

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0118407 (43) 공개일자 2012년10월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2012-0016076		(72) 발명자 김병수 서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 201-603
(22) 출원일자 2012년02월16일 심사청구일자 2012년02월16일		이승진 서울특별시 은평구 갈현동 385-6번지 대림아파트 202동 1502호 (뒷면에 계속)
(30) 우선권주장 1020110035470 2011년04월18일 대한민국(KR)		(74) 대리인 김선애

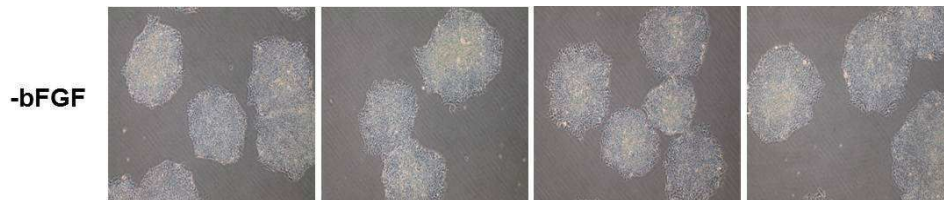
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **태반유래세포에 조건화된 배양 배지, 및 이를 이용한 무동물 및 무지지세포 줄기세포 배양 방법**

(57) 요약

본 발명은 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지, 및 이를 이용한 무동물 및 무지지세포 줄기세포 배양 방법에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의하면, 이종 단백 또는 세포에 의한 오염 문제를 방지할 수 있으며, 인간 배아줄기세포를 장기간 체외에서 미분화 상태를 유지하면서 경제적으로 배양할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박용

서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 102동
404호

정지혜

서울특별시 강남구 역삼동 704-21

김지혜

경상북도 문경시 공평동 22-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K000434

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21C프론티어사업

연구과제명 Telomerase 조작 및 인간유래지지세포를 이용한 줄기세포 증식 조절 신기술개발

주관기관 고려대학교

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 태반유래세포를 젤라틴-코팅된 웰 플레이트상에 접종하는 단계;
- (b) 세포배양액을 첨가하여 상기 태반유래세포를 배양하는 단계; 및
- (c) 배양액만을 수거하는 단계를 포함하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것을 특징으로 하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 세포배양액은 혈청대체제를 포함하는 DMEM/F-12인 것을 특징으로 하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 20-30 시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 줄기세포 배양 배지는 bFGF, IL-8, 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin), uPAR, TIM-1, TIM-2, IGFBP-6, ICAM-1, 안지오제닌(Angiogenin), BDNF, IGFBP-4, IGFBP-2, IL-6, GLP-2, MCP-1, GRO, 및 GRO-a로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지를 젤라틴이 도포된 세포배양접시에 첨가하는 단계; 및

상기 세포배양접시에 줄기세포를 접종하는 단계를 포함하는 줄기세포 배양 방법.

청구항 8

상기 제7항에 있어서, 상기 태반은 인간 태반이고, 상기 줄기세포는 인간배아줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포 배양 방법.

청구항 9

상기 제7항에 있어서, 상기 태반은 인간 태반이고, 상기 줄기세포는 인간 유도만능줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포 배양 방법.

청구항 10

bFGF, IL-8, 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin), uPAR, TIM-1, TIM-2, IGFBP-6, ICAM-1, 안지오제닌(Angiogenin), BDNF, IGFBP-4, IGFBP-2, IL-6, GLP-2, MCP-1, GRO, 및 GRO-a로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 태반유래세포에 조건화된 배양 배지 및 이를 이용한 무동물 및 무지지세포 줄기세포 배양 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 인간태반유래세포의 조건화된 배양배지를 이용함으로써 동물혈청 첨가 및 지지세포 이용을 회피할 수 있는 인간 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, 이하 'iPS' 또는 'iPSC'와 혼용하여 사용함)의 배양 방법 및 그 배양 배지에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인간배아줄기세포는 전분화능을 가지고 있어 인간의 몸을 구성하는 모든 배엽(내배엽, 외배엽, 중배엽)으로 분화될 수 있는 능력을 가지고 있는 세포로 당뇨, 간경변, 심부전, 각종 암 등의 난치병 치료의 세포치료제로 개발될 수 있는 원천세포이다. 인간배아줄기세포를 이용한 세포치료제가 개발되기 위해서는 인간배아줄기세포가 체외에서 미분화상태를 유지하면서 동시에 안전성을 확보한 상태로 장기간 배양될 수 있어야 한다. 1998년 Thomson에 의해 인간배아줄기세포를 처음으로 체외에서 미분화상태로 배양하는 기술이 성공적으로 개발되면서(비특허문헌 0001) 인간배아줄기세포를 이용한 세포치료제 개발이 가시화되는 듯 하였으나 인간배아줄기세포의 체외배양 기법에는 많은 문제점들이 지적되어 왔다. 이 중 일부는 극복되었으나 아직 궁극적으로 해결되지 못한 상태이다.
- [0003] Thomson이 개발한 인간배아줄기세포의 체외배양 기법은 FBS(fetal bovine serum)을 배양액에 첨가하였으며 MEF(mouse embryonic fibroblast)를 지지세포로 사용하여 인간배아줄기세포를 배양하였다. FBS와 MEF는 모두 인간이 아닌 이종 동물에서 기원한 체액 및 세포로서 인간배아줄기세포가 이들과 접촉하면서 배양되는 환경에는 필연적으로 인간배아줄기세포가 동물 단백질 및 세포에 오염될 수밖에 없다. 이런 환경에서 배양된 인간배아줄기세포를 이용하여 세포치료제를 개발하면 이종 단백질 및 세포가 환자의 체내에 주입될 가능성이 항상 존재하고 이 경우 예측할 수 없는 심각한 부작용들이 발생할 수 있다. 따라서 안정성 측면에서 동물 단백질 및 세포를 배제한 인간배아줄기세포의 배양시스템을 개발하기 위해 많은 연구가 진행되어 왔다.
- [0004] 먼저 FBS를 대체하기 위해 화학적으로 조성된 혈청 대체제 (serum replacement, SR)가 개발되어(비특허문헌 0002) 현재 상업적으로 구매가능하다(20% Knockout Serum Replacement, KSR[®], Invitrogen). 하지만 KSR을 이용하여도 지지세포 없이 인간배아줄기세포의 미분화상태 유지가 불가능하기 때문에 인간 기원의 지지세포를 이용한 배양기법이 개발되어 왔다. 인간 포피 섬유아세포(human foreskin fibroblast, HFF), 인간 내피세포(human endothelial cell, HEC), 인간 골수 중간엽 줄기 세포(human bone marrow mesenchymal stem cell, HMSC), 인간태반유래세포(human placental cell, HPC) 등이 여기에 해당된다. 하지만 동종의 인간유래 지지세포를 이용하면 이종 단백질과 세포에 의한 오염은 피할 수 있을지라도 이는 인간배아줄기세포와는 다른 개체에서 기원한 것이기 때문에 이형(allogenic) 단백질과 세포에 의한 오염은 피할 수 없다. 인간배아줄기세포에서 기원한 세포치료제가 이형 단백질과 세포에 오염되어 있을 경우 환자의 면역계에 의한 거부반응이 발생할 수 있기 때문에 궁극적으로는 지지세포 없는 배양기법(feeder-free culture system)이 필요하다. 지지세포 없는 배양기법(feeder-free culture system)에 사용되는 배양액의 개발은 MEF에 조건화된 배양액(MEF-conditioned media)에서부터 시작되었다(비특허문헌 0003, 0004). 세포배양에 필수적인 화합물만을 첨가한 세포배양액을 MEF에 일정 시간 노출시킨 후 다시 수거하여 이를 인간배아줄기세포 배양액으로 이용하여 지지세포 없는 배양(feeder-free culture)을 시행하는 방법이나 이는 진정한 무동물 배양 기법(animal-free culture system)이라고 할 수 없다. MEF에 노출된 배양액을 사용하기 때문에 이종 단백질과 세포에 의한 오염가능성은 항상 존재한다. 최근에는 이종 단백질과 세포의 부산물을 완전히 차단한 배양액이 개발되어 상업적으로 구매가능하다 (TeSR[™] 2, STEMCELL TECHNOLOGIES).
- [0005] 하지만 현재의 지지세포 없는 배양기법(feeder-free culture system)에는 배양액 외에도 다른 제한 사항이 존재한다. 지지세포 없는 배양(feeder-free culture)의 경우 지지세포 대신 세포가 배양접시에 안정적으로 부착하면서 자랄 수 있게 세포배양접시 바닥에 젤라틴과 같은 접촉성 물질이 필요한데 인간배아줄기세포 배양시에는 통상적으로 사용되는 젤라틴은 사용할 수 없고 생쥐 육종 세포에 조건화된 특수한 젤라틴 유사물질을 사용해야 한다. 이는 조건화 과정에서 인간배아줄기세포의 미분화상태 유지 및 생존에 도움이 되는 여러 사이토카인 및 단백질들이 젤 안에 포함되는 것으로 이해되고 있다. 이 조건화된 젤은 현재 상업적으로 구매가능하다

(Matrigel[®], BD Biosciences). 하지만 Matrigel 역시 이중 세포와의 접촉에 의해 생산되기 때문에 이중 단백질 세포의 부산물을 완전히 차단한 배양액(TeSRTM2)을 사용해도 이를 진정한 무동물 배양 기법(animal-free culture system)이라 할 수 없어 이중 단백질과 세포에 의한 오염의 우려가 항상 존재한다.

[0006] 기존의 지지세포 없는 배양기법(feeder-free culture system)은 경제성 면에서도 많은 제한점이 있다. MEF-conditioned media나 Matrigel을 생산할 경우 지속적인 생쥐 성체 및 배아의 희생이 요구되어 많은 비용이 요구된다. 또한 MEF-conditioned media나 Matrigel을 사용하여 인간배아줄기세포를 체외배양할 경우 미분화상태를 유지하기 위해 배양액이나 지지액에 반드시 bFGF(basic fibroblast growth factor)를 지속적으로 첨가해야 하는데 이는 매우 많은 비용이 필요하다. 임상적으로 적용가능한 세포치료제 개발을 위한 인간배아줄기세포는 대량 생산이 가능해야 하는데 현재의 지지세포 없는 배양기법(feeder-free culture system)은 대량 생산 시 매우 많은 비용이 요구되어 경제성이 없다고 판단된다.

[0007] 한편, 배아줄기세포를 이용한 세포치료제 개발은, 배아줄기세포를 얻는 과정에서 수정된 배아를 파괴해야 하므로 윤리적인 문제가 있으며 타인의 배아줄기세포로부터 치료에 필요로 하는 세포로 분화시킨 후 환자에게 이식했을 때 생기는 면역 거부반응과 분화가 완전히 이뤄지지 못한 세포를 이식했을 때 종양 형성의 위험이 존재한다는 문제점들을 가지고 있다. 이런 문제점을 해결하기 위해, 분화된 세포에서 역분화(reprogramming) 과정을 통해 배아줄기세포와 유사한 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell)를 형성하는 유전자 도입을 통한 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS cell) (Cell 132, 567-582, 2008) 기술이 개발되었다. 상기 iPS 배양에도 상술한 배아줄기세포의 대량 생산시 발생하는 문제점이 있었다.

[0008] 본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 공개특허 10-2007-0079586(2007.08.07)에 인간 태반기질세포를 이용한 인간 배아줄기세포 증식배양 방법, 배아체 분화배양 방법 및 조혈모세포로의 분화배양방법이 기재되어 있다. 그리고 대한민국 공개특허 10-2010-0006452(2010.01.19)에는 인간 태줄 유래 섬유모세포를 지지세포로 이용한 인간배아줄기세포의 배양방법이 기재되어 있다. 그러나 이 경우 지지세포를 까는 작업이 노동집약적이라서 경제성이 낮고 이형단백질로 인한 오염 가능성은 여전히 문제가 된다.

[0009] 따라서, 면역거부반응 등 이중 단백질 또는 세포에 의한 오염을 회피하면서 경제적으로 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유사세포를 대량으로 생산할 수 있는 새로운 줄기세포 체외배양기법에 대한 요구가 계속해서 있어 왔다.

[0010] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 또는 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 또는 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2007-0079586(2007.08.07)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2010-0006452(2010.01.19)

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) 1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

(비특허문헌 0002) 2. Wiles MV, Johansson BM. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. Exp Cell Res1999 Feb 25;247(1):241-8.

(비특허문헌 0003) 3. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth

of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol2001 Oct;19(10):971-4.

(비특허문헌 0004) 4. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. Dev Dyn2004 Feb;229(2):259-74.

(비특허문헌 0005) 5. Park Y, Choi IY, Lee SJ, Lee SR, Sung HJ, Kim JH, et al. Undifferentiated propagation of the human embryonic stem cell lines, H1 and HSF6, on human placenta-derived feeder cells without basic fibroblast growth factor supplementation. Stem Cells Dev Nov;19(11):1713-22.

(비특허문헌 0006) 6. Park Y, Kim JH, Lee SJ, Choi IY, Park SJ, Lee SR, et al. Human Feeder Cells Can Support the Undifferentiated Growth of Human and Mouse Embryonic Stem Cells Using Their Own Basic Fibroblast Growth Factors. Stem Cells Dev Feb 25.

(비특허문헌 0007) 7. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. Fertil Steril2005 May;83(5):1517-29.

(비특허문헌 0008) 8. McDonagh S, Maidji E, Ma W, Chang HT, Fisher S, Pereira L. Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. J Infect Dis2004 Aug 15;190(4):826-34.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 이런 문제점들을 해결하기 위해 Matrigel 없이 인간태반유래 지지세포에 조건화된 배양액만을 이용한 인간배아줄기세포 배양기법을 개발하였다. 인간태반은 임신기간 중에 태아가 성체 내에서 생존하는데 필수적인 환경을 제공하는 기관으로 현재는 출산 후 의학적 폐기물로 분류되어 버려지고 있다. 하지만 인간 태반의 융모막을 구성하는 세포들을 추출하여 인간배아줄기세포 배양시 지지세포로 사용할 수 있다는 사실이 밝혀지면서(비특허문헌 0005) 그 효용이 대두되고 있다. 또 인간태반유래 지지세포에서는 인간배아줄기세포의 미분화상태유지에 필수적인 bFGF가 생산되어 인간태반유래지지세포를 사용할 경우에는 bFGF의 추가적인 공급 없이도 인간배아줄기세포의 미분화상태가 유지될 수 있음이 최근에 규명되었다(비특허문헌 0006). 본 발명자들은 인간태반유래 세포의 이런 특성에 주목하여 싸이토키린이 전혀 첨가되지 않은 배양액을 24시간 동안 인간태반유래지지세포에 노출시킨 후(HPC conditioning) 수거하여 인간태반유래세포에 조건화된 배지(HPC-conditioned media)를 제작하였고 이를 이용하여 젤라틴만 도포된 세포배양 접시에서 다량의 인간배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)를 미분화 상태로 장기간 유지하는 데 성공하였다.

[0014] 따라서 본 발명의 목적은 태반유래세포에 노출시킨 후(PC conditioning) 수거하여 제조된 태반유래세포에 조건화된 배지 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 태반유래세포에 조건화된 배양배지를 이용하여, 동물 이종 단백 및 세포의 직, 간접적인 접촉이 완전히 배제된 상태의 지지세포를 이용하지 않은 무동물 및 무지지세포 줄기세포 배양 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은, Matrigel 또는 bFGF가 필요 없이 배아줄기세포의 대량생산 시 기존의 무혈청(serum-free), 지지세포 없는 배양 기법(feeder-free culture system)에 비해 더 경제적인 줄기세포 배양기법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 태반유래세포를 젤라틴-코팅된 웰 플레이트상에 접종하는 단계; (b) 세포배양액을 첨가하여 상기 태반유래세포를 배양하는 단계; 및 (c) 배양액만을 수거하는 단계를 포함하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 제조방법을 제공한다.

- [0019] 본 발명은 또한 상기 제조방법에 의해 제조된 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양배지를 제공한다.
- [0020] 본 발명은 상기 제조된 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지를 젤라틴이 도포된 세포배양접시에 첨가하는 단계; 및 상기 세포배양접시에 줄기세포를 접종하는 단계를 포함하는 줄기세포 배양 방법을 제공한다.
- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 (a) 태반유래세포를 젤라틴-코팅된 웰 플레이트상에 접종하는 단계; (b) 세포배양액을 첨가하여 상기 태반유래세포를 배양하는 단계; 및 (c) 배양액만을 수거하는 단계를 포함하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 태반은 모체로부터 출산 후 분리되는 태반을 의미하며, 상기 태반은 분리된 후 신속하게 멸균된 용기 및 얼음에 담아 보관될 수 있다.
- [0024] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 단계 (a)에서 상기 태반유래세포는 용모막판에서 분리되어 DMEM 배양액에서 계대배양하고 태반유래세포를 트립신 처리 및 방사선조사하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0025] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 단계 (a)에서 태반유래세포는 인간 용모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것이 바람직하다.
- [0026] 상기 단계 (b)에서 세포배양액은 우태혈청 등이 배제된 통상의 배양액일 수 있다. 특별히 한정되는 것은 아니나, 혈청대체제, 황산화제 및 항생제를 포함하는 DMEM/F-12인 것이 바람직하다. 보다 구체적인 일 실시예로 20% Knockout Serum Replacer (GIBCO), 0.1 mM β -mercaptoethanol, 및 1% penicillin-streptomycin (Sigma) 가 보충된 DMEM/F-12 10ml을 이용할 수 있다.
- [0027] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 단계 (b)에서 20-30 시간 동안 배양하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 24시간 배양한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 줄기세포는 무한히 분열할 수 있는 능력을 가지며 적합한 환경 조건 아래에서 특정 세포로 분화하는 능력을 가진 모든 세포를 의미하며, 성체줄기세포, 배아줄기세포, 및 배아줄기세포 유사세포를 포함한다. 즉, 전분화능(pluripotency), 다분화능(multipotency), 또는 단일분화능(unipotency)을 갖는 줄기세포를 모두 포함한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 줄기세포는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)가 바람직하다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지를 제공한다.
- [0030] 상기 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지는 태반유래세포에 의해 분비된 인간배아줄기세포의 미분화상태유지에 필수적인 bFGF 이외에도 IL-8(Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 13988-13993.), 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176 (1998).), uPAR(uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 932-943 (2002)), TIM-1(Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2001;2:1109-.16.), TIM-2(The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 3: 454-462.), IGFBP-6(Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2000; 19: 4432-4436.), ICAM-1(Structural plasticity in Ig superfamily domain 4 of ICAM-1 mediates cell surface dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15358-15363.), 안지오제닌(Angiogenin, ANG mutations segregate with familial and "sporadic" amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006, 38: 411-.413), BDNF(Cell Type-Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 2010; 330-385), IGFBP-4(Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273, 16836-.16842), IGFBP-2(Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15274-15279.), IL-6(Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342.),

GLP-2(The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med*, 6 (2000), pp. 802-807; Glucagon-like Peptide (GLP)-2 Reduces Chemotherapy-associated Mortality and Enhances cell Survival in Cells Expressing a Transfected GLP-2 Receptor *Cancer Res* 2001;61:687-693.), MCP-1(miR-124a as a key regulator of proliferation and MCP-1 secretion in synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Mar;70 Suppl 1:i88-91.), GRO(Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4125-32.), 및 GRO-a(GROa regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate. *Differentiation* 81 (2011) 222-232)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인이 포함되어 있다(도 14 ~ 도 17 참조)(Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*. 2006 Feb;24(2):160-1.)

- [0031] 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지는 IL-8, MCP-1, TIMP-2, 및 GRO-a로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0032] 나아가, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지를 젤라틴이 도포된 세포배양접시에 첨가하는 단계; 및 상기 세포배양접시에 줄기세포를 접종하는 단계를 포함하는 줄기세포 배양 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 줄기세포 배양 방법은 인간뿐만 개, 소, 양 등 다양한 동물의 줄기세포 배양에도 활용이 가능하다. 바람직하게는, 상기 태반은 인간 태반이고, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)이고, 상기 배아줄기세포는 인간배아줄기세포가 더욱 바람직하다.
- [0034] 종래의 조건화된 배양액은 일반적으로 마우스에서 유래된 동물세포(MEF)를 이용하여 이종 단백 또는 세포에 의한 오염 문제가 있었다. 본 발명자들은 인간세포 중 태반유래세포에 조건화된 배지(HPC-conditioned media)를 사용한 배양방법은 최초로 확립하였다. 이에 이종 단백 또는 세포에 의한 오염을 방지할 수 있어, 인간 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)의 의학적 임상적용 효용성을 향상시킬 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 배지에는 줄기세포의 미분화상태 유지 및 생존에 도움이 되는 여러 사이토카인 및 단백질들이 포함되어 있어, 종래의 지지세포 없는 배양 기법(feeder-free culture system)과 달리 세포배양접시에 Matrigel을 도포할 필요가 없다. 본 발명은 고비용의 Matrigel 없이 젤라틴만 도포한 상태에서 인간배아줄기세포 등 줄기세포의 배양이 가능하여 매우 경제적이다.
- [0036] 나아가, 기존의 지지세포 없는 배양 기법(feeder-free culture system)은 인간배아줄기세포의 미분화 상태 유지를 위해 배양액에 지속적인 bFGF의 공급이 필수적이어서 복잡하고 비용이 많이 들었으나, 본 발명에 의한 조건화된 배지에는 태반유래세포에 의해 분비된 인간배아줄기세포의 미분화상태유지에 필수적인 bFGF 등이 포함되어 bFGF의 추가적인 공급이 필요 없어 매우 경제적이다.
- [0037] 도 3 ~ 도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 무동물 및 무지지세포 태반유래세포에 조건화된 배양 배지를 이용하여 배양된 줄기세포의 미분화의 측정은 알칼라인 포스파타제(ALP) 활성의 측정을 통해 확인되었다. 또한 본 발명에 의해 배양된 줄기세포는 미분화 세포에 전형적인 SSEA4, TRA-60 및 TRA-81 세포 표면 마커를 발현하는 것으로 확인되었다. 나아가 본 발명에 의한 배아줄기세포주에서는 bFGF 첨가 유무에 관계없이 미분화 표지자인 Rex1, Nanog, Oct4가 잘 발현되고 있음이 확인되었다.
- [0038] 배아줄기세포는 체내(in vivo) 또는 체외(in vitro)에서 삼배엽(외배엽, 중배엽, 내배엽)으로 분화가 가능한 분화능력을 가지고 있다. 본 발명에 의해 젤라틴 코팅된 플레이트에서 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지로 배양된 줄기세포들이, 이러한 분화능력이 있는지를 확인하기 위해 체외(in vitro) 상에서 분화유도하였더니 삼배엽으로 모두 분화되는 것을 각 배엽의 표지인자들을 면역염색법으로 확인할 수 있었다(도 11 및 도 12). 뿐만 아니라 정량적인 유전자 발현 분석을 위한 실시간 중합효소 연쇄반응실험(Quantitative real-time PCR Analysis)을 통하여 분화능을 다시 한번 확인하였다(도 13).

[0039] 따라서, 본 발명에 의하면 안정적이고 미분화된 줄기세포를 체외에서 장기간 대량 배양할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 bFGF, IL-8, 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin), uPAR, TIM-1, TIM-2, IGFBP-6, ICAM-1, 안지오제닌(Angiogenin), BDNF, IGFBP-4, IGFBP-2, IL-6, GLP-2, MCP-1, GRO, 및 GRO-a로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지 조성물을 제공한다. 이에 한정되는 것은 아니나 바람직하게 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지는 IL-8, MCP-1, TIMP-2, 및 GRO-a로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0041] 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지는 어떠한 조성으로 이루어져 있는지 확인하기 위하여, 미국의 RayBiotech Inc.에서 개발한 human cytokine array를 통하여 총 120가지의 사이토카인 발현량을 확인하였고(도 14) 대조군으로는 판매되고 있는 STEM CELL TECHNOLOGIES사의 mTeSR와 비교 실험하였다. 그 결과 5배 이상 발현의 차이가 나는 17개의 사이토카인을 선별해 낼 수 있었는데 그 중 인간배아줄기세포의 미분화상태유지에 필수적인 bFGF는 판매되고 있는 mTeSR에서 상당량 첨가되었으나 태반유래세포에 조건화된 배아줄기세포 배양 배지에서는 상대적으로 발현이 많지 않았음에도 불구하고 배아줄기세포가 미분화 상태를 유지하며 장기간 배양에 성공할 수 있었음이 확인되었다(도 15). 인간 배아줄기세포의 미분화상태를 유지하는 배양 조건에 가장 발현의 차이가 컸던 상위 4가지의 사이토카인은 IL-8, MCP-1, TIMP-2, GRO-a로 나타났고, 효소-연결면역흡수 측정검사(enzyme linked immunosorbent assay:ELISA)를 통해 정확한 성분량이 측정되었다(도 16 및 도 17).

발명의 효과

[0042] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 동물 이종 단백 또는 세포의 직, 간접적인 접촉이 완전히 배제된 상태로, 지지세포를 이용하지 않은 무동물 및 무지지세포 줄기세포 배양 방법을 제공하여, 이종 단백 또는 세포에 의한 오염 문제를 방지할 수 있으며, 인간 배아줄기세포를 장기간 체외에서 미분화 상태를 유지하면서 배양할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명에 의하면, Matrigel 없이 인간태반유래 지지세포에 조건화된 배양액만을 이용하여 인간 배아줄기세포 배양할 수 있고, 고가인 bFGF를 지속적으로 첨가할 필요가 없어 배양 비용을 획기적으로 절감하여 경제적이면서도 장기간 안정적으로 인간 줄기세포를 체외에서 대량 생산할 수 있다.

[0044] 따라서, 본 발명은 배아줄기세포 등 줄기세포를 이용하는 세포치료제 분야에서 매우 유용한 발명이라고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 인간 태반유래 세포의 초배양 과정을 보여주는 사진이다. (A) 세포배양접시에 접종 후 4일 후 : 아직까지는 동일하지 않은 여러 형태의 세포군락들이 관찰된다. (B) 세포배양접시 접종 후 2주 후 : 섬유아세포 모양 세포로 균질하게 구성된 세포군락을 확인할 수 있다. Magnification (A-B): X40

도 2는 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 배지(PC conditioned media; 이하 'PC-CM'과 혼용하여 사용됨)에 bFGF 첨가 영향을 확인한 사진으로, 인간태반유래세포에 조건화된 배지(HPC conditioned media)에 bFGF를 첨가하지 않고 H1 배아줄기세포주를 배양한 결과이다. 태반유래세포에 조건화된 배지(PC conditioned media)에 bFGF를 첨가하지 않아도 미분화상태의 인간배아줄기세포주 군락이 잘 유지되고 있는 것을 볼 수 있다(10계대에서 촬영한 사진임).

도 3은 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)만으로 배양한 H1 인간배아줄기세포주 군락에서 줄기세포 표지자인 ALP가 잘 발현되고 있는 것을 확인한 결과를 보여주는 사진이다(10계대에서 촬영한 사진임).

도 4는 인간 배아줄기세포의 미분화 표지자인 SSEA4, TRA60, TRA81, OCT4가 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)에서 배양한 H1 인간배아줄기세포주 군락에서 잘 발현되고 있음을 확인한 결과를 보여주는 사진이다(10계대에서 촬영한 사진임).

도 5는 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)를 이용하여 배양한 H1 인간배아줄기세포주에서는 bFGF 첨가 유무에 관계없이 미분화 표지자인 Rex1, Nanog, Oct4가 잘 발현되고 있음을 확인한 결과를 보여주는 사진이다(10계대에서 시행한 RT-PCR 결과임).

도 6은 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)를 이용하여 배양한 H1을 각기 다른 조건에서 비교 배양한 결과이다. 본 발명조건인 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 배양액의 배양조건(PCCM-bFGF(G))에서 가장 미분화상태를 잘 유지하는 것을 알 수 있다. 같은 배양액에 판매되고 있는 MATRIGEL에서 배양한 그룹(PCCM-bFGF(M)), 젤라틴 위에서 bFGF가 첨가된 그룹(PCCM+bFGF(G)), MATRIGEL 위에서 bFGF가 첨가된 그룹(PCCM+bFGF(G)). 이상 총 4가지 조건에서 동일 세포주 H1으로 배양이 진행되었고 n=4로 3 반복 실험하였으며 각 배양 접시의 세포주 개수가 다르므로 전체 세포개수에서 미분화된 세포의 개수를 백분율(%)로 계산한 수치를 나타냄.

도 7은 도 6의 각 실험 조건에서 배양되고 있는 인간배아줄기세포주의 배율 x40에서 촬영한 모습이다(10계대에서 촬영한 사진임). bFGF가 첨가된 그룹과 첨가되지 않은 그룹간의 분화 정도가 분명히 구별되며 본 발명에 의한 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 배양액의 배양조건에서 가장 미분화상태를 잘 유지하는 것을 알 수 있다. 알칼라인 포스파테인 활성염색을 통하여 검사하였다.

도 8은 본 발명에 의해 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-CM-bFGF)만으로 배양한 인간 유도만능줄기세포 iPSC의 배양모습을 촬영한 사진이다(배율 X40로 8계대에서 촬영함).

도 9는 본 발명에 의해 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-CM-bFGF)만으로 10계대 배양 후 인간배아줄기세포주(H1)와 인간 유도만능줄기세포(iPSC)가 줄기세포 미분화 표지자인 Rex1, Nanog, Oct4 유전자를 잘 발현하고 있음을 확인한 결과를 보여주는 사진이다.

도 10은 본 발명에 의해 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-CM-bFGF)만으로 배양 후 인간배아줄기세포주(H1)와 인간 유도만능줄기세포(iPSC)가 줄기세포 미분화표지자인 Nanog, TRA-60, TRA-81, SSEA-4, OCT-4를 면역염색법으로 염색한 뒤 관찰하여 잘 발현하고 있음을 확인한 결과를 보여주는 사진이다(SSEA-1은 Negative control임, DAPI는 세포의 유무를 위해 핵 염색함, 배율 x40에서 촬영함).

도 11은 본 발명에 의해 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-CM-bFGF)만으로 배양 후 그 세포주가 인간배아 줄기세포의 고유의 특성을 잘 간직하고 있는지를 확인하기 위해 체외(in vitro)에서 2주간 배아 유사세포덩어리(embryoid body)로 분화유도한 뒤 젤라틴 코팅된 배양접시 위에서 다시 10일간 부착 배양 한 뒤 삼배엽의 표지자인 AFP(내배엽), DESMIN(중배엽), TUJ1(외배엽)를 면역염색법으로 염색한 뒤 형광현미경을 이용해 40배율에서 촬영한 결과를 나타내는 사진이다. 삼배엽으로 분화가 가능한 줄기세포 고유의 분화능을 확인하였다.

도 12는 본 발명에 의해 젤라틴 코팅 배양 접시에 bFGF가 따로 첨가되지 않은 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-CM-bFGF)만으로 인간 유도만능줄기세포(iPSC)를 도 11의 조건으로 배양한 결과를 나타내는 사진이다. 인간 유도만능줄기세포 또한 배아줄기세포주와 마찬가지로 본 발명에 의해 배양하는 경우 줄기세포 고유의 특성을 잃지 않고 잘 배양되고 있음을 확인하였다.

도 13은 본 발명에 의해 배양된 세포를 정량적인 유전자 발현 분석을 위한 실시간 중합효소 연쇄반응실험(Quantitative real-time PCR Analysis)을 통하여 분화 능을 다시 한번 확인한 결과이다. 2주간 분화유도가 끝난 배아유사세포덩어리에서 RNA를 추출하여 complementary DNA를 합성한 뒤 각 유전자의 발현을 조사하였다. 대조군은 분화유도시키지 않은 인간배아줄기세포주를 사용하였고 House keeping gene인 GAPDH를 이용하여 complementary DNA가 잘 합성되었는지를 확인하고 표준화하였다. 실험결과 미분화 표지자인 OCT-4, NANOG도 잘 발현하며 분화를 유도한 그룹에서 내배엽, 중배엽, 외배엽을 표지하는 유전자의 발현이 정상적으로 이루어지고 있음을 확인하였다.

도 14는 본 발명에 의한 태반유래세포의 조건화된 배양 배지의 조성을 확인하기 위해서 미국의 raybiotec(Raybiotech Inc., www.raybiotech.com)에서 판매되고 있는 cytokine antibody array 키트를 이용하여 총 120개 단백질의 발현정도를 확인한 결과이다. 실험의 대조군으로는 인간태반유래세포에 노출 시키지 않은 기본배양액과 현재 판매되고 있는 stem cell technologies사의 mTeSR를 사용하였다. 실험군의 결과를 대조군으로 사용된 기본배양액 결과로 표준화(normalization)하였고 그 중에서 mTeSR 그룹과 발현차이가 현저히 나는 싸

이토카인(cytokine)들을 선택하였다.

도 15는 도 14의 멤브레인 어레이(membrane array) 결과를 밀도(density)를 이용해 측정한 값을 나타낸다. 왼쪽은 흡광도(optical density)를 측정하는 프로그램 (sicon)을 이용하여 각 스팟들의 값을 수치화시킨 뒤 평균값으로 정리한 뒤 그룹간의 발현 차이가 적어도 5배 이상 나는 사이토카인들을 정리한 표로, 분홍색칸은 대조군의 발현이 높은 것, 노란색칸은 실험군의 발현이 굉장히 높은 것을 표시한다. 오른쪽은 수치들을 비교하기 편하도록 그래프로 나타난 것으로 가장 발현이 높은 5개를 빨간색으로 표시하였다.

도 16은 도 15에서 현저한 발현차이를 보인 상위 4개의 사이토카인의 ENTREZE ID와 단백질 이름을 나타낸다.

도 17은 도 15에서 현저한 발현차이를 보인 상위 4개의 사이토카인의 정확한 양을 측정하기 위해 실시된 효소-연결면역흡수측정검사(enzyme linked immunosorbent assay:ELISA) 결과를 그래프화한 결과이다. 실험의 대조군으로는 태반유래세포에 노출시키지 않은 기본 배양액(Con1)과 판매되고 있는 mTeSR(Con2)를 사용하였으며 실험군은 무작위로 선별된 5개의 본 발명에 의한 배지(sample)를 3회 반복 실험하였다(단위 = pg/ml).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 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 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0047] 실시예 1: 인간태반유래세포의 생산

[0048] 건강한 여성의 태반에서 융모막판(chorionic plates)을 수술적으로 분리하여, 다지고 37℃에서 30분간 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 그 후에 그 세포들을 20% fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc, Logan, UT, 100 U/ml penicillin, 및 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에서 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도 조건에서 배양하였다.

[0049] 그 배지를 세 계대(passage)까지 매 3-4일마다 교환하였다. 배양 동안에, 본 발명자들은 배양 배지에서 떠오르는 세포 찌꺼기를 제거하고, 그 판에 부착된 태반-유래 섬유세포-유사 세포를 발견하였다. 접종 약 2 주에, 그 판에 부착된 섬유세포-유사 세포의 콜로니를 형성하였다 (도 1 참조).

[0050] HPCs는 12th 계대까지 배양하고, 이들 세포 모두를 저장(stock)하였다. 냉동 스톱을 트립신처리 및 방사선 조사(1500 cGy)후 크라이오바이얼(cryovial) 당 1 x 10⁶ 세포의 양으로 수행하였다. 태반에 통상적으로 감염되는 병원체들은 스톱으로 냉동하기 전에 RT-PCR에 의하여 테스트하였다. 이들은 cytomegalovirus, herpes simplex virus types 1 및 2, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia spp*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, 및 *Ureaplasma ureaticum*을 포함한다. 공개된 프라이머 서열을 사용하였다 (비특허문헌 0007, 0008). 병원성에 대하여 포지티브인 HPC는 폐기하였다.

[0051] 실시예 2: 태반유래세포에 조건화된 배지(PC-conditioned media)의 생산

[0052] 저장된 HPCs를 해동하고 1 x 10⁶ cells/well로 0.1% 젤라틴-코팅된 35-mm 웰 플레이트 상에 접종하였다. 20% Knockout Serum Replacer (GIBCO), 0.1 mM β-mercaptoethanol, 및 1% penicillin-streptomycin (Sigma)가 보충된 DMEM/F-12 10ml을 HPC가 접종되어 있는 배양접시에 첨가하여 24시간 동안 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 배양 후 배양액만을 따로 추출하여 4℃에 냉장 보관하였다.

[0053] 실시예 3: 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)를 이용한 미분화 상태의 인간배아줄기세포의 장기간 체외 유지 및 배양

[0054] 젤라틴이 도포된 세포배양 접시에 인간태반유래세포에 조건화된 배양배지(HPC-conditioned media)를 첨가한 후 H1 인간배아줄기세포주를 세포배양접시에 접종 후 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 배양하였다. 인간태반유래세포에 조건화된 배양배지(HPC-conditioned media)는 48시간마다 교환하였다. H1 인간배아줄기세포는 매주 새로운

젤라틴 도포된 세포배양접시에 계대 배양을 시행하여 적어도 20계대까지 미분화상태를 유지하면서 체외배양되는 것이 확인되었다.

[0055] 미분화상태를 확인하기 위해 매일 inverted microscope으로 관찰하였고(도 2) 매 5계대마다 줄기세포 표지자의 발현을 조사하였다. 줄기세포 표지자 중 alkaline phosphatase (ALP), Oct-4, stage specific embryonic antigen (SSEA)-4, tumor rejection antigen (TRA)-60, TRA-81은 면역염색으로(도 3, 4, 7 및 10), Oct-4, Nanog, 및 Rex-1에 대한 것은 RT-PCR에 의해(도 5) 확인하였다.

[0056] RT-PCR에 사용된 프라이머들은 다음과 같다;

[0057] Oct-4, 577bp:

[0058] CGACCATCTGCCGCTTTGAG (forward, 서열번호 1)

[0059] CCCCCTGTCCCCATTCCTA (reverse, 서열번호 2),

[0060] Nanog, 149bp:

[0061] AAAGAATCTTCACCTATGCC (forward, 서열번호 3),

[0062] GAAGGAAGAGGAGAGACAGT (reverse, 서열번호 4),

[0063] Rex-1, 306bp:

[0064] CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT (forward, 서열번호 5),

[0065] GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA (reverse, 서열번호 6).

[0066] 면역조직화학(immunocytochemistry)에 사용된 동시배양은 6-웰 플레이트에서 확립되었다. 분석 전에, 부착 세포 층(adherent cell layers)을 상온에서 10% 포르말린의 첨가에 의하여 고정하고(15 분), 10분 동안 0.1% Triton X-100/PBS를 투과시키고 4℃에서 일차 항체로 오버나잇 배양하였다. SSEA-4에 대한 일차 항체는 Hybridoma Bank (Hybridoma Bank, IA)에서 구입하였고, 다른 항체들은 Chemicon (Chemicon, CA)으로부터 구입하였다. ALP 활성은 상업적 키트(Sigma)를 사용하여 검출하였다. 줄기세포성 마커에 대한 RT-PCR도 수행하였다. 전체 RNA는 QIAGEN RNeasy 키트(Qiagen-Hilden, Germany)를 사용하여 제조하였고, 역전사는 AMVreverse transcriptase (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 사용하는 랜덤 헥사머로 500 ng의 토탈 RNA를 프라이밍하여서 수행하였다. PCR을 수행한 후, 그 산물들을 1.5% 아가로스 젤 상에서 분석하고 에티움 브로마이드(ethium bromide)로 시각화하였다.

[0067] 나아가 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지와 기존의 상품화되어 있는 matrigel을 대조군으로 하여 비교 실험을 하였다. 미국의 wicell research institute에서 분양받은 인간 배아 줄기세포주 H1을 이용하였다. 줄기세포의 분화의 측정은 알칼라인 포스파타제(ALP) 활성의 측정(도 7)을 통해 확인하였다. 그 결과 본 발명에 의한 젤라틴이 코팅된 플레이트에서 태반유래세포에 조건화된 배아줄기세포 배양 배지로 배양된 그룹(PCCM-bFGF(G))이 17계대(4~5개월 정도의 기간) 이상까지 미분화 상태를 가장 잘 유지하는 것으로 나타났다(도 6 및 도 7).

[0068] **실시예 4: 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)를 이용한 미분화 상태의 유도만능줄기세포(iPS)의 배양**

[0069] 미국의 wicell research institute에서 분양받은 인간 배아 줄기세포주 H1과 인간 유도만능줄기세포주 iPS(Foreskin-1)으로 검증해 보았다. 인간 유도만능줄기세포주 iPS도 인간 배아 줄기세포주 H1과 마찬가지로 미분화상태를 유지하며 계대배양에 성공하였다(도 8). 실시예 3과 같이 줄기세포의 분화의 측정은 유전자 증폭기술(도 9) 및 각 줄기세포의 미분화 표지자인 SSEA4, TRA-60 및 TRA-81과 Rex-1, Nanog, oct-4를 세포 면역염색법(도 10)을 통해 확인하였다.

[0070] **실시예 5: 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)를 이용한 미분화 상태의 인간배아줄기세포 및 유도만능줄기세포(iPS)의 체외 배양 분화능 확인 (Differentiation in vitro)**

[0071] 인간배아줄기세포는 체내(in vivo) 또는 체외(in vitro)에서 삼배엽(외배엽, 중배엽, 내배엽)으로 분화가 가능

한 분화능력을 가지고 있는데, 본 발명에 의한 젤라틴이 코팅된 플레이트에서 인간 태반유래세포에 조건화된 배아줄기세포 배양 배지로 배양된 세포들도 체외(in vitro)상에서 분화유도하면 삼배엽으로 모두 분화되는지를 다음과 같은 방법으로 확인하였다.

[0072] 1) 면역염색 조직화학적 방법

[0073] 본 발명에 의해 미분화상태를 유지하며 자라고 있는 인간줄기세포 또는 iPSC를 14세대 이상 배양한 뒤 효소처리(dispass)하여 콜로니를 분리하고 배아체(embryoid body)를 형성하는 배양조건에서 2주 동안 부유배양(suspension culture)하여 분화를 유도한 뒤, 젤라틴 코팅된 디쉬로 옮겨주어 다시 10일 동안 부착배양(adherent culture)하였다. 분화유도한 배양배지 조건은 80% DMEM-F12, 20%KONCK-OUT SERUM, 0.1mM β -mercaptoethanol, 1% nonessential amino acids가 포함되었다. 부착된 세포들을 면역염색 조직화학(immunocytochemistry) 방법으로 세포질을 염색하여 내배엽, 중배엽, 외배엽으로 분화 가능한지를 확인하였다. 부착 세포 층(adherent cell layers)을 상온에서 4% 포르말린의 첨가에 의하여 고정하고(15 분), 10분 동안 0.1% Triton X-100/PBS를 투과시키고 4℃에서 일차 항체로 오버나잇 반응하였다. AFP과 Desmin에 대한 일차 항체는 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.에서 구입하였고, TUJ1은 Chemicon (Chemicon, CA)으로부터 구입하였다. 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타냈다.

[0074] 2) 정량적 PCR 분석(Quantitative PCR analysis):

[0075] 인간배아줄기세포와 인간배아체, 인간 유도만능줄기세포 등의 전체 RNA 분리는 High Pure RNA Isolation kit (Qiagen)를 사용하였고 200 unit의 reverse transcriptase와 500ng의 oligo(dT)를 첨가하여 2 ug의 cDNA를 합성하였다. 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 및 1 mM dNTPs 처리한 뒤 1 시간 동안 42℃에서 반응시켰다. 실시간중합연쇄반응은 iCYCLER (BioRad)로 1 x SYBR Green mix (Invitrogen)을 사용하여 실시되었다. denaturation은 94℃에서 30 초간 반응시키고 annealing은 55℃에서 30 초간, 그리고 extension은 72℃에서 1 분 동안 진행되어 33 cycle 반복되어 반응되었다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0076] **실시예 6: 태반유래세포에 조건화된 배양배지(PC-conditioned media)의 조성조사와 함유량 정량분석, 인간줄기세포 미분화 배양 유지의 핵심적인 후보물질 발굴**

[0077] 기존의 상품화 된 인간 배아 줄기세포 배양물질들과 비교하여 본 발명에 의한 태반유래세포에 조건화된 줄기세포 배양 배지의 조성을 확인하기 위하여, 다음과 같이 미국의 RayBiotech Inc.에서 개발한 human cytokine array를 통하여 총 120가지의 사이토카인 발현량을 확인하였고 대조군으로는 판매되고 있는 STEM CELL TECHNOLOGIES사의 mTeSR와 비교 실험하였다.

[0078] 1) 인간 사이토카인 항체 어레이(human cytokine antibody array):

[0079] 본 발명의 조건화된 배양액과 대조군(control)으로 사용된 배지를 각각 60개의 사이토카인이 프린팅 되어있는 nitrocellulose membrane에 2장씩 반응시키고(duplicate spots), blocking, incubation, washing 단계를 거치게 되고 biotin-conjugated antibodies를 첨가 후 streptavidin-conjugated peroxidase와 ECL chemiluminescence reagent로 반응시킨 뒤 autoradiographic film (BioMax Lite, Kodak)을 이용해 현상하였다. 랜덤하게 선택된 5개의 샘플로 반복실험되었으며 총 120개의 사이토카인 발현을 측정하였다. 실험군의 결과를 대조군으로 사용된 기본배양액 결과로 표준화(normalization)하였고 그 중에서 mTeSR 그룹과 발현 차이가 현저히 나는 사이토카인(cytokine)들을 선택하였다. 그 결과를 도 14 ~ 도 16에 나타내었다.

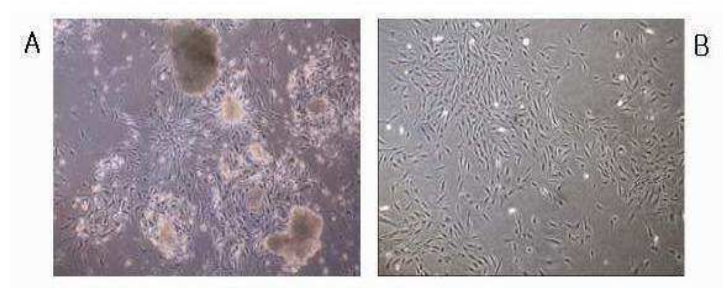
[0080] 2) ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay):

[0081] 사이토카인 측정실험을 통해 얻어진 후보들의 본 발명에서의 정확한 함유량을 알기 위해 Raybiotech에서 개발된 Humna ELISA 키트를 이용하여 실험이 진행되었다. 앞의 실험과 마찬가지로 대조군(control)과 실험군은 동일하게 사용하였고 4가지 사이토카인의 기준을 확립하였다(standardization). 실험순서는 100 μ l의 실험군과 대조군 샘플을 각각 넣고 4℃에서 오버나잇 반응시킨 후 biotin antibody를 첨가 후 1 시간 incubation 한다. Streptavidin solution과 TMB One-Step Substrate Reagent로 반응시킨 뒤 50 μ l Stop Solution으로 반응을 중지시킨 뒤 microplate reader를 사용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 사이토카인의 controls 과 samples들은 세 반복 실험되었다(triplicate). 그 결과를 도 17에 나타내었다.

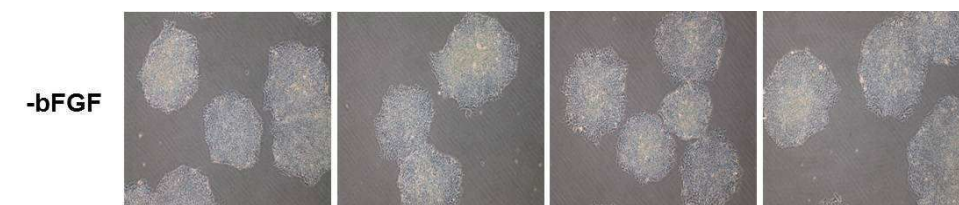
[0082] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 도면에 의해 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

도면

도면1



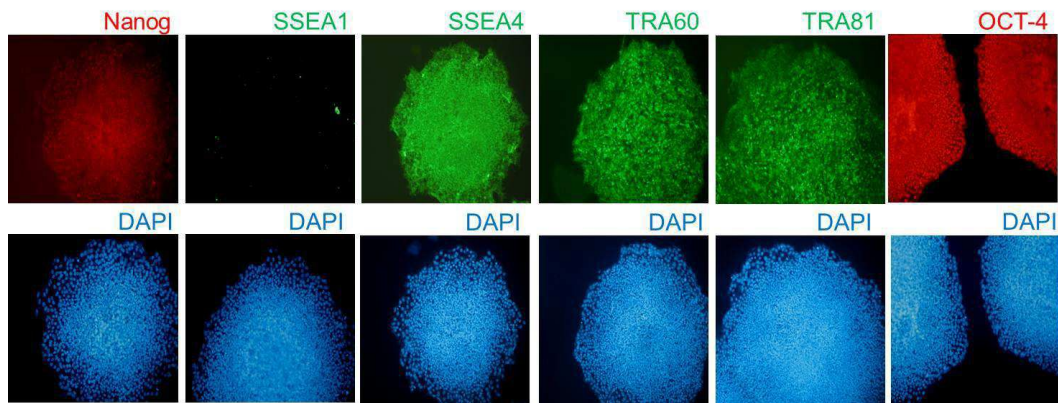
도면2



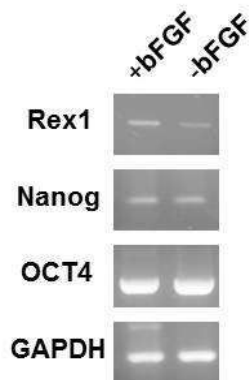
도면3



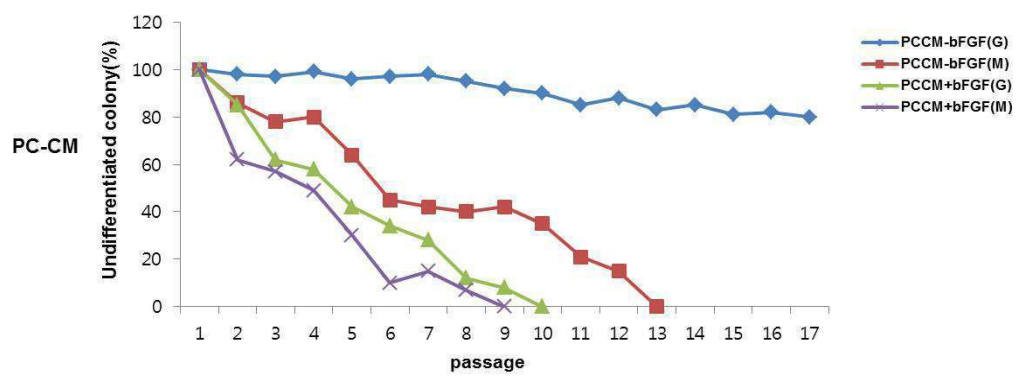
도면4



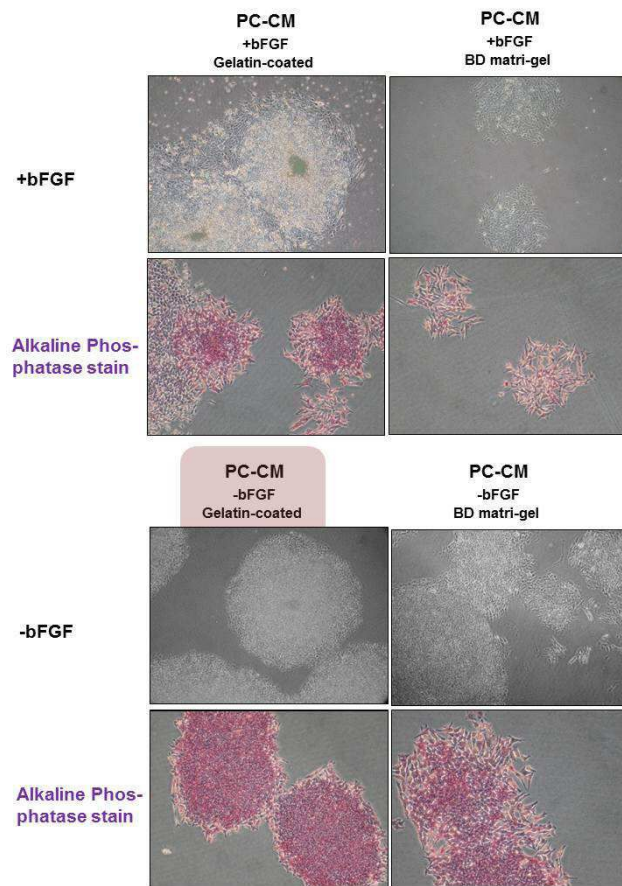
도면5



도면6

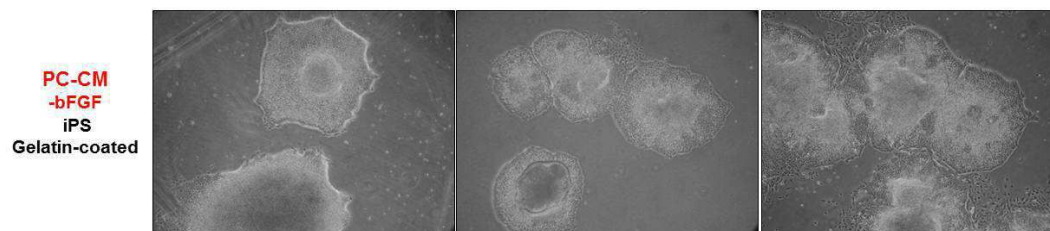


도면7



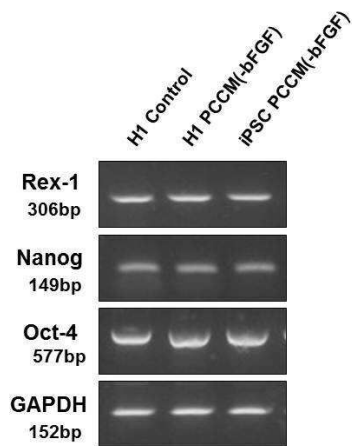
도면8

- Cell lines : iPS(foreskin-1) # p8
- Feeder-Independent, Conditioned medium



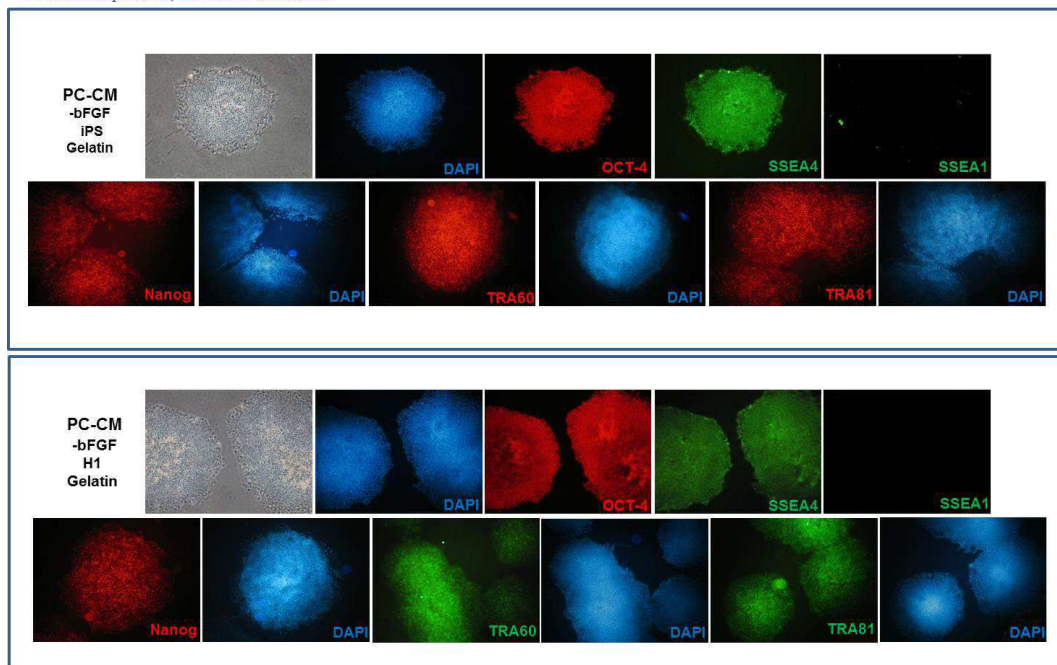
도면9

RT-PCR analysis of stemness markers #p10



도면10

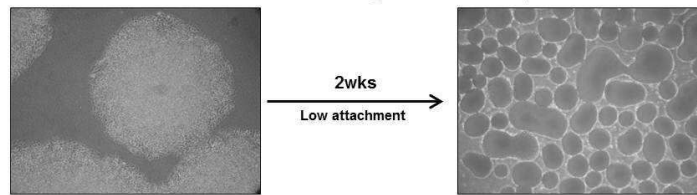
- Cell lines : iPS(foreskin-1) , H1 #p8
Feeder-Independent, Conditioned medium



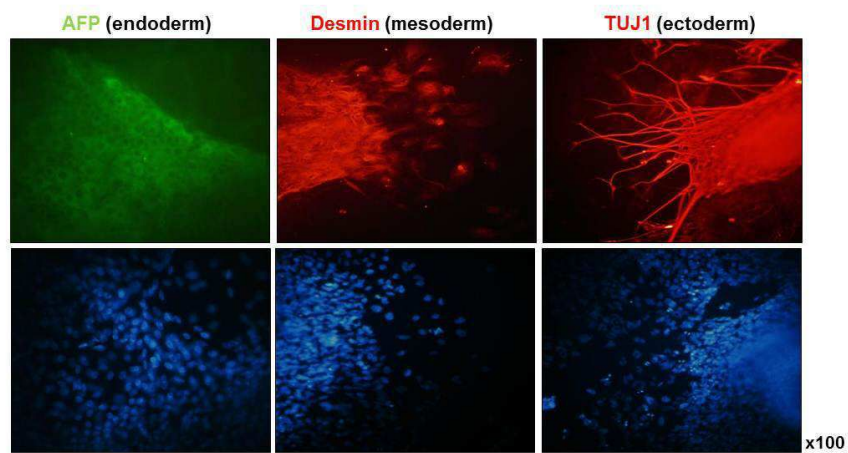
도면11

EB formation : Feeder-Independent, Conditioned medium

(Cell line: H1, Medium: PC-CM -bFGF, Matrix: gelatin coated)



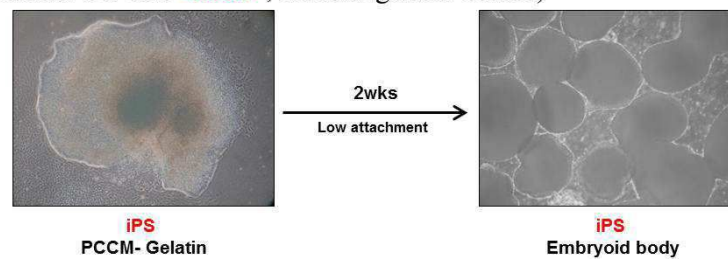
* Analysis of pluripotency *in vitro* (AFP, Desmin, TUJ1)



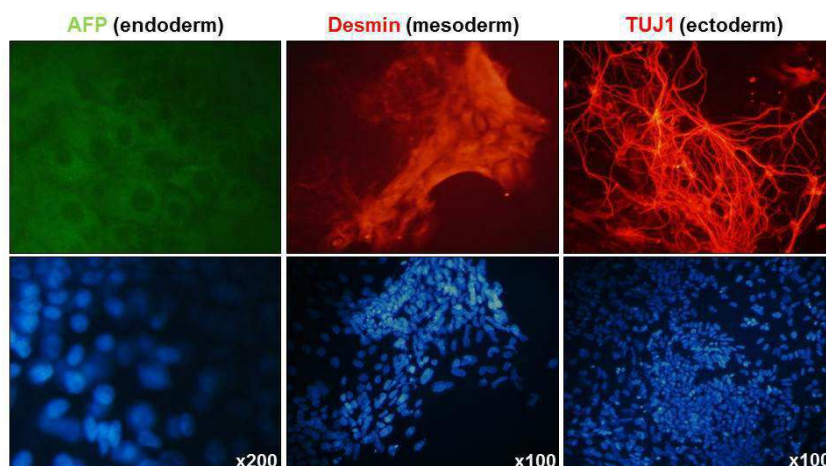
도면12

EB formation : Feeder-Independent, Conditioned medium

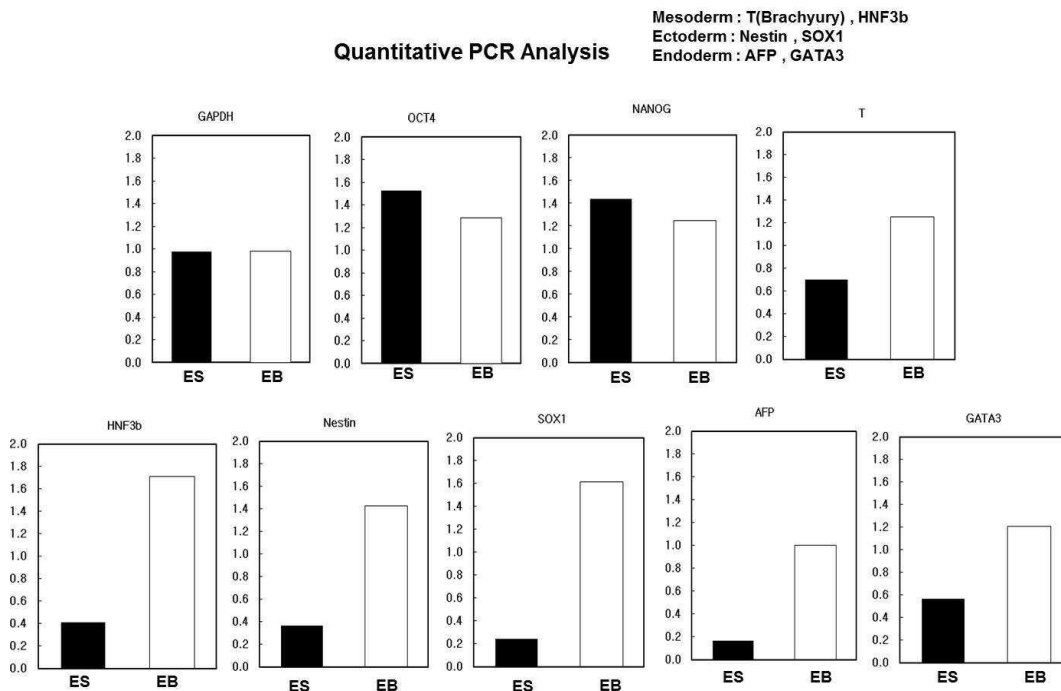
(Cell line: iPSC, Medium: PC-CM -bFGF, Matrix: gelatin coated)



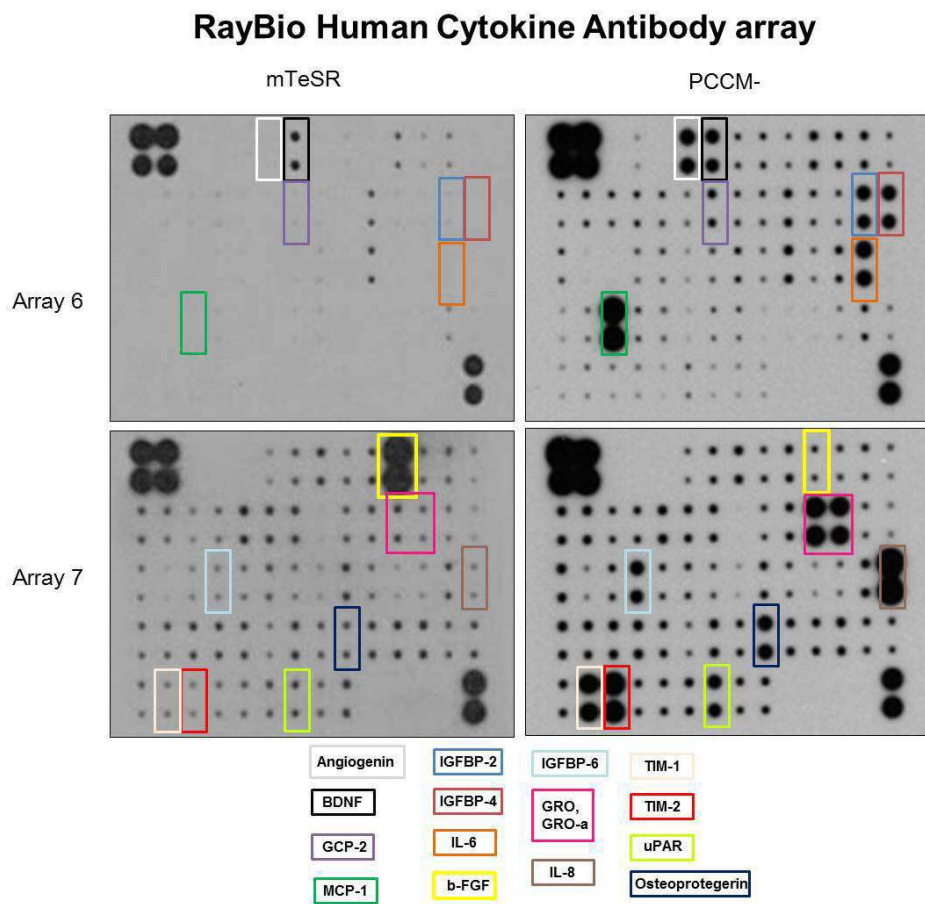
* Analysis of pluripotency *in vitro* (AFP, Desmin, TUJ1)



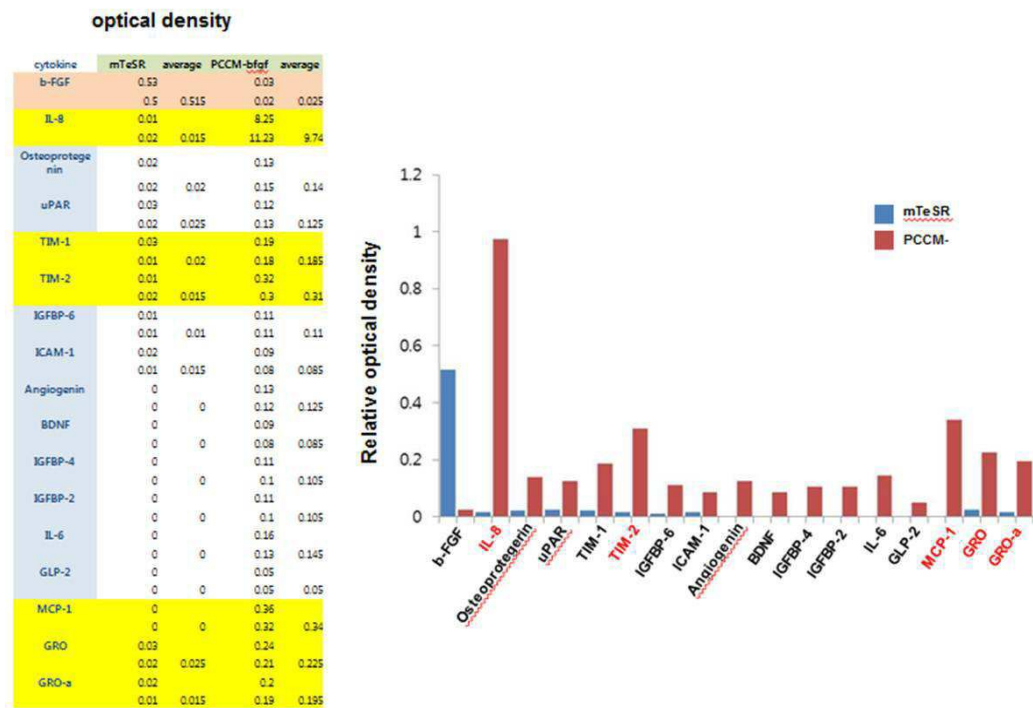
도면13



도면14



도면15



The expression of cytokines determined using an antibody array. Densitometry was used to quantify the relative intensity of signal spots of 5 fold change. The mean data were obtained from two dots in one of duplicate experiments.

도면16

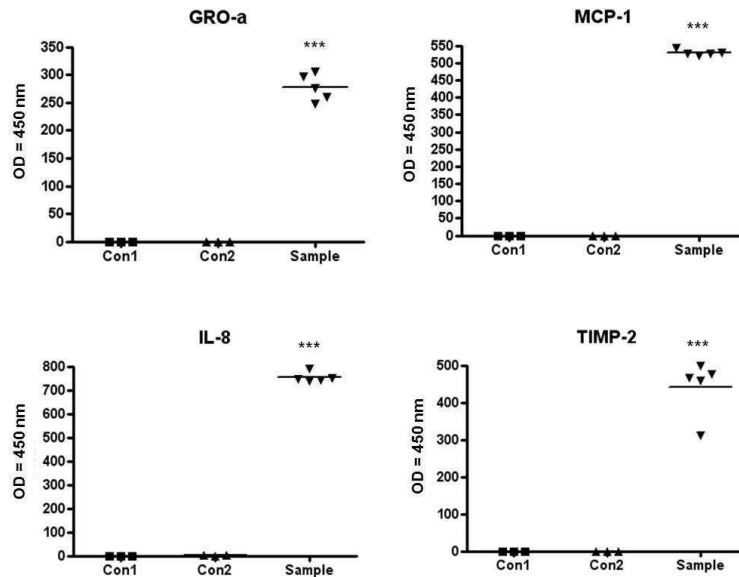
Protein Name	Entrez GeneID	Official gene name provided by HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)
CCL2/MCP-1	6347	chemokine (C-C motif) ligand 2
CXCL1/GRO-α	2919	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL8/IL-8	3576	interleukin 8
TIMP-2	7077	TIMP metalloproteinase inhibitor 2

도면17

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

: GRO- α , MCP-1, IL-8, TIMP-2

→ Control 1 : basal medium, Control 2 : mTeSR, sample : PCCM(-bFGF) (n=5)



The mean data were obtained from 5 individual samples of triplicate experiments (n=5). concentration(pg/ml) ***p<0.0001

서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Placenta-derived cells conditioned media and animal-free, feeder-free culture method for maintaining undifferentiated stem cells using the same
- <130> P11-120201-01
- <150> 10-2011-0035470
- <151> 2011-04-18
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PCR PRIMER
- <400> 1
- cgaccatctg ccgctttgag

20

- <210> 2

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	2	
ccccctgtcc cccattccta		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	3	
aaagaatctt cacctatgcc		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	4	
gaaggaagag gagagacagt		20
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	5	
cagatcctaa acagctcgca gaat		24
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	6	
gcgtacgcaa attaaagtcc aga		23