



등록특허 10-2611109



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월07일

(11) 등록번호 10-2611109

(24) 등록일자 2023년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) C12N 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0679 (2013.01)

C12N 9/48 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0081705

(22) 출원일자 2021년06월23일

심사청구일자 2021년06월23일

(65) 공개번호 10-2022-0170629

(43) 공개일자 2022년12월30일

(56) 선행기술조사문헌

US20070128685 A1

WO2022270932 A1

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

남기택

경기도 고양시 일산동구 강송로 156, 207-902

이부현

서울특별시 종로구 자하문로 266, 301호

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 15 항

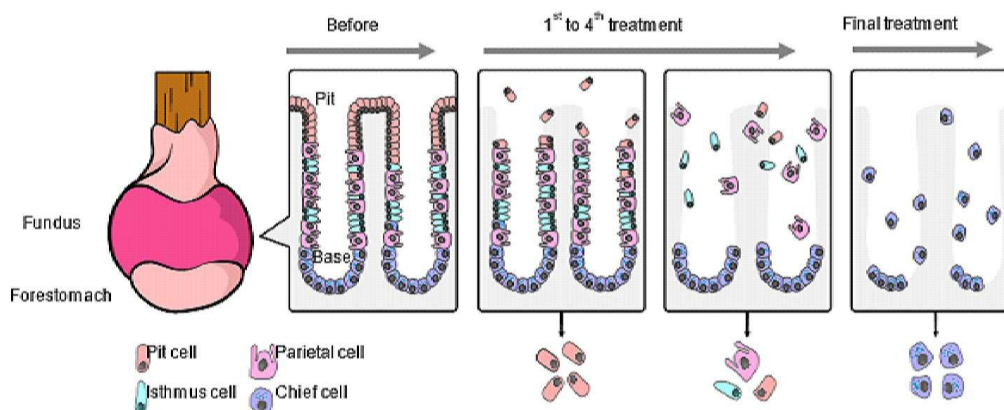
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 조직 또는 기관으로부터 세포 분리용 조성물

(57) 요약

본 발명은 생체 조직 또는 기관, 특히는 위(stomach)로부터 세포를 분리하기 위한 조성물과 이를 이용하여 세포를 분리하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2509/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130374
과제번호	2016M3A9D5A01952416
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	국가마우스표현형분석기반구축
연구과제명	유전자변형마우스 병리표현형 분석서비스시스템 구축 및 운용
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127324
과제번호	2017M3A9F3041234
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	무균 및 노토바이오텍 마우스 기반구축과 엄증성 장 질환 마우스모델에서 프로바이
오믹스의 유효성 평가	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.05.24

명세서

청구범위

청구항 1

프로테이나제 E(proteinase E)를 포함하는, 기관(organ) 또는 기관 유래 조직(tissue)으로부터 세포를 분리하기 위한 세포 분리용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 기관은 위(stomach)인, 세포 분리용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포는 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal cell) 및 협부 세포(isthmus cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 세포 분리용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 DL-디티오프레이톨(DL-Dithiothreitol), 모노나트륨 인산염(NaH_2PO_4), 디나트륨 인산염(Na_2HPO_4), 탄산수소 나트륨(NaHCO_3), 염화 나트륨(NaCl) 및 염화 칼륨(KCl)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 기본 조성물을 더 포함하는, 세포 분리용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 프로테이나제 E(proteinase E)는 상기 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mg/ml의 농도로 포함되는, 세포 분리용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 기본 조성물은 DL-디티오프레이톨(DL-Dithiothreitol) 0.01 내지 10 mM, 모노나트륨 인산염(NaH_2PO_4) 0.1 내지 10 mM, 디나트륨인산염(Na_2HPO_4) 0.1 내지 10 mM, 탄산수소 나트륨(NaHCO_3)은 1 내지 100 mM, 염화 나트륨(NaCl) 10 내지 200 mM 및 염화 칼륨(KCl) 1 내지 100 mM을 포함하는, 세포 분리용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 기본 조성물은 D-(+)-글루코스(D-(+)-Glucose), 버퍼 및 항생제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는, 세포 분리용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 세포 분리용 조성물은 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 및 콜라게나제(collagenase)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는, 세포 분리용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)은 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mM의 농도로 포함되는, 세포 분리용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 소 혈청 알부민(BSA)은 기본 조성물에 대하여 0.01 내지 10 w/v%의 농도로 포함되는, 세포 분리용 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 콜라게나제(collagenase)는 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mg/ml의 농도로 포함되는, 세포 분리용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 세포 분리용 조성물을 이용하여 분리된 기관(organ) 또는 기관 유래 조직(tissue)으로부터 세포를 분리하는 단계를 포함하는 세포 분리 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 기관 또는 조직은 인간, 소, 말, 낙타, 라마, 당나귀, 야크, 양, 돼지, 염소, 사슴, 알파카, 개, 너구리, 족제비, 여우, 고양이, 토끼, 햄스터, 기니피그, 랫트, 마우스, 다람쥐, 아메리카너구리, 잉꼬, 앵무새, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 꿩(helmed guinea fowl), 꿩, 타조, 메추라기 또는 에뮤(emu)로부터 분리된 것인, 세포 분리 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 기관은 위(stomach)인, 세포 분리 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 세포는 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal cell) 및 협부 세포(isthmus cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 세포 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 조직 또는 기관, 특히 위(stomach)로부터 세포를 분리하기 위한 조성물 및 이를 이용한 세포 분리 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 위의 상피 조직은 생리학적으로 자가 재생 조직에 해당한다. 종래에는 위선의 상부에만 줄기세포가 존재하는 것으로 파악되었으나, 최근 하부에 존재하는 줄기세포로서 주 세포(Chief cell)에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 그 기능이나 역할에 대해 뚜렷하게 구분되어 확인할 수 없었다. 위의 루멘을 구성하고 있는 세포 형태 중, 주 세포는 펩신과 게스트릭 리파제를 분비하는 세포로서, 하부(base)에 위치한다.

[0003] 위에서 항상성은 다양한 세포 계통으로 예를 들면 산 생성 벽 세포, 점액 분비 목 세포 및 지모겐 분비 주 세포

의 생성 및 유지의 균형에 의존한다. 정상 위에서 점액 분비 목 세포는 벽 세포로부터 위선의 기저부로 이동하면서 주 세포로 전이 분화(transdifferentiate)한다.

[0004] 벽 세포의 부재 시 주 세포 또한 소멸하는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 주 세포의 성숙을 조절하는 인자를 벽 세포가 분비할 것으로 예측되었다. 이러한 인자 및 신호 기작들을 밝히려는 많은 시도가 있었지만, 주 세포의 항상성 및 기능의 복잡한 기작을 구성하는 요소에 대한 연구는 아직까지 많이 진행된 바 없다.

[0005] 따라서, 최근에는 위 벽 세포 및 주 세포 등의 상관 관계를 조사하고 위의 기작 등을 연구하기 위하여, 위 기관으로부터 이들 세포를 높은 효율로 분리할 수 있는 방법 또한 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 조직 또는 기관으로부터 세포를 분리하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 조직 또는 기관으로부터 세포를 분리하는 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 1. 세포 분리용 조성물

[0010] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 기관(organ) 또는 기관 유래 조직(tissue)으로부터 세포를 분리하기 위한 조성물에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에서 상기 “조직(tissue)”은 장기 내에 존재하는 같은 종류의 세포 덩어리를 말하며, 동물 조직으로는 결합 조직, 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명에서 상기 “기관(organ)”은 다세포생물의 몸을 구성하는 단위로, 여러 가지 조직이 모여 통합된 구조를 형성하고, 특정 기능을 하는 구조를 말한다. 본 발명에서 상기 기관은 위, 심장, 신장, 간, 비장, 췌장, 소장, 대장, 폐, 뇌, 갑상선, 망막, 각막, 안구, 식도, 방광, 피부, 림프절, 골격근, 골수, 뼈 및 치아 등일 수 있고, 바람직하게는 위 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 인체를 구성하는 기관이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 세포는 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal cell) 및 협부 세포(isthmus cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 주 세포일 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 “주 세포(chief cell)”는 위 주 세포(gastric chief cell), 부갑상샘 주 세포(parathyroid chief cell) 및 경동맥체 유래 1형 주 세포(type 1 chief cells found in the carotid body)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 위 주 세포일 수 있다.

[0015] 본 발명에서 상기 “위 주 세포(gastric chief cell)”는 소화성 세포(peptic cell) 또는 위 효소원 세포(gastric zymogenic cell)이라고도 불리우며 펩시노겐 및 위장 리파아제(gastric lipase)를 분비하는 위선 세포(gastric gland cell)에 해당하며, 반추 동물에서 키모신(chymosin)을 분비하는 세포에도 해당된다.

[0016] 본 발명에서 상기 세포 분리용 조성물은 기본 조성물을 포함할 수 있다.

[0017] 기본 조성물

[0018] 본 발명에서 상기 기본 조성물은 DL-디티오프레이톨(DL-Dithiothreitol), 모노나트륨 인산염(NaH_2PO_4), 디나트륨 인산염(Na_2HPO_4), 탄산수소 나트륨(NaHCO_3), 염화 나트륨(NaCl) 및 염화 칼륨(KCl)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 기본 조성물은 DL-디티오프레이톨(DL-Dithiothreitol)을 0.01 내지 10 mM, 바람직하게는 0.1 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 0.1 내지 1 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에서 상기 모노나트륨 인산염(NaH_2PO_4)은 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 0.5 내지 5 mM, 보다 바람직하

게는 0.1 내지 2 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0021] 본 발명에서 상기 디나트륨인산염(Na_2HPO_4)은 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 0.5 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 0.1 내지 2 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 상기 탄산수소 나트륨(NaHCO_3)은 1 내지 100 mM, 바람직하게는 5 내지 50 mM, 보다 바람직하게는 5 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 상기 염화 나트륨(NaCl)은 10 내지 200 mM, 바람직하게는 20 내지 100 mM, 보다 바람직하게는 30 내지 70 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에서 상기 염화 칼륨(KCl)은 1 내지 100 mM, 바람직하게는 5 내지 50 mM, 보다 바람직하게는 5 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서 상기 기본 조성물은 글루코스, 바람직하게는 D-(+)-글루코스(D-(+)-Glucose)를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 글루코스는 1 내지 100 mM, 바람직하게는 5 내지 50 mM, 보다 바람직하게는 5 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에서 상기 기본 조성물은 버퍼를 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 버퍼는 HEPES(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonic acid) 버퍼, TNM(Tris NaCl MgCl_2) 버퍼, PBS(Phosphate Buffered Saline) 버퍼, Tris-Cl 버퍼, SSC(Saline Sodium Citrate) 버퍼, HEN(Hepes EDTA Neocuproine) 버퍼, TEN(Tris EDTA NaCl) 버퍼 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 상기 버퍼의 양은 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면, 10 내지 200 mM, 바람직하게는 20 내지 100 mM, 보다 바람직하게는 30 내지 60 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에서 상기 기본 조성물은 항생제를 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 항생제는 겐타마이신(gentamicin), 스트렙토마이신(streptomycin), 페니실린 G(penicillin G) 또는 암포테리신 B(amphotericin B) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 상기 항생제의 양은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 0.01 내지 50 mg/ml, 바람직하게는 0.05 내지 10 mg/ml, 보다 바람직하게는 0.05 내지 1 mg/ml의 양으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서 상기 기본 조성물은 용매를 잔부로 포함할 수 있고, 여기서 상기 용매는 물, 인산염 완충 용액(phosphate buffer solution; PBS), 생리 식염수(saline solution) 또는 알코올 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 제1 세포 분리용 조성물
- [0033] 본 발명의 제1 세포 분리용 조성물은 기본 조성물을 포함하고, 프로테이나제 E(proteinase E)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 본 발명에서 상기 “프로테이나제 E(proteinase E)”는 췌장 엔도펩티다제 E(Pancreatic endopeptidase E)로 알려진 효소로, EC 번호가 3.4.21.70이고, CAS 번호는 68073-27-8이며, Ala- 부위를 절단하고, 췌장액 유래 패밀리 S1의 펩티다제에 속한다.
- [0035] 본 발명의 제1 세포 분리용 조성물은 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 및 콜라게나제(collagenase)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 프로테이나제 E(proteinase E)는 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mg/ml, 바람직하게는 1 내지 5 mg/ml, 보다 바람직하게는 2 내지 3 mg/ml의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서 상기 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)은 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 1 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 1 내지 3 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에서 상기 소 혈청 알부민(BSA)은 기본 조성물에 대하여 0.01 내지 10 w/v%, 바람직하게는 0.1 내지 5 w/v%, 보다 바람직하게는 0.5 내지 2 w/v%의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에서 상기 콜라게나제(collagenase)는 1형 콜라게나제일 수 있고, 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10

mg/ml, 바람직하게는 2 내지 8 mg/ml, 보다 바람직하게는 3 내지 5 mg/ml의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 제2 세포 분리용 조성물

[0041] 본 발명의 제2 세포 분리용 조성물은 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 및 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)은 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 1 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 1 내지 3 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에서 상기 소 혈청 알부민(BSA)은 기본 조성물에 대하여 0.01 내지 10 w/v%, 바람직하게는 0.1 내지 5 w/v%, 보다 바람직하게는 0.5 내지 2 w/v%의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 제3 세포 분리용 조성물

[0045] 본 발명의 제3 세포 분리용 조성물은 염화 칼슘(CaCl_2), 염화 마그네슘(MgCl_2) 및 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 염화 칼슘(CaCl_2)은 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 0.5 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 0.1 내지 2 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에서 상기 염화 마그네슘(MgCl_2)은 기본 조성물에 대하여 0.1 내지 10 mM, 바람직하게는 0.5 내지 5 mM, 보다 바람직하게는 0.1 내지 2 mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서 상기 소 혈청 알부민(BSA)은 기본 조성물에 대하여 0.01 내지 10 w/v%, 바람직하게는 0.1 내지 5 w/v%, 보다 바람직하게는 0.5 내지 2 w/v%의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 2. 세포 분리 방법

[0051] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 세포 분리용 조성물을 이용하여 분리된 기관(organ) 또는 기관 유래 조직(tissue)으로부터 세포를 분리하는 단계를 포함하는 세포 분리 방법에 관한 것이다.

[0052] 본 발명에서 상기 세포 분리 방법은 우선 목적하는 개체로부터 분리된 기관 또는 조직을 준비하는 단계를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 상기 개체는 척추 동물이라면, 특히 제한되지 않으며, 포유류인 가축, 조류인 가축 또는 인간이 보다 바람직하다. 포유류의 가축으로서는, 소, 말, 낙타, 라마, 당나귀, 야크, 양, 돼지, 염소, 사슴, 알파카, 개, 너구리, 족제비, 여우, 고양이, 토끼, 햄스터, 기니피그, 랫트, 마우스, 다람쥐, 아메리카너구리 등을 들 수 있다. 또한, 조류의 가축으로서는, 잉꼬, 앵무새, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 꿩(helmeted guinea fowl), 꿩, 타조, 메추라기, 에뮤(emu) 등을 들 수 있으나, 바람직하게는 마우스, 랫트, 소, 돼지, 토끼 또는 인간일 수 있다.

[0054] 본 발명에서 상기 조직(tissue)은 결합 조직, 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에서 상기 기관(organ)은 위, 심장, 신장, 간, 비장, 췌장, 소장, 대장, 폐, 뇌, 갑상선, 망막, 각막, 안구, 식도, 방광, 피부, 림프절, 골격근, 골수, 뼈 및 치아 등일 수 있고, 바람직하게는 위 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 인체를 구성하는 기관이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0056] 본 발명에서 상기 세포는 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal cell) 및 협부 세포(isthmus cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 주 세포일 수 있다.

[0057] 본 발명에서 상기 주 세포는 예를 들면, 위 주 세포(gastric chief cell), 부갑상샘 주 세포(parathyroid chief cell) 및 경동맥체 유래 1형 주 세포(type 1 chief cells found in the carotid body)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 위 주 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에서 상기 준비된 조직 또는 기관에 본 발명에 따르는 제1 세포 분리용 조성물을 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 상기 조직 또는 기관에 상기 제1 세포 분리용 조성물을 처리하기 전; 후; 또는 전과 후 모두에, 상

기 조직 또는 기관을 본 발명에 따르는 제2 세포 분리용 조성물 및 제3 세포 분리용 조성물 중 적어도 하나에 침지하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0060]

본 발명의 세포 분리용 조성물을 이용하는 경우 조직 또는 기관, 특히는 위 조직 또는 기관으로부터 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal cell) 또는 협부 세포(isthmus cell) 등을 높은 효율로 분리할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061]

도 1은 본 발명에 따라 위 기관에 각 처리 후 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal cell) 및 협부 세포(isthmus cell)를 분리하는 방법의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 1에서 멸균된 봉합사를 이용하여 마우스의 식도와 위의 접합 부위를 묶어준 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 1에서 마우스의 위를 적출한 뒤 PBS 용액에 침지하여 세척하는 사진을 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 1에서 멸균된 면봉으로 적출된 마우스의 전위(Forestomach)를 밀어 위 점막이 외부로 노출되도록 뒤집어준 뒤의 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 1에서 점막이 외부로 노출되도록 뒤집어진 위의 위 저 부분(Fundus)을 멸균된 봉합사로 묶어 준 후의 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 실시예 1에서 마우스의 전위(Forestomach) 부위에 인슐린 주사기를 이용하여 제1 세포 분리용 용액을 주입하는 사진을 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 1에서 위를 제2 세포 분리용 용액에 침지하여 37도씨 인큐베이터에서 60RPM 속도로 30분간 교반시켜 분획1 용액을 얻은 사진을 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 1에서 분획1 용액에서 위를 꺼내어 제3 세포 분리용 용액에 침지하여 동일한 조건으로 30분간 교반시켜 분획2 용액을 얻은 사진을 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 1에서 분획5 용액을 100 μ m 거름망 필터를 통과시키는 사진을 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 1에서 거름망 필터를 통과시킨 분획5 용액을 원심분리하여 주 세포를 침전시킨 사진을 나타낸 것이다.

도 11은 실험예 1에서 마우스로부터 적출된 위 조직과, 분획5 용액에서 여과된 위 조직에 대하여 헤마톡실린&에 오신(H&E) 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 실험예 2에서 분획5 용액로부터 얻어진 세포에 Gif 와 GPR43을 면역 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 실험예 3에서 분획5 용액로부터 얻어진 세포와 비교예 1에서 분리된 세포에 대하여 다양한 위 상피 세포 마커의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 실험예 3의 실험 모식도를 나타낸 것이다.

도 15는 실험예 3에서 주 세포 특이적으로 RFP 형광 단백질을 발현시킬 수 있는 리포터 마우스(Mist1creEr;R26-tdTomato)의 위로부터 얻어진 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 16은 실험예 4에서 GF(germ free) 마우스와 SPF(specific pathogen free) 마우스의 위로부터 얻어진 분획1 용액, 분획3 용액 및 분획5 용액에 존재하는 세포에 대하여 다양한 위 상피 세포 마커의 발현 수준을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 실험예 6에서 SPF 마우스와 GF 마우스의 위로부터 얻어진 분획5 용액에서 얻어진 주 세포로부터 분화되는 위 상피 세포를 면역 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 실시예 2에서 제조된 위 오가노이드를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 19는 비교예 2에서 제조된 위 오가노이드를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 20은 실험예 7에서 분획5 용액로부터 얻어진 세포를 제조예 4의 배양 용액 또는 기존의 일반적 배양 용액에서 배양한 뒤 다양한 위 상피 세포 마커의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

[준비예 1] 기본 용액의 제조

멸균된 3차 증류수에 하기 표 1에 나타난 조성으로 각 성분을 첨가하여 기본 용액을 제조하였다.

표 1

기본용액	성분	구조식	작업 농도 (working concentration)
	젠타마이신(Gentamicin)		0.1mg/ml
	DL-디티오프레이톨(DL-Dithiothreitol)	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$	0.5mM
	모노나트륨 인산염(Sodium phosphate monobasic)	NaH_2PO_4	1mM
	디나트륨 인산염(di-Sodium hydrogen phosphate)	Na_2HPO_4	1mM
	탄산수소 나트륨(Sodium bicarbonate)	NaHCO_3	10mM
	염화 나트륨(Sodium chloride)	NaCl	50mM
	염화 칼륨(Potassium chloride)	KCl	10mM
	HEPES	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	50mM
	D-(+)-글루코스(D-(+)-Glucose)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	10mM

[제조예 1] 제1 세포 분리용 용액의 제조

상기 준비예 1에서 제조된 기본 용액에 하기 표 2에 나타난 성분을 첨가하여 제1 세포 분리용 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 용액은 사용 전 포어 사이즈가 0.22 μm 인 멸균의 셀룰로오스 아세테이트 막(Cellulose acetate membrane) 필터로 여과한 뒤 사용하였다.

표 2

	성분	작업 농도 (working concentration)
제1 세포 분리용 용액	EDTA	2mM / 기본 용액
	BSA	1w/v% / 기본 용액
	프로테이나제 E(Proteinase E)	2.5mg /ml 기본 용액
	콜라게나제 1형(Collagenase Type1)	4mg /ml 기본 용액

[제조예 2] 제2 세포 분리용 용액

상기 준비예 1에서 제조된 기본 용액에 하기 표 3에 나타난 성분을 첨가하여 제2 세포 분리용 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 용액은 사용 전 포어 사이즈가 0.22 μm 인 멸균의 셀룰로오스 아세테이트 막(Cellulose acetate membrane) 필터로 여과한 뒤 사용하였다.

표 3

	성분	작업 농도 (working concentration)
제2 세포 분리용 용액	EDTA	2mM / 기본 용액
	BSA	1w/v% / 기본 용액

[제조예 3] 제3 세포 분리용 용액

상기 준비예 1에서 제조된 기본 용액에 하기 표 4에 나타난 성분을 첨가하여 제3 세포 분리용 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 용액은 사용 전 포어 사이즈가 0.22 μ m인 멸균의 셀룰로오스 아세테이트 막(Cellulose acetate membrane) 필터로 여과한 뒤 사용하였다.

표 4

	성분	구조식	작업 농도 (working concentration)
제3 세포 분리용 용액	염화 칼슘 (Calcium chloride)	CaCl_2	1mM / 기본 용액
	염화 마그네슘 (Magnesium chloride)	MgCl_2	1.5mM / 기본 용액
	BSA	1%	1w/v% / 기본 용액

[제조예 4] 주 세포 배양용 용액

하기 표 5에 나타난 조성으로 기본 배양 배지에 각 성분을 첨가하여 위의 주 세포 배양용 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 용액은 사용 전 포어 사이즈가 0.22 μ m인 멸균의 셀룰로오스 아세테이트 막(Cellulose acetate membrane) 필터로 여과한 뒤 사용하였다.

표 5

	인자		작업 농도 (working concentration)
주세포 배양 용액	기본 배양 배지	Glutamax 1v/v%	37.35v/v%
		HEPES 1mM	
		Penicillin-Streptomycin 100U/ml	
		Advanced DMEM/F-12 (Gibco, # 12634028)	
	Wnt3a CM		50v/v%
	R-spondin CM		10v/v%
	mNoggin		100ng/ml
	B27		0.02v/v%
	N-acetyl Cystein		1.25mM
	hFGF10		100ng/ml
	bFGF		100ng/ml
	mEGF		25ng/ml
	HGF		200ng/ml
	gastrin		1uM
	Y-27632		10mM
	BSA		10w/v%
	Insulin-Transferrin-Selenium-Sodium Pyruvate		8ug/ml
	Hydrocortisone		1ug/ml

[실시예 1] 마우스 위로부터의 주 세포의 분리

도 1은 본 발명에 따라 위 기관에 각 처리 후 주 세포(chief cell), 벽공 세포(pit cell), 벽 세포(parietal

cell) 및 협부 세포(isthmus cell)를 분리하는 방법의 모식도를 나타낸 것이다. 구체적인 분리 방법으로는 8주령 C57BL/6 마우스를 CO₂챔버를 이용하여 안락사 시킨 뒤 복강을 절개하고, 멸균된 봉합사를 이용하여 식도와 위의 접합 부위를 묶어주었다(도 2). 위를 적출한 뒤 PBS 용액에 침지하여 세척하고(도 3), 위 저 부분(Fundus)을 제외한 전정부(Antrum/Pylorus)를 가위를 이용하여 제거하였다. 멸균된 면봉으로 전위(Forestomach) 부분을 밀어주어 위 점막이 외부로 노출되도록 뒤집어주었다(도 4). 뒤집어진 위를 제2 세포 분리용 용액에 침지하여 세척한 후 절개된 위 저 부분(Fundus)을 멸균된 봉합사로 묶어 주었다(도 5). 전위(Forestomach) 부위에 인슐린 주사기를 이용하여 제1 세포 분리용 용액을 주입하여 위를 부풀렸다(도 6). 이후, 위를 제2 세포 분리용 용액에 침지하여 37도씨 인큐베이터에서 60RPM 속도로 30분간 교반 시킨 후(도 7)(분획1 용액), 30분뒤 얻어진 분획1 용액에서 위를 꺼내어 제3 세포 분리용 용액에 침지하여 동일한 조건으로 30분간 교반 시켰다(분획2 용액). 30분뒤 분획2 용액에서 위를 꺼내어 제3 세포 분리용 용액에 침지하여 60RPM 속도로 30분간 교반 시키고(분획3 용액), 30분뒤 분획3 용액에서 위를 꺼내어 제3 세포 분리용 용액에 침지하고 동일 조건으로 교반시켰다(분획4 용액). 이후 분획4 용액으로부터 위를 꺼내어 제3 세포 분리용 용액에 침지하여 60RPM 속도로 30분간 교반 시키되, 매 5분마다 볼텍스믹서로 30초간 강하게 믹싱하였다(도 8)(분획5 용액). 얻어진 분획5 용액을 100 μ m 거름망 필터를 통과시킨 뒤(도 9) 12000RPM으로 원심분리하여 용액에 포함 되어있는 주 세포를 침전시켰다(도 10). 상층액을 제거하고 침전된 주 세포만을 수득하였다.

[실험예 1]

상기 실시예 1에서 마우스로부터 적출된 위 조직과, 분획5 용액에서 여과된 위 조직에 대하여 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 수행하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

도 11에서 보는 바와 같이, 분획5 용액에서 여과된 위 조직에서는 대부분의 위 상피 세포들이 분리 및 제거된 것을 확인할 수 있었다.

[실험예 2]

상기 실시예 1에서 얻어진 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포를 배양하여 마우스 위 조직의 주 세포 특이적으로 발현되는 단백질로 알려진 Gif 와 GPR43을 면역 염색하여 그 결과를 도 12에 나타내었다.

도 12에서 보는 바와 같이, 분리된 세포 전체에서 주 세포 특이적인 단백질인 Gif 와 GPR43가 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

이를 통해 상기 실시예 1에서 얻어진 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포는 위 유래 주 세포인 것을 알 수 있었다.

[비교예 1]

본 발명에 따른 분리 방법의 위 주 세포 분리 효율이 뛰어난을 증명하기 위하여 이하의 실험을 수행하였다. 상기 실시예 1과 같이 8주령 C57BL/6 마우스를 CO₂챔버를 이용하여 안락사 시킨 뒤 복강을 절개하고, 멸균된 봉합사를 이용하여 식도와 위의 접합 부위를 묶어주어 위를 적출한 뒤 PBS 용액에 침지하여 세척하였다. 이후, 적출된 위를 잘게 다진 후(chopping) EDTA로 배양하고 트립신 처리를 통해 단일 세포를 분리하였다.

[실험예 3]

상기 실시예 1에서 얻어진 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포와 상기 비교예 1에서 분리된 세포로부터 RNA를 추출한 뒤 위 점막을 이루는 각 상피 세포 특이적 마커를 발현하는 지 확인하여 그 결과를 도 13에 나타내었다. 단, 도 13에서 MUC5ac는 선와 세포(foveolar cell)의 마커이고, TFF2는 목 세포(neck cell)의 마커이며, Gif 및 Mist1는 주 세포(chief cell)의 마커이고, H+K+ ATPase는 벽 세포(parietal cell)의 마커이다.

도 13에서 보는 바와 같이, 실시예 1에서 회수된 세포(#2)에서는 주 세포의 마커(Gif 및 Mist1)만 발현되는 것을 확인할 수 있었으나, 비교예 1에서 분리된 세포(#1)에서는 위 점막을 이루는 상피 세포인 선와 세포(MUC5ac), 목 세포(TFF2), 주 세포(Gif 및 Mist1) 및 벽 세포(H+K+ ATPase)의 마커가 모두 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

이를 통해 본 발명에 따른 분리 방법을 이용하는 경우 위 주 세포만을 높은 효율로 분리할 수 있음을 알 수 있었다.

[실험예 4]

- [0112] 도 14는 본 실험의 모식도를 나타낸 것으로, 위에 존재하는 주 세포 특이적으로 RFP 형광 단백질을 발현시킬 수 있는 리포터 마우스(Mist1creEr;R26-tdTomato)에 대하여 타목시펜(Tamoxifen) 5mg을 3회 피하 투여한 뒤, 위를 적출하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 분획5 용액을 얻고, 이로부터 침전 및 회수된 세포를 현미경으로 관찰하였다. 그 결과는 도 15에 나타내었다.
- [0113] 도 15에서 보는 바와 같이, 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포들에서 전체적으로 RFP 형광 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0114] 이를 통해 상기 실시예 1의 방법으로 얻어진 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포는 위 유래 주 세포인 것을 알 수 있었다.
- [0116] [실험예 5]
- [0117] GF(germ free) 마우스와 SPF(specific pathogen free) 마우스에 대하여 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수행하여 분획1 용액, 분획3 용액 및 분획5 용액을 얻었다. 이후 각 분획 용액에 존재하는 세포에서 mRNA를 추출한 뒤, qRT-PCR로 다양한 위 상피 세포 마커의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 16에 나타내었다.
- [0118] 도 16에서 보는 바와 같이, 분획1 용액 및 분획3 용액 유래의 세포들에서는 주 세포 마커와 함께 그 외에 위 상피 세포의 마커가 발현되는 것을 확인할 수 있었으나, 분획5 용액 유래의 세포에서는 주 세포 마커가 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0119] 또한, SPF 마우스 유래의 분획5 용액 세포와, GF 마우스 유래의 분획5 용액 세포에서의 증식 세포 마커인 Ki67의 발현 수준을 확인한 결과, GF 마우스 유래의 분획5 용액 세포에서 Ki67가 더 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었는 바, GF 마우스 유래의 분획5 용액 세포의 줄기세포능이 SPF 마우스 유래의 분획5 용액 세포 보다 뛰어난 것을 알 수 있었다.
- [0121] [실험예 6]
- [0122] 상기 실험예 4에서 SPF 마우스와 GF 마우스로부터 얻어진 분획5 용액 유래의 주 세포를 각각 1번의 계대(passage)를 넘기고 7일간 배양한 뒤 이러한 주 세포로부터 분화되는 위 상피 세포를 면역 염색하여 그 결과를 도 17에 나타내었다.
- [0123] 도 17에서 보는 바와 같이, SPF 마우스 유래의 주 세포 보다 GF 마우스 유래의 주 세포로부터 분화되는 위 상피 세포의 수가 더 많은 것을 확인할 수 있었다.
- [0124] 이를 통해 GF 마우스 유래의 주 세포가 SPF 마우스 유래의 주 세포에 비하여 줄기세포능이 더 뛰어난 것을 알 수 있었다.
- [0126] [실시예 2] 위 오가노이드의 제작
- [0127] 상기 실시예 1에서 분리된 주 세포 펠렛을 RPMI1640 배양액 1 ml에 희석하여 세포 계수 후, 다시 원심 분리하여 세포 결집체를 매트릭젤과 혼합하고(15 μ l/well), 24웰 플레이트에 분주 후 37 °C에서 1시간 배양하였다. 이후 상기 제조예 4의 주 세포 배양 용액을 첨가하고 37°C, 가스 5 부피% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 2-3일 간격으로 신선하게 교체하며, 배양 5일 후 다른 상피 세포로의 분화 여부를 관찰하였다. 이렇게 제작된 위 오가노이드를 현미경으로 관찰한 사진을 도 18에 나타내었다.
- [0128] 도 18에서 보는 바와 같이, 버딩(budding) 형상의 위 오가노이드가 형성된 것을 확인할 수 있었다.
- [0130] [비교예 2]
- [0131] 상기 비교예 1에서 분리된 세포 펠렛을 RPMI1640 배양액 1ml에 희석하여 세포 계수 후, 다시 원심 분리하여 세포 결집체를 매트릭젤과 혼합하고, 24웰 플레이트에 분주 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 이후 EGF, 가스트린, FGF10, Noggin, Wnt3a, 및 R-spondin 보충된 배양 배지(ENRGFW 배지)를 첨가하여 37°C CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 2-3일 간격으로 신선하게 교체하였다. 이렇게 제작된 위 오가노이드를 현미경으로 관찰한 사진을 도 19에 나타내었다.
- [0132] 도 19에서 보는 바와 같이, 원형의 위 오가노이드가 형성된 것을 확인할 수 있었다.
- [0134] [실험예 7]
- [0135] 상기 실시예 1에서 얻어진 분획5 용액에서 침전 및 회수된 세포를 제조예 4의 주 세포 배양 용액 또는 기존의

일반적인 배양 용액으로 EGF, 가스트린, FGF10, Noggin, Wnt3a, 및 R-spondin 보충된 배양 배지(ENRGFW 배지)에서 37℃, 가스 5 부피% CO₂ 인큐베이터에서 5일간 배양한 후 실험예 3과 같이 RNA를 추출한 뒤 위 점막을 이루는 각 상피 세포 특이적 마커를 발현하는 지 확인하여 그 결과를 도 20에 나타내었다.

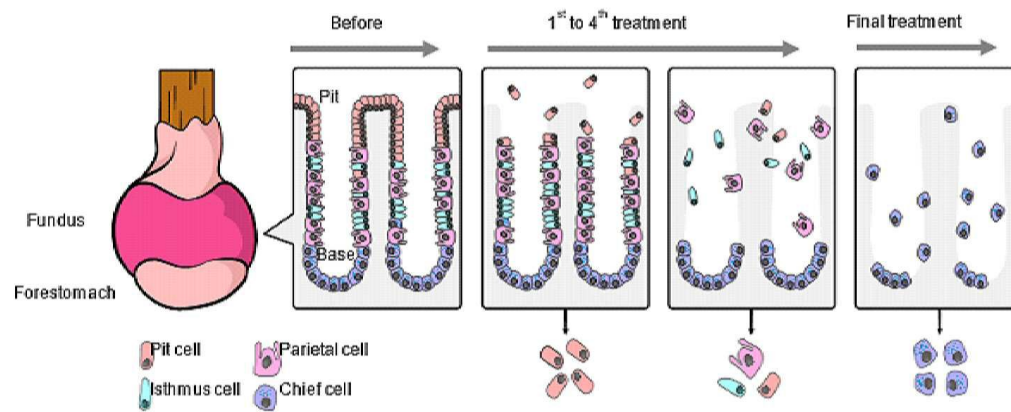
[0136] 도 20에서 보는 바와 같이, 제조예 4의 주 세포 배양 용액을 이용하여 배양한 경우(#2) 위 점막을 이루는 상피 세포인 선와 세포(MUC5ac), 목 세포(TFF2), 주 세포(Gif 및 Mist1) 및 벽 세포(H+K+ ATPase)의 마커가 모두 발현되는 것을 확인할 수 있었으나, 기존의 일반적인 배양 용액에서 배양한 경우(#1) 벽 세포로의 세포 분화가 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

[0137] 이를 통해 본 발명에 따른 배양 용액을 사용한 경우 위 주 세포로부터 위 점막을 이루는 상피 세포인 선와 세포, 목 세포, 주 세포 및 벽 세포로 효과적인 분화를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0139] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



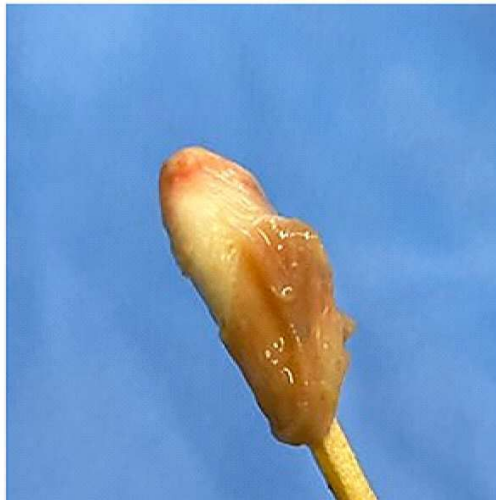
도면2



도면3



도면4



도면5



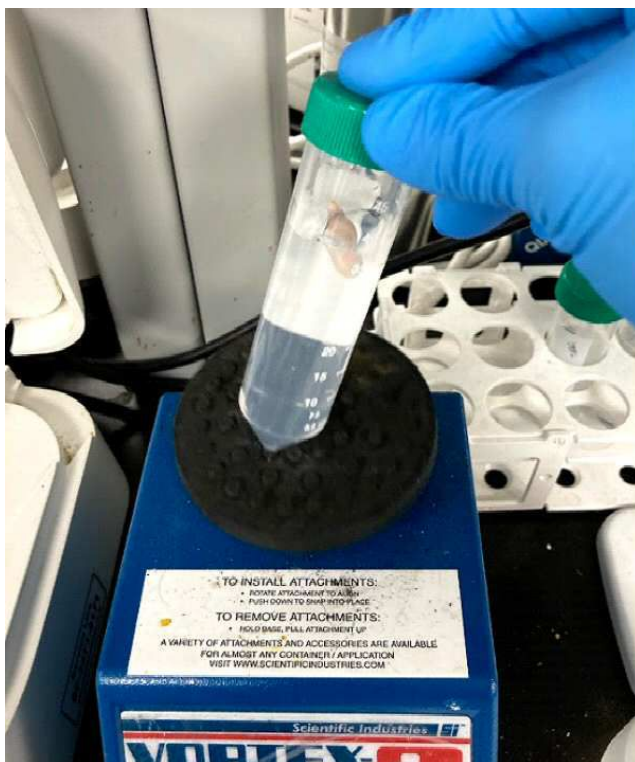
도면6



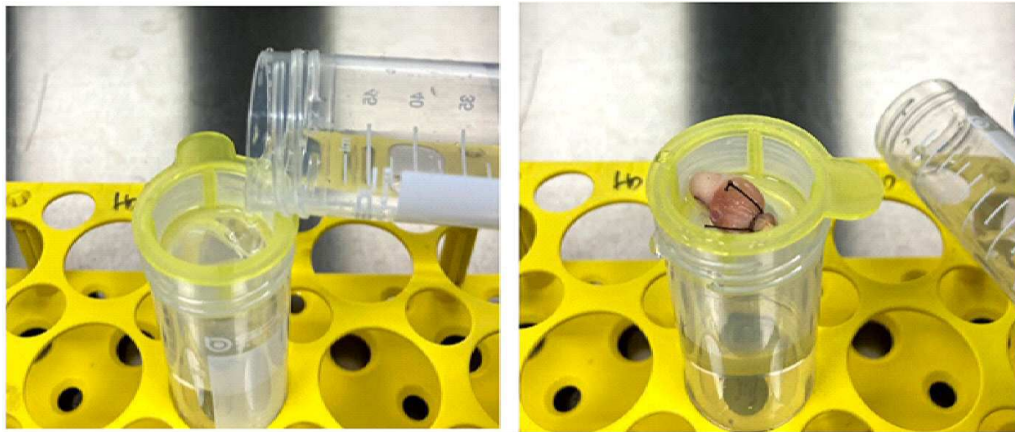
도면7



도면8



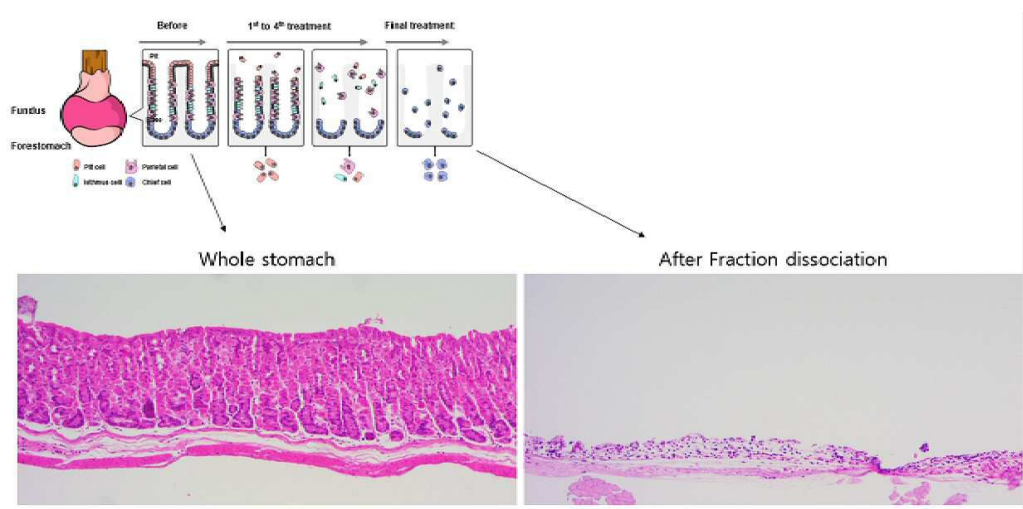
도면9



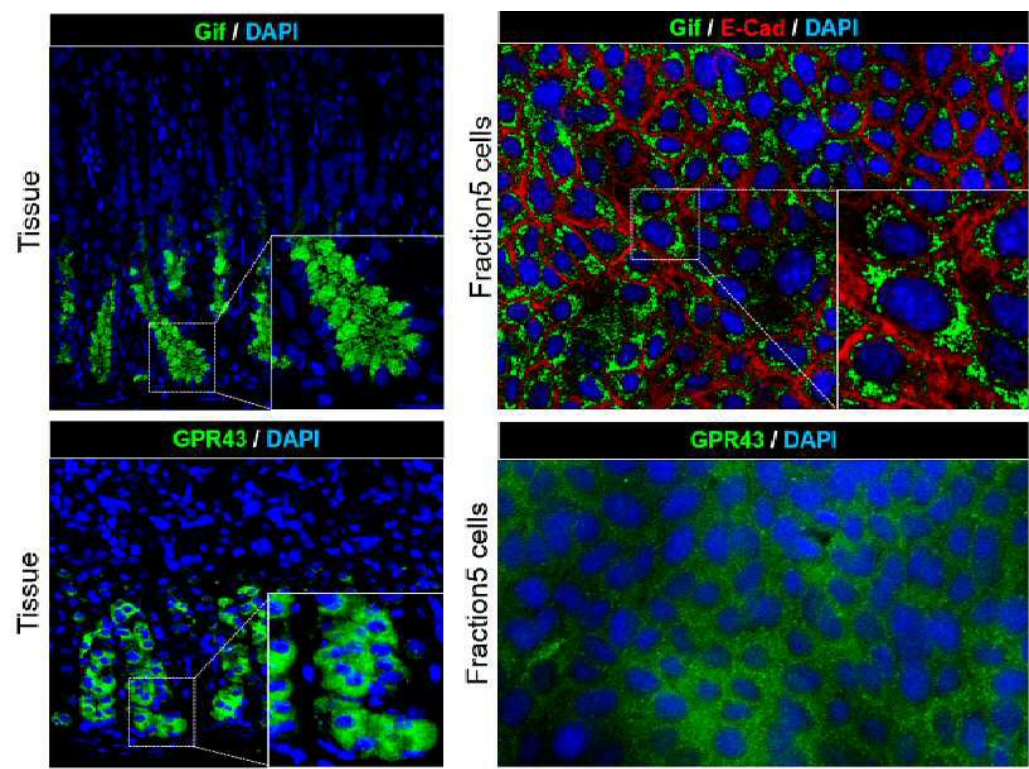
도면10



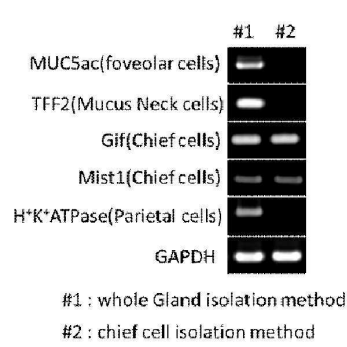
도면11



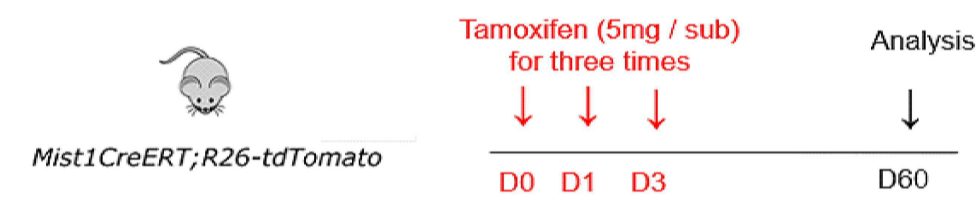
도면12



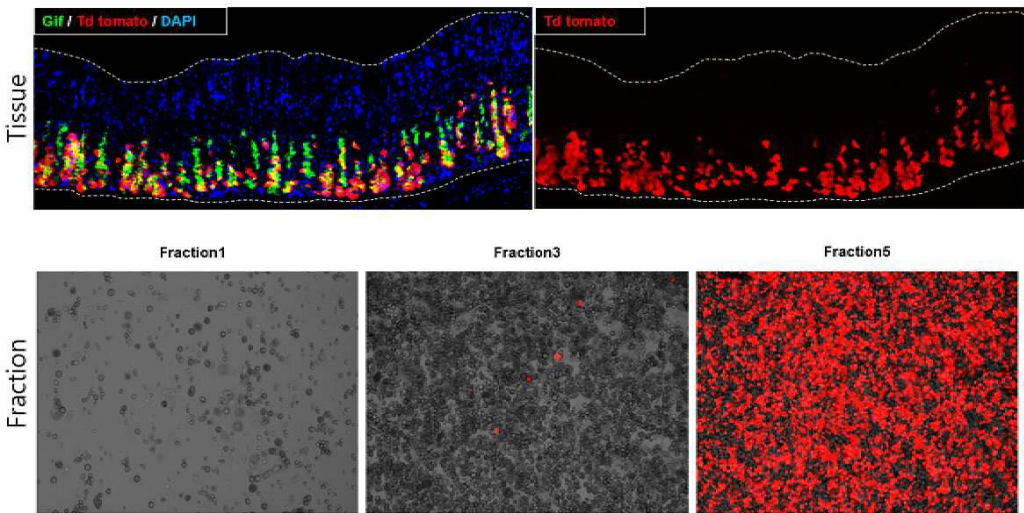
도면13



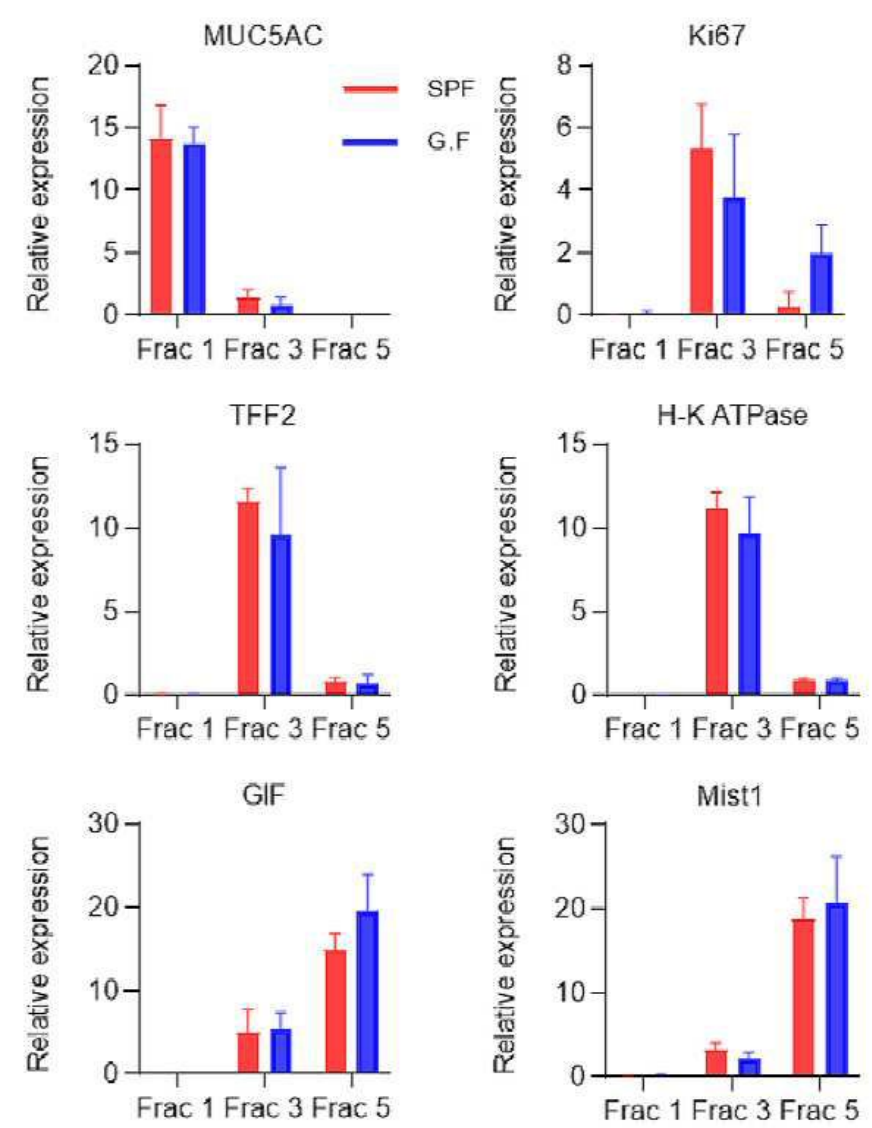
도면14



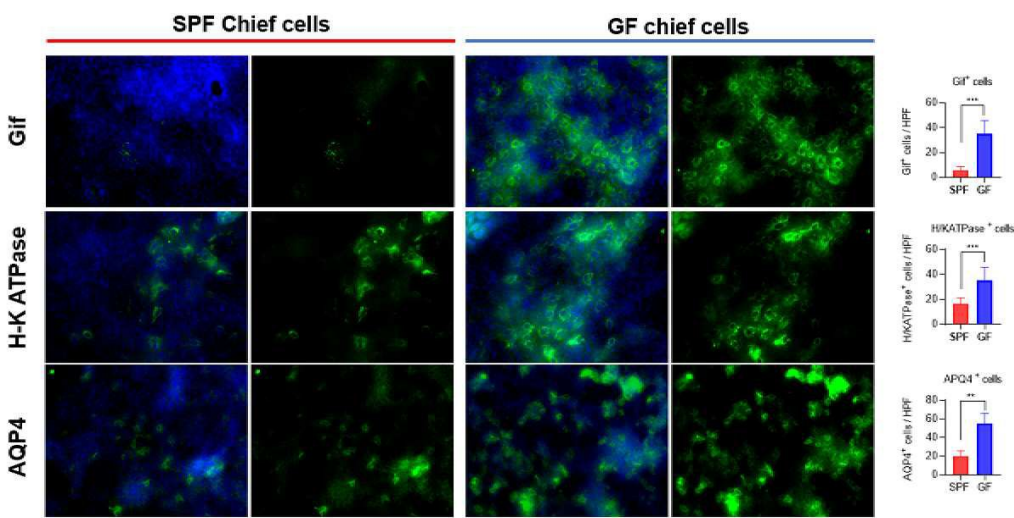
도면15



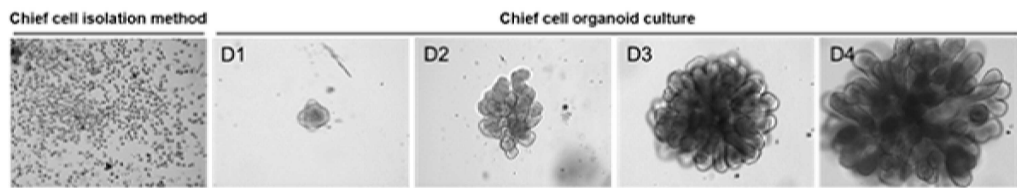
도면16



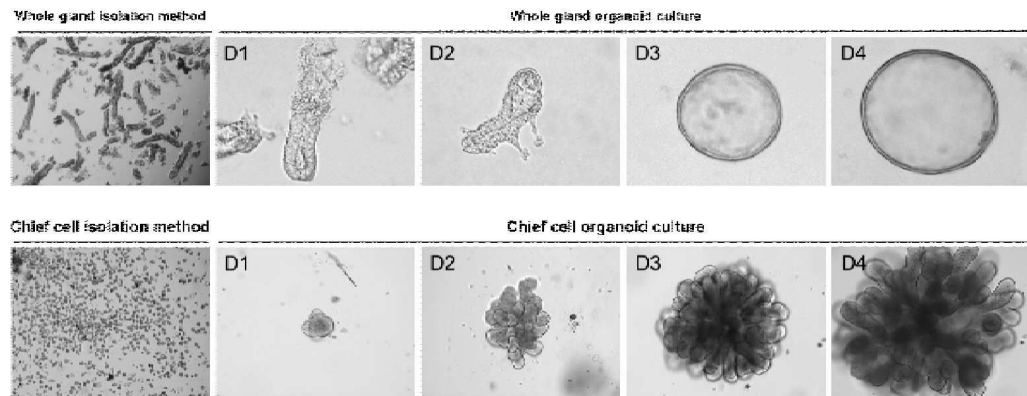
도면17



도면18



도면19



도면20

