

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0133892
(43) 공개일자 2023년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61P 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61P 19/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7028336
(22) 출원일자(국제) 2022년02월18일
심사청구일자 2023년08월21일
(85) 번역문제출일자 2023년08월21일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/008103
(87) 국제공개번호 WO 2022/177032
국제공개일자 2022년08월25일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-024794 2021년02월19일 일본(JP)

(71) 출원인
퓨렉 가부시키가이샤
일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1
(72) 발명자
다케타니 다케시
일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1 고쿠리
쓰 다이가쿠호진 시마네다이가쿠 나이
오다 야스아키
일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1 고쿠리
쓰 다이가쿠호진 시마네다이가쿠 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리어나

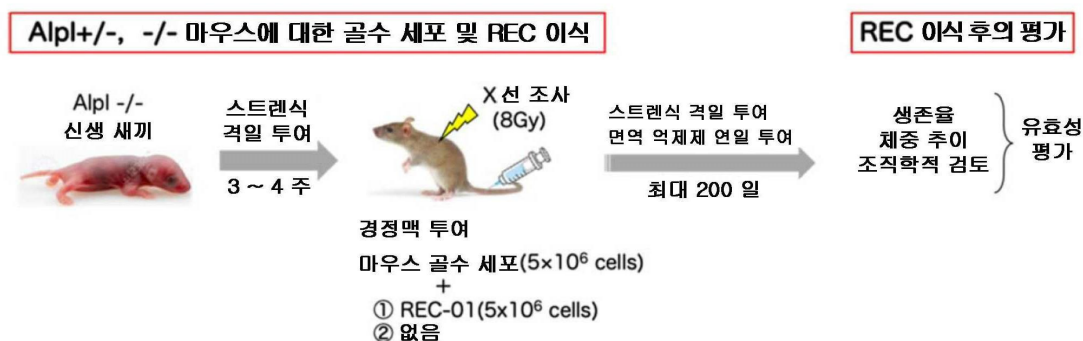
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 골질환 치료용 의약 조성물

(57) 요약

고순도 간엽계 줄기세포를 포함하는, 대상에 있어서 골아세포를 증가시키는 의약 조성물로서, 당해 대상에 대한 조혈 줄기세포 이식과 병용하도록 사용되는, 상기 의약 조성물.

대표도



(72) 발명자

이요쿠 유미

일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89번치 1 퓨렉 가
부시키가이샤 나이

스야마 다카시

일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89번치 1 퓨렉 가
부시키가이샤 나이

명세서

청구범위

청구항 1

고순도 간엽계 줄기세포를 포함하는, 대상에 있어서 골아세포를 증가시키는 의약 조성물로서, 당해 대상에 대한 조혈 줄기세포 이식과 병용하도록 사용되는, 상기 의약 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

조혈 줄기세포가 제대혈 유래의 것인, 의약 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

조혈 줄기세포가, 대상 이외의 도너의 골수 유래의 것인, 의약 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상이 선천성 골계통 질환 환자인, 의약 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

선천성 골계통 질환이 저포스파타아제증인, 의약 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

고순도 간엽계 줄기세포가, 인간 골수 유래의 고속 증식성 간엽계 줄기세포인, 의약 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

고속 증식성 간엽계 줄기세포가, LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 것인, 의약 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기세포는, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 세포 집단인, 의약 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기세포는, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 세포 집단인, 의약 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다

청구항 10

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

세포는, 대상의 체중 1 kg 당 1×10^7 cells 을 주 1 회 투여하고, 이것을 4 회 반복하도록 사용되는, 의약 조성물.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

세포가 적어도 1×10^6 cell/ml 의 농도로 사용되는, 의약 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 와 불일치인, 의약 조성물.

청구항 13

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 의 3 좌 6 항원 중 적어도 4 항원과 일치하는, 의약 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 의 3 좌 6 항원 중 적어도 3 항원과 일치하는, 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 골질환 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 저포스파타아제증 (Hypophosphatasia, HPP) 은, ALPL 유전자 변이에 의한 상염색체 열성 유전증으로, 알칼리포스파타아제 (ALP) 의 결손에 의한 석회화 장애를 일으킨다. 그리고, ALP 의 활성 저하에 수반하여 축적되는 피로인산이 석회화를 장애하는 것이나, 국소의 인 농도가 저하됨으로써, 뼈의 저석회화, 구루병형 변화가 야기된다.

[0003] 혈청학적으로는, ALP 의 기질인 phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate (피로인산), pyridoxal 5'-phosphate 의 상승이 보인다. 골 관련인 임상 이미지로서, 뼈의 만곡, 이(易)골절성, 치아의 탈락 등이 확인되고, 중추 신경 증상으로는, 경련이나 난청, 발달 지체가 확인된다. 중증례는 치사적인 임상 경과를 거쳐가거나, 경증례에서도 일상 생활이 제한되는 경우가 많다. 특히 늑골을 비롯한 흉곽의 저형성에 의한 호흡 장애가 있는 경우, 생명 예후가 불량하다. 가장 중증인 주산기에 발증하는 환자의 사망률은 50 ~ 100

% 이다. 현재 일본내 환자수는 100 ~ 200 명으로 여겨지고, 효과적인 치료법은 미확립이다 (대증 요법만).

[0004] 현재 행해지고 있는 HPP 의 치료법은, ALP 효소 보충 요법이다. 이 효소 제제를 투여함으로써 뼈의 석회화가 개선되고, 중증 HPP 환자의 생명 예측이 개선될 뿐만 아니라, 경증례에서도 운동 기능이 회복될 수 있다.

그러나, 보충 요법이기에 때문에 평생에 걸쳐 정기적으로 투여할 (주 3 회 피하 주사) 필요가 있는 것, 효소에 대한 항체가 산생되어 효과가 줄어들고 약해지는 것, 뇌혈액 관문을 통하지 않기 때문에 중추 신경계 증상은 개선되지 않는 것, 의료비가 고액일 것 (가장 투여량이 적은 환자라도 연간 2,000 만엔 이상) 등의 문제점이 있다.

[0005] 그런데, 간엽계 줄기세포 (Mesenchymal Stem Cell : MSC) 는, 골수, 지방 조직, 태반, 치수 (齒髓), 양막 등 다양한 조직으로부터 비교적 쉽게 분리 가능한 세포이다. 그 조직 수복 작용, 면역 억제능에 주목하여, 다수의 질환을 대상으로 하여 수백의 임상 시험이 진행 중이다. 그러나, 후기 임상 단계에 이른 시험은 소수이며, 또 각국 규제 당국에 의해 승인된 것은, 일본에 있어서의 중증 GvHD 를 대상으로 한 Temcel (JCR-Pharma 사), 2019년 당초에 유럽에서 승인 추천을 받은 Tigenix 사의 Alfisel (대상은 크론병에서 유래하는 항문 열상) 등, 수가 한정되어 있다.

[0006] 이와 같은 MSC 의 실용화의 곤란함의 원인으로는, 투여하는 세포를 대량으로 또한 균질하게 제조함에 있어서의 품질 관리가 어렵고, 또 투여 후 환부로 송달의 어려움, 비침습적인 세포 트래킹 기술의 결여 (체내 동태의 파악 곤란) 등, 여러 가지 원인이 지적되고 있다.

[0007] 이전에, 본 발명자들은, LNGFR (CD271) 및 Thy1 (CD90) 의 2 종의 항체를 사용함으로써 매우 효율적으로 인간 MSC 를 선별할 수 있음을 분명히 하여, 골수, 말초혈, 태반용모막 및 치수로부터 셀 소터를 사용해서 인간 MSC 를 직접 분리하는 기술을 개발하였다. 이 기술에 의해 얻어진 세포군 (Rapidly Expanding Clone : REC) 은, 우수한 증식능, 분화능 및 유주능을 나타내고, 고품질이며 또한 고순도의 인간 MSC 인 것이 확인되었다 (특허문헌 1, 비특허문헌 2).

[0008] 또한, 본 발명자에 의해, 「인간 줄기세포를 사용하는 임상 연구에 관련된 지침」에 기초하여, 중증 HPP 환자에 대한 골수 이식 병용 동종 골수 유래 MSC 이식 치료가 행해졌다 (비특허문헌 1). 이 임상 연구에서는, 골수 이식에 의해 도너 유래의 면역 세포 (골수세포) 로 치환한 후에 MSC 를 이식함으로써, 이식한 MSC 의 일부가 거절되는 일 없이 골수에 정착되어 정상 뼈가 형성되는 것이 시사되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 일본 특허 제6363950호

(특허문헌 0002) 국제 공개 제2016/017795호 팜플렛

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) T. Taketani et al., "Ex vivo expanded allogeneic mesenchymal stem cells with bone marrow transplantation improved osteogenesis in infants with severe hypophosphatasia," Cell Transplant., vol.24, no.10, pp.1931-1943, 2015

(비특허문헌 0002) Mabuchi Y et al., "LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells". Stem Cell Reports 1 (2) : 152-165, 2013

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 골수 이식과 병용한 동종 골수 유래 MSC 이식에 의한 임상 상의 저명한 효과로서, (i) 뼈의 석회화 및 생명 예측의 개선, (ii) 중추 신경계 증상의 회복 및 정신 발달을 들 수 있다. 그러나, MSC 이식 후의 환자에 있어

서 정상적인 골 구조를 형성시켜, 한층 더 효능을 얻기 위해서는, 보다 높은 유주능이나 골 분화능을 가진 고순도의 MSC 를 사용하는 것이 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명자는 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토를 실시한 결과, 고순도 간엽계 줄기세포의 투여와 함께 조혈 줄기세포 이식을 병용함으로써, 상기 과제를 해결하는 것에 성공하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0013] 즉, 본 발명은 이하와 같다.
- [0014] [1] 고순도 간엽계 줄기세포를 포함하는, 대상에 있어서 골아세포를 증가시키는 의약 조성물로서, 당해 대상에 대한 조혈 줄기세포 이식과 병용하도록 사용되는, 상기 의약 조성물.
- [0015] [2] 조혈 줄기세포가 제대혈 유래의 것인 [1] 에 기재된 의약 조성물.
- [0016] [3] 조혈 줄기세포가, 대상 이외의 도너의 골수 유래의 것인 [1] 또는 [2] 에 기재된 의약 조성물.
- [0017] [4] 대상이 선천성 골계통 질환 환자인 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 의약 조성물.
- [0018] [5] 선천성 골계통 질환이 저포스파타아제증인 [4] 에 기재된 의약 조성물.
- [0019] [6] 고순도 간엽계 줄기세포가, 인간 골수 유래의 고속 증식성 간엽계 줄기세포인 [1] ~ [5] 중 어느 한 항에 기재된 의약 조성물.
- [0020] [7] 고속 증식성 간엽계 줄기세포가, LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성 (共陽性) 인 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 것인, [6] 에 기재된 의약 조성물.
- [0021] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다
- [0022] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다
- [0023] [7-1] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기세포는, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 세포 집단인, [6] 에 기재된 조성물.
- [0024] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다
- [0025] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다
- [0026] [7-2] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기세포는, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 세포 집단인, [6] 에 기재된 조성물.
- [0027] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다
- [0028] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다
- [0029] [8] 세포는, 대상의 체중 1 kg 당 1×10^7 cells 을 주 1 회 투여하고, 이것을 4 회 반복하도록 사용되는, [1] ~ [7-2] 중 어느 한 항에 기재된 의약 조성물.
- [0030] [9] 세포가 적어도 1×10^6 cell/ml 의 농도로 사용되는, [8] 에 기재된 의약 조성물.
- [0031] [10] 고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 와 불일치인, [1] ~ [9] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0032] [11] 고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 의 3 좌 6 항원 중 적어도 4 항원과 일치하는, [1] ~ [9] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0033] [12] 고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 의 3 좌 6 항원 중 적어도 3 항원과 일치하는, [1] ~ [9] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

발명의 효과

- [0034] 본 발명에 의해, 대상에 있어서 골아세포를 증가시키는 것이 가능해졌다. 그 결과, 본 발명의 의약 조성물

을, 저포스파타아제증 등의 선천성 골계통 질환에 대하여 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1 은, 저포스파타아제증 병태 모델 마우스에 대한 고순도 간엽계 줄기세포 REC-01 의 유효성 검증을 위한 이식 시험 방법을 나타내는 도면이다.
- 도 2 는, 아스포타제 알파 (스트렌식 (등록상표)) 투여에 의한 $Alpl^{-/-}$ 마우스의 생존 곡선 (연명 효과의 검증 결과) 을 나타내는 도면이다.
- 도 3 은, 세포 이식 후의 각 마우스의 체중의 추이를 나타내는 도면이다. 도면은, 세포 이식 후의 $Alpl^{-/-}$ 마우스 (좌), 및 $Alpl^{+/-}$ 마우스 (정상군 : 우) 의 체중 경시적 변화이다. 비교 대상으로서 사용한 $Alpl^{+/-}$ 마우스는, $Alpl^{-/-}$ 의 littermate (동복자) 이다. 세로축 : 이식일 당일의 체중을 1 로 하여 이식 후의 체중의 추이를 비 (比) 로 나타내었다. 가로축 : 이식 후의 일수를 나타내었다.
- 도 4 는, REC-01 이식 2 개월 후의 골수내 ALP 활성의 검토 결과를 나타내는 도면이다. 도면은, 마우스 대퇴골의 동결 절편의 ALP 염색 이미지를 나타낸다. 마우스 골수세포만을 투여한 $Alpl^{-/-}$ 마우스 (좌), 마우스 골수세포+REC01 을 투여한 $Alpl^{-/-}$ 마우스 (중간 좌측 및 중간 우측), ALP 활성의 포지티브 대조군인 $Alpl^{+/-}$ 마우스 (우) 화살표 (청색) 의 지점은, ALP 염색 양성 (청자색) 인 것을 나타내었다.
- 도 5 는, REC-01 이식에 의한 장기 생착과 골수내 ALP 활성을 나타내는 도면이다. 도면은, 이식 3 개월 후의 마우스 대퇴골 및 두개골 동결 절편의 ALP 염색 이미지를 나타낸다. 화살표 (청색) 는 ALP 염색 양성 부위 (청자색)
- 도 6 은, REC-01 이식의 유무에 따른 $Alpl^{-/-}$ 마우스의 생존 곡선을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 1. 개요
- [0037] 일반적으로 세포 치료에 의한 치료 효과의 메커니즘으로는, 레시피엔트의 조직 및 장기에 이식 세포가 삽입되어, 레시피엔트의 세포를 이식 세포로 치환함으로써 기능 회복을 실시하는 세포 치환 (Cellular Replacement) 에 의한 것과, 이식 세포가 산생하는 영양 인자, 사이토카인 및 세포외 기질의 작용에 의해, 호스트의 세포에 대한 보호 효과 또는 조직의 수복 능력이 높아져 기능 회복이 이루어지는 영양 효과 (Trophic Action) 를 기대하는 것으로 크게 구별된다.
- [0038] 저포스파타아제증 (HPP) 의 치료에서는 세포 치환이 필수이며, 환부로의 세포의 도달과 장기적인 생존과 분화가 가장 중요한 요소가 된다. 또한, 본 질환은 전신 증상을 나타내는 골형성 부전 질환이기 때문에, 경정맥적 전신 투여가 필요해진다. 그러나, 통상적인 간엽계 줄기세포 (MSC) 는 대부분이 유주능을 상실하고 있어, 대량의 세포를 경정맥 투여한 경우에 폐 색전이나 혈전 형성 등의 부작용을 일으킨다는 위험성이 있어, 1 회에 이식 가능한 세포수에 한계가 있다. 또한, HPP 외에도, 치료법 미확립의 유전적 골형성 질환이 450 종류 이상 존재한다. 선천성 골계통 질환 (Congenital Skeletal Diseases : CSD) 은 확립된 치료법이 없어, 치사적인 경과를 취하거나, 현저하게 일상 생활이 장애를 받고 있다. CSD 에서는 뼈를 형성하는 골아세포의 기원인 MSC 가 골화되는 경로가 장애되고 있기 때문에, 골화능이 정상적인 동종 MSC 에 의한 골 재생 의료는 유망한 치료법으로 생각된다.
- [0039] 본 발명은, 간엽계 줄기세포 중에서도 분화능 및 유주능이 우수함과 함께, 고속 증식능을 갖는 간엽계 줄기세포, 즉 고순도 간엽계 줄기세포에 주목하여 완성된 것으로, 골아세포를 증가시키고, 나아가 골 질환에 대한 의약으로서 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 즉, 본 발명은, 고순도 간엽계 줄기세포를 포함하는, 대상에서 골아세포를 증가시키는 의약 조성물을 제공한다. 그리고, 본 발명의 의약 조성물은, 대상에 대한 조혈 줄기세포 이식과 병용하도록 사용된다.
- [0041] 2. 고순도 간엽계 줄기세포
- [0042] 본 발명에 있어서 사용되는 간엽계 줄기세포는, 중배엽성 조직 (간엽) 에서 유래하는 체성 줄기세포로, 뼈나 혈관, 심근의 재구축 등의 재생 의료로의 응용이 기대되고 있다.
- [0043] 간엽계 줄기세포는, 골수, 지방 조직, 태반 조직, 치수 또는 제대 조직 등의 다양한 조직으로부터 취득할 수 있

다. 그 정제 프로세스는, 예를 들어 이하와 같다.

- [0044] 인간 또는 비인간 포유 동물 (예를 들면, 소, 원숭이, 고양이, 마우스, 래트, 모르모트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양, 말, 및 염소 등)로부터 채취한 소량의 지방편을 효소 처리하여 얻어지는 세포형의 혼합 집단으로부터, 원심 분리에 의해 부유성의 지방 세포 집단을 분리하고, 배양액을 채운 배양기의 천장면에 접촉시킨 상태로 가만히 정지시켜 두었을 때에 하부 상면 (床面) 에 침강하여 증식되는 섬유아형 세포를 계대 배양에 의해 증식시킨다.
- [0045] 또, 본 발명에 있어서는, iPS 세포 유래의 간엽계 줄기세포나, 시판되는 간엽계 줄기세포를 사용하는 것도 가능하다.
- [0046] 본 발명자는, 이전의 연구에 의해, LNGFR (CD271) 이 양성인 간엽계 줄기세포 (CD271+ 세포), 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 간엽계 줄기세포 (CD271+CD90+ 세포) 중에서, 증식이 빠른 고속 증식성의 세포 클론 (Rapidly Expanding Clone : REC) 을 단리하는 것에 성공하였다. 이 REC 클론은, 본 발명에 있어서의 「고순도 간엽계 줄기세포」의 일종이다.
- [0047] REC 는, 96 웰 플레이트에 1 개씩 세포를 파종하여 배양했을 때에, 2 주간에 컨플루언트에 도달할 수 있는 세포이고, 종래법으로 얻은 간엽계 줄기세포와 비교하여, 증식능, 분화능 및 유주능이 모두 1000 배 이상의 능력을 갖는다. 그리고, 특히 유주능을 유지하고 있기 때문에, 경정맥내 투여가 가능해져, 골 및 연골 형성 부전증 등의 위독한 전신성 질환에 적용할 수 있다.
- [0048] 고순도 간엽계 줄기세포의 일종인 REC 는, 골수의 단핵구 획분으로부터, 셀 소터로 LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy1 (CD90) 이 공양성인 세포를 분리하고, 1 세포씩 플레이트에 파종하여 증식능이 빠른 고속 증식성의 MSC 만을 선별하기 때문에, 매우 균일한 세포 집단이다.
- [0049] 이와 같이 하여 분리 정제한 REC 는, 분화능, 증식능, 유주능을 유지한 채, 단일의 세포로부터 1012 개를 초과하여 증폭 가능하다. 특히 유주능을 유지하고 있기 때문에, 경정맥내 투여가 가능해져, 골·연골 형성 부전증 등의 위독한 전신성 질환에 대한 응용을 기대할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서는, 상기 REC 클론 중, 분화능이나 증식능에 있어서 편차가 적은 세포 클론을 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 간엽계 줄기세포를 얻으려면, 예를 들면 W02009/31678호에 기재된 방법을 따를 수 있다. 그 방법의 개요는 이하와 같다.
- [0052] 먼저, 인간 간엽계 줄기세포가 포함되는 세포 집단으로부터, LNGFR (CD271) 이 양성 (CD271+), 또는 CD271 및 CD90 이 공양성 (CD271+CD90+) 인 세포 분획을 선별함으로써, 간엽계 줄기세포를 고도로 농축시킨다. 또한, 인간 간엽계 줄기세포가 포함되는 세포 집단에 혈구계 세포가 포함되는 경우에는, 비혈구계의 세포를 선별하기 위해서, CD45 및 CD235a 가 공음성 (CD45-CD235a-) 인 세포를 선별하는 공정을 추가해도 된다.
- [0053] 간엽계 줄기세포가 포함되는 세포 집단은, 플로 사이토메트리나 어피니티·크로마토그래피에 의해 조제할 수 있다.
- [0054] 이 세포 집단을 얻기 위한 재료는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 골수, 지방 조직, 제대혈, 말초혈 (G-CSF 투여 후의 말초혈을 포함한다) 등을 들 수 있다. 또한, 골수는, 척추, 흉골, 장골 등의 골수를 사용하면 된다. 또, 세포로서, ES 세포 및 iPS 세포를 들 수도 있다.
- [0055] 세포 조제시, 재료가 간엽계 줄기세포를 포함시켜 넣은 세포 덩어리가 되어 있는 경우에는, 필요에 따라, 재료에 대하여 피펫팅 등에 의한 물리적 처리나, 트립신, 콜라게나아제 등에 의한 효소 처리를 실시할 수 있다. 또, 재료에 적혈구가 혼입되어 있는 경우에는, 미리 적혈구를 용혈해 두는 것이 바람직하다.
- [0056] 상기와 같이 조제된 세포 집단을 사용하여, CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별한다.
- [0057] CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별하는 방법으로는, 예를 들어, 항체를 사용하는 방법을 들 수 있다. 항체는, CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별하는 것이 가능한, 항 CD271 항체 및/또는 항 CD90 항체이다. 선별에 플로 사이토메트리를 사용하는 경우에는, FITC, PE, APC 등의 상이한 형광 색소로 표지된 항 CD271 항체, 또는 항 CD271 항체와 항 CD90 항체를 적절히 조합하여 사용함으로써, 생세포를 단시간에 선별하는 것이 가능해진다. 또한, 플로 사이토메트리 이외에도, 자기 비드를 사용하는 방법이나 어피니티·크로마토그래피를 사용하는 방법에 의해, CD271+CD90+ 세포를 선별하는 것이 가능하다.

- [0058] 또한, 이들 방법을 사용하기 전에, 미리, 사세포를 염색하는 형광 색소 (예를 들어, PI) 를 세포 집단과 반응시켜, 형광으로 염색된 세포를 제거함으로써, 사세포를 제거해도 된다.
- [0059] 다음으로, 선별한 LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR 및 Thy1 공양성 세포를 단일 세포 (클론) 배양하고, 증식이 빠른 로트를 선택함으로써, 증식능, 분화능 및 유주능이 우수한 REC 를 얻는다.
- [0060] 여기서, 「증식이 빠르다」, 「고속 증식성」이란, 96 구멍 배양 플레이트의 1 웰에 세포 1 개씩 과중하여 배양했을 때에, 배양 개시 2 주일 후 또는 그 이전에 배양 플레이트가 컨플루언트 또는 세미컨플루언트가 되는 정도의 증식 속도 (배가 시간 (더블링 타임) 이 26 ± 1 시간) 를 갖는 것을 의미한다.
- [0061] 컨플루언트란, 배양 용기 표면 (배양면) 의 90 % 이상을 배양 세포가 덮고 있는 상태이다. 또한, 세미컨플루언트란, 배양 용기 표면 (배양면) 의 70 ~ 90 % 를 배양 세포가 덮고 있는 상태이다. 사용하는 배양 기구의 사이즈 및 종류는, 세포의 증식 속도에 따라 적절히 변경 가능하다. 늦게 증식되고 있는 세포 (Moderately/Slowly Expanding Cells), 즉 단일 세포 배양 2 주 후가 되어도 세미컨플루언트 또는 컨플루언트가 되지 않은 세포는 파기한다. REC 로서 선별한 각 웰로부터 회수한 REC 를 각 웰마다 배양 플라스크에 옮겨 넣고, 추가로 컨플루언트가 될 때까지 배양한다 (확대 배양). 그 후, 확대 배양한 세포를 따로 따로 회수한다. 1 웰 유래의 REC 를 1 로트로 한다.
- [0062] 본 발명에 있어서 사용되는 REC 는, 1 웰에 세포 1 개씩 과중하는 클론 소트에 의해 얻어진 것이기 때문에, 증식한 세포끼리의 유전 형질은 모두 동일하다. 따라서, 본 발명에 있어서는 세포 집단 전체를 「클론」이라고 하는 경우도, 세포 집단을 구성하는 개개의 세포를 「클론」이라고 하는 경우도 있다.
- [0063] 또한, 본 발명에 있어서, 선별에 사용하기 위한 REC 는, REC 마커 (항 Ror2) 에 의해 미리 평가해 둘 수도 있다. 예를 들어, 상기 확대 배양 후, 전체 로트로부터 부착 증식한 세포를 회수하고, 각 로트의 일부 ($1 \sim 3 \times 10^5$ 개 정도) 의 세포를 분리하여, 항 Ror2 에 대한 모노클로날 항체로 단일 염색을 실시한다. 항 Ror2 에 대한 모노클로날 항체로 단일 염색을 실시하는 수법은 공지이다 (W02016/17795). 요약하면, REC 마커를 사용한 플로 사이토메트리 해석에 의해, 회수 세포에 있어서의 REC 마커 양성 세포의 비율을 구한다. 비율은, 정량적 PCR 을 이용하여 Ror2 의 mRNA 발현을 정량해도 되고, 현미경에 의해 동 비율을 매뉴얼에 의해 구해도 된다. 상기 양성 비율이 일정값 (예를 들어 65 %) 이상인 로트 (세포 집단) 를 합격으로 하고, 이것을 선별에 사용할 수도 있다.
- [0064] 본 발명의 세포 클론을 포함하는 세포 집단은, LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성이고, 또한 증식이 빠른 간엽계 줄기세포 클론의 집단이며, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족한다.
- [0065] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다
- [0066] (b) 평균 세포 사이즈가 $20 \mu\text{m}$ 이하이다
- [0067] 본 발명의 일 양태에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기세포는, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 세포 집단이다.
- [0068] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다
- [0069] (b) 평균 세포 사이즈가 $20 \mu\text{m}$ 이하이다
- [0070] 또한 본 발명의 일 양태에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기세포는, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 중 적어도 하나의 특징을 만족하는 세포 집단이다.
- [0071] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40 % 이하이다
- [0072] (b) 평균 세포 사이즈가 $20 \mu\text{m}$ 이하이다
- [0073] 본 발명에 있어서는, 개개의 로트의 REC 클론에 대해, 세포의 증식능, 지방 분화능, REC 특이적 마커 발현량, 세포 사이즈의 균일성을 조사하여, 각각의 상관성을 해석함으로써, 고순도이며 또한 균일하고 보다 세포 성능이 높은 REC 를 선별하는 것이 가능해졌다.
- [0074] 본 발명에 있어서는, 전방 산란광의 변동 계수 (Coefficient of Variation : CV 값) 및 세포의 평균 사이즈를

선별의 지표로 한다.

- [0075] 전방 산란광 (Forward Scatter) 이란, 레이저 광의 축에 대하여 전방향의 작은 각도로 산란하는 광이다. 전방 산란광은, 세포 표면에서 발생하는 레이저 광의 산란광, 회절광 및 굴절광으로 이루어지고, 샘플의 크기에 관한 정보가 얻어진다.
- [0076] 변동 계수 (Coefficient of Variation : CV) 는, 표준 편차를 평균값으로 나눈 값으로, 단위가 상이한 데이터의 편차나, 평균값에 대한 데이터와 편차의 관계를 상대적으로 평가할 때에 사용하는 수치이다.
- [0077] 본 발명에 있어서는, 상기 CV 값이 40 % 이하인 것을 선별한다. CV 값이 40 % 이하인 세포 집단은, 크기가 균일한 세포에 의해 구성되어 있는 세포 집단이다. 바람직하게는, CV 값은 35 % 이하, 30 % 이하, 25 % 이하, 또는 20 % 이하이다.
- [0078] 또한, 본 발명에 의해 선별된 세포 집단에 있어서의 세포의 평균 사이즈는, 20 μm 이하이다. 바람직하게는 18 μm 이하이고, 14 μm ~ 18 μm 의 범위의 크기이다.
- [0079] 3. 본 발명의 조성물
- [0080] (1) 대상
- [0081] 본 발명의 조성물은, 인간, 또는 인간 이외의 생물, 예를 들어, 닭 및 비인간 포유 동물 (예를 들어, 소, 원숭이, 고양이, 마우스, 래트, 모르모트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양, 및 말) 에 적용하여, 골아세포를 증식시키고, 뼈의 재생을 촉진하기 위해서 사용된다.
- [0082] 적용의 대상이 되는 질환은, 골아세포의 증가가 요구되는 골계통 질환이며, 선천성인지 후천성인지를 묻지 않는다. 골계통 질환이란, 뼈나 연골 등의 골격을 형성하는 조직의 장애에 의해, 골격의 이상을 초래하는 질환의 총칭명이다. 그리고, 선천성 골계통 질환은 이골증과 골연골 이형성증의 2 가지 카테고리로 크게 구별된다.
- [0083] 선천성 골계통 질환으로는, 예를 들면 흉곽 부전 증후군, 저포스파타아제증, 연골 무형성증, 연골 저형성증, 골형성 부전증, 대리석골병, 다발성 연골성 외골종증, 내연골종증, 2 형 콜라겐 이상증 관련 질환, 점상 연골 이형성증, 위성 연골 무형성증, 라센 (Larsen) 증후군, 진행성 골화성 섬유 이형성증, TRPV4 이상증, 골경화성 질환, 빌즈 (Beals) 증후군 등을 들 수 있다. 특히 본 발명에 있어서는, 선천성 골계통 질환인 저포스파타아제증이 바람직하다.
- [0084] (2) 세포 농도, 투여량
- [0085] 세포는, 적어도 1×10^6 cell/ml 의 농도의 세포 집단에서 사용된다. 예를 들어, 1×10^6 cell/ml, 5×10^6 cell/ml, 1×10^7 cell/ml 등이고, 사용 목적에 따라서 적절히 설정할 수 있다.
- [0086] 세포는, 대상의 체중 1 kg 당 1×10^7 cells 의 세포 집단을 주 1 회 투여하고, 이것을 1 ~ 4 회 (1 쿨의 투여기간이 1 ~ 4 주), 바람직하게는 4 회 반복하도록 사용된다.
- [0087] (3) 조성물
- [0088] 본 발명에 있어서, 간엽계 줄기세포는 의약 조성물의 형태로 투여된다. 하나의 형태에 있어서, 그러한 조성물은 의약상 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 투여 형태는, 정맥 주사, 점적 정주 등의 주사이다.
- [0089] 「담체」 및 「부형제」란, 세포의 저장, 투여, 및/또는 생물학적 활성을 촉진하기 위해 당해 분야에서 관용적으로 사용되는 조성물을 말한다.
- [0090] 본 발명의 조성물에 있어서 사용되는 담체로는, 예를 들어, 생리 식염수, 수성 텍스트로오스, 락토오스, 링겔액, 완충액 등을 들 수 있다. 또한 부형제로는, 전분, 셀룰로오스, 글루코오스, 락토오스 등을 들 수 있다.
- [0091] 본 발명의 간엽계 줄기세포를 포함하는 조성물은, 예를 들어 완충 용액 또는 배양액 중에서, 적절한 액체 현탁액으로서 조제한다. 주사에 사용하기 위한 현탁액은, 나트륨카르복시메틸셀룰로오스, 소르비톨, 텍스트란 등을 함유시켜도 된다.

- [0092] 4. 조혈 줄기세포 이식과의 병용
- [0093] 일반적으로, 간엽계 줄기세포 (MSC) 를 정맥내 투여하는 것만으로는, 골수에 생착되는 세포는 매우 적다. 그래서 본 발명에 있어서는, 간엽계 줄기세포를 투여할 때에, 조혈 줄기세포 이식을 병용한다.
- [0094] 먼저, 골 형성능이 장애된 대상 (환자) 유래의 MSC 로부터, 골 형성능이 정상적인 MSC 로 치환한다. 그것을 위해, 항암제나 방사선 요법 등에 의해 환자 유래 MSC 를 제거한다. 이 때, 환자 유래 조혈 줄기세포도 제거되기 때문에, 본 발명의 고순도 간엽계 줄기세포를 투여할 때에, 혈액 세포의 유지를 위해 조혈 줄기세포 이식을 병용한다. 「병용」이란, 고순도 간엽계 줄기세포의 투여와 조혈 줄기세포 이식을, 하나의 치료 쿨루브에서 사용하는 것을 의미하고, 조혈 줄기세포 이식의 시기는, 고순도 간엽계 줄기세포의 투여의 전후에 상관없이, 전이여도 되고 후여도 되며, 동시여도 된다. 「동시」에는, 고순도 간엽계 줄기세포와 조혈 줄기세포를 상기 담체에 혼합한 현탁액을 제조하고, 이것을 주사하는 것을 포함한다. 단, 본 발명에 있어서는 조혈 줄기세포 이식을 실시한 후에, 고순도 간엽계 줄기세포를 투여하는 것이 바람직하다.
- [0095] 이식된 조혈 줄기세포는 동시에 투여된 MSC 를 자기로 인식하면서 혈구 세포로 분화하기 때문에, 이식된 MSC 가 레시피언트의 면역 세포에 의해 거절을 받을 가능성은 매우 미미하다.
- [0096] 본 발명에 있어서는, 고순도 간엽계 줄기세포의 공급원이 되는 도너, 및 조혈 줄기세포 이식에 있어서의 조혈 줄기세포의 공급원이 되는 도너는, 모두 대상 환자와는 다른 사람 (예를 들면, 정상인) 에서 유래한다. 또한, 고순도 간엽계 줄기세포의 도너와 조혈 줄기세포의 도너는 동일해도 되고 상이해도 된다. 조혈 줄기세포 이식에서는, HLA 형의 A 좌, B 좌, C 좌 및 DR 좌라고 하는 4 좌 (8 항원) 의 일치하는 비율이 중요하다고 되어 있지만, 대부분의 경우에는, 고순도 간엽계 줄기세포의 제공자 (도너) 의 HLA 가, 대상의 HLA 와 불일치한다. 그러나, 대상의 HLA 가 도너의 HLA 와 완전 일치가 아니라 불일치라도 적용할 수 있다.
- [0097] 바꾸어 말하면, 고순도 간엽계 줄기세포의 제공자의 HLA 가, 대상의 HLA 의 3 좌 (HLA-A, B, DR-B) 6 항원 중 적어도 3 항원과 일치하는 것, 또는, 적어도 4 항원과 일치하는 것을 사용할 수 있다.
- [0098] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단, 본 발명의 범위는 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0099] [제조예]
- [0100] 본 발명에 있어서 사용하는 고순도 간엽계 줄기세포는, 건강한 도너로부터 채취된 골수액을 밀도 구배 원심법에 의해 단핵구 분리하고, CD90 및 CD271 항체를 사용하여 공양성 세포만을 선택적으로 분리, 싱글 셀화하고, 또한 P4 까지 확대 배양하여, CV 값 40 % 이하의 세포 클론을 선별함으로써 취득하였다.
- [0101] 얻어진 세포 클론을 「REC-01」 이라고 한다.
- [0102] [시험예]
- [0103] 스트렌식 투여에 의한 Alpl^{-/-} 마우스의 연명 효과의 검증
- [0104] 179 마리의 저포스파타아제증 병태 모델 마우스 (알칼리포스파타아제 결손 마우스 : ALP^{-/-} 마우스) 를 제작 및 사육하고, 이것에 스트렌식 (아스포타제 알파) 을 격일로 피하 투여하였다.
- [0105] 그 결과, Alpl^{-/-} 마우스 179 마리 중, 41 마리 (22.9 %) 는 출산 당일에 사망하였다 (사산 포함). 유전자 판정 후까지 생존한 마우스에 대해, 효소 (스트렌식) 를 격일로 피하 투여한 결과를 도 2 에 나타낸다. 생후 2 주간 이내에 88 마리 (49.2 %), 30 일 이내에 98 마리 (54.7 %), 60 일 이내에 생후 158 마리 (88.3 %), 100 일 이내에 168 마리 (93.9 %) 가 사망하였다.
- [0106] 스트렌식을 투여하지 않은 경우, 전체 개체가 2 주일 이내에 사망한 점에서 (Millan JL, et al. J Bone Miner Res.2008), 스트렌식 단독 투여에 의해 다소의 연명 효과가 인정되나, 생명 예후에 대한 효과는 국한적인 것으로 생각된다.
- [0107] [실시예 1]
- [0108] ALP^{-/-} 마우스에 대한 고순도 간엽계 줄기세포 REC 의 이식 시험
- [0109] 본 실시예에서는, 저포스파타아제증 모델 마우스인 Alpl^{-/-} 마우스를 사용하여, REC-01 이식에 의한 유효성을 평가하였다.

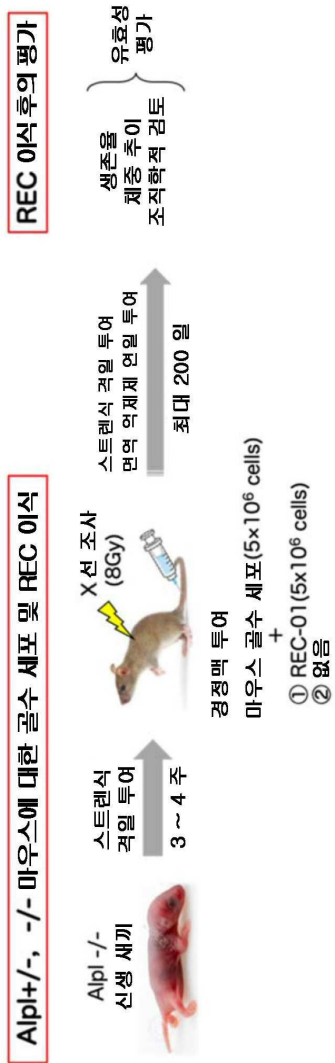
- [0110] 1. 방법
- [0111] (1) 레시피엔트 마우스로의 REC-01 투여
- [0112] Alpl 헤테로 (Alpl+/-) 마우스끼리를 교배하여 얻어진, day 0 ~ day 5 의 새끼 마우스 꼬리에서 게놈 DNA 를 추출하고, PCR 로 유전형의 판정을 실시하였다. 출생 후, Alpl-/- 마우스에는 주 2, 3 회의 빈도로 8 mg/kg 의 스트렌식을 계속적으로 피하 투여하였다 (도 1).
- [0113] REC-01 이식의 전달, 도너인 야생형 마우스 (B6 암컷) 와, 레시피엔트인 Alpl-/- 마우스에 면역 억제제 (0.5 mg/1 mL 그라셉터 (Gracaptor)) 를 체중 10 g 당 0.1 mL 투여하였다. 이식 당일, 생후 33 ~ 159 일령 (n=9) 의 Alpl-/- 마우스에, 체중 10 g 당 0.1 mL 의 3 종 혼합 마취약 (0.75 mg/kg 도미톨, 4 mg/kg 미다졸람, 5 mg/kg 부토르파놀) 을 투여하여, 완전히 진정화시켰다. 그 후, 8 Gy 의 방사선을 조사하고, 직후에 5×10^6 cells 의 B6 마우스 유래 골수세포와 5×10^6 cells 의 REC 를 현탁하여 마우스의 꼬리 정맥으로부터 투여하였다 (액량으로서 합계 200 μ L). 비교 대조가 되는 Alpl-/- 마우스에는, 동수의 골수세포만을 투여하였다 (도 1).
- [0114] (2) 세포 투여 후의 유지
- [0115] 세포 이식 후의 마우스에는, 면역 억제제 (0.5 mg/1 mL 그라셉터) 를 체중 10 g 당 0.1 mL 의 양으로, 거의 매일 투여하였다. 또한, Alpl-/- 마우스에는 세포 이식 유무와 상관없이, Alpl-/- 마우스가 사망 혹은 실험에 제공하여 안락사시킬 때까지 주 2, 3 회의 빈도로 8 mg/kg 의 스트렌식을 계속적으로 피하 투여하였다.
- [0116] (3) 레시피엔트 마우스 생존 곡선 해석
- [0117] 카플란 마이어 생존 곡선은, 통계 해석 소프트웨어 EZR 을 사용하여 해석하였다. 해석 방법은, 기존의 각종 매뉴얼을 참조하였다 (지치 의과대학 부속 사이타마 의료 센터 혈액과).
- [0118] 2. 결과
- [0119] (1) 세포 이식 후의 각 마우스의 체중의 추이
- [0120] REC-01 세포 이식 후의 Alpl-/- (n=4), 및 정상군인 Alpl+/- (n=5) 에 대해, 정기적으로 체중을 측정하고, 경시적 변화를 관찰하였다. 세포 이식 당일의 각 마우스의 체중을 1 로 하여, 이식 후의 체중비의 추이를 그래프에 나타내었다 (도 3).
- [0121] 그 결과, Alpl-/- 이식군은 레시피엔트마다 차이가 확인되어, Homo-1 (#1233) 는 헤테로 마우스에 준한 체중 증가를 나타내었지만, Homo-2 (#1313) 는 이식 한달 후부터 체중이 감소하기 시작하여, 50 일째에 사망하였다. 한편, Homo-3 (#1375) 및 Homo-4 (#1399) 는 큰 증감은 확인되지 않았다.
- [0122] (2) REC-01 이식 후의 골수내 ALP 활성의 검토
- [0123] ALP 활성의 포지티브 대조군으로 준비한 정상 마우스 (#1237, hetero-2) 에서는, 통상 골아세포가 많이 국재하는 대퇴골 골두부 해면골 (성장판 부근) 및 피질골 표면에서 ALP 활성 (연보라색 부분) 이 검출되었다 (도 4 우측). 또한, REC-01 을 이식 후의 관찰 기간 중에 체중이 감소한 #1313 (homo-2, 도 4 중간 우측) 마우스에서는, 대퇴골의 극히 일부의 지점으로부터 ALP 활성이 검출되었다. ALP 활성은 골아세포의 마커인 점에서, REC-01 이 골아세포로 분화된 것이라고 할 수 있다. 한편, 네거티브 대조군인 골수세포 (BM) 만을 이식한 #1359 의 대퇴골에서는, 어느 부위에서도 ALP 활성은 검출되지 않았다 (도 4 좌측).
- [0124] 주목해야 할 것으로, 조혈 줄기세포 이식과 REC-01 을 병용한 Alpl-/- 마우스 중, 정상적인 체중 증가를 나타낸 #1233 (homo-1, 도 4 중간 좌측) 에서는 정상 마우스와 마찬가지로 골두부 해면골, 및 피질골 표면에서 ALP 활성이 검출되었다.
- [0125] 레시피엔트로서 사용한 ALP-/- 마우스는, 전체 개체가, 출생 직후부터 사망 혹은 검체로서 도살될 때까지의 기간 중, 계속적으로 스트렌식을 투여받고 있다. 골수만을 이식한 군에서는 ALP 활성이 전혀 검출되지 않았던 점에서, 투여한 ALP 제제인 스트렌식은 혈중 ALP 농도를 높이는 것은 가능해도 골수 내에 머무르는 일은 없는 것, REC-01 투여 후에 체중 증가가 확인된 개체에서는 골수내에 생착된 REC-01 이 골아세포로 분화되어 ALP 를 산생하는 것이 체중 증가 (성장) 에 기여한 것, 등이 시사되었다.
- [0126] 다음으로 수기적으로 한계 기간인, 이식 100 일 후의 마우스 대퇴골 및 두부의 동결 절편의 ALP 염색을 실시하

였다.

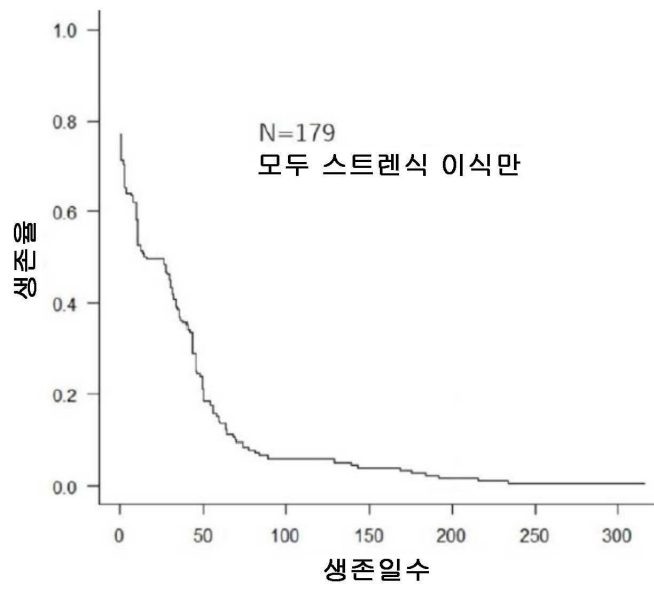
- [0127] BM+REC-01 을 이식한 $Alpl^{-/-}$ 마우스 (#1375 및 #1399) 에서는, 골단부 · 피질골 · 해면골에서의 ALP 활성이 정상 마우스 (#1237+/-, hetero-5) 와 동일하게 확인되었다. 또한, 두부의 절편에 있어서도, 두개골의 일부나, 다른 뇌조직이라고 생각되는 부위에서, 대퇴골과 비교하면 약간 약하지만 ALP 활성이 검출되었다 (도 5).
- [0128] 간엽계 줄기세포의 골수 내에서의 생존 기간은 실험적으로 전혀 증명되어 있지 않지만, 조혈 줄기세포 이식에서는 3 개월을 경유하여 도너 세포가 검출된 경우에, 장기 생착, 으로 규정되어 있고 (Osawa et al. Science 273 (5272) : 242-5, 1996), 그 규정을 적용하면 REC-01 의 골수내에서의 장기 생착이 확인되었다고 판정할 수 있다.
- [0129] (3) REC-01 이식의 유무에 따른 생존율의 향상 (도 6)
- [0130] 비이식군 (n=67, 효소 있음, 우측 도면 : 검은선) 과 이식군 (n=9, BM+REC+효소 있음, 우측 도면 : 붉은선) 의 생존 곡선을 카플란 마이어법을 이용하여 log-rank 검정으로 평가하였다.
- [0131] 그 결과, REC-01 이식에 의해 $Alpl^{-/-}$ 마우스의 생존율이 유의하게 개선되었다 (도 6, $p=0.00045$).
- [0132] 효소 (스트렌식) 는 혈액 뇌관문을 통과할 수 없기 때문에, 저포스파타아제증의 주증상의 하나인 뇌전증 발작을 억제할 수 없는 것이 문제점으로서 지적되고 있다. 실제로, 이식 없음 (효소 있음) 의 관찰군에서는, 뇌전증 발작을 일으켜 사망하는 마우스가 높은 빈도로 관찰되었다.
- [0133] 이에 대해, REC-01 이식군에서는, 뇌전증 발작 자체를 거의 확인할 수 없으며, 도 5 에 나타낸 바와 같이 두개골에서 ALP 양성 세포가 검출되었기 때문에, REC-01 투여가 뇌전증 발작 억제에도 효과를 발휘하는 것이 나타났다.
- [0134] 3. 정리
- [0135] REC-01 을 이식한 $Alpl^{-/-}$ 레시피엔트 마우스에서는, 골수 내에서의 정상적인 ALP 의 산생 (ALP 염색에 의한 ALP 활성의 확인), 및 이식된 REC-01 유래의 인간 세포의 마우스 대퇴골에 대한 장기 생착 (ALP, STEM121 항체 양성) 을 확인할 수 있었다. 또한, REC-01 이식군은 비이식군과 비교하여 유의한 생존율 상승이 확인되었다.
- [0136] 이상의 결과로부터, 스트렌식 투여만에 의한 임상 성적 (생존율 상승) 에 추가하여, REC-01 을 이식함으로써, 이식한 REC-01 이 저포스파타아제증 환자의 대퇴골 내에 생착, 골아세포로의 분화, 정상적인 골형 ALP 의 산생을 통해서 환자의 골조직이 정상화되고, 나아가서는 뇌전증 발작의 억제 등의 기능 개선에 의해 환자 QOL 에 대해, 보다 높은 효과를 가져오는 것을 기대할 수 있다.
- [0137] 인간 · 마우스 어느 경우에도 경정맥 투여에 의한 배양 후 간엽계 줄기세포의 장기 생착 성공에는 지금까지 보고가 없다.
- [0138] 이에 대하여, 본 발명에 있어서는, 면역계가 정상적인 유전자 변이 동물을 레시피엔트로서 사용하고, 면역 억제를 병용한 이종간 이식으로, 조직 적합성이 매우 낮다. 따라서 이식된 REC-01 이 3 개월에 걸쳐 검출 가능했던 것은 경이적인 결과이다.
- [0139] 본 발명에 의해, 이종간에서의 경정맥 투여에 의한 인간 간엽계 줄기세포 이식과 조혈 줄기세포 이식의 병용의 성공을 의미하고 있으며, 골질환에 대한 의약으로서 매우 유용하다.

도면

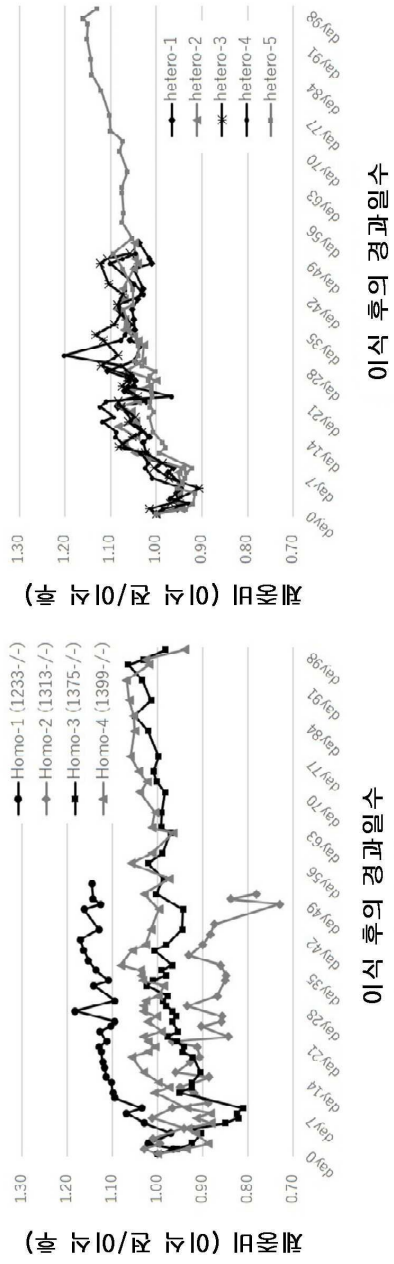
도면1



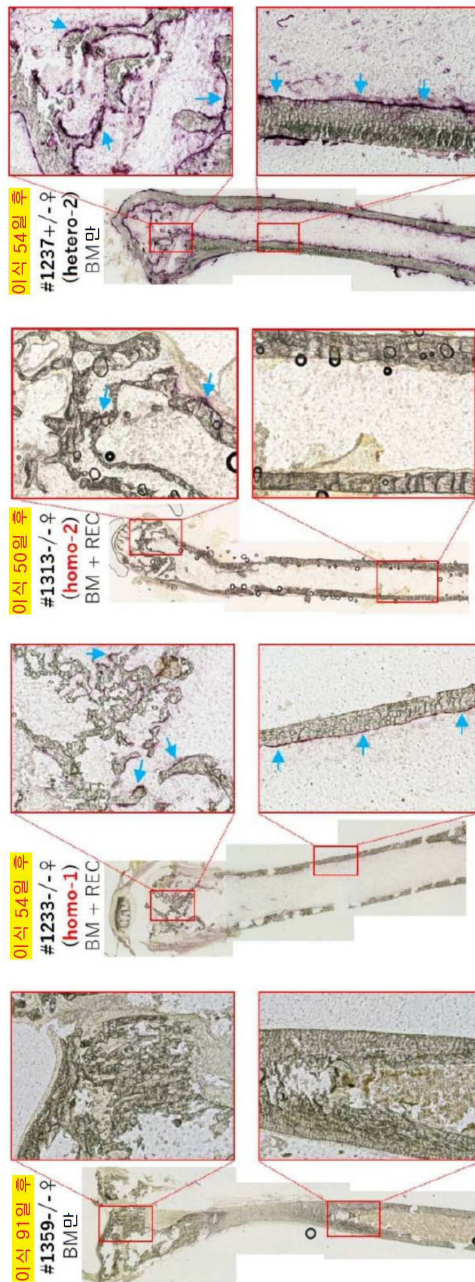
도면2



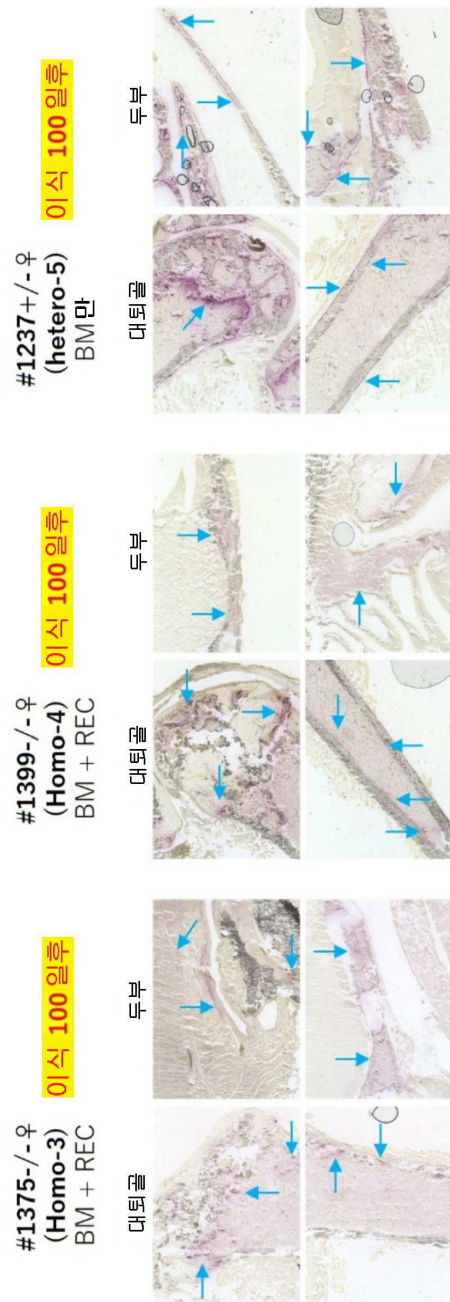
도면3



도면4



도면5



도면6

