(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[8]
C12N 5/08 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0016132
(43) 공개일자 2006년02월21일

(21) 출원번호 10-2006-0009930
(22) 출원일자 2006년02월02일

(71) 출원인 김병수
서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

(72) 발명자 김병수
서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

심사청구 : 있음

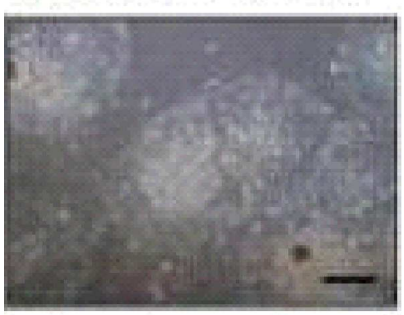
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 SC2220
부처명 과학기술부
연구사업명 뉴프론티어 세포응용연구사업
연구과제명 Telomerase 조절 및 인간유래지지세포를 이용한 줄기세포증식조절 신기술 개발
주관기관 세포응용연구사업단
연구기간 2005년 4월 1일-2008년 3월 31일

(54) 인간 배아줄기세포 증식 측진 인간 골수기질세포 생산 및인간 배아줄기세포 증식배양 기술

요약

본 발명은 인간 배아 줄기세포의 증식배양을 위한 지지세포(feeder cells)로 인간 골수기질세포(human bone marrow stromal cells)를 적용시키는 기술에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 배아 줄기세포을 위한 지지세포로 인간 골수기질세포를 사용한 경우 그 증식배양 효율은 양호함을 증명함으로써 인간 배아줄기세포 증식배양을 위하여 인간 골수기질세포를 적용시키는 본 기술은 인간 배아 줄기세포 증식배양 산물들의 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

대표도



색인어

인간골수기질세포, 인간배아줄기세포, 증식배양

명세서

도면의 간단한 설명

도 1: 인간 골수기질세포의 모습 (X 40) (위: V9 염색, 아래: 지방세포 분화)

도 2: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 증식배양효율

도 3: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 면역화학염색 모습 (X 40) (위부터 아래로, ATPase, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80)

도 4: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 OCT-4 발현 양상

도 5: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 염색체 모습

도 6: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 유전자 지문 모습

도 7: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 Teratoma 형성 모습 (내배엽)

도 8: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 Teratoma 형성 모습 (내배엽)

도 9: 인간 골수기질세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 Teratoma 형성 모습 (내배엽)

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 배아 줄기세포의 증식배양을 위한 지지세포(feeder cells)로 인간 골수기질세포(human bone marrow stromal cells)를 적용시키는 기술에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 배아 줄기세포을 위한 지지세포로 인간 골수기질세포를 사용한 경우 그 증식배양 효율은 양호함을 증명함으로써 인간 배아줄기세포 증식배양을 위하여 인간 골수기질세포를 적용시키는 본 기술은 인간 배아 줄기세포 증식배양 산물들의 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

인간 배아 줄기세포는 내배엽, 중배엽, 외배엽 분화가 모두 가능한 전분화능(totipotency)을 지니고 있기 때문에 난치병 치료를 위한 중요한 연구대상으로 현재 주목을 받고 있다. 그런데, 현재까지 이와 같은 배아 줄기세포의 증식배양을 위한 지지세포로 쥐 등의 동물에서 유래된 기질세포들이 사용되어 왔으며, 이는 인간 배아 줄기세포 증식배양 산물의 실제 임상적용을 어렵게 하는 요인으로 작용하고 있는 실정이다. 그러므로, 인간 배아 줄기세포의 증식배양을 위하여 인간 유래 기질세포를 적용하는 기술 개발이 필요하며 이에 관련된 연구 및 기술 개발이 전세계적으로 진행이 되고 있다..

본 기술 또한 인간 배아 줄기세포의 증식배양을 위하여 적용 가능한 인간 유래 기질세포를 탐색하는 과정에서 개발된 것으로, 본 발명과 같이 인간 배아 줄기세포의 증식, 배양을 위하여 인간 태반기질세포를 적용하여 그 효과를 증명한 내용은 아직 국내적으로 보고되거나 개발된 바 없었다.

현재, 인간 배아 줄기세포의 증식배양은 쥐의 섬유아세포(fibroblast) 및 이를 세포주(cell line)으로 확립한 STO 세포 등 동물 유래 기질세포와의 복합배양 기법을 근간으로 하고 있다.

본 기술은 1998년 인간 배아 줄기세포의 증식 배양이 처음으로 발명된 1998 년 Thomson 등에 의하여 보고된 바 이후 현재까지 표준기술로 자리매김을 하고 있으나 이는 연구목적일 경우에는 모르겠으나 직접 인체에 적용을 하기 위한 목적으로 사용하기에는 문제(인간 배아 줄기세포와 동물 기질세포의 상호 작용 속에서 유전자적으로 변형된 인간 배아 줄기세포의 생산, 동물 유래 병원균의 침범 등)가 있을 수 있다고 여겨진다.

이에 인간 유래 지지세포를 개발하고자 하는 여러 연구(피하 섬유아세포, 자궁내막, 우방 기질세포 등)들이 있었으나 아직 대중적으로 상용화할 수 있는 기술이 개발되지 못하고 있는데, 그 이유는 현재까지 개발된 기술이 다음의 요건을 만족시키지 못하고 있기 때문이다.. 우선 인간 유래 지지세포를 공급하는 사람은 정상인이어야 하고 그 채집과정 중에 심각한 문제를 제공자에게 일으키지 말아야 한다. 또한 인간 유래 지지세포의 공급이 충분하면서도 원활하여야 할 뿐만 아니라 비용-효과 면에서도 적절하여야 한다.

본 출원인 등은 인간 배아 줄기세포 및 그 산물을 인간 유래 지지세포와 복합 배양하는 기술을 꾸준히 개발하고 있으며 인간 배아 줄기세포로부터 비롯한 배아체를 인간 골수기질세포와 복합배양하여 조혈모세포의 생산효율이 쥐 유래 기질세포에 비견할 만큼 효과적이었음을 증명한 결과를 국외내 저명학술지에 발표한 바 있었다 (김석진 등, 2004, Kim SJ *et al*, 2005).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 기술개발의 목적은 정상 골수공여자로부터 골수채집 시 제공자에 해가 없이 채집 가능하면서 추가적 비용 없이 충분한 공급이 가능한 인간 골수기질세포를 지지세포로 이용하여 인간 배아 줄기세포의 증식배양 효과가 동물 유래 지지세포와 비견됨을 증명함으로써 보다 안전하고 효율적으로 인체에 적용할 수 있는 인간 배아 줄기세포 증식배양 기술을 개발함에 있다. 이를 위하여 출원인 등은 인간 골수기질세포를 지지세포 적용한 인간 배아 줄기세포의 증식배양을 시도하면서 그를 쥐 유래 STO 세포를 지지세포로 증식배양한 인간 배아줄기세포와 비교하고 면역화학염색, RT-PCR, 그리고 염색체, 유전자 지문 분석 등을 통하여 증명하였다.

본 기술 발명은 인간 배아 줄기세포의 증식배양 산물을 실제 인간의 세포치료를 위하여 매우 유용하게 응용될 수 있다.

발명의 구성 및 작용

본 기술은 인간 배아줄기세포의 증식배양을 위한 인간 골수 기질세포의 정제 생산 및 그의 인간 배아 줄기세포 복합배양 적용 등 크게 2단계로 이루어 진다.

채집된 인간 골수 기질세포(human stromal cell)를 1,500 cGy의 방사선을 조사하고 well 에서 24 시간 배양한 후 well 의 바닥에 지지세포층이 형성되면 배양된 인간 배아줄기세포를 첨가하여 배양을 시행한다. 이 때 배지 및 배양기법은 아래와 같다. 인간 골수 기질세포들이 올바르게 정제, 분리되었는지를 확인하기 위하여 중간엽세포(mesenchymal cells)의 증명을 위한 V9 면역화학염색 및 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)의 증명을 위한 지방세포(adipocyte)분화 배양을 실시한다. 본 과정을 통하여 확립된 인간 태반기질세포의 현미경적 모습(X40), V9 면역화학염색 모습(X40), 그리고 지방세포 분화 배양 모습(X40)은 도1과 같다.

본 출원인은 과학기술부 세포응용사업단에서 공인한 배아줄기세포주인 SNUhES-3 (46 X,Y)를 사용하며 그 배양기법은 다음과 같다. 우선 SNUhES-3 인간 배아 줄기세포의 배양을 위하여 약 150-300 세포 정도로 구성된 인간 배아 줄기세포 종괴(clump)를 쥐 배아 섬유아세포로 이루어진 지지세포(STO cell, ATCC, USA) 위에 접종한다. 접종된 인간 배아 줄기세포를 DMEM/F-12(GIBCO, USA), 20% Knockout SR(GIBCO, USA), 0.1 mM nonessential amino acid(GIBCO, USA), 0.1 mM β- mercaptoethanol(Sigma, USA), 100 U/ml penicillin G(Sigma, USA), 100 g/mL streptomycin((Sigma, USA), 4 ng/mL recombinant human βFGF(invitrogen, USA)으로 구성된 인간 배아 줄기세포 배양액을 well 당 0.8 mL 를 첨가하여 37℃, 5% CO_2, 습도 95%의 조건에서 배양한다. 배양 48 시간 후 인간 배아 줄기세포가 지지세포 위에 정착하였음을 확인한 후 배양용기로부터 배양액을 제거하고 serum 이 제거된 인간 배아 줄기세포 배양액으로 세척한 다음 다시 인간 배아 줄기세포 배양액을 well 당 0.8 mL 를 첨가한다. 이러한 과정으로 배양액을 48시간마다 교환하였다. 약 6-7 일이 경과하면 인간 배아 줄기세포 종괴가 커지면서 내부에서는 분화가 발생하기 시작하기 때문에 지속적인 현미경 육안 관찰을 통하여 종괴의 크기가 충분히 커지고 내부에서 분화가 시작되는 증거가 관찰되면 미분화된 인간 배아 줄기세포 종괴를 물리적인 방법으로 분리하여 다시 계대배양을 시행한다. 인간 배아줄기세포의 증식배양을 위하여 인간 골수 기질세포를 사용한 경우에는 쥐 배아 섬유아세포 대신 인간 골수기질세포를 대신 사용하였을 뿐 나머지 기법은 모두 동일하다. 인간 골수기질세포를 지지세포로 사용하여 배양한 인간 배아줄기세포의 모습은 요약서의 대표도와 같다.

인간 배아줄기세포의 배양을 위한 지지세포로 쥐 배아 섬유아세포와 본 특허 출원대상인 인간 골수기질세포와의 인간 배아줄기세포 증식배양효율을 비교, 분석한다. 그 결과 10 회의 계대배양까지 인간 태반기질세포를 지지세포로 사용한 인간 배아줄기세포의 증식배양 효과가 쥐 배아 섬유아세포를 지지세포로 사용한 인간 배아 줄기세포의 증식배양 효과에 비견할 만 함을 확인할 수 있었다 (도 2)

그리고 배양된 인간배아 줄기세포의 성상 유지 확인을 위하여 ALP, SSEA, TRA 면역화학염색과 RT-PCR 기법을 통한 강력한 Oct-4 발현을 관찰함으로써 인간 배아줄기세포의 성상을 유지하고 있음을 확인한다. 그 결과 인간 골수기질세포를 지지세포로 사용한 인간 배아줄세포의 ALP, SSEA, TRA, Oct-4 모두 발현됨을 확인함으로써 인간 배아 줄기세포의 성상을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. (도3,4) 또한 본 기술의 염색체 및 유전자적 안정성을 확인하기 위하여 시행한 염색체 karyotype 및 유전자 지문 DNA finger print 검사를 시행한다. 그 결과 모두 정상임을 확인함으로써 염색체 및 유전자적으로도 본 기술이 안전함을 확인할 수 있었다. (도 5,67). 마지막으로 인간 골수 기질세포에 배양된 인간 배아줄기세포를 SCID 쥐에 피하주사한 후 8-12주 후에 형성된 Teratoma를 조직검사한다. 그 결과 내배엽, 중배엽, 외배엽 모두 확인할 수 있었다. (도 7,8,9) 이는 인간 골수기질세포와 복합배양된 인간 배아줄기세포의 성상이 잘 유지되고 있음을 증명한다.

이하, 본 발명을 실시 예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시 예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 인간 배아줄기세포 배양 지지세포로 인간 골수기질세포 제조 및 배양 기술

본 발명은 인간 배아 줄기세포의 증식배양을 위한 지지세포로의 역할을 수행할 수 있는 인간 골수기질세포를 제조하기 위한 기술에 관한 것이다.

우선 인간 유래지지세포로 사용하는 정상 골수는 채집 후 원심분리(1200 cGY) 등을 통하여 이물질을 제거한 후 채집된 세포들을 dPBS에 3번 washing하고 배양용기(culture dish)에 넣고 DMEM 배양액을 2일에 한번 교체해주며 일주일간 배양한다. 배양용기 벽이 붙어서 자라나온 골수 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 계대 시행 위해 새로운 배양용기에서 배양한다. 이렇게 만들어진 태반 세포는 mitomycin-C를 처리하여 배양 지지세포로 사용하고 나머지는 계대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장한다. 인간 골수 지지세포 준비는 배양 하루 전에 이루어진다. 인간 골수 기질세포(human stromal cell)를 1,500 cGy의 방사선을 조사하고 well 에서 24 시간 배양한 후 well 의 바닥에 지지세포층이 형성되면 배양된 인간 배아줄기세포를 첨가하여 배양을 시행한다. 인간 골수 기질세포들이 올바르게 정제, 분리되었는지를 확인하기 위하여 중간엽세포(mesenchymal cells)의 증명을 위한 V9 면역화학염색 및 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)의 증명을 위한 지방세포(adipocyte)분화 배양을 실시한다. (도1) 그리고 인간 골수 기질세포에 복합배양된 인간 배아줄기세포의 복합배양 모습을 관찰한다. 그 결과 인간 골수기질세포가 V9염색에 양성이고 지방세포로의 분화가 됨을 확인함으로써 인간 골수기질세포의 정제, 분리가 양호하였음과 인간 골수기질세포와 복합배양되는 인간 배아줄기세포의 colony 모양이 쥐 배아 섬유아세포의 그 것과 차이가 없음을 관찰함으로써 인간 골수기질세포가 인간 배아줄기세포의 지지세포로 양호한 기능을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

실시예 2: 인간 골수기질세포와 복합배양된 인간 배아줄기세포의 증식배양 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 골수기질세포와 인간 배아줄기세포와의 복합배양시 인간 배아줄기세포의 증식배양 촉진 효과를 증명하기 위하여 쥐 배아 섬유아세포와 복합배양한 인간 배아줄기세포의 경우와 증식배양 colony 수를 비교하여 분석하였으며 본 실험은 총 7회 반복되었다..

그 결과 계대배양 10회까지 지지세포로서의 두께도 인간 배아줄기세포로의 배양에 적합하게 유지되면서. 배양용기 당 평균 colony 수는 87.6(효율; 66%)로 쥐 배아 섬유아세포의 178.1(효율: 78%)보다 낮기는 하나 양호하게 유지됨을 확인할 수 있었다. (도 2)

실시예 3: 인간 골수기질세포와 복합배양된 인간 배아줄기세포의 성상 유지 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 골수기질세포와 인간 배아줄기세포와의 복합배양시 인간 배아줄기세포의 성상 유지 확인을 위하여 ALP, SSEA, TRA 면역화학염색과 Oct-4 발현을 PCR 기법을 통하여 인간 배아줄기세포의 성상을 유지하고 있음을 확인하였다.

그 결과 인간 골수기질세포를 지지세포로 사용한 인간 배아줄기세포의 ALP(AP ase) 염색에서 강양성, SSEA 염색에서 SSEA-4 강양성, SSEA-1 음성, TRA 염색에서 TRA-1-81과 TRA-1-60에서 강양성을 보이고 Oct-4이 강력히 발현됨을 관찰함으로써 인간 배아 줄기세포의 성상을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. (도 3,4)

실시예 4: 인간 골수기질세포와 복합배양된 인간 배아줄기세포의 염색체, 유전자 적 안정성 유지 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 골수기질세포와 인간 배아줄기세포와의 복합배양시 인간 배아줄기세포의 염색체, 유전자 적 안정성 유지 확인을 위하여 염색체 karytype 분석과 DNA finger printing 검사(9 short tandem repeat (STR) loci D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S137, D18S51, D21S11, FGA, and VWA)를 실시하였다.

그 결과 인간 골수기질세포를 지지세포로 사용한 인간 배아줄기세포의 경우 정상적인 46XY 소견을 보이고 있고 DNA finger printing 검사에서도 기존의 양상과 일치되는 소견을 관찰함으로써 염색체 및 유전자 적으로 안전하게 증식배양되었음을 확인할 수 있었다. (도 5,6)

실시예 5: 인간 골수기질세포와 복합배양된 인간 배아줄기세포의 Teratoma 형성 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 태반기질세포와 인간 배아줄기세포와의 복합배양시 인간 배아줄기세포의 Teratoma 형성 확인을 위하여 SCID 쥐에 배양된 인간 배아줄기세포의 피하 주사를 실시 후 8-12 주 후에 내배엽, 중배엽, 외배엽의 존재를 조직검사를 통하여 확인하였다.

그 결과 형성된 Teratoma 내에 내배엽(도 7), 중배엽(도 8), 외배엽(도 9)의 존재를 공히 확인할 수 있었고 이는 인간 골수기질세포에서 배양된 인간 배아줄기세포가 온전함으로 증명한다.

발명의 효과

본 발명으로 정상 인간 골수기질세포가 인간 배아줄기세포의 증식배양을 위한 지지세포로 역할을 할 수 있음을 확인할 수 있다. 상기 인간 골수기질세포는 기존 기술인 쥐 배아 섬유아세포를 이용하는 경우보다 안전하게 인체에 적용할 수 있는 인간 배아줄기세포를 생산할 수 있으리라고 기대된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

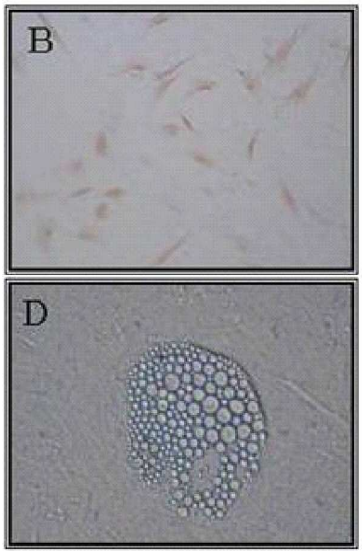
인간 배아줄기세포 증식배양을 위한 인간 골수기질세포의 생산

청구항 2.

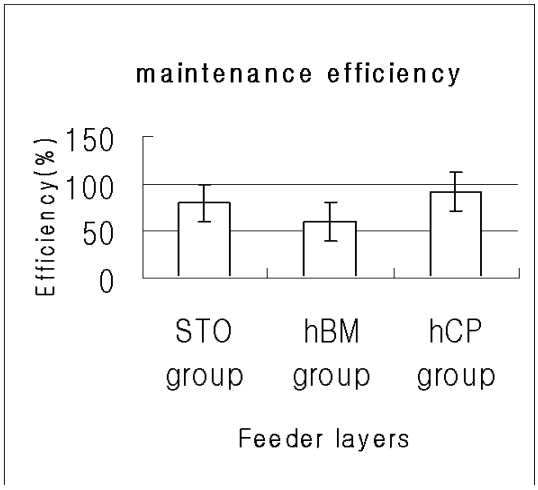
인간 골수기질세포를 이용한 인간 배아줄기세포의 증식배양

도면

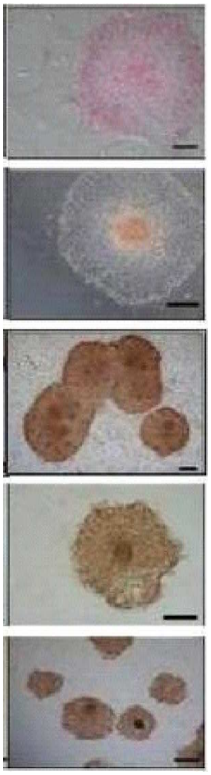
도면1


B
D

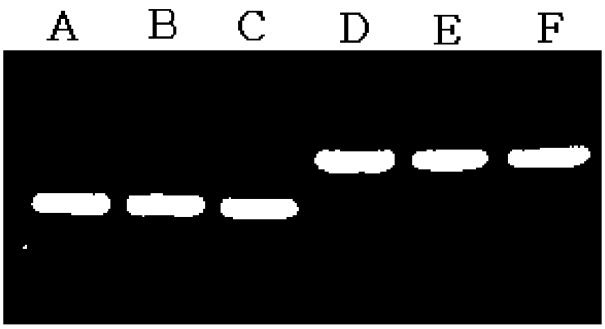
도면2


maintenance efficiency
Efficiency(%)
150
100
50
0
STO group
hBM group
hCP group
Feeder layers

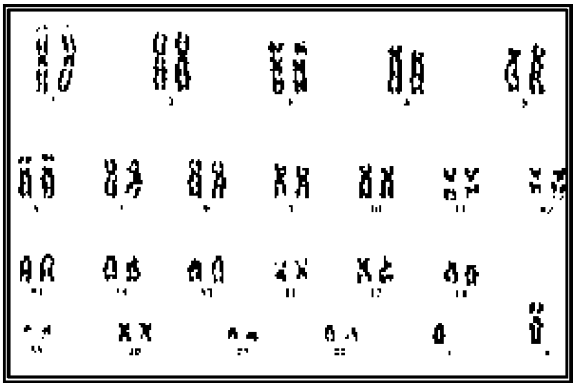
도면3



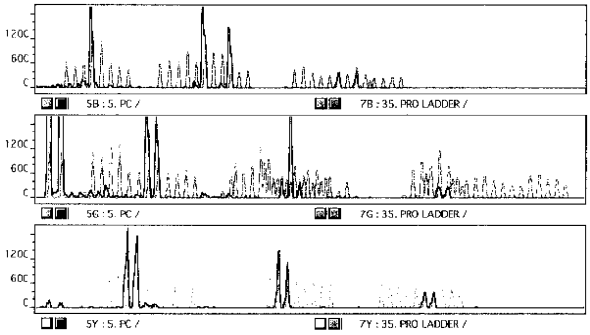
도면4



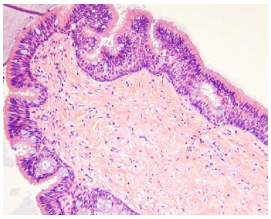
도면5



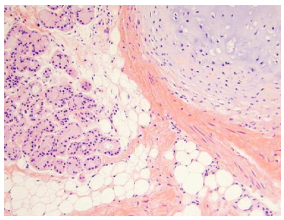
도면6



도면7



도면8



도면9

