



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0061605  
(43) 공개일자 2010년06월08일

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)  
C12N 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0120190

(22) 출원일자 2008년11월29일

심사청구일자 2008년11월29일

(71) 출원인

한국전자통신연구원

대전 유성구 가정동 161번지

(72) 발명자

정민숙

전북 정읍시 상동 대우드림체아파트 101동 706호

정문연

대전 유성구 도룡동 391 주공타운 11-104호

박선희

대전 서구 만년동 강변아파트 112-106호

(74) 대리인

권혁수, 송윤호, 오세준

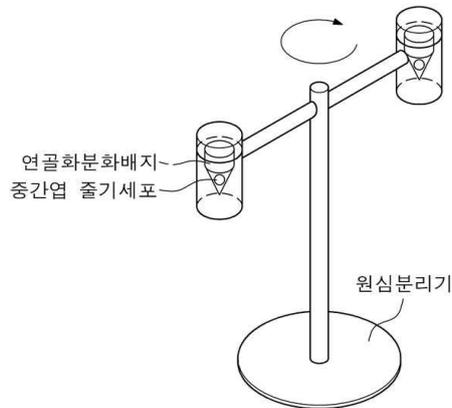
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화 방법 및 이에 의해 분화된 연골발생세포를 포함하는 연골손상 질환 치료용 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화 방법 및 이에 의해 분화된 연골발생세포를 함유하는 연골손상 질환 치료용 조성물을 제공하며, 이 방법에서는 인간의 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하여 연골 발생 세포(chondrogenic cell)로 분화한다. 이로써 고가의 사이토카인이나 성장 인자를 사용하지 않으면서도 원심력만을 주기적으로 인가함으로써 저렴하게, 연골화분화를 달성할 수 있다. 또한 본 실시예에 따른 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법에 따르면, 인간의 중간엽 줄기세포로부터 연골발생 세포를 분화할 수 있다.

**대표도** - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

중간엽 줄기 세포를 단층 배양하는 단계;

상기 단층 배양된 중간엽 줄기 세포를 3차원 배양하는 단계; 및

상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하여 연골 발생 세포(chondrogenic cell)로 분화하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 중간엽줄기세포는 인간의 중간엽줄기세포인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하는 단계는 10~200 g-force로 진행되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하는 단계는 하루에 10~30분간, 2주~4주 동안 연속하여 실시하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 인간의 배아, 성체 조직 또는 골수(bone-marrow) 유래인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 연골세포를 분화하는 방법.

### 청구항 6

중간엽 줄기 세포를 단층 배양하는 단계; 상기 단층 배양된 중간엽 줄기 세포를 3차원 배양하는 단계; 및 상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하여 연골 발생 세포(chondrogenic cell)로 분화하는 단계를 거쳐 분화된 연골 발생 세포를 포함하는 연골손상 질환 치료용 조성물.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 연골손상 질환은 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 근육조직의 손상, 족저근막염, 상완골외과염, 석회화근염, 골절의 불유합, 또는 외상에 의한 관절손상인 것을 특징으로 하는 연골손상 질환 치료용 조성물.

### 청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 중간엽줄기세포는 인간의 중간엽줄기세포인 것을 특징으로 하는 연골손상 질환 치료용 조성물.

### 청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하는 단계는 10~200 g-force로 진행되는 것을 특징으로 하

는 연골손상 질환 치료용 조성물.

**청구항 10**

제 6 항에 있어서,

상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하는 단계는 하루에 10~30분간, 2주~4주 동안 연속하여 실시하는 것을 특징으로 하는 연골손상 질환 치료용 조성물.

**청구항 11**

제 6 항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 인간의 배아, 성체 조직 또는 골수(bone-marrow) 유래인 것을 특징으로 하는 연골손상 질환 치료용 조성물.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 중간엽 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화 방법 및 이에 의해 분화된 연골발생세포를 함유하는 연골손상 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 줄기세포(stem cell)란 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 미분화 상태에서 무한 증식이 가능하고 특정 분화 자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재적 가능성을 가진 세포를 말한다.

[0003] 줄기세포는 분화 가능성에 따라 크게 배아 줄기세포(embryonic stem cell: ES cell)와 성체줄기세포(adult stem cell (조직 특이적 줄기세포(tissue specific stem cell))로 나뉜다. 배아 줄기세포는 수정란이 형성된 후 자궁내막에 착상하기 전의 초기 단계인 포배기(blastocyst) 배아 중 태아로 발생할 세포괴(inner cell mass: ICM)로부터 분리된 줄기세포로서, 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있는 세포이다.

[0004] 반면, 조직 특이적 줄기세포는 배아 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계에 나타나는 각 장기에 특이적인 줄기세포로서, 그 분화능이 일반적으로 그 조직을 구성하는 세포로만 한정(multipotent)된다. 대표적인 조직 특이적 줄기세포는 골수(bone-marrow)에 존재하는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell)와 혈구 세포 이외의 결합조직(connective tissue) 세포로 분화되는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)가 있다. 조혈 줄기세포는 적혈구, 백혈구등 각종 혈구 세포로 분화되고, 중간엽 줄기세포는 골아세포(osteoblast), 연골아세포(chondroblast), 지방세포(adipocyte) 및 근아세포(myoblast) 등으로 분화된다.

[0005] 근래에 들어 인간으로부터 배아 줄기세포 분리가 성공한 이후, 그 임상적 적용에 관심이 고조되고 있다. 줄기세포의 적용분야로서 가장 주목받고 있는 것은 세포 대체요법을 위한 세포 공급원으로서의 이용이다.

[0006] 중간엽 줄기세포에서 연골발생세포(chondrogenic cell), 더 나아가 연골세포(chondrocyte)로의 분화, 즉 연골화 분화(chondrogenic differentiation)에는, 사이토카인이나 성장인자들이 관여하고 있다. 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않고 있으나, 연골세포로의 분화에 있어서 TGF-β(transforming growth factor beta), IGF(insulin-like growth factor), BMP(bone morphogenic protein), FGF(fibroblast growth factor) 등이 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. 그러나 이러한 TGF-β와 같은 성장인자들은 그 자체가 매우 고가일 뿐만 아니라, 세포의 노화를 오히려 촉진하여 세포 생존률의 감소를 동반하여 임상적 이용에 제한이 있을 수 있다.

[0007] 최근들어 물리적, 기계적 자극을 통한 연골화분화가 보고되어지고 있으나, 종래의 기술들은 주로 인간이 아닌 동물의 중간엽줄기세포에 대한 연구에 편중되어 있는 실정이다. 인간의 중간엽 줄기세포는 동물의 중간엽줄기세포보다 분화가 더욱 어렵기 때문에, 종래의 동물 중간엽줄기세포에 대한 연구를 인간의 중간엽 줄기세포에 그대로 적용하기에 어려움이 있다. 또한 인간이 아닌 동물의 중간엽 줄기세포로부터 분화된 연골세포등을 포함하는 조성물은 인간에게 연골손상 치료용 조성물로 적용 및 주입하기가 거의 불가능에 가깝다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

- [0008] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 고가의 사이토카인이나 성장인자를 이용하지 않아 저렴한, 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 과제는 인간에게 적용 가능한 연골발생세포를 함유하는 연골손상 질환 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

**과제 해결수단**

- [0010] 상기 과제를 달성하기 위한 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법에 따르면, 중간엽 줄기 세포를 단층 배양하고, 상기 단층 배양된 중간엽 줄기 세포를 3차원 배양하고, 상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하여 연골 발생 세포(chondrogenic cell)로 분화한다.
- [0011] 상기 중간엽줄기세포는 바람직하게는 인간의 중간엽줄기세포이다. 상기 중간엽 줄기세포는 인간의 배아, 성체 조직 또는 골수(bone-marrow) 유래일 수 있다.
- [0012] 상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하는 단계는 바람직하게는 10~200 g-force로 진행될 수 있다. 상기 3차원 배양된 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하는 단계는 바람직하게는 하루에 10~30분간, 2주~4주 동안 연속하여 실시된다.
- [0013] 상기 3차원 배양은 알지네이트 비드(alginate bead) 또는 PGA(Poly(glycolic acid)) 스캐폴드(scaffold)를 이용하거나, 펠릿(pellet) 배양등을 할 수 있다. 상기 3차원 배양을 위한 3차원 구조체 생성을 위해, 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan), 히알루론산(hyaluronic acid), 덱스트란(dextran) 또는 폴리락트산 (poly(lactic acid))이 이용될 수 있다.
- [0014] 상기 다른 과제를 달성하기 위한 본 발명에 따른 연골손상 질환 치료용 조성물은 상기 방법들에 의해 분화된 연골 발생 세포를 포함한다.
- [0015] 상기 연골손상 질환은 상기 연골손상 질환은 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 근육조직의 손상, 족저근막염, 상완골외과염, 석회화근염, 골절의 불유합, 또는 외상에 의한 관절손상일 수 있다.

**효과**

- [0016] 본 실시예에 따른 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법에 따르면, 인간의 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하여 연골 발생 세포(chondrogenic cell)로 분화한다. 이로써 고가의 사이토카인이나 성장 인자를 사용하지 않으면서도 원심력만을 주기적으로 인가함으로써 저렴하게, 연골화분화를 달성할 수 있다. 또한 본 실시예에 따른 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법에 따르면 인간의 중간엽 줄기세포로부터 연골발생 세포를 분화할 수 있다.
- [0017] 또한 본 실시예에 따른 연골손상치료용 조성물은 인간의 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화(chondrogenic differentiation) 방법으로 분화된 인간의 연골 발생 세포를 포함하므로, 인간에게 바로 적용 또는 주입이 가능하다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- [0018] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 이하의 실시예는 이 기술 분야에서 통상적인 지식을 가진 자에게 본 발명이 충분히 이해되도록 제공되는 것으로서, 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 다음에 기술되는 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서는 인간의 중간엽 줄기세포의 연골화분화를 중점적으로 연구하고 실시하였으나, 인간의 중간엽 줄기세포보다 분화가 용이한 동물의 중간엽 줄기세포에 적용이 가능함은 당업자에게 자명한 것이다.
- [0019] 먼저, 중간엽 줄기세포로부터의 연골화분화를 하기 위하여, 중간엽 줄기세포를 준비한다. 상기 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 인간의 것이며, 인간의 배아, 성체 조직 또는 골수(bone-marrow) 유래일 수 있다. 상기 중간엽 줄기세포는 줄기세포 은행으로부터 얻거나, 환자의 골수 등으로부터 직접 채취 및 배양한 것일 수 있다.
- [0020] 상기 준비한 중간엽 줄기세포를 예를 들면 배양접시 안에서, 단층 배양(2차원 배양)한다. 상기 단층 배양은 중

간엽 줄기세포를 150 mm의 배양접시에  $1 \times 10^6$  세포의 농도로 소 태반 혈청과 항생제를 포함하는 성장 배지에 넣어 이루어지며, 37°C의 온도와 5%의 이산화탄소 농도를 가지는 대기 조건의 인큐베이터 안에서 세포를 배양접시에 부착시켜 배양이 이루어질 수 있다. 상기 배지는 3일에 한번씩 교환되고 1주일에 한번씩 계대 배양이 이루어질 수 있다. 이러한 단층 배양을 통해, 3차원 배양에 적합한 중간엽 줄기세포 수를 확보할 수 있다.

- [0021] 상기 단층 배양을 완료한 후에, 상기 배양접시로부터 중간엽 줄기세포를 떼어내어, 3차원 배양을 한다. 상기 3차원 배양으로는 펠렛(pellet) 형태를 만들어 배양하는 펠렛 배양, 또는 알지네이트 비드(alginate bead)나 PGA(Polyglycolide의 약자로, poly(a-hydroxy acid)의 일종인 지방족 폴리에스터) 스캐폴드(scaffold)를 이용하는 배양 등을 들 수 있다. 상기 3차원 형태를 만든 후에 연골화 분화 배지 안에 넣고, 상기 인큐베이터 안에 넣는다. 상기 연골화 분화 배지는 예를 들면 3일에 한번씩 교환될 수 있다.
- [0022] 상기 인큐베이터 안에서 연골화분화배지안에 들어있는 중간엽줄기세포의 3차원 구조물을 상기 인큐베이터로부터 꺼내 도 1과 같은 원심분리기에 넣고 바람직하게는 10~200 g-force로 회전하여 상기 중간엽 줄기세포에 원심력을 인가하여준다. 이 과정은 하루에 10~30분간, 2주~4주 동안 연속하여 실시될 수 있다. 이러한 과정으로 중간엽 줄기세포로부터, 연골 발생 세포(chondrogenic cell) 또는 연골세포 특성을 가지는 세포가 분화될 수 있다. 더 나아가 연골세포(chondrocyte)가 분화될 수 있다.
- [0023] 연골 발생 세포 또는 연골세포의 분화 여부는 사프라닌-O 및/또는 면역조직학적 분석을 이용하여 GAG 단백질과 타입 II 콜라겐 단백질의 발색 여부와, 연골세포의 특징인 연골소강(lacuna)의 형성 여부를 확인함으로써 진행될 수 있다.
- [0024] 또한 연골 발생 세포 또는 연골세포의 분화 여부는 연골 세포 분화의 표지자인 타입 II 콜라겐과 아그리칸 유전자의 발현을 확인함으로써 진행될 수 있다.
- [0025] 이러한 방법으로 분화된 연골 발생 세포 또는 연골세포는 연골손상 질환 치료용 조성물로 사용될 수 있다. 상기 PGA나 알지네이트는 생체내에서 분해되어 생체에 저절로 흡수되는 성질을 가지고 있다. 따라서 상기 PGA 스캐폴드나 알지네이트를 이용하여 분화된 연골 발생 세포 또는 연골세포는 PGA나 알지네이트가 포함된 채로 조성물로 사용될 수 있다.
- [0026] 더 나아가, 본 발명에 의한 중간엽 줄기세포를 관절형태의 삼차원 지지체 상에서 연골 발생 세포 또는 연골세포로 분화시키면 인공관절을 제조할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 방법으로 생산된 중간엽 줄기세포가 고정된 생분해성 고분자를 이용하여 치료할 수 있는 연골 질환으로는 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 근육조직의 손상, 족저근막염, 상완골외과염, 석회화근염, 골절의 불유합, 외상에 의한 관절손상 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] <실험예 1: 단층 배양>
- [0029] 인간의 중간엽 줄기세포는 LONZA (USA)에서 구입하였다. 상기 중간엽 줄기세포를 배양접시 바닥에 붙이고, 중간엽 줄기세포 성장 배지인 MSCGM bullet kit (LONZA, USA)를 넣고 단층 배양하였다. 상기 배양접시를 37°C와 5%의 이산화탄소 농도의 인큐베이터 안에 넣었다. 3일에 한번씩 배지교환을 하고, 1주일에 한번씩 계대배양을 통해 3차원 배양에 적합한 세포 수를 확보하였다.
- [0030] <실험예 2: 3차원 배양>
- [0031] 상기 실험예 1에서 배양한 중간엽 줄기세포를 0.05% 트립신-EDTA(ethylenediaminetetraacetate)를 처리하여 배양 접시로부터 떼어내었다.
- [0032] 상기 중간엽 줄기세포들 중의 일부는,  $2 \times 10^6$  세포/ml의 농도로 2% 알지네이트 용액에 현탁시키고, 세포/알지네이트 현탁액을 102 mM CaCl<sub>2</sub> 용액으로 천천히 떨어뜨려 10분간 방치하여 구형의 비드를 형성하였다.
- [0033] 상기 중간엽 줄기세포들 중의 다른 일부는, PGA 스캐폴드에 중간엽 줄기세포의 접종은 상기의 방법으로 떼어낸 중간엽 줄기세포를  $5 \times 10^6$  세포/ml의 농도로 4시간에 걸쳐 CO<sub>2</sub> 인큐베이터 안에서 배양하면서 PGA 스캐폴드에 직접 주입하였다.
- [0034] 이렇게 구성된 3차원 구성물들은 각각 연골화 분화 배지 [high glucose DMEM (hyclone, USA), ITS (ITS LIQUID MEDIA SUPPLEMENT)(Sigma, USA), 50 µg/ml ascorbic acid 2-phosphate, 100 mM dexamethasone (Sigma, USA),

40 µg/ml proline, 1.25 mg/ml BSA(bovine serum albumin) (Sigma, USA), 100 µg/ml sodium pyruvate (Sigma, USA)]에 담그고 실험에 1과 동일한 인큐베이터 안에 넣고 배양하였다.

[0035] <실험예 3-1: 원심력 인가 집단>

[0036] 실험예 2의 중간엽 줄기세포가 포함된 알지네이트 비드와 PGA 스캐폴드의 일부에 대해서는 원심력을 인가하면서 연골화분화를 유도하였다. 이 원심력 인가 집단의 중간엽 줄기세포에는 100 x g-force의 원심력을 하루에 한번씩 2주 동안 인가하였으며, 배양은 37°C의 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 3일에 한번씩 배지를 교환해 주면서 수행하였다.

[0037] <실험예 3-2: 대조군 집단>

[0038] 실험예 2의 중간엽 줄기세포가 포함된 알지네이트 비드와 PGA 스캐폴드의 다른 일부에 대해서는 원심력을 인가하지 않고, 37°C의 5%의 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 3일에 한번씩 배지를 교환해 주면서 배양만 진행하였다.

[0039] <실험예 4: 면역 조직학적 분석 1>

[0040] 실험예 3-1과 3-2에서 각각 배양한, PGA 스캐폴드에 포함된 중간엽 줄기세포들을 각각 PBS(Phosphate Buffer Saline)로 세척하고 10%의 포르말린 용액에서 고정시켰다. 고정된 시료들을 탈수시킨 후, 각각 파라핀 블록으로 만들어 4 µm 두께의 절편들로 자른 뒤 일부는 사프란닌-O 염색을 한 후 현미경 사진을 각각 도 2b와 도 2a에 나타내었다. 사프란닌-O 염색으로, 연골세포의 특성인 아그리칸 유전자 발현의 표시 인자인 GAG(glycosaminoglycan) 단백질을 붉게 발현을 시킨다. 도 2a의 원심력을 인가하지 않은 정적인 상태에서 배양되었던 대조군 집단의 중간엽 줄기 세포 사진과 도 2b의 원심력 인가 집단의 중간엽 줄기세포 집단의 사진을 비교하면, 도 2b에서 붉게 염색된 부분들이 보다 많아 GAG 단백질 발현이 증가되었음을 알 수 있으며, 연골세포의 상징 중의 하나인 라쿠나(lacuna, 연골소강)의 존재를 빈번하게 확인할 수 있다. 이로써 원심력 인가로 인해 중간엽줄기세포로부터 연골발생세포 또는 연골세포가 분화되었음을 알 수 있다. 도 2a에서는 연골세포의 분화가 관찰되지 않았으며, 중간엽 줄기 세포들 상태로 남아있음을 알 수 있다. 도 2a와 도 2b의 사진에서 진하게 나타난 부분들은 PGA들이다.

[0041] <실험예 5: 면역 조직학적 분석 2>

[0042] 연골세포 분화의 표지자인 타입 II 콜라겐의 발현을 확인하고자, 실험예 4의 파라핀 블록 절편들 중 다른 일부는 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액으로 세포내 과산화효소를 제거하고 pepsin 처리를 거친 후, 1% BSA(bovine serum albumin) 용액에 반응시켜 비특이적 반응을 억제시켰다. 마우스 항-인간 타입 II 콜라겐 항체를 이용하여 반응시켰으며, 아비딘-바이오틴 반응을 이용하여 시그널을 증폭시켰다. DAB (diaminobenzidine)에 의해 타입 II 콜라겐 단백질이 갈색으로 발색이 되고, 이를 현미경 사진을 촬영하여 도 3a와 도 3b에 각각 나타내었다. 도 3a의 원심력을 인가하지 않은 정적인 상태에서 배양되었던 대조군 집단의 중간엽 줄기 세포 사진과 도 3b의 원심력 인가 집단의 중간엽 줄기세포 집단의 사진을 비교하면, 도 3b에서 갈색으로 염색된 부분들이 보다 많아, 타입 II 콜라겐의 발현이 증가되었음을 확인할 수 있으며, 연골세포의 하나의 상징인 라쿠나(lacuna, 연골소강)의 존재를 빈번하게 확인할 수 있다. 이로써 원심력 인가로 인해 중간엽줄기세포로부터 연골발생세포 또는 연골세포가 분화되었음을 알 수 있다. 도 3a에서는 연골세포의 분화가 관찰되지 않았으며, 중간엽 줄기 세포들 상태로 남아있음을 알 수 있다.

[0043] <실험예 6: 연골세포 분화 표지 RNA 발현 확인>

[0044] 실험예 3-1의 결과로 나타날 수 있는 중간엽 줄기세포의 연골세포 분화 정도를 확인하기 위해, 연골세포 분화의 표지자인 타입 II 콜라겐과 아그리칸 유전자의 발현을 RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)을 통해 확인하였다.

[0045] 55 mM sodium citrate를 이용하여 알지네이트 비드로부터 중간엽 줄기세포를 분리해낸 후, Trizol 용액 (invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA 2 µg을 AMV reverse transcriptase (Roche)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 v표 1의 유전자 특이 primer (타입 II 콜라겐 및 아그리칸)를 이용하여 PCR 반응을 통해 증폭시켰다. 어떤 조건에서도 항상 일정한 양이 발현되는 유전자인 GAPDH에 대한 프라이머를 대조군으로 사용하였다. 상기 PCR 산물은 1.5% 아가로오즈 겔을 사용하여 전기영동하였고, 그 사진을 도 4에 나타내었다.

표 1

유전자	프라이머	염기서열 (human)
타입 II 콜라겐	센스	5'-CTCCTGGAGCATCTGGAGAC-3'
	안티센스	5'-ACCACGATCACCCCTTGACTC-3'
아그리칸	센스	5'-TGAGTCCTCAAGCCTCCTGT-3'
	안티센스	5'-CAGTGGCCCTGGTACTTGTT-3'
GAPDH	센스	5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'
	안티센스	5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'

도 4를 살펴보면, 원심력 인가 집단의 타입 II 콜라겐과 아그리칸 부분의 면적들이, 각각 대조군 집단의 타입 II 콜라겐과 아그리칸 부분의 면적들에 비해 넓으므로, 원심력 인가 집단에서 타입 II 콜라겐과 아그리칸의 발현이 더 많음을 알 수 있다. 이로써 원심력 인가로 인해 중간엽줄기세포로부터 연골발생세포 또는 연골세포가 분화되었음을 알 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 연골화분화를 위해 중간엽줄기세포에 원심력을 인가하는 모습을 도시한 그림이다.

도 2a는 본 발명의 실험예 3-2의, 원심력을 인가하지 않은 대조군 집단의 중간엽 줄기세포를 조직학적으로 사프라닌-0로 염색한 사진이다.

도 2b는 본 발명의 실험예 3-1의 원심력 인가집단의 중간엽 줄기세포를 조직학적으로 사프라닌-0로 염색한 사진이다.

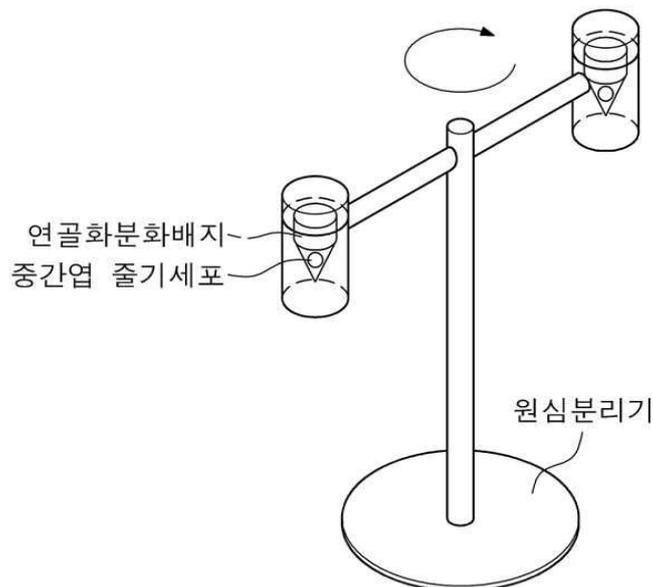
도 3a는 본 발명의 실험예 3-2의, 원심력을 인가하지 않은 대조군 집단의 중간엽 줄기세포를 면역조직학적으로 분석한 사진이다.

도 3b는 본 발명의 실험예 3-1의 원심력 인가집단의 중간엽 줄기세포를 면역조직학적으로 분석한 사진이다.

도 4는 본 발명의 원심력 인가 집단과 대조군 집단의 중간엽 줄기세포들의 RNA를 타입II콜라겐 및 아그리칸 프라이머로 RT-PCR한 결과를 나타낸 전기영동 사진이다.

**도면**

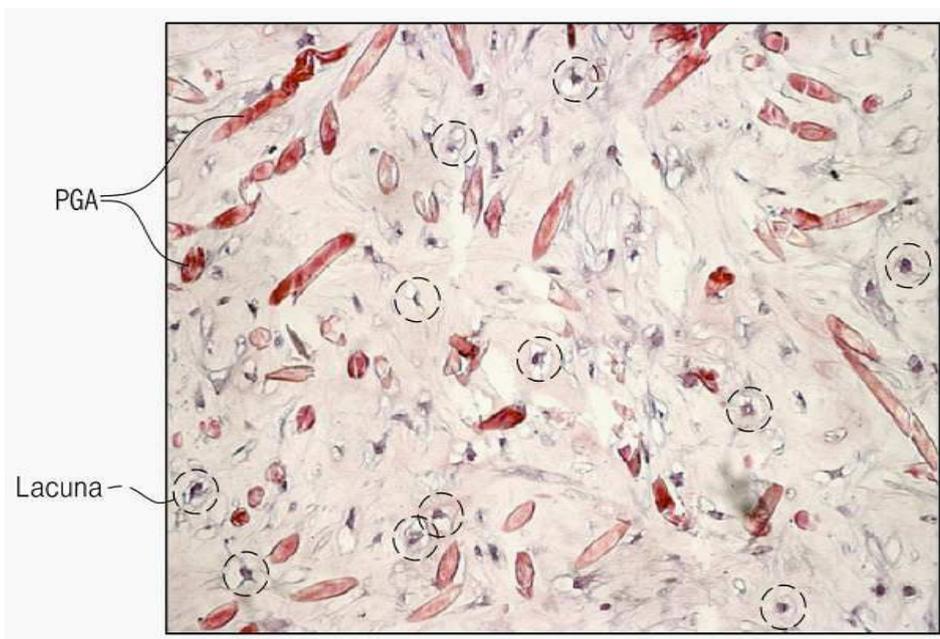
도면1



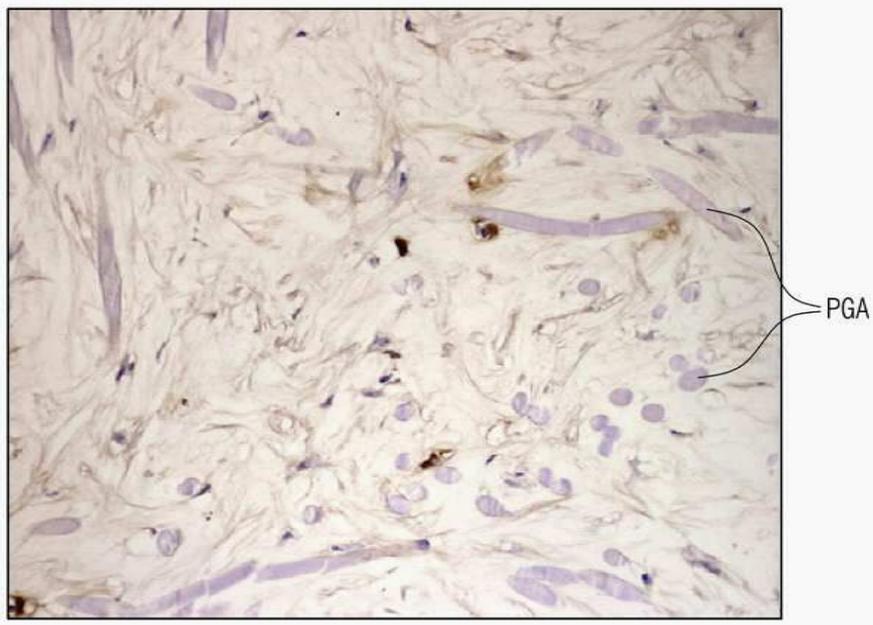
도면2a



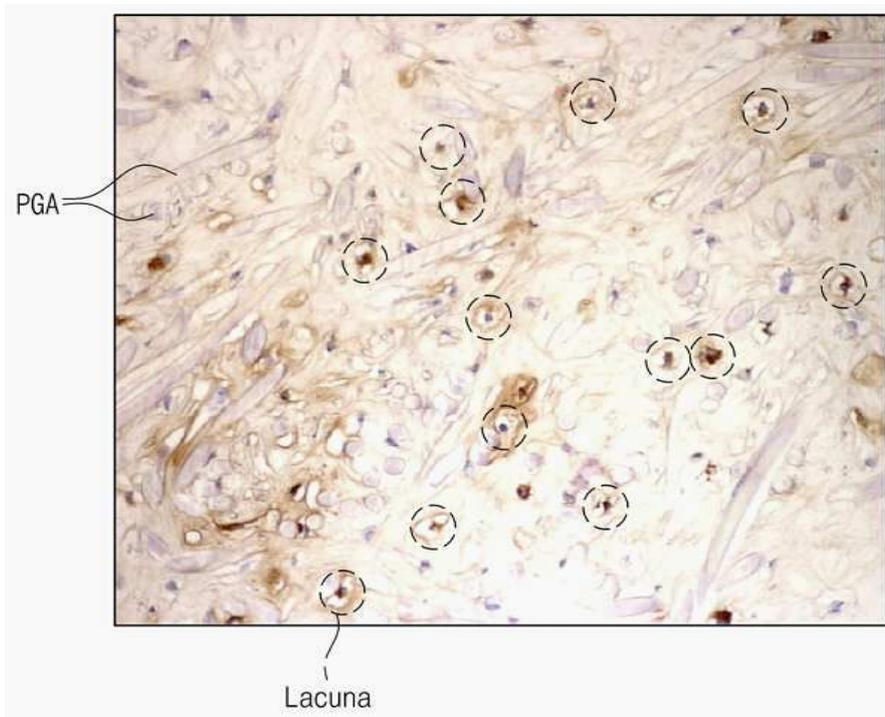
도면2b



도면3a



도면3b



도면4

