



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0121606

(43) 공개일자

2013년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 1/04 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0044970

(22) 출원일자

2012년04월27일

심사청구일자

2013년04월23일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김한수

서울시 영등포구 여의도동 미성아파트 E동 503호

우소연

서울시 동대문구 용두동 792번지 래미안 허브리츠 102동 601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

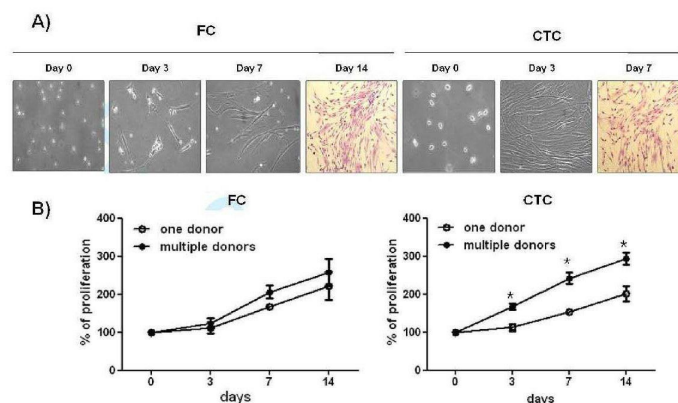
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 키메라 중간엽 줄기세포군 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법, 상기 방법에 의하여 제조된 키메라 중간엽 줄기세포군, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 냉동 및 해동시키는 단계를 포함하는 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 향상된 증식능을 가지는 키메라 중간엽 줄기세포군, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 분화시키는 방법, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분리된 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제 및 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 키메라 중간엽 줄기세포군은 버려지는 편도조직으로부터 유래될 뿐만 아니라 별개의 편도조직으로부터 제조될 수 있으므로, 경제적으로 제조할 수 있고, 냉동 및 해동후에도 동일한 줄기세포로서의 활성을 나타내므로, 줄기세포은행의 세포공급원으로서 활용될 수 있을 것이다.

대표도



(72) 발명자

유경하

서울시 강남구 삼성1동 98-9 대우멤버스카운티 10
2동 202호

조경아

서울시 강남구 일원동 615-1

조인호

충청남도 천안시 서북구 두정동 이안더센트럴아파
트 108동 1001호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0022335

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 부갑상선 자가 이식을 위한 스캐폴드의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2015.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 별개의 기증자로부터 분리된 각 편도조직으로부터 단핵세포를 각각 수득하는 단계;
- (ii) 상기 수득한 단핵세포를 배양하여 중간엽 줄기세포를 선별하는 단계; 및,
- (iii) 상기 선별된 중간엽 줄기세포를 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법.

청구항 2

제1항의 방법에 의하여 제조되고, 하기의 특성을 나타내는 키메라 중간엽 줄기세포군:

- (i) 별개의 기증자로부터 수득한 별개의 편도조직으로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 포함하고;
- (ii) 단일 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포와 동일한 세포활성을 나타내며;
- (iii) CD14, CD34 및 CD45의 발현이 저하되고;
- (iv) CD73, CD95 및 CD105의 발현이 증가하며;
- (v) 면역관련 표현 항체에 대하여 음성을 나타내고;
- (vi) 중배엽성 세포로 분화될 수 있으며; 및
- (vii) 내배엽성 세포로 분화될 수 있다.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 면역관련 표현 항체는 HLA-DR, CD40, CD80, CD86 또는 이들의 조합인 것인 키메라 중간엽 줄기세포군.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 중배엽성 세포는 지방세포, 골세포, 연골세포 또는 이들의 조합인 것인 키메라 중간엽 줄기세포군.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 내배엽성 세포는 부갑상선 조직세포인 것인 키메라 중간엽 줄기세포군.

청구항 6

제2항의 키메라 중간엽 줄기세포군을 냉동 및 해동하는 단계를 포함하는 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 냉동은 냉각매체, 동결보호제 또는 이들의 조합을 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 냉각매체는 액체질소인 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 동결보호제는 글라이세롤, 설탕, 글루코스 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 10

제6항의 방법으로 제조되고, 하기의 특성을 나타내는 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군:

- (i) 냉동 및 해동을 수행하지 않은 키메라 중간엽 줄기세포군과 동등한 수준의 분화능을 나타내고; 및,
- (ii) 냉동 및 해동을 수행하지 않은 키메라 중간엽 줄기세포군보다 향상된 수준의 증식능을 나타낸다.

청구항 11

제2항의 키메라 중간엽 줄기세포군 또는 제10항의 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군을 텍사메타손, 아스코빅 산, L-프롤린, TGF- β , BMP-6 및 ITS를 함유한 연골세포 분화배지에서 배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군을 연골세포로 분화시키는 방법.

청구항 12

제2항의 키메라 중간엽 줄기세포군 또는 제10항의 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군을 아스코빅산 2-포스페이트, 텍사메타손 및 β -글리세로포스페이트를 함유한 배양배지에 배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군을 골세포로 분화시키는 방법.

청구항 13

제2항의 키메라 중간엽 줄기세포군 또는 제10항의 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군을 3-이소부틸-1-메틸-젠티, 텍사메타손, 인도메타신 및 인슐린을 함유한 배양배지에 배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군을 지방세포로 분화시키는 방법.

청구항 14

제2항의 키메라 중간엽 줄기세포군 또는 제10항의 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군을 우태아혈청 (FBS), 액티빈 A(activin A) 및 Shh(sonic hedgehog)를 함유한 배양배지에 배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군을 부갑상선 조직세포로 분화시키는 방법.

청구항 15

제2항의 키메라 중간엽 줄기세포군 또는 제10항의 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분리된 줄기세포, 또는 상기 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제.

청구항 16

- (i) 별개의 기증자로부터 분리된 각 편도조직으로부터 단핵세포를 각각 수득하는 단계;
- (ii) 상기 수득한 단핵세포를 배양하여 중간엽 줄기세포를 선별하는 단계; 및,
- (iii) 상기 선별된 중간엽 줄기세포를 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 키메라 중간엽 줄기세포군 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법, 상기 방법에 의하여 제조된 키메라 중간엽 줄기세포군, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 냉동 및 해동시키는 단계를 포함하는 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 향상된 증식능을 가지는 키메라 중간엽 줄기세포군, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 분화시키는 방법, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분리된 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제 및 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근에 들어, 기관 재생과 면역반응 조절 능력을 가지는 성체 줄기세포에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 현재 임상 및 연구에서 사용되고 있는 성체 줄기세포의 공급원은 골수, 지방세포, 제대혈등이 있다(Ding DC, et al., Cell Transplant., 20:5-14, 2011; Lee OK, et al., Blood, 103:1669-1675, 2004). 그러나, 종래의 성체 줄기세포는 사용에 몇 가지 제한점이 있는데, 조직을 채취하는 과정이 침습적이고, 충분한 양을 얻기 어려우며, 대부분이 중배엽 기원의 조직이어서 외배엽과 내배엽 기원의 조직으로 분화가 용이하지 않다(Jung YJ, et al., Stem Cells Dev., 15:687-695, 2006). 이러한 제한점을 극복하기 위하여 줄기세포의 공급원을 다양화 하는 연구가 필요하다(Uranio MF, et al., Mol. Reprod. Dev., 78361L:373, 2011; Cho KA, et al., Cell Biol. Int., 33:772-777, 2009; Ivanovski SS, et al., Oral Dis., 12:358-363, 2006).

[0003] 한편, 인간의 편도선은 일종의 림프상피 면역조직으로서 인체의 구인두 비인두에 존재하는데, 사춘기까지 그 면역기능을 수행하여 이후에는 서서히 퇴화하므로, 편도선이 비정상적으로 비대해지거나(아데노이드편도 과형성: adenotonsillar hyperplasia), 감염(편도염: tonsillitis)되는 등의 문제가 발생하면 편도선 절제수술(tonsillectomy)을 통해 제거하게 된다.

[0004] 최근에 들어, 편도선의 조직에서 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells(MSC))를 추출한 연구결과가 보고되어, 상기 편도조직이 성체 줄기세포의 새로운 공급원으로 주목되고 있다(Janjanin SF, et al., Arthritis Res. Ther., 10:R83, 2008). 상기 편도조직으로부터 유래된 줄기세포는 다른 성체 줄기세포와 동일한 수준의 줄기세포능을 나타내어, 중배엽성 세포(지방세포형성(adipogenesis), 골세포형성(osteogenesis), 연골세포형성(chondrogenesis))로 분화될 수 있다. 이러한 편도조직의 장점은 편도선 절제수술을 통해 버려지는 조직이기 때문에 재료의 공급이 비교적 원활하다는 점이다.

[0005] 성체 줄기세포의 특성상 자가 조직을 이용하는 것이 가장 이상적이지만, 편도조직으로부터 유래된 줄기세포는 치료적으로 유효한 양을 확보하기 어렵기 때문에 그의 활용이 제한되고 있다.

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 편도조직으로부터 유래된 줄기세포의 활용성을 향상시키기 위하여 예의 연구

노력한 결과, 서로 다른 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 줄기세포를 혼합배양하여도 단일 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 줄기세포와 동일한 특성을 나타낼 뿐만 아니라, 상기 혼합배양된 줄기세포를 대상으로 냉동 및 해동과정을 수행할 경우에도 냉동보관 전의 줄기세포와 동일한 세포능력을 가지고 있으며, 줄기세포의 증식율이 증가함을 확인함으로써, 상기 줄기세포군을 줄기세포 은행에 사용가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군(Chimeric mesenchymal stem cell population)의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의하여 제조된 키메라 중간엽 줄기세포군을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 냉동 및 해동시키는 단계를 포함하는 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 향상된 증식능을 가지는 키메라 중간엽 줄기세포군을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 분화시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분리된 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 단계를 포함하는 키메라 중간엽 줄기세포군(Chimeric mesenchymal stem cell population)의 제조방법 또는 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법을 제공한다.
- [0015] 구체적으로, 본 발명의 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법 또는 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법은 (i) 별개의 기증자로부터 분리된 각 편도조직으로부터 단핵세포를 각각 수득하는 단계; (ii) 상기 수득한 단핵세포를 배양하여 중간엽 줄기세포를 선별하는 단계; 및, (iii) 상기 선별된 중간엽 줄기세포를 혼합하여 배양하는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 용어 "편도조직"이란, 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여, 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직을 의미한다. 상기 편도조직은 인두편도, 귀인두관편도, 구개편도, 혀편도 등을 포함한다. 본 발명의 목적상 상기 편도조직은 편도유래 중간엽 줄기세포를 제공하는 원천조직으로 사용되지만, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0017] 본 발명의 용어 "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)"란, 골, 연골, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등으로 분화될 수 있는 미분화된 줄기세포를 의미하는데, 성인에서는 일반적으로 골수에 머물러 있지만 체대혈, 말초혈액, 기타 조직 등에도 존재한다. 본 발명의 목적상 상기 중간엽 줄기세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 사람의 편도로부터 유래되어 서로 다른 개체에서 유래된 각각의 중간엽 줄기세포와 혼합배양이 가능한 세포가 될 수 있고, 지방세포, 골세포, 연골세포 등의 중배엽성 조직세포로 분화될 수 있을 뿐만 아니라, 부갑상선 조직세포 등의 내배엽성 조직세포로도 분화될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "줄기세포"란, 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는

세포를 의미하며, 만능 줄기세포 (totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cells), 다분화능 (다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다. 본 발명의 용어 "만능 줄기세포 (totipotent stem cells)"란, 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 용어 "전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cells)"란, 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포 (blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기 세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못하는 세포를 의미한다.

[0019] 본 발명의 용어 "지방세포"란, 지방의 형태로 에너지를 저장하는 지방 조직을 구성하는 주된 세포를 의미한다. 상기 지방세포는 세포질 층으로 둘러싸인 커다란 지방 방울을 포함하는 백색지방세포와 지방 방울이 고루 흩어져있는 상당량의 세포질을 포함하는 다각형의 갈색지방세포의 두가지 형태로 존재할 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어 "연골세포"란, 연골에서 발견되는 유일한 세포를 의미하는데, 주로 콜라겐과 프로테오글리칸으로 구성되는 연골기질을 생산 및 유지할 수 있다. 연골 내에서 연골세포의 구성은 연골의 형태 및 조직의 위치에 따라 달라진다.

[0021] 본 발명의 용어 "골세포"란, 발육중인 뼈에 있어서 골아세포로부터 분화되는 세포를 의미하는데, 골조직속에 포함된 골소강의 내부에 존재하고, 골소강과 같은 형의 편평한 타원체 형태를 가지며, 극히 많은 돌기를 지니고, 주위골조직의 무기질대사에 관여한다.

[0022] 본 발명의 용어 "부갑상선 조직세포"란, 갑상선에 부착하여 있는 내분비기관인 부갑상선을 구성하는 세포를 의미하는데, 파라토르몬(parathormone)을 분비하는데, 혈액의 칼슘과 인의대사를 조절한다.

[0023] 본 발명의 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하는 방법에 있어서, 편도조직으로부터 단핵세포를 수득하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 편도조직을 분쇄하고, 이를 여과하는 방법에 의하여 수득할 수 있다.

[0024] 또한, 단핵세포를 배양하여 중간엽 줄기세포를 선별하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 줄기세포 배양용 배지를 사용하여 배양함으로써 배양용기의 바닥에 부착된 세포를 선별하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 이때, 줄기세포 배양용 배지는 특별히 이에 제한되지 않으나, FBS(Invitrogen) 및 항생제를 포함하는 DMEM-HG(Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose) 배지를 사용할 수 있고, 상기 항생제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 스트렙토마이신, 암피실린 등이 될 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어 "혼합배양"이란, 서로다른 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직으로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 혼합하여 배양하는 방법을 의미한다. 동일한 성격의 조직세포라 하여도 서로다른 기증자로부터 분리된 세포인 경우에는 세포의 미세한 특성에 차이가 있어서, 통일된 특성을 나타내지 못하게 된다. 그러나, 본 발명의 편도조직 유래 중간엽 줄기세포는 서로다른 별개의 기증자로부터 수득한 줄기세포를 혼합하여 배양할 경우에도, 단일 기증자로부터 수득한 줄기세포와 동일한 특성을 나타낸다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 편도조직 유래 중간엽 줄기세포(tonsillar mesenchymal stem cells, T-MSC)는 중배엽성 세포인 지방세포, 골세포 및 연골세포로 분화될 수 있음을 확인하였고(도 3a), 뿐만 아니라 내배엽성 세포인 부갑상선 조직세포로도 분화될 수 있음을 확인하였다(도 3b).

[0027] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 방법에 의하여 제조된 키메라 중간엽 줄기세포군을 제공한다.

[0028] 상기 키메라 중간엽 줄기세포군은 (i) 별개의 기증자로부터 수득한 별개의 편도조직으로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 포함하고; (ii) 단일 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포와 동일한 세포활성을 나타내며; (iii) CD14, CD34 및 CD45의 발현이 저하되고; (iv) CD73, CD95 및 CD105의 발현이 증가하며; (v) 면역

관련 표현 항체에 대하여 음성을 나타내고; (vi) 중배엽성 세포로 분화될 수 있으며; 및 (vii) 내배엽성 세포로 분화될 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "키메라 중간엽 줄기세포군"란, 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하여 수득한 중간엽 줄기세포를 의미하는데, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군은 서로 다른 기증자로부터 분리된 각각의 중간엽 줄기세포가 포함되어 있으면서도, 단일 기증자로부터 분리된 중간엽 줄기세포와 동일한 수준의 세포특성을 나타낸다. 본 발명의 목적상, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군은 T-MSC의 면역표현형은 전형적인 줄기세포의 표현형을 나타낼 수 있다. 즉, CD14, CD34 및 CD45의 발현은 약한 반면 CD73, CD95 및 CD105의 발현이 증가하고(도 2a), 면역관련 표현 항체(HLA-DR, CD40, CD80, CD86)도 음성을 나타낸다(도 2b). 뿐만 아니라, 중배엽성 세포인 지방세포, 골세포 및 연골세포로 분화될 수 있고(도 3a), 내배엽성 세포인 부갑상선 조직세포로도 분화될 수 있다(도 3b).

[0030] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양할 경우, 키메라를 형성하여 하나의 중간엽 줄기세포를 형성할 수 있음을 알 수 있었고(도 4b), 단일 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포와 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하여 수득한 중간엽 줄기세포를 CFU-F 형성능 및 증식능의 측면에서 비교한 결과 유사한 수준을 나타냄을 확인하였다(도 1a).

[0031] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 냉동 및 해동시키는 단계를 포함하는 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군의 제조방법을 제공한다.

[0032] 상기 증식능이 향상된 키메라 중간엽 줄기세포군은 (i) 냉동 및 해동을 수행하지 않은 키메라 중간엽 줄기세포군과 동등한 수준의 분화능을 나타낼 수 있고; 및, (ii) 냉동 및 해동을 수행하지 않은 키메라 중간엽 줄기세포군보다 향상된 수준의 증식능을 나타낼 수 있다.

[0033] 본 발명의 용어 "냉동"이란, 본 발명의 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 보존하기 위하여 액체 질소등의 냉각 매체를 이용하여 냉동시키는 행위를 의미한다. 이때, 냉동시 세포의 손상을 방지하기 위하여 동결보호제를 포함하는 용액을 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 용어 "동결보호제"란, 생물세포를 동결상태에서 산체로 보존할 경우, 동해를 경감할 목적으로 매액(媒液)에 첨가시키는 물질을 의미하는데, 상기 동결보호제로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 글라이세롤, 설탕, 글루코스 등을 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 용어 "해동"이란, 상기 냉동된 본 발명의 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 활용하기 위하여, 상온으로 온도를 증가시켜서 세포가 정상적인 생리활성을 나타내도록 하는 행위를 의미한다.

[0036] 본 발명에서 제공하는 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합하여 배양한 다음, 냉동 및 해동과정을 수행하면, 놀랍게도 냉동 및 해동과정을 수행하지 않은 중간엽 줄기세포 보다도 증식능이 향상됨을 확인할 수 있었다(도 1b).

[0037] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 상기 방법으로 제조된 향상된 증식능을 가지는 키메라 중간엽 줄기세포군을 제공한다.

[0038] 본 발명의 용어 "향상된 증식능"이란, 본 발명에서 제공하는 편도조직 유래 중간엽 줄기세포의 증식속도가 냉동 및 해동과정을 적용한 후에 증가하는 현상을 의미한다.

- [0039] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 단일 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포와 별개의 기증자로부터 수득한 편도조직 유래 중간엽 줄기세포를 혼합배양하여 수득한 중간엽 줄기세포를 냉동 및 해동하면, 혼합배양된 중간엽 줄기세포가 오히려 높은 수준의 증식능을 나타냄을 확인하였다(도 1b).
- [0040] 본 발명의 편도조직 유래 중간엽 줄기세포는 중배엽성 세포 및 내배엽성 세포로 분화될 수 있고, 다른 기증자 유래의 줄기세포와 혼합하여 배양하여도 단일 기증자 유래의 줄기세포와 동일한 분화능 및 증식능을 나타낼 뿐만 아니라, 냉동 및 해동을 수행하여도, 최초의 줄기세포로서 나타내는 분화능 및 증식능을 그대로 유지할 수 있으므로, 줄기세포은행을 구성하는데 필수적인 세포공급원으로 활용될 수 있다.
- [0041] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 다양한 세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 다양한 세포로 분화시키는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 아스코빅 산, L-프롤린, TGF-3, BMP-6 및 ITS를 함유한 연골세포 분화배지에 배양하여 연골세포로 분화시키거나, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 아스코빅산 2-포스페이트, 텍사메타손 및 β -글리세로포스페이트를 함유한 배양배지에 배양하여 골세포로 분화시키거나, 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 3-이소부틸-1-메틸-젬틴, 텍사메타손, 인도메타신 및 인슐린을 함유한 배양배지에 배양하여 지방세포로 분화시키거나, 또는 상기 키메라 중간엽 줄기세포군을 우태아혈청(FBS), 액티브인 A(activin A) 및 Shh(sonic hedgehog)를 함유한 배양배지에 배양하여 부갑상선 조직세포로 분화시킬 수 있다.
- [0043] 본 발명의 용어 "분화(differentiation)"란, 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분 계(部分系)로 분리되는 현상을 의미하는데, 구체적으로 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 현상을 의미한다. 예를 들면, 개체발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리카락 몸통 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포 또는 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어지는 현상을 들 수 있다. 상대적으로, "미분화"란 상술한 분화가 일어나지 않은 아직 줄기세포로써의 특징을 함유하고 있는 상태를 의미한다.
- [0044] 한편, 상기 방법으로 분화된 키메라 중간엽 줄기세포군의 분화정도를 측정하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 당해 분야에 익히 공지된 기법인 유세포 분석방법, 면역세포화학적 방법, PCR 및 유전자 발현 프로파일을 사용하여 세포 표면 표지 또는 형태의 변화를 측정하는 방법, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하여 세포의 형태변화를 조사하는 방법, 유전자 발현 프로파일의 변화를 측정하는 방법 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 RT-PCR, Oil red O 염색법, Safranin O 염색법, Type II collagen 면역조직화학 염색법, alkaline phosphate 염색법 및 Alizarin S 염색법 등을 이용할 수 있다.
- [0045] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분리된 줄기세포, 또는 상기 키메라 중간엽 줄기세포군으로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포 치료제를 제공한다. 이때, 상기 분화된 세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 세포치료에 사용될 수 있는 모든 세포가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 중배엽성 세포 또는 내배엽성 세포가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 지방세포, 연골세포, 골세포, 부갑상선 조직세포 등이 될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 용어 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해

제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0047]

상기 본 발명의 키메라 중간엽 줄기세포군은, 신체의 조직 또는 기관이 목적하는 세포 군집, 예를 들어 줄기세포 또는 유래세포군집의 생착, 이식 또는 주입에 의해 강화, 치료 또는 대체되는 다양한 종류의 치료 프로토콜에 사용될 수 있다. 상기 본 발명의 키메라 중간엽 줄기세포군은 존재하는 조직을 대체 또는 강화시켜, 새롭거나 변화된 조직이 되게 하거나 생물학적 조직 또는 구조와 결합시킬 수 있다. 본 발명의 키메라 중간엽 줄기세포군은 그의 특성상 사람의 연골, 건, 인대, 부갑상선 조직 등의 강화, 치료 또는 대체에 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0048]

본 발명의 키메라 중간엽 줄기세포군은 버려지는 편도조직으로부터 유래될 뿐만 아니라 별개의 편도조직으로부터 제조될 수 있으므로, 경제적으로 제조할 수 있고, 냉동 및 해동후에도 동일한 줄기세포로서의 활성을 나타내므로, 줄기세포은행의 세포공급원으로서 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0049]

도 1은 T-MSC가 실험실적 조건의 배양에서 증식됨을 나타낸다. (A) 새로 접종된 T-MSC(fresh T-MSC, FC)(Day 0; 상단)를 접착능(day 3; 상단)과 섬유아세포-유사 스핀들 모양의 형태로 증식하는 특성에 의해 분리하였다. 분리 실험에서, 냉동 보존 및 해동 후의 T-MSC(CTC)를 배양하였다(하단). CFU-F는 FC의 경우 14일에 CFC의 경우 7일에 Giemsa 염색에 의해 확인되었다. (B) T-MSC의 증식의 동력학을 MTT 분석에 의해 확인하였다. FC는 하나의 공여자에서 수득한 것과 다수의 공여자에서 수득한 것이 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(왼쪽). 그러나, CTC는 하나의 공여자에서 수득한 것 보다는 다수의 공여자에서 수득한 것이 현저하게 높은 수준으로 증식됨을 확인하였다(오른쪽).

도 2는 T-MSC가 특이적인 표면 항원을 발현함을 나타낸다. T-MSC를 3주동안 배양하고, 유세포분석을 통해 표면 항원의 발현수준을 확인하였다. T-MSC에서는 (A) 조혈세포 표지(CD14, CD34 및 Cd45); (B) class II MHC(HLA-DR)과 조 자극 인자들 표지(CD40, CD80 및 CD86); 및 (C) FDC인자(CD11b, Cd21, CD23, CD35 및 CD54)가 발현되지 않았으나, CD73, CD95 및 CD105는 높은 수준으로 발현되었다(A). 데이터는 3회의 반복실험을 통해 막대그래프로 표시되었다.

도 3은 T-MSC가 중배엽성 세포 및 내배엽성 세포로 분화될 수 있음을 나타낸다. (A) T-MSC가 중배엽성 세포인 지방세포, 골세포 및 연골세포로 분화될 수 있음을 나타낸다. (B) activin A와 onic hedgehog으로 처리된 T-MSC는 내배엽성 세포의 표지(FoxA2, Sox17, 그리고 CXCR4), 시원세포 표지(Eya1, Six1, Pax1, Noggin 그리고 BMP4) 및 부갑상선 조직세포의 표지(GCM2, CaSR, CCL21 and PTH)를 발현시킨다. 이때, FoxA2는 forkhead box A2를 의미하고; Sox17은 SRY(sex determining region Y)-box 17을 의미하며; CXCR4는 chemokine(C-X-C motif) receptor 4를 의미하고; Eya1은 eyes absent homolog 1을 의미하며; Six1은 SIX homeobox를 의미하고; Pax1은 paired box 1을 의미하며; BMP4는 bone morphogenic protein 4를 의미하고; GCM2는 glial cells missing homolog 2를 의미하며; CaSR은 calcium sensing receptor를 의미하고; CCL21은 chemokine(C-C motif) ligand 21을 의미하며; PTH는 parathyroid hormone을 의미하고; 및, GAPDH는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 의미한다.

도 4는 T-MSC가 면역 조절 활성을 갖음을 나타낸다. (A) PMA는 T 세포의 증식을 유도하지만, T-MSC에 의하여 T 세포의 증식 유도가 억제되고, FC와 CTC 모두 유사한 수준의 억제 능력을 나타낸다. (B) 3명의 공여자로부터 유래된 T-MSC의 개별적인 배양 및 혼합배양의 배양물로부터 게놈 DNA를 각각 수득하고, 이형 접합체를 형성하는 3 부위(D8S1179, D3S1358 및 D18S51)를 선별하였다. 이때, 개별적인 배양의 배양물로부터 수득한 게놈 DNA는 각각 D1, D2 및 D3로 표시하고, 혼합배양의 배양물로부터 수득한 게놈 DNA는 D1+D2+D3로 표시하였다. 상기 D1, D2 및 D3는 각각 D8S1179, D3S1358, 및 D18S51를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 실시예 1: 재료 및 방법
- [0052] 실시예 1-1: 편도조직의 적출
- [0053] 이비인후-두경부외과의 환자 중에서 10세 미만의 9명의 환자(소년 5인 및 소녀 4인, 평균연령=6.2세)를 대상으로 편도적출술을 시행하였다. 이대목동병원에서 시행하였으며 임상윤리위원회의 심의를 통과하였다(ECT 11-53-02). 적출된 편도의 3분의 2는 조직검사에 이용하였으며 나머지 3분의 1을 가지고 실험에 사용하였다.
- [0054] 실시예 1-2: 단핵세포의 분리 및 배양
- [0055] 세절된 편도 조직을 210U/ml의 콜라겐분해효소 I(collagenase I)(Invitrogen)과 10 μ g/ml DNase(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 포함하는 Roswell Park Memorial Institute medium 1640(RPMI-1640)(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 배양액에서 37℃의 조건하에서 30분 동안 분쇄하였다. 상기 분쇄된 조직을 여과하여 세포를 수득하고, 상기 세포를 RPMI 1640/20% NHS(normal human serum)(PAA Laboratories, GmbH, Paching, Austria)로 2회 세척하고, RPMI 1640/10% NHS로 1회 세척하였다. 세척된 세포를 Ficoll-Paque(GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 구매 원심분리에 적용하여 단핵 세포들을 수득하였다. 상기 단핵세포 10⁸개를 10% FBS(Invitrogen), 100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 100U/ml 암피실린을 함유하는 DMEM-HG(Dulbecco's modified Eagle's medium-High Glucose)(Invitrogen)배지에 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 부착되지 않은 세포는 제거하고, 편도조직 유래 중간엽 줄기세포(tonsillar mesenchymal stem cells, T-MSC)로 간주되는 부착된 세포는 4주에 걸쳐 3-5세대까지 계대 배양하였다.
- [0056]
- [0057] 실시예 1-3: 세포의 냉동보관 및 해동 Cryopreservation-and-thawing of mononuclear cells
- [0058] 상기 실시예 1-2에서 배양된 T-MSC를 PBS(pH 7.4)로 세척하고, 세척된 T-MSC에 동결보존액(cryomedium, 50% FBS, 40% DMEM 및 10% DMSO)을 가하여 현탁시킨 다음, 상기 현탁액을 각 용기당 2 x 10⁶ 개의 세포를 포함하도록 분주하였다. 상기 현탁액이 분주된 용기를 -70℃ 에서 24시간 동안 동결시키고, -200℃ 액체 질소에서 10일 동안 보관하였다(Liu Y, et al., Biotechnol. Prog., 26:1635-1643, 2010). 공지된 방법을 이용하여 상기 보관된 용기를 37℃ 물에서 2분에 걸쳐 해동시키고, 해동된 세포현탁액을 원심분리하여 T-MSC를 수득하였다.
- [0059] 실시예 1-4: 접착능과 CFU-F(colony-forming unit-fibroblast) 분석
- [0060] 먼저, 냉동시키지 않은 T-MSC(freshly-culture cells, FC)를 14일 동안 배양하고, 배양된 세포를 PBS로 세척하며, 100% 메탄올로 5분간 고정한 다음, 메탄올을 제거하고, 5분동안 공기중에서 건조시켰다. 건조된 세포를 대상으로 Giemsa 염색을 수행하고, 섬유아세포-유사 세포의 콜로니를 위상차 현미경을 사용하여 확인하였다(Castro-Malasina H, et al., Blood, 56:289-301, 1980; Baksh D, et al., Exp. Hematol., 31:723-732, 2003).
- [0061] 아울러, 냉동 및 해동과정을 거친 T-MSC(cryopreserved-and-thawed cell, CTC)를 7일 동안 배양하고, 상술한

바와 동일한 방법에 적용하였다.

[0062] 한편, FC와 CTC의 세포 분화능을 확인하기 위하여, 각각 3×10^3 개의 세포를 배양액이 담겨진 96-웰 플레이트에 접종하고, 배양하면서, 0, 3, 7 및 14일이 경과한 시점에서 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Sigma-Aldrich)를 이용하여 MTT 분석법을 수행하였다.

[0063] 실시예 1-5: 세포표현형 분석

[0064] FACSCalibur system(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)을 이용하여, 상기 FC와 CTC의 표면항원의 발현여부를 확인함으로써, T-MSC의 세포표현형을 분석하였다.

[0065] 구체적으로, FC와 CTC를 각각 14일 및 7일동안 배양하고, 표면항원과 반응할 수 있는 각각의 항체($2\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 30분간 4°C 에서 염색하고 FACSCalibur system을 이용하여 분석하였다. 이때, 사용된 항체는 다음과 같다: 조혈모세포 표지(hematopoietic cell markers)(PE-CD14, PE-CD34 및 PerCP-CD45), 시원 세포 표지(primitive cell markers)(PE-CD73, PE-CD90, 및 PE-CD105), class II MHC와 보조자극 인자 표지(co-stimulatory molecules markers)(PE-HLA-DR, FITC-CD40, PE-CD80 및 FITC-CD86) 및 모낭수지상 세포 표지(follicular dendritic cell markers)(PE-CD11b, PE-CD21, PE-CD23, PE-CD35 및 PE-CD54).

[0066] 아울러, 대조군으로서 비특이적 결합을 수행할 수 있는 항체인 IgG1 혹은 IgG2a(Becton Dickinson) isotype 항체를 사용하였다.

[0067] 실시예 1-6: T-MSC의 분화능 확인

[0068] 실시예 1-6-1: T-MSC의 중배엽성 세포로의 분화능 확인

[0069] T-MSC가 중배엽성 세포로 분화가능한지를 확인하기 위하여, T-MSC를 이용하여 중배엽성 세포인 지방세포, 골세포 및 연골세포로의 분화를 유도하였다.

[0070] 실시예 1-6-1-1: 지방세포로의 분화

[0071] 3-이소부틸-1-메틸-젠틴, 텍사메타손, 인도메타신 및 인슐린을 함유한 지방세포 배양액(Invitrogen)이 담겨진 12-웰 플레이트에 각 웰당 10^4 개의 T-MSC를 분주하고 상기 배양액을 3-4일마다 교체하면서 3주간 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양액을 제거하고, 각 웰의 바닥에 부착된 세포를 PBS로 세척한 다음, 4% 파라포름 알데히드를 사용하여 5분동안 고정하며, 각 웰을 건조시키고, Oil red O(Sigma-Aldrich)로 10분간 상온에서 염색하였다. 염색이 종료된 후, Oil red O를 제거하고 즉시 증류수로 4회 세척한 다음, 위상차 현미경으로 관찰하여 대조군(분화를 유도하지 않고 배양한 T-MSC)과 비교하였다(Yang Z, et al., Methods Mol. Biol., 698:353-366, 2011; Maxson S, et al., J. Tissue Eng. Regen. Med., 2:147-154, 2008).

[0072] 실시예 1-6-1-2: 골세포로의 분화

[0073] 아스코빅산 2-포스페이트, 텍사메타손 및 β -글리세로포스페이트를 함유한 골세포 배양액(Invitrogen)이 담겨진 12-웰 플레이트에 각 웰당 10^4 개의 T-MSC를 분주하고 상기 배양액을 3-4일마다 교체하면서 3주간 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양액을 제거하고, 각 웰의 바닥에 부착된 세포를 PBS로 세척한 다음, 60% 이소프로필알콜을 사용하여 5분동안 고정하며, 증류수로 2회 세척하고, 2% Alizarin red O 수용액(pH 4.2)로 3분간

염색하였다. 염색이 종료된 후, Alizarin red O 수용액을 제거하고 즉시 증류수로 3회 세척한 다음, 위상차 현미경으로 관찰하여 대조군(분화를 유도하지 않고 배양한 T-MSC)과 비교하였다(Yang Z, et al., Methods Mol. Biol., 698:353-366, 2011; Maxson S, et al., J. Tissue Eng. Regen. Med., 2:147-154, 2008).

[0074] **실시예 1-6-1-3: 연골세포로의 분화**

[0075] 텍사메타손, 아스코빅 산, L-프롤린, TGF-3, BMP-6 및 ITS를 함유한 연골세포 배양액(Invitrogen)이 담겨진 14ml 코니칼 튜브에 2×10^6 개의 T-MSC를 접종하고 상기 배양액을 3-4일마다 교체하면서 3주간 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양된 세포를 수거하고, 수거된 세포를 4% 파라포름 알데히드로 고정하고 파라핀으로 임베드(embedded)하여 파라핀 블록을 수득하였다. 상기 수득한 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 세절하여 박편을 수득하고, 상기 수득한 박편을 슬라이드 글라스 위에 올린 후, 파라핀을 제거하여, 슬라이드 글라스상에 세포절편을 고정하였다. 상기 슬라이드 글라스에 고정된 세포절편에 포함된 황화단백클리칸(sulfated preteoglycan)을 Alcian blue(pH 2.3)으로 염색하고, 현미경으로 관찰하여 대조군(분화를 유도하지 않고 배양한 T-MSC)과 비교하였다(Yang Z, et al., Methods Mol. Biol., 698:353-366, 2011).

[0076] **실시예 1-6-2: T-MSC의 내배엽성 세포로의 분화능 확인**

[0077] T-MSC가 내배엽성 세포로 분화가능한지를 확인하기 위하여, T-MSC를 내배엽성 세포인 부갑상선 조직세포(parathyroid cell-like cells)로의 분화를 유도하였다.

[0078] 구체적으로, T-MSC를 5% FBS, 액티빈 A(activin A, 100 ng/ml, R&D System, Inc. Minneapolis)와 sonic hedgehog(Shh)(100ng/ml, R&D Systems)를 포함하는 RPMI 1640 배지에 접종하고, 상기 배양액을 4일마다 교체하면서 3주간 배양하였다. 배양이 종료된 후, 역전사 효소 연쇄 반응(RT-PCR) 방법으로 내배엽 특이적인 단백질의 발현을 확인하였고, 부갑상선 조직세포에 특이적인 GCM2(glial cells missing homolog 2), CaSR(calcium sensing receptor), CCL21(chemokine(C-C motif) ligand 21) 및 PTH(parathyroid hormone) 유전자의 발현을 확인하였다(Bingham EL, et al., Stem Cells Dev., 18:1071-1080, 2009).

[0079]

[0080] **실시예 1-7: 역전사 효소 연쇄 반응(RT-PCR)**

[0081] T-MSC에서 분화된 내배엽성 세포에서 총 RNA를 추출하고, 추출된 RNA 1 μ g을 RT system(Promega, Madison, WI)에 적용하여 cDNA를 합성하였다. 이때, 사용된 프라이머의 서열은 표 1에 기재하였고, 전체적인 방법은 TRIZOL(Invitrogen)사의 사용자 매뉴얼에 따라 수행하였다.

표 1

[0082]

RT-PCR에 사용된 프라이머의 염기서열

명칭	염기서열(5'-3')	산물의 크기	서열번호
FoxA2 F	actgtttcctgaaggtgccc	145 bp	1
FoxA2 R	agctgcttctcgcaacttgaa		2
Sox17 F	ttcatgggtgtgggctaagga	203 bp	3
Sox17 R	ggccggtagttgtagttggg		4
CXCR4 F	aaatcttcctgccaccatc	245 bp	5
CXCR4 R	gatgacatggactgccttgc		6
Eya1 F	gcagtagtttcagcccacga	220 bp	7
Eya1 R	caccatagaggaaatgccg		8
Six1 F	ctggtttaagaaccggaggc	253 bp	9
Six1 R	gcccgggagagaatagtttg		10
Pax1 F	ccgtacgaggcaagtaagca	269 bp	11
Pax1 R	ggagagtaagcggtagccttc		12
Noggin F	gtgggcagctgcttcagtaa	160 bp	13
Noggin R	atgatggggtagctggatggg		14
BMP4 F	cactggctgaccacctcaac	204 bp	15
BMP4 R	ggcaccacatccctctact		16
GCM2 F	acaaccacaatggccacatc	272 bp	17
GCM2 R	aactcccttggcctgaaaaa		18
CaSR F	agcccttcttcccaacttga	280 bp	19
CaSR R	gaggagtctgctggaggagg		20
CCL21 F	aagcttaggctgctccatcc	239 bp	21
CCL21 R	tctgtgaccgctcagtcctc		22
PTH F	gcgtaagaagctgcaggatg	123 bp	23
PTH R	tggctctcaaccaagacattg		24
GADPH F	gtcttctccaccatggagaaggct	395 bp	25
GADPH R	catgccagttagcttcccgttca		26

[0083]

FoxA2: forkhead box A2, SOX17: SRY(sex determining region Y)-box 17, CXCR4: chemokine(C-X-C motif) receptor 4, Eya1: eyes absent homolog 1, Six1: SIX homeobox 1, Pax1: paired box 1, BMP4: bone morphogenic protein 4, GCM2: glial cells missing homolog 2, CaSR: calcium sensing receptor, CCL21: chemokine(C-C motif) ligand 21, PTH: parathyroid hormone, and GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

[0084]

실시예 1-8: T-MSC의 면역조절능 분석

[0085]

인간 CD4⁺ T 세포를 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 수득하였고, PMA(Phorbol 12- myristate 13- acetate)(Sigma-Aldrich)를 유사분열 촉진제로 사용하였다.

[0086]

공지된 방법에 따라, PMA-자극 T 세포 분열의 억제능을 측정하였다(Rasmusson I, et al., Exp. Cell Res., 305:33-41, 2005).

[0087]

CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit(Invitrogen)을 이용하여, CD4⁺ T 세포를 CFSE(carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)로 표지하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다: 세포를 미리 가온한 0.1% BSA를 포함하는 PBS에 10⁶ 세포/ml의 농도로 현탁한 다음, 10 μM CFSE를 가하였다. 이어, 37℃에서 10분간 배양하고, 배양된 세포를 다시 5배의 ice-cold 배양액에 정지시켜서 염색을 종료시킨 다음, 원심분리하여, CFSE로 표지된 CD4⁺ T 세포를 수득하였다.

[0088] 상기 수득한 CFSE로 표지된 CD4⁺ T 세포(3×10^4 세포)를 배양액에 재현탁하여 3회 세척하고, 세척된 세포를 배양된 T-MSC가 존재하는 웰(10^4 세포) 또는 존재하지 않는 웰에 접종하였다. 그런 다음, 상기 세포가 접종된 각 웰에 최종농도 1 내지 200 ng/ml의 PMA를 가하고, 3일 동안 배양한 다음, CFSE⁺ CD4⁺ T 세포를 유세포분석법(flow cytometry)으로 증식정도를 측정하고, ModifitLT 소프트웨어를 이용하여 CFSE 양성세포의 감소정도를 분석하였다.

[0089] 실시예 1-9: 다수 공여자로부터 추출한 T-MSC의 STR(Short tandem repeats) 분석

[0090] 3명의 독립적인 공여자(2명의 소년과 1명의 소녀)로부터 얻은 각각의 T-MSC를 각각 개별적으로 또는 함께 혼합하여 4주동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 배양된 세포에서 게놈 DNA를 추출하여 공지된 방법으로 STR 분석을 수행함으로써 chimerism을 확인하였다(Kristt DM, et al., J. Biomol. Tech., 16:380-391, 2005; Kim DW, et al., Blood, 103:1941-1948, 2004). 이때, 추출된 게놈 DNA는 PCR로 증폭하여 사용하고, STR 분석은 capillary electrophoresis(ABI 3130XL Genetic analyzer, Carlsbad, CA)를 이용하여 수행하였으며, 결과분석은 GeneMapper software를 이용하여 수행하였다.

[0091] 실시예 1-10: 통계 분석

[0092] 데이터를 평균 $\pm$ 표준편차(S.E.)로 표시하고, 통계적으로 유의한 값은 GRAPHPAD PRISM 소프트웨어(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)를 이용하여 Student's t-test로 분석하였다. 모든 분석에서, $P < 0.05$ 로 통계적 유의수준을 결정하였다. 모든 실험은 적어도 3회 반복수행하였다.

[0093] 실시예 2: 결과 및 분석

[0094] 실시예 2-1: T-MSC 증식 및 CFU-F 형성

[0095] 각 편도조직(2cm x 1.5cm x 1.5cm)으로부터 수득한 단핵세포의 수는 약 10^8 내지 10^9 이고, FC와 CTC는 각각 유사한 수준의 접착능을 나타내었으며(도 1), 유사한 수준의 CFU-F 결과를 나타내었다(도 1a).

[0096] 또한, 증식능의 측면에서도 단일 공여자로부터 얻어진 FC 배양과 여러 공여자로부터 얻어진 혼합된 FC 배양 사이에서는 차이를 보이지 않았다(도 1b). 그러나, 여러 공여자로부터 얻어진 혼합된 CTC 배양시에는 상대적으로 높은 수준의 증식능을 나타내었다.

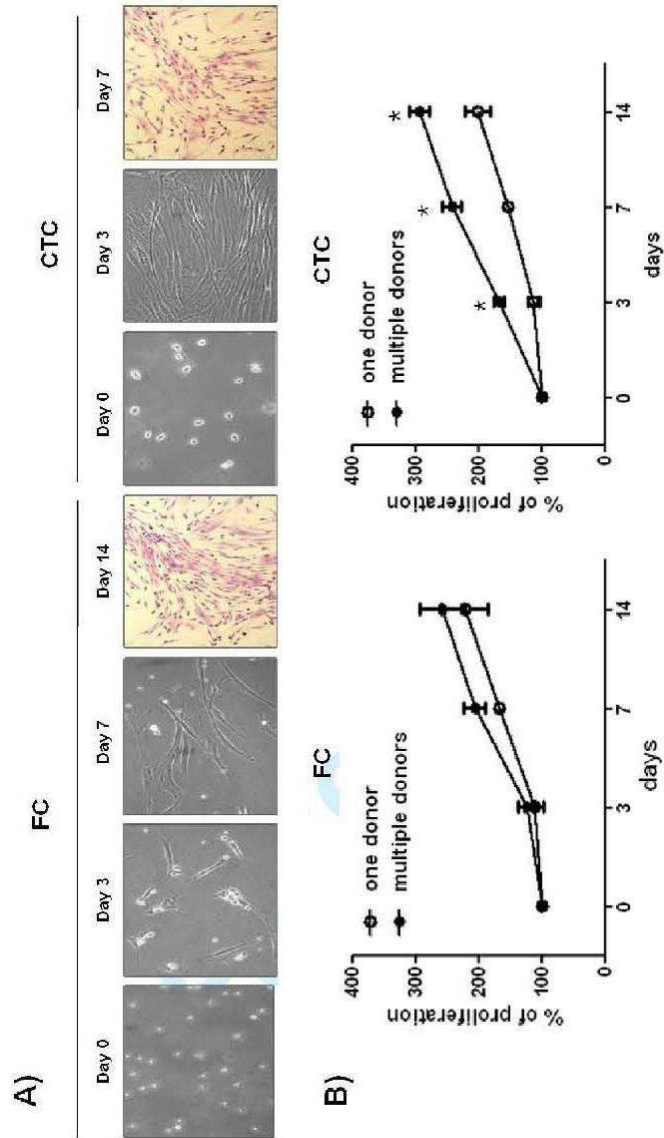
[0097] 실시예 2-2: T-MSC의 중간엽줄기세포의 형태 형성

[0098] T-MSC의 면역표현형은 전형적인 줄기세포의 표현형을 나타내었다. 즉, CD14, CD34 및 CD45의 표현은 약한 반면 CD73, CD95, CD105 표현이 증가하여, T-MSC가 조혈모세포와는 상이함을 나타내었다(도 2a). 또한, 면역관련 표현 항체(HLA-DR, CD40, CD80, CD86)도 음성을 나타내었다(도 2b).

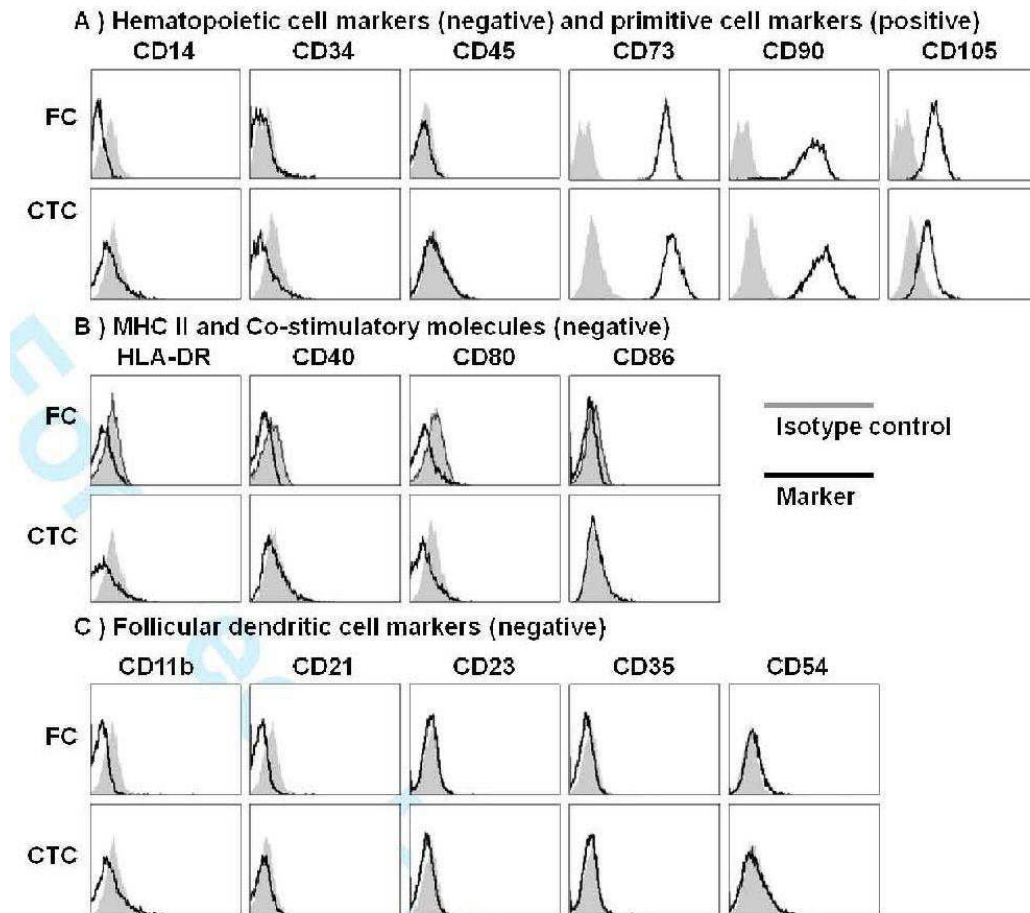
[0099] 편도조직에서 유래되며 T-MSC와 비슷한 접착성에 가변성을 가지며 증식하는 것으로 알려진 모낭수지상 세포(follicular dendritic cells, FDC)와 비교분석한 결과, 도 2c에서 보듯이 T-MSC는 FDC와는 다른 세포임을 알 수 있었다.

- [0100] 아울러, FC와 CTC 군 사이에는 표현형에 차이가 없었다.
- [0101] **실시예 2-3: T-MSC의 중배엽성 세포로의 분화능**
- [0102] 3주간의 지방분화 유도 후 세포내 지방 방울(lipid droplets)이 형성됨을 확인하였고(도 3a, 좌측), 골세포로의 분화와 칼슘의 침착이 발생됨을 확인하였으며(도 3a, 중앙), 연골세포로의 분화와 매트릭스 황화 단백질(단백질 sulfated preteoglycan)의 축적을 확인하였다(도 3a, 우측). 이에 반하여, 대조군에서는 분화특이적인 특성이 관찰되지 않았다.
- [0103] **실시예 2-4: T-MSC의 내배엽성 세포로의 분화능**
- [0104] RT-PCR 결과에서 내배엽성 세포의 표지 유전자인 FoxA2, Sox17 및 CXCR4의 발현을 확인하였고(도 3b), 흉선과 부갑상선 마커(thymus/parathyroid primordium markers)인 Eya1, Six1, Pax1, Noggin 및 BMP4의 발현도 확인하였으며, 부갑상선의 결정적 마커인 GCM2, CaSR, CCL21 및 PTH의 발현도 확인하였다.
- [0105] 상기 결과로부터 T-MSC가 내배엽성 세포인 부갑상선 조직세포로 분화될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0106] **실시예 2-5: T-MSC의 alloreactive T 세포의 증식 억제능**
- [0107] PMA는 그의 투여량에 비례하는 방식으로 CD4⁺ T 세포의 증식을 유도하였으나, T-MSC의 처리에 의하여 PMA에 의한 CD4⁺ T 세포의 증식유도가 억제됨을 확인하였고, 이는 FC와 CTC 양쪽 모두 유사한 수준을 나타내었다(도 4a).
- [0108] **실시예 2-6: T-MSC의 키메라 형성**
- [0109] STR 분석을 통하여, 총 15개의 부위중에서 D8S1179, D3S1358 및 D18S51의 3개의 부위에서 키메라(이형접합체)를 형성함을 확인하였다(도 4b). 상기 결과에서 보듯이, 다양한 기원의 편도로부터 유래된 T-MSC는 혼합배양시 키메라를 형성할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 T-MSC는 기원에 상관없이 동등하고 유사한 수준의 세포특성을 나타내어, 혼합배양을 통해 하나의 중간엽 줄기세포군을 형성할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0110] 상기 실시예 2의 결과를 종합하면, 편도로부터 유래된 T-MSC에 대하여 다음과 같은 3가지 사실을 확인할 수 있었다.
- [0111] 첫 째, T-MSC는 냉동 및 해동과정을 수행한 후에도, 냉동 및 해동과정을 수행하지 않은 T-MSC와 동일한 수준의 세포능력을 나타내고, 오히려 증식능의 측면에서는 냉동 및 해동과정을 수행한 후에 증가하는 양상을 나타낸다.
- [0112] 둘 째, 다양한 기원의 편도로부터 유래된 T-MSC는 기원에 상관없이 동등하고 유사한 수준의 세포특성을 나타내어, 혼합배양을 통해 하나의 중간엽 줄기세포군을 형성할 수 있다.
- [0113] 셋 째, T-MSC는 내배엽성 세포로만 분화시킬 수 있는 종래의 중간엽 줄기세포와는 달리 내배엽성 세포로도 분화시킬 수 있다.
- [0114] 따라서, 상술한 특성을 나타내는 편도로부터 유래된 T-MSC를 이용하여 줄기세포 은행을 형성할 수 있음을 알 수 있었다.

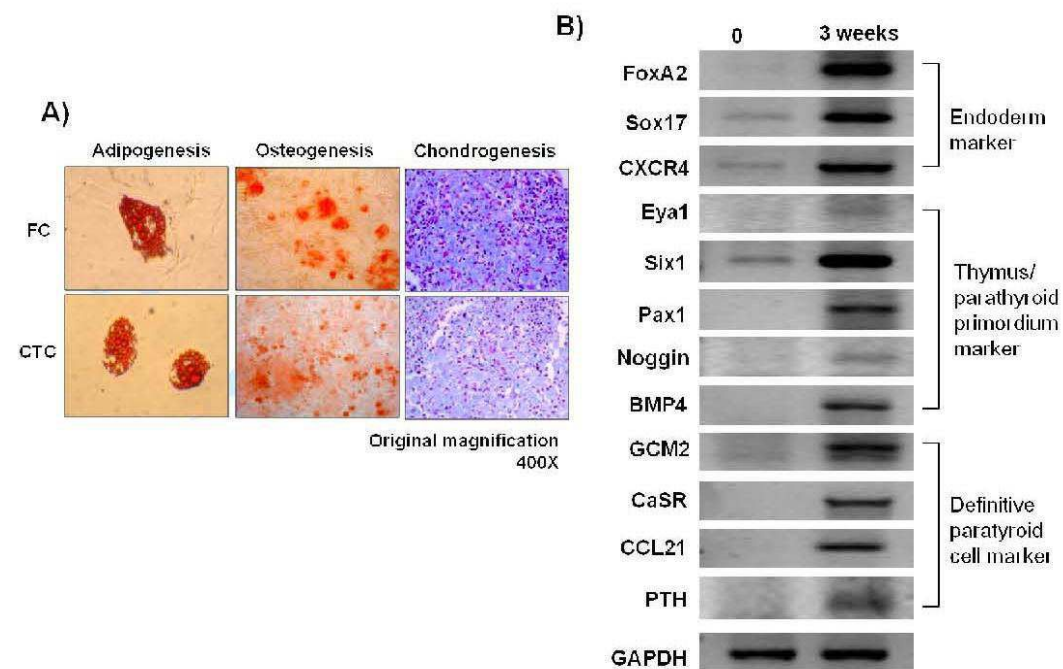
도면
도면1



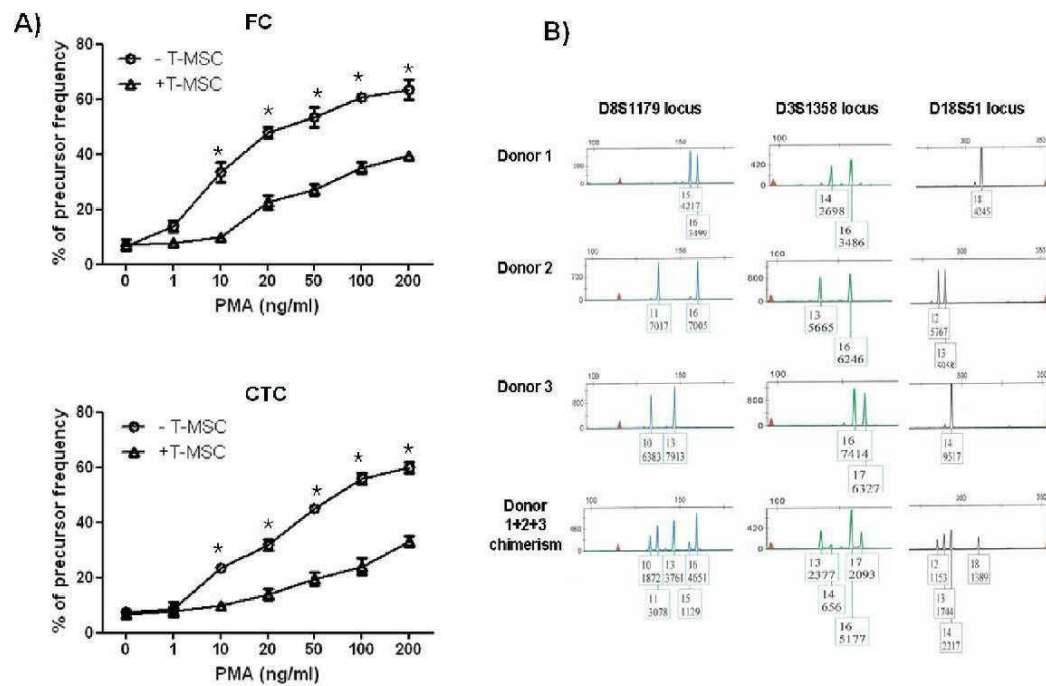
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
- <120> Chimeric mesenchymal stem cell population and process for preparing the same
- <130> PA120372/KR
- <160> 26
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> FoxA2 F
- <400> 1
- actgtttcct gaaggtgcc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> FoxA2 R
- <400>

> 2	
agctgcttct cgcacttgaa	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Sox17 F	
<400> 3	
ttcatgggtgt gggctaagga	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Sox17 R	
<400> 4	
ggccgggtact ttagttggg	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213>	
Artificial Sequence	
<220><223> CXCR4 F	
<400> 5	
aaatcttctt gccaccatc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CXCR4 R	
<400> 6	
gatgacatgg actgccttgc	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Eya1 F
 <400> 7
 gcagtagttt cagcccacga 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Eya1 R
 <400> 8
 caccatatga ggaaatgccg 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Six1 F
 <400> 9
 ctggtttaag aaccggaggc 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Six1 R
 <400> 10
 gcccgaggaga gaatagtttg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pax1 F
 <400> 11
 ccgtacgagg caagtaagca 20

<210> 12
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pax1 R
 <400> 12
 ggagagtaag cggcgccttc 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Noggin F
 <400> 13
 gtgggcagct gcttcagtaa 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Noggin R
 <400> 14
 atgatgggggt actggatggg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BMP4 F
 <400> 15
 cactggctga ccacctcaac 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BMP4 R
 <400> 16
 ggcacccaca tccctctact 20

<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GCM2 F	
<400>	17	
	acaaccacaa tggccacatc	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GCM2 R	
<400>	18	
	aactcccttg gcctgaaaaa	20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CaSR F	
<400>	19	
	agcccttctt cccaactga	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CaSR R	
<400>	20	
	gaggagtctg ctggaggagg	20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CCL21 F	
<400>	21	

aagcttaggc tgctccatcc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CCL21 R	
<400> 22	
tctgtgaccg ctcagtcctc	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PTH F	
<400> 23	
gcgtaagaag ctgcaggatg	20
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PTH R	
<400> 24	
tggtctctcaa ccaagacatt g	21
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GADPH F	
<400> 25	
gtcttctcca ccatggagaa ggct	24
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> GADPH R

<400> 26

catgccagtg agcttcccgt tca

23