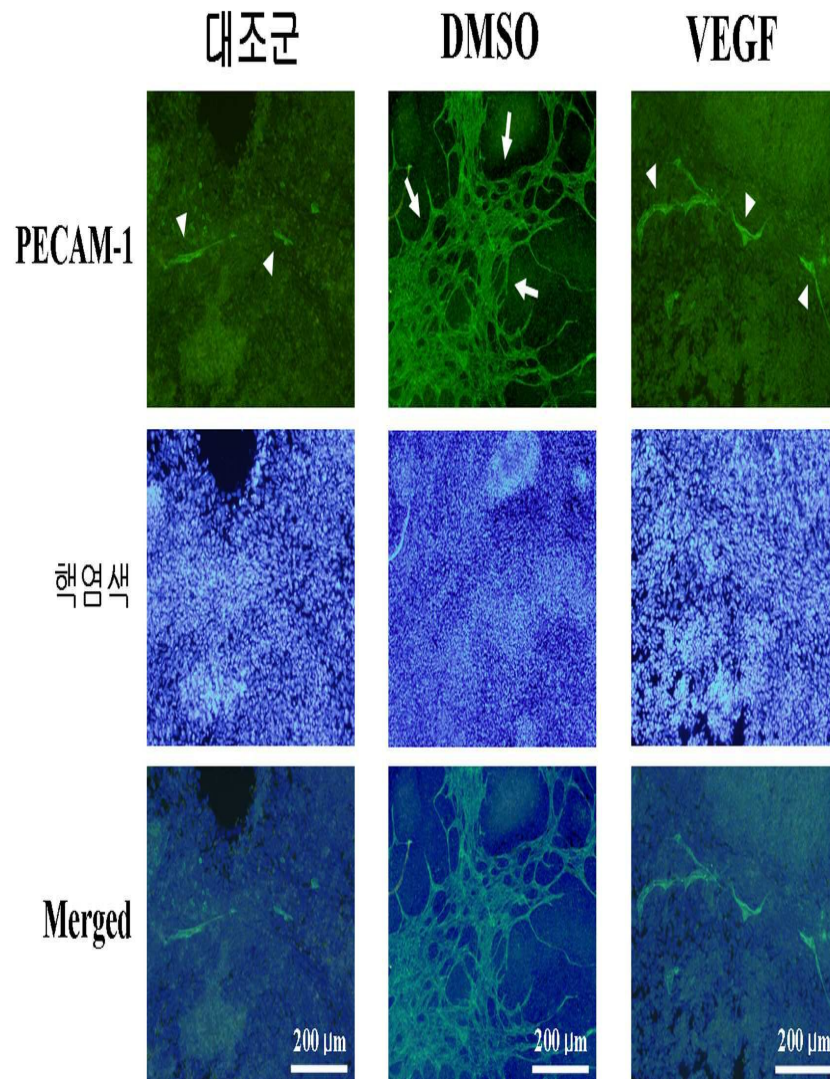
- <81> 도 1은 P19 세포를 대조군, DMSO 또는 VEGF 존재하에 배상체를 형성시킨 후, 각 처리 조건하에서 형성된 배상체를 20ng/ml VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로 분화 유도 후 도립현미경하에서 형태적 변화를 기록한 것이다 (Scale bars = 200 μ m).
- <82> 도 2는 대조군, DMSO 또는 VEGF 처리 조건하에서 P19 세포를 혈관내피세포로 분화 유도 후 혈관내피세포 마커인 PECAM-1 항체를 사용한 면역염색법에 의해 혈관내피세포로의 분화를 확인한 것이다. 이차항체로서 Alexa 488을 사용하였으며, DAPI 염색에 의해 핵을 가시화하였다.
- <83> 도 3은 P19 세포를 DMSO 존재하에 배상체를 형성시킨 후, 형성된 배상체를 20ng/ml VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로 분화 유도후에 혈관내피세포 마커들의 프라이머 쌍을 사용한 중합효소연쇄반응을 실시하여 예측된 크기의 단일 PCR 산물을 확인한 것이다[레인 1: 100 bp DNA 래더 마커, 레인 2: Flk-1 PCR 산물(162 bp), 레인 3: PECAM-1 PCR 산물(152 bp), 레인 4: Tie-1 PCR 산물(160 bp), 레인 5: Tie-2 PCR 산물(138 bp)].
- <84> 도 4는 P19 세포를 대조군, DMSO 또는 VEGF 존재하에 배상체를 형성시킨 후에 각 처리조건에서 형성된 배상체를 20ng/ml VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로 분화를 유도한 것이다. 혈관내피세포 마커들인 Tie-1(A), Tie-2(B), Flk-1(C), PECAM-1(D)의 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 각 처리구 간의 혈관내피세포 마커들의 mRNA의 발현을 정량적으로 비교하기 위해 GAPDH의 발현 양을 기준으로 Ct(threshold cycle)값을 측정하였다.
- <85> 도 5는 P19 세포를 DMSO 존재하에 형성된 배상체를 배양액 조성 또는 우태아혈청농도가 다른 조건에서 20ng/ml VEGF 처리에 의해 혈관내피세포로의 분화를 유도한 후 Flk-1(A) 또는 PECAM-1(B) 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 것이다. 각 처리구 간의 혈관내피세포 마커들의 mRNA의 발현을 정량적으로 비교하기 위해 GAPDH의 발현 양을 기준으로 Ct(threshold cycle)값을 측정하였다.
- <86> 도 6은 P19 세포를 DMSO 존재하에 배상체 형성을 유도한 후, 형성된 배상체를 2% 우태아혈청과 20ng/ml VEGF를 포함하는 DMEM 배양액에서 혈관내피세포로의 분화를 유도한 후 유세포 분석을 통해 혈관내피세포로 분화된 세포의 비율을 분석한 것이다. (A) 4번의 반복 실험 중 한 예를 나타낸 것이다. (B) PECAM-1 양성 반응을 나타내는 세포의 비율은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

도면

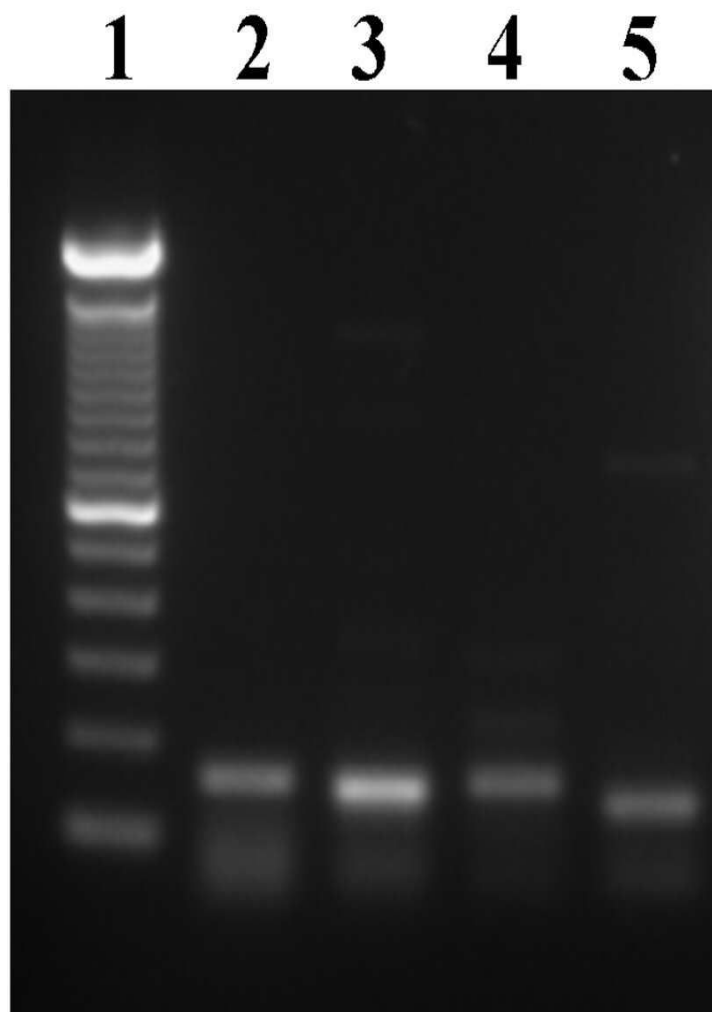
도면1



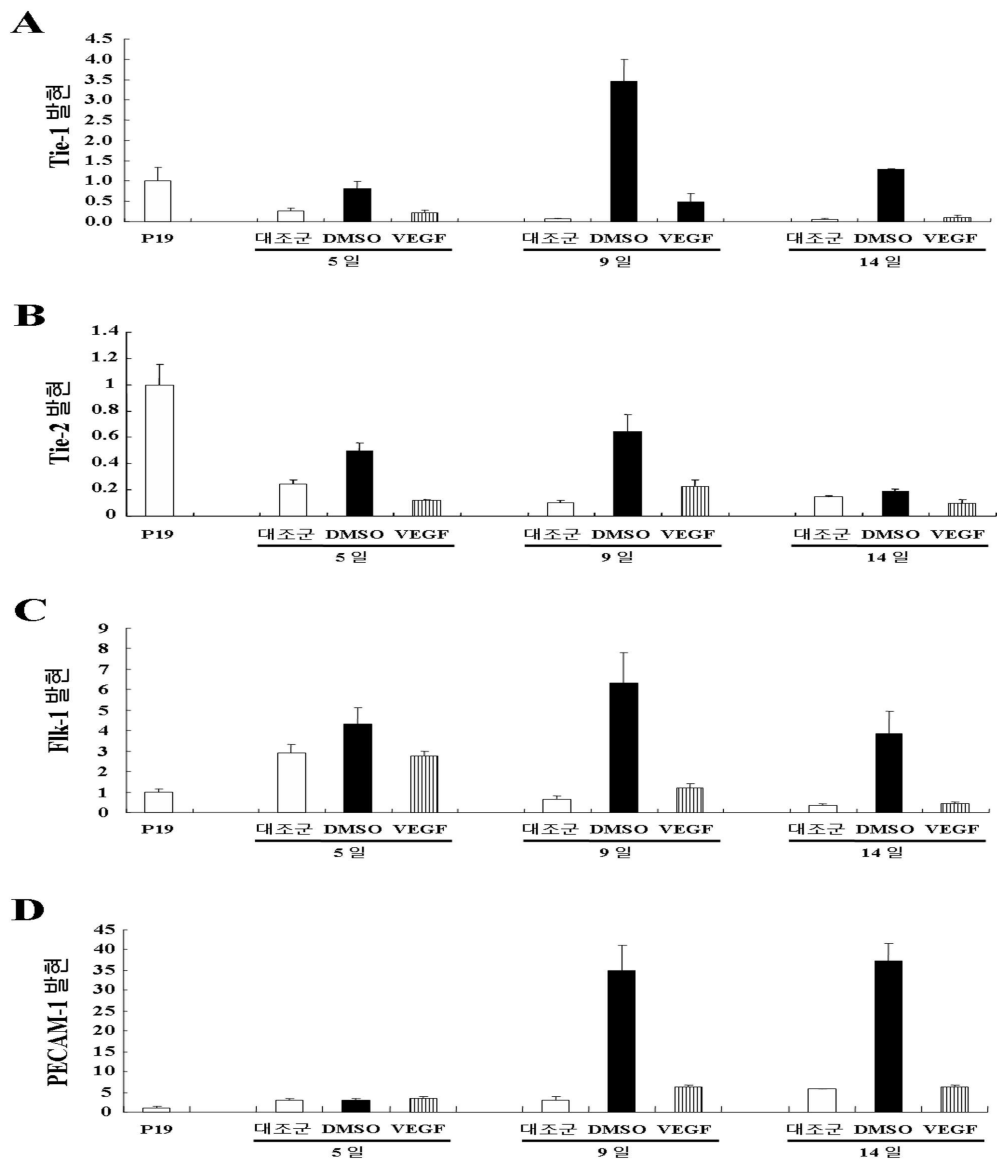
도면2



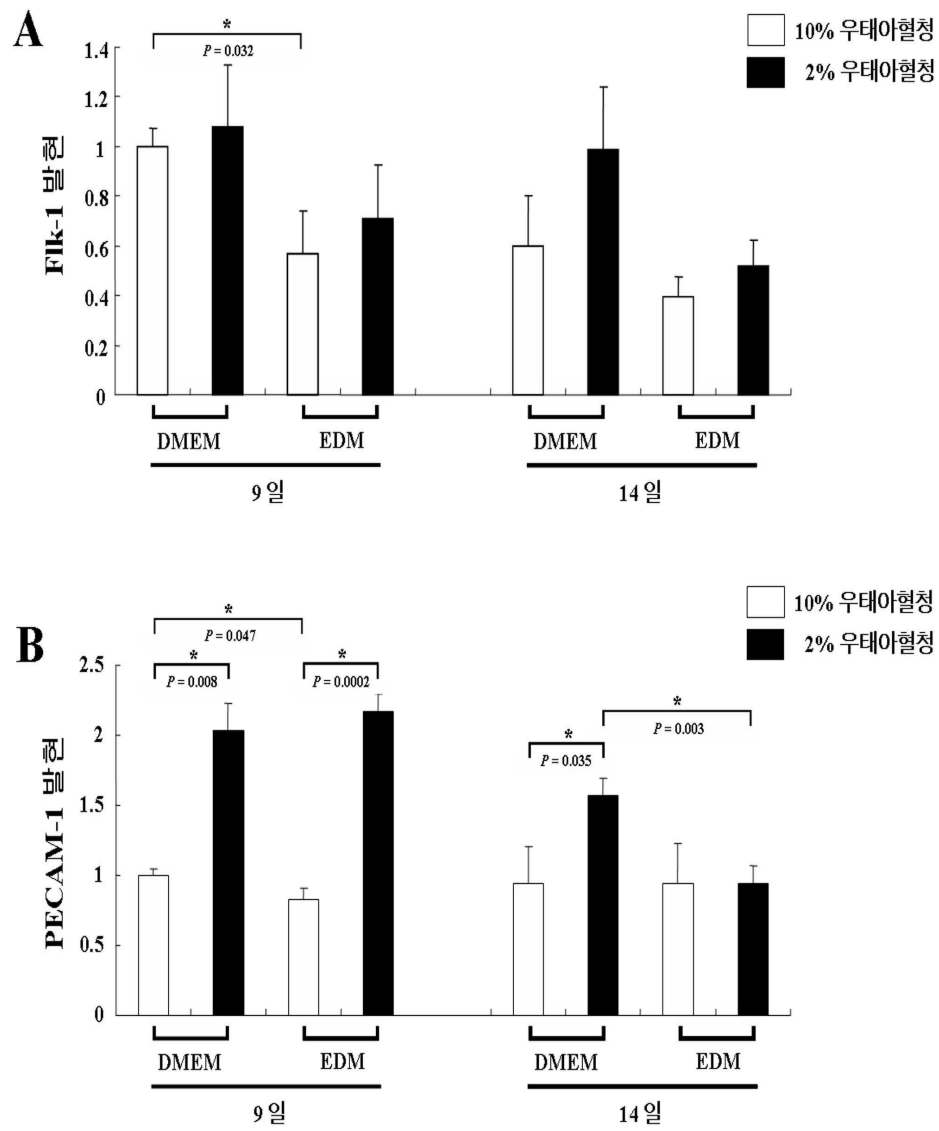
도면3



도면4

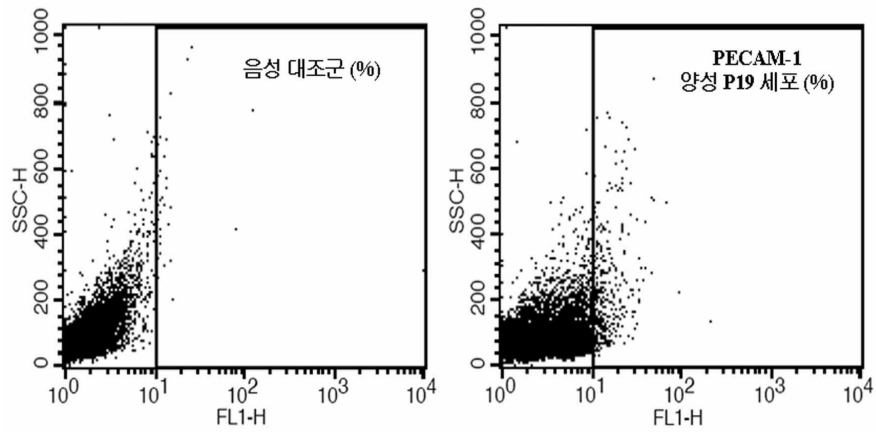


도면5

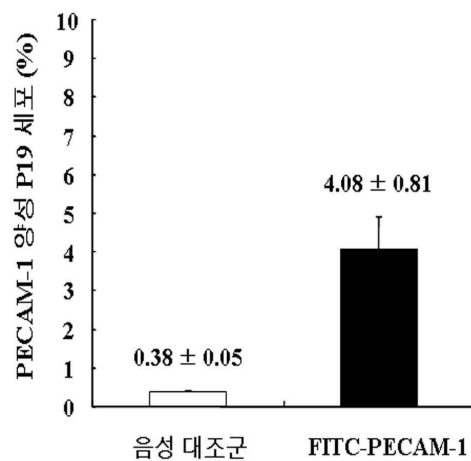


도면6

A



B



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> The potential of embryonal carcinoma cells as a new model system for endothelial cell differentiation
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 1
ggcgggtggtg acagtatctt 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 2
gtcactgaca gaggcgatga 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 3
agagacggtc ttgtcgagt 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 4

gtcactgaca gaggcgatga

20

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

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 5
 caggcacagc aggttgtaga

20

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

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 6
 gtgccaccat ttgacactg

20