



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0104917  
(43) 공개일자 2017년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/0775 (2010.01) C07K 14/52 (2006.01)  
C12P 21/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0667 (2013.01)  
C07K 14/52 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0158414(분할)  
(22) 출원일자 2016년11월25일  
심사청구일자 2016년11월25일  
(62) 원출원 특허 10-2016-0027472  
원출원일자 2016년03월08일  
심사청구일자 2016년03월08일

(71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)  
(72) 발명자  
임도선  
서울특별시 강남구 선릉로 206, 101동 204호 (대치동, 동부센트레빌)  
김종호  
서울특별시 성북구 인촌로 30, 501호 (안암동2가, 수산리빙텔)  
주형준  
서울특별시 강남구 선릉로 120, 12동 1106호 (대치동, 개포2차우성아파트)  
(74) 대리인  
이처영, 장제환

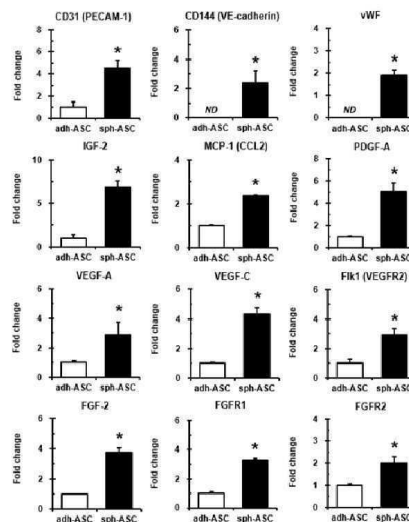
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용한 사이토카인의 발현능이 증가된 줄기세포의 제조방법

### (57) 요약

본 발명은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 이용하여 사이토카인 또는 성장인자의 발현능을 증가시킨 중간엽 줄기세포의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 사이토카인 또는 성장인자의 발현능을 증가시킨 중간엽 줄기세포의 제조방법은 생체 이외의 성분을 이용하지 않고 줄기세포를 분화시킬 수 있으므로, 임상적으로 부작용 없는 줄기세포 치료에 매우 유용하다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

**C12P 21/00** (2013.01)

C12N 2501/10 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0225040014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 [3차년도] 급성심근경색모델에서 배아줄기세포 유래 심장근세포 시트 생체적용 최적화 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

지방유래 줄기세포를 유도인자 및 화합물의 처리 없이 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)가 코팅된 배양 용기에서 삼차원 구 형태로 배양하여, CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, MCP-1 (CCL2) 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 발현이 증가되고 혈관 내피세포로의 분화능이 증가된 줄기세포의 제조방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 지방유래 줄기세포는  $3.3 \times 10^4$  내지  $3.3 \times 10^5$  세포/mL로 접종하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 1.2g/mL 농도로 코팅하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 37℃에서 72시간 코팅하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5

다음 단계를 포함하는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, MCP-1 (CCL2) 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 제조방법:

- (a) 지방유래 줄기세포를 유도인자 및 화합물의 처리 없이 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트가 코팅된 배양 용기에서 삼차원 구 형태로 배양하여 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, MCP-1 (CCL2) 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질을 생성하는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질을 회수하는 단계.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 지방유래 줄기세포는  $3.3 \times 10^4$  내지  $3.3 \times 10^5$  세포/mL로 접종하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 1.2g/mL 농도로 코팅하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 37℃에서 72시간 코팅하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 이용한 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 사이토카인 또는 성장인자의 발현능을 증가시킨 중간엽 줄기세포의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 줄기세포는 다분화능을 가지는 미분화 세포이다. 미분화 상태의 세포를 각각의 적절한 환경 및 유도인자를 제공해주면, 다양한 세포와 조직으로 분화할 수 있다. 이러한 줄기세포의 분화유도는 조직 및 장기 재생연구의 기초로 활발히 연구되고 있다.

[0004] 대표적으로 지방줄기세포는 다분화능 줄기세포로서 조직이나 기관의 특이적인 세포로 분화할 수 있는 세포로서, 조직의 성장과 발달 및 성체 조직의 유지와 재생을 유도하는 기능을 가지고 있다. 이 세포는 인간 배아에서 추출한 배아 줄기세포와 달리, 성체의 조직에서 추출하기 때문에 윤리적인 문제가 적으며 자가 재생 능력이 뛰어나고 지방, 골, 연골, 혈관내피, 심장근세포 등으로 분화하는 다분화능을 가지고 있다. 또한, 다른 조직에서보다 많은 양의 줄기세포를 얻을 수 있으며, 추출과정이 안전하고 용이하다는 장점이 있다 (P.A.Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001).

[0005] 최근 줄기세포에 다양한 환경 및 유도인자의 처리를 통하여 성숙세포로의 분화능을 높이기 위한 많은 방법들이 보고되고 있다. 특히, 혈관내피세포로의 분화능 증진을 위해 많은 연구 그룹이 성장인자 (VEGF, FGF-2 및 PDGF)의 처리를 실시하였다 (Kim *et al.*, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 13, 2015). 그러나, 대부분의 연구실에서 실시되는 혈관내피세포로의 분화유도는 시험관 내 (*in vitro*) 환경에서 실시되고 있으며, 이는 줄기세포의 종류에 따라 다양한 성장인자 처리농도 및 분화 효율을 가지고 있으며, 인체 내에서의 환경을 반영하지 않은 방법을 이용하고 있다. 또한 줄기세포의 특정 분화를 유도하기 위한 키트 및 배양액이 시판되고 있지만 그에 따른 경제적이 부담이 가중되는 실정이다.

[0006] 따라서, 생체 내 환경을 모사하면서 특정 유도인자 및 화학물을 처리를 하지 않고 배양환경의 변화만으로 줄기세포의 분화 유도가 가능한 기술이 요구된다. 또한, 지방줄기세포는 생체 내에서 타 줄기세포보다 쉽게 얻을 수 있으므로, 이러한 지방줄기세포를 이용하여 배양환경의 변화만으로 안정적인 줄기세포 분화 유도 기술의 개발이 필요하다.

[0007] 최근, 배양환경의 변화를 위한 다양한 화합물과 재료들이 보고되고 있으나, 삼차원 구 형태로 배양을 위한 대표적인 다양한 화합물과 재료들을 이용한 시도들은 모든 세포를 구 형태로 배양할 수 없다. 또한, 세포이식 등에서 균일화된 세포의 크기와 분화효율을 보장하지 못하며, 시간적, 경제적 측면에서 한계를 가진다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 배양환경의 변화만으로 안정적인 줄기세포의 분화를 유도하기 위해 예의 노력한 결과, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 이용하여 지방줄기세포를 삼차원 구 형태로 배양함으로써, 줄기세포가 발현 및 분비하는 사이토카인 또는 성장인자가 증가된 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 중간엽 줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)가 코팅된 배양 용기에서 삼차원 구 형태로 배양하여 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-

cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현이 증가된 줄기세포의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 줄기세포로부터 생성되는 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 제조방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)가 코팅된 배양 용기에서 3차원 구 형태로 배양하는 단계를 포함하는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 발현이 증가된 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 중간엽 줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트가 코팅된 배양 용기에서 삼차원 구 형태로 배양하여 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사이토카인을 생성하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 사이토카인을 회수하는 단계를 포함하는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 제조방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 이용하여 사이토카인 또는 성장인자의 발현능을 증가시킨 중간엽 줄기세포의 제조방법은 생체 이외의 성분을 사용하지 않고 줄기세포를 분화시킬 수 있으므로, 임상적으로 부작용 없는 줄기세포 치료에 매우 유용하다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 다양한 화학물질을 이용하여 삼차원 구 형태의 배양 24시간 후, 삼차원적 구 형성을 비교한 광학 사진이다 (스케일 바는 100  $\mu$ m).

도 2는 지방줄기세포 100,000개를 접종하고 삼차원 구 형태로 배양하여, 시간에 따른 지방줄기세포의 형태 변화를 확인한 광학현미경 사진이다 (스케일 바는 100  $\mu$ m).

도 3은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA) 처리를 통해 지방줄기세포의 사이토카인 또는 성장인자 발현 증진을 확인하기 위한 개괄적인 도표이다.

도 4는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리 후 지방줄기세포의 삼차원적 구 형태의 배양을 확인한 형광사진이다 (스케일 바는 100  $\mu$ m).

도 5는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리 후 지방줄기세포 접종 세포 수 및 배양 시간에 따른 삼차원 구 형태 세포가 형성된 면적을 정량화한 그래프이다.

도 6은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통해 지방줄기세포의 세포사멸을 mRNA 수준에서 비교한 결과이다.

도 7은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통한 지방줄기세포의 저산소 관련 인자인 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA 및 단백질 수준을 비교한 결과이다.

도 8은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리 후 지방줄기세포에서 CD31, CD144, vWF, IGF-2, MCP-1, PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1, FGF-2, FGFR1 및 FGFR2의 mRNA 수준을 비교한 결과이다.

도 9는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통한 지방줄기세포의 성숙 혈관내피세포로의 분화를 FGFR1의 발현을 이용하여 면역형광염색법으로 확인한 것이다 (스케일 바는 100  $\mu$ m).

도 10은 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통한 지방줄기세포의 성숙 혈관내피세포로의 분화를 FGF-2의 발현을 통해 면역형광염색법으로 확인하고, 삼차원 구 형태의 세포를 와해시켜 단세포 수준에서 FGF-2의 발현을 확인한 것이다 (스케일 바는 100  $\mu$ m).

도 11은 시그마코트 처리 및 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통해 삼차원 구 형태로 배양한 지

지방줄기세포의 세포사멸을 mRNA 수준에서 비교한 결과이다.

도 12는 각각 일반 페트리디쉬, 시그마코트 (Sigmacote), 플루로닉 F-127 (Pluronic F-127) 및 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통해 삼차원 구 형태로 배양한 지방줄기세포에서 저산소 관련인자인 HIF-1 $\alpha$  및 HIF-2 $\alpha$ 의 mRNA와 단백질 발현을 확인한 결과이다.

도 13은 각각 일반 페트리디쉬, 시그마코트, 플루로닉 F-127 및 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통해 삼차원 구 형태로 배양한 지방줄기세포에서 CD31, CD144, vWF, IGF-2, MCP-1, PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1, FGF-2, FGFR1 및 FGFR2의 mRNA 수준을 비교한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0020] 본 발명에서는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 배양용기에 전처리하여, 지방줄기세포가 삼차원 구형태로 배양되는 것을 확인하였다. 또한, 이렇게 배양된 지방줄기세포는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1(CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2 등의 사이토카인 또는 성장인자의 발현 및 생성이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0021] 따라서, 본 발명은 일관점에서 중간엽 줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트가 코팅된 배양 용기에서 삼차원 구 형태로 배양하는 단계를 포함하는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 발현이 증가된 줄기세포의 제조방법에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명은 다른 관점에서 (a) 중간엽 줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트가 코팅된 배양 용기에서 삼차원 구 형태로 배양하여 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사이토카인을 생성하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 사이토카인을 회수하는 단계를 포함하는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, Flk1 (VEGFR2), FGF-2, FGFR1 및 FGFR2로 구성된 군에서 선택되는 성장인자 또는 혈관내피세포 분화유도 물질의 제조방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방줄기세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 지방줄기세포는 다양한 세포로의 분화능이 보고되어 있으며, 타 줄기세포보다 쉽게 얻을 수 있고, 윤리적 문제를 극복할 수 있다는 장점이 있다. 지방줄기세포를 수득할 수 있는 지방조직은 성숙한 지방세포를 포함하여 이를 둘러싸고 있는 다양한 주변 조직과 결합되어 구성되어 있는 것으로, 체내 위치에 상관없이 모든 지방조직을 총칭한다. 대표적으로 정소주위지방, 피하지방, 장간막지방, 위장지방 및 후복막 지방조직 등이 지방줄기세포의 유래로 가능하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명에서 사용한 지방줄기세포는 마우스 유래이나 이에 한정되지는 않으며, 인간, 백서, 돼지 또한 원숭이 등의 모든 포유류 유래의 지방줄기세포를 포함한다.
- [0026] 지방조직으로부터 분리되어 배양 배지에서 배양된 지방줄기세포는 통상적 세포 표현형 마커를 이용하여 속성 확인이 가능하며, 다양한 세포 분화를 통하여 줄기세포의 역가를 평가할 수 있다. 이러한, 분화는 지방, 골, 연골, 신경, 혈관내피, 심장근세포 등으로 유도하는 것이 바람직하나, 이들만으로 제한되지는 않는다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^6$  세포/6-웰 배양 플레이트로 접종하는 것이 바람직하다. 즉, 6-웰 배양 플레이트에 약 100,000개 정도의 세포를 접종하는 것이 바람직하며, 상기 제시된 세포 수 미만이면 지방줄기세포의 낮은 생존율에 의해 삼차원 구를 형성하지 못하는 문제점이 있고, 이와 반대로 상기 제시된 범위에서 세포 수가 2배 이상 초과하면 상대적으로 삼차원 구를 형성한 세포가 많아지므로 배양액의 혼탁 등 오염의 가능성이 높아지는 문제점이 있다.
- [0028] 본 발명의 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 1.2g을 100% 에탄올 1mL에 녹여 제조한 농도가 바람직하다. 만약 더욱 높은 농도인 경우 결정이 쉽게 생기는 문제점이 있고, 이와 반대로 상기 제시된 농도보다 낮은 농도로 녹이면 상대적으로 플레이트 도말 시에 충분한 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트의 전처리가 되지 않을 수 있으므로 상기 농도가 가장 바람직하다. 또한, 녹이는 시간은 약 30분인 것이 바람직하며, 상기 시



간보다 짧을 경우 결정이 생기는 문제점이 있고, 시간이 길어질 경우 에탄올의 증발로 인하여 농도가 높아질 수 있다.

- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 1.2g/mL 농도로 코팅하는 것이 바람직하다. 즉, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 6-웰 배양 플레이트에 1mL의 양으로 코팅하는 것이 바람직하다. 만약 상기의 양보다 많을 경우 에탄올의 증발 시간이 길어지게 되며, 적은 양을 채울 경우 충분한 양의 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 도말이 이루어지지 않는 문제점이 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 37℃에서 72시간 코팅하는 것이 바람직하다. 즉, 37℃ 인큐베이터에서 72시간 동안 에탄올의 증발과정이 필요하다. 제시한 시간보다 오랜 시간 증발시킬 경우 도말된 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 결정이 배양 용기에 묻어나는 문제점이 있으며, 짧은 시간 동안 증발시킬 경우 에탄올이 완전히 증발되지 않을 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 "CD31 (PECAM-1)"은 혈소판, 단핵구, 호중구 및 T 세포 일부 유형의 표면에서 발견되고, 내피세포 간의 intercellular junction에 큰 역할을 하며, 백혈구 유출, 혈관신생 및 인테그린 활성화와 관련되어 있다. 또한, "CD144 (VE-cadherin)"은 칼슘 의존성 세포간 부착 당 단백질로써, intercellular junction을 조절하여 내피세포에서 중요한 역할을 하며, "vWF"는 지혈에 관여하는 당 단백질로 혈관 내피의 접착에 관여한다.
- [0033] 본 발명에서 "IGF-2 (인슐린 유사 성장인자-2)"는 IGF-1 수용체와 결합하여 그 효과를 나타내는 인슐린과 구조적으로 유사한 3가지 호르몬 중 하나이다. 또한, "MCP-1 (CCL2)"는 대표적인 C-C 케모카인의 일종인 small 사이토카인으로, monocyte, 혈관내피 등을 생성하는 인자이다.
- [0034] 본 발명에서 "PDGF-A (혈소판 유래 성장인자-A)"는 혈관신생에 중요한 역할을 하며, 중간엽 세포에 대한 강력한 유사분열 물질이다. "VEGF-A (혈관내피 성장인자-A)"는 특히 혈관내피세포에 작용하여 혈관신생 및 혈관 내피세포 성장을 유도하는 유사분열 물질이며, "VEGF-C (혈관내피 성장인자-C)" 역시 주로 내피세포의 생존, 성장 및 이동과 관련된 역할을 한다. 모든 VEGF 패밀리는 VEGFR (혈관내피 성장인자 수용체)과 결합하여 반응하며, 거의 모든 VEGF는 "VEGFR-2 (Flk-1)"과 결합함으로써 반응을 매개한다.
- [0035] 본 발명에서 "FGF-2 (섬유아세포 성장인자-2)"는 혈관신생, 상처 치유 등의 역할을 하며, 증식 및 분화에서 매우 중요하다. "FGFR (섬유아세포 성장인자 수용체)"는 FGF 패밀리가 결합하는 타이로신 인산화 효소형 수용체로, "FGFR2"는 세포의 분열, 성장 및 분화에 관여하여 특히 뼈와 혈관 등의 조직복구에 중요한 역할을 한다.
- [0037] 줄기세포의 분화능 증진을 위한 연구는 다양한 재료 및 방법으로 시도되었으나, 일, 이차원적 줄기세포의 분화와 생체 내의 분화는 많은 괴리가 있으며, 또한 특정 성숙세포로의 분화를 위해서는 성장인자의 지속적인 처리가 요구된다. 아울러, 기존의 삼차원 배양 방법 및 재료는 세포의 종류에 따라 삼차원 구 형태를 형성하지 못하는 등의 기술적 한계가 있으며, 세포의 삼차원 구의 크기를 조절하지 못하는 문제점 등이 발견되었다. 이 밖에 과도한 비용 및 화학재료 사용에 따른 세포의 변성 등의 부작용이 내재하고 있다.
- [0038] 이에, 본 발에서는 이러한 한계들을 극복하기 위하여 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 사이토카인의 발현이 증가된 줄기세포를 삼차원 구 형태 배양을 통해 제조하였다.
- [0039] 본 발명에 따른 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용한 배양은 기존의 삼차원 구 형태의 배양을 위한 많은 화학물의 처리에 비하여 조작 (handling)이 쉽고, 경제적 부담과 배양의 시간을 최소화하여 지방줄기세포의 시딩 (seeding) 후에도 세포생존이 탁월하고 분화능이 향상된 효과를 기대할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 세포의 생착 억제를 위한 제품으로 개발된 다양한 물질 중 대표적으로, 일반 페트리디쉬, 시그마코트 (Sigmacote) 및 플루로닉 F-127 (Pluronic F-127)를 사용한 기존의 삼차원 구 형태 배양 시스템보다 화학물의 영향에 따른 문제 및 세포 종류에 따른 한계를 극복할 수 있는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 지방줄기세포를 삼차원 구 형태로 배양하였다.
- [0041] 보다 구체적으로, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하면, 단시간 내에 삼차원 구 형태 배양을 통하여 어렵지 않게 지방줄기세포의 분화를 유도할 수 있다. 또한, 삼차원적 구를 배양시간에 의존하여 크기 및 수를 조절할 수 있어 세포이식에 유용하며, 세포에 화학적 자극을 주지 않고 분화를 유도할 수 있는 장점이 있다.
- [0042] 본 발명에서는 종래에 보고된 일반배양에 비하여, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용한 삼차원 구 형태 배양에서 혈관내피세포 특이 사이토카인 또는 성장인자의 발현이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따

라서, 본 발명의 줄기세포 제조방법은 기존의 생체 이외의 성분을 이용한 방법과는 달리 부작용이 없고, 생체를 모사한 시스템이라는 점에서 국소 재생 치료 등의 임상 응용으로의 발전 가능성이 기대되므로, 의학 및 생물학 분야에 매우 유용하다.

[실시예]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

**실시예 1: 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 이용한 줄기세포의 삼차원 구 형태 배양**

GFP양성 수컷 마우스 (C57BL/6J)의 정소주위 지방조직으로부터 콜라게나아제 (Collagenase)를 이용하여 순수한 지방줄기세포를 분리하였다. 분리한 지방줄기세포를 2계대 배양한 후, 줄기세포 마커인 Sca-1의 양성 발현을 확인하고, 지방, 골, 혈관내피 및 심장근세포로의 분화유도를 통해 줄기세포임을 검증하였다.

분리된 지방줄기세포 100,000개를 일반 페트리디쉬, 시그마코트 (Sigmacote), 플루로닉 F-127 (Pluronic F-127) 또는 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트가 처리된 배양 용기에 접종하여, 삼차원 구 형태 배양을 24 시간 동안 유도하였다.

그 결과, 플루로닉 F-127와 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트가 처리된 배양 용기에서만 삼차원 구 형태 배양이 성공한 것을 확인할 수 있었으며, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리군에서 훨씬 많은 지방 줄기세포를 확인할 수 있었다 (도 1).

또한, 플루로닉 F-127와 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리 후, 지방줄기세포의 삼차원 구 형태 유지 및 생존을 시간에 따라 비교하였다.

그 결과, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리군은 시간이 경과하여도 삼차원 구 형태를 계속 유지하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2).

**실시예 2: 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)에 의한 지방줄기세포의 증식 및 분화능 증가**

실시예 1에서 분리한 지방줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 삼차원 구 형태로 배양하여, 줄기세포의 분화능을 확인하였다.

폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 100% 에탄올에 30분간 녹여 1.2g/mL의 농도로 제조하여, 6-웰 배양 플레이트에 1ml 실시예 1에서 분리한 지방줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 삼차원 구 형태로 배양하여, 줄기세포의 분화능을 확인하였다.

폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트는 100% 에탄올에 30분간 녹여 1.2g/mL의 농도로 제조하여, 6-웰 배양 플레이트에 1ml의 양으로 코팅하였다. 37℃ 인큐베이터에서 72시간 동안 에탄올을 증발시켜 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 배양 용기에 코팅한 후, 상기 분리한 지방줄기세포 100,000개를 접종하여 3일 동안 배양하면서 삼차원 구 형태를 시간별로 확인하였다 (도 3).

그 결과, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 처리한 플레이트에서 배양한 지방줄기세포는 삼차원 구 형태를 유지하면서, 접종 세포수와 시간에 따라 크기가 증가한 세포를 획득할 수 있었다 (도 4 및 도 5).

폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리에 의해 삼차원 구 형태 배양으로 획득한 지방줄기세포의 세포사멸을 유세포분석 (FACS) 또는 RT-PCR로 측정하였다. 또한, 저산소 관련 인자의 mRNA 발현 및 단백질 발현을 anti-HIF-1α (AF1935, R&D system), anti-HIF-2α (AF2996, R&D system) 항체를 이용하여 확인하였다.

그 결과, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 처리하지 않은 지방줄기세포에 비해 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 처리한 지방줄기세포에서 Bax의 발현이 감소하고, Bcl-2의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 즉, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 처리를 통한 삼차원 구 형태 배양으로 지방줄기세포의 세포사멸이 감소한 것을 알 수 있다 (도 6). 또한, 저산소 환경인자인 HIF-1α의 발현도 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

**실시예 3: 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)에 의한**

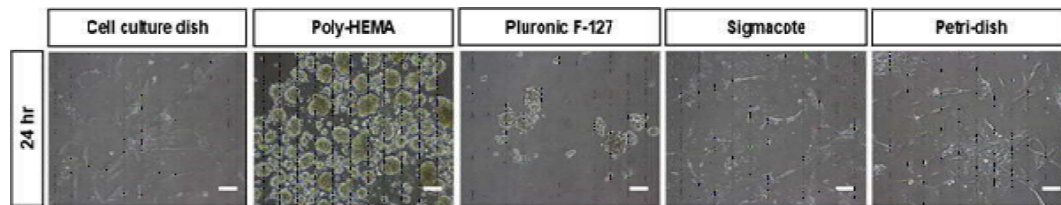


## 지방줄기세포의 사이토카인 또는 성장인자 발현 증가

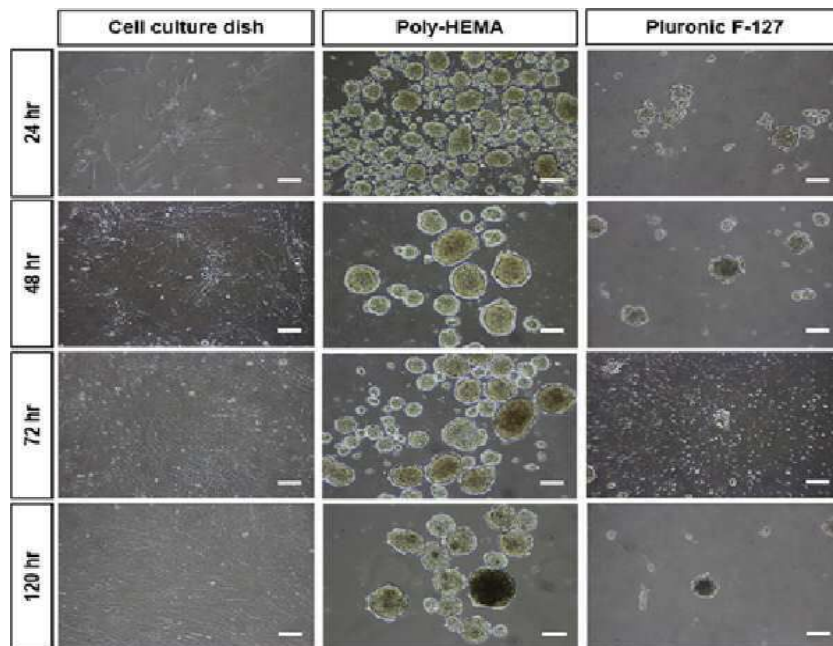
- [0063] 실시예 1에서 분리한 지방줄기세포를 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 삼차원 구 형태로 배양하여, 12가지 사이토카인 또는 성장인자의 발현을 qPCR 및 형광면역염색법으로 확인하였다.
- [0064] 그 결과, 성숙 혈관내피세포의 대표적인 인자들인 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, FGF-2, Flk1 (VEGFR2), FGFR1 및 FGFR2 등의 mRNA 발현이 현저히 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. (도 8), 또한, 형광면역염색법을 이용하여 FGFR1의 발현도 확인할 수 있었다 (도 9).
- [0065] 그 다음, 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트를 이용하여 삼차원 구 형태로 배양한 세포를 와해시킨 후 단 세포 수준에서 사이토카인 또는 성장인자의 발현을 확인한 결과, FGF-2의 발현이 증가되어 있는 것을 알 수 있었다 (도 10). 즉, 삼차원 구 형태로 배양된 모든 세포는 성숙 혈관내피세포로의 분화가 유도되었음을 알 수 있다.
- [0067] **실시예 4: 기존의 삼차원 구 형태 배양과 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 (Poly-2-hydroxyethyl methacrylate; Poly-HEMA)를 이용한 삼차원 구 형태 배양의 비교**
- [0068] 실시예 1에서 분리한 지방줄기세포 100,000개를 일반 페트리디쉬, 시그마코트 (Sigmacote), 플루로닉 F-127 (Pluronic F-127) 및 폴리-2-하이드록시에틸 메타아크릴레이트 가 처리된 6-웰 배양 플레이트에 접종하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 48시간 동안 배양한 후, 세포생존, 저산소 정도 및 사이토카인 또는 성장인자의 발현을 비교하였다.
- [0070] 4-1: 세포사멸 및 저산소 정도의 비교
- [0071] 삼차원 구 형태 배양으로 획득한 지방줄기세포의 Bax 및 Bcl-2의 mRNA 수준을 측정하여 세포사멸을 비교하였으며, 저산소 관련 인자인 HIF-1 $\alpha$  및 HIF-2 $\alpha$ 의 mRNA 및 단백질 수준을 측정하여 저산소 정도를 비교하였다.
- [0072] 그 결과, 시그마코트 처리군에 비해 poly-HEMA를 처리한 지방줄기세포에서 Bax의 발현이 더욱 감소하고, Bcl-2의 발현이 더욱 증가한 것을 확인하였다 (도 11).
- [0073] 또한, 일반 페트리디쉬, 시그마코트 및 플루로닉 F-127을 처리하여 삼차원 구 형태로 배양한 지방줄기세포에 비해 poly-HEMA를 처리한 지방줄기세포에서 HIF-1 $\alpha$  및 HIF-2 $\alpha$ 의 mRNA 및 단백질 발현이 높은 것을 확인하였다 (도 12).
- [0075] 4-2: 사이토카인 또는 성장인자의 발현 비교
- [0076] 일반 페트리디쉬, 시그마코트 및 플루로닉 F-127을 처리하여 삼차원 구 형태로 배양한 지방줄기세포와 poly-HEMA를 처리하여 삼차원 구 형태로 배양한 지방줄기세포에서 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, IGF-2, MCP-1 (CCL2), PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C, FGF-2, Flk1 (VEGFR2), FGFR1 및 FGFR2의 mRNA 발현을 비교하여, 성숙 혈관내피세포로의 분화능을 확인하였다.
- [0077] 그 결과, 일반 페트리디쉬, 시그마코트 및 플루로닉 F-127 처리군 모두에 비해 poly-HEMA 처리군에서 통계적으로 유의하게 발현이 증가한 사이토카인 또는 성장인자는 CD31 (PECAM-1), CD144 (VE-cadherin), vWF, MCP-1 (CCL2) 및 FGFR2로 나타났다 (도 13).
- [0079] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

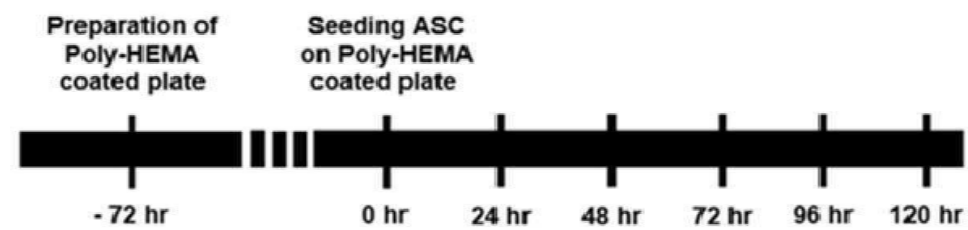
### 도면1



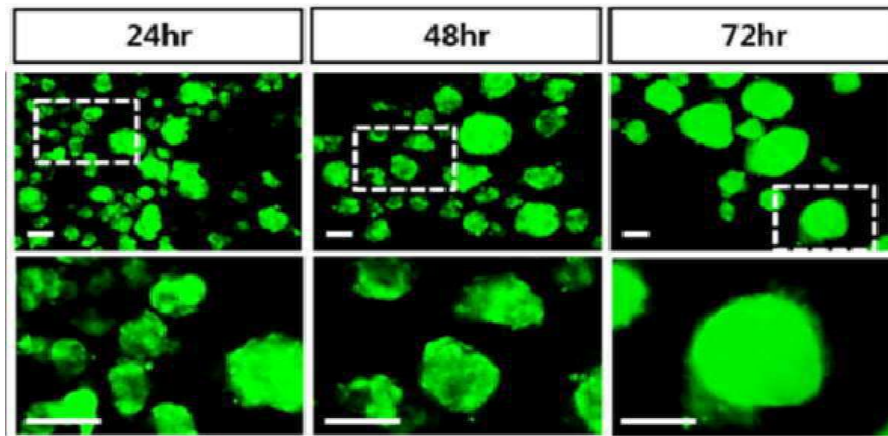
### 도면2



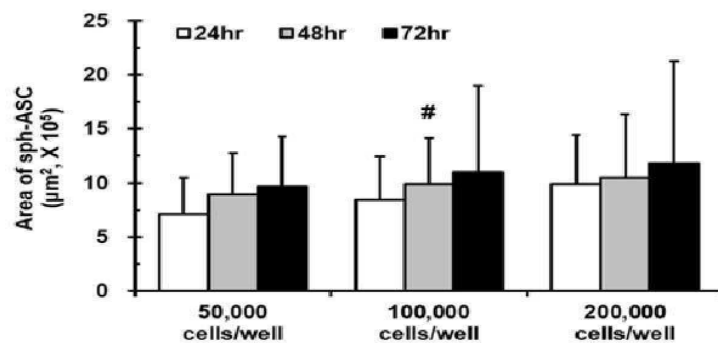
### 도면3



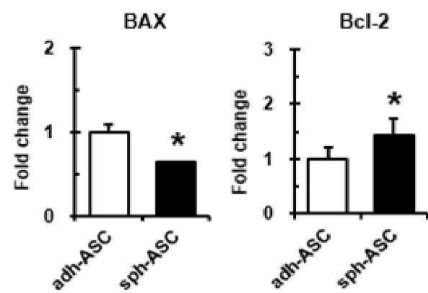
도면4



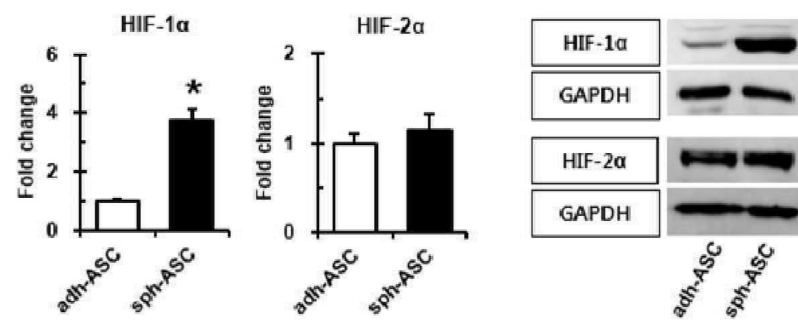
도면5



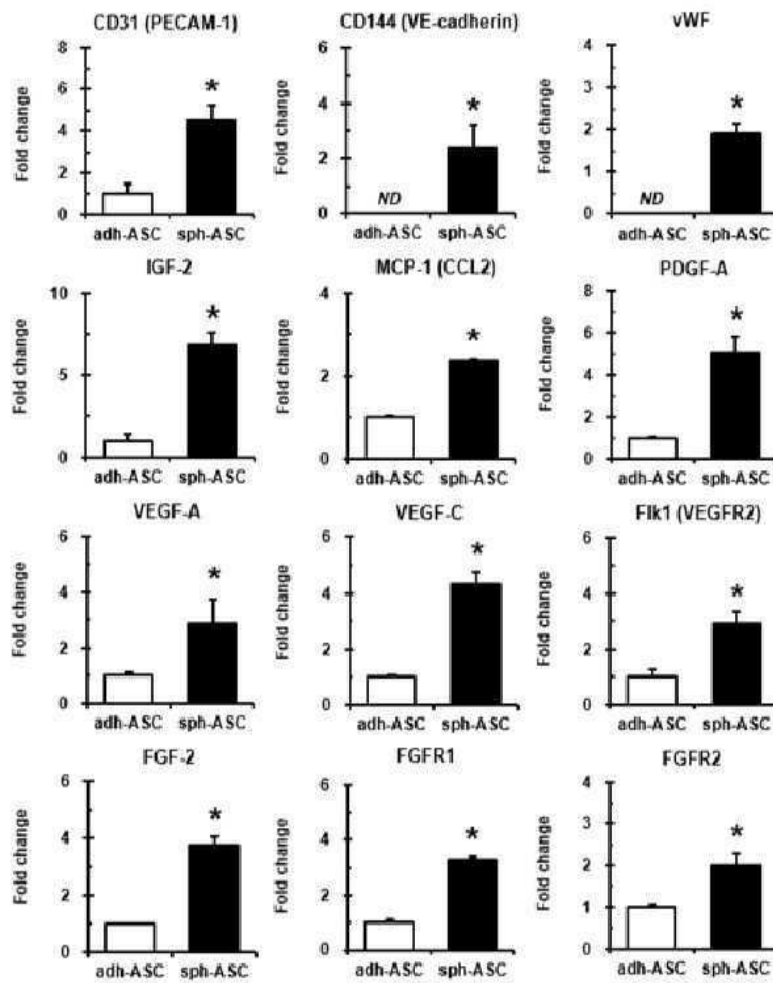
도면6



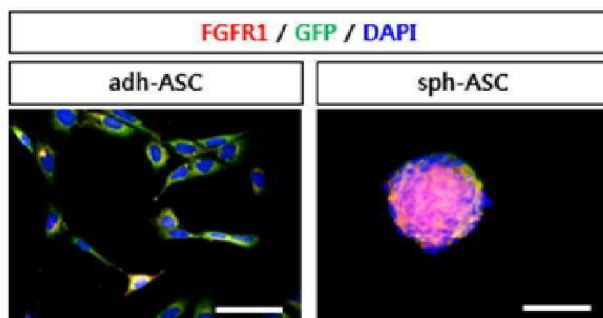
도면7



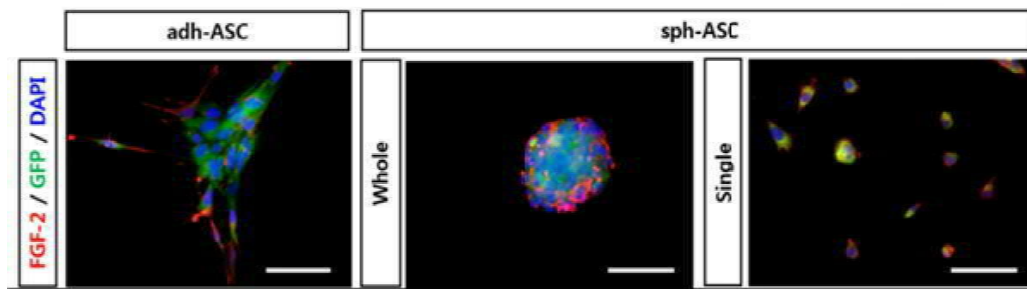
도면8



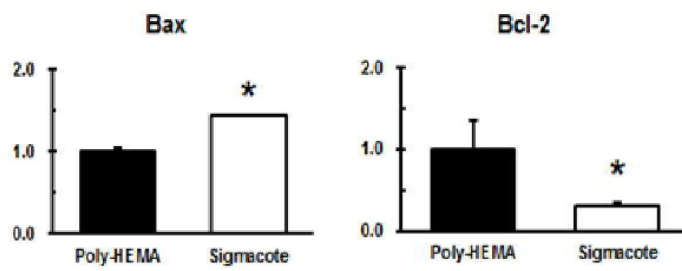
도면9



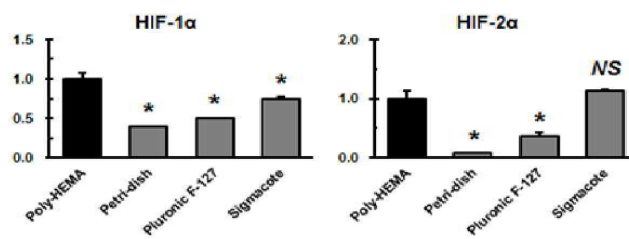
도면10



도면11



도면12



도면13

