



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0106165
(43) 공개일자 2018년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 2506/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0033892

(22) 출원일자 2017년03월17일
심사청구일자 2017년03월17일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

김송철

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 221동 2002호
(신천동, 파크리오)

이송

경기도 의정부시 백석로 33, 104동 904호 (호원동, 삼익1차아파트)

심인경

서울특별시 송파구 풍성로26길 47, 102동 804호
(풍납동, 송파해모로아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

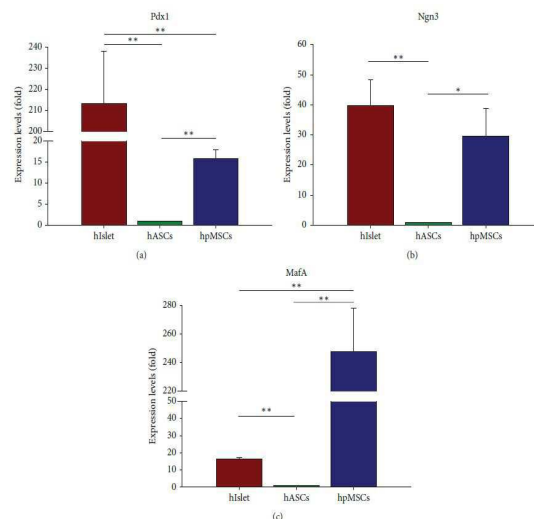
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 사람 췌장 외분비세포 유래 중간엽줄기세포(hpMSCs)는 중간엽줄기세포의 특성을 가지는 동시에 췌장 세포의 주요 전사인자를 발현하는 것이 확인됨에 따라, hpMSCs를 인슐린 분비 세포로 분화가 가능하다. 또한, 본 발명의 hpMSCs는 환자의 췌장에서 직접 분리된 세포로부터 배양될 수 있으므로 자가 세포 이식이 가능함에 따라, 면역반응을 억제시키고 세포의 생착율 및 생존율을 향상시킬 수 있으므로, 당뇨병 환자의 세포 이식 치료를 위한 전구 세포로 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H114C3214

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 간세포유래 자가 인슐린 생성세포를 이용한 인슐린 의존성 당뇨병 치료의 비임상 연구

기 여 율 50/100

주관기관 서울아산병원

연구기간 2014.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9F8031039

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술 개발 사업/바이오의료기술 개발 사업/세포재생기술개발사업

연구과제명 자가 세포 유래 인슐린 생성 세포와 3D 프린팅 조직 재생기술을 이용한 바이오 인공췌장의

개발

기 여 율 50/100

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포주는 사람 췌장의 외분비 세포로부터 분화되는 것을 특징으로 하는 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인슐린 분비세포로의 분화를 조절하는 유전자는 Pdx1, Ngn3 및 MaFA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주.

청구항 4

사람 췌장으로부터 분리된 외분비 세포를 2 내지 3일간 현탁 배양하여 외분비 세포 클러스터를 성장시키는 단계(제1단계); 및

상기 제1단계의 현탁 배양하여 성장시킨 외분비 세포 클러스터를 세포배양 플레이트에 옮겨 4 내지 6일간 부착 배양하여 중간엽줄기세포로 분화시키는 단계(제2단계)를 포함하며, 상기 중간엽줄기세포는 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 것을 특징으로 하는 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법은 제2단계의 중간엽줄기세포가 세포배양 플레이트에 80 내지 100% 성장할 때 계대 배양하여 중간엽줄기세포를 증식시키는 단계를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 인슐린 분비세포로의 분화를 조절하는 유전자는 Pdx1, Ngn3 및 MaFA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 췌장조직 내 췌도세포 중 인슐린을 분비하는 베타세포의 파괴 또는 기능적 소실로 인하여 혈중 당의 조절이 이루어지지 않아 발병하는 질환으로, 급속한 사회발달과 함께 기름진 음식 및 인스턴트 식품의 대중화에 의해 전 세계적으로 발병률이 급증하고 있다.

[0003] 당뇨가 유발되면 인슐린과 글루카곤의 분비상태가 교란되어 탄수화물뿐만 아니라, 당백질 및 지질대사 등 생체 내 대사 조절기능에 이상이 생겨 여러 가지 대사질환이 나타나게 되며, 당뇨 증상이 오래 지속되면 모세혈관의 상피 세포막의 비후가 일어나 순환기 등에 많은 합병증을 유발시킬 수 있다.

[0004] 당뇨병 치료에 있어서, 가장 중요한 목표는 혈당치를 가능한 정상치에 가깝게 조절하는 것으로, 치료방법으로 약물요법, 식이요법 및 운동요법을 실시하고 있다.

- [0005] 현재 제 1형 및 제 2형 당뇨병환자에게 사용되는 경구 혈당 강하제로, α -글루코시다아제(α -glucosidase) 억제제, 설폰닐우레아(sulfonylurea) 제제 및 비구아니드(biguanide) 제제가 있으며, α -글루코시다아제 억제제는 섭취한 식이 중의 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 및 혈중 인슐린의 상승을 감소시킴으로써 당뇨병의 치료효과를 나타낸다.
- [0006] 현재 임상에서 사용하고 있는 것으로는 아카보스(acarbose), 보글리보스(voglibose) 및 미글리톨(miglitol) 등이 있으나, α -글리코시다아제 억제제를 장기간 복용한 경우 일부 환자에 있어서 복부 팽만감, 구토 설사 등 부작용을 나타낼 수 있어 그 사용이 제한되는 문제가 있다.
- [0007] 또한, 심각한 당뇨병의 경우 전 췌장 이식 및 췌도세포 이식과 같은 외과적 수술이 필요하지만, 이식을 위한 췌도세포는 뇌사자의 췌장에서부터 공급받아 이루어지고 있어 이식원인 췌도세포의 극심한 부족이 문제가 되어 심각한 당뇨병 환자들의 치료가 제대로 이루어지지 못하고 있으며, 이를 해결하기 위해, 배아줄기세포 및 성체줄기세포를 이용한 세포 기반 치료법이 연구단계에 있지만 아직까지 임상적으로 사용하기에는 여러 가지 문제점이 있다.
- [0008] 중간엽줄기세포는 다양한 성체조직에서 분리, 배양할 수 있는 대표적인 성체줄기세포 중 하나로, 뼈, 연골, 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 세포로 알려져 있으나, 일반적인 중간엽줄기세포는 골수에서 분리되는 것이 대부분이며, 이러한 세포는 인슐린을 분비하는 세포를 포함하여 췌장 세포로 분화하기 어려운 조건을 가지고 있어, 당뇨병 치료를 위한 이식 세포의 전구 세포 사용되기 어렵다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1202086호 (2012.11.15 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 앞서 기술한 바와 같이 일반적인 중간엽줄기세포는 골수에서 분리되는 것이 대부분이며, 이러한 세포는 인슐린을 분비하는 세포를 포함하여 췌장 세포로의 분화가 어려운 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주를 제공한다.
- [0012] 사람 췌장에서부터 분리된 외분비 세포를 2 내지 3일간 현탁 배양하여 외분비 세포 클러스터를 성장시키는 단계(제1단계); 및 상기 제1단계의 현탁 배양하여 성장시킨 외분비 세포 클러스터를 세포배양 플레이트에 옮겨 4 내지 6일간 부착 배양하여 중간엽줄기세포로 분화시키는 단계(제2단계)를 포함하며, 상기 중간엽줄기세포는 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 것을 특징으로 하는 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따르면 사람 췌장 외분비세포 유래 중간엽줄기세포(hpMSCs)는 중간엽줄기세포의 특성을 가지는 동시에 췌장 세포의 주요 전사인자를 발현하는 것이 확인됨에 따라, hpMSCs를 인슐린 분비 세포로 분화가 가능하다. 또한, 본 발명의 hpMSCs는 환자의 췌장에서 직접 분리된 세포로부터 배양될 수 있으므로 자가 세포 이식이 가능하여 면역반응을 억제시키고, 세포의 생착율 및 생존율을 향상시킬 수 있으므로, 상기 사람 췌장 외분비세포 유래 중간엽줄기세포는 당뇨병 환자의 세포 이식 치료를 위한 전구 세포로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1은 성인 췌장 외분비 세포의 In vitro 배양 결과로, 도 1(a)는 성인 췌장 조직으로부터 분리된 외분비 세포를 비 조직 배양 플레이트에서 3일간 현탁배양하여 단일 외분비 세포가 클러스터로 응집된 것을 확인한 결과이며, 도 1(b)는 새로운 조직 배양 플레이트에 외분비 클러스터가 부착된 후 단층으로 빠르게 증식하는 모습을 확인한 결과이며, 도 1(c)는 단층 배양 3일 후, 빈틈없는 클러스터 내에서 상피세포와 유사한 형태 및 성장을 나타내는 대다수의 외분비 세포를 확인한 결과이며, 도 1(d)는 배양 인큐베이션 시간 증가에 의한 상피세포와 유사한 일부 세포의 형태 변화를 확인한 결과로, 특히, 도 1(e)는 클러스터 밖에 위치한 섬유아 세포와 유사한 형태의 세포를 확인한 결과이고, 도 1(f)는 상피 유사 세포와 동시에 증식하는 모습을 확인한 결과이다. 도 1(g)는 배양 4일째 상피 유사 세포에서 인슐린 양성 세포를 확인한 결과로, 인슐린 양성 세포가 확인되지 않았으나, 도 1(h)는 글루카곤 양성 세포를 확인한 결과이며, 도 1(i) 및 (j)는 외분비 세포의 대다수에서 아밀라아제 및 CA19-9가 양성 염색된 것을 확인한 결과이며, 도 1(k)는 배양 2, 4, 및 6일째 외분비 세포에서 췌장 세포 마커인 인슐린, 글루카곤, 아밀라아제 및 사이토카인 19 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과로, 배양 기간 동안 아밀라아제 mRNA 발현은 감소하여, 배양 6일째에는 발현이 나타나지 않은 반면, 사이토카인 19 mRNA는 배양 6일째까지 지속적인 발현 증가를 확인한 결과이다.

도 2는 증식된 중간엽줄기세포의 표현 형질을 확인한 결과로, 도 2(a)는 외분비 세포의 초대 배양 후 배양 플레이트에 부착된 섬유아세포 형태의 세포가 연속적인 1 내지 12 계대에 걸쳐 유사한 형태로 유지되는 것을 확인한 결과이며, 도 2(b)는 6번째 계대 배양된 hpMSCs를 4% 파라포름알데하이드에 고정시킨 후 항-인슐린(insulin), 글루카곤(glucagon), 아밀라아제(α-amylase) 및 CA19-9로 면역형광 염색한 결과로, 췌장 세포 호르몬인 인슐린, 글루카곤, 아밀라아제 및 외분비 세포로부터 분리되는 호르몬은 검출되지 않은 반면, 대부분의 세포에서 CA19-9의 발현을 확인한 결과이며, 도 2(c)는 계대배양 6일 후 섬유아세포와 유사한 형태의 세포를 수집하여 유동세포 분석을 수행한 결과로, PE가 결합된 CD73, CD90, CD105, CD14, CD19, CD45, CD31, MCAM, HCAM 및 αSMA 아이소타입 항체 또는 FITC가 결합된 CA19-9 항체를 이용하여 사람 중간엽줄기세포(hMSC) 마커를 표지하여 분석한 결과, hMSC-양성 마커인 CD73 (96.7%), CD90 (93.5%), CD105 (91%), αSMA (40.4%), MCAM (98.4%) 및 HCAM (86%)가 확인되었고, hMSC-음성 마커인 CD14, CD19, CD45 및 CD31는 확인되지 않은 반면, 췌장 도 세포 양성 마커인 CA19-9 (96.9%)가 함께 확인되었다. 도 2(d)는 면역형광 염색을 수행하여 사람 중간엽줄기세포(hMSC) 표현형 마커를 확인한 결과로, 6번째 계대에서 CD90, CD105, MCAM 및 HCAM의 강한 신호가 확인된 반면, CD14 및 CD19는 발현이 확인되지 않았다.

도 3은 사람 췌장 외분비 세포 유래 중간엽줄기 세포(hpMSCs)에서 췌장 전구세포 마커 발현을 확인하기 위해, RT-PCR 분석을 수행하여 외분비 세포, hpMSCs, 및 대조군인 사람 도세포의 mRNA 발현을 확인한 결과로, 배양 2 및 4일째 외분비 세포 mRNA를 추출하였으며, hpMSC mRNA는 2, 4, 6, 8, 10 및 12 계대 세포에서 추출하였다. 도 3(a)는 모든 계대의 hpMSCs에 mRNA 발현 수준을 확인한 결과로, 사이토카인 19 발현이 확인된 반면, 인슐린, 글루카곤 및 아밀라아제의 발현은 확인되지 않았다. 도 3(b)는 성장 및 분화를 조절하는 췌장 세포 전사 인자의 발현 수준을 확인한 결과로, 주요 전사 인자인 Pdx1, Ngn3 및 MafA는 4번째 계대에서 8번째 계대 배양 세포에서 발현이 확인되었으며, Nkx2.2, Nkx6.1 및 P48은 모든 hpMSCs에서 발현되었으며, Isl1 및 Pax6는 4번째 계대부터 발현이 시작되었으며, 외분비 세포에서 Nkx2.2 및 Nkx6.1의 약한 발현과 외분비 세포 마커인 P48의 강한 발현이 나타나는 것을 확인한 결과이며, 도 3(c)는 CD44, CD90, 비멘틴(vimentin) 및 데스민(desmin)과 같은 hpMSCs와 관련있는 마커들이 hpMSCs에서 지속적으로 발현되는 것을 확인한 결과이다.

도 4는 6번째 계대 배양된 hpMSCs의 핵에서 주요 췌장 전사 인자의 발현을 확인한 결과로, Pdx1, Ngn3 및 MafA는 β-세포 내에서 췌장 성장 및 췌장 전구 세포 분화를 조절하는 주요 전사 인자로, 도 4(a)는 Pdx1-양성 면역형광 염색 결과이며, 도 4(b)는 Ngn3-양성 면역형광 염색 결과이며, 도 4(c)는 MafA-양성 면역형광 염색 결과이다(Scale bar = 100 μm).

도 5는 hpMSCs에서 주요 췌장 전사인자의 mRNA 발현을 확인하기 위해, 사람 도 세포, 사람 ASCs 및 hpMSCs에서 qPCR를 수행하여 주요 췌장 전사인자인 Pdx1, Ngn3 및 MafA 발현 수준을 확인하고 hASC에서 측정된 발현 수준을 기준으로 상대값을 계산하여 나타낸 결과로, 도 5(a)는 췌장 세포(213.040 ± 25.002) 및 hpMSCs (15.867 ± 2.019)에서 Pdx1가 높게 발현된 것을 확인한 결과이며, 도 5(b)는 췌장 세포 (39.855 ± 8.529)와 hpMSC (29.535 ± 9.319)에서 Ngn3가 유사한 수준으로 발현된 것을 확인한 결과이며, 도 5(c)는 MafA가 췌장 세포 (16.342 ± 0.640)보다 hpMSCs (247.826 ± 30.376)에서 더 높게 발현하는 것을 확인한 결과이다. Error bars indicate SD (n = 3); *P < 0.05; *P < 0.005.

도 6은 hpMSCs 및 췌장 전구 세포 사이에서 전사 인자 발현 상관관계를 확인한 결과로, 사람 외분비 췌장 조직

에서 유래된 hpMSCs의 Pdx1, Nkx2.2, Nkx6.1 및 P48 발현 수준을 췌장 전구세포와 비교한 결과이며, hpMSC에서 Ngn3, Isl1, Pax6 및 MafA와 같이 췌장 내분비 발달 계통과 관련된 다른 인자들의 발현 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주를 제공할 수 있다.
- [0016] 보다 상세하게는 상기 중간엽줄기세포주는 사람 췌장의 외분비 세포로부터 분화된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 성인 사람 췌장의 외분비 세포로부터 분화된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 상기 췌장 외분비세포(Pancreatic exocrine cell)는 소장으로 분비되는 효소를 생산하는 췌장 세포를 의미한다.
- [0018] 상기 인슐린 분비세포로의 분화를 조절하는 유전자는 Pdx1, Ngn3 및 MaFA로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자일 수 있다.
- [0019] 보다 상세하게는 상기 중간엽줄기세포주는 췌장 도 세포 유전자인 CA19-9과 hMSC-양성 마커인 CD73, CD90, CD105, αSMA, MCAM 및 HSCAM 과 같은 hMSCs 관련 마커들이 함께 발현될 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 사람 췌장에서부터 분리된 외분비 세포를 2 내지 3일간 현탁 배양하여 외분비 세포 클러스터를 성장시키는 단계(제1단계); 및 상기 제1단계의 현탁 배양하여 성장시킨 외분비 세포 클러스터를 세포배양 플레이트에 옮겨 4 내지 6일간 부착 배양하여 중간엽줄기세포로 분화시키는 단계(제2단계)를 포함하며, 상기 중간엽줄기세포는 인슐린 분비 세포로의 분화를 조절하는 유전자가 발현된 것을 특징으로 하는 성인 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0021] 상기 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주 제조방법은 제2단계의 중간엽줄기세포가 세포배양 플레이트에 80 내지 100% 성장할 때 계대 배양하여 중간엽줄기세포를 증식시키는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0022] 보다 상세하게는 사람 췌장에서부터 순수한 외분비 세포를 얻기 위해, 연속적인 밀도 구배를 이용하여 분해된 조직으로부터 췌장 도 세포를 분리하였다.
- [0023] 췌장 도 세포를 분리하고 남은 외분비 세포를 10% 태아소혈청(FBS) 및 1% 항생제가 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 비 조직 배양 플레이트에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건으로 현탁 배양하여 외분비 세포가 클러스터를 이루도록 유도하였다.
- [0024] 2일마다 배지를 교체하여 죽은 세포를 제거하고, 외분비 세포의 밀도가 60%를 이루도록 클러스터를 배양한 후 부착 배양을 위해, 부유된 외분비 세포 클러스터를 조직 배양 플레이트에 옮기고 4일 내지 6일 동안 10 % FBS 및 1 % 항생제가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.
- [0025] 부착된 외분비 세포 클러스터 밖으로 사람 췌장 외분비 세포 유래 중간엽줄기세포(hpMSCs)가 단층으로 증식하였으며, 췌장 외분비 세포 및 hpMSCs가 >80% 합류되면 0.25% 트립신-EDTA로 세포들을 떼어내고 10% FBS 및 1% 항생제가 포함된 신선한 DMEM(Dulbeccos Modified Eagle Medium) 배지가 들어 있는 조직 배양 플레이트로 계대 배양하여 섬유아세포와 같은 형태를 나타내는 hpMSCs를 증식시켰다.
- [0026] 상기 인슐린 분비세포로의 분화를 조절하는 유전자는 Pdx1, Ngn3 및 MaFA으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, hpMSCs의 6번째 계대 배양기간 동안 면역형광 염색을 수행하여 주요 췌장 전구 세포의 전사 인자인 Pdx1, Ngn3 및 MafA의 발현을 확인한 결과, 도 4(a)와 같이 hpMSCs의 중첩된 핵에서 Pdx1 발현이 확인된 반면, 도 4(b) 및 4(c)와 같이 Ngn3 및 MafA는 도 4(b) 및 4(c)와 같이 모든 hpMSCs에서 발현이 확인되었다.
- [0028] 또한, hpMSCs 특징을 확인하기 위해, qPCR를 수행하여 췌장 도 세포, 성인 지방 조직 유래 중간엽줄기세포(hASCs) 및 hpMSCs 사이에서 주요 전사 인자인 Pdx1, Ngn3 및 MafA의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과, 도 5(a)와 같이 hpMSCs의 Pdx1 발현 수준이 hASCs보다 15배 높은 것을 확인할 수 있었으며, 도 5(b)와 같이 Ngn3의 발현은 hASCs보다 췌장 도 세포와 hpMSCs에서 높게 나타났으며, MafA mRNA의 경우, 도 5(c)와 같이 췌장 도 세포보다 hpMSCs에서 높게 발현된 것을 확인할 수 있었다.

- [0029] 상기 결과로부터 hpMSCs는 췌장 전구 세포와 유사하게 주요 췌장 전사 인자를 자발적으로 발현되는 것이 확인되었다.
- [0030] 또한, 본 발명의 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주는 췌장 도 세포 유전자인 CA19-9과 hMSC-양성 마커인 CD73, CD90, CD105, α SMA, MCAM 및 HCAM과 같은 hMSCs 관련 마커들이 함께 발현될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 사람 췌장 유래 중간엽줄기세포주에서 췌장 세포 마커인 인슐린, 글루카곤, 아밀라아제 및 CA19-9의 발현을 확인한 결과, 도 2(b)와 같이 췌장 세포 마커인 인슐린, 글루카곤 및 아밀라아제는 검출되지 않았으나, 4번째 계대 배양에서 CA19-9의 발현이 확인되었다.
- [0032] 또한, 특이적인 사람 중간엽줄기 세포(hMSC) 마커의 발현을 확인하기 위해, 면역형광염색 및 유세포 분석을 수행하여 hMSC의 세포 표면 항원 발현을 확인한 결과, 도 2(c) 및 2(d)와 같이 사람 중간엽줄기 세포(hMSC)와 관련된 세포 표면 마커인 CD73, CD90, CD105, MCAM 및 HCAM에 대한 항원이 hpMSCs에서 85% 이상 발현된 반면, hMSC 음성 마커인 CD14, CD19, CD45 또는 CD31의 발현은 나타나지 않는 것이 확인됨에 따라, 상기 세포들이 hpMSC 표현형을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0033] 상기 결과로부터 사람 췌장 외분비세포 유래 중간엽줄기세포(hpMSCs)는 중간엽줄기세포의 특성을 가지는 동시에 췌장 세포의 주요 전사인자를 발현하는 것이 확인됨에 따라, 상기 hpMSCs는 인슐린 분비 세포로의 분화가 가능하다. 따라서, 상기 사람 췌장 외분비세포 유래 중간엽줄기세포는 당뇨병 환자의 세포 이식 치료를 위한 전구 세포로 사용될 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0037] <실험예 1> 사람 외분비 췌장으로부터 중간엽줄기 세포 분리
- [0038] 서울 아산 병원 임상 시험위원회의 규정에 따라 5 명의 환자로부터 정상 성인 췌장 조직을 얻었으며, 헬싱키 및 우수 임상 실습에 따라 수행되었다.
- [0039] 도세포 및 외분비 세포를 분리하기 위해, 수정 된 Ricordi의 췌장 도 세포 분리 방법을 수행하였다.
- [0040] 순수한 외분비 세포를 얻기 위해, OptiPrep 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 COBE 2991 세포 처리기(Gambro BCT Inc., Lakewood, CO, USA)로 연속적인 밀도 구배를 이용하여 분해된 조직으로부터 췌장 도 세포와 외분비 세포를 분리하였다.
- [0041] 분리된 외분비 세포는 10% 태아소혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 1% 항생제가 포함된 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640; Gibco, Carlsbad, CA, USA)배지를 이용하여 비 조직 배양 플레이트에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건으로 현탁 배양하였다.
- [0042] 12시간 후 첫 번째 배지를 교체하고, 2일 마다 배지를 교체하여 죽은 세포를 제거하고 60% 세포 밀도의 외분비 세포 클러스터로 성장시켰다.
- [0043] 부착 배양을 위해, 부유된 외분비 세포 클러스터를 조직 배양 플레이트에 옮기고 4일 동안 10 % FBS 및 1 % 항생제가 포함된 RPMI 배지 1640 (Gibco)에서 배양하였다.
- [0044] 초기 배양기간 동안 세포 배양 플레이트에 부착된 외분비 세포 밖으로 소수의 hpMSCs가 이동하였다.
- [0045] 췌장 외분비 세포 및 hpMSCs가 >80% 합류되면 0.25% Trypsin-EDTA (TE; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 세포들을 떼어내고 10% FBS 및 1% 항생제가 포함된 신선한 DMEM(Dulbeccos Modified Eagle Medium; Gibco) 배지가 들어 있는 조직 배양 플레이트로 계대배양한 후 광학현미경을 이용하여 부착된 hpMSCs를 관찰하여 섬유아세포와 같은 형태를 확인하였다.
- [0047] <실험예 2> 유동 세포 분석(Flow Cytometry Analysis)

- [0048] 분화(CD) 마커 클러스터에 대한 항체 및 피코에리트린-(PE-)이 결합된 단클론성 생쥐 항인간 CD73, CD90, CD105, CD45 및 CD31 항체(BD Biosciences, La Jolla, CA, USA)와 hpMSCs를 함께 인큐베이션하였다.
- [0049] 일차 인큐베이션 후 PE가 결합되지 않은 단클론성 생쥐 항체 MCAM, HCAM, CD14, CD19(Millipore, Billerica, MA, USA), alpha smooth-muscle actin(α SMA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 및 NCL-L-CA19-9 (Leica Biosystems, Newcastle, UK)는 항-마우스 IgG-PE (Santa Cruz Biotechnology) 또는 Alexa Fluor 488 항-마우스 IgG (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 결합시켰다.
- [0050] 항체 희석 및 인큐베이션 시간은 제조사의 설명서에 따라 수행되었으며, 세포는 항체와 압조건, 4°C에서 30분간 인큐베이션되었다. 음성 대조군으로 아이소타입이 일치하는 IgG-PE를 이용하였으며, FACSCaliber flowcytometer (BD Biosciences)를 이용하여 상기 방법으로 표지된 hpMSCs를 분석하였다.
- [0052] <실험예 3> 면역형광 염색(Immunofluorescence Staining)
- [0053] 면역형광 염색을 위해, hpMSCs를 배양시킨 슬라이드를 4% 파라포름알데하이드(PFA; Merck, Darmstadt, Germany)로 4°C에서 30분간 고정한 후 인산염완충식염수 (PBS)로 두 번 세척하였다.
- [0054] 상기 hpMSCs를 4°C에서 5분간 0.3% 트리톤 X-100로 투과시킨 후 PBS를 이용하여 세 번 세척하고, 항체 불활성화를 위해 실온에서 5% 정상 염소 혈청으로 30분간 인큐베이션하였다.
- [0055] 내분비 및 외분비 세포 확인을 위해, 항 래빗 인슐린(1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), 래빗 항 인간 글루카곤(1 : 100; DaKo, Glostrup, Denmark), 항-래빗 아밀라아제(1 : 200; Sigma-Aldrich) 및 항-마우스 CA19-9 (1 : 200; Leica Biosystems) 일차 항체로 인큐베이션하였다.
- [0056] 항-래빗 α SMA (1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), 항-마우스 HCAM, MCAM, CD14 및 CD19 (1 : 100; Millipore)와 항-마우스 CD90 및 CD105 (1 : 100; BD Biosciences)를 이용하여 hpMSCs와 관련있는 마커의 발현을 확인하였다.
- [0057] 주요 췌장 내분비 전사 인자의 확인을 위해, 항-염소 Pdx1 (1 : 10000; Abcam, Cambridge, UK), 항-래빗 Ngn3 (1 : 100; Abcam) 및 항-래빗 MafA (1 : 200; Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO, USA)를 이용하였다.
- [0058] 모든 일차 항체들은 4°C에서 하룻밤동안 인큐베이션 되었으며, 이차 형광 표지를 위해, hpMSCs와 Alexa Fluor 488 염소 항-마우스 또는 항-래빗 IgG (1 : 200; Life Technologies) 및 Alexa Fluor 594 염소 항-래빗 IgG(1:200; Life Technologies)를 인큐베이션하였다.
- [0059] Hoechst 33342 (1:100; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 실온에서 3분간 핵 염색을 수행한 후, 세포를 PBS로 세 번 세척하였다.
- [0060] LSM710 공초점 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)하에서 상기 슬라이드를 시각화하였다.
- [0062] <실험예 4> 역전사 PCR (Reverse-Transcription PCR; RT-PCR)
- [0063] 제조사의 설명서에 따라 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 hMSCs로부터 전체 RNA를 추출하였다.
- [0064] 배양 2 및 4일째 외분비 세포와 2, 4, 6, 8, 10 및 12 계대의 hpMSCs로부터 전체 RNA를 추출하였다.
- [0065] 50°C에서 60분 및 70°C에서 15분 조건의 SuperScript III reverse-transcription kit (Invitrogen)와 oligo-dT 프라이머를 이용하여 1 μ g RNA 주형으로부터 cDNA를 합성하였다.
- [0066] rTaq plus master mix (ELPIS Biotech, Seoul, South Korea)와 표 1과 같은 유전자 특이적 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다.
- [0067] PCR 증폭 조건은 다음과 같다; 95°C에서 5분간 초기 변성(denaturation) 후 95°C에서 20초, 55°C 또는 57°C에서 20초 조건으로 30 사이클을 진행하고, 72°C에서 20초간 중합(extension)시키고, 72°C에서 3분간 최종 증폭을 진행하였다.
- [0068] RT-PCR 결과는 β -2 마이크로블린 항존유전자에 대하여 표준화하였다.

표 1

[0069]

유전자		서열(5'→3')	서열번호	T _m (℃)	크기(bp)
Insulin	Forward	CATGGCCCTGTGGATGCGC	1	64	331
	Reverse	AGTTGCAGTAGTTCTCCAG	2	52.5	
Glucagon	Forward	CCCAAGATTTTGTGCAGTGGTT	3	57.5	221
	Reverse	GCGGCAAGTTCTTCAACAAT	4	57.7	
Amylase	Forward	GGTTCAGGTCTCTCCACCAA	5	53.5	214
	Reverse	TCCTGCACTCACAGCGTTAC	6	53.4	
Cytokeratin 19	Forward	AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA	7	68.2	460
	Reverse	ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA	8	55.8	
Pdx1	Forward	GCCCCGCGCCGCCGCGCA	9	75.1	231
	Reverse	GGCAGCTGGACGCGTTGGGC	10	71.2	
Ngn3	Forward	GTAAGAAAGGATGAGCCTCAACC	11	57.5	241
	Reverse	TCAGTGCCAACTCGCTCTTAGG	12	58.1	
MafA	Forward	TTCAGCAAGGAGGAGGTCAT	13	53.3	216
	Reverse	CGCCAGCTTCTCGTATTCT	14	53.6	
Nkx2.2	Forward	TTCTACGACAGCAGCACAACC	15	58.9	393
	Reverse	CGTCACCTCCATACCTTTCTCG	16	57.2	
Nkx6.1	Forward	ACACGAGACCCACTTTTCCG	17	57.6	336
	Reverse	TGCTGGACTTGTCTTCTCAAC	18	58	
Isl1	Forward	ATTTCCCTATGTGTGGTTGCG	19	57.4	229
	Reverse	CGTTCTTGCTGAAGCCGATG	20	58	
Pax4	Forward	TTTGTGCTGAAGGGCTTTGC	21	57.5	216
	Reverse	GGGAGAAGATAGTCCGATTCCG	22	57.6	
Pax6	Forward	CGGCAGAAGATTGTAGAG	23	44.8	290
	Reverse	GATGACACGCTTGGTATG	24	45.8	
Sox9	Forward	TACGACTACACCGACCACCA	25	53.4	213
	Reverse	TCAAGGTCGAGTGAGCTGTG	26	53.3	
P48	Forward	CTGGAATGCCTGGACTCAAT	27	53.6	232
	Reverse	AGGTGCTTTTCCTTCAGCA	28	53.8	
CD44	Forward	AAGGTGGAGCAACACAACC	29	53.6	151
	Reverse	AGCTTTTCTTCTGCCACA	30	53.8	
CD90	Forward	CTAGTGGACCAGGCCTTCG	31	53.7	236
	Reverse	TGGAGTGCACAGTGTAGGT	32	53.4	
Vimentin	Forward	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	33	53.8	170
	Reverse	TCCAGCAGCTTCTGTAGGT	34	53.6	
Desmin	Forward	AAGCTGCAGGAGGATTCA	35	53.7	240
	Reverse	GGCAGTGAGGTCTGGCTTAG	36	53.6	
Beta actin	Forward	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	37	53.5	184
	Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	38	53.4	

[0071] <실험예 5> qPCR

[0072] 실시간 PCR 생산물은 AccuPower Plus DualStar qPCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 TaqMan 프로브와 함께 관찰하였다.

[0073] TaqMan 분석은 Taq DNA 중합효소의 5' - 에서 3' -엑소뉴클레아제 활성을 이용하였으며, 각 반응은 유전자 특이적 프라이머 및 형광 염료 표지된 TaqMan 프로브가 포함되었다.

[0074] 상기 프로브에는 5' -리포터 염료 FAM (6-carboxyfluorescein) 및 3' -소광제 염료 TAMRA (carboxytetramethylrhodamine)가 포함되어 있으며, 각 프로브는 표 2와 같이 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 사이의 표적 서열에 어닐링되도록 설계되었다.

[0075] qPCR 프로그램은 95℃에서 5분간 초기변성(predenaturation) 및 95℃에서 15초간 변성시키는 두 단계 반응으로 수행되었으며, 이후 55℃ 또는 60℃에서 20초간 45 사이클로 결합(annealing)/중합(extension)/검출

(detection) 과정이 진행되었으며, 반응 완료 후 $2^{-(\Delta \Delta Ct)}$ 방법을 이용하여 유전자 발현 분석을 수행하였다.

표 2

유전자		서열(5' → 3')	서열번호	T _m (℃)	크기(bp)
Pdx1	Forward	GCATCCCAGGTCTGTCTTCT	39	60.7	140
	Reverse	CACTGCCAGAAAGGTTTGAA	40	58.5	
	Probe	AACCCGAGCACAAGGCCAG	41	62.9	
Ngn3	Forward	GAAAGGACCTGTCTGTCGCT	42	59	124
	Reverse	AGGGAGAAGCAGAAGGAACA	43	57.7	
	Probe	CTCCCGGCTCCCTCCCTCTC	44	62.9	
MafA	Forward	TTCAGCAAGGAGGAGGTCAT	45	60.3	119
	Reverse	TTCTCGCTCTCCAGAATGTG	46	61.5	
	Probe	CTCAAGCAGAAGCGGCGCAC	47	62.7	
B2M	Forward	GACTTTGTACAGCCCAAGA	48	59.2	111
	Reverse	CAAGCAAGCAGAATTGGAA	49	61.8	
	Probe	TCATCCAATCCAATGCGGCA	50	62.7	

<실시예 1> 성인 외분비 췌장 세포의 특징 확인

높은 순도의 외분비 세포를 얻기 위해 성인 외분비 췌장 세포 배양을 위한 두 단계 배양방법을 고안하였다.

먼저, 성인 외분비 췌장 세포를 비 조직 배양 플레이트에서 3 일 동안 현탁 배양하였으며, 배양 기간 동안 도 1(a)와 같은 세포 성장이 확인되었다.

세포 성장 확인 후 조직 배양 플레이트로 교체하였다. 교체 2 일 이내 외분비 클러스터가 플레이트에 부착되었으며, 도 1(b)와 같이 외분비 클러스터 부착 직후부터 새로운 외분비 세포 단층이 자라났으며, 도 1(c)와 같이 상기 세포들은 상피 세포와 같은 형태를 나타내었으며, 6일의 배양기간 동안 나타난 단층 질량을 기초로 빠른 증식이 확인되었다.

또한, 도 1(d) 및 도 1(e)와 같이 낮은 세포 밀도 영역에서는 상피 세포와 같은 형태에서 벗어난 일부 세포들이 관찰되었는데, 상기 세포들은 독립적으로 증식하였으며, 도 1(f)와 같이 섬유아세포와 유사한 형태를 나타내었다.

부착된 외분비 세포 클러스터의 특징을 확인하기 위해, 인슐린, 글루카곤, 아밀라아제 및 CA19-9와 같은 췌장 세포 마커에 대한 면역형광 염색을 수행하였다.

그 결과, 도 1(g)와 같이 인슐린 양성 세포는 확인되지 않았으나, 도 1(h)와 같이 글루카곤을 발현하는 단일 세포가 배양 4일째에 확인되었다.

또한, 도 1(i) 및 1(j)을 참고하면, 췌장 선포세포로부터 분비되는 효소인 아밀라아제 및 췌관 세포 마커 CA19-9는 배양 4일째에 외분비 세포에서 대부분 확인되었으며, 유전자 발현 패턴은 도 1(k)와 같이 배양 2, 4 및 6일에서 비슷하게 나타났다.

인슐린 mRNA는 발현되지 않았으나, 배양 2, 4 및 6일에 글루카곤 mRNA가 약하게 발현되었으며, 아밀라아제 mRNA의 발현은 감소한 반면, 사이토케라틴 19 mRNA는 배양 기간 동안 지속적으로 발현되었다.

상기 결과들로부터 본 발명에서 고안된 세포 분리 및 배양 방법은 내분비 세포 없이 순수한 등급의 외분비 세포를 제공하는 데 매우 적합한 방법인 것이 확인되었다.

<실시예 2> 외분비 세포에서 유도된 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cells)의 증식 및 표현형 확인

사람 췌장 외분비 세포에서 유래된 중간엽줄기세포(hpMSCs)를 증식시키기 위해, 플레이트 전체에 세포가 덮일 때까지 초대 외분비 클러스터를 부착 배양하였다.

초대 배양기간 동안 외분비 세포의 성장과 비교하여 hpMSCs는 적은 수로 성장하였으나, 외분비 세포의 계대배양

후 hpMSCs가 나타나기 시작하였으며, 계대 배양기간 동안 거의 모든 상피 세포와 유사한 외분비 세포는 새로운 조직 배양 플레이트에 부착되지 않았다.

[0092] 반면, 도 2(a)와 같이 섬유아세포와 유사한 hpMSCs는 부착되어 쉽게 성장하였으며, 지속적인 계대 배양을 통해 hpMSC이 점차 증가하였으나, 도 2(b)와 같이 성인 췌장 세포 마커인 인슐린, 글루카곤 및 아밀라아제는 검출되지 않았으며, CA19-9은 4번째 계대배양에서 발현이 확인되었다.

[0093] 특이적인 사람 중간엽줄기 세포(hMSC) 마커의 발현을 확인하기 위해, 4번째 계대배양 후 면역형광염색 및 유세포 분석을 수행하여 hMSC의 세포 표면 항원 발현을 확인하였다.

[0094] 그 결과 도 2(c) 및 2(d)와 같이 사람 중간엽줄기 세포(hMSC)와 관련된 세포 표면 마커인 CD73, CD90, CD105, MCAM 및 HCAM에 대한 항원이 hpMSCs에서 85 % 이상 발현된 반면, hMSC 음성 마커인 CD14, CD19, CD45 또는 CD31의 발현은 나타나지 않았다.

[0095] 상기 결과로부터 상기 세포들이 hpMSC 표현형을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0096] 또한, 도 2(c)를 참고하면, 사람 중간엽줄기 세포(hMSC)의 마이너 마커인 αSMA 역시 hpMSC에서 발현되었으며, 흥미롭게도 췌장관 세포 마커인 CA19-9은 대부분의 세포에서 발현된 것을 확인할 수 있었다.

[0097] 상기 결과들로부터 본 발명에서 고안된 세포 분리 및 배양 방법은 특별한 분리 방법 없이 순수한 췌장 외분비 세포로부터 hpMSC 분화 및 증식이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

[0098] 또한, hpMSCs는 CA19-9와 hMSC 마커 모두를 동시에 나타내는 것을 확인함에 따라, hpMSC 변형 후에도 췌장관 세포 표현형을 함께 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] <실시예 3> hpMSC에서 췌장 전구체 유전자 발현 확인

[0101] 외분비 세포와 사람 췌장 외분비 세포 유래 중간엽줄기세포(hpMSCs)에서 mRNA 발현을 확인하기 위해, 전구 세포 및 성장 세포를 포함하여 중간엽줄기세포와 췌장 세포에서 발현 차이를 나타내는 것으로 알려진 유전자의 발현 수준을 RT-PCR로 확인하였다.

[0102] 그 결과, 도 3(a)와 같이 성숙한 췌장 내분비 세포 호르몬인 인슐린과 글루카곤 mRNA와 성숙한 외분비 세포 소화 효소인 아밀라아제 mRNA는 2, 4, 6, 8, 10 및 12 계대의 hpMSC에서 발현되지 않았으나, 일반적인 외분비 세포 및 대조군인 사람 도(islet) 세포에서는 발현되었다.

[0103] 한편, 췌장관 세포 마커인 사이토케라틴 19 mRNA는 외분비 세포, 도세포 및 hpMSCs의 모든 계대에서 발현이 확인되었다.

[0104] 또한, 췌장 전구 세포와 분화 마커인 Pdx1, Ngn3, MafA, Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1, Pax4, Pax6, Sox9, P48 및 FoxA2의 발현 수준을 확인한 결과, 도 3(b)와 같이 계대 배양된 hpMSCs에서 Pdx1, Ngn3, MafA, Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1, Pax6 및 P48 mRNA의 발현 패턴이 변화된 반면, 일반적인 외분비 세포에서는 Nkx2.2와 Nkx6.1의 발현 감소 및 P48의 발현 증가가 확인되었다.

[0105] 췌장의 주요 전사 인자인 Pdx1, Ngn3 및 MafA mRNA의 발현은 hpMSC의 4번째 계대에서 확인되었으나, 이후 10번째 계대까지 점차 사라지는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 그러나 Nkx2.2 및 Nkx6.1 mRNA 발현은 전체 hpMSC 계대 배양기간 동안 나타났다.

[0107] 초기 내분비 세포 마커인 Isl1 (Isl1), Pax6 및 FoxA2의 mRNA 발현은 hpMSC의 4번째 계대에서 확인되기 시작하여 12번째 계대까지 계속 관찰되었으나, 다른 내분비 세포 분화 마커인 Pax4 및 Sox9의 발현은 hpMSCs의 계대 배양기간 동안 나타나지 않았다.

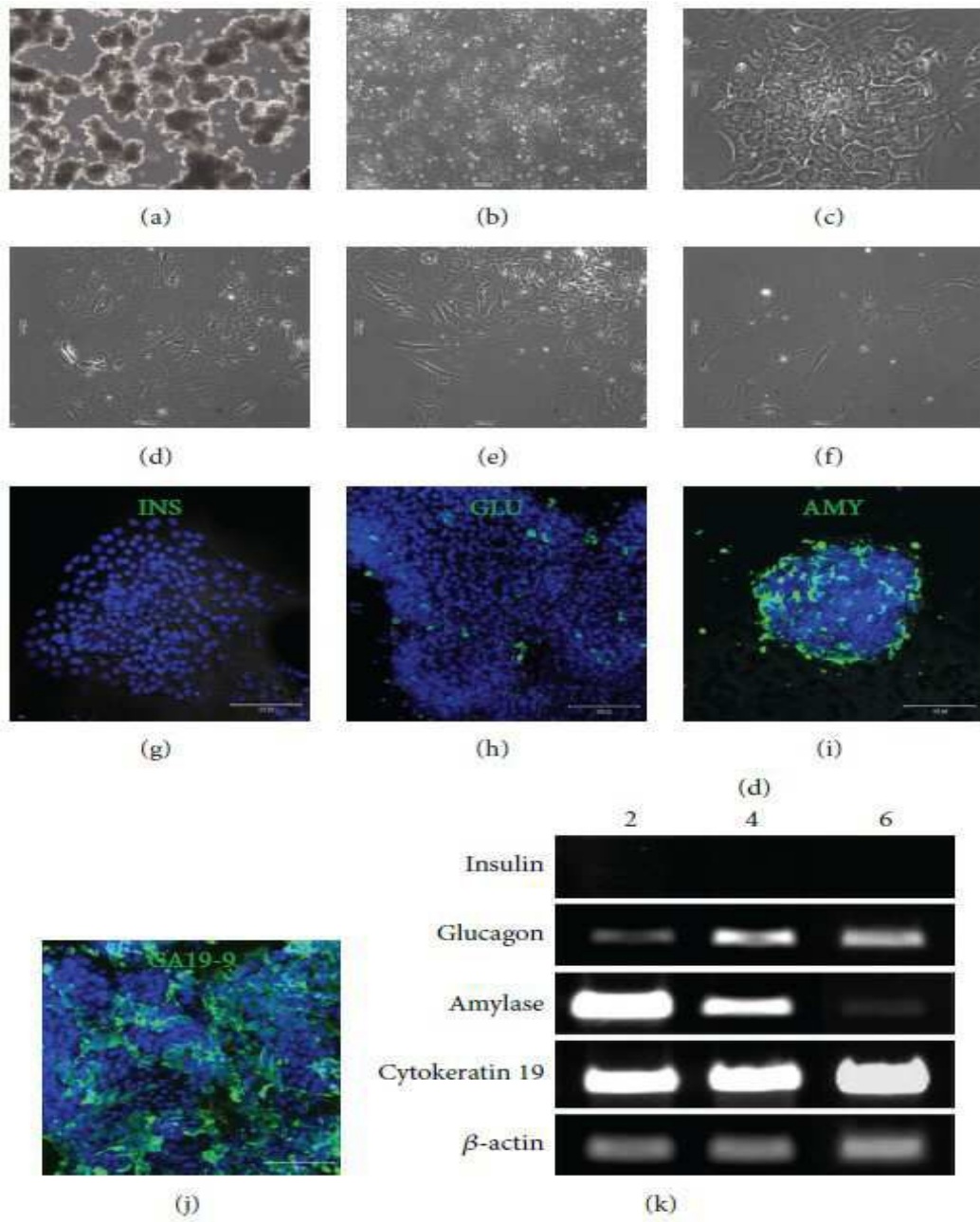
[0108] 또한, 도 4(c)와 같이 hMSC 마커인 CD44, CD90, 비멘틴(vimentin) 및 데스민(desmin)은 모든 hpMSCs 계대에서 발현되었으나, 일반적인 외분비 세포에서는 CD90 및 데스민의 발현이 나타나지 않거나 매우 적은 수준으로 발현된 것을 확인할 수 있었다.

[0109] 상기 결과로부터 사람 중간엽줄기세포(hMSC)와 유사한 특징을 나타내는 사람 췌장 외분비 세포 유래 중간엽줄기 세포(hpMSCs)이 성공적으로 분리 배양된 것을 확인할 수 있었으며, hpMSCs에서 췌장 전구 마커를 동시에 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

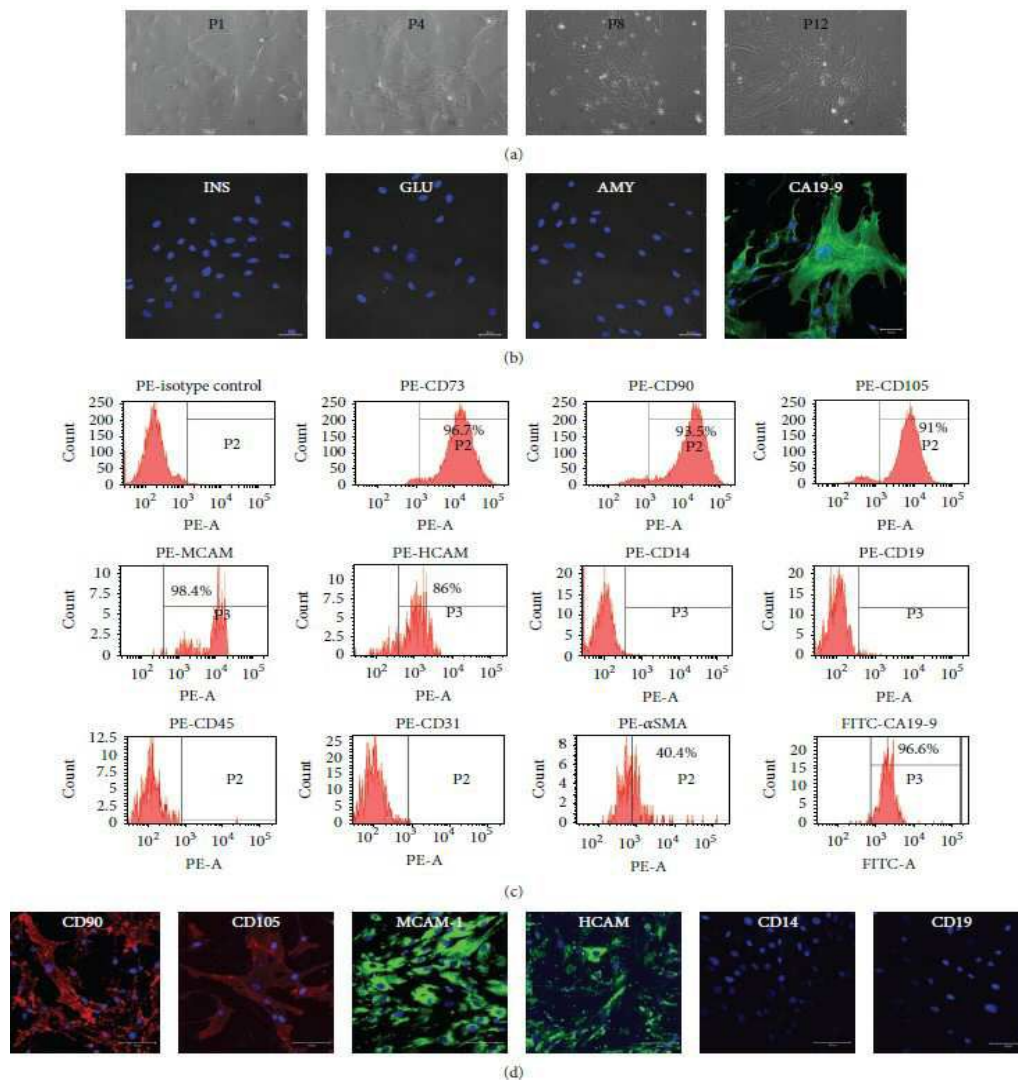
- [0111] <실시예 4> hpMSCs에서 Pdx1, Ngn3 및 MafA의 자발적인 발현 확인
- [0112] 면역형광염색을 수행하여 hpMSCs의 6 계대 배양기간 동안 주요 췌장 전구 세포의 전사 인자인 Pdx1, Ngn3 및 MafA의 발현을 확인하였다.
- [0113] 그 결과, 도 4(a)와 같이 Pdx1은 hpMSCs의 증접된 핵에서 비교적 발현이 나타난 반면, Ngn3 및 MafA는 도 4(b) 및 4(c)와 같이 모든 hpMSCs에서 일반적으로 검출되었다.
- [0114] 또한, hpMSCs 특징을 확인하기 위해, 췌장 도 세포, 성인 지방 조직 유래 중간엽줄기세포(hASCs) 및 hpMSCs 사이에서 주요 전사 인자의 발현을 비교하였다.
- [0115] qPCR를 수행하여, Pdx1, Ngn3 및 MafA의 mRNA 발현 수준을 확인하였으며, hASC의 발현 수준에 기초하여 상대적 발현 수준을 계산하였다.
- [0116] 그 결과, 도 5(a)와 같이 Pdx1은 hASCs보다 췌장 도 세포에서 높게 발현되었으며, hpMSCs의 Pdx1 발현 수준이 hASCs보다 15배 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [0117] 또한, 도 5(b)와 같이 Ngn3의 발현이 hASCs보다 췌장 도 세포와 hpMSCs에서 높은 것이 확인된 반면, 도 5(c)와 같이 MafA mRNA의 경우, 췌장 도 세포보다 hpMSCs에서 높게 발현된 것을 확인할 수 있었다.
- [0118] 상기 결과로부터 hpMSCs는 췌장 전구 세포와 유사하게 주요 췌장 전사 인자를 자발적으로 발현하는 것이 확인되었다.
- [0120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

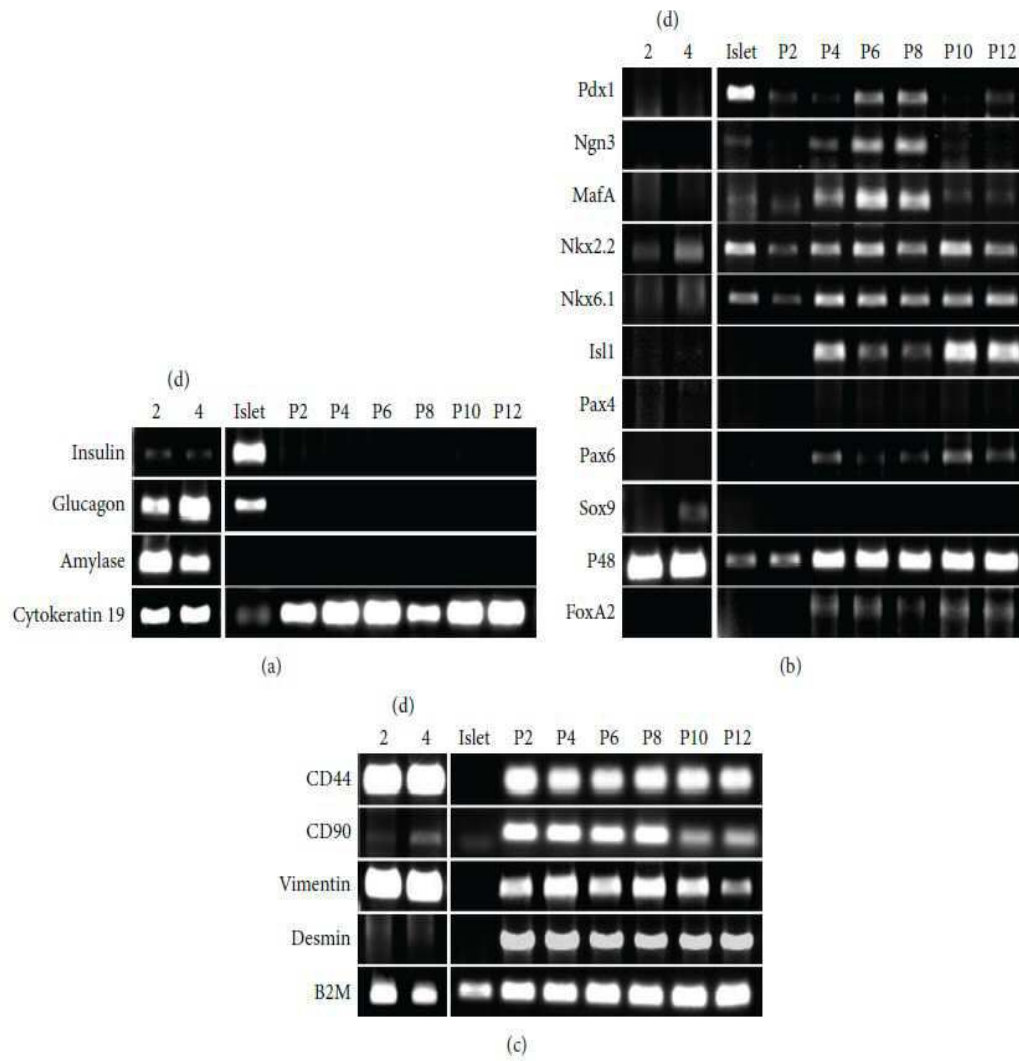
도면1



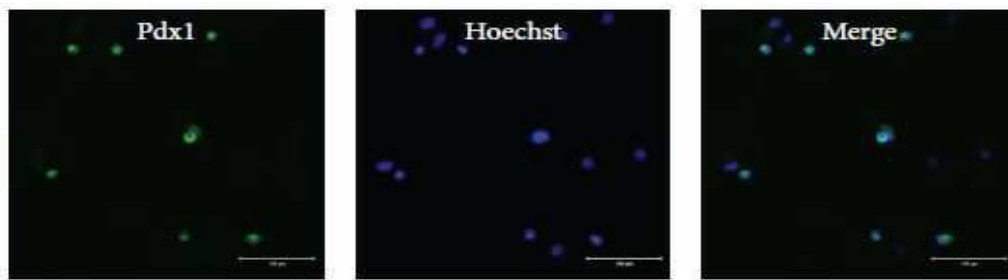
도면2



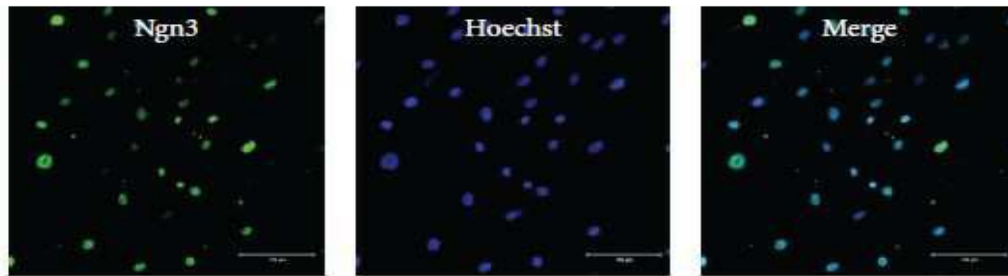
도면3



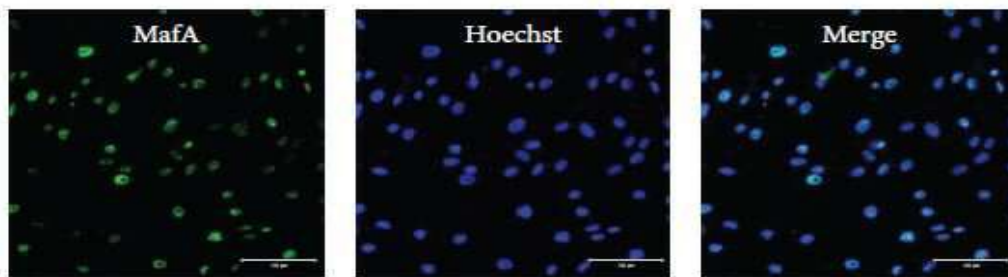
도면4



(a)

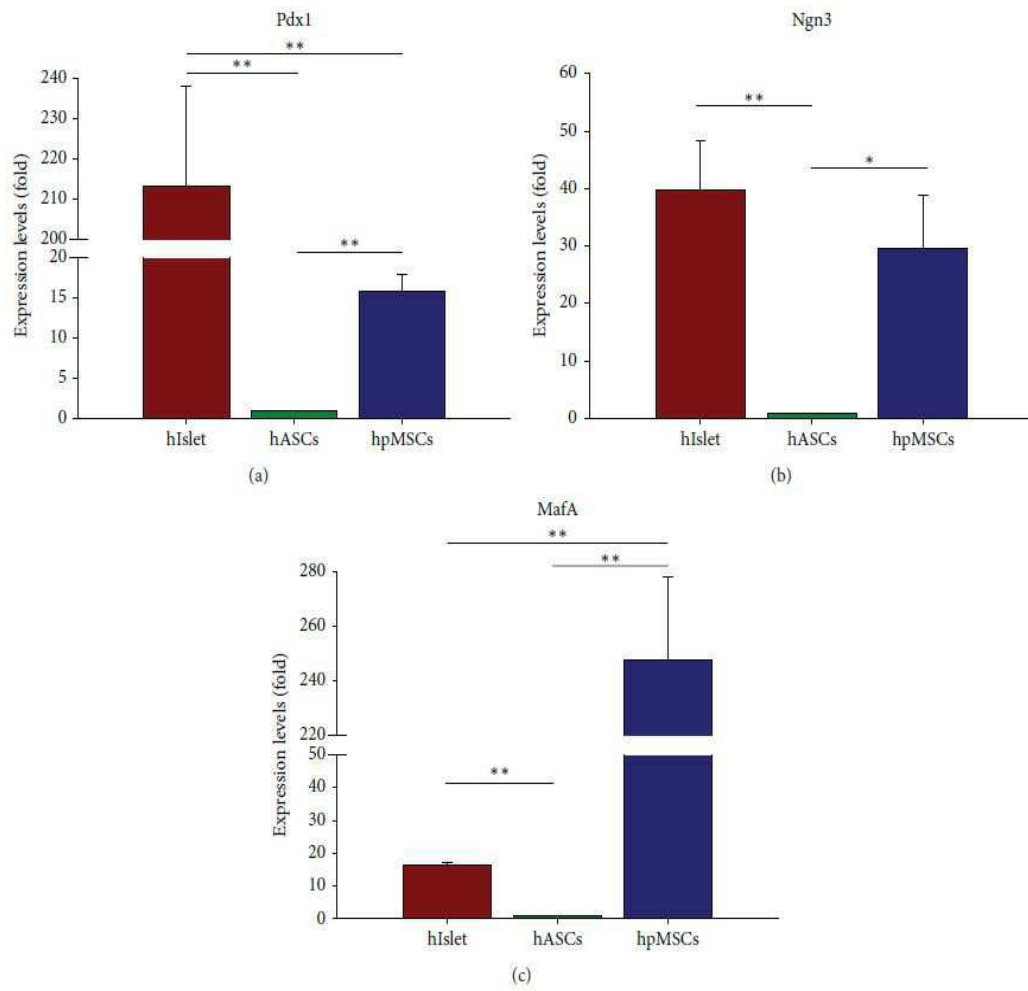


(b)

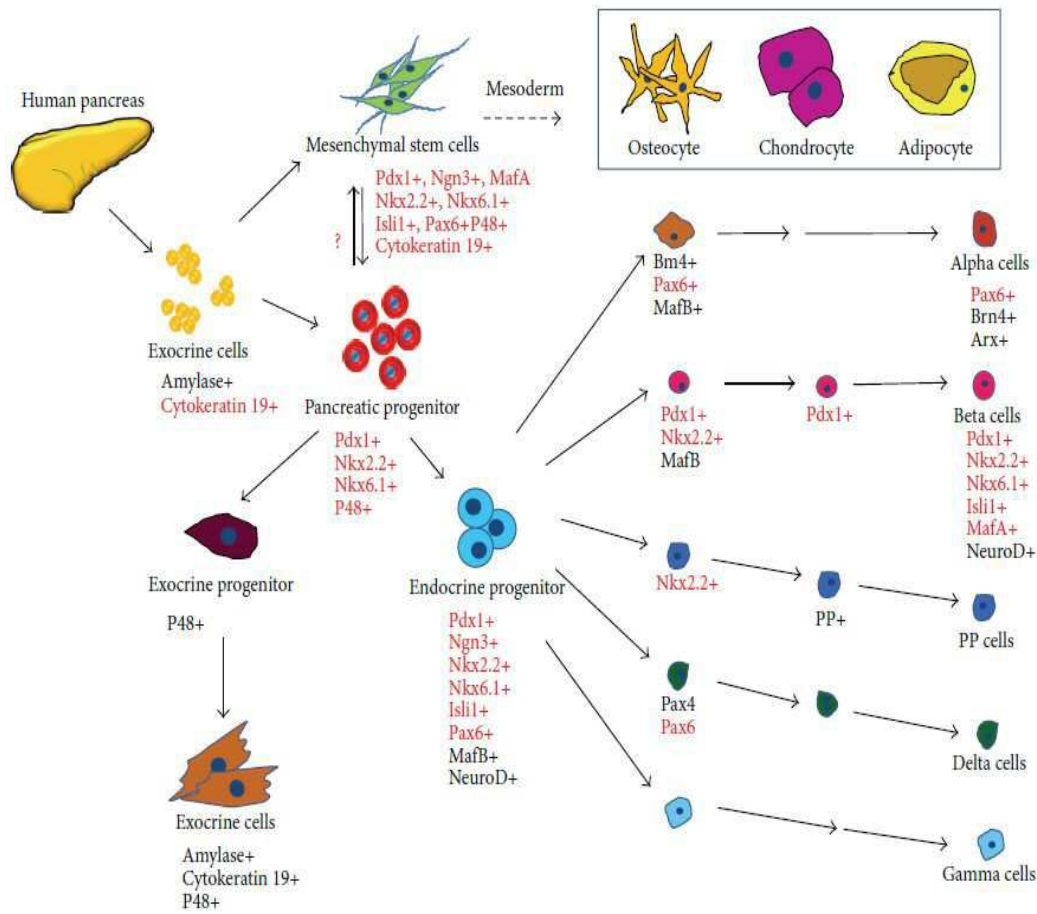


(c)

도면5



도면6



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- THE ASAN FOUNDATION
- <120> Mesenchymal stem cells dreived from human pancreas and
preparation method thereof
- <130> ADP-2015-0544
- <160> 50
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- catggccctg tggatgcgc
- <210> 2

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

agttgcagta gttctccag 19

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cccaagattt tgtgcagtgg tt 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gcggccaagt tcttcaaca t 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggttcaggtc tctccaccaa 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tcctgcactc acagcgttac	20
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
aggtggattc cgctccgggc a	21
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
atcttcctgt ccctcgagca	20
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
gcccccgccg ccgccgccgc a	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
ggcagctgga cgcggttggg c	21
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 11
 gtagaaagga tgacgcctca acc 23
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 tcagtgcctaa ctcgctctta gg 22
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 ttcagcaagg aggaggtcat 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 cgccagcttc tcgtatttct 20
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 ttctacgaca gcagcgacaa cc 22
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

cgtcacctcc atacctttct cg

22

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

acacgagacc cactttttcc g

21

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

tgctggactt gtgcttcttc aac

23

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

atttcctat gtgttggtg cg

22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

cgttcttgct gaagccgatg

20

<210> 21

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	21	
tttgtgctga agggctttgc		20
<210>	22	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	22	
gggagaagat agtccgattc cg		22
<210>	23	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	23	
cggcagaaga ttgtagag		18
<210>	24	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	24	
gatgacacgc ttggtatg		18
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	25	

tacgactaca ccgaccacca	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 26	
tcaaggtcga gtgagctgtg	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 27	
ctggaatgcc tggactcaat	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 28	
aggttgcttt tccttcagca	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 29	
aaggtggagc aaacacaacc	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 30
 agctttttct tctgccaca 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 31
 ctagtggacc agagccttcg 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 32
 tggagtgcac acgtgtaggt 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 33
 gagaactttg ccgttgaagc 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 34
 tccagcagct tcctgtaggt 20

 <210> 35
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 35
 aagctgcagg aggagattca 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 36
 ggcagtgagg tctggcttag 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 37
 agagctacga gctgcctgac 20

 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 38
 agcactgtgt tggcgtacag 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 39
 gcatcccagg tctgtcttct 20
 <210> 40

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 40
 cactgccaga aaggtttgaa 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe
 <400> 41
 aacccgagca caaggcccag 20

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 42
 gaaaggacct gtctgtcgct 20

<210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 43
 agggagaagc agaaggaaca 20

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe
 <400> 44

ctcccggctc cctccctctc	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 45	
ttcagcaagg aggaggtcat	20
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 46	
ttctcgctct ccagaatgtg	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Probe	
<400> 47	
ctcaagcaga agcggcgcac	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 48	
gactttgtca cagccaaga	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	49	
caagcaagca gaatttggaa		20
<210>	50	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Probe	
<400>	50	
tcatccaatc caaatgcggc a		21