명세서

발명의 명칭: 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 및 이의 제조 방법

기술분야

[1] 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제조하는 방법, 상기 방법으로 생산된 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액, 및 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 줄기세포는 다분화성을 가지고 있어 특정 세포로 분화될 수 있으며, 배아줄기세포, 성체줄기세포 및 역분화 줄기세포로 나눌 수 있다. 현재까지 성체줄기세포 연구는 대부분 골수 (bone marrow)에서 이루어져 있고 일부에서는 지방조직 (adipose tissue) 혹은 제대혈 (cord blood)에서 줄기세포를 분리 및 배양하는 방식으로 이루어지고 있다. 그러나 골수 및 지방조직 세포는 침습적인 방법으로 채취되며 장년기나 노년기 환자에서 분리한 줄기세포의 경우 분화능 및 증식력이 감소한다. 또한, 제대혈의 경우 채취가 용이하나 제대혈 내 줄기세포의 함량은 낮다. 탯줄 (umbilical cord: UC) 및 태반 (placenta)은 골수 또는 지방 유래세포와는 다르게 이미 신체에서 분리된 조직에서 추출하므로 비침습적이다. 또한, 배아 유래 줄기세포와는 다르게 윤리적 측면에서도 자유롭다. 따라서, 최근 난치성 또는 재생의학의 유용한 재료로 각광받고 있으며, 원시세포로서 증식능과 분화능을 동시에 만족시킬 수 있어 조직 재생 뿐 아니라 조직 특성에 맞게 분화 후 사용될 수 있다는 장점을 가진다.

[3] 한편, 세포 치료제는 체내 이식 후 생존율이 높지 않고, 면역 거부반응을 일으킬 수 있어 실제 임상 적용에서 광범위하고 안정적으로 성공한 예를 찾기 어렵다. 이에 세포 치료제에 대한 대안으로, 세포의 조건 배양액 (conditioned media)이 주목을 받고 있다. 세포의 조건 배양액 (또는 세포 배양액이라고 함)은 세포를 배양한 후 수득한 세포를 포함하지 않는 배지로서, 세포 성장에 필수적인 여러 가지 성분들, 예를 들면 사이토카인, 성장인자 등이 포함되어 있다. 세포 배양액은 세포의 성장을 촉진시키거나, 특정 성분을 분리해내기 위해 사용되고 있으며, 이 밖에도 배양액 자체로 여러가지 질환의 치료에 응용되고 있다.

[4] 본 발명자들은 유용한 단백질의 함량을 높이기 위하여 최적의 배양 조건을 확립하였으며, 이를 통하여 이전의 세포 배양액을 제조하는 환경으로는 발현이 되지 않았거나 매우 적은 양으로만 발현되는 것으로 알려진 다양한 단백질을 함유하는 세포 배양액을 개발하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 일 양상은 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제조하는 방법을 제공한다.

[6] 다른 양상은 상기 방법으로 생산된 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제공한다.

[7] 다른 양상은 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[8] 일 양상은 줄기세포를 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 분화 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계; 상기 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물을 생성시키는 단계; 및 상기 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물로부터 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 회수하는 단계;를 포함하는 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제조하는 방법을 제공한다.

[9] 용어 "줄기세포"는 분화능 (potency) 및 자기재생 (self-renewal)능을 갖는 세포를 의미한다. 줄기세포는 분화 능력에 따라 전분화능 (pluripotency), 다분화능 (multipotency) 또는 단일분화능 (unipotency)로 나누어진다. 상기 줄기세포는 배아줄기세포 (embryonic stem cell: ESC)(착상 전 배아의 내세포), 성체줄기세포 (adult stem cell) (각 조직 및 장기에 존재하는 미분화된 세포) 및 역분화 줄기세포 (induced pluripotent stem cell: iPSC)(체세포에 유전자 및/또는 단백질을 삽입하여 역분화가 유도된 세포, 또는 유도만능 줄기세포)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.

[10] 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것일 수 있다. 용어 "중간엽 줄기세포 (Mesenchymal sterm cell: MSC)"는 성체 줄기세포로서, 다분화능과 자기재생능을 갖고, 증식능이 우수하고 유전적으로 안정화되어 있다. 상기 중간엽 줄기세포는 지방, 연골, 뼈, 골수간질, 근육, 신경 등을 만드는데 원조가 되는 세포이며, 다양한 세포 예를 들면, 지방세포, 연골세포, 피부세포 및 골세포 등으로 분화할 수 있다.

[11] 상기 줄기세포는 분화능과 자기재생능을 갖는 것이라면, 그 종류 및 유래가 제한되지 아니한다. 상기 줄기세포는, 예를 들면, 포유동물, 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스 또는 토끼 등으로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 줄기세포는 분리된 탯줄, 태반, 지방, 골수, 제대혈 또는 양수로부터 유래한 것일 수 있다. 용어 "분리된"은 자연적으로 발생하는 세포 또는 조직의 환경과는 다른 환경에 존재하는 것을 의미한다.

[12] 용어 "탯줄 (umbilical cord)"은 포유류의 태아가 태반에서 성장할 수 있도록 모체와 배를 연결해주는 줄을 의미하며, 일반적으로 와튼 젤리로 둘러싸인 3개의 혈관, 즉, 2개의 배꼽 동맥과 1개의 배꼽 정맥으로 구성된 조직인 것일 수 있다. 용어 "태반 (placenta)"은 포유류의 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 기관을 의미하며, 태반의 한쪽은 모체와 닿아 있고 다른 한쪽은 태아와 맞닿아

있으며 그 사이 공간에 모체의 혈액이 담겨 있어 태아에게 영양분을 공급하는 것일 수 있다. 태반은 양막, 융모막, 탈락막의 3층으로 구성되어 있다. 양막은 태아를 둘러싸고 있는 얇고 투명한 막으로, 양수가 들어 있으며, 양수 및/또는 양막에는 태아의 줄기세포가 존재한다. 탈락막은 수정란이 자궁에 착상되기 위해 자궁의 상피세포가 변형되어 형성된 막으로써 모체의 줄기세포가 존재한다. 융모막은 태아나 양수를 둘러싸고 있는 양막과 탈락막 사이에 있는 막으로, 수정란에서 발생하여 난막의 일부를 구성한다. 태반 유래 줄기세포는 태아 또는 모체에서 유래한 것일 수 있다. 양수 유래 줄기세포는 태아에서 유래한 것일 수 있다. 탯줄 또는 태반로부터 유래된 줄기세포는 그 양이 아주 풍부하며 증식이 잘되고 다른 세포로 분화도 가능하다. 용어 "골수 (bone marrow)"는 적혈구, 백혈구 및 혈소판 등을 포함하는 혈액 세포를 만드는 조직을 의미한다. 용어 "제대혈 (cord blood)"은 분만 후 신생아의 탯줄에서 나온 혈액을 의미한다. 용어 "지방"은 체지방을 의미하며, 지방으로부터 유래된 줄기세포는 수득이 용이하고, 지방 세포의 1% 정도가 줄기세포로 추정되므로 수득률이 높다.

[13] 상기 방법은 분리된 탯줄, 태반, 지방, 골수, 제대혈 또는 양수를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 분리된 탯줄, 태반, 지방, 골수, 제대혈 또는 양수는 통상의 해부학적 방법에 의하여 수득될 수 있다. 상기 탯줄, 태반, 양수 또는 제대혈은 산모의 모체로부터 출산 후 분리된 탯줄, 태반, 양수 또는 제대혈인 것일 수 있다. 상기 분리된 탯줄, 태반, 양수 또는 제대혈은 분리된 후 신속하게 멸균된 용기 및 얼음에 담아 보관될 수 있다.

[14] 태반의 경우 예를 들면, 태반 내에 존재하는 태반 조직들을 멸균된 가위로 여러 부위로 잘라냄으로써 얻을 수 있다. 상기 태반 조직은 양막, 융모막 또는 탈락막인 것일 수 있다. 탯줄의 경우 예를 들면, 탯줄을 태반으로부터 분리함으로써 얻을 수 있다. 상기 탯줄에서 동맥과 정맥을 추가적으로 제거할 수 있다. 지방의 경우 예를 들면, 복부 또는 허벅지의 피하지방층에서 지방흡인 (liposuction)을 수행함으로써 얻을 수 있다. 얻어진 태반 조직, 탯줄 또는 지방은 항생제, 예를 들면, 페니실린, 스트렙토마이신, 겐타마이신, 또는 이들의 조합이 포함된 인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline: PBS)로, 1회, 2회 또는 3회 이상 세척함으로써, 조직에 존재하는 혈액 등의 오염 물질들을 제거할 수 있다.

[15] 상기 방법은 분리된 탯줄, 태반 또는 지방을 직접 효소와 반응시키거나, 또는 멸균된 가위 등을 사용하여 더 잘게 세절한 후 효소와 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 분리된 탯줄, 태반 또는 지방을 멸균된 가위 등을 사용하여 더 잘게 (예를 들면, 약 20mm 이하, 또는 약 10 mm 이하) 세절한 후, 세절된 세포를 효소와 반응시키는 것일 수 있다.

[16] 상기 방법은 줄기세포를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 줄기세포를 수득하는 방법은 통상의 기술자에게 공지된 방법으로 수행될 수 있다. 탯줄 또는 태반의 경우, 예를 들면, 상기 분리된 탯줄 또는 태반을 배양 용기에 부착하여 5

내지 20일, 10 내지 20일, 또는 10 내지 15일 배양하는 단계; 상기 배양된 탯줄 또는 태반에서 세포가 뻗어나오는 것을 확인하는 단계; 및/또는 탯줄 또는 태반과 분리 효소를 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 또는, 탯줄 또는 태반의 경우, 예를 들면, 상기 분리된 탯줄 또는 태반과 분리 효소를 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 분리 효소는 콜라게나아제를 포함하는 것일 수 있다. 상기 콜라게나아제는 콜라겐의 펩티드 결합을 파괴하는 효소를 의미하며, 콜라게나아제 타입 I, 타입 II, 타입 III, 타입 IV 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 상기 분리 효소는 10 U/㎖ 내지 4000 U/㎖, 20 U/㎖ 내지 2000 U/㎖, 50 U/㎖ 내지 800 U/㎖, 100 U/㎖ 내지 400U/㎖, 150 U/㎖ 내지 300U/㎖, 또는 200 U/㎖의 콜라게나아제를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 분리 효소는 트립신 (trypsin), 디스파아제 (Dispase) 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 분리 효소를 포함하는 용액은 콜라게나아제, 트립신, 디스파아제 또는 이들의 조합을 포함하는 물, 염수 (saline), 예를 들면, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)를 포함하는 것일 수 있다. 상기 탯줄 또는 태반과 분리 효소를 반응시키는 단계는 진탕 또는 정치하여 수행될 수 있다. 상기 진탕 또는 정치는 약 20℃ 내지 약 40℃, 약 30℃ 내지 약 40℃, 약 35℃ 내지 약 40℃, 또는 약 37℃에서 수행될 수 있고, 1 내지 20시간, 2 내지 10시간, 4 내지 9시간, 또는 5 내지 6시간 동안 수행될 수 있다. 지방의 경우, 예를 들면, 상기 분리된 지방과 분리 효소를 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 분리 효소는 콜라게나아제, 트립신, 디스파아제 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 상기 분리 효소를 포함하는 용액은 콜라게나아제, 트립신, 디스파아제 또는 이들의 조합을 포함하는 물, 염수, 예를 들면, HBSS를 포함하는 것일 수 있다. 상기 지방과 분리 효소를 반응시키는 단계는 진탕 또는 정치하여 수행될 수 있다.

[17] 추가적으로, 상기 탯줄, 태반 또는 지방과 분리 효소를 반응시킨 후에, 분리 효소를 불활성화하기 위한 과정을 수행할 수 있으며, 예를 들면, 혈청을 첨가하여 효소 반응을 정지시킬 수 있다. 또한, 상기 탯줄, 태반 또는 지방과 분리 효소를 반응시킨 후에, 탯줄, 태반 또는 지방으로부터 줄기세포를 얻는 방법은 통상의 기술자에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들면 원심분리한 후, 세포체 (strainer)를 사용하여 세포를 분리하여 수행될 수 있다.

[18]

[19] 상기 방법은 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계 전에, 상기 줄기세포를 혈청을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 혈청은 우태혈청 (fetal bovine serum: FBS), 우아혈청 (bovine calf serum: BCS) 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 혈청은 분화 배지의 총 부피에 대하여 약 1% 내지 약 50%, 약 2% 내지 약 25%, 약 5% 내지 약 20%, 약 7.5% 내지 약 12.5%, 또는 약 10%인 것일 수 있다. 상기 배지는 섬유아세포 성장 인자-4 (fibroblast growth factor-4: FGF-4) 및/또는 헤파린을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배지 중

FGF-4의 농도는 약 10 ng/㎖ 내지 약 40 ng/㎖, 약 20 ng/㎖ 내지 약 30 ng/㎖, 또는 약 25 ng/㎖인 것일 수 있다. 상기 배지 중 헤파린의 농도는 약 0.5 ㎍/㎖ 내지 약 2 ㎍/㎖, 약 0.5 ㎍/㎖ 내지 약 1.5 ㎍/㎖ 또는 약 1 ㎍/㎖인 것일 수 있다. 상기 배지는 항생제를 포함하는 것일 수 있다. 상기 항생제는 페니실린, 스트렙토마이신, 겐타마이신 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배지 중 항생제의 농도는 약 10㎍/㎖ 내지 약 250㎍/㎖, 약 25㎍/㎖ 내지 약 100㎍/㎖, 약 40㎍/㎖ 내지 약 65㎍/㎖, 또는 약 50㎍/㎖인 것일 수 있다.

[20] 상기 방법은 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계 전에, 상기 줄기세포를 혈청을 포함하는 배지에서 10 내지 350시간 동안 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 배양은 10 내지 350시간, 20 내지 170시간, 또는 50 내지 70시간, 또는 0.5 내지 14일, 1일 내지 7일, 또는 2 내지 3일 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 배양은 분리된 줄기세포를 P0으로 하는 것일 수 있다. 상기 배양의 계대수는 특별히 제한되는 것은 아니며, 원하는 증식 세포의 수에 따라 적절히 계대수를 선택할 수 있다. 상기 배양의 계대수는 1 내지 20계대, 2 내지 10계대, 3 내지 7계대, 또는 4 내지 5계대 수행함으로써 필요한 수의 누적 증식 세포를 얻을 수 있다.

[21] 상기 방법은 상기 줄기세포를 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 분화 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 줄기세포는 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 분화 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화될 수 있다.

[22] 용어 "분화 (differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 의미한다. 특정 세포 유형으로의 분화 정도를 측정 또는 판단하는 것은 당해 분야에 익히 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 상기 분화는, 유세포 분석 또는 면역세포화학과 같은 기법을 사용하여 세포 표면 표지 (예를 들면, 조직-특이적 또는 세포-표지 특이적 항체로 세포를 염색함) 및 세포 형태의 변화를 측정하면서, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하여 세포 형태를 조사함으로써, 또는 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction: PCR) 및 유전자-발현 프로파일과 같은 당해 분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.

[23] 상기 줄기세포는 주변 미세 환경 (stem cell niche)에 따라 세포 분열, 분화 또는 이동하는 등 행동 양상이 달라질 수 있다. 상기 줄기세포는 주변 미세 환경으로부터 오는 자극에 의해 유전자 발현 양상이 달라질 수 있으며, 이에 따라 분화되는 세포가 달라질 수 있다.

[24] 상기 분화 배지는 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 것일 수 있다. 아스코르브산 (ascorbic acid)은 항산화 특성을 가지는 유기 화합물로, 비타민 C의 일종이며, 수용성이고, 분자식은 $C_6H_8O_6$을 갖는다. 상기 아스코르브산은

L-아스코르브산인 것일 수 있다. 상기 아스코르브산은, 아스코르브산 또는 이의 염의 형태인 것일 수 있다. 상기 아스코르브산의 염은 무기산염, 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염인 것일 수 있으며, 예를 들면 염산염, 질산염, 황산염 등의 무기산염, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 금속염, 알칼리 토금속염 등일 수 있고, 예를 들면 L-아스코르브산나트륨, L-아스코르브산마그네슘, L-아스코르브산칼륨, L-아스코르브산칼슘 등의 L-아스코르브산염인 것일 수 있다. 상기 아스코르브산은 줄기세포 유래 피부전구세포의 증식 및 기저막 형성 (basement membrane formation)에 영향을 줄 수 있다. 배지 중에 상기 아스코르브산의 농도는 약 0.03 μM 내지 약 3μM, 약 0.05 내지 약 2 μM, 약 0.1 내지 약 1 μM, 또는 약 0.1 μM 내지 약 0.5 μM인 것일 수 있다.

[25] 상기 히드로코르티손 (hydrocortison)은 부신 피질 호르몬의 일종이며, 분자식 $C_{21}H_{30}O_5$를 갖는다. 상기 히드로코르티손은, 히드로코르티손 또는 이의 염의 형태인 것일 수 있다. 상기 히드로코르티손의 염은 산 부가염인 것일 수 있으며, 예를 들면 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등의 무기산염, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산 등의 무독성 유기산 등인 것일 수 있다. 히드로코르티손은 피부전구세포로의 분화능을 자극하는 인자로서, 작게는 지질 합성 (lipid synthesis)과 세포막 (plasma membrane) 구성에 역할을 하며, 표피층의 윗부분에 위치하는 각질층의 형성을 촉진시킬 수 있다. 배지 중에 상기 히드로코르티손의 농도는 약 0.05㎍/㎖ 내지 약 5㎍/㎖, 약 0.075㎍/㎖ 내지 약 3.5㎍/㎖, 약 0.1㎍/㎖ 내지 약 2.5㎍/㎖, 약 0.2㎍/㎖ 내지 약 1.25㎍/㎖, 약 0.3㎍/㎖ 내지 약 1㎍/㎖, 또는 약 0.4㎍/㎖ 내지 약 0.6㎍/㎖인 것일 수 있다.

[26] 상기 분화 배지는 세포 배양에 이용될 수 있는 것이라면, 특별히 제한되는 것은 아니며, 예를 들면, 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 complete 배지, AminoMaxII complete 배지, EBM-2 Basal 배지, Chang's Medium 및 MesenCult-XF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 분화 배지는 혈청을 포함하는 것일 수 있다. 상기 혈청은 우태혈청 (fetal bovine serum: FBS), 우아혈청 (bovine calf serum: BCS) 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 혈청은 분화 배지의 총 부피에 대하여 약 1% 내지 약 50%, 약 2% 내지 25%, 약 5% 내지 약 20%, 또는 약 7.5% 내지 약 12.5%인 것일 수 있다.

[27] 상기 방법은 상기 줄기세포를 분화 배지에서, 120 내지 600시간, 150 내지 500시간, 180 내지 450시간, 또는 200 내지 300시간, 또는 5 내지 25일, 6 내지

21일, 7 내지 18일, 8 내지 15일, 또는 9 내지 12일 동안 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 것을 포함할 수 있다.

[28] 피부는 표피층, 진피층 및 피하지방층으로 구성된다. 표피층의 가장 아랫부분에는 기저층 (base layer)이 위치하며, 새로운 표피세포 (keratinocyte, 피부조직세포 또는 각질형성세포)는 세포 분열을 통해 이 기저층에서 형성되고, 형성된 표피세포는 표피층 상부의 죽은 세포들을 계속해서 대체한다. 이러한 과정은 피부세포의 재생을 유도한다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 표피층, 예를 들면 기저층을 구성하는 세포인 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 표피세포의 전구세포인 것일 수 있다.

[29] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 이의 분화능 및 자기재생능이 줄기세포에 비하여 제한된 세포인 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 100%의 분화능을 가지는 세포 또는 임의의 %의 분화능을 가지는 줄기세포에서 0%의 분화능을 가지는 세포 또는 임의의 %보다 낮은 %의 분화능을 가지는 세포로 전환된 세포인 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 줄기세포 유래 표피전구세포, 분화된 피부전구세포, 분화된 표피세포, 피부줄기세포 또는 표피줄기세포와 호환적으로 사용될 수 있다.

[30] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 분화 배지에서 배양하기 전의 줄기세포에 비하여 케라틴 5 (keratin 5: Krt5), 케라틴 1 (keratin 1: Krt1) 및 케라틴 14 (keratin 14: Krt14)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현이 증가한 것일 수 있다. 즉 상기 줄기세포가 피부전구세포로 분화하면서 Krt5, Krt1 및 Krt14로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현이 증가할 수 있다. 상기 증가는 유전자의 발현, 즉 mRNA 양 또는 단백질 양이 2배 이상, 4배 이상, 8배 이상, 10배 이상, 또는 20배 이상 증가한 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 분화 정도에 따라 Krt10 및/또는 인볼루크린 (Involucrin: IVL)을 다량으로 발현하는 분화 후기에 도달하지 않은 상태로 분화되는 것일 수 있다. 상기 발현은, 예를 들면 실시간 중합효소 연쇄 반응법 (real-time PCR: RT-PCR), 또는 면역블롯 (Immunoblot: IB)과 같은 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 일정한 크기의 원형의 특이적인 형태를 나타내는 것일 수 있다.

[31] 상기 방법은 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물을 생성시키는 단계를 포함할 수 있다.

[32] 상기 배양은 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 계대 배양 없이 배양하여 수행될 수 있다. 상기 배지는 단백질 생산에 적합한 배지로서, 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포가 배양되는 과정 중에 세포간에 상호작용을 통해서 유용한 단백질을 생산 및 세포 밖으로 분비할 수 있는 배지를 의미한다. 상기 배지는 무혈청 배지인 것일 수 있다. 상기 배지는 콜린 클로리드 (choline chloride), 페놀 레드 (phenol red, 또는 페놀술포프탈레인) 또는 이들의 조합을 포함하지 않는 배지인 것일 수 있다. 상기 배지는 세포 배양에 이용될 수 있는

것이라면, 특별히 제한되는 것은 아니며, 예를 들면, 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 complete 배지, AminoMaxII complete 배지, EBM-2 Basal 배지, Chang's Medium 및 MesenCult-XF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[33] 상기 방법은 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서, 10 내지 350 시간, 15 내지 200시간, 20 내지 170시간, 또는 40 내지 80시간, 또는 0.5 내지 15일, 1 내지 8일, 1.5 내지 4일, 또는 2 내지 3일 동안 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물을 생성시키는 것을 포함할 수 있다.

[34] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물은 분화된 피부전구세포를 배지에서 배양하는 과정 중 또는 배양한 후 수득된, 배지, 분화된 피부전구세포, 또는 이의 혼합물을 의미하는 것일 수 있다.

[35] 상기 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포는 배지에서 배양되면서 세포간 상호작용을 통하여 세포 밖으로 피부전구세포 유래 단백질을 분비할 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 주변 환경으로부터 오는 자극에 의해 유전자 발현 양상이 달라질 수 있으며, 이에 따라 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 분비되는 단백질의 종류 및 이의 양도 달라질 수 있다. 상기 자극은 줄기세포 유래 피부전구세포가 배양되는 배지 및/또는 배양 시간을 포함하는 것일 수 있다. 즉 배양되는 배지 및/또는 배양 시간에 따라 줄기세포 유래 피부전구세포에서 분비하는 단백질의 종류 및 이의 양이 달라질 수 있고, 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 내에 존재하는 단백질의 조성 및 함량도 달라질 수 있다.

[36] 상기 방법은 상기 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물로부터 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 회수는 분화된 피부전구세포를 배지에서 배양하는 과정 중 또는 배양한 후 수득된, 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물 또는 이의 상층액을 그대로 수득하는 것일 수 있다. 상기 회수는 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 배양하는 과정 중 또는 배양한 후 수득된, 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물 또는 이의 상층액을 원심분리하거나 또는 필터에 여과하여 분화된 피부전구세포 및/또는 거대 분자를 제거한 후에 수득하는 것일 수 있다.

[37] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 줄기세포 유래 피부전구세포가 세포 밖으로 분비하는 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포는 배지에서 배양됨으로써 단백질을 생산하고 분비하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 사이토카인, 성장인자 등의 유용한 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 하기 도 5에 기재된 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은

트롬보스폰딘 (Thrombospondin: TSP), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 2 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2: TIMP2), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 1: TIMP1), 엑토디스플라신-A2 (Ectodysplasin-A2: EDA-A2) X-연관 엑토디스플라신-A 수용체 (X-linked ectodysplasin-A receptor: XEDAR), 안지오포이에틴-1 (Angiopoietin-1), 스팍 (secreted protein acidic and rich in cysteine: SPARC), 상피세포성장인자 유사 및 두 폴리스타틴 유사 도메인 1을 갖는 막관통 단백질/토모레귤린-1 (Transmembrane protein with EGF-like and two Follistatin-like domains 1/ Tomoregulin-1: TMEFF1/Tomoregulin-1), 니도겐-1 (Nidogen-1), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3 (Insulin-like growth factor-binding protein-3: IGFBP-3), 트롬보스폰딘-2 (Thrombospondin-2), 종양 괴사 인자-관련 활성 유도 사이토카인 (TNF-related activation-induced cytokine: TRANCE), 및 인터루킨-15 수용체 알파 (interleukin-15 receptor alpha: IL-15R 알파)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[38] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 트롬보스폰딘 (Thrombospondin: TSP), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 1: TIMP1), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 2 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2: TIMP2), 엑토디스플라신-A2 (Ectodysplasin-A2: EDA-A2) X-연관 엑토디스플라신-A 수용체 (X-linked ectodysplasin-A receptor: XEDAR), 안지오포이에틴-1 (Angiopoietin-1), 스팍 (secreted protein acidic and rich in cysteine: SPARC), 상피세포성장인자 유사 및 두 폴리스타틴 유사 도메인 1을 갖는 막관통 단백질/토모레귤린-1 (Transmembrane protein with EGF-like and two Follistatin-like domains 1/ Tomoregulin-1: TMEFF1/Tomoregulin-1), 니도겐-1 (Nidogen-1), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3 (Insulin-like growth factor-binding protein-3: IGFBP-3), 트롬보스폰딘-2 (Thrombospondin-2), 종양 괴사 인자-관련 활성 유도 사이토카인 (TNF-related activation-induced cytokine: TRANCE), 및 인터루킨-15 수용체 알파 (interleukin-15 receptor alpha: IL-15R 알파)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 농도를 약 10 pg/㎖ 이상, 약 15 pg/㎖ 이상, 또는 약 20 pg/㎖ 이상으로 포함하는 것일 수 있다.

[39] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 그루초 (groucho: GRO), 잠재성 TGF-베타 결합 단백질 (latent TGF-beta binding protein 1: latent TGF-beta bp1), 크로스베인리스-2 (Crossveinless-2: CV-2), 스매드4 (Smad4), 인터루킨-8 (interleukin-8: IL-8), 액티빈 C (Activin C), 인터루킨-6 (interleukin-6: IL-6), 대식세포 염증 단백질 2 (macrophage inflammatory protein 2: MIP 2), 및 액티빈 A (Activin A)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[40] 줄기세포를 상기 분화 배지에서 배양하여 피부전구세포로 분화시킴으로써 수득된 분화된 피부전구세포를 배지에서 배양하는 경우, 줄기세포를 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하지 않는 배지에서 배양함으로써

수득된 세포를 배지에서 배양하는 경우에 비하여, 또는 통상의 피부전구세포를 배지에서 배양하는 경우에 비하여, 세포의 배양물 중에 및/또는 세포 유래 단백질 중에 상기 유용한 단백질의 양이 증가될 수 있다. 상기 증가는 예를 들면 실시간 중합효소 연쇄 반응법 (real-time PCR: RT-PCR), 면역블롯 (Immunoblot: IB), 또는 효소결합 면역흡착 분석법 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA)과 같은 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.

[41]

[42] 다른 양상은 줄기세포를 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 분화 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계; 상기 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물을 생성시키는 단계; 및 상기 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물로부터 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 회수하는 단계;를 포함하는 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제조하는 방법에 의하여 생산된 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제공한다.

[43] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 줄기세포 유래 피부전구세포가 세포 밖으로 분비하는 단백질을 포함하는 것일 수 있고, 하기 도 5에 기재된 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 트롬보스폰딘 (Thrombospondin: TSP), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 1: TIMP1), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 2 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2: TIMP2), 엑토디스플라신-A2 (Ectodysplasin-A2: EDA-A2) X-연관 엑토디스플라신-A 수용체 (X-linked ectodysplasin-A receptor: XEDAR), 안지오포이에틴-1 (Angiopoietin-1), 스팍 (secreted protein acidic and rich in cysteine: SPARC), 상피세포성장인자 유사 및 두 폴리스타틴 유사 도메인 1을 갖는 막관통 단백질/토모레귤린-1 (Transmembrane protein with EGF-like and two Follistatin-like domains 1/ Tomoregulin-1: TMEFF1/Tomoregulin-1), 니도겐-1 (Nidogen-1), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3 (Insulin-like growth factor-binding protein-3: IGFBP-3), 트롬보스폰딘-2 (Thrombospondin-2), 종양 괴사 인자-관련 활성 유도 사이토카인 (TNF-related activation-induced cytokine: TRANCE), 및 인터루킨-15 수용체 알파 (interleukin-15 receptor alpha: IL-15R 알파)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[44] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액은 분화된 피부전구세포를 배지에서 배양한 후 얻어지는 조건 배양액 (conditioned media)으로서, 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포가 배양되는 과정 중에 세포간에 상호작용을 통해서 세포 밖으로 분비하는 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 사이토카인, 성장인자 등의 유용한 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제조하는 방법에 의하여 생산된 줄기세포 유래

피부전구세포 배양액은 배양액 내 다수의 유용한 단백질을 고농도로 함유하고 있으며, 상기 제조 방법에 의하면 상기 과정을 반복적으로 수행하는 경우에도 유용한 단백질의 조성 및 이의 농도가 일정한 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 수득할 수 있다.

[45]

[46] 다른 양상은 줄기세포를 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 분화 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계; 상기 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물을 생성시키는 단계; 및 상기 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물로부터 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 회수하는 단계;를 포함하는 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[47] 상기 줄기세포를 아스코르브산 및 히드로코르티손을 포함하는 분화 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포로 분화시키는 단계; 상기 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포를 배지에서 배양하여 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물을 생성시키는 단계; 및 상기 줄기세포 유래 피부전구세포의 배양물로부터 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 회수하는 단계, 및 단백질에 대하여는 상기한 바와 같다.

[48] 상기 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 생산된 단백질은 분화된 줄기세포 유래 피부전구세포가 배지에서 배양되는 과정 중에 세포간에 상호작용을 통해서 세포 밖으로 분비하는 유용한 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 사이토카인, 성장인자 등의 유용한 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 상기 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 단백질을 생산하는 방법에 의하여 생산된 단백질은 다수의 유용한 단백질을 고농도로 함유하고 있으며, 상기 생산 방법에 의하면 상기 과정을 반복적으로 수행하는 경우에도 유용한 단백질의 조성 및 이의 함량이 일정한 단백질을 수득할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 단백질을 생산하는 방법에 따르면 다수의 유용한 단백질을 대량으로 생산할 수 있다.

발명의 효과

[49] 일 양상에 따른 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액을 제조하는 방법, 및 상기 방법으로 생산된 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액에 의하면, 상기 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 내에 유용한 단백질을 다량 함유할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[50] 도 1은 피부 유래 미분화 표피세포 (skin derived undifferentiated keratinocyte)를 표피세포로 분화시킨 후, 및 태반 유래 줄기세포 및 탯줄 유래 줄기세포를 분화 배지에서 11일 동안 피부전구세포로 분화시킨 후, 각 세포의 형태를 나타내는 도면이다.

[51] 도 2는 태반 유래 줄기세포를 분화 배지에서 피부전구세포로 분화시키는 과정 중, 3일, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 17일, 19일 및 21일에, Krt5, Krt1, IVL, Krt14, 및 Krt10의 발현 수준을 측정한 결과이다.

[52] 도 3 및 4는 태반 유래 줄기세포를 분화 배지에서 피부전구세포로 분화시키는 과정 중, 3일, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 17일, 19일 및 21일에, Krt14의 단백질 수준을 측정한 결과이다.

[53] 도 5는 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액에서 발현양이 높은 사이토카인 가운데 상위 24종을 나타낸 것이다.

[54] 도 6은 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 (분화 배양액), 미분화 줄기세포 배양액 (미분화 배양액), 및 통상의 표피세포 배양액 (표피세포 배양액)에서 니도겐-1의 농도를 나타낸 것이다.

[55] 도 7a는 태반 유래 줄기세포의 표면 항원 특성을 나타낸 결과이다. 도 7b는 태반 유래 줄기세포에 각각 분화 유도물질을 첨가하여, 지방세포, 조골세포 및 연골세포로 분화를 유도한 결과를 나타내는 이미지이다.

발명의 실시를 위한 형태

[56] 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.

[57]

[58] **실시예 1: 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 제조 및 줄기세포 유래 피부전구세포로부터 생산된 단백질 성분 확인**

[59] **1. 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 제조**

[60] **(1) 줄기세포로부터 피부전구세포로의 분화**

[61] 정상적으로 분만한 건강한 산모로부터 사전에 충분한 설명에 근거한 동의(informed consent)를 받고, 정상 태반 분만시에 수집된 태반으로부터 탯줄을 분리하였다. 분리된 태반 및 탯줄 각각을 Ca/Mg를 함유하지 않는 (free) 둘베코스 인산염 완충 식염수 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline: DPBS)로 2 내지 5회 세척하여 혈액을 제거하였다. 이후, 태반 조직을 1 내지 5 mm 정도 크기로 잘라내었다. 또한, 탯줄에서 동맥과 정맥을 제거한 뒤 1 내지 5 mm 정도 크기로 탯줄을 잘라내었다. 이후, 상기 태반 및 탯줄 각각을 배양 용기에 부착하여 10 내지 15일 배양을 하였고, 상기 배양된 조직에서 세포가 뻗어나오는 것을 확인한 후, 5 내지 6시간 동안 200 U/㎖의 콜라게나아제 I을 가하여 태반 유래 줄기세포 및 탯줄 유래 줄기세포를 각각 분리하였다.

[62] 태반 유래 줄기세포가 중간엽 줄기세포의 특성을 나타내는지 확인하기 위하여, 표면 단백질 분석을 위해 유세포 분석을 수행하였다. 세포를 DPBS를 사용하여 세척하고, 2%의 FBS가 함유된 DPBS에 담아 CD44, CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD31, CD29, CD49, CD9, HLA-ABC, 및 HLA-ER 항체와 약 20분간

반응시켰다. 이 후, 유세포 분석기 (FACS Calibur, Becton Bickinson)를 통해 표면 항원 특성을 분석하였다. 도 7a는 태반 유래 줄기세포의 표면 항원 특성을 나타낸 결과이다. 도 7a에 나타낸 바와 같이, 태반 유래 줄기세포에서 CD44, CD73, CD90, CD105, CD29, CD49, CD9 및 HLA-ABC의 발현양이 높게 나타난 것으로부터, 상기 태반 유래 줄기세포가 중간엽 줄기세포의 성격을 갖는 것을 알 수 있다.

[63] 또한, 태반 유래 줄기세포의 분화능 분석을 위해, 지방세포, 조골세포 및 연골세포로 분화를 유도하였다. 이후, 지방세포로 분화를 유도한 시료는 Oil Red O로 염색하였고, 연골세포로 분화를 유도한 시료는 Alcian blue로 염색하였으며, 조골세포로 분화를 유도한 시료는 Alizarin Red S로 염색하여, 분화능을 분석하였다. 도 7b는 태반 유래 줄기세포에 각각 분화 유도물질을 첨가하여, 지방세포, 조골세포 및 연골세포로 분화를 유도한 결과를 나타내는 이미지이다. 도 7b에 나타낸 바와 같이, 상기 분리된 세포는 중간엽 줄기세포와 같은 다분화능을 갖는 것으로, 그로부터 각각 지방세포, 조골세포 및 연골세포로 분화가 유도된 것을 알 수 있다. 상기 분리된 세포를 100 내지 5,000 세포/cm^2의 농도로 멀티 플라스크 (multi-flask)에 분주하고, 상기 세포를 P0으로하여, 25 ng/㎖의 섬유아세포 성장 인자-4 (fibroblast growth factor-4: FGF-4), 1 ㎍/㎖의 헤파린, 50 ㎍/㎖의 겐타마이신, 및 10%의 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum: FBS)이 함유된 MEM alpha GlutaMAX (PS-CM) 배지에서 37℃, 5%의 CO_2의 조건에서 2일 동안, 5계대 동안 계대 배양하였다.

[64] 이후, 배양된 세포에, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지와 0.3 μM의 아스코르브산 (ascorbic acid), 0.5 ㎍/㎖의 히드로코르티손 (hydrocortison), 및 10%의 FBS을 함유하는 분화 배지를 멀티 플라스크에 5 ㎖/cm^2가 되도록 첨가하고, 37℃, 5%의 CO_2의 조건하에서 11일 동안 배양하였다. 대조군은 아스코르브산 및 히드로코르티손을 함유하지 않는 배지에서 배양한 것을 사용하였다.

[65] 도 1은 피부 유래 미분화 표피세포를 표피세포로 분화시킨 후, 및 태반 유래 줄기세포 및 탯줄 유래 줄기세포를 분화 배지에서 11일 동안 피부전구세포로 분화시킨 후, 각 세포의 형태를 나타내는 도면이다. 태반 유래 줄기세포 및 탯줄 유래 줄기세포 각각은 분화 배지에서 피부전구세포의 형태와 유사한 작고 일정한 크기의 원형의 세포 모양으로 분화하였다. 도 1에서 나타낸 바와 같이, 태반 유래 줄기세포 및 탯줄 유래 줄기세포는 분화 배지에서 배양된 후 피부전구세포의 형상를 나타냄을 알 수 있다.

[66]

[67] **(2) 분화된 피부전구세포에서 유전자 발현 확인**

[68] **(2.1) 실시간 중합효소연쇄반응법 (real-time PCR: RT-PCR) 분석**

[69] (1)의 태반 유래 줄기세포를 피부전구세포로 분화시키는 과정 중에, 중기 및 말기 단계에 발현하는 유전자인 Krt5, Krt1, IVL, Krt14, 및 Krt10의 발현 수준을

RT-PCR로 측정하였다.

[70] 태반 유래 줄기세포를 피부전구세포로 분화시키는 과정 중, 3일, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 17일, 19일 및 21일에, 세포를 수득하고 페놀/클로로포름을 사용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 역전사하여 cDNA를 합성하였다. cDNA의 유전자 발현 정도는 Applied Biosystems 700 서열 검출 시스템 (Foster City, CA, USA) 상에서, RT-PCR로 분석하였다. 이 때, 합성된 cDNA, 하기 표 1에 기재된 Krt5, Krt1, IVL, Krt14, 및 Krt10 각각에 특이적인 프라이머 세트, 2 x TaqMan 마스터 혼합물 및 20 x premade TaqMan 유전자 발현 분석 (Applied Biosystems) 키트를 이용하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 95℃에서 10분, 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분, 40회 반복. Krt5, Krt1, IVL, Krt14, 및 Krt10의 mRNA 수준을 인간 글리세르알데히드-3-인산디히드로게나아제 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) 수치로 정규화하였다.

[71]

[72] [표1]

유전자명	정방향 프라이머	역방향 프라이머
Krt5	GTC TCG CCA GTC AAG TGT GT(서열번호 1)	GAC ACG GAG GTG AAG CTG(서열번호 2)
Krt1	GGG TGG TTA TGG TCC TGT CT(서열번호 3)	GGA TCT CAG GGT CAA TCT CC(서열번호 4)
IVL	CCA GGT CCA AGA CAT TCA AC(서열번호 5)	ACT GCG GGT GGT TAT TTA TG(서열번호 5)
Krt14	GAG CAG CAG AAC CAG GAG T(서열번호 7)	GAG AAC TGG GAG GAG GAG AG(서열번호 8)
Krt10	ACT ACT CTT CCT CCC GCA GT(서열번호 9)	TGA GCT AAA TCC TCC ACC AA(서열번호 10)

[73] 도 2는 태반 유래 줄기세포를 피부전구세포로 분화시키는 과정 중, 3일, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 17일, 19일 및 21일에, Krt5, Krt1, IVL, Krt14, 및 Krt10 유전자의 발현 수준을 측정한 결과이다. Y축은 인간 GAPDH로 정규화된 상기 유전자의 발현양을 나타낸다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 분화가 진행되면서 5일 이후 피부전구세포의 분화 단계에서 중기에 발현하는 Krt14의 mRNA 수준이 증가하였다.

[74] **(2.2) 면역블롯 (Immunoblot: IB)**

[75] (1)의 태반 유래 줄기세포를 피부전구세포로 분화시키는 과정 중에, 중기 단계에 발현하는 유전자인 Krt14의 단백질 수준을 면역블롯으로 측정하였다.

[76] 태반 유래 줄기세포를 피부전구세포로 분화시키는 과정 중, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 17일, 19일 및 21일에, 세포를 수득하고 수득된 세포를 세포 용해

버퍼에서 용해하였다. 상기 세포 용해 버퍼는 RIPA 버퍼 (Thermofisher) 및 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche, Inc., Indianapolis, IN, USA)을 포함하는 것을 사용하였다. 세포 용해물에 함유된 단백질을 정량하고, 각 시험군 및 대조군에 대하여 단백질 20 μg을 7.5%의 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법 (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)으로 분리하였다. 분리된 단백질을 폴리비닐덴디플루오리드 (polyvinylidene fluoride: PVDF) 막 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)으로 이동시켰다. 상기 PVDF 막을 1차 항체와 4℃에서 밤새 반응시켰다. 다음 날, 상기 PVDF 막을 Tween과 Tris, NaCl이 함유된 TBST 용액으로 세척하고, HRP가 결합된 2차 항체와 상온에서 반응시켰다. 단백질 밴드를 증가된 화학발광 (Enhanced chemiluminescence: ECL) 키트 시스템 (EMD Millipore)을 사용하여 가시화하였다.

[77] 도 3 및 4는 태반 유래 줄기세포를 분화 배지에서 피부전구세포로 분화시키는 과정 중, 3일, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 17일, 19일 및 21일에, Krt14의 단백질 수준을 측정한 결과이다. 도 3 및 4에서 나타낸 바와 같이, 태반 유래 줄기세포는 분화 배지에서 배양된 5일 이후부터 Krt14 단백질의 양이 점차적으로 증가하였음을 알 수 있다. 반면, 태반 유래 줄기세포는 아스코르브산 및 히드로코르티손을 함유하지 않는 배지에서 배양된 후, Krt14 유전자가 발현되지 않거나 또는 매우 낮은 정도로 발현됨을 확인하였다.

[78]

[79] **(3) 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 제조**

[80] (1)에서 분화된 피부전구세포로부터 배양액을 생산하였다.

[81] (1)에서 분화된 피부전구세포에서 분화 배지를 제거하고, DPBS로 세척하여 잔류 혈청을 제거하였다. 이 후, 콜린 클로리드 (choline chloride) 및 페놀 레드 (phenol red)를 포함하지 않는 DMEM/F12 배지를 배양 플레이트에 2 내지 3㎖/cm^2가 되도록 첨가하고, 37℃, 5%의 CO_2의 조건에서 2 내지 4일 동안 배양하였다. 그 후, 분화된 피부전구세포 및 배지가 혼합된 피부전구세포의 배양물에서 상층액을 회수하였다. 이어서, 상기 상층액을 0.22μm의 필터에 여과하여 분화된 피부전구세포 배양액을 수득하였다. 대조군은 아스코르브산 및 히드로코르티손을 함유하지 않는 배지에서 배양된 태반 유래 줄기세포 (이하, 미분화 줄기세포) 및 통상의 표피세포 각각에, 배지를 첨가하고 배양하여 회수된 배양액을 사용하였다.

[82]

[83] **(4) 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액의 단백질 성분 분석**

[84] (3)에서 수득한 분화된 피부전구세포 배양액 내에서 세포 유래 단백질의 성분을 세크리톰 분석으로 확인하였다. 구체적으로 총 507종의 사이토카인의 수준을 확인하였다.

[85] 세크리톰 분석은 RayBio 인간 사이토카인 항체 어레이 (RayBio Human Cytokine Antibody Array)의 프로토콜에 따라 RayBio™ 커스톰 L-시리즈 인간

사이토카인 어레이 (RayBio™ Custom L-Series Human Cytokine Array) (RayBiotech, Norcross, GA)를 이용하여 수행하였다. 얻어진 스폿 (spot)의 상대 강도는 이미지 J에 의해 측정되었고, 배경 제거 (background subtraction)에 의해 보정되었다. 결과는 2회 판독 결과의 평균치로 나타내었다.

[86] 도 5는 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액에서 발현양이 높은 사이토카인 가운데 상위 24종을 나타낸 것이다. 표 2는 분화된 피부전구세포 배양액에서 다량으로 발현하는 사이토카인 24종을 나타낸 것이다. 분화된 피부전구세포 배양액은 트롬보스폰딘 (Thrombospondin: TSP), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 1: TIMP1), 금속단백질분해효소의 조직 억제제 2 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2: TIMP2), 엑토디스플라신-A2 (Ectodysplasin-A2: EDA-A2) X-연관 엑토디스플라신-A 수용체 (X-linked ectodysplasin-A receptor: XEDAR), 안지오포이에틴-1 (Angiopoietin-1), 스팍 (secreted protein acidic and rich in cysteine: SPARC), 상피세포성장인자 유사 및 두 폴리스타틴 유사 도메인 1을 갖는 막관통 단백질/토모레굴린-1 (Transmembrane protein with EGF-like and two Follistatin-like domains 1/ Tomoregulin-1: TMEFF1/Tomoregulin-1), 니도겐-1 (Nidogen-1), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3 (Insulin-like growth factor-binding protein-3: IGFBP-3), 트롬보스폰딘-2 (Thrombospondin-2), 종양 괴사 인자-관련 활성 유도 사이토카인 (TNF-related activation-induced cytokine: TRANCE), 및 인터루킨-15 수용체 알파 (interleukin-15 receptor alpha: IL-15R 알파) 등을 다량 함유하는 것을 알 수 있다.

[87] [표2]

No.	사이토카인	신호 강도
1	트롬보스폰딘 (TSP)	5,886,805
2	IGFBP-rp1/IGFBP-7	3,970,222
3	TIMP-2	3,950,540
4	EDA-A2	3,938,694
5	XEDAR	1,572,912
6	안지오포이에틴-1	1,167,638
7	SPARC	1,020,366
8	GDF-3	1,009,469
9	sFRP-4	999,123
10	GRO	963,242
11	MIP 2	865,819
12	TIMP-1	785,939
13	잠재성 TGF-베타 bp1	554,608
14	CV-2/크로스베인리스-2	475,676
15	IL-6	441,917
16	TMEFF1/토모레귤린 -1	430,143
17	니도겐-1	413,625
18	Smad 4	391,810
19	액티빈 C	228,189
20	IGFBP-3	182,444
21	트롬보스폰딘-2	112,674
22	TRANCE	100,065
23	액티빈 A	76,102
24	IL-15R 알파	51,270

[88] **(5) 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액 내 단백질 농도 분석**

[89] 상기 분화된 피부전구세포 배양액에서 표 2의 단백질이 다량 분비되는 것을 확인하였으며, 이들의 분비량을 효소 결합 면역흡착 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 정량적으로 분석하였다. 대조군은 아스코르브산 및 히드로코르티손을 함유하지 않는 배지에서 배양된 태반 유래

줄기세포 (이하, 미분화 줄기세포)에 배지를 첨가하고 2 내지 4일 동안 배양하여 회수된 배양액, 및 표피세포에 배지를 첨가하고 2 내지 4일 동안 배양하여 회수된 배양액을 사용하였다. ELISA 키트는 트롬보스폰딘에 대하여 DTP00B (R&D system, Minieapolis, MN), 니도겐-1에 대하여 ELH-Nidogen1 (Raybiotec, Norcross, GA), TRANCE에 대하여 MBS262463 (Mybiosource), IL-15R 알파에 대하여 ELH-IL15RA (Raybiotec, Norcross, GA)를 이용하였으며, 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 모두 450nm에서 마이크로 플레이트 리더기 Epoch (BioTek Inc.)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, Gen5 (2.00) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[90] 하기 표 3은 분화된 피부전구세포 배양액에서 트롬보스폰딘, 니도겐-1, TRANCE, 및 IL-15R 알파의 농도를 측정한 결과이다. 분화된 피부전구세포 배양액은 니도겐, 트롬보스폰딘 등을 다량 함유하는 것을 알 수 있다. 도 6은 줄기세포 유래 피부전구세포 배양액, 미분화 줄기세포 배양액 및 통상의 표피세포 배양액에서 니도겐-1의 농도를 나타낸 것이다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 분화된 피부전구세포 배양액은 미분화 줄기세포 배양액 및 통상의 표피세포 배양액에 비하여 니도겐-1의 함량이 10배 이상 높은 것을 알 수 있다.

[91] [표3]

No.	사이토카인	농도(pg/㎖)	신호 강도
1	트롬보스폰딘	63.65	5,886,805
2	니도겐-1	15180	413,625
3	TRANCE	29	100,065
4	IL-15R 알파	19	51,270

[92]