

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0124074
(43) 공개일자 2013년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 11/04 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0047700
(22) 출원일자 2012년05월04일
심사청구일자 2012년05월04일

(71) 출원인
인제대학교 산학협력단
경상남도 김해시 어방동 607 인제대학교 내
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
양영일
부산광역시 해운대구 우1동 경동아파트 102동 1003호
이승진
서울특별시 영등포구 여의도동 롯데캐슬아이비 102동 2804호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

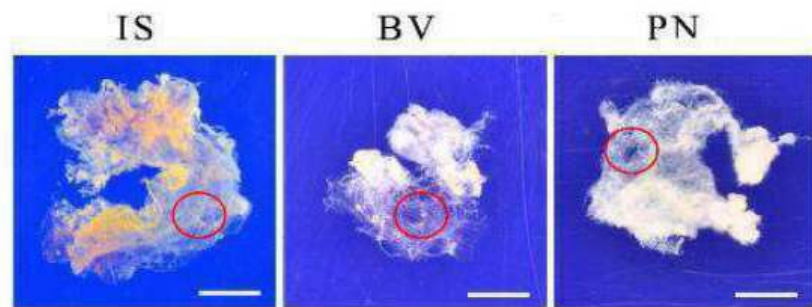
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 위장관, 말초신경, 또는 혈관 기원의 중간엽줄기세포의 배양방법 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 중간엽줄기세포의 배양방법, 상기 배양방법에 의해 얻어진 중간엽줄기세포 및 상기 중간엽줄기세포를 이용한 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법, 상기 배양방법에 의해 배양된 중간엽줄기세포를 제공하며, 본 발명의 중간엽줄기세포는 자가복제 능력 및 다분화 능력이 뛰어나 조직 또는 장기 재생용 세포치료제로의 활용가치가 매우 크다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최민영

경상남도 김해시 장유면 신문리 쌍용예가아파트
106동 104호

김종태

부산광역시 사상구 주례동 럭키아파트 11동 907호

김형인

부산광역시 동래구 안락2동 안락뜨란채 1단지 104
동 905호

최창수

부산광역시 수영구 수영동 수영협성르네상스아파트
204동 2402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100000254

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 세포모방 세포외기질과 niche 보존 배양시스템을 기반으로 한 줄기세포 융합치료제의 개발

연구

기 여 율 1/2

주관기관 인제대학교 산학협력단

연구기간 2008.05.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110007745

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 기관조직 재생유도 연구개발

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2008.04.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및

하이드로젤만을 분해하여 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

1) 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 피브린 하이드로젤 내에 함입시키는 제 1단계;

2) 성장배양액을 첨가하여 5 내지 30rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양 (organ culture)하는 제 2단계; 및

3) 유로키나아제, 스트렙토키나아제 및 플라즈민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분해효소를 처리하여 피브린 하이드로젤만을 분해시켜, 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포 및 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 회수하는 제 3단계; 및

4) 상기 회수된 중간엽줄기세포를 단층배양법으로 증폭시키는 제 4단계;

를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 위장관 점막하조직은 위 점막하조직, 소장 점막하조직 및 대장 점막하조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직인, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 말초신경 외막조직은 상지 말초신경 외막조직 및 하지 말초신경 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직인, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 혈관 외막조직은 대정맥 외막조직, 대동맥 외막조직, 중정맥 외막조직 및 중동맥 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직인, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 하이드로젤은 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 콘드로이틴(chondroitin), 하알루로닉산(hyaluronic acid), 알지닌(alginic acid), 매트릭젤(Matrigel™), 키토산(chitosan), 펩티드(peptide), 피브린(fibrin), PGA(polyglycolic acid), PLA(polylactic acid), PEG(polyethylene glycol) 및 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것인, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 하이드로젤의 분해는 콜라지나아제, 젤라티나아제, 유로키나아제, 스트렙토키나아제, TPA(tissue plasminogen activator), 플라스민(plasmin) 및 히알루로니다아제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 효소를 통하여 분해되는, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α -민무늬근 액틴 (α -smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가지는, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 제3단계에서 회수된 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 다시 제 1단계의 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는, 중간엽줄기세포의 배양방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 배양방법에 의해 얻어진 중간엽줄기세포이며, 상기 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α -민무늬근 액틴 (α -smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가지는 중간엽줄기세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 조골세포, 지방세포, 연골세포, 혈관내피세포, 신경세포 및 골격근세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포로의 분화력을 지닌, 중간엽줄기세포.

청구항 12

제10항 또는 제11항의 중간엽줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는, 조골세포, 지방세포, 연골세포, 혈관내피세포, 신경세포 및 골격근세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포의 세포치료제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 하이드로젤과 혼합된, 세포치료제.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 세포치료제는 항염증제제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는, 세포치료제.

명세서

기술분야

본 발명은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 또는 혈관 외막조직으로부터 중간엽줄기세포를 분리, 배양하는 방법 및 상기 방법에 의해 배양된 중간엽줄기세포에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 성체 줄기세포 중 가장 연구가 많이 진행된 것은 조혈모세포(hematopoietic stem cell)이며, 최근 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, 중간엽줄기세포)에 대한 연구들도 활기를 띠고 있다.
- [0003] 1999년 Pittenger 등의 실험에 의하여 사람에서도 골수에서 분리한 중간엽줄기세포가 자가 재생(self renewal) 능력과 뼈, 연골, 지방으로 분화할 수 있는 능력이 있음을 알게 되었다. 이 실험에 의해 성체 중간엽줄기세포가 실험실에서의 조작이 가능함이 알려졌으며, 줄기세포치료의 개념이 도입될 수 있게 되었다. 이후 골수 중간엽줄기세포가 간세포(hepatocyte), 심근세포, 신경 및 뇌세포로 분화될 수 있음이 알려지게 되었으며, 성체 줄기세포도 유전자를 재활성화시키면, 모든 종류의 세포로 분화가 가능함이 알려졌다. 따라서 성체 줄기세포를 이용하여 손상된 인체의 모든 기관을 대체하려는 시도가 활발히 시도되고 있으며, 현재 골절, 건손상, 연골손상, 간부전(hepatic failure), 심근경색, 신경손상, 뇌손상, 뇌졸중, 파킨슨병, 기타뇌신경퇴행성 질환 등의 치료를 위한 활발한 연구가 진행 중이다(Horwitz, E.M. et al., Nat. Med. 5: 309-313, 1999; Pittenger, M.F. et al., Circ. Res. 95: 9-20, 2004).
- [0004] 중간엽줄기세포는 골수(bone marrow), 제대혈(cord blood), 골막(periosteum), 활막(synovium), 지방(fat) 등에서 유래하며, 중배엽 기원의 세포와 조직으로 분화하는 능력이 있을 뿐만 아니라 신경세포와 같은 외배엽 기원의 세포와 조직, 그리고 심근세포로도 분화할 수 있는 다분화능(multipotency) 줄기세포이다. 중간엽줄기세포는 조혈모세포와는 달리 체외 배양과 증폭이 가능하다는 장점을 가지고 있어 세포치료제로서의 그 가능성이 아주 높다. 중간엽줄기세포는 골세포, 연골세포, 반월판세포, 심장근육세포, 신경세포 등으로 분화할 수 있는 능력과 해당 결손 조직을 재건할 수 있는 능력이 실험적 혹은 임상적 연구결과로 입증되어 해당 결손 조직과 장기의 기능을 재건하기 위한 세포치료제로 사용되거나 혹은 임상시험이 진행되고 있다. 즉 중간엽줄기세포는 골다공증, 골절, 관절염, 심근경색, 울혈성심부전, 퇴행성 및 외상성 뇌질환을 치료할 수 있는 세포치료제로 개발되고 있다.
- [0005] 세포치료제로서 중간엽줄기세포는 동물 및 인체 내 조직원에서부터 분리한 후 체외에서 증폭 배양하는 과정이 요구된다. 환자에게 적용하기 위한 세포치료제로서 중간엽줄기세포는 최소 1천만 개 이상의 세포가 요구된다. 중간엽줄기세포를 분리하기 위한 조직원으로는 현재까지 골수가 가장 많이 이용되고 있으나, 골수조직 내 중간엽줄기세포 밀도는 10억 개의 조혈세포 중 1개의 중간엽줄기세포만이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 또한 나이와 반비례하여 급속히 골수 내 중간엽줄기세포 수가 감소하는 것으로 알려져 있다. 중년층 환자에 있어서 골수로부터 중간엽줄기세포 세포치료제를 제조하기 위해서는 최소 100 c.c.의 골수조직을 채취하여야 하며, 채취 과정은 환자의 전신마취 및 침습적 수술이 요구되는 위험성이 동반된다. 또한 골수 내 중간엽줄기세포의 희소성에 기인하여 채취한 후 세포치료제로서 유효용량의 수만큼 증폭배양이 용이하지 않는 단점이 대두되었다.
- [0006] 이로 인하여 중간엽줄기세포를 분리할 수 있는 골수 이외의 조직원을 발굴하는 연구가 활발히 진행되었으며, 중간엽줄기세포는 골막, 활막, 지방, 골격근, 심장, 피부, 제대혈, 제대, 양막, 태반 등에도 존재하는 것이 밝혀지게 되었다. 그러나 이들 조직들의 채취는 침습적 술기와 이에 따른 위험성이 동반되며, 또한 이들 조직들로부터 순도 높은 중간엽줄기세포를 분리하는 기술의 개발이 요구된다. 제대혈 내에도 줄기세포가 존재하는 것이 밝혀졌으나, 출생 시 제대혈을 보관하지 않은 환자의 경우는 자가 세포치료제를 제조할 수 없다는 문제점이 있다.
- [0007] 한편, 종래의 성인 인간에서부터 중간엽줄기세포를 분리하기 위하여 아래에 기술한 두 가지 방법이 널리 적용되고 있다. 첫째, 성인의 골막, 활막, 그리고 지방조직을 콜라제네이즈(collagenase), 디스페이즈(disypase), 혹은 트립신(trypsin) 등과 같은 조직분해효소를 처리하여 고형성 조직으로부터 해리된 단일세포군을 분리하는 조직해리과정(tissue dissociation step)을 거쳐 단일세포를 단층배양법으로 증폭시켰다. 이후 배양용기에 부착되지 않은 세포를 제거시키고, 배양용기에 부착된 세포만을 배양하는 과정을 거쳐서 중간엽줄기세포를 분리 배양하는 방법이 널리 활용되고 있다. 둘째 방법은 첫 번째 방법과 동일하게 고형성 조직의 조직해리과정을 거친 후 얻어진 단일해리세포(single dissociated cells)를 분리한 후 CD34 혹은 CD29와 같은 표지자를 이용하여, 해당 표지자가 발현되는 세포만을 면역학적 방법을 이용하여 정제하고, 이후 단층배양법으로 증폭시키는 방법이 제시되었다.
- [0008] 그러나 상기에 기술한 종래의 중간엽줄기세포의 분리배양 방법은 몇 가지 문제점이 제시되었다. 첫째, 고형성 조직으로부터 단일해리세포를 분리하기 위하여 조직해리과정은 필수적이다. 조직해리과정은 사용한 조직분해효소의 종류, 역가, 반응시간, 반응온도, 사용한 조직의 상태에 따라 얻어지는 단일세포 수는 큰 편차를 나타내며, 또한 조직해리과정 중 세포의 손상은 피할 수 없다는 단점이 널리 제시되었다. 그 결과 조직해리과정

은 표준화하기 어려우며 또한 분리수율이 낮다는 비효율성의 단점이 제시되었다. 둘째, 조직해리과정 후 얻어진 단일해리세포는 기원 장기 혹은 조직을 구성하는 다양하고 이질적 특성을 지닌 세포를 모두 함유하고 있다. 상기 조직에서부터 분리된 단일해리세포는 중간엽줄기세포외에도 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 지방세포, 혈구세포, 섬유모세포를 모두 포함하고 있다. 상기 이질적 단일해리세포에서부터 중간엽줄기세포를 선택적으로 분리하기 위하여 중간엽줄기세포에서만 특정적으로 발현되는 표지자를 이용한 면역학적 정제방법이 요구된다. 그러나 중간엽줄기세포에서만 특이적이고 일정하게 발현되는 표지자는 현재 밝혀져 있지 않다는 근본적인 문제점이 대두되었다.

[0009] 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직은 세포외기질과 수분이 주된 구성 성분이며, 인간 및 포유동물의 모든 고형성 장기를 따라 광범위하게 분포하고 있으나, 본 발명 이전에는 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직, 혈관의 외막조직 내 중간엽줄기세포가 존재할 것이라는 결과는 전혀 알려져 있지 않다.

[0010] 이에, 본 발명은 인간 성인의 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직에서부터 단일공정을 통하여 고 순도의 중간엽줄기세포를 분리 배양하는 방법을 제시하고자 한다. 본 발명에서는 인간 성인의 위장관, 말초신경 및 혈관 내 존재하는 중간엽줄기세포를 선택적으로 분리함에 있어 조직분해효소를 사용하지 않으며, 해당 조직 내 중간엽줄기세포 미세구조를 파괴하지 않으면서도 안정적인 신기능선줄기세포의 분리 배양방법을 제시하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법을 제공하고자 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 배양방법에 의해 얻어진 줄기세포와, 이를 포함하는 세포치료제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법을 제공한다.

[0014] 상기 중간엽줄기세포의 배양방법의 일례로, 1) 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 피브린 하이드로젤 내에 함입시키는 제 1단계; 2) 성장배양액을 첨가하여 5 내지 30rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양 (organ culture)하는 제 2단계; 및 3) 유로키나아제, 스트렙토키나아제 및 플라즈민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분해효소를 처리하여 피브린 하이드로젤만을 분해시켜, 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포 및 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 회수하는 제 3단계; 및 4) 상기 회수된 중간엽줄기세포를 단층배양법으로 증폭시키는 제 4단계;를 포함할 수 있다.

[0015] 상기 위장관 점막하조직은 위 점막하조직, 소장 점막하조직 및 대장 점막하조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직일 수 있다.

[0016] 상기 말초신경 외막조직은 상지 말초신경 외막조직 및 하지 말초신경 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직일 수 있다.

[0017] 상기 혈관 외막조직은 대정맥 외막조직, 대동맥 외막조직, 중정맥 외막조직 및 중동맥 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직일 수 있다.

[0018] 상기 하이드로젤은 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 콘드로이틴(chondroitin), 하알루로닉산(hyaluronic acid), 알지닌(alginic acid), 매트릭젤(Matrigel™), 키토산(chitosan), 펩티드(peptide), 피브린(fibrin),

PGA(polyglycolic acid), PLA(polylactic acid), PEG(polyethylene glycol) 및 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것일 수 있다.

[0019] 상기 하이드로젤의 분해는 콜라지나아제, 젤라티나아제, 유로키나아제, 스트렙토키나아제, TPA(tissue plasminogen activator), 플라스민(plasmin) 및 히알루로니다아제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 효소를 통하여 분해될 수 있다.

[0020] 상기 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α -민무늬근 액틴 (α -smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가질 수 있다.

[0021] 상기 회수된 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직은 다시 제 1단계의 하이드로젤 내에 함입시켜 반복적으로 배양될 수 있다.

[0022] 상기 중간엽줄기세포의 배양방법은 일례로, 1) 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 트롬빈 및 피브리노젠이 혼합된 혼합액에 넣고 25℃ 내지 40℃에서 10 내지 180분간 중합반응을 시킴으로 피브린 하이드로젤 내로 함입시키는 단계; 2) 성장배양액을 첨가하여 25℃ 내지 40℃에서 3 내지 28일간 5 내지 30rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양(organ culture)하는 단계; 3) 하이드로젤의 0.5 내지 4배 (부피비)의 유로키나아제를 20℃ 내지 40℃에서 10 내지 180분간 처리하여 하이드로젤만을 분해시켜, 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포 및 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 회수하는 단계; 및 4) 하이드로젤로부터 회수한 중간엽줄기세포를 단층배양법으로 증폭시키는 단계; 를 포함하며, 상기 배양된 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α -민무늬근 액틴 (α -smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가지는 중간엽줄기세포의 배양방법을 제공한다.

[0023] 본 발명은 상기 배양방법에 의해 얻어진 중간엽줄기세포이며, 상기 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α -민무늬근 액틴 (α -smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가지는 중간엽줄기세포를 제공한다.

[0024] 상기 중간엽줄기세포는 조골세포, 지방세포, 연골세포, 혈관내피세포, 신경세포 및 골격근세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포로의 분화력을 지닐 수 있다.

[0025] 본 발명은 상기 중간엽줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는, 조골세포, 지방세포, 연골세포, 혈관내피세포, 신경세포 및 골격근세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포의 세포치료제를 제공한다.

[0026] 상기 중간엽줄기세포는 하이드로젤과 혼합될 수 있다.

[0027] 상기 세포치료제는 항염증제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직으로부터 분리된 다분화 능력과 자기복제 능력이 뛰어난 중간엽줄기세포를 제공하며, 이는 세포치료제 및 조직공학적 치료제 등의 바이오 신약 생산에 적용 가능하여 산업적 이용가능성이 높을 뿐 아니라, 성체줄기세포의 세포생물학적, 분자생물학적 기초 연구에도 사용되어 자가 증식과 분화 연구와 관련된 주요 세포신호전달기전을 규명하는데 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029]

도 1은 위장관, 말초신경, 혈관으로부터 수집된 점막하조직, 신경외막, 및 혈관외막조직을 나타내는 사진이다 (Scale bar = 1 cm; IS, intestinal submucosa; BV, blood vessels; PN, peripheral nerve tissue).

도 2는 하이드로젤 지지 3차원 장기배양 (organ culture)법으로 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 혈관 외막조직을 배양하는 위상자 현미경 사진이다. 조직 내(Tissue) 방추상 모양의 세포 (arrow)가 피브린 하이드로젤 (Fibrin) 내로 이동하여 성장하는 사진이다 (Scale bar = 100 μ m . ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-BV, 혈관의 외막조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 3은 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직, 또는 혈관의 외막조직을 피브린 하이드로젤 내 함입시킨 후 3차원 배양과정 중 상기 조직에서 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포의 형태학적 특성 및 면역학적 특성을 나타낸 도이다 (Scale bar = 100 μ m, ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-BV, 혈관의 외막조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 4는 하이드로젤 지지 3차원 장기배양 (organ culture) 후 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 세포를 선택적으로 회수한 후, 회수한 세포의 단층배양 환경에서의 성장특성에 관한 도이다 (ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-BV, 혈관의 외막조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 5는 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포를 회식하여 배양접시에 과종한 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 세포의 높은 콜로니 형성 능력, 즉 자기복제 능력을 나타내는 도이다 (ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-BV, 혈관의 외막조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 6은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 세포는 인간 피부 섬유아세포 (human dermal fibroblast, HDF)와 비교하였을 때 더 많은 수의 콜로니를 형성하여, 높은 자기복제 능력을 지닌 것을 보여주는 도이다 (*, $p < 0.01$. ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-BV, 혈관의 외막조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 7은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 세포가 단층배양환경에서 10회 이상 계대배양이 가능하다는 결과를 나타내는 도이다(ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-BV, 혈관의 외막조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 8은 말초신경 외막조직 및 위장관 점막하조직으로부터 유래한 세포의 실험실적 다 분화능력을 보여주는 사진으로서, 위장관 점막하조직 또는 말초신경 외막조직에서 이동 성장한 중간엽줄기세포는 조골세포 (calcein 염색) 및 지방세포 (sudan black 염색)로 분화하는 능력을 보여주는 도이다 (Scale bar = 100 μ m, ACT-IS, 위장관 점막하조직; ACT-PN, 말초혈관의 외막조직).

도 9는 혈관의 외막조직으로부터 유래한 세포의 실험실적 분화능을 보여주는 사진으로서, 혈관의 외막조직에서 이동 성장한 중간엽줄기세포는 조골세포(A위, alizarin red 염색) 및 지방세포 (A아래, oil red O 염색)로 분화하는 능력을 보여주는 도이다 (Scale bar = 100 μ m). 혈관의 외막조직으로부터 유래한 세포를 조골세포로 분화를 유도 시 해당 조골세포 특이 mRNA인 bone sialoprotein, osteocalcin, osteopontin이 발현되고, 지방세포로 분화를 유도 시 지방세포 특이 mRNA인 leptin, lipoprotein lipase, PPAR가 발현되는 것을 나타내는 전기영동 도이다 (B). 또한 혈관의 외막조직으로부터 유래한 세포를 혈관내피세포로 분화를 유도 시 모세혈관모양 구조를 형성하고 (위), acetylated low density lipoprotein을 uptake하고 (아래, 좌), 혈관내피세포 특이 표지자인 CD31을 발현하는 (아래, 우)것을 나타내는 도이다(C).

도 10은 위장관 점막하조직 기원 중간엽줄기세포(IS-MSC) 및 말초신경 외막조직 기원 중간엽줄기세포(PN-MSC)의 생체 내 뼈조직 형성능력을 나타내는 도이다. 이식한 중간엽줄기세포에 의하여 뼈조직(*)이 형성되었으며, 그 주위로 조골세포(화살)가 둘러싸고 있다. 이들 조골세포는 인간-특이 미토콘드리아 항체(Anti-hMT)에 양성으로, 이식한 세포에 의하여 뼈가 형성됨을 나타내고 있다.

도 11은 위장관 점막하조직 기원 중간엽줄기세포(IS-MSC) 및 말초신경 외막조직 기원 중간엽줄기세포(PN-MSC)의 생체 내 지방조직 형성능력을 나타내는 도이다. 이식한 중간엽줄기세포에 의하여 지방조직(A, D, 화살)과 지방세포(B, E, oil red O 염색)이 형성되었으며, 이들 지방세포는 CM-DiI에 양성(C, F)으로 이식한 세포에 의하여 지방조직이 형성됨을 나타내고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법, 상기 배양방법에 의해 배양된 중간엽줄기세포 및 이를 이용한 세포치료제를 제공한다.
- [0031] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 중간엽줄기세포의 배양방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일례로, 상기 중간엽줄기세포의 배양방법은 1) 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 피브린 하이드로젤 내에 함입시키는 제 1단계; 2) 성장배양액을 첨가하여 5 내지 30rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양 (organ culture)하는 제 2단계; 및 3) 유로키나아제, 스트렙토키나아제 및 플라즈민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분해효소를 처리하여 피브린 하이드로젤만을 분해시켜, 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포 및 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 회수하는 제 3단계; 및 4) 상기 회수된 중간엽줄기세포를 단층배양법으로 증폭시키는 제 4단계;를 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 위장관 점막하조직은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 위 점막하조직, 소장 점막하조직 및 대장 점막하조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직일 수 있다.
- [0035] 일례로, 상기 위장관 점막하조직은 위, 소장, 및 대장으로부터 점막하층에 분포하고 있는 조직을 분리하여 지방, 신경 및 혈전을 제거한 조직을 사용할 수 있다.
- [0036] 상기 혈관 외막조직은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 대정맥 외막조직, 대동맥 외막조직, 중정맥 외막조직 및 중동맥 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직일 수 있다.
- [0037] 일례로, 혈관의 외벽에 분포하는 조직을 분리하여 지방, 신경 및 혈전을 제거한 조직을 사용할 수 있다.
- [0038] 상기 말초신경 외막조직은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 상지 말초신경 외막조직 및 하지 말초신경 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직일 수 있다.
- [0039] 일례로, 신경의 외벽에 분포하는 조직을 분리하여 지방, 신경 및 혈전을 제거한 조직을 사용할 수 있다.
- [0040] 상기 조직은 배양 전 조직분해효소 처리과정 없이 생체 내의 구조가 보존된 상태로 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 생체 외에서 하이드로젤-지지 3차원 장기배양 (organ culture)할 수 있다.
- [0041] 상기 하이드로젤은 친수성 고분자가 공유 또는 비공유 결합으로 가교되어져 만들어진 3차원 망상구조물을 의미할 수 있다. 이는 구성 물질의 친수성으로 인해 수용액내 및 수성환경 하에서 많은 양의 물을 흡수하여 팽윤하지만 가교구조에 의해 용해되지 않는 성질을 가지고 있다. 또한, 본 발명의 하이드로젤은 하이드로젤 지지 3차원 장기배양 (organ culture)을 위해 용액상태로 존재하다가 졸과 겔로 전환될 수 있는 상전이 (phase transitional)성 하이드로젤이 바람직하다. 이는 용액상태에서 고형성 장기와 쉽게 혼합할 수 있으며, 졸과 겔로 전이되면서 고형성 장기를 물리적으로 완전하게 3차원 하이드로젤 내로 함입시킬 수 있다. 즉, 액상상태에서 고분자는 중합 (polymerization)과 교차결합 (cross-linkage) 과정을 통하여 겔로 상전이가 이루어지며, 이는 중합효소, 교차결합효소, 그리고 온도의 조절을 통하여 겔로 상전이를 조절할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 하이드로젤은 특별히 한정되는 것은 아니나, 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 콘드로이틴(chondroitin), 하알루로닉산(hyaluronic acid), 알지닌(alginic acid), 매트리지엘(Matrigel™), 키토산(chitosan), 펩티드(peptide), 피브린(fibrin), PGA(polyglycolic acid), PLA(polylactic acid),

PEG(polyethylene glycol) 및 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 콜라겐, 피브린, 매트릭젤, 젤라틴과 같은 생체 내 세포외기질 기원 고분자로 구성된 하이드로젤일 수 있다.

- [0043] 본 발명의 하이드로젤 내로 3차원적으로 함입시킴으로, 하이드로젤은 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직에 안정적인 물리적 지지를 제공함과 동시에 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직 내 존재하는 중간엽줄기세포를 하이드로젤 내로 이동하고 성장할 수 있는 세포외기질 기능을 동시에 제공할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일례로, 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 트롬빈 및 피브리노젠이 혼합된 혼합액에 넣고 25℃ 내지 40℃에서 10 내지 180분간 중합반응을 시킴으로, 상기 조직을 피브린 하이드로젤 내로 3차원적으로 함입시킬 수 있다.
- [0045] 본 발명의 성장배양액(culture media)은 생체 외(in vitro)에서 중간엽줄기세포의 성장을 유도할 수 있는 배지를 의미할 수 있고, 포유동물 세포배양에 사용되는 통상의 배지를 모두 포함할 수 있다. 본 발명의 일례로 상업적으로 제조된 세포배양액인 DMEM, RPMI 1640, F-10, F-12, a-최소필수배지(a-Minimal Essential Medium, a-MEM), Glasgow's Minimal Essential Medium, Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등을 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 배양액 내에는 중간엽줄기세포의 동원, 성장을 촉진시킬 수 있는 성장인자를 추가로 포함할 수 있으며, 이들 성장인자는 혈청, 즉 인간을 포함한 동물의 혈청, bFGF(basic fibroblastic growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), 인슐린(Insulin), EGF(epidermal growth factor), LIF(leukemia inhibitory factor), IGF(insulin-like growth factor), PDGF(platelet-derived growth factor), SCF(stem cell factor) 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 배지는 페니실린, 스트렙토마이신, 겐타마이신 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일례로, 성장배양액은 DMEM:HamsF12 (1:1)혼합물, 우태아혈청, EGF, bFGF, IGF, 겐타마이신으로 구성될 수 있으며, 보다 구체적으로 70 내지 95 (vol/vol) % DMEM:Hams F12 (1:1)혼합물, 5 내지 15 (vol/vol)% 우태아혈청, 5 내지 50 ng/ml EGF, 0.5 내지 10 ng/ml bFGF, 5 내지 50 ng/ml IGF, 5 내지 50 mg/ml 겐타마이신으로 구성될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일례로, 하이드로젤 내로 함입된 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 또는 혈관의 외막조직이 포함된 배양용기에 성장배양액을 첨가하여 25℃ 내지 40℃에서 5일 내지 28일간 배양할 수 있다.
- [0049] 종래에 장기(organ)절편의 3차원 배양은 산소 및 영양분 교환을 증진하기 위하여 공기 중에 장기절편을 노출시켜 배양하는 방법과 오비탈 셰이커(orbital shaker)에서 역동적(dynamic)으로 배양하는 방법이 존재하였는데, 장기절편을 공기 중에 노출시켜 배양하는 방법은 영양분 공급이 제한적이기에 장기간 배양에는 적합하지 않으며, 또한 역동적 배양은 배양액의 와류에 의하여 배양액으로 노출된 장기절편이 shearing 손상을 받게 되는 문제점이 존재하였다.
- [0050] 그러나 본 발명의 하이드로젤에 함입된 상태로 오비탈 셰이커에 장기(organ)배양시, 심근조직이 하이드로젤에 함입되어 있어 shearing 손상을 받지 않을 수 있고 셰이킹(shaking)을 통해 충분한 산소와 영양분을 공급받아 심장전구세포의 성장을 촉진시킬 수 있다.
- [0051] 셰이킹(shaking) 속도는 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 5 내지 30 rpm 속도일 수 있다. 셰이킹 속도가 상기보다 낮을 때는 산소와 영양분의 공급이 충분히 이루어지지 않을 수 있으며, 상기보다 높을 때는 심근절편의 shearing 손상이 일어날 수 있고 하이드로젤 내의 심장전구세포 배양의 안정성이 손상될 수 있다.
- [0052] 상기 하이드로젤-지지 3차원 장기배양 (organ culture) 단계 후 하이드로젤 내로 이동/성장한 중간엽줄기세포들을 회수하기 위해, 하이드로젤만을 선택적으로 분해시킬 수 있다.
- [0053] 상기 하이드로젤의 분해는 하이드로젤 구성 고분자를 선택적으로 분해하는 효소를 배양액에 첨가함으로써 이를 수 있다.
- [0054] 상기 하이드로젤 구성 고분자 분해 효소는 특별히 한정된 것은 아니나, 콜라지네이즈, 젤라티네이즈, 유로카이네이즈(urokinase), 스트렙토카이네이즈(streptokinase), TPA(tissue plasminogen activator), 플라스민(plasmin) 및 히알루로니데이즈(hyaluronidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0055] 일례로, 콜라겐 하이드로젤, 젤라틴 하이드로젤, 혹은 매트릭젤을 사용하여 본 발명의 조직을 3차원 장기배양

(organ culture)한 경우는 콜라지네이즈 혹은 젤라티네이즈를 배양액 내로 첨가하여 하이드로젤을 선택적으로 분해시킬 수 있으며, 피브린 하이드로젤을 사용한 경우는 유로카이네이즈(urokinase), 스트렙토카이네이즈(streptokinase), TPA(tissue plasminogen activator), 플라스민(plasmin) 군에서 하나 이상을 선택하여 배양액 내로 첨가하여 피브린 하이드로젤을 선택적으로 분해시킬 수 있으며, 히아루닌산 하이드로젤은 히알루노니데이즈(hyaluronidase)를 사용하여 하이드로젤만을 선택적으로 분해시킬 수 있다.

[0056] 상기 배양액 내로 하이드로젤 구성 고분자를 선택적으로 분해하는 분해효소를 첨가한 후 20℃ 내지 40℃에서 10분 내지 180분간 반응시키면 하이드로젤만이 선택적으로 분해되나, 하이드로젤 내의 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동/성장한 중간엽줄기세포 및 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 손상 없이 하이드로젤로부터 분리, 회수할 수 있다.

[0057] 상기 하이드로젤로부터 회수한 중간엽줄기세포의 증폭 배양방법은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 단층배양 방법을 이용함으로 고수율의 중간엽줄기세포를 얻을 수 있다.

[0058] 본 발명의 일례로, 하이드로젤로부터 회수한 중간엽줄기세포를 배양용기에 파종후, 배양용기 표면적의 60 내지 90%를 차지하면, 이들 세포를 트립신 (trypsin)-EDTA로 처리하여 배양용기에서부터 떼어내고, 다시 새로운 배양용기에 파종하여 계대배양(subculture)할 수 있다. 이러한 단층배양법으로 15회 이상의 계대배양 과정을 통하여 하이드로젤로부터 회수한 중간엽줄기세포는 100 배 이상 증폭 배양할 수 있다.

[0059] 또한, 상기 하이드로젤만을 선택적으로 분해하여 회수한 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직 및 혈관의 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 다시 하이드로젤 내로 합입시켜 반복적으로 3차원 장기배양(organ culture)을 시행하여 반복적으로 중간엽줄기세포의 분리, 배양이 가능하며, 배양이 끝나고 회수시 하이드로젤만을 선택적으로 분해하기에 중간엽줄기세포의 구조가 온전히 보존된 상태를 유지할 수 있다.

[0060] 상기 배양방법에 의하여 하이드로젤-지지 3차원 장기배양(organ culture) 배양 14일 후에는 1g의 위장관의 점막하조직, 말초신경의 외막조직, 및/또는 혈관의 외막조직으로부터 2백만 개 이상의 중간엽줄기세포를 회수할 수 있었고, 하이드로젤로부터 분리 회수된 중간엽줄기세포의 95% 이상이 생존율을 보였다.

[0061] 또한, 상기의 배양방법에 의해 얻어진 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α-민무늬근 액틴 (α-smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지닐 수 있으며, 자기복제 능력 및 다분화 능력이 뛰어나서, 뼈, 연골, 지방, 힘줄, 혈관, 섬유아세포, 근육세포, 신경세포 등으로 분화할 수 있다.

[0062] 본 발명의 바람직한 일례로, 중간엽줄기세포의 배양방법은 1) 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직을 트롬빈 및 피브리노젠이 혼합된 혼합액에 넣고 25℃ 내지 40℃에서 10 내지 180분간 중합반응을 시킴으로 피브린 하이드로젤 내로 합입시키는 단계; 2) 성장배양액을 첨가하여 25℃ 내지 40℃에서 3 내지 28일간 5 내지 30rpm 속도의 셰이커에서 하이드로젤-지지 3차원 장기배양(organ culture)하는 단계; 3) 하이드로젤의 0.5 내지 4배 (부피비)의 우로키나아제를 20℃ 내지 40℃에서 10 내지 180분간 처리하여 하이드로젤을 분해시켜, 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조직으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 중간엽줄기세포를 회수하는 단계; 및 4) 하이드로젤로부터 회수한 중간엽줄기세포를 단층배양법으로 증폭시키는 단계; 를 포함하는, (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α-민무늬근 액틴 (α-smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가지는 중간엽줄기세포의 배양방법에 의할 수 있다.

[0063] 본 발명은 상기 배양방법에 의해 얻어진 중간엽줄기세포이며, 상기 중간엽줄기세포는 (i) CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 STRO-1으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) flk-1, CD14, CD34, 및 CD45으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (iii) CD140b, CD146, 및 α-민무늬근 액틴 (α-smooth muscle actin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지

자 군에 양성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 가지는 중간엽줄기세포를 제공한다.

- [0064] 상기 중간엽줄기세포는 1 내지 15회까지 노화의 진행 없이 계대배양이 가능하고 110 내지 140회 세포분열능력을 지닐 수 있다.
- [0065] 상기 중간엽줄기세포는 자기복제능력과 다분화 능력이 뛰어나며, 상기 중간엽줄기세포에서 다양한 세포로 분화를 유도하는 방법으로는, 당업계의 공지된 방법에 의할 수 있으며, 분화유도배지로부터 혈청 또는 혈청 대체물을 제거함으로써 또는 분화를 촉진하는 성분을 첨가함으로써 분화를 유도할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일례로, 중간엽줄기세포를 지방세포로의 분화를 유도하기 위한 배지로는 3-아이소부틸-1-메틸크산틴(3-siobutyl-1-methylxanthine), 인도메타신(indomethacin), 텍사메타손(dexamethasone), 인슐린, 우태아혈청을 포함하는 DMEM를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 1 mM 3-아이소부틸-1-메틸크산틴, 60 내지 100 μ M 인도메타신, 0.5 내지 2 μ M 텍사메타손, 1 내지 10 μ g/ml 인슐린, 1 내지 20 % 우태아혈청을 포함하는 DMEM 배지를 사용할 수 있다. 상기 배지에서 분화유도기간은 특별히 한정되는 것은 아니나 5 내지 30일, 바람직하게는 10 내지 20일일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 일례로, 중간엽줄기세포를 조골세포로의 분화를 유도하기 위한 배지로는 텍사메타손, 아스코르베이트-2포스페이트(ascorbate-2-phosphate), (베타)-글리세로포스페이트(β -glycerophosphate), 및 우태아혈청을 포함하는 α -MEM일 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 2 μ M 텍사메타손, 30 내지 80 μ M 아스코르베이트-2-포스페이트, 5 내지 15 mM (베타)-글리세로포스페이트, 1 내지 20 % 우태아혈청을 포함하는 α -MEM일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 일례로, 중간엽줄기세포를 연골세포로의 분화를 유도하기 위해 마이크로매스 배양법(micromass culture method)을 사용할 수 있다. 이때의 분화를 유도하기 위한 배지로는 형질전환성장인자-(베타)1(transforming growth factor- β 1), 아스코르베이트-2-포스페이트, 인슐린, 우태아혈청을 포함하는 DMEM 배지를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 10 μ g/ml 인슐린, 5 내지 20 ng/ml 형질전환성장인자-(베타)1(transforming growth factor- β 1), 30 내지 80 μ M 아스코르베이트-2-포스페이트, 0.1 내지 2 % 우태아혈청을 포함하는 DMEM 배지를 사용할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일례로, 중간엽줄기세포를 혈관내피세포의 분화를 유도하기 위해 피브린 하이드로젤위로 세포를 파종한 후 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), bFGF, EGF, dimethyl methyl sulfoxide(DMSO)를 사용할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일례로, 중간엽줄기세포를 골격근세포의 분화를 유도하기 위해 100% 밀도가 되도록 배양용기에 파종한 후, 형질전환성장인자-(베타)1(transforming growth factor- β 1) 및 10 % 우태아혈청을 포함한 DMEM을 이용하여 골격근세포로의 분화를 유도할 수 있다.
- [0071] 본 발명은 상기 중간엽줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는, 조골세포, 지방세포, 연골세포, 혈관내피세포, 신경세포 및 골격근세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포의 세포치료제를 제공한다.
- [0072] 본 발명에서 중간엽줄기세포 기원 세포치료제는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 바이오의약품 (한국식품의약품 및 미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가 혹은 동종 세포를 체외에서 증폭시키고, 선별하거나, 혹은 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭할 수 있다. 세포 치료제는 세포의 분화 정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며, 본 발명은 특히 줄기세포치료제에 관한 것을 제공한다.
- [0073] 본 발명의 줄기세포는, 조직 세포의 재생 및 회복방법, 그리고 생체 내(in vivo)에서 일어날 수 있는 상기 세포들의 분화 방법을 포함하는 치료방법에 직접적으로 사용될 수 있다. 줄기세포 및 분화된 세포를 이용하여 손상된 조직의 재생 및/또는 형성이 될 수 있으며, 또한 정상적으로 발생하지 않은 경우처럼 기관이 손상 받지 않은 때에도 적용할 수 있다. 따라서 본 발명의 조직세포 재생은 조직의 성장 또는 개선 방법 모두를 포함하도록 넓게 해석되어야 한다.
- [0074] 또한, 본 발명은 상기 중간엽줄기세포 또는 이의 분화된 세포뿐만 아니라, 상기 중간엽줄기세포 또는 이의 분화

된 세포에 유전자 변형을 가한 경우도 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

- [0075] 본 발명의 중간엽줄기세포 및 이로부터 분화된 세포는 특정한 성질을 가지게 유전자 조작될 수도 있고, 그런 후 유전자 치료를 위해 사용될 수도 있다.
- [0076] 본 발명의 일례로, 상기 조골세포로 분화할 수 있는 중간엽줄기세포 또는 상기 분화방법에 의해 조골세포로 분화된 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 골조직 재생 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0077] 상기 골조직 재생용 세포치료제는 골조직 질환, 또는 기형형성 등에 관한 사용될 수 있으며, 일례로 유방암 또는 전립선암 등의 종양이 뼈로 전이되어 발생한 골 전이암 병소(bone metastatic lesion) 혹은 원발성(primary)으로 뼈에 생성된 종양을 치료하기 위하여 방사선 치료 혹은 외과적 절제수술 이후에 발생하는 뼈가 소실된 경우, 골다공증, 류마티스성 또는 퇴행성 관절염, 치주질환, 염증성 치조골 흡수 질환, 염증성 뼈 흡수 질환 및 파게트 질병(Paget's disease) 등에 사용될 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명의 일례로, 상기 지방세포로 분화할 수 있는 중간엽줄기세포 또는 상기 분화방법에 의해 지방세포로 분화가 유도된 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 지방조직 재생용 세포치료제를 제공한다. 상기 지방조직 재생용 세포치료제는 연부조직 결손 관련 질환과 성형 및 미용을 목적으로 사용하는 경우에도 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 일례로, 상기 연골세포로 분화될 수 있는 중간엽줄기세포 또는 상기 분화방법에 의해 연골세포로 분화된 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 연골조직 재생용 세포치료제를 제공한다. 상기 연골조직 재생용 세포치료제는 연골관련 질환 또는 기형형성에 사용될 수 있으며, 일례로 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 외상에 의한 연골손상 등에 사용될 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 일례로, 상기 혈관내피세포로 분화되는 중간엽줄기세포 또는 상기 분화방법에 의해 혈관내피세포로 분화된 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 혈관재생용 세포치료제를 제공한다.
- [0081] 상기 혈관재생용 또는 치료용 세포치료제는 허혈성 질환에 사용될 수 있으며, 혈관형성을 통해 완화, 치료, 또는 예방될 수 있는 임의의 질환 또는 장애의 치료, 완화, 또는 예방에 사용될 수 있다. 일례로, 혈관조직 치료용 세포치료제는 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 허혈성 질환 등에 사용될 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 혈관이 부족 혹은 파괴되어 발생하는 질환인 화상, 창상, 열상, 피부 궤양, 욕창, 당뇨병성 궤양에 사용될 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 일례로, 상기 골격근세포로 분화될 수 있는 중간엽줄기세포 또는 상기 분화방법에 의해 골격근세포로 분화가 유도된 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 근조직 재생용 세포치료제를 제공한다.
- [0083] 상기 근조직 재생용 세포치료제는 사고 및 외상으로 인한 골격근 결손, 신경성 골격근 위축, 이형성 골격근 질환 등에 적용할 수 있지만, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명의 중간엽줄기세포 기원 세포치료제는 치료의 목적에 적합한 방법으로 투여될 수 있으며, 국소 혹은 전신 투여로 환자에게 전달될 수 있다. 일례로, 투여방법으로는 정맥주사, 피하주사, 근육주사, 복강 내 주사 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0085] 상기 세포치료제는 당업계에 알려진 일반적인 세포치료제의 제형으로 이루어질 수 있으며 (참조: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science; Mack Publishing Company, Easton PA]), 일례로, 주사제의 형태로 제조될 수 있고, 외과적인 수술을 통하여 손상된 조직 및 장기에 직접 이식될 수 있으며, 정맥에 투여될 수 있는데, 상기 투여된 세포치료제는 손상된 조직 또는 장기로도 이동할 수 있다.
- [0086] 본 발명의 중간엽줄기세포 또는 상기 중간엽줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 하는 치료용 조성물은 세포 단독 혹은 담체에서 배양된 상태로 환자의 생체 내로 주입될 수 있다.
- [0087] 상기 담체는 그 종류에 있어 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 하이드로젤일 수 있다. 상기 하이드로젤은 구성 고분자의 농도를 조절하여 생체 내에서 분해속도를 조절할 수 있다. 상기 하이드로젤은 세포주입 시 혈액 내로 소실되는 단점을 방지할 수 있으며, 또한 손상부위 내 염증세포 및 효소에 의한 세포손상을 감소시킬 수 있다.
- [0088] 상기 세포치료제는 하나 이상의 희석제를 포함할 수 있는데, 상기 희석제는 특별히 한정된 것은 아니나, 생리식염수, PBS(Phosphate Buffered Saline), HBSS(Hank's balanced salt solution) 등의 완충용액, 혈장 또는 혈액 성분 등이 있을 수 있으며, 상기 희석제 외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을

추가로 포함할 수 있다.

- [0089] 본 발명의 세포치료제의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 세포치료제의 투여량은 바람직하게는 1회 1 ~ 5천만 개 세포이며, 통상적으로 1 회 또는 2 회 투여된다. 그러나 이들의 용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 상처의 정도에 따라 증감될 수 있다.
- [0090] 상기 세포치료제는 추가적으로 항염증제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 항염증제는 하이드로코르티손이 이식된 심장전구세포를 과도한 염증반응으로부터 보호하기 위하여 사용될 수 있고, 줄기세포 동원인자 또는 혈관성장 유도인자를 포함하여 심근 내 줄기세포의 동원 및 혈관성장을 유도함으로써 세포재생 효과를 증대시킬 수 있다.
- [0092] 상기 항염증제는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 COX 억제제, ACE 억제제, 살리실산염(salicylate) 및 벵사메타손(dexamethasone)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0093] 상기 줄기세포 동원 인자는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 IGF, bFGF, PDGF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0094] 상기 혈관성장 유도인자는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 EGF, PDGF, VEGF, ECGF 및 엔지오제닌(angiogenin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0095] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시한 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0096] <실시예>

[0097] 실시예 1. 위장관 점막조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직의 분리 및 피브린 하이드로젤 내로의 함입

[0098] 인제대학교 의과대학 윤리위원회의 승인 후에, 종아리의 말초신경에서부터 외벽에 분포하고 있는 외막조직을 선택적으로 분리하였고, 위, 소장, 그리고 대장에서부터 위장관의 점막하조직을 선택적으로 분리하였고, 종아리 동맥 및 정맥으로부터 혈관 외벽에 분포하고 있는 외막조직을 선택적으로 분리하였다. 현미경하에서 관찰하여 조직 내 지방조직, 신경, 혈전 등을 제거하였다 (도 1). 분리된 조직은 DPBS으로 5분간 5차례 세척하고, 1에서 5 mm³ 크기로 절단한 다음, 1 NIH U/ml 농도의 트롬빈(Sigma, Louis, MO)을 함유한 DMEM에 5분간 2차례 세척하였다. 상기 조직을 1 gm 당 10 ml의 1 NIH U/ml 농도 트롬빈을 함유한 DMEM 용액과 혼합하여 분산시켰다. 이후 트롬빈 용액 내로 동량의 DMEM에 5 mg/ml 농도로 피브리노젠(녹십자, 수원, 대한민국)이 용해된 피브리노젠 용액을 첨가한 후 혼합하였다. 상기 위장관 점막조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직은 트롬빈 및 피브리노젠 혼합용액 1 ml 당 100 ~ 250 mg 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직이 함유되도록 하였다. 상기 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직을 포함한 트롬빈 및 피브리노젠 혼합용액은 하이드로젤이 형성되기 전에 100-mm 배양용기에 옮긴 다음, 습식 챔버(humidified chamber)에서 37℃에서 2시간 동안 중합과정을 거쳤다.

[0099] 트롬빈에 의해서 피브리노젠이 중합되고, 그 결과 용액은 고형성의 피브린 하이드로젤이 형성되며, 그 결과 상기 위장관 점막조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직은 피브린 하이드로젤 내로 3차원적으로 함입되었다.

[0100] 실시예 2. 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직 및 혈관 외막조직의 하이드로젤-지지 3차원 장기배양(organ culture)

[0101] 실시예 1과 같이 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직을 하이드로젤 내로 완전히 함입하였다. 이후 배양접시에 성장배양액을 첨가하였다. 성장배양액은 90 % DMEM:HamsF12 (1:1) 배양액(Invitrogen)에

10 % 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Invitrogen), 10 μ g/ml 젠타마이신(Yuhan, Seoul, Korea)으로 구성되었다. 상기 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직이 함유된 배양용기를 15 rpm 속도의 오비탈 셰이커 (orbital shaker)에 놓고 습식 챔버 (humidified chamber)에 넣은 후 37℃에서 14일간 장기배양 (organ culture)법으로 배양하였다. 성장배양액은 2일에 한번 신선한 성장배양액으로 교체하였다.

[0102] 도 2에서 나타난 바와 같이, 하이드로젤 지지 3차원 장기배양(organ culture)법을 통하여 위장관, 신경, 또는 혈관에서 각각 분리한 모든 조직으로부터 배양 12시간째부터 하이드로젤내로 세포의 이동 성장을 관찰되었고, 배양 6일째 하이드로젤 내 많은 영역이 상기 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직으로부터 이동 성장한 세포가 차지하였고, 배양기간이 증가할수록 세포밀도도 증가하였다 (도2).

[0103] **실시예 3. 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직으로부터 하이드로젤 내로 이동 성장한 중간엽줄기세포의 면역표면학적 특성**

[0104] 실시예 2와 같이 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직을 피브린 하이드로젤 내에 함입시킨 후 체외에서 2주간 장기배양 (organ culture)한 후, 2% 중성포르말린으로 2시간 고정하고, 고정된 조직, 세포, 그리고 하이드로젤은 파라핀에 함입시킨 후 파라핀 블록을 제조한 다음, 헤마톡실린-에오신 (hematoxylin-eosin) 염색을 통하여 배양된 세포의 위치와 형태학적 특성을 규명하였다. 또한, 면역조직화학적 염색 (immunohistochemical staining)을 수행하여 체외배양기간 중 이동 성장한 세포의 면역표면학적 특성을 규명하였다. 사용한 일차항체는 단클론성 항-인간 CD73, CD90, CD105, CD140b, CD146, 알파 민무늬근 액틴 (alpha-smooth muscle actin, SMA)을 사용하였다. 발현 여부는 EnVision™ 시스템 (DAKO)과 3, 3'-다이아미노벤지딘(3, 3'-diaminobenzidine, DAB, Sigma)을 이용하여 평가하였다.

[0105] 도 3에 나타난 바와 같이, 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포는 중간엽줄기세포 표지자인 CD73, CD90, 및 CD105 항체가 95% 이상 균일하게 발현하였으며, 혈관주위세포 표지자인 CD140b, CD146, 그리고 SMA를 균일하게 발현하였다 (도 3). 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포의 40%는 CD146를 발현한 반면, 95% 이상의 세포에서 CD140b 및 SMA를 발현하였다.

[0106] **실시예 4. 하이드로젤 내로 이동 성장한 중간엽줄기세포의 선택적 분리 및 단층배양법을 통한 체외 증폭**

[0107] 실시예 2에 기술한 방법으로 피브린 하이드로젤 내 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직을 장기배양한 후 배양용기는 DPBS로 3차례 10분간 세척하였다. 세척 후 하이드로젤 1 ml 용량당 1,000 unit/ml 우로키나아제(urokinase) 및 20 % 송아지혈청(calf serum, CS)을 함유한 DMEM을 첨가하였다. 이후 배양접시는 15 rpm 속도의 오비탈 셰이커(orbital shaker) 위에서, 37℃ 습식 챔버에서 30분에서 2시간 동안 반응시켰다. 피브린 하이드로젤이 분해된 후 25 ml 트랜스퍼 피펫(transfer pipette)을 이용하여 반복적으로 흡입 및 방출 과정을 통하여 피브린 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포의 유리를 촉진시킨 후, 용액 내로 해리된 세포를 코니컬 튜브(conical tube)에 옮긴 후 100 x g force에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 가라앉은 세포는 성장배양액으로 분산시켰다. 이후 통상적인 단층배양법으로 피브린 하이드로젤로부터 회수한 세포를 증폭 배양하였다. 하이드로젤로부터 회수한 세포는 배양용기 1 cm² 당 2000개의 수로 파종하였다. 파종한 세포가 배양용기 면적의 80 %를 차지할 때 트립신-EDTA (Invitrogen)를 이용하여 배양접시로부터 떼어낸 후 새로운 배양용기에 2,000 cells/cm² 농도로 파종하여 계대배양하였다.

[0108] 우로키나아제 투여 후 피브린 하이드로젤은 느슨해지며 분해되기 시작하였다. 피브린 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포는 우로키나아제 처리 후 하이드로젤로부터 유리되어 반응용액 내로 해리되었다. 트립판블루 배제법 (trypan blue exclusion assay) 분석한 결과 하이드로젤로부터 해리된 세포의 95% 이상이 생존한 것을 확인할 수 있었다. 또한 해리된 세포는 새로운 플라스틱 배양용기로 파종하였을 때 10분 이내에 플라스틱 배양접시에 부착되었다. 이들 세포는 전형적인 중간엽줄기세포와 동일한 방추상 모양의 형태학적 특성을 보였다 (도4).

- [0109] **실시예 5. 피브린 하이드로젤로부터 회수한 중간엽줄기세포의 자기복제 및 증식 능력**
- [0110] 실시예 4와 같이 우로키나아제 처리 후 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서부터 피브린 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포를 선택적으로 회수하였다. 단층배양법 환경에서 분리한 세포의 체외 증폭능력은 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast, CFU-F)와 군집배가시간(population doubling time, PDT)의 분석을 통하여 평가하였다. CFU-F의 형성능력은 하이드로젤로부터 회수한 세포를 5×10^3 cells/cm² 밀도의 60-mm 배양 접시에 파종한 후 성장배양액을 첨가한 후 11일간 배양하였다. 이후 배양용기는 2% 완충 포르말린으로 고정하고 5분간 10% 크리스탈 바이올렛(LabChem Inc., Pittsburgh, PA)으로 염색하였다. 염색용기는 디지털 CCD 카메라로 이미지를 획득하였고, 형성된 CFU-F 수는 영상분석 프로그램(Image J, NIH, Bethesda, MD)을 이용하여 산정하였다. 인간 피부진피에서 분리한 섬유아세포(HDFs)를 대조군으로 사용하였다. 하이드로젤로부터 회수한 세포의 PDT를 측정하기 위해, 2×10^3 세포들을 48-멀티웰(multiwell) 배양용기에 파종한 후 배양하였다. 배양 1일째와 5일째 세포는 CellLyticTM 용액(Sigma)으로 용해하였고, 용해된 샘플 내 DNA 함량은 PicoGreen dsDNA fluorescent dye(Invitrogen)을 사용하여 측정하였다. 형광 마이크로플레이트 리더기(fluorescent microplate reader, SynergyTM HT; Bio-Tek Instruments, Neufahrn, Germany)를 사용하여 발광(emission) 485nm, 여기(excitation) 540nm의 파장에서 형광강도를 측정하였다. 측정된 형광강도를 세포수로 전환하기 위해 지방조직에서 분리한 지방줄기세포를 이용하여 표준곡선을 구하였고, 이 표준곡선을 이용하여 샘플 내 형광강도를 세포수로 변환하였다. PDT는 다음 공식에 따라 산정하였다. $PDT = [(days \text{ in exponential phase}) / ((\log N_2 - \log N_1) / \log 2)]$ 이때, N1은 지수성장기의 초기의 세포수이며, N2는 지수성장기의 말기에서의 세포수이다.
- [0111] 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 피브린 하이드로젤 이동 성장한 세포는 조직의 기원과는 무관하게 단층배양환경에서 방추상 모양을 나타내었다(도 4). 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 이동 성장한 세포의 20%에서 CFU-F를 형성할 수 있었으며(도 5 및 도 6), 조직기원에 따른 자기복제 능력의 차이는 찾을 수 없었다(도 6). 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 이동 성장한 세포는 15회까지 계대배양이 가능하였고 120회 가량 세포 분열할 수 있는 능력을 지는 것을 확인할 수 있었다. 계대배양 4번째부터 10번째까지 PDT는 24.2시간에서 46.7 시간 사이로 비교적 빠르게 성장하였다. 그러나 15회 이상 계대배양할 경우 세포는 PDT가 길어지며 노화되기 시작하였다(도 7).
- [0112] **실시예 6. 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 유래한 중간엽줄기세포의 면역표면학적 특성**
- [0113] 실시예 4의 단층배양법으로 증폭한 후, 계대배양 3번째 세포를 대상으로 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 면역표면학적 특성을 분석하였다. 십만 개 세포는 일차항체 혹은 아이소타입 대조항체(isotype-matched control antibodies)와 30분 동안 반응시켰다. 일차항체는 피코에리트린(phycoerythrin, PE) 또는 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)와 결합된 항-인간 항체들로 CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD133, STRO-1, MHC-I 및 MHC-II를 사용하였다. 형광물질과 결합된 모든 일차항체 및 대조항체는 BD Bioscience(San Jose, CA)에서부터 구입하였다. 형광표지자와 결합되지 않은 비결합된 항체(unconjugated antibodies)들인 Flk-1(R&D Systems, Minneapolis, MN), CD105(R&D Systems), c-kit(DAKO, Glostrup, Denmark), PDGFR- β (CD140b; Abcam, Cambridge, MA), CD146 (Abcam), α -민무늬근 액틴(α -smooth muscle actin, SMA; DAKO)은 10만개 세포와 30분간 반응시킨 후 FITC와 결합된 2차 항체와 30분간 반응하였다. 반응이 종료된 후 세포는 DPBS로 3차례 세척한 후 2% 파라포름알데히드에서 5분간 고정하였다. 각 항체에 대한 양성률은 FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 사용하여 분석하였으며, 최소 만개 이상의 세포에서 발현율을 분석하였다.
- [0114] 표 1에 나타난 바와 같이, 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 기원한 세포는 95% 이상에서 CD29, CD44, CD73, CD90, 및 CD105과 같은 중간엽줄기세포 표지자에 양성이었다. 또한 상기 세포는 45% 가량에서 중간엽줄기세포 표지자중 하나인 STRO-1가 발현되었다. 면역항원 표지자인 I형 MHC 표지자인 HLA-

A,B,C는 95% 이상에서 양성으로 발현되었으나, II형 MHC 표지자인 HLA-DR은 음성이었으며, 상기 결과는 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 기원한 중간엽줄기세포는 동종간 이식이 가능하다는 면역표면학적 특성을 보였다. 또한 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 기원한 중간엽줄기세포는 CD34 및 KDR 및 CD14, CD34, CD45, c-kit 및 CD133 등의 표지자는 모두 음성으로 혈관내피세포 및 조혈계 세포로의 오염이 없다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직에서 기원한 중간엽줄기세포는 CD140b, CD146, 그리고 SMA 등의 혈관주위세포 표지자가 발현되었다.

표 1

Antibody	ACT-IS (%)	ACT-BV (%)	ACT-PN (%)
CD29	97.7	96.8	98.4
CD44	96.6	96.8	98.5
CD73	94.6	95.0	93.4
CD90	98.2	93.2	96.1
CD105	93.0	95.4	93.4
HLA-ABC	96.9	92.4	97.4
HLA-DR	0.8	0.1	0.4
CD14	0.5	0.1	0.1
CD34	1.5	2.8	0.7
CD45	0.7	0.4	0.3
CD133	0.2	0.1	0.1
SMA	88.3	72.4	82.7
PDGFR	95.6	92.7	96.4
STRO-1	52.4	42.8	48.5
c-kit	0.0	0.0	0.0
Flk-1	0.0	0.0	0.0

[0115]

[0116] 실시예 7. 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직 기원 중간엽줄기세포의 다분화 능력

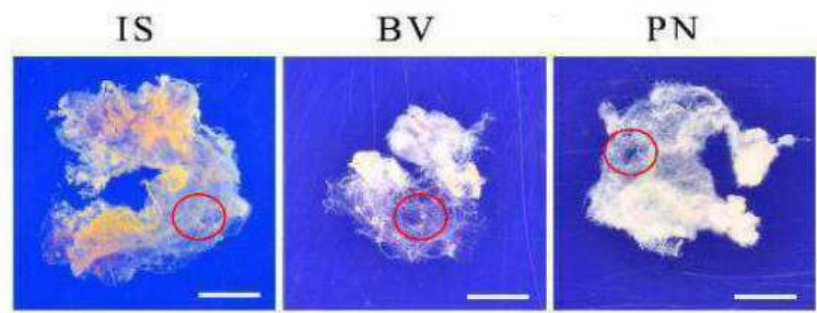
[0117] 실시예 4의 단층배양법으로 증폭한 후, 계대배양 3번째 세포를 대상으로 실험실적 지방세포, 조골세포, 혈관내피세포로의 분화를 유도하였다. 상기 지방세포로의 분화는 상기 세포 30만개를 6-멀티웰(multiwell) 세포배양용기에 파종한 후 0.5 mM 3-아이소부틸-1-메틸크산틴, 80 μ M 인도메타신, 1 μ M 텍사메타손, 5 μ g/ml 인슐린, 10% 송아지혈청을 함유하는 DMEM에서 14일 동안 세포를 배양하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 세포내 지질 축적 여부는 Oil Red O (Sigma) 혹은 Sudan Black 염색을 통하여 확인하였다. 더불어 지방세포 특이 mRNA 발현 여부를 reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 후 전기영동 분석을 통하여 판정하였다.

[0118] 조골세포로의 분화는 위장관 점막하조직, 말초신경 외막조직, 또는 혈관 외막조직 유래 중간엽줄기세포 30만개를 6-멀티웰 세포배양용기에 파종한 후 1 μ M 텍사메타손, 50 μ M 아스코르베이트-2-포스페이트, 10 mM β -글리세로포스페이트, 10% 송아지혈청을 함유한 α -MEM에서 2주간 배양하여 분화를 유도하였다. 조골세포로의 분화여부는 Alizarin Red(Sigma) 혹은 칼세인(calcein, Sigma)염색 통하여 세포외기질의 무기질 침착여부로 판정하였다. 더불어 조골세포 특이 mRNA 발현 여부를 reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 후 전기영동 분석을 통하여 판정하였다.

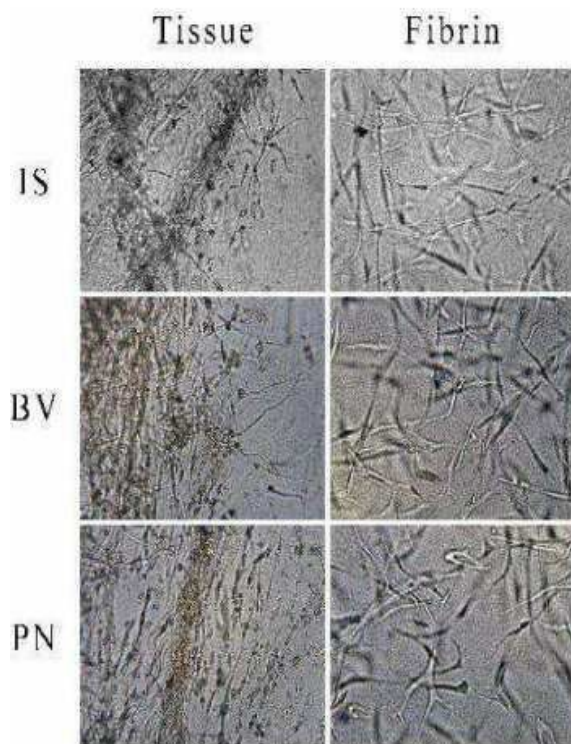
- [0119] 혈관내피세포로의 분화는 위장관 점막하조직에서부터 유래한 중간엽줄기세포 10만개를 피브린 젤이 코팅된 6-웰 티웰 세포배양용기에 파종한 후 1 μ M 텍사메타손, 50 μ M 아스코르베이트-2-포스페이트, 10 ng/ml vascular endothelial growth factor, 1% 송아지혈청을 함유한 DMEM에서 1주간 배양하여 분화를 유도하였다. 혈관내피세포로의 분화여부는 모세혈관양 네트워크 형성, Acetylated-low density lipoprotein uptake, CD31 발현 여부로 판정하였다.
- [0120] 기원 조직과는 무관하게 하이드로젤 내로 이동, 성장한 모든 세포는 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 확인할 수 있었다 (도 8, 도 9). 지방세포로 분화 유도 후 하이드로젤 내로 이동, 성장한 세포는 균일하게 지방세포로 분화하였으며, 분화유도 5일째부터 세포질 내로 지방질의 축적이 관찰되었으며, 지방세포로 분화가 유도된 세포의 90% 이상에서 지방질의 축적이 관찰되었다 (도 8, 도9A). 또한 지방세포로 분화 유도 후 세포는 지방세포 특이 mRNA인 leptin, lipoprotein lipase, PPAR-gamma가 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 8B).
- [0121] 조골세포로 분화가 유도된 세포는 세포의 형태가 입방상피 모양으로 변화하였으며, 알리자린 레드(Alizarin Red) (도 9A) 혹은 칼세인 (calcein) 염색 (도 8)에서 무기질이 침착된 것을 확인할 수 있었다. 또한 조골세포로 분화가 유도된 세포에서 조골세포 특이 mRNA인 bone sialoprotein, osteocalcin, osteopontin mRNAs가 분화 전과 비교하여 저명하게 발현이 증가되었다(도 8B).
- [0122] 위장관 점막하조직 기원 세포를 VEGF와 피브린 젤을 이용하여 혈관내피세포로 분화를 유도하였으며, 분화유도 1 일째부터 세포는 모세혈관과 유사한 네트워크를 형성하였고(도 9C), 혈관내피세포 특이 표지자인 CD31이 발현되었으며, 아세틸화된 저밀도지단백질을 흡수할 수 있는 능력을 보유하였다 (도 9C).
- [0123] **실시예 8. 위장관 점막하조직 및 말초신경 외막조직 기원 중간엽줄기세포의 조직재생능력**
- [0124] 실시예 4의 단층배양법으로 증폭한 후, 계대배양 3번째 중간엽줄기세포 2백만 개를 50 mg 하이드록시아파타이트-트리칼슘 포스페이트 입자 (hydroxyapatite-tricalcium phosphate particles, Zimmer Inc., Warsaw, IN)와 혼합하였다. 이를 누드 마우스(Balb/c nu/nu, Charles River Lab., Seoul, Korea; n = 5)의 요추 인접 부위의 근육사이에 삽입하였다. 이식 4주후에 이식한 이식체를 수거하여 이식체 내 이소성(ectopic) 골 형성여부를 조직학적으로 판정하였다.
- [0125] 더불어 위장관 점막하조직 및 말초신경 외막 기원 중간엽줄기세포의 지방조직 재생능력을 규명하기 위하여 2백만 개의 중간엽줄기세포를 피브린 하이드로젤과 혼합한 후 누드 마우스의 피하층에 주입하였다. 주입 4주 후 수거하여 조직학적 방법으로 지방조직 생성능력을 규명하였다. 누드 마우스로 주입한 중간엽줄기세포의 생체 내 지방세포로의 분화를 규명하기 위하여 CM-DiI(Molecular Probes)로 표지하여 이식하였으며, 주입한 세포가 생체 내 조골세포로의 분화를 규명하기 위하여 인간-특이 미토콘드리아 항체를 이용하여 분석하였다.
- [0126] 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite)와 함께 근육사이로 주입한 위장관 점막조직 기원 중간엽줄기세포(IS-MSC) 및 말초신경 외막 기원 중간엽줄기세포(PN-MSC)에 의하여 조골세포 (화살)가 둘러싸고 있는 이소성 뼈조직(*)이 형성되었다(도 10). 이소성 뼈조직을 둘러싸고 있는 조골세포는 인간-특이 미토콘드리아 항체에 양성으로, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite)와 함께 이식한 인간 중간엽줄기세포가 조골세포로 분화하여 뼈조직을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 피브린 하이드로젤과 함께 피하층으로 이식한 위장관 점막조직 기원 중간엽줄기세포(IS-MSC) 및 말초신경 외막 기원 중간엽줄기세포(PN-MSC)에 하얀 지방조직(A, D, 화살)이 형성되었으며, 조직학적 검사에서 이들 세포 내로 지방질의 침착(B, E)을 확인하여 지방세포로의 분화를 확인할 수 있었고, 이들 지방세포가 CM-DiI에 양성으로 피브린 하이드로젤과 함께 이식한 인간 중간엽줄기세포가 지방세포로 분화하여 지방조직을 형성하는 것을 확인할 수 있었다(도 11).

도면

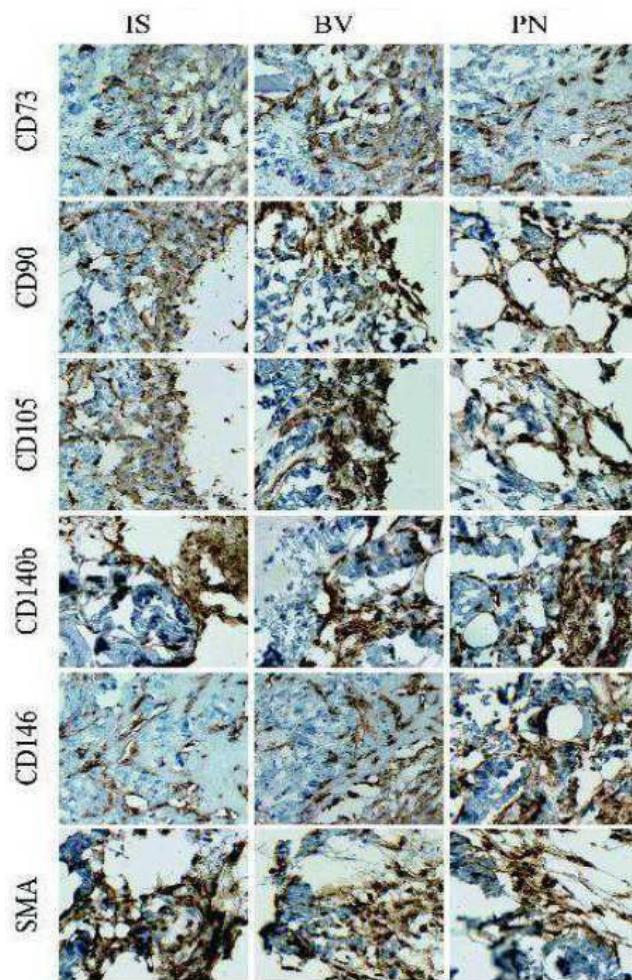
도면1



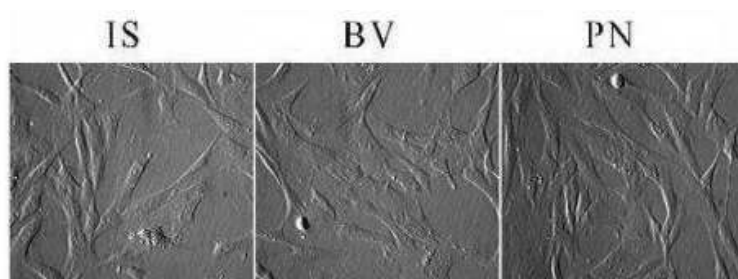
도면2



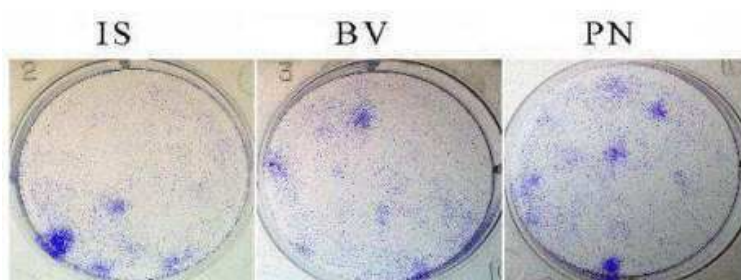
도면3



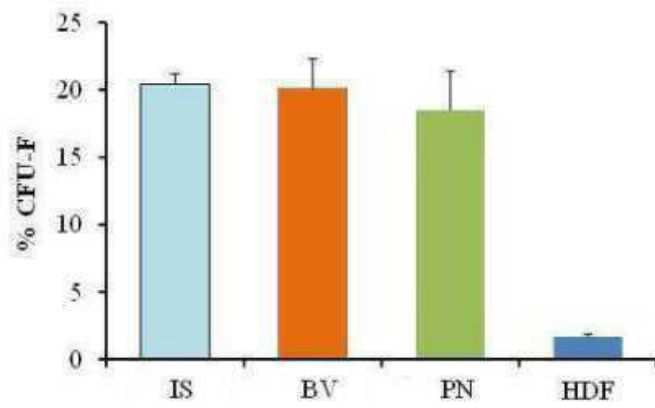
도면4



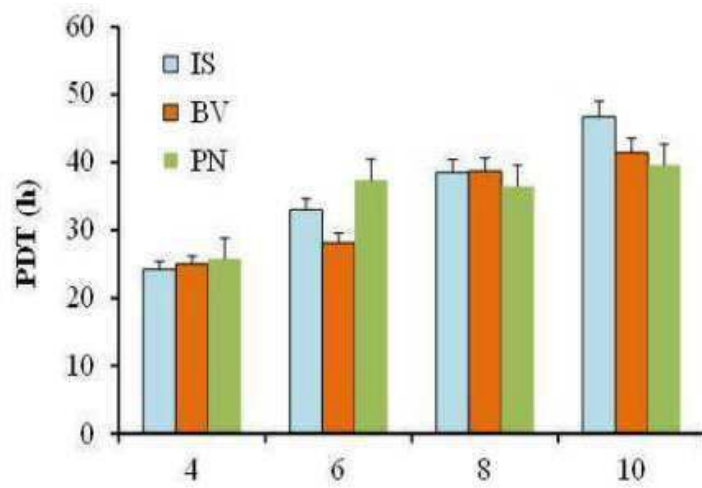
도면5



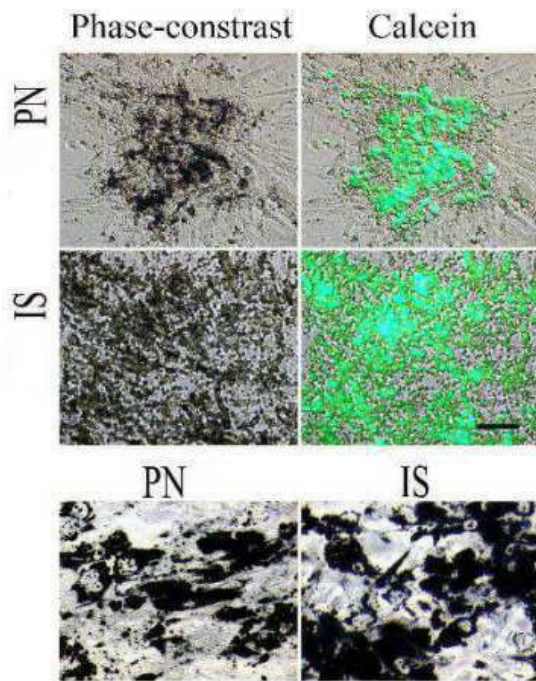
도면6



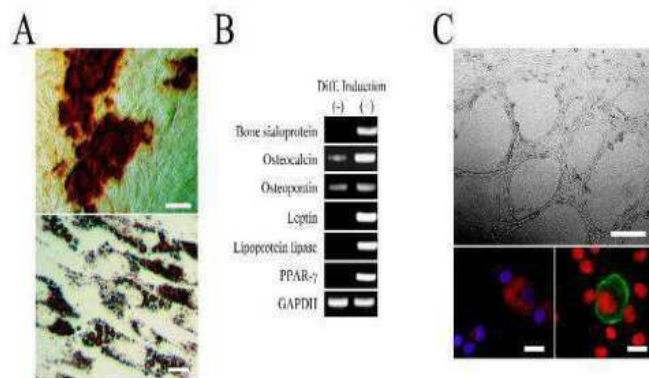
도면7



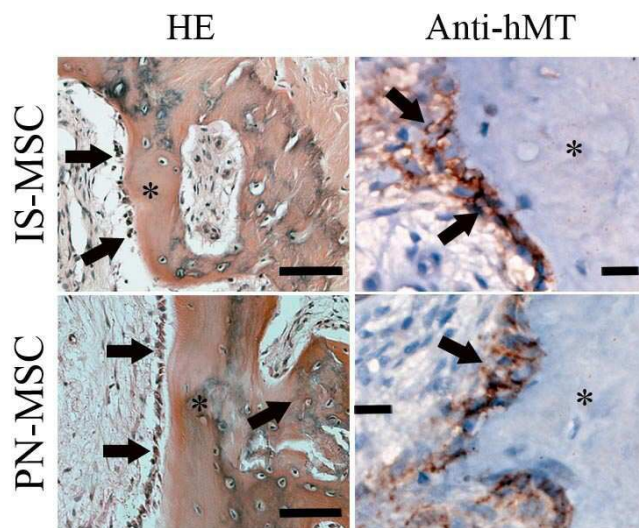
도면8



도면9



도면10



도면11

