

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0036437 (43) 공개일자 2010년04월08일
(51) Int. Cl. <i>A61F 2/28</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0095675 (22) 출원일자 2008년09월30일 심사청구일자 2008년09월30일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900 (72) 발명자 박봉욱 경상남도 진주시 칠암동 90 경상대학교 의학전문 대학원 치과학교실 구강악안면외과 노규진 경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 수의과대학 수의산과 (뒷면에 계속) (74) 대리인 손민	

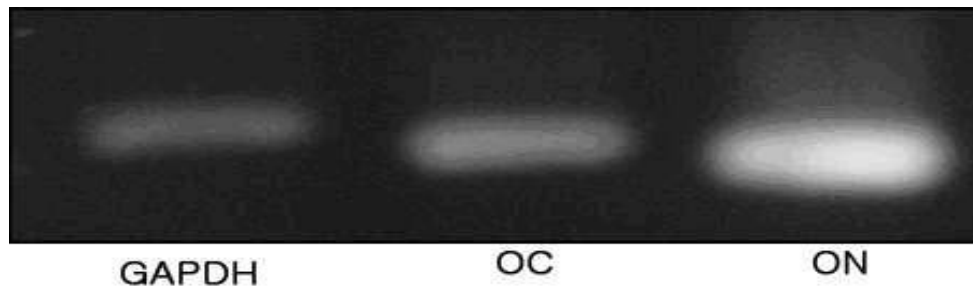
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 피부 유래 전구세포를 포함하는 치조골 재생용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 치조골 재생을 위한 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 피부 유래 전구세포를 포함하는 치아 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물 및 개체로부터 피부를 분리하여 배양하고, 배양된 세포에서 피부 유래 전구세포를 선별하여 치조골 세포에 노출시키는 단계를 포함하는 치조골 재생 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3c



(72) 발명자

강은주

경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 수의과대학 수
의산과

강동호

경상남도 진주시 칠암동 90 경상대학교 의학전문대
학원 신경외과학교실

변준호

경상남도 진주시 칠암동 90 경상대학교 의학전문대
학원 치과학교실 구강악안면외과

특허청구의 범위

청구항 1

피부 유래 전구세포를 포함하는 치과 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치과 시술은 임플란트 시술인 치조골 재생용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 치과 시술은 상악동저 거상술(maxillary sinus floor elevation)인 치조골 재생용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 피부 유래 전구세포는 자가(autogenous)유래 세포인 치조골 재생용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 피부 유래 전구세포는 피부로부터 추출된 것 또는 중간엽 줄기세포로부터 분화된 것인 치조골 재생용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 피부 유래 전구세포는 Oct-4(octamer-4), Sox-2 ((sex determining region Y)-box 2) 및 Nanog(homeobox protein nanog)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 이상의 유전자 발현이 증가된 것인 치조골 재생용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 탈회골(demineralized bone) 및 피브린 글루(fibrin glue)를 더 포함하는 치조골 재생용 조성물.

청구항 8

- (a) 개체로부터 피부 조직을 분리하는 단계;
 - (b) 상기 분리된 피부를 배양하는 단계;
 - (c) 배양된 세포에서 피부 유래 전구세포를 선별하는 단계; 및
 - (d) 선별된 피부 유래 전구세포를 치조골 세포에 노출시키는 단계;
- 를 포함하는 치조골 재생 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (d) 단계는 계대 배양한 피부 유래 전구세포를 동물의 상악동에 이식하는 단계인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 (a) 단계의 피부 및 (d) 단계의 치조골은 자가 유래 세포인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 (c)단계는 Oct-4(octamer-4), Sox-2 ((sex determining region Y)-box 2) 및 Nanog(homeobox protein nanog)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 이상의 유전자 발현을 확인함으로써 선별하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 (d) 단계 이후 (e) 오스테오칼신(osteocalcin) 또는 오스테오넥틴(osteonectin)의 발현을 확인하는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치조골 재생을 위한 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 피부 유래 전구세포를 포함하는 치아 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물 및 개체로부터 피부를 분리하여 배양하고, 배양된 세포에서 피부 유래 전구세포를 선별하여 치조골 세포에 노출시키는 단계를 포함하는 치조골 재생 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 치아는 저작기능 및 발음 기능뿐만 아니라 미적으로도 중요한 역할을 한다. 포유류에서는 치아가 섬유성 인대인 치주인대(periodontal ligament)에 의해 악골에 부착되어 있으며, 이러한 방식은 저작력에 견딜 수 있는 충분한 유연성을 제공한다. 해부학적으로 치아는 치관(crown)과 치근(root)으로 구성되며 그 경계를 치경부라고 한다. 이러한 치아의 지지 조직으로 치조골(alveolar), 치주인대(periodontal ligament: 치주막이라고도 함), 백악질로 구성되는 특이한 지지 구조에 의해 악골에 부착되어 있으며, 그 모든 구조는 치은으로 보호되어 있다. 치주 인대는 치아와 치조골 사이에 위치하며 두께가 약 0.2mm 정도 되는 고도로 분화된 결합 조직이다. 주 기능은 치아를 악골에 연결하는 것이며, 상당한 저작력을 견딜 수 있는 정도를 충족해야 한다. 또한 치아는 치주 인대에 의해 골에 부착되어 있는데 치조골은 턱의 기저골(basal bones)에 단단히 부착되어 있는 치조돌기의 일부이다. 치아가 상실되면 치조 돌기도 점차로 소실되며 따라서 안면의 높이 감소로 인해 턱과 코가 가까워지는 무치악환자들의 특징적인 안모를 나타내게 된다. 따라서 전체 또는 부분적 틀니를 시술하는 환자 또는 임플란트 환자의 경우, 이러한 치조골이 이미 많이 소실된 상태인 경우에는 인공 치아를 지지할 수 있도록 하기 위하여, 치과학적으로 별도의 치조골을 재생시키는 과정이 필요하다.

[0003] 현재 인공 치아를 식립하기 위하여 임플란트가 가장 대중적으로 시술되고 있다. 임플란트 시술이란 상실된 치아를 인공치아 식립을 통해 회복하는 치과 시술의 한 분야로서, 상실된 치아의 치근을 대신할 수 있도록, 인체에 거부반응이 없는 인공 치근을 이가 빠져나간 치조골에 심어서 유착시킨 뒤 인공치아를 고정시켜 치아의 원래 기능을 회복하게하는 치과 시술 방법이다. 최근, 치과 임플란트 치료법의 눈부신 발전으로 많은 치아 소실 환자들이 치과 임플란트에 의해 저작 기능과 심미성을 회복하고 있으며, 현재 시술되고 있는 임플란트 치료는 티타늄(titanium)으로 제조된 인공 치근을 악골 내 식립하여 골 유착을 유도한 후 인공 치관을 만들어 인공 치근과 나사 또는 시멘트(cement)로 부착하는 방법으로 시술이 행해지고 있다.

[0004] 상악동저 거상술(maxillary sinus floor elevation)은 심한 상악골 위축과 상악동 함기화로 상악구치부에 잔존 치조골이 적게 남은 경우 성공적으로 임플란트를 식립하기 위한 필수적인 시술방법이다. 보인(Boyne) 및 제임스(James)는 처음으로 상악동저에 자가골 이식 기술에 대해 소개하였다(Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. J Oral Sur 1980;38:613-616). 타툼(Tatum)은 그 후 상악동저에 있어서 측벽 시술(lateral window technique)을 제안하였다(Tatum H Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. Dent Clin North Am 1986;30:207-229). 최근 다양한 이식술 및 물질들이 상악 후 치조제(maxillary posterior alveolar ridge)의 거상에 사용되고 있다. 임플란트 시술에 있어서 상악 구치부는 상악동의 함기화와 치조골량의 부족으로 항상 임플란트 식립에 제한을 받으며, 이러한 경우 성공적인 임플란트 치료를 위해서는 자가골, 동종골 또는 합성골 등을 이용한 상악동 내 골 이식술이 필요하다. 자가골은 골 생착과 임플란트 골유착에는 장점이 있으나 이식골의 흡수율이 높고 공여부의 이차적 수술이 필요한 단점이 존재하며(Schmelzeisen R, Schimming R, sittinger M. Making bone: implant into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. J Cranio Maxillofac Surg 2003;31:34-39), 동종골 및 합성골은 골 생착에 많은 시간이 소요되고, 생착 후에도 골질이 좋지 않아 장기간의 임플란트 성공률에 영향을 미치는 단점이 있다(Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ. Six-year clinical and histology study of sinus-lift grafts. Int J Oral Maxillofac Implants 1996;11:26-34).

[0005] 상기와 같이 상악동으로 인하여 상악 구치부의 치조정 길이가 적게 남은 경우, 상악동 내 골 이식술이 반드시

필요하며 이 경우 이식골의 생착을 조기에 달성하고, 임플란트의 성공률을 높이며, 특히 많은 양의 골이식술이 필요할 경우 자가골 이식술이 수행된다. 수술 방법이 발달함에 따라 자가골 이식술로도 비교적 양호한 결과를 기대할 수 있지만, 여전히 골 공여주 채취에 따른 환자 불편의 증가, 합병증 유발의 가능성, 수술 횟수 증가 및 수술 비용 부담은 환자에게 큰 불편으로 남아있다.

[0006] 이에 본 발명자들은, 골 이식 과정을 생략하고, 보다 쉽게 골 형성을 유도할 수 있는 조성물을 제공함으로써 환자에게 침습적인 골 이식 과정을 생략하여 신체적, 정신적, 및 경제적 부담을 줄일 수 있는 방법을 제공하기 위하여 예의 노력한 결과, 피부 유래 전구세포를 개체의 치조골 세포에 노출시키는 경우, 외배엽성인 피부 유래 전구세포로부터 중배엽성인 치조로 분화할 수 있어, 기존의 불편, 고통 및 비용 부담이 따르는 치조골 이식 수술 없이 치조골의 재생 및 형성이 가능함을 밝혀내고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 피부 유래 전구세포를 포함하는 치아 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 개체로부터 전층의 피부를 분리하는 단계; 상기 분리된 피부를 조직 배양판에서 배양하는 단계; 배양된 세포에서 피부 유래 전구세포를 선별하는 단계; 및 선별된 피부 유래 전구세포를 치조골 세포에 노출시키는 단계를 포함하는 치조골 재생 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 따라서 하나의 양태로서, 본 발명은 피부 유래 전구세포를 포함하는 치과 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에서 사용되는 용어 "치과 시술"은 치아 및 잇몸 등을 포함하는 모든 치의학적 시술을 포함하며, 치의학적 시술의 예로는 전체 틀니, 부분 틀니, 풍치의 치료 및 치주염 등의 잇몸질환의 치료, 임플란트 시술(implant) 및 상악동저 거상술(maxillary sinus floor elevation) 등이 있으나 본 발명이 상기 예에 의해 제한되는 것은 아니다. 바람직하게, 본 발명은 상기 치과 시술 중 하나로써 임플란트 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물을 제공한다. 임플란트 시술이 필요한 대상의 대다수가 고연령층의 성인인바 상악 구치부의 치조골량이 부족하여, 바로 임플란트 시술을 수행할 수 없다. 따라서 치조골량을 증대시키기 위하여 현재까지 골이식 시술이 보편적으로 사용되고 있으나, 상기 배경기술에서 언급한 바와 같이 자가골, 동종골 또는 합성골을 이용하여 골이식을 수행하는 방법은 시술 대상에게 있어서 고통 및 비용 부담 및 시술의 효과 등에 있어서 만족스럽지 못한 실정이다. 그러나 본 발명의 피부 유래 전구세포를 포함하는 치과 시술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물을 사용하는 경우, 불편한 별도의 골 이식 과정 없이도 상악동 구치부의 치조골량을 증가시킬 수 있게 되어, 임플란트 시술의 성공률을 높일 뿐만 아니라, 시술 기간을 단축시키는 효과를 가져온다. 바람직하게 본 발명은 줄기세포로부터 분화된 외배엽성 전구세포를 치조골에 노출시키는 경우, 외배엽성 기원의 세포가 중배엽성인 치조골로 분화되어 치조골을 형성하게 하며, 더욱 바람직하게는 외배엽성 기원인 피부 유래 전구세포를 추출하여 이를 치조골 세포에 노출시킴으로써 치조골을 재생시킨다.

[0011] 또 하나의 바람직한 양태로서 본 발명은 상기 치과 시술 중 상악동저 거상술에 사용하기 위한 치조골 재생용 조성물을 제공한다. 상악동이란 부비강의 하나로 위턱뼈 가운데 있는 한 쌍의 공동을 가리키는 용어로서, 안쪽은 콧속의 점막으로 덮여 있고 그 내부에 공기가 들어 있는 구조를 가진다. 아래 어금니 부위와는 달리 위의 어금니 부위의 뿌리 쪽 부분은 뼈로 차 있지 않고 빈 공간으로 존재하는 이러한 상악동으로 인하여 윗 어금니 부위에 임플란트 식립시 충분한 높이의 뼈를 확보하기 어려운 경우가 대부분이며, 이런 경우 임플란트 식립을 위해, 상기 상악동 부분에 뼈를 이식하고 임플란트를 식립하게 된다. 상악동 하방부의 골 높이가 10mm 이상이 되어야 성공적인 임플란트를 식립할 수 있게 되며, 상기와 같은 임플란트 식립을 위하여 치조골량이 부족한 대상에게 상기와 같은 골이식 과정이 진행되는 것이 통상적이다. 그러나 본 발명의 피부 유래 전구세포를 이용하는 경우에는 골 자체를 이식할 필요없이, 피부 유래 전구세포를 이식함으로써 골 생착에 우수하고 이식 세포의 흡수율이 낮은 우수한 치조골 재생 효과를 나타낼 수 있다.

[0012] 이 밖에도 임플란트 치료를 위한 상악동저 거상술 외에도, 선천기형, 악골외상, 악골종양 등으로 치조골을 완전 및 부분적으로 상실한 경우에도 치조골 재생술이 필요하다. 즉, 구순구개열 같은 선천기형인 경우 치조골 회복을 위하여 약 6 - 10세 경 자가 장골을 이용한 치조골 이식술을 실시 하며, 이 경우 본 발명 조성물인 자

가 피부유래 전구세포를 이용하여 골이식술을 대체할 수 있다. 또한, 외상으로 악골을 부분적으로 소실한 경우나 악골내 양성 및 악성 종양으로 종양적출술을 시행 받은 환자의 경우 건강한 치아와 악골의 회복을 위하여는 치조골 이식술이 반드시 필요하며, 이 경우도 본 발명의 조성물로 이를 대체할 수 있게 된다.

[0013] 본 발명의 용어 "피부 유래 전구세포"는 외배엽성으로 분화된 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포의 한 종류를 의미한다. 피부 조직에는 표피 간세포(epidermal stem cells), 중간엽 줄기 세포 유사 세포(mesenchymal stem-cell-like cells) 및 피부 유래 전구 세포(skin derived progenitor cell, SKP)등의 다양한 기원의 줄기세포가 존재한다고 알려져 있으며, 본 발명에서 사용된 용어 "피부 유래 전구세포 (skin derived progenitor cell, SKPs)"는 모낭의 진피 유두층(dermal papillae)에 상주하는 다능성 전구세포로서, EGF, FGF 및 TGF- β 에 의해 증식되며, 시험관 내 (in vitro)에서 이들 성장 인자에 의해 뉴런, 아교세포, 평활근 세포 및 지방세포로 분화하는 세포를 의미한다. 바람직하게 상기 피부 유래 전구세포는 동종에서 유래된 전구세포일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 자가 유래 전구세포이다. 한편, 상기 피부 유래 전구세포는 Oct-4 (octamer-4), Sox-2 ((sex determining region Y)-box 2), 및 Nanog (homeobox protein nanog)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자 발현이 증가된 것이 바람직하다. 피부 조직은 다른 조직에 비하여 채취가 쉽고 빠르며, 공여부의 합병증을 최소한으로 줄일 수 있고, 면역 반응에 의한 제한을 받지 않는 장점이 있어, 골이식을 대체하기 위한 조성물을 제조하는데 용이하다.

[0014] 상기의 피부 유래 전구세포는 다양한 경로로부터 취득될 수 있다. 상기 피부 유래 전구세포는 통상적인 전구세포의 취득 방법으로 취득할 수 있는데, 그 예로 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell) 또는 성체줄기세포(adult stem cell)를 분화 유도하여 상기 분화된 세포에서 외배엽성 전구세포를 선별하는 과정으로 취득될 수 있다. 분화 유도된 세포는 치조골 세포에 노출시켜 치조골 세포로 분화하게 된다. 그 외에도 피부 유래 전구세포는 성체 조직으로부터 취득될 수 있는데, 이 경우에는 피부 조직을 추출, 배양하는 한편, 배양된 세포에서 피부 유래 전구세포를 선별하는 방법을 통하여 전구세포를 얻을 수 있다. 상기와 같은 방법들은 피부 유래 전구세포를 취득하는 예시에 불과하며, 따라서 상기 예들에 의하여 전구세포의 취득 방법이 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 본 발명은, 미니돼지의 이첨부 피부 조직으로부터, 부착성을 갖는 세포를 선별, 계대 배양하여 피부 유래 전구세포를 취득하였다.

[0015] 분화란 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 구조나 기능이 특정 형태로 결정되는 현상으로서, 하나의 개체에서 각 기능이 다른 세포, 조직의 역할을 수행하기 위하여 기능적, 형태적 특이성을 확립해가는 현상을 의미하며, 탈분화란 비-줄기세포가 다른 형태의 세포로 변화하거나 또는 이미 분화된 줄기세포가 그의 결정된 분화 방향과 다른 방향으로 분화를 진행하는 생물학적 현상을 의미한다. 탈분화는 생물학자이자 생화학자인 데이비스 토쉬(David Tosh)에 의해 제창된 이론으로, 이러한 탈분화는 특정 형태로 분화된 세포 형태(type)가 다른 형태로 역행할 수 없는 기존의 이론에 배치되는 양상으로 진행되며, 줄기 세포의 상호전환 (interconversion)을 포함한 세포 운명의 변화를 포함하는 형태의 변질형성 (type of metaplasia) 과정이다. 치조골은 일반적인 분화 과정에 의해 줄기세포가 중배엽성으로 분화하고, 나아가 골 세포로 분화하는 것으로부터 형성될 수도 있으나, 바람직하게 본 발명의 치조골은 외배엽성 줄기세포, 더욱 바람직하게는 피부 유래 전구세포의 탈분화에 의해 형성된다.

[0016] 본 발명에서 사용된 용어 "치조골(alveolar bone)"은 치아를 감싸고 있는 뼈를 총칭하는 용어로서, 치아를 지지해 주어 치아가 음식을 씹을 수 있도록 해주는 기능을 수행한다. 치조골은 개체 내의 다른 뼈 조직과는 다르게 치아를 상실하게 되면 같이 소실되며, 치주염과 같은 잇몸 질환이 있는 경우에도 소실되어 버리는 특징이 있다. 본 발명의 의한 피부 유래 전구세포를 포함하는 조성물은 이를 개체의 치조골에 노출시키거나, 치조골에 이식하는 경우, 해당 조직의 재생을 도움으로써, 임플란트 및 치주염 등 치조골 조직이 필요한 치과 시술에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0017] 본 발명에 따른 조성물에 포함된 피부 유래 전구 세포주는 치조골의 재구성 또는 재생을 필요로 하는 개체 내에서 조직의 재구성 또는 재생을 위해 사용될 수 있는데, 상기 전구 세포들은 이들이 의도된 조직 부위로 이식되어 기능적으로 결핍된 영역을 재구성하거나 재생시키는 방식으로 투여된다. 바람직하게 본 발명의 피부 유래 전구세포는 치조골 세포와 접촉하거나 치조골에 이식됨으로써 치조골 세포로 분화하여 치조골 조직 재생을 유도하게 된다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 피부 유래 전구세포를 포함하는 치조골 재생용 조성물을 미니돼지에 이식하고, 이식 2주 후, 실험 동물을 희생하여 골 형성 정도를 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색과 오스테오칼신 (osteocalcin, OC) 면역조직화학 염색 (immunohistochemical staining)으로, 피부 유래 전구세포로부터 치조골이 형성되었음을 확인하였다.

- [0018] 추가적인 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은, 이식부위 내의 효과적인 적용이 가능하도록 하기 위하여 의약학적으로 허용가능한 첨가물을 추가적으로 포함할 수 있다. 이러한 첨가물은 이식되는 전구세포가 이식된 조직 내에서 일정한 부피를 유지하면서 일차적 안정성을 향상시키는 일종의 스캐폴드(scaffold) 역할을 하는 것으로, 본 연구서는 탈회골(demineralized bone) 과 피브린 글루(fibrin glue)를 혼합하여 스캐폴드(scaffold)로 사용하였으나 본 발명의 첨가제가상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 또 하나의 양태로서 본 발명은, (a) 개체로부터 전층의 피부를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 피부를 배양하는 단계; (c) 배양된 세포에서 피부 유래 전구세포를 선별하는 단계; 및 (d) 선별된 피부 유래 전구세포를 치조골 세포에 노출시키는 단계를 포함하는 치조골 재생 방법에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 개체로부터 피부 유래 전구세포를 분리 및 선별하는 방법으로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 줄기 세포의 분리 및 선별 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 피부 조직으로부터 전구세포를 분리하는 방법은 개체의 피부 조직을 소독 및 세척하여 분리시킨 뒤, 피부 조직을 추출하고 필요에 따라 지방조직을 제거하는 방법으로 수행될 수 있으며, 줄기세포를 선별하는 방법으로는 피부 줄기 세포로 규정할 수 있는 특이적인 표식 인자의 발현을 확인하는 방법, 유세포 분석법으로 분석하는 방법 및 배양 배지에 부착성을 갖는 세포를 선별함으로써 피부 줄기세포를 분리하는 등의 방법 등이 있으나, 상기 예에 의해 분리 방법이 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 실험 동물을 전신마취 한 후, 소독한 뒤 이첨부를 완전히 절제하여 표피(epidermis), 진피(dermis), 모낭, 피지샘 및 땀샘등이 모두 포함된 전층의 피부를 분리하였고, 이를 배양 배지에 키워 부착성을 갖는 세포를 선별한 뒤, 선별된 세포를 계대 배양함으로써 피부 유래 줄기세포를 수득하였으며, 수득된 세포에서 초기 전사인자인 Oct-4 (octamer-4), Sox-2 ((sex determining region Y)-box 2), 및 Nanog(homeobox protein nanog) 유전자의 발현을 관찰함으로써, 본 연구에서 배양한 세포가 원시적 다분화 능력을 갖춘 피부 유래 전구세포임을 확인하였다.
- [0021] 선별된 피부 조직을 치조골 세포에 노출시키는 단계는 타 조직으로 분화하게 하기 위하여 당업계에서 통상적으로 사용하는 줄기세포의 노출방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 피부 유래 전구세포는 개체로부터 분리된 치조골 세포와 혼합되는 방법으로 치조골 세포에 노출될 수 있으며, 이때에는 치조골 세포의 성장 조건에 부합하는 배지 조성을 제공해야 한다. 다른 방법으로는 치조골 세포가 포함되는 기관에 직접 이식하는 방법을 들 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 시험관 내(in vitro)의 골 형성을 확인하기 위하여 3 번째 계대 배양된 SKPs를 골 형성 유도 배지로 교체하여 배양함으로써, 골 세포로 분화함을 확인하였고, 생체 내(in vivo)의 치조골 형성을 확인하기 위하여 배양된 피부 유래 전구세포를 개체의 치조골에 직접 이식함으로써 해당 피부 유래 전구세포가 치조골 세포로 분화됨을 관찰하였다. 분화 후, 치조골 세포로 정상 분화되었음을 오스테오칼신 (osteocalcin, OC) 또는 오스테오넥틴 (osteonectin, ON)을 통해 확인하였다.

효 과

- [0022] 자가 피부유래 전구세포를 이용한 상악동저 거상술은 신생골 형성에 상당히 유용한 방법으로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 잔존골 부족으로 임플란트 시술에 장애를 받는 환자들에게 보다 쉽게 골형성을 유도함으로써, 환자에게 침습적인 골이식 과정을 생략하여 신체적, 정신적 및 경제적 고통을 줄일 수 있는 방법을 제공한다. 나아가 상기 자가 피부 유래 전구세포를 이용하는 경우, 향후 골이식술이 필요한 신체 어느 곳에서라도 침습적인 골이식술의 대체방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0023] 실시예1: 실험 동물군의 선정
- [0024] 본 연구를 위하여 체중 25kg 내외의 생후 6개월에서 1년 사이의 미니돼지를 이용하였다. 초기 실험을 위하여 실험군 및 대조군의 두 마리의 동물이 사용되었다. 모든 실험연구는 동물실험 윤리기준을 준수하면서 이루어졌다.
- [0025] 실시예2: 미니돼지의 이부에서 피부유래 전구세포의 추출
- [0026] 실험동물은 4mg/kg의 azaperone (Stresnil[®], Janssen-Cilag, Belgium)을 근육 주사하여 진정시켰으며, 이후 10mg/kg의 tiletamine-zolazepam(Zoletil[®], Virbac, France)을 정맥 내 주사하여 전신마취하였다. 미니돼지의 한쪽 이부에 베타딘 (betadine) 액으로 소독하였고, 1:1,000,000 에피네프린에 2% 리도카인 (lidocaine HCL with 1:1000,000 epinephrine)을 피하주사 한 후 이첨부를 완전히 절제하였다(도 1a). 공여부 상처는 전기소작

기로 지혈한 후 3-0 나일론(Nylon)으로 일차 봉합하였다.

[0027] 실험실에서 채취한 이첨부 조직에 제모를 시행한 후 100 U/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 함유된 소독된 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Invitrogen, MD, USA)로 수 차례 세척한다. 채취한 조직에서 표피(epidermis) 및 진피(dermis)와 모낭, 피지샘 및 땀샘 등이 포함된 전층의 피부를 분리한다. 분리된 전층 피부를 약 1 - 3 mm²의 조각으로 분리하여 10% FBS(fetal bovine serum; Invitrogen), 10 ng/ml EGF(endothelial growth factor; Sigma, MO, USA), 10 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor; Sigma), 100 U/ml 페니실린(penicillin; Sigma), 그리고 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin; Sigma)와 0.25 µg/ml 암포테리신 B(Amphotericin B; Invitrogen)을 첨가한 2 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/F12 (Invitrogen) 배지가 함유된 35mm 또는 60mm 크기의 조직 배양판(tissue culture plates, Nunc, Denmark)에 넣고 38.5°C, 5% CO₂와 습한(humidity) 조건에서 조직 배양을 실시하였다(도 1). 일차배양 2일 후 피부조직에서 탈락된 세포가 배지에 부착된 것을 확인하고 남은 피부 조직은 포셉(forceps)으로 제거하였다. 이 시기에는 배지를 하루에 한 번씩 교체하였고, 피부절편을 제거한 후에는 1주일에 2번씩 배지를 교체하였으며, 융합 세포(confluent cells)는 0.25% EDTA(trypsin-etylenediaminetetraacetic acid; Invitrogen)으로 처리한 후 계대배양(subculture)하였다.

[0028] 약 3주간 배양시켜 균일한 모양의 피부 유래 전구세포를 획득하고, 획득한 세포는 RT-PCR을 통하여 초기전사인자인 Oct-4, Sox-2 및 Nanog의 발현을 확인하여 원시적이고 다기능 및 다분화 능력을 가진 줄기세포 및 전구세포임을 확인하였다. 실험에 사용된 프라이머는 실시예 5에 나타난 바와 같다.

[0029] 실시예3: 시험관 내 골 형성(osteogenic) 및 지방 조직 생성(adipogenic) 분화

[0030] 골 형성 유도를 위하여 3번째 계대 배양된 SKPs가 약 70% 정도 되었을 때, 배양된 배지를 골형성 유도 배지(10nM 덱타메타손(dexamethasone)이 첨가된 DMEM 배지, 10mM β-글리세로인산 나트륨(sodium β-glycerophosphate), 및 50 µM 아스코르브산(ascorbic acid))으로 교체하였다.

[0031] 지방조직 생성 유도를 위하여, 3번째 계대배양된 SKPs가 약 70% 정도 되었을 때, 배양된 배지를 지방 생성 유도 배지(10nM 덱타메타손(dexamethasone)이 첨가된 DMEM 배지, 0.5mM 인도메타신(indomethacin), 5 µg/ml 인슐린, 100 mM 3-소듐 이소부틸-1-메틸잔틴(3-sodium isobutyl-1-methylxanthin), 및 10% FBS)로 교체하였다.

[0032] 상기 배양된 양 배지는 3주간 두 번 교체하였고, 분화된 세포의 존재를 확인하기 위하여 조직화학염색(histochemical staining) 및 RT-PCR를 수행하였다.

[0033] 실시예4: 분화된 세포의 면역화학 염색

[0034] 골 노듈 형성(bone nodule formation) 분석을 위하여, 광물화 기질(mineralized matrix)을 폰 코사(von Kossa) 염색을 사용하여 측정하였다. 골 형성 유도 3주 후에, 배양된 세포는 PBS로 세척하였고, 30분간 실온에서 4% 중성 완충 포르말데하이드(neutral buffered formaldehyde)에 고정시켰다. 증류수로 세척한 후, 세포는 5% 질산은 용액 (silver nitrate solution, Sigma)으로 처리하였고, 암실에서 1시간 동안 보관하였다. 증류수를 사용하여 과량의 질산은 용액을 완전하게 세척하고, 발색을 위하여 배양판에 탄소 나트륨(sodium carbonate)/포르말데하이드 용액(formaldehyde solution)으로 처리하였다. 남아있는 질산은은 5% 티오황산나트륨(sodium thiosulfate)으로 중화시켰다. 세포 핵(cell nucleus)을 5분간 헤마토실린(hematoxylin) 용액으로 염색시켰다.

[0035] 지방 생성 유도 배지의 유지질 노듈(lipoid nodules)은 오일-레드 0 염색에 의하여 측정되었다. 지방 생성 유도 3주 후, 배양된 세포는 PBS로 세척한 뒤, 30분간 4% 중성 완충 포르말데하이드(neutral buffered formaldehyde)에 고정시켰다. 오일-레드 0 반응 용액은 6 ml 스톡 오일-레드(Sigma) 대 4 ml 증류수(double distilled water, ddH₂O 또는 Bidest. water라고도 호칭됨)를 첨가하여 제조하였다. 증류수로 세척한 후, 세포를 오일-레드 0 염색으로 처리하였고, 1시간 동안 실온에서 보관하였다. 과량 염색을 제거하기 위하여 증류수로 세포를 수 회 세척하였고, 공기-건조를 이용하여 배양판을 건조시켰다.

[0036] 실시예5: RNA 추출 및 RT-PCR 분석

[0037] 배양된 SKPs를 3번째 계대 배양 후에 배양판으로부터 떼어내어, RT-PCR을 이용하여 동정된 피부-유래 세포의 줄기 세포 특성을 확인하기 위하여 Oct-4, Nanog, 및 Sox-2와 같은 특정 전사 인자의 발현을 분석하였다. 전체 RNA를 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 배양된 세포로부터 추출하였으며, 올리고-dT 프라이머(oligo-dT primer)로 Omniscript Reverse Transcription Kit(Qiagen)을 이용하여 55°C에서 30분 동안 cDNA를 합성하였다. PCR 증폭을 위해 주형으로 cDNA를 사용하였고, Maxime PCR Premis(iNtRON

Biotechnology, Korea)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

- [0038] Oct-4, Nanog, 및 Sox-2의 전사 유전자가 조사되었다. RNA 추출 및 RT-PCR 조건에 있어서 내부 대조군으로 GAPDH를 사용하였고, 사용된 프라이머는 다음과 같다.
- [0039] Oct-4의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (335 bp):
- [0040] F: 5'-AGGTGTTTCAGCCAAACGAACC-3' (서열번호 1)
- [0041] R: 5'-TGATCGTTTGCCCTTCTGGC-3' (서열번호 2)
- [0042] Nanog의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (438 bp):
- [0043] F: 5'-ATCCAGCTTGTCCTCCCAAAG-3' (서열번호 3)
- [0044] R: 5'-ATTTCATTCGCTGGTCTGG-3' (서열번호 4)
- [0045] Sox-2의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (443 bp):
- [0046] F: 5'-GCCTGGGCGCCGAGTGA-3' (서열번호 5)
- [0047] R: 5'-GGGCGAGCCGTTTCATGTAGGCTG-3' (서열번호 6)
- [0048] 오스테오칼신(osteocalcin) 및 오스테오넥틴(osteonectin)의 유전자 발현을 이용하여 골 형성 분화를 확인하였고, PPAR γ 2(peroxisome proliferators activated receptor gamma 2) 및 aP2(adipocyte fatty acid-binding protein)의 유전자 발현을 이용하여 지방 생성 분화를 확인하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다.
- [0049] 오스테오칼신의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (205 bp):
- [0050] F: 5'-CTGGACCAACATCTTGAGCA-3' (서열번호 7)
- [0051] R: 5'-ACCCCTTTGGTGGTGTGTA-3' (서열번호 8)
- [0052] 오스테오넥틴의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (189 bp):
- [0053] F: 5'-TCCGGATCTTTCCTTGCTTTCTA-3' (서열번호 9)
- [0054] R: 5'-CCTTCACATCGTGGCAAGAGTTTG-3' (서열번호 10)
- [0055] PPAR γ 2의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (229 bp):
- [0056] F: 5'-ATGGTGACTTGGGAAATGGA-3' (서열번호 11)
- [0057] R: 5'-ATAATGGTTTGCTGCCATC-3' (서열번호 12)
- [0058] aP2의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (192 bp):
- [0059] F: 5'-AACCCAACCTGATCATCACTG-3' (서열번호 13)
- [0060] R: 5'-TCTTTCCATCCCACTTCTGC-3' (서열번호 14)
- [0061] 내부 대조군으로 선택된 GAPDH의 프라이머는 다음과 같다.
- [0062] GAPDH의 정방향 프라이머(F) 및 역방향 프라이머(R) (230 bp):
- [0063] F: 5'-GGGCATGAACCATGAGAAGT-3' (서열번호 15)
- [0064] R: 5'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3' (서열번호 16)
- [0065] 95℃에서 3분간 변성(denaturation), 60℃에서 30초간 어닐링(annealing), 및 72℃에서 45초간 합성과정을 거쳤고, 마지막은 72℃에서 10분간 신장시킴으로써 PCR을 35회 내지 40회 수행하였다. 1 μ g/ μ l EtBr(ethidium bromide)이 첨가된 1% 아가로스겔에 전기 영동함으로써 PCR 생성물을 분리하였고, 자외선을 조사하여 관찰하였다.
- [0066] 실시예6: 자가 피부유래 전구세포를 이용한 상악동저 거상술
- [0067] 실험동물을 전신마취시킨 후, 실험군 미니돼지 2 두에서 이첨부 피부를 채취하여 자가 피부유래 전구세포로 3주간 분화 유도하였다. 분화된 전구세포가 1×10^7 cells/100 μ l 이상 도달 하면, 미니돼지를 다시 전신마취 후

구의 접근법으로 상악동 전벽을 노출시켰다. 수술용 전기드릴(drill)을 이용하여 약 1cm 직경의 측방 골창을 상악동 전벽에 형성시켰다. 이 골창을 통하여 상악동 점막을 거상하고, 상악동 점막과 상악동 측벽에 충분한 공간을 형성시켰다(도 3a).

- [0068] 1×10^7 cells/100 μ l의 자가 피부유래 전구세포(autogenous skin-derived precursor cells)에 0.1 cc의 탈회골(demineralized bone) (Grafton[®], OsteotechTM, NJ, USA) 및 0.2 ml의 피브린 글루(fibrin glue)(Greenplast[®] kit, Green Cross, Korea)를 혼합한 것을 골격(scaffold)으로 하여 상악동 점막과 측벽 사이의 공간에 이식하였다.
- [0069] 대조군 2두에서는 같은 방법으로 상악동 점막을 거상하고 상악동 측벽과 점막 사이의 공간에 피부유래 전구세포를 제외한 탈회골(demineralized bone) 및 피브린 글루의 골격만을 이식하였다.
- [0070] 골 형성(osteogenesis) 및 지방 조직 생성(adipogenesis)은 탈분화 3주 후 각각, 양성 폰코사(von Kossa) 및 오일-레드 0 염색(Oil-red 0)을 수행함으로써 확인하였다. 또한 골 형성 분화 배지에서의 오스테오칼신(osteocalcin) 및 오스테오넥틴(osteonectin)의 발현 및 지방 조직 생성 분화 배지에서의 PPAR γ 2 및 aP2의 발현이 RT-PCR에 의하여 확인되었다. 이식 수행 2주 후, 실험군과 대조군의 실험동물을 희생하여 조직표본을 채위한 후 골형성 정도를 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색과 오스테오칼신(osteocalcin)에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 관찰하였다.
- [0071] 실험군에서는 새롭게 형성된 해면골(trabecular bones)이 이식물질 주변에 형성된 것이 관찰되었고, 새로운 골은 주변(periphery)으로부터 이식된 물질의 중앙 부분으로 성장하는 것을 확인하였다. 그러나 대조군은 새로운 해면골이 이 거의 관찰되지 않았으며 이러한 결과는 SKPs가 초기의 전분화능(pluripotency) 및 다분화능(multi-lineage differentiation)의 능력을 가진다는 것을 보여주는 결과로 해석된다.

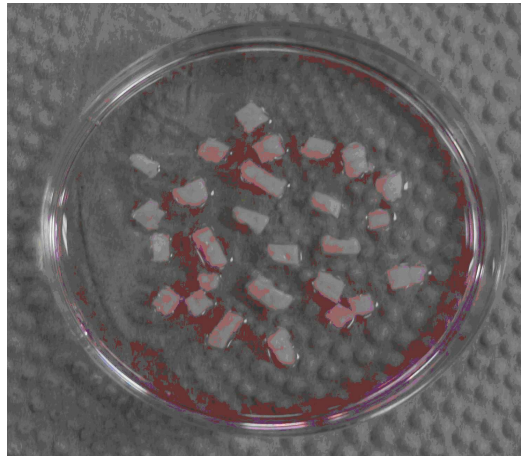
도면의 간단한 설명

- [0072] 도 1은 피부유래 전구세포를 배양하는 과정을 나타낸 것으로써, 채취한 미니돼지의 이첨부에서 전층의 피부조직을 분리한 후 1 - 3mm의 크기로 잘라 일차 배양판에서 배양하는 모습을 나타내었다.
- [0073] 도 2는 피부 유래 세포의 배양 모습을 나타낸 사진이다. 도 2a 및 도 2b는 일차 배양판에서 약 1주간 일차배양 후의 모습으로 초기 피부 유래 세포들이 상당히 다양한 모습으로 관찰되며 세포 군락(colony)을 형성한 소견이 관찰된다(화살표). 도 2c는 피부 유래 세포를 약 3주간 2-3차 계대 배양한 후, 안정적이고 균일한 모양의 세포가 관찰되며, 도 2d는 상기 세포들에서 RT-PCR을 수행하여 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, 및 Sox-2이 발현됨을 확인한 사진이다.
- [0074] 도 3은 SKPs의 골 형성 및 지방 생성 탈분화 3주 후의 모습을 나타낸 그림이다. 도 3a는 폰 코사 염색을 통해 골 분화된 세포에서 양성의 검은 골회질(bone minerals)이 관찰된다. 도 3b는 오일-레드 0 염색을 통하여 지방 생성 분화된 세포에서 양성의 붉은 유지질 조직(lipoid tissues)이 관찰된다. 도 3c는 골 기질 단백질의 발현을 관찰한 것으로써, RT-PCR을 통하여 확인되는 골 형성 분화된 세포에서 관찰되는 오스테오칼신(osteocalcin, OC) 및 오스테오넥틴(osteonectin, ON)이 관찰된다. 도 3d PPAR γ 2(Peroxisome proliferators activated receptor gamma 2) 및 aP2(adipocyte fatty acid-binding protein)가 RT-PCR을 통하여 지방 생성 분화된 세포에서 발현되는 것을 관찰한 그림이다.
- [0075] 도 4는 자가 피부 유래 전구세포를 이용한 상악동저 거상술을 나타내었다. 도 4a는 미니돼지의 구의 접근법으로 상악동 전벽을 노출하고, 약 1cm 직경의 골창을 형성 후 상악동 점막을 거상한 모습이다. 도 4b는 이식 2주 후 실험동물을 희생하고 이식 조직을 채취한 모습이며, 상악동 점막과 하방으로 이식조직이 잘 유지되고 있는 것을 확인할 수 있다. 도 4c는 피부 유래 전구세포를 이식하지 않은 대조군의 이식 2주 후 조직 절편의 H&E 염색결과를 나타낸 그림이다. 염색 결과, 신생골 형성이 잘 관찰되지 않으며, 상악동 전벽에 형성된 골창 부분이 관찰된다(화살표). 도 4d는 대조군 조직을 확대한 사진으로 아직 흡수되지 않은 탈회골(demineralized bone)은 관찰되나(화살표), 이식편 주변으로 뚜렷한 신생골 형성은 관찰되지 않는다. 도 4e는 자가유래 전구세포를 이식한 실험군의 이식 2주 후 조직을 나타낸 것으로, 이식편이 구 모양으로 잘 형성되어 있고, 이식편 내부에 아직 흡수되지 않은 탈회골이 관찰됨을 알 수 있다. 도 4f는 도 4e를 확대하여 나타낸 것으로 도 4e에서 H&E 염색으로 확인되는 활발한 신생골소주가 구체적으로 이식편 주변에서 내부로 자라 들어가는 모습을 확인할 수 있다. 도 4g는 자가 피부유래 전구세포를 이식한 조직의 신생골소주에서 오스테오칼신(osteocalcin) 발현을 관찰 할 수 있다. 하부의 기저골(화살표 머리) 상방으로 새로 형성된 골소주(화살표)의 강한 발현을 관찰 할

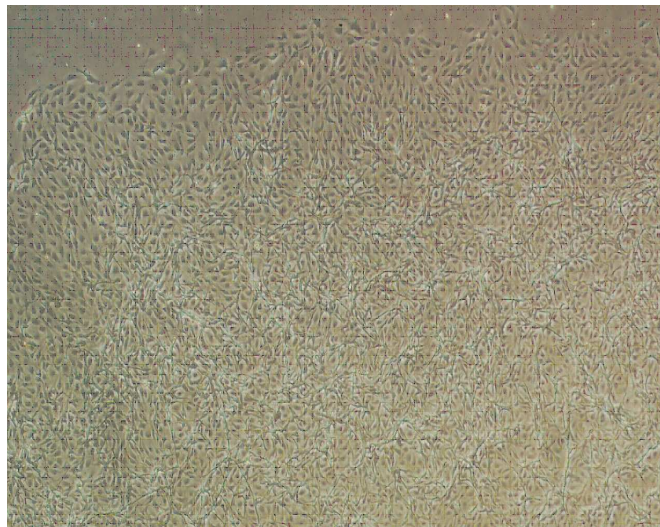
수 있다.

도면

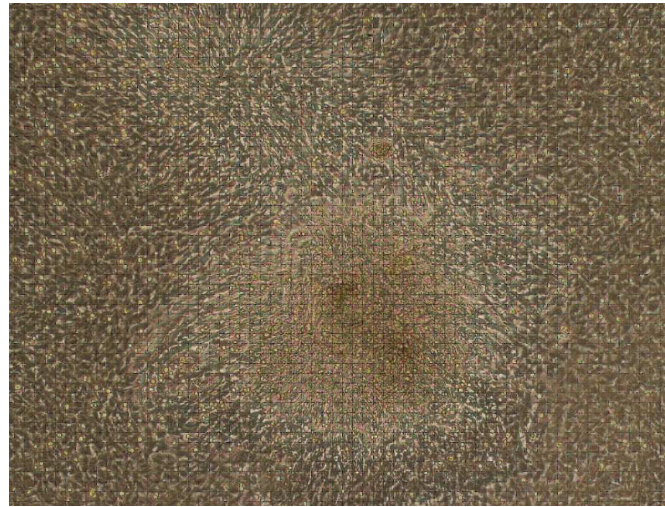
도면1



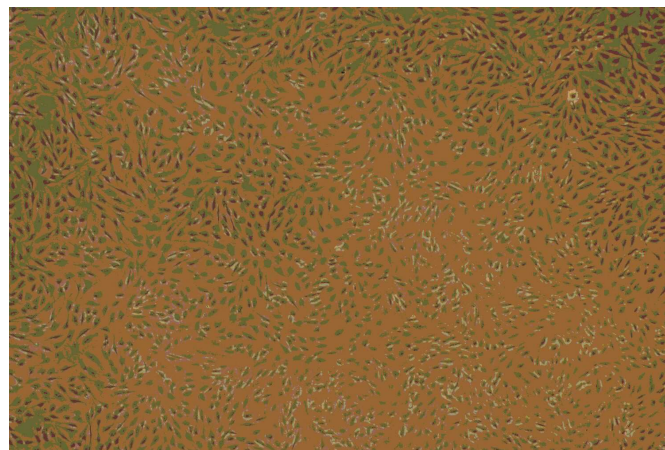
도면2a



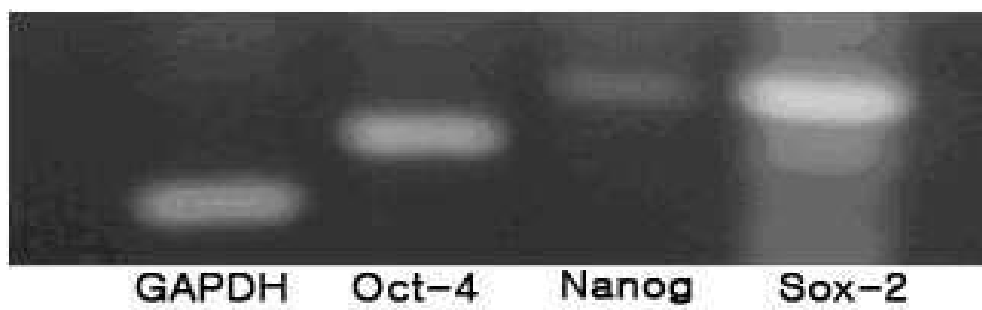
도면2b



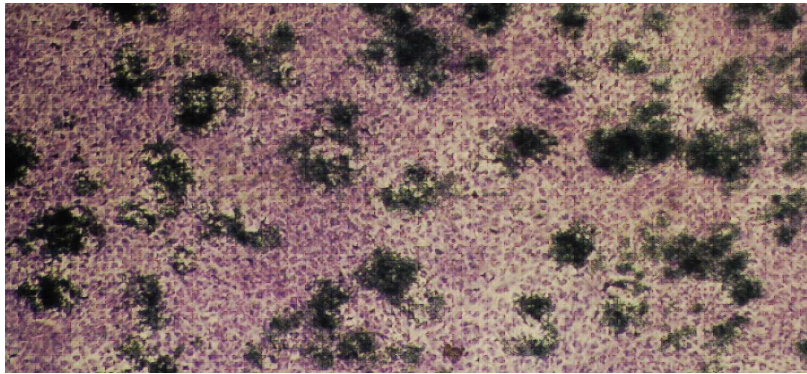
도면2c



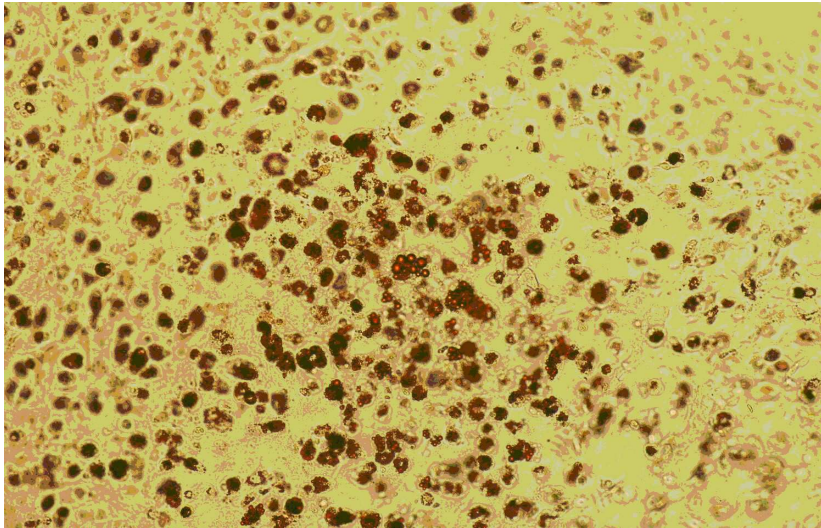
도면2d



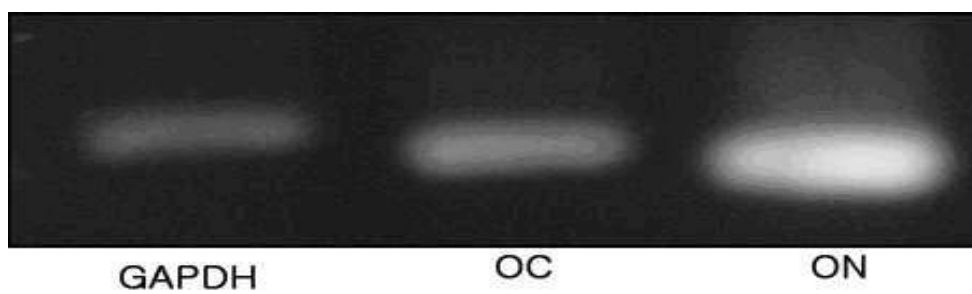
도면3a



도면3b



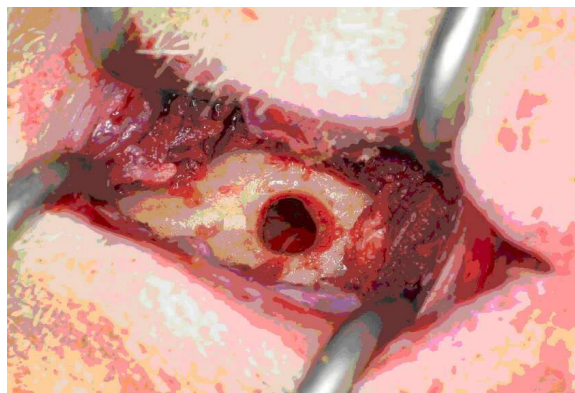
도면3c



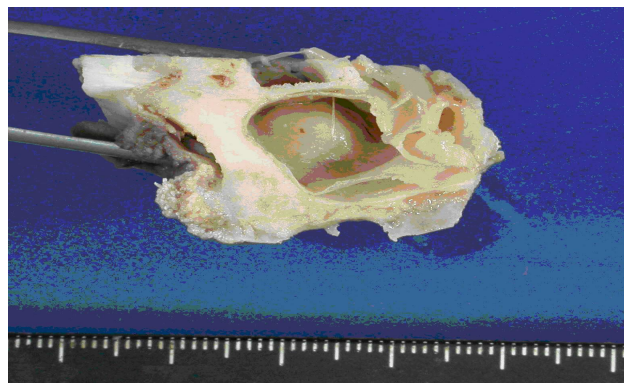
도면3d



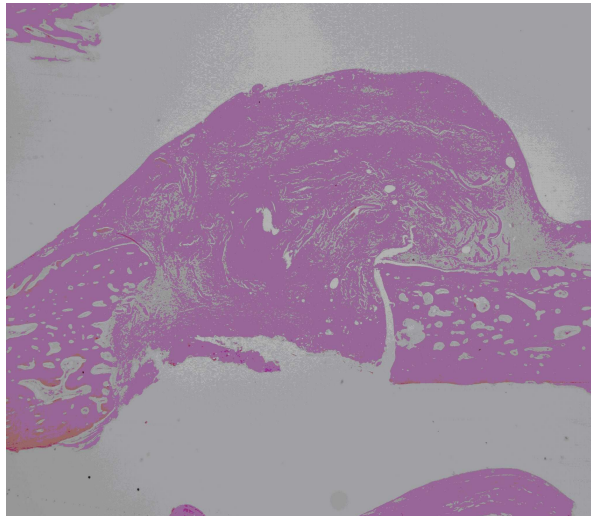
도면4a



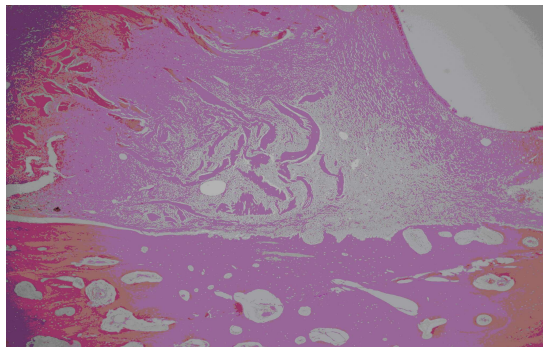
도면4b



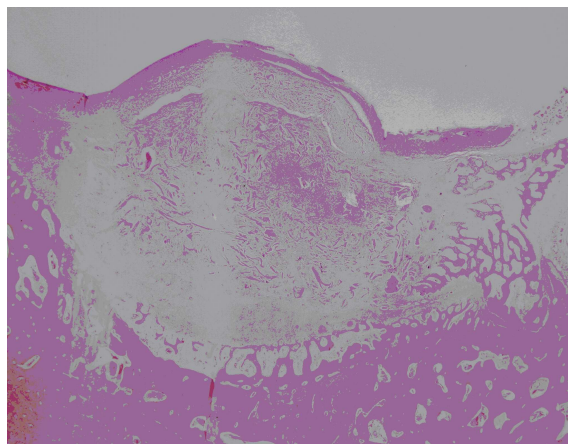
도면4c



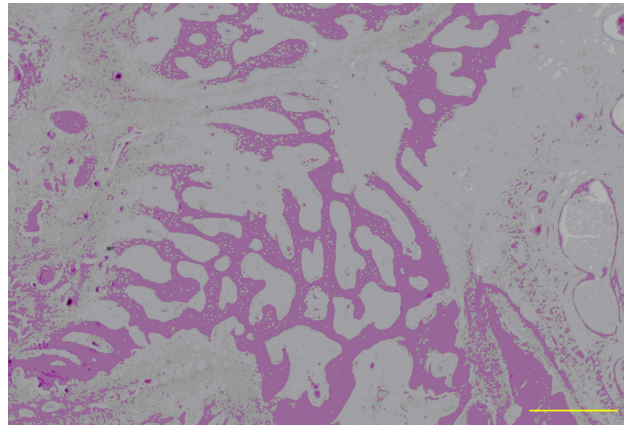
도면4d



도면4e



도면4f



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> THE COMPOSITION FOR ALVEOLA BONE REGENERATION INCLUDING
 SKIN-DERIVED PRECURSOR CELLS AND METHOD FOR PRODUCING THEREOF

<130> PA080352KR

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for Oct-4

<400> 1

aggtgttcag ccaaacgaac c

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for Oct-4

<400> 2

tgatcgtttg cccttctggc

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for Nanog

<400> 3

atccagcttg tccccaaag

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for Nanog

<400> 4

atttcattcg ctggttctgg

20

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for Sox-2

<400> 5

gcctgggcgc cgagtgga

18

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for Sox-2

<400> 6
 gggcgagccg ttcatgtagg tctg 24

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for osteocalcin

<400> 7
 ctggaccaac atcttgagca 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for osteocalcin

<400> 8
 acccctttgg tgggttgta 20

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for osteonectin

<400> 9
tccggatctt tcctttgctt tcta 24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for osteonectin

<400> 10
ccttcacatc gtggcaagag ttg 24

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for PPARgamma2

<400> 11
atggtgactt gggaaatgga 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for PPARgamma2

<400> 12
ataatggttt gctgcccatc 20

<210> 13

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for aP2

<400> 13
 aaccaaacct gatcatcact g 21

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for aP2

<400> 14
 tctttccatc ccacttctgc 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for GAPDH

<400> 15
 gggcatgaac catgagaagt 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for GAPDH

<400> 16
aagcagggat gatgttctgg

20