



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월27일
(11) 등록번호 10-2115960
(24) 등록일자 2020년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0617 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0149867
(22) 출원일자 2018년11월28일
심사청구일자 2018년11월28일
(56) 선행기술조사문헌
W02015002724 A2
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
송미연
서울특별시 강남구 영동대로112길 15, 501호 (삼성동, 풍림아파트)
(72) 발명자
송미연
서울시 강남구 영동대로 112길 15, 풍림1차 아파트 101동 501호
(74) 대리인
특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 5 항

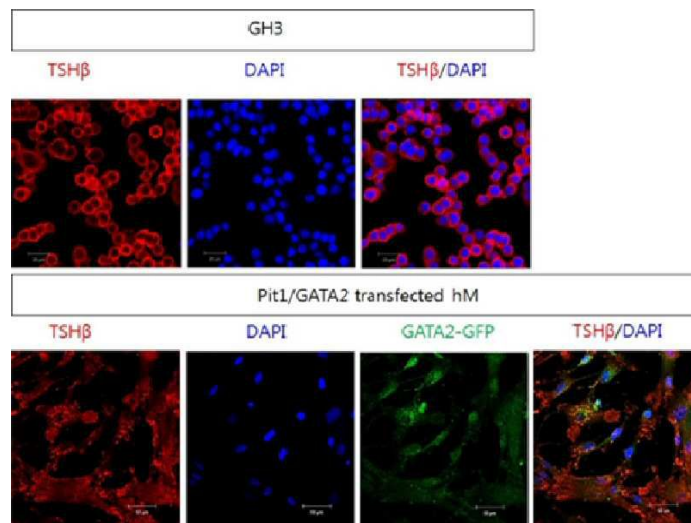
심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 호르몬 분비세포로 분화 방법

(57) 요약

본 발명의 일실시예는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법을 제공할 수 있다. 구체적으로는, 상기 인간 중간엽 줄기세포에 Pit-1 및 GATA2유전자를 트랜스펙션시켜서 갑상선 자극호르몬을 분비하는 세포로 분화시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 14/4705 (2013.01)
C12N 2506/1346 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02012092458 A2
W02007014373 A2
US20140031415 A1
US20080175814 A1
Mod Pathol. 15(1):11-7 (2002.01.).*
Endocr Rev. 30(7):790-829 (2009.12.).*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

인간 중간엽 줄기세포를 수득한 후 배양하는 단계;

상기 배양된 인간 중간엽 줄기세포에 Pit-1을 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계;

상기 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포를 항생제가 포함된 배지에서 배양하는 단계;

상기 항생제가 포함된 배지에서 배양된 인간 중간엽 줄기세포를 전체 배지 100중량%에 대해 우태아혈청 3 내지 6중량%가 포함된 배지에서 안정화시키는 단계; 및

상기 안정화된 인간 중간엽 줄기세포에 GATA2를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계;

를 포함하고,

상기 인간 중간엽 줄기세포는 인간 태줄 유래인 것을 특징으로 하며,

상기 수득된 인간 중간엽 줄기세포는 계대배양 passage 3 내지 5 상태인 것을 특징으로 하고,

상기 안정화시키는 단계는 인간 중간엽 줄기세포의 confluence가 50 내지 80%가 될 때까지 유지되는 것을 특징으로 하는,

인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항생제는 암피실린(ampicillin), 클로테트라사이클린(chlortetracycline), 디히드로스트렙토마이신(dihydrostreptomycin), 젠타마이신(gentamycin), 카나마이신(kanamycin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(Tetracycline), 티로신(tylosin), G418 및 네오마이신(neomycin)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 안정화시키는 단계는 3 내지 14일동안 이루어지는 것을 특징으로 하는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 Pit-1 트랜스펙션시키는 단계 이후에 우태아혈청이 포함된 배지에서 상기 인간 중간엽 줄기세포를 배양시

키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 GATA2 트랜스펙션시키는 단계 이후에 우태아혈청이 포함된 배지에서 상기 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비 세포로 분화 시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 중간엽 세포에 전사인자 Pit1 과 GATA2를 트랜스펙션하여 갑상선 자극호르몬 분비하는 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌하수체는 시상하부와 신체 전반에서 분비되는 호르몬의 영향을 받아 전체 호르몬의 분비를 조절한다. 뇌하수체는 발생학적으로 전엽과 후엽으로 나뉘는데, 뇌하수체 전엽에서 분비되는 대표적인 호르몬은 성장호르몬, 성선자극호르몬, 갑상선자극호르몬, 부신피질자극호르몬과 유즙분비호르몬이며 뇌하수체 후엽에서는 항이노호르몬이 대표적인 호르몬이다. 뇌하수체기능저하증은 이러한 호르몬들의 분비가 감소되어 있는 상태의 질환을 의미한다. 뇌하수체기능저하증의 가장 흔한 원인은 뇌하수체 종양이며 (70~80%), 두개인두종 (12~13%), 특발성 (8~10%), 산후 다량 출혈로 인한 쉬한 증후군 (1~3%) 등도 뇌하수체기능저하증을 유발할 수 있다. 특히, 뇌손상으로 인한 뇌하수체기능저하는 진단되지 않아 더 많은 뇌하수체 기능저하증의 발생이 있을 수 있다. 뇌하수체 기능저하 환자는 사망률이 높는데, 그 이유는 짧은 시간에도 부신피질 자극호르몬 (adrenocorticotropin hormone; ACTH)과 갑상선 자극호르몬 (thyroid-stimulating hormone; TSH)의 분비 저하는 생명에 위험하기 때문이다.

[0003] 현재 뇌하수체기능저하증의 치료는 분비능이 감소한 호르몬을 보충하는 것이다. 하지만, 이 호르몬 주입 치료법은 부작용이 있고, 치료가 비싸고, 또한 수십 년간 매일 주입 받아야 하는 단점이 있다. 따라서 손상된 뇌하수체 조직을 대신하는 뇌하수체 호르몬을 분비하는 세포 치료에 대한 연구가 늘어나고 있는 상황이다. 예를 들어, 세포 치료 방법 중의 하나로서 배아 줄기세포(embryonic stem cells)로부터 뇌하수체 호르몬 분비 세포로 분화시켜 분화된 세포를 이식 하는 방법이 연구되었었다(Medical Hypotheses, 2011). 즉, 이전 연구에서는 마우스 배아 줄기세포를 뇌하수체 종양 세포주 (GH3)의 배양액으로 세포의 배양하여 성장호르몬 (growth hormone; GH)와 젖분비 호르몬 (prolactin; PRL)이 분비되는 세포로 분화됨을 보였다(Molecular and Cellular Endocrinology, 2007). 그리고, 구강 외배엽 (Oral ectoderm)으로부터 라트케 주머니 (Rathke's pouch)로 분화되는 과정이 뇌하수체 발생에 중요함이 밝혀졌고, Rathke's pouch의 세포에서는 Lim3의 발현이 알려졌으며, Pit-1 (Pou domain transcription factor 1) 발현이 되면, 뇌하수체 세포들로 분화가 되는 것이 밝혀졌다(Hormones, 2015). 최근에는 인간 배아 줄기세포와 인간 iPSC (induced pluripotent stem cells)를 fluorescence-activated cell sorting (FACS)로 분리한 SIX1::H2B-GFP+ Placode 세포를 이용해서 ACTH, GH 호르몬 분비 세포로 분화시킨 후, 분화된 세포를 뇌하수체 절제한 설치류 모델에 이식하여 3주후부터는 ACTH, GH 호르몬 등이 증가됨을 확인되었다(Stem Cell Reports, 2016).

[0004] 그러나 종래 연구에서는 뇌하수체에서 분비되는 모든 호르몬을 분비하는 세포로 분화를 시키는데 그 특징이 있었다. 뇌하수체 세포는 각기 다른 세포 종류의 세포들이 있고, 각기 다른 세포들은 각기 다른 호르몬을 분비하고 있으며, 각기 다른 뇌하수체 조직 손상에는 다른 호르몬 분비 세포가 필요하다. 이렇게 호르몬 특이적 분비 세포로 분화시키는 연구는 아직 진행 중에 있으며 특히, 갑상선 자극 호르몬만을 분비하는 세포로 분화시키는 기술은 현재까지 나와있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬을 분비하는 세포로 분화 하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일측면에 따른 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법은,
- [0008] 인간 중간엽 줄기세포를 수득한 후 배양하는 단계;
- [0009] 상기 배양된 인간 중간엽 줄기세포에 Pit-1을 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계;
- [0010] 상기 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포를 항생제가 포함된 배지에서 배양하는 단계;
- [0011] 상기 항생제가 포함된 배지에서 배양된 인간 중간엽 줄기세포를 전체 배지 100중량%에 대해 우태아혈청 3 내지 6중량%가 포함된 배지에서 안정화시키는 단계; 및
- [0012] 상기 안정화된 인간 중간엽 줄기세포에 GATA2를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계;
- [0013] 를 포함시킬 수 있다.
- [0014] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 인간 중간엽 줄기세포는 인간 태줄 유래일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 수득된 인간 중간엽 줄기세포는 계대배양 passage 3 내지 5 상태일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 항생제는 암피실린(ampicillin), 클로테트라사이클린(chlortetracycline), 디히드로스트렙토마이신(dihydrostreptomycin), 젠타마이신(gentamycin), 카나마이신(kanamycin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(Tetracycline), 티로신(tylosin), G418 및 네오마이신(neomycin)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 안정화시키는 단계는 인간 중간엽 줄기세포의 confluence가 50 내지 80%가 될 때까지 유지될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 안정화시키는 단계는 3 내지 14일동안 이루어질 수 있다.
- [0019] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 Pit-1 트랜스펙션시키는 단계 이후에 우태아혈청이 포함된 배지에서 상기 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 GATA2 트랜스펙션시키는 단계 이후에 우태아혈청이 포함된 배지에서 상기 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 실시예에 따르면, 인간 중간엽 줄기세포에 전사인자 Pit1과 GATA2를 트랜스펙션하여 갑상선 자극호르몬을 분비하는 세포로 분화 유도 할 수 있다. 갑상선 자극호르몬 분비 되는 세포로 갑상선 자극호르몬 저하증이나 갑상선 상실 환자에게 치료법으로 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 Pit-1 트랜스펙션을 면역형광염색법으로 확인한 사진이다.
- 도2는 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션된 Pit-1의 발현여부를 전기영동법을 통해서 확인한 사진이다.
- 도3은 Pit1 유전자 주입한 인간 중간엽 세포에 GATA2 유전자를 주입한 후 이를 GFP(Green fluorescent

protein)으로 확인한 사진이다.

도4는 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션된 Pit-1 및 GATA2의 발현을 전기영동법을 통해서 확인한 사진이다.

도5는 갑상선 암 세포인 GH3 세포에서 THS β 발현 및 Pit-1/GATA2 유전자 트랜스펙션한 인간 중간엽 줄기세포에서 THS β 발현을 보여주는 사진이다.

도6은 Pit1/GATA2 유전자 트랜스펙션한 인간 중간엽 줄기세포에서 THS β 발현을 전기영동법을 통해 확인한 사진이다.

도7은 Pit1/GATA2 유전자 트랜스펙션한 인간 중간엽 줄기세포에서 THS β가 분비되는지를 ELISA를 통해 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0025] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0029] 본 발명의 일측에 따른 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키는 방법은 a) 인간 중간엽 줄기세포를 수득한 후 배양하는 단계; b) 상기 배양된 인간 중간엽 줄기세포에 Pit-1을 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계; c) 상기 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포를 항생제가 포함된 배지에서 배양하는 단계; d) 상기 항생제가 포함된 배지에서 배양된 인간 중간엽 줄기세포를 전체 배지 100중량%에 대해 우태아혈청 3 내지 6중량%가 포함된 배지에서 안정화시키는 단계; 및 e) 상기 안정화된 인간 중간엽 줄기세포에 GATA2를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 인간 중간엽 줄기세포를 수득한 후 배양하는 단계는 인간 중간엽 줄기세포를 기반으로 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시키기 위해 준비하는 단계로서, 먼저 인간 중간엽 줄기세포를 수득하여 이를 배지에 배양시키는 단계이다. 상기 인간 중간엽 줄기세포는 다분화능을 가진 기질세포(가슴샘이나 골수 등의 기관에서 그 기능을 담당하는 세포나 조직(유조직)에 둘러싸고 지탱하는 세포)로 조골세포(뼈 세포), 연골세포, 근육세포, 지방세포(골수 지방 조직을 만드는 지방세포)를 포함한 다양한 세포로 분화할 수 있다. 그리고, 상기 인간 중간엽 줄기세포는 연골, 골조직, 인대, 골수기질 등 다양한 결합조직으로 분화할 수 있는 능력을 가질 수 있으며 이러한 구조적 지지 기능 이외에도 면역조절, 억제 기능을 가지고 있어서 염증 반응을 저해하고 조직 재생에 기여할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 인간 중간엽 줄기세포는 인간 탯줄 유래일 수 있다. 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 인간 중간엽 줄기세포는 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화시킬 수 있으며 이를 위해서, 상기 인간 중간엽 줄기세포의 계대배양 passage상태가 3 내지 5인 것을 사용할 수 있다. 바람직한 계는 상기 인간 중간엽 줄기세포의 계대배양 passage상태가 4인 것을 사용할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 수득된 인간 중간엽 줄기세포는 우태아혈청, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 인간 중간엽 줄기세포 배지에서 배양될 수 있다. 그리고, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 인간 중간엽 줄기세포 배지는 DMEM 또는 인간 탯줄 유래 중간엽 줄기세포 배양액 (Human Umbilical Cord derived MSC Growth Medium) 일 수 있다.
- [0032] 상기 갑상선 자극호르몬(Thyroid-stimulating hormone, TSH)은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 분자량이 약

28,000달톤인 당단백질 호르몬으로, 약 15%가 탄수화물이며, α -subunit와 β -subunit로 구성되어 있고. α -subunit는 LH, FSH, hCG 등의 성선 자극 호르몬(gonadotropin)과 거의 동일한 아미노산 배열을 갖고 있다. TSH의 특이적인 생리적 활성은 β -subunit의 다양한 특징에 기인한 것이며 호르몬이 아단위(subtype)로 분리되면 생리적 활성은 나타나지 않을 수 있다. 상기 갑상선 자극호르몬은 갑상선 호르몬 T4와 T3의 생성과 분비를 자극할 수 있으며, 갑상선 자극호르몬 분비는 낮은 T3 및 T4 농도와 갑상선자극호르몬유리호르몬(TRH)에 의해 촉진될 수 있고, T3와 T4 농도 상승에 의해 억제될 수 있다. 갑상선기능의 변화에 상기 갑상선 자극호르몬이 가장 민감하게 변하고, 갑상선 질환을 배제하기 위한 음성 예측도가 가장 높기 때문에, 보행이 가능한 정상적인 사람에서 갑상선기능이상을 선별하는데 상기 갑상선 자극호르몬 농도가 가장 좋은 지표가 될 수 있다. 본 발명의 일 실시예 따르면, 본 발명에 따른 방법으로 인간 중간엽 줄기세포를 상기 갑상선 자극 호르몬을 분비하는 세포로 분화시킬 수 있으며, 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따라 분화된 세포는 갑상선 종양 세포에서 보다 많은 갑상선 자극 호르몬을 분비할 수 있다(도 7참조).

- [0033] 상기 배양된 인간 중간엽 줄기세포에 Pit-1을 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계는 상기 인간 중간엽 줄기세포가 Pit-1발현할 수 있도록 Pit-1코딩 핵산을 벡터에 삽입한 후 상기 벡터를 상기 배양된 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션시키는 과정을 의미한다. 상기 벡터는 항생제 내성 유전자를 포함하는 플라스미드일 수 있지만, 단백질을 코딩하는 핵산을 트랜스펙션시키기 위해 당업계에서 사용되는, 항생제 내성 유전자를 포함하는 벡터라면 제한 없이 사용이 가능하다.
- [0034] 상기 Pit-1 (Pou domain transcription factor 1)은 성장호르몬을 위한 전사인자를 의미하며, 구체적으로 포유동물에서 뇌하수체 발달 및 호르몬 발현에 영향을 주는 뇌하수체 특이적 전사인자이다. 특히, 상기 Pit-1은 프로락틴(prolactin) 및 갑상선 자극 호르몬 β -subunit를 코딩하는 유전자 제어를 할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 Pit-1 트랜스펙션시키는 단계 이후에 우태아혈청이 포함된 배지에서 상기 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 우태아혈청이 포함된 배지에서 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계는 Pit-1트랜스펙션 이후에 인간 중간엽 줄기세포내에서 Pit-1유전자가 제대로 삽입되도록 할 수 있다.
- [0036] 상기 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포를 항생제가 포함된 배지에서 배양하는 단계는 세포 배양시에 무균 상태 유지를 위해서 항생제가 포함된 배지에서 상기 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포만을 배양하는 과정을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항생제가 포함된 배지에 배양하는 단계는 Pit-1을 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션시킨 후에 수행될 수 있다. 만약 Pit-1이 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션된 후에 상기 항생제가 포함된 배지에서 배양 시키지 않으면, Pit-1 이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기 세포만 배양되지 않고, 이후 상기 인간 중간엽 줄기세포가 갑상선 자극 호르몬을 분비하는 세포로 분화되지 못할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 항생제는 암피실린(ampicillin), 클로테트라사이클린(chlortetracycline), 디히드로스트렙토마이신(dihydrostreptomycin), 젠타마이신(gentamycin), 카나마이신(kanamycin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(Tetracycline), 티로신(tylosin), G418 및 네오마이신(neomycin)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 바람직하게는 G418 및 네오마이신(neomycin)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 G418 및 네오마이신(neomycin)일 수 있다.
- [0038] 상기 항생제가 포함된 배지에서 배양된 인간 중간엽 줄기세포를 전체 배지 100중량%에 대해 우태아혈청 3 내지 6중량%가 포함된 배지에서 안정화시키는 단계는 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포가 항생제가 포함된 배지에서 배양되는 동안 받은 스트레스를 경감시키고 또한 이후에 수행될 GATA2트랜스펙션이 가능 하도록 상기 인간 중간엽 줄기세포를 준비시키는 과정을 의미한다. 특히, 상기 안정화시키는 단계는 전체 배지 100중량%에 대해 우태아혈청 3 내지 6중량%가 포함된 배지를 사용할 수 있는데, 이는 당업계에서 널리 사용되는 10중량%의 우태아혈청이 포함된 배지를 사용하는 것과는 차이가 있으며, 또한 혈청을 포함하지 않는 배지를 사용하는 것보다 차이가 있다.
- [0039] 당업계에서 인간 유래 세포를 포함해서 동물세포를 배양할 때 혈청이 포함된 배지를 사용할 수 있는데 이는 혈청이 호르몬, 성장인자, 비타민을 공급해 줌으로써 동물세포의 성장과 활성을 촉진시킬 수 있기 때문이다. 혈청은 이외에도 단백질 분해효소 (protease)의 활성을 억제하고, pH 조절용 완충제 역할을 할 수 있다. 그러나 혈청을 멸균하기 위하여 가열법을 사용하지 못하고 여과 (filtration)해야 하기 때문에 마이코플라즈마 (mycoplasma) 또는 바이러스 등에 의한 오염의 가능성을 증가시킬 수 있고, 또한 혈청을 함유한 배지는 거품이

잘 생길 수 있다. 그러나 혈청 사용의 가장 큰 문제점은 배치 (batch) 마다 혈청의 조성이 달라지기 때문에 혈청을 사용한 실험은 재현성을 얻기 어렵다는 점이다. 동일한 세포를 같은 성분의 배치에서 배양한다 하더라도 그 배양의 결과가 항상 다르게 나타날 수 있다. 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극 호르몬을 분비하는 세포로 분화시키는데 그 목적이 있고, 이를 위한 하나의 단계로서 상기 안정화시키는 단계가 수행되는데, 당업계에서 사용되는 10중량%의 우태아혈청을 사용하게 되면 본 발명이 이루고자 하는 목적을 달성할 수 없을 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 만약 상기 안정화시키는 단계에서 전체 배치 100중량%에 대해 우태아혈청 6중량%를 초과하여 포함하는 배지를 사용하게 되면, 이후에 수행될 GATA2형질이 상기 인간 중간엽 줄기세포에 도입 안될 수 있고 또한 항생제 처리에 대한 효과를 반감시킬 수 있다.

[0040] 당업계에서는 상기 혈청을 포함한 배지의 문제점을 극복하기 위해 무혈청(serum-free) 배지를 사용하기도 하는데, 무혈청 배치 내에는 포도당, 글루타민, 다른 아미노산, 염들 이외에도 혈청 대체 물질로서 인슐린, 트랜스페린 (transferrin), 셀레늄 (selenium)을 포함할 수 있다. 무혈청 배지는 그 구성 물질의 조성을 분명히 알 수 있어 배치 조성이 표준화되며 실험의 재현성을 높힐 수 있고 멸균이 용이하며, 생성물의 정제가 쉽다. 하지만, 용도에 따라 맞춤 생산이 되어야 하는 점, 세포의 성장속도가 혈청이 함유된 배치보다 느린 점, 세포 계통마다 서로 다른 무혈청 배치 조성을 요구하는 점과 무혈청 배지에 적응되지 않는 세포 계통이 있다는 점이다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 만약 전체 배치 100중량%에 대해 우태아혈청 3중량%미만을 포함하는 배지를 사용하게 되면, 무혈청배지를 사용하게 되는 것과 유사한 효과를 지니게 되는데, 이는 인간 중간엽 줄기세포를 항생제 포함하는 배치에서 배양하는 단계를 상기 안정화시키는 단계 전에 포함하는 본 발명에서 상기 항생제의 효과를 지속하여 하여 지나치게 높게 유지시켜서 인간 중간엽 줄기세포에 유해할 수 있다. 이는 다시 이후에 수행될 GATA2 트랜스펙션을 방해하여 인간 중간엽 줄기세포가 갑상선 자극 호르몬을 분비하는 세포로 분화되지 못하게 할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 우태아혈청은 전체 배치 100중량%에 대해 3 내지 6중량%를 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 4 내지 6중량%일 수 있다. 가장 바람직하게는 전체 배치 100중량%에 대해 5중량%일 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 안정화시키는 단계는 인간 중간엽 줄기세포의 confluence가 50 내지 80%가 될 때까지 유지될 수 있다. 상기 confluence는 세포 배양 플레이트의 전체 면적에서 성장하는 세포들의 면적이 차지하는 비율을 의미한다. 구체적으로, 만약 상기 confluence가 50%미만이면 상기 인간 중간엽 줄기세포가 안정화되지 않아서 이후 단계에서 수행될 GATA2트랜스펙션이 제대로 이루어지지 않을 수 있고, GATA2 트랜스펙션 이후에 인간 중간엽 줄기세포의 상태가 저하 될 수 있다. 이렇게 상태가 저하된 인간 중간엽 줄기세포들은 갑상선 자극 호르몬으로 분화 되기 전에 일찍 사멸 할 수 있다. 만약 상기 confluence가 80%를 초과_하면 인간 중간엽 줄기세포가 과잉증식하여 안정화된 세포들이 세포과피화로 인해 GATA2트랜스펙션이 제대로 이루어지지 않을 수 있어 인간 중간엽 줄기세포들은 갑상선 자극 호르몬 분비세포로 분화되기 어려울 수 있다.

[0043] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 안정화시키는 단계는 3 내지 14일동안 이루어질 수 있다. 구체적으로, 3 내지 10일동안 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 3 내지 7일동안 이루어질 수 있다.

[0044] 상기 안정화된 인간 중간엽 줄기세포에 GATA2를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터를 트랜스펙션시키는 단계는 상기 인간 중간엽 줄기세포가 GATA2를 발현할 수 있도록 GATA2코딩 핵산을 벡터에 삽입한 후 상기 벡터를 상기 안정화된 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션 시키는 과정을 의미한다. 상기 벡터는 플라스미드일 수 있으나, 단백질을 코딩하는 핵산을 트랜스펙션 시키기 위해 당업계에서 사용되는 벡터라면 제한없이 사용이 가능하다.

[0045] 상기 GATA2(GATA-binding factor 2)는 유전자의 발현을 제어할 수 있는 전사인자로서, 세포핵 단백질의 하나이다. 상기 GATA2는 배아발달, 혈액 형성 줄기세포, 림프계 형성 줄기세포 및 다른 조직형성 줄기세포의 자기재생, 유지 및 기능성과 관련된 유전자들을 제어할 수 있다. 또한 상기 GATA2는 Pit-1과 상호작용하여 기능을 할 수 있고, 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 GATA2는 Pit-1이 트랜스펙션된 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션되어 갑상선 자극 호르몬을 분비하는 세포로 분화하는데 작용할 수 있다. 도6 및 도7을 참조해서 보면, Pit-1만으로는 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극 호르몬을 분비하는 세포로 분화시킬 수 없었고, Pit-1이외에 GATA2를 인간 중간엽 줄기세포에 트랜스펙션시킴으로써 인간 중간엽 줄기세포를 갑상선 자극 호르몬 분비세포로 분화시킬 수 있었다.

[0046] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 GATA2 트랜스펙션시키는 단계 이후에 우태아혈청이 포함된 배치에서 상기 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 우태아혈청이 포함된 배치에서 인간 중간엽 줄기세포를 배양시키는 단계는 GATA2트랜스펙션 이후에 인간 중간엽 줄기세포내에서 GATA2유전자가 제대로

삽입되도록 할 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0050] **실시예1. 플라스미드 DNA제조(Pit-1 및 GATA2)**

[0051] Geneaid Midi Plasmid Kit (Endotoxin Free, Cat. No. PIE25) Geneaid Biotech Ltd. 를 사용하여 Pit-1유전자 및 GATA2 유전자를 함유하는 플라스미드 DNA를 제조하였다. 사용된 Pit-1유전자는 POU1F1 (Myc-DDK-tagged)-Human POU class1 homeobox 1 (POU1F1), transcript variant alpha. (OriGene Technologies Inc., Cat. No. RC216387, Accession No.: NM_000306, Vector : pCMV6-Entry (Cat# PS100001), Antibiotic Resistance: Kanamycin (25 ug/ml), Restriction site: Sgf1-Mlu1)이고, GATA2유전자는 GATA2(GFP-tagged)-Human GATA binding protein 2 (GATA2), transcript variant 1, (OriGene Technologies Inc., Cat. No. RG227363, Accession No.: NM_001145661, Vector: pCMV6-AC-GFP, Antibiotic Resistance: Ampicillin (100 ug/ml), Restriction site: Sgf1-Mlu1) 이다.

[0052] 제조사의 매뉴얼에 따라서, 세포 펠렛(pellet)을 만들기 위해 원심분리를 통해 배양된 박테리아를 수득한 뒤 재부유(resuspension)시켰다. 그런 다음, 박테리아 세포를 용해시킨 뒤 부유물을 증화시켰다. PIE02 및 PIE25를 사용할때, 증립화 처리 이후에 엔도톡신(endotoxin)을 제거하기 위해 PER 버퍼처리를 하였다. 오염물질이 부유상태로 남아있는 상태에서 DNA를 실리카 레진(silica resin)에 결합시킨 후 세척하였다. 순수한 플라스미드 DNA를 용리 시킨 후 침전시켰다.

[0054] **실시예2. 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포 배양**

[0055] 계대배양 passage 4인 상태의 인간태줄(umbilical cord blood) 유래 중간엽 줄기세포를 CFBIO(한국)으로부터 수득하였다. 수득한 인간 태줄 유래 중간엽 줄기세포를 5일동안 confluence가 70%가 될 때까지 10 % FBS, 1% Penicillin 및 streptomycin을 포함하는 인간 태줄 유래 중간엽 줄기세포 배지 (Human Umbilical Cord derived MSC Growth Medium, CB-UCMSC-GM; 세포바이오)에서 배양하였다.

[0057] **실시예3. 트랜스펙션(Pit-1 및 GATA2) 및 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포 안정화**

[0058] 실시예2에서 배양된 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포를 24 well플레이트에서 5×10^4 세포수/500ul 분주하여 24시간동안 인큐베이션시켰다. 이후 배양배지를 제거하고 나서 실시예1에서 준비된 Pit-1 유전자를 가진 플라스미드 DNA(배지 50 ul 당 0.8 ug) 및 Lipofectamin (배지50 ul에 2 ul)(Life TechnologiesTM, CAT. No. 15338-100)을 OPTI-MEM배지 하에서 6시간동안 트랜스펙션 시켰다. 이후에 배지를 10%의 우태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM배지로 바꿔준 뒤 2일동안 인큐베이션시켰다. 그리고 나서, 기존 배지를 100 μ g/ml의 Neomycin 및 100 μ g/ml의 G418 이 포함된 DMEM 선택성 배지로 바꿔 배양 시켜 Pit-1유전자를 가진 플라스미드 DNA가 트랜스펙션된 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포만을 수득하였다. 그런 다음 Pit-1유전자가 트랜스펙션된 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포를 5%의 우태아혈청을 포함하는 DMEM Reduced Serum Medium에서 5일동안 안정화시키는 과정을 거쳤고, confluence가 70% 되었을 때, GATA2유전자를 포함하는 플라스미드 DNA 및 Lipofectamin (배지50 ul에 2 ul)(Life TechnologiesTM, CAT. No. 15338-100)을 OPTI-MEM배지 하에서 6시간동안 트랜스펙션 시켰다. GATA2가 트랜스펙션된 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포를 10%의 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지에서 2일동안 배양시켰다.

[0060] **실시예4. 면역화학염색**

[0061] 면역화학염색법을 통해서 실시예3에서 트랜스펙션된 Pit-1 및 GATA2가 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포에 유전형질주입이 제대로 되었는지 확인하였다. 먼저 커버 슬라이드 코팅을 위해서 24 well culture 플레이트에 라운드 커버슬라이드를 넣고, well에 1%의 젤라틴 1ml을 넣고 1일동안 36도 인큐베이터에서 인큐베이션 시켰다. 이후 젤라틴을 제거하고 PBS로 3번 세척하였다. 그리고 나서 Pit-1 및 GATA2가 트랜스펙션된 인간 태줄유래 중간엽 줄기세포를 분주했다. 분주된 세포들을 1일 동안 배양한 후, 천천히 세포가 떨어지지 않게 배양액을 제거하고, PBS로 세척한 후, 4%의 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시키고 나서 PBS로 3번 세척하였다. 그리고 나서, blocking buffer(3% BSA, 5%NDS, 5% NHS, 0.1% Triton X-100 in PBS)로 30분동안 인큐베이션시켰다. 이후에, Myc (rabbit, 1:500; abcam, ab32072), Pit-1 (mouse, abcam, ab10545) 및 TSH beta (R&D systems, monoclonal mouse IgG1, Clone#512908 Cat # MAB57941)에 대한 1차 항체를 넣고 4°C에서 3시간동안 인큐베이션

시켰다. 인큐베이션이 끝난 후 PBS로 5분동안 3회 세척하였고, 2차 항체(anti-mouse Alexa-Cy3 (1:400) 및 anti-rabbit Alexa488 (1:400))를 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 이후에 PBS로 5분동안 3회 세척을 한 후, DAPI 를 포함하는VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories) 를 30분동안 상온에서 빛 차단 상태에서 반응시켰다. 도 1을 참고하면, 인간 중간엽 줄기세포에 Myc-DDK-Pit1 트랜스펙션 주입한 후, 세포 내에 유전자 형질 주입이 되었는지 면역형광염색을 통해 확인한 사진이며 Myc-DDK-Pit1 트랜스펙션 주입한 세포는 Myc 와 Pit1 모두 양성으로 염색되었다. Control은 세포내 유전자를 형질 주입하지 않은 세포이고, pCMV-Myc-N을 세포에 트랜스펙션 주입한 세포는 Myc 만 양성으로 염색되었다. 또한, 도5를 참고하면, 설치류 갑상선 암 세포인 GH3 세포를 TSH β 염색의 positive control로 사용하여 염색하였고, Pit-1/GATA2 유전자 트랜스펙션 주입한 인간 중간엽 줄기세포에서 TSH β 양성으로 염색되는 것을 확인 하였다.

[0063] **실시예5. RT-PCR**

[0064] 실시예 3에서 트랜스펙션시킨 Pit-1 및 GATA2의 발현여부를 확인하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. 이를 위한 준비단계로서, Total RNA추출을 위해 트리졸 용액(Tri-reagent; TR118, MRC co.) 추출 방법을 이용하여 분리하였다. Pit-1 및 GATA2이 트랜스펙션된 인간 태줄류체 중간엽 줄기세포에 1ml 트리졸을 처리하여 4분 있다가 세포를 걸었다. 그리고 200ul의 클로로포름(chloroform)을 넣고 잘 섞어주고 나서, 원심분리기에 넣고 4° 13000 rpm으로 15동안 원심분리하였다. 투명한 상등액과 중간층의 찌꺼기, 핑크색의 하등액으로 나뉘는데, 3가지 층으로 나뉜 sample에서 투명한 상등액 400ul을 따서 준비된 새 EP tube에 옮겼다. 투명한 상등액이 들어있는 EP tube에 상등액과 동량으로 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 넣고 vortex를 이용하여 잘 섞어주었다. 실온에서 10분 반응시킨 후 sup(액체부분)을 버렸다. RNA pellet을 75% 에탄올 1ml을 넣고, Tapping후 원심분리기로 4°에서 13000 rpm으로 10분동안 원심분리시켰다. 그리고 DEPC water를 30~50ul를 넣어 RNA pellet을 녹여 주고 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Solutions LLC)로 정량 하였다.

[0065] 이후, cDNA를 제조하기 위해서 정량 값에 따라 RNA sample (농도 1ug) (max: 9ul), DEPC 물 (9-RNA sample 양) 및 Oligo dT 1ul (Bioneer, 냉동실)을 PCR tube에 넣어 total 10ul를 만들었다. 그리고 Vortex후 10초간 spin down 해주고 난뒤, PCR 기계에 넣고 cycle 1 (70° C for 5 min and place it on ice.)을 돌려주었다. Cycle 1 진행이 끝나면 AccuPower®RT PreMix 튜브 (Bioneer)로 옮겨서 DEPC 물을 넣어 vortexing하여 섞고 spin down 한 뒤, cycle 2 (42° C, 60 분 (cDNA synthesis) 및; 94° C, 5 분(RTase inactivation))을 진행하여 cDNA를 얻었다.

[0066] 얻은 cDNA로 AccuPower®PCR PreMix (Bioneer)을 사용하여 RT-PCR 을 진행하였고, PCR 산물은 1.5% 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동방법으로 분석하였다. PCR에 사용된 프라이머 서열을 표1에 나타내었다. 그리고, 전기영동분석 결과값은 도2, 도4 및 도6으로 나타냈었고, 도2를 참고하여 보면, Myc-DDK-Pit1 형질 주입한 인간 중간엽 줄기세포(Pit1-hM)내에서 Pit1의 발현을 확인하였다(hM : 인간 중간엽 줄기세포에 유전자 형질을 주입하지 않은 세포에서의 Pit1의 발현; cM: 인간 중간엽 줄기세포에 pCMV-Myc-N 를 형질 주입한 세포에서의 Pit1의 발현). 도 6은 TSH β 발현을 보여주며, Pit-1 유전자 트랜스펙션 주입한 인간 중간엽 줄기세포는 TSH β 발현이 없고, Pit-1 유전자 주입후 GATA2 유전자 주입한 Pit1/GATA2 유전자 주입한 인간 중간엽 줄기세포는 모두 TSH β 유전자 발현을 보였다.

표 1

[0068]

| 유전자 | 정방향 프라이머(5'→3') | 역방향 프라이머(5'→3') |
|----------|--------------------------|--------------------------|
| Pit-1 | GTGATGTCTACAGCAACAGGACT | GGCCTCCCCAACATTTGTCT |
| GATA2 | GCGTCAAGTACCAGGTGTCA | AATTTGCACAACAGGTGCCG |
| GAPDH | CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT | AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC |
| TSH beta | CCACAGCATCTGCTACCAAT | AGCAACATGGAGTGGGCATC |

[0069] **실시예6. ELISA(TSH beta)**

[0070] ELISA를 통해서 본 발명에 따른 인간 중간엽 줄기세포가 갑상선 자극 호르몬(TSH)를 분비하는지 확인하였다. 사용된 Kit는 Human Thyroid Stimulating Hormone ELISA Kit (RAB0502, Sigma Aldrich (Lot # 0329D0291, RAB 0502-1KT)로서, 제조사의 매뉴얼에 따라서, 표준용액 및 세포를 배양한 배양액 샘플을 각각100 ul씩 플레이트의 well에 담고 실온에서 2.5시간동안 인큐베이션시켰다. 이후 용액들을 버리고 나서 1x 세척용액으로 4번 세척하였고, 이후 모든 세척용액을 버렸다. 그리고 나서 각 well에 100ul의 1x biotinylated Detection 항체를 넣어 주고 실온에서 1시간동안 약간의 shaking을 유지하면서 인큐베이션시켰다. 용액을 버린 후 상기 세척과정을 3번

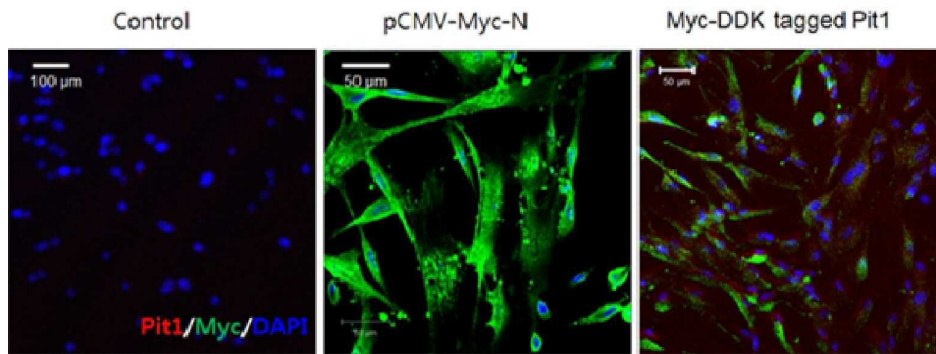
반복하였다. 세척후, 100ul의 HRP-Streptavidin 용액을 각 well에 넣어주고 실온에서 45분동안 약간의 shaking을 유지하면서 인큐베이션시켰다. 다시 용액을 버린 후 상기 세척과정을 3번 반복하였다. 세척후, 100ul의 ELISA Colorimetric TMB 시약을 각 well에 넣어준 뒤, 실온에서 30분동안 약간의 shaking을 유지하면서 인큐베이션시켰다. 이후, 각 well에 50ul의 Stop 용액을 넣어준 뒤 450 nm 파장대에서 결과값을 측정하였다. 그 결과값은 도7로 나타내었으며, 도7을 참고하여 보면, TSH β가 세포에서 분비되는지 ELISA로 양을 측정한 결과를 나타내었다. Pit-1 유전자 트랜스펙션 주입한 인간 중간엽 줄기세포는 TSH β 분비가 없었고, Pit-1 유전자 주입 후 GATA2 유전자 주입한 인간 중간엽 줄기세포는 모두 TSH β가 분비되는 것을 확인하였다. 세포 수에 따른 분비량의 그래프는 설치류의 갑상선 종양 세포보다 분비량이 높았다.

[0072] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

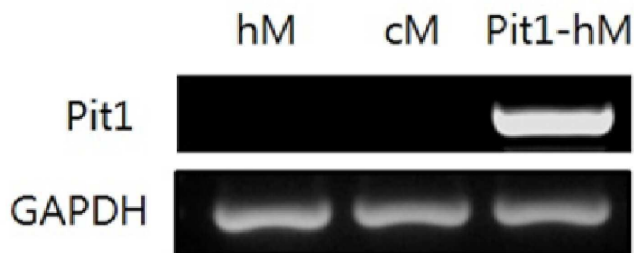
[0073] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

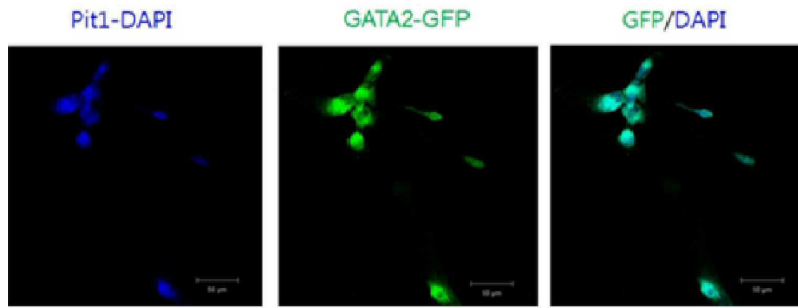
도면1



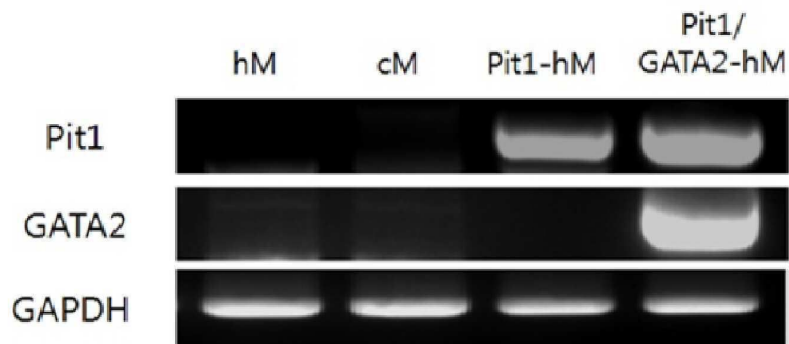
도면2



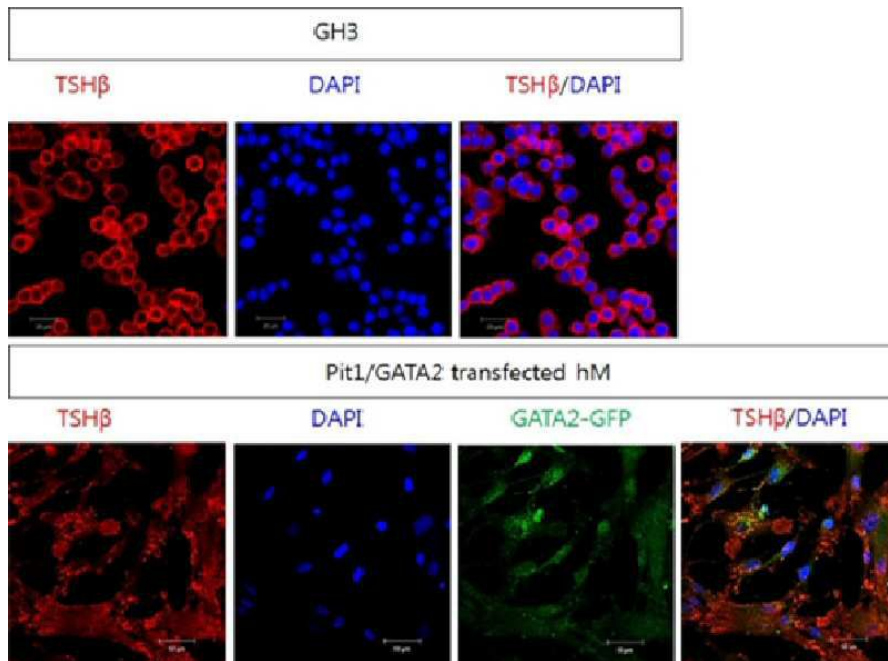
도면3



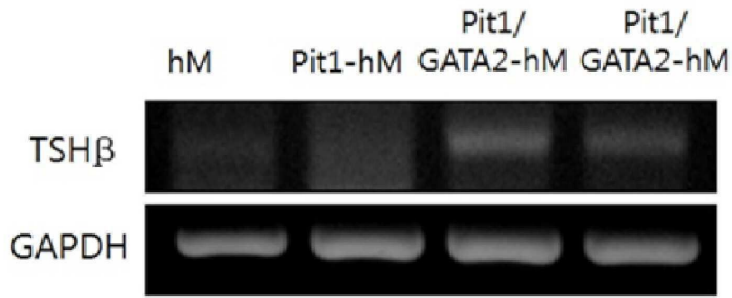
도면4



도면5



도면6



도면7

