(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월05일
(11) 등록번호 10-1774751
(24) 등록일자 2017년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 47/42* (2017.01)
A61K 9/06 (2006.01) *A61K 9/10* (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7011493
(22) 출원일자(국제) 2014년09월29일
심사청구일자 2016년04월29일
(85) 번역문제출일자 2016년04월29일
(65) 공개번호 10-2016-0062758
(43) 공개일자 2016년06월02일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2014/075849
(87) 국제공개번호 WO 2015/050078
국제공개일자 2015년04월09일
(30) 우선권주장
JP-P-2013-207485 2013년10월02일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
Rafael Assumpcao Larocca, et al. PLoS One. 2013; Vol.8(10) (2013.10.04. 공개)*
Sohn MH, et al. Scand J Rheumatol. 2003; Vol.32(6): pp.364-6. (2003년 공개)*
Jignesh Dalal, et al. Pediatric Research (2012) 71, pp.445-451 (2012.02.08. 공개)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)안트로젠
서울특별시 금천구 디지털로 130, 남성플라자 405호 (가산동)
(72) 발명자
야마시타 준지
일본국 286-0825 치바켄 나리타시 신이즈미 34 니혼 세이야쿠 가부시키가이샤 켄큐죠 나이
(74) 대리인
남연정

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 정의준

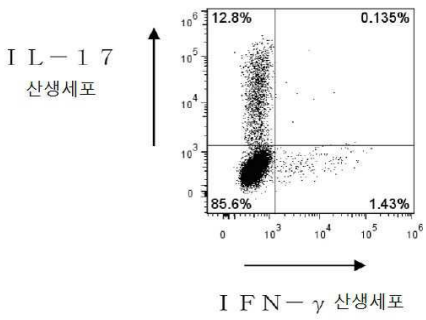
(54) 발명의 명칭 **IL-17 산생 억제 조성물**

(57) 요 약

IL-17 관련 질환(구체적으로는 IL-17이 증가함으로써 유발되는 자가면역 및 염증성 질환)을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공하며, 본 발명은 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 IL-17 산생 억제 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 IL-17 산생 억제 조성물은 가와사키병, 현미경적 다발성

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



혈관염, 성인 스틸병, 스티븐스 죤슨 증후군 및 중독성 표피 박리증으로 구성되는 군에서 선택되는 IL-17으로 인한 질환의 예방 또는 치료에 유효하다.

(52) CPC특허분류
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 9/10 (2013.01)
C12N 5/0667 (2013.01)
C12N 2501/2317 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 IL-17로 인한 질환인 가와사키병, 현미경적 다발성 혈관염, 성인 스틸병, 스티븐스 죤슨 증후군 및 중독성 표피 박리증으로 구성되는 군에서 선택되는 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 적어도 50%가 CD10, CD13, CD29, CD44 및 CD90에 대해서 양성이고 CD34, CD45 및 STRO-1에 대해서 음성인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 조성물은 주사용인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 지방조직 유래 간엽계 줄기세포가 마트리겔에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 마트리겔이 피브린 겔인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 포함하는 IL-17 산생 억제 조성물에 관한 것이며 특히 본 발명은 IL-17 또는 Th17 세포의 증가에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료에 적합한 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 재생 의료는 손상이나 기능이 저하된 조직 및/또는 기관을 치료하기 위한 방법으로서, 다분화능 줄기세포를 이용하는 세포에 기초한 치료법(cell-based therapy)이 일반적으로 알려져 있다. 다분화능 줄기세포 중 간엽계 줄기세포는 간엽계 세포(지방세포, 골아세포 및 연골 세포), 또한 줄기 세포, 신경세포, 내피 세포, 성상세포 및 상피 세포로도 분화가 가능한 다능성 성인 줄기세포이다. 따라서 뼈나 혈관, 심근의 재구축 등의 재생 의료 및

이식 의료로의 응용이 기대되고 있다.

[0003] 지방조직은 간엽계 줄기세포를 다량 포함하고 있어 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 이식 재료로 이용하고자 하는 광범위한 연구가 최근 진행되고 있다. 지방조직은 다른 조직형과 비교하여 꽤 대량의 간엽계 줄기세포를 가지며, 지방조직과 동량의 골수에서 단리된 간엽계 줄기세포와 비교하면 약 1,000배 많이 가지고 있다. 이 지방조직 유래 간엽계 줄기세포는 골수 유래 간엽계 줄기세포와 같이 연골 세포, 골아세포, 지방세포, 줄기 세포 등으로 분화할 수 있는 다분화능을 가지고 있다. 또한 지방조직 유래 간엽계 줄기세포는 골수 유래 간엽계 줄기세포와 같은 세포 표면마커의 발현을 나타내며 자가 또는 동종이계의 면역 반응에 대한 생체 내 및 인비트로 면역 조절 활성을 가지고 있다.

[0004] 인터루킨-17A(IL-17A)는 분자량 약 21 KDa의 폴리펩타이드로 구성되는 호모2량체의 당단백질로 1993년에 마우스의 T세포 하이브리도마에서 클로닝되고 1995년에 새로운 사이토카인으로서(단지 IL-17이라고도 부른다) 로 명명되었다. IL-17은 종래 알려져 있던 IFN-γ를 산생하는 Th1 세포 및 IL-4를 산생하는 Th2 세포와는 다른 헬퍼 T 세포 집단(Th17 세포)에서 산생되는 것이 발견되었다. Th17 세포는 TGF-β 및 IL-6 자극에 의해 naive T세포에서 분화 유도되고 IL-17외에 IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26을 산생한다. Th17 세포의 발견은 Th1/Th2 이론에서는 설명 다 할 수 없었던 많은 면역 현상의 설명을 가능하게 했다. 특히 지금까지 Th1형 질환이라고 생각되어 온 콜라겐 유도 관절염이나 자가면역성 뇌척수염 등의 자가면역질환이 IFN-γ나 IL-12 결손 마우스에서는 억제되지 않고, 오히려 악화하는데 대해, IL-17이나 IL-23 결손 마우스에 의해 강하게 억제된다는 점은 자가면역질환의 병태의 발현 및 진행에 있어 Th17 세포가 매우 중요한 역할을 할 수 있다는 점을 뒷받침하는 계기가 되었다. IL-17은 염증 반응을 유도해, 그것에 의해 복수의 자가 염증성 질환의 원인이 되는 주요한 이펙터 사이토카인(effector cytokine)이며 그 억제는 새로운 유효한 치료법의 개발로 연결된다.

[0005] 자가면역질환의 현재의 치료는 주로 프레드니솔론에 의한 스테로이드 요법이나 시클로스포린, 시크로포스파미드 및 아자티오프린을 비롯한 면역 억제제의 투여 및 이들의 조합 투여가 이루어지고 있다. 그렇지만 환자 중에는 치료 저항성 증례가 존재하는 것 외에 치료제의 부작용으로서 이감염성, 탈모 및 골다공증 등의 문제도 있어 장기적 예후는 반드시 만족스러운 것은 아니다. 그러므로 자가면역질환의 새로운 치료법에 대한 강한 요구가 존재한다.

[0006] 최근, 항IL-17 항체를 이용한 인간 임상실험의 보고가 이루어져 있으며, 류머티스 관절염이나 건선 등 염증성 질환을 적응증으로 하여 개발되어 있지만, 아직 시판에는 이르지 않았다. 또한 항체는 제조가 용이하고 특이성이 높다는 점에서 분석, 정제, 진단 및 치료 목적으로 사용되지만, 여전히 많은 문제점이 있다. 예를 들면 복잡한 포유류 세포의 생상체계가 필요하다는 점, 이황화 결합의 안정성에 대한 의존도, 항체 단편의 응집 경향, 저용해성이 문제가 되고 있다. 또한 항체는 인간 배열과 같이 설계된 경우(인간화 항체)라도, 원하지 않는 면역반응을 일으킬 가능성이 있어 의약품으로 사용되는 경우 가장 우려되는 요인이 되고 있다. 실제, 항체 제제를 반복 투여함으로써, 그 면역 반응이 원인으로 부적응 예가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 부적응 증상이 나타난다면 더 이상 당해 치료제에 의한 치료법을 이용할 수 없게 되는 등의 큰 문제점이 발생하게 된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Harrington LE et al.Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.Nat Immunol.2005 Nov;6(11):1123-32.

(비특허문헌 0002) Farida Djouad et al.Mesenchymal stem cells:innovative therapeutic tools for rheumatic diseases.Nat Rev Rheumatol.2009 Jul;5(7):392-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 종래 기술의 문제점을 감안해 안출된 것이며 IL-17 관련 질환(구체적으로는 IL-17이 증가함으로써 유발되는 자가면역 및 염증성 질환)을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자는 상기 목적을 달성하기 위해 연구한 결과, 지방조직 유래 간엽계 줄기세포가 IL-17의 산생을 억제하는 것을 발견하여 본 발명의 완성에 이르렀다. 즉 본 발명은 이하의(1)~(7)의 구성을 가지는 것이다.

[0010] (1) 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 IL-17 산생 억제 조성물.

[0011] (2) IL-17으로 인한 질환의 예방 또는 치료를 위해서 사용하는 것을 특징으로 하는(1)에 기재된 IL-17 산생 억제 조성물.

[0012] (3) IL-17으로 인한 질환이 가와사키병, 현미경적 다발성 혈관염, 성인 스틸병, 스티븐스 죤슨 증후군 및 중독성 표피 박리증으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는(2)에 기재된 IL-17 산생 억제 조성물.

[0013] (4) 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 적어도 50%가 CD10, CD13, CD29, CD44 및 CD90에 대해서 양성이지만 CD34, CD45 및 STRO-1에 대해서 음성인 것을 특징으로 하는(1)~(3) 중 어느 하나에 기재된 IL-17 산생 억제 조성물.

[0014] (5) 주사용인 것을 특징으로 하는(1)~(4) 중 어느 하나에 기재된 IL-17 산생 억제 조성물.

[0015] (6) 지방조직 유래 간엽계 줄기세포가 마트리겔에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는(1)~(5) 중 어느 하나에 기재된 IL-17 산생 억제 조성물.

[0016] (7) 마트리겔이 피브린 겔인 것을 특징으로 하는(6)에 기재된 IL-17 산생 억제 조성물.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 IL-17 산생 억제 조성물은 유효성분인 지방조직 유래 간엽계 줄기세포가 IL-17의 산생을 억제하므로, IL-17의 증가에 의해 유발되는 IL-17 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 Naive CD4 T세포를 Th17 세포로 분화시키는 조건에서 3 일간 배양 후, IL-17을 산생하는 세포의 비율을 유세포 분석기(flow cytometry)로 측정한 도이다.

도 2는 Naive CD4 T세포를 Th17 세포로 분화시키는 조건에서 3 일간 배양 후, 인간 및 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 배양 용기 상에 Th17 세포를 첨가해, 공배양 1일 후, IL-17을 산생하는 세포의 비율을 유세포 분석기(flow cytometry)로 측정한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 IL-17 산생 억제 조성물이다. 본 발명의 조성물로 사용하는 지방조직 유래 간엽계 줄기세포는 배양 용기에 부착되며 방추상 섬유아세포형의 형상을 나타낸다. 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 적어도 50%, 또한 바람직하게는 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 적어도 70%가 CD10, CD13, CD29, CD44, CD90 등의 간질 세포 관련 마커를 발현하지만, CD34, CD45 및 STRO-1 등의 조혈 줄기세포 관련 마커는 발현하지 않는 균일한 세포 집단이다.

[0020] 본 발명의 조성물로 사용하는 지방조직 유래 간엽계 줄기세포는 당업자에게 공지 방법으로 얻을 수 있지만, 그 일례를 다음에 나타낸다.

[0021] (i) 지방조직에서의 간질 혈관 세포군(SVF라고도 부른다)의 분리

[0022] 지방조직은 주로 피하에서 지방 흡입수술 또는 외과적 절제 수술에 의해 얻을 수 있으며, 이 지방조직을 콜라게나제로 처리한 후, 원심분리를 한다. 지방세포를 포함하는 상층을 제거하고, 하층에 인산 완충 생리 식염수(PBS라고도 부른다)를 가하여 현탁액을 형성한다. 이어서, 원심분리에 의해 SVF를 함유하고 있는 하층을 회수한다.

[0023] (ii) SVF의 배양배지에서 배양

[0024] SVF를 배양배지에 현탁시킨 후, 현탁액을10,000~40,000 cells/cm^2의 농도로 배양용기에 파종하고, 배양한다. 당해 배양배지는 10% 소태아혈청을 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)로 구성되는 배지이며 SVF를 약 24시간 배양하기 위해 이용한다.

[0025] (iii) 증식 배지에서 배양

[0026] SVF의 배양배지를 제거한 후, 증식 배지를 더해 접착(또는 부착) 세포를 증식시킨다. 증식 배지는 10% 소태아혈청 및 성장 인자로 0.1~100 ng/mL의 EGF 또는 유사 성장 인자 활성을 가지는 물질을 첨가한 DMEM이며 지방 유래의 간엽계 줄기세포를 신속하게 증식시키고, 이를 통해 세포의 수를 단기간에 큰폭으로 증가시키도록 기능한다.

[0027] (iv) 계대 배양

[0028] 세포가 배양 용기의 바닥의 80~90%를 충족하면, 증식 배지를 제거하고, 트립신 처리하여 배양 용기에서 세포를 채취한다. 계대 배양을 위해 세포를 1:3 ~ 1:4의 비율로 희석한 다음, 새로운 배양 용기에서 증식 배지를 이용해 배양한다. 상기와 같은 방법에 의해 또한 계대 배양을 실시할 수 있다.

[0029] (v) 계대 배양 후의 조성물

[0030] 이러한 계대 배양을 실시함으로써, CD10, CD13, CD29, CD44, CD90 등의 간질 세포 관련 마커를 발현하지만, CD34, CD45 및 STRO-1 등의 조혈 줄기세포 관련 마커를 발현하지 않는 균일한 세포집단(본 발명의 조성물)을 얻을 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 지방조직 유래 간엽계 줄기세포, 또는 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 세포 집단을 예방적 또는 치료적으로 유효한 양으로 포함하며, 또한 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 일반적으로 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제를 함유한다.

[0032] 이러한 담체 및 희석제의 예는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면 이하의 것을 들 수 있다: 유당, 포도당 및 자당 등의 당; 옥수수 전분 및 감자 전분 등의 전분; 소디움 카르복시메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스 및 초산 셀룰로오스 등의 셀룰로오스 및 그 유도체; 분말 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터 및 좌약 왁스 등의 부형제; 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유 등의 기름; 프로필렌 글리콜 등의 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜 등의 폴리올; 올레인산 에틸 및 라우린산 에틸 등의 에스테르; 한천; 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄 등의 완충제; 알긴산; 발열 물질을 포함하지 않는 물; 등장 식염액; 링거 용액; 에틸 알코올; pH완충액; 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리산 무수물(polyanhydrides); 및 의약 제제에 사용되는 다른 비독성 적합 물질.

[0033] 본 발명의 조성물은 세포의 보호를 목적으로 디메틸설폭사이드(DMSO)나 혈청알부민 등을, 세균의 혼입을 저지하는 것을 목적으로 항생 물질 등을, 세포의 활성화, 증식 또는 분화 유도 등을 목적으로 각종 성분(비타민류, 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드 등)을 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 대상으로의 적절한 투여형태를 제공하기 위해, 예방적 또는 치료적 유효량의 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를, 바람직하게는 순수한 상태에서 적당량의 담체와 함께 포함한다. 치료적 유효량의 세포가 투여되도록, 1회 투여량으로는 예를 들면 1×10^4개 ~ 1×10^{10}개의 지방조직 유래 간엽계 세포를 함유시키는 것이 바람직하다. 또한 지방조직 유래 간엽계 세포의 투여량은 환자의 증상, 연령 및 체중, 치료 또는 예방되기 위한 질환의 성질 및 중증도, 투여 경로 및 치료제의 제형에 따라 다르다. 본 발명의 조성물은 단회 투여 또는 분할 투여로 투여될 수 있다.

[0035] 제형은 투여 방식에 적합한 것으로 해야 한다. 본 발명의 조성물은 무균 상태로 제공되고 발열 물질을 포함하지 않는 조제물로 제공되며, 인간 대상으로의 투여에 적합한 형태인 한 본 발명의 조성물의 투여 경로는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면 국소적으로, 경구, 비경구, 흡입 분무, 직장, 경비, 경협(볼내 투여), 질내, 경안 또는 이식 리저버를 통해 투여할 수 있다. 여기서 비경구란 피하, 피 내, 정맥 내, 근육내, 관절내, 활액낭 내, 흉골 내, 지주막하강 내, 병소 내 및 두개 내 주입 또는 수혈기술을 포함한다.

[0036] 본 발명의 조성물에서는 지방조직 유래 간엽계 줄기세포는 세포 담지체(마트리겔)에 포함시켜 사용할 수 있다. 이것에 의해 치료 적응 국소에 효과적으로 투여, 작용시키는 것이 가능하다. 마트리겔은 세포를 담지할 수 있는

것이면 좋고 예를 들면 피브린 겔(피브린 접착제), 히알루론산, 알긴산, 폴리젖산, 글리콜산 등을 들 수 있다. 또한 라미닌, 콜라겐IV, 엔타크틴 등의 세포외 기질을 조성으로 하는 마트리겔이나 세포외 기질에 증식 인자류를 첨가한 마트리겔을 이용하는 것도 유용하다. 마트리겔을 지방조직 유래 간엽계 줄기세포와 혼합하고, 치료 적응 부위에 중층 또는 혼합해 적용한다. 지방조직 유래 간엽계 줄기세포와 혼합하는 마트리겔로는 피브린 겔이 바람직하다. 피브린 겔은 피브리노겐과 트롬빈을 혼합함으로써 제조되며, 예를 들면 보르히르 조직 접착용(화학 및 혈청 요법 연구소제)이다. 지방조직 유래 간엽계 줄기세포와 마트리겔과의 혼화물은 치료 적응 국소 상태, 크기 등에 따라 적당히 증감하여, 환부(접착 폐쇄 부위)에 중층 또는 혼합하여 적용한다.

[0037] 본 발명의 조성물은 IL-17 산생 억제 효과를 가지며, IL-17의 증가에 의한 IL-17 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. IL-17 관련 질환은 이로 한정되는 것은 아니나 가와사키병, 현미경적 다발성 혈관염, 성인 스틸병, 스티븐스 존슨 증후군, 중독성 표피 박리증을 예시로 들 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물의 조제 예, 효과, 응용예의 일례를 다음에 나타내지만, 본 발명은 이들로 한정되는 것이 아니다.

[0039] **(실시예 1)**

[0040] **인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포액의 조제**

[0041] 지방 흡입수술을 통해 건강한 사람의 피하 지방 조직을 채취하였다. 지방조직으로부터 혈액을 제거하기 위해, 수득된 지방조직을 동일 용량의 PBS를 이용해 세정했다. 동량의 콜라게나제 용액을 지방조직과 함께 37℃에서 지방 입자가 없어질 때까지 소화시켰다. 소화시킨 후, 원심분리하여 지방세포를 포함하고 있는 상층을 제거한 후, SVF를 포함하는 하층을 회수하였다. SVF를 배양배지(DMEM, 10% FBS, 항생 물질)에 현탁하고, 배양 용기에 분주하고, 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 약 24시간 배양하였다. 그 후 혈구계 세포 등의 부유 세포를 PBS로 세척하여 제거하고, 접착능을 가지는 배양 용기에 부착하는 세포로서 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 선별하였다. 그 후 증식 배지(DMEM, 10% FBS, 1ng/mL bFGF)에서 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 확장 배양했다. 지방조직 유래 간엽계 줄기세포가 배양 용기의 80%를 커버하기까지 증식하면, 트립신 처리하여 세포를 박리해, 수득된 세포를 증식 배지에서 1:3 ~ 1:4의 비로 희석하여 3~4 계대배양을 하였다. 계대배양 후 세포액을 바이알에 충전하여, 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포액을 조제하였다. 이 세포액은 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 80% 이상이 CD10, CD13, CD29, CD44 및 CD90에 대해서 양성 반응을 나타내며 CD34, CD45 및 STRO-1에 대해서 음성 반응을 나타냈다.

[0042] **(실시예 2)**

[0043] **마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포액의 조제**

[0044] 6주령의 암컷 C57BL/6 마우스에서 피하지방 조직을 채취하였다. 이 피하지방 조직에 동량의 콜라게나제 용액을 첨가하고, 37℃에서 지방 입자가 없어질 때까지 소화시켰다. 소화 후, 원심분리하여 지방세포를 포함하는 상층을 제거한 후, SVF를 포함하는 하층을 회수하였다. SVF를 배양배지(DMEM, 10% FCS, 항생 물질)에 현탁하고, 배양 용기에 분주하고, 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 약 24시간 배양하였다. 그 후 혈구계 세포 등의 부유 세포를 PBS로 세척하여 제거하고, 접착능을 가지는 배양 용기에 부착하는 세포로서 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 선별하였다. 이후, 증식 배지에서 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 확장 배양했다. 지방조직 유래 간엽계 줄기세포가 배양 용기의 80%를 커버하기까지 증식하면, 트립신 처리하여 세포를 박리시키고, 수득된 세포를 증식 배지로 1:3 ~ 1:4의 비로 희석하여 3~4 계대배양을 하였다. 계대배양 후의 세포액을 바이알에 충전하여, 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포액을 조제하였다. 이 세포액의 경우, 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 70% 이상이 CD29 및 CD90에 대해서 양성 반응을 나타내며 CD34 및 CD45에 대해서 음성 반응을 나타냈다.

[0045] **(실시예 3)**

[0046] **인간 및 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포에 의한 IL-17 산생 세포의 억제 효과**

[0047] **(1) Th17 세포의 조제**

[0048] 암컷 C57BL/6 마우스(6주령;일본 체르스리바)의 경부 림프절에서 임파구를 채취하고, $CD4^+CD62L^+$T Cell Isolation Kit II(130-093-227; Miltenyi Biotec Inc.)를 이용하여 Naive CD4 T세포를 분리 추출하였다. 그 후 항마우스 CD3 항체(16-0031; eBioscience)를 고상화시킨 24 웰의 배양 용기 상에 Naive CD4 T세포를 1.5×10^6개 분주하고, Naive CD4 T세포로부터 Th17 세포로 분화시키는 조건 하에서(IL-6; 50 ng/mL; BioLegend, TGF-beta; 1 ng/mL; BioLegend, IL-23; 5 ng/mL; BioLegend, 항IL-4 항체; 10 μg/mL; BioLegend, 항IFN-γ항체; 10 μg/mL; BioLegend, 항CD28 항체; 5 μg/mL; BioLegend) 3 일간 배양(37℃, 5% CO_2)하였다. 배양 3일 후, 세포를 항마우스 IL-17 항체(12-7177-81; eBioscience) 및 항마우스 IFN-γ항체(17-7311; eBioscience)로 염색해, Naive CD4 T세포에서 Th17 세포로 분화한 세포의 비율을 유세포 분석기(flow cytometry)(Cytomics FC500; BECKMAN COULTER)로 측정하였다(도 1).

[0049] 도 1에 나타낸대로, Th17 세포로 분화시키는 조건에서 3 일간 배양한 후 IL-17을 산생하는 세포의 비율은 12.80%였다. 한편, IFN-γ를 산생하는 세포는 1.43%였다. 이러한 결과로부터 Naive CD4 세포에서 Th17 세포로 분화되었다는 점을 분명히 알 수 있다.

[0050] (2) Naive CD4 T세포에서 Th17 세포로 분화시키는 조건에서 3 일간 배양하여, IL-17을 산생하는 Th17 세포로 분화시킨 후(도 1), 실시예 1 및 실시예 2에 따른 인간 및 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포(1.0×10^4개)의 세포 밀도가 80% 이상을 나타낸 24 웰의 배양 용기 상에 Th17 세포를 1.0×10^6개 첨가하여, 1일간 공배양하였다. 공배양 1일 후, Th17 세포를 회수해, 항IL-17 항체 및 항IFN-γ항체로 세포를 염색한 후, IL-17을 산생하는 Th17 세포의 비율을 유세포 분석기(flow cytometry)로 측정했다(도 2 및 표 1).

[0051] 도 2에 나타낸 대로(A)의 공배양하지 않은 경우, IL-17을 산생하는 세포의 비율은 11.5%였다. 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 배양 용기 상에 Th17 세포를 첨가한 (B)에서는 IL-17을 산생하는 세포의 비율이 1.18%였다. 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 배양 용기 상에 Th17 세포를 첨가한 (C)에서는 IL-17을 산생하는 세포의 비율은 1.86%였다. 한편, IFN-γ를 산생하는 세포의 비율에 관해 각 군 모두 큰 변화는 없었다.

표 1

[0052]

	(A) ASC 없음	(B) 인간 ASC*	(C) 마우스 ASC*
IL-17 산생세포의 억제율(%)	0%	89.6%	93.5%

[0053] *지방조직유래 간엽계 줄기세포(ASC)

[0054] 표 1에 나타낸 바와 같이, IL-17 산생 세포의 억제율은 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 배양 용기 상에 Th17 세포를 첨가한 (B)에서는 89.6%이며 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 배양 용기 상에 Th17 세포를 첨가한 (C)에서는 93.5%였다.

[0055] 이상에서 인간 및 마우스 지방조직 유래 간엽계 줄기세포는 IL-17 산생 세포를 유의하게 억제한다는 점을 분명히 알 수 있다.

[0056] **(실시예 4)**

[0057] **지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 외용약으로서의 응용예**

[0058] 실시예 1에 따른 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포액을 이하 방법으로 보르히르 조직 접착용에 포함시켰다. 즉 피브리노겐 동결 건조 분말(바이알 1)을 피브리노겐 용해액(바이알 2) 전량으로 용해해, A액으로 했다(피브리노겐 농도 ; 80 mg/mL). 트롬빈 동결 건조 분말(바이알 3)을 트롬빈 용해액(바이알 4) 전량으로 용해해, B액으로 했다(트롬빈 농도; 250단위). 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 A액으로 희석 후, 그 동량이 되도록 B액을

혼합하고, 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 외용약을 조제하였다.

[0059] **(실시예 5)**

[0060] **가와사키병 모델 마우스의 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포의 개선 효과**

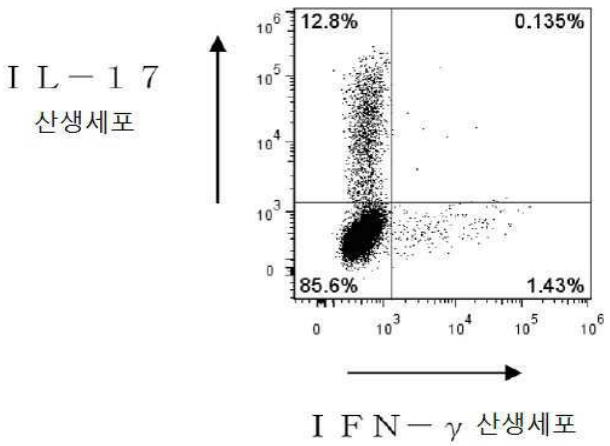
[0061] 4주령의 암컷 C57BL/6 마우스에 LCWE(*Lactobacillus casei* cell wall extract) 0.5 mg를 복강내 투여하여, 가와사키병을 유도하였다. 실시예 1의 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포를 PBS로 1 mL 당 2×10^6개가 되도록 준비한 후, 5×10^5개를 LCWE 투여 2주 후에 정맥 투여하였다. 8주령 시 안락사시키고 양측 관동맥 분기부를 포함한 대동맥기시부를 적출하여, 각 군에서 관동맥염의 정도를 병리 조직학적으로 비교하였다. 그 결과, 인간 지방조직 유래 간엽계 줄기세포 투여군에서는 음성 대조군과 비교하여 관동맥 병변의 범위 및 관동맥 주변의 세포 침윤이 현저히 억제되었다.

산업상 이용가능성

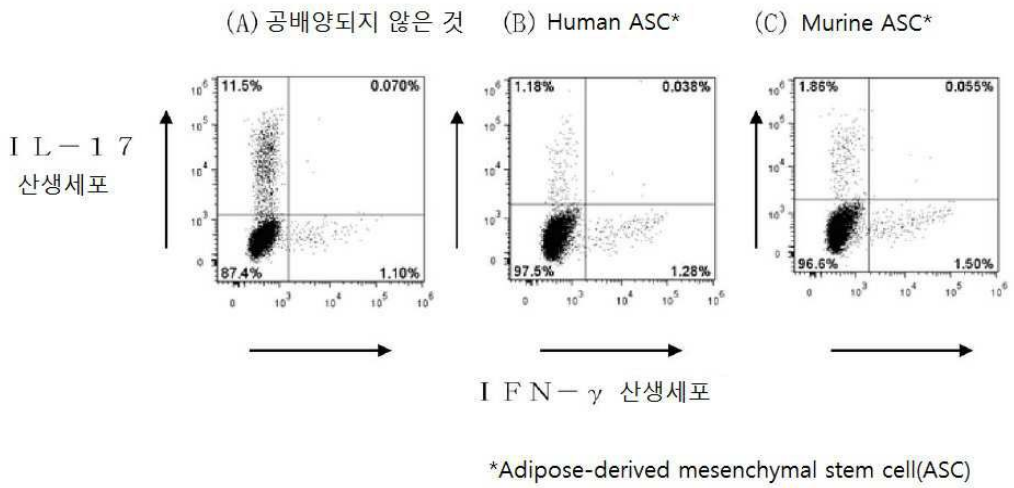
[0062] 본 발명의 조성물은 IL-17의 산생을 억제하는 효과를 가지므로, IL-17의 증가로 인한 IL-17 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면

도면1



도면2



*Adipose-derived mesenchymal stem cell(ASC)