



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0080225
(43) 공개일자 2009년07월24일

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0006082

(22) 출원일자 2008년01월21일

심사청구일자 2008년01월21일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김병수

서울 강남구 압구정1동 신사현대아파트 201동603호

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 인간 태반 중간엽줄기세포를 이용한 인간 골수 및 제대혈단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 또는 CD14+단핵구로의 분화배양 방법

(57) 요약

본 발명은 정상 산모로부터 정상 분만 후 제공자에게 해가 없이 채집 가능하면서 추가적 비용 없이 충분한 공급이 가능한 인간 태반으로부터 정제 분리 생산된 중간엽 줄기세포를 인간 골수 혹은 제대혈에서 채집된 단핵세포의 배양을 위한 지지세포로 적용하여 혈청이 포함되어 있지 않은 배양액에서 CD34+ 조혈모세포의 증식배양 및 CD14+ 단핵구로의 분화배양을 유도하는 기술에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구 생산을 위한 배양을 위하여 인간태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 사용하여u 인간 골수 및 제대혈로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구를 분화 생산할 수 있어 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D41

부처명 서울시

연구사업명 서울시 신기술 연구개발 지원사업

연구과제명 제대혈 및 골수 조혈모세포로부터 혈액세포 생산 신기술개발(서울시 신기술연구지원사업)

주관기관 고려대학교

연구기간 2005년 12월 01일 ~ 2007년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 조혈모세포로의 분화배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 태반 중간엽 줄기세포는 산모의 분만 후 태반의 융모막 세포를 채취하여 DMEM 배양액에서 배양하고, 여기서 자라나온 태반세포를 트립신-EDTA 처리하여 계대배양하고, 계대배양 된 세포를 1500 cGy의 방사선을 조사하여 제조된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 F-ligand 및 인터루킨-7을 함유한 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 단핵구로의 분화배양 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 인간 태반 중간엽 줄기세포는 산모의 분만 후 태반의 융모막 세포를 채취하여 DMEM 배양액에서 배양하고, 여기서 자라나온 태반세포를 트립신-EDTA 처리하여 계대배양하고, 계대배양 된 세포를 1500 cGy의 방사선을 조사하여 제조된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 따른 방법에 의해 제조된 조혈 모세포.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 따른 방법에 의해 제조된 단핵구.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 인간 골수 및 제대혈로부터 유래된 단핵세포(mononuclear cell)로부터 CD34+ 조혈모세포(hematopoietic stem cells)로의 증식 생산 및 CD14+ 단핵구(monocyte)로의 분화 생산을 위한 배양 시 지지세포(feeder cells)로 인간 태반유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells derived from human placenta)를 적용시키는 기술에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 또는 CD14+ 단핵구로의 분화 배양 방법에 관한 것이다.

<2> 또 다른 본 발명의 목적은 인간 골수 및 제대혈로부터 CD34+ 조혈모세포(hematopoietic stem cells)로의 증식 생산 및 CD14+ 단핵구(monocyte)로의 분화 생산을 위한 배양 시 지지세포로 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포를 사용한 경우에 기존의 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포를 적용한 경우보다 그 증식 및 분화 배양 효율이 비슷하거나 매우 양호함을 증명함으로써 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구 생산을 위한 배양 기술을 개발함에 있다. 인간 태반 중간엽 줄기세포를 적용시키는 본 기술은 인간 골수 및 제대혈로부터 유래된 단핵세포의 배양 산물들을 CD34+ 조혈모세포 또는 CD14+ 단핵구로 효율적으로 분화시킬 수 있어 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

배경 기술

- <3> 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포는 조혈모세포를 다수 함유하고 있기 때문에 난치병 치료를 위한 중요한 연구대상으로 현재 주목을 받고 있다. 그런데, 현재까지 이와 같은 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 증식 및 분화배양을 위해서는 배양을 위한 지지세포의 적용이 필수적이다. 그런데 본 배양을 위한 지지세포로 쥐 등의 동물에서 유래된 기질세포들이 사용되어 왔으며, 이는 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양 산물의 실제 임상 적용을 어렵게 하는 요인으로 작용하고 있는 실정이다. 따라서 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양을 위하여 인간 유래 기질세포를 적용하는 기술 개발이 필요하며, 이에 관련된 연구 및 기술 개발이 전 세계적으로 진행이 되고 있다.
- <4> 현재, 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 증식 및 CD14+ 단핵구의 분화 배양은 쥐의 섬유아세포(fibroblast) 및 이를 세포주(cell line)로 확립한 세포 등 동물 유래 기질세포와의 복합배양 기법을 근간으로 하고 있다.
- <5> 상기 동물 유래 기질세포와의 복합배양 기법은 연구목적으로 사용될 경우에는 문제가 발생할 소지가 적으나, 직접 인체에 적용을 하기 위한 목적으로 사용하기에는 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포와 동물 기질세포의 상호 작용 속에서 유전자적으로 변형된 세포의 생산 또는 동물 유래 병원균의 침범 등의 예상치 못한 문제점들이 발생할 우려가 있다.
- <6> 이러한 종래 기술에 존재하는 문제점을 해결하고자 골수 중간엽 줄기세포와 피하 섬유아세포 등 인간 유래 지지세포를 개발하고자 하는 여러 연구들이 있었으나 아직 대중적으로 상용화 할 수 있는 기술이 개발되지 않았는데, 그 이유는 다음과 같다. 우선 인간 유래 지지세포를 공급하는 사람은 정상인이어야 하고, 그 채집과정 중에 심각한 문제를 제공자에게 일으키지 말아야 하며, 인간 유래 지지세포의 공급이 충분하면서도 원활하여야 하고, 채집 시 비용-효과 면에서도 적절하여야 하는데 이러한 요건을 만족시키는 것이 어렵기 때문이다. 또한 상용화에 가장 큰 어려움으로 꼽고 있는 난관은 인간 배아 줄기세포의 증식배양 효과가 동물 유래 지지세포와 비견되거나 우월하여야 한다는 점이다. 현재 골수 중간엽 줄기세포의 경우 동물 유래 지지세포와 유사한 효과가 2004년에 McNiece 등에 의하여 보고(Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. I McNiece, J Harrington, J Turney, J Kellner J, EJ Shapall. Cytotherapy, 2004 Vol 6(No.4), 311-317)된 바 있으나, 이 경우에도 사용되는 골수 중간엽 줄기세포의 채집을 위하여 정상인에게 골수를 채집하는 위험이 수반된 침습적 조작을 하여야 하는 문제점이 있었다.
- <7> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양을 위하여 인간 태반유래 중간엽 줄기세포를 지지세포로 사용하는 경우, 기존의 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포를 적용한 경우보다 그 증식 및 분화 배양 효율이 비슷하거나 매우 양호함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 인간 태반으로부터 중간엽 줄기세포를 분리 배양 후 이를 지지세포로 이용하여 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포의 증식배양 또는 CD14+ 단핵구의 분화 배양하는 방법을 제공하는 데 있다.
- <9> 본 발명의 다른 목적은 상기 인간 태반 중간엽줄기세포를 이용한 인간 골수 및 제대혈 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 또는 CD14+ 단핵구의 분화배양 방법을 이용한 CD34+ 조혈모세포 또는 CD14+ 단핵구를 제공하는 데 있다.
- <10> 또 다른 본 발명의 목적은 정상 산모로부터 정상 분만 후 제공자에 해가 없이 채집 가능하면서 추가적 비용 없이 충분한 공급이 가능한 인간 태반으로부터 중간엽 줄기세포를 분리 배양 후 이를 지지세포로 이용하여, 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포의 증식배양 또는 CD14+ 단핵구의 분화배양 시에 효과가 있는 인간 골수 유래 중간엽줄기세포와 비견되거나 우월함을 증명함으로써 보다 안전하고 효율적으로 인체에 적용할 수 있는 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구의 배양생산기술을 개발함에 있다.
- <11> 이를 위하여 출원인 등은 인간 태반 유래 중간엽줄기세포를 지지세포로 적용한 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구의 생산을 시도하면서 그 효과를 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포를 지지세포로 배양한 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포와 비교하고 이를 집락배양 및 현미경적 관찰 등을 통

하여 증명하였다.

과제 해결수단

- <12> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 조혈모세포로의 분화배양 방법을 제공한다.
- <13> 본 발명의 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 조혈모세포로의 분화배양 방법에서, 상기 인간 태반 중간엽 줄기세포는 산모의 분만 후 태반의 융모막 세포를 채취하여 DMEM 배양액에서 배양하고, 여기서 자라나온 태반세포를 트립신-EDTA 처리하여 계대배양하고, 계대배양 된 세포를 1500 cGy의 방사선을 조사하여 제조된 것이 바람직하다.
- <14> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 F-ligand 및 인터루킨-7을 함유한 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 단핵구로의 분화배양 방법을 제공한다.
- <15> 본 발명의 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 단핵구로의 분화배양 방법에서, 상기 인간 태반 중간엽 줄기세포는 산모의 분만 후 태반의 융모막 세포를 채취하여 DMEM 배양액에서 배양하고, 여기서 자라나온 태반세포를 트립신-EDTA 처리하여 계대배양하고, 계대배양 된 세포를 1500 cGy의 방사선을 조사하여 제조된 것이 바람직하다.
- <16> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 조혈모세포로의 분화배양 방법에 의해 제조된 조혈 모세포를 제공한다.
- <17> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 인간 태반 중간엽 줄기세포로 이루어진 지지세포위에 접종하는 단계, 접종된 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포를 F-ligand 및 인터루킨-7을 함유한 무혈청 동물세포 배양액을 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 인간 골수 또는 제대혈 단핵세포로부터 단핵구로의 분화배양 방법에 의해 제조된 단핵구를 제공한다.
- <18> 본 발명의 방법에서는 무혈청 동물세포 배양액을 사용한다. 여기에서 사용하는 무혈청 배양액은 인간을 포함한 동물로부터 유래된 혈청을 함유하지 않고, 그 성분이 화학적으로 규명된 물질로 구성된 동물세포 배양용 배양액을 의미한다. 혈청을 구성하는 정제되고 동정된 물질을 첨가한 배양액은 본 발명에 따른 무혈청 동물세포 배양액에 포함된다. 그러한 배양액의 기본 성분은 아미노산, 당, 유기산과 같은 에너지원, 비타민, pH 조절용 완충 성분, 무기염 등을 포함한다. 배양액은 페놀레드와 같은 pH 지시약을 함유할 수 있다. 무혈청 동물세포 배양액에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, RPMI 배양액, Iscove's 배양액, 최소 필수 배양액, Dulbeccos Modified Eagles Medium 및 기타 당업계에서 공지된 것이 포함된다(참고문헌은, 예를 들어, U.S. 특허 제 6,733,746 호). 시판되어 입수 가능한 기본 배양액에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, Stemline™(Sigma Aldrich), StemSpan™(StemCell Technologies, Vancouver, Canada), Stempro™(Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) HPGM™(Cambrex, Walkersville, MD, USA), QBSF™(Quality Biological, Gaithersburg, MD, USA), X-VIVO (Cambrex Corp., Walkersville, MD, USA) 및 Mesencult™(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)이 포함된다. 상기 및 기타 배양액의 제형은 당업자에게 자명하다.
- <19> 본 기술은 인간태반 중간엽 줄기세포의 정제 생산 및 이들의 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 증식 및 CD14+ 단핵구로의 분화 배양에의 적용 등 크게 2단계로 이루어진다.
- <20> 먼저 정상 분만 후 채집된 태반으로부터 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포에서 CD34+ 조혈모세포로의 증식 또는 CD14+ 단핵구로의 분화 배양을 촉진시키기 위한 지지세포로 적용되는 인간태반 중간엽 줄기세포의 정제 생산 과정은 다음과 같다. 인간 유래 지지세포로 사용되는 정상태반은 분만 후 태반으로부터 융모막 세포를 채취하여 이를 dPBS에 3번 세척하고, 수술용 가위로 충분히 잘게 잘라진 조직을 25m² flask에 넣고, DMEM 배양액을 2일에 한번 교체해주어 일주일간 배양한다. 본 조직에서 자라나온 태반 세포는 Trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을

위해 새로운 flask에서 배양한다. 이렇게 만들어진 태반 세포는 137 Cs gamma-irradiator로 1500 cGy의 방사선 조사 처리 후 배양 지지세포로 사용하고, 나머지는 제대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장한다. 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포 준비를 위한 1500 cGy의 방사선 조사 처리는 공배양 하루 전에 이루어진다. 지지세포에 화학물질을 처리하지 않고 방사선 조사를 하는 경우에는 실험자에 따라 약간의 변동이 있는 화학물질처리 방법과 달리 균일한 조건의 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포를 준비할 수 있다. 0.1% gelatin으로 30분간 coating된 35mm 배양접시에 각각의 세포를 깔고 다음 날 transfer하기 직전에 배양액을 교체한다. 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포들이 올바르게 정제, 분리되었는지를 확인하기 위하여 지방세포(adipocyte)분화 및 골세포(osteocyte) 분화 배양을 실시한다. 방법론적으로 인간 태반 유래 중간엽줄기세포를 인간 단핵세포의 배양 지지세포로 사용하기 위하여 1500 cGy의 방사선 조사를 시행한 예는 본 특허출원이 처음이다. 이 때 생산된 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포의 전반적인 현미경적 모습(도 1)과 지방세포 및 골세포로의 분화능이 인간골수 유래 중간엽 줄기세포와 마찬가지로 관찰되는 양상을 관찰할 수 있다. 또한 염색제 검사상 변이가 없는 정상 염색체를 지니고 있음이 확인할 수 있다(도 4).

<21> 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 정제 생산과정은 다음과 같다. 제대혈은 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취, 냉동 보관하며, 제대혈로부터 단핵세포를 분리하기 위해서는 피콜-하이팩 밀도구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method)과 같은 공지의 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로, 골수 또는 제대혈을 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)과 혼합하여 희석한 후, 희석된 골수 또는 제대혈과 동량의 피콜-하이팩 용액(Ficoll-Hypaque, 밀도; 1.077 g/ml)에 중첩시킨다. 이때, 피콜-하이팩 용액은 사용 전에 실온이 되도록 하며, 희석된 골수 또는 제대혈의 부피가 피콜-하이팩 용액 부피의 3 배가 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 이를 원심분리하여 적혈구층, 단핵세포층 및 혈청층을 분리한다. 파스퇴르 피펫(pasteur pipette) 등을 이용하여 단핵세포층만을 새로운 튜브로 옮기고, PBS 등으로 세척하여 단핵세포층 채취 시 혼입된 피콜-하이팩 용액이나 오염된 혈소판을 제거한다. 이와 같이 분리된 단핵세포는 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에 바로 이용하거나 초저온 냉동시켜 장기간 보관 후 사용할 수 있다.

<22> 앞선 기술한 방법으로 생산된 인간 태반 유래 중간엽줄기세포를 지지세포로 이용하여 골수 및 제대혈의 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 증식 생산을 수행한 배양기법은 다음과 같다. 우선 공배양 하루 전에 1500 cGy로 방사선 조사를 받은 인간 태반 중간엽줄기세포를 2.0×10^5 로 T75 용기에 24시간 동안 배양하여 배양용기 표면에 부착되었음을 확인한다. 그리고 골수 및 제대혈로부터 Ficoll-Hypaque 기법으로 분리된 단핵세포 1.0×10^6 을 QBSF serum free media (Sigma Aldrich, USA) 20 cc를 배양액으로 하여 4 주간 배양을 시행한다. 배양액은 매 1주마다 총량의 1/2만큼 세포 수 측정 및 분석을 위하여 채집되고, 새로운 배양액이 첨가되며 본 과정은 4주간 지속된다. 이 때 태반 유래 중간엽 줄기세포와 같은 기법으로 생산된 골수유래 중간엽줄기세포를 지지세포로 이용하여, 동일한 과정으로 통하여 배양된 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양효율을 측정하여, 태반 유래 중간엽줄기세포의 그 것과 비교, 분석한다. 그리고 지지세포와 공배양을 하지 않고 앞서 언급한 동일한 배지에서만 골수 및 제대혈 유래 단핵세포를 배양한 경우를 대조군으로 한다. 그 결과배양 1-4 주 사이에 인간태반 유래 중간엽줄기세포를 지지세포로 하여배양된 골수 및 제대혈 유래 단핵세포가 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 경우와 유의한 차이가 없으며, 대조군에 비해서는 매우 유의하게 CD34+ 세포의 배양증식 효과가 있음이 관찰되었다. 이에 해당하는 결과는 배양 각 주별로 증식 효과를 그래프로 보여주는 도 5와 유세포 분석 결과를 보여주는 도 6에 나타내었다. 그리고 본 세포들이 진정한 CD34+ 조혈모세포임을 확인하기 위하여 Methocult semisolid Cellulose 배지에서의 집락배양을 실시한 결과 조혈모세포로부터 증식 분화된 CFU-GEEM, CFU-GM 등을 관찰할 수 있음을 확인하였기 때문에 본 세포들이 CD34+ 조혈모세포임을 증명할 수 있었다(도 7). 본 기법의 특징은 무혈청(serum free) 배양액에서 세포 성장을 촉진시키는 시토카인(cytokine)을 사용하지 않고, CD34+ 조혈모세포의 증식배양을 시도한 점에 있다.

<23> 또한 인간 태반 유래중간엽줄기세포를 지지세포로 사용하여 골수 및 제대혈로 유래 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구의 분화배양을 촉진시키기 위하여, 20 ng/mL의 농도로 F-ligand와 Interleukin-7을 혼합한 QBSF serum free media(Sigma Aldrich, USA) 20cc를 배양배지로 하여, 공배양 하루 전에 1500 cGy로 방사선 조사를 받은 인간 태반 중간엽 줄기세포 2.0×10^5 로 부착된 T75 용기에 24시간 동안 배양하였다. 배양용기 표면에 인간 태반 중간엽 줄기세포가 부착된 T75 배양 용기에 단핵세포 1.0×10^6 을 배양한다. 본 배양은 총 6주간 진행된다. 그 밖에 다른 시토카인 혼합으로 Thrombopoietin 생산 유전자를 지닌 아데노바이러스, 각각 50 ng/mL의 농도로 K-ligand, F-ligand, Thrombopoietin을 사용한 경우, 아무 시토카인을 사용하지 않은 경우를 같이 비교 분석하였다. 그 결과 F-ligand와 Interleukin-7을 사용한 군에서 현저하게 CD14+ 단핵구의 배양분화 효과가 있음이 관찰

되었다. 이에 해당하는 결과는 CD14+ 단핵구 분화효과를 그래프로 보여주는 도 8과 유세포 분석결과를 보여주는 도 9에 나타내었다. 그리고 본 세포들이 진정한 CD14+ 단핵구임을 확인하기 위하여 현미경적 관찰을 시행한 결과 전형적인 단핵구의 모습을 확인할 수 있었다 (도 10). 본 기법의 특징은 무혈청(serum free) 배양액에서 세포 성장을 촉진시키는 시토카인(cytokine)을 사용하여, CD14+ 단핵구의 분화배양을 시도한 점에 있다.

<24>

<25>

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<26>

실시예 1. 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포 배양에서 지지세포의 역할을 하는 인간 태반 중간엽 줄기세포의 제조 및 배양 기술

<27>

본 발명은 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양에서 지지세포의 역할을 하는 인간 태반 중간엽 줄기세포를 제조하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다. 하기 실험은 총 10회 반복되었다.

<28>

1-1. 인간 태반 중간엽 줄기세포의 분리

<29>

인간 태반 중간엽 줄기세포를 분리하기 위하여 분만 후 태반으로부터 용모막 조직을 채취하였다. 이를 소독된 생리 식염수로 3회 세척하였고, 소독된 수술용 가위로 충분히 잘게 잘라서 25cm² 플라스크에 넣었다. 여기에 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배양액을 2일에 한번 교체하여 일주일 간 배양하였다. 상기 배양된 조직에서 자라난 중간엽 줄기세포를 Trypsin-EDTA(10 ml)를 처리 후, 계대 배양을 위하여 새로운 플라스크에 옮겨 배양하였다. 3 내지 4회 계대배양을 수행하는 경우 인간 태반 중간엽 줄기세포가 존재하게 된다. 이렇게 분리된 중간엽 줄기세포에 유세포 분석(flow cytometry, Becton-Dickinson, USA)을 실시하였고, 하기에 기재된 것처럼 분리 및 정제 확인 실험을 수행하였다.

<30>

1-2. 인간 태반 중간엽 줄기세포의 분리 및 정제 확인

<31>

상기 분리된 인간 태반 중간엽 줄기세포는 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양을 위한 지지세포로 사용되는 경우 1,500 cGy의 방사선 처리를 시행하여 배양 지지세포로 사용하였고, 나머지는 계대배양 후 세포수를 늘려 이후의 사용을 위해 냉동 저장하였다. 인간 태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 준비하는 과정을 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 배양 하루 전에 수행하였다. 0.1% gelatin으로 30분 동안 coating한 35mm 배양접시에 각각의 세포를 깔고, 다음 날 transfer하기 직전에 배양액을 동일한 양의 MEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사)으로 교체하였다. 인간 태반 중간엽 줄기세포들이 올바르게 정제, 분리되었는지를 확인하기 위하여 직접적인 현미경 관찰(도 1)과 분리된 인간 태반 중간엽 줄기세포를 FITC로 표지된 anti-CD44, CD73, CD105, CD29 antibody(Becton-Dickinson사)로 염색하였고, 유세포분석법을 통해 형광강도(Fluorescence intensity)를 측정하였고, 지방세포(도 2) 및 골세포(도 3)로의 분화배양을 실시하였다.

<32>

본 발명의 인간 태반기질세포의 복합 배양 시 염색체의 안정성 유지 확인을 위하여 염색체 karyotype 분석을 실시하였다. 그 결과 인간 태반기질세포는 50 계대 배양까지 정상적인 46XY 소견을 보이고 있었다(도 4).

<33>

실시예 2. 인간 태반중간엽줄기세포를 지지세포로 이용하여 인간 골수및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포의 생산

<34>

2-1. 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 정제

<35>

인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 정제 생산과정은 다음과 같다. 제대혈은 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취, 냉동 보관하며, 제대혈로부터 단핵세포를 분리하기 위해서는 피콜-하이팩 밀도구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method)과 같은 공지의 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로, 골수 또는 제대혈을 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)과 혼합하여 희석한 후, 희석된 골수 또는 제대혈과 동량의 피콜-하이팩 용액(Ficoll-Hypaque, 밀도; 1.077 g/ml)에 중첩시킨다. 이때, 피콜-하이팩 용액은 사용 전에 실온이 되도록 하며, 희석된 골수 또는 제대혈의 부피가 피콜-하이팩 용액 부피의 3 배가 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 이를 원심분리하여 적혈구층, 단핵세포층 및 혈청층을 분리한다. 파스퇴르 피펫(pasteur pipette) 등을 이용하여 단핵세포층만을 새로운 튜브로 옮기고, PBS 등으로 세척하여 단핵세포층 채취 시 혼입된 피콜-하이팩 용액이나 오염된 혈소판을 제거한다. 이와 같이 분리된 단핵세포는 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에

바로 이용하거나 초저온 냉동시켜 장기간 보관 후 사용할 수 있다.

<36> 2-2. 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포의 생산

<37> 본 발명의 핵심에 해당하는 인간 태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 이용하여 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵 세포로부터 CD34+ 조혈모세포를 생산할 수 있음을 증명하기 위하여 5례의 인간 골수 유래 단핵세포와 5례의 인간 제대혈 유래 단핵세포에 10례의 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포를 배양 지지세포로 적용하여 CD34+ 조혈모 세포의 생산효율을 비교하여 분석하였다. 이 때 QBSF serum free media(Sigma Aldrich, USA) 20cc를 배양배지로 하여 O₂ 농도 20%, CO₂ 농도 5%, 37°C의 온도로 배양하였다. 상기 실험은 총 10회 반복되었다.

<38> 그 결과 CD34+ 조혈모세포의 생산효율이 배양 1 주에는 태반 지지세포 군은 13.6 ± 5.3, 골수 지지세포 (American Type Culture Collection 사) 군은 14.7 ± 3.8, 대조군(지지세포를 사용하지 않은 대조군)은 5.1 ± 2.3의 CD34+ 조혈모세포의 수를 보였다(도 5). 배양 2 주에는 태반 지지세포 군은 29.7 ± 8.3, 골수 지지세포 군은 27.9 ± 7.4, 대조군은 6.7 ± 3.7의 CD34+ 조혈모세포의 수를 보였고, 배양 3 주에는 태반 지지세포 군은 39.4 ± 5.4, 골수 지지세포 군은 41.0 ± 7.2, 대조군은 6.9 ± 4.7 으로 최고점에 도달하였다. 배양 4 주에는 태반 지지세포 군, 골수 지지세포 군, 대조군 모두에서 저하되는 모습을 보였다.

<39> 통계 분석 결과 인간 태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 사용할 때 인간 골수 중간엽 줄기세포를 사용하는 것과 동일한 CD34+ 조혈모세포 증식효과를 보였으며, 지지세포를 사용하지 않은 대조군과 유의한 차이를 보였다(p < 0.001).

<40> CD34+ 조혈모세포를 FITC(5'-fluorescein isothiocyanate) 및 PE(Phycoerythrin)로 표지된 anti-CD34 antibody(Becton-Dickinson사)와 anti-CD38 antibody(Becton-Dickinson사)로 염색하였고, 유세포분석법 (flowcytometry, Becton-Dickinson, USA)을 통해 형광강도(Fluorescence intensity)를 측정하였다. 유세포 분석 결과 증식된 CD34+ 세포 대부분이 CD34+/38+로 분화과정에 있는 CD34+ 조혈모세포임을 알 수 있었다. 배양 3 주째에 CD34+/38+이 전체 CD34+ 세포에서 차지하는 비율을 살펴보면 태반 지지세포 군은 96.9 ± 5.7%, 골수 지지세포 군은 98.5 ± 11.3%, 대조군은 92.7 ± 9.3%로 관찰되었다(도 6). 그리고 상기 세포들에서 시행한 Methocult Semisolid 배양(MethoCult, Stem Cell Technologies, Vancouver)을 수행한 결과 Progenitor에 해당하는 CFU-GEMM(colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte), CFU-GM(colony forming unit-granulocyte, macrophage) 등이 관찰되었고, 이를 통해 CD34+ 조혈모세포로서의 기능을 갖고 있음을 확인할 수 있었다(도 7).

<41> 실시예 3. 인간 태반 중간엽줄기세포를 지지세포로 이용하여 인간골수 및 제대혈 유래단핵세포로부터 CD14+ 단핵구의 생산 기술

<42> 3-1. 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포의 정제

<43> 상기 실시예 2-1과 같은 방법으로 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포를 정제하였다.

<44> 3-2. 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구의 생산

<45> 본 발명의 인간 태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 이용하여 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구의 생산을 증명하기 위하여 5례의 인간 골수 유래 단핵세포와 5례의 인간 제대혈 유래 단핵세포에 5례 등 총 10례의 인간 태반유래 중간엽 줄기세포를 배양 지지세포로 적용하여 각종 시토카인의 조합에서 CD14+ 조혈모 세포의 생산효율을 비교하여 분석하였다 이 때 QBSF serum free media(Sigma Aldrich, USA) 20cc를 배양배지로 하여 O₂ 농도 20%, CO₂ 농도 5%, 37°C의 온도로 배양하였다. 상기 실험은 총 10회 반복되었다.

<46> 총 6개의 군으로 나누어 실험을 진행하였고, 실험은 아래 표 1에 기재된 조건에 따라 진행하였다.

<47> [표 1]

	사용된 사이토카인	배양배지교환	배양기간	태반 중간엽세포 방사선 조사 여부 (1,500 cGy_
Adeno-TPO 군	200 PFU*/mL	1주일 마다	6 주	방사선 조사
FL/IL-7 군	20 ug/mL	1주일 마다	6 주	방사선 조사
KL/FL/TPO 군	50 ug/mL	1주일 마다	6 주	방사선 조사
Adeno-TPO 군	200 PFU/mL	1주일 마다	6 주	방사선 조사 하지 않음

FL/IL-7 군	20 ug/mL	1주일 마다	6 주	방사선 조사 하지 않음
KL/FL/TPO 군	50 ug/mL	1주일 마다	6 주	방사선 조사 하지 않음

<49>

*PFU: Plaque Forming Unit

<50>

그 결과 CD14+ 단핵구의 생산효율이 배양 6 주째에 F-ligand, Interleukin-7 군에서 430,000/uL로 다른 군에 비하여 현저히 높은 사실을 파악할 수 있었다. (도 8) 이는 통계적 분석으로도 매우 유의한 결과이다($p < 0.001$). 또한 비 방사선 조사군 보다 방사선 조사군에서 CD14+ 단핵구의 생산효율이 증가함이 관찰되었다.

<51>

단핵세포를 APC(Allophycocyanin) 및 PE(Phycoerythrin)로 표지된 anti-CD14 antibody(Becton-Dickinson사)와 anti-CD34 antibody(Becton-Dickinson사)로 유세포분석법(FACS Calibur, BD bioscience)을 통해 형광강도(Fluorescence intensity)를 측정하였다. 그리고 유세포 분석 결과 분화된 CD14+ 세포 이외에 증식된 CD34+ 세포는 거의 없음을 확인하였다. 본 실험을 위하여 배양된 세포에서 단핵구를 분리 후 APC 및 PE가 부착된 항 CD14 및 CD34 단클론 항체(anti-HPCA-2, Becton-Dickinson)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 원심분리 후, 1mL의 세척액에 부유시켜 FACS scan(Becton-Dickinson, USA)을 이용하여 CD14+CD34- 세포함유 정도를 측정하였다.

<52>

따라서 본 배양이 CD34+ 조혈모세포의 증식배양이 아니라 CD14+ 단핵구로 분화시키는 선택적인 배양임을 증명하였다(도 9). 또한 본 세포들의 현미경적 관찰 상에서도 전형적인 면역 단핵구임을 관찰할 수 있었다. (도 10)

산업이용 가능성

<53>

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 안전하게 무한대로 공급이 가능한 정상 인간 태반 중간엽줄기세포가 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포로의 증식을 위한 지지세포로 사용이 가능하고 또한 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구로의 분화를 위한 지지세포로 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.

<54>

또한 인간 골수 및 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구 생산을 위한 배양을 위하여 인간태반 중간엽 줄기세포를 적용시키는 본 기술은 인간 골수 및 제대혈로부터 CD34+ 조혈모세포 및 CD14+ 단핵구를 분화 생산할 수 있어 실제 세포치료에 유용하게 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<55>

도 1은 정제, 분리된 인간 태반 중간엽 줄기세포의 모습(No Stain, X 40)이다.

<56>

도 2는 인간태반 중간엽 줄기세포로부터 분화된 지방세포의 모습(No Stain, X 40)이다.

<57>

도 3은 인간 태반 중간엽 줄기세포로부터 분화된 골세포 모습(Von Kossa Stain, X 40)이다.

<58>

도 4는 분리된 인간 태반 중간엽줄기세포의 염색체가 변이 없이 정상임을 보여준다.

<59>

도 5는 인간 단핵세포로부터 CD34+ 조혈모세포의 증식효과가 인간 태반 중간엽 줄기세포를 이용한 경우가 인간 골수 중간엽 줄기세포를 이용한 경우와 차이가 없음을 나타내는 그래프이다.

<60>

도 6은 인간 태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 이용한 경우, 인간 골수 중간엽 줄기세포를 지지세포로 이용한 경우, 그리고 지지세포 없이 배양한 대조군 모두에서 CD34+/38+ 세포가 대부분임을 나타내는 유세포(Flowcytometry) 분석 결과이다[(a) 인간 태반 중간엽줄기세포, (b) 인간 골수 중간엽 지지세포, (c) 지지세포를 사용하지 않은 대조군].

<61>

도 7은 인간 태반 중간엽 줄기세포를 이용하여 분화 유도된 CD34+ 조혈모세포의 Methocult CFU-GEEM 집락배양 모습 (X 200)이다.

<62>

도 8은 인간 태반 중간엽 줄기세포를 지지세포로 이용하여 인간 골수 혹은 제대혈 유래 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구로 분화 유도시 F-ligand와 Interleukin-7을 사용할 때 다른 시토카인을 사용한 경우보다 현저히 인간 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구로의 분화함을 보여준다.

<63>

도 9는 인간 단핵세포로부터 CD14+ 단핵구의 분화효과가 CD34+ 세포의 증식 없이 선택적으로 발생함을 나타내는

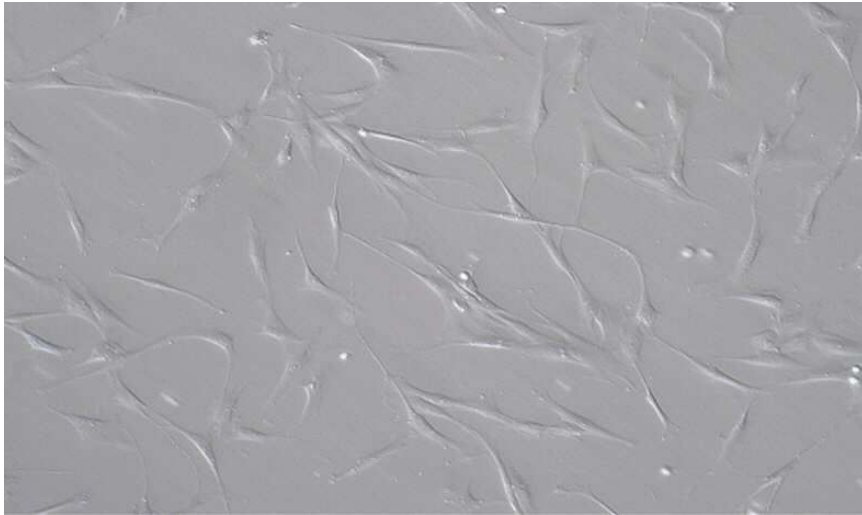
유세포 (Flowcytometry) 분석 결과이다.

<64>

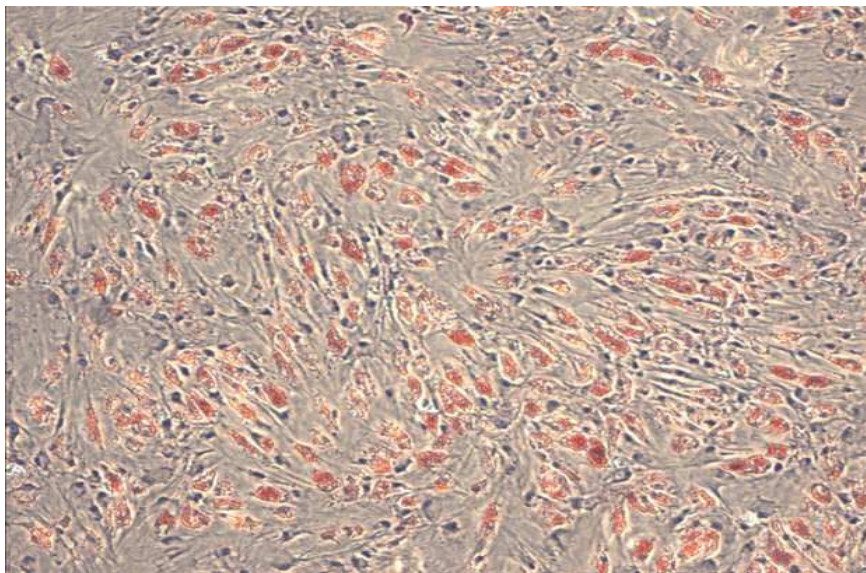
도 10은 인간태반 중간엽 줄기세포를 이용하여 배양 생산된 CD14+ 단핵구의 모습이다(Wright Stain, X 400).

도면

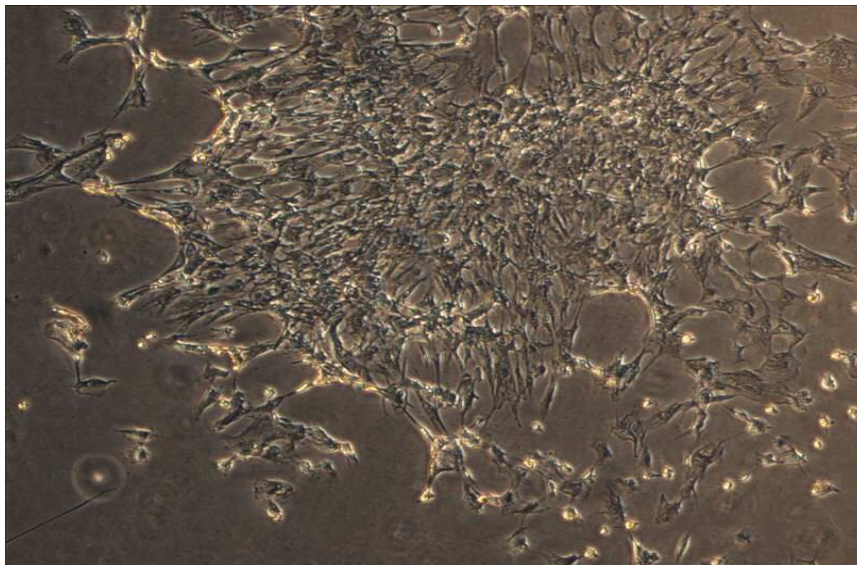
도면1



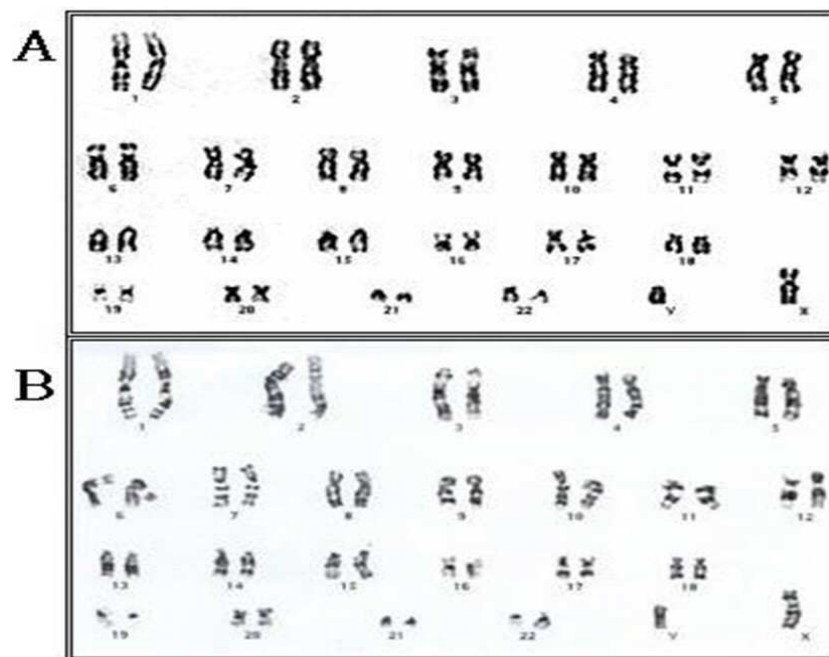
도면2



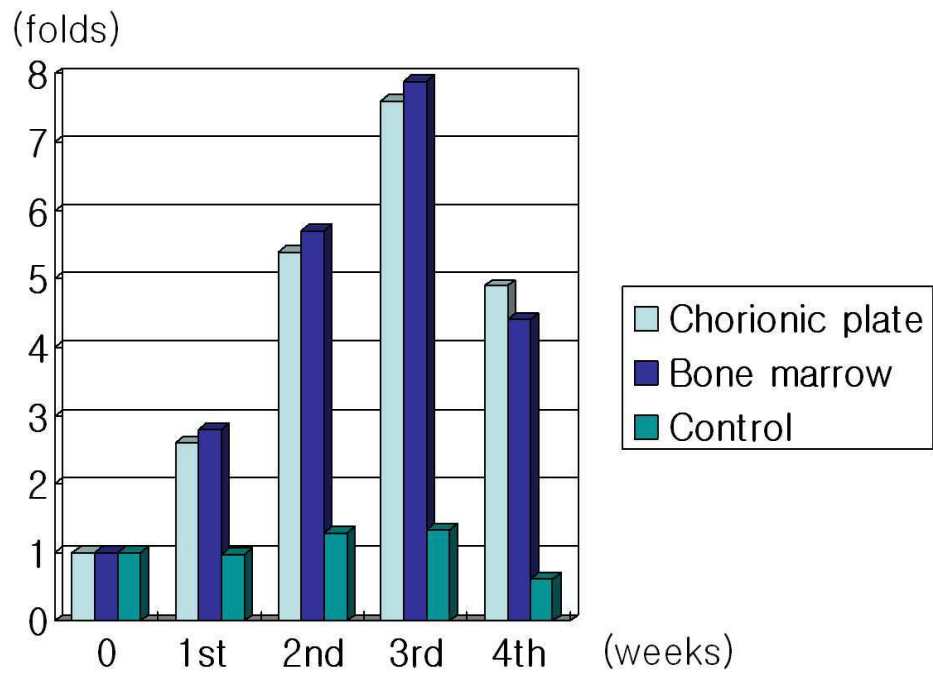
도면3



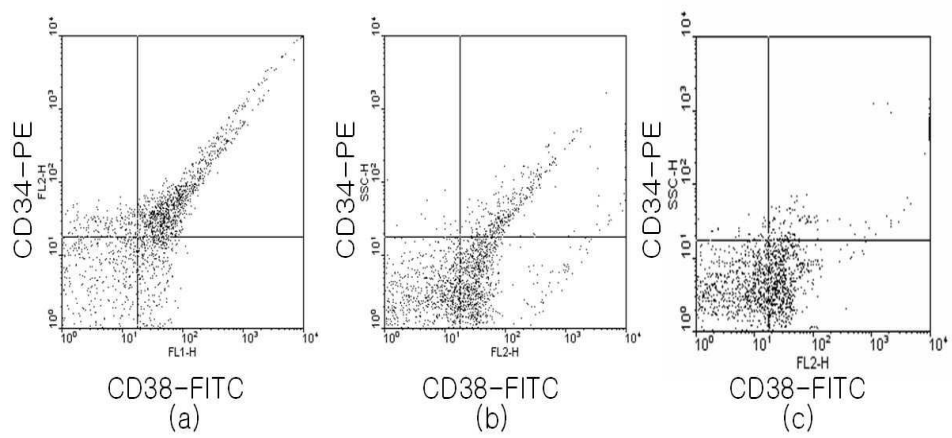
도면4



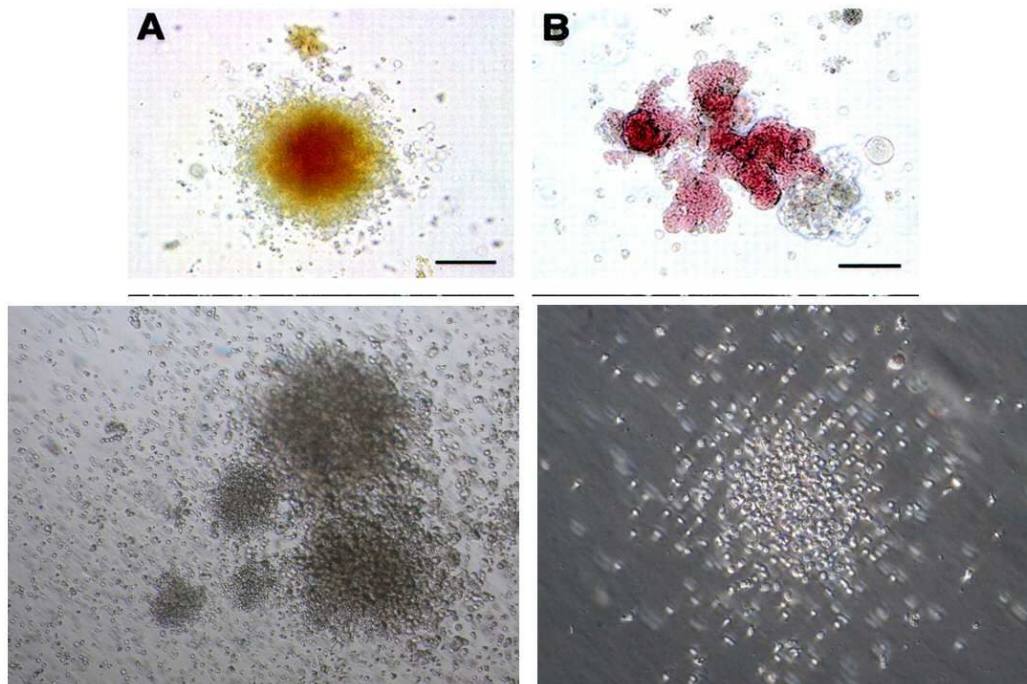
도면5



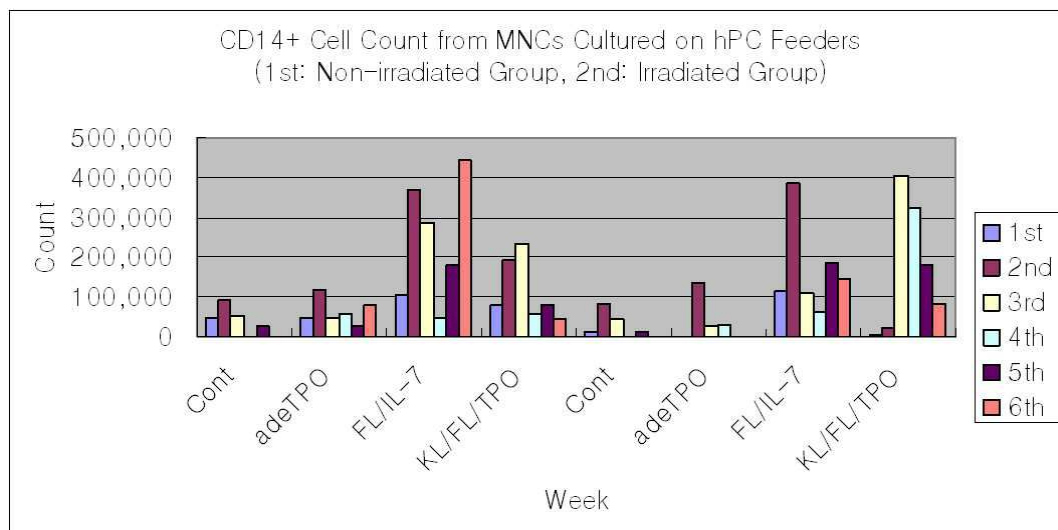
도면6



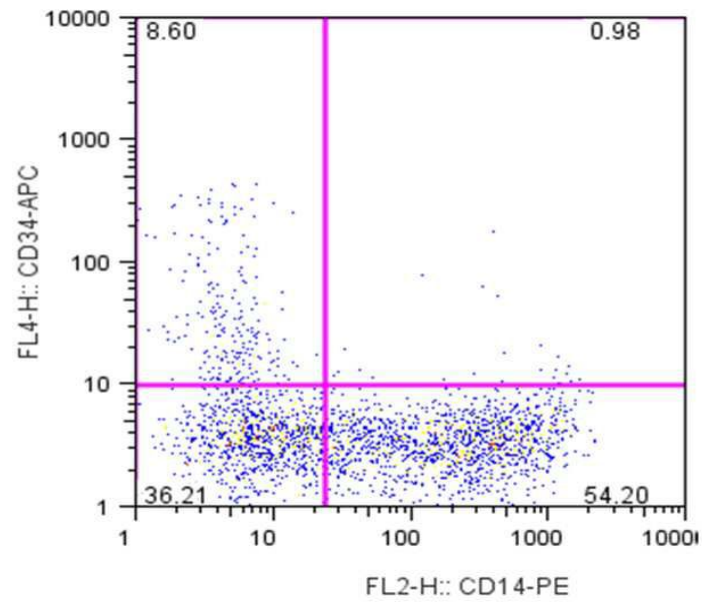
도면7



도면8



도면9



도면10

