



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0032280  
(43) 공개일자 2022년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/42 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/069 (2013.01)  
C12Q 1/42 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0113873  
(22) 출원일자 2020년09월07일  
심사청구일자 2020년09월07일

(71) 출원인  
경상국립대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
이준희  
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 102동 1402호  
(평거동, 들말대경아파트)  
황보 철  
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 107동 504호  
(가좌동, 센트럴헬가)  
(74) 대리인  
김순웅

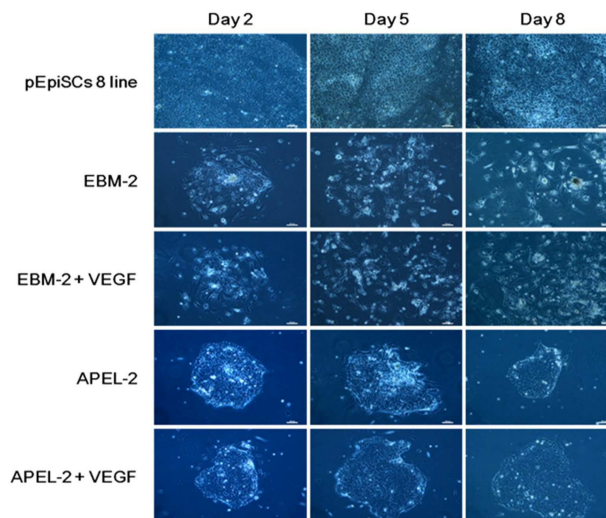
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 VEGF가 최적의 농도로 포함된 배양액으로 배양하여, 혈관내피세포로의 선택적 체외 분화를 유도한 것으로, 이를 통해 분화된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포는 중앙유전자가 포함된 유도만능 줄기세포의 위험성을 배제하여 보다 안전하고, 인공혈관이 수행 불가능한 혈액응고 방지, 혈관 확장 조절 및 혈액내 수송물질의 투과 및 흡수 조절 등의 혈관 본연의 기능이 가능한 혈관질환 모델 생산이나, 혈관 질환 환자에게 이식 가능한 생체 혈관으로 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 2501/165 (2013.01)  
 C12N 2501/734 (2013.01)  
 C12N 2502/02 (2013.01)  
 C12N 2502/1323 (2013.01)  
 C12N 2506/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                                              |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 3072689                                                                      |
| 과제번호        | NRF-2020R1I1A3072689                                                         |
| 부처명         | 교육부                                                                          |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                                                       |
| 연구사업명       | 지역대학우수과학자지원사업                                                                |
| 연구과제명       | 돼지 전능성(배아, 유도만능) 줄기세포 및 성체줄기세포 기반 바이오프린팅 오가노이드를 이용한 3차원 혈관 구조물 생산 및 기능 비교 평가 |
| 기 여 율       | 1/2                                                                          |
| 과제수행기관명     | 경상대학교                                                                        |
| 연구기간        | 2020.06.01 ~ 2025.05.31                                                      |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                        |
|-------------|--------------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 6007728                                                |
| 과제번호        | NRF-2018R1C1B6007728                                   |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                              |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                                 |
| 연구사업명       | 신진연구지원사업                                               |
| 연구과제명       | 혈관 내피세포 노화 조절을 위한 Toll-like receptor 4의 새로운 기능 및 기전 연구 |
| 기 여 율       | 1/2                                                    |
| 과제수행기관명     | 경상대학교                                                  |
| 연구기간        | 2018.03.01 ~ 2021.02.28                                |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 포함된 내피세포 성장 기저 배양액(endothelial cell growth basal medium)으로 배양하는 단계를 포함하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포는 하기와 같은 단계를 통해 획득되는 것을 특징으로 하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법:

- a) 돼지 체내수정란의 배반엽 상층으로부터 세포덩어리를 분리하는 단계;
- b) 상기 분리한 세포덩어리를 배양보조세포 위에서 배양하는 단계;
- c) 상기 배양된 세포덩어리로부터 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포와 배양보조세포를 분리하는 단계; 및
- d) 상기 분리된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 알칼리인산분해효소(Alkaline Phosphatase, AP)의 발현 여부를 확인하여 선별하는 단계.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 d) 단계에 있어서, AP가 발현되지 않는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 선별하는 것을 특징으로 하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 내피세포 성장 기저 배양액은 EBM-2(Endothelial Cell Growth Medium-2) 배양액인 것을 특징으로 하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법.

#### 청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 b)단계 중 상기 세포덩어리는 배양 3 내지 5일 마다 콜라겐분해효소 및 디스파제(Dispase)가 혼합된 혼합 효소로 20 내지 50℃에서 5분 내지 30분 동안 처리된 후 배양보조세포 위에서 배양되는 것을 특징으로 하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 혼합효소는 콜라겐분해효소 및 디스파제가 1:1의 비율로 혼합된 것을 특징으로 하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법.

## 청구항 7

제 2항에 있어서,

상기 배양보조세포는 비활성화된 생쥐배아섬유아세포(Irradiated Mouse Embryonic Fibroblasts, iMEF)인 것을 특징으로 하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법.

## 청구항 8

10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 내피세포 성장 기저 배양액을 포함하는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 배지 조성물.

## 청구항 9

10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 내피세포 성장 기저 배양액을 포함하는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 전능성 줄기세포(Pluripotent Stem Cell)는 모세포의 특징을 딸 세포가 그대로 가지는 자가증식능력(self-renewal)을 가지고, 특정한 신호를 주었을 때 여러 신체 유형으로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)을 가진다. 전능성 줄기세포는 착상 전 배아의 내부세포괴로부터 유도되는 배아줄기세포 (ESCs), 착상 후 배아의 배반엽 상층으로부터 유래되는 배반엽 상층유래 줄기세포 (EpiSCs), 그리고 이미 분화된 체세포에 여러 리프로그래밍 인자로부터 유도되는 유도만능줄기세포 (iPSCs) 등이 있다. 전능성 줄기세포는 혈관 질병의 치료를 위한 잠재적인 치료재료로서 내피세포로 분화하여 사용할 수 있다. 하지만 인간의 배아줄기세포와 유도만능줄기세포는 윤리적인 문제와 안전성의 문제가 뒤따른다.

[0004] 1981년 처음 마우스로부터 배아줄기세포(Embryonic stem cells, ES cells)가 구축된 이후, 원숭이, 인간, 양, 햄스터, 돼지 등 다양한 종에서 줄기세포 연구가 보고되었다. 특히 돼지는 인간과 매우 유사한 생리학적, 해부학적, 면역학적 특성을 가지고 있어 인간 질병연구 모델, 이종 장기 생산 및 신약 생산을 위한 생체 반응기로서 주목을 받아왔다.

[0005] 돼지에서 줄기세포와 관련된 많은 연구 보고가 있었지만 대부분은 배아줄기 유사 세포인 것으로 확인되었으며, 많은 연구에서 돼지 ES cells 유도시 마우스 ES cells 구축 방법을 그대로 적용하였으나, 마우스와 달리 돼지에서는 ES cells을 구축할 수 없었다. 이는 마우스 ES cells이 착상 전 배반포의 내부세포괴(inner stem cells, ICM)로부터 유도되는데 반해 돼지에서는 배반포 상태가 줄기세포 유도에 적합하지 않았음을 시사한다.

[0006] 한편 최근 배반엽 상층 유래 줄기세포(epiblast stem cells, EpiSCs) 연구가 활발히 진행되고 있으며 설치류의 착상 후 초기 상태의 배아 배반엽 상층에서 분리한 EpiSCs는 모든 세포 형태로 분화가 가능한, 전능성이 있는 세포로 보고되었다. 또한 EpiSCs는 activin/Nodal, FGF signaling pathway를 통해 미분화 상태를 유지하면서 체외에서 안정된 상태로 무한 증식할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 하지만 현재까지 상기 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 특정 세포로 선택적으로 분화할 수 있는 특정한 방법

에 대해서는 많은 연구가 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 특정 세포로의 선택적 분화 방법에 대하여 연구하던 중, 특정 인자가 최적의 농도로 포함된 배양액으로 배양하는 경우, 혈관내피세포로 분화를 유도할 수 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 키트를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 포함된 내피세포 성장 기저 배양액(endothelial cell growth basal medium)으로 배양하는 단계를 포함하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 내피세포 성장 기저 배양액을 포함하는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 내피세포 성장 기저 배양액을 포함하는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 키트를 제공한다.

### 발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따르면, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 VEGF가 최적의 농도로 포함된 배양액으로 배양함으로써, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 혈관내피세포로 효과적으로 분화 유도할 수 있으므로, 이를 통해 수득한 혈관내피세포를 혈관질환 모델 생산이나 생체 혈관으로 유용하게 활용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 돼지 배반엽 상층로부터 구축한 줄기세포주 및 이의 알칼리인산분해효소(Alkaline Phosphatase, AP) 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 다양한 조건 하에 혈관내피세포로 체외분화 유도한 후, 이의 형태를 확인한 도이다.
- 도 3은 다양한 조건 하에 혈관내피세포로 체외분화 유도된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 전능성 유전자 발현을 확인한 도이다.
- 도 4는 다양한 조건 하에 혈관내피세포로 체외분화 유도된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 전능성 단백질 발현을 확인한 도이다.

도 5는 다양한 조건 하에 혈관내피세포로 체외분화 유도된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포 마커 발현 여부를 확인한 도이다.

도 6은 다양한 조건 하에 혈관내피세포로 체외분화 유도된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포 중 혈관내피세포로 분화된 줄기세포의 수를 확인한 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 포함된 내피세포 성장 기저 배양액(endothelial cell growth basal medium)으로 배양하는 단계를 포함하는, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도 방법을 제공한다.
- [0023] 정자와 난자의 수정에 의해 형성된 수정란은 하나의 세포로부터 난할을 통해 약 100개 정도의 세포로 이루어진 배반포로 발달한다. 초기 배반포는 내부세포덩어리(inner cell mass, ICM)와 영양막(trophoblast)으로 이루어져 있으며, 후기배반포로 발달하면서 ICM은 다시 배반엽상피(epiblast)와 원시내배엽(primitive endoderm)으로 발달한다. 따라서 후기 배반포는 착상 전 배아의 마지막 단계이며 배반엽상피(epiblast), 원시내배엽(primitive endoderm), 영양막(trophoblast) 이렇게 세 가지의 세포 타입으로 이루어져있다.
- [0024] 본 발명의 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포는 상기 배반엽 상피로부터 유래하는 것을 특징으로 하며, 하기와 같은 단계를 통해 수득될 수 있다.
- [0025] a) 돼지 체내수정란의 배반엽 상층으로부터 세포덩어리를 분리하는 단계;
- [0026] b) 상기 분리한 세포덩어리를 배양보조세포 위에서 배양하는 단계;
- [0027] c) 상기 배양된 세포덩어리로부터 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포와 배양보조세포를 분리하는 단계; 및
- [0028] d) 상기 분리된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 알칼리인산분해효소(Alkaline Phosphatase, AP)의 발현 여부를 확인하여 선별하는 단계.
- [0029] 더불어 상기 d) 단계에 있어서, 분화 표지자인 AP가 발현되지 않는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 선별하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "분화"란 세포가 분열하여 증식하며 전체 개체가 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 말한다. 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어지는 역할을 수행하기 위해 적합한 형태 및 기능으로 변하는 과정을 말한다. 예를 들어, 배아줄기세포와 같은 전능성 줄기세포가 외배엽, 중배엽, 및 내배엽 세포로 변하는 과정도 분화이며, 좁게는 조혈모세포가 적혈구, 백혈구, 혈소판 등으로 변하는 과정도 분화에 해당된다.
- [0031] 본 발명에서 용어, “배양액(culture media)”은 체외배양 조건에서 줄기세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하며, 본 발명의 내피세포 성장 기저 배양액은 VEGF를 포함하지 않은 배양액인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 본 발명은 상기 VEGF를 포함하지 않은 배양액에 VEGF를 최적의 농도로 처리한 후, 이로 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 배양하여 혈관내피세포로 분화를 유도한 것에 특징이 있다.
- [0033] 상기 VEGF는 10 내지 100 ng/ml로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 90 ng/ml, 30 내지 80 ng/ml, 40 내지 70ng/ml 또는 50 내지 60 ng/ml로 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 50 ng/ml로 포함될 수 있다.
- [0034] 더불어 상기 VEGF를 포함하지 않는, 내피세포 성장 기저 배양액은 EBM-2(Endothelial Cell Growth Medium-2) 배양액일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 상기 b)단계 중 상기 세포덩어리는 배양 3 내지 5일 마다 콜라겐분해효소 및 디스파제(Dispase)가 혼합된 혼합효소로 20 내지 50℃에서 5분 내지 30분 동안 처리된 후 배양보조세포 위에서 배양될 수 있다.
- [0036] 상기 혼합효소는 콜라겐분해효소 및 디스파제가 1:1의 비율로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서 용어, “배양보조세포(feeder cell)”란, 줄기세포의 미분화를 돕는 다른 세포, 또는 이의 배양물 등을 말하며, 주로 생쥐배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, iMEF)나 인간포피섬유아세포(human

foreskin fibroblast)를 사용한다.

- [0038] 본 발명에서 배양보조세포는 비활성화된 생쥐배아섬유아세포(Irradiated Mouse Embryonic Fibroblasts, iMEF) 일 수 있으며, 상기 비활성화는 증식, 즉 세포 분열 저해를 의미하며, 상기 iMEF에 미토마이신 C(Mitomycin C)를 처리하여 유도할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따라 분화 유도된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포는 혈관내피세포와 림프구 마커의 발현이 증가한 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 CD31 단백질 마커의 발현이 증대된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 또한 본 발명은 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 내피세포 성장 기저 배양액을 포함하는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 VEGF 외에도 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 혈관내피세포로 분화 유도할 수 있는 성분을 추가적으로 더 포함할 수 있다.
- [0042] 또한 본 발명은 10 내지 100 ng/ml의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 내피세포 성장 기저 배양액을 포함하는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 키트를 제공한다.
- [0043] 상기 키트는 상기한 것에 한정되는 것은 아니며, 다른 시약이나 기구를 포함할 수 있다. 예를 들면, 대상 세포를 배양하기 위한 배양 플레이트나 혈관내피세포로의 분화 상태를 평가 가능한 시약(예를 들면, 신속 레드 바이올렛(Fast Red Violet), 나프톨 AS-BI 인산염 용액(Naphthol AS-BI phosphate solution) 등이 포함된 염색액)을 포함할 수 있고, 배양하는 대상이 되는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 구비하고 있을 수도 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 키트의 제공형태는 분화 유도 배지용 첨가제, 또는 VEGF, 또는 사이토카인, 인지질, 또는 기초 배지와 그 외의 시약 모두를 적절한 용량 및/또는 형태로 함유한 하나의 용기일 수 있거나, 각각 다른 용기에 의해 제공할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 키트는 상술한 본 발명에 따른 방법을 실시하기 위한 순서 등을 기재한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0047] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0049] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

#### [0051] 실시예 1. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포 배양

- [0052] 돼지 배반엽 상층 분리에 적합한 체내수정란을 회수하기 위하여 인공수정 후 9 내지 9.5일째 돼지 자궁을 적출하여 체내수정란을 회수하였다. 자궁에서 회수된 돼지 체내수정란의 배반엽 상층에서 분리한 세포 덩어리로부터 하기와 같은 방법으로 배반엽 상층 유래 줄기세포(porcine Epiblast Stem Cells, pEpiSCs)를 구축하였다.
- [0053] 상기 세포덩어리 유래 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포(pig epiblast stem cells, pEpiSCs)는 1 % MEM 비필수 아미노산(nonessential amino acids), 2 mM L-글루타민(L-glutamine), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin), 0.1 mM  $\beta$ -메르카пто에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol), 20% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum(FBS), Gibco), 5 ng/ml 섬유아세포 증식인자 2(basic Fibroblast Growth Factor 2(bFGF2), R&D), 10  $\mu$  M Y-27632 (Enzo)가 첨가된 배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM/F12), Gibco)에서 마이트마이신 C(mitomycin C)에 의해 비활성화된 생쥐배아섬유아세포(Irradiated Mouse Embryonic Fibroblasts, iMEF) 위에서 배양하였다. 이때 1 mg/ml 콜라겐분해효소IV(Collagenase type IV)와 1 mg/ml 디스파제(Dispase, Gibco)가 혼합된 혼합 효소를 pEpiSCs에 매 3~5일마다 39℃에서 10분 동안 처리한 후 iMEFs 위에서 배양하였다.

#### [0055] 실시예 2. 혈관내피세포로의 체외분화 유도

[0056] pEpiSCs의 혈관내피세포로의 체외분화는 0.5% 젤라틴(gelatin)이 코팅된 배양접시에 4종류의 혈관내피세포 체외 분화 배양액 [Kit 구성 성분 중 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)를 제외한, EGM™-2(Endothelial Cell Growth Medium-2) MV Microvascular Endothelial SingleQuots™ Kit (Lonza)를 첨가한 EBM™-2(Endothelial Cell Growth Basal Medium-2)), 50 ng/ml VEGF가 첨가된 EBM-2 (EBM-2 + VEGF, R&D), StemDiff APEL™ 2 medium (APEL-2, STEMCELL Technologies), 50 ng/ml VEGF가 첨가된 StemDiff APEL™ 2 medium (APEL-2 + VEGF)]에서 8일 동안 배양하였다. 혈관내피세포 체외분화 배양액은 매 3일마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

[0058] **실시예 3. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포 구축 및 Alkaline Phosphatase(AP) 검사**

[0059] 상기 실시예 1과 같이 구축한 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포에서 분화표지자인 AP의 존재 유무를 확인하였다. 상기 AP 검사는 알칼리인산분해효소 검출 키트(Alkaline Phosphatase Detection Kit) (Chemicon/Milipore)의 매뉴얼 방법대로 실시하였다. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포 [pEpiSCs 2 세포계(line) 및 8 세포계]는 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)에서 1 내지 2분 처리한 후, TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20)에서 세 번 세척하였다. pEpiSCs는 염색액 (Fast Red Violet/ Naphthol AS-BI phosphate solution/물을 1:2:1로 혼합하여 제조)에서 15분 동안 배양하였다. 염색 후 NIS Elements 현미경 이미지 소프트웨어 (Nikon, Japan, version 3.0)가 장착된 LEICA 현미경 (LEICA, Germany, type 090-135 001)에서 AP 염색 여부를 검사하였다.

[0060] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포 2세포계(pEpiSCs 2 line)은 장기간 배양에서도 AP 염색이 확인된 반면, 배반엽 상층 유래 줄기세포 8 세포계(pEpiSCs 8 line)의 경우는 AP가 염색되지 않았다. 이 두 줄기세포 라인을 혈관내피세포(Endothelial Cells, EC)로의 체외분화 유도 실험에 사용하였는데, AP가 염색된 pEpiSCs 2 line의 경우 대부분 혈관내피세포(EC)로 체외분화 유도과정 중에 세포들이 사멸되어 혈관내피조직으로 체외분화 실험에 부적격한 것을 확인하였다. 때문에 AP가 염색되지 않는 pEpiSCs 8 line만 혈관내피세포 체외분화 실험에 사용하였다.

[0062] **실시예 4. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포 체외분화 형태 확인**

[0063] pEpiSCs를 혈관내피세포로 분화시키기 위하여 0.5% 젤라틴이 코팅된 배양접시에서 다양한 체외분화 배양액 조건에 따라 8일동안 배양하였다. 그 결과 도 2와 같이, pEpiSCs 8 line 단독, APEL-2 단독 배양액, APEL-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 인간배아줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs)와 같은 납작한 형태의 콜로니가 관찰되었으나, 8일째 EBM-2 단독 배양액과 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 혈관내피세포의 대표적 형태적 특징인 자갈 모양으로 분화된 것이 관찰되었다.

[0065] **실시예 5. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 체외분화 후 전능성 유전자 발현 검사**

[0066] 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 다양한 체외분화 배양액에서 혈관내피세포로 체외분화를 유도하였을 때, 전능성에 관련된 유전자의 발현 양상을 q-PCR 방법으로 확인하였다. 혈관내피세포로 체외분화된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포에서 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 RNA를 추출하였으며, Revoscript™ RT Premix (iNTRON Biotechnology Inc)를 이용하여 cDNA을 합성하였다. RNA와 cDNA 양은 MaestroNano® Spectrophotometer (MAESTROGEN)를 이용하여 측정하였다. Real-time PCR은 THUNDERBIRD® SYBR®qPCR Mix (TOYOBO)를 이용해 샘플링(sampling)하고 Rotor-Gene Q - Pure Detection system (QIAGEN)로 PCR을 실시하였으며, 이를 위해 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다. PCR 조건으로는 40 cycles 동안 95℃에서 60초간 사전-변성(pre-denaturation), 95℃에서 15초간 변성(denaturation), 그리고 60℃에서 60초간 종결(extinction)을 실시하였다. 데이터 분석은  $\Delta\Delta C_t$  방법으로, 유전자 발현은 참조 유전자(reference gene) (18S)의 발현을 표준 값으로 사용하였다. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 체외분화를 위한 다양한 조성의 배양액에서 혈관내피세포로 체외분화를 유도하였을 때, 전능성(pluripotency)에 관련된 유전자의 발현 양상을 q-PCR 방법으로 확인하였고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3과 같이, 8일째 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 OCT-3/4(octamer-binding transcription factor 4), NANOG, SOX2(SRY (sex determining region Y)-box 2), c-MYC

전능성 유전자 모두가 유의적으로 발현이 감소되었다( $p < 0.05$ ). 따라서 이를 통해 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서 체외 분화가 유도된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포만 줄기세포의 전능성을 상실하고 혈관내피세포로 분화가 되었음을 확인할 수 있었다.

표 1

| 유전자     | 정방향(Forward)               | 역방향(Reverse)               |
|---------|----------------------------|----------------------------|
| OCT-3/4 | GGA TAT ACC CAG GCC GAT GT | GTC GTT TGG CTG AAC ACC TT |
| NANOG   | CCC GAA GCA TCC ATT TCC AG | GAT GAC ATC TGC AAG GAG GC |
| SOX2    | CAT GTC CCA GCA CTA CCA GA | GAG AGA GGC AGT GTA CCG TT |
| c-MYC   | GCA ACA ACC GAA AAT GTG CC | CCG CCT CTT GTC ATT CT     |
| 18S     | TCG GAA CTG AGG CCA TGA TT | GAA TTT CAC CTC TAG CGG CG |

#### 실시예 6. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 체외분화 후 전능성 단백질 발현 검사

돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 체외분화 배양액 조건에 따른 혈관내피세포의 분화를 확인하기 위하여, 면역형광염색법을 이용하여 전능성 인자(OCT-3/4, NANOG, SOX2 및 c-MYC)의 단백질 발현을 검사하였다. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 8일 동안 체외분화 배양액에 담겨진 커버슬립 위에서 배양한 후, 4℃에서 20분 동안 4% PFA를 처리하고, 5분 동안 PBS-T로 세 번 세척하였다. 세척된 커버슬립은 blocking solution (5% BSA in PBS-T)에서 1시간 동안 저장하였다. 커버슬립을 밤 동안 4℃에서 블로킹 용액(blocking solution)에서 1차 항체(primary antibodies) [OCT-3/4 (1:100, Santacruz), NANOG (1:100, Abcam), SOX2 (10 ng/ml, R&D System), CD31 (1:100, Novusbio)]에 처리하였다. 그 후, 커버슬립을 5분 동안 PBS-T에 세 번 세척하고, 1시간 동안 실온에서 블로킹 용액에 2차 항체(secondary antibodies) [Alexa fluor<sup>®</sup> 568 Donkey Anti-Goat IgG (1:150, Invitrogen), Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 Goat Anti-Rabbit IgG (1:150, Invitrogen), Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 Donkey Anti-Mouse IgG (1:150, Invitrogen)]와 함께 반응시켰다. 세포의 핵은 15분 동안 실온에서 5  $\mu$ M Hoechst 33342로 처리하였다. 모든 이미지는 Leica Application Suite (LAS) (LEICA, version 2.7)가 장착된 LEICA 형광현미경 (LEICA, DM 2500)을 이용하여 관찰하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타낸 바와 같이, 8일째 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF 배양액에서는 OCT-3/4, NANOG, SOX2의 단백질 발현이 다른 배양액에 비하여 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다. 이에 반하여, pEpiSCs 8 line 단독, APEL-2 단독 배양액, APEL-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 전능성 인자(OCT-3/4, NANOG, SOX2) 단백질 발현이 관찰되었다. 이 결과 EpiSCs 8 line 단독, APEL-2 단독 배양액, APEL-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 혈관내피세포로의 분화가 이루어지지 않고, 전능성 줄기세포의 미분화 상태로 남아 있는 것이 확인되었다.

#### 실시예 7. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포 체외분화 후 혈관내피세포 마커 검사

돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 혈관내피세포로 체외분화 유도한 후, 혈관내피세포와 림프구(lymphocytes)의 마커 단백질인 CD31의 단백질 발현을 면역형광염색법과 웨스턴블롯 방법으로 분석하였다. 혈관내피세포로 체외분화된 세포의 단백질은 단백질분해효소/인산가수분해효소 억제제(protease/phosphatase inhibitor (Cell signaling technology))가 첨가된 용해 완충액(Lysis buffer)을 이용하여 추출하였다. 용해 완충액이 처리된 세포는 30분동안 얼음을 포함한 차가운 물에서 항온 처리 후, 4℃에서 15분 동안 15,000 rpm으로 원심분리하여 상층액만 회수하였으며, Bio-Rad 단백질 분석 염료 시약 농축물(Protein Assay Dye Reagent Concentrate) (Bio-Rad)을 이용하여 단백질 양을 측정하였다. 이 단백질은 SDS-PAGE로 분리하고, PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인(membrane) (Bio-Rad)으로 옮겨 1시간 동안 5% 탈지유(skim milk) (Bioshop)에 블로킹시킨 후, 15분 동안 PBS-T에서 세 번 세척하였다. 멤브레인은 4℃에서 1차 항체[CD31 (1:1000, Novusbio), CD45 (1:1000, Novusbio),  $\beta$ -actin (1:4000, Santacruz)]에 하룻밤 동안 처리하였다. 이 멤브레인은 15분 동안 PBS-T에서 세 번 세척하고, 4℃에서 2차 항체[Goat anti-Rabbit IgG (H&L) (1:1000, Tonbo Biosciences), Goat anti-Mouse IgG (H&L) (1:2000, Tonbo Biosciences)]가 첨가된 5% 탈지유 PBS-T에서 3 내지 5시간 동안 처리하였다. 면역복합체(Immunocomplexes)는 ECL (Bio-Rad)를 이용하여 HRP (horseradish peroxidase) 효소를 활성화하였다. HRP 신호는 ChemiDoc<sup>™</sup> XRS<sup>+</sup> System (Bio-Rad)을 이용하여 탐지하였으며, BioRAD The Discovery Series

Quantity One 10D Analysis software (Bio-Rad)을 이용하여 분석하여 도 5에 나타내었다. pEpiSCs 8 line 단독, APEL-2 단독, APEL-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 CD31의 단백질 발현이 관찰되지 않았으나, EBM-2 단독 배양액 및 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 CD31 단백질 발현이 관찰되었다. 특히 EBM-2 단독 배양액에서보다 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서 CD31의 단백질이 높게 발현되었다. 한편, 백혈구의 단핵백혈구(monocytes)와 림프구(lymphocytes)의 마커인 CD45는 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서 발현되지 않은 것이 관찰되었다. 이를 통해 EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양 조건은 혈관내피 세포 특이적 분화조건임을 확인하였다.

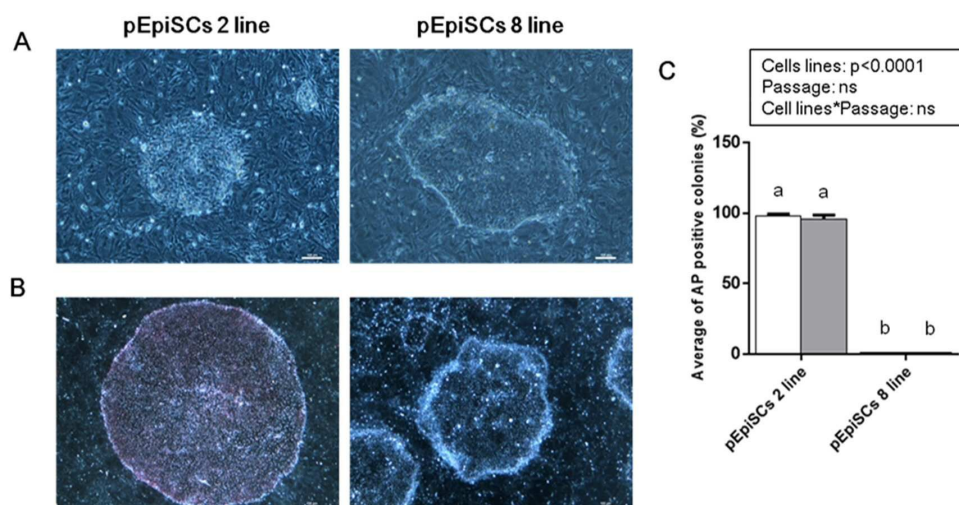
#### [0076] 실시예 8. 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 혈관내피세포 체외분화 후 혈관내피세포 수 검사

[0077] 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 혈관내피세포로 체외분화 유도한 후, FACS(Fluorescence activated cell sorter) 분석 방법으로 혈관내피세포로 분화된 배반엽 상층 유래 줄기세포(pEpiSCs) 수를 측정하였다. 먼저 혈관내피세포로 체외분화된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포는 0.05% 트립신(Trypsin) EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)에서 39℃에서 5분 동안 처리하였다. 트립신이 처리된 세포는 PBS를 이용하여 튜브로 모으고, 5분 동안 300g에서 원심분리하였다. 이 세포들은 착색 완충액(stain buffer (1 x PBS, 2% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH 7.1~7.4))에서 부유하였다. 단일 세포로 분리된 세포는 유세포 분석을 위하여 형광물질이 결합된 항체, CD31-PE(1:100, BD Pharmingen<sup>TM</sup>)로 염색하였으며, 어둡속에서 20~45분 동안 배양하였다. 배양 후, 세포의 펠렛을 착색 완충액에 두 번 세척하여 부유하였다. 염색된 세포는 FACS verse<sup>TM</sup> (BD Biosciences)와 Flow Jo를 이용하여 분석하였다. 그 결과 도 6과 같이 EBM-2 단독의 경우 7.32%, APEL 단독의 경우 3.96%, APEL+VEGF 포함된 배양액의 경우 3.38%의 체외분화율을 보였음에 반해, EBM-2 + 50 ng/ml VEGF이 포함된 배양액에서는 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포의 27.4%가 혈관내피세포로 체외분화 되었음을 확인하였다.

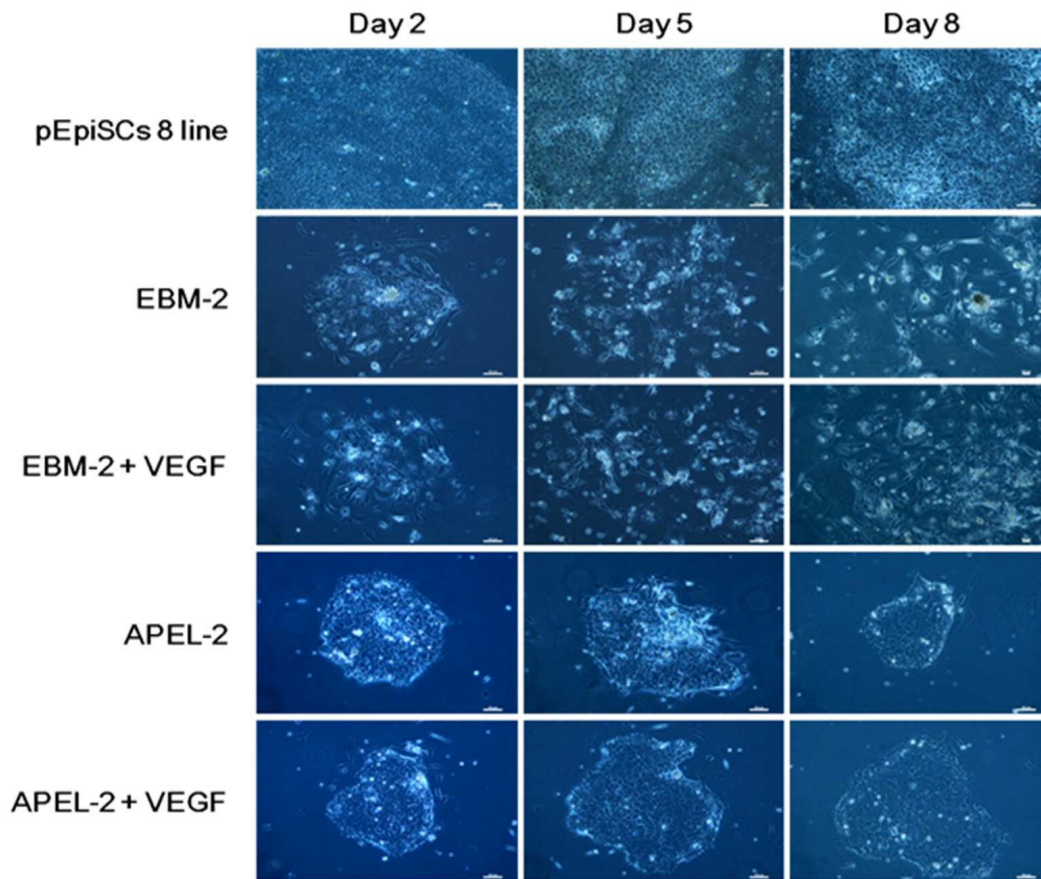
[0079] 종합적으로, 본 발명은 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포를 VEGF가 최적의 농도로 포함된 배양액(EBM-2)으로 배양하여, 혈관내피세포로의 선택적 체외 분화를 유도한 것으로, 이를 통해 분화된 돼지 배반엽 상층 유래 줄기세포는 종양유전자가 포함된 유도만능 줄기세포의 위험성을 배제하여 보다 안전하고, 인공혈관이 수행 불가능한 혈액응고 방지, 혈관 확장 조절 및 혈액내 수송물질의 투과 및 흡수 조절 등의 혈관 본연의 기능이 가능한 혈관 질환 모델 생산이나, 혈관 질환 환자에게 이식 가능한 생체 혈관으로 유용하게 활용할 수 있다.

## 도면

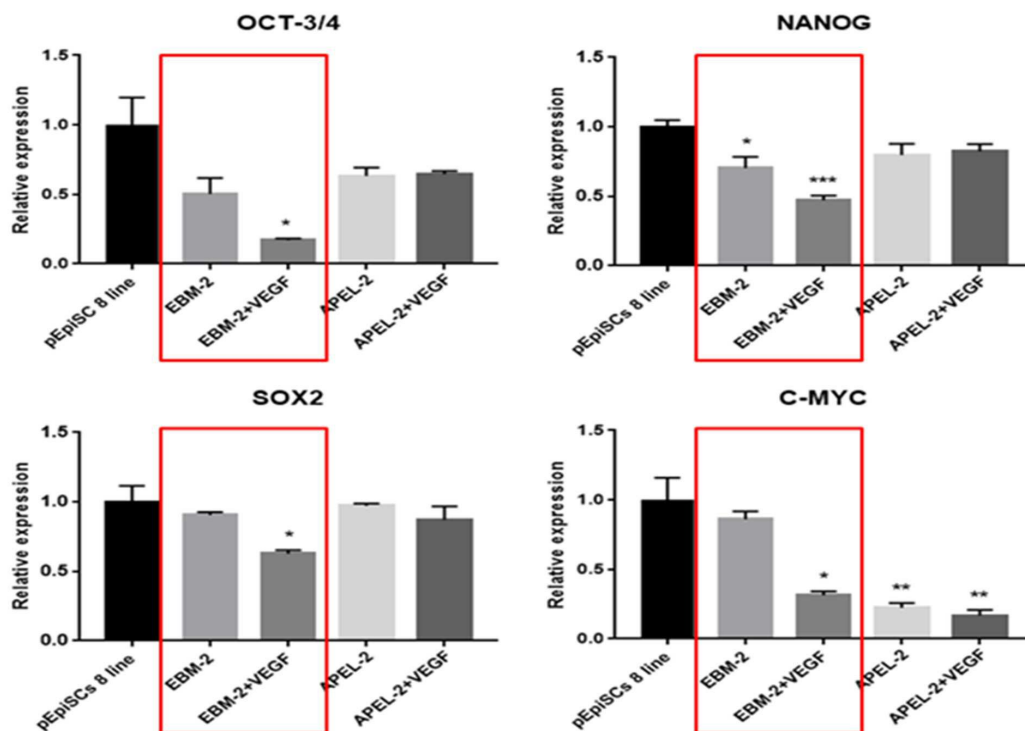
### 도면1



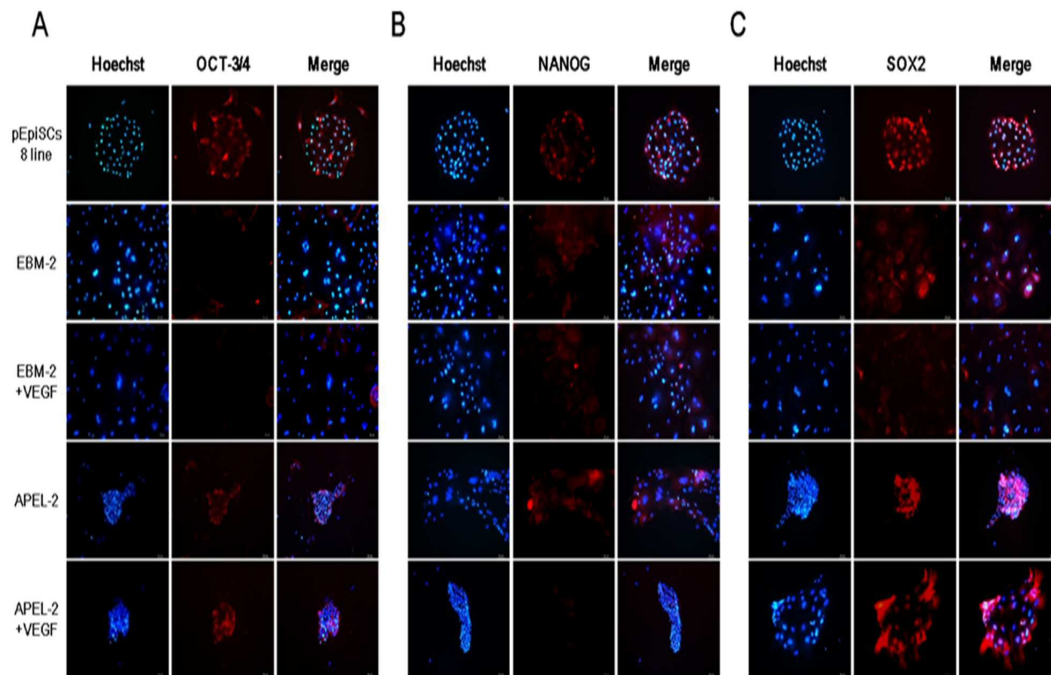
도면2



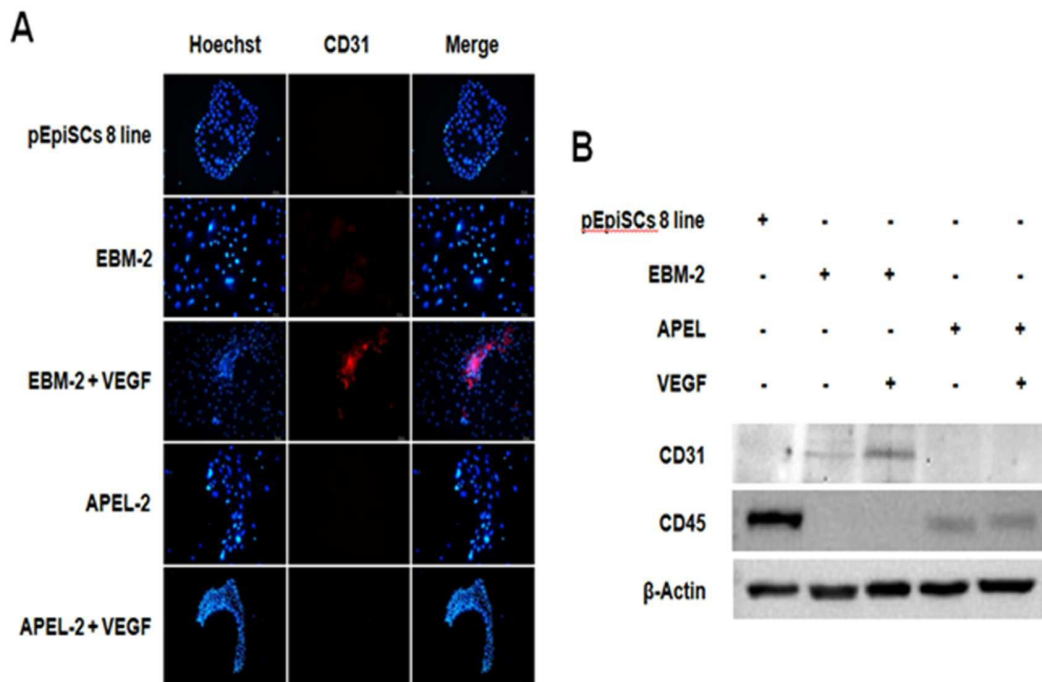
도면3



도면4



도면5



도면6

