명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포로부터 유도만능 줄기세포를 제조하는 방법 및 그 방법에 의해 제조된 유도만능 줄기세포

기술분야

[0001] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 만능줄기세포 유도 배지 조성물 및 이를 이용하여 유도만능 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포는 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 미분화 상태에서 일정기간 동안 자신과 동일한 세포를 지속적으로 만들어 낼 수 있는 성질과 적당한 조건하에서는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화될 수 있는 성질을 가지고 있다.

[0003] 줄기세포는 분화능과 생성시기에 따라 크게 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 성체 줄기세포(adult stem cell)로 구분될 수 있다. 또 다른 분류는 줄기세포의 분화능에 따른 것으로, 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다.

[0004] 성체줄기세포는 다분화능 또는 단분화능 줄기세포로 구분할 수 있다. 대표적인 성체줄기세포에는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)와 조혈모세포(hematopoietic stem cells; HSCs)가 있다. 중간엽 줄기세포는 연골세포(chondrocyte), 골아세포(osteoblast), 지방세포(adipocyte), 근육세포(myocyte), 신경세포(neuron)로 분화하며 조혈모세포에는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 주로 혈액내의 혈구세포로 분화하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 반면에 만능 줄기세포는 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer) 모두로 분화될 수 있어 인체의 모든 세포나 장기 조직으로 분화할 수 있는 다기능성을 지닌 줄기세포를 지칭하며, 일반적으로 배아줄기세포가 이에 해당된다. 인간 배아 줄기세포는 인간 생명체로 발생할 수 있는 배아로부터 만들어지기 때문에 많은 윤리적인 문제점을 가지고 있으나, 성체 줄기세포에 비하여 세포증식 및 분화 능력이 우수한 것으로 알려져 있다. 성체 줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 피부 등에서 얻을 수 있어 윤리적인 문제가 적으나, 배아 줄기세포에 비하여 한정된 분화능력을 가지고 있다.

[0006] 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로, 성체에서 유래한 세포를 역분화시켜 배아줄기세포와 유사한 맞춤형 만능 줄기세포를 제조하기 위한 여러 가지 방법들이 시도되어 왔다. 대표적인 방법으로 세포 융합법(fusion with ES cell), 체세포 핵치환법(somatic cell nuclear transfer), 특정 인자 주입법(reprogramming by gene factor) 등이 있다. 세포융합법은 유도된 세포가 2쌍의 유전자를 더 가지고 있어 세포의 안정성 측면에서 문제점이 있고 체세포 핵치환법은 난자가 대량으로 필요하며 효율 또한 매우 낮다는 점에서 문제가 있다. 그리고 특정

인자 주입법은 특정 유전자를 삽입하여 역분화를 유도하기 위하여 발암유전자를 포함하는 바이러스를 이용하는 방법으로 암발생의 위험이 높으며, 낮은 효율과 방법적인 측면에서의 난이도로 인해 세포 치료제 개발 가능성 면에서 문제시 되고 있다.

[0007] 만능 줄기세포를 성공적으로, 그리고 다량으로 얻기 위해서는 분리된 제대 유래 단핵세포를 배양하는 단계에서의 배양 조성물이 매우 중요한 바, 보다 많은 양, 고효율의 유도방법으로 만능 줄기세포를 제조하기 위한 연구가 필요한 상태이다.

[0008]

[0009] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 요약

기술적 과제

[0010] 본 발명자들은 안전성와 생산효율이 높은 세포 치료제 개발의 실용화를 위한 만능 줄기세포를 고효율로 유도하는 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 안전한 천연 추출물인 감태 추출물을 세포 배양 배지에 첨가할 경우 중간엽 줄기세포를 이용하여 안전하고도 높은 효율로 유도만능 줄기세포를 제조할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011]

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 감태 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포를 유도만능 줄기세포로 역분화시키기 위한 배지 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 감태 추출물이 포함된 배지에서 중간엽 줄기세포를 유도만능 줄기세포로 역분화시키는 단계를 포함하는 유도만능 줄기세포의 제조 방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조 방법으로 제조된 유도만능 줄기세포를 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유도만능 줄기세포를 포함하는 세포 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0016]

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

과제 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 감태(*Ecklonia cava*) 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유도만능 줄기세포(induced pluripotency stem cell)로 역분화하기 위한 배지 조성물을 제공한다.

[0019]

[0020]

[0021] 본 발명자들은 배아를 파괴하는 윤리적 문제를 없이 안전성와 생산효율이 높은 세포치료제 개발의 실용화를 위한 만능 줄기세포를 고효율로 유도하는 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 안전한 천연 추출물인 감태 추출물을 세포 배양 배지에 첨가할 경우 놀랍게도 높은 효율로 유도만능 줄기세포를 제조할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0022] 본 발명의 배지 조성물에 포함되는 유효성분인 감태(甘苔, *Ecklonia cava*)는 주로 남해안, 제주도 해안 일대 및 울릉도 해안 일대에서 서식하는 갈조식물 다시마목 다시마과의 여러해살이 해조류로서, 주로 전복과 소라 등의 먹이가 되며, 알긴산이나 요오드·칼륨을 만드는 주요 원료나, 식용으로 이용하기도 한다.

[0023] 본 발명이 포함하는 감태 추출물은 물, (a) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (b) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (c) 아세톤, (d) 에틸 아세테이트, (e) 클로로포름, (f) 1,3-부틸렌글리콜, (g) 헥산, (h) 디에틸에테르 등의 유기용매를 이용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올과 물과의 혼합용매를 이용하여 추출할 수 있다. 혼합용매를 이용하여 추출할 경우 메탄올 또는 에탄올의 함량은 50-80 v/v%가 바람직하다.

[0024] 현재 상기 감태 추출물을 화장료 등의 피부 조성물에 적용하기 위한 사례가 증가되고 있으나(대한민국 공개특허 제2013-0017159호, 제2012-0040488호, 제2010-0097293호 등 참조), 만능 줄기세포 유도용 배지로 개발된 사례는 전무하다.

[0025] 본 발명에서 사용된 용어 "배아줄기세포"는 수정 후 발생 초기인 배반포기(blastocyst)의 내부세포덩어리(inner cell mass)에서 분리하여 배양한 세포로 만능성(pluripotency)을 지니는 세포를 지칭한다. 본 발명에서 사용된 용어 "만능줄기세포"는 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer), 즉 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm), 외배엽(ectoderm) 모두로 분화할 수 있는 만능성을 지닌 줄기세포를 지칭한다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다.

[0027] 본 발명에서 사용된 용어 "세포 치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포 치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포 치료제,

줄기세포 치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포 치료제에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 중간엽 줄기세포는 포유동물 유래의 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포에서 분리한 세포로서, 바람직하게는 제대 유래 중간엽 줄기세포이며, 보다 바람직하게는 인체 제대유래 중간엽 줄기세포이다. 상기 줄기세포는 인체에서 태반과 태아를 연결하는 제대에서 채취하여 얻을 수 있다. 제대로부터 중간엽 줄기세포의 채취는 다양한 방법을 이용하여 이를 수행할 수 있으며, 예를 들어, 인체에서 제대를 채취하여 DPBS 로 혈액이 나오지 않을 때까지 씻어주고, 씻은 제대를 수술용 칼날로 다지고 37℃에서 인큐베이션(incubation) 시켜서 단핵세포가 함유된 용액을 얻을 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용된 용어 "배지"는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외 (*in vitro*)에서 줄기세포 등의 세포의 배양 또는 분화를 위한 혼합물을 말한다.

[0030] 당업계에는 다양한 배지가 시판되고 있으며, 인위적으로 제조하여 사용할 수도 있다. 시판 중인 배지로는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM F-12, α-MEM(α-Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMPM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), AmnioMax, AminoMaxII complete Medium(Gibco, Newyork, USA), Chang's Medium MesemCult-XF Medium(STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) 등이 있으며, 인위적으로 제조할 수 있는 배지와 더불어 본 발명의 배지 조성물에 포함되는 기본 배지로 사용할 수 있다.

[0031] 상기 기본 배지에는 통상적으로 첨가되는 혈청 성분(예를 들어, FBS(Fetal Bovine Serum)) 및 항생제(예를 들어, 페니실린, 스트렙토마이신) 등을 첨가할 수 있다. 상기 기본 배지에 첨가되는 혈청 성분 또는 항생제 성분의 농도는 본 발명의 효과를 달성할 수 있는 범위 내에서 변할 수 있으며, 바람직하게는 10% FBS, 100 unit/㎖ 페니실린, 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 등을 첨가할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 배지는 영양혼합물(Nutrient Mixture)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 영양 혼합물은 세포배양에 일반적으로 사용되는 각종 아미노산, 비타민, 무기염 등을 포함하는 혼합물로서, 상기 아미노산, 비타민, 무기염 등을 혼합하여 제조하거나 상업적으로 제조된 영양 혼합물을 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 영양혼합물은 M199, MCDB110, MCDB202, MCDB302 등을 예로 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명의 배지는 만능 줄기 세포의 유도와 안정화를 위해 에너지워터를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 에너지워터는 0.01 내지 10 v/v%로 추가하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 0.05 내지 0.5 v/v%로 추가한다.

[0034] 본 발명의 배지 조성물은 만능 줄기세포 유도에 특이적인 배지로서, 상기 기본 배지에 감태 추출물을 첨가함으로써 달성될 수 있으며, 바람직하게는 전체 배지

조성물 기준 1 내지 1,000 ㎍/㎖ 농도로, 보다 바람직하게는 100 내지 400 ㎍/㎖ 농도로 감태 추출물을 포함할 수 있다.

[0035]

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 감태 추출물을 세포 배양 배지에 첨가하는 단계; 및 상기 배지에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유도만능 줄기세포(induced pluripotency stem cell)로 역분화시키는 단계를 포함하는 유도만능 줄기세포의 제조 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 감태 추출물이 포함된 배지 조성물을 이용한 경우 DMEM F-12 배지만을 이용한 경우와 달리 8-10일째 되는 날 만능 줄기세포 콜로니들이 형성되었음을 확인할 수 있었다(도 2 내지 도 5).

[0038]

[0039] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 제조 방법으로 제조된 유도만능 줄기세포를 제공한다.

[0040] 본 발명의 유도만능 줄기세포는 배아 줄기세포와 동일한 분화능을 가지며, 세포의 모양에 있어서도 배아 줄기세포와 거의 동일하다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 배아줄기세포에 특징적인 유전자(Nanog, Oct4, Sox-2, Klf) 및 단백질(SSEA4)의 발현여부를 조사한 결과 본 발명에 의해 유도된 만능 줄기세포에서 배아줄기세포와 동일하게 상기 유전자 및 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 4).

[0041]

[0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 유도만능 줄기세포를 포함하는 세포 치료용 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 유도만능 줄기세포는 배아 줄기세포와 동일한 만능분화능(pluripotency)을 가지며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화할 수 있는 만능성을 가짐을 확인할 수 있었다(도 5).

[0044] 따라서, 본 발명의 유도만능 줄기세포는 효과적인 세포 치료제로 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 임의의 투여경로에 의해서, 구체적으로는 복강 또는 흉강 투여, 피하 투여, 정맥 또는 동맥 혈관내 투여, 근육내 투여, 주사에 의한 국소 투여 등의 방법에 의해서 투여 가능하다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 통상의 방법에 기초하여 주사제, 현탁제, 유화제 등의 형태로 투여할 수 있고, 필요에 따라서 프로인트 완전 보조제 등의 보조제에 현탁되거나, 또는 BCG와 같은 보조제 활성을 갖는 물질과 함께 투여하는 것도 가능하다. 상기 조성물은 멸균되거나 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 의한 세포 치료용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체나 첨가제를 함유할 수 있는데, 유효성분 이외에 희석제(예를 들어,

덱스트로즈, 솔비톨, 셀룰로즈, 글리신, 락토즈, 스쿠로즈, 만니톨), 결합제(예를 들어, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 트라가칸스, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈), 붕해제(예를 들어, 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 감미제, 향미제 및 착색제를 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명의 세포 치료용 조성물은 관절염, 신경계질환, 내분비질환, 간질환 등에 적용이 가능하며, 추후 사람에 대한 임상시험 결과에 따라서는 사람에 대한 동종세포 치료제로의 가능성도 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049] (i) 본 발명은 감태 추출물을 포함하는 유도만능 줄기세포 역분화용 배지 조성물을 제공한다.

[0050] (ii) 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물을 이용한 유도만능 줄기세포 제조 방법을 제공한다.

[0051] 을 제공한다.

[0052] (iii) 본 발명에 따른 배지 조성물을 이용하면 중간엽 줄기세포를 이용하여 유도만능 줄기세포를 효율적으로 제조할 수 있으며, 제조된 만능 줄기세포는 다양한 세포로의 분화가 가능하므로 세포 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 중간엽 줄기세포에서 감태추출물 배지를 주입하여 배양 시 배아 줄기세포와 거의 동일한 만능 줄기세포가 유도되는 것을 보여주는 그림이다.

[0054] 도 2는 본 발명의 방법으로 유도된 만능 줄기세포를 특이적 단백질 발현을 이용하여 만능 줄기세포임을 확인한 것이다.

[0055] 도 3은 본 발명의 방법으로 감태 추출물의 농도에 따라 유도된 만능 줄기세포 콜로니 형성을 나타낸 것이다.

[0056] 도 4는 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 유전자 발현을 나타낸 것이다.

[0057] 도 5는 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포 생체내 분화능을 시험한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 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.

[0059]

[0060] 실시예

[0061] <u>실시예 1: 감태 추출물의 제조</u>

[0062] 실험에 사용된 생약 시료들은 제주도에서 구입하여 전문가의 정확한 감정을 거친 후 실험에 사용하였다. 건조된 생약 시료 100 g을 70% 메탄올 1 ℓ에 넣고 16시간 동안 환류 추출하고 여과지를 사용하여 여과하였다. 여액을 회전감압증발기에서 농축시키고 즉시 동결 건조하였다.

[0063]

[0064] **실시예 2: 인체 제대에서 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양**

[0065] **실시예 2-1: 인체 제대 채취**

[0066]

[0067] 제대 조직은 출산 직후 바로 수집된다. 시료가 실험실로 옮겨지기 전에 우선 깨끗이 헹군 다음 즉시 이송용 배지(50 IU/㎖의 페니실린, 50 ㎍/㎖의 스트렙토마이신(Invitrogen으로부터 구매))이 첨가된 F-12 배지가 들어있는 500 ㎖의 멸균 유리병로 옮겨진다. 실험실에서는 멸균 상태 하에서 class 100의 플로우 후드에서 줄기세포의 추출이 수행된다. 시료는 우선 멸균 스테인레스 스틸의 용기로 옮겨진다. PBS는 수회 세정한 후 제대 조직 시료는 이후 2 ㎝ 길이로 잘라져 10 ㎝ 지름의 세포 배양 접시로 옮겨지며, 여기서 추가적인 세정 및 70% 에탄올로 항감염처리하고, 항생제 혼합물(50 IU/㎖의 페니실린, 50 ㎍/㎖의 스트렙토마이신 (Invitrogen으로부터 구매))이 첨가된 PBS로 상기 용액이 깨끗해 질 때까지 수차례 세정한다.

[0068]

[0069] **실시예 2-2: 인체 제대에서 줄기세포 분리 및 배양**

[0070] 제대의 혈관 및 기타 내부요소들로부터 와튼젤리(제대의 기질)을 분리하기 위해 제대조직의 절개가 우선 이루어진다. 혈관을 제거한 후 분리된 와튼젤리는 세포의 추출을 위해 작은 조각(0.5 ㎝ x 0.5 ㎝)의 크기로 잘라진다.
외식(explant)은 상피 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포의 추출에 적합한 세포배양 조건이 갖추어져 있는 각기 다른 조직배양 접시에 제대 와튼젤리의 조각을 넣어 수행된다.

[0071] 중간엽 세포의 분리/배양을 위해 상기의 외식된 조직은 10% 우태혈청(FBS, Hyclone)이 첨가된 5ml의 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) F-12(Gibco), 10% FBS, 100 unit/㎖ 페니실린, 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신에 담가져 이산화탄소 세포배양기에서 37℃로 유지되었다. 배지는 매 3일 또는 4일마다 교체되었다. 세포의 성장(outgrowth)은 광학현미경으로 모니터링 되었다. 신장하는 세포들은 추가적인 확장 및 냉동보관(DMEM/10% FBS 이용)을 위해 트립신처리(0.125% 트립신/0.05% EDTA)하였다.

[0072] 상기 배지는 매 3일 또는 4일마다 교체되었다. 외식된 조직으로부터의 세포의 신장(outgrowth)은 광학현미경으로 모니터링 되었다.

[0073] 중간엽 줄기세포의 추출을 위해, 세포의 펠렛은 배지 DMEM F-12(Gibco), 10% FBS, 100 unit/㎖ 페니실린, 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신에 재 현탁 및 카운트 되었으며, 10 ㎝ 조직배양 접시에 1 x 10^6 세포/접시의 밀도로 접종되었다. 상기

배지는 매 3일 또는 4일마다 교환되었다. 세포의 성장(growth) 및 클론형성은 광학현미경으로 모니터링 되었다. 약 90%의 세포수(confluence)에서, 세포들은 상기에 설명된 바와 같이 서브-배양(sub-culture)되었다.

[0074]

[0075] **실험예 1: 중간엽 줄기세포로부터 만능 줄기세포 유도**

[0076] **실험예 1-1: 감태 추출물 농도에 따른 인간유래 중간엽 줄기세포의 만능 줄기세포 제조**

[0077] 제주 감태 추출물의 농도에 따라 인간 제대 유래 줄기세포로부터 만능 줄기세포를 유도하기 위한 실험으로 대조군은 MSC의 전용 배지로 DMEM F-12(Gibco), 10% FBS, 100 unit/㎖ 페니실린, 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신을 기본배지로 사용하였으며, 실험군은 계대배양을 세 번째 한 인간 제대 유래 중간엽 줄기세포를 사용하여 배지에 제주 감태 추출물을 1 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 400 ㎍/㎖, 800 ㎍/㎖, 1000 ㎍/㎖의 농도와 에너지 워터(SiO_2, Al_2O_3, TiO_3, Fe_2O_3, CaO, Na_2O, K_2O, LiO를 함유하는 정제 탈이온수, 에스티씨나라) 0.1 v/v%를 첨가하였다(도 1). 인간 제대 유래 중간엽 줄기세포들을 분리하여 세척된 단핵구 세포를 6-웰 플레이트(dish)에 1 x 10^4 개의 세포를 접종하여 37℃와 5% CO_2를 유지하여 배양하였다.

[0078] 본 발명의 방법에 의해 유도된 만능 줄기세포에 대하여 배아 줄기세포의 특이 단백질인 OCT4, SOX2, SSEA4(stage-specific embryonic antigen4)의 발현 여부를 이에 대한 항체를 사용하여 면역화학적 염색법을 사용하여 단백질 발현 여부를 분석하였다. 염색 과정은 우선 4% 파라포르말데하이드(Paraformaldehyde)를 이용하여 세포를 고정한 후 PBS로 세정하고 1% BSA용액으로 블로킹(blocking)을 하였다. OCT4, SOX3, SSEA4에 대한 1차 항체를 처리하여 4℃에서 18시간 동안 반응 시킨 후, PBS로 세정을 하고 1차 항체에 대한 형광(FITC)이 붙은 2차 항체를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세정을 한 후 공초점현미경(confocal microscope)을 사용하여 발현 여부를 분석하여 그 결과를 도 2에 나타내었다. BF는 bright field를 의미하며, 두 번째 그림은 각 단백질 발현에 대한 염색 결과를 의미하고 세 번째 그림은 이 두 그림을 합쳐서 나타내고 있다(도 2).

[0079] 그 결과, 실험군에서는 제주감태 추출물의 농도가 100-400 ㎍/㎖일 때만 10일 후 콜로니가 형성하는 것이 관찰 되었으며(도 3) 만능 줄기세포 특이적 마커인 OCT4, SOX2, SSEA4가 콜로니에서만 염색되어 만능줄기세포임을 확인 하였다.

[0080]

[0081] **실험예 1-2: 만능 줄기세포 유전자 분석 비교**

[0082] 상기 실시예 2-1에서 제조된 만능 줄기세포를 현미경으로 보면서 200 ㎕ 파이펫을 사용하여 콜로니만 떼어낸 후, TRIzol 시약(Invitrogen사 제조)을 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 OCT4, Sox-2, Nanog, c-Myc 및 대조유전자인

GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. Nanog, OCT4, Sox-2는 배아줄기세포에서 보이는 특징적 유전자이며, c-Myc 유전자는 배아줄기세포 및 성체세포 모두에서 양성으로 보일 수 있는 비 특이적인 유전자이다. PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여, 이들 유전자의 발현을 확인한 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 따르면, 유도 과정을 거치치 않은 중간엽 줄기세포에서는 만능 줄기세포의 특징적인 유전자인 OCT4의 발현도가 낮은 반면에 본 발명의 방법에 의해 유도된 만능 줄기세포(STC2013-F002)에서는 이들 특징적인 유전자들이 현저히 높게 발현되었다. 줄기세포 유전자인 SOX2와 Nanog는 비슷한 수준으로 발현 되었고 비 특이적인 유전자인 c-Myc은 유도과정을 거친 세포(STC2013-F002)가 유도과정을 거치지 않은 세포보다 낮게 발현됨을 알 수 있었다.

[0083]

[0084] **실험예 2 테라토마 시험에 의한 만능 줄기세포 확인**

[0085] 본 발명의 방법으로 유도된 만능 줄기세포의 생체 내 분화능을 분석하기 위해 지지세포 위에서 배양한 미분화 만능 줄기세포 콜로니를 배양 5일째 트립신-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 교원질 분해효소(collagenase)에 넣어 인큐베이터에서 30분간 두었다. 미분화 만능 줄기세포를 회수하여 1 x 10^6 세포를 중증복합면역결핍증(severe combined immune deficiency, SCID) 마우스에 피하주사(subcutaneous injection)하였다. 4주 후 형성된 기형종을 수확하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후 통상적인 파라핀 포매(embedding)를 실시하였다. 10 ㎛ 두께로 조직을 잘라 헤마톡실린(Hematoxylin) 및 에오신(Eosin) 염색을 하였다.

[0086] 도 5에 따르면, 본 발명의 방법으로 제조된 유도 만능 줄기세포를 주입한 곳에서 육안적으로 기형종(teratoma)이 형성됨을 알 수 있으며, 보다 상세하게는 조직학적으로 외배엽 유래인 신경조직(도 5a), 중배엽 유래인 근육조직(도 5b), 그리고 내배엽 유래인 위장조직(원주상피 도 5c) 등으로 분화할 수 있는 기형종이 형성됨을 보여주었다. 상기 실험을 통해, 본 발명의 방법으로 유도된 세포가 실제로 생체 내에서 배아 줄기세포와 동일한 분화능, 즉 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화할 수 있는 만능성(pluripotency)을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0087]

[0088] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 감태(*Ecklonia cava*) 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유도만능 줄기세포(induced pluripotency stem cell)로 역분화하기 위한 배지 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 감태 추출물은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α-MEM(α-Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium 및 Chang's Medium MesemCult-XF Medium으로 구성된 군으로부터 선택되는 배지에 포함되는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 감태 추출물은 배지 조성물 기준 100-400 ㎍/㎖ 포함된 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 배지 조성물은 에너지워터 0.01 내지 10 v/v%를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

[청구항 5] 감태(*Ecklonia cava*) 추출물을 세포 배양 배지에 첨가하는 단계; 및 상기 배지에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유도만능 줄기세포(induced pluripotency stem cell)로 역분화시키는 단계를 포함하는 유도만능 줄기세포의 제조 방법.

[청구항 6] 제 5 항의 제조 방법으로 제조된 유도만능 줄기세포.

[청구항 7] 제 6 항의 유도만능 줄기세포를 포함하는 세포 치료용 조성물.