



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0040442
(43) 공개일자 2017년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/50 (2015.01) A61K 35/28 (2015.01)
C12N 5/073 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/50 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0139287

(22) 출원일자 2015년10월02일

심사청구일자 2015년10월02일

(71) 출원인

순천향대학교 산학협력단

충청남도 아산시 신창면 순천향로 22, 순천향대학교내

차의과학대학교 산학협력단

경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태희

경기도 부천시 원미구 석천로 216번지 은하마을
대우동부아파트 503-1601

이상훈

서울시 성북구 북악산로 828 (정릉동,
쌍용아파트) 101동 1408호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진동

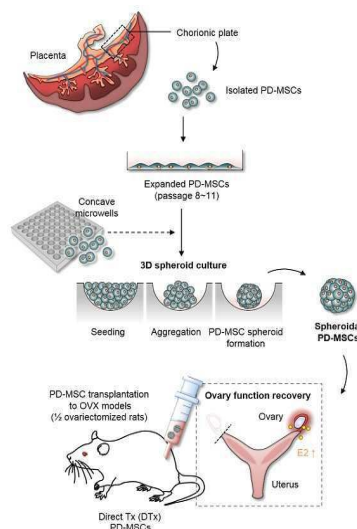
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 스페로이드형 세포집합체를 함유하는 난소기능 개선용 약학조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은, 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스페로이드형 세포집합체를 유효성분으로 포함하여 포유류의 난소기능을 개선 또는 회복시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0605 (2013.01)

C12N 5/0662 (2013.01)

(72) 발명자

김기진

경기도 성남시 분당구 장미로 139. 매화마을 2 단
지 아파트 213 동 704 호

황지영

서울특별시 성북구 솔샘로1길 19 (정릉동 그린존)
604호

최중호

경기도 용인시 기흥구 금화로11번길 10 310동 802
호 (상갈동, 금화마을주공3단지아파트)

전예슬

서울특별시 송파구 송이로17길 49 (가락동) 4층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A3049819

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (구)여성과학자지원사업

연구과제명 위축성 질염 치료를 위한 질 조직 내 비타민 D의 작용기전 규명

기 여 율 1/3

주관기관 순천향대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A1A09004998

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(도약)

연구과제명 신경계와 연결된 바이오장기 개발 및 응용 (약물 스크리닝/질병 모델)

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2018.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2011-0019610

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 간재생 촉진 및 섬유화 억제를 위한 미세환경 적중세포 개발

기 여 율 1/3

주관기관 차의과학대학교

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 함유하는 스페로이드형 세포집합체(spheroid cell aggregates)을 유효성분으로 포함하는, 난소기능개선용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스페로이드형 세포집합체는 서로 이웃하는 세포들 사이의 세포 연결(junctional complex)과 세포외기질(extracellular matrix, ECM)에 의하여 세포 간의 접합 경계가 적어 비교적 매끈한 외면을 갖는 것인, 난소기능개선용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 난소기능개선용 약학조성물은, 조기 난소 부전, 불임/난임, 조기 폐경, 폐경 및 갱년기 증상으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 증상을 완화 또는 치료하는 용도로 적용되는, 난소기능개선용 약학 조성물.

청구항 4

반구형 마이크로웰 플레이트(concave microwell plate)에 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 투여하는 투여단계;

세포성장인자를 함유하는 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 상기 마이크로웰 내에서 상기 태반유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스페로이드형 세포집합체를 형성하도록 유도하는 배양 단계; 그리고

상기 스페로이드형 세포집합체를 회수하는 회수단계;를 포함하는 난소기능개선용 세포집합체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스페로이드형 세포집합체를 함유하는 난소기능개선용 약학 조성물 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 스페로이드 형태의 세포집합체(spheroid cell aggregates)로 제조하여 조기 난소 부전, 불임/난임, 조기 폐경, 폐경 및 갱년기 증상의 완화 또는 치료 용도로 적용될 수 있는 약학조성물 제공에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소는 여성 생식 시스템의 건강을 유지시킬 뿐만 아니라 호르몬 생산 시스템의 균형을 유지하도록 해 주어 여성의 삶의 질을 유지시키는 데에 중요한 역할을 하는 기관이다. 난소 기능장애 또는 노화에 의한 폐경은 많은 여성들의 전신적 문제(치매, 골다공증, 심장병, 갱년기 질환, 및 신진대사장애)를 가져온다.

[0003] 갱년기 질환은 여성 생기능을 유지할 뿐만 아니라 혈액순환, 체중조절, 뼈 관리를 돕는 등의 다양한 기능을 하는 여성호르몬인 에스트로겐의 분비가 저하되면서 발병하는 질환으로 50세 전후의 갱년기에 주로 발생하나 갱년기가 아니더라도 난소 절제, 난소 기능저하 등 다른 원인에 의한 에스트로겐 결핍 환자에서도 동일한 증상이 나타난다. 이러한 갱년기 질환은 여성의 호르몬 생산 시스템의 균형에 중요한 역할을 하는 난소의 기능장애 또는 노화에서 기인하는 폐경에 의하여 발생하는 경우가 많다.

[0004] 구체적인 갱년기 질환의 증상으로는, 갱년기성 골다공증, 안면홍조, 복부비만, 자궁위축, 인지장애, 알츠하이머, 혈류장애, 다한증 및 피부 노화 등의 신체적인 증상뿐만 아니라, 우울증, 집중력저하, 불면, 두통,

이명, 신경과민 등의 정신신경계통에서 증상이 나타날 수 있으므로, 갱년기 질환 증상의 완화와 여성 호르몬 균형의 유지는 여성의 삶의 질을 유지시키는데 매우 중요한 역할을 한다.

[0005] 많은 연구에서, 일부 약초나 음식들이 갱년기 증상 발생을 막지는 못하나 임상적인 증상들을 완화시킨다고 보고되고 있다. 그럼에도 불구하고, 조기 난소 부전(premature ovarian failure)과 폐경(menopaus)은 아직까지 치료법이 없으며, 유방암 발생의 위험에도 불구하고 호르몬 대체 요법이 유일한 치료방법이다. 이러한 이유 때문에, 폐경 이후 여성은, 삶의 절반 동안 에스트로겐 프로게스테론과 같은 생식 관련 호르몬 없이 지내게 되며, 이의 근본적인 해결책이 필요한 상황이다.

[0006] 줄기세포 기반 치료는, 자가면역 질환, 재생 의학, 그리고 조직 공학의 영역에서 최근 주목 받고 있는 치료 접근법이다. 줄기세포 치료는, 골 또는 연골의 재생과 화학요법을 위한 면역치료에서 적용될 뿐만 아니라, 요실금, 1형 당뇨병, 심근증(cardiomyopathy), 크론병(Crohn's disease)의 합병증 등의 치료 목적으로 임상적으로 적용되고 있다. 그러나, 줄기세포 기반 치료가 다른 임상적 질환과 관련해서는 많이 적용되고 있지 못하며, 아직 기초 연구가 진행 중이다.

[0007] 태반(placenta)은 임신기간 동안 태아의 발달에 필수적인 영양공급, 노폐물, 산소 등과 같은 물질들의 전달 매개체로서의 역할 뿐 아니라 자체적으로 많은 종류의 생리활성도를 갖는 사이토카인, 단백질 등의 합성과 분비에 관여하는 장기로, 출산 시 자궁으로부터 배출된다. 출산 후 폐기되는 일시적인 기관으로 인식되어 왔으나, 최근 들어 태반의 부위별로 중간엽 세포, 탈락막(decidua) 세포, 양막(amnion), 혈관 내피 세포(endothelial cells), 면역 세포 등의 다양한 세포의 회수가 가능하고, 이 세포들의 특징 분석을 포함한 연구 및 다양한 퇴행성 질환에서 치료 효능에 대한 연구가 진행되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내등록특허 제10-1282926호, 2013년 07월 01일 공고.

(특허문헌 0002) 국내등록특허 제10-0900309호, 2009년 06월 02일 공고.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은, 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 스페로이드 형태의 세포집합체(spheroid cell aggregates)로 제조하는 방법과 이러한 스페로이드형 세포집합체를 유효성분을 포함하여, 조기 난소 부전, 불임/난임, 조기 폐경, 폐경 및 갱년기 증상의 완화 또는 치료 용도로 적용될 수 있는, 난소기능개선용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 난소기능개선용 약학 조성물은, 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 함유하는 스페로이드형 세포집합체(spheroid cell aggregates)를 유효성분으로 포함한다.

[0011] 상기 스페로이드형 세포집합체는 서로 이웃하는 세포들 사이의 세포 연결(junctional complex)과 세포외기질(extracellular matrix, ECM)에 의하여 세포 간의 접합 경계가 적어 비교적 매끈한 외면을 갖는 것일 수 있다.

[0012] 상기 난소기능개선용 약학조성물은, 조기 난소 부전, 불임/난임, 조기 폐경, 폐경 및 갱년기 증상으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 증상을 완화 또는 치료하는 용도로 적용되는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 난소기능개선용 스페로이드형 세포집합체의 제조방법은, 반구형 마이크로웰 플레이트(concave microwell plate)에 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 반구형 마이크로웰에 투여하는 투여단계; 세포성장인자를 함유하는 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 상기 마이크로웰 내에서 상기 태반유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스페로이드형 세포집합체를 형성하도록 유도하는 배양단계; 그리고 상기 스페로이드형 세포집합체를 회수하는 회수단계;를

포함한다.

- [0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로", "상대적으로", "비교적"등의 표현은 언급된 의미에 고유한 특성에 의하여 허용되는 오차를 포함하는 그 수치에 근접한 범위를 포함하는 의미로 사용되고, 정확하게거나 절대적인 수치 또는 표현으로 인하여 언급된 내용이 부당하게 좁은 의미로 해석되고 침해자가 이를 부당하게 이용하는 것을 회피하기 위하여 사용된다.
- [0017] 본 명세서에서 단수 표현은 특별한 설명이 없으면 문맥상 해석되는 단수 또는 복수를 포함하는 의미로 해석된다.
- [0018] 본 명세서에서 상기 "폐경기 또는 갱년기 질환"이란, 난소의 노화 또는 기능상실로 인한 에스트로겐(여성호르몬)의 분비 감소에 따라 나타나는 하기와 같은 증상, 또는 이로부터 유발되는 질환을 의미한다: i) 혈관성 변화에 의한 증상, ii) 근골격계 변화에 의한 증상, iii) 비뇨생식기 변화에 의한 증상, iv) 뇌신경계 변화에 의한 증상 및 v) 일반적 변화에 의한 증상. 상기 혈관성 변화에 의한 증상은 주로 안면홍조, 빈맥, 발한 또는 두통 등이 있으며, 상기 근골격계 변화에 의한 증상은 근육통, 관절통 또는 요통 등이 있고, 상기 비뇨생식기 변화에 의한 증상은 빈뇨 또는 요실금 등이 있으며, 상기 뇌신경계 변화에 의한 증상은 기억력 감퇴, 우울증, 집중력 감퇴 및 현기증 등이 있으며, 상기 일반적 변화에 의한 증상은 시력감퇴 또는 피부 및 모발의 변화 등을 들 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 "태반(placenta)"이란, 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 생체 내 조직을 의미하는 것으로, 세부 조직으로 융모막(chorionic membrane; CM), 융모-영양막(chorionic membrane and chorionic trophoblast layer; CMT), 영양막층 전체(total chorionic trophoblast layer; tCT), 영양막 상층부(upper portion of chorionic trophoblast layer; uCT) 및 영양막 기저층(basal portion of chorionic trophoblast layer; bCT)를 포함한다. 또한, 상기 태반은 포유동물의 태반이라면 적용될 수 있으며, 예를 들어 인간, 돼지 등에 태반이 적용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 난소기능개선용 약학 조성물은, 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells, 이하 PD-MSCs)를 함유하는 세포집합체(cell aggregates)를 유효성분으로 포함한다.
- [0022] 골수유래 중간엽 줄기세포(bone marrow derived mesenchymal stem cells, 이하 BM-MSCs), 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived MSCs)와 같은 다른 중간엽 줄기세포들과 달리, 태반 유래 줄기세포(PD-MSCs)는 태반으로부터의 분리라는 침습적인 과정 없이 비교적 쉬운 방법으로 많은 수의 세포들을 확보할 수 있다는 장점을 가진다.
- [0023] 태반유래 중간엽 줄기세포(PD-MSCs)는, 골수유래 중간엽 줄기세포(BM-MSCs)와 유사하게, 지방형성(adipogenic), 연골발생(chondrogenic), 골형성(osteogenic)을 포함하는 중배엽(mesodermal lineages)으로 분화할 수 있는 다분화능을 가지며, 특히 난모세포 유사 세포(oocyte-like cells)로 분화할 수 있는 능력을 갖는다. 나아가, 태반 유래 중간엽 줄기세포는 사람 백혈구 항원 G(human leukocyte antigen-G, HLA-G)와 관련해 면역제어에 큰 효과가 있다고 보고되고 있다.
- [0024] 본 발명에서는 난소기능개선의 용도로 태반유래 중간엽 줄기세포를 세포집합체의 형태로 적용하며, 일반적으로 세포 배양에 적용되고 있는 단층배양이 아닌, 단층배양된 태반유래 중간엽 줄기세포들을 포함하면서 일정한 부피를 가지도록 삼차원으로 배양된 세포집합체 형태로 난소기능개선용 약학조성물의 유효성분으로 적용된다.
- [0025] 최근 생물의학 분야에서 가장 흥미 있는 주제 중 하나인 삼차원 세포 배양은, 전형적인 단층배양(2D culture, monolayer culture)이 생명 시스템의 복잡한 미세환경(microenvironment)을 재현하는데 제한적이라는 점을 보완하며, 세포-세포(cell-cell) 및 세포-세포외기질(cell-extracellular matrix, cell-ECM)로 유지되는 생체 내와 유사한 환경을 제공할 수 있는 세포배양 방법이다.
- [0026] 중간엽 줄기세포의 삼차원 배양체는 재생의학분야에서 향상된 치료 가능성으로 인하여 주목 받고 있으며, 단층으로 부착 배양한 중간엽 줄기세포와 비교하여, C-X-C chemokine receptor type 4, IL-24 또는 tumor necrosis

factor-inducible gene 6 protein의 발현과 내피세포의 부착을 촉진하는 prostaglandin E2 genes을 증가시켜서, 항염증 또는 암억제 특성이 향상되도록 자가활성화 되었다고 보고하고 있다.

- [0027] 상기 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 세포집합체는, 서로 이웃하는 세포들 사이에 형성되는 세포 연결(junctional complex)과 세포-세포외기질(cell-extracellular matrix, cell-ECM)을 포함하여, 이들에 의하여 세포 간의 접합 경계가 적어 비교적 표면이 울퉁불퉁하지 않고 비교적 매끈한 외면을 가질 수 있다. 상기 세포 집합체는 태반유래 중간엽 줄기세포와 이들의 연결 및 세포-세포외기질로 이루어진 것일 수 있다.
- [0028] 상기 세포집합체는 스페로이드형(spherical)의 삼차원 구조를 가질 수 있다. 다만, 여기서 스페로이드형이라는 의미는 대체적으로 단면이 원형 또는 타원형으로 보일 수 있을 정도로 세포가 응집되어 있는 입체 구조를 의미하는데, 이러한 형태는 세포 또는 세포응집체의 특성을 고려해 판단되어야 하며, 완전한 스페로이드형이나 구형을 의미하는 것이 아님은 자명하다.
- [0029] 상기 세포집합체는 현적배양(hanging drop culture), 스핀너 플라스크 배양(spinner flask culture), 반구형 마이크로웰 플레이트(concave microwell plate)를 이용한 삼차원 세포배양 등 입체 형태로 세포집합체를 배양할 수 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0030] 단층배양된 세포들로부터 유도되어 형성되는 세포집합체는, 배양 초기에는 세포들이 서로 응집하여 세포연접에 의하여 연결되어 있기는 하나, 세포집합체의 표면에서 각 세포의 형태가 드러나 보며 전체적으로 울퉁불퉁한 외형을 가지며 전체적으로 삼차원 배양이 완료된 세포집합체의 경우보다 큰 직경을 갖는다.
- [0031] 배양이 진행될수록 세포집합체의 직경이 줄어들다가 일정 수준으로 유지되면서 세포집합체의 표면에 울퉁불퉁한 형태들이 점차 상대적으로 매끈한 상태로 바뀌게 되며, 전체적으로 본 발명에서 말하는 스페로이드형 입체 형태를 가지게 된다.
- [0032] 상기 세포집합체는 세포집합체 내의 세포들의 활성이 유지되면서 삼차원의 형태를 유지할 수 있는 정도의 크기라면 상기 약학조성물에 적용할 수 있고, 구체적으로 상기 세포집합체는 직경이 250 μm 이하인 것일 수 있으며, 100 내지 250 μm 인 것일 수 있다.
- [0033] 상기 약학 조성물은 포유동물의 난소기능개선용으로 활용될 수 있고, 조기 난소 부전(Premature ovarian failure), 조기 폐경(early menopause), 폐경(menopause), 불임/난임, 갱년기 증상 등의 증상완화와 치료용으로 적용될 수 있다.
- [0034] 포유동물의 난자형성(oogenesis) 과정에서, 생식선(germ line)은 난포(ovarian follicles)와 상호작용한다. 생식적으로 성숙한 포유류 여성에서, 난소기능의 회복은 새로운 난모세포(oocyte)와 원시난포(primordial follicles)가 발생하도록 하는 개념을 포함하며, 이때, Nobox, Nanos3 및 Lhx8과 같은 난자형성과 난포발생(folliculogenesis)에 관련된 마커들이 발현된다.
- [0035] 난소에서 Nobox 유전자 발현은 원시난포(primordial follicles)의 형성과 유지에 매우 중요하며, 생식 세포 발달(germ cell development)과 관련된 RNA 결합 단백질(RNA binding protein)에 의하여 유도되는 Nanos는 높은 보존성도 갖기에 난소기능 회복 또는 유지에 대한 유용한 바이오 마커로 활용된다. Lhx8의 경우, 주로 생식 세포에서 발생하며, 포유동물의 난자형성에 필수적인 LIM-homeobox transcription factor를 유도하는 단백질이다. 난소여포 미세환경에서 Nobox, Nanos3 및 Lhx8 발현을 통하여 난소 회복이 유도되었다는 보고도 있다.
- [0036] 본 발명의 발명자들은, 상기 약학 조성물을 일방난소절제 쥐(rat) 모델에 투여할 경우, Nobox, Nanos3 및 Lhx8 발현을 확인했고, 이를 통해 상기 약학조성물이 난소 기능을 회복시킬 수 있다는 점을 확인하였다.
- [0037] 상기 세포집합체를 유효성분으로 포함하는 약학조성물을 투여한 경우, 난소여포 미세환경을 통해서 난소 회복에 대한 치료적 효과가 있다는 점을 확인했으며, 이러한 투여를 통해서 난소여포(ovarian follicle)의 수도 증가시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명의 발명자들은 실험적으로 상기 약학조성물의 투여가 난소 일방 절제를 통해 난소기능이 감소된 쥐 모델에서 에스트라디올 수준(estradiol level)을 향상시킬 수 있으며 난포발생을 유도할 수 있다는 점도 확인했다.
- [0039] 이러한 결과를 바탕으로, 상기 약학조성물의 투여가 난포발생(folliculogenesis)을 통한 난자형성(oogenesis)에 의하여 기능부전 난소의 기능회복과 재생가능성이 있음을 확인하였다.
- [0040] 상기 약학 조성물은 위에서 설명한 세포집합체를 유효성분으로 포함하여, 상기 세포집합체의 제조에 사용되는 단층배양된 세포를 유효성분으로 포함하는 경우와 비교하여 난소여포 미세환경 내에서 세포집합체의 세포활성유

지 지속 기간이 길어지고 난자형성 마커(oogenesis marker)의 발현도 증가하며 난소여포(ovarian follicle)의 수 증가 효과도 더 우수한 것으로 나타나, 단층배양된 세포를 이용하는 경우보다 더 높은 치료적 가능성을 가진다.

- [0041] 조기 난소 부전(Premature ovarian failure)과 조기 폐경(early menopause)은 호르몬 결핍을 가져오고, 이는 사망률, 관상 동맥성 심장 질환, 치매, 골다공증, 노년기 우울증과 같은 심리적 변화, 성기능장애, 위축성 질염 등을 동반한다. 또한 갱년기 증상은, 생리주기 불규칙, 안면홍조, 발한, 불면증, 질 건조감, 요실금, 성욕감퇴, 골다공증 등을 동반하기도 한다.
- [0042] 이러한 갱년기 증상들을 완화시키기 위한 호르몬대체요법이 여성들에게 유일한 단기 처방이었고, 특히 폐경 이후 이루어지는 호르몬 치료는 장기간 적용시 유방암 등의 합병증 발생 가능성이 있어서 단기적인 처방이 주로 이루어지고 있다.
- [0043] 상기 약학조성물은 위의 호르몬대체 요법과는 달리 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스펜도이드형 세포집합체를 투여하여 난소기능회복에서 기인하는 에스트라디올 수준 유지 등의 효과를 얻을 수 있으며, 갱년기 치료의 목적인, 높은 안정성과 폐경기에 좋은 건강상태의 유지, 노화에 따른 합병증 최소화, 그리고 질병물의 최소화라는 효과도 얻을 수 있다. 또한, 상기 약학조성물은 난소 기능의 복원과 난소의 기능적 주기 확장이라는 방법으로, 여성의 삶의 질을 향상시키고 노화 관련 질병의 발생에 의한 의료 비용을 감소시킬 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학 조성물은 위에서 설명한 바와 같이 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스펜도이드형 세포집합체를 유효성분으로 함유하고, 약학적으로 허용가능한 담체, 즉 세포 치료제(cell therapy) 분야에서 통상적으로 사용되는 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 제제학적 방법에 따라 주사제[바람직하게는 난소(또는 자궁) 주입용 주사제]의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 멸균된 수용액(예를 들어, 생리식염수 등), 비수성용제 등을 포함할 수 있다. 또한, 필요에 따라 적절한 안정화제, 아주반트(예를 들어, 프로인트 완전 아주반트, 프로인트 불완전 아주반트 등), 등장화제, 보존제 등을 포함할 수도 있다.
- [0047] 본 발명의 약학조성물에 유효성분으로서 함유되는 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스펜도이드형 세포집합체의 투여량은, 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있고, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 세포집합체의 수를 기준으로 대략 500 개/kg가 투여될 수 있고, 필요에 따라 한번 또는 수회 반복하여 투여될 수 있다. 또한, 세포수를 기준으로 1회에 5×10^4 cells/kg 내지 1×10^6 cells/kg로 투여될 수 있다.
- [0048] 상기 약학조성물의 투여 경구, 직장, 정맥, 비강, 복강, 피하 또는 국소 투여의 방법으로 적용될 수 있고, 구체적으로 자궁 또는 난소 조직에 직접 주사 등을 이용하여 국소투여하는 방법이 적용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 난소기능개선용 스펜도이드형 세포집합체의 제조방법은, 세포집합체 배양용 반구형 마이크로웰 플레이트에 단층배양된 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 투여하는 투여단계; 세포성장인자를 함유하는 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 상기 반구형 마이크로웰 내에서 상기 태반유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 스펜도이드형 세포집합체를 형성하도록 유도하는 배양단계; 그리고 상기 스펜도이드형 세포집합체를 회수하는 회수단계;를 포함한다.
- [0051] 상기 마이크로웰은 세포집합체의 배양에 적절한 형태라면 적용할 수 있으나, 예를 들어 도 1에 도시된 것과 같은 반구형 마이크로웰 플레이트가 적용될 수 있으며, 소프트리소그래피(soft-lithography) 공법과 폴리머의 메니스커스(meniscus) 등을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0052] 상기 반구형 마이크로웰 플레이트는 제어된 크기와 모양을 가진 마이크로 크기의 스펜도이드형 세포집합체를 대량 생산하기 위해 유용한 수단이며, 세포집합체 배양을 위한 추가적인 장치나 노동력 투입 필요 없이 투여된 세포들이 자기조직의 방식으로 입체 형태를 갖추도록 할 수 있다.
- [0053] 상기 반구형 마이크로웰 플레이트는 실리콘으로 제조된 것이 적용될 수 있으며, 예를 들어 폴리디메틸실록세인

(polydimethylsiloxane, PDMS)으로 제조된 것일 수 있다.

- [0054] 상기 마이크로웰의 직경과 깊이는 상기 마에크로웰에 투여된 세포의 특성에 따라 일정한 모양과 크기가 적용될 수 있고, 예를 들어 상기 마이크로웰의 직경은 (도 1에서 ϕ 로 표시) 300 내지 1,000 μm 일 수 있고, 바람직하게는 400 내지 600 μm 일 수 있다.
- [0055] 반구형 구조를 가지는 상기 마이크로웰은 여러 몰드 형태로 만들 수 있으며, 본 몰드는 스페로이드형 구조로 세포응집체를 형성하여 세포가 자라는데 최적의 Multiple-concave형 몰드로, 수 백 개에서 수 천 개까지의 스페로이드형 세포응집체의 제조가 가능한 장점을 가진다.
- [0056] 상기 스페로이드형 세포집합체 배양용 마이크로웰에는 세포 투여 전에 웰의 반구형 표면의 세포부착을 막기 위한 코팅이 실시될 수 있으며, 예를 들어 소혈청 알부민으로 위의 세포집합체 배양용 웰을 코팅하는 등의 처리를 할 수 있다.
- [0057] 상기 세포집합체 배양용 웰로 반구형 마이크로웰 어레이가 형성된 플레이트를 적용하는 경우에는, 스페로이드형 세포집합체로 유도하기 위하여 몰드에 맞게 적절한 양의 세포를 투여하고 비교적 균일한 크기의 세포집합체를 비교적 간단한 방법으로 얻을 수 있다.
- [0058] 반구형 마이크로웰을 이용한 삼차원 세포배양은 세포들의 자기조립에 의하여 세포집합체를 형성할 수 있기 때문에 공정이 비교적 간단하고, 반구형 웰의 직경과 깊이를 조절해서 세포집합체의 크기를 조절할 수 있으며, 단층 배양된 태반유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 세포집합체를 의도하는 크기를 비교적 균일하게 가지도록 형성할 수 있다.
- [0059] 상기 마이크로웰에 투여된 태반유래 중간엽 줄기세포는, 태반으로부터 얻어진 세포를 공지의 처리과정으로 배양하여 얻어지는 것일 수 있으며, 태반유래 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있는 방법이라면 적용 가능하다. 구체적으로, 상기 태반유래 중간엽 줄기세포는 인간 태반에서 용모판의 막을 제거하고, 제거된 막으로부터 스크랩한 세포들을 단층배양하여 얻어지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 상기 투여는, 의도하는 세포집합체의 크기를 고려하여 정해진 마이크로웰의 크기에 따라 적절한 수의 세포를 마이크로웰의 반구형 면에 접하도록 위치시키는 방법으로 진행될 수 있다.
- [0061] 상기 투여된 세포들은, 세포들이 마이크로웰에 잘 가라앉는지를 확인한 후 세포집합체 배양용 배지를 이용하여 배양한다(배양단계).
- [0062] 상기 세포집합체 배양용 배지는 성장인자로 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF)과 헤파린(heparin)을 포함할 수 있다. 상기 배양액은 2 내지 3일에 한 번씩 교환되면서 상기 배양단계가 진행될 수 있다.
- [0063] 상기 배양단계는 1 내지 7일, 바람직하게 2 내지 5일 동안 진행될 수 있고, 본 발명에서 의도하는 상대적으로 매끈한 상태의 외면을 가지며 스페로이드 형태를 가지는, 즉 태반유래 중간엽 줄기세포들 사이에 연결과 세포외기질의 형성이 충분히 진행된 세포집합체의 형태를 제조할 수 있는 정도로 배양단계가 진행되면 족하다.
- [0064] 상기 회수단계는, 위의 과정으로 제조한 태반유래 중간엽 줄기세포를 함유하는 세포집합체를 회수하는 과정이다. 회수되는 세포집합체의 크기는 위의 마이크로웰의 직경과 깊이를 조절하는 방법으로 조절될 수 있으며 실질적으로 균일한 크기로 세포집합체를 제조할 수 있다.
- [0065] 예를 들어, 평균 직경이 약 500 μm 인 마이크로웰을 이용하여 세포집합체를 제조하는 경우, 투여 직후 자기조립이 진행중 스페로이드형 세포집합체의 경우 대략 250 μm 정도의 직경을, 배양이 진행되면서 비교적 매끄러운 외형의 세포집합체를 형성이 완성될 경우에는 대략 150 μm 정도의 직경의 세포집합체가 제조될 수 있다.
- [0066] 예를 들어, 평균 직경이 약 300 μm 인 웰을 이용하여 세포집합체를 제조하는 경우, 투여 직후 자기조립이 진행중인 스페로이드형 세포집합체의 경우 대략 100 μm 정도의 직경을, 배양이 진행되면서 비교적 매끄러운 외형의 세포집합체를 형성이 완성될 경우에는 대략 80 μm 정도의 직경을 가지는 세포집합체를 제조할 수 있다.
- [0067] 상기 난소기능개선용 스페로이드형 세포집합체의 제조방법은, 비교적 간단한 방법으로 태반유래 중간엽 줄기세포를 균일한 직경의 세포집합체의 형태로 제조할 수 있고, 배양 과정에서 세포들 사이의 연결과 세포외기질이 충분히 형성된, 난소기능개선용 약학조성물의 유효성분으로 적용될 수 있는 세포집합체를 제조할 수 있도록 한다. 상기 난소기능개선용 세포집합체의 제조방법은 위에서 설명한 난소기능개선용 약학 조성물의 제조 과정으로써 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0068] 본 발명의 난소기능개선용 약학 조성물 및 이의 제조방법은, 태반유래 중간엽 줄기세포(placenta derived mesenchymal stem cells)를 스페로이드형 세포집합체(spheroid cell aggregates)로 제조하여, 조기 난소 부전, 불임, 난임, 조기 폐경, 폐경, 및 갱년기 증상의 완화 또는 치료용 약학 조성물로 적용될 수 있다. 특히, 단층 배양된 태반유래 중간엽 줄기세포와 비교하여 본 발명에서 세포집합체, 구체적으로 스페로이드형으로 삼차원 배양된 세포집합체는 이식 시 세포생존능 향상, 에스트라디올 수준향상과 난포발생촉진 정도 향상 등의 난소기능 개선에 우수한 치료적 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 본 발명의 실시예에서 일방난소적출 쥐 모델을 이용하여 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 난소 기능 회복 효과를 확인한 실험의 과정을 보여주는 그림이다.

도 2는 본 발명의 실시예에서 적용한 반구형 마이크로웰 플레이트의 구조를 보여주는 그림이다(ϕ 는 직경을 의미).

도 3은 본 발명의 실시예 1. 1)에서 오목 마이크로웰 플레이트에 시딩된 Naive PD-MSCs가 시간의 경과에 따라 PD-MSCs 구형세포집합체로 변화하는 과정을 현미경으로 관찰한 결과이다(Scale bars: 200 μ m).

도 4는 위의 도 3에서 관찰한 3일째의 PD-MSCs 구형세포집합체를 마이크로웰 플레이트에서 분리하여 회수한 샘플들의 현미경 관찰 결과이다(Scale bar: 200 μ m).

도 5는 위의 도 3에서 1일째에 해당하는 PD-MSCs 구형세포집합체를 회수하여 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과이다[Scale bars: 10 nm, 화살표는 이웃하는 세포들 사이에 존재하는 서로 다른 종류의 연결(junctions)을 표시함].

도 6은 위의 도 3에서 3일째에 해당하는 PD-MSCs 구형세포집합체를 회수하여 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과이다[Scale bars: 10 nm, 화살표는 이웃하는 세포들 사이에 존재하는 서로 다른 종류의 연결(junctions)을 표시함].

도 7은 본 발명의 실시예 1. 2)에서 설명하고 있는 시간에 따른 세포집합체의 직경에 대한 측정 결과를 보여주는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 실시예 1. 3)에서 설명하고 있는 삼차원 배양 1일째의 세포집합체의 세포 생존능 평가 결과를 보여주는 형광사진이다(Scale bar: 200 μ m).

도 9는 본 발명의 실시예 1. 3)에서 설명하고 있는 삼차원 배양 3일째의 세포집합체의 세포 생존능 평가 결과를 보여주는 형광사진이다(Scale bar: 200 μ m).

도 10은 위의 도 8과 도 9의 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다(means $\pm$ S.D., n=25).

도 11은 본 발명의 실시예 2. 1)에서 각 그룹별로 쥐 모델의 체중에 대한 난소무게 값을 이식 1주 후와 2주 후에 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 실시예 2. 2)에서 각 그룹별 쥐 모델의 E_2 level을 이식 1주후와 2주 후에 분석한 결과이다.

도 13은 본 발명의 실시예 2에서 PD-MSCs의 이식 성공 여부를 확인하기 위하여 human Alu sequences에 대한 real-time PCR 분석을 이식 후 1주 및 2주 후의 샘플을 이용해 수행한 결과이다.

도 14는 본 발명의 실시예 2. 3)에서 PD-MSCs에 의한 난소 기능 회복 효과를 확인하기 위하여 각 그룹별 난소에서 여포의 발달 여부를 확인한 면역조직화학적 염색 사진이다(Scale bar: 20 nm).

도 15는 본 발명의 실시예 2. 4)에서 PD-MSCs에 의한 난소 기능 회복 효과를 확인하기 위하여 이식 1주 후 및 2주 후에 발달한 여포의 수를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 16은 본 발명의 실시예 3. 1)에서 qRT-PCR을 이용하여 이식 1주 후 및 2주 후의 난소 조직으로부터 Nanos3 mRNA 발현 정도를 분석한 결과이다.

도 17은 본 발명의 실시예 3. 1)에서 qRT-PCR을 이용하여 이식 1주 후 및 2주 후의 난소 조직으로부터 Nobox

mRNA 발현 정도를 분석한 결과이다.

도 18은 본 발명의 실시예 3. 1)에서 qRT-PCR을 이용하여 이식 1주 후 및 2주 후의 난소 조직으로부터 Lhx8 mRNA 발현 정도를 분석한 결과이다.

도 19는 본 발명의 실시예 3. 2)에서 이식 1주 후 및 2주 후의 난소 조직에서 Nanos3 단백질 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

도 20은 본 발명의 실시예 3. 2)에서 이식 1주 후 및 2주 후의 난소 조직에서 Nobox 단백질 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

도 21은 본 발명의 실시예 3. 2)에서 Lhx8 단백질 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0070] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 첨부한 도면을 참고로 하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0072] 이하에서, %는 특별한 설명이 없으면 중량%를 의미하며, 실시예의 설명 및 도면에서 적용한 약자는 별도의 설명이 없으면 하기의 의미를 갖는다.
- [0073] - PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체: PD-MSC spheroids
- [0074] - 단층배양된 PD-MSCs(monolayerd PD-MSCs, Naive PD-MSCs): Naive PD-MSCs
- [0075] - 일방난소절제술이 시행된 쥐: OVX(ovariectomy) rats
- [0076] - 난소절제술을 시행하지 않은 쥐 그룹: Control 그룹
- [0077] - 일방난소절제술을 시행한 쥐 그룹(Non-transplanted rats, NTx sham controls로 배양 배지를 이식함): NTx 그룹
- [0078] - 일방난소절제술을 시행한 쥐에 Naive PD-MSCs 5×10^5 cells를 쥐의 꼬리를 통해 정맥 주사한 그룹): Naive 그룹
- [0079] - 일방난소절제술을 시행한 쥐에 100개의 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체(약 1×10^5 cells)를 주사를 통해 남아있는 난소에 이식한 모델: Spheroids 그룹
- [0081] 도 1은 이하 실시예에서 설명하는 일방난소적출 쥐 모델을 이용하여 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 난소 기능 회복 효과를 확인한 실험의 과정을 보여주는 그림이다. 도 1을 참고하면, 인간태반의 융모판(chorionic plate)으로부터 분리되어 반구형 마이크로웰 플레이트에 투여된 후 삼차원 배양된 중간엽줄기세포는 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체 형태로 난소적출 쥐 모델에 이식되었으며 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체가 이식받은 쥐의 난소 기능에 있어서 어떠한 영향을 미치는지를 아래에서 설명하는 방법으로 확인하였다.
- [0083] < 실험 방법>
- [0084] 1. 실험동물의 준비
- [0085] 35마리의 6주령 SD 쥐(Sprague-Dawley rat, 체중 205 내지 215 g)를 오리엔트 바이오(Orient Bio Inc)로부터 입수하고, 실험 전에 실온에서 그룹별로 사육했다. 모든 과정은 제넥사인 연구소(Genexine Co., 대한민국 성남)의 윤리 가이드라인에 따라 수행되었다.
- [0086] 일방 난소적출(Ovx; removed the one ovary)은 논문(Am J Anat. 1970 Jan;127(1):1-7. Effects of unilateral ovariectomy on ovulation and cycle length in 4- and 5-day cycling rats. Peppler RD, Greenwald GS.)에 기재된 방법으로 수행되었다.

- [0087] 구체적으로, 무균 조건 하에서 케타민(ketamine)과 럼폰(Rompun)을 3:1의 부피비로 혼합하고 100ul/체중g의 용량으로 근육 내 주사하는 방법으로 마취시킨 쥐에 일방 난소 적출을 위한 수술적 과정이 적용되었다. 마취된 쥐의 뒷 가슴 하부를 면도한 후 3cm 절개하여 배근(back muscles)을 노출시키고, 근육을 1cm 절개하고 오른쪽 난소를 절제-분리한 후 살균된 봉합사로 묶는 방식으로 일방 난소 적출이 실시되었다.
- [0088] 일방 난소가 적출된 쥐에게는 1주 동안 회복 기간이 주어졌다.
- [0090] 2. 태반유래 중간엽줄기세포의 분리 및 배양
- [0091] 의학적, 산과적, 수술적인 문제가 없는 사람의 정상 태반을 확보하였다. 임신기간은 38 내지 40주였다. 모든 여성 태반은, 태반 수집에 대하여 미리 문서화된 서면 동의를 득하고 제공받았으며, 태반의 수집과 사용은 차병원의 IRB(Institute Review Board) 승인 하에 진행되었다.
- [0092] PD-MSCs(태반 유래 중간엽 줄기세포, placenta derived mesenchymal stem cells)는 등록된 특허 (태반 용모판-유래 중간엽 줄기세포의 고순도 분리방법, 등록번호: 10-0900309, 등록연도: 2009)에 설명된 방법으로 분리되었고, 2D 상태로 배양용기에서 배양해 Naive PD-MSCs로 적용되었다.
- [0093] 구체적으로, 태반에서 용모판의 막을 제거하고 막으로부터 세포를 스크랩했으며, 스크랩된 세포는 37 °C에서 30 분 동안 0.5% 콜라게나제 IV(collagenase IV, SIGMA)로 처리되었다. 처리된 세포들은 T25 플라스크 내에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 보충된 Ham's F-12/DMEM에 2×10^5 cells/cm²로 이식되고 배양되었다.
- [0095] 3. PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 제조
- [0096] 스페로이드형 세포집합체(Spheroid cell aggregates)는 폴리디메틸실록세인(polydimethylsiloxane, PDMS) 기반 반구형 마이크로웰 플레이트(concave microwell plate)를 이용하여 제조하였다.
- [0097] 도 2에 나타난 것과 같이, 500 μm 직경을 가진 반구형 마이크로웰은, 등록된 특허 (표면장력을 이용한 반구형 마이크로웰의 제조 및 이를 이용한 세포집합체의 형성, 등록번호: 10-1282926, 등록연도: 2013)에 설명된 방법대로 소프트 리소그래피(soft lithography techniques)와 PDMS 프리폴리머(polydimethylsiloxane prepolymer)의 메니스커스(meniscus)를 이용하여 플레이트의 단위 cm² 당 100 wells의 밀도로 배열되도록 제조되었고, 세포부착을 막기 위하여 3% (w/v) BSA(bovine serum albumin)으로 코팅된 후 스페로이드형 세포집합체 제조에 적용되었다.
- [0098] 위의 2.에서 2D 상태로 상용 배양용기에서 배양한 Naive PD-MSCs(8-11 passages)을 트립신으로 떼어낸 후 플레이트당 200,000 cells로 세포들이 웰 안쪽에 위치되도록 투여되었다. 거의 모든 세포들은 투여 5분 후에 균일하게 안착되었고, 반구형 마이크로웰 내에 안착되지 못한 세포들은 제거되었다.
- [0099] 안착된 세포들은 50ng/ml 내지 100ng/ml의 FGF-4과 500ng/ml 내지 5 μg/ml의 heparin을 보충한 배지로 교환하여 배양되었다. 세포 응집과 스페로이드형 세포집합체 형성 과정은 현미경을 이용하여 매일 관찰되었다. 스페로이드형 세포집합체의 직경은 Image J software(NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석되었다.
- [0101] 4. PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 생존능(viability) 평가
- [0102] PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체(PD-MSC spheroids)에 포함된 세포들의 생존능을 확인하기 위하여, PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체는 50 mM calcein-AM과 25 mg/mL EthD-1 (ethidium homodimer-1; Molecular Probes, USA)와 함께 배양 배지에서 40분동안 37° C에서 배양된 후, 공초점 현미경(Olympus, Japan) 하에서 관찰되었다.
- [0103] 관찰 결과에서, 초록색인 calcein-AM 신호는 살아있는 세포를 의미하고, 빨간색인 EthD-1 신호는 죽은 세포를 의미한다. ImageJ software를 이용하여 관찰결과로부터 정량화된 세포생존능의 데이터도 확보하였다.
- [0105] 5. 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM) 관찰

[0106] PD-MSCs 스펜로이드형 세포집합체는 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)가 포함된 PBS(phosphate buffer saline)로 1시간 동안 고정화하고, 탈이온수로 3 내지 5회 부드럽게 세척하였다. 2차 고정을 위해서 스펜로이드형 세포집합체는 1% 사산화 오스뮴(osmium tetroxide)이 포함된 탈이온수에 1시간 동안 침지되었다.

[0107] 고정된 스펜로이드형 세포집합체는 실온에서 농도별 에탄올(25%, 50%, 75%, 95%, 및 100%)에 순차적으로 침지시킨 후, 테트라부틸알코올(tetra butyl alcohol)에 각각 30분씩 3번 침지시켜 탈수화하고 -70 °C에서 냉동하였다. 테트라부틸알코올은 스펜로이드형 세포집합체를 동결건조하는 과정으로 제거되었고, 이렇게 제조된 견본 조각은 팔라듐 합금으로 코팅하고 흑연 페이스트와 함께 주사전자현미경(scanning electron microscope, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan)으로 스펜로이드 세포집합체의 형태를 관찰하였다.

[0109] 6. 이식(Transplantation)

[0110] 3일 동안 배양된 PD-MSCs 스펜로이드형 세포집합체는 반구형 마이크로웰로부터 회수되어 이식에 사용되었다. Naive PD-MSCs(5×10^5 cells)과 Spheroidal PD-MSCs (1×10^5 cells)은 PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit(Sigma-Aldrich)로 염색되고, 난소절제술 후 1주일간 안정을 취한 쥐의 남아있는 난소로 이식되었다(Naive; n=10, Spheroid; n=10). PD-MSCs 이식을 실시하지 않은 쥐(Non-transplanted rats, NTx; n=10)은 sham controls로 배양 배지를 이식하였다.

[0111] 각각의 그룹들의 쥐는 1주 후와 2주 후에 각각 희생하여 난소 조직이 회수되었고, 회수된 모든 그룹(Control, NTx, Naive 및 Spheroid)의 난소 조직으로부터 난소 중량 등의 측정을 수행했다. 매주 혈액 샘플들을 쥐로부터 채취되어, 원심분리에 의하여 EDTA plasma를 분리하고 -80°C에 보관한 후 연구에 사용하였다. 플라즈마에서 에스트라디올 수준은 Estradiol DSL-4400 Radioimmunoassay kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.)을 이용하여 제조자가 제시한 방법에 따라 측정되었다.

[0113] 7. qRT-PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction) 분석

[0114] 냉동보관 후 해동된 된 난소를 페놀/클로로포름(SIGMA-Aldrich)을 이용하여 DNA를 추출하고 에탄올을 이용하여 침전시킨 후, UN absorbance에 의하여 총 DNA를 확인하였다. 실시간 PCR은 타겟 DNA 300ng와 Alu-specific preimer를 이용하여 Applied Biosystems사의 자동화 기기를 이용하여 수행되었다. 타겟 서열은, 95°C에서 2분, 그리고 95°C에서 5초와 56°C에서 30초의 40 사이클 반복하는 조건에서 증폭되었고, 쥐 β -actin 유전자를 이용해 정규화되었다. 모든 반응은 독립적으로 3번 수행되었다.

[0115] 난자형성과 관련된 Nanos3, Nobox 및 Lhx8의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위하여, 마커들의 mRNA 발현 수준을 Applied Biosystems사의 자동화 기계와 SYBR®ExScript™RT-PCR Kit(TaKaRa)를 이용하여 정량적 실시간 PCT 증폭 분석을 실시하였다. 각각의 유전자 발현은 rat internal reference인 GAPDH 수준을 참고하여 정규화하였다. 여기서 사용된 프라이머의 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 타겟 서열은 95°C에서 10초, 그리고 95°C에서 10초, 59°C에서 30초를 40 사이클 반복하는 온도 조건을 사용하여 증폭하였다. 모든 반응은 독립적으로 두 번 실시되었다.

표 1

[0116]

Gene	Primer sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)
human Alu	F: CTGGGCGACAGAACGAGATTCTAT R: CTCCTACTTGGTGACAGGTTC	59
Nanos3	F: CTC TGC ATG AGG AAG AGG AGC C R: GGA CTG ATA GAT CGC ACG AGA	55
Lhx-8	F: GTA TCA CTT GGC TTG CTT R: ATT ACC GTT CTC CAC TTC	55
Nobox	F: AGC CAG TGC AGA TCT GCA CC R: TGT CAC TGC CAG GAA CAT CCC TC	50
β -actin	F: TCC TTC TGC ATC CTG TCA GCA R: CAG GAG ATG GCC ACT GCC GCA	58

GAPDH	F: TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA R: AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT	55
-------	--	----

[0118] 8. 웨스턴 블로팅(Western blot analysis)

[0119] 각 그룹의 쥐로부터 얻어진 난소 조직은 단백질 용해 버퍼(protein lysis buffer, Sigma-Aldrich)를 이용하여 균질화 및 용해되었다. 각 쥐로부터 얻어진 동량의 단백질 용해물은 1주와 2주에 난소로부터 회수했다.

[0120] 단백질 용해물은 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels)에 로딩된 후 PVDF 멤브레인(PVDF membrane, Bio-Rad Laboratories)에 이동되었다. 멤브레인을 블록킹하고 4℃에서 anti-LHX8 polyclonal antibody(Santacruz), anti-Nanos3 polyclonal antibody(Abcam) 그리고 anti-Nobox polyclonal antibody(Abcam)와 같은 1:1,000으로 희석된 일차 항체로 처리하여 하룻밤 결합하도록 하였다.

[0121] 멤브레인은 세척된 후 이차항체(horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG, 1:10,000, Bio-Rad Laboratories; 또는 anti-goat IgG, 1:5,000, Santa Cruz Biotechnology)가 결합되도록 1시간반 동안 실온에서 반응시켰다. 최종 멤브레인을 세척한 후에, 타겟 단백질들은 ChemiDoc(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 확인하였다. 결과의 정량화를 위해서, 모든 반응은 세 번 독립적으로 반복 실시되었다.

[0123] 9. 조직학적 분석(Histological analysis)

[0124] 난자가 성숙되었는지를 확인하기 위하여, 난소를 파라핀에 침지하여 고정하고, 3μm 두께로 절편을 제조한 후, haematoxylin and eosin(HE) procedure를 이용하여 염색하였다. 절편들은 4% PFA으로 고정되고, Mayer's hematoxylin으로 염색된 후 graded ethanol으로 탈수화되고, xylene으로 세척된 후 Zeiss Axioskop2 MAT microscope (Carl Zeiss MicroImaging)를 이용하여 관찰되었고, 상대적인 정량화를 위해서 총 여포의 수를 확인하였다.

[0126] 10. 통계분석

[0127] 모든 데이터는 means ± standard error 로 표시되었고, 다양한 시점에서 그룹들간의 결과치를 비교하는 turkey post-test에 따라 이원변량분석법(two-way ANOVA)에 의하여 분석되었다. 모든 통계적인 분석은 SPSS software (SPSS)를 이용하여 수행되었고, 0.05 이하인 P 값을 통계적으로 유의미한 것으로 취급하였다.

[0129] <실험 결과>

[0130] 실시예 1: 반구형 마이크로웰 플레이트를 이용한 스페로이드형 세포집합체의 제조

[0131] 위에서 설명한 것과 같이, PDMS 기반 반구형 마이크로웰 플레이트에서 Naive PD-MSCs를 배양하면서 세포가 응집 되도록 유도하는 방법으로 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체를 제조하였다.

[0133] 1) 응집과정 및 표면 관찰

[0134] Naive PD-MSCs를 투여한 직후부터 3일이 경과한 시점까지 매일 현미경으로 관찰한 결과를 도 3에 나타내었다. 또한, 3일이 경과한 후 회수된 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 현미경 관찰 사진을 도 4에, 각각 1일째와 3일째에 회수한 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체 주사현미경(SEM) 관찰사진을 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0135] 상기 도 4 내지 도 6을 참조하면, PD-MSCs는 세포가 웰 내에 안착된 직후부터 응집되기 시작했고, 1일이 경과한 후에는 스페로이드 모양으로 집합체를 형성하였다. 비교적 매끈한 외면을 가진 조밀한 구의 형태는 2일 이후부터 관찰되었다(도 3). 이식이 진행되기 전에 회수된 스페로이드형 세포집합체는, 반구형 마이크로웰에 의하여 제어된 크기를 가지며, 실질적으로 일정한 크기인(size-homogeneous) 것으로 관찰되었다(도 4).

[0136] 삼차원 배양의 PD-MSCs의 응집 과정에서 나타나는 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서, SEM 이미지로 배양 1일

제와 배양 3일째의 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 표면을 관찰하였다(도 5 및 도 6).

[0137] 배양 1일째의 스페로이드형 세포집합체는 울퉁불퉁한 표면을 가지는 것으로 관찰되었으나, 배양 3일째에는 표면의 세포들이 비교적 평평하게 촘촘한 표면에 쌓여 있는 것으로 관찰되었다. 특히, 도 5과 도 6 하단 사진인 Magnified SEM images는 배양 1일째의 샘플과 배양 3일째의 샘플에서 서로 다른 모양의 세포-세포 연결(cell-cell junctions)이 확인된다는 점을 보여주었다.

[0139] 2) 세포집합체의 직경

[0140] 위의 실험방법에서 설명한, 500 μm 직경의 마이크로웰 플레이트에서 배양한 PD-MSC 스페로이드형 세포집합체의 (평균)직경을 매일 측정하여 그 결과를 도 7에 그래프로 나타내었다.

[0141] 상기 도 7을 참조하면, 배양 1일째의 PD-MSC 스페로이드형 세포집합체는 평균 크기가 $194.7 \pm 9.6 \mu\text{m}$ 로 나타났고, 배양 3일째의 평균 크기는 $143.7 \pm 5.7 \mu\text{m}$ 로 줄어드는 것으로 나타났다. 배양 5 내지 7일째까지 거의 일정하게 배양 3일째 이후의 평균 크기로 유지된다는 점을 확인할 수 있었다.

[0143] 3) 세포집합체의 세포 생존능 평가

[0144] 배양 1일째와 배양 3일째 PD-MSC 스페로이드형 세포집합체의 세포 활성을 평가하였다. live/dead assay reagents로 염색된 PD-MSC spheroids의 형광 사진을 도 8(1일째)과 도 9(3일째)에, 이 결과를 정량화한 결과를 도 10에 나타내었다.

[0145] 도 8 및 도 9를 참조하면, 녹색으로 관찰되는 살아있는 세포와 빨간색으로 관찰되는 사멸한 세포의 형광 사진으로부터 세포집합체의 표면에 있는 잔해(Debris)는 시간의 경과에 따라서 사라졌고, 스페로이드형 세포집합체를 이루는 거의 모든 세포가 녹색으로 관찰되어 상당히 높은 세포생존율을 가진다는 점을 확인할 수 있었다.

[0146] 이 결과를 정량화해 나타낸 도 10을 참조하면, 배양 1일째와 배양 3일째에서 모두 높은 세포 생존율(각각 $90.4 \pm 3.9\%$ 과 $94.8 \pm 2.7\%$)을 가진다는 점을 확인할 수 있었고, 이는 PDMS 반구형 마이크로웰 플레이트를 이용하여 태반유래 줄기세포 스페로이드형 세포집합체의 배양이 효과적으로 진행된다는 점을 나타내는 결과이다.

[0148] 실시예 2: 난소절제 쥐에 이식된 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체의 난소기능 회복 효과 평가

[0150] 1) 난소무게 분석

[0151] 난소절제 쥐 모델에서 이식된 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체에 의한 효과를 확인하기 위하여, 쥐 모델의 체중과 해당 쥐 모델의 난소무게를 이식 1주 후와 2주 후에 관찰하였고 체중과 대비한 난소 무게 값을 도출하여 그 결과를 도 11에 정리하였다.

[0152] 도 11를 참조하면, 이식 1주 후에 Naive 그룹의 난소무게가 감소한 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 이식 1주 및 2주 후의 spheroids 그룹의 난소 무게는 NTx 그룹의 경우와 비교하여 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다($p<0.05$). 나아가, 이식 1주와 2주 경과 후 Spheroid 그룹의 난소 무게는 Naive 그룹의 난소 무게와 비교하여도 유의미하게 증가하는 것으로 확인되었다($p<0.05$).

[0154] 2) E₂ 수준 분석

[0155] PD-MSCs 이식이 난소 기능에 미치는 영향을 연구하기 위해, 각 그룹들에서 세럼 에스트라디올 수준(serum estradiol levels, E₂ level)을 분석하여 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0156] 도 12를 참조하면, 이식 1주 후 NTx 그룹에서 control 그룹과 비교하여 E₂ level이 약 50%로 수준으로 감소하였다($30 \pm 4.8 \text{ pg/mL}$ vs. $15.58 \pm 0.76 \text{ pg/mL}$; $p<0.05$). 또한, NTx 그룹의 E₂ level은 이식 1주 후부터 급격하게 감소하여 2주가 되는 시점에는 control 그룹과 비교하여 약 77%($6.9 \pm 1.4 \text{ pg/mL}$; $p<0.05$) 감소하는 것으로 확인

되었다.

[0157] PD-MSCs 이식이 실시된 두 그룹(Naive 그룹과 Spheroids 그룹)의 경우, NTx 그룹과 비교하여 이식 2주 후에 E_2 level이 증가하는 것으로 나타났다(18.9 ± 3.8 pg/ml; Naive 그룹, 40.3 ± 3.8 pg/ml; Spheroid 그룹, $p < 0.05$). 또한, 이식 2주 후 Spheroid 그룹의 E_2 level은 Naive 그룹의 경우보다 눈에 띄게 높게 나타났다($p < 0.05$).

[0159] 3) human Alu sequences 분석

[0160] PD-MSCs의 이식 성공 여부를 확인하기 위하여, human Alu sequences에 대한 real-time PCR 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0161] 도 13에 나타난 결과를 참조하면, human Alu sequences는 control 그룹과 NTx 그룹에서는 관찰되지 않았고, 이식을 진행한 그룹들(Naive 그룹 및 Spheroid 그룹)에서만 유의미한 수준으로 관찰되었다($p < 0.05$).

[0162] Spheroid 그룹의 난소에서 Alu sequence의 발현은, 그 수준이 증가된 상태에서 꾸준히 유지되는 반면($p < 0.05$), Naive 그룹의 경우에는 이식 1주 후의 시점과 비교하여 이식 2주 후의 시점에서 급격하게 감소하는 것으로 나타났다.

[0163] 이는 Spheroid 그룹에서 적용하고 있는 것처럼 PD-MSCs를 세포집합체 형태로 이식할 경우가, 그렇지 않은 경우와 비교해 *in vivo* 에서 세포 생존에 유리하며, 그 기능이 지속적으로 유지될 수 있다는 점을 보여주는 결과라고 생각된다.

[0165] 4) 난소 내 총 여포 수의 분석

[0166] PD-MSCs의 난소 기능 회복 효과를 확인하기 위하여, 모든 그룹에서 난소 내의 여포(follicles) 발달 및 여포의 수를 확인하고 그 결과를 도 14 및 도 15에 나타내었다.

[0167] 도 14 및 도 15의 결과를 참조하면, 여포의 수는 Control 그룹과 비교하여 NTx 그룹에서 감소했다($p < 0.05$). Naive 그룹의 경우, 이식 1주 후 시점에는 NTx 그룹과 별 다른 차이가 없었으나, 2주 경과 후에는 NTx 그룹과 비교하여 여포의 수가 2배 정도 증가하였다(30.3 ± 1.2 vs. 15 ± 2.5 , $p < 0.05$). Spheroid 그룹을 적용한 샘플들은 NTx 그룹과 비교하여 2배정도 증가된 여포의 수를 가지며 이러한 특징은 이식 후 2주부터 주수와 무관하게 유지되는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

[0168] 이식 후 1주를 기준으로, 여포의 수는 Naive 그룹과 비교하여 Spheroid 그룹에서 약 1.8배 증가한 것으로 나타났다($p < 0.05$).

[0169] 이러한 결과는 난소에 직접적으로 이식한 PD-MSCs가 난소절제 이후의 에스트라디올 생산을 조절하여 난소 기능을 회복시킨다는 점을 의미하는 것으로 해석된다. 그리고, 이는 세포집합체의 치료적 효과가 Naive PD-MSCs의 경우보다 우수하다는 점을 보여주는 결과로 평가된다.

[0171] 실시예 3: 난소절제 쥐에 이식된 PD-MSCs 스페로이드형 세포집합체에 의한 난포발생 활성 평가

[0172] 난소여포(ovarian follicle) 형성에 영향을 주는 인자들로, Nanos3, Nobox(Newborn ovary homeobox) 및 Lhx8(LIM-homeobox protein8) 등이 알려져 있다. 난소절제 쥐의 난소에서 real-time PCR, 및 웨스턴블롯팅(western blot)으로 난포발생 마커의 발현을 시험하여, 난포발생(folliculogenesis)에 대한 PD-MSCs 이식의 영향을 아래와 같이 확인하였다.

[0174] 1) qRT-PCR 분석

[0175] qRT-PCR을 이용하여 난소 조직으로부터 Nanos3(Nanos), Nobox 및 Lhx8의 mRNA 발현 정도를 분석했고, 그 결과를 각각 도 16 내지 도 18에 나타냈다.

[0176] Nobox의 mRNA 발현 수준은 1주와 2주 시점에서 NTx 그룹과 비교하여 Naive 그룹에서 유의미하게 증가하였고($p < 0.05$), Spheroid 그룹의 경우에는 유의미한 차이가 발견되지 않았다(도 17 참고). 그러나, 이식 1주 후와 2

주 후의 두 경우 모두, Spheroid 그룹에서 NTx 그룹 및 Naive 그룹과 비교하여 Nanos와 Lhx8의 mRNA 발현이 유의미하게 증가하였다는 점을 확인할 수 있었다($p<0.05$, 도 16 및 도 18 참고).

[0178] 2) 웨스턴 블로팅(Western blot analysis)

[0179] Nanos3, Nobox 및 Lhx8 단백질 발현 정도를 확인한 웨스턴 블로팅 결과를 도 19 내지 도 21에 나타내었다.

[0180] 웨스턴 블로팅 결과를 참조하면, Nanos3, Nobox 및 Lhx8의 단백질 발현은 이식 후 2주 시점에서 NTx 그룹과 비교하여 Naive 그룹에서 증가한 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 또한, Nanos3, Nobox 및 Lhx8 단백질 발현은 NTx 그룹과 비교하여 Spheroid 그룹에서 이식 1주 후와 2주 후의 경우 모두에서 유의미하게 증가하였다는 점을 확인할 수 있었다($p<0.05$).

[0181] Nanos3과 Nobox 단백질 발현은 1 주 후의 Naive 그룹과 비교하여 비교하여 Spheroid 그룹에서 유의미하게 증가한 것으로 나타났으며($p<0.05$), Lhx8의 발현은 이식 1주 후와 이식 2주 후 모두에서 Naive 그룹과 비교하여 Spheroid 그룹에서 급격하게 증가하였다는 점을 확인할 수 있었다($p<0.05$).

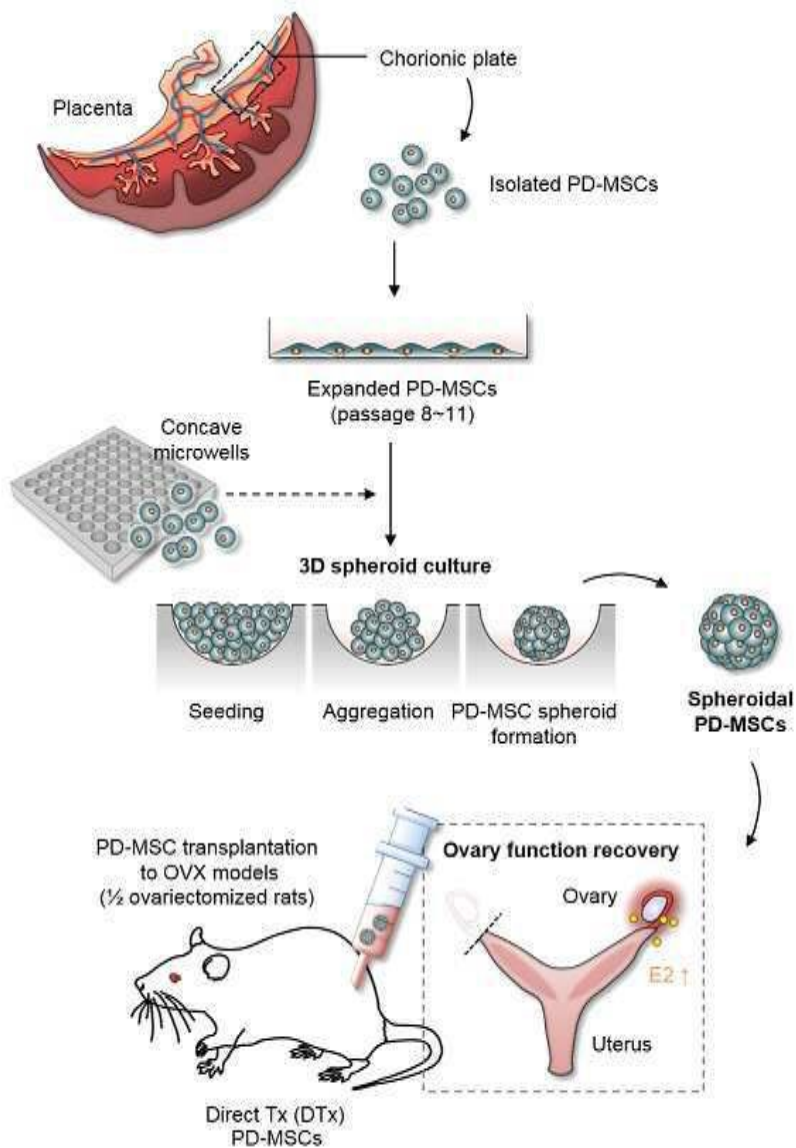
[0183] 위의 결과들을 참조하면, 난소여포(ovarian follicle) 형성에 영향을 주는 인자들의 발현 수준이 PD-MSCs 이식의 영향을 받아 유의미하게 증가한다는 점을 확인할 수 있었으며, 이를 고려하면 PD-MSCs 이식은 난포발생을 촉진하는 것으로 판단된다.

[0185] 위에서 설명한 실험 결과들은 Spheroid 그룹에 이식된 PD-MSC 스페로이드형 세포집합체가 이식 후에 난소 기능을 향상시킬 수 있다는 점을 보여주고 있으며, 세포 이식 후 유전자 발현의 차이, E_2 농도의 변화, 여포의 성숙 정도 등을 고려하면 이식 후 약 1주일 후부터 이식된 PD-MSC 스페로이드형 세포집합체가 난소 기능 향상에 직접적인 기여를 하며 그 기능이 유지되는 것으로 생각된다.

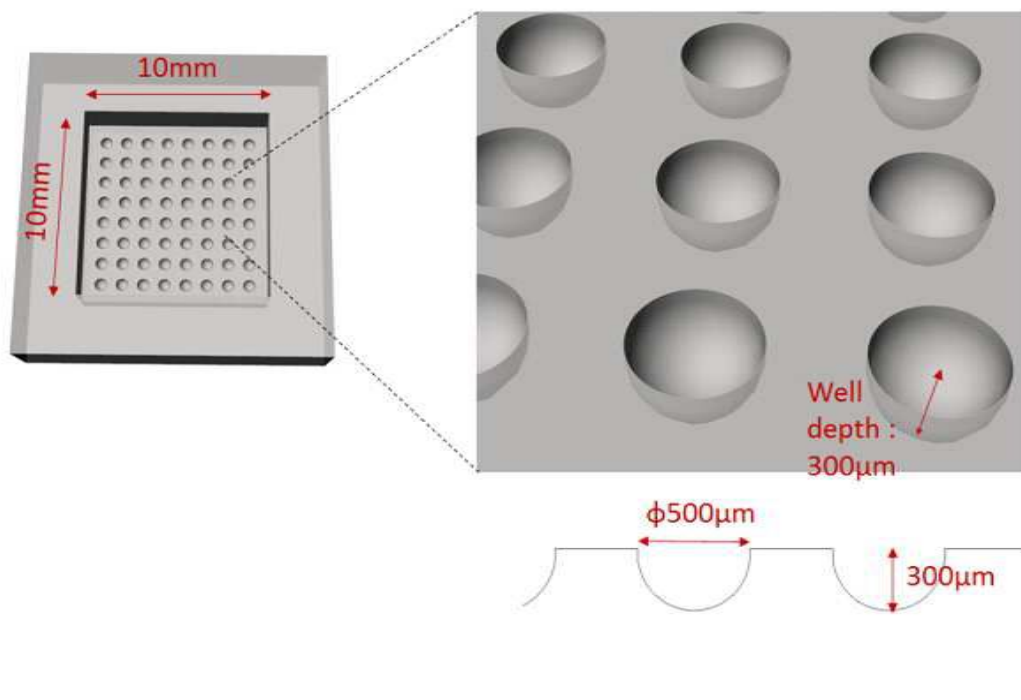
[0187] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

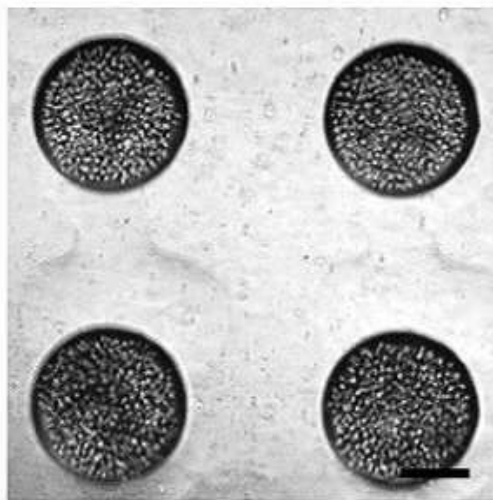
도면1



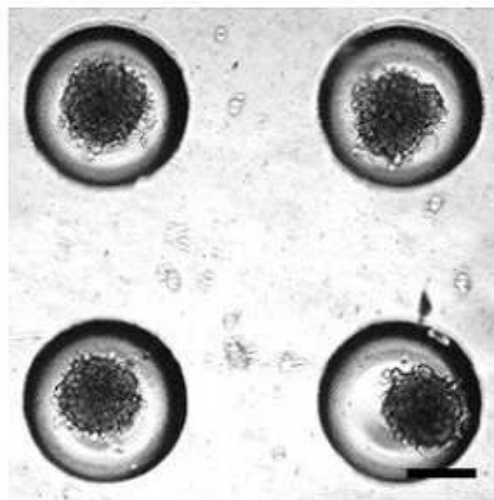
도면2



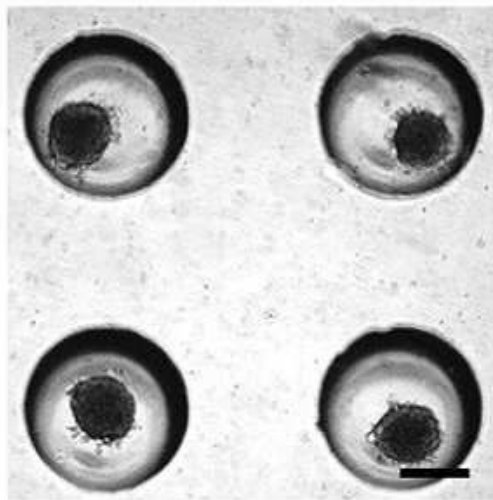
도면3



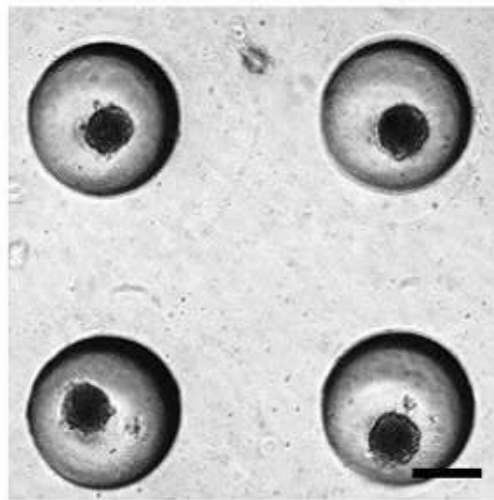
Day 0



Day 1

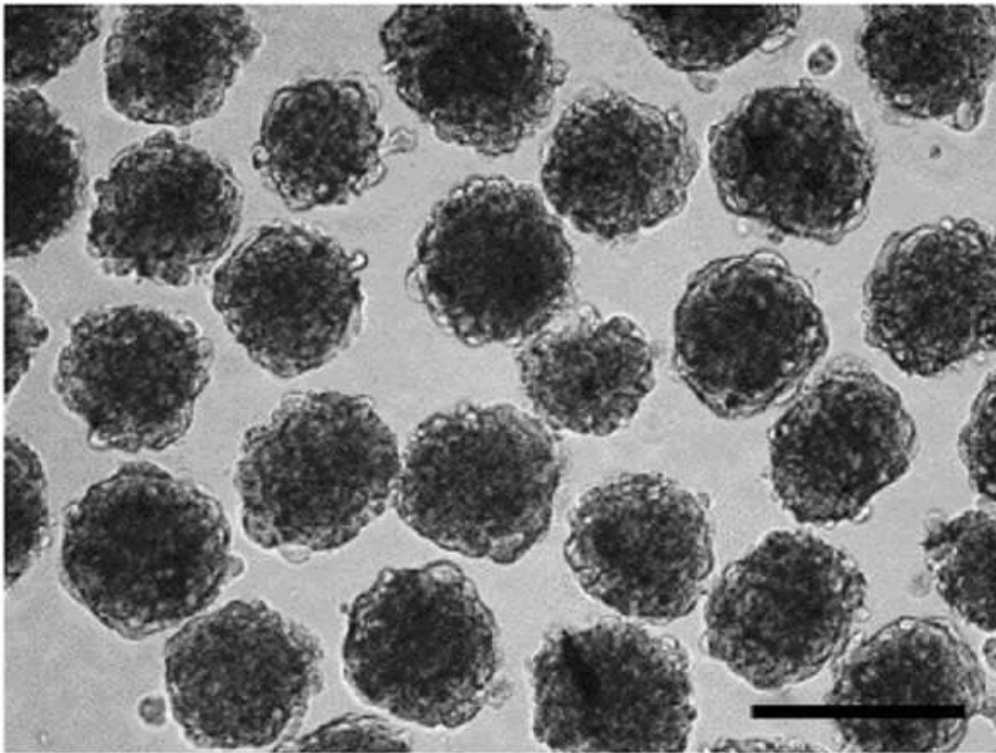


Day 2



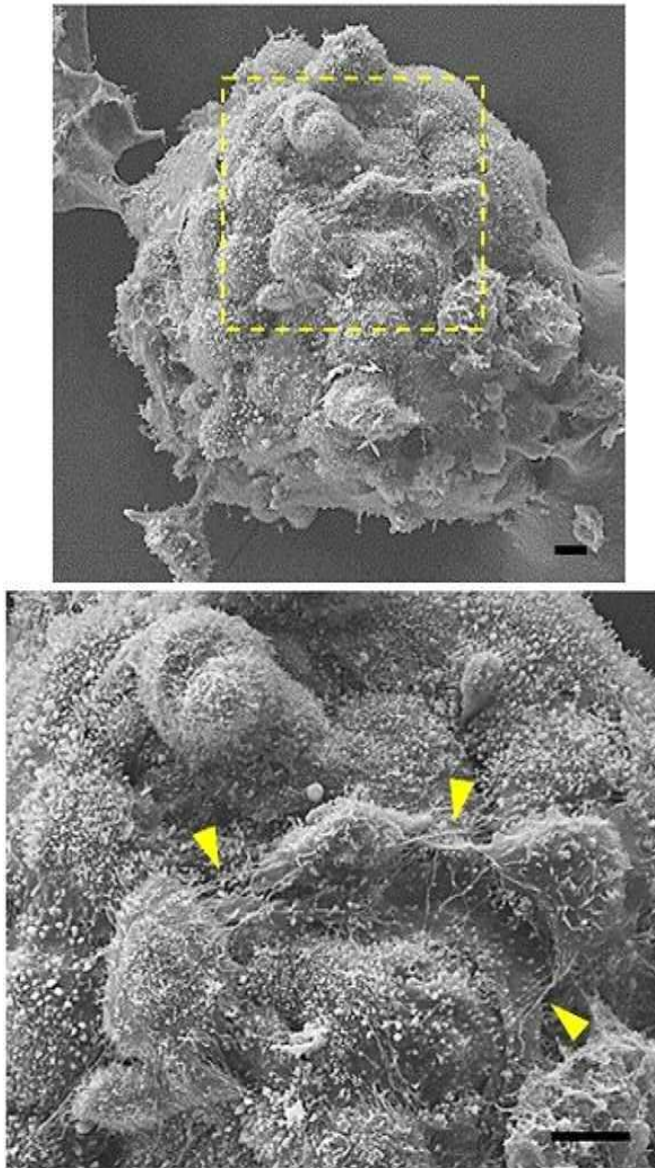
Day 3

도면4

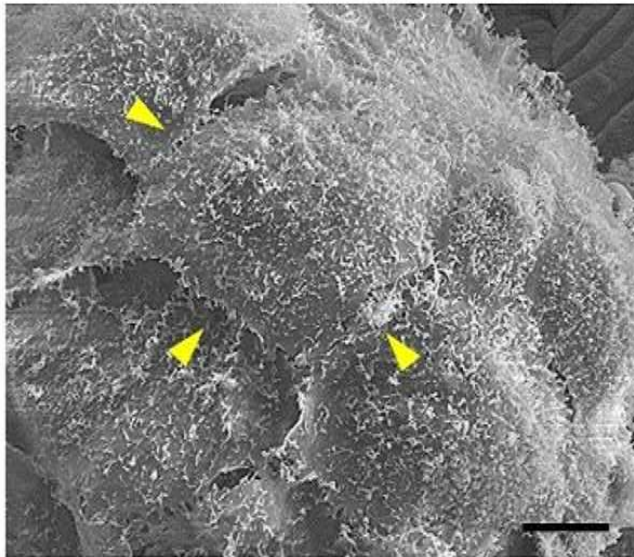
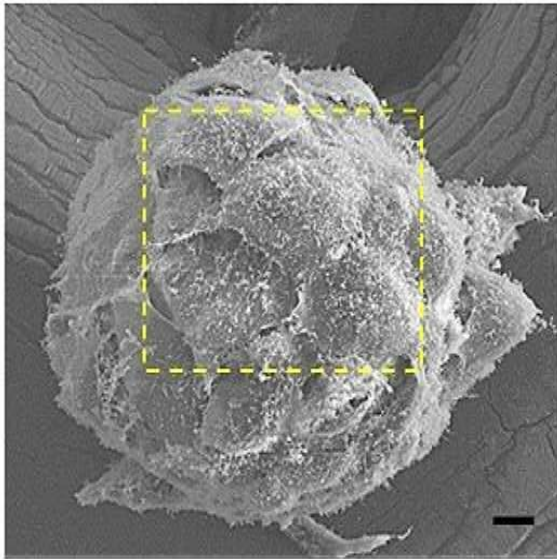


Harvested

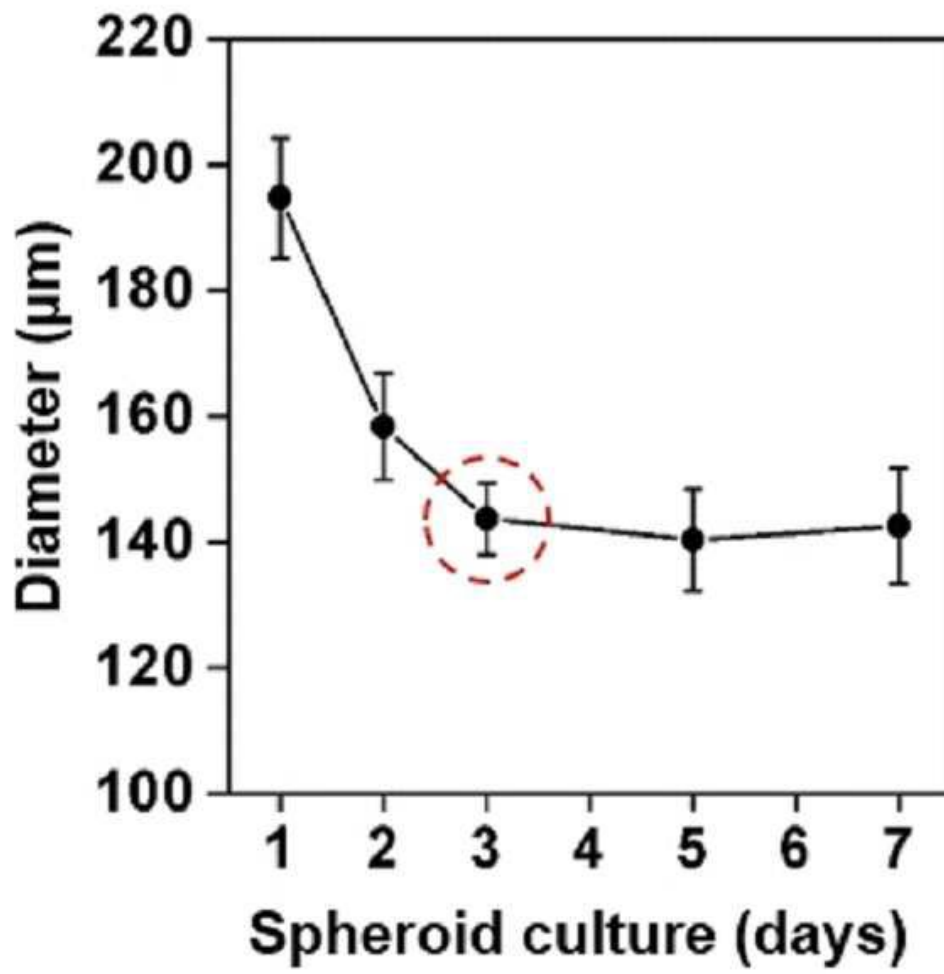
도면5



도면6

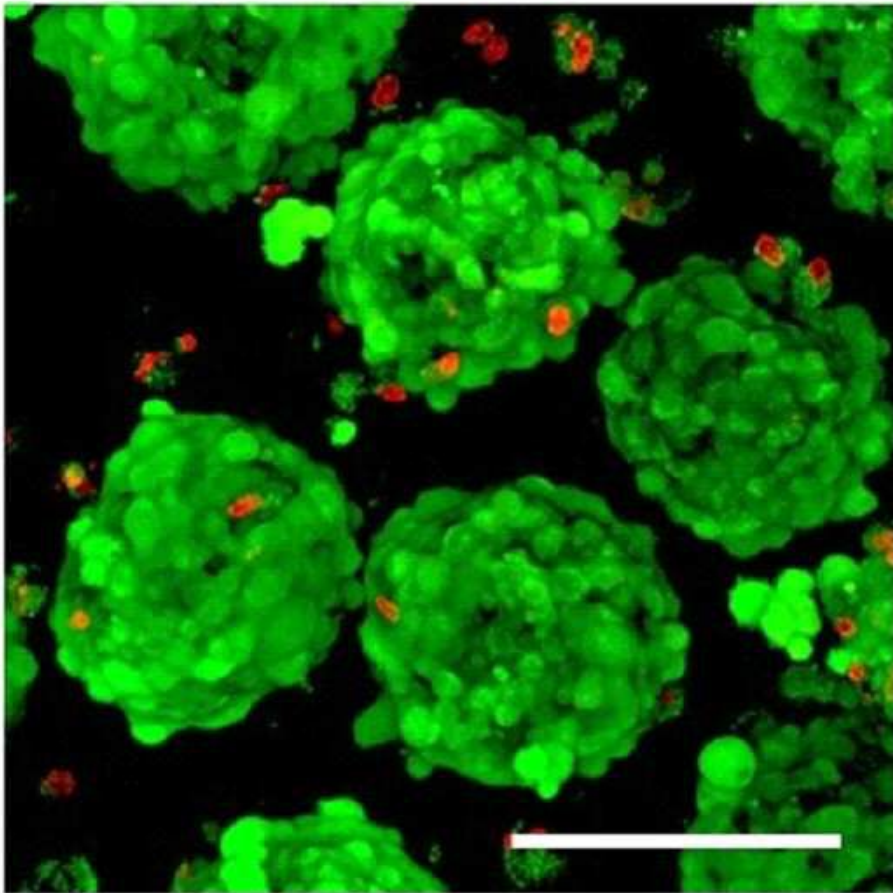


도면7



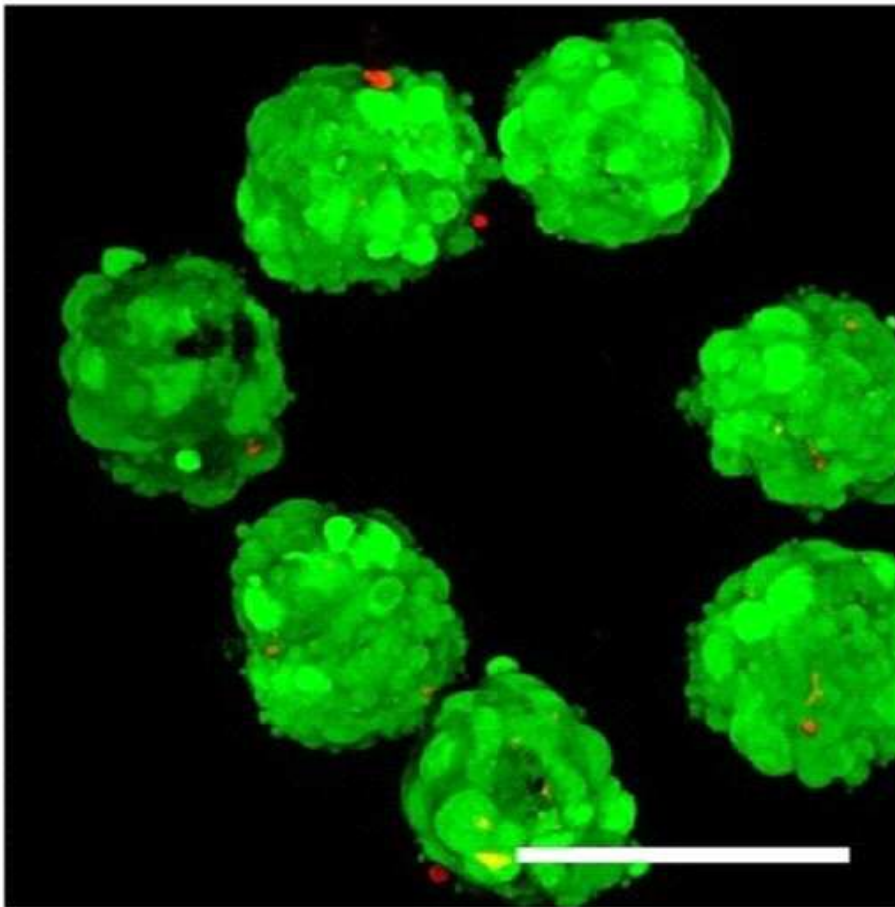
도면8

Live Dead

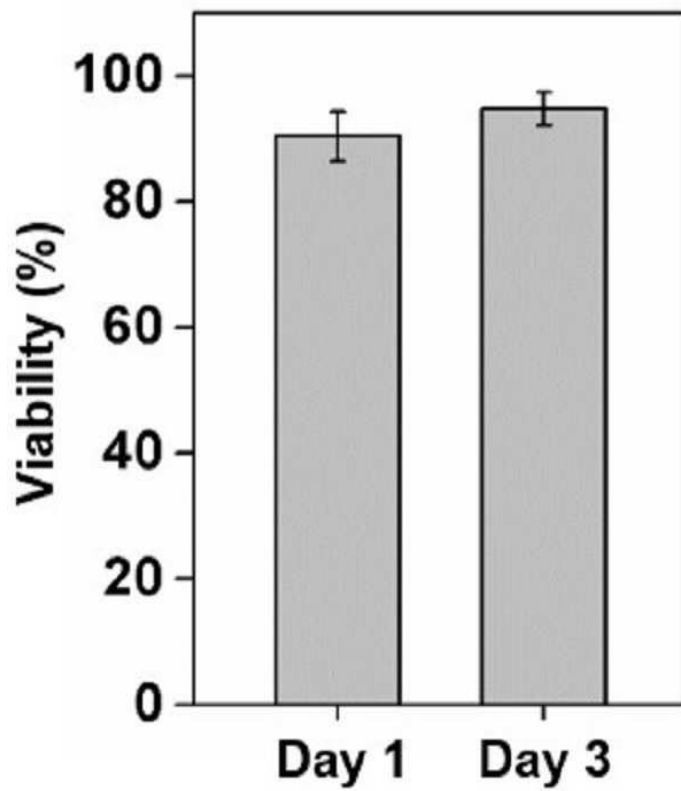


도면9

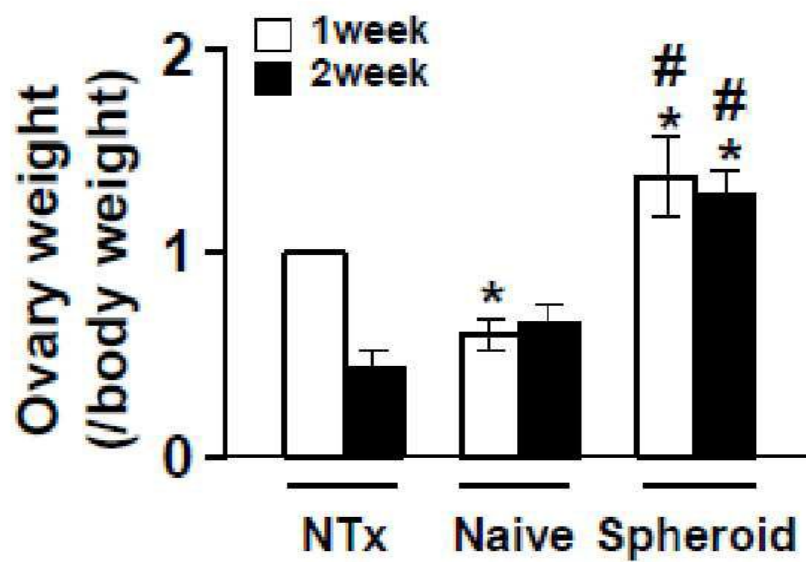
Live Dead



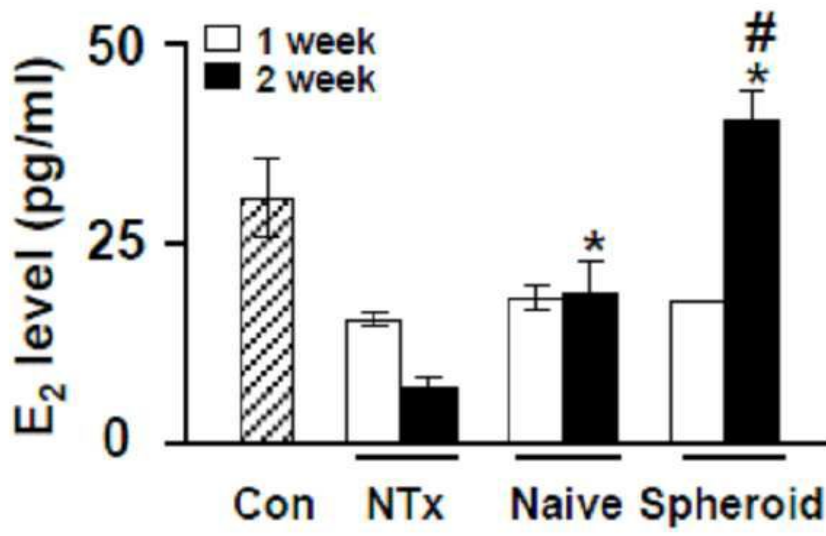
도면10



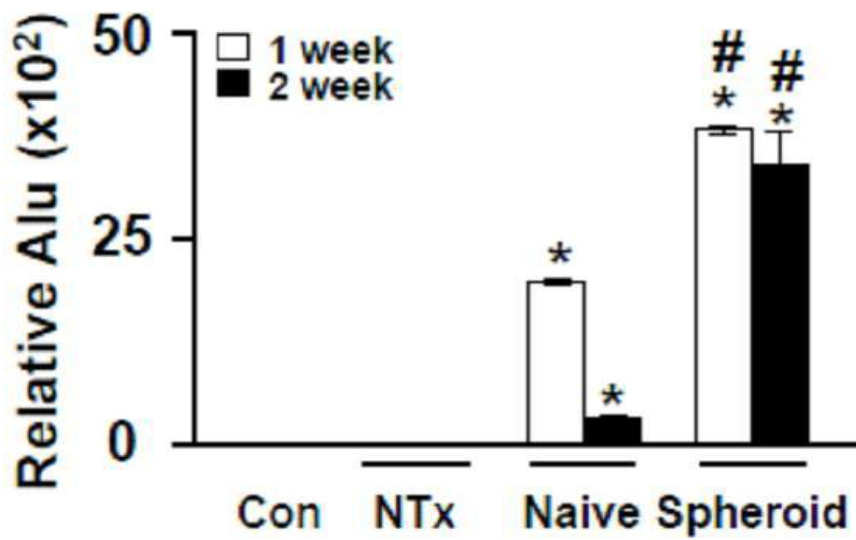
도면11



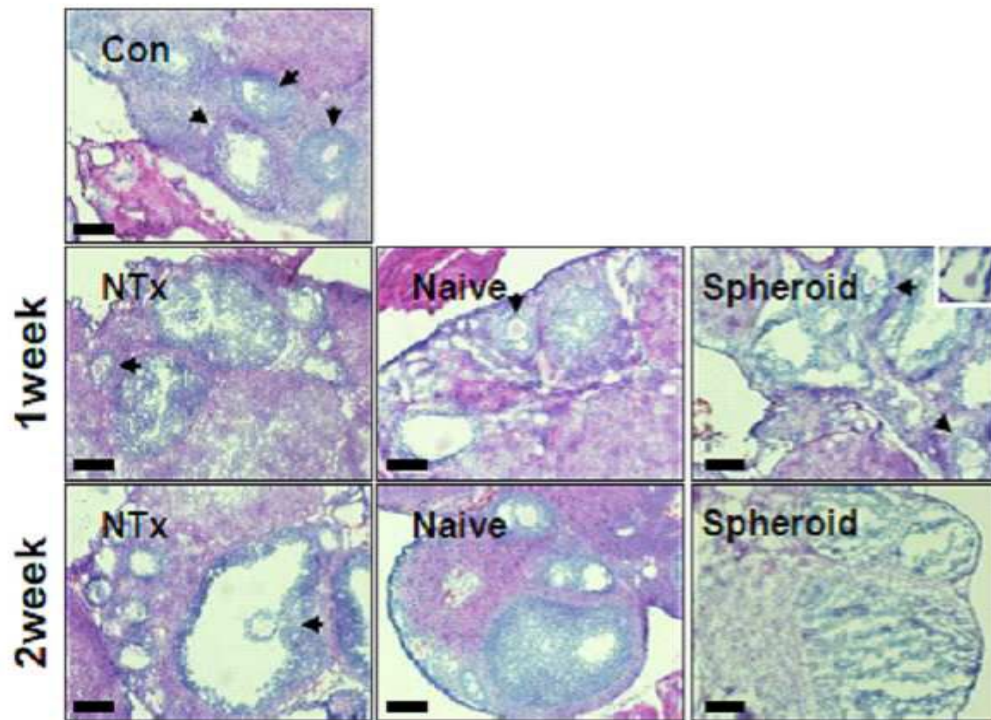
도면12



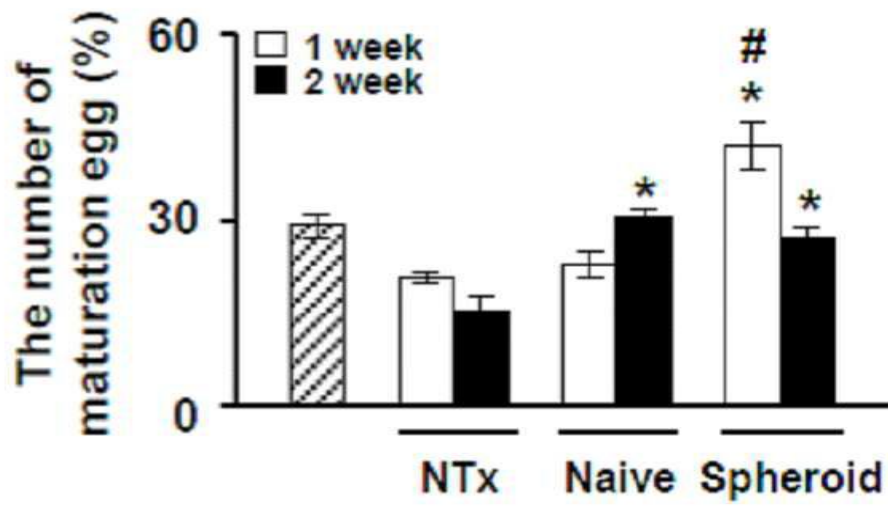
도면13



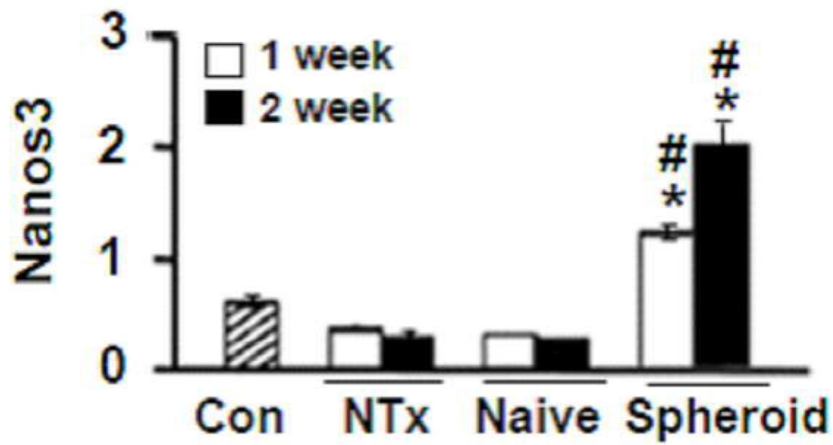
도면14



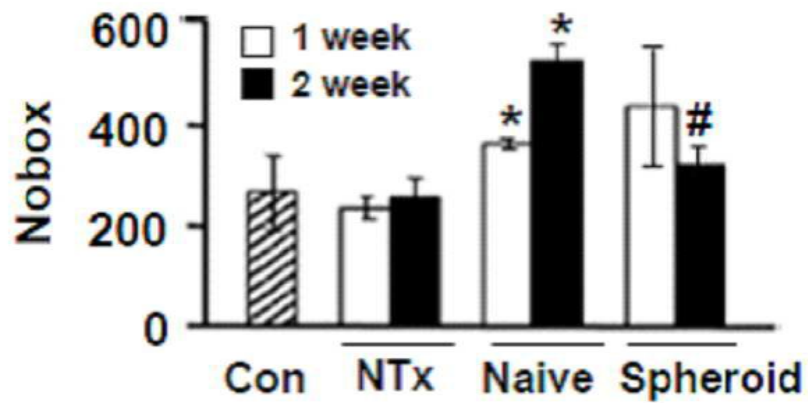
도면15



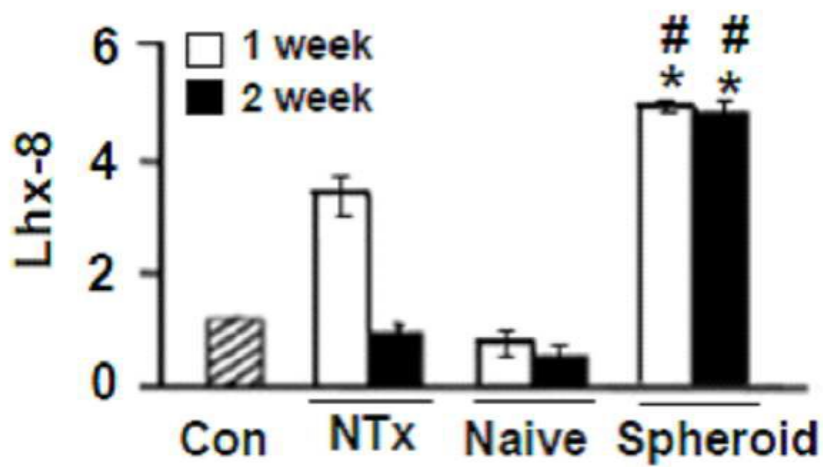
도면16



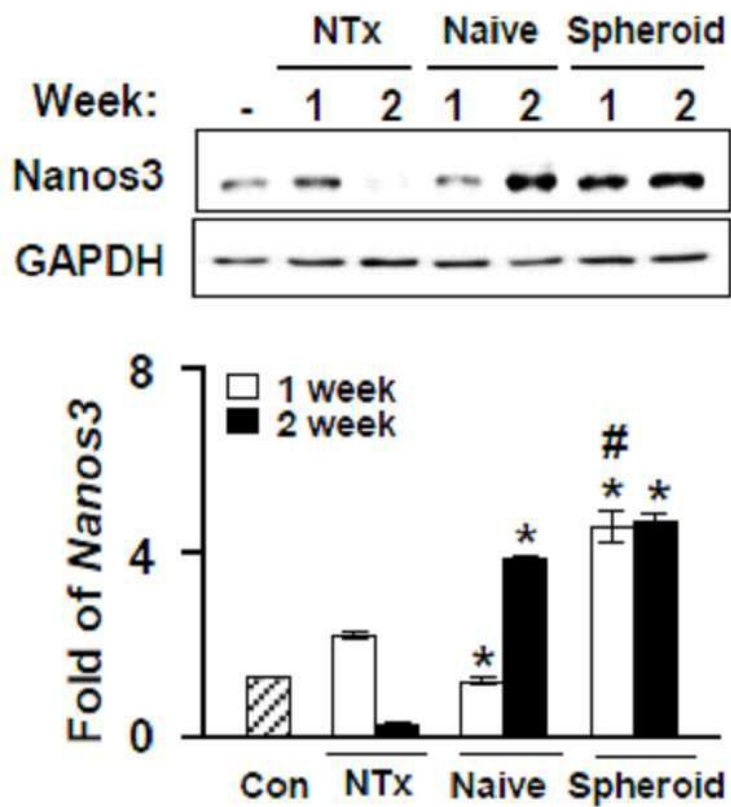
도면17



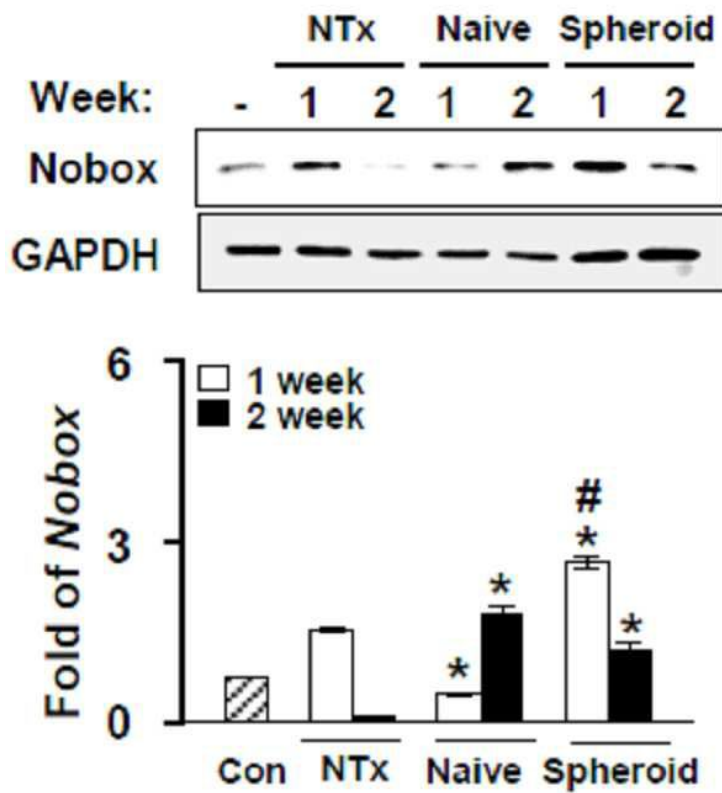
도면18



도면19



도면20



도면21

