



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0099382
(43) 공개일자 2017년08월31일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 5/0775</i> (2010.01) <i>A61K 35/28</i> (2015.01)
 <i>C12N 5/0789</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 5/0662</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/28</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0023651
 (22) 출원일자 2017년02월22일
 심사청구일자 2017년02월22일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020160021374 2016년02월23일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 박기숙
 서울특별시 강남구 자곡로 101, 611동 802호 (자곡동, 래미안 강남힐즈)</p> <p>유진영
 서울특별시 동대문구 이문로 18, 609호 (휘경동)</p> <p>(74) 대리인
 안소영</p> |
|---|---|

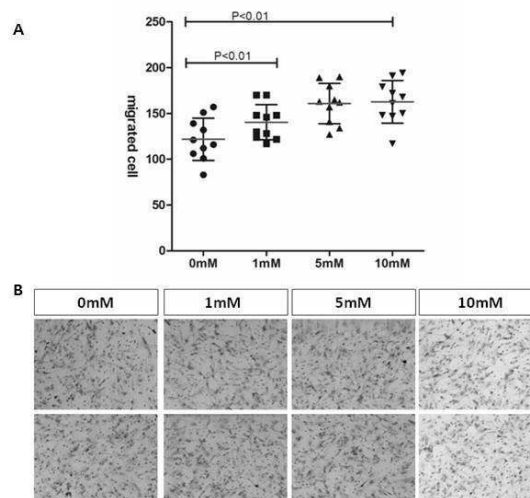
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **줄기세포의 효능 개선을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능 및 CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법에 의하면, 저렴한 인체 유래 물질인 저급 지방산 또는 이의 염을 사용하여 높은 이동능을 가지고 우수한 콜로니 형성능 가지며 생착능이 우수하여 인체 적합성이 우수한 줄기세포를 다량으로 손쉽게 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0647 (2013.01)

C12N 2500/36 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1479

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 당뇨 창상 치유 기술 개발을 위한 창상의 미세환경 조절 연구

기 여 율 20/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2019.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1D1A1A09057839

부처명 교과부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구자지원사업(후속연구지원)

연구과제명 N-cadherin에 의한 중간엽줄기세포 이동 조절과 그 활용 방안 연구

기 여 율 80/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 저급 지방산은 아세트산, 프로피온산, 부티레이트산, 카프로 산 (C₆), 카프릴 산 (C₈), 카프르 산 (C₁₀), 라우르 산 (C₁₂), 미리스트 산 (C₁₄), 팔미트 산 (C₁₆), 스테아르 산 (C₁₈), 올레산 (C_{18:1}) 엘라이드 산 (C_{18:1}), 리놀레산 (C_{18:2}), α-리놀렌산 (C_{18:3}), γ-리놀렌산 산 (C_{18:3}), 아라키돈 산 (C_{20:3}), 아이코사펜타엔 산 (C_{20:5}), 도코사헥사엔 산 (C_{22:6}), 5,6-에폭시에이코사트리엔 산 및 8,9-에폭시에이코사트리엔 산으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포 또는 조혈 모세포인 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계는 체외(*ex vivo*) 또는 시험관 내 (*in vitro*)에서 수행되는 것인 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계는 무혈청 DMEM 배지 또는 RPMI1640 배지에서 3시간 내지 14일간 처리되는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 6

저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 저급 지방산은 아세트산, 프로피온산, 부티레이트산, 카프로 산 (C₆), 카프릴 산 (C₈), 카프르 산 (C₁₀), 라우르 산 (C₁₂), 미리스트 산 (C₁₄), 팔미트 산 (C₁₆), 스테아르 산 (C₁₈), 올레산 (C_{18:1}) 엘라이드 산 (C_{18:1}), 리놀레산 (C_{18:2}), α-리놀렌산 (C_{18:3}), γ-리놀렌산 산 (C_{18:3}), 아라키돈 산 (C_{20:3}), 아이코사펜타엔 산 (C_{20:5}), 도코사헥사엔 산 (C_{22:6}), 5,6-에폭시에이코사트리엔 산 및 8,9-에폭시에이코사트리엔 산으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 줄기세포.

청구항 9

제8항의 줄기세포를 포함하는 세포치료제 조성물.

청구항 10

저급 지방산 또는 이의 염을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 피험체에서 골수유래 조혈모줄기세포를 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법.

청구항 11

저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상의 증진용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 저급 지방산은 아세트산, 프로피온산, 부티레이트산, 카프로 산 (C₆), 카프릴 산 (C₈), 카프르 산 (C₁₀), 라우르 산 (C₁₂), 미리스트 산 (C₁₄), 팔미트 산 (C₁₆), 스테아르 산 (C₁₈), 올레산 (C_{18:1}) 엘라이드 산 (C_{18:1}), 리놀레산 (C_{18:2}), α-리놀렌산 (C_{18:3}), γ-리놀렌산 산 (C_{18:3}), 아라키돈 산 (C_{20:3}), 아이코사펜타엔 산 (C_{20:5}), 도코사헥사엔 산 (C_{22:6}), 5,6-에폭시에이코사트리엔 산 및 8,9-에폭시에이코사트리엔 산으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상의 증진용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포 또는 조혈 모세포인, 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상의 증진용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능과 같은 줄기세포의 특성을 개선시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)는 조혈모세포 (hematopoietic stem cell)와 함께 골수 등에 존재하는 줄기세포로, 시험관 내(*in vitro*) 배양 시 증식 및 팽창이 가능하고, 적절한 배양환경이 주어지면 골세포, 연골세포, 지방세포, 근아세포, 간세포, 심근세포, 신경세포 등 다양한 계통의 세포로 분화할 수 있는 능력을 지니고 있다. 이러한 이유로 조직재생을 위한 중간엽 줄기세포의 연구가 세포생물학, 조직공학 분야 등에서 많이 진행되었으며, 일부 임상시험 연구도 이루어지고 있다.

[0003] 위와 같이 줄기세포는 다분화 잠재능을 가지고 있고 손상된 조직에서 필요한 세포로의 분화를 유도할 수 있다는 점에서 세포치료에 있어서의 잠재력이 크지만, 현재 개발수준에서는 체내 이식 후 생존율이 높지 않아 실제 임상 적용에서 광범위하고 안정적으로 성공한 예를 찾기 어렵다.

[0004] 이러한 문제점 때문에 줄기세포에 적절한 자극을 주어 줄기세포를 이식에 적합한 상태로 활성화시키거나 이의 특성을 변화시킬 필요가 있다.

[0005] 예를 들어, 중간엽 줄기세포는 *in vitro* 상태에서 콜로니(colony)를 형성하면서 섬유아세포 (fibroblast)와 유사한 특징을 이루며 배양되므로 이를 콜로니 형성 단위 섬유아세포 (colony forming unit fibroblasts, 이하 CFU-Fs)라고 명하였는데, CFU-Fs는 하나의 중간엽 줄기세포가 증식되어서 콜로니를 이루는 것으로 밝혀졌다. 즉, CFU-Fs는 중간엽 줄기세포의 수를 의미하는 것이며 이의 높은 효능을 보여주는 것인 바, CFU-Fs가 클수록 많은 양으로 우수한 중간엽 줄기세포 특성을 지니는 세포들을 얻음을 의미하므로, *in vitro* 상에서 배양시 CFU-Fs를 대량 생산할 수 있어야 한다.

[0006] 또한, 이식 후 줄기세포가 병변에서 빠른 시간 내 작용할 수 있도록 하거나 생체 내에서 줄기세포의 빠른 이동을 촉진하거나 생착능을 증진시키기 위하여 줄기 세포의 이동 및 유도의 기작이 촉진되어야 할 필요가 있다.

- [0007] 한편, 중간엽 줄기세포가 활성화되면 조직 재생 및 면역 항상성 유지를 촉진하는 다양한 면역억제성 분자와 성장 인자가 발현되어 항염증 면역억제 효과를 유도한다는 것이 알려져 있다. 중간엽 줄기세포는 면역 반응에서 IL-10, IL6, TGF β , 케모카인, CL-2/MCP-1, CCL5/RANTES, IDO, VEGF, ICAM, PGE2와 같은 다양한 사이토카인을 분비함으로써 면역억제 효과와 같은 면역조절 효과를 유도할 수 있다. 또한, 염증 반응이 일어날 때 염증으로 인한 염증성 사이토카인은 염증 부위에 중간엽 줄기세포를 동원하고, 여기서 중간엽 줄기세포는 조직-특이적 세포 형태로 전환분화(transdifferentiation)하거나 항염증 기능을 가지는 인자의 분비를 통해 국소 회복 효과를 발휘할 수 있다. 면역 반응에 있어 이러한 중간엽 줄기세포의 특성은 중간엽 줄기세포의 잠재적인 임상적 응용 가능성을 시사한다(Kyurkchiev D et al., World Journal of Stem Cells, 2014 Nov., 6(5); 552-570; S Ma et al., Cell Death and Differentiation (2014) 21, 216-225; 및 Madrigal et al. Journal of Translational Medicine 2014, 12:260 등 참조).
- [0008] 혈관신생(angiogenesis)은 기존 혈관의 내피세포가 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 분해하고, 이동, 분열 및 분화하여 새로운 모세혈관을 형성하는 과정으로, 상처 수복, 배아 발생, 종양 형성, 만성염증, 비만 등 여러 가지 생리적 및 병리적 현상에 관여한다. 혈관신생은 상처 치유나 조직 재생에 필수적인 현상이라 할 수 있는데, 예를 들어 혈관의 미형성으로 인한 괴사, 궤양 및 허혈의 경우 조직이나 기관의 기능 이상을 유발하거나 사망의 원인이 될 수 있고, 동맥경화증, 심근경색 및 협심증과 같은 질병도 원활하지 못한 혈액 공급이 원인이 되고 있다.
- [0009] 활성화된 중간엽 줄기세포는 VEGF를 포함하는 성장인자를 발현하여 혈관신생 및 혈관 내피세포 분화를 자극함으로써, 중간엽 줄기세포 매개성 조직 재생을 촉진해 상처 치유에 관여한다는 것이 알려져 있다(Madrigal et al. Journal of Translational Medicine 2014, 12:260 등 참조).
- [0010] 그러나, 이러한 줄기세포의 생착능 증진, CFU-Fs 형성 증진, 증식과 이동의 촉진, 항염증 기능 증진, 면역억제 기능 증진, 및 혈관신생 촉진을 위한 방법에 대해서는 생체 내(*in vivo*)뿐만 아니라 생체 외(*ex vivo*) 및 시험관 내(*in vitro*) 상에서도 알려진 바가 매우 적다.
- [0011] 따라서, 줄기세포의 이용 및 치료 효율의 향상을 위해 줄기세포의 효능을 향상시킬 수 있는 신규 인자들을 규명하고 이에 관하여 기술개발을 수행할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 10-2016-0009420 (2006. 1. 26. 공개)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 10-2011-0044722 (2011. 4. 29. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상의 증진용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 줄기세포를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 줄기세포를 포함하는 세포 치료제 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 피험체에서 골수 유래 조혈모줄기세포의 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포 이동능 증진 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 이동능 증진용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명자들은 줄기세포에 적절한 자극을 주어 줄기세포를 이식에 적합한 상태로 활성화시키거나 이의 특성을 변화시켜 세포치료제로 적합한 줄기세포의 특성을 최대화하기 위해 예의 노력한 결과, 줄기세포에 저급 지방산 또는 이의 염들을 처리함으로써 줄기세포의 이동능이 증진되며 우수한 콜로니 형성능을 보이며 우수한 생착능을 나타내고, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능이 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0021] 본 발명은 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명에 따른 증진 방법에 따르면 *ex vivo* 또는 *in vitro* 상의 전처리에 따라, *in vitro* 및 *in vivo*상에서 이동능, 줄기세포의 이식에 따른 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능이 크게 증진됨으로써 줄기세포를 이식에 적합한 상태로 활성화시키고 이의 특성을 인체에 적합하게 변형시킴으로써 세포치료제로 적합한 줄기세포의 특성을 가진 줄기세포를 제공한다.

[0023] 본 발명에 있어서 저급지방산(short chain fatty acids) 또는 이의 염은 아세트산, 프로피온산, 부티레이트산, 카프로 산 (C₆), 카프릴 산 (C₈), 카프르 산 (C₁₀), 라우르 산 (C₁₂), 미리스트 산 (C₁₄), 팔미트 산 (C₁₆), 스테아르 산 (C₁₈), 올레산 (C_{18:1}) 엘라이드 산 (C_{18:1}), 리놀레산 (C_{18:2}), α-리놀렌산 (C_{18:3}), γ-리놀렌산 산 (C_{18:3}), 아라키돈 산 (C_{20:3}), 아이코사펜타엔 산 (C_{20:5}), 도코사헥사엔 산 (C_{22:6}), 5,6-에폭시에이코사트리엔 산 및 8,9-에폭시에이코사트리엔 산, 및 이의 염으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하며, 바람직하게는 탄소수 6 이하를 가지는 지방산 또는 이의 염이며, 보다 바람직하게 인체 유래로 인체에 사용이 안전한 아세트산, 프로피온산, 부티레이트산 및 이의 염이다.

[0024] 상기 염은 의약품계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미한다. 예를 들어, 상기 염은 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염이며, 바람직하게는 나트륨 염이다.

[0025] 본 발명이 적용될 수 있는 줄기세포는 제한이 없으며, 배아줄기세포, 성체줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포 및 배아중양세포를 포함하며, 바람직하게는 다분화능(multipotent) 성체줄기세포이고, 보다 바람직하게는 조혈모세포, 중간엽 줄기세포(MSC)이며, 가장 바람직하게 골수 유래 중간엽 줄기세포 및 조혈모세포이다.

[0026] 본 발명에서 “이동능”이란 줄기세포의 이동 활성 (migration activity)에서의 증진 효과를 의미하며, 이식부위로부터 손상부위로 줄기세포의 이동 능력 증가, 골수로부터 말초 혈액으로의 줄기세포의 이동능력 증가 및 말초 혈액으로부터 림프 노드, 심장, 허파, 간, 피부, 비장, 작은 창자 및 큰 창자, 위, 또는 췌장과 같은 특정한 조직 또는 기관으로 이동 증가 등의 효과를 모두 포함한다. 예컨대, 이식 부위에서 손상 부위로 이동 촉진에 따라 유효 이식 줄기세포 수의 절감, 이에 따른 줄기세포 체외 배양 기간 단축 및 줄기세포의 안전성 증가와 제조원가 절감의 효과를 가질 수 있다. 또한, 골수에서 말초 혈액으로 이동이 촉진됨으로써 말초 혈액에서 이동된 많은 수의 줄기세포의 분리가 용이하기 때문에 골수 유래 줄기세포 이식을 위한 줄기세포 채집이 용이하다. 또한, 말초 혈액에서 말초 장기로의 이동을 촉진하여 질환의 치료 효능을 높일 수 있는 장점을 가진다.

[0027] 본 발명에서 “생착능”이란 이식된 줄기세포가 분화된 후속세포, 이식된 후 체내에서 생산한 세포 또는 주입된 세포가 손실 혹은 손상된 세포를 대체할 수 있는 능력을 말한다. 생착능 증진에 따라 예컨대 유효 이식 줄기세포 수의 절감, 이에 따른 줄기세포 체외 배양 기간 단축 및 줄기세포의 안전성 증가와 제조원가 절감의 장점을 가질 수 있다.

[0028] 본 발명에서 “CFU-Fs 형성능”이란 하나의 중간엽 줄기세포가 증식되어서 콜로니를 이루는 것을 말한다. CFU-Fs 형성능 증진에 따라 예컨대 줄기세포의 줄기세포성(Stemness)의 연장 및 증식능 증진에 따른 안전하고 효과적인 *ex vivo* 및 *in vitro* 확장(Expansion)에 장점을 가진다.

[0029] 본 발명에서 “항염증 면역억제 유도 기능”이란 염증 반응 또는 면역 반응을 제어하거나 억제하는 데 도움을 주는 억제성 신호를 제공하는 것으로, 염증 반응 또는 면역 자극을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 면역 활성을 저하, 방지, 또는 지연시키거나, 또는 항원 제시, T 세포 활성화, T 세포 분화, T 세포 기능 발현, 시토크인 분비 또는 생산, 및 표적 세포 용해 등을 감소시키는 것을 유도하는 기능을 의미한다.

- [0030] 항염증 면역억제 유도 기능에 따라, 다양한 자가면역질환 또는 염증성 질환에 대한 유효성이 더욱 증진된 줄기세포치료제의 줄기세포원 배양이 가능할 수 있다. 뿐만 아니라, 항염증 면역억제 유도 물질 발현이 높은 줄기세포 배양이 가능함에 따라, 유효 이식 줄기세포 수의 절감, 이에 따른 줄기세포 체외 배양 기간 단축 및 줄기세포 안전성 증가와 제조원가 절감의 장점도 가질 수 있다.
- [0031] 상기 자가면역질환 또는 염증성 질환은 류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis), 천식 (Asthma), 피부염 (Dermatitis), 건선 (Psoriasis), 낭성유증 (Cystic Fibrosis), 다발성 경화증 (Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis), 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환 (Inflammatory Bowel Diseases), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 자가면역성 당뇨병 (Autoimmune Diabetes), 당뇨병 망막증 (Diabetic retinopathy), 비염 (Rhinitis), 허혈-재관류 손상 (Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착 (Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환 (Chronic obstructive pulmonary diseases; COPD), 그레이브병 (Graves disease), 위장관 알러지 (Gastrointestinal allergies), 결막염 (Conjunctivitis), 죽상경화증 (Atherosclerosis), 관상동맥질환 (Coronary artery disease), 협심증 (Angina) 및 소동맥 질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 “혈관신생 촉진능”이란 혈관이 새로 형성되는 과정, 즉 새로운 혈관이 세포, 조직 또는 기관 내로 발생 및 분화하는 것을 촉진하는 기능을 의미한다. 본 발명의 혈관신생 촉진능, 내피세포 활성화, 이동, 증식, 매트릭스 재형성 및 세포 안정화를 비롯한 혈관 형성 과정에 관련된 혈관재생, 혈관회복 및 혈관 분화의 촉진을 포함한다.
- [0033] 혈관신생 촉진능에 따라, 재관류 손상, 예를 들어 허혈성 심근경색증에서 손상된 심근 또는 뇌졸중에 따른 뇌손상 등에 의해 손상된 조직에서 혈관재생, 혈관회복 및 혈관 분화 촉진이 가능하다.
- [0034] 또한, 본 발명에 따르면 혈관신생 촉진능에 의해 조직 재생능이 증진된 줄기세포를 배양할 수 있다. 뿐만 아니라, 혈관신생 촉진 유도 물질 발현이 높은 줄기세포 배양이 가능함에 따라, 유효 이식 줄기세포 수의 절감, 이에 따른 줄기세포 체외 배양 기간 단축 및 줄기세포 안전성 증가와 제조원가 절감의 장점도 가질 수 있다.
- [0035] 위와 같이 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능이 증진된 줄기세포는 세포 치료제로써 우수한 치료 효과를 가질 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 방법은 체외(ex vivo)에서 수행되거나 시험관 내(in vitro)에서 수행될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계는 배지에서 배양되는 줄기세포에 저급 지방산 또는 이의 염을 처리하는 것을 의미한다.
- [0038] 본 발명에서 배지(media)는 in vitro에서 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium: CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, αMEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 배지는 DMEM 배지 또는 RPMI1640 배지이며, 혈청 성분 및 항생제를 더 포함한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 저급 지방산 또는 이의 염은 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 해야 한다.
- [0041] 본 발명에서 유효 농도는 저급 지방산 또는 이의 염이 줄기세포의 이동능 증진, 생착능 증진, CFU-Fs, 형성능 증진, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능에 충분한 양의 저급 지방산 또는 이의 염을 의미하며, 유효 농도 이하에서는 활성을 나타내지 않고 유효 농도 이상에서는 세포에 독성을 나타내게 되므로 유효 농도 내에서 저급 지방산 또는 이의 염을 사용하도록 한다. 본 발명에서 바람직한 저급 지방산 또는 이의 염의 처리 농도는 0.1 mM 내지 100 mM, 보다 바람직하게 1 mM 내지 20mM이다.
- [0042] 또한, 본 발명에서 바람직한 저급 지방산 또는 이의 염의 처리 시간은 3시간 내지 14일, 보다 바람직하게 12 내

지 48시간이다.

- [0043] 상기 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계는 일반 혈청 배지에서 수행되거나, 혈청 배지에서 계대 배양된 줄기세포를 무혈청 배지로 옮긴 후 수행되는 것일 수 있다. 무혈청 배지 중에서의 배양은 혈청 배지에서의 배양액을 제거하고, 세포를 인산염 완충용액으로 세척한 후에 수행될 수 있다.
- [0044] 본 발명은 바람직하게는 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포 이동능 증진 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 따른 줄기세포 이동능 증진 방법에 의하면, 저급 지방산 또는 이의 염 처리에 따라 줄기세포의 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 이동능이 크게 증진됨으로써, 줄기세포를 이식에 적합한 상태로 활성화시키고 이의 특성을 인체에 적합하게 변형시킴으로써 세포치료제로 적합한 줄기세포의 특성을 가진 줄기세포를 제공한다.
- [0046] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상의 증진용 조성물을 제공한다. 저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 증진용 조성물에 관한 내용은 위 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법에 관한 내용을 모두 포함한다.
- [0047] 상기 줄기세포 이동능, 생착능, 및 CFU-Fs 형성능 증진용 조성물을 줄기세포에 처리하면, 줄기세포의 이동능이 증가되고 콜로니 형성능이 우수하게 되며, 인체 이식에 적합한 특성을 지닌 줄기세포를 저비용으로 쉽게 다량으로 생산할 수 있다.
- [0048] 바람직하게, 본 발명은 저급 지방산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 이동능 증진용 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 줄기세포에 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법으로 제조된 줄기세포를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 줄기세포 이동능 증진 방법으로 제조된 줄기세포로 제조된 줄기세포를 제공한다.
- [0050] 상기 줄기세포는 저급 지방산 또는 이의 염 처리에 따라 이동능이 증가되고, 생착능이 증가되며, CFU-Fs 형성능이 증가되는 특성을 지니고, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능을 나타내며, 이식부위로부터 손상 부위로 줄기세포의 이동 능력 증가, 골수로부터 말초 혈액으로의 줄기세포의 이동 능력 증가 및 말초 혈액으로부터 림프 노드, 심장, 허파, 간, 피부, 비장, 작은 창자 및 큰 창자, 위, 또는 췌장과 같은 특정한 조직 또는 기관으로 이동 증가, 생착능 증가 등의 작용 효과를 가져 세포 치료제로 사용에 적합한 특성을 가진다.
- [0051] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 줄기세포를 포함하는 세포 치료제 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능이 증진된 줄기세포 자체를 이용하여 질병을 치료할 수 있다. 상기 세포는 동물의 생체 내에 주사(injection), 주입(infusion), 이식되어서 빠르게 병변으로 이동하거나 말초 혈액으로 이동이 촉진되거나 특정한 유형의 세포 집단(population)과 직접 접촉함으로써 특정 유형의 세포로 분화함으로써 적절히 질병을 치료할 수 있으며, 치료할 수 있는 질병의 종류는 제한적이지 않다.
- [0053] 본 발명의 줄기세포능이 증진된 세포는 세포를 보호 및 유지하고, 목적하는 조직에 주사, 주입, 이식시 사용에 용이하도록 하는 하나 이상의 희석제를 포함하는 세포 조성물의 형태가 바람직하다. 상기 희석제는 생리식염수, PBS(Phosphate Buffered Saline), HBSS(Hank's balanced salt solution) 등의 완충용액, 혈장 또는 혈액성분 등이 있을 수 있다.
- [0054] 투여량은 10^5 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 5×10^5 내지 10^8 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명은 또한 저급 지방산 또는 이의 염을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 피험체에서 골수유래 조혈모줄기세포의 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.

[0056] 본 발명의 골수유래 조혈모줄기세포를 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법에 따르면, 골수에서 말초 혈액으로 조혈모줄기세포의 이동이 촉진됨으로써 말초 혈액에서 이동된 많은 수의 줄기세포의 분리가 용이하기 때문에 골수 유래 줄기세포 이식을 위한 줄기세포 채집이 용이하며, 이러한 이동 촉진에 의해 질환의 치료 효능을 높일 수 있는 장점이 있다. 특히, 본 발명에 따른 골수유래 조혈모줄기세포의 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법에 의하면 기존에 알려진 방법들과 대비하여 덜 침습적인 방법으로 자가 골수 유래 조혈모줄기세포를 채취할 수 있는 점에서 장점을 가진다. 또한, 본 발명의 골수유래 조혈모줄기세포의 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법은 상기 조혈모줄기세포의 말초혈액으로의 이동을 촉진하는 방법 이후, 이동된 골수 유래 조혈모줄기세포를 채취하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 줄기세포의 이동능, 생착능, CFU-Fs 형성능, 항염증 면역억제 유도 기능, 및 혈관신생 촉진능 중 선택되는 어느 하나 이상을 증진하는 방법에 따르면, 저렴한 인체 유래 물질인 저급 지방산 또는 이의 염을 사용하여 높은 생착능 및 이동능을 가지고 우수한 콜로니 형성능 가져 인체 적합성이 우수한 줄기세포를 다량으로 손쉽게 제조할 수 있고, 줄기세포를 이식에 적합한 상태로 활성화시켜 세포치료제로서 적합한 줄기세포를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 농도별 아세트산 나트륨 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포의 이동능 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 농도별 프로피온산 나트륨 또는 부틸레이트산 나트륨 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포의 이동능 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 아세트산 나트륨 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포에서 이동능 촉진 신호 관련 단백질 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 아세트산 나트륨 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포에서 침습(invasion) 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 아세트산 나트륨 처리에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 아세트산 나트륨 또는 프로피온산 나트륨 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포의 CFU-F 형성능 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 아세트산 나트륨 처리에 따른 조혈 전구 세포의 골수에서 말초 혈액으로의 이동능 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 아세트산 나트륨 처리에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 CFU-F 형성능 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 아세트산 나트륨(200 mM)이 포함된 음용수 섭취에 따른 골수 유래 중간엽 줄기세포의 세포 집단의 빈도 및 크기 증가를 확인한 결과를 나타낸다.

도 10은 아세트산 나트륨 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포에서 항염증 면역억제 및 혈관신생 촉진 신호 관련 단백질 발현 증가를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 본 발명의 구현 모습을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명하나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0061] <실시예 1> 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 촉진 확인

[0062] 이동성 분석(Migration Assay)을 통해 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 촉진을 확인하였다.

- [0063] 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포인 ST2 세포주는 Riken Cell Bank (Tsukaba, Japan)로부터 얻었다. 세포를 10% FBS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신 (Invitrogen)을 포함하는 RPMI1640 (Invitrogen)에서 유지하였다. 상기 세포를 밀집도(confluence)가 80%가 될 때까지 배양하고, 0.25% 트립신/EDTA(Invitrogen)으로 회수한 후, 1:3 ~ 1:4 비율로 계대배양하였다. 5 계대 내지 8 계대 세포를 실험에 사용하였다. 세포는 5% CO₂를 포함하는 37℃ 배양기에 유지하였다.
- [0064] 8 μm 구멍(pore) 크기의 밀리셀 컬처 플레이트 인서트(Millicell culture plate inserts) (EMD Millipore)를 0.5 μg/ml 1형 콜라겐으로 코팅하였다. ST2 세포 (2.5×10⁴ 개)를 정상 성장 배지로 현탁하여 상부 챔버에 첨가하였다. 세포 배양 5 내지 6시간 후, 배지를 2% FBS 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지로 교환하였다. 밤새 배양 후, 0-10 mM의 아세트산 나트륨(Sodium acetate), 프로피온산 나트륨 (sodium propionate) 및 부티레이트산 나트륨(Sodium butyrate)을 각각의 하부 챔버에 첨가하였다(저급 지방산은 모두 Sigma-Aldrich에서 구매함).
- [0065] 12시간 추가 배양 후, 인서트(insert)를 PBS 하에서 4% 포름알데하이드로 10분간 상온에서 고정하였다. ST2 세포를 헤마톡실린 용액으로 30분간 염색하고, 상부 챔버 멤브레인에 남아 있는 세포들은 면봉으로 제거하였다. 하부 챔버 멤브레인은 Nikon ECLIPSE TS 100 현미경을 이용하여 확인하였다. 각각의 세포 이미지에서 세포 수는 어도비 포토샵(Adobe Photoshop) CS6를 사용하여 세었다.
- [0066] 아세트산 나트륨을 이용한 이동성 분석(Migration assay) 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1의 A는 이동(migration)이 일어난 세포수를 카운트(counting)한 결과를 보여주며, 도 1의 B는 현미경 이미지를 보여준다. 도 1에서 확인되는 바와 같이, 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포주인 ST2 세포의 이동능은 아세트산 나트륨 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다.
- [0067] 또한, 도 2는 프로피온산 나트륨(sodium propionate) 및 부티레이트산 나트륨(Sodium butyrate)을 사용한 실험 결과를 나타낸다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 프로피온산 나트륨 및 부티레이트산 나트륨 농도 의존적으로 ST2 세포의 이동능이 증진되는 것이 확인되었다.
- [0069] <실시예 2> 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 촉진 신호 전달 인자 변화 확인
- [0070] 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 촉진 신호 전달 인자 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.
- [0071] ST2 세포를 정상 성장 배지 조건하에 6-well 플레이트에 첨가하였다. 5~6시간 배양 후, 배지를 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 무혈청 배지로 교환하여 16-18 시간 배양하였다. 세포를 각각 30초, 1분, 2분, 3분, 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간 또는 9시간 동안 10 mM 아세트산 나트륨으로 처리하였다. 상기 시료부터 세포 용해물을 획득하고, 단백질 시료는 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 세포를 니트로셀룰로즈 멤브레인으로 옮기고 멤브레인을 블로킹한 후, 포스포-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology), 포스포-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology) 또는 포스포-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology)의 일차 항체로 처리하였다. 그리고 나서, 세포를 다시 HRP 접합된 2차 항체로 처리한 후, 화학 발광 검출을 통해 단백질 밴드를 확인하였다. 밴드 밀도는 ImageJ 소프트웨어 (NIH, Bethesda, MD)를 이용하여 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0072] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 아세트산 나트륨 처리에 따라 p38, ERK 및 Akt 신호전달이 매우 빠른 시간 내에 일시적으로 (early and transient) 활성화되는 것을 확인하였다. 즉, 저급 지방산 또는 이의 염 처리에 따라 세포 이동능 촉진에 관련된 인자들이 변화하여 이동능 촉진이 일어나는 것을 확인하였다.
- [0073]
- [0074] <실시예 3> 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 침습(Invasion) 촉진 확인
- [0075] 침습성 분석(Invasion assay)을 통해 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 침습 촉진을 확인하였다.
- [0076] 8 μm 구멍(pore) 크기 밀리셀 컬처 플레이트 인서트(Millicell culture plate inserts) (EMD Millipore)를 0.5 μg/ml 1형 콜라겐으로 코팅하였다. 그리고 나서, 인서트(insert)의 윗부분을 50 μl의 성장인자를 줄인 매

트리젤(growth factor reduced Matrigel, BD Bioscience)로 코팅하였다. ST2 세포 (2.5×10^4)를 그들 각각의 일반 성장 배지로 현탁하여 상부 챔버에 첨가하였다. 세포 배양 5 내지 6시간 후, 배지를 2% FBS 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지로 교환하였다. 밤새 배양 후, 아세트산 나트륨(10 mM)을 각각의 하부 챔버에 첨가하였다. 12시간 추가 배양 후, insert를 PBS 하 4% 포르말데하이드로 10분간 상온에서 고정하였다. 세포를 헤마톡실린 용액으로 30분간 염색하고, 상부 챔버 멤브레인에 남아 있는 세포들은 면봉으로 제거하였다. 하부 챔버 멤브레인은 Nikon ECLIPSE TS 100 현미경을 이용하여 확인되었다. 각각의 세포 이미지에서 세포 수는 어도비 포토샵(Adobe Photoshop) CS6를 사용하여 세었다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0077] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 아세트산 나트륨 처리에 따라 세포 수가 크게 증가된 것을 확인하였고, 이는 침습이 증가하는 것을 보여준다. 즉, 10mM 아세트산 나트륨 처리에 의해 사람 골수 유래 중간엽줄기세포의 매트릭스 침습 능력(matrigel invasion ability)이 증가한 것을 확인할 수 있으며, 이는 아세트산 나트륨 처리에 의해 줄기세포의 ECM 리모델링 능력/이동성 능력(remodeling ability/migration ability)이 증가한 것을 보여준다.

[0079] <실시예 4> 저급 지방산 처리에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 촉진 확인

[0080] 이동성 분석(Migration Assay)을 통해 저급 지방산 처리에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능 촉진을 확인하였다.

[0081] 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(human bone marrow derived MSCs, hMSC)는 Lonza (Basel, Switzerland)로부터 얻었고, MSCGM (Lonza)로 배양하였다. 3 계대 내지 6 계대의 세포들을 실험에 사용하였다. 10% FBS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신 (Invitrogen), 및 1% L-글루타민을 포함하는 DMEM (GE Healthcare Life Sciences)을 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동 실험(migration experiments)을 위해 사용하였다. 세포를 5% CO₂를 포함하는 37°C 배양기에서 유지하였다.

[0082] 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 경우, 5 내지 6시간 배양 후 정상배지를 1% L-글루타민, 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 무혈청 DMEM 배지로 교환하고, 남아 있는 상부 챔버 멤브레인의 세포들을 제거하고, Insert를 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)로 프로롱 골드 안티페이드 접착 용액(ProLong Gold antifade mounting solution)을 사용하여 슬라이드에 고정시킨 점을 제외하고, 실시예 1과 유사하게 이동성 분석(Migration assay)을 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0083] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 이동능이 저급 지방산 또는 이의 염인 아세트산 나트륨의 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0085] <실시예 5> 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 콜로니 형성능 증진 확인

[0086] 콜로니 형성 단위 섬유아세포 분석(Colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assay)을 통해 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 콜로니 형성능 증진을 확인하였다.

[0087] ST2 세포를 아세트산 나트륨 (10 mM) 또는 프로피온산 나트륨 (10 mM)으로 처리하고 정상 배양 배지를 사용하여 36시간 배양하였다. 그리고 나서, 세포를 5.7×10^4 세포/well로 첨가하고, 플레이트를 5 % CO₂ 및 37°C 조건 하에서 10일간 배양하였다. 그 후, 플레이트를 크리스탈 바이올렛 염색 용액(1% 용액, Sigma-Aldrich)으로 염색하고, 콜로니를 입체 현미경 하에 카운팅하였다. 여기서, 1 mm 이상의 직경을 가진 세포 집단을 콜로니로 간주하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0088] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 저급 지방산 또는 이의 염인 아세트산 나트륨 또는 프로피온산 나트륨 처리에 따라 콜로니 형성능이 크게 증진되는 것을 확인하였다.

[0090] <실시예 6> 저급 지방산 처리에 따른 조혈 전구 세포의 이동능 증진 확인

[0091] 유동 세포 분석을 통해 저급 지방산 처리에 따른 조혈 전구 세포의 이동능 증진 확인을 확인하였다.

[0092] 순환되는 조혈 전구 세포(Hematopoietic progenitor cells(HPCs), lineage 음성, Sca-1 양성, c-Kit 양성(Lin-/Sca1+/c-Kit+, LSK) 세포의 집단을 유동 세포 분석기로 분석하였다. 아세트산 나트륨(4 nmole/kg)을 8주령

C57BL/6 마우스의 옆구리에 피하 주사하고, 주입 후 10분 뒤 말초 혈액을 채취하였다. 단핵구 세포를 피콜(Ficoll)로 원심분리를 통해 분리하였다. 그리고 나서, 조혈 전구 세포를 항-마우스 CD4-FITC (Biolegend, San Diego, CA), 항-마우스 CD49b-FITC (Biolegend), 항-마우스 CD11b-FITC (Biolegend), 항-마우스 B220-FITC (Biolegend), 항-마우스 Gr-1-FITC (Biolegend), 항-마우스 CD8-FITC (Biolegend), 항-마우스Ly-6A/E (Sca-1)-PE (Biolegend), 및 항-마우스 CD117 (c-Kit)-APC (Biolegend)를 사용하여 확인하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0093] 도 7에서 확인되는 바와 같이, 말초 혈액의 단핵구의 수(PB MNCs)의 수는 크게 변화가 없었지만, 위 Lin-/Sca1+/c-Kit+(LSK)의 특성을 나타내는 조혈 전구 세포는 일반 대조군에 비하여 말초 혈액에서 더 많이 관찰되었음이 확인되어, 위 저급 지방산 또는 이의 염들이 줄기세포 이동능에 효과가 있음을 확인하였다.

[0095] <실시예 7> 저급 지방산 처리에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포의 콜로니 형성능 증진 확인

[0096] 콜로니 형성 단위 섬유아세포 분석(Colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assay)을 통해 저급 지방산 처리에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(hMSC)의 콜로니 형성능 증진을 확인하였다.

[0097] 정상 배양 배지(DMEM high glucose + 10% FBS + 1% 페니실린 및 스트렙토마이신)에 아세트산 나트륨 (10 mM)을 처리하여 2회 계대배양 하였다. 그리고 나서, 10% FBS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신(Invitrogen) 및 1% L-글루타민을 포함하는 저-글루코스(low-glucose) DMEM(GE Healthcare Life Sciences)에 세포를 5×10^2 세포/well(10 cm dish)로 첨가하고, 플레이트를 5% CO₂ 및 37°C 조건하에서 14일간 배양하였다. 그 후, 플레이트를 100% 메탄올로 고정하고, 크리스탈 바이올렛 염색 용액(1% 용액, Sigma-Aldrich)으로 염색한 후, 콜로니를 입체 현미경하에 카운팅하였다. 여기에서, 3 mm 이상의 직경을 가진 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포 집단을 콜로니로 간주하였다.

[0098] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0099] 도 8에서 확인되는 바와 같이, 저급 지방산 또는 이의 염인 아세트산 나트륨 처리에 따라 콜로니 형성능이 약 5배 정도로 크게 증진되는 것을 확인하였다.

[0101] <실시예 8> 저급 지방산이 포함된 음용수 섭취에 따른 마우스에서의 골수 유래 중간엽 줄기세포의 세포집단 크기 증가 확인

[0102] 콜로니 형성 단위 섬유아세포(CFU-F) 분석을 통해 저급 지방산이 포함된 음용수 섭취에 따른 마우스에서의 골수 유래 중간엽 줄기세포의 세포 집단 크기 증가를 확인하였다.

[0103] 아세트산 나트륨(200 mM) 포함 음용수 또는 아세트산 나트륨 미포함 음용수를 C57BL/6 마우스에 7일간 섭취시킨 후, 이 마우스들로부터 대퇴골(femur)을 채취하였다. 채취한 대퇴골을 막자사발을 이용하여 으스러뜨린(crushing) 후, 0.2% 콜라게나아제(Type 1 collagenase, Worthington)를 처리하여 골에 붙어있던 골수세포(bone marrow cell)를 채취하였다. 채취된 세포를 20% FBS, 1% 페니실린과 스트렙토마이신(Invitrogen), 1% L-글루타민 및 5% 피루브산을 포함하는 α -MEM(Sigma-Aldrich)에 2.0×10^5 세포/well(25T flask)로 플레이트에 첨가하고, 이 플레이트를 5% CO₂ 및 37°C 조건하에 14일간 배양하였다.

[0104] 그 후, 플레이트를 100% 메탄올로 고정하고, 크리스탈 바이올렛 염색 용액(1% 용액, Sigma-Aldrich)으로 염색한 후 콜로니를 입체 현미경 하에 카운팅하였다. 여기서, 1 mm 이상의 직경을 가진 세포 집단을 콜로니로 간주하였다.

[0105] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0106] 도 9에서 확인되는 바와 같이, 저급 지방산 또는 이의 염인 아세트산 나트륨이 포함된 음용수를 섭취한 마우스로부터 채취된 골수 유래 중간엽 줄기세포의 빈도 및 세포 집단의 크기가 아세트산 나트륨이 포함되지 않은 음용수를 섭취한 마우스에 비해 약 2배 증가되는 것이 확인되었다.

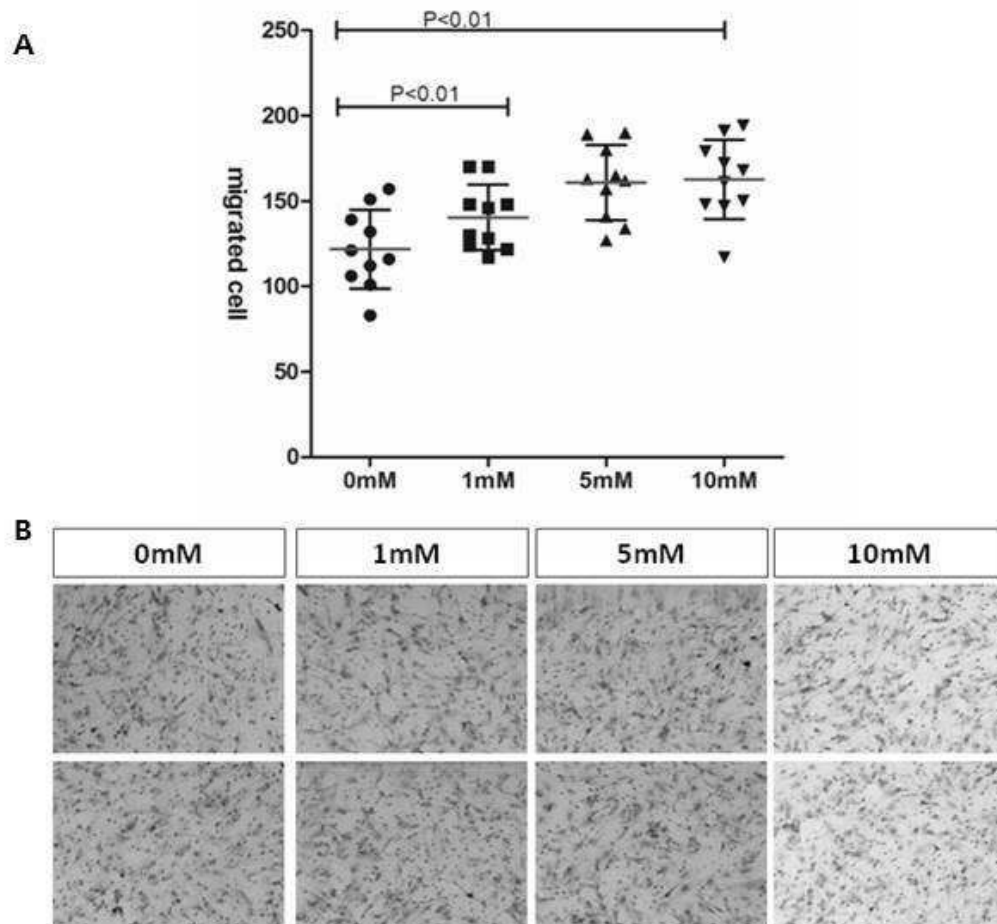
[0108] <실시예 9> 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 항염증 면역억제 및 혈관신생 촉진

신호 관련 인자의 발현 증가 확인

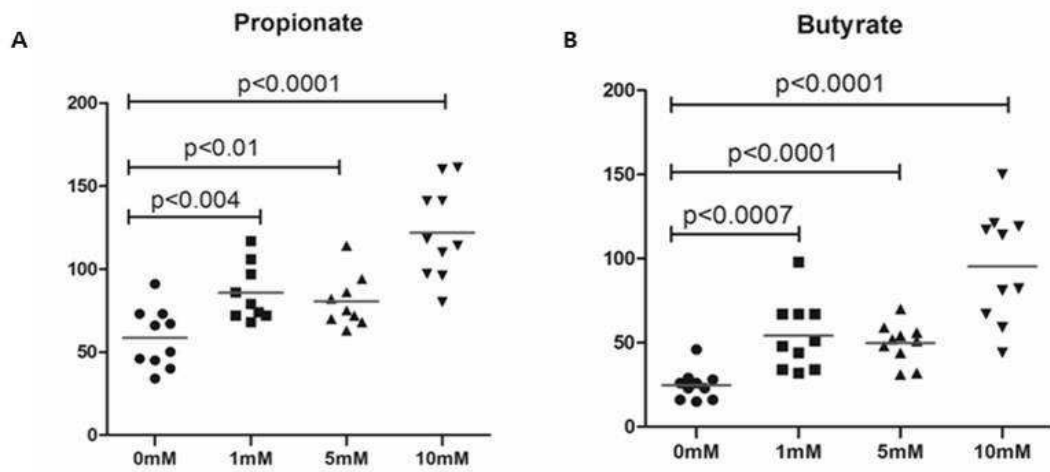
- [0109] 저급 지방산 처리에 따른 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포의 항염증 면역억제 및 혈관신생 촉진 신호 관련 인자 변화를 mRNA 발현 증가를 통해 확인하였다.
- [0110] ST2 세포(3.8×10^5 개)를 정상 성장 배지 조건하에 6-well 플레이트에 첨가하였다. 밤새 배양 후, 배지를 FBS를 첨가하지 않은 무혈청 저-글루코스(low-glucose) DMEM 배지로 교환하여 18시간 배양하였다. 그 다음, 세포를 48 시간 동안 10 mM 아세트산 나트륨으로 처리하거나(C2), 처리하지 않았다(CON).
- [0111] 상기 시료로부터 세포 용해물을 획득하고, TRIzol을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 세포의 총 RNA로부터 cDNA를 합성한 후 VEGF 및 IL-10에 대한 프라이머와 형광물질인 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(SYBR green PCR Master Mix)를 사용하여 세포 내에서의 VEGF 및 IL-10의 mRNA 발현량을 실시간 중합효소 연쇄반응(Realtime PCR)을 통하여 측정하였다.
- [0112] 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0113] 도 10에서 확인되는 바와 같이, 아세트산 나트륨 처리에 따라 항염증 면역억제 기능을 나타내는 IL-10의 발현은 아세트산 나트륨을 처리하지 않은 대조군(CON)에 비해 약 2.4배, 혈관신생 촉진 기능을 나타내는 VEGF의 발현은 약 2.5배 증가되는 것을 확인하였다. 즉, 저급 지방산 또는 이의 염 처리에 따라 줄기세포가 활성화되어 줄기세포의 항염증 면역억제 및 혈관신생 촉진 신호 관련 인자들의 합성이 높아진 것을 확인하였다.

도면

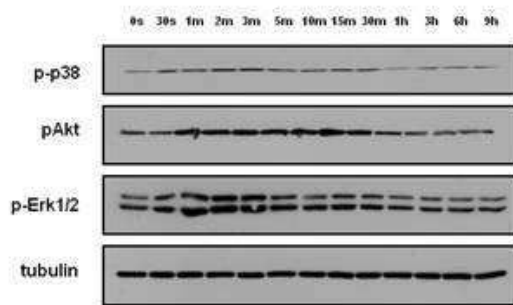
도면1



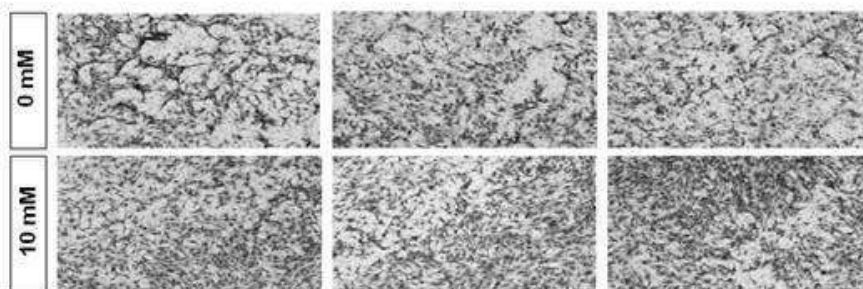
도면2



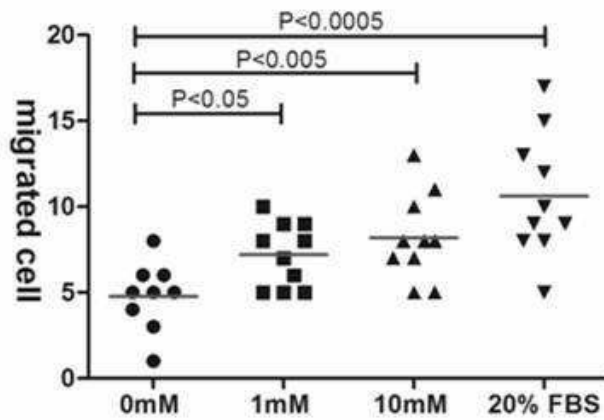
도면3



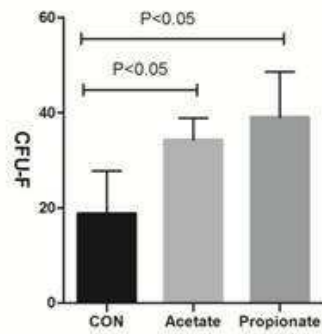
도면4



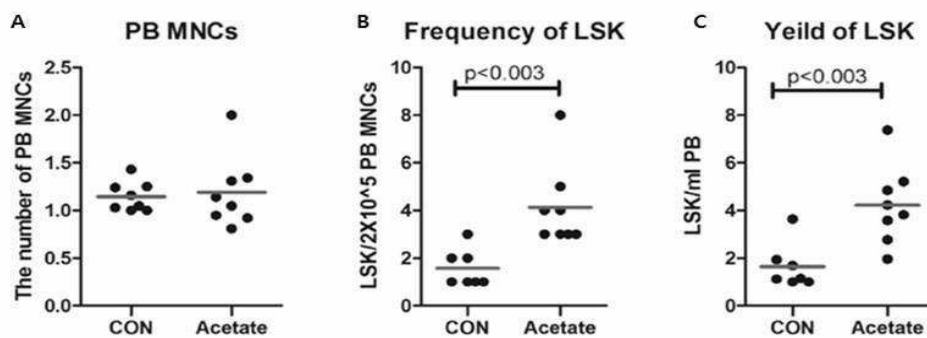
도면5



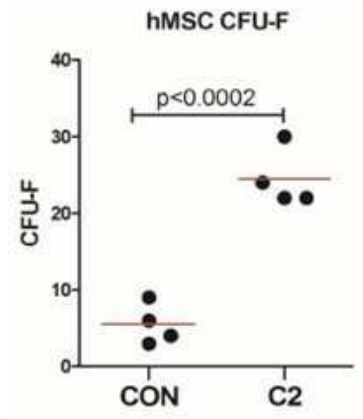
도면6



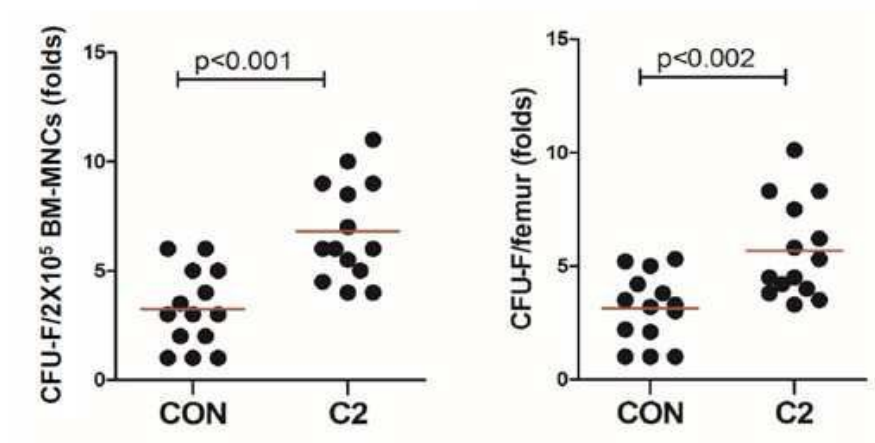
도면7



도면8



도면9



도면10

