



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0042667

(43) 공개일자 2015년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/095 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2013-0121609

(22) 출원일자 2013년10월11일

심사청구일자 2013년10월11일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍성희

서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)

황인식

서울특별시 성동구 왕십리로33길 12-1 (하왕십리동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

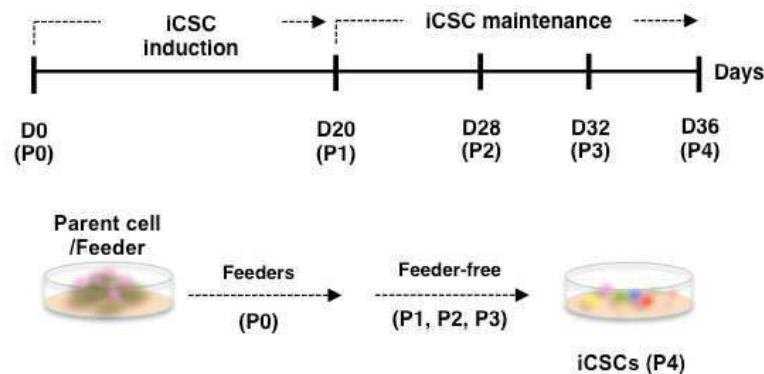
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포를 증식 배양하여 지지세포로 준비하는 제1단계; 및 상기 중간엽 줄기세포를 지지세포로 유도배양액(induction media)에서 불멸화된 세포주를 공동 배양하여 불멸화된 세포주를 암 줄기세포로 유도하는 제2단계를 포함하는 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 염색체 구조적 변이성이 적지만, 염색체 수적 변이성이 증가된, 종양 형성능력이 우수한 암 줄기세포를 대량으로 용이하게 제조할 수 있어, 항암제 탐색이나 암 치료 효율을 극대화할 수 있는 새로운 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

최경아

서울특별시 성북구 보문로30나길 9 (동선동2가)

박항수

서울특별시 성북구 인촌로10길 19-6, 옥탑 (안암동3가)

정혜선

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 304동 1101호 (신천동, 파크리오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A110606

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 골수-유래 중간엽 줄기세포로부터 유도된 신경줄기세포의 개발

기 여 율 30/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012050131

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구

기 여 율 35/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2013.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120392-1201-0000300

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 다양한 세포근원 유래 신경 줄기세포의 임상적용 가능성 검증 연구

기 여 율 35/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.01 ~ 2013.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

중간엽 줄기세포를 증식 배양하여 지지세포로 준비하는 제1단계; 및

상기 중간엽 줄기세포를 지지세포로 유도배양액(induction media)에서 불멸화된 세포주를 공동 배양하여 불멸화된 세포주를 암 줄기세포로 유도하는 제2단계를 포함하는 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유도배양액은 하이 글루코스(high glucose) DMEM 배지로 글루코스 농도가 20~30 mM인 것을 특징으로 하는 암 줄기세포주를 제조하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유도배양액은 L-글루타민(L-glutamin) 및 L-알라닐-글루타민(L-alanyl-glutamine)이 더 포함되는 것을 특징으로 하는 암 줄기세포주를 제조하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제2단계는 16~20일 동안 공동배양하는 것을 특징으로 하는 암 줄기세포주를 제조하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 불멸화된 세포주는 HEK293 또는 293FT 세포주인 것을 특징으로 하는 암 줄기세포주를 제조하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 유도 암 줄기세포주는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 암 줄기세포주를 제조하는 방법.

(1) 상기 유도 암 줄기세포주는 FBS가 포함된 배양액으로 고착배양(adherent culture)을 통한 계대 배양이 가능하며, FBS가 없는 배양액에 bFGF와 EGF를 첨가함으로써 부유배양(suspension culture)을 통해서도 계대 배양이 가능함.

(2) 상기 유도 암 줄기세포주는 신경 줄기세포 마커인 CD15(SSEA-1: 90~94%), CD56(NCAM: 77~78%), CD29(Integrin beta1: 72~75%), Nestin (61~62%), CD133(Prominin 1: 8~10%), 및 CD24(Small cell lung carcinoma cluster 4 antigen: 3~7%), CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4: 68~77%)에 대하여 양성 면역학적 특성을 나타내고 중간엽 줄기세포 마커인 CD73(Ecto-5' - Nucleotidase: <0.1%)에 대하여 음성 면역학적 특성을 나타냄.

(3) 상기 유도 암 줄기세포는 부유배양(suspension culture)시 세포배양 접시 바닥에 고착하며 자라는 세포(분화-유도된 세포, differentiated cells)가 없다는 특성을 나타냄.

(4) 상기 유도 암 줄기세포주는 부유배양(suspension culture)을 통해서 신경줄기세포의 표식인자인 CD133의 발현율(>95%)을 높일 수 있으며, 그 결과 CD15⁺/CD133⁺ (double positive, >95%)의 특성을 나타내는 암 줄기세포를 얻을 수 있음.

(5) 상기 유도 암 줄기세포주는 FBS가 첨가된 배양액에서 핵이 전체세포에 비해서 상대적으로 크고, 둥글며 유선형이며, 신경세포의 형태학적 특징인 돌기(dendrite)가 보이는 특성을 나타냄.

(6) 상기 유도 암 줄기세포는 유도 전 모세포인 불멸화 세포주의 구조적 염색체 돌연변이의 축적을 스스로 제거

하고, 수적 염색체 돌연변이를 증가시킴으로써, 암세포의 특징인 구조 유전적 돌연변이(chromosome instability)를 감소시켜, 암 줄기세포의 유전적인 요소를 지속적으로 유지하는 특성을 나타냄.

(7) 상기 유도 암 줄기세포주는 최소 10개의 세포만으로도 면역억제 마우스(BALB/c nu/nu)에서 종양 형성능력을 보이는 특성을 나타냄.

(8) 상기 유도 암 줄기세포주는 분화 유도배양액을 통해서 신경세포로 분화될 수 있으며, 분화의 결과를 다양한 신경세포의 마커의 발현으로 확인할 수 있는 특성을 나타냄.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 생산되는 암 줄기세포주.

청구항 8

중간엽 줄기세포; 및

하이 글루코즈 DMEM 배지에 FBS, L-글루타민, 및 L-알라닌-글루타민을 포함하는 것을 특징으로 하는 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 유도하기 위한 배양액 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 인체 유래의 불멸화된 세포주를 이용, 골수-유래 중간엽 줄기세포(bone marrow-derived stem cells)와 공동배양(coculture)함으로써, 암 줄기세포(cancer stem cell, CSC)의 특성을 갖는 새로운 암 줄기세포주(cancer stem cell line)를 제조하는 방법 및 이에 의해 제조된 암 줄기세포주에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 줄기세포(이하, CSC 또는 종양 줄기세포와 혼용함)는 혈관, 간엽세포(mesenchymal cells) 및 다양한 종류의 암세포 등이 모여진 미세환경(microenvironment)을 형성함으로써, 자가 재생(self-renewal), 증식능력(proliferative capacity) 및 다분화능(multi-differentiation)을 갖는 원발 종양성 세포이다. 종양 줄기세포의 특성을 이용, 암세포로부터 암 줄기세포를 분리하는 방법은 현재 4가지로 나뉠 수 있다.

[0003] 첫째, 종양 줄기세포가 발현하는 특정 표지인자의 항체를 이용한 MACS (magnetic cell sorting) 및 FACS(fluorescence activated cell sorting) 방법.

[0004] 둘째, 백혈병과 다발성 골수종 등에서 주로 높은 활성을 보이는 ABC transporter의 특성을 이용한 색소배제법(dye exclusion)으로 side population을 분리하는 방법.

[0005] 셋째, 종양 줄기세포에서 과다 발현하는 Aldehyde dehydrogenase(ALDH)와 같은 효소 활성 능력을 이용한 분리법.

[0006] 넷째, 종양 줄기세포를 혈청이 제거된 배양액에 성장인자(EGF와 bFGF)를 처리하여 tumorsphere를 형성하여 분화된 암세포를 제거 후 분리하는 방법.

[0007] 이러한 방법들을 이용함으로써, 암세포로부터 암 줄기세포를 쉽게 분리할 수 있지만, 암 줄기세포의 비율이 서로 달라서 다수의 암 줄기세포를 확보하는데 효과적이지 못하며, 각각의 분리 방법에 따라 분리된 암 줄기세포의 암 형성 능력은 서로 다르다. 또한, 배양시 그 특성이 변화되는 단점이 있으므로 분리 방법과 배양방법 있어서 연구개발이 필요하고, 더구나 암환자의 종양조직을 얻기 위해서는 법률적, 행정적인 사항들에 따른 시간이 요구된다.

[0008] 따라서 균일한 특성의 암 줄기세포주를 다량 확보할 수 있으면서도 법률적, 행정적 제한이 적은 암 줄기세포주 제조 방법이 정립될 필요가 있다.

[0009] 본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 등록특허 10-1242726(2013.03.13)에는 알데하이드 디하이드로지네이즈(Aldehyde dehydrogenase, ALDH) 발현 정도를 측정하여 종양줄기세포 특성의 암 진단에 정보를 제공하는 방법이

개시되어 있고, 대한민국 공개특허 10-2012-0099904(2012.09.12)에는 악성 뇌종양 미분화 줄기세포를 선별적으로 인지하여 결합할 수 있는 종양줄기세포 표적펩타이드 GICT 및 그 펩타이드를 이용한 뇌종양 진단 방법에 관해 기재되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허 10-0783199(2007.12.06)에는 악성 뇌종양 환자의 글라이오블라스토마(glioblastoma) 조직에서 유래하고 항암제에 대한 약제 내성을 갖는 암 줄기세포주 GBM 2에 대해 기재되어 있다.

[0010] 그러나, 불멸화된 세포주를 이용, 암 줄기세포를 쉽게 분리하며 그 특성을 유지하는 분리 및 배양방법에 대해 알려진 바는 없다.

[0011] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허가 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1242726(2013.03.13)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2012-0099904(2012.09.12)
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 10-0783199 (2007.12.06)

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. Scaffidi P, Misteli T. Nat Cell Biol. 2011 Aug 21;13(9):1051-61.
(비특허문헌 0002) SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. Cell Stem Cell. 2009 may 8; 4(5):440-52
(비특허문헌 0003) CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, et al., BMC Cancer. 2010 Feb 24;10:66.
(비특허문헌 0004) The micro-RNA 199b-5p regulatory circuit involves Hes1, CD15, and epigenetic modifications in medulloblastoma. Andolfo I, Liguori L, De Antonellis P, Cusanelli E, Marinaro F, Pistollato F, Garzia L, et al., Neuro-Oncology. 2012 Jan 22; 14(5):596-612.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 불멸화된 인간의 세포주를 이용한 종양 줄기세포의 특성을 갖는 세포를 만드는 새로운 방법으로, 본 발명의 목적은 소집단의 암 줄기세포를 분리하는 기존의 방법적인 한계를 극복할 수 있는 다수의 암 줄기세포주를 용이하게 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 불멸화된 인간의 세포주를 이용하여 암 줄기세포의 특성을 유지할 수 있는 암 줄기세포주를 제조 및 배양하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 종양 줄기세포를 제조에 있어 법률적, 행정적 제한을 해소할 수 있는 불멸화된 인간의 세포주를 이용하여 암 줄기세포주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 세포치료제 개발에 도움이 되는 상기 방법에 의해 제조된 암 줄기세포주를 제공하는

것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 증식 배양하여 지지세포로 준비하는 제1단계; 및 상기 중간엽 줄기세포를 지지세포로 유도배양액(induction media)에서 불멸화된 세포주를 공동 배양하여 불멸화된 세포주를 암 줄기세포로 유도하는 제2단계를 포함하는 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 제조하는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 암 줄기세포주를 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 중간엽 줄기세포; 및 하이 글루코스 DMEM 배지에 FBS, L-글루타민, 및 L-알라닐-글루타민을 포함하는 것을 특징으로 하는 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 유도하기 위한 배양액 조성물을 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명에 의한 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포를 제조하는 방법은 중간엽 줄기세포를 증식 배양하여 지지세포로 준비하는 제1단계; 및 상기 중간엽 줄기세포를 지지세포로 유도배양액(induction media)에서 불멸화된 세포주를 공동 배양하여 불멸화된 세포주를 암 줄기세포로 유도하는 제2단계를 포함한다.

[0024] 본 발명에서 지지세포로 사용된 중간엽 세포는 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 골수(bone marrow), 말초신경 혈액, 제대혈, 골막(periosteum), 진피(dermis) 및 중배엽 기원의 조직 등으로부터 분리되고 정제될 수 있다. 상기 중간엽 세포는 이에 한정되는 것은 아니나, 골수-유래 중간엽 줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BMMSC)가 바람직하다. 상기 골수-유래 중간엽 줄기세포는 뼈(bone), 연골(cartilage), 지방(fat), 힘줄(腱), 신경 조직(nerve tissue), 섬유아세포(fibroblast) 및 근육 세포(muscle cell) 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 만능 전구 세포(pluripotent progenitors)를 말한다.

[0025] 상기 중간엽 줄기세포는 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 인간의 골수로부터 분리하여 사용할 수 있는데, 골수에서 단핵세포를 분리한 후 이들을 1 내지 2주간 배양하면 분화되기 쉬운 조혈 줄기세포는 모두 분화되어 성숙한 혈구 세포들을 만들기 때문에 남아 있는 무한 증식 세포인 줄기세포만을 분리하는 방법에 의해서 손쉽게 중간엽 줄기세포만을 얻을 수 있다. 아울러, 골수에서 분리한 단핵세포에서 중간엽 줄기세포를 분리해내지 않고, 중간엽 줄기세포를 포함하는 단핵세포들 전체를 본 발명의 방법에 따라 배양하여 지지세포로 이용할 수 있다.

[0026] 상기 골수 유래 중간엽 세포는 상업적 구매하여 사용할 수도 있다. 본 발명에 있어, 상기 지지세포는 이에 한정되는 것은 아니나 80% 이상 confluency가 될 때까지 LONZA MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium)에 10% MCGS supplement+2% L-glutamine+0.1% GA-1000이 포함된 배양액으로 증식시켜 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명에 있어, 상기 유도배양액의 기본 배양배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배양 배지를 사용할 수도 있다. 본 발명의 배양액은 DMEM(둘베코 변형 이글 배지, Life Technologies 社)에 포도당의 양만을 선택적으로 증가시킨 조성물을 기본 배지로 한다. 상기 유도배양액은 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 하이 글루코스(high glucose) DMEM 배지가 바람직하고, 상기 글루코스 농도가 20~30 mM이고, 더욱 바람직하게 25 mM이다.

[0028] 본 발명의 상기 유도배양액에는 하이 글루코스(high glucose) DMEM 배지에 성장에 필수적인 혈청, 성장인자, 및/또는 항생제 등이 포함될 수 있다. 바람직하게 상기 배양액에 L-글루타민(L-glutamin) 및 L-알라닐-글루타민(L-alanyl-glutamine)이 포함된다. 이에 한정되는 것은 아니나, 보다 구체적인 실시예에 의하면 상기 배양액은 상기 하이 글루코스(high glucose) DMEM 배지에 10% FBS와 2mM L-글루타민 (L-glutamin) 및 4mM L-알라닐-글루타민(L-alanyl-glutamine) 그리고 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin) 용액을 포함시켜 이용하였다.

- [0029] 또한 본 발명에 사용된 불멸화된 세포주는 정상 세포에 유전적인 요소를 변형시켜 불멸화된 세포주로서 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 인간 유래 불멸화된 세포주가 바람직하다. 인간 유래 불멸화된 세포주는 암 세포주를 포함한 인간 유래의 불멸화된 세포주를 말하며, 불멸화 및 형질전환 방법으로는 첫째, viral genes (E1A, SV40 Large-T antigen 등)을 인간의 체세포에 감염시켜 암억제 유전자의 산물인 p53, pRb 등의 기능을 억제시켜 불멸화시키거나, 둘째, 인간의 체세포에 telomerase reverse transcriptase gene을 도입시켜, 과발현을 유도함으로써 불멸화시키는 방법, 셋째, Ras 및 MYC유전자를 과발현시킴으로써 불멸화시키는 방법 등이 있으며, 인간의 정상 세포에 유전적인 요소를 변형시켜 불멸화된 세포주를 가르킨다.
- [0030] 나아가 상기 인간 유래 불멸화된 세포주는 이에 한정되는 것은 아니나, HEK293 또는 293FT 세포주인 것이 바람직하다. 인간의 골수 유래 중간엽 줄기세포를 지지세포로 하며, 불멸화된 세포주(293FT cell line, invitrogen社)를 이용하여 뇌암줄기세포(brain cancer stem cell)의 특성을 갖는 새로운 암 줄기세포주를 제조할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 암 줄기세포를 유도하는 제2단계에서, 바람직하게 배양액에서 16~20일 동안, 더욱 바람직하게는 20일 동안 공동배양한다.
- [0032] 나아가, 본 발명에 의해 제조된 유도 암 줄기세포주는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0033] (1) 상기 유도 암 줄기세포주는 FBS가 포함된 배양액으로 고착배양(adherent culture)을 통한 계대 배양이 가능하며, FBS가 없는 배양액에 bFGF와 EGF를 첨가함으로써 부유배양(suspension culture)을 통해서도 계대 배양이 가능함.
- [0034] (2) 상기 유도 암 줄기세포주는 신경 줄기세포 마커인 CD15(SSEA-1: 90~94%), CD56(NCAM: 77~78%), CD29(Integrin beta1: 72~75%), Nestin (61~62%), CD133(Prominin 1: 8~10%), 및 CD24(Small cell lung carcinoma cluster 4 antigen: 3~7%), CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4: 68~77%)에 대하여 양성 면역학적 특성을 나타내고 중간엽 줄기세포 마커인 CD73(Ecto-5' - Nucleotidase: <0.1%)에 대하여 음성 면역학적 특성을 나타냄(표 1 참조).
- [0035] (3) 상기 유도 암 줄기세포는 부유배양(suspension culture)시 세포배양 접시 바닥에 고착하며 자라는 세포(분화-유도된 세포, differentiated cells)가 없다는 특성을 나타냄.
- [0036] (4) 상기 유도 암 줄기세포주는 부유배양(suspension culture)을 통해서 신경줄기세포의 표식인자인 CD133의 발현율(>95%)을 높일 수 있으며, 그 결과 CD15⁺/CD133⁺ (double positive, >95%)의 특성을 나타내는 암 줄기세포를 얻을 수 있음.
- [0037] (5) 상기 유도 암 줄기세포주는 FBS가 첨가된 배양액에서 핵이 전체세포에 비해서 상대적으로 크고, 둥글며 유선형이며, 신경세포의 형태학적 특징인 돌기(dendrite)가 보이는 특성을 나타냄.
- [0038] (6) 상기 유도 암 줄기세포는 유도 전 모세포인 불멸화 세포주의 구조적 염색체 돌연변이의 축적을 스스로 제거하고, 수적 염색체 돌연변이를 증가시킴으로써, 암세포의 특징인 구조 유전적 돌연변이(chromosome instability)를 감소시켜, 암 줄기세포의 유전적인 요소를 지속적으로 유지하는 특성을 나타냄.
- [0039] (7) 상기 유도 암 줄기세포주는 최소 10개의 세포만으로도 면역력억제 마우스(BALB/c nu/nu)에서 종양 형성능력을 보이는 특성을 나타냄.
- [0040] (8) 상기 유도 암 줄기세포주는 분화 유도배양액을 통해서 신경세포로 분화될 수 있으며, 분화의 결과를 다양한 신경세포의 마커의 발현으로 확인할 수 있는 특성을 나타냄.

표 1

[0041]

신경 줄기세포 및 중간엽 줄기세포 표식인자 발현 분포								
세포	CD15	CD56	CD29	Nestin	CD133	CD24	CXCR4	CD73
iCSC1	90%	77%	72%	61%	10%	3%	68%	<0.1%
iCSC2	94%	78%	75%	62%	8%	7%	77%	<0.1%

293FT-icsc	6%	N.D.	N.D.	N.D.	3%	N.D.	N.D.	N.D.
------------	----	------	------	------	----	------	------	------

[0042] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조되는 암 줄기세포주를 제공한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 암 줄기세포주는 바람직하게 293FT로부터 제조된 뇌암 줄기세포주이다. 상기 뇌암 줄기세포는 모세포(parental cell)인 293FT cell와 다른 새로운 뇌종양줄기 세포주이며, FBS를 사용한 고착배양 및 부유배양 모두 가능하고, 신경줄기세포 마커의 발현 증가, 신경구 형성능력 향상, 부유배양시 $CD15^{+}/CD133^{+}$ 의 발현율을 최대 95%까지 높일 수 있으며, 신경줄기세포와 형태적으로 유사성 증가, 구조 유전적 변이성 감소, 종양 형성능력 획득, 다양한 신경세포로의 분화가 가능하다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 중간엽 줄기세포; 및 하이 글루코스 DMEM 배지에 FBS, L-글루타민, L-알라닐-글루타민을 포함하는 것을 특징으로 하는 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포주를 유도하기 위한 배양액 조성물을 제공한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 배양액 조성물은 20~30 mM의 글루코스를 함유하는 하이 글루코스(high glucose) DMEM 배지에 8~10% FBS, 1~3 mM L-글루타민(L-glutamin) 및 3~5 mM L-알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)을 포함하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0044] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 인간 유래의 불멸화된 세포주를 이용 암 줄기세포주를 높은 효율로 유도 및 생산이 가능함으로써, 소집단의 암 줄기세포를 분리하는 기존의 방법적인 한계를 극복할 수 있어 다수의 암 줄기세포를 용이하게 제조할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명에 의하면, 불멸화 세포주를 이용하여 법률적, 행정적 제한을 덜 받으면서 구조 유전적 변이성이 적고, 종양 형성능력이 우수한 암 줄기세포를 제조할 수 있다.

[0046] 나아가, 본 발명에 의하면, 불멸화된 세포주로부터 암 줄기세포를 유도함으로써 암 줄기세포의 발생기전에 대한 분자적인 메커니즘을 연구하는데 도움을 주며, 확보된 종양줄기 세포주를 이용하여 항암제 탐색이나 암 치료 효율을 극대화할 수 있는 새로운 치료제 개발로 활용될 수 있으며, 바이오 벤처 및 제약회사에 맞춤형 신약개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1a 및 도 1b는 인간의 골수유래 중간엽 줄기세포의 특성을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 1a는 골수유래 중간엽 줄기세포 (Early passage, P3)가 섬유아세포 (Fibroblast)의 모양을 하고 있는 것을 보여주는 도면이다(100배로 관찰한 결과).

도 1b는 줄기세포 특이적으로 발현되는 세포 표면마커 (Positive markers; CD29, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC와 Negative markers; CD14, CD34, CD45)들을 이용한 FACS분석을 통해서 실험에 사용된 세포들(>98%)이 중간엽 줄기세포임을 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

도 2a ~ 도 2f는 인간의 골수-유래 중간엽 줄기세포를 지지세포로 이용한 암 줄기세포의 유도방법 및 결과 나타낸 도면이다.

도 2a는 인간의 불멸화된 세포주를 이용한 암 줄기세포로 유도하기 위한 유도방법을 나타내는 모식도이다.

도 2b는 인간의 불멸화된 세포주(293FT)를 이용한 암 줄기세포로 유도과정을 보여주는 도면이다(40배로 관찰한 결과).

도 2c는 인간의 불멸화된 세포주(293FT)에서 유도된 암 줄기세포주(iCSC1, iCSC2)를 보여주는 도면이다(100배로 관찰한 결과).

도 2d는 인간의 불멸화된 세포주(HEK293, 293T, 293FT, Dermal papilloma, Neural stem cell) 및 암세포주(L-132, U87, SW480, A549, HeLa)를 이용한 암 줄기세포로 유도효율결과를 보여주는 FACS 분석결과 도면이다.

도 2e는 인간의 불멸화된 세포주(293FT)와 293FT-유래 암 줄기세포에서 CD133(Prom1)의 상대적인 mRNA발현율을 real-time PCR 방법으로 분석한 결과를 보여주는 도면이다.

도 2f는 인간의 불멸화된 세포주(293FT)와 유도된 암 줄기세포주(iCSC1, iCSC2)의 핵형분석결과를 보여주는 도면이다.

도 3은 인간의 불멸화된 세포주(293FT)와 293FT-유래 종양 줄기세포주에서 알려진 암 줄기세포 마커들의 발현을 FACS 방법으로 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4a 및 도 4b는 293FT-유래 종양줄기 세포주에서 신경줄기세포 마커의 발현을 면역형광 염색방법 및 FACS 분석방법으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a ~ 도 5d는 본 발명에 의한 암 줄기세포주의 신경구 형성능력을 확인하고(100배로 관찰한 결과), 형성된 신경구에서 CD15 및 CD133의 발현양을 면역형광염색방법(200배로 관찰한 결과) 및 FACS 분석방법으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6a ~ 도 6c는 본 발명에 의한 암 줄기세포주의 신경세포 분화능력을 면역형광염색방법(200배로 관찰한 결과)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7a ~ 도 7e는 본 발명에 의한 암 줄기세포를 CD15⁺를 이용하여 분리 후 제한적인 수의 세포를 면역억제생쥐의 피하에 이식함으로써 종양 형성능력을 확인한 결과를 나타낸 도면이다. 모세포인 293FT세포와 암 줄기세포로 유도 후 세포의 형태적 변형이 관찰된 유도 암 줄기세포(Induced cancer stem cell)를 보여주는 도면이다(100배로 관찰한 결과).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예만 국한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 골수유래 중간엽 줄기세포 (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell) 증식

본 발명에 사용된 골수유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)는 미국 세포주 은행인 LOZA(LONZA Walkersville Inc.)사로부터 구입한 것으로, 나이는 18세, 흑인 남성의 골수유래 중간엽 줄기세포 (PT-2501)이다. 구입한 세포는 1.6×10^7 cells (Passage number 2)로써 37°C CO₂ incubator에서 2시간 동안 미리 코팅(CELLstart™ CTS™, Gibco, USA)을 해둔 10 cm plate에 99% confluency가 될 때까지 LONZA MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium)에 10% MCGS supplement+2% L-glutamine+0.1% GA-1000이 포함된 배양액으로 증식시켰다. 증식은 발명에 필요한 세포의 수를 확보하기 위해서 동일한 증식배양액으로 Passage number 3까지 계대배양을 실시하였다. 도 1a는 Passage number 4에서의 골수유래 중간엽 줄기세포의 현미경 사진(100배)이다.

실시예 2: FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) 분석을 통한 골수유래 중간엽 줄기세포의 특성 확인

골수유래 중간엽 줄기세포(P4)에서 중간엽 줄기세포 특이적인 Cell surface markers (Positive: CD29, CD73, CD90, CD105, HLA Class I-ABC와 Negative: CD14, CD34, CD45)를 이용하여 발명에 사용된 중간엽 줄기세포의 대부분 (>98%)이 중간엽성 특성을 가지고 있다는 사실을 FACS분석을 통해서 확인하였다. 도 1b는 FACS 분석의 결과를 나타낸다.

실시예 3: 골수유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)를 지지세포로 이용 인간의 불멸화된 세포(human immortalized cell)를 암 줄기세포 (cancer stem cell)로 유도(Induction) 및 증식시키는 방법

도 2a에서처럼 인간의 골수-유래 중간엽줄기세포(human bone marrow-derived stem cell)를 지지세포(feeder cell)로 약 50개 미만의 인간의 불멸화된 각각의 세포주(HEK293, 293T, 293FT, Dermal papilloma, Neural stem cell, L-132, U87, SW480, A549, HeLa)를 약 20일 동안 공동배양방법으로 colony를 유도하고 (도 2b),

mechanical passaging 방법으로 subculture하여 증식시켰다. 실시예 1에서 기술한 BM-MSC 증식에 필요한 배양액과 iCSC(induced cancer stem cell)로 유도 및 증식시키기 위한 배양액의 조성은 아래와 같다.

1) 골수-유래 중간엽 줄기세포 배양액 : LONZA MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium)+10% MCGS supplement+2% L-glutamine+0.1% GA-1000

2) 암 줄기세포 유도 및 배양액 : DMEM(high glucose, 25 mM)+8~10% FBS+2 mM L-glutamine+4 mM L-alanyl-L-glutamine+1% Penicillin-streptomycin

실시예 4: 면역학적 염색법을 통한 본 발명에 의한 iCSC의 특성 확인

본 발명에 의한 iCSC(도 2c)는 인간의 불멸화된 세포주(293FT)에서 유도된 암 줄기세포주(iCSC1, iCSC2)를 보여주는 도면이다(100배로 관찰한 결과). 도 2d는 인간의 불멸화된 세포주(HEK293, 293T, 293FT, Dermal papilloma, Neural stem cell) 및 암세포주(L-132, U87, SW480, A549, HeLa)를 이용한 암 줄기세포로 유도효율 결과를 보여주는 FACS 분석결과 도면이다.

실시예 5: 리얼-타임 PCR(Real-time PCR)을 통한 본 발명에 의한 iCSC의 특성 확인

본 발명에 의한 iCSC(도 2c)에서 신경줄기 및 암 줄기세포 마커 (CD133: prom1)의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 2e).

실시예 6: STR 분석방법을 통한 293FT와 iCSC의 유전자 감식

STR(short of tandem repeat)분석방법을 통해서 유도된 암 줄기세포(iCSC)와 293FT세포는 유전적 특성이 동일하다는 사실을 확인하였다(표 2).

표 2

STR profile of 293FT and iCSC1, 2 cell lines					
	Locus name	Chromosomal location	293FT	iCSC1	iCSC2
1	Amelogenin	23	X, X	X, X	X, X
2	CSF1PO	5q33.1	11,12	11,12	11,12
3	D13S317	13q22-q31	12,12	12,12	12,12
4	D16S539	16q24.1	9, 9	9, 9	9, 9
5	D5S818	5q21-q31	8, 9	8, 8	8, 9
6	D7S820	7q	11, 12	11, 12	11, 12
7	TH01	11p15.5	7, 9.3	9.3, 9.3	7, 9.3
8	TPOX	2q25.3	11, 11	11, 11	11, 11
9	vWA	12p13.31	16, 19	16, 19	16, 19
10	D8S1179	8q24.13	12, 14	12, 12	12, 14
11	D21S11	21q21.1	28, 30.2	30.2, 30.2	28, 30.2
12	D3S1358	3p21	15, 17	15, 17	15, 17
13	D2S1338	2q35	19,19	19,19	19,19
14	D19S433	19q12	15, 18	18, 18	15, 18
15	D18S51	18q21.33	17, 17	17, 17	17, 17
16	FGA	4q28	23, 23	23, 23	23, 23

실시예 7: 핵형(Karyotyping) 분석을 통한 293FT와 iCSC의 염색체 비교분석

[0065] 293FT와 iCSC의 핵형을 비교분석한 결과, 총 염색체 수는 iCSC가 293FT보다 6개 더 증가한 상태였지만(도 2f: A, 293FT의 핵형분석; B, iCSC의 핵형분석; C, 293FT와 iCSC의 핵형분석을 통한 염색체 수 비교), iCSC의 염색체상 유전적 변이는 293FT보다 더 줄어든 상태를 확인하였다(addition, 1개; deletion, 1개; inversion, 1개; translocation, 1개) (도 2f: D, 293FT의 염색체상 유전적 변이 분석; E, iCSC의 염색체상 유전적 변이 분석).

[0066] 실시예 8: FACS분석을 통한 iCSC에서 암 줄기세포 마커 발현 분석

[0067] 다양한 암 줄기세포 마커(CD15, 92~96%; CD133, 19~28%; CD24, 3~6%; CD44, 96~97%; CD326, 15~17%; CD90, 0.7%)들의 발현 유무를 확인한 결과, 뇌암 줄기세포의 마커(CD15⁺, CD133⁺, CD44⁺)의 발현율이 높다는 사실을 확인하였다(도 3). subculture를 통한 early 및 late passage에서 뇌암 줄기세포 마커의 발현율의 변화를 확인하였다(도 3 및 표 3). CD15의 경우 early 및 late passage에서 발현율의 차이(0.08~1.5%)는 거의 나타나지 않았으며, CD133의 경우 early보다 late passage에서 발현이 증가(0.79~17.72%) 됐으며, CD44의 경우 early보다 late passage에서 발현이 감소(31.27~52.84%) 됨이 확인되었다.

표 3

Cultured Cells	Passages	Percent Expression of Cancer Stem Cell Marker							
		Total CD15 ⁺	Total CD133 ⁺	Total CD44 ⁺	CD15 ⁺ /CD133 ⁺	CD44 ⁺ /CD133 ⁺	CD15 ⁺ /CD44 ⁺	CD15 ⁺ /CD44 ⁺ /CD133 ⁺	CD15 ⁺ /CD44 ⁺ /CD133 ⁺
293FT	P6	5.51	3.03	81.39	2.03	2.35	4.71	1.64	17.52
iCSC1	P6	92.95	19.42	97.48	19.42	19.36	91.62	19.36	1.19
	P25	94.45	20.21	44.64	20.19	13.21	43.70	13.18	4.60
iCSC2	P8	96.63	28.59	96.63	28.59	28.42	94.36	28.42	1.11
	P23	96.55	46.31	65.36	46.26	35.66	64.53	35.62	2.61

[0068]

[0069] 실시예 9: 면역형광염색법 및 FACS분석을 통한 iCSC에서 다양한 신경줄기세포 마커발현 분석

[0070] 다양한 암 줄기세포 마커(CD15, CD24, CD29, CD133, NCAM/CD56, CD73, Nestin) 발현 유무를 면역형광염색법으로 확인한 결과, 신경줄기세포의 특성(CD15⁺, CD24^{Low}, CD29⁺, CD133⁺, CD56/NCAM⁺, CD73⁻, Nestin⁺)을 확인하였다(도 4a). 또한 FACS 분석을 통한 신경줄기세포 마커(CD15⁺, 89~94%; CD24^{Low}, 3~6%; CD29⁺, 71~74%; CD133⁺, 7~9%; CD56/NCAM⁺, 76~78%; CD73⁻, 0.12%; Nestin⁺, 61~62%)의 발현율을 확인하였다(도 4b).

[0071] 실시예 10: 신경구 형성 능력 및 특성 분석

[0072] DMEM/F-12, 20 ng FGF 및 20 ng EGF가 포함된 신경구체 형성배지를 이용 신경구 형성능력을 확인한 결과, iCSC에서 신경구 형성능력이 높고 (도 5a, 5d, 5e) 분화된 세포들이 적다는 사실을 확인하였다 (도 5a, 15 day). iCSC 신경구 (primary sphere)에서 신경줄기세포 마커인 CD133의 발현이 95%이상 증가하여 CD15⁺/CD133⁺ population 비율 또한 증가 (>95%) 되었다 (도 5d). 동결 절편 후 면역형광염색방법으로 iCSC에서 CD15 및 CD133의 발현이 증가함을 확인하였다 (도 5c).

[0073] 실시예 11: 신경구 형성 후 신경세포의 분화능력 분석

[0074] 신경구 형성 (7 day) 후 10% FBS가 포함된 분화 배지에서 7일 동안 분화유도(도 6a) 후 줄기세포마커(Oct4, CD15, CD133) 및 신경세포마커(Tuj1, O4, GFAP, MAP2)의 발현을 면역형광염색방법으로 확인한 결과, 줄기세포의 마커(Oct4, 0%; CD15, 0%; CD133, 0%)의 발현은 사라지고 신경세포마커 (Tuj1, 7%; O4, 100%, GFAP, 100%; MAP2, 100%)의 발현은 증가됨을 확인하였다(도 6b). 또한 Tuj1⁺/GFAP⁺ 세포는 45%, MAP2⁺/GFAP⁺ 세포는 100%의 발

현 비율을 나타냈다(도 6c).

[0075]

실시예 12: iCSC의 종양형성 능력 분석

[0076]

FACS를 이용 iCSC1을 $CD15^+$ 및 $CD15^-$ 분리 후 (도 7a), iCSC (unsorted), $CD15^+$, $CD15^-$ 및 293FT 세포들을 각각 면역력억제 마우스(BALB/c nu/nu)에서 피하층에 주입 후 종양 형성능력을 확인해 본 결과, iCSC(unsorted) 및 $CD15^+$ 세포를 주입한 군에서는 동일한 비율(평균 암 줄기세포가 존재할 비율=암 줄기세포 수/전체 세포 수 = $1/333 \sim 1/134$, $P=0.995$)로 종양을 형성하였고, iCSC(unsorted)세포를 주입한 군과 $CD15^-$ 세포를 주입한 군은 서로 다른 비율(평균 암 줄기세포가 존재할 비율=암 줄기세포 수/전체 세포 수 = $1/333 \sim 1/28,004$; $P=2.36e^{-9}$)로 종양 형성능력에 있어서 차이를 보였으며, CSC(unsorted)세포를 주입한 군과 293FT세포를 주입한 군 또한 서로 다른 비율(평균 암 줄기세포가 존재할 비율=암 줄기세포 수/전체 세포 수 = $1/333 \sim \infty$, $P=1.71e^{-11}$)로 종양 형성능력에 있어서 차이를 보였다 (도 7b).

[0077]

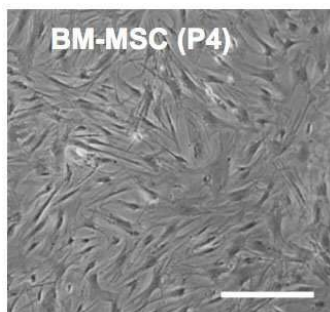
동일한 세포 수(1×10^4 cells)의 iCSC1, $CD15^+$, $CD15^-$, 293FT 세포를 각각 면역력억제 마우스(BALB/c nu/nu)에서 피하층에 주입 후 종양 형성능력을 확인해 본 결과, iCSC1(unsorted) 세포와 $CD15^+$ 세포를 각각 주입한 경우 종양이 0.5cm^2 에 크기로 걸리는 시간은 46일이었으며, $CD15^-$ 세포는 61일 그리고 293FT 세포는 71일이 지나도 종양이 형성되지 않았다 (도 7c). iCSC(unsorted) 세포 주입 후 생성된 종양의 크기를 비교한 결과, 주입한 세포 수와 종양의 크기는 비례했으며 (도 7d), 각각의 세포를 주입 후 생존율을 조사해 본 결과, $CD15^+$ 및 iCSC1(unsorted) 세포를 각각 주입한 군에서 가장 낮은 (median survival time, 1×10^4 cells, $T_{50}=15 \sim 16$ weeks) 생존율을 보였고, $CD15^-$ 세포의 경우는 주입한 세포 수에 비례한 생존율을 보였고 (5×10^5 cells, $T_{50}=20$ weeks; 1×10^4 , $T_{50}=53$ weeks), 293FT세포 (1×10^4 cells)를 주입한 경우는 65주(455일)가 지나도 종양 형성이 일어나지 않았으며, 생존했다 (도 7e).

[0078]

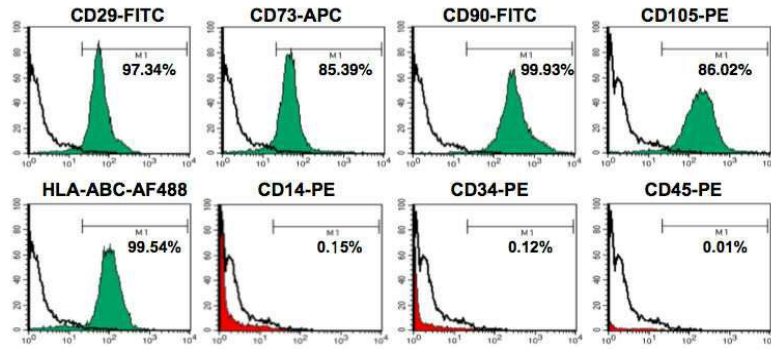
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

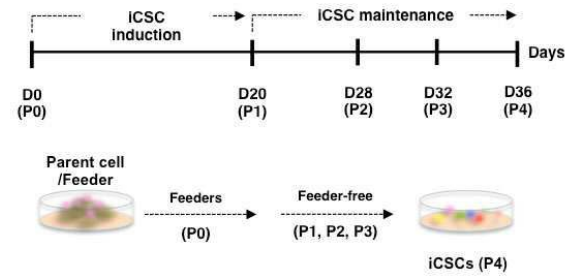
도면1a



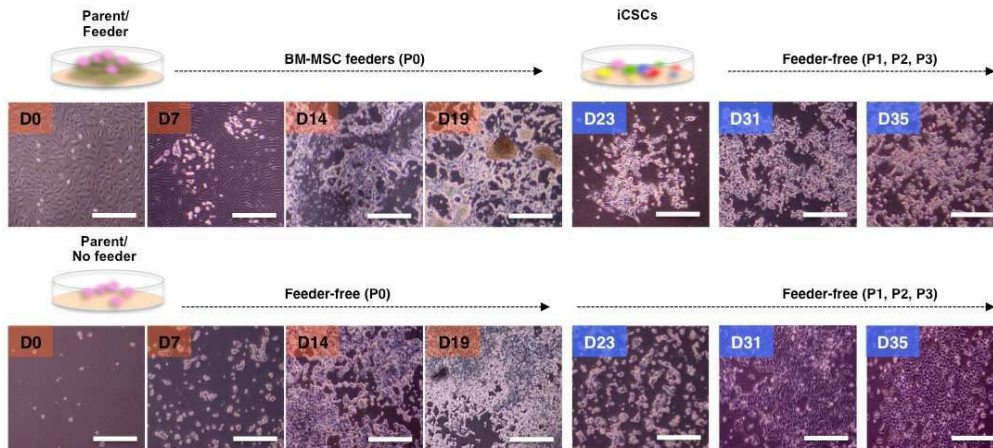
도면1b



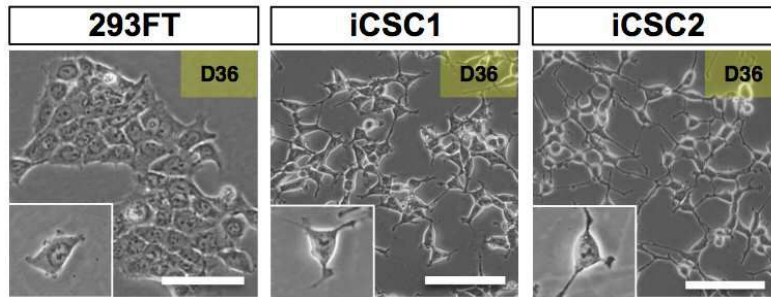
도면2a



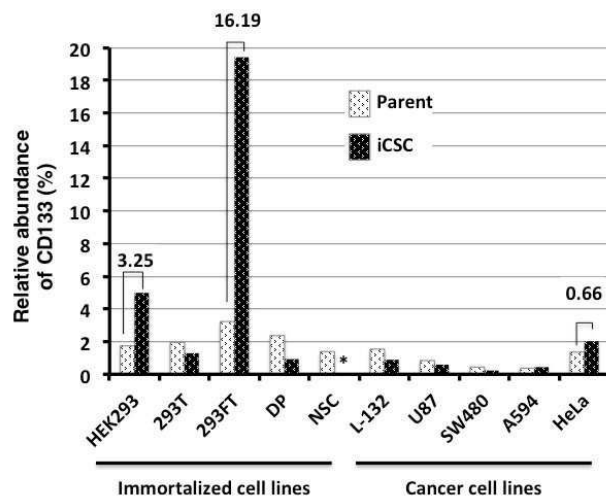
도면2b



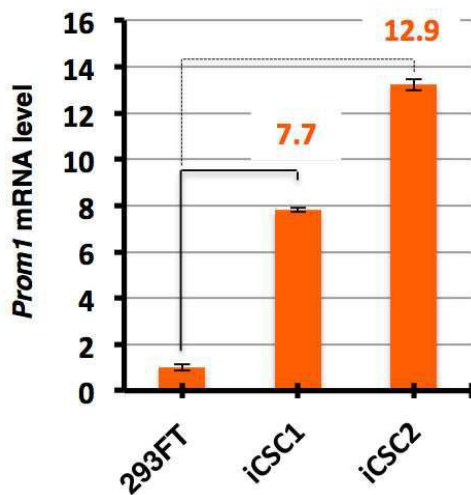
도면2c



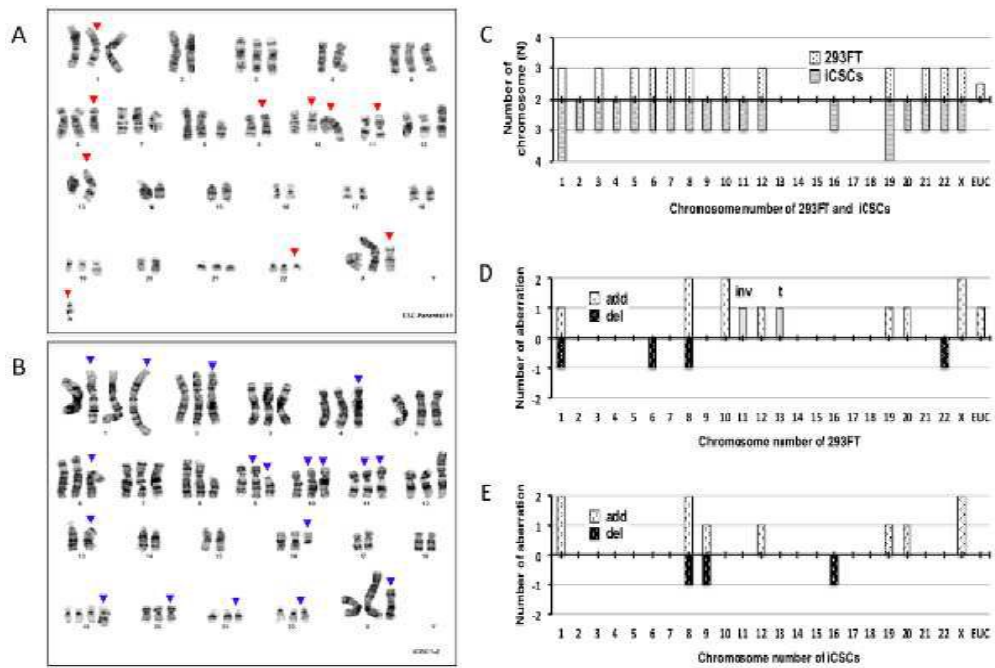
도면2d



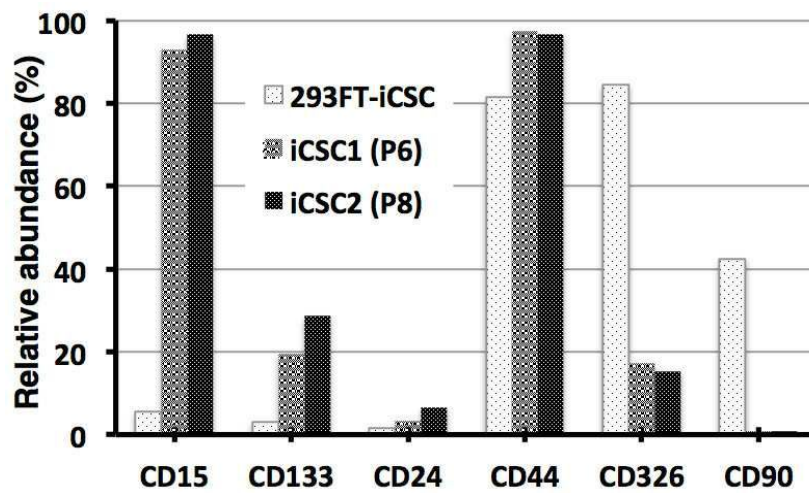
도면2e



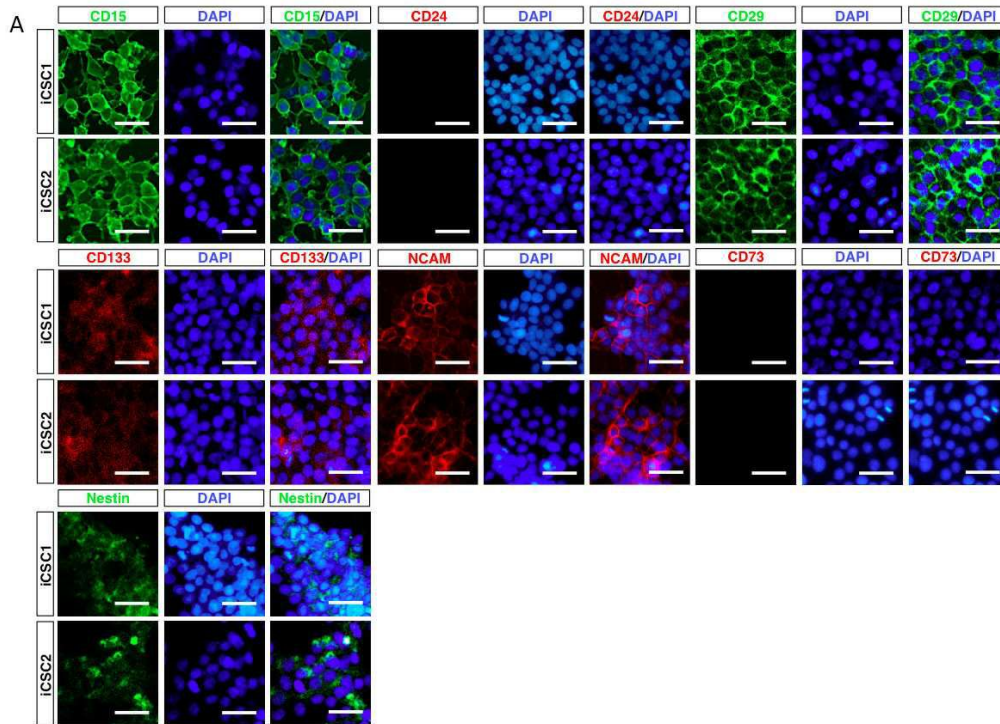
도면2f



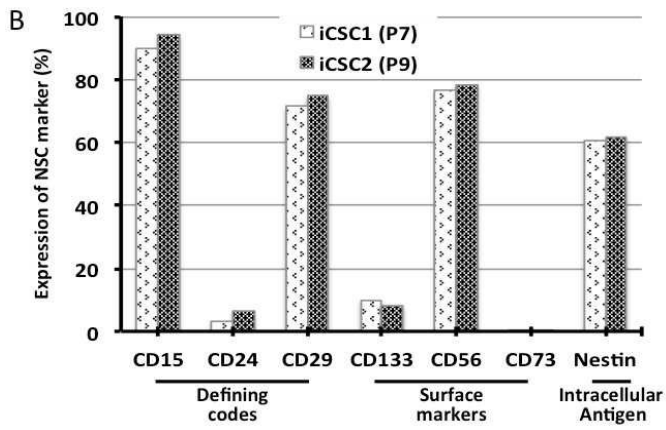
도면3



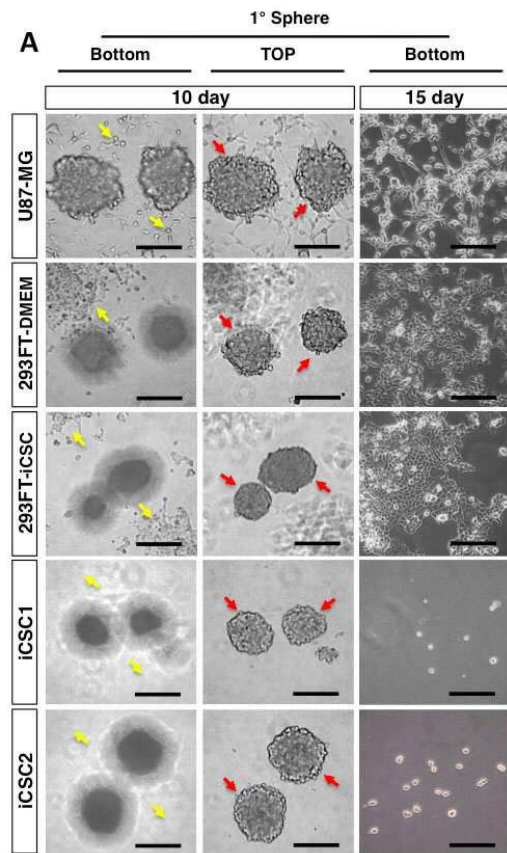
도면4a



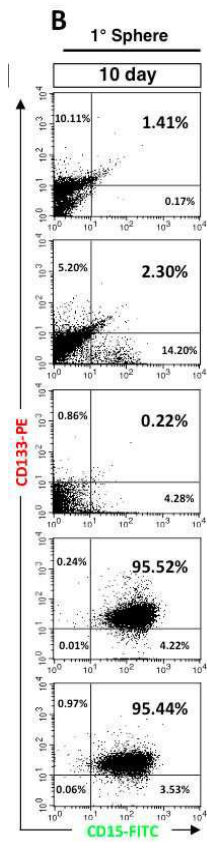
도면4b



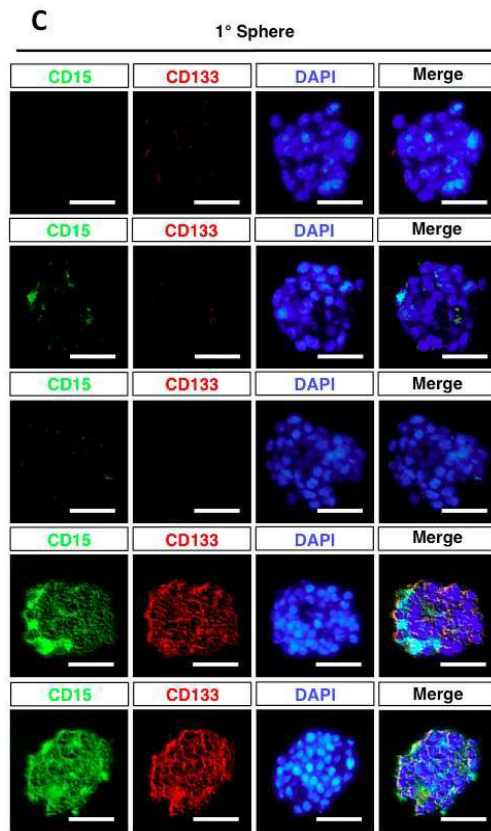
도면5a



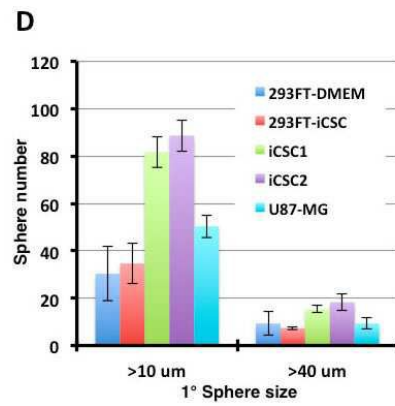
도면5b



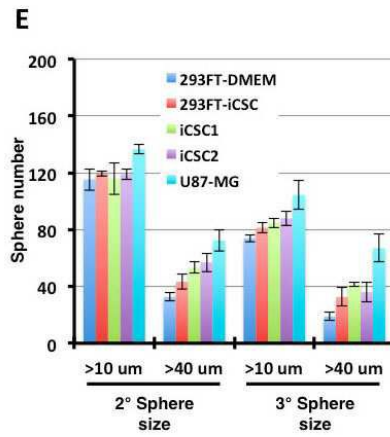
도면5c



도면5d



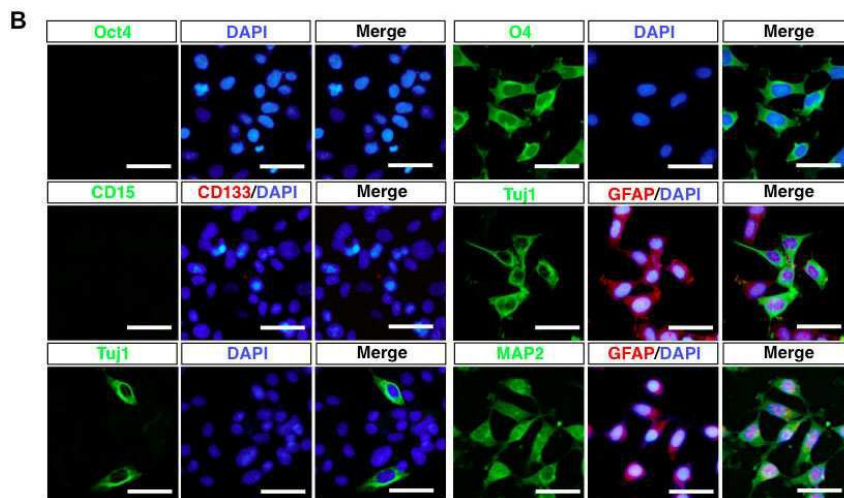
도면5e



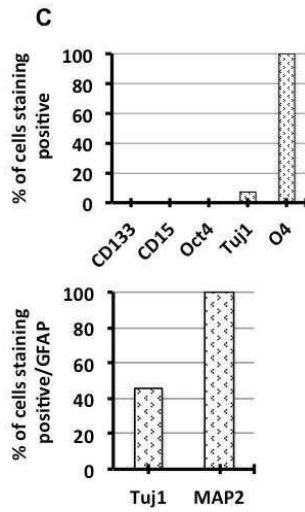
도면6a



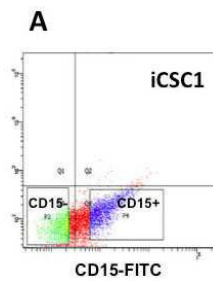
도면6b



도면6c



도면7a



도면7b

B

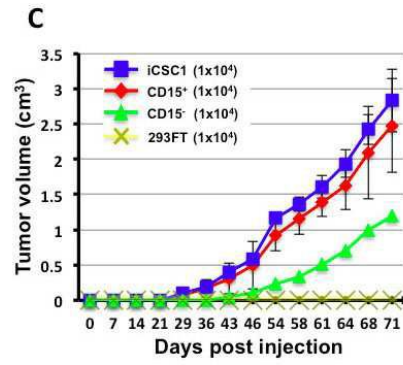
	Injected cells	Outgrowths/ Injection	Frequency
iCSC1 (Unsorted)	5×10^6	3/3	1/133 (1/33 ~ 1/548)
	1×10^6	3/3	
	5×10^5	6/6	
	1×10^4	6/6	
	1×10^3	6/6	
	1×10^2	1/3	
	1×10^1	1/3	
CD15 ⁺	1×10^4	3/3	1/134 (1/32 ~ 1/571)
	1×10^3	3/3	
	1×10^2	1/3	
	1×10^1	1/3	
CD15 ⁻	5×10^5	3/3	1/28,004 (1/3,974 ~ 1/197,381)
	1×10^4	1/3	
	1×10^3	0/3	
	1×10^2	0/3	
293FT	1×10^4	0/3	-Inf (1/11,016 ~ -Inf)
	1×10^3	0/3	

$P = 0.995$

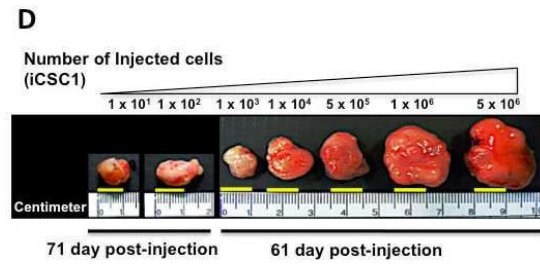
$P = 2.36e-9$

$P = 1.71e-11$

도면7c



도면7d



도면7e

