

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0113838

(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/19 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/074 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0662 (2013.01)

A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0034596

(22) 출원일자 2019년03월26일

심사청구일자 2019년03월26일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

차재민

차재민

서울특별시 영등포구 신풍로 77 104동 705호

방오영

서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 105동 601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

차준용

전체 청구항 수 : 총 19 항

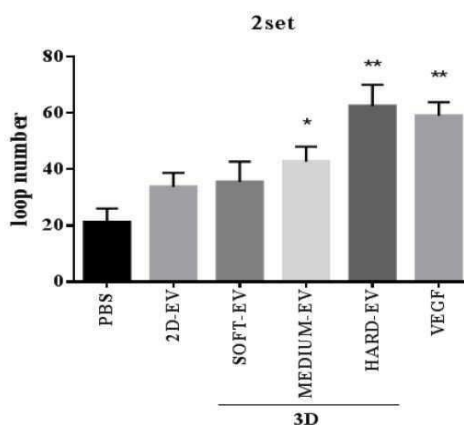
(54) 발명의 명칭 하이드로겔의 기계적 강도를 이용한 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관신생 관련 사이토카인 조절 방법

(57) 요약

본 발명은 하이드로겔의 기계적 강도를 이용한 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관신생 관련 사이토카인 조절 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 줄기세포를 캡슐화하는 단계를 포함하는 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법, 기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화되어 배양된 줄기세포 및 상기 줄기세포로부터 유래된 세포의 소포체에 관한 것으로, 본 발명은 화학적 인자 또는 세포 형질감염 없이 하이드로겔의 기계적 강도 조절이라는 간편하고 안전한 방법을 통하여, 표적 치료 인자로 구성된 세포의 소포체의 생산 가능성을 보여주었다.

대표도 - 도15b

(b)



PBS				2d				soft				medium				hard				veg			
n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4
13	21	16	35	38	41	37	19	21	47	25	49	43	47	28	53	72	76	60	42	61	45	62	68

(52) CPC특허분류

A61K 38/19 (2013.01)

C12N 5/0012 (2013.01)

C12N 5/0606 (2013.01)

C12N 5/0696 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

(72) 발명자

정선영

인천광역시 남동구 인주대로518번길 28-16, 303호

김태희

경기도 부천시 상일로21번길 26-15, 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1C1B2002624

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 줄기세포유래 미세소포체의 약학조성물 조절 및 고효율 대량생산 플랫폼 개발 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 인천대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 줄기세포를 캡슐화하는 단계를 포함하는 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화된 줄기세포를 진탕 배양 또는 바이오리액터로 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 배아줄기세포, 성체줄기세포, 만능유도줄기세포, 및 전발생세포(progenitor cells)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 3차원 고분자 세포 지지체는 메타크릴레이트화된 젤라틴(methacrylated gelatin, GelMA)를 포함하는 하이드로겔인 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 캡슐화는 메타크릴레이트화된 젤라틴(methacrylated gelatin, GelMA) 용액에 줄기세포 및 광개시제를 혼합하고, 상기 혼합 용액에 UV를 조사하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도는 상기 혼합 용액에 조사되는 UV 강도에 의하여 조절되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 방법은 EGF, THPO, PDGF-BB, VEGF-D, ENA-78 또는 MMP-9 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현을 2D 대조

군에 비하여 증가시키는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도는 3 ~ 30 kPa 범위에서 조절되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도가 3 ~ 10kPa인 경우, GRO, PLGF, IFN γ , RANTES, IGF-1, TGF β 1, TIMP-1 또는 VEGF-D 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도가 3 ~ 10kPa인 경우, I-309 또는 IL-10 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 감소되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도가 11 ~ 18kPa인 경우, I-TAC, MCP-3, MCP-4, IL-10, MMP-1, ANGPT1, MMP-9, ANGPT2, PECAM-1, PLG, IL-2, Endostatin, IL-4, 또는 TNF α 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도가 11 ~ 18kPa인 경우, IL-6, ANG 또는 IL-8 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 감소되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도가 19 ~ 30kPa인 경우, Leptin, MCP-1 또는 VEGF 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 기계적 강도가 19 ~ 30kPa인 경우, PLGF, IL-1 α , IL-1 β , PECAM-1, PLG, IL-2, TIE-2, Endostatin, IL-4 또는 TNF- α 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 감소되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법.

청구항 15

기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화되어 배양된 줄기세포.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 줄기세포는 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인이 증가된 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 17

제15항 또는 제16항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 혈관신생의 유도 또는 촉진을 위한 약학적 조성물.

청구항 18

제15항 또는 제16항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포 유래 세포의 소포체.

청구항 19

제18항에 따른 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생의 유도 또는 촉진을 위한 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 하이드로겔의 기계적 강도를 이용한 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관신생 관련 사이토카인 조절 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 줄기세포를 캡슐화하는 단계를 포함하는 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법, 기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화되어 배양된 줄기세포 및 상기 줄기세포로부터 유래된 세포의 소포체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 줄기세포는 자가 재생 및 다 계통 분화 능력이 있는 세포로 정의된다. 인간 배아 줄기세포(human embryonic stem cell, hESC)와 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, hiPSCs)를 포함하는 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell, hPSCs)는 세 가지 모든 배엽층(germ layer)의 유도체로 분화할 수 있는 자가 재생 및 다능성의 가능성을 가지고 있다고 보고되었다. 이러한 이유로 많은 연구자들은 PSC 또는 PSC-유래 세포를 사용하여 다양한 질병을 치료하는 방법에 중점을 두었다.

[0004] 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell, MSC)는 지방, 연골 및 뼈와 같은 간엽 계통으로 분화할 수 있는 자가-재생성, 다능성 성체 줄기세포이다. 비-조혈 줄기세포로서 MSC의 표현형은 CD73, CD90 및 CD105와 같은 표면 마커의 발현 및 CD14, CD34 및 CD45의 결핍으로 특징지어진다. MSC는 초기에 골수에 존재한다고 여겨졌지만, 후속

연구에 의하면 MSC는 지방 조직, 심장, 와튼 젤리(Wharton's jelly), 치수(dental pulp), 말초 혈액, 제대혈, 생리혈, 용모막과 같은 다양한 성인 조직으로부터 분리될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 줄기세포 니치(niche) 및 조직 항상성의 유지는 이러한 다양한 조직에 존재하는 MSC에 의해 이루어진다.

[0005]

최근 세포의 소포체(extracellular vesicle, EV)는 줄기세포-기반 요법의 대체제로 무 세포 치료 전략의 후보가 되었다. 세포의 소포체(EV)는 다른 세포에서 생물학적 신호를 얻거나 산화성 또는 저산소증과 같은 화학적 자극을 받았을 때 세포가 방출하는 지질막으로 둘러싸인 모든 종류의 소낭(vesicle)을 가리킨다. 세포의 소포체의 크기는 약 40nm에서 수 mm이다. 세포의 소포체에서 각 세포 유형에 특유한 생체 분자의 조합은 이중 지질 막 구조로 둘러싸여 있다. 다양한 유형의 단백질(효소, 성장 인자, 수용체 및 사이토카인), 막 단백질, 핵산 및 대사 산물이 세포의 소포체의 주요 내용물이다. 세포의 소포체는 세포, 장기 및 심지어 생물 사이의 신호 전달에 관여하며 혈액, 소변, 뇌척수액, 모유 및 타액과 같은 체액에서 검출된다. 세포의 소포체는 엑소좀(직경 30-100nm), 미세소포(100-1000nm), 그리고 세포사멸체(50-5000nm) 크기로 세분화된다. 세포의 소포체는 또한 biogenesis에 의해 구별할 수 있다. 엑소좀은 다소포체(multivesicular body, MVB)에서 유래한 반면 미세소포(microvesicle, MV)는 세포의 원형질막에서 나와 직접 세포 외 공간으로 방출된다. 엑소좀은 CD9, CD63, CD81, Alix 또는 TSG101과 같은 단백질 마커에 의해 정량화될 수 있지만 미세소포의 특정 마커는 아직 확인되지 않았다. 크기 분석과 형태학 관찰도 가능하다.

[0006]

세포의 소포체는 생체 분자의 다양하고 독특한 구성의 전달을 통해 수용체 세포 기능에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다. 이 다양한 세포 신호 전달을 통해 대상 세포가 소포 기원으로부터 원격 위치에 있더라도 표적 세포를 보호하거나 다른 메시지를 받을 수 있다. 흥미롭게도, 소포(vesicle)의 RNA 8%만이 부모 세포에서 기원한 것으로 밝혀졌으며, 270개의 독특한 유전자 전사물이 엑소좀에서 발견되었다. 세포의 소포체의 단백질은 또한 정보 전달자가 될 수 있다. MSC에서 추출한 세포의 소포체는 수많은 연구를 통해 많은 세포 상호 작용에 참여하는 것으로 입증되었다. 면역 조절 및 재생 잠재력을 보유한 것으로 알려진 MSC는 다량의 세포의 소포체를 방출하기 때문에 잠재적인 치료용 세포의 소포체 생산자로 간주된다. MSC에서 추출한 세포의 소포체는 CD44, CD73, CD90과 같은 특정 마커로 식별할 수 있다. 종합해보면, MSC는 유전 물질과 단백질의 조성이 다른 세포의 소포체를 생산하여 인접한 세포의 행동을 조절하여 기능의 재생을 유도한다고 추측할 수 있다.

[0007]

Bioprocess는 실험실 규모의 연구를 성공적인 임상 요법 또는 상업화로 전환할 수 있는 기술이다. 광범위한 임상 적용을 위해서는 비용, 자동화, 표준화 및 적절한 세포 수를 가진 고품질 세포 생산과 같은 추가적인 문제를 해결해야 한다. 대량 생산 및 품질 관리는 기본적으로 고려되어야 한다. 최근 연구자들은 생물 반응기에서 세포 배양이 세포의 소포체의 생산 속도를 증가시킨다는 것을 보여주었다. 그러나 세포의 소포체의 생산 및 임상 효능을 증가시키기 위한 생물 공정 방법이 없기 때문에 줄기세포에서 추출한 세포의 소포체를 사용하는 데에는 여전히 한계가 있다. 예를 들어, 이전의 연구에서는 2차원 세포 간 접촉만 허용하는 단층 배양 조건이 세포, 세포 외 기질(ECM) 및 기타 인접 세포 간의 커뮤니케이션을 방해한다고 보고했다. 따라서 MSC가 치료 화합물을 방출하는 본래의 능력을 재현하기에는 충분하지 않다. 본 발명자의 이전 연구는 3D 스페로이드에서 MSC를 배양하여 이러한 한계를 극복하고 MSC 유래 미세소포(MV)의 증폭된 생산과 효능을 보였다. 이러한 이전 연구를 토대로, 세포의 소포체 연구를 성공적인 임상 결과로 전환하기 위해서는 보다 효과적인 생물 공정 기술이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009]

(특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0123852호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명은 MSC의 3D 바이오 프로세싱 및 그의 배양 매트릭스를 통해 EV의 치료 화합물을 맞춤형 제작하는 것을 목표로 한다. MSC와 배양 매트릭스 간의 물리적 상호 작용은 MSC가 표적 질병에 대한 준비된 사이토카인의 조합으로 측분비인자(paracrine factor)를 분비하도록 자극한다. 배양 매트릭스의 물리적 특성을 조절하는 것은 세포를 겔마(GelMA, Gelatin methacryloyl) 하이드로겔로 캡슐화함으로써 달성된다. 세포 개질(cell

remodeling)에 관여하는 아르기닌-글리신-아스파르트산(arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 서열, 세포 부착점(cellular attachment point) 및 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP) 반응성 펩티드 모티프를 함유하고 있는, 상기 3D GelMA 하이드로겔은 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)에 둘러싸인 미세 환경을 모방할 수 있다. 이는 세포의 증식과 세포 골격 확장을 허용하여 다른 세포 모폴로지를 나타낸다. 본 발명은 화학적 인자 또는 세포 형질감염 없이 표적 치료 인자로 구성된 EV의 생산 가능성을 보여 주었기 이러한 접근법은 더 큰 규모의 플랫폼에 적용될 수 있으며, MSC에서 추출한 EV를 임상 시험에 적용할 수 있게 해준다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 줄기세포를 캡슐화하는 단계를 포함하는 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법을 제공하며, 상기 방법은 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화된 줄기세포를 진탕 배양 또는 바이옱액터로 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 바이옱액터(bioreactor)는 생물의 체내에서 이루어지는 물질의 분해, 합성, 화학적인 변환 등의 생화학적 반응 과정을 인공적으로 재현하는 시스템을 지칭하며, 생물반응장치라고도 한다.
- [0014] 상기 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells), 성체줄기세포(adult stem cells), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPS cells), 및 전발생세포(progenitor cells)를 모두 포괄하는 의미로 사용될 수 있으며, 예컨대, 줄기세포는 배아줄기세포, 성체 줄기세포, 만능유도줄기세포, 및 전발생세포들로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 줄기세포는 동종 유래의 줄기세포 및/또는 자가 유래의 줄기세포일 수 있다. 바람직하게 상기 줄기세포는 성체줄기세포, 예컨대, 중간엽줄기세포, 보다 구체적으로 인간 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 세포외소포체란 세포에서 생성되어 세포 밖으로 분비되는 소포체로써, 엑소좀(exosome), 마이크로베지클(microvesicle), 마이크로파티클(microparticle) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포의 소포체는 줄기세포로부터 유래한 세포의 소포체일 수 있다.
- [0016] 세포의 소포체의 크기는 약 40nm에서 수 mm일 수 있고, 세포의 소포체에서 각 세포 유형에 특유한 생체 분자의 조합은 이중 지질막 구조로 둘러싸여 있다. 다양한 유형의 단백질(enzymes, growth factors, receptor 및 cytokine), 멤브레인형 지질, 핵산 및 대사 산물이 세포의 소포체의 주요 내용물이다. 세포의 소포체는 세포, 장기 및 심지어 생물 사이의 신호 전달에 관여하며 혈액, 소변, 뇌척수액, 모유 및 타액과 같은 체액에서 검출될 수 있다.
- [0017] 3차원 고분자 세포 지지체는 세포의 체외 배양 및 체내 이식이 가능하도록 만들어진 물리적 지지체로 세포성장을 유도분화하고 촉진시킬 수 있으며, 생체적합성이며 생분해성인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 3차원 고분자 세포 지지체는 메타크릴레이트화된 젤라틴(methacrylated gelatin, GelMA)를 포함하는 하이드로겔로서, 줄기세포의 부착능이 우수하며, 젤라틴과 같은 천연생체고분자를 기반으로 한다.
- [0018] 본 발명에 따른 혈관 신생 관련 사이토카인 조절 방법은 줄기세포를 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화하는 것을 특징으로 하며, 상기 캡슐화 방법은 메타크릴레이트화된 젤라틴(methacrylated gelatin, GelMA) 용액에 줄기세포 및 광개시제를 혼합하고, 상기 혼합 용액에 UV를 조사하여 이루어지고, 상기 메타크릴레이트화된 젤라틴은 UV 조사에 의하여 상호 교차결합(cross-linking)된다.
- [0019] 상기 3차원 고분자 세포 지지체의 기계적 강도는 상기 혼합 용액에 조사되는 UV 강도에 의하여 조절될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 GelMA 수화겔을 제조할 때 GelMA의 methacryloylation 정도, 즉 GelMA의 치환도가 높을수록 가교 밀도가 증가하고 제조된 수화겔의 강성(stiffness)이 증가할 수 있어 이와 같은 방법에 의하여 세포 지지체의 기계적 강도를 조절할 수도 있다.
- [0020] 상기 조사되는 UV의 강도는 $1 \sim 10\text{mW/cm}^2$, GelMA(시편)와의 거리는 $3 \sim 10\text{cm}$ 이며, 이는 고분자의 종류에 따라서 적절하게 조절될 수 있으며, 바람직하게는 $2 \sim 5\text{mW/cm}^2$ 이고, 거리는 $5 \sim 9\text{cm}$ 이며 가장 바람직하게는 3.8mW/cm^2 , 거리는 7cm 이다. UV의 강도가 너무 강하면 줄기세포의 DNA 손상을 유발하여 세포노화와 세포사멸을 유도할 수 있기 때문에, UV의 강도와 GelMA와의 거리를 상기 기재된 범위로 유지하는 것이 바람직하다.

- [0021] 상기 세포 지지체의 기계적 강도는 3 ~ 30kPa 범위에서 3단계로 구분되는데 연성(soft)의 강도를 갖는 세포 지지체는 1 ~ 5초 동안 UV를 조사하며 이때 세포 지지체의 영률(Young's modulus, kPa)은 3 ~ 10kPa이고; 중성(medium)의 강도를 갖는 세포 지지체는 6 ~ 15초 동안 UV를 조사하며 이때 영률은 11 ~ 18kPa이고; 강성(hard)의 강도를 갖는 세포 지지체는 16 ~ 25초 동안 UV를 조사하며 이때 영률은 19 ~ 30kPa이다.
- [0022] 상기 세포 지지체의 기계적 강도가 3kPa 미만이면 세포 배양 과정에서 하이드로젤이 풀어지게 되고, 기계적 강도가 30kPa를 초과하는 경우에는 세포가 자라지(growth) 못하게 된다.
- [0023] 적절한 상업적 UV 광개시제는 CIBA SPECIALTY CHEMICALS사로부터 입수 가능한 Irgacure TM 184, Irgacure TM 500, Irgacure TM 907, Irgacure TM 369, Irgacure TM 1700, Irgacure TM 651, Irgacure TM 819, Irgacure TM 1000, Irgacure TM 1300, Irgacure TM 1870, Irgacure TM 2959, Darocur TM 1173, Darocur TM 2959, Darocur TM 4265 및 Darocur TM ITX, BASF AG사로부터 입수 가능한 Lucerin TM TPO, LAMBERTI사로부터 입수 가능한 Esacure TM KT046, Esacure TM KIP150, Esacure TM KT37 및 Esacure TM EDB, SPECTRA GROUP Ltd.사로부터 입수 가능한 H-Nu TM 470 및 H-Nu TM 470X를 사용할 수 있으며, 본 발명에서는 2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone(Irgacure TM 2959)을 사용하였다.
- [0024] 상기 방법으로 줄기세포를 캡슐화한 이후, 이를 진탕 배양하면 혈관신생 관련 사이토카인인 EGF, THPO, PDGF-BB, VEGF-D, ENA-78 또는 MMP-9 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현을 2D 대조군에 비하여 증가시키며, 이는 기계적 강도에 상관없이 모든 그룹(연성, 중성 및 강성)에서 나타나는 특징이다.
- [0025] 연성 그룹(3 ~ 10kPa)에서 배양된 줄기세포의 세포의 소포체(EV)의 경우 I-309 또는 IL-10 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 다른 그룹(중성, 강성 및 2D 대조군)에 비하여 감소되며, GRO, PLGF, IFN γ , RANTES, IGF-1, TGF β 1, TIMP-1 또는 VEGF-D 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 다른 그룹에 비하여 증가된다.
- [0026] 중성 그룹(11 ~ 18kPa)에서 배양된 줄기세포의 세포의 소포체(EV)의 경우 I-TAC, MCP-3, MCP-4, IL-10, MMP-1, ANGPT1, MMP-9, ANGPT2, PECAM-1, PLG, IL-2, Endostatin, IL-4, 또는 TNF α 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 다른 그룹(연성, 강성 및 2D 대조군)에 비하여 증가되며, IL-6, ANG 또는 IL-8 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 다른 그룹에 비하여 감소된다.
- [0027] 강성 그룹(19 ~ 30kPa)에서 배양된 줄기세포의 세포의 소포체(EV)의 경우 PLGF, IL-1 α , IL-1 β , PECAM-1, PLG, IL-2, TIE-2, Endostatin, IL-4 또는 TNF- α 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 다른 그룹(연성, 중성 및 2D 대조군)에 비하여 감소하며, Leptin, MCP-1 또는 VEGF 중 어느 하나 이상의 사이토카인 발현이 다른 그룹에 비하여 증가한다.
- [0028] 본 발명의 다른 실시 예에서, 기계적 강도가 조절된 3차원 고분자 세포 지지체 내부에 캡슐화되어 배양된 줄기세포 및 상기 줄기세포로부터 유래된 세포의 소포체가 제공된다. 상기 캡슐화는 메타크릴레이트화된 젤라틴(methacrylated gelatin, GelMA) 용액에 줄기세포 및 광개시제를 혼합하고, 상기 혼합 용액에 UV를 조사하여 이루어질 수 있으며, 기계적 강도는 UV 조사 시간에 의하여 조절된다. 또한 상기 배양된 줄기세포는 collagenase로 상기 GelMA를 분해하여 분리할 수 있으며, 상기 줄기세포는 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [0029] 줄기세포로부터 세포의 소포체를 분리하는 방법은 알려진 통상적인 모든 방법에 의하여 수행될 수 있으며, 예컨대 원심분리, 필터링(Filtering), 컬럼(size exclusion column), exoquick 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명자는 세포의 소포체 분리를 위하여 tangential flow filtration(TFF)를 이용하였다.
- [0030] 또 다른 실시 예에서, 상기 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 유래된 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생의 유도 또는 촉진을 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명에 따른 세포의 소포체의 혈관 신생 관련 사이토카인이 증가된 줄기세포 유래 세포의 소포체는 대조군에 비하여 다양한 혈관신생 사이토카인의 발현이 증가되는 것뿐만 아니라 상기 세포의 소포체를 HUVEC에 처리한 경우 대조군에 비하여 효과적으로 혈관신생을 유도하여 혈관을 형성한다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 상기 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 유래된 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생의 유도 또는 촉진을 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물은 혈관신생을 필요로 하는 질환, 예를 들어 심근경색증, 뇌졸중, 저산소성 허혈성 뇌손상, 하지동맥경화성 질환 등의 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 유래된 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체, 즉 세포 치료제(cell therapy) 분야에서 통상적으로 사용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 제제학적 방법에 따라 세포이식을 위한 조직 내-이식용 주사제, 정맥 주사제, 주사용 동결건조제 등의 형태로 제제화될 수 있으며, 특히 바람직하게는 세포이식을 위한 조직내-이식용 주사제의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 멸균된 수용액(예를 들어, 생리 식염수 등), 비수성용제 등을 포함할 수 있다. 또한, 필요에 따라 적절한 안정화제, 아주반트(예를 들어, 프로인트 완전 아주반트, 프로인트 불완전 아주반트 등), 등장화제, 보존제 등을 포함할 수도 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 하이드로겔의 기계적 강도를 이용한 줄기세포 유래 세포의 소포체의 혈관신생 관련 사이토카인 조절 방법은 화학적 인자 또는 세포 형질감염 없이 하이드로겔의 기계적 강도 조절이라는 간편하고 안전한 방법을 통하여, 표적 치료 인자로 구성된 세포의 소포체의 생산 가능성을 보여주었다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 캡슐화 과정을 개략적으로 나타낸 그림이다; (a) 처리되지 않은 슬라이드 글라스를 10% NaOH 용액에 담근 후, TMS-PMA 및 PEG로 코팅하였다. (b) 트립신 처리된 MSC를 1:5(v/v)의 비율로 0.005% PI 용액에서 10% 젤마와 혼합하였다. (c) 제작된 PDMS 스페이서 위에 Cell-GelMA 혼합물을 300 μ m의 높이로 놓고 UV를 조사하였다. (d) 자외선의 출력은 3.8 mW/cm²이고, 경화 시간은 연성, 중성 및 강성에 대해 각각 3초, 10초 및 20초이다. (e) 캡슐화된 MSC는 20 rpm의 속도로 케도 진탕기에서 5일 동안 배양되었다.

도 2는 GelMA의 기계적 성질을 AFM로 측정한 결과를 나타낸다; (a) GelMA 샘플의 힘-거리 곡선과 (b, c) GelMA의 힘-거리 곡선으로부터의 영률값.

도 3은 연성, 중성 및 강성 GelMA 하이드로겔의 FIB Quanta 3D 이미지이다.

도 4는 MSC 마커의 qRT-PCR 분석결과를 나타낸 것으로, 획득된 Ct 값은 GAPDH로 정규화되었다.

도 5는 2차원 배양(2D) 대조군 MSCs의 면역세포화학(Immunocytochemistry) 이미지이다; (a) DAPI 처리되지 않은 음성 대조군, (b) DAPI 처리된 음성 대조군, (c) 양성 MSC 마커인 CD105로 면역 염색된 2차원 배양(2D) 대조군 MSCs.

도 6은 캡슐화된 MSC의 광학 현미경 이미지이다; (a) 연성, (b) 중성, (c) 강성 GelMA 하이드로겔.

도 7은 캡슐화된 MSC의 Live and Dead 결과를 보여주는 사진이다; (a) 연성, (b) 중성, (c) 강성 GelMA 하이드로겔.

도 8은 배양 5일 후의 캡슐화된 MSC의 팔로이딘(phalloidin) 염색 이미지이다; (a) 연성, (b) 중성, (c) 강성 GelMA 하이드로겔, 팔로이딘(녹색), DAPI(파랑).

도 9는 캡슐화된 MSC 및 2차원 배양(2D) MSC의 유전자 발현 프로파일 분석결과를 비교한 그림이다; 캡슐화된 MSC의 유전자 발현 프로파일에 대한 (a) qPCR array, (b) 산점도(scatter plot), (c) 그래프.

도 10은 캡슐화된 MSC의 DNA 정량 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 분리된 세포의 소포체의 TEM 이미지이다.

도 12는 세포의 소포체의 크기 분포를 나타내는 그래프이다; (a, b) GelMA 캡슐화된 MSC로부터 유래된 세포의 소포체의 크기 분포 그래프, (c) 평균 크기.

도 13은 분리된 세포의 소포체의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 사진이다.

도 14는 분리된 세포의 소포체의 혈관신생 사이토카인 어레이(Angiogenic cytokine array) 분석 결과이다.

도 15는 분리된 세포의 소포체의 시험관 튜브 형성 효능 실험(tube formation efficacy assay) 결과를 나타내는 그림이다; VEGF는 양성 대조군이며, PBS는 음성 대조군임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0040] 실시예

[0041] (1) 캡슐화 준비

[0042] 무-처리 베어 슬라이드 글래스는 다이아몬드 커터를 사용하여 24 X 24mm로 절단하고 실온에서 밤새 10% NaOH 용액에 담가 놓았다. 글래스를 증류수 및 70% 에탄올로 2회 세척한 후 건조시켰다. 완전 건조된 글래스는 80℃에서 3-트리메톡시실릴프로필 메타크릴레이트(3-trimethoxysilyl propyl methacrylate, TMS-PMA) 용액으로 밤새 처리하였다. TMS-PMA 코팅 유리를 PEG 용액으로 스핀 코팅하였다. Working PEG 용액은 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS), 폴리(에틸렌 글리콜) 1000 디메타크릴레이트(Poly(ethylene glycol) 1000 dimethacrylate, PEG), 광개시제(2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone)를 각각 10:1:0.1의 비율로 포함한다. PEG-코팅된 유리는 3.8 mW/cm^2 의 출력에서 60초 동안 UV 유도 가교 결합되었다(Omniculture® S2000, Excelitas Technologies Corp., Massachusetts, USA). 경화된 유리를 PBS로 다시 세척하고 건조시켰다. 캡슐화하기 전에, 10% 겔마(GelMA, Gelatin methacryloyl)를 함유하는 겔마 하이드로겔 용액 및 PBS 중의 0.05%의 광개시제를 새로 제조하고 즉시 사용하였다. 높이가 $300\mu\text{m}$ 인 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS) 스페이서도 캡슐화 공정을 위해 제작되었다.

[0044] (2) MSC의 배양 및 캡슐화

[0045] 인간중간엽줄기세포(hMSCs, PT2501, Lonza, Basel, Switzerland)를 5% CO_2 를 함유한 습한 대기에서 37℃ 인큐베이터에서 배양하였다. MSC의 확장(expansion)을 위해 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 항생제-항균제를 포함하는 Low-glucose DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)를 사용하였다. 배지는 3-4일마다 교체되었다. 캡슐화된(Encapsulated) MSCs는 10% FBS와 1% 항생제-항균제를 포함하는 Low-glucose DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)와 함께 배양하였다.

[0046] hMSC의 캡슐화를 위해, 세포를 TrypLE Express(Gibco)로 해리시키고 세포 수를 혈구계(hemocytometer)로 계산하였다. 트립신 처리된(Trypsinized) 세포를 1.5×10^5 세포/총 부피 $75\mu\text{l}$ 의 농도로 5:1의 비율로 겔마(GelMA) 용액과 캡슐화 배지에 현탁시켜, 최종 겔마(GelMA) 농도를 8.3%로 만들었다. 현탁된 hMSC를 포함하는 GelMA 용액 $75\mu\text{l}$ 를 TMS-PMA 및 PEG-코팅된 슬라이드 글래스에 부었다. MSC는 달리 조절된 기계적 강도(mechanical stiffnesses)를 갖는 가교 결합된 겔마(GelMA) 내에 캡슐화되었다; 즉, 연성(Soft)(3.8mW/cm^2 에서 3초), 중성(Medium)(3.8mW/cm^2 에서 10초), 강성(Hard)(3.8mW/cm^2 에서 20초). 캡슐화된 MSC는 20rpm의 속도-진탕 조건하에서 5일 동안 배양되었다. 배지는 배양 기간 동안 변경되지 않았다.

[0048] 실험예

[0049] (1) 겔마(GelMA) 하이드로겔에 의한 배양 기질(culture matrix)의 물리적 특성 조절

[0050] 겔마(GelMA) 하이드로겔의 기계적 성질은 하이드로겔용 probehand가 장착된 원자 힘 현미경(AFM, XE-120, Park Systems, Suwon, South Korea)을 사용하여 힘-거리(F/D) 곡선 측정에 의해 조사되었으며, F/D 곡선 측정은 PBS 용액으로 채워진 액체 환경에서 수행되었고 각 샘플의 무작위로 선택된 5개의 포인트에서 기록되고 평균화되었다.

표 1

샘플	1	2	3	4	5
연성(Soft)	7.11	9.21	11.84	11.86	6.51

중성(Medium)	13.15	11.7	13.39	16.65	15.47
강성(Hard)	26.39	17.99	20.53	22.15	17.42

[0053] 상이한 강도(stiffness)를 갖는 각 겔마 하이드로겔의 영률(Young's modulus, kPa)을 측정하였으며, 결과는 '강성' 그룹에서 가장 높은 영률(19 ~ 30kPa)을 나타냈으며 연성 그룹에서 가장 낮은 영률(3 ~ 10kPa)을 나타내었다(도 2). 겔마(GelMA) 하이드로겔의 공극율(Porosity)과 형태(morphology)는 Focused Ion Beam Quanta 3D(FIB Quanta 3D)에 의해 관찰되었다. 기공 크기(Pore size)와 공극율은 하이드로겔의 강도가 증가함에 따라 감소하였다(도 3).

[0055] (2) 상이한 기계적 특징에서 MSC의 캡슐화 및 배양

[0056] 인간 골수 유래 MSC를 정상 세포 확장 배지(expansion medium)와 함께 배양하였다. MSC는 qRT-PCR 및 면역세포 화학(Immunocytochemistry)을 사용하여 세포 표면 마커 발현에 대해 평가되었다.

[0057] 면역세포화학(Immunocytochemistry) 실험은 아래의 과정으로 수행하였다; hMSCs는 4℃에서 10분간 4%(w/v) 파라포름알데히드(Biosesang, 성남, 한국)에 고정시켰다. PBS로 세척한 후, 샘플을 0.2% Triton X-100에서 15분 동안 투과화하였다. 샘플을 PBS로 3회 세척하고 밤새 4℃에서 4% BSA(Bovine serum albumin)으로 차단시켰다. 차단 후, 캡슐화된 세포를 세포의 세포 골격 구조의 이미징을 위해 4℃에서 밤새 Alexa Fluor 488 Phalloidin(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)과 함께 배양 하였다. MSC의 특성 규명을 위해 2D 대조군 MSC를 4℃에서 밤새 1차 항체 mouse-anti CD105(Abcam, Cambridge, England)와 2차 항체 AlexaFluor 488 anti-mouse IgG(Abcam)와 함께 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 샘플을 1% BSA로 3회 세척하고 암실에서 실온에서 10분 동안 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Thermo Fisher Scientific)과 함께 배양 하였다. 샘플을 1% BSA 및 PBS로 각각 1회 세척하였다. 시료는 mountant(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 보존하였다. 공초점 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 이미지를 시각화하였다.

[0058] 상기 실험 결과 MSC는 qRT-PCR 결과에서 CD73 및 CD105에 대해 양성 발현, CD34 및 CD45에 대해 음성을 나타내었다(도 4). 염색 데이터는 양성 대조군에서 MSCs의 CD105 발현을 나타내었으며 음성 대조군에는 CD105 발현을 확인할 수 없었다(도 5).

[0059] MSC는 겔마(GelMA)의 기계적 강성을 조절함으로써 달성된 서로 다른 매트릭스 특성을 갖는 겔마(GelMA) 하이드로겔에 3차원적으로 캡슐화되었다. 캡슐화된 MSC는 20 rpm의 궤도-진탕 조건하에서 FBS 배양 배지를 사용하여 배양되었다.

[0060] 캡슐화된 MSC는 기질의 강성이 다양함에 따라 다른 형태를 나타내었다. 연성 조건에서 MSCs는 '뉴런-형(neuron-like)'과 때로는 '응집된(aggregated)' 형태를 보여 주었으며, 세포 골격 확장(cytoskeleton extension)이 관찰되었다. 강성 그룹에서는 반대로, MSC의 형태는 둥글고 응집되지 않았으며, 그 세포 골격이 확장되지 않았다(도 6 및 8). 그러나 MSC는 여전히 다른 세포 거동을 보이면서도 MSC 줄기세포능(stemness)을 유지하였다(도 9). 캡슐화된 MSCs는 live and dead assay에서 높은 생존력을 보였다(도 7). 또한, DNA 정량화 결과는 배양 기간 동안 캡슐화된 MSC가 성장(growing)하는 것으로 나타났다(도 10).

[0062] (3) 캡슐화 및 2D 대조군 MSC의 유전자 발현 프로파일링

[0063] 생물학적 특성을 특성화하기 위해, 캡슐화된 MSC 및 2D 대조군 MSC의 유전자 발현 패턴을 분석하였다. 유전자 발현 패턴은 qRT-PCR에 의해 분석하였으며 그 실험방법은 아래와 같다.

[0064] 캡슐화된 MSC의 총 RNA를 배양 5일째에 추출하고, Collagenase(Sigma)를 GelMA 하이드로겔 분해에 사용하였다. 클로로포름(Sigma)을 1:5(v/v)의 비율로 TRIzol 시약(ThermoFisher Scientific) 처리 샘플에 첨가하였다. 클로로포름과 TRIzol을 혼합한 시료를 4℃, 15,000 rpm으로 15 ~ 20분간 원심 분리한 후, 상등액을 분리하고 1:1의 비율로 이소프로판올(Sigma)과 혼합하였다. 다시 4℃, 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후, 상등액을 버리고 펠릿을 70% 에탄올로 세척한 다음 동일한 조건에서 다시 원심 분리하였다. 용액을 제거하고 펠릿을 실온에서 수분간 완전히 건조시켰다. 펠릿을 적절한 DEPC 처리되지 않은 nuclease-free water(Invitrogen)에 용해시켰다.

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix(TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 역전사하여 제조사의 지시에 따라 cDNA를 제조하였으며, qRT-PCR 어레이는 지시에 따라 RT² 프로파일러 PCR 어레이(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 수행되었다.

[0065] 상기 qRT-PCR 결과를 도 9(a)에 그래프로 나타내었다. 상기 실험에서 확인한 발현 유전자는 [표 2]에 도시하였다.

표 2

[0066]

기능	관련 유전자(마커)
Stemness	CTNNB1(Catenin(cadherin associated protein), beta 1); FGF2(Fibroblast growth factor 2); INS2(Insulin II); LIF(Leukemia inhibitory factor); POU5F1(POU domain, class 5, transcription factor 1); SOX2(SRY-box containing gene 2); TERT(Telomerase reverse transcriptase); WNT3A(Wingless-related MMTV integration site 3A); ZFP42(Zinc finger protein 42)
MSC-Specific	ALCAM(Activated leukocyte cell adhesion molecule); ANPEP(Alanyl(membrane) aminopeptidase); BMP2(Bone morphogenetic protein 2); BMP7(Bone morphogenetic protein 7); CASP3(Caspase 3); CD44(CD44 antigen); ENG(Endoglin); ERBB2(v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2); FUT4(Fucosyltransferase 4); FZD9(Frizzled homolog 9); ITGA6(Integrin alpha 6); ITGAV(Integrin alpha V); KDR(Kinase insert domain receptor); MCAM(Melanoma cell adhesion molecule); NGFR(Nerve growth factor receptor); NT5E(5' nucleotidase, ecto); PDGFRB(Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide); PROM1(Prominin 1); THY1(Thymus cell antigen 1, theta); VCAM1(Vascular cell adhesion molecule 1)
Adipogenesis	PPARG(Peroxisome proliferator activated receptor gamma); RHOA(Ras homolog gene family, member A)
Tenogenesis	GDF15(Growth differentiation factor 15); SMAD4(MAD homolog 4); TGFBI(Transforming growth factor, beta 1)
Myogenesis	ACTA2(actin alpha 2); JAG1(Jagged 1); NOTCH1(Notch gene homolog 1)
Chondrogenesis	ABCB1(ATP-binding cassette, sub-family B(MDR/TAP), member 1A); BMP4(Bone morphogenetic protein 4); GDF5(Growth differentiation factor 5); GDF6(Growth differentiation factor 6); GDF7(Growth differentiation factor 7); HAT1(Histone aminotransferase 1); ITGAX(Integrin alpha X); KAT2B(lysine acetyltransferase 2B); SOX9(SRY-box containing gene 9); COL1A1(Collagen, type I, alpha 1)
Osteogenesis	ANXA5(Annexin A5); BGLAP(Bone gamma carboxyglutamate protein 1); BMP6(Bone morphogenetic protein 6); FGF10(Fibroblast growth factor 10); HDAC1(Histone deacetylase 1); HNF1A(HNF1 homeobox A); MMP2(Matrix metalloproteinase 2); PTK2(PTK2 protein tyrosine kinase 2); RUNX2(Runt related transcription factor 2); SMURF1(SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1); SMURF2(SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2); TBX5(T-box 5)
Angiogenesis	CSF3(Colony stimulating factor 3); EGF(Epidermal growth factor); FUT1(Fucosyltransferase 1); HGF(Hepatocyte growth factor); PIGS(Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S); VEGFA(Vascular endothelial growth factor A); VWF(Von Willebrand factor homolog); NUDT6(Nudix(nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6)
Neurogenesis	NUDT6; NES(Nestin); BDNF(Brain derived neurotrophic factor); VIM(Vimentin); SLC17A5(solute carrier family 17 member 5); CSF2(Colony stimulating factor 2); IL1B(Interleukin 1 beta); IL6(Interleukin 6)
Immunomodulation	ITGB1(Integrin beta 1); KITLG(KIT ligand); PTPRC(Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C); TGFBI3(Transforming growth factor, beta 3); ICAM1(Intercellular adhesion molecule 1); IFNG(Interferon gamma); IGF1(Insulin-like growth factor 1); IL10(Interleukin 10); TNF(Tumor necrosis factor)
Anti-Apoptosis	GTF3A(General transcription factor III A)

[0068] 강성 그룹의 MSC는 2D 대조군 MSC와 비교하여, 강화된 혈관신생(angiogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 골

형성(osteogenesis), 신경생성(neurogenesis) 및 면역 조절(immunomodulation) 관련 유전자 발현을 보였다.

[0069] 구체적으로 강성 그룹에서는 혈관신생(angiogenesis) 관련 유전자 중에서 CSF3, EGF, FUT1, HGF 및 VWF 유전자; 연골형성(chondrogenesis) 관련 유전자 중에서 ABCB1, BMP4, GDF6, GDF7, HAT1 및 ITGAX; 골형성(osteogenesis) 관련 유전자 중에서 BGLAP, BMP6, FGF10, HDAC1, HNF1A, RUNX2, SMURF1 및 TBX5; 신경생성(neurogenesis) 관련 유전자 중에서 NES, CSF2 및 IL1B; 면역 조절(immunomodulation) 관련 유전자 중에서 PTPRC, TGFβ3, ICAM1, IFNG, IL10 및 TNF 유전자가 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 대조적으로, 지질생성(adipogenesis), 테노제네시스(tenogenesis), 근발생(myogenesis), 및 항-세포사멸(anti-apoptosis)에 관련된 유전자는 하향 조절되었다.

[0071] 구체적으로 지질생성(adipogenesis) 관련 유전자 중에서 RHOA; 테노제네시스(tenogenesis) 관련 유전자 중에서 GDF15, SMAD4 및 TGFβ1; 근발생(myogenesis) 관련 유전자 중에서 ACTA2 및 JAG1; 항-세포사멸(anti-apoptosis) 관련 유전자인 GTF3A 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 흥미롭게도 강성 그룹의 MSC는 2D 대조군 MSC와 비교하여, 줄기세포로서의 특성은 고도로 상향 조정되었고 다른 생물학적 특성은 변화를 보였다. 구체적으로 줄기세포능(Stemness) 마커 유전자 중에서 INS2, LIF, POU5F1, SOX2, TERT, WNT3A 및 ZFP42 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] 중성 그룹의 MSC는 강성 그룹과 유사한 유전자 발현 패턴을 나타내었으나, 연성 그룹의 MSC는 강성 그룹과는 다른 유전자 발현 패턴을 나타내는 경향이 있었다. 연성 그룹의 MSC에서 연골형성(chondrogenesis), 면역 조절(immunomodulation), 신경생성(neurogenesis), 테노제네시스(tenogenesis), 골형성(osteogenesis), 근발생(myogenesis) 관련 유전자, 및 MSC 특이적 마커는 하향 조절되었으나, 혈관신생(angiogenesis), 지질생성(adipogenesis), 항-세포사멸(anti-apoptosis)에 관련된 유전자는 큰 변화를 나타내지 않았다.

[0074] 구체적으로 연골형성(chondrogenesis) 관련 유전자 중에서 BMP4, KAT2B 및 COL1A1; 골형성(osteogenesis) 관련 유전자 중에서 ANXA5, PTK2, SMURF1 및 SMURF2; 면역 조절(immunomodulation) 관련 유전자 중에서 ITGB1 및 PTPRC; 신경생성(neurogenesis) 관련 유전자 중에서 BDNF 및 VIM; 테노제네시스(tenogenesis) 관련 유전자 중에서 GDF15 및 SMAD4; 근발생(myogenesis) 관련 유전자 중에서 ACTA2 및 JAG1 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] (4) 캡슐화 및 2D 대조군 MSC에 의해 생성된 EV의 특성

[0077] 배양 5일째에 캡슐화된 MSC로부터 수집된 EVs를 투과 전자 현미경(TEM)으로 이미지화하고, 이들의 형태를 시각화하였다.

[0078] EV는 다음과 같은 방법으로 분리하였다; 캡슐화된 hMSCs 조정 배지(conditioned medium)를 배양 5일째에 수집하고, 0.22μm 막 주사기 필터를 통해 여과하여 죽은 세포를 제거하였다. 수집된 배지를 100,000g, 4℃에서 1시간 동안 원심분리하고 그 상등액을 제거하였다. 수집된 EVs의 세척을 위해 PBS를 넣고 100,000g, 4℃에서 1시간 동안 다시 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 EV를 펠렛으로 수집하였다. 수집된 EV는 둥근 bi-lipid 막 구조를 보였다(도 11).

[0079] EV의 크기 분포는 NTA(nanoparticle tracking analysis, Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom) 시스템에 의해 분석되었다. 겔마로 캡슐화된 MSC의 EV는 2D 대조군에 비해 크기가 큰 EV의 비율이 더 높았다(도 12). Western blot은 수집된 EV가 세포사멸체(apoptotic body)가 아님을 보여주기 위해 수행되었다. EVs는 세포사멸체 발현을 나타내지 않았다(도 13).

[0081] (5) 캡슐화된 MSC 유래 EV의 혈관 생성 효능(Angiogenic efficacy)

[0082] 캡슐화된 MSC 유래 EVs의 혈관 생성 효능은 사이토카인 어레이 및 튜브 형성 분석(tube formation assay)에 의해 확인되었다.

[0083] 분리된 EV의 용해물은 제조사의 지시에 따라서 cytokines array(human angiogenesis cytokine array, Abcam)에 적용하였다. 본 cytokines array를 통하여 발현 패턴을 확인한 사이토카인(cytokine)은 [표 3]에 나타내었다.

표 3

[0084]

cytokine	Full name	cytokine	Full name
GRO	Growth-related oncogene	uPAR	Urokinase plasminogen activator receptor
PLGF	Placental growth factor	GM-CSF	Granulocyte-macrophage CSF
IFN- γ	Interferon γ	MCP3	Monocyte chemoattractant protein 3
RANTES	RNATES(CCL5)	VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
IGF-1	Insulin-like growth factor 1	I-309	Small inducible cytokine I-309
TGF- β 1	Transforming growth factor-beta 1	MCP-4	Monocyte chemoattractant protein
IL-6	Interleukin 6	VEGFR3	vascular endothelial growth factor receptor 3
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	IL-10	Interleukin 10
ANG	Angiogenin	MMP-1	matrix metalloproteinase 1
IL-8	Interleukin 8	ANGPT1	angiopoietin 1
TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	IL-1 α	Interleukin 1 α
EGF	Epidermal growth factor	MMP-9	matrix metalloproteinase 9
Leptin	Leptin	ANGPT2	angiopoietin 1
THPO	thrombopoietin	IL-1 β	Interleukin 1 β
ENA-78	Epithelial neutrophil-activating protein	PECAM-1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1	PLG	plasminogen
VEGF	vascular endothelial growth factor precursor	IL-2	Interleukin 2
bFGF	Fibroblast growth factor 2	TIE-2	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-2
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor polypeptide	endostatin	endostatin
VEGF-D	Vascular endothelial growth factor D	IL-4	Interleukin 4
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor	TNF- α	Tumor necrosis factor α
I-TAC	IFN-ind. T-cell chemoattractant		

[0085]

cytokines array결과를 살펴보면, 일반적으로 캡슐화된 MSC 유래 EV는 2D 대조군 MSC 유래 EV보다 높은 혈관 신생 관련 사이토카인 발현을 나타냈다(도 14).

[0086]

특히, 연성 조건으로 캡슐화된 MSC에서 유래된 EV의 경우, GRO, PLGF, IFN γ , RANTES, IGF-1, TGF β 1, TIMP-1 및 VEGF-D와 같은 혈관 신생 인자는 다른 그룹에 비해 높게 발현되었으며, I-309 및 IL-10의 발현이 높게 감소하였다.

[0087]

중성(medium) 조건으로 캡슐화된 MSC에서 유래된 EV는 I-TAC, MCP-3, MCP-4, IL-10, MMP-1, ANGPT1, MMP-9, ANGPT2, PECAM-1, PLG, IL-2, Endostatin, IL-4, 및 TNF α 에서 높은 발현이 나타났고, IL-6, ANG 및 IL-8에서는 다른 그룹에 비하여 오히려 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0088]

강성 조건으로 캡슐화된 MSC에서 유래된 EV는 대부분의 항체에서 연성 및 중성 조건에서 캡슐화된 MSC에서 유래된 EV와 유사한 발현 수준을 나타내었다. 특히 강성조건에서는 Leptin, MCP-1 및 VEGF에서 다른 그룹에 비하여 높은 발현을 나타내었으며, PLGF, IL-1 α , IL-1 β , PECAM-1, PLG, IL-2, TIE-2, Endostatin, IL-4 및 TNF- α 는 2D 대조군에 비하여 발현이 감소하였다.

[0089]

EGF, THPO, PDGF-BB, VEGF-D, ENA-78 및 MMP-9는 연성, 중성 및 강성 모든 그룹에서 2D 대조군에 비하여 발현이 증가하였으며, bFGF는 연성 및 강성 그룹에서 다른 그룹에 비하여 발현이 증가하였으며, G-CSF, I-TAC, uPAR, VEGFR2 및 MCP-4는 중성 및 강성 그룹에서 다른 그룹에 비하여 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0090]

튜브 형성 효능 시험(tube formation assay)은 다음과 같이 수행하였다; 실험 전 μ -Slide Angiogenesis 15 well(Ibidi, Martinsried, Germany)을 37°C에서 30분 동안 매트릭셀(BD Bioscience, California, USA)로 코팅

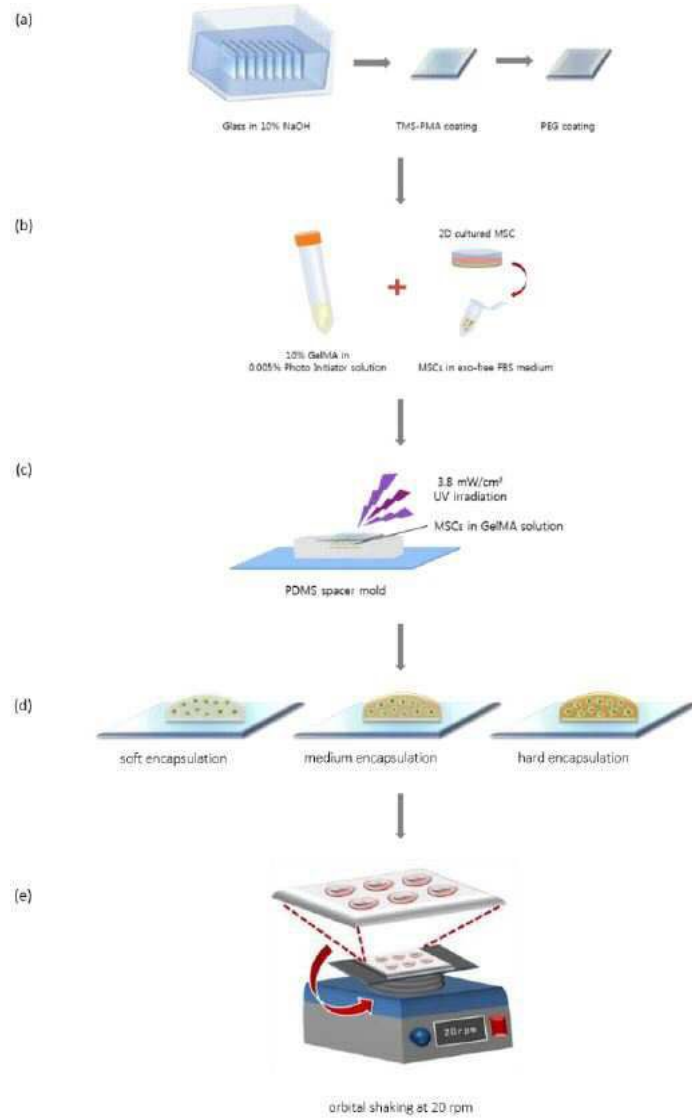
하였다. Human Umbilical Vascular Endothelial Cell(HUVEC)을 트립신 처리하고, 세포 현탁액을 상부 웰이 적용하였다. 캡슐화(연성, 중성 및 강성) 및 2D 대조군 MSC로부터 분리된 EV를 각 웰에 첨가하여 최종 50 μ l의 부피를 만들었다. 이후 μ -Alide Angiogenesis를 제공된 뚜껑으로 덮고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 4시간 배양한 후 튜브 형성을 광학 현미경으로 영상화하고 Image J 프로그램으로 분석하였다. VEGF는 양성 대조군, PBS는 음성 대조군으로 처리하였다.

[0091]

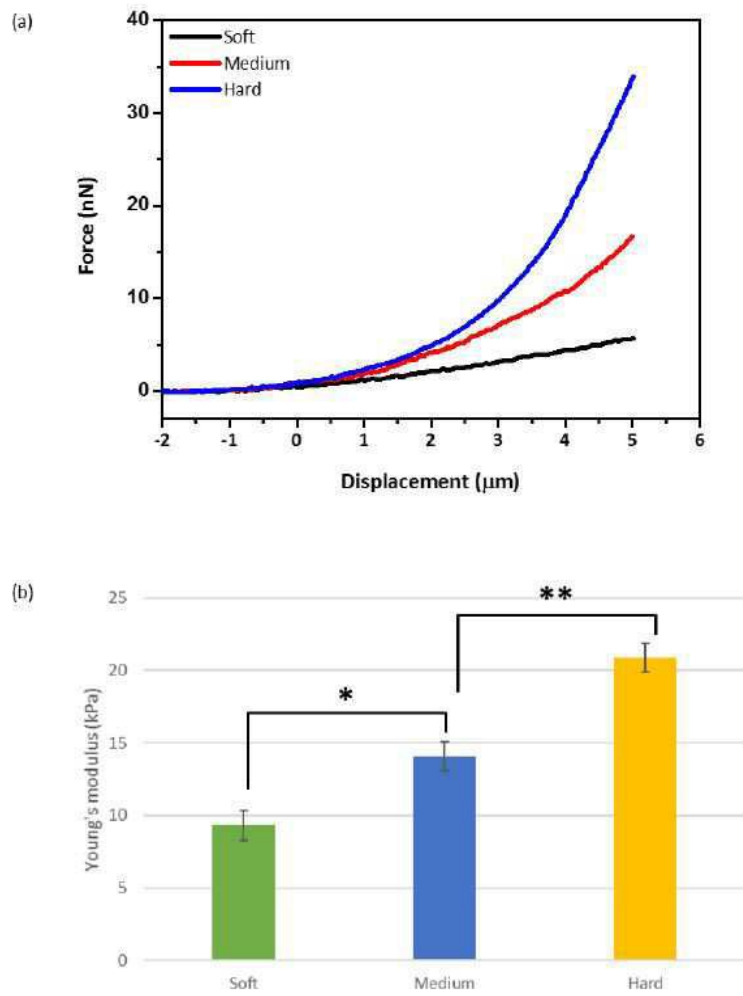
튜브 형성 효능 시험 결과는 사이토카인 어레이 결과와 유사한 패턴을 보였으며, 시험관 내 HUVEC의 혈관 생성에서 2D 대조군 MSC-유래 EV보다 캡슐화된 MSC-유래 EV가 더 높은 효과를 나타내었다(도 15). 강성 하이드로겔로 캡슐화된 MSC로부터 분리된 EV를 처리한 경우, 양성 대조군인 VEGF를 처리한 것보다 더 많은 loop를 형성하는 것을 확인할 수 있으며, 연성 및 중성 하이드로겔의 EV는 2D 대조군의 EV에 비하여 많은 수의 loop를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

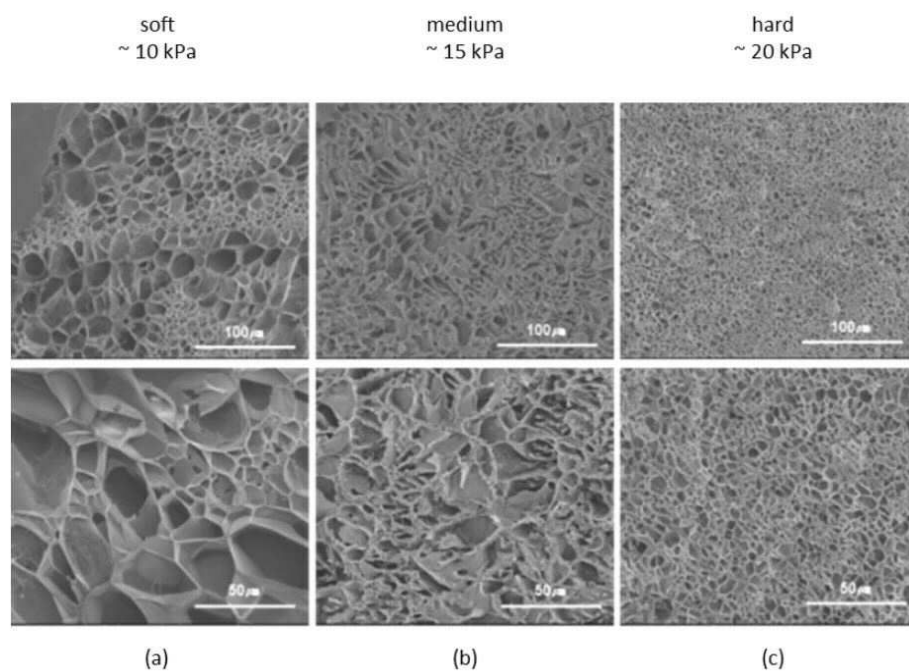
도면1



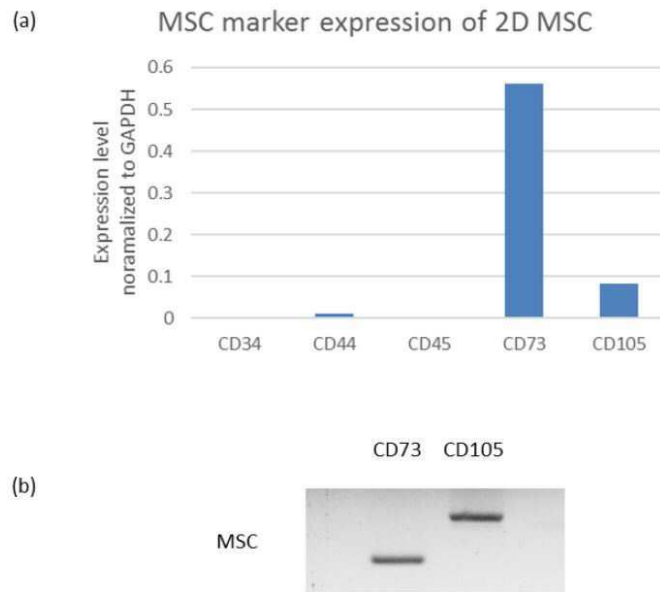
도면2



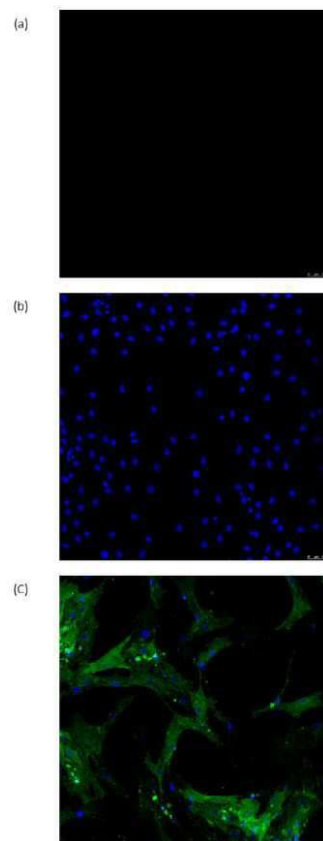
도면3



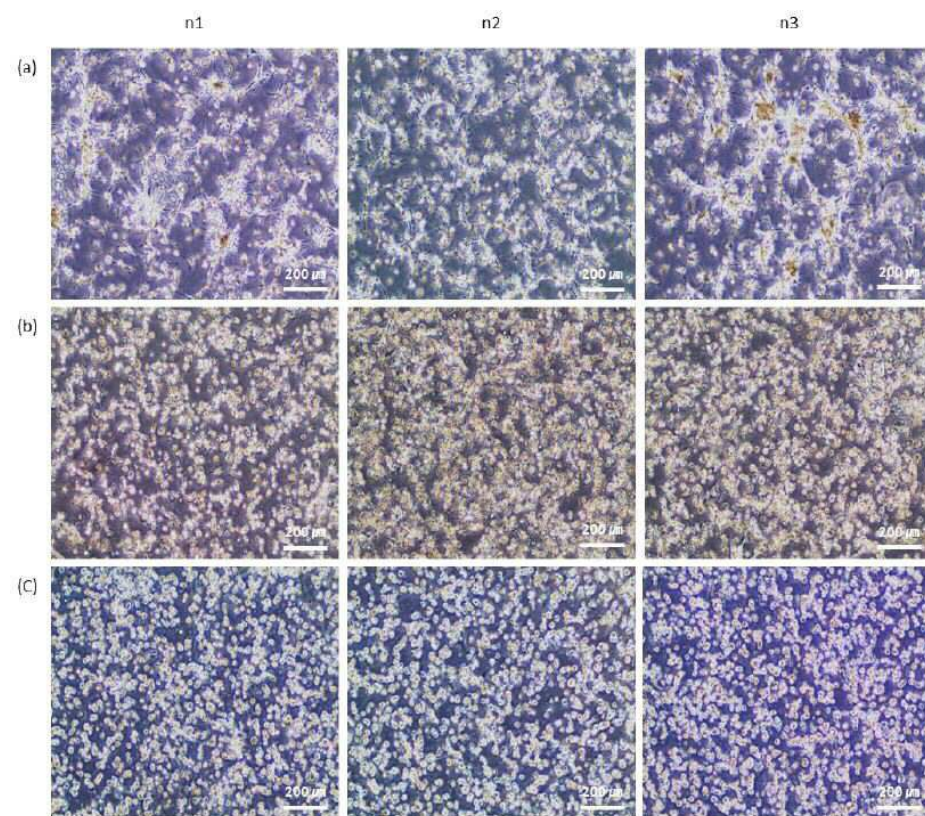
도면4



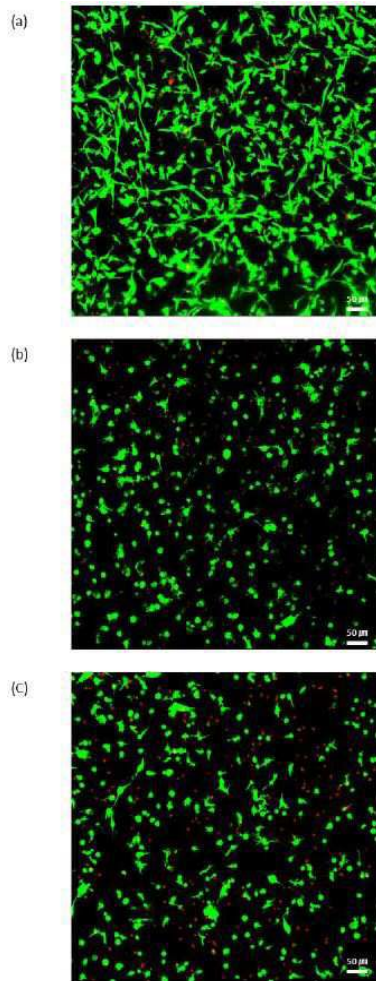
도면5



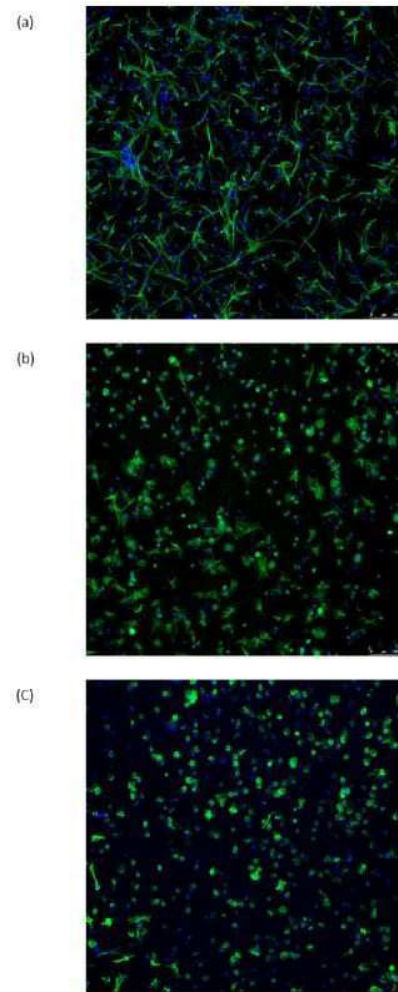
도면6



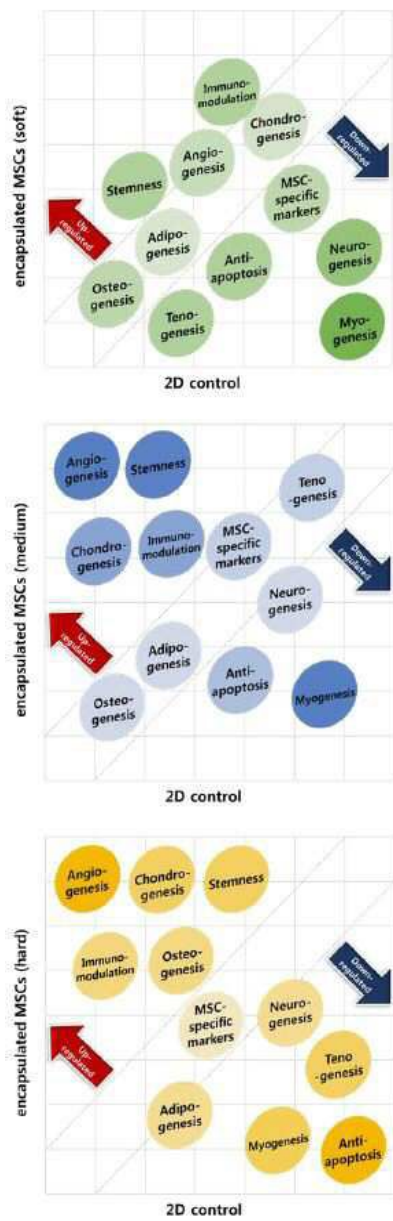
도면7



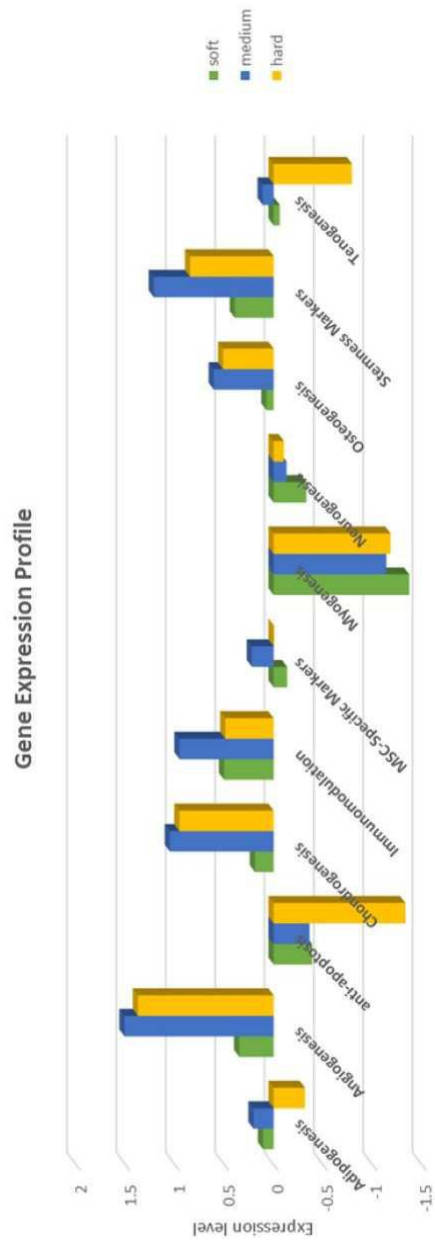
도면8



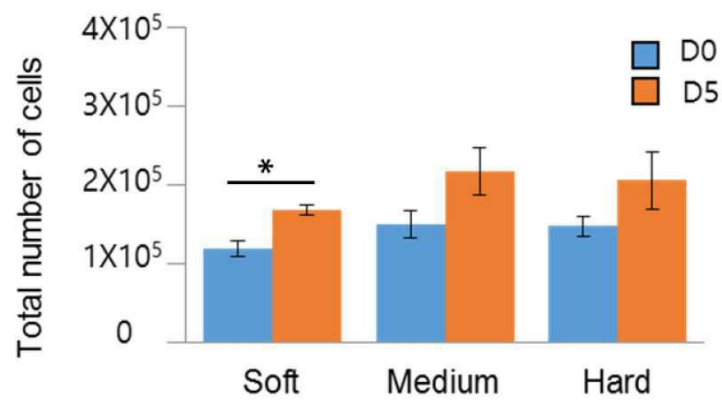
도면9b



도면9c

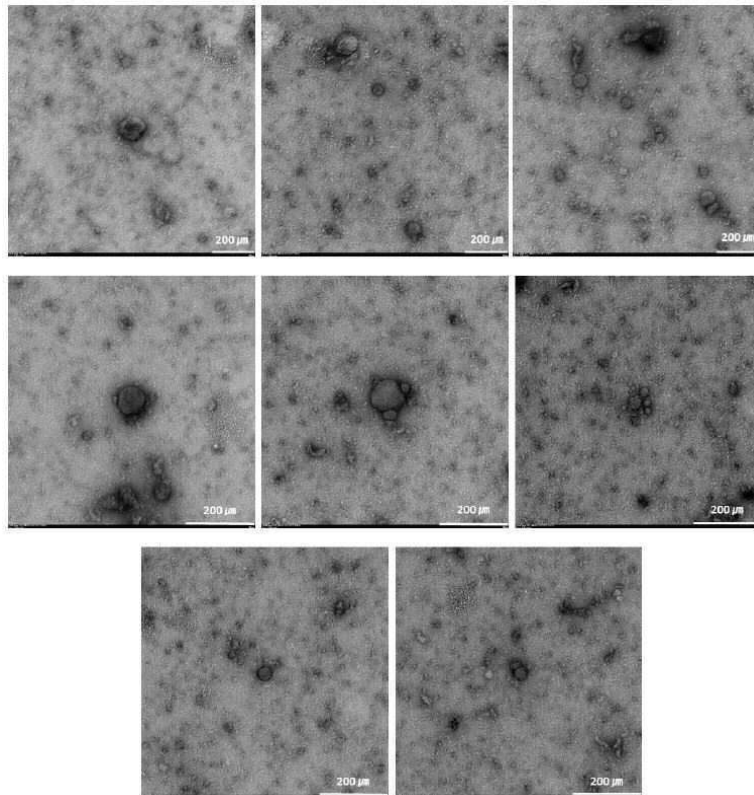


도면10

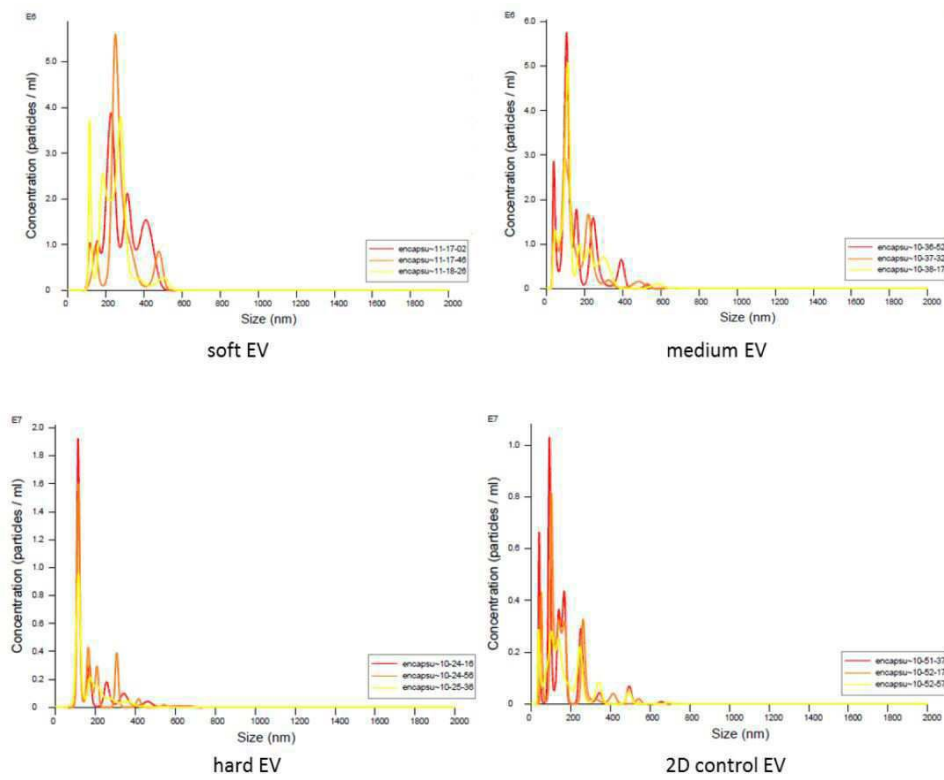


		OD			Cell Number				
SET 5		1	2	3	1	2	3	AVE.	STD
D 0	Soft	0.238	0.252	0.228	234500	248500	224500	235833	12055
	Medim	0.268	0.262	0.238	264500	258500	234500	252500	15875
	Hard	0.272	0.24	0.25	268500	236500	246500	250500	16371
D 5	Soft	0.298	0.288	0.268	294500	284500	264500	281167	15275
	Medim	0.314	0.282	0.27	310500	278500	266500	285167	22745
	Hard	0.308	0.274	0.29	304500	270500	286500	287167	17010

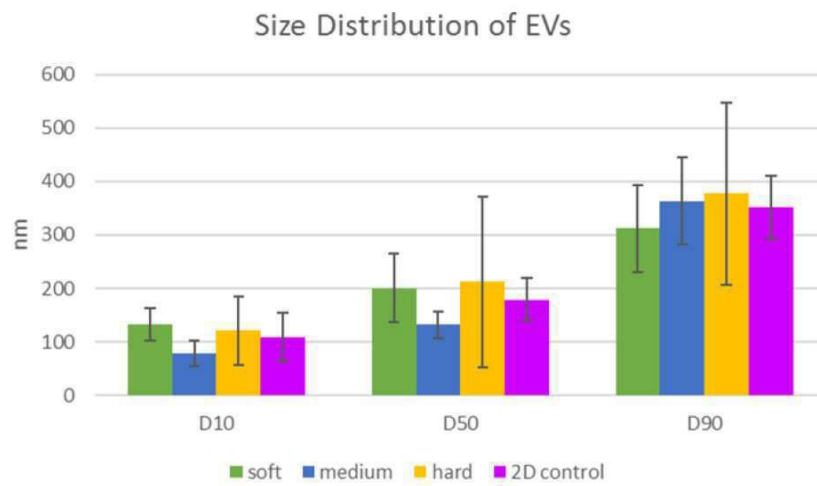
도면11



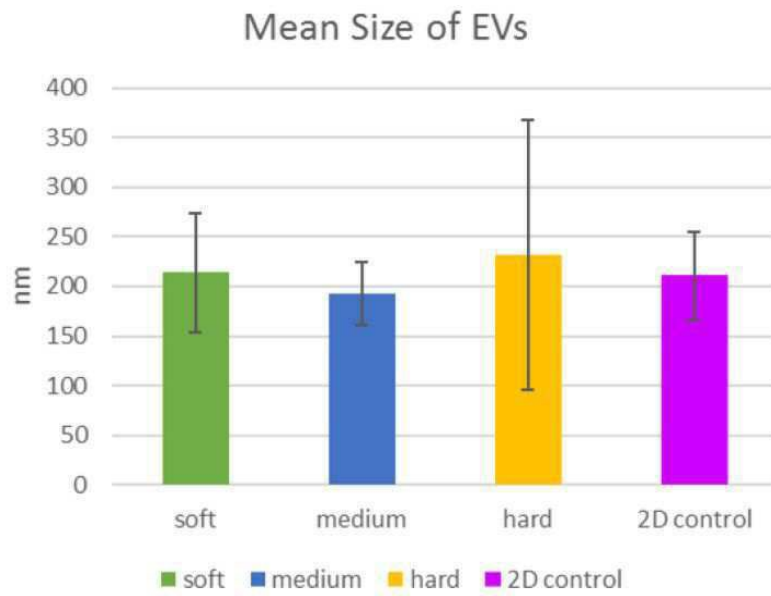
도면12a



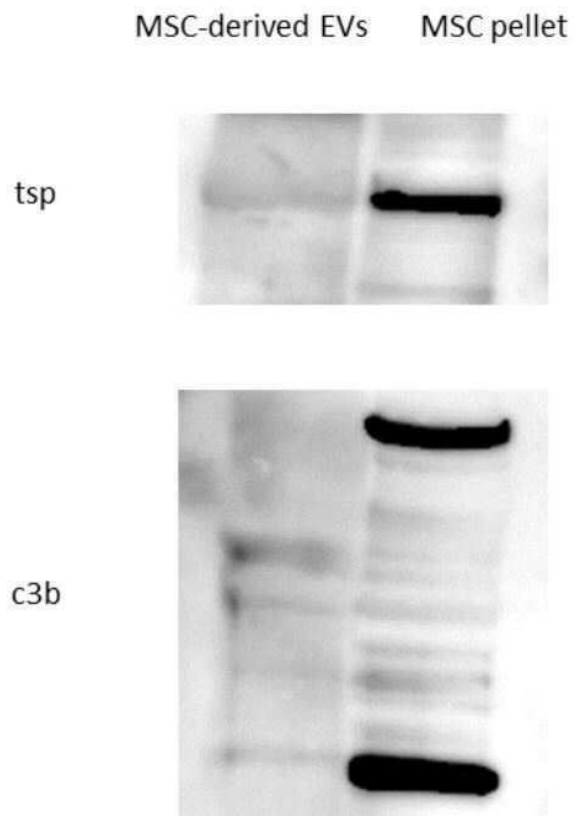
도면12b



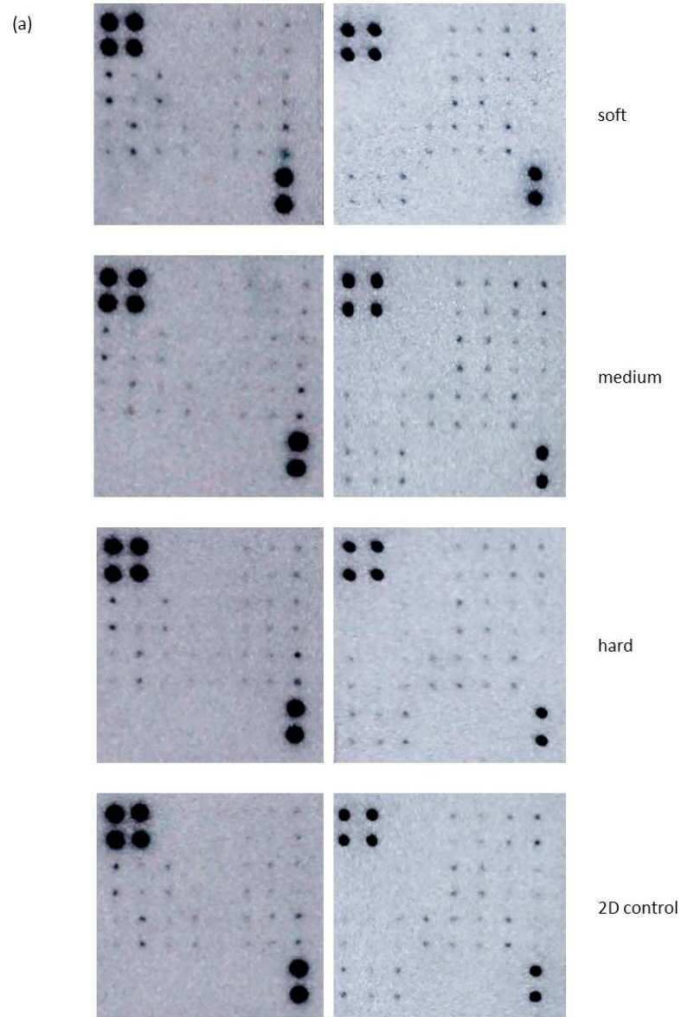
도면12c



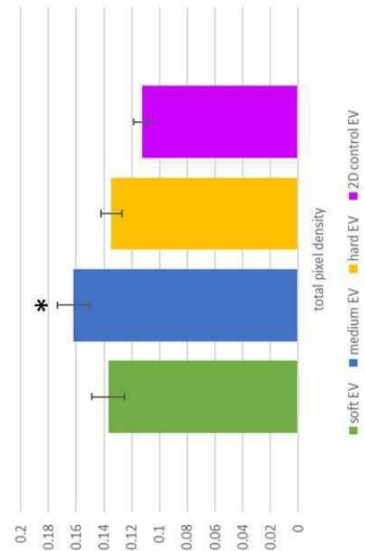
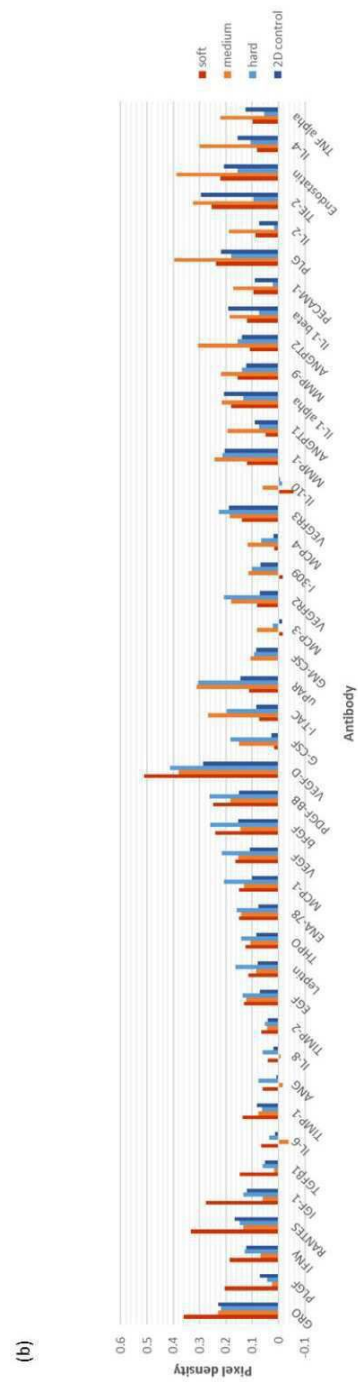
도면13



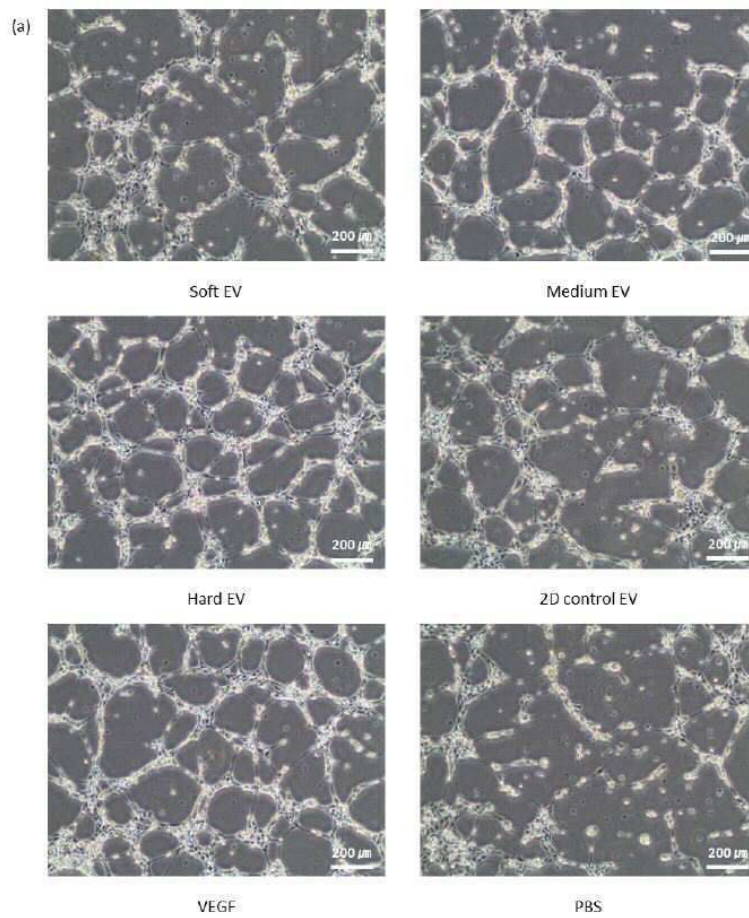
도면14a



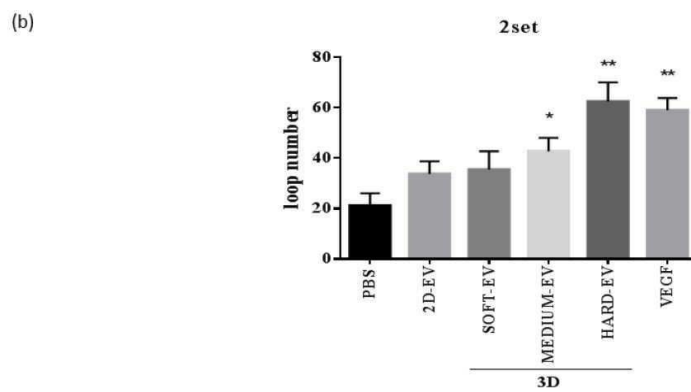
도면 14b



도면15a



도면15b



PBS				2d				soft				medium				hard				veg			
n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4	n1	n2	n3	n4
13	21	16	35	38	41	37	19	21	47	25	49	43	47	28	53	72	76	60	42	61	45	62	68