



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월08일
(11) 등록번호 10-1816246
(24) 등록일자 2018년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
C12N 5/0662 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0115081
(22) 출원일자 2016년09월07일
심사청구일자 2016년09월07일
(56) 선행기술조사문헌
US20100278790 A1
KR1020080063406 A*
KR1020130111448 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에스씨엠생명과학 주식회사
인천광역시 중구 서해대로 366, 310호(신흥동3가, 정석빌딩)
(72) 발명자
송순욱
인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 80, 107동 1604호(송도동, 송도 푸르지오 하버뷰)
이택기
경기도 양주시 고읍로 36-10, 102동 1301호(고읍동, 산내들마을우남퍼스트빌아파트)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

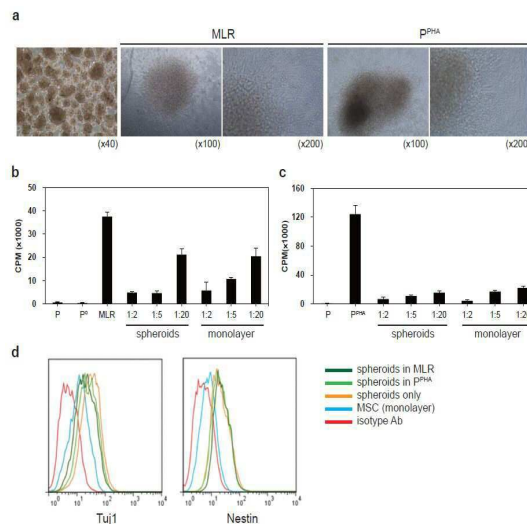
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **염증 자극된 중간엽 줄기세포를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 중간엽 줄기세포 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 염증 자극된 중간엽 줄기세포는 아세틸콜린을 분비하는 효과가 있어, 부작용이 알려진 기존의 면역억제제 및 염증억제제를 대체할 수 있고, 경제적으로 사용될 수 있는 세포치료제로서 면역질환 및 염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 2501/20 (2013.01)

C12N 2501/40 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중간엽 줄기세포에 염증 자극을 가하여 배양하는 단계; 를 포함하고,

상기 염증 자극은 공배양된 복수 공여자의 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)와 중간엽 줄기세포를 함께 배양하여 이루어지는 것 또는 식물성 응집소(phytohemagglutinin, PHA)가 처리된 공여자의 PBMC와 중간엽 줄기세포를 함께 배양하여 이루어지는 것을 특징으로 하는,

아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 층분리배양법(Subfractionation Culturing Method)으로 분리된 것을 특징으로 하는, 아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD49f, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-class I(HLA-I) 및 Oct4를 발현하는 것을 특징으로 하는, 아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아세틸콜린은 면역세포의 니코틴 콜린성 수용체에 결합하는 것을 특징으로 하는, 아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포는 비-접촉성 자극에 의해 표현형의 변화가 유도된 것을 특징으로 하는, 아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포의 제조 방법.

청구항 6

제1항의 제조방법으로 제조된 아세틸콜린 분비능이 증대되고 콜린성 뉴런-유사 표현형을 나타내는 중간엽 줄기세포를 포함하는, 면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증, 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 및 폐양성 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 중간엽 줄기세포 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뼈 안의 부드러운 물질인 골수는 새로운 혈액 세포에서 생산되는 활성 조직이며, 적어도 두가지 타입의 줄기세포를 포함한다. 조혈모 줄기세포 (Hematopoietic stem cells, HSCs)는 자가-갱신 줄기세포로서 모든 혈액 계대에서 생산된다. 상기 조혈모 줄기세포와는 달리, 비조혈 유래의 희귀한 줄기세포는 조혈작용(hematopoiesis)을 위한 지지적 기질 구조를 공급 및 구성한다. 이는 중간엽 계대의 체세포로 분화될 수 있다. 조혈 작용을 돕는 비-조혈 줄기세포는 골수 기질 세포 또는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)로 정의된다. 중간엽 줄기세포는 다양한 성인 조직으로부터 분리되었으며, 중간엽 세포 타입뿐만 아니라 신경세포와 같은 비 중간엽 줄기세포 타입으로도 분화되는 것으로 알려져 있다. 중간엽 줄기세포는 본래 다능성을 갖고 있지만, 분화 가능성의 관점에서는, in vivo상의 전환 분화(transdifferentiation)를 위한 불확실한 능력은 임상적 적용에 대해 제한되어 사용할 가능성이 있다.

[0003] 현재까지 많은 화합물 면역억제제 또는 항염증제가 개발되어 있고, 임상적으로 가장 흔히 사용되는 면역억제제로는 사이클로스포린 (cyclosporine, Neoral, Cipol A), 아자치오프린(imuran), 프레드니솔론(일종의 스테로이드)이 있다. 상기 면역억제제는 항원자극에서 항체생성에 이르는 과정 중 대식세포에 의한 항원의 탐식, 림프구 등에 의한 항원 인식, 세포 분열, T세포와 B세포의 분열, 항체 생성 등 몇 가지 과정을 저해시킴으로써 면역 억제를 야기한다. 대부분 항종양 활성을 가지고 있는데, 그 이유는 DNA 장애, DNA 합성 저지 등을 매개로 하여 세포 분열을 저지하기 때문이다. 그러나 이에 따른 대표적인 부작용으로 고혈압과 신독성(콩팥기능이 저하됨)이 있으며 이 부작용의 발생률이 높기 때문에 사용할 때 충분히 경과를 관찰해야 하는 등의 문제가 있어 왔다. 그 외 부작용으로 드물게 떨림, 발작, 간염, 담액 저류, 혈중 노산증가, 근육기력 저하, 조모증 (hypertrichosis), 치은 비대(gingival hypertrophy)등이 있다. 흔히 쓰이는 억제제 중 아자치오프린은 백혈구수치의 감소, 빈혈, 혈소판 감소 등 골수 기능을 억제하기도 하며 체장염, 간염, 담즙저류와 함께 드물게 탈모, 발열 등을 보이는 합병증이 있을 수 있다. 스테로이드 제제의 하나인 프레드니솔론은 면역 억제제 중 가장 먼저 사용되기 시작하였으나, 동맥 경화증을 촉진시킬 뿐 아니라 고혈압, 위궤양, 당뇨, 성장 저해, 골다공증, 백내장, 녹내장 등을 일으키므로 주의해야 할 약물이므로, 안전한 면역억제제 또는 항염증제의 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 중간엽 줄기세포를 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 조건 또는 식물성응집

소(phytohemagglutinin, PHA) 처리 조건에서 배양한 결과, 상기 배양을 통해 염증 자극을 받은 중간엽 줄기세포는 콜린성 뉴런-유사 표현형(cholinergic neuron-like phenotype)으로 변화하여, 신경 세포성(neuron-like)특성을 가지며, 아세틸콜린을 분비하여 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료에 용이하게 사용 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 중간엽 줄기세포 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에 염증 자극을 가하여 배양하는 단계;를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 중간엽 줄기세포 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 염증 자극된 중간엽 줄기세포는 아세틸콜린을 분비하는 효과가 있어, 부작용이 알려진 기존의 면역억제제 및 염증억제제를 대체할 수 있고, 경제적으로 사용될 수 있는 세포치료제로서 면역질환 및 염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1의 a는 본 발명의 MSCs가 섬유아세포-유사 형태를 갖는 것을 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 본 발명의 MSCs의 지방세포화(adipogenically), 연골분화(chondrogenically) 및 골 분화(osteogenically)로의 분화 잠재력을 확인한 결과를 나타낸 도이다. C는 본 발명의 MSCs의 양성 또는 음성 마커를 유세포 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2의 a는 PBMCs (P 또는 Po) 및 혼합림프구반응(MLR) 상에서 MSCs 유무에 따른 동종 항원성(alloantigenic) 면역 반응을 림프구 증식 및 활성을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 PBMCs (P), PHA(1 μ g/ml) 처리된 인간 PBMCs(P^{PHA})에 MSCs 공동 배양 유무에 따른 림프구 증식 및 활성 결과를 나타낸 도이다. c는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에서 MSCs를 공동 배양했을 때 비정상적인 형태학적 변화를 광학 현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. d 및 e는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 신경세포-유사 형태적 특징을 확인한 결과를 나타낸 도이다. f 및 g는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 신경교-유사 세포 클러스터(붉은 화살표)를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3의 a는 염증성 조건에 대한 MSCs에서 스펜지 개체 생성을 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 염증성 조건을 최소화하였을 때 MSCs의 스펜지 생성 여부 및 MSCs 특성 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4의 a는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여, nestin, Tuj1, MAP2, NF-M 및 GFAP의 발현을 확인한 도이다. b는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 nestin, Tuj1 및 GFAP의 유세포 분석 결과를 나타낸 도이다. c 및 d는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 면역형광 염색하여 nestin, Tuj1, NCAM1, GFAP 및 O4의 발현 정도를 확인한 도이다.

도 5의 a는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여, TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR} 발현을 확인한 도이다. b 및 c는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 qRT-PCR을 통하여 TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR} 발현을 확인한 도이다. d는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 웨스턴 블랏을 수행하여, TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR} 발현을 확인한 도이다. e 및 f는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후, 면역형광 염색을 수행하여 TrkA 발현 정도를 확인한 결과를 확인한 도이다.

도 6의 a는 MLR-활성화된 PBMCs를 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여, NGF 및 BDNF의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 MLR-활성화된 PBMCs에 qRT-PCR을 수행하여, NGF 및 BDNF의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. c는 PHA-활성화된 PBMCs를 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여, NGF 및 BDNF의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. d는 PHA-활성화된 PBMCs에 qRT-PCR을 수행하여, NGF 및 BDNF의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. e 내지 h는 ELISA를 수행하여 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs로부터 분리된 NGF 및 BDNF의 분비량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7의 a는 염증성 조건에 의한 MSCs의 스펜도이드 형성을 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 MSCs의 스펜도이드의 Tuj1, NF-M 및 MAP2의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8의 a는 염증성 조건에 의해 활성화된 PBMCs의 스펜도이드 형성을 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 혼합림프구반응(MLR) 조건에서, MSCs 스펜도이드 또는 MSCs 단일분자막의 비율(1:2, 1:5 및 1:20)에 따른 림프구 증식 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. c는 식물성혈구응집소(PHA) 조건에서, MSCs 스펜도이드 또는 MSCs 단일분자막의 비율(1:2, 1:5 및 1:20)에 따른 림프구 증식 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. d는 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 MSCs 스펜도이드의 Tuj1 및 nestin의 발현을 유세포분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9의 a는 아무것도 처리하지 않은 MSCs를 neurobasal medium 배지에 배양한 후 Tuj1, nestin, MBP 및 NF-M의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 혼합림프구반응(MLR) 조건의 MSCs를 neurobasal medium 배지에 배양한 후 Tuj1, nestin, MBP 및 NF-M의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10의 a는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 면역형광 염색하여 ChAT, TH 및 GABA의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 qRT-PCR을 수행하여 ChAT 발현 정도를 확인한 도이다. c는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 웨스턴 블랏을 수행하여 ChAT 발현 정도를 확인한 도이다. d는 MLR-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 면역형광 염색을 통하여 ChAT, NCAM1, MBP, Tuj1, NF-M, nestin, TrkA 및 GABA의 발현 정도를 나타낸 도이다. e는 MLR-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양한 후, PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여 아세틸콜린 분비를 확인한 결과를 나타낸 도이다. f는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs의 공동 배양한 후, PBMCs단독(P)군과 비교하여 아세틸콜린 분비를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11의 a는 일반 배양 또는 트랜스 웰 플레이트 배양과 비교하여, 염증성 조건에서 MSCs의 콜린성 뉴런-유사 표현형으로의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다. b는 조정배지(conditioned medium, CM) 조건에서 MSCs의 콜린성 뉴런-유사 표현형으로의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다. c는 b조건에서 ChAT, NCAM1, NF-M 및 Tuj1의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 12의 a는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 nAChR α3, nAChR α5, nAChR α7, nAChR α8, nAChR β2의 발현 정도를 확인한 결과이다. b는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여 qRT-PCR을 수행하여 nAChR α5 또는 nAChR α7의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다. d는 MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여, 웨스턴 블랏을 통해 nAChR α7의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 13는 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 PBMCs를 유세포 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 14의 a 내지 c는 α-BTX를 첨가한 배지에 MLR-활성화 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여 각 림프구 증식, TNF-α 및 IFN-γ 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다. d 내지 f는 α-BTX를 첨가한 배지에 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs 단독(P 및 Po)군과 비교하여 각 림프구 증식, TNF-α 및 IFN-γ 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다. g 내지 i는 ACh-CI를 첨가한 배지에 MLR-활성화 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여 각 림프구 증식, TNF-α 및 IFN-γ 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다. j 내지 l은 ACh-CI를 첨가한 배지에 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs단독(P 및 Po)군과 비교하여 각 림프구 증식, TNF-α 및 IFN-γ 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 15의 a 내지 d는 비특이적 콜린성 아고니스트인 카바콜(carbachol)을 배지에 첨가한 후, MLR-활성화 또는 PHA-활성화된 PBMCs에 MSCs를 공동 배양 후 PBMCs 단독(P 및 Po)군과 비교하여 각 림프구 증식, TNF-α 및 IFN-γ 결과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 16의 a는 CD3/CD28-활성화된 마우스 비장세포(2×10^5)와 MSCs(4×10^3 내지 4×10^4)을 1:5, 1:10, 1:20, 및 1:50의 비율로 배양 후, 림프구 증식 억제 결과를 확인한 도이다. b는 마우스의 비장세포 처리된 MSCs의 콜린성 신경세포 유사 표현형 변화 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다. c는 마우스의 비장세포 처리된 MSCs의 ChAT, NCAM1, Tuj1, NF-M, nestin, MBP 및 TH의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 17의 a는 CD3/CD28-활성화된 래트의 비장세포(2×10^5)와 MSCs(4×10^3 내지 4×10^4)을 1:5, 1:10 및 1:20의 비율로 배양 후, 림프구 증식 억제 결과를 확인한 도이다. b는 래트의 비장세포 처리된 MSCs의 콜린성 신경세포 유사 표현형 변화 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다. c는 마우스의 비장세포 처리된 MSCs의 ChAT, NCAM1, Tuj1, NF-M, nestin, TH 및 GABA의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 18의 a는 일시적인(transient) 인간화 GVHD 마우스 모델에 PBMCs 및 MSCs 접종하여 ChAT+ nestin+ 인간 세포를 확인 과정을 모식화한 도이다. b는 ChAT+ nestin+ 인간 세포를 확인하기 위하여, PBMCs(P1 또는 P2) 또는 혼합된 PBMCs (P1+P2) 주입 마우스에 인간 MSCs를 처리한 각 마우스에서 항-ChAT 및 항-nestin 항체의 발현 정도를 확인한 결과이다. c는 MSC 세포질 여부를 확인하기 위하여, PBMCs(P1 또는 P2) 또는 혼합된 PBMCs (P1+P2) 주입 마우스에 인간 MSCs를 처리한 각 마우스에 생체 적합한 실리카-코팅된 형광 나노입자를 주입한 결과를 나타낸 결과이다(화살표는 MSC 세포질을 나타냄).

도 19는 본 발명의 염증성 자극에 대한 MSCs의 콜린성 항-염증 메커니즘을 모식화한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 상기 중간엽 줄기세포는 층분리배양법(Subfractionation Culturing Method)으로 분리될 수 있고, 상기 방법으로 분리된 본 발명의 중간엽 줄기세포는 CD29, CD44, CD49f, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-class I (HLA-I) 및 Oct4를 발현할 수 있다.
- [0013] 본 발명에 있어서, "층분리배양법"은 개체로부터 골수를 채취하고 이를 배양한 후, 상기 배양 상층액만 새로운 용기로 이동시켜 배양하고, 상기 배양에서 생성되는 배양 상층액만 분리하여 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기에서 반복배양하는 단계를 거쳐 중간엽 줄기세포를 수득하는 방법을 의미하며, KR 10-0802011에 기재된 내용이 본 발명에 전체로서 참조될 수 있고, 바람직하게는 상기 문헌에 개시된 바에 따라 층분리배양법을 수행할 수 있다.
- [0014] 상기 염증 자극된 중간엽 줄기세포는 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 조건, 유사분열 촉진물질(mitogen) 처리 조건 및 사이토카인(Cytokine) 처리 조건으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 조건에서 배양하는 방법을 통해 염증 자극된 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 상기 유사분열 촉진물질은 식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA), 콘카나발린 A(Con A), PWM(pokeweed mitogen), 지질다당, 스트렙토리신S, 수은화합물 및 항림프구항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이고, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명에 있어서, "혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR)"은 세포성 면역기능을 시험관에서 측정하는 방법의 하나로 장기이식 시, 공여자와 수용자 사이의 조직적합성(histocompatibility)을 조사하기 위해 이용되는 시험법이다. 공여자와 수혜자의 림프구를 섞어서 세포배양을 했을 때 만일 양자의 조직적합성 항원이 서로 다르면 림프구는 분열을 시작한다. 분열했는지의 여부는 미리 배지에 가해 둔 3H 타이미딘이 DNA에 수용되었는지의 여부에 따라서 알 수 있다. 본 발명에 있어서, 혼합림프구반응은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것을 의미하며, 여기에 중간엽 줄기세포를 처리하여, 본 발명의 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 수득한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, "유사분열 촉진물질(mitogen)"은 세포분열을 유발하는 물질을 의미하며, 면역학적으로는 항원비특이적(다중클론성)으로 림프구를 유효화하여 분열을 유발시키는 것을 의미한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, "식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA)"은 식물 유래의 세포응집 활성(aggregation activity of cell)을 갖춘 렉틴[lectin(당결합단백질)]을 의미하며, T세포에만 작용하는 특징이 있다. 본 발명에 있어서, 식물성응집소 처리는 공여자에서 수득한 PBMCs에 PHA를 처리한 후, 여기에 중간엽 줄기세포를 처리하는 것을 의미하며, 이와 같은 처리를 통해 본 발명의 염증 자극된 중간엽 줄기세포를 수득한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, "콘카나발린 A(Con A)"은 완두(*Canavalia ensiformis*)의 종자로부터 얻어진 결정성 단백질의

하나이다. Con A는 T세포를 활성화시키지만 B세포는 활성화시키지 않아, 불용화하면 B세포도 활성화된다. 또 여러 암세포에서 정상세포에 비하여 Con A에 대한 높은 응집성을 나타내기 때문에 암세포막 구조의 특이성을 연구하는 수단으로 이용되고 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, "염증 자극된 중간엽 줄기세포"는 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR), 유사분열 촉진물질(mitogen) 처리 및 사이토카인(Cytokine) 처리 조건으로 염증 자극 되거나, 바람직하게는, 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 또는 식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA) 조건으로 염증 자극되어 중간엽 줄기세포가 신경 세포와 유사한 특징을 갖는 것을 의미하며, 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 염증 자극된 중간엽 줄기세포는 신경세포와 유사한 형태로 변화하였고, 신경세포 마커인 Tuj1, nestin 및 MAP2을 발현하고, 성상교세포(별아교세포) 마커인 GFAP 및 희소돌기신경교 마커인 O4과 같은 신경교 마커는 발현하지 않음을 확인하였다.

[0020] 상기 염증 자극된 중간엽 줄기세포는 콜린성 뉴런-유사 표현형(cholinergic neuron-like phenotype)으로 변화하고, 아세틸콜린을 분비할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, "콜린성 뉴런(cholinergic neuron)"은 신경섬유 말단으로부터 화학전달물질로서 아세틸콜린을 분비하는 뉴런을 의미한다.

[0022] 본 발명에 있어서, "아세틸콜린"은 콜린과 아세트산의 에스테르인 신경전달물질이며 신경의 말단에서 분비되며, 신경의 자극을 근육에 전달하는 화학물질이다.

[0023] 상기 조성물에는 아세틸콜린의 아고니스트(agonist)를 더 포함할 수 있고, 예컨대, ACh chloride(ACh-Cl), 카바콜(carbachol), 에피바티딘(epibatidine), DMPP(dimethylphenylpiperazinium), 수자메토늄(suxamethonium), 시티신(cytisine), 니코틴(nicotine), 니펜(nifene), 바레니클린(varenicline), MDMA(3,4-Methylenedioxymethamphetamine) 및 엠파타민(methamphetamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 선택하여 더 포함할 수 있고, 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료를 위한 것이라면 이에 제한되지 않는다.

[0024] 상기 면역질환 또는 염증질환은 자가면역질환, 이식거부, 관절염, 이식편대숙주병, 세균감염, 패혈증 및 염증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선 기능저하증, 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.

[0027] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분 (corn starch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘, 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스 (tragacanth), 젤라틴, 셀락 (shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린, 펙틴 (pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 파립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며 (예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA), 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 외용제일 수 있다. 본 발명의 외용제에는 시트제, 액상도포제, 분무제, 로션제, 크림제, 파프제, 분제, 침투 패드제, 분무제, 겔제, 파스타제, 리니먼트제, 연고제, 에어로졸, 분말제, 현탁액제, 경피흡수제 등의 통상적인 외용제의 형태가 포함될 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042 (Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 유효량은 환자의 상처 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 중

류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 통상 본 발명의 약학 조성물의 일일 유효량을 환자에 적용시 0.00001 내지 10000 μ g일 수 있다. 상기 1 일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.

- [0030] 그러나, 본 발명의 약학적 조성물의 상기 사용량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도, 상처 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 유효량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 조성물은 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 면역반응 또는 염증반응을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, "개체"란 소, 개, 돼지, 닭, 양, 말, 인간을 포함한 포유동물을 의미하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포에 염증 자극을 가하여 배양하는 단계를 포함하는 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 중간엽 줄기세포 제조 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 염증 자극은 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 조건, 유사분열 촉진물질(mitogen) 처리 및 사이토카인(Cytokine) 처리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이고, 상기 유사분열 촉진물질은 식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA), 콘카나발린 A(Con A), PWM(pokeweed mitogen), 지질다당, 스트렙토리신S, 수은 화합물 및 항림프구항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 바람직하게는 혼합림프구반응 조건 또는 식물성응집소 처리이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 상기 제조 방법에 의해 제조된 중간엽 줄기세포는 아세틸콜린을 분비하며, 면역억제제 또는 항염증제로 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, "면역억제제"란 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 조건, 식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA) 처리 또는 사이토카인(Cytokine) 처리 조건에서 배양한 중간엽 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 제제로 면역 반응을 억제하여 면역질환을 치료할 수 있는 제제를 의미한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, "항염증제"란 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 조건, 식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA) 처리 또는 사이토카인(Cytokine) 처리 조건에서 배양한 중간엽 줄기세포 또는 그 배양물을 포함하는 제제로 염증 반응을 억제하여 염증 질환을 치료할 수 있는 제제를 의미한다.
- [0041] 본 발명에서 용어 "배양"은 본 발명의 중간엽 줄기세포를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.
- [0042] 상기 본 발명의 중간엽 줄기세포는 통상의 배지에서 생육 가능하며, 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.
- [0043] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 군주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [0044] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에

의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0046] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0048] **실험예 1. 재료 및 방법**

[0049] 1-1. 중간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cells, MSCs) 분리, 특징 및 배양

[0050] MSCs는 KR 10-0802011에 개시된 층분리배양법(Subfractionation Culturing Method)으로 분리된 중간엽 줄기세포이다. 상기 MSCs의 분리 및 특징은 세포 모양, 마커 발현 및 중간엽 분화로 확인하였으며 그 결과를 도 1에 나타내었다. 유세포 분석을 위한 항체는 anti-CD14(BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD29(Serotec, Kidlington, UK), anti-CD34(BD Biosciences), anti-CD44(Serotec), anti-CD45(BD Biosciences), anti-CD49f(BD Biosciences), anti-CD73(BD Biosciences), anti-CD90(BD Biosciences), anti-CD105(Serotec), anti-CD106(BD Biosciences), anti-CD146(BD Biosciences), anti-HLA class I(BD Biosciences), anti-HLA-DR(BD Biosciences), 및 anti-Oct4 (BD Biosciences) 항체를 이용하였다. 이소타입-매치된 대조 항체는 대조군으로서 사용하였다. 지방 세포, 골 형성 및 연골 분화를 포함하는 중간엽 줄기 분화 가능성은 종래의 문헌(Jung, K. H. 등, Gastroenterology 140, 998-1008 (2011))을 참고하여 평가하였다. MSCs는 10% 소 태아 혈청(Gibco-BRL), 1% 페니실린/스트렙토 마이신(Gibco-BRL) 및 1% 마이코곤(Genlantis, San Diego, CA, USA)으로 보충된 저 글루코스(low glucose, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's 배지에 37도로 가습된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 70-80% 정도에 도달하면, 트립신/ EDTA를 포함하여 분리한 후, 추가 배양을 위하여, 서브-배양하였다.

[0052] 1-2. 면역억제 분석 및 염증 조건

[0053] 인간 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 두 환자에서 분리하였고, 각 환자의 1×10⁵ PBMCs를 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction, MLR)을 위하여 96-웰 플레이트에 공동-배양하였다. 림프구 증식에서 MSCs의 효과를 평가하기 위하여, 4×10⁴ MSCs를 혼합 림프구 반응(MLR)상에서 5일 동안 공동-배양하였다. 미토젠(mitogen) 활성을 위하여, 2×10⁵ PBMCs를 1 μg/mL 식물성응집소(phytohemagglutinin, PHA)(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 자극하였다. 또한, 4×10⁴ MSCs를 PBMCs와 함께 3일 동안 배양하였다. 림프구 증식은 [³H]티미딘(1 μCi/well)의 합입(incorporation)에 의해 방출된 방사선은 β-카운터(Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)을 이용하여 분석하였다. MLR 또는 PHA 처리에 의한 림프구 활성으로 염증 반응을 확인하였다.

[0055] 1-3. ELISA

[0056] nAChR 안타고니스트(antagonist) 또는 아고니스트(agonist)를 포함하여 공동-배양한 배지를 수득하였다. TNF-α (BD Biosciences; cat. # 555212) 및 IFN-γ (BD Biosciences; cat. # 555141)에 대한 ELISA 키트를 이용하여 분비된 전염증성 사이토카인을 정량하였다. MLR 또는 PHA이 활성화된 PBMCs를 배양한 배지를 이용하여 NGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; cat. # DY256-05) 및 BDNF (R&D Systems; cat. # DBD00)에 대한 분석을 수행하였다.

[0058] 1-4. RNA분리, semi-quantitative RT-PCR 및 quantitative RT-PCR(qRT-PCR) 수행

[0059] 총 RNA는 easyBlue RNA isolation reagent(Intron, Sungnam, Korea)을 이용하여 분리하였다. AccuPower cDNA Synthesis Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 1g의 총 RNA로 cDNA를 합성하였다. Semi-quantitative RT-PCR는AccuPower PCR premix(Bioneer)를 이용하여 수행하였다. 앰플리콘(amplicons)은 SyberSafe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함하는 1% 아가로스 겔로 전기영동을 수행하였고, fluorescence image analyzer LAS4000 mini(Fuji PhotoFilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. PCR 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 상기 프라이머는 TrkA(Hs01021011), TrkB(Hs00178811), TrkC(Hs00176797), p75NTR(Hs00609977), nAChR α 7(Hs04189909), nAChR α 5(Hs00181248), ChAT(Hs00252848) 및 18s rRNA(Hs03928985)을 증폭하기 위하여 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)에서 구입하여 qRT-PCR을 수

행하였다. 상기 qRT-PCR는 real-time thermal cycler(StepOne Real-Time RT-PCR system, Applied Biosystem s)에서 수행하였다.

표 1

Gene	Primers	Sequence (5`-3`)	Ta (°C)	Cycle	Products (bp)	서열번호
MAP2	Forward	TAAGTTTGGAGCAAGCAGTTACAG	56	35	508	1
	Reverse	TTCTCTCCATACACTTTTGGATCA				2
Tuj1	Forward	AACGAGGCCTCTTCTCACAA	56	25	537	3
	Reverse	CGATACCAGGTGGTTGAGGT				4
GFAP	Forward	GAGTACCAGTACCTGAAGA	55	30	203	5
	Reverse	TTCACCACGATGTTCTCTT				6
NF-M	Forward	TTTGGTTTCTCTATGATCTCTCTC	54	25	212	7
	Reverse	AGATGGCTCTGGATATAGAAATCG				8
nest in	Forward	TCCAGAGCTGTCAATGACTCTAAG	56	37	596	9
	Reverse	GACCACTCCAGTTAGAGGCTAAG				10
TrkA	Forward	GAAGAGTGGTCTCCGTTTCG	62	35	410	11
	Reverse	CTGACTGCTCCAGCTCTGTG				12
TrkB	Forward	ATCCCTTCCACAGACGTCAC	50	40	494	13
	Reverse	TCCTGCTCAGGACAGAGGTT				14
TrkC	Forward	ACAAGATGCTTGTGGCTGTG	201	40	201	15
	Reverse	GGGCCCTGAGGAAGTTATTC				16
p75 ^{NTR}	Forward	AGCCTTCAAGAGGTGGAACA	62	35	447	17
	Reverse	CTGCACAGACTCTCCACGAG				18
NGF	Forward	ATACAGGCGGAACCACACTC	56	30	408	19
	Reverse	GTCTGTGGCGGTGGTCTTAT				20
BDNF	Forward	TGGCTGACACTTTCGAACAC	54	30	520	21
	Reverse	CTTATGAATCGCCAGCCAAT				22
nAchRa3	Forward	CCATGTCTCAGCTGGTG	53.5	35	502	23
	Reverse	GTCCTTGAGGTTTCATGGA				24
nAchRa5	Forward	GATAATGCAGATGGACGT	54	35	506	25
	Reverse	TGATGGTATGATCTCTTC				26
nAchRa7	Forward	CCCGGCAAGAGGAGTGAAAGGT	61	31	442	27
	Reverse	CCGGGCTCTTCATTTCGAG				28
nAchRa9	Forward	CTACAATGGCAATCAGGTGG	60	30	425	29
	Reverse	ATGATGGTCAACGCAGTGG				30
nAchRb2	Forward	CAGCTCATCAGTGTGCA	58.5	40	410	31
	Reverse	GTGCGGTCGTAGGTCCA				32
GAPDH	Forward	GTCATCCATGACAACCTTGGTATC	56	25	476	33
	Reverse	CTGTAGCCAAATTCGTTGTCATAC				34

1-5. 유세포 분석

유세포 분석을 위하여, Anti-GFAP(BD Biosciences; 51449), anti-Tuj1(BD Biosciences; 560381) 및 anti-nestin(BD Biosciences; 56130) 항체를 이용하였다. 이소타입-매치된 대조 항체는 대조군으로서 이용하였으며, FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences)을 이용하여 분석하였다.

1-6. 웨스턴 블랏 분석

각 실험군의 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)(Sigma), 1mM 오르토바나듐산 나트륨(sodium orthovanadate)(Sigma), 1 mM 염화 불소(sodium fluoride), 1 mM 페닐메탄설포닐 플루오리드(phenylmethanesulfonyl fluoride)(Sigma), 1% Triton-X 100, 프로테아제 저해 각테일(Pierce, Rockford, IL, USA) 및 포스파타아제 저해 각테일(Pierce))을 30분간 아이스에 두어 처리하였다. 세포 파편은 15,000×g로 15 분간 원심분리하여 제거한 후, 상층액을 새로운 마이크로 튜브로 옮겼다. 세포 용해물에서 단백질 농도는 BCA protein assay reagent kit (Pierce)를 이용하여 측정하였다. 동등한 단백질은 환원 조건하에서 10 % SDS-폴리

아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여 분리하였고, 이모빌론 P 멤브레인(EMD Millipore)에 전기 이동을 수행하였다. 면역검출을 위하여, anti-TrkA (EMD Millipore; cat. # 06-574), anti-TrkC (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; cat. # 3376), anti-p75NTR (Cell Signaling Technology; cat. # 8238), anti-ChAT (EMD Millipore; cat. # AB144P), anti-nAChR 7 (Alomone, Jerusalem, Israel; cat. # ANC-007), 또는 anti-Actin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; cat. # SC-47778) 항체를 일차 항체로서 이용하였다. 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)에 공여하여 이차 항체를 처리하여 배양한 후, 밴드의 강화된 화학발광은 West-Zol Plus (Intron)을 이용하여 검출하였다.

[0068] 1-8. ACh 분석

[0069] 24시간 동안 MLR 또는 PHA로 자극된 MSCs를 배양하고, 각 MSCs를 수득하였다. ACh/콜린은 제조사의 매뉴얼에 따라 Enzychrom Acetylcholine Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA; EACL-100)을 이용하여 정량하였다.

[0071] 1-9. 스펜도이드 형성 확인

[0072] 세포 접종 전에, 1% Pluronic F-127 (Sigma, 증류수에 용해함)을 페트리디쉬(diameter, 100mm)에 실은 조건으로 30분간 코팅한 후, PBS로 충분히 세척하였다. 총 1×10^6 MSCs를 1% 비 필수 아미노산(Gibco-BRL), 1% L-글루타민 (Gibco-BRL), 1% N2 보충제(Gibco-BRL), 20ng/ml 상피세포 성장 인자 (R&D Systems), 20ng/ml 염기성 섬유아세포 증식인자 (R&D Systems)를 포함하는 디쉬에 접종한 후 24-72 시간 동안 배양하였다.

[0074] 1-10. 면역형광 염색 및 공초점 현미경 사용

[0075] 각 실험군의 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정한 후, PBS로 용해된 0.5% TritonX-100 (Sigma)를 이용하여 투과화하였다. 상기 세포를 anti-TrkA (EMD Millipore, Billerica, MA, USA; cat. # 06-574), anti-ChAT (EMD Millipore; cat. # AB144P), anti-Tuj1 (EMD Millipore; cat. # MAB1637), anti-TH (Cell Signaling Technology; cat. # 2792), anti-NCAM1 (EMD Millipore; cat. # CBL275), anti-MBP (EMD Millipore; cat. # AB980), anti-O4 (Sigma; cat. # 07139), anti-NF-M (EMD Millipore; cat. # AB1987), anti-Nestin (EMD Millipore; cat. # MAB5326), 또는 anti-GABA (Abcam, Cambridge, MA, USA; cat. # Ab86186)인 일차 항체 (1:200 - 1:1000 희석)로 4도 조건으로 밤새 표지하였다. 일차 항체와 배양한 후, 상기 세포를 AlexaFluor488 또는 AlexaFluor594-공여된 이차 항체(Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) (1:300 희석)로 1시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes)로 1분 동안 염색하고, 이를 공초점 현미경(Zeiss LSM510 Meta Confocal Imaging System; Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 이용하여 관찰하였다.

[0077] 1-11. 콜린성 안타고니스트(cholinergic antagonist) 또는 아고니스트(agonist) 처리

[0078] α -붕가로톡신(α -Bungarotoxin)(EMD Millipore; cat. # 203980)는 nAChR $\alpha 7$ 의 안타고니스트이며, 1 M 농도로 배지에 첨가하였다. 콜린성 아고니스트로서, ACh 클로라이드(ACh chloride)(Sigma; cat. # A6625) 및 카르바콜(carbachol)(EMD Millipore; cat. # 212385)을 각 1 nM 및 10 pM 농도로 첨가하여 실험을 수행하였다.

[0080] 실시예 1. 본 발명의 MSCs의 특성 확인

[0081] 본 발명의 MSCs는 층분리배양법(Subfractionation Culturing Method)으로 분리하였다. 본 발명의 MSCs는 종래의 농도구배원심분리법(Density gradient centrifugation method)으로 분리된 MSCs과 비교하였을 때, 줄기세포가 아닌 다른 종류의 세포들이 섞여있지 않고, 줄기세포만 분리되어 줄기세포의 순도가 높은 장점이 있다. 상기 MSCs를 이용하여 하기 일련의 실험에 사용하는 MSCs의 특성을 확인하였다.

[0082] 구체적으로, 본 발명의 MSCs를 배양한 후, 이의 형태적 특성을 확인하였다. 또한, MSCs의 분화 잠재력을 확인하기 위하여, 지방 세포-특이적 지질 액체(adipocyte-specific lipid droplets)인 Oil Red O를 이용하여 시각화하였고, 연골-특이적 프로테오글리칸(cartilage-specific proteoglycans)인 Safranin O를 이용하여 시각화하였으며, 골-특이적 무기화작용(bone-specific mineralization)은 Alizarin Red S를 이용하여 시각화하였다. 또한, 유세포 분석을 수행하여 본 발명의 MSCs를 특성을 확인하기 위하여, 양성 마커인 CD29, CD44, CD49f, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-class I (HLA-I) 및 Oct4를 이용하였다. 음성 마커는 CD14, CD34, CD45, CD106 및 HLA-DR을 포함하는 조혈성/내피 마커를 이용하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0083] 도 1의 a에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 MSCs는 섬유아세포-유사 형태를 나타냄을 확인하였다.

- [0084] 도 1의 b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 MSCs는 지방세포화(adipogenically), 연골분화(chondrogenically) 및 골 분화(osteogenically)로의 분화 잠재력이 존재함을 확인하였다.
- [0085] 도 1의 c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 MSCs는 양성 마커인 CD29, CD44, CD49f, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-class I (HLA-I) 및 Oct4가 정상적으로 발현함을 확인하였다.
- [0087] **실시예 2. 염증성 조건에 의한 MSCs의 림프구 증식 억제 효과, 형태학적 변화, 스페로이드 개체 생성 여부 및 면역 억제와의 관계 확인**
- [0088] 2-1. 염증성 조건에 의한 MSCs의 림프구 증식 억제 효과 및 형태학적 변화 확인
- [0089] 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에 의한 인간 MSCs의 림프구 증식 억제 효과 및 형태학적 변화를 확인하였다.
- [0090] 구체적으로, 상기 실험에 1-2의 방법에 따라, 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것이고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건이다. 상기 염증성 조건에 따라, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 및 Po); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA})에 대하여, 동종 항원성(alloantigenic) 면역 반응에 따른 림프구 증식 억제 효과 및 형태학적 변화를 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0091] 도 2의 a에 나타난 바와 같이, 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군에서 동종 항원성(alloantigenic) 면역 반응에 의해 유도된 림프구 증식을 효과적으로 억제함을 확인하였다.
- [0092] 도 2의 b에 나타난 바와 같이, 식물성혈구응집소(PHA) 조건에서 공동 배양한 MSCs는 림프구 증식을 억제함을 확인하였다.
- [0093] 도 2의 c에 나타난 바와 같이, 혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 조건에서 공동 배양한 MSCs의 특이적인 신장, 필라멘트(filamentation) 및 분기(branching)를 포함하는 비정상적인 형태학적 변화가 나타남을 확인하였다.
- [0094] 도 2의 d 및 e에 나타난 바와 같이, 혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 조건에서 공동 배양한 MSCs의 수상돌기-유사 세포와 같은 신경세포와 유사한 형태적 특징이 나타남을 확인하였다. 또한, 수상돌기-유사 경로를 통하여 인접 세포와 연결됨을 확인하였다.
- [0095] 도 2의 f 및 g에 나타난 바와 같이, 염증성 조건에서 MSCs는 신경 세포와 유사한 형태가 나타남을 확인하였다.
- [0096] 따라서, MSCs는 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 비정상적으로 형태가 변함을 확인하였다.
- [0098] 2-2. 염증성 조건에 의한 MSCs의 스페로이드 개체 생성 여부 및 면역 억제와의 관계
- [0099] 염증성 조건에 대한 MSCs에서 스페로이드 개체(spheroid entities) 생성 여부 및 상기 개체가 아노이키스(anoikis) 작용 기전에 의한 사멸보다 면역 억제와 관련이 있는지 확인하였다.
- [0100] 구체적으로, 상기 실험에 1-2의 방법에 따라, 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것이고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건으로, 스페로이드 개체 생성 여부를 확인하였다. 또한, 상기 혼합림프구반응(MLR) 조건 효과에 대한 중화 및 효과를 최소화하기 위하여, MSCs의 부착되지 않은 스페로이드 개체의 구조를 포함하는 상층액을 새로운 배지에 옮겨 24 시간 배양하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0101] 도 3의 a에 나타난 바와 같이, MLR의 염증성 조건에 의하여 MSCs에서 스페로이드 개체가 생성됨을 확인하였다.
- [0102] 도 3의 b에 나타난 바와 같이, MLR의 염증성 조건을 최소화하였을 때, MSCs에서 스페로이드 개체가 아닌 배지에 부착된 섬유아세포-유사 MSCs 형태가 나타남을 확인하였다.
- [0103] 따라서, 염증성 조건을 최소화하였을 때는 스페이로이드 개체의 생성이 저해되고, 섬유아세포-유사 MSCs로 발현됨을 확인하여, 염증성 조건은 MSCs에서 스페로이드 개체(spheroid entities) 생성을 유도하고, MSCs의 특성을 변화시킴을 확인하였다.

[0105] **실시예 3. 염증성 조건에 의한 MSCs의 신경세포-유사 특성 확인**

[0106] 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에 의하여 인간 MSCs가 신경세포-유사 특성으로 변하는지 확인하였다.

[0107] 구체적으로, 상기 실험예 1-2의 방법에 따라, 신경성장인자 수용체 발현을 확인하였다. 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것이고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건이다. 상기 염증성 조건에 따라, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 및 Po); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA})에 대하여, 상기 실험예 1-4의 방법에 따라 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 nestin, Tuj1, MAP2, NF-M 및 GFAP의 발현을 확인하였다. 또한, 실험예 1-5의 방법에 따라 nestin, Tuj1 및 GFAP의 유세포 분석을 수행하였다. 또한, 실험예 1-9의 방법에 따라 면역형광 염색하여 nestin, Tuj1, NCAM1, GFAP 및 O4의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0108] 도 4의 a에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs에서 신경세포 마커인 Tuj1 및 MAP2는 발현됨을 확인하였으나, 성상교세포(별아교세포)인 GFAP는 발현되지 않음을 확인하였다.

[0109] 도 4의 b에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs에서 nestin 및 Tuj1는 발현하나, GFAP는 발현되지 않음을 확인하였다.

[0110] 도 4의 c 및 d에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs에서 nestin 및 Tuj1과 같은 신경세포 마커는 발현함을 확인하였다. 그러나, 성상교세포(별아교세포) 마커인 GFAP 및 희소돌기신경교 마커인 O4과 같은 신경교 마커는 발현하지 않음을 확인하였다.

[0111] 따라서, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs는 불완전 및 미성숙 신경세포 특징이 억제되고, 신경세포와 유사한 특징이 나타남을 확인하였다.

[0113] **실시예 4. 염증성 조건에 의한 MSCs의 신경성장인자 수용체(neurotrophin receptor) 및 신경성장인자 발현 확인**

[0114] 4-1. 염증성 조건에 따른 MSCs의 신경성장인자 수용체 발현 확인

[0115] 염증성 조건에 따른 MSCs의 신경성장인자 수용체의 발현을 확인하기 위하여, 상기 실험예 1-2의 방법에 따라, 성장인자 수용체 발현을 확인하였다. 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것이고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건이다. 상기 염증성 조건에 따라, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 및 Po); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA}); 또는 일반 MSC에 PHA처리군(MSC+PHA)에 대하여, Trk 패밀리아(A, B 및 C) 및 p75^{NTR}를 포함하는 신경성장인자 수용체의 발현을 확인하였다.

[0116] 상기 실험예 1-4의 방법에 따라 Semi-quantitative RT-PCR 또는 qRT-PCR을 수행하여 TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR}의 발현을 확인하였다. 또한, 실험예 1-6의 방법에 따라 웨스턴 블랏을 수행하여 TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR}의 발현을 확인하였다. 또한, 실험예 1-9의 방법에 따라 면역형광 염색하여 TrkA 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0117] 도 5의 a, b 및 c에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs에서 TrkA 및 p75^{NTR}의 발현은 유의적으로 발현되었음을 확인하였으나, TrkB 및 TrkC의 발현은 낮은 것을 확인하였다.

[0118] 도 5의 e 및 f에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs에서 TrkA 단백질이 발현됨을 확인하였다.

[0120] 4-2. 염증성 조건에 따른 PBMCs의 신경성장인자 발현 확인

[0121] 신경성장인자로 알려진 NGF(nerve growth factor) 및 BDNF(brain-derived growth factor)의 발현을 PBMCs에서 확인하였다.

- [0122] 구체적으로, 상기 3-1과 같은 조건으로, 상기 실험에 1-4의 방법에 따라 Semi-quantitative RT-PCR 또는 qRT-PCR을 수행하여 NGF 및 BDNF의 발현을 확인하였다. 또한, 실험에 1-3의 방법에 따라, ELISA를 수행하여 NGF 및 BDNF의 발현을 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0123] 도 6의 a 내지 h에 나타난 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 PBMCs에서 NGF 및 BDNF이 모두 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다.
- [0124] 따라서, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 PBMCs에서 신경성장인자-수용체 및 신경성장인자 모두를 발현하여, 상기 MSCs를 자극하여 MSCs가 신경세포 유사 특징이 나타남을 확인하였다.
- [0126] **실시예 5. 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 신경세포 마커 발현 및 림프구 증식 억제 효과 확인**
- [0127] 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 신경세포 마커 발현 및 림프구 증식 억제 효과를 확인하였다.
- [0129] 5-1. 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 신경세포 마커 발현 확인
- [0130] 구체적으로, 상기 실시예 1에 나타난 바와 같이, 염증성 조건에 의한 MSCs에서 타원체(spheroidal) 구조는 신경구(neurospheres)와 닮았으며, 본 발명의 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 신경구(neurospheres) 특성을 확인하기 위하여, 염증성 조건에 의한 MSCs의 스페로이드를 상기 실험에 1-8의 방법에 따라 수득하여 매트릭셀-코팅된 배지에 두어 배양한 후, 배지에 부착된 스페로이드를 확인하였다. 또한, 상기 스페로이드의 신경세포 마커 발현을 확인하기 위하여, neurobasal medium (Gibco-BRL), 2% B27 supplement(Gibco-BRL), 1% 비-필수적 아미노산, 10 ng/ml BDNF, 20 ng/ml 상피세포 성장 인자, 40 ng/ml 염기성 섬유아세포 성장 인자 및 10 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 8(Peprotech, Rehovot, Israel)를 포함하는 신경성 분화 배지에 배양하였다. 그 후, 면역 형광 염색하여 신경세포 마커인 Tuj1, NF-M 및 MAP2의 발현과 신경전구세포(neural progenitor cell, NPCs)의 마커인 nestin의 발현을 확인하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0131] 도 7의 a에 나타난 바와 같이, 염증성 조건에 의한 MSCs는 스페로이드를 성공적으로 생성시킴을 확인하였다. 또한, 도 7의 b에 나타난 바와 같이, 신경 세포 마커인 Tuj1, NF-M 및 MAP2의 발현 및 신경전구세포(neural progenitor cell, NPCs)의 마커인 nestin이 발현됨을 확인하여, 본 발명의 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 신경구(neurospheres) 특성이 나타남을 확인하였다.
- [0133] 5-2. 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 림프구 증식 억제 효과 확인
- [0134] 염증성 조건에 의한 MSCs를 구성하는 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)와 PBMCs간의 관계를 확인하기 위하여, 혼합림프구반응(MLR) 조건으로 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 실험을 수행하였고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건으로 PBMCs에 PHA를 처리하여 3 또는 5일동안 배양하는 실험을 수행하였으며, 이에 따른 스페로이드 형성을 확인하였다.
- [0135] 또한, MLR 염증성 조건에 의한 MSC 스페로이드가 림프구 증식을 억제하는지 확인하기 위하여, 세포 수에 의존적인 단일분자막으로 배양된 MSCs와 비교하였다. 구체적으로, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 또는 Po); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); MSCs이 없는 PHA 조건군(P^{PHA}); MSCs 스페로이드와 MLR 또는 PHA-활성화된 PBMCs간의 1:2, 1:5 및 1:20의 비율로 배양된 군(spheroids); MSCs 단일분자막과 MLR 또는 PHA-활성화된 PBMCs간의 1:2, 1:5 및 1:20의 비율로 배양된 군(monolayer)에 대한 림프구 증식 억제 정도를 확인하였다.
- [0136] 또한, 상기 실험에 1-5에 나타난 바와 같이, 유세포 분석을 수행하여, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 MSCs 스페로이드의 Tuj1 및 nestin의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0137] 도 8의 a에 나타난 바와 같이, 상기 염증성 조건에 의해 활성화된 PBMCs(MLR)에서 둥근 모양의 스페로이드가 형성됨을 확인하여, PBMCs 및 MSC 스페로이드 간의 상호 관계가 형성됨을 확인하였다.

- [0138] 도 8의 b 및 c에 나타난 바와 같이, MLR 또는 PHA-활성화된 PBMCs와 MSCs 스페로이드의 혼합 배양군(spheroids)에서, MSCs 스페로이드의 비율이 높을수록 림프구 증식 억제 효과가 효과적임을 확인하였다. 또한, MLR 또는 PHA-활성화된 PBMCs와 MSCs 단일분자막의 혼합 배양군(monolayer)에서 림프구 증식 억제가 더 활성화됨을 확인하였다.
- [0139] 도 8의 d에 나타난 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 MSCs 스페로이드의 Tuj1 및 nestin의 발현이 증가됨을 확인하였다.
- [0141] 5-3. 신경성 포텐셜(high neurogenic potential)에 따른 염증성 조건에 의한 MSCs의 신경구-유사 스페로이드(Neurosphere-like spheroids)의 신경 세포 마커 발현 확인
- [0142] 신경성 포텐셜에 따른 염증성 조건에 의한 MSCs의 스페로이드의 신경세포 마커의 발현을 확인하기 위하여, 대조군으로, 아무것도 처리하지 않은 MSCs를 2% N₂ supplement(Gibco-BRL), 1% 비-필수 아미노산, 10 ng/ml BDNF, 20 ng/ml 상피 세포 성장 인자, 40 ng/ml 염기성 섬유아세포 성장 인자 및 10 ng/ml 섬유아세포 성장인자 8를 포함한 neurobasal medium 배지에 배양하여, MSC1 및 MSC2으로 나타내었다. 그 후, 신경세포 마커 또는 신경전구세포 마커인 Tuj1, nestin, MBP 및 NF-M의 발현을 확인하였다.
- [0143] 또한, 혼합림프구반응(MLR) 조건으로, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 MSC와 공동 배양하여 수행하였으며, 2% N₂ supplement(Gibco-BRL), 1% 비-필수 아미노산, 10 ng/ml BDNF, 20 ng/ml 상피 세포 성장 인자, 40 ng/ml 염기성 섬유아세포 성장 인자 및 10 ng/ml 섬유아세포 성장인자 8를 포함한 neurobasal medium 배지에 배양하여, 각각 MSC1 및 MSC2으로 나타내었다. 그 후, 신경세포 마커 또는 신경전구세포 마커인 Tuj1, nestin, MBP 및 NF-M의 발현을 확인하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0144] 도 9의 a 및 b에 나타난 바와 같이, 신경구-유사 스페로이드에서 신경세포 마커들이 발현된다는 사실을 확인하여, 상기 신경구-유사 스페로이드는 신경유사 세포들처럼 유사한 기능을 발휘할 수 있음을 확인하였다.
- [0146] **실시예 6. 염증성 조건에 의한 MSCs의 아세틸콜린(ACh) 분비 확인**
- [0147] 6-1. 염증성 조건에 의한 MSCs의 아세틸콜린(ACh) 분비 확인
- [0148] 염증성 조건에 의한 MSCs는 신경세포 유사 특징을 갖는 것으로 확인되어, 신경전달 물질인 아세틸콜린(ACh)의 분비를 확인하였다.
- [0149] 구체적으로, 상기 실험에 1-2의 방법 및 1-7의 방법과 같이, 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것을 의미하고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건을 의미하며, 두가지 조건을 포함하여 염증성 조건이라 언급한다. 상기 염증성 조건에 따라, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 및 Po); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA})에 대하여, 실험에 1-5의 방법에 따라, qRT-PCR을 수행하여 ChAT(choline acetyltransferase) 발현 정도를 확인하였다. 또한, 상기 실험에 1-6의 방법에 따라 웨스턴 블랏을 수행하여 ChAT 발현 정도를 확인하였다. 또한, 실험에 1-9의 방법에 따라 면역형광 염색하여 ChAT, TH(tyrosine hydroxylase) 및 GABA(γ -aminobutyric acid); 또는 ChAT, NCAM1, MBP, Tuj1, NF-M, nestin, TrkA 및 GABA;에 대한 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0150] 도 10의 a에 나타난 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs에서 콜린성(cholinergic)인 ChAT가 발현함을 확인하였다. 반면, 가바성(GABAergic)인 GABA 및 도파민성(dopaminergic) TH는 발현하지 않음을 확인하였다.
- [0151] 도 10의 b 및 c에 나타난 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs는 다른 조건의 세포보다 ChAT이 높게 발현됨을 확인하였다.
- [0152] 도 10의 d에 나타난 바와 같이, MSCs의 스페로이드는 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에 의해 MSCs는 콜린성으로 유도됨을 확인하였다.
- [0153] 도 10의 e 및 f에 나타난 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs는 아세틸콜린을 분비함을 확인하였다.
- [0155] 6-2. 염증성 조건에서 분비된 수용성 인자(Soluble factors)에 의해 MSCs의 콜린성 뉴런-유사 표현형으로의 변

화 확인

- [0156] 염증성 조건에서 세포와 세포간의 contact으로 야기된 콜린성 뉴런-유사 표현형으로의 변화가 아닌, 어떤 분비된 수용성 인자(Soluble factors)에 의해 MSCs의 콜린성 뉴런-유사 표현형으로의 변화를 트랜스웰 플레이트를 이용한 실험을 통하여 확인하였다.
- [0157] 구체적으로, 0.4μm-pore의 트랜스웰 플레이트(Corning, Tewksbury, MA, USA) 십만 개의 MSCs를 하단 웰에 접종하고, 혼합림프구반응(MLR)-활성화된 PBMCs (1×10^6) (bottom: MSC, insert: P+Po) 또는 배지(bottom: MSC, insert: medium)를 삽입하여 3일간 배양하였다. 또한, 트랜스웰이 아닌 일반 배양방법으로 혼합림프구반응(MLR) 조건으로 MSCs를 배양하여(MSC in MLR (co-culture)) 콜린작동성 뉴런-유사 표현형으로의 변화를 확인하였다.
- [0158] 또한, 조정배지(conditioned medium, CM)에 배양하지 않은 MSCs(no CM); 혼합림프구반응(MLR) 조건에서 활성화된 PBMCs의 조정배지(CM)에 MSCs 배양(CM from MLR); 및 혼합림프구반응(MLR) 조건에서 활성화된 PBMCs의 조정배지(CM)에 MSCs 배양(CM from P^{PHA})하여, 상기 MSCs의 콜린작동성 뉴런-유사 표현형으로의 변화를 확인하였다. 또한, ChAT, NCAM1, NF-M 및 Tuj1의 발현을 확인하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0159] 도 11의 a에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에서 배양된 MSCs의 신경-유사 형태학적 변화는 트랜스웰 분석상에도 확인되었다.
- [0160] 도 11의 b 및 c에 나타낸 바와 같이, 조정배지(CM) 조건에서도 상기 MSCs는 콜린작동성 뉴런-유사 표현형이 나타남을 확인하였고, ChAT, NCAM1, NF-M 및 Tuj1의 발현 또한 나타남을 확인하였다.
- [0162] **실시예 7. 염증성 조건에 의한 PBMCs의 니코틴 콜린성 수용체 발현 및 콜린성 억제 메커니즘을 확인**
- [0163] 7-1. 염증성 조건에 의한 PBMCs의 니코틴 콜린성 수용체 발현 확인
- [0164] 염증성 조건에 의한 PBMCs가 니코틴 콜린성 수용체를 발현하는지 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-2의 방법에 따라 실험을 수행하였다. 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것이고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건이다. 상기 염증성 조건에 따라, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 및 Po); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA})을 두었다.
- [0165] 실험에 1-5의 방법에 따라, Semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 nAChR α3, nAChR α5, nAChR α7, nAChR α8, nAChR β2의 발현 정도를 확인하였고, qRT-PCR을 수행하여 nAChR α5 또는 nAChR α7의 발현 정도를 확인하였다. 또한, 상기 실험에 1-6의 방법에 따라 웨스턴 블랏을 수행하여 nAChR α7의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0166] 도 12의 a 내지 c에 나타낸 바와 같이, PBMCs의 스페로이드는 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에 의해 nAChR α5 및 nAChR α7을 발현함을 확인하였다.
- [0167] 도 12의 d에 나타낸 바와 같이, PBMCs의 스페로이드는 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건)에 의해 nAChR α7을 발현함을 확인하였다.
- [0169] 7-2. MSCs의 니코틴 콜린성 수용체 발현 확인
- [0170] MSCs가 니코틴 콜린성 수용체를 발현하는지 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-2의 방법에 따라 실험을 수행하였다. MSCs 단독군(MSC control); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA})을 두었다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [0171] 도 13에 나타낸 바와 같이, MSCs 단독군은 nAChR α7의 발현이 적거나, 나타나지 않음을 확인하였다.
- [0172] 따라서, 상기 7-1 및 7-2의 실시예에 따라, 니코틴 콜린성 수용체인 nAChR α7는 면역세포인 PBMC 세포에서만 발현됨을 확인하였다. 이에 따라, 줄기세포인 MSC에서 분비된 아세틸콜린이 상기 니코틴 콜린성 수용체가 발현된 면역세포들에만 결합함을 확인하였다.
- [0174] 7-3. 염증성 조건에 의한 MSCs의 ACh-nAChR 경로 메커니즘 확인
- [0175] 염증성 조건에 의한 MSCs에서 ACh-nAChR 경로 메커니즘을 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-2 및 1-10의 방법에

따라 실험을 수행하였다. 혼합림프구반응(MLR) 조건은 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs를 함께 배양하는 것이고, 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건은 PBMCs에 PHA를 처리하여 생성한 조건이다. 상기 염증성 조건에 따라, 서로 다른 공여자에서 수득한 각 PBMCs 단독군(P 및 Po); 혼합림프구반응(MLR) 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in MLR); MSCs이 없는 혼합림프구반응 조건군(MLR); 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건에 공동 배양한 MSCs군(MSC in P^{PHA})을 두었다. 콜린성 안타고니스트(antagonist)인 α -BTX(α -bungarotoxin, nAChR $\alpha 7$ 의 안타고니스트); 콜린성 아고니스트(agonist)인 ACh chloride(ACh-Cl, AChR의 아고니스트); 또는 비특이적 콜린성 아고니스트인 카바콜(carbachol)을 배지에 첨가한 후, 각 염증성 조건에 의한 MSCs의 TNF- α 및 IFN- γ 의 활성을 확인하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0176] 도 14의 a 내지 c에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건인 혼합림프구반응(MLR) 조건으로 배양된 MSCs에 의해 억제된 림프구 증식, TNF- α 및 IFN- γ 이 α -BTX와 함께 배양함에 따라 다시 활성화됨을 확인하였다.

[0177] 도 14의 d 내지 f에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건인 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건으로 배양된 MSCs에 의해 억제된 림프구 증식, TNF- α 및 IFN- γ 이 α -BTX와 함께 배양함에 따라 다시 활성화됨을 확인하였다.

[0178] 도 14의 g 내지 i에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건인 혼합림프구반응(MLR) 조건으로 배양된 MSCs에 의해 억제된 림프구 증식, TNF- α 및 IFN- γ 이 ACh-Cl와 함께 배양함에 따라 유의적으로 더 억제됨을 확인하였다.

[0179] 도 14의 j 내지 l에 나타낸 바와 같이, 염증성 조건인 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건으로 배양된 MSCs에 의해 억제된 림프구 증식, TNF- α 및 IFN- γ 이 ACh-Cl와 함께 배양함에 따라 유의적으로 더 억제됨을 확인하였다.

[0180] 도 15의 a 내지 d에 나타낸 바와 같이, 비특이적 콜린성 아고니스트인 카바콜(carbachol)을 본 발명의 염증성 조건의 MSCs 배양 배지에 첨가하여 배양 시, 상기 MSCs의 림프구 증식 및 염증성 사이토카인의 방출을 억제함을 확인하여, 특이적 또는 비특이적 콜린성 아고니스트 모두에서 ACh-nAChR 경로 메커니즘을 확인하였다.

[0182] **실시예 8. 마우스 또는 래트의 염증 세포 처리를 통한 MSCs의 염증성 자극 여부, 형태적 변화 및 신경세포 유사 특성 확인**

[0183] **실시예 8-1. 마우스 또는 래트의 염증 세포 처리를 통한 MSCs의 염증성 자극 여부, 형태적 변화 및 신경세포 유사 특성 확인**

[0184] 마우스의 염증 관련 세포 중 하나인 비장세포 처리를 통하여 MSCs에 염증성 자극 여부를 확인하고, 이에 따른 MSCs의 형태적 변화 및 콜린성 신경세포 유사 표현형으로의 변화 정도를 확인하였다.

[0185] 구체적으로, C57BL/6 마우스(Orient, Sungnam, Korea)의 비장세포(Splenocytes, SP)를 1 μ g/ml anti-CD3 (BD Biosciences) 및 anti-CD28 (BD Biosciences) 항체(α CD3/CD28)와 함께 배양하여 활성화하였다. 이 후, CD3/CD28-활성화된 마우스 비장세포(2×10^5)와 MSCs(4×10^3 내지 4×10^4)을 1:5, 1:10, 1:20, 및 1:50의 비율로 배양하고, 이의 형태학적 변화를 확인하였다.

[0186] 또한, 콜린성 뉴런 또는 신경전구세포 관련 마커인 ChAT, NCAM1, Tuj1, NF-M, nestin, MBP 및 TH를 이용하여 이의 발현을 확인하였다. 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0187] 도 16의 a에 나타낸 바와 같이, 마우스의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 림프구 증식 억제가 제대로 이루어지지 않음을 확인하였다.

[0188] 도 16의 b에 나타낸 바와 같이, 마우스의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 콜린성 신경세포 유사 표현형으로 변화되지 않음을 확인하였다.

[0189] 도 16의 c에 나타낸 바와 같이, 마우스의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 콜린성 뉴런 또는 신경전구세포 관련 마커인 ChAT, NCAM1, Tuj1, NF-M, nestin, MBP 및 TH이 발현되지 않음을 확인하였다.

[0191] **실시예 8-2. 래트의 염증 세포 처리를 통한 MSCs의 염증성 자극 여부, 형태적 변화 및 신경세포 유사 특성 확인**

[0192] 래트의 염증 관련 세포 중 하나인 비장세포 처리를 통하여 MSCs에 염증성 자극 여부를 확인하고, 이에 따른 MSCs의 형태적 변화 및 콜린성 신경세포 유사 표현형으로의 변화 정도를 확인하였다.

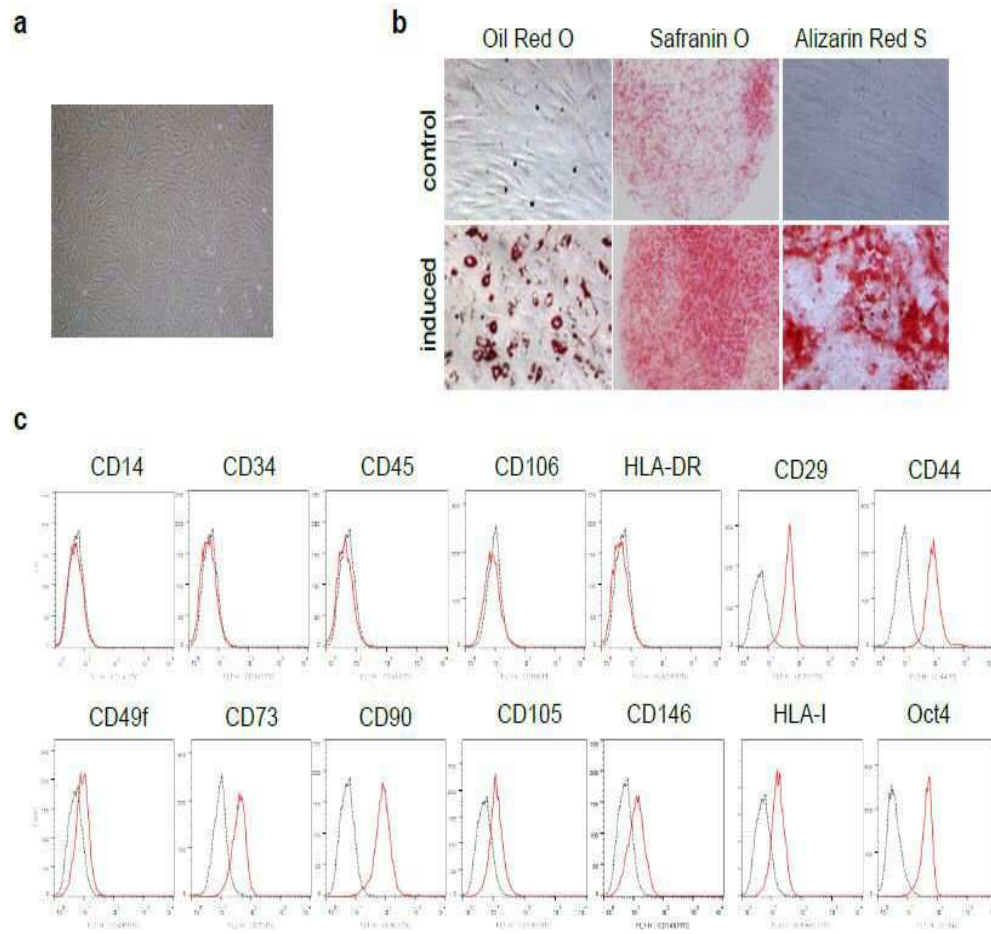
[0193] 구체적으로, Sprague-Dawley 래트(Orient, Sungnam, Korea)의 비장세포(Splenocytes, SP)를 1 μ g/ml anti-CD3 (BD Biosciences) 및 anti-CD28 (BD Biosciences) 항체(α CD3/CD28)와 함께 배양하여 활성화하였다. 이 후, CD3/CD28-활성화된 마우스 비장세포(2×10^5)와 MSCs(4×10^3 내지 4×10^4)을 1:5, 1:10 및 1:20의 비율로 배양하

고, 이의 형태학적 변화를 확인하였다.

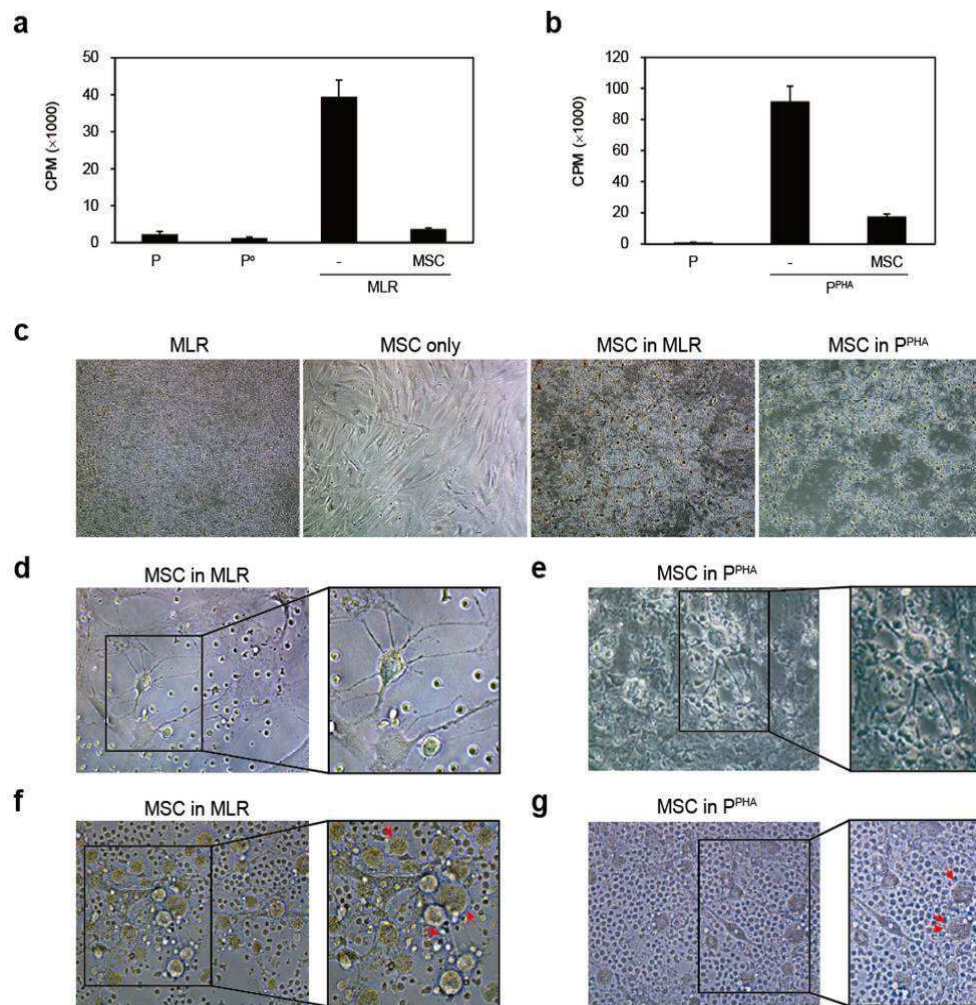
- [0194] 또한, 콜린성 뉴런 또는 신경전구세포 관련 마커인 ChAT, NCAM1, Tuj1, NF-M, nestin, MBP, TH 및 GABA을 이용하여 이의 발현을 확인하였다. 또한, 래트의 비장세포 처리된 MSCs의 신경성장인자 수용체인 TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR}의 mRNA 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.
- [0195] 도 17의 a에 나타난 바와 같이, 래트의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 림프구 증식 억제제가 제대로 이루어지지 않음을 확인하였다.
- [0196] 도 17의 b에 나타난 바와 같이, 래트의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 콜린성 신경세포 유사 표현형으로 변화되지 않음을 확인하였다.
- [0197] 도 17의 c에 나타난 바와 같이, 래트의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 콜린성 뉴런 또는 신경 전구 세포 관련 마커인 ChAT, NCAM1, Tuj1, NF-M, nestin, MBP, TH 및 GABA이 발현되지 않음을 확인하였다.
- [0198] 도 17의 d에 나타난 바와 같이, 래트의 비장세포 처리된 MSCs는 염증성 자극이 되지 않아, 신경성장인자 수용체인 TrkA, TrkB, TrkC 및 p75^{NTR}의 mRNA 발현이 일반 MSCs보다 더 낮음을 확인하였다.
- [0200] 따라서, MSCs의 콜린성 뉴런-유사 표현형(cholinergic neuron-like phenotype)으로의 변화 및 신경세포 유사 특성은 마우스 또는 래트에서는 나타나지 않는 인간 특이적 현상임을 확인하였다.
- [0202] **실시예 9. 마우스 내 인간 세포의 ChAT 또는 nestin 발현 여부 및 MSC 세포질 발생 여부 확인**
- [0203] PBMCs 및 MSCs 처리에 따른 마우스 내 인간 세포의 ChAT 또는 nestin 발현 여부 및 MSC 세포질 발생 여부 확인하였다.
- [0204] 구체적으로, 도 18의 a에 나타난 바와 같이, 일시적인(transient) 인간화 GVHD 마우스 모델을 제작하기 위하여, 10주령의 Balb/c 수컷 마우스(Central Lab Animal, Seoul, Korea) (n = 3)에 8.5 Gy (4MV Linac; Siemens, Berlin, Germany)를 방사선 조사하였다. 조사 24시간 후, 상기 마우스에 각각 PBMCs(P1 또는 P2; 5×10^6 cells/each/head) 또는 혼합된 PBMCs (P1+P2; 1×10^7 cells/head, 혼합비는 1:1)를 주입하였다. 그 후, 인간 MSCs (1×10^6 cells/head)를 상기 마우스에 각각 주입하고 48시간 후, 상기 각 마우스를 희생시켜 2차 림프 기관(비장 및 표면 자궁경부(superficial cervical), 겨드랑이, 장간막 및 서혜부의 림프 노드(inguinal lymph nodes))을 적출한 후, 동결하여 각 절편을 준비하였다. ChAT⁺ nestin⁺ 인간 세포를 확인하기 위하여, 상기 각 마우스에 인간-특이적 항- ChAT 및 항-nestin 항체로 면역형광 염색하여 이를 확인하였다. DAPI는 핵의 염색을 확인하기 위해 사용하였다. 또한, MSC 추적 실험을 위해, 상기 각 마우스에 제조사의 프로토콜에 따라, MSC의 세포질 여부를 확인하기 위하여, 생체 적합한 실리카-코팅된 형광 나노입자(Neostem; Biterials, Seoul, Korea)로 표지하였다. 그 결과를 도 18에 나타내었다.
- [0205] 도 18의 b에 나타난 바와 같이, 혼합된 PBMCs (P1+P2)를 주입 후, 인간 MSCs를 주입한 마우스의 장간막 림프 노드(mesenteric lymph nodes)에서 anti-ChAT 및 anti-nestin의 항체가 발현됨을 확인하였다.
- [0206] 도 18의 c에 나타난 바와 같이, 혼합된 PBMCs (P1+P2)를 주입 후, 인간 MSCs를 주입한 마우스에서 MSC의 세포질이 발견됨을 확인하였다.
- [0208] 상기 일련의 실험을 통하여, 도 19에 나타난 바와 같이, 본 발명의 염증성 조건(혼합림프구반응(MLR) 조건 또는 식물성혈구응집소(PHA) 처리 조건) 처리는 MSCs를 실제 뉴런세포로의 전환분화(transdifferentiation)시키는 것이 아니라, 콜린성 뉴런-유사 표현형으로 변화시킨다는 것을 확인하였다. 염증성 조건으로 처리된 MSCs는 신경성장인자 수용체(neurotrophin receptor), 니코틴 콜린성 수용체의 발현이 증가하며, 구체적으로, 상기 신경성장인자 수용체 중 TrkA 및 p75^{NTR}의 발현이 유의적으로 증가하였으며, 염증환경에 있는 면역세포들에서 발현된 신경성장인자 NGF 및 BDNF들에 의해 자극받아 콜린성 뉴런-유사 세포 모양으로 변화됨을 확인하였다. 또한, 본 발명의 염증성 조건으로 처리된 MSCs는 아세틸콜린을 분비하여 면역세포 표면에 증가된 니코틴 콜린성 수용체(nicotinic cholinergic receptors)인 nAChR $\alpha 7$ 을 통하여 활성화된 면역세포들을 억제할 수 있음을 확인하였고, 이러한 특성들을 활용하면 면역질환 또는 염증 질환의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

도면

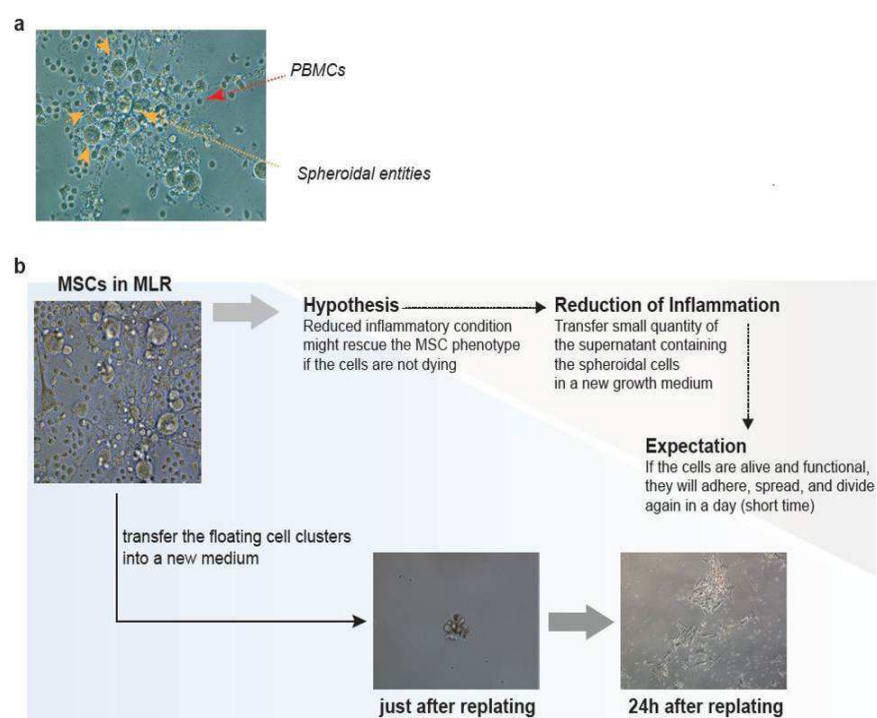
도면1



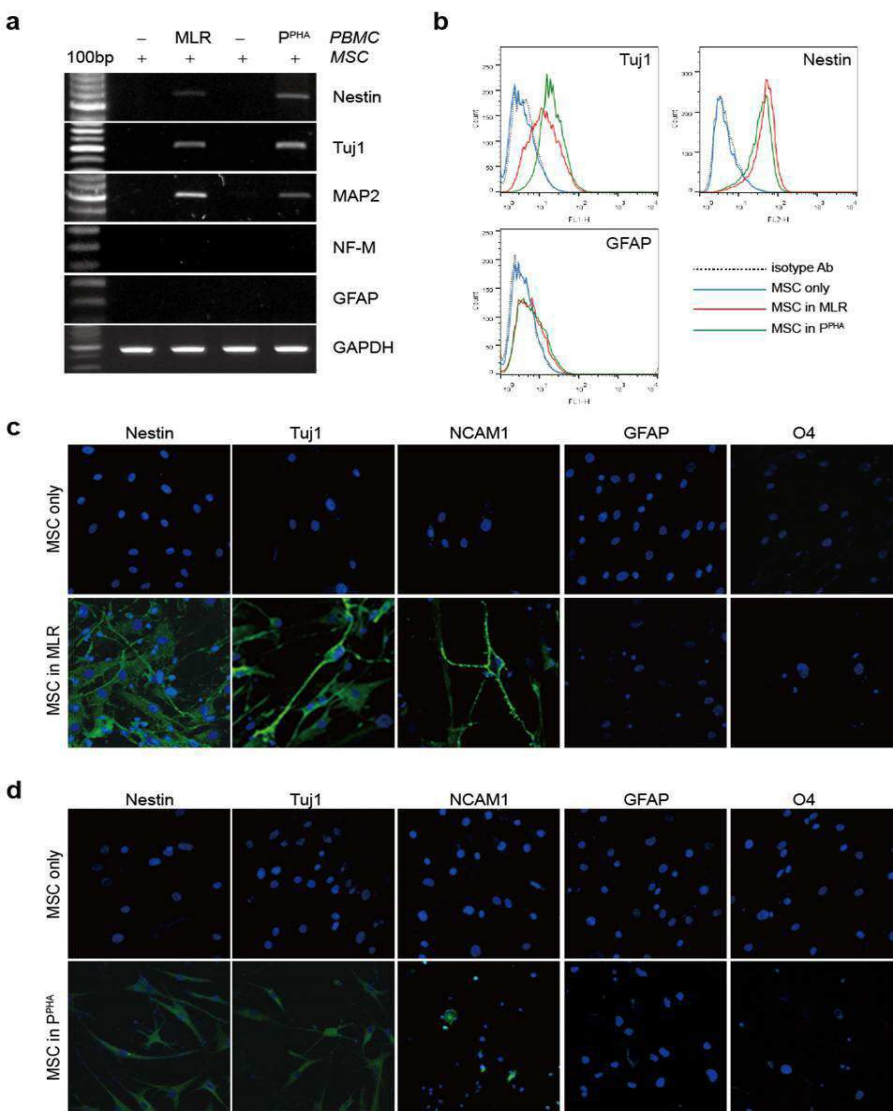
도면2



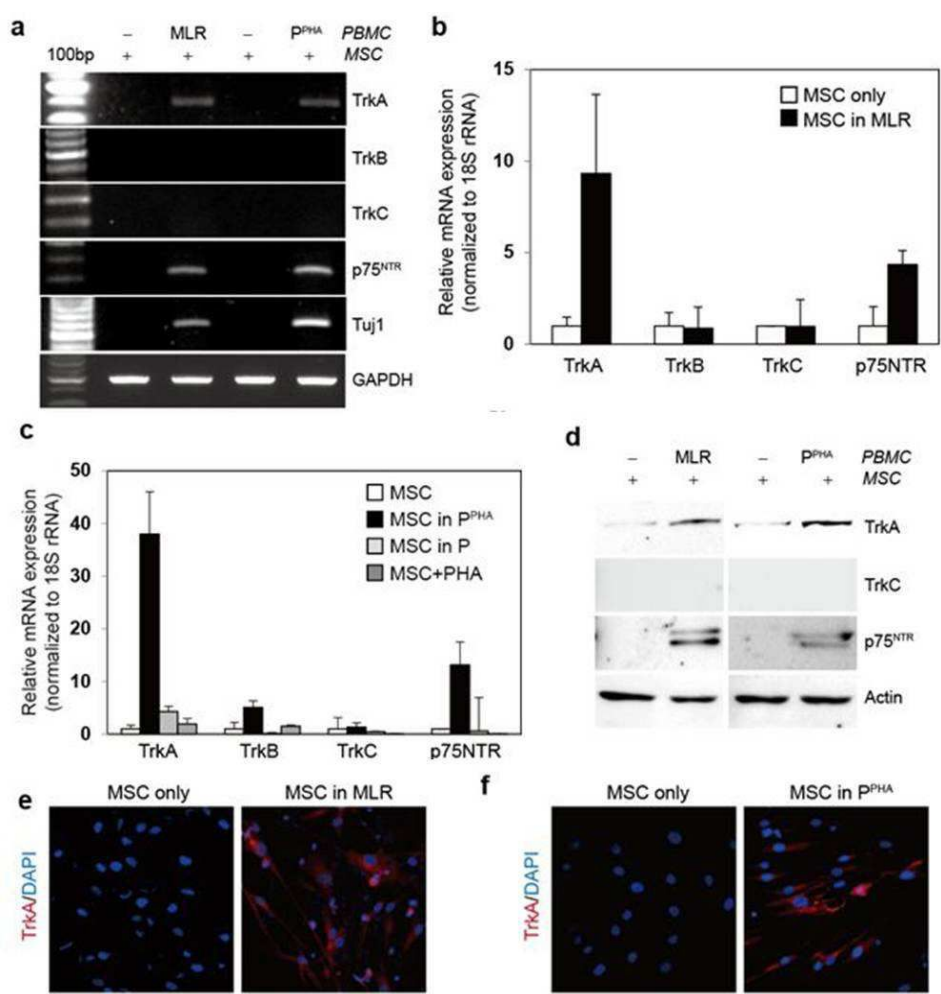
도면3



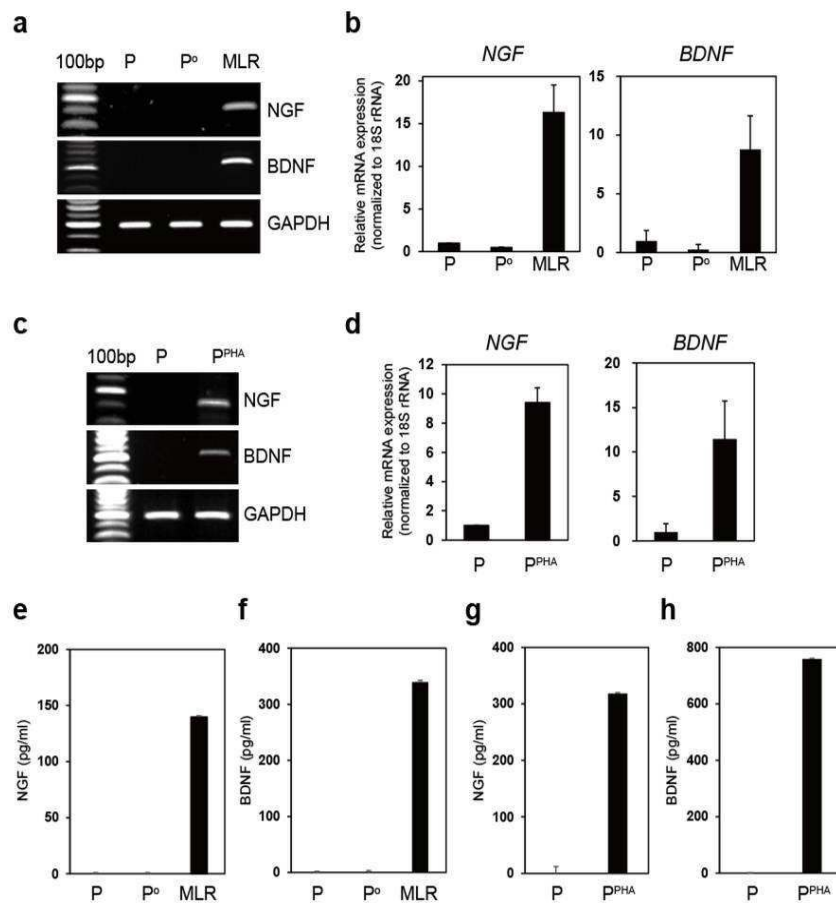
도면4



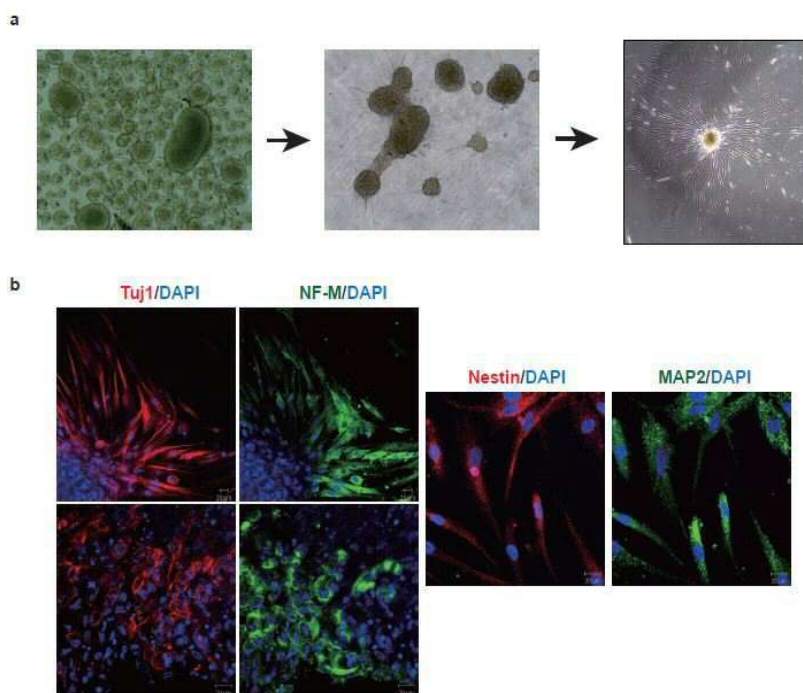
도면5



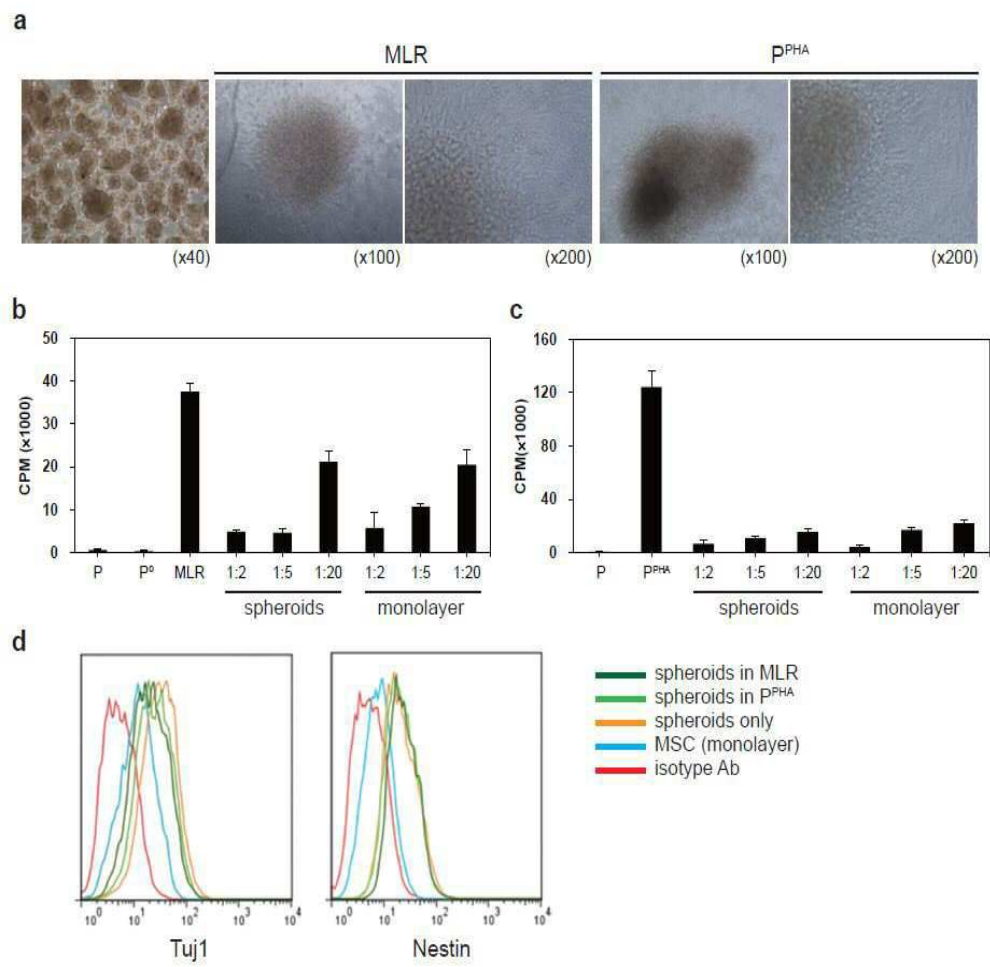
도면6



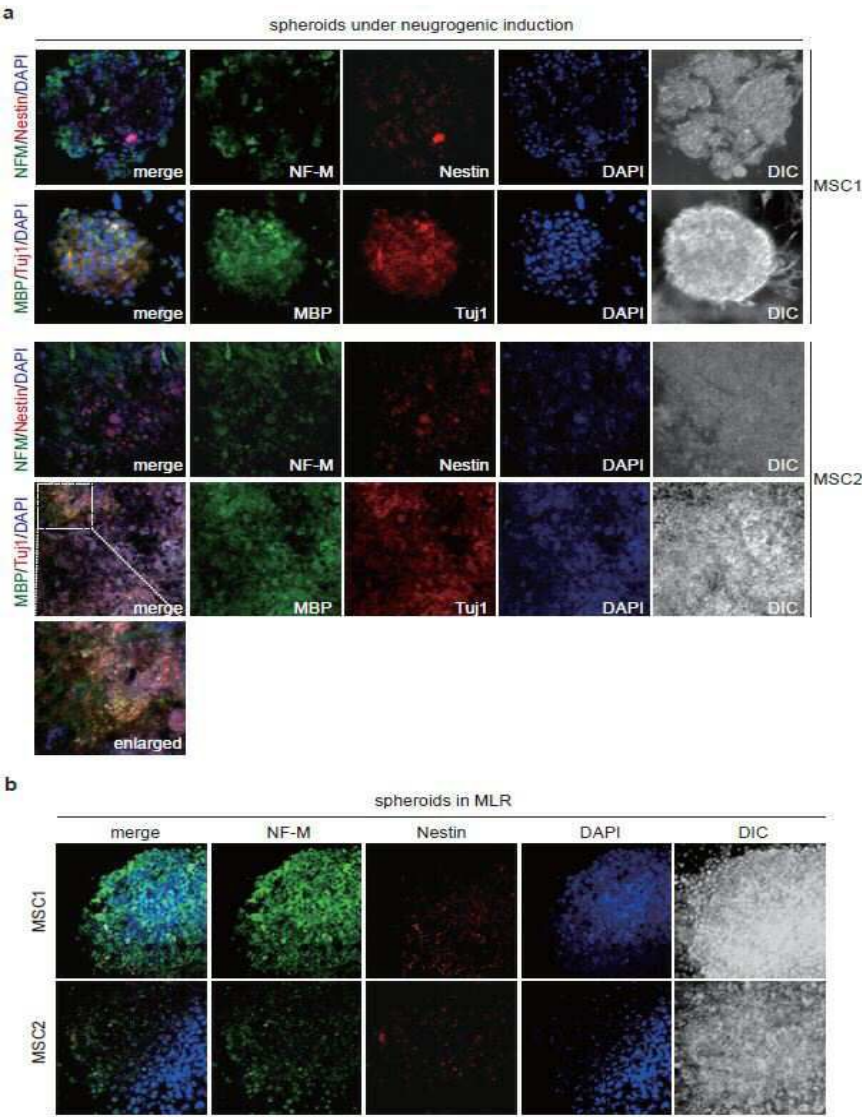
도면7



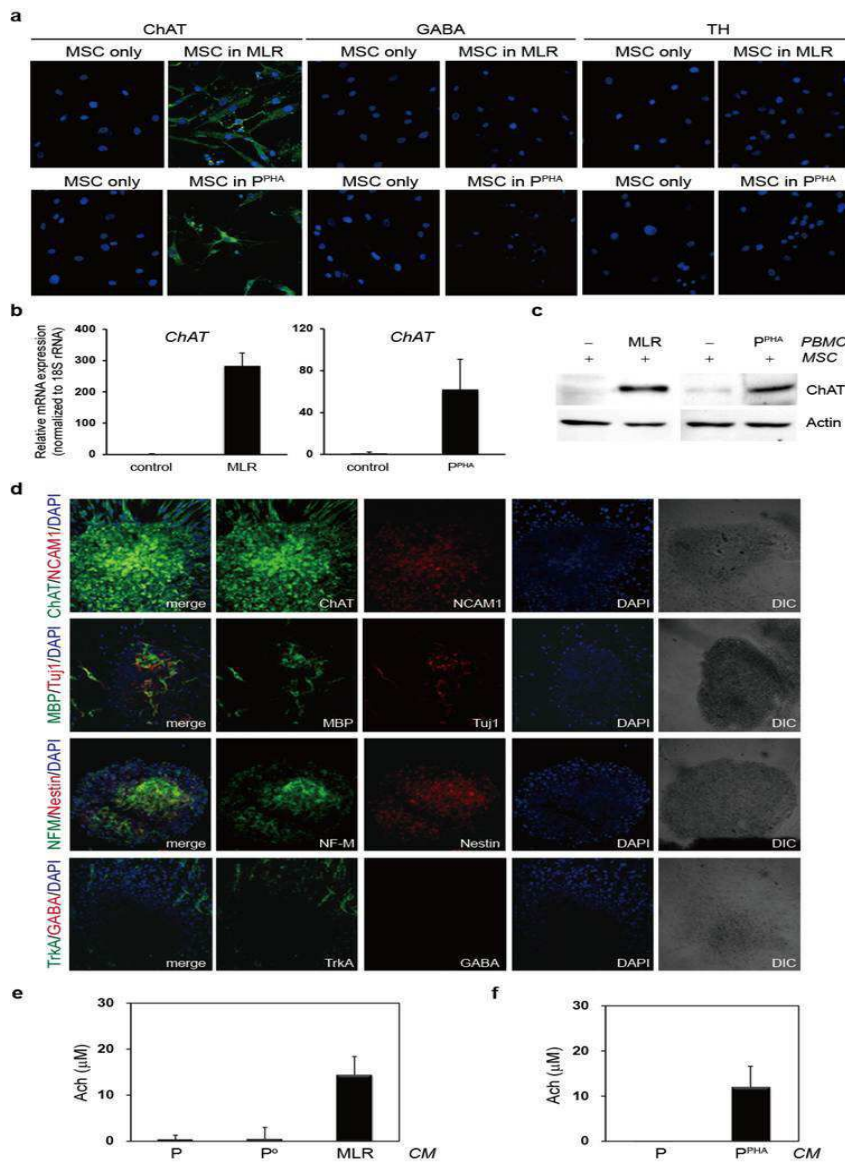
도면8



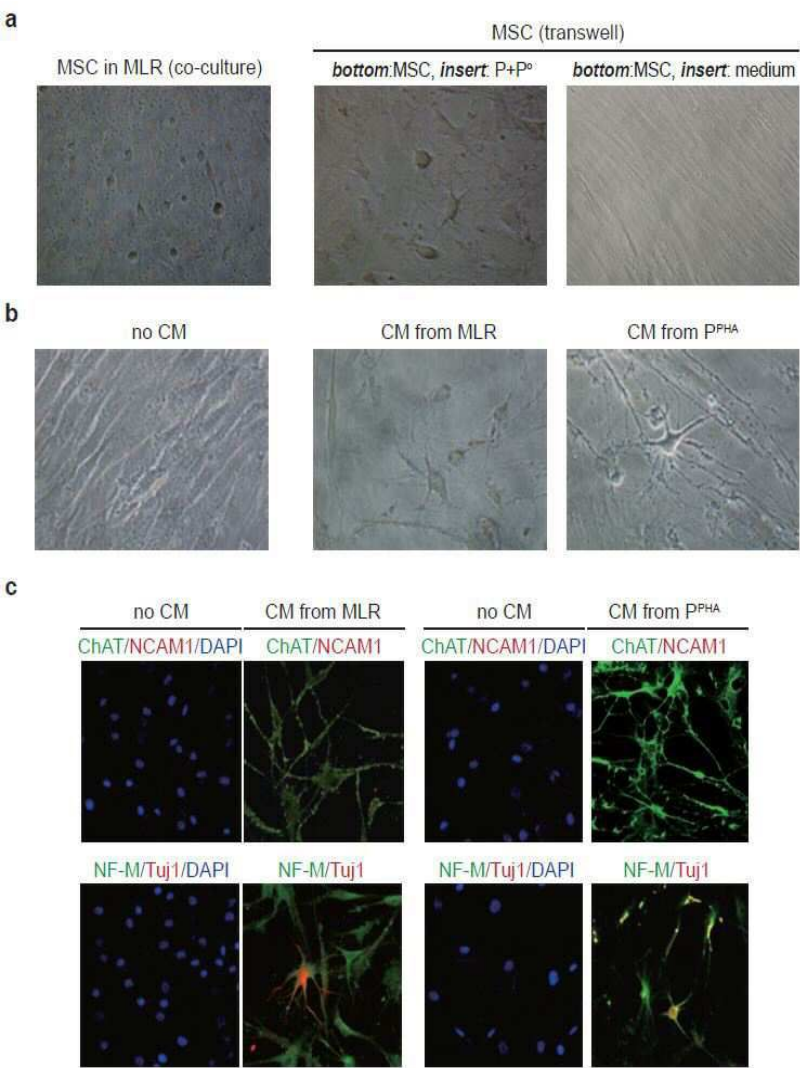
도면9



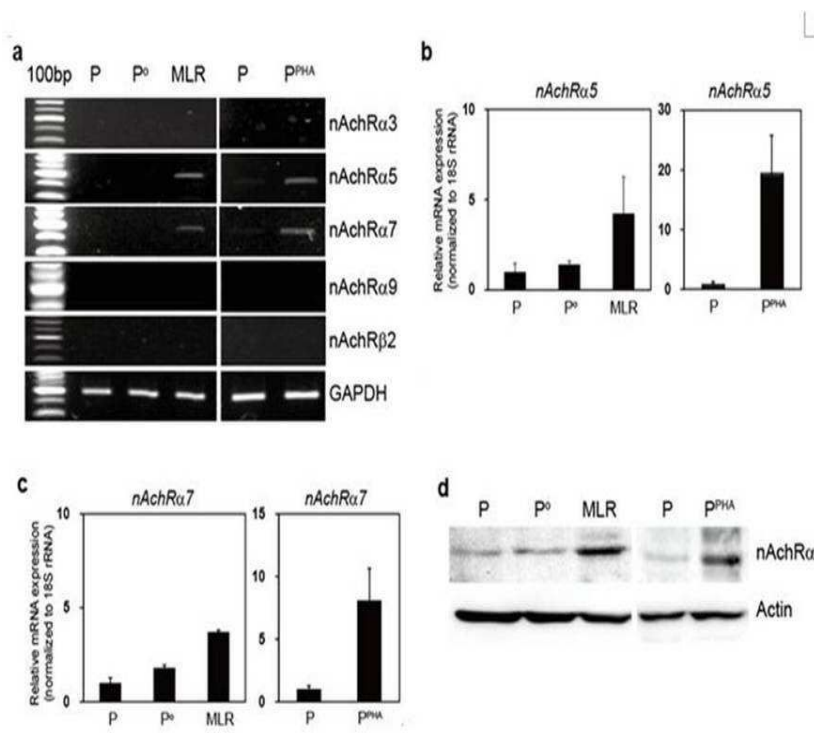
도면10



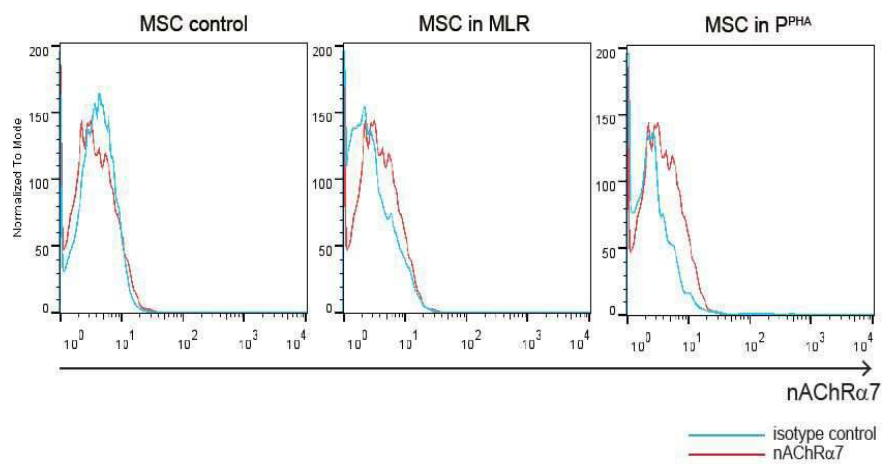
도면11



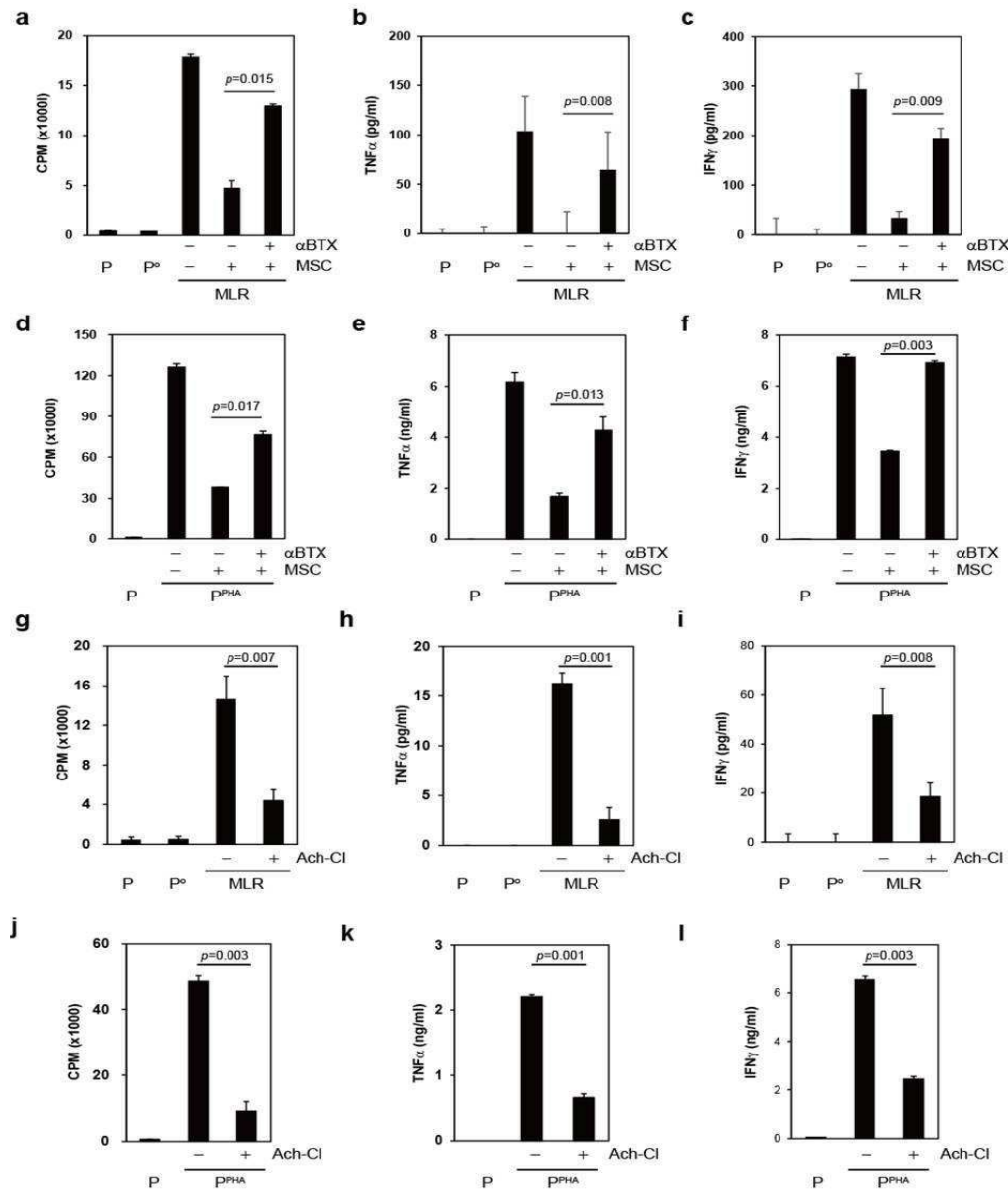
도면12



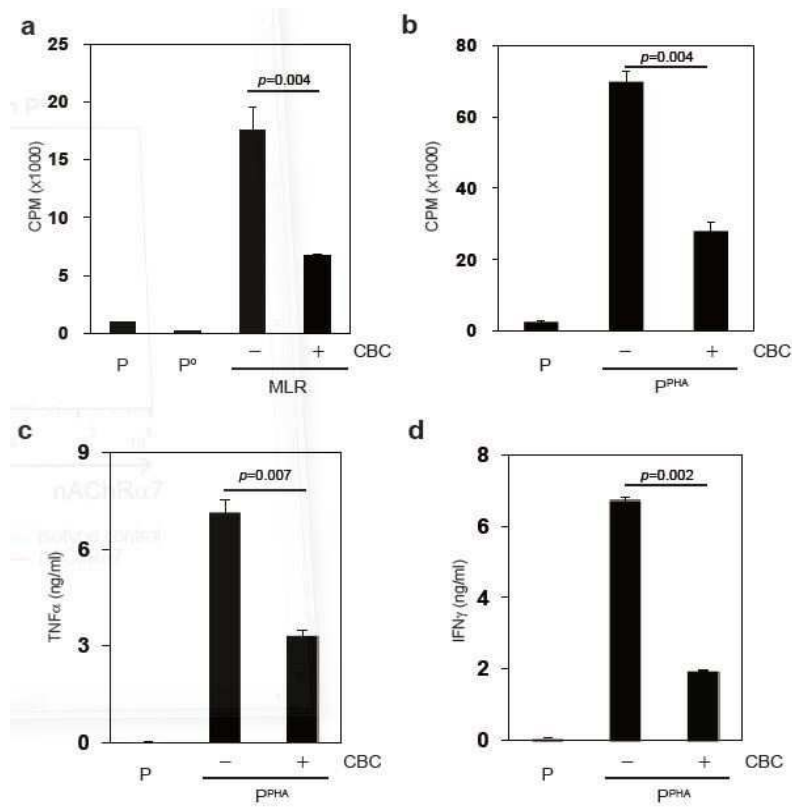
도면13



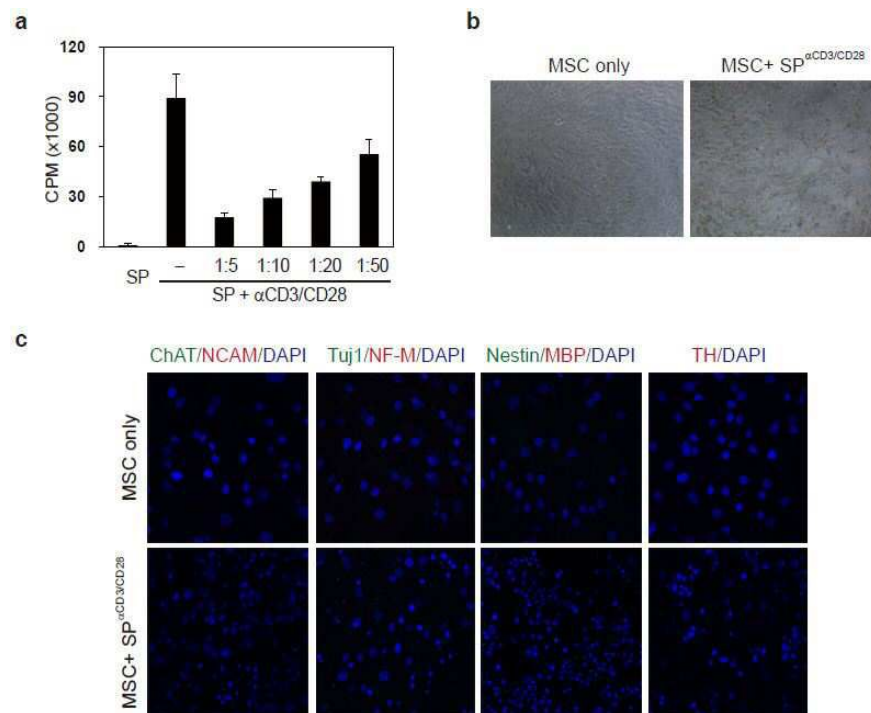
도면14



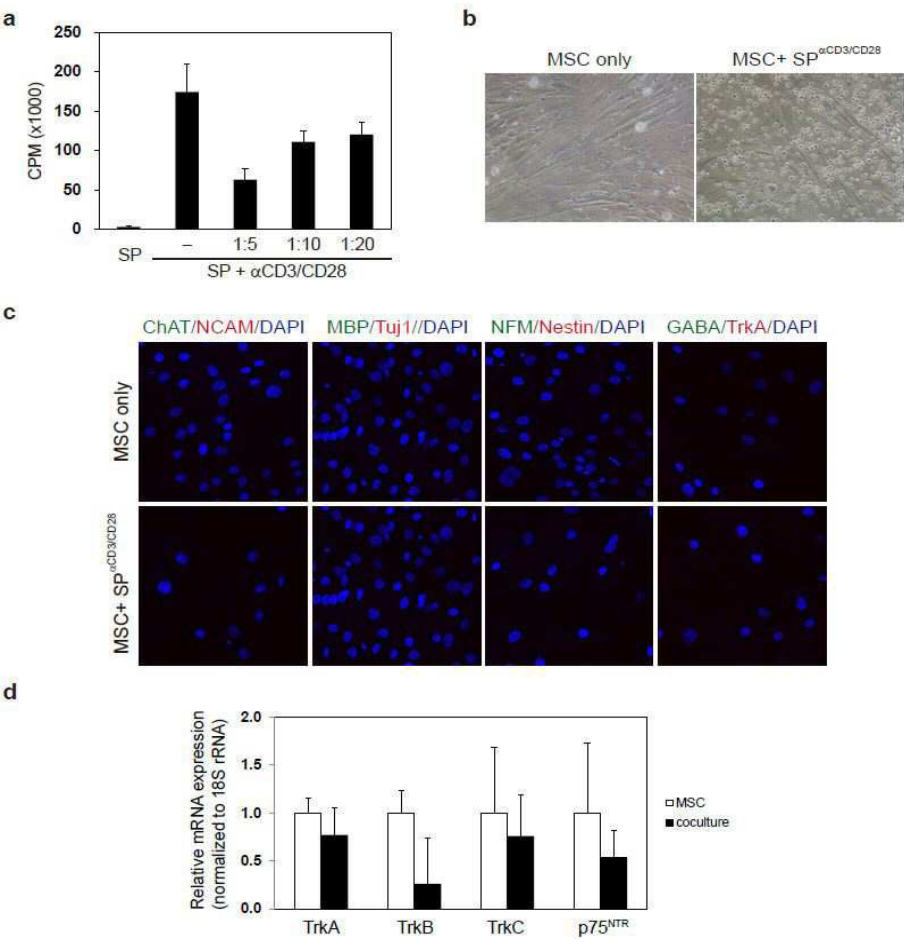
도면15



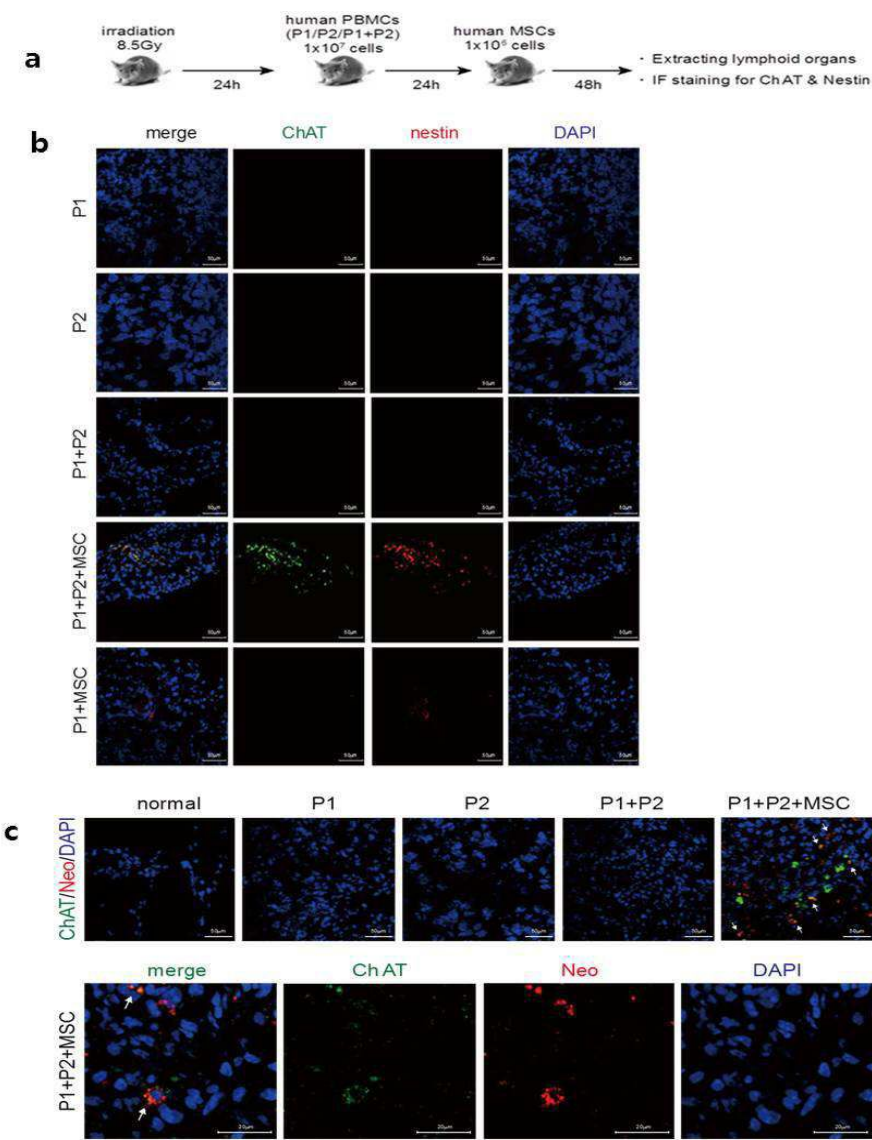
도면16



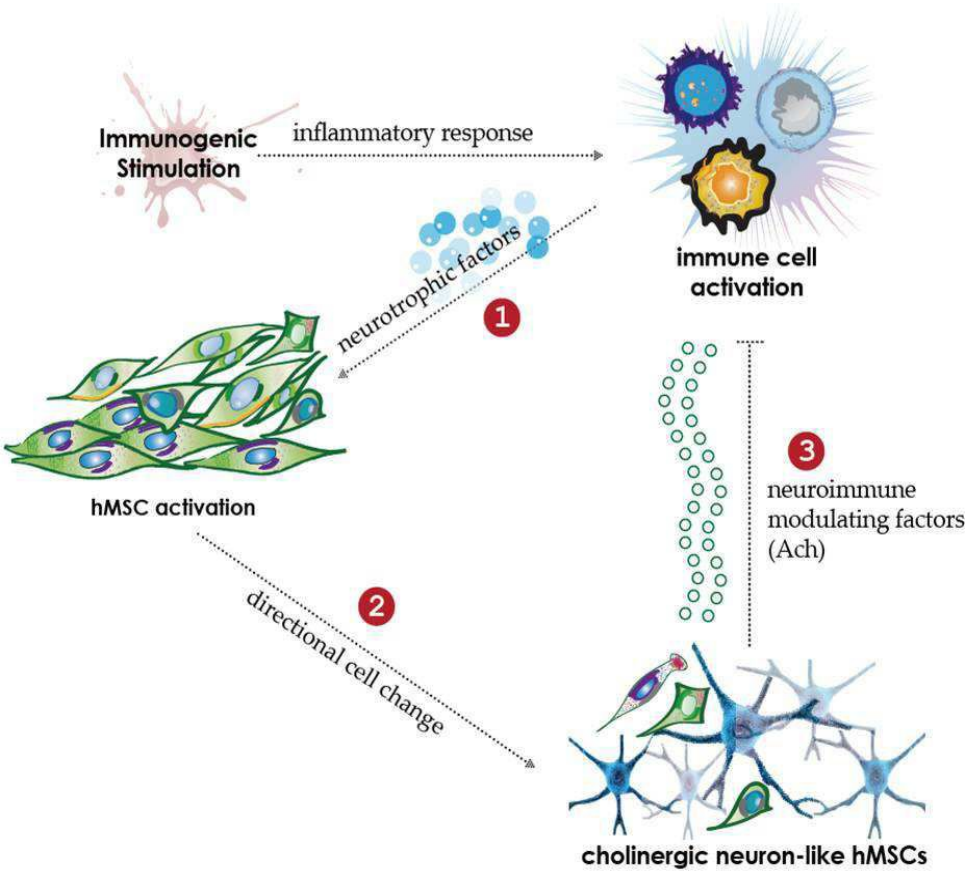
도면17



도면18



도면19



서열 목록

- <110> SCM Lifescience Co., Ltd
- <120> Pharmaceutical composition for prevention or treatment of immune diseases and inflammatory diseases comprising immunogenic stimulated mesenchymal stem cells
- <130> 1-4
- <160> 34
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward Primer of MAP2
- <400> 1
- taagtttgga gcaagcagtt acag
- <210> 2
- <211> 24

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of MAP2

<400> 2

ttctctccat acacttttgg atca 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of Tuj1

<400> 3

aacgaggcct cttctcaca 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of Tuj1

<400> 4

cgataccagg tggttgaggt 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of GFAP

<400> 5

gagtaccagt acctgaaga 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of GFAP

<400> 6

ttcaccacga tgttctcttt 20

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of NF-M

<400> 7
 ttgtgtttcc tctatgatct cctc 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of NF-M

<400> 8
 agatggctct ggatatagaa atcg 24

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of nestin

<400> 9
 tccagagctg tcaatgactc taag 24

<210> 10

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of nestin

<400> 10
 gaccactcca gtttagagc taag 24

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of TrkA

<400>	11	
gaagagtggg	ctccgtttcg	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse Primer of TrkA	
<400>	12	
ctgactgctc	cagctctgtg	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward Primer of TrkB	
<400>	13	
atcccttcca	cagacgtcac	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse Primer of TrkB	
<400>	14	
tcctgctcag	gacagaggtt	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward Primer of TrkC	
<400>	15	
acaagatgct	tgtggctgtg	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of TrkC

<400> 16

gggccctgag gaacttatc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of p75NTR

<400> 17

agccttcaag aggtggaaca 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of p75NTR

<400> 18

ctgcacagac tctccacgag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of NGF

<400> 19

atacaggcgg aaccacactc 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of NGF

<400> 20

gtctgtggcg gtggtcttat 20

<210> 21

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of BDNF
 <400> 21
 tggctgacac tttcgaacac 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of BDNF
 <400>
 > 22
 cttatgaatc gccagccaat 20
 <210> 23
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of nAChR-alpha-3
 <400> 23
 ccatgtctca gctggtg 17
 <210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of nAChR-alpha-3
 <400> 24
 gtccttgagg ttcattga 18
 <210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of nAChR-alpha-5
 <400> 25

gataatgcag atggacgt	18
<210> 26	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse Primer of nAchR-alpha-5	
<400> 26	
tgatggtatg atctcttc	18
<210> 27	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	
> Forward Primer of nAchR-alpha-7	
<400> 27	
cccggcaaga ggagtgaag gt	22
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse Primer of nAchR-alpha-7	
<400> 28	
ccgggcctct tcattgcgag	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward Primer of nAchR-alpha-9	
<400> 29	
ctacaatggc aatcaggtgg	20
<210> 30	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Reverse Primer of nAchR-alpha-9

<400> 30

atgatgtgtca acgcagtgg 19

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of nAchR-beta-2

<400> 31

cagctcatca gtgtgca 17

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Reverse Primer of nAchR-beta-2

<400> 32

gtgcggtcgt aggtcca 17

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of GAPDH

<400> 33

gtcatccatg acaactttgg tatc 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of GAPDH

<400> 34

ctgtagccaa attcgttgtc atac 24