



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0085944
(43) 공개일자 2015년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/24 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)

(21) 출원번호 10-2014-0005961

(22) 출원일자 2014년01월17일

심사청구일자 2014년01월17일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

손영숙

서울특별시 강남구 언주로 107, 205동 703호 (개포동, 현대2차아파트)

이은경

서울특별시 강북구 송인로 39, 205동 708호 (미아동)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

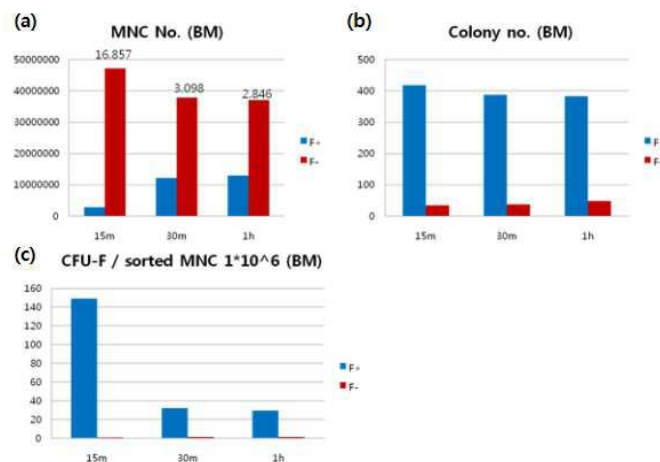
(54) 발명의 명칭 골수 흡인물로부터 미분화된 세포를 분리하는 방법

(57) 요약

본 발명은 골수흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 분리방법에 의하면, 높은 순도를 가지는 미분화세포를 골수 흡인물로부터 분리할 수 있으며, 이렇게 분리된 미분화세포는 다양한 세포치료 용도로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9C6050499

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 세포재생기술개발사업

연구과제명 골수 줄기세포 가동화 기술 및 심근세포 분화 기작을 이용한 당뇨 및 당뇨병성 혈관질환 치료의 POP 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법으로써,

- (a) 골수 흡인물로부터 원심분리를 통해 단핵구 세포군을 분리하는 단계;
- (b) 단핵구 세포군에 자성입자를 처리하고 배양하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계 배양액을 자성 컬럼에 통과시켜 미분화 세포를 분리하는 단계를 포함하는 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미분화 세포는 조혈모세포, 중배엽유래줄기세포, 혈관내피전구세포에서 선택된 어느 하나 이상인 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 자성입자는 5nm 내지 500nm의 직경을 가지는, 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 자성입자는 폴리-L-리신, 텍스트란, 키토산, 실리카, 알콕시실리칸, 폴리-(N,N-디메틸아크릴아마이드), 알콕시실란 또는 1-히드록시에틸리덴-1,1-비스포스포산 중 선택된 어느 하나의 운반체로 코팅된, 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 운반체는 폴리-L-리신인, 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양 시간은 10분 내지 2시간인, 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 미분화 세포 분리 후, 미분화 세포를 농축시키는 단계를 더 포함하는, 골수 흡인물로부터 미분화 세포 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골수 흡인물로부터 미분화된 세포를 분리/농축하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골수는 다양한 줄기세포를 얻기 위한 세포원이며, 골수에는 대표적으로 조혈모세포(HSC: hematopoietic stem cell), 중배엽유래 줄기세포(MSC: mesenchymal stem cell), 혈관내피전구세포(EPC: endothelial progenitor cell) 등과 같은 줄기세포가 포함되어 있다. 현재 골수로부터 얻어진 줄기세포들을 이용한 다양한 세포치료법이 연구 및 시행되고 있다.

[0003] 조혈모세포는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 여러 가지 혈액세포를 만들어 낼 수 있는 세포로서 줄기세포의 특징인

자가복제능력, 다세포분열능, 다분화잠재능 등을 지니고 있다(van der Kooy D 등 2000, science, 287 ; 1439-1441). 현재 조혈모세포 이식을 통하여 다양한 질환들이 치료되고 있으며, 그 예로서 급성 또는 만성 백혈병, 선천적 또는 유전적으로 결정된 조혈 이상, 빈혈증, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 골화석증, 다발성 골수종, 악성 림프종 등 혈액암 관련 질환 내지 혈액학적 질환, 유방암, 난소암, 신장암, 소세포성폐암 등 고형암과 불응성 전신성 홍반성 낭창, 불응성 류마티스 관절염 등 악성 자가면역질환(Lennard 등, 2000, BMJ, 321, 433-437 ; Ikehara, 2001, Experimental Hematology, 29 ; 661-669), 중증 합병 면역 결핍증 등이 있다.

[0004] 중배엽유래 줄기세포는 골수에 존재하는 비조혈모세포로써, 조혈모세포의 성장을 보조하거나 조절한다고 알려져 있으며, 골모세포, 근육세포, 연골세포, 및 지방세포 등 다양한 근골격계 기관의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 다능성 줄기세포로써, 세포 이식 등을 통해 손상조직의 기능적 회복을 유도하기 위한 줄기세포치료에 이용될 수 있다. 또한, 중간엽 줄기세포가 간세포 (hepatocyte), 심근세포, 신경 및 뇌세포로 분화될 수 있음이 알려져 있으며(Theise, N.D. et al., Hepatology. 32: 11-16, 2000; Alison, M.R. et al., Nature. 406: 257, 2000; Orlic, D. et al., Nature. 410: 701-705, 2001; Jackson, K.A. et al., J. Clin. Invest. 107: 1395-1402, 2001; Kopen, G.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 10711-10716, 1999; Woodbury, D. et al., J. Neurosci. Res. 61:364-370, 2000), 현재 골절, 건손상, 연골손상, 간부전 (hepatic failure), 심근경색, 신경 손상, 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).

[0005] 혈관내피전구세포는 혈관신생 및 혈관의 재생에 기여하는 세포로써, 현재 심근경색, 관상동맥이상, 뇌졸중, 당뇨병성족부궤양 및 버거씨병 등과 같은 많은 허혈성 질환의 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

[0006] 골수 흡인물(bone marrow aspirate)의 단핵구세포(mononuclear cells)에는 혈구세포 및 혈구세포전구체, 조혈모세포가 대부분을 차지하며, 조직재생용으로 활용할 수 있는 치료목적의 중간엽유래 줄기세포와 혈관내피전구세포가 아주 소량으로 존재한다. 따라서, 조직재생용 치료목적의 중간엽유래 줄기세포와 혈관내피전구세포를 환자에게 이식하고자 하는 경우 선택적인 분리과정이 필요하다.

[0007] 골수 유래 단핵구 세포군으로부터 중간엽유래 줄기세포 또는 혈관내피전구세포를 선택적으로 분리하기 위한 방법으로, 항체를 이용한 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 방법 또는 MACS(Magnetic-activated cell sorting) 방법이 이용되고 있는데, 이들 방법의 경우, 항체 제조에 대한 비용 부담이 있으며, 항체가 세포와 함께 이식되는 경우 면역반응을 유발할 수 있다는 위험이 있다.

[0008] 이에 따라, 저비용으로 골수로부터 미분화된 세포들을 분리할 수 있는 새로운 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 단핵구세포군 내 미분화세포를 분리/농축하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 골수흡인물로부터 단핵구 세포군을 분리하고, 이에 자성입자를 처리한 후 자력에 의해 분리되는 미분화 세포를 회수하는 것을 포함하여, 골수흡인물로부터 미분화 세포를 분리방법을 제공한다.

[0011] 즉, 본원발명은 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법으로써,

[0012] (a) 골수 흡인물로부터 원심분리를 통해 단핵구 세포군을 분리하는 단계;

[0013] (b) 단핵구 세포군에 자성입자를 처리하고 배양하는 단계;

[0014] (c) 상기 (b) 단계 배양액을 자성 컬럼에 통과시켜 미분화 세포를 분리하는 단계를 포함하는 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법을 제공한다. 이의 각 단계별 분리 및 배양 방법의 모식도는 도 1에 나타내었다.

[0015] 본원 발명의 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법은 미분화 세포들이 자성입자를 엔도시토시스하는 성질을 이용하여, 미분화 세포가 엔도시토시스를 통해 자성입자를 함유하게 하고, 자성 컬럼을 이용하여 이를 분리함으로써 항체 제조에 대한 비용 부담이나 면역반응의 유발 없이 저비용으로 골수 흡인물에 존재하는 미분

화 세포들을 높은 순도로 분리할 수 있다.

- [0016] 본원 발명의 분리 방법은 골수 흡인물로부터 원심분리를 통해 단핵구 세포군을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0017] 골수 흡인물이란, 골수로부터 분리된 골수 조직을 포함하는 액상의 추출물을 의미한다. 골수 흡인물에는 단핵구 세포군을 비롯한 다량의 미분화 세포들이 포함되어 있고, 이에 포함된 미분화 세포들은 골수조직에서 엔도시토시스(endocytosis)와 식세포작용(phagocytosis)을 통해 자성입자를 함유할 수 있으며, 예를 들어, 조혈모세포, 중배엽 유래 줄기세포, 혈관내피전구세포 등이 있다.
- [0018] 골수 흡인물로부터 단핵구 세포군의 분리 방법은 ficoll 밀도 원심분리가 바람직하며, Sepax, AXP와 같은 제대혈 자동 처리 장비를 이용하여서도 얻을 수 있으며, 당업계에서 일반적으로 사용되는 분리 방법이라면 어느 것이라도 사용하여도 무방하다.
- [0019] 본원 발명의 분리 방법은 단핵구 세포군에 자성입자를 처리하여 분리하는 단계를 포함한다. 자성 입자와 단핵구 세포군의 배양은 충분한 엔도시토시스가 이루어질 수 있도록 10분 내지 2시간 정도 배양하는 것이 바람직하며, 일반적인 단핵구 세포의 배양 배지, 자가혈청 함유 배양 배지 또는 버퍼 용액 하에서 배양하는 것이 바람직하다.
- [0020] 본원 발명의 분리 방법에서 사용되는 입자는 자기장 안에서 자성을 가지고 있으며, 세포에 독성을 주지 않고, 엔도시토시스(endocytosis) 등에 의하여 세포에 용이하게 흡수될 수 있는 것이면 어느 것이나 사용될 수 있다. 상기 입자는 예를 들면, 수퍼파라마그네틱 철 옥사이드 입자(superparamagnetic iron oxide nanoparticles: SPION), 마그네타이트, 마그헤마이트, 소프트페로마그네틱 비드, 코발트 및 구리로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 이들 나노입자는 그 자체로 세포에 유해하지 않은 재질의 것이거나 페루카보트란(Ferucarbotran) 및 페록옥사이드(Ferumoxide) 등과 같은 세포에 유해하지 않은 물질로 코팅되어 있는 것일 수 있다. 또한, 상기 자성입자에는 플루란 코팅된 자성입자와 같이 특정한 물질로 코팅되거나 변형된 자성 입자가 포함된다. 상기 자성입자의 크기는 세포에 의하여 용이하게 흡수될 수 있는 크기이면, 특별한 차원의 크기에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 1 내지 1000nm, 보다 바람직하게는 5 내지 500nm의 직경을 가질 수 있다.
- [0021] 본원 발명의 자성입자는 엔도시토시스를 유발할 수 있는 운반체를 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 폴리-L-리신, 텍스트란, 키토산, 실리카, 알콕시실리칸, 폴리-(N,N-디메틸아크릴아마이드), 알콕시실란 또는 1-히드록시에틸리덴-1,1-비스포스포산 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 폴리-L-리신을 사용한다.
- [0022] 운반체와 자성입자 사이의 결합은 자성입자와 10분 내지 2시간 함께 반응시켜 코팅하는 것이 바람직하며, 자성입자에 운반체가 결합(Conjugation)된 입자를 사용할 수도 있다.
- [0023] 본원 발명의 분리 방법은 엔도시토시스 등을 통해 자성입자를 함유한 세포를 자성 컬럼에 처리하여 분리하는 방법을 포함한다. 자석활성분리기(MACS separator)에 자석활성 칼럼을 장착한 후 MACS 완충용액(MACS buffer, PBS + 2 % FBS)으로 칼럼을 평형시킨 후 자성입자를 함유하는 배양액을 자석활성 칼럼에 통과시킨다. 자석활성 분리기의 자기장(magnetic field)에 의해 자성입자를 함유한 세포만이 자석활성 칼럼 내에 남게 되고, 비자성입자를 함유하지 않은 세포는 MACS 완충용액을 사용한 세정 과정을 통해 자석활성칼럼 밖으로 흘러나오게 된다. 세정 단계가 끝난 후 MACS 완충용액을 자석칼럼 내에 채운 후 주사기를 사용하여 미분화된 줄기세포가 농축되어 있는 세포군을 분리한다.
- [0024] 본원 발명은 또한 추가적으로 분리된 미분화 줄기 세포를 농축 시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 분리된 미분화 세포를 원심 분리 등의 과정을 통해 더 농축하여, 체내 적용, 주사 적용 등을 용이하게 진행할 수 있는 형태로 제조할 수 있다. 이렇게 분리된 미분화 세포들은 급성심근경색, 허혈성 질환 등의 주사용 치료제 등으로 활용 가치가 높다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 의하면 기존의 항체에 의한 분리 방법의 고비용 문제 및 면역 부작용 없이, 저렴하고 손쉬운 방법으로 골수 흡인물로부터 미분화세포를 분리할 수 있으며, 분리된 미분화 세포를 다양한 세포 치료 용도로 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 산화철을 이용한 골수 흡인물로부터 미분화 세포를 분리하는 방법에 대한 모식도이다.
- 도 2는 자기장을 통과하면서 분리된 자성 입자를 함유한 세포와 자성 컬럼을 통과한 세포의 세포 수 및 콜로니 형성능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 골수 흡인물로부터 분리한 단핵구세포군과 분리된 자성 입자를 함유한 세포의 FACS를 통한 세포 내 소기관 및 크기를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 산화철을 이용하여 분리한 세포군을 림프구 마커 (CD3), 혈관내피전구세포 (Lectin), 혈구세포 (CD45), 단핵구 마커 (CD11b)로 FACS 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 본 발명의 구현 모습을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명하나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0028] <실시예>

[0029] 1. 담체에 담지된 자성입자의 제조

- [0030] 20% FBS, 1% 페이실린/스트렙토마이신이 첨가된 α -MEM 배지에 페리덱스주사(Feridex I.V.(Ferumoxides Injectable Solution))와 폴리-L-리신 (PLL)을 각각 50ug/ml 및 0.75ug/ml 농도로 첨가하여 15분, 30분 또는 1시간동안 37℃에서 배양하여 페리덱스를 폴리-L-리신으로 코팅한 자성입자를 얻었다.

[0031] 2. 골수 흡인물로부터 단핵구세포군의 분리

- [0032] 골수 단핵구 세포군을 8-12주령 SD 랫 대퇴골로부터 얻었다. 3ml 주사기를 이용하여 대퇴골 1개당 10ml의 2% FBS를 포함한 PBS 또는 기본 배지 (α -MEM)를 이용하여 골수를 단일세포로 분리한 다음, 70um strainer로 걸러주었다. PBS로 2번 세척한 다음, 5×10^7 cells/ml 농도로 10% FBS, L-glutamine 및 1% penicillin/streptomycine가 첨가된 α -MEM 배지에 세포를 준비하였다. 8-12 주령 랫 대퇴골 1개에서는 대략 1×10^8 단핵구 세포를 얻을 수 있었다.

- [0033] 또한 사람 대퇴골로부터 주사기를 이용하여 골수흡인물을 10ml 얻어낸 다음, PBS로 2-3 배 희석하여 Ficoll 밀도구배 원심분리를 통해 단핵구세포군을 얻었다. 이를 PBS로 2번 세척한 다음 70 μ m strainer로 걸러주어 단핵구 세포를 얻었다.

[0034] 3. 단핵구세포군에 자성입자 처리

- [0035] 상기 2.에서 얻은 인간 단핵구 세포 5×10^7 개를 1ml에 resuspension한 다음, 폴리-L리신 코팅된 페리덱스를 5 μ g/ml 농도로 첨가하여 잘 섞어준 다음, 37℃에서 15분, 30분 또는 1시간 동안 배양하였다.

[0036] 4. 자성입자 처리된 단핵구세포군의 자석 컬럼 통과

- [0037] 자석에 철비드로 된 컬럼을 장착한 후 2% FBS를 포함하는 PBS 3ml을 먼저 흘려보내 세척하고, 상기 3.의 세포 배양액을 통과시켰다. 그 후, 2% FBS가 첨가된 PBS 3ml로 3회 세척을 수행하여 자석에 붙지 않는 세포를 제거하고, 자성입자를 함유한 세포만을 얻었다.

[0038] 5. 자석 컬럼에 부착된 세포의 회수

- [0039] 컬럼을 자석에서 분리하여 5ml PBS로 2회 플러싱하고 남아있는 세포를 회수하고 이의 수를 계수하였다.

[0040] <실험예>

[0041] 1. 콜로니 형성능 확인

- [0042] 줄기세포의 특징인 콜로니 형성능을 가진 세포의 존재를 확인하기 위해 분리된 세포들에 대하여 CFU-F, HSC-CFU를 수행하였다. CFU-F는 중배엽 유래 줄기세포의 특성으로, 이를 확인하기 위하여 20% FBS, L-glutamine을 첨가한 α -MEM 배지(CFU-F용 배양 배지)에 세포를 접종하고 배양접시에 부착되어 자라는 세포를 2 주간 배양하여 콜로니 수를 측정하였다. 5×10^7 개의 단핵구 세포에 PLL-coated feridex solution을 처리한 다음, 자석에 붙는 세포군, 붙지 않은 세포군 각각을 CFU-F용 배양 배지에 접종하였다. 2 주간 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 3

회 세척한 다음, 100% methanol로 상온에서 20분간 세포를 고정하였다. 메탄올을 제거하고 증류수로 세척한 후 포화 메틸 바이올렛 용액으로 세포를 상온에서 20분간 염색한 다음, 증류수로 세척하고 건조시켰다. 50개 이상의 세포로 이루어진 콜로니 1개를 기준으로 해부현미경상에서 관찰하여 콜로니 개수를 측정하였다. 또한, 분리된 미분화 세포와 자성 컬럼을 통과한 세포 수를 각각 확인하였다.

[0043] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2(a)는 자성입자를 처리한 시간에 따른 분리된 단핵구 세포 수에 대한 결과이다. F+는 자성입자를 함입하여 자성에 의해 분리된 세포군을 말하고, F-는 자성을 통과한 세포군을 말한다. 자성입자를 15분간 처리한 경우 전체 단핵구세포의 약 5.6%의 세포가 자성에 의해 분리되었고(15분(m) F+), 30분 처리 시 24.4%(30 분(m) F+), 1시간 처리 시 26.0%(1시간(h) F+)의 단핵구 세포가 자성에 의해 분리되었다. 도 2(b)는 (a)에서 분리된 단핵구세포군의 중배엽유래 줄기세포 콜로니 수에 대한 결과이다. 대부분의 콜로니 형성 세포는 자성에 의해 분리된 것을 확인하였다 (15분(m), 30분(m), 1시간(h) F+). 도 2(c)는 분리된 단핵구세포의 콜로니 형성능을 평가한 결과로 분리된 단핵구 1×10^6 당 콜로니 형성능에 대한 결과이다. 자성입자를 15분간 처리한 경우에 단위 단핵구 숫자당 콜로니 형성능이 가장 좋은 것으로 나타났다 (15분(m) F+).

[0044] 도 2에 나타낸 바와 같이, 자성을 통과한 세포군(F-)에 대비하여 자성에 의해 분리된 세포(F+)에서 콜로니 형성능이 매우 우수한 것을 확인하였다.

[0045] 2. FACS 분석

[0046] 자성에 의해 분리한 세포군의 크기 및 세포내 소기관을 FACS를 이용해 분석하였다. 산화철을 15분, 1시간 처리한 후 분리된 세포군을 3.7% 포름알데히드 용액으로 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 고정된 세포를 FACS Calibur(BD Biosciences)를 이용하여 세포 크기와 소기관을 분석하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0047] 그 결과, (a)의 M2, M3에서 확인되는 바와 같이, 분리된 미분화 세포들이 세포 크기가 작고 세포내소기관에 적은 것으로 확인되었다. 즉, 자력에 의해 분리된 세포들은 미분화된 세포임을 확인할 수 있었다.

[0048] 3. 면역형광분석

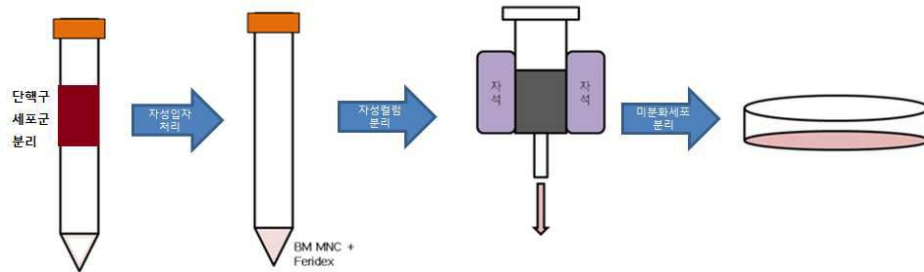
[0049] 분리된 미분화 세포들의 마커 분석을 통해 그 구성을 확인하였다. 골수 내에는 중배엽유래 줄기세포, 조혈모세포, 혈관내피전구세포와 함께 다양한 분화 단계의 세포들이 존재한다. 특히 골수는 조혈세포들의 저장고로써 조혈모세포로부터 림프구, 단핵구 등의 면역관련 세포들이 생산된다. CD45는 혈구세포에서 발현되는 마커로 알려져 있고, 모든 lymphocyte는 CD3을 발현하며, CD4(+)세포(T helper cell)와 CD8(+)세포(cytotoxic T cells)로 분화한다. 또한 단핵구는 CD11b(+) 세포로써 골수에서 조혈모세포로부터 분화되어 생산되며 전신으로 공급되고, Lectin-UEA1은 혈관내피전구세포의 마커로 알려져 있다.

[0050] 각 세포의 마커분석을 통해 자성에 의해 분리되는 세포들과 버려지는 세포들 중에 포함된 T 림프구, 단핵구, 혈관내피전구세포, 혈구세포의 양을 측정하기 위해, 산화철을 15분, 1시간 처리한 후 분리된 세포를 3.7% 포름알데히드 용액으로 상온에서 20분간 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 5% BSA 첨가 PBS로 상온에서 20분간 blocking한 후 각 세포의 마커에 대한 항체로 상온에서 30분간 반응시킨 후 FACS 분석을 실시하였다. 산화철을 이용하여 분리한 세포군을 림프구 마커 (CD3), 혈관내피전구세포 (Lectin), 혈구세포 (CD45), 단핵구 마커 (CD11b)로 FACS 분석하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

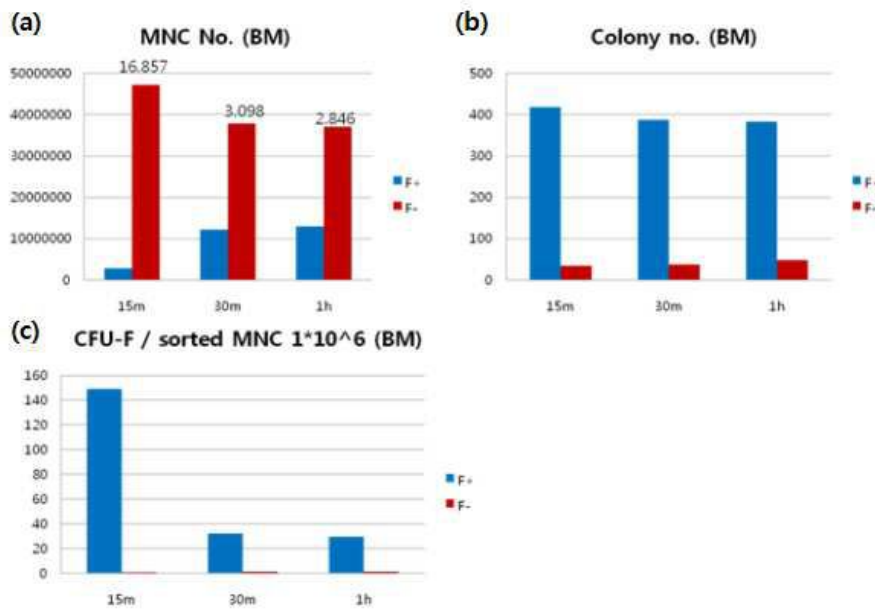
[0051] 도 4에 나타낸 바와 같이, 자성에 의해 분리되는 세포들 중 CD3(+) 발현 세포는 일부 분리되지만, 대부분의 CD45(+) 세포, CD11b(+) 세포, Lectin (+)세포는 자성에 의해 분리되지 않는 것을 확인하였다. 즉, 대부분의 분화된 세포는 자성에 의해 분리되지 않는 것을 보여주며, 본원 발명의 분리 방법이 골수 내 미분화 세포가 산화철을 엔도시토시스하여 자성에 의해 분리되는 것을 보여준다.

도면

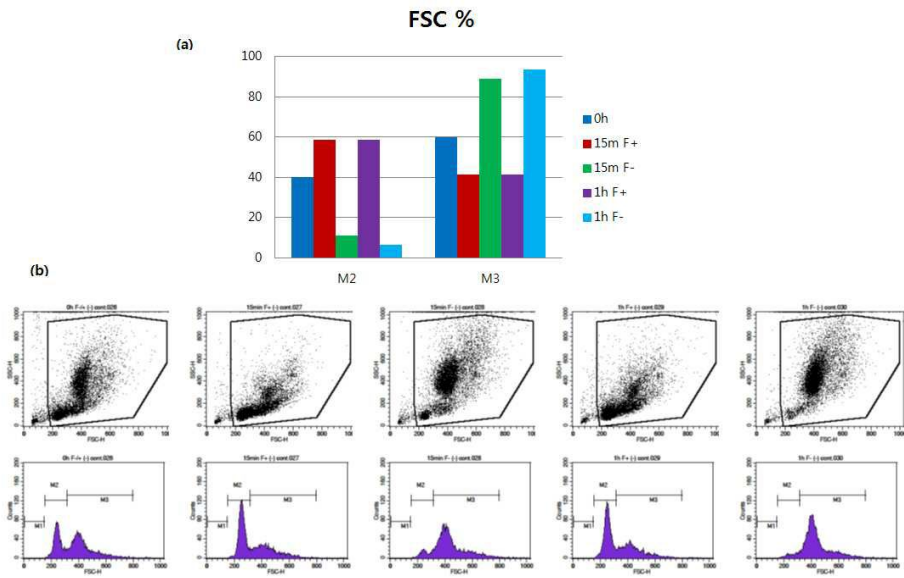
도면1



도면2



도면3



도면4

