

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 10월 12일 (12.10.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/176050 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/077 (2010.01) A61K 35/28 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/44 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/003739
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 5일 (05.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0042201 2016년 4월 6일 (06.04.2016) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222 가톨릭대학교 성의교정내, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 오일환 (OH, Il Hoan); 06084 서울시 강남구 학동로 88길 5, 1동 1403호 (삼성동, 진흥아파트), Seoul (KR). 김진아 (KIM, Jin A); 02714 서울시 성북구 길음로 119, 205동 803호 (길음동, 길음뉴타운), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

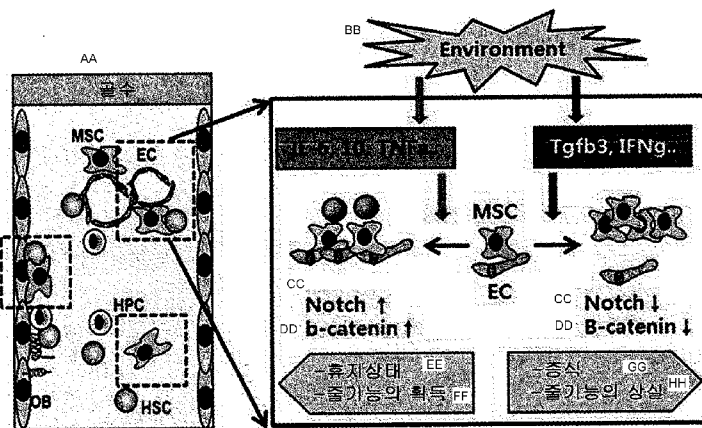
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: TECHNIQUE FOR ENHANCING STEM CELL REGENERATION THROUGH INTERACTION OF VASCULAR ENDOTHELIAL CELL AND MESENCHYMAL STEM CELL

(54) 발명의 명칭 : 혈관 내피세포와 중간엽 기질세포의 상호작용을 통한 줄기세포 재생 증진기술

[도15]



AA ... Bone marrow
BB ... Environment
CC ... Notch
DD ... b-catenin
EE ... Quiescent
FF ... Acquisition of stemness
GG ... Proliferation
HH ... Loss of stemness

(57) Abstract: In the present invention, it was discovered that when vascular endothelial cells are co-cultured with mesenchymal stem cells, an improvement is brought about in the niche activity of mesenchymal stem cells and the self-renewal of hematopoietic or neural stem cells and particularly that the niche activity and the self-renewal of hematopoietic or neural stem cells can easily be controlled by regulating the stimulus (cytokines, etc.) of vascular endothelial cells to the mesenchymal stem cells. Therefore, the present invention can not only improve the self-renewal of stem cells, but also easily control it as needed, and thus is expected to expand the usefulness of mesenchymal stem cell-based cell therapy.

(57) 요약서: 본 발명에서는, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 공배양시킨 경우, 중간엽 줄기세포의 니치 활성, 및 조혈 또는 신경 줄기세포의 자가 재생능이 향상되며, 특히, 중간엽 줄기세포에 대한 혈관 내피세포의 자극을 조절함 (사이토카인 등)으로써, 상기 니치 활성 및 조혈 또는 신경 줄기세포의 자가 재생능을 손쉽게 조절할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 줄기세포의 자가 재생능을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 필요에 따라 이를 손쉽게 조절할 수 있는바, 중간엽 줄기세포 기반 세포 치료의 효용성을 확장시킬 수 있을 것

이라 기대된다.

WO 2017/176050 A1

명세서

발명의 명칭: 혈관 내피세포와 중간엽 기질세포의 상호작용을 통한 줄기세포 재생 증진기술

기술분야

- [1] 본 발명은 혈관 내피세포와 중간엽 기질세포의 상호작용을 통한 줄기세포 재생 증진기술에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 21세기의 생명공학은 인간복지를 최종목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 최근 줄기세포의 기술은 난치병 치료의 새로운 기술로 떠오르고 있다. 이전까지는 인간의 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역거부와 공급 장기 부족, 백터 개발이나 질환 유전자에 대한 지식 부족으로 효율적인 실용화가 미진하였다.
- [3] 이에, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포에 대한 관심이 고조되어, 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근원적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되고 있으며, 많은 과학자가 인체의 거의 모든 장기 재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상 등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해 왔다.
- [4] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 여러 가지 줄기세포 분류 중 만능줄기세포(pluripotent stem cell)라 함은 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer) 모두로 분화할 수 있는 다기능성을 지닌 줄기세포를 지칭한다. 줄기세포를 분류함에 있어, 해부학적인 존재부위, 세포의 기능, 세포표면에 표현된 항원의 종류, 전사인자, 세포가 생성하는 단백질 또는 그 줄기세포가 만들어 낼 수 있는 특정 세포 종류에 따라 분류할 수 있는데, 이러한 여러 가지 분류 중 가장 흔히 이용되고 비교적 명확한 분류는 줄기세포가 분리된 개체에 따른 것이다.
- [5] 배아(embryo)에서 분리된 경우 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)와 성체에서 분리된 경우 성체 줄기세포(adult stem cell)로 나눌 수 있다. 또 다른 혼한 분류는 하나의 줄기세포로부터 몇 종류의 분화된 세포를 만들어 낼 수 있는가에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotent) 줄기세포로 나눌 수 있으며, 일반적으로 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)는 만능줄기세포로, 성체줄기세포(adult stem cell)는 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotent) 줄기세포로 구분할 수 있다. 수정 후 발생 초기인 배반포기(blastocyst)의 내부세포덩어리(세포내피, inner cell mass)는 장차 태아를 형성할 부분으로서 이 내부세포덩어리로부터 형성된 배아줄기세포(embryonic

stem cell, ES cell)는 한 개체를 구성하는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 만능줄기세포(pluripotent stem cell)라 할 수 있다. 즉, 배아줄기세포는 무제한적으로 증식이 가능한 미분화 세포이고, 모든 세포로 분화할 수 있으며 성체줄기세포와 달리 배(germ) 세포도 만들 수 있어 다음 세대로 유전될 수 있다.

- [6] 다능성 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고, 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다. 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기세포의 원천이지만, 다능성 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 획득할 수 있다. 그러나 골수와 같은 성체 조직 내의 줄기세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크리닝되어 있는 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기세포들은 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다. 따라서 최근 이러한 인간 줄기세포의 동정, 증식 및 분화에 대한 관심이 크다.
- [7] 또한, 조직 공학, 유전자 치료 및 세포 치료제에서의 줄기세포의 적용이 급속도로 진행되면서 현재 당업계에서는 줄기세포에 대한 관심이 폭발적으로 증대되고 있는바, 다양한 조직으로부터 획득한 줄기세포의 개발 및 보다 안정되면서도 뛰어난 증식효과를 나타낼 수 있는 줄기세포의 증식 방법 및 여러 세포 또는 조직으로의 안정된 분화 방법에 대한 기술이 절실히 요구되고 있는 상황이다 (한국 공개특허 10-2012-00111301).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 중간엽 기질세포-기반 세포 치료의 유효성을 향상시키기 위하여 예의 노력한 결과, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 공배양시킨 경우, 중간엽 줄기세포의 니치 활성화, 및 조혈 또는 신경 줄기세포의 자가 재생능이 향상되며, 특히, 중간엽 줄기세포에 대한 혈관 내피세포의 자극을 조절함 (사이토카인 등)으로써, 상기 니치 활성을 손쉽게 조절할 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [9] 본 발명의 목적은 혈관 내피세포를 이용한 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물을 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 체외로 분리된, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 물리적으로 접촉되어 있는 상태로 공배양하는 단계를 포함하는, 니치 활성화 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관 내피세포를 이용한 중간엽 줄기세포의 니치 활성화 조절방법을 제공하는데 있다.
- [12]
- [13] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에

제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포를 포함하는, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 혈관 내피세포는 STAT3 활성이 증가되어 있는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 혈관 내피세포는 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 포함하는 벡터로 형질감염된 것일 수 있고, b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자가 처리된 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 체외로 분리된, 중간엽 줄기세포를 추가로 포함하며, 상기 중간엽 줄기세포는 혈관 내피세포와 물리적으로 접촉된 상태로 제공되는 것일 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명은 혈관 내피세포; 및 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자를 포함하는 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 체외로 분리된, 중간엽 줄기세포를 추가로 포함하며, 상기 중간엽 줄기세포는 혈관 내피세포와 물리적으로 접촉된 상태로 제공되는 것일 수 있다.
- [20] 또한, 체외로 분리된, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 물리적으로 접촉되어 있는 상태로 공배양하는 단계를 포함하는, 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 공배양하는 단계 전, 혈관 내피세포에 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 과발현시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [22] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 공배양하는 단계는 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자를 첨가하여 공배양하는 것일 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명은 체외로 분리된, 중간엽 줄기세포와 물리적으로 접촉되어 있는 상태로 공배양되는, 혈관 내피세포 내 Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현 또는 저발현시키는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 과발현시키는 단계는, 혈관 내피세포를 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느

하나를 포함하는 벡터로 형질감염시키거나, 혈관 내피세포에 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 처리하는 것일 수 있다.

[25] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 저발현시키는 단계는 혈관 내피세포에 Tgfb3, IFN- γ 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 처리하는 것일 수 있다.

[26] 한편, 본 발명에서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방조직, 골수, 말초 혈액 또는 체대혈에서 유래한 것일 수 있고, 상기 성체 줄기세포는 조혈 줄기세포 또는 신경 줄기세포일 수 있다.

발명의 효과

[27] 본 발명에서는, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 공배양시킨 경우, 중간엽 줄기세포의 니치 활성화, 및 조혈 또는 신경 줄기세포의 자가 재생능이 향상되며, 특히, 중간엽 줄기세포에 대한 혈관 내피세포의 자극을 조절함(사이토카인 등)으로써, 상기 니치 활성화 및 조혈 또는 신경 줄기세포의 자가 재생능을 손쉽게 조절할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 줄기세포의 자가 재생능을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 필요에 따라 이를 손쉽게 조절할 수 있는바, 중간엽 줄기세포-기반 세포 치료의 효용성을 확장시킬 수 있을 것이라 기대된다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 혈관 내피세포와의 공배양에 따른 중간엽 줄기세포의 특성 변화를 확인하기 위한 실험과정을 개략적으로 나타낸 모식도이다.

[29] 도 2는 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 세포 성장 변화를 확인한 것으로서, 중간엽 줄기세포 각각의 (A) 형태적 특징; (B) 크기; 및 (C) 증식 정도를 비교한 결과이다.

[30] 도 3은 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 세포 성장 변화를 확인한 것으로서, 중간엽 줄기세포 각각의 (A) 세포 주기; 및 (B) 세포 주기 조절 인자를 비교한 결과이다.

[31] 도 4는 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 향상을 확인한 것으로서, 중간엽 줄기세포 각각의 (A) CFU-F; (B) 지방조직으로의 분화를 비교한 결과이다.

[32] 도 5는 혈관 내피세포와 비접촉되어 있는 상태로 배양된 군(EC-CM)과 중간엽 줄기세포를 단독배양한 군(MSC-CM)간 중간엽 줄기세포 각각의 (A) 크기; (B) 세포 증식; (C) CFU-F; 및 (D) 골 형성 또는 지방조직으로의 분화를 비교한 결과이다.

[33] 도 6은 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 세포 특성 변화를 확인한 것으로서, 혈관주위(perivascular) 특성과 관련된 유전자의 발현을 비교한 결과이다.

[34] 도 7은 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 세포 특성 변화를

확인한 것으로서, 중간엽 줄기세포 각각의 (A) EMT 유전자; (B) EMC 유도 유전자; (C) EMT 유도-수용체 유전자; 및 다능성 관련 유전자를 비교한 결과이다.

- [35] 도 8은 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 니치 활성 향상 효과를 확인한 것으로서, (A) 실험과정의 개략적인 모식도; (B) 조혈모 유지 활성 (LSK 세포); 및 (C) 자가재생 마커의 발현을 비교한 결과이다.
- [36] 도 9는 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 니치 활성 향상 효과를 확인한 것으로서, 중간엽 줄기세포 각각의 (A) 조혈모 사이토카인의 발현; 및 (B) notch 리간드의 발현을 비교한 결과이다.
- [37] 도 10은 혈관 내피세포와의 공배양된 중간엽 줄기세포의 니치 활성 향상 효과를 확인한 것으로서, 공배양된 조혈 줄기세포 각각의 (A) notch repoter; 및 (B) notch 타겟 유전자의 발현을 비교한 결과이다.
- [38] 도 11은 니치 활성과 관련된 혈관 내피세포의 발현인자를 확인한 것으로서, 공배양된 혈관 내피세포의 (A) b-catenin; (B) b-catenin co-factor; (C) Wnt 수용체; 및 (D) b-catenin 조절자의 발현을 비교한 결과이다.
- [39] 도 12는 니치 활성과 관련된 혈관 내피세포의 발현인자를 확인한 것으로서, (A) 공배양된 혈관 내피세포의 Wnt 단백질 발현; (B) 공배양된 중간엽 줄기세포의 EphrinB2 및 ErB4 발현을 비교한 결과이고; 및 (C) 본 발명에 따른 조혈 줄기세포 자가재생 관련 메커니즘을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [40] 도 13은 혈관 내피세포의 자극 효과를 조절하는 신호 인자 규명한 것으로서, (A) 공배양된 혈관 내피세포의 Wnt 리간드 발현을 비교한 결과이고; 및 (B) 사이토카인 처리에 따른 공배양된 중간엽 줄기세포의 notch 리간드 발현을 비교한 결과이다.
- [41] 도 14는 혈관 내피세포의 자극 효과를 조절하는 신호 인자 규명한 것으로서, (A) 활성화형 STAT3 (STAT3-C; SC)와 억제형 STAT3 (dnSTAT3)을 발현하는 레트로바이러스 벡터의 모식도이고; (B) 활성화형 STAT3가 도입된 혈관 내피세포의 notch 리간드 발현을 확인한 결과이고; (C) 상기 혈관 내피세포 공배양된 중간엽 줄기세포의 CFU-F를 확인한 결과이고; 및 (D) 상기 중간엽 줄기세포의 조혈 줄기세포 자가재생능 향상 효과를 확인한 결과이다.
- [42] 도 15는 본 발명에 따른 조혈 줄기세포의 자가 재생능 조절 기전을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [43] 도 16은 척수 절단 동물모델을 대상으로 중간엽 줄기세포 및 혈관 내피세포의 혼합 투여에 의한 신경계 자가재생 촉진 효과를 확인한 것으로서, 운동 신경의 기능을 Basso Mouse Scale(BMS) 방법으로 분석한 결과이다.
- [44] 도 17은 척수 절단 동물모델을 대상으로 중간엽 줄기세포 및 혈관 내피세포의 혼합 투여에 의한 신경계 자가재생 촉진 효과를 확인한 것으로서, 감각 신경의 기능을 somatosensory evoked potential (SEP) 방법으로 분석한 결과이다.
- [45] 도 18은 척수 절단 동물모델을 대상으로 중간엽 줄기세포 및 혈관 내피세포의

혼합 투여에 의한 신경계 자가재생 효과를 확인한 것으로서, 척수절단손상 부위별 NeuN 양성 세포 수를 비교한 결과이다.

[46] 도 19는 척수 절단 동물모델을 대상으로 중간엽 줄기세포 및 혈관 내피세포의 혼합 투여에 의한 신경계 자가재생 효과를 확인한 것으로서, 척수절단손상 부위별 Tuj-1 양성 세포 수를 비교한 결과이다.

[47] 도 20은 척수 절단 동물모델을 대상으로 중간엽 줄기세포 및 혈관 내피세포의 혼합 투여에 의한 신경계 자가재생 효과를 확인한 것으로서, 척수절단손상 부위별 nestin 양성 세포 수를 비교한 결과이다.

[48] 도 21은 본 발명의 기술을 이용한 조혈 또는 신경 줄기세포의 자가재생능 조절 방법을 개략적으로 나타낸 모식도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[49] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[50]

[51] 본 발명은, Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포를 포함하는, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물; Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 성체 줄기세포의 자가재생 촉진방법; 및 성체 줄기세포의 자가재생 촉진을 위한 Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포의 용도를 제공한다.

[52] 본 발명에서 사용되는 용어, "자가 재생 (self-renewal)"은 동일한 성상 및 특징을 갖는 세포를 생산해내는 능력으로 자기복제, 자기복제, 자가재생이라고도 하며, 줄기세포가 가지는 중요한 특징의 하나이다. 특히, 본원 발명에서 자가 재생이란 분화되지 않은 상태를 유지하면서 증식을 계속하는 능력을 의미한다.

[53] 본 발명에서 사용되는 용어, 성체 줄기세포는 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotent) 줄기세포로서, 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 획득할 수 있다. 그러나 골수와 같은 성체 조직 내의 줄기세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크리닝되어 있는 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기세포들은 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다. 한편, 본 발명의 목적상, 상기 성체 줄기세포는 조혈 줄기세포 또는 신경 줄기세포일 수 있다.

[54] 본 발명에서 사용되는 용어, "조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell: HSC)"는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 혈액세포를 만드는 미분화된 골수조혈세포의 조상세포로서, 조혈모 세포라고도 한다. 용어, "신경 줄기세포(Neural stem cell; NSC)"는 신경계에 존재하는 원시세포로서 아스트로사이트 (astrocyte), 뉴런 (neuron) 및 올리고덴드로사이트 (oligodendrocyte) 등의 신경세포를 만드는 미분화된 줄기세포를 말한다. 조혈 줄기세포 또는 신경 줄기세포는 각각 골수

또는 신경계가 파괴된 숙주에 이식하였을 때 재생하는 동안 자가재생능(self-renewing capacity)을 가지고 장기간 재구성능력(repopulation)을 보여준다. 본 발명의 성체 줄기세포는 인간(human), 원숭이(monkey), 돼지(pigs), 말(horses), 소(cows), 양(sheep), 개(dogs), 고양이(cats), 생쥐(mice), 토끼(rats) 등의 모든 동물 유래의 성체줄기세포를 포함하나, 바람직하게는 인간 유래의 세포이다.

[55] 본 발명에서, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 물리적으로 접촉된 상태로 공배양시킴으로써, 중간엽 줄기세포의 니치 활성이 향상되고, 이에 따라 성체 줄기세포의 자가 재생능을 향상시킬 수 있음을 규명하였다. 특히, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포간 상호 작용에 의한 효과는, 혈관 내피세포의 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드에 의해 매개됨을 실험적으로 확인하였다. 따라서, 본 발명은 Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포를 이용한 중간엽 줄기세포의 니치 활성 증진 기술, 궁극적으로, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진 기술을 제공한다는 점에서 기술적 특징이 있다.

[56] 본 발명에서는, 당업계의 공지된 방법을 사용하여, 혈관 내피세포에 Wnt 또는 EphrinB2 리간드를 과발현시킬 수 있으며, 바람직하게 혈관 내피세포에 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 포함하는 벡터로 형질감염시키거나, 혈관 내피세포에 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자를 혈관 내피세포에 처리하여 과발현시킬 수 있다.

[57] 본 발명에서 사용되는 용어, 벡터는 상기 인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현 벡터를 말하며 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[58] 상기 플라스미드의 예로는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배큘로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스와의 복합체 등으로 구성된

군으로부터 선택된 바이러스가 사용될 수 있다. 당업자라면 본 발명의 유전자 또는 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에 도입시키는데 적합한 벡터를 사용할 수 있으며 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다.

- [59] 한편, 본 발명은 상기와 동일한 기능을 수행할 수 있는 범위 내에서 변형되어 적용될 수 있다. 우선, 전술한 바와 같이, 생체 내 존재하는 중간엽 줄기세포를 타겟으로 하여, 전술한 바와 같이 Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포만을 제공할 수 있다. 또한, 혈관 내피세포와 Wnt 또는 EphrinB2 리간드의 발현을 증진시킬 수 있는 사이토카인 (b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합)의 조합으로 제공될 수 있다. 이 뿐만 아니라, 상기 2 가지 형태의 조성물에 체외로 분리된 중간엽 줄기세포를 첨가하여 제공할 수 있으며, 이 때, 상기 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포는 물리적으로 접촉된 상태를 유지한 채로 이식될 수 있고, 또한, 필요에 따라 공배양 과정 후 체내 주입될 수도 있다.
- [60] 본 발명에서 사용되는 용어, 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell; MSC)는 연골, 뼈, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등을 만드는데 원조가 되는 세포로서, 성인에서는 일반적으로 골수에 머물러 있지만 제대혈, 말초혈액, 기타 조직 등에도 존재하며, 이들로부터 수득할 수 있는 세포를 의미한다. 본 명세서에서는, 중간엽 줄기세포는 중간엽 기질세포 또는 기질세포와 같은 의미로 사용된다. 상기 중간엽 줄기세포는 인간(human), 원숭이(monkey), 돼지(pigs), 말(horses), 소(cows), 양(sheep), 개(dogs), 고양이(cats), 생쥐(mice), 토끼(rats) 등의 모든 동물 유래의 세포를 포함하나, 바람직하게는 인간 유래의 세포일 수 있다.
- [61] 본 발명에서 사용되는 용어, 니치(Niche)는 줄기세포 및 그 외 체세포와 같은 조직세포의 발달 및 증식을 지원하는 조직 또는 기관으로 구성된 구성요소(세포 및/또는 물질)를 의미하며, 세포간 상호작용을 유발하고 전능성을 갖기 위하여 필요한 인자들을 분비하는 것으로 알려져 있다. 니치는 소위 미세환경(microenvironment)이라고도 말하며, 줄기세포의 모든 특징을 표현하는 줄기세포성(stemness)을 유지하는데 있어 핵심적인 역할을 한다. 줄기세포는 점착성 분자 성장 요소(adhesion molecules growth factors)로 이루어진 일종의 미세환경에 자리 잡고 있는바, 학계에서는 이를 니치라고 명명하며, 줄기세포의 이러한 영역은 입지(location), 점착성(adhesiveness), 귀소성(homing), 휴면성(quiescence), 활동성 (activation)을 유지하고 조정하는 역할을 하고 있다. 즉 니치는 줄기세포의 분화를 조정하며, 다른 곳으로의 이동 혹은 세포 자살을 막고 보호해주는 역할을 하는 줄기세포를 둘러싼 주요한 미세환경이라고 볼 수 있다.
- [62] 본 발명에 따른 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물은, 조혈 줄기세포의 이식을 필요로 하는 환자의 치료를 위해 이용될 수 있다. 구체적으로 급성

백혈병, 만성 백혈병, 골수이형성 증후군, 림프종, 다발성 골수종, 생식세포 종양, 유방암, 난소암, 소세포폐암, 신경아세포종양, 재생불량성 빈혈, 적혈구병증, 고서씨병, 헌터 증후군, ADA 효소결핍증, Wiskot-Aldrich 증후군, 류마티스 관절염, 전신성홍반성 낭창, 또는 다발성 경화증을 앓는 환자, 또는 항암제 투여 또는 방사선 조사로 인해 조혈세포가 손상된 환자에게 이식하기 위해 사용할 수 있다.

[63] 또한, 본 발명에 따른 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물은 신경 줄기세포의 이식을 필요로 하는 환자의 치료를 위해 이용될 수 있으며, 구체적으로 뇌졸중 (stroke), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 파킨슨병, 헌팅톤병 (Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 픽병(Pick's disease), 니이만병(Niemann pick disease) 및 척수 손상 질환 (spinal cord injury disease)으로 구성된 군에서 선택되는 퇴행성 신경계 질환을 앓는 환자에게 이식하기 위해 사용할 수 있다.

[64]

[65] 본 발명에서, 전술한 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포간 상호 작용의 효과는 혈관 내피세포 자체의 신호체계로부터 기인되는바, 혈관 내피세포에 대한 신호 조절이 중간엽 줄기세포의 니치 활성을 증폭하는 방법으로 활용될 수 있음을 규명하였다. 따라서, 본 발명은 혈관 내피 세포의 인자 (Wnt 및 EphrinB2)의 증진을 통해 중간엽 줄기세포의 니치 활성을 향상시킬 수 있다는 점에서 또 다른 기술적 특징이 있다.

[66] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 체외로 분리된, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 물리적으로 접촉되어 있는 상태로 공배양하는 단계를 포함하는, 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[67] 본 발명의 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법은 전술한 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물에서 기술한 바 있는 혈관 내피세포, 중간엽 줄기세포 등을 이용하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[68] 본 발명은 상기 공배양하는 단계 전, 혈관 내피세포에 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 과발현시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 공배양하는 단계는 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자를 첨가하여 공배양하는 것일 수 있다.

[69] 상기 과발현시키는 단계는 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C)으로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나의 유전자를 포함하는 벡터를 혈관 내피세포에 도입하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[70] 본 발명에 따른 상기 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 도입할 수 있는데, 상기 본 발명에 따른 재조합 벡터를 숙주 세포에 도입하는 방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 염화칼슘(CaCl₂) 및 열 쇼크(heat shock)

방법, 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 방법 등을 사용할 수 있으며, 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다

[71]

[72] 본 발명에서, 전술한 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포간 상호 작용의 효과는 혈관 내피세포 자체의 신호체계의 조절 하에 있는 바, 혈관 내피세포에 대한 신호 조절이 중간엽 줄기세포의 니치 활성을 조절하는 방법으로 활용될 수 있음을 규명하였다. 따라서, 본 발명은 혈관 내피 세포의 인자 (Wnt 및 EphrinB2)의 조절을 통해 중간엽 줄기세포의 니치 활성을 상향 또는 하향 조절할 수 있다는 점에 또 다른 기술적 특징이 있다.

[73] 이에, 본 발명은 체외로 분리된, 중간엽 줄기세포와 물리적으로 접촉되어 있는 상태로, 공배양되는 혈관 내피세포 내 Wnt, 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현 또는 저발현시키는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법을 제공한다.

[74] 본 발명의 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법은 전술한 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물에서 기술한 바 있는 혈관 내피세포, 중간엽 줄기세포 등을 이용하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[75] 본 발명에서, 상기 과발현시키는 단계는 혈관 내피세포를 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3(STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 포함하는 벡터로 형질감염시키거나, 혈관 내피세포에 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 처리하는 것일 수 있다.

[76] 본 발명에서, 상기 저발현시키는 단계는 혈관 내피세포에 Tgfb3, IFN- γ , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 처리하는 것일 수 있다.

[77]

[78] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[79]

[80] 실시예 1. 혈관 내피세포와의 공배양에 따른 중간엽 줄기세포의 특성 변화

[81] 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 등에 대한 혈관 내피세포의 영향을 확인하기 위하여, 두 세포를 in vitro 상에서 공동 배양시킨 후, 이에 따른 변화를

분석하였다. 공배양한 중간엽 줄기세포를 cell sorter로 분리하기 위하여, 두 가지 세포 중 하나의 세포에만 GFP를 도입하였다. 생체 내 두 세포의 입체적 상호작용과 유사한 조건을 만들기 위하여, 혈관 내피세포를 바닥에 깔아준 후, 그 위에 중간엽 줄기세포를 깔아주는 방법을 이용하였다. 이러한 공배양 방법을 통하여, 혈관 내피세포와의 직접적 접촉(direct cell-contact)과 분비인자(soluble factor)에 의한 영향이 중간엽 줄기세포에 미치도록 설계하였다(도 1).

[82]

[83] **1-1. 중간엽 줄기세포의 세포 성장 변화**

[84] 본 실시예에서는, 혈관 내피세포와의 상호 작용에 의한 중간엽 줄기세포의 성장 변화를 확인하고자 하였으며, 비교군은 중간엽 줄기세포 단독배양 군을 이용하였다. 혈관 내피세포와 공배양한 중간엽 줄기세포는, 단독배양한 경우와 달리, 혈관 내피세포 위에서 sphere-like 형태로 성장하고, 세포의 크기가 작아지며, 세포증식이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(도 2A 내지 도 2C). 또한, cell cycle을 분석한 결과, 혈관 내피세포와 공배양한 중간엽 줄기세포는, 단독배양한 경우에 비해, G0 arrest가 높게 나타나 전반적인 cell cycle progression이 저해되어 quiescence 상태를 유지하고 있었다(도 3A). 아울러, cyclinD1, E 등의 G0-G1 진행 관련 인자의 발현이 감소되고, p21, p27등의 억제 인자들은 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(도 3B).

[85]

[86] **1-2. 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 향상**

[87] 본 실시예에서는, 혈관 내피세포와의 상호 작용에 의한 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 변화를 확인하고자 하였으며, 비교군은 중간엽 줄기세포 단독배양 군을 이용하였다. 혈관 내피세포와 공배양한 중간엽 줄기세포는 집락군 형성능(CFU-F)이 비교군에 비해 증가되었으며, 특히, 세포의 증식이 현저히 감소함에도 불구하고, 공배양 전에 비해 집락군 형성능을 가진 세포의 비율이 증가된 상기의 결과를 볼 때, 미분화된 상태가 유지될 뿐만 아니라 집락군을 형성하는 세포로의 리프로그래밍이 일어났음을 알 수 있었다(도 4A). 또한, 중간엽 줄기세포의 다분화능의 경우, 혈관 내피세포와의 공배양에 의해 지방 세포로의 분화는 억제되는 경향을 보였다 (도 4B).

[88] 이와 더불어, 혈관 내피세포의 영향에 대한 상호작용 메커니즘을 분석하기 위해, 혈관 내피세포의 conditioned medium(EC-CM)만을 단독으로 처리한 경우(혈관 내피세포와 비접촉되어 있는 상태로 배양된 군)와 중간엽 줄기세포를 단독배양한 경우(MSC-CM)를 비교하였다. 그 결과, 이들간 중간엽 줄기세포의 크기, 세포성장, 집락군 형성능, 분화능에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 상기 줄기세포능은 두 세포간의 직접적인 접촉(direct-contact)에 의한 현상임을 알 수 있었다 (도 5A 내지 도 5D).

[89]

[90] **1-3. 중간엽 줄기세포의 세포 특성 변화**

- [91] 본 실시예에서는, 혈관 내피세포와의 상호 작용에 의한 중간엽 줄기세포의 세포 특성 변화를 확인하고자 하였으며, 비교군은 중간엽 줄기세포 단독배양군을 이용하였다. 혈관 내피세포와 공배양한 중간엽 줄기세포는 생체 내 혈관 내피세포와 인접한 perivascular cells 또는 pericyte의 마커 중 nestin, NG2 등의 발현이 증가되었으나 α -SMA는 감소하여 arterial perivascular cell의 특성을 나타내었다. 이러한 결과는 체외 배양된 중간엽 줄기세포가 혈관 내피세포와의 상호작용에 의해 생체 내에서와 유사한 perivascular character를 획득함을 나타내는 것이다(도 6).
- [92] 또한, 상기 공배양된 중간엽 줄기세포는 최근 암줄기세포 뿐만 아니라, 보다 미분화된 중간엽 줄기세포의 특성과 관련된 것으로 알려진 EMT marker (Sox9, Snail1, Zeb1, Twist 등)의 발현이 현저히 증가함을 확인할 수 있었으며, 고기능성 줄기세포능의 획득 (reprogramming)과 관련해 중간엽적 특성이 강화됨을 알 수 있었다(도 7A). 실제로, 중간엽 줄기세포와 공배양한 혈관 내피세포에서 EMT를 유도할 수 있는 cytokine들의 발현이 증가되어 있고, 상기 중간엽 줄기세포에서는 IL-8의 수용체 (CXCR1, 2)의 발현이 급격히 증가하여 혈관 내피세포로부터 이러한 인자의 수용 능력(susceptibility)이 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 두 세포의 상호작용에 의한 중간엽기질세포의 reprogramming 시, EMT 과정이 수반됨을 확인할 수 있었다(도 7B 및 도 7C).
- [93] 한편, 중간엽 줄기세포의 줄기세포능의 향상과 관련하여, 배아 줄기세포성 또는 체세포의 역분화와 관련된 Oct4, Sox2, Klf4 등의 pluripotency 유전자와 epigenetic regulator인 Chd1의 발현이 증가함을 확인함으로써, 중간엽 줄기세포의 세포적 특성이 pluripotent 상태로 reprogramming됨을 알 수 있었다(도 7D).

[94]

[95] 실시예 2. 조혈 줄기세포에 대한 자가재생 촉진효과 확인[96] 2-1. 중간엽 줄기세포의 니치 활성 향상

- [97] 혈관 내피세포와의 공배양에 의해 변화된 중간엽 줄기세포를 분리하여 골수에서 분리한 조혈 줄기세포(Lin-cells)와 공배양한 결과, 단독배양한 중간엽 줄기세포에 비해 미분화된 조혈줄기세포 Lin-Sca+Kit+(LSK cells)의 증식을 촉진시켰으며, 이때, 조혈 줄기세포의 자가재생과 관련된 인자 (HoxB4, Bmi1)들의 발현도 높아져 니치 활성이 향상되었음을 확인할 수 있었다(도 8A 내지 8C). 또한, 이러한 혈관 내피세포와 공배양된 중간엽 줄기세포는 조혈 줄기세포의 성장인자로 알려진 cytokine(IL-6, IL-10, TPO, VEGF)들의 발현이 증가되어 있었으며, 특히 조혈 줄기세포의 미분화유지 및 자가재생에 중요한 인자로 알려진 notch ligand (Jag1,2, DLL1)들의 발현이 증가하였다(도 9A 및 9B). 아울러, CBF-reporter(notch signaling이 일어날 경우 NICD와 결합한 CBF-1(RBPJ-kappa)의 기능을 모니터링하는 repoter)를 통해서 분석한 결과, 혈관 내피세포에 의해 변화된 중간엽 줄기세포와 공배양된, 조혈 줄기세포에서 notch signaling이 증가되어 있고, 이러한 조혈 줄기세포에서 notch target

유전자들(Hes1, 5, Hey1, Deltex1)의 발현이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었는바, 중간엽 줄기세포의 향상된 니치 활성을 재차 확인할 수 있었다 (도 10A 및 10B).

[98]

[99] **2-2 니치 활성과 관련된 혈관 내피세포의 발현 인자 확인**

[100] 중간엽 줄기세포의 이러한 기능적 변화, 구체적으로, 주요 신호전달 인자들의 변화를 유도하는 메커니즘을 분석한 결과, 중간엽 줄기세포 (MSC)에서 b-catenin의 활성을 돕는 co-factor인 LEF1, TCF1, TCF3 등이 증가한 것을 확인하였고, wnt ligand 에 반응할 수 있는 수용체들(Fzd4, 7, LRP family)이 증가되어 있었다(도 11A 내지 11D). 또한, 신경 줄기세포를 자극할 때 관여하는 것으로 알려진 EphrinB2 리간드는 혈관 내피세포에서 발현되는데, 이와 관련하여, EphrinB2에 반응할 수 있는 수용체인 ErB4의 발현이 중간엽 줄기세포에서 증가되어 있었다. 따라서, 중간엽 줄기세포의 유지 활성(supporting activity)을 나타내는 과정에서, 혈관 내피세포의 Wnt 리간드와 EphrineB2 리간드가 매개 인자로 관여함을 발견하였다(도 12A 내지 12C).

[101]

[102] **2-3.혈관 내피세포의 자극 효과를 조절하는 신호 인자 규명**

[103] 상기 실시예들에서는, 중간엽 줄기세포를 자극하는 혈관 내피세포의 기능 및 관련 매개 인자를 규명하였다. 본 실시예에서, 중간엽 줄기세포를 자극하는 혈관 내피세포의 능력을 조절하기 위한 수단으로서, 혈관 내피세포의 관련 활성을 조절하는 up-stream 신호체계를 분석하였다. 그 결과, 혈관 내피세포가 중간엽 줄기세포를 자극하는 매개 인자로 밝혀진, Wnt 리간드의 혈관 내피세포에서의 발현이 bFGF, VEGF, TPO, IL-6, 및 IL-10에 의해 증가하였고, bFGF, VEGF, IL-6, IL-10 및 TNF-alpha는 중간엽 줄기세포의 notch 리간드인 jagged-1 과 Dll-1의 발현을 유의하게 증가시켰다(도 13A 및 13B).

[104] 또한, 상기 사이토카인에 의해 혈관 내피세포가 활성화됨에 있어서, STAT3의 활성이 주요 인자로 작용함을 알 수 있었다. 구체적으로, 활성화형 STAT3 (STAT3-C; SC, Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene.Cell.1999;98:295-303에 개시된 서열)와 억제형 STAT3 (dnSTAT3)를 발현하는 레트로바이러스 벡터로 구축한 후(도 14A), 이들을 혈관 내피세포에 도입하여 발현시킨 결과, 활성화된 STAT3를 도입한 혈관 내피세포에서, EphrineB2 리간드와 더불어 Jgged-1, 2, Dll-4 등의 notch ligand 가 뚜렷하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 14B). 아울러, 이러한 STAT3의 활성 및 억제형을 발현하는 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 공배양한 결과, STAT3-C에 의해 중간엽 줄기세포의 CFU-F 가 증가함을 확인하였다(도 14C). 특히, 이들 각각의 혈관 내피세포와 접촉한 중간엽 줄기세포를 sorting으로 분리한 후, 미분화된 조혈모 세포(Lin-)와 공배양한 결과, 단독배양한 중간엽 줄기세포(Lin+MSC)에 비해, 혈관 내피세포와 접촉했던 중간엽 줄기세포(Lin+MSC(+MEC))가 훨씬

높은 조혈 줄기세포(Lin-Sca-1+c-kit+; LSK)의 팽창을 유도하였고, 특히 STAT3-C가 활성화된 혈관 내피세포(SEC)와 접촉했던 중간엽 줄기세포(Lin+MSC(+SEC))는, 그 보다도 더 높은 조혈 줄기세포 팽창 능력을 보여주었다(도 14D).

- [105] 즉, IL-6, IL-10 등의 사이토카인은 혈관 내피세포를 활성화하고(STAT3, Wnt 리간드, EphrinsB2 리간드), 상기와 같이 활성화된 혈관 내피세포와 접촉된 중간엽 줄기세포는 니치 활성이 향상되어(b-catenin, notch), 미분화 조혈 줄기세포의 자가재생 및 팽창을 유도함을 확인할 수 있었다(도 15). 따라서, 본 발명은 혈관 내피세포의 활성 및 관련 인자의 발현을 조절함으로써, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 및 조혈 줄기세포의 자가재생능을 상승 또는 하향 조절할 수 있음을 규명하였다.

[106]

[107] **실시예 3. 신경 줄기세포의 자가재생 촉진 효과 확인**

- [108] 본 실시예에서는 전술한 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포간 상호 작용이 조혈계뿐만 아니라, 신경계의 자가재생에도 영향을 미칠 수 있는지 확인하였다.

- [109] 척수를 절단한 마우스 동물 모델을 대상으로 각각의 세포(2D-MSC, 3D MSC+EC)를 matrigel과 섞어서 손상부위에 투여한 후, 척수 기능의 회복을 운동 능력의 정도(locomotor rating scale)를 통하여 비교 분석하였다. 운동 신경의 기능을 측정하는 Basso Mouse Scale(BMS) 방법으로 분석했을 때, 단독 matrigel만 투여한 군에 비해 중간엽 줄기세포를 투여한 군(2D-MSC)에서 더 높은 운동 능력의 회복이 보였으며, 특히, 중간엽 줄기세포와 혈관 내피세포를 함께 섞은 후 투여한 군(3D MSC+EC)에서 현격하게 높은 비율로 운동 능력이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 16). 또한, 감각 신경의 기능을 측정하는 somatosensory evoked potential (SEP) 방법으로 분석했을 때에도 유사하게 MSC+EC에서 기능성이 증가하는 것을 관찰하였다(도 17).

- [110] 또한, 재생 과정에 있는 척수 조직을 면역형광 염색으로 분석하였으며, 비교군으로는 단순배양된 중간엽 줄기세포를 투여한 군(2D-MSC), 3차원 배양된 중간엽 줄기세포를 투여한 군(3D-MSC)을 이용하였다. 중간엽 줄기세포와 혈관 내피세포를 함께 섞은 후 투여한 군(3D MSC+EC)에서, 척수절단손상 부위의 상부 (-1mm) 영역에서 신경세포의 마커인 NeuN 양성 세포, 척수절단손상 부위의 하부 (+1mm) 영역에서 신경세포의 마커인 Tuj-1 양성 세포가 다른 비교군에 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 18 및 도 19). 또한, 분화된 신경 세포조직뿐만 아니라, 이들의 재생과 관련된 신경 줄기세포(neural progenitor)에 해당하는 마커인 nestin 양성 세포가 다른 비교군에 비해 뚜렷하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 20). 상기의 결과는, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포간 상호 작용이 신경계의 자가재생에도 큰 영향을 미침을 나타내는 것이다.

[111]

- [112] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의

통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

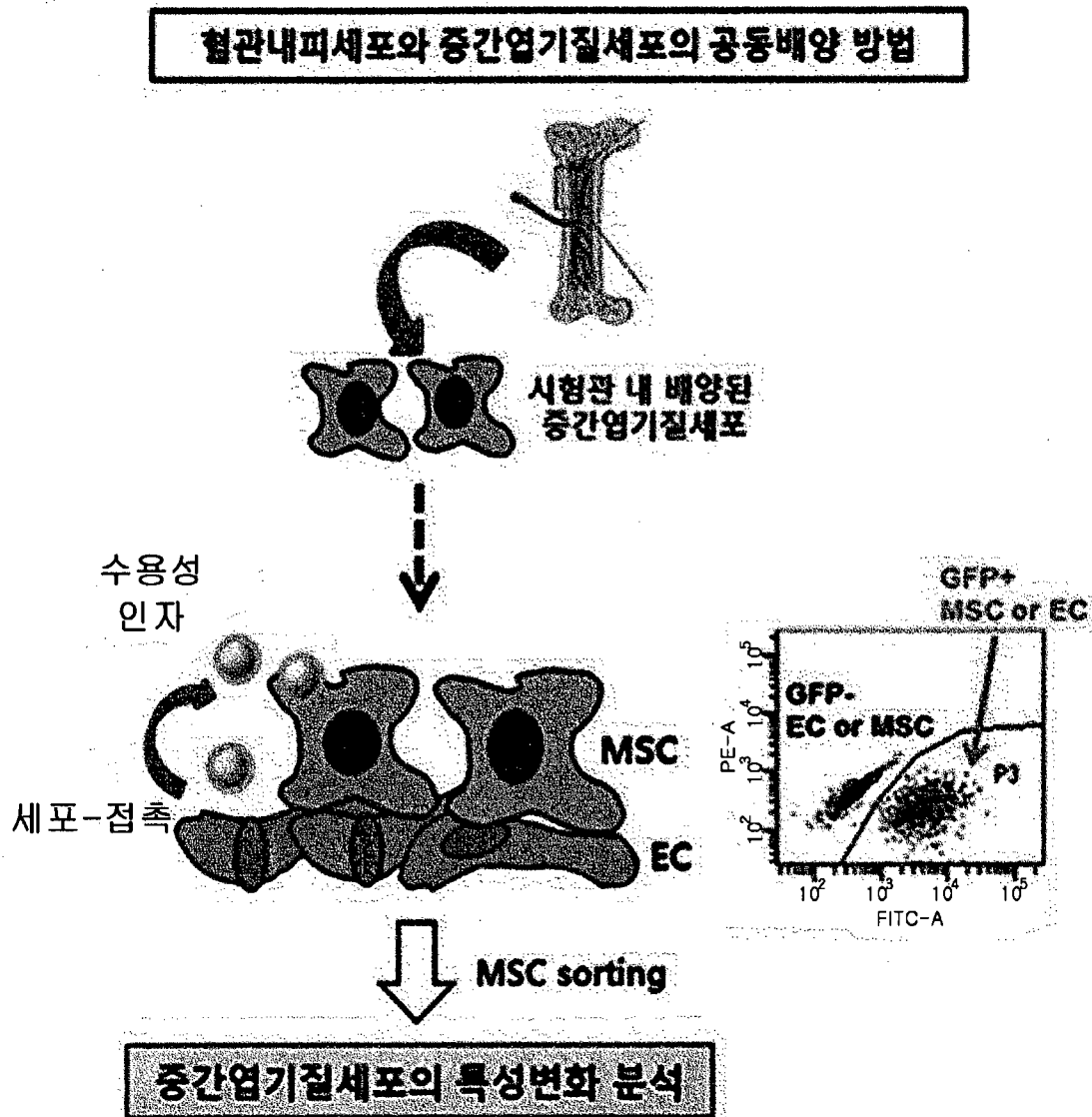
[113]

청구범위

- [청구항 1] Wnt, 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관 내피세포를 포함하는, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 혈관 내피세포는 STAT3 활성이 증가되어 있는 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 혈관 내피세포는 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 포함하는 벡터로 형질감염된 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 혈관 내피세포는 b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), TPO (thrombopoietin), VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-6 (interleukin-6), IL-10 (interleukin-10), TNF- α (tumor necrosis factor- α), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자가 처리된 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 조혈 줄기세포 또는 신경 줄기세포인 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 체외로 분리된, 중간엽 줄기세포를 추가로 포함하며, 상기 중간엽 줄기세포는 혈관 내피세포와 물리적으로 접촉된 상태로 제공되는 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 7] 혈관 내피세포; 및
b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자를 포함하는, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 조혈 줄기세포 또는 신경 줄기세포인 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 체외로 분리된, 중간엽 줄기세포를 추가로 포함하며, 상기 중간엽 줄기세포는 혈관 내피세포와 물리적으로 접촉된 상태로 제공되는 것인, 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물.
- [청구항 10] 체외로 분리된, 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 물리적으로 접촉되어 있는 상태로 공배양하는 단계를 포함하는, 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 공배양하는 단계 전, 혈관 내피세포에 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 과발현시키는 단계를 추가로 포함하는, 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 공배양하는 단계는 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인자를 첨가하여 공배양하는 것인, 니치 활성이 증진된 중간엽

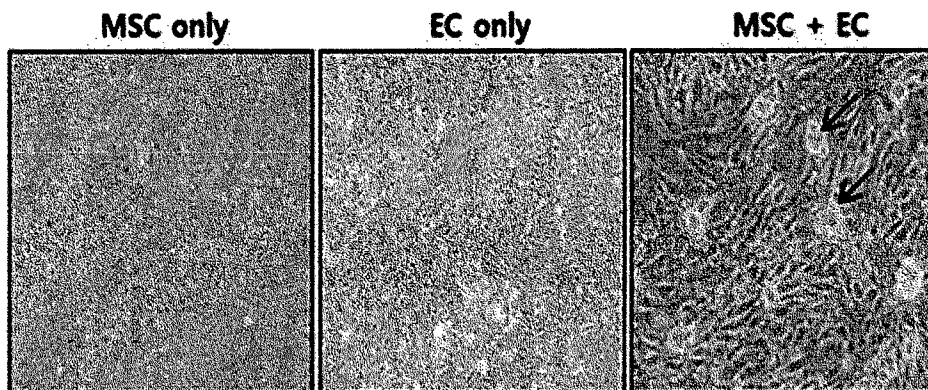
- 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방조직, 골수, 말초 혈액 또는 제대혈에서 유래한 것인, 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 14] 체외로 분리된 중간엽 줄기세포와 물리적으로 접촉되어 있는 상태로 공배양되는, 혈관 내피세포 내 Wnt, 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현 또는 저발현시키는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 과발현시키는 단계는, 혈관 내피세포를 Wnt 리간드, EphrinB2 리간드, 활성화형 STAT3 (STAT3-C), 및 이들의 조합 중 어느 하나를 포함하는 벡터로 형질감염시키는 것인, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 과발현시키는 단계는, 혈관 내피세포에 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 처리하는 것인, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법.
- [청구항 17] 제14항에 있어서, 상기 저발현시키는 단계는, 혈관 내피세포에 Tgfb3 (transforming growth factor, beta 3), IFN- γ (interferon gamma) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 처리하는 것인, 중간엽 줄기세포의 니치 활성 조절방법.

[도1]

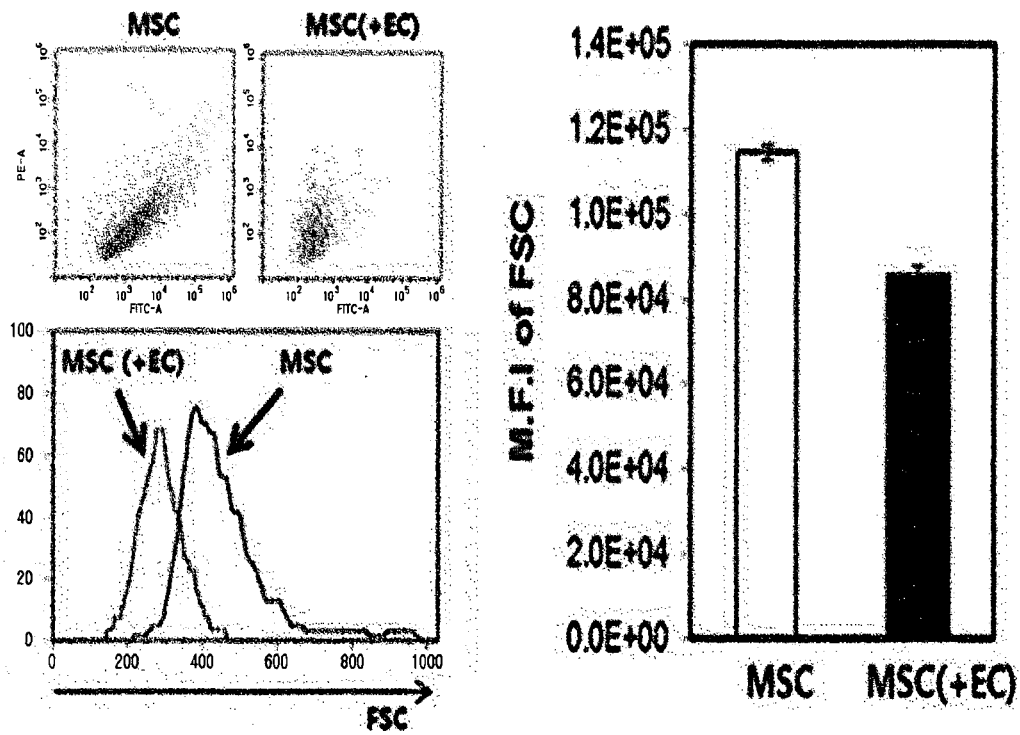


[도2a]

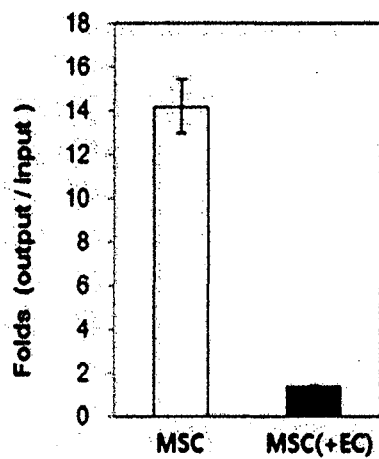
A. 세포 형태



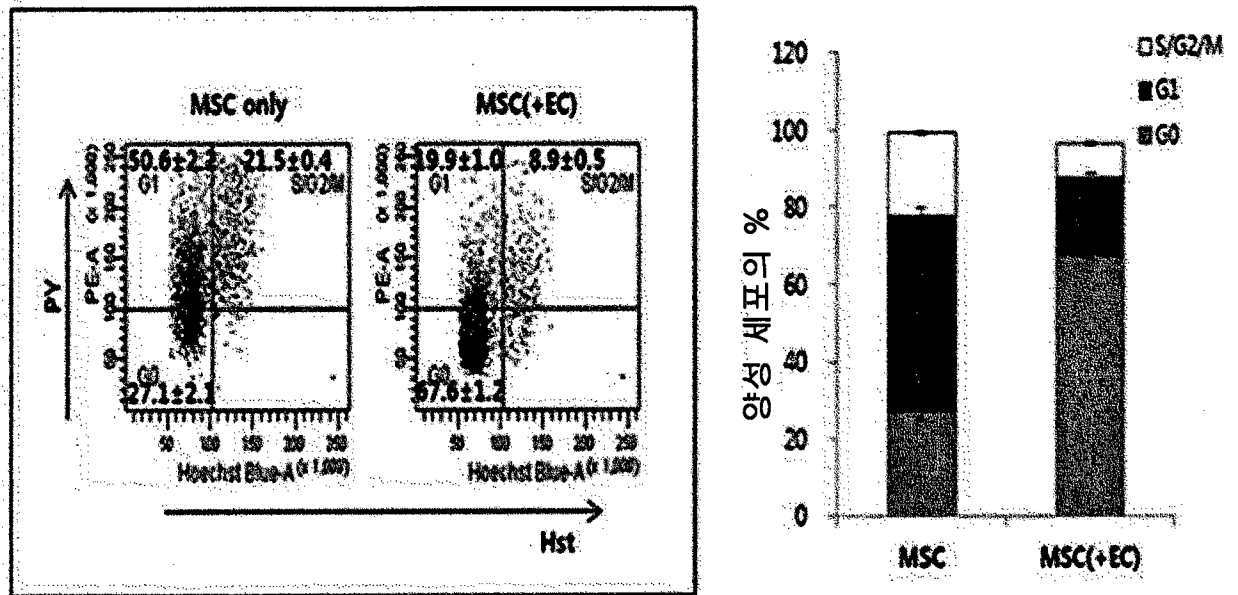
[도2b]

B.

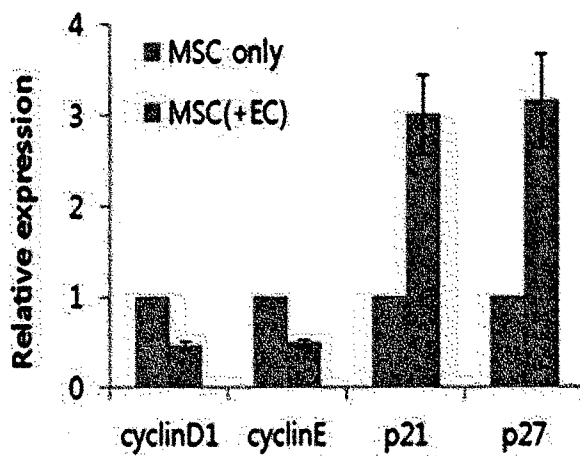
[도2c]

C. 세포 증식

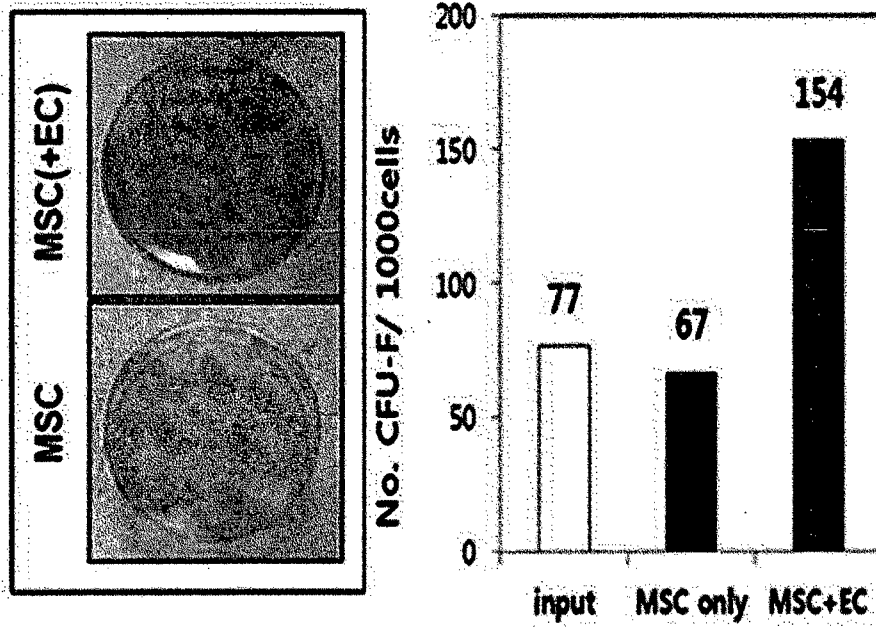
[도3a]

A. 세포 주기

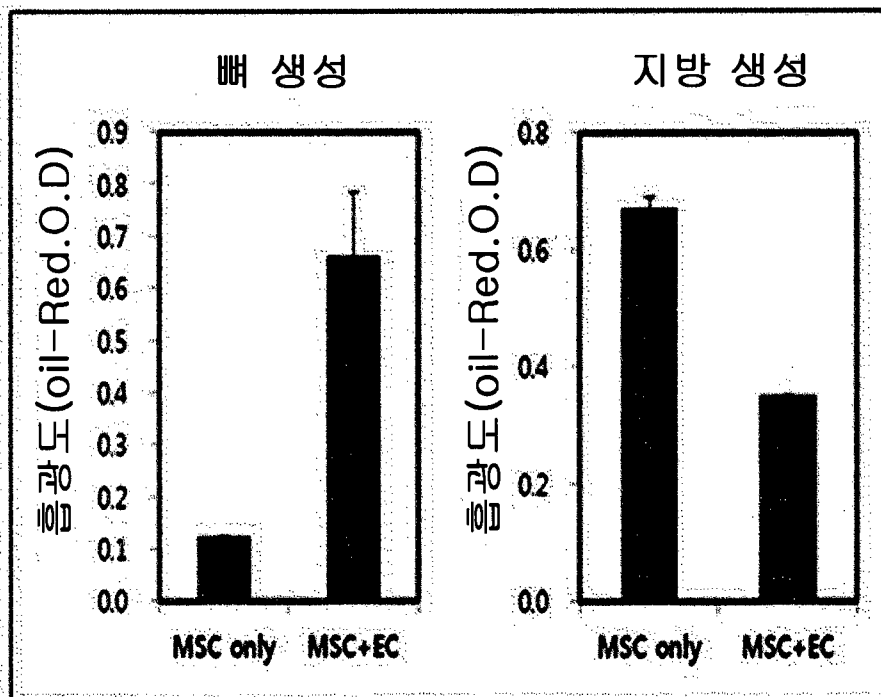
[도3b]

B. 세포 주기 조절자

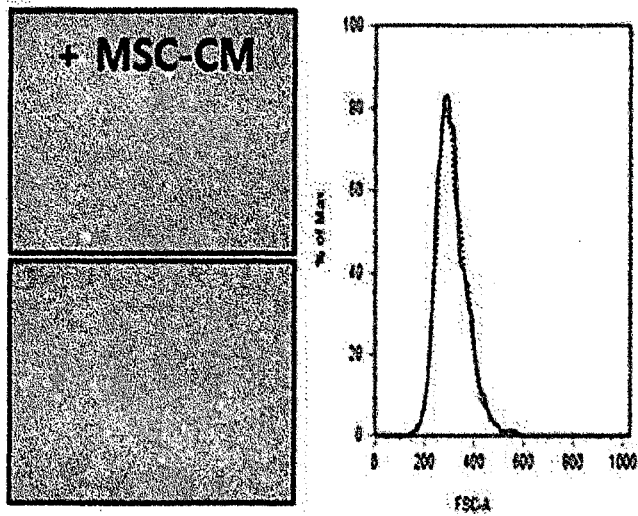
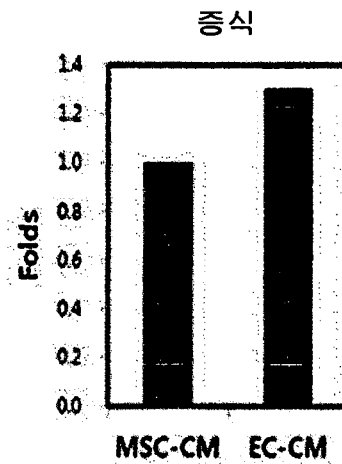
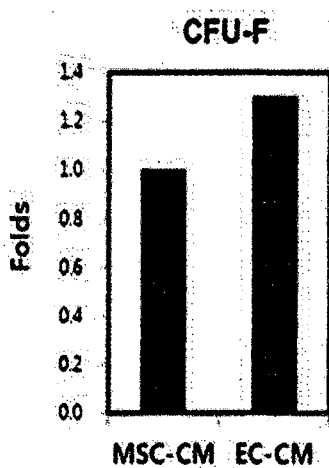
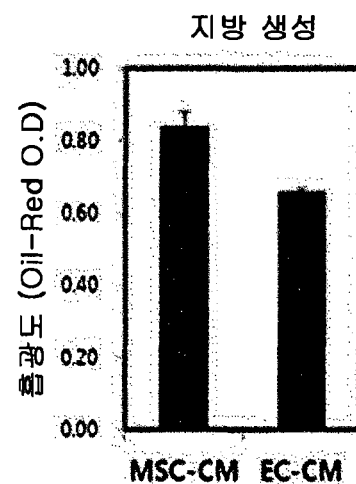
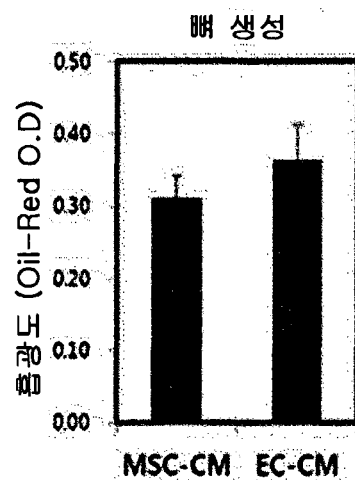
[도4a]

A. CFU-F

[도4b]

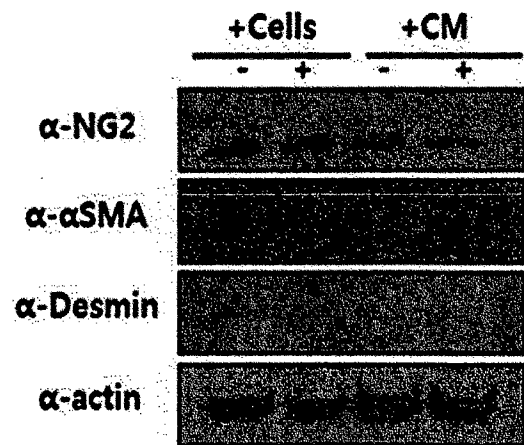
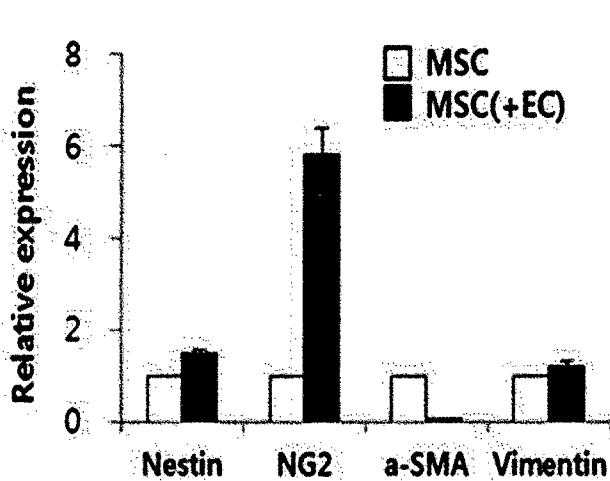
B. 분화

[도5]

A. 세포 크기**B. 증식****C. CFU-F****D. 분화**

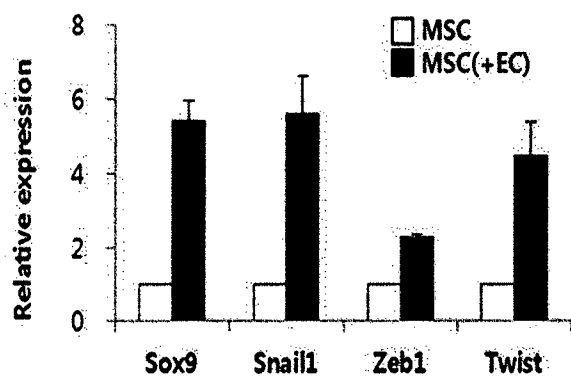
[도6]

혈관주위-관련 유전자

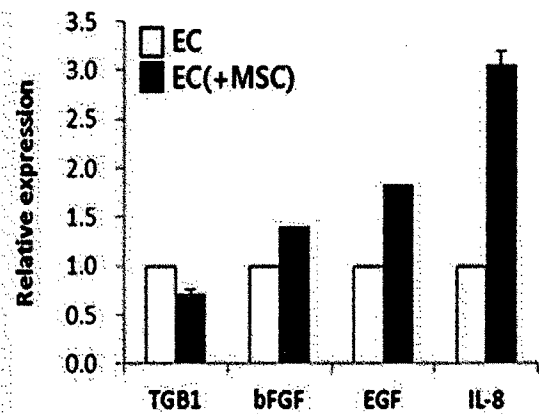


[도7]

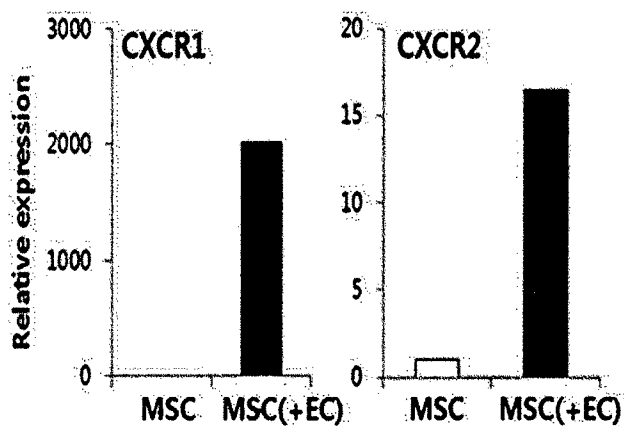
A. EMT 유전자



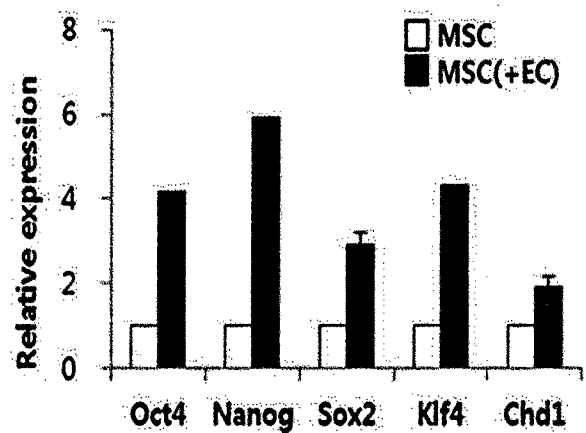
B. EMT 유도자



C. EMT 유도자-수용체

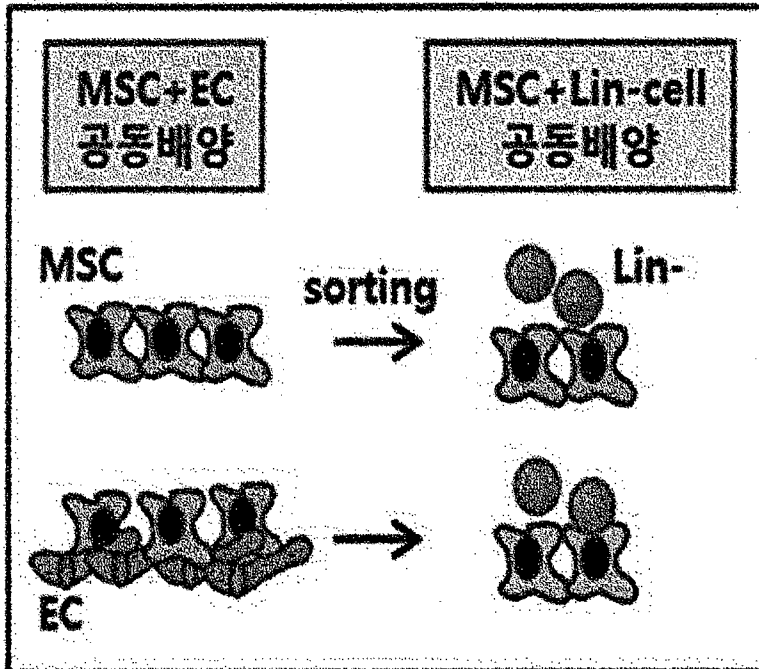


D. 다능성-관련 유전자



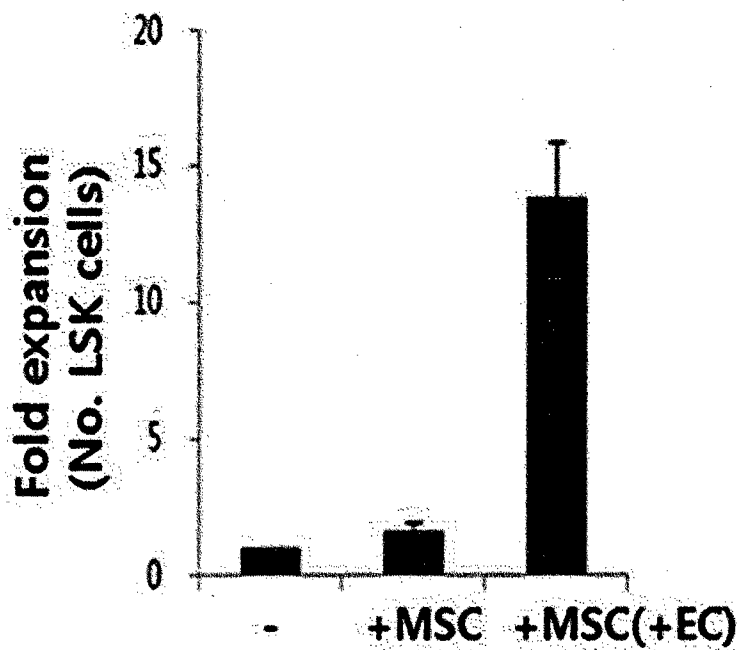
[도8a]

A. Exp. scheme

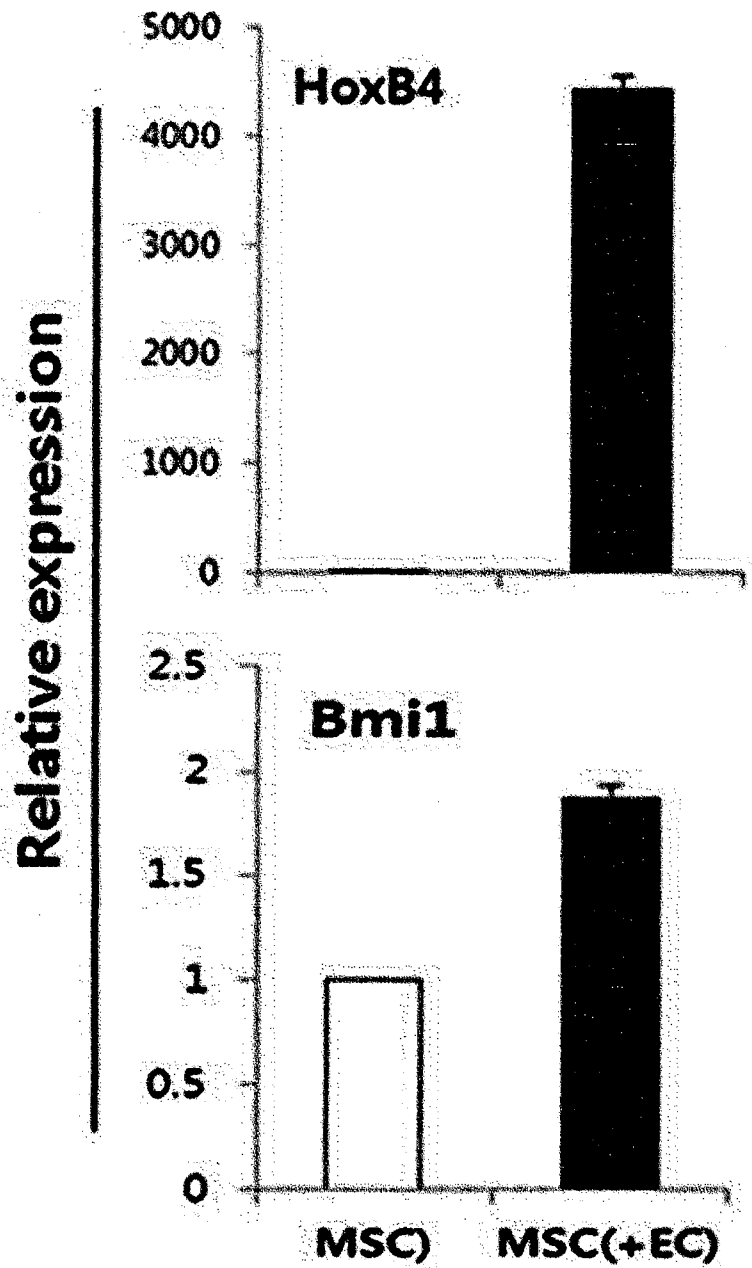


[도8b]

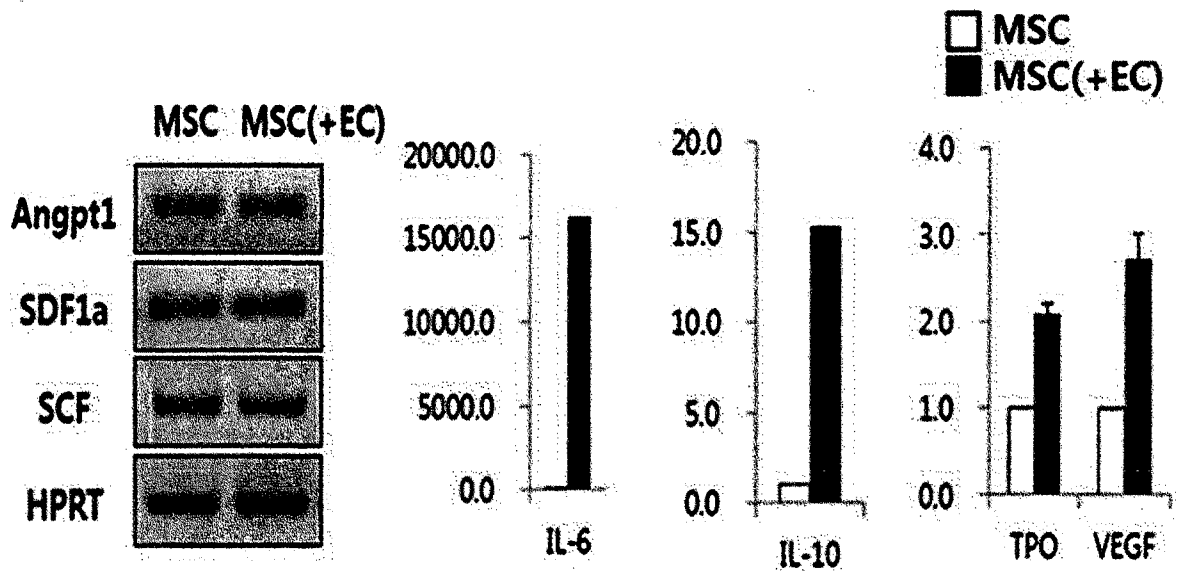
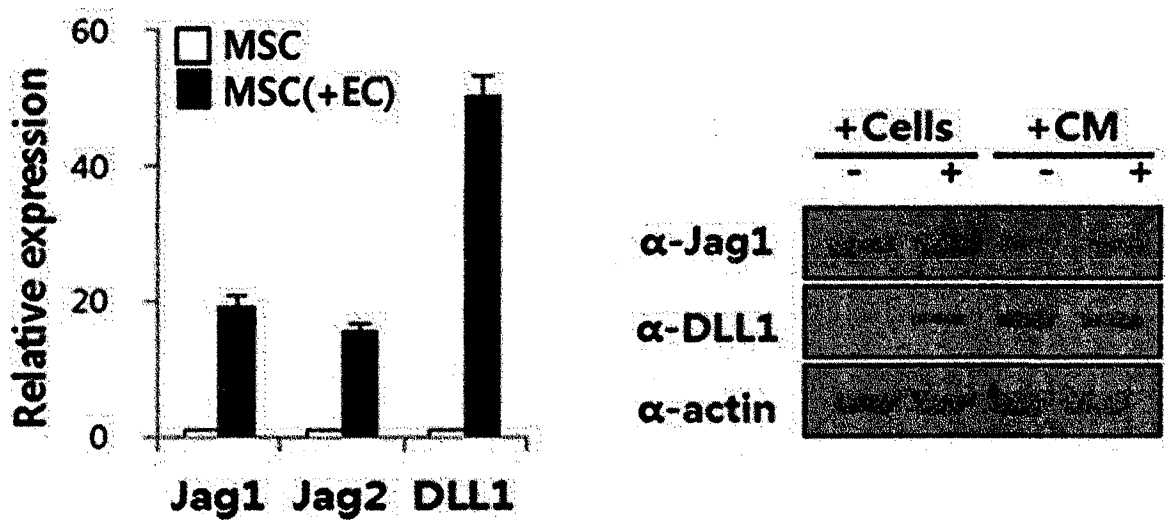
B. 조혈모 유지 활성



[도8c]

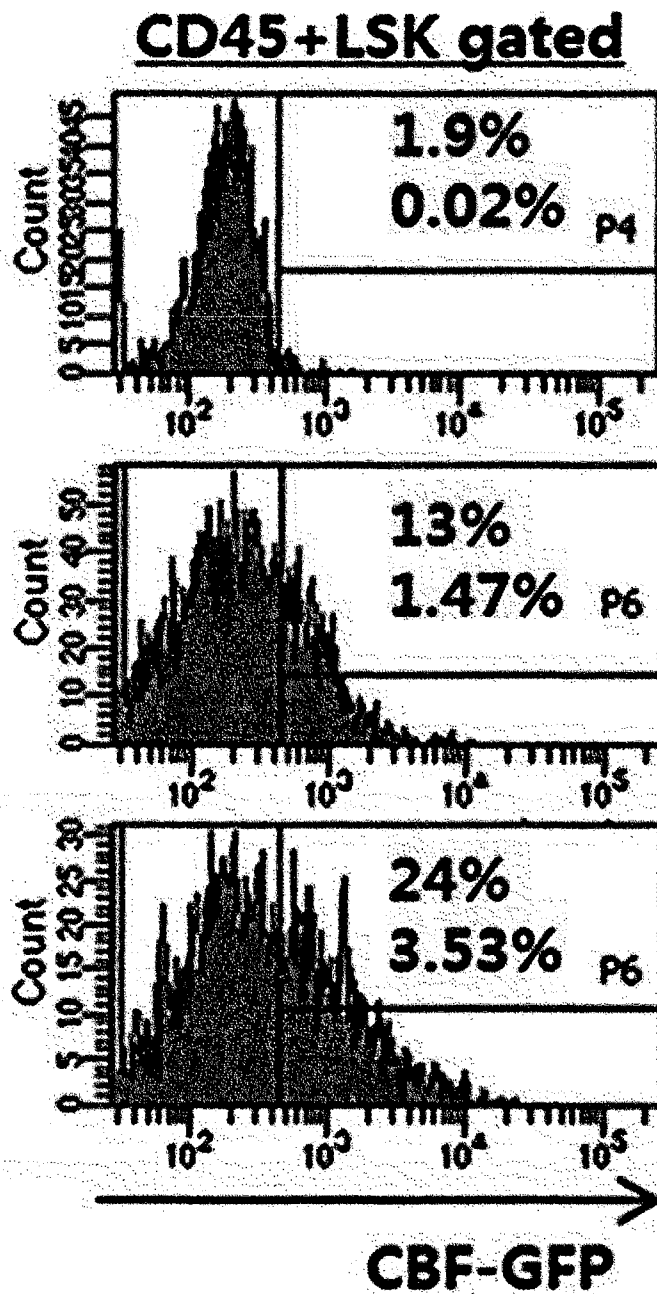
C. 자가-생성 마커

[도9]

A. 조혈모 사이토카인**B. Notch 리간드**

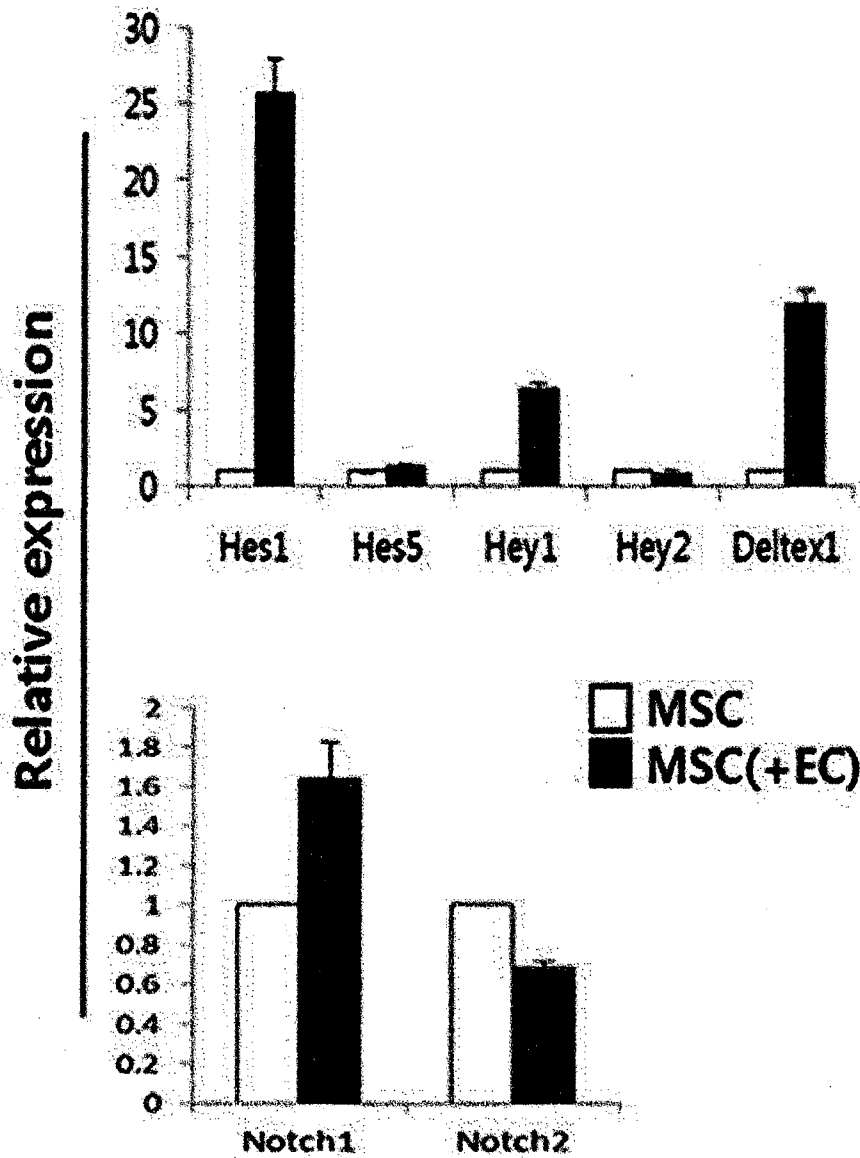
[도10a]

A. Notch 리포터



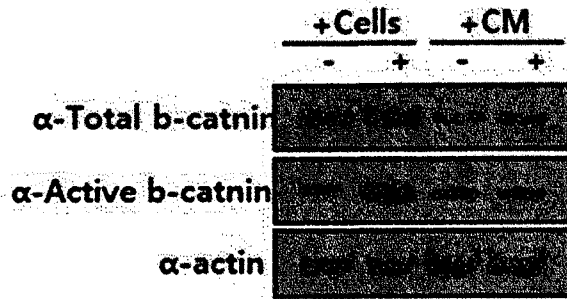
[도10b]

B. Notch 타겟

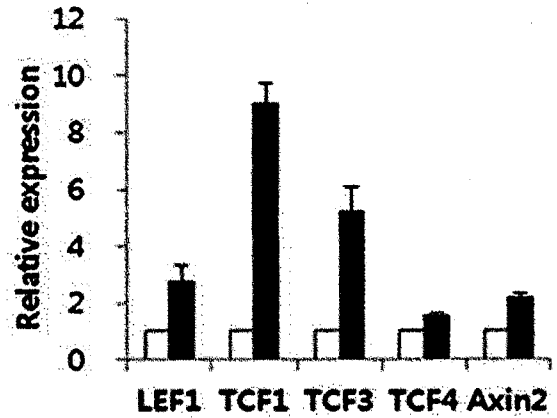


[도11]

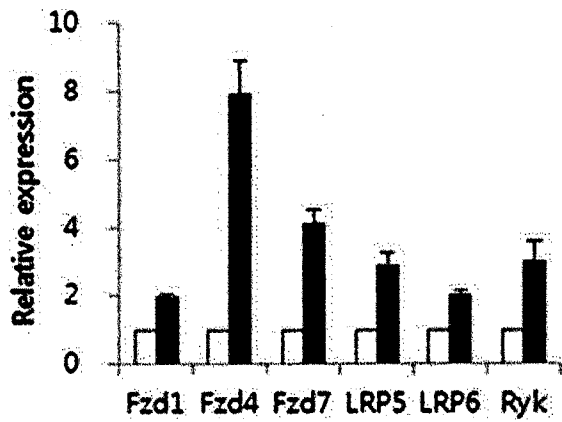
A. b-catenin 축적



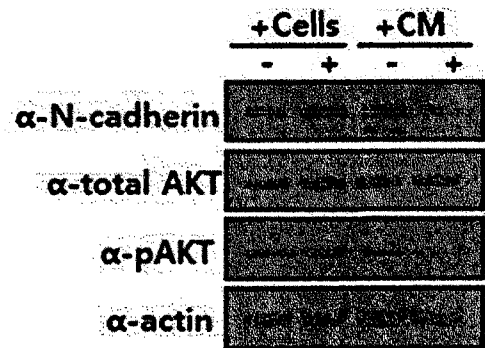
B. b-catenin 보조인자



C. Wnts 리포터

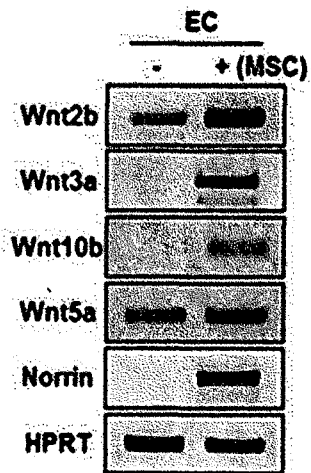


D. b-catenin 조절자

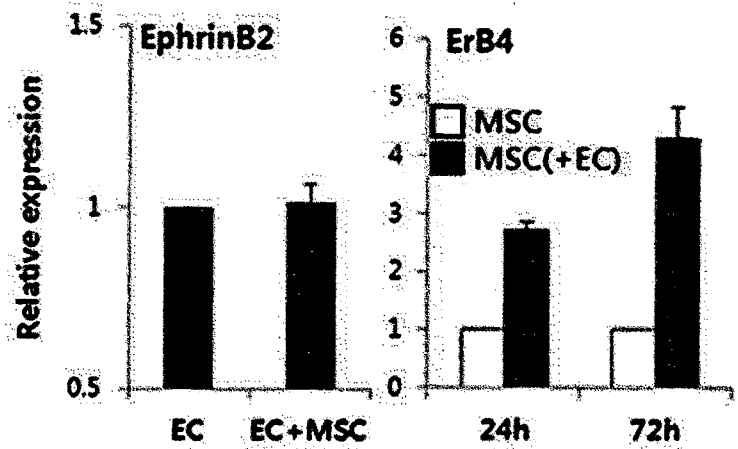


[도12]

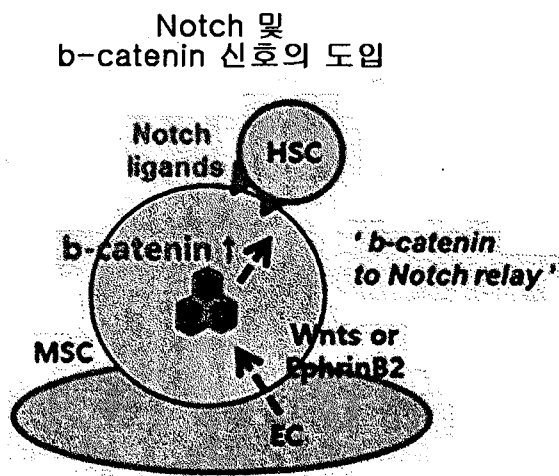
A. Wnts



B. EphrinB2/ErB4

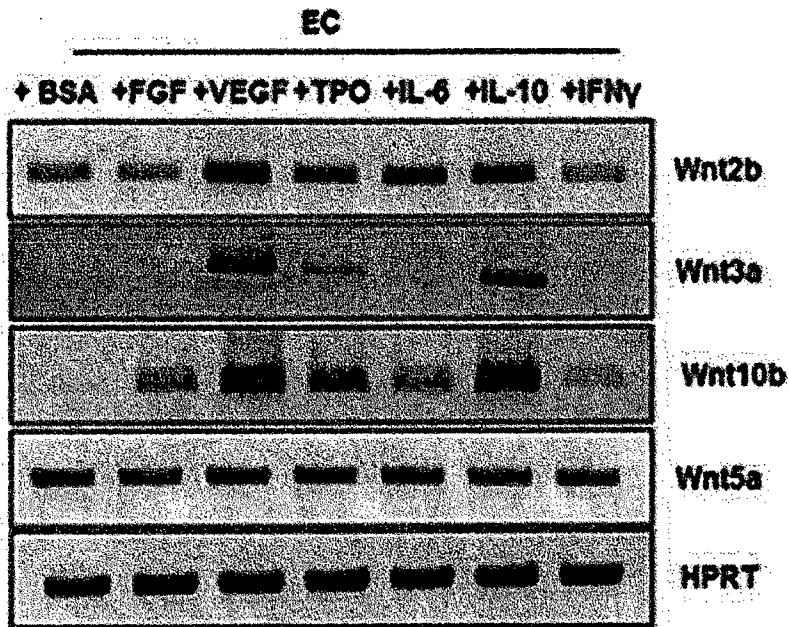


C.



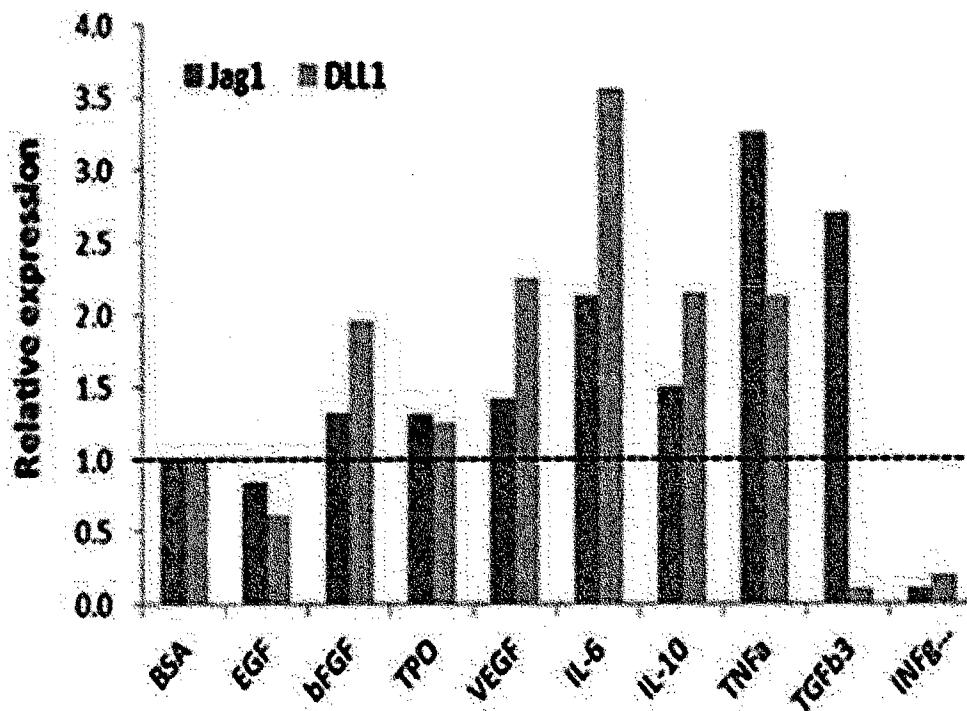
[도13a]

A. Wnt 리간드

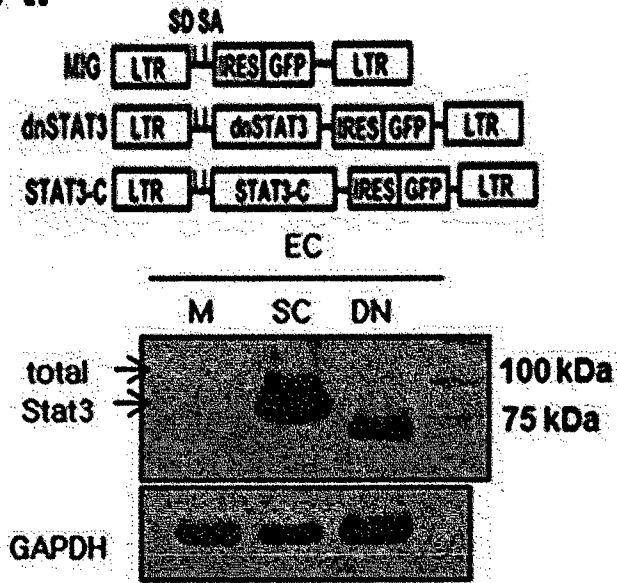
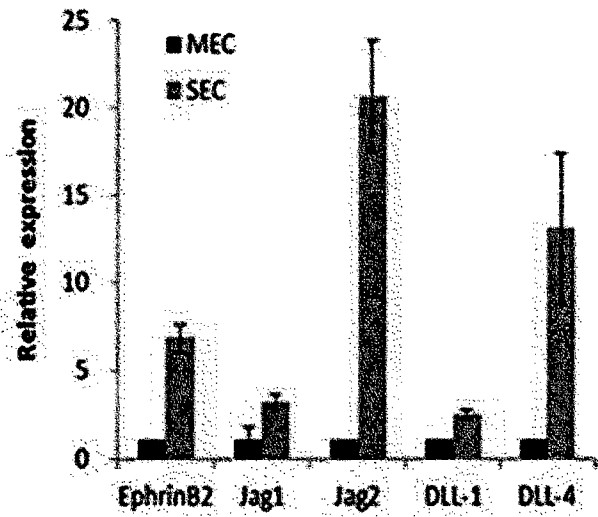
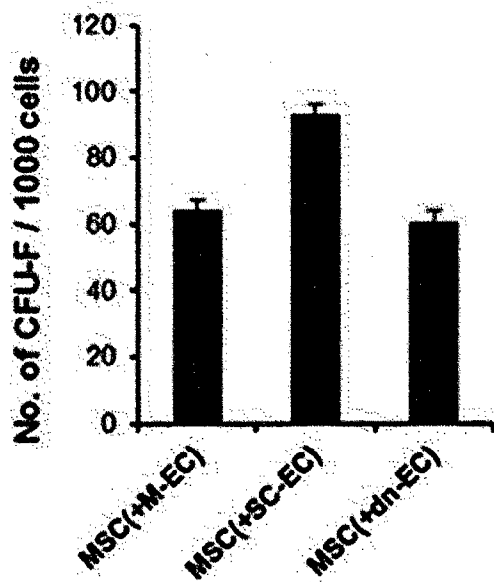
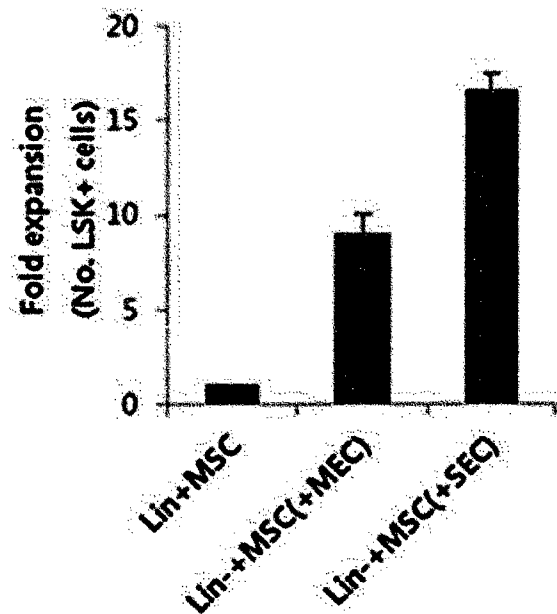


[도13b]

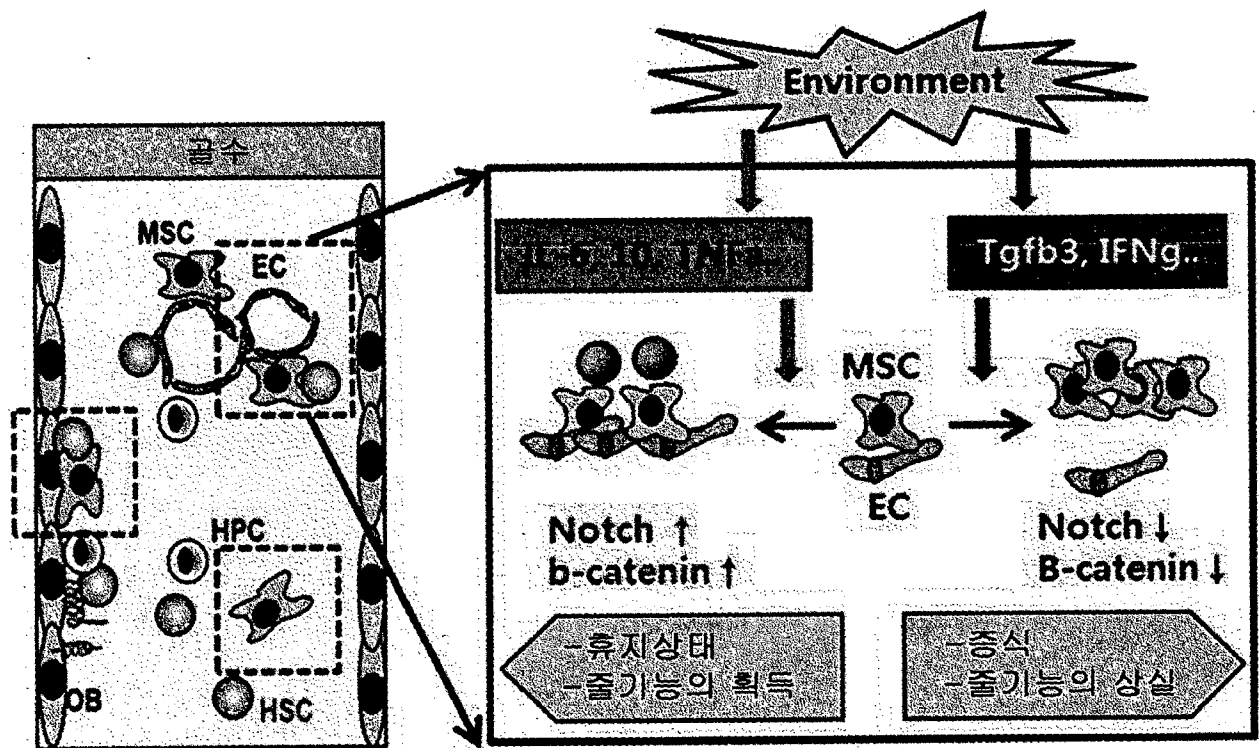
B. Notch 리간드



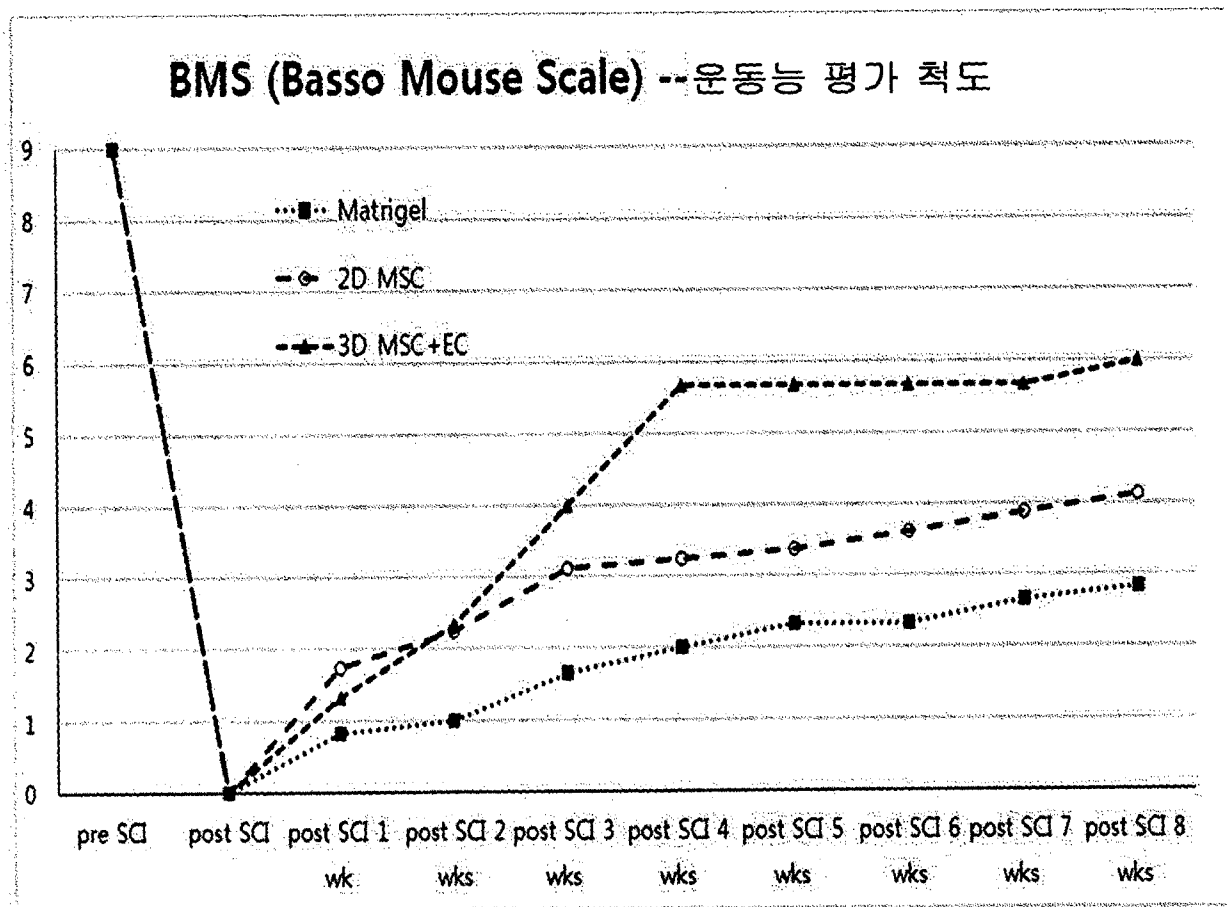
[도14]

A.**B. Notch 리간드****C. CFU-F****D. 조혈모 유지 활성**

[도15]



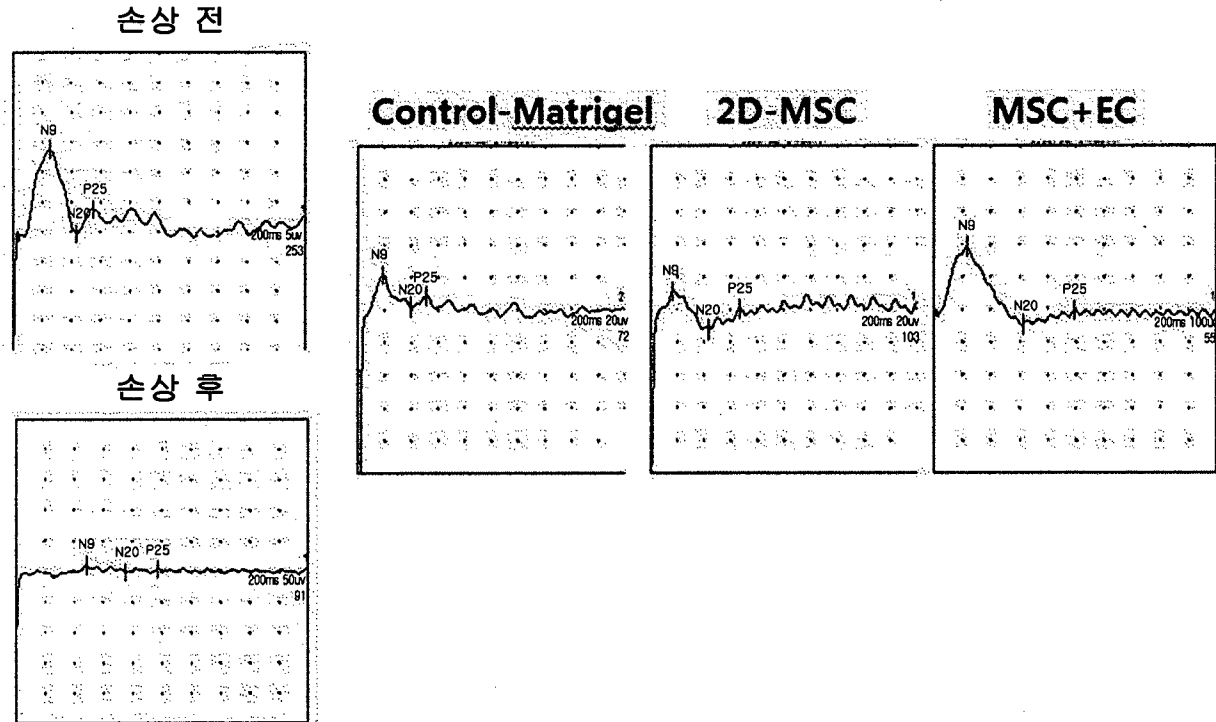
[도16]



[도17]

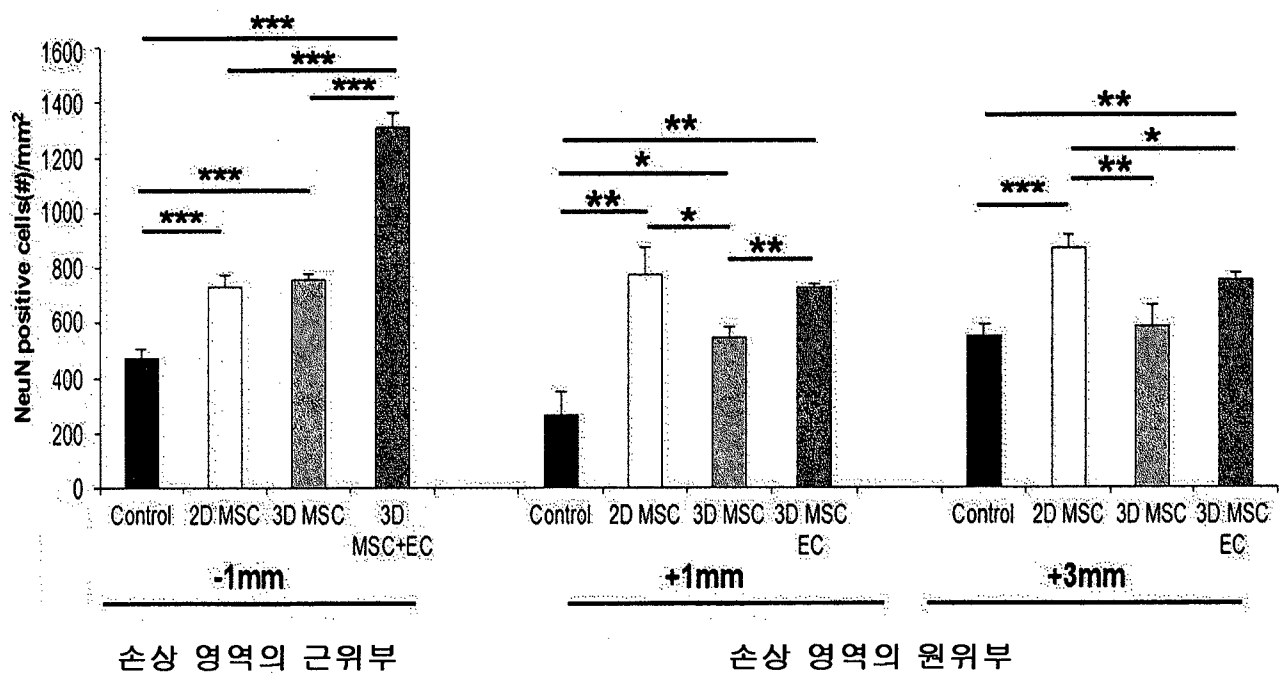
척수 재생에 미치는 효과

체성 감각 유발 전위 검사(SEP)



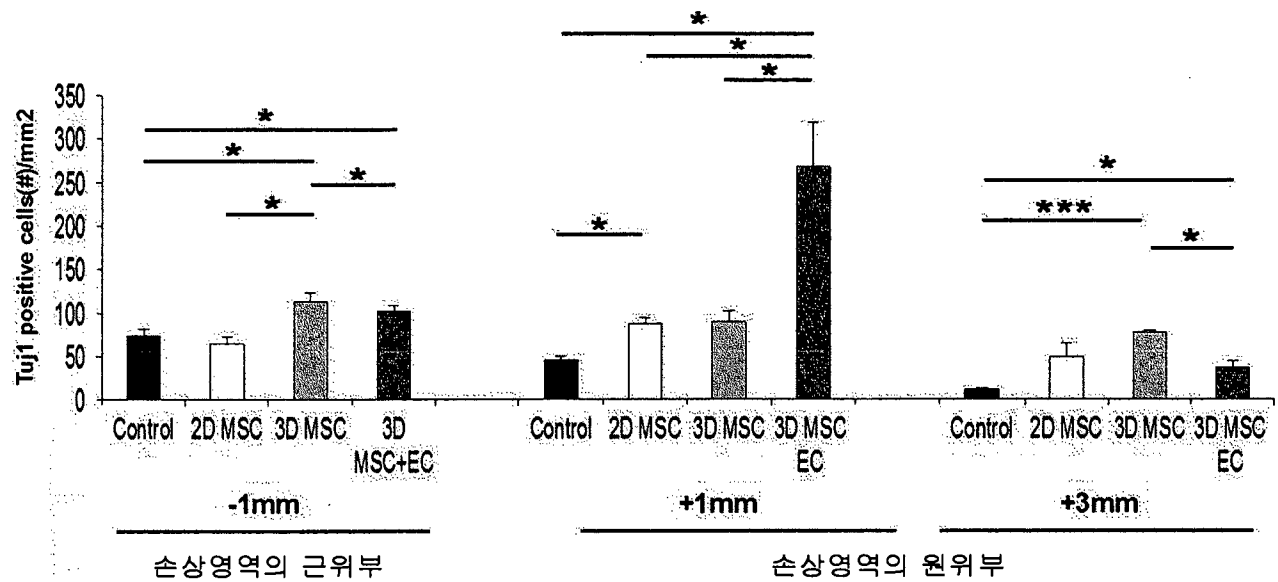
[도18]

척수 손상 모델에 EC 및 MSC를 이식한 경우,
손상 영역의 근위부에서 보다 많은 NeuN+뉴런이 발견됨



[도19]

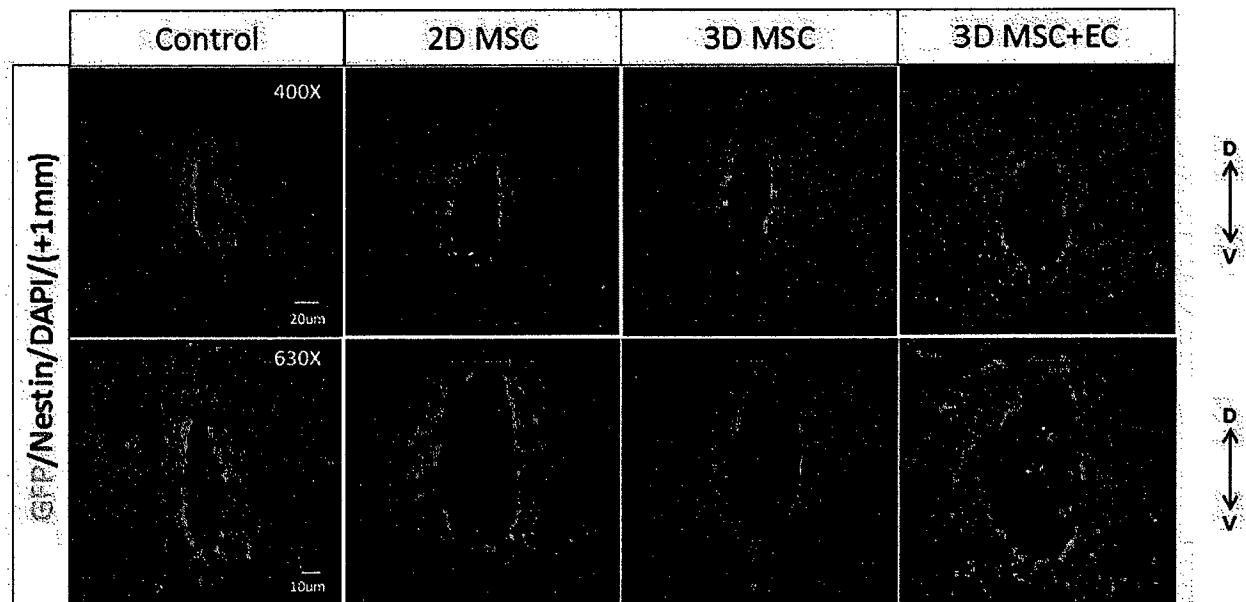
내피세포 및 MSC를 이식한 후 척수 손상 모델의
손상 영역의 원위부에서 보다 많은 TuJ1+ 미성숙 뉴런이 발견됨



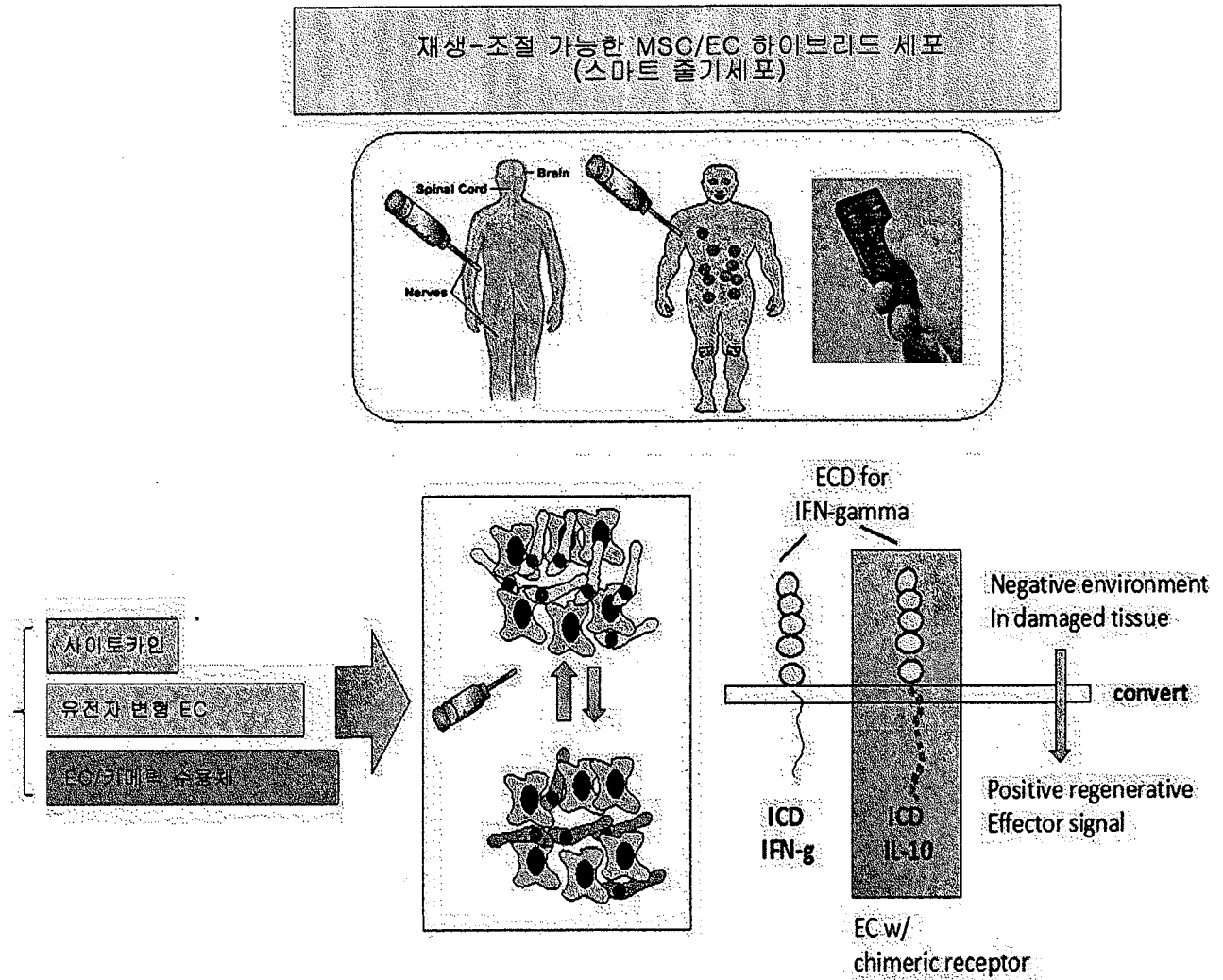
[도20]

재생중인 척수에서 신경 전구세포 (Nestin+세포)에 대한
면역화학 염색

+1mm point tissue section (400X, 630X)



[도21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/003739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2010.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61K 35/44(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/077; C12N 5/06; C12N 5/071; A61P 37/00; C12N 5/08; C12N 5/07; A61K 38/20; C12N 5/0775; A61K 35/28; A61K 35/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Wnt, EphrinB2, STAT3, stem cell, self-renewal, b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , mesenchymal stem cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005-0277189 A1 (TEMPLE, Sally et al.) 15 December 2005 See claims 1 and 5.	1-3,5-6
A		4,7-17
Y	MASCKAUCHAN, T. Nestor H. et al., "Wnt5a Signaling Induces Proliferation and Survival of Endothelial Cells In Vitro and Expression of MMP-1 and Tie-2", Molecular Biology of the Cell, December 2006, vol. 17, pages 5163-5172 See abstract; page 5167, right column.	1-3,5-6,11,14-15
Y	US 2008-0213892 A1 (NUSSE, Roeland et al.) 04 September 2008 See claims 1 and 6; paragraphs [0005] and [0011]; figure 3.	1-3,5-6,11,14-15
Y	KR 10-1027288 B1 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 April 2011 See claim 1; paragraphs [0164]-[0165].	2
X	SALEH, F. A. et al., "Effects of Endothelial Cells on Human Mesenchymal Stem Cell Activity in a Three-dimensional In Vitro Model", European Cells and Materials, 2011, vol. 22, pages 242-257 See abstract; page 243, right column, second paragraph; page 252, right column.	10,13
Y		6,11,14-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/003739

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2008-0095729 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 29 October 2008 See claims 1 and 6.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/003739

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-6 pertain to a composition for promoting auto-regeneration of an adult stem cell, comprising a vascular endothelial cell overexpressing any one or more ligands between Wnt and EphrinB2.

Claims 7-9 pertain to a composition for promoting auto-regeneration of an adult stem cell, comprising a vascular endothelial cell and any one factor selected from the group consisting of b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , and the combination thereof.

Claims 10-17 pertain to a method for preparing a mesenchymal stem cell, of which Niche activity is increased, the method comprising a step of coculturing a vascular endothelial cell and a mesenchymal stem cell.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/003739

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2005-0277189 A1	15/12/2005	US 7901936 B2	08/03/2011
US 2008-0213892 A1	04/09/2008	NONE	
KR 10-1027288 B1	06/04/2011	AU 2003-245073 A1	04/09/2003
		JP 2005-517404 A	16/06/2005
		JP 4834291 B2	14/12/2011
		KR 10-2003-0068696 A	25/08/2003
		KR 10-2004-0084918 A	06/10/2004
		US 2003-0157711 A1	21/08/2003
		US 7510870 B2	31/03/2009
		WO 03-068952 A1	21/08/2003
KR 10-2008-0095729 A	29/10/2008	KR 10-0980849 B1	10/09/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/077(2010.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61K 35/44(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/077; C12N 5/06; C12N 5/071; A61P 37/00; C12N 5/08; C12N 5/07; A61K 38/20; C12N 5/0775; A61K 35/28; A61K 35/44

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Wnt, EphrinB2, STAT3, 줄기세포, 자가재생, b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α , 중간엽 줄기세포

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2005-0277189 A1 (TEMPLE, SALLY 등) 2005.12.15 청구항 1 및 5 참조.	1-3,5-6
A		4,7-17
Y	MASCKAUCHAN, T. NESTOR H. 등, 'Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2', Molecular Biology of the Cell, 2006.12, 제17권, 5163-5172 페이지 초록; 페이지 5167, 우컬럼 참조.	1-3,5-6,11,14-15
Y	US 2008-0213892 A1 (NUSSE, ROELAND 등) 2008.09.04 청구항 1 및 6; 단락 [0005] 및 [0011]; 도면 3 참조.	1-3,5-6,11,14-15
Y	KR 10-1027288 B1 (가톨릭대학교 산학협력단) 2011.04.06 청구항 1; 단락 [0164]-[0165] 참조.	2
X	SALEH, F. A. 등, 'Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model', European Cells and Materials, 2011, 제22권, 242-257 페이지 초록; 페이지 243, 좌컬럼, 두 번째 단락; 페이지 252, 우컬럼 참조.	10,13
Y		6,11,14-15

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2008-0095729 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2008.10.29 청구항 1 및 6 참조.	1-17

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

청구항 1-6은 Wnt 및 EphrinB2 중 어느 하나 이상의 리간드를 과발현하는 혈관내피세포를 포함하는 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물에 관한 것입니다.

청구항 7-9는 혈관 내피세포 및 b-FGF, TPO, VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자를 포함하는 성체 줄기세포의 자가재생 촉진용 조성물에 관한 것입니다.

청구항 10-17은 혈관 내피세포와 중간엽 줄기세포를 공배양하는 단계를 포함하는 니치 활성이 증진된 중간엽 줄기세포의 제조방법에 관한 것입니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☒ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2005-0277189 A1	2005/12/15	US 7901936 B2	2011/03/08
US 2008-0213892 A1	2008/09/04	없음	
KR 10-1027288 B1	2011/04/06	AU 2003-245073 A1	2003/09/04
		JP 2005-517404 A	2005/06/16
		JP 4834291 B2	2011/12/14
		KR 10-2003-0068696 A	2003/08/25
		KR 10-2004-0084918 A	2004/10/06
		US 2003-0157711 A1	2003/08/21
		US 7510870 B2	2009/03/31
		WO 03-068952 A1	2003/08/21
KR 10-2008-0095729 A	2008/10/29	KR 10-0980849 B1	2010/09/10