(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

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

(11) 공개번호 10-2006-0016133
(43) 공개일자 2006년02월21일

(21) 출원번호 10-2006-0009934
(22) 출원일자 2006년02월02일

(71) 출원인 김병수
서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

(72) 발명자 김병수
서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

심사청구 : 있음

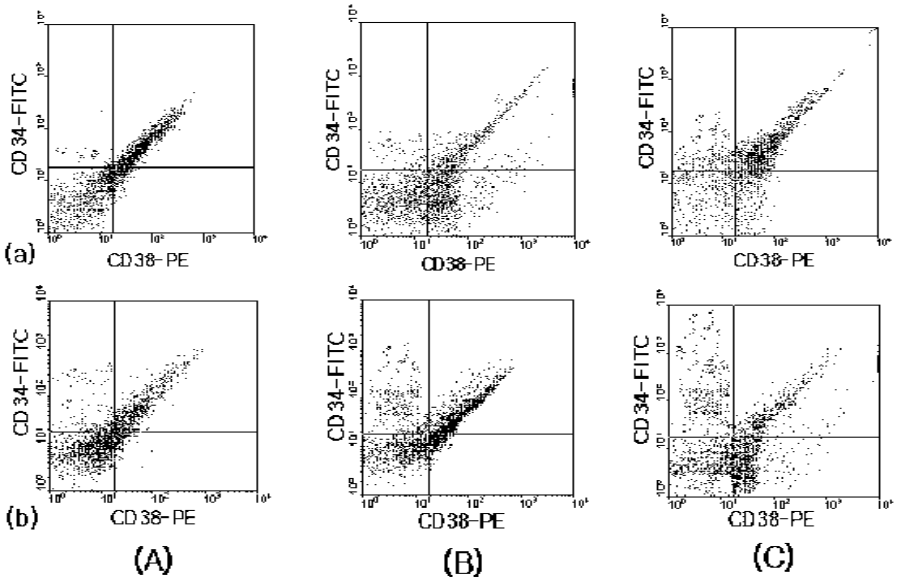
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 SC2220
부처명 과학기술부
연구사업명 뉴프론티어 세포응용연구사업
연구과제명 Telomerase 조절 및 인간유래지지세포를 이용한 줄기세포증식조절 신가술 개발
주관기관 세포응용연구사업단
연구기간 2005년 4월 1일 - 2008년 3월 31일

(54) 인간 배아줄기세포 및 배아체로부터 조혈모세포로의 분화를위한 인간 태반기질세포 생산 및 인간 배아줄기세포 및배아체로부터 조혈모세포로의 분화배양 기술

요약

본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 제조된 배아체를 인간 태반기질세포와 복합배양함으로써 CD34+ 38- 인간 조혈모세포로의 분화를 촉진시키는 기술에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 5일간 분화된 배아체를 정상 인간 태반기질세포와 복합배양한 경우에 현저하게 CD34+ 38- 인간 조혈모세포로의 분화를 촉진시킴을 증명함으로써 본 기술은 인간 배아 줄기세포로부터 조혈모세포의 분화/ 증식 촉진을 통하여 세포 치료를 위한 면역세포 공급 및 인공혈액의 생산에 유용하게 응용될 수 있다.

대표도



색인어

인간 태반기질세포, 인간 배아줄기세포, 인간 배아체, 조혈모세포 분화

명세서

도면의 간단한 설명

도 1: 인간 배아체와 복합배양하는 인간 태반기질세포의 모습 (X40) (위: V9 염색, 아래: 지방세포 분화)

도 2: 인간배아 줄기세포 집락 배양 모습 (X 40)

도 3: 인간 배아줄기세포로부터 배아체 분화 유도 5일 째 모습 (X 40)

도 4: CD34+ 38- 조혈모세포 분화 백분율의 비교 Graph: 인간 태반기질세포에 인간 배아 줄기세포와 분화 유도된 배아체를 복합 배양한 경우 배양 시간에 따른 CD34+ 38- 조혈모세포의 분화 유도 효과: 배양 14일째가 가장 최적 (a: Open bar: 인간 태반기질세포를 인간 배아 줄기세포와 배양

b: Dark bar: 인간 태반 기질세포를 배아체와 배양.)

도 5: 배아체/인간 태반기질세포 복합배양시 집락형성 단위(colony forming unit, CFU) 형성 수의 배양 시간에 따른 변화: 배양 14일째가 가장 높은 효율을 보임.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 제조된 배아체를 인간 태반기질세포와 복합배양함으로써 CD34+ 38- 인간 조혈모세포로의 분화를 촉진시키는 기술에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 배아 줄기세포로부터 5일간 분화된 배아체를 정상 인간 태반기질세포와 복합배양한 경우에 현저하게 CD34+ 38- 인간 조혈모세포로의 분화를 촉진시킴을 증명함으로써 본 기술은 인간 배아 줄기세포로부터 조혈모세포의 분화/ 증식 촉진을 통하여 세포 치료를 위한 면역세포 공급 및 인공혈액의 생산에 유용하게 응용될 수 있다.

배아 줄기세포는 내배엽, 중배엽, 외배엽 분화가 모두 가능한 전분화능(totipotency)을 지니고 있기 때문에 난치병 치료를 위한 중요한 연구대상으로 현재 주목을 받고 있다. 그런데, 이와 같은 배아 줄기세포의 전분화능은 배아 줄기세포로부터 특정 세포를 생산하기 위한 표적 분화(directed differentiation) 기술 개발의 면에서는 장애로 작용할 수 있다. 그러므로, 배아 줄기세포로부터 특정 세포로의 분화를 유도하는 기술 개발을 위해서는 그 목표 달성을 위한 최적의 배양조건을 조성함으로써 배아 줄기세포로부터 원하는 특정 세포로의 분화 효율을 극대화시키고자 하는 조건의 탐색이 우선되어야 하며 이에 관련된 연구 및 기술 개발이 전세계적으로 진행이 되고 있는 실정이다..

본 기술 또한 인간 배아 줄기세포로부터 조혈모세포로의 분화 촉진을 위한 최적의 배양조건을 탐색하는 과정에서 개발된 것으로, 인간 배아 줄기세포로부터 배아체로 분화를 유도한 뒤 이를 인간 기질세포와 복합배양함으로써 조혈모세포의 생산을 촉진시키는 내용으로 국내외적으로 본 출원인이 인간 배아줄기세포에서 비롯한 배아체와 정상 성인 인간 골수기질세포와의 복합배양을 통하여 조혈모세포로의 분화를 보고한 논문(Kim SJ *et al*, 2005) 외에는 거의 찾아 볼 수 업소 본 특허 출원처럼 인간 태반기질세포를 사용한 보고는 전혀 없었다.

현재, 인간 배아 줄기세포로부터 조혈모세포로의 분화 촉진 기술은 배양 조건의 적절한 조절을 통하여 인간 배아 줄기세포로부터 분화된 여러 다양한 세포들 중 조혈모세포가 다른 계통의 세포들보다 상대적으로 잘 생존하게 하는 개념을 근간으로 하고 있다.

인간 배아 줄기세포로부터 조혈모세포로의 분화유도를 촉진하는 대표적인 기술은 2001 년 Kaufman 등에 의하여 최초로 보고된 바 있었다. Kauffman 등은 인간배아 줄기세포를 cytokine 첨가 없이 fetal bovine serum(FBS)만을 포함한 배지에서 H1 인간 배아 줄기세포 주를 바로 쥐의 기질세포인 S17 세포 혹은 배아 12 일째 쥐 난황에서 비롯된 C166 세포와 같이 배양하여 배양 3-5일에 기질세포에 약하게 부착되어 있는 작고 둥근 모양의 세포들을 관찰 후 이들을 17일간 계속 H1/S17 세포 혹은 H1/C166 세포로 분화시킨 다음 CD34+ 조혈모세포를 분리하고 hematopoiestic growth factor 가 포함된 semisolid methylcellulose-based medium 배양을 통하여 혈액세포 전구체(progenitors) 집락군을 관찰함으로써 조혈모세포의 존재와 기능을 증명한 바 있었다. 그 후 여러 기술 개발이 시도되고 있으나 모두 Kaufman 등이 제시한 기술을 근간으로 하고 있다. 그런데 Kaufman 등은 인간 배아 줄기세포를 쥐의 기질세포인 S17 세포 혹은 배아 12 일째 쥐 난황에서 비롯된 C166 세포와 같이 배양하였는데, 이는 연구목적일 경우에는 모르겠으나 직접 인체에 적용을 하기 위한 조혈모세포를 배양하는 목적으로 사용하기에는 문제(인간 배아 줄기세포와 쥐의 기질세포의 상호 작용 속에서 유전자적으로 변형된 인간 조혈모세포가 발생할 가능성)가 있을 수 있다고 여겨진다.

이에 본 출원인 등은 인간 배아 줄기세포를 인간 골수 기질세포와의 복합배양을 통하여 조혈모세포를 생산하는 기술을 개발하여 그 결과를 국내외 저명 학술지에 발표한 바 있었다. (김석진 등, 2004, Kim SJ *et al*, 2005) 그러나 아직 전세계적으로 배아체가 아닌 인간 배아줄기세포자체로부터 조혈모세포로의 분화를 촉진케하는 인간 유래지지세포의 발명은 이루어져 있지 않은 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 기술개발의 목적은 정상 인간 태반기질세포를 이용하여 인간 배아체로부터 조혈모세포로의 분화 촉진을 유도하는 기술을 개발함으로써 보다 효율적으로 인간 배아 줄기세포로부터 조혈모세포의 분화를 유도할 뿐만 아니라 보다 안전하게 인체에 적용할 수 있는 조혈모세포 생산 기술을 개발함에 있다. 특히 현재까지 배아체가 아닌 인간 배아줄기세포 그 자체로부터 조혈모세포를 생산케하는 인간 유래지지세포의 개발은 이루어져 있지 않기 때문에 본 발명은 매우 중요하다.

이를 위하여 출원인 등은 인간 배아 줄기세포로부터 배아체를 형성 후 이를 인간 태반기질세포와의 배양을 시도하였고 그 결과를 유세포분석법 및 배양을 통한 집락형성 단위 측정을 통하여 증명하였다.

본 기술 발명은 특히 세포 치료에 필요한 혈액세포 생산 및 인공 혈액의 생산에 매우 유용하게 응용될 수 있다.

발명의 구성 및 작용

본 기술은 인간 배아줄기세포 및 분화된 배아체로부터 조혈모세포의 생산을 위한 인간 태반 기질세포의 정제, 생산과 그의 인간 배아 줄기세포 자체 및 배아체와의 복합배양을 통하여 조혈모세포로의 분화를 촉진케 하는 기술 등 크게 2단계로 이루어 진다.

우선 인간 유래지지세포로 사용하는 정상 태반은 분만 후 태반으로부터 융모막 세포를 채취하여 이를 dPBS에 3번 washing하고 수술용 가위로 충분히 잘게 잘라진 조직을 25m^2 flask에 넣고 DMEM 배양액을 2일에 한번 교체해주며 일주일간 배양한다. 본 조직에서 자라나온 태반 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 계대 시행 위해 새로운 flask에서 배양한다. 이렇게 만들어진 태반 세포는 mitomycin-C를 처리하여 배양 지지세포로 사용하고 나머지는 계대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장한다. 인간 태반 지지세포 준비는 배양 하루 전에 이루어진다. 0.1% gelatin으로 30분간 coating된 35mm 배양접시에 각각의 세포를 깔고 다음 날 transfer하기 직전에 배양액을 교체한다. 인간 태반 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.

그리고 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 mL를 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. 그리고 배양된 인간배아 줄기세포 종괴는 ALP 염색 및 SSEA 면역화학법으로 배아 줄기세포 주의 성상을 유지하고 있음을 확인한다(도 2). 배아 줄기세포로부터 배아체 분화, 형성을 위하여 배아 줄기세포 종괴를 계대 배양할 때의 크기보다 3-4 배정도 크게 분리한다. 분리된 종괴를 배양액(DMEM-F12, FBS, βFGF, GIBCO BRL, USA)에서 1시간 동안 응집시킨 후 다시 βFGF가 없는 DMEM-F12 배지에 혼합한다. 이를 48시간동안 incubator 에서 배양한 후 pasteur pipette 과 spoid 를 사용하여 종괴를 둥글게 조작하면서 배지를 1/2 정도 교환시켰다. 이런 방법으로 5 일 간 배양하여 배아체를 형성시킨다(도 3).

이와 같이 생산된 인간 배아줄기세포 혹은 배아체를 분리, 정제된 인간 태반기질세포에 첨가하여 복합배양을 시행한다. 이 때 배지에는 IMDM(KDR, USA)를 사용하고 그 외에 fetal bovine serum, horse serum, L-glutamine, penicillin 등이 첨가되나 조혈성장촉진인자는 포함되지 않는다. 배지액은 1 주일마다 교환한다.

본 기술의 효과 판정을 위하여 CD34+ 38- 조혈모세포 분화 백분율 및 집락형성 단위(colony forming unit, CFU)의 측정, 비교를 시간의 흐름(배양 5일, 7일, 10일 14일, 21일)에 따라 시행한다. CD34+ CD38- 세포의 백분율을 측정을 위하여 유세포 분석법(flowcytometry, Beckton-Dickinson, USA)을 이용하였다. 우선 각 배양군으로부터 단핵구를 분리 후 단핵구에 FITC가 부착된 항 CD34 및 CD38 단클론 항체(anti-HPCA-2, Beckton-Dickinson, Mountain View, CA)를 20uL씩 첨가한 후 암소에서 4°C로 25분간 반응시켰다. 이를 0.1%의 sodium azide(Sigma)와 2% 우태아혈청이 함유된 세척액 1mL 및 2mL로 300g에서 각각 7분씩 2회 원침세척한 후, 1mL의 세척액에 부유시켜 FACS scan(Becton-Dickinson, USA)을 이용하여 CD34+ CD45- 세포함유 정도를 측정하였다. 이 때 음성 대조군으로는 상기 CD34 양성 단클론 항체와 같은 종류인 anti-mouse IgG_2 단세포군 항체를 동일한 조건으로 반응시킨 상층액을 사용하였다.집락형성 단위(CFUs)의 측정, 비교를 위하여 Semisolid methylcellulose-based medium 배양 중 Methocult H4444(Terry Fox Laboratory, USA) 법을 이용하였다. 우선, 각 배양군으로부터 Ficoll-Hypaue(Histopaque: Sigma, USA)을 이용한 밀도 구배 원심 분리법(density gradient centrifugation) 을 통하여 단핵구를 분리하였다. 이 단핵구들은 5% 우 혈청 알부민(Bovine serum albumin, BSA, Sigma, USA)과 phosphate-buffered saline(PBS, Sigma, USA)로 1회 세척 후 거름망(30 um mesh)으로 걸러내었다. 그리고, 단핵구를 모아 CD34 단클론 항체 (QBend-10 mouse IgG1, Miltenyi reagent A2)를 이용하여 고 구배 면역자장 분리법(high gradient immunomagnetic separation, HGIS: MidiMACS, Miltenyi biotech, Sunnyvale, CA, USA)을 이용해서 분리하였다. 4℃에서 30 분간 단 클론 항체와 반응시킨 세포들을 PBS 로 1회 세척하며 자장이 걸려있는 분리 컬럼(column)을 통과시킨 CD34+ 세포를 분리하였다. 분리된 CD34+ 세포의. CFUs 집락 배양을 위하여 CD34+ 세포의 최종 농도를 2X10^3/mL 로 한 다음 이를 H-4444 배지와 10:1 의 비율로 혼합한 후 37℃, 5% CO_2, 습도 95%의 조건에서 배양하여 14일째에 도립 현미경을 통하여 집락 수를 측정한다.

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 혹은 배아체와의 복합배양을 위한 인간 태반기질세포 제조 및 배양 기술

본 발명은 인간 배아 줄기세포로 혹은 배아체와 복합배양 시킴으로써 조혈모세포의 생산을 촉진하기 위한 인간 태반기질세포를 제조하기 위한 기술에 관한 것이다.

우선 인간 유래지지세포로 사용하는 정상 태반은 분만 후 태반으로부터 융모막 세포를 채취하여 이를 dPBS에 3번 washing하고 수술용 가위로 충분히 잘게 잘라진 조직을 25m^2 flask에 넣고 DMEM 배양액을 2일에 한번 교체해주며 일주일간 배양한다. 본 조직에서 자라나온 태반 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 계대 시행 위해 새로운 flask에서 배양한다. 이렇게 만들어진 태반 세포는 mitomycin-C를 처리하여 배양 지지세포로 사용하고 나머지는 계대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장한다. 인간 태반 지지세포 준비는 배양 하루 전에 이루어진다. 0.1% gelatin으로 30분간 coating된 35mm 배양접시에 각각의 세포를 깔고 다음 날 transfer하기 직전에 배양액을 교체한다. 인간 태반 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) 그 결과 인간 태반기질세포가 V9염색에 양성이고 지방세포로의 분화가 됨을 확인함으로써 인간 태반기질세포의 정제, 분리가 양호하였음을 확인할 수 있었다. 이들과 인간 배아 줄기세포 혹은 배아체를 첨가하여 복합배양을 시행한다. 이 때 배지에는 IMDM(KDR, USA)를 사용하고 그 외에 fetal bovine serum, horse serum, L-glutamine, penicillin 등이 첨가되나 조혈성장촉진인자는 포함되지 않는다.

실시예 2: 인간 배아줄기세포 혹은 배아체와 인간 태반기질세포 복합배양시 CD34+ 38- 세포 생산 효과

본 기술발명의 핵심에 해당하는 인간 배아줄기세포 혹은 배아체와 인간 태반기질세포와의 복합배양시 CD34+ 38- 조혈모세포 분화 촉진 효과를 증명하기 위하여 유세포분석법(flowxytometry)과 집락형성단위(CFC) 측정을 위한 H4444 Methocult 배양을 배양 5, 7, 14, 21일에 실시하였다.

그 결과 유세포분석법에서는 배양 5일에는 공히 0.10% 이하였다가 인간 배아줄기세포 배양군과 배아체 배양군에서 각각 배양 7일에는 1.54%, 0.77%, 7.43%, 4.15%로 증가하고 배양 14일에는 9.31%, 6.34%, 18.47%,7.43%로 최고치를 보이다가 배양 21일에는 저하되는 양상을 보였다. (대표도, 도 4). 그리고 집락형성단위 배양(도 5)에서도 동일한 양상을 관찰할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명으로 인간 태반기질세포가 인간 배아줄기세포 및 배아체로부터 조혈모세포로의 분화를 촉진함을 확인할 수 있었다. 특히 인간 유래 지지세포를 사용한 연구, 발명으로는 처음으로 인간 태반기질세포가 인간 배아줄기세포 자체로부터 조혈모세포로의 분화를 촉진함을 증명하였다. 뿐만 아니라 배아체와의 복합 배양에서는 그 효율이 18.47%, 7.43%로 성정촉진인자를 사용하지 않은 점을 감안하면 매우 높은 분화효율을 보이고 있음도 확인할 수 있었다.

결국 상기 인간 태반기질세포는 동물 유래 지지세포를 이용하는 경우보다 안전하게 인체에 적용할 수 있는 조혈모세포를 생산할 수 있으리라고 기대된다.

본 기술 발명은 특히 세포 치료에 필요한 혈액세포 생산 및 인공 혈액의 생산에 매우 유용하게 응용될 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

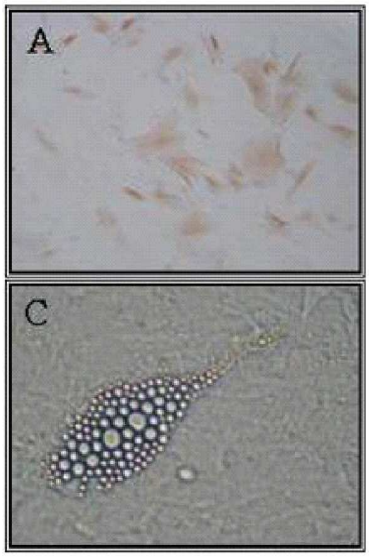
인간 배아줄기세포 및 배아체로부터 조혈모세포 분화를 위한 인간 태반 기질세포의 생산

청구항 2.

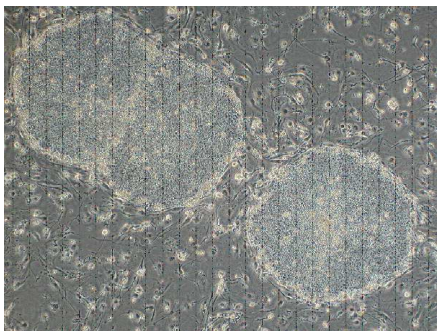
인간 태반기질세포를 이용한 인간 배아줄기세포 및 배아체로부터 조혈모세포로의 분화배양

도면

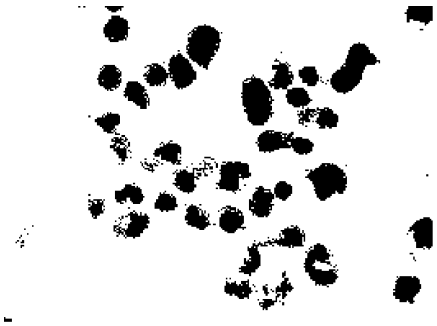
도면1



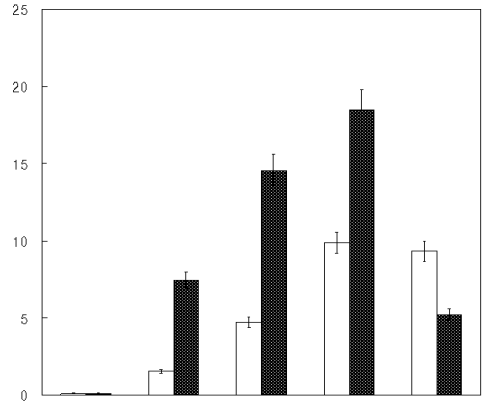
도면2



도면3



도면4



도면5

