



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0023477
(43) 공개일자 2016년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/44 (2015.01) A61K 35/12 (2015.01)

A61P 13/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0109948

(22) 출원일자 2014년08월22일

심사청구일자 2014년08월22일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

주명수

서울특별시 강남구 선릉로 120, 9동 701호(대치동, 개포1차우성아파트)

송미호

경기도 용인시 기흥구 이현로29번길 88, 109동 901호(보정동, 대림아파트)

(74) 대리인

위병갑

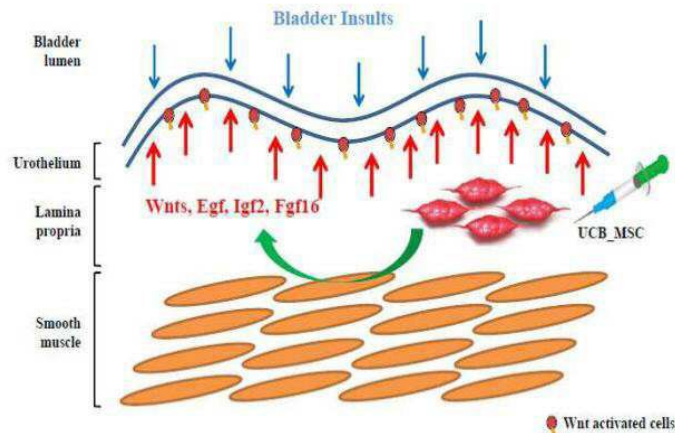
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 방광 통증증후군 치료를 위한 간엽줄기세포의 용도

(57) 요약

본 발명은 간엽줄기세포의 새로운 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 간엽줄기세포가 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절시키고 손상된 세포의 재생 및 회복을 촉진시키는 기작을 통한, 방광 통증증후군(bladder pain syndrom)의 치료 용도 및 이의 이용에 관한 것이다.

대표도 - 도12



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2004678

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 방광기능이상 난치성 질환의 성체줄기세포 치료 방안 연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)를 유효성분으로 포함하는, 방광 통증 증후군(bladder pain syndrom) 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 간엽줄기세포는 제대혈 유래인 것을 특징으로 하는 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방광 통증증후군 관련된 질환은 방광 내 상피 세포의 손상(방광점막손상)으로 인해 유발되는 것을 특징으로 하는 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 방광 통증증후군 관련된 질환은

간질성 방광염(IC), 하부 요로 증후군(LUTS) 및 통증성 방광 증후군(PBS)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 통증은 하복부(골반) 통증; 방광 통증; 치골위 통증; 질 통증; 음경, 고환, 음낭, 회음부의 통증; 요도 통증; 성교통; 방광이 채워짐에 따라 증가할 수 있는 통증, 압력 및 불편함으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 통증인 것을 특징으로 하는, 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절하는 것을 특징으로 하는 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는

하기와 같은 기능을 추가로 더 가지는 것을 특징으로 하는 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물:

(i) 유로상피 및 근처 기질 조직 내로 직접 분화함,

(ii) 제6항의 신호전달 체계가 유로상피의 기저층에 주로 존재하는 내생성 줄기세포를 자극함으로써 방광 재생을 활성화함, 및

(iii) Wnt2b, Wnt5a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt11; 및 성장인자 Notch1, Fgf16(fibroblast growth factor 16), Egf, 및 Igf2(insulin-like growth factor 2)로 구성된 군에서 선택된 1이상의 유전자의 발현 증가.

청구항 8

제1항의 조성물을 포함하는, 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 키트 또는 패키징.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간엽줄기세포의 새로운 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 간엽줄기세포가 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절시키고 손상된 세포의 재생 및 회복을 촉진시키는 기작을 통한, 방광 통증증후군(bladder pain syndrome)의 치료 용도 및 이의 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 방광은 요의 저장, 요 구성물의 유지, 및 적절한 간격으로 요의 배출을 위한 막성 근육 기관이다. 이의 구조는 상피, 고유판(lamina propria), 고유 근육(즉, 배뇨근) 및 방광주위 연조직을 포함한 4 개의 기본적인 층으로 구성된다.

[0003] 방광의 내부의 형성하며 요와 접촉하는 상피는 이행상피 또는 요로상피라고 칭하며 요와 혈액 사이의 화학적인 구배를 유지시키는 기능을 한다. 상피의 하부에 존재하는 것은 고유판, 즉, 결합조직과 혈관의 층이다. 얇으며 종종 불연속인 평활근의 층, 즉, 점막내 근육이 고유판 내부에 있다. 이러한 평활근의 표면층은 방광의 벽을 형성하는 두꺼운 평활근 다발로 구성되는 심층 근육인 고유근육 또는 배뇨근과는 구별된다. 방광주위 연조직은 방광의 외층을 포함하며 지방, 섬유조직 및 혈관으로 구성된다. 방광의 기능부전은 일반적이며, 감염된 개체에 쇠약효과를 줄 수 있다.

[0004] 간질성 방광염(IC)은 통증, 예를 들면 골반통의 증후, 및 하부 요로 증후군(LUTS), 예를 들면 증가된 빈뇨/절박뇨를 특징으로 하는, 원인이 밝혀지지 않은 만성 방광 질환이다. 보다 최근의 용어는 이 복합 증후를 집합적으로 개시하기 위해 IC와 함께 통증성 방광 증후군(PBS)([MacDiarmid SA et al. Rev Urol 2007; 9(1): 9-16]) 또는 방광 통증 증후군(BPS)([van der Merve et al. European Urology 53(2008) 60-67])를 포함하는 것으로, 즉 IC/PBS/BPS로 변화되고 있다.

[0005] IC/PBS/BPS의 유병률은 임상적으로 확인된 질병을 갖는 100,000명의 여성당 67 내지 230명으로 다양하며, 흔히 자궁내막염, 재발성 요로 감염, 과민성 방광 또는 외음부 통증으로 잘못 진단되거나 저진단되기 때문에 이 수치는 아마도 더 높을 것이다([Forrest J B et al. Clinical Courier 2006; 24(3): 1-8]). IC는 삶의 질에 상당한 영향을 미치고, 여행, 가족관계 및 활동에 영향을 미치고([Slade D et al. Urol 1997; 49 (5A Suppl):10-3]), 또한 우울성 증후과 관련되어 있다([Rothrock N E et al. J Urol 2002; 167: 1763-1767]).

[0006] 단일한 병인이 확인되지 않았고, 이는 아마도 악화되는 조직 손상, 흉터 및 섬유증을 이끌어내는 상피 세포 기능부전, C-신경 섬유 활성화, 및 비만 세포의 증식이라는 자가-영속성 과정을 야기하는 여러 곳의 요도 손상을 갖는 다원적인 과정이다. 염증으로부터 C 섬유의 반복적인 자극 및 방광의 감각 신경의 상향조절은 궁극적으로 영구적인 변화(집중화)를 일으켜, 통각과민, 만성 방광 통증 및 배뇨 장애를 일으킨다([Forrest J B et al. Clinical Courier 2006; 24(3):1-8]).

[0007] 비록 IC의 근본적인 원인에 대한 합의에는 이르지 못하였지만, 현재의 자료는 하기의 3가지 병리생리학적 기작이 포함될 수 있으리라는 추측을 이끌어내었다: 상피 기능부전, 비만세포 활성화 및 신경 염증([Nazif O et al. Urol 2007; 69 (Suppl 4A): 24-33]).

[0008] 현재 이용가능한 치료법의 부작용이나 효능 제한이 없는, 신규하고 효과적인 간질성 방광염 및/또는 통증성 방광 증후군 및/또는 방광 통증 증후군의 통증 및/또는 하부 요로 증후군 치료법이 제공될 필요가 지속적으로 존재한다

[0009] 즉, 방광통증증후군은 아직까지 명확한 원인과 병태 생리가 밝혀져 있지 않고 치료제들(항우울제, 항히스타민제, 진통제, 항콜린제 등) 역시 효과가 그리 좋지 못하다. 방광통증증후군의 발생률은 Curhan 등이 발표한 미국 통계에 따르면 100,000명당 60명의 발생률을 보고하였고, 유럽에서는 100,000명당 18명, 일본에서는 100,000명당 5~7명 정도로 발생률이 높지는 않지만, 증상의 심각성은 깊어 삶의 질에 큰 영향을 주고 있어 효과적인 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0010]

이에 본 발명자들은 방광통증증후군 백서 모델에 제대혈 유래 간엽줄기세포를 주입한 결과, Wnt-Egf-Vegf 신호 전달 체계를 상향 조절시키고 손상된 세포의 재생 및 회복을 촉진시키는 기작을 통해 안전하면서도 효과적으로 방광통증증후군을 치료 및 개선할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011]

(비특허문헌 0001) 1) Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: Report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. Neurourol Urodyn 2002;21:167-78

(비특허문헌 0002) 2) van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, Bouchelouche K, Cervigni M, Daha LK, et al. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. Eur Urol 2008;53:60-7

(비특허문헌 0003) 3) Elbadawi AE, Light JK. Distinctive ultrastructural pathology of nonulcerative interstitial cystitis: new observations and their potential significance in pathogenesis. Urol Int 1996;56:137-62

(비특허문헌 0004) 4) Peeker R, Enerback L, Fall M, Aldenborg F. Recruitment, distribution and phenotypes of mast cells in interstitial cystitis. J Urol 2000;163:1009-15

(비특허문헌 0005) 5) Parsons CL, Lilly JD, Stein P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). J Urol 1991;145:732-5

(비특허문헌 0006) 6) Anderson JB, Parivar F, Lee G, Wallington TB, MacIver AG, Bradbrook RA, et al. The enigma of interstitial cystitis-an autoimmune disease- Br J Urol 1989;63:58-63

(비특허문헌 0007) 7) Saban R, Saban MR, Nguyen N-B, Hammond TG, Wershil BK. Mast cell regulation of inflammation and gene-expression during antigen-induced bladder inflammation in the mouse. Physiological Genomics 2001; 7:35-43

(비특허문헌 0008) 8) Rosamilia A, Cann L, Scurry J, Rogers P, Dwyer P. Bladder microvasculature and the effects of hydrodistention in interstitial cystitis. Urology 2001;57:132

(비특허문헌 0009) 9) Gillenwater JY, Wein AJ. Summary of the National nstitute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases Workshop on Interstitial Cystitis. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28-29, 1987. J Urol 1988;140:203-6

(비특허문헌 0010) 10) Hanno PM, Landis JR, Matthews-Cook Y, Kusek J, Nyberg L Jr. The diagnosis of interstitial cystitis revisited: lessons learned from the National Institutes of Health Interstitial Cystitis Database study. J Urol 1999; 161:553-7

(비특허문헌 0011) 11) Parsons CL, Greenberger M, Gabal L, Bidair M, Barme G. The role of urinary potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis. J Urol 1998;159: 1862-6

(비특허문헌 0012) 12) Wilkinson DR, Erickson SR. Urinary and serologic markers for interstitial cystitis: an update. Curr Urol Rep 2006;7:414-22

(비특허문헌 0013) 13) Keller ML, McCarthy DO, Neider RS. Measurement of symptoms of interstitial cystitis. a pilot study. Urol Clin North Am 1994;21:67-71

(비특허문헌 0014) 14) OLeary MP, Sant GR, Fowler FJ Jr, Whitmore KE, Spolarich-Kroll J. The interstitial cystitis symptom index and problem index. Urology 1997;49:58-63

(비특허문헌 0015) 15) Parsons CL, Dell J, Stanford EJ, Bullen M, Kahn BS, Waxell T, et al. Increased prevalence of interstitial cystitis: previously unrecognized urologic and gynecologic cases identified

using a new symptom questionnaire and intravesical potassium sensitivity. Urology 2002;60:573-8

(비특허문헌 0016) 16) Probert KJ, Schaeffer AJ, Brensinger CM, Kusek JW, Nyberg LM, Landis JR. A prospective study of interstitial cystitis: results of longitudinal followup of the interstitial cystitis data base cohort. The Interstitial Cystitis Data Base Study Group. J Urol 2000;163: 1434-9

(비특허문헌 0017) 17) Hanno PM, Landis JR, Matthews-Cook Y, Kusek J, Nyberg L Jr. The diagnosis of interstitial cystitis revisited: lessons learned from the National Institutes of Health Interstitial Cystitis Database study. J Urol 1999; 161:553-7

(비특허문헌 0018) 18) Fall M, Oberpenning F, Pecker R. Treatment of bladder pain syndrome/interstitial cystitis 2008: can we make evidence-based decisions? Eur Urol 2008;54:65-75

(비특허문헌 0019) 19) Mazurick CA, Landis JR. Evaluation of repeat daily voiding measures in the national interstitial cystitis data base study. J Urol 2000;163:1208-11

(비특허문헌 0020) 20) Parsons CL, Koprowski PF. Interstitial cystitis: successful management by increasing urinary voiding intervals. Urology 1991;37:207-12

(비특허문헌 0021) 21) Markwell SJ. Physical therapy management of pelvi/perineal and perianal syndromes. World J Urol 2001; 19:194-9

(비특허문헌 0022) 22) Mendelowitz F, Moldwin R. Complementary approaches in the management of interstitial cystitis. In Sant GR (ed.) Interstitial Cystitis. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997;235

(비특허문헌 0023) 23) Koziol JA. Epidemiology of interstitial cystitis. Urol Clin North Am 1994;21:7-20

(비특허문헌 0024) 24) Wein AJ, Hanno PM. Targets for therapy of the painful bladder. Urology 2002;59:68-73

(비특허문헌 0025) 25) Erickson DR, Kunselman AR, Bentley CM, Peters KM, Rovner ES, Demers LM, et al. Changes in urine markers and symptoms after bladder distention for interstitial cystitis. J Urol 2007;177:556-60

(비특허문헌 0026) 26) Cole EE, Scarpero HM, Dmochowski RR. Are patient symptoms predictive of the diagnostic and/or therapeutic value of hydrodistention? Neurourol Urodyn 2005; 24:638-42

(비특허문헌 0027) 27) Parsons CL, Benson G, Childs SJ, Hanno P, Sant GR, Webster G. A quantitatively controlled method to study prospectively interstitial cystitis and demonstrate the efficacy of pentosan polysulfate. J Urol 1993;150:845-8

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본원발명은 방광 통증증후군과 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 간엽줄기세포의 용도에 관한 것으로,
- [0013] 본 발명의 주요한 목적은 간엽줄기세포를 포함하는, 방광 통증증후군과 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 간엽줄기세포를 이용하여 방광 통증증후군과 관련된 질환의 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)의 방광 통증증후군과 관련된 질환의 치료적 용도를 제공한다.

- [0016] 일 구체예로서, 본 발명은 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)를 유효성분으로 포함하는, 방광 통증 증후군(bladder pain syndrom) 관련된 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 이를 이용한 치료방법을 제공한다. 이 때, 상기 간엽줄기세포는 제대혈 유래인 것이 가장 바람직하나, 다른 조직 유래의 것을 사용하여도 무방하다.
- [0017] 특히, 상기 방광 통증증후군 관련된 질환은 방광 내 상피 세포의 손상(방광점막손상)으로 인해 유발되는 것을 특징으로 하는데, 간질성 방광염(IC), 하부 요로 증후군(LUTS) 및 통증성 방광 증후군(PBS)을 포함한다.
- [0018] 이 때, 상기 통증은 하복부(골반) 통증; 방광 통증; 치골위 통증; 질 통증; 음경, 고환, 음낭, 회음부의 통증; 요도 통증; 성교통; 방광이 채워짐에 따라 증가할 수 있는 통증, 압력 및 불편함으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 통증일 수 있다.
- [0019] 특히, 본 발명의 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절함으로써, 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방적 기능을 발휘하는데, 하기와 같은 기능을 추가로 더 가진다.:
- [0020] (i) 유로상피 및 근처 기질 조직 내로 직접 분화함,
- [0021] (ii) 제6항의 신호전달 체계가 유로상피의 기저층에 주로 존재하는 내생성 줄기세포를 자극함으로써 방광 재생을 활성화함, 및
- [0022] (iii) Wnt2b, Wnt5a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt11; 및 성장인자 Notch1, Fgf16(fibroblast growth factor 16), Egf, 및 Igf2(insulin-like growth factor 2)로 구성된 군에서 선택된 1이상의 유전자의 발현 증가.
- [0023] 다른 구체예로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 방광 통증증후군 관련된 질환의 치료 또는 예방용 키트 또는 패키징을 제공한다.
- [0024] 뿐만 아니라, 본 발명은 간엽줄기세포, 가장 바람직하게는 제대혈 유래 간엽줄기세포의 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절능 및 손상된 세포의 재생, 회복을 촉진능을 이용하는 방광통증증후군 치료적 용도의 다양한 태양을 모두 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 간질성방광염/방광통증증후군에 대해서 아직까지 명확한 원인과 병태 생리가 밝혀져 있지 않고 적절한 치료제가 없는 실정에서, 본 발명의 간엽줄기세포를 이용하면 간질성 방광염 등을 포함하는 방광 통증 증후군과 관련된 질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 IC 방광에서 UCB-MSC 주입에 따른 방광기능의 개선을 확인한 연속적 방광내압측정 결과(A) 및 수축 간격 관찰 그래프(B)를 나타낸 것이다.
- 도 2는 IC 방광에서 UCB-MSC의 치료 효능을 확인한, H&E, Toluidine, 사이토케라틴 염색결과이다(화살표:심각한 염증(A) 및 손상된 유로상피(C)을 나타냄)
- 도 3은 N200+ neurofilaments (A;×400) 및 CD31+ vessels (B;×200)에 대한 면역염색결과이다.
- 도 4는 UCB-MSC의 이식에 따른 (A) 사이토케라틴+ 유로상피 (B)비멘틴+ 기질세포에 대한 형광 면역조직학적 분석 결과이다.
- 도 5는 UCB-MSC의 이식에 따른 Shh-Wnt-EGF 신호연쇄반응(signaling cascade)의 활성화를 나타낸 것으로, RQ-PCR 분석 결과[(A) Shh, (B) Wnt, 및 (C) 다운스트림 성장인자] 및 비인산 베타 카테닌 단백질(non-phospho β -catenin protein)의 형광 면역조직학적 검출 결과이다.
- 도 6은 (A) Shh, (B) Wnt, 및 (C) 다운스트림 성장인자에 대한 RQ-PCR 분석결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 IC 및 IC+MSC 그룹의 방광에서 비인산 베타 카테닌 단백질의 웨스턴 블랏 분석 결과이다.
- 도 8은 IC 방광에서 UCB-MSC의 치료 효과를 매개하는 Wnt-EGF 시그널링 활성을 확인한 결과이다.

도 9는 저해제의 존재 유무에 따라 PKH26-표지된 UCB-MSCs(붉은색)의 주입 후 비인산 베타 카테닌 단백질의 형광 면역분석 결과이다[화살표: 양성 염색 영역]

도 10은 Shh-Wnt-EGF 신호연쇄반응의 유전자 발현 상의 Wnt-EGF 시그널링 활성의 영향을 확인한 결과 그래프이다.

도 11은 방광 조직에서 (A) Wnt, IGF2 및 (B) FGF16 유전자에 대한 RQ-PCR 분석결과를 나타낸 것이다.

도 12는 IC 방광에서 UCB-MSC의 치료 관련 분자적 메커니즘을 도식화한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0028] "줄기세포(stem cell)"는 어떤 조직으로부터 발달할 수 있는 세포를 의미한다. 기본적인 특징으로는 두 가지가 있는데, 우선 반복 분열하여 자신을 만들어 내는 자기 재생산(self-renewal), 그리고 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는다.

[0029] "(중)간엽줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포의 한 종류로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 성체 줄기세포 중 조혈모세포는 주로 부유상태(non-adherent)로 존재하지만 간엽줄기세포는 주로 부착성 세포들이다. 특히, 제대 유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 골수 유래 간엽줄기세포, 지방 유래 간엽줄기세포, 근육 유래 간엽줄기세포, 신경 유래 간엽줄기세포, 피부 유래 간엽줄기세포, 양막 유래 간엽줄기세포 및 태반 유래 간엽줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 제대혈 유래 간엽줄기세포이다. 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.

[0030] "분화(differentiation)"라는 용어는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변화하는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다.

[0031] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.

[0032] "유전자 발현"이란 용어는 일반적으로 생물학적 활성이 있는 폴리펩티드가 DNA 서열로부터 생성되고 세포에서 생물학적 활성을 나타내는 세포 과정을 의미한다. 그런 의미로, 유전자 발현은 전사 및 해독 과정을 포함할 뿐만 아니라, 유전자 또는 유전자 산물의 생물학적 활성에 영향을 끼칠 수 있는 전사후 및 해독후 과정을 포함한다. 상기 과정들은 RNA 합성, 가공 및 수송뿐만 아니라, 폴리펩티드 합성, 수송 및 폴리펩티드의 해독후 변형을 포함하지만, 이들에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에서는 유전자 발현의 태양으로 유전자 프로모터의 메틸화, mRNA 발현 및 단백질 발현의 경우를 모두 포함한다.

[0033] "상향조절(up-regulation)"이라는 표현은, 정상조직세포에 비하여, 활성화된 세포에서 세포내 전사(gene transcription) 또는 번역(gene translation)에 의해서 특정 유전자의 mRNA로의 발현 또는 단백질로 발현량이 현저하게 증가된 것을 의미한다.

[0034] "하향조절(down-regulation)"이라는 표현은, 정상조직세포에 비하여, 활성화된 세포에서 세포내 전사(gene transcription) 또는 번역(gene translation)에 의해서 특정 유전자의 mRNA로의 발현 또는 단백질로 발현량이 현저하게 감소된 것을 의미한다.

[0035] "억제제 또는 저해제(inhibitor)"는 목적 유전자의 발현 또는 활성을 억제, 차단 또는 감소시키는 물질을 의미한다. 억제제의 활성 메커니즘은 특별히 제한되지 않는다. 예로서는 유기 또는 무기 화합물, 단백질, 탄수화물, 지질과 같은 폴리머 화합물, 다양한 화합물의 컴포지트(composite)를 포함한다.

[0036] "표지" 또는 "라벨"는 직접 또는 간접적으로 시약, 예를 들어 핵산 프로브 또는 항체에 컨쥬게이팅 되거나 융합되고 컨쥬게이팅 되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출될 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매 할 수 있다.

- [0037] "통증"은 급성 통증, 만성 통증, 및 염증 요소를 갖는 임의의 통증을 비롯한 임의의 병인의 통증을 의미한다. "통증"은 통증의 수용 및 감지를 포함하고, 통증은 통증 점수 및 당 분야에 잘 공지된 다른 방법을 이용하여 주관적으로 및 객관적으로 평가될 수 있다.
- [0038] "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. "치료"는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방 조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "완화(Palliating)"하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.
- [0039] "유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 저해제 화합물의 유효량은 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 제제는 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다. 상기 제제의 존재가 수혜 환자의 생리학적으로 검출가능한 변화를 초래한 경우라면 상기 제제는 생리학적으로 의미가 있다.
- [0040] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [0041] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0042] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0043] 간엽줄기세포
- [0044] 본 발명은 줄기세포(stem cells)의 방광 통증증후군(bladder pain syndrom)의 치료적 효능과 관련된 특정 기능을 이용하는 것이다.
- [0045] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포로서, 소스 유래에 따라 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포를 이용할 수 있으며, 본 발명에서는 바람직하게는 다양한 기원 조직으로부터 유래된 성체 줄기세포, 예를 들어, 지방, 자궁, 골수, 근육, 태반, 제대혈 또는 피부(상피) 등의 조직 유래 줄기세포를 사용할 수 있다.
- [0046] 특히, 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)인 것이 바람직하다.
- [0047] 상기 간엽줄기세포는 일반적으로 조혈작용을 돕는 지지세포(stroma)로서, 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포로 분화하는 능력을 지녔으며, 미분화상태를 유지하면서 쉽게 증식시킬 수 있는 특징이 있다. 일 구체예에서는 지방, 골수 및 제대혈 유래 간엽줄기세포(MSCs)를 사용할 수 있다.
- [0048] 가장 바람직하게는 제대혈 유래 간엽줄기세포를 이용한다.
- [0049] 제대혈이란 출산 때 탯줄에서 나오는 탯줄혈액을 말하는 것으로, 백혈구와 적혈구혈소판 등을 만드는 조혈모세포 및 혈관내피전구세포를 다량 함유하고, 연골과 뼈근육신경 등을 만드는 간엽줄기세포도 갖고 있어 의료 가치가 매우 높다. 제대혈의 특성은 조혈모세포 수가 골수나 말초혈에 비하여 높은 농도로 존재할 뿐 아니라, 그 성숙도가 더욱 미숙하며 골수에서 발견되는 조혈모세포보다도 증식, 자기 복제 및 분화능력이 훨씬 뛰어나다는 것이다. 또한, 버려지는 제대(Umbilical cord)에서 간단한 시술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있으므로, 본 발명의 바람직한 일 태양은 인간 제대혈 유래 혈액에서 분리한

간엽줄기세포를 이용하는 것이다.

- [0050] 한편, 본 발명에 따른 간엽줄기세포는 당업계에 공지된 방법에 따라 증식 및 배양될 수 있다.
- [0051] 적절한 배지는 동물 세포 및 특히, 포유동물 세포의 배양을 위해 개발되거나, 또는 동물 세포 성장에 필요한 적절한 성분, 예컨대 동화성 탄소, 질소 및/또는 미량 영양소와 함께 실험실 내에서 제조될 수 있는 임의의 이용 가능한 배지를 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 배지는 동물 세포 성장에 적절한 임의의 기본 배지, 비제한적인 예로서, 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM(Minimal Essential Medium), DMEM(Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이용되는 배지라면 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게는, α -MEM 배지(GIBCO), K-SFM 배지, DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), DMEM/F12 배지, PCM 배지, M199/F12(mixture)(GIBCO), 및 MSC 확장배지(Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 이러한 기본 배지에, 탄소, 질소 및 미량 영양소의 동화성 공급원, 비제한적인 예로서, 혈청 공급원, 성장 인자, 아미노산, 항생제, 비타민, 환원제, 및/또는 당 공급원이 첨가될 수 있다. 그러나 당업계에서 통상의 지식을 가진 자가 다양한 조직 기원 유래 줄기세포에 가장 적합한 배지를 선택 또는 조합하여 공지의 방법으로 적절히 배양할 수 있음은 자명할 것이다. 본 발명의 일 실시예에서는 DMEM(Dulbecco modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다.
- [0053] 또한, 이 분야의 통상의 지식에 기초하여 적합한 배양 환경, 시간, 온도 등의 조건을 조절하면서 배양할 수 있음은 자명하다.
- [0054] 방광 통증증후군
- [0055] 본 발명은 상기 설명한 간엽줄기세포가 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절시키고 방광 내 손상된 세포의 재생 및 회복을 촉진시키는 기능의 이용에 관한 것이다(도 12).
- [0056] 특히, 방광 내 염증 유발에 의한 것이 아닌, 상피 세포의 손상(방광점막손상)으로 인해 유발되는 방광 통증 증후군(bladder pain syndrom)의 치료에 현저한 기능을 발휘하는 것을 특징으로 한다.
- [0057] "방광 통증증후군(bladder pain syndrom)"은 예를 들면 골반통의 증후, 및 하부 요로 증후군(LUTS), 예를 들면 증가된 빈뇨/절박뇨를 특징으로 하는, 원인이 밝혀지지 않은 만성 방광 질환과 관련된 통증을 의미하는 것으로, 특히, 간질성 방광염(IC) 및 통증성 방광 증후군(PBS)([MacDiarmid SA et al. Rev Urol 2007; 9(1): 9-16]) 등의 복합적 증후를 집합적으로 포함한다.
- [0058] 상기 방광 통증 증후군과 관련된 통증은 하복부(골반) 통증; 방광 통증; 치골위 통증; 질 통증; 음경, 고환, 음낭, 회음부의 통증; 요도 통증; 성교통; 방광이 채워짐에 따라 증가할 수 있는 통증, 압력 또는 불편함을 포함한다.
- [0059] 본 발명은 특히, 방광 내 상피 세포의 손상(방광 점막손상)으로 인해 유발되는 상기 방광 통증 증후군(bladder pain syndrom)의 치료에 효과적이다. 본 발명의 일 실시예에서는 간엽줄기세포의 방광 상피세포 손상 회복능 및 조직 재생능을 확인하였다.
- [0060] 특히, 본 발명의 간엽줄기세포는 유로상피 및 근처 기질 조직 내로 직접 분화함으로써 손상된 방광을 재생시키고, 이 때, Shh 및 Wnt 신호연쇄반응(signaling cascade)이 유로상피의 기저층에 주로 존재하는 내생성 줄기세포를 자극함으로써 방광 재생을 활성화시킨다. 그러므로, Wnt2b, Wnt5a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt11 및 관련 성장인자들 Notch1, Fgf16(fibroblast growth factor 16), Egf, Igf2(insulin-like growth factor 2)들의 발현이 증가됨을 확인할 수 있다(도 5). 본 발명의 일 실시예에서는 증가된 비인산 베타 카테닌(non-phospho β -catenin protein)이 기저 유로상피층에 위치한 세포(내생성 방광 줄기세포에 대한 주요한 자리)의 핵에 축적됨을 확인하였다.
- [0061] 구체적 이용
- [0062] 그러므로, 본 발명은 다른 관점에서 간엽줄기세포를 유효성분으로 함유하는 방광 통증 증후군(bladder pain

syndrom) 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용하는 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

- [0063] 상기 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 이미 사용되고 있는 스테로이드성 약물, 항히스타민제, 소염진통제 및 항생제 등의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스(sucrose), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0066] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0067] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0068] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0069] 또한, 지속적 방출 제제가 준비될 수 있다. 지속적 방출 제제의 적합한 예는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형 제품, 예를 들면 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속적 방출 매트릭스의 예는 폴리에스터, 하이드로겔(예를 들면 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜), 폴리락타이드, L-글루탐산과 7-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글라이콜산 공중합체, 예를 들면 루프로논 데포(Lupron depo: 상표명)(락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미세구), 슈크로즈 아세테이트 아이소부티레이트 및 폴리-D-3-하이드록시부티르산을 포함한다.
- [0070] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 조성물은 당 분야에 공지된 의학 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 특히, 임의의 의학적으로 적합한 방법, 예를 들면, 정상적인 정맥내 투여 또는 동맥내 투여, 뇌척수액으로의 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 조성물 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 암의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성, 및 상기 특정한 치료제에 대한 감수성에 의존적일 것이다.
- [0072] 본 발명은 또한, 키트 또는 패키징된 제형 형태를 포함한다.
- [0073] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 개시된 임의의 하나 이상의 조성물을 포함하는 키트 및 조성물에 관한 것이다. 일반적으로 적합한 포장에 들어있으며 적절한 지시서가 제공되어 있는 이들 키트는 본원에 개시된 임의의 방법에 유용하다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같은 키트 또는 패키징된 약물은 방광 통증증후군 질환 상태를 치료하기 위한 투여 용량을 보유하는 컨테이너 내에 유효성분인 간엽줄기세포를 포함하는, 1회 이상의 투여용량의 약제 조성물을 포함한다. 예를 들어, 패키지는 수성 용액중에 혼합하기 위한 분말 형태로 혼합된 약제학적 담체와 함께 펩티드를 함유할 수 있으며, 이는 방광 내로 주입되거나 투여될 수 있다. 패키지 또는 키트는 적합한 설명서를 포함하며, 이는 제형을 사용하기 위한 설명을 제공하는 도표, 레코딩 (예를 들어, 오디오, 비디오, 콤팩트 디스크) 및 컴퓨터 프

로그래를 포함한다.

[0075] 이처럼, 본 발명에 따른 간엽줄기세포, 가장 바람직하게는 제대혈 유래 간엽줄기세포는 Wnt-Egf-Vegf 신호전달 체계를 상향 조절시키고 손상된 세포의 재생 및 회복을 촉진시키는 기작을 통해 방광통증증후군 치료 효과를 현저히 상승시킴으로써, 이와 관련된 간엽줄기세포의 다양한 이용을 모두 포함한다.

[0076] <실시예>

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0078] 재료 및 준비

[0079] 1. UCB-MSCs 배양

[0080] 인간 UCB-MSC는 Medipost Co., Ltd., (Seoul, Korea)로부터 기증받아 사용하였다. 제대혈은 산모의 동의 하 신생아 분만 후 탯줄 정맥으로부터 수집하였다.

[0081] UCB-MSCs를 사전에 PAH31에 기술된 대로 분리하여, 2mM L-글루타민, 20mM HEPES (pH7.3), MEM 비필수 아미노산 용액, 페니실린/스트렙토마이신 (Cellgro, Pittsburgh, PA, USA), 1μg/mL 아스코르브산 (Sigma, St Louis, MO, USA), 2% heat-inactivated FBS (Hyclone), 5ng/mL human epidermal growth factor, 10ng/mL basic fibroblast growth-factor, 및 50 μg/mL Long R3-insulin-like growth-factor-1 (Prospec, Rehovot, Israel)를 보충한 DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium)-고 글루코스 배지(Hyclone, Pittsburgh, PA, USA)에서 5% CO₂ 및 37℃의 습한 대기 하 유지시켰다.

[0082] 상기 UCB-MSC는 4세대 배양으로 확장시켰고 그들의 다능성(multipotency) 확인을 위한 이식에 이용하였다. 배양된 UCB-MSC는 PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits (Sigma)으로 라벨링하여 이식 및 트랜스-분화능을 측정하였다.

[0083] 2. IC 동물 모델

[0084] 모든 실험 동물들에 대하여 울산 의과대학 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았다(IACUC-2012-02-174). 줄기세포 치료가 IC 상에서 치료적 효과가 있는지 여부를 알아보기 위하여, HCl을 이용하여 IC 랫트 모델을 유도하였다.

[0085] IC 랫트는 10-주령 암컷 Sprague Dawley 랫트에서 0.1M HCl를 방광 내로 서서히 주입시킴으로써 유도하였다. 모의(sham) 그룹(n=10)에 대해서, PBS(phosphate buffered saline) 비히클을 HCl 대신 사용하였다. IC의 1주 후, 복부 절개를 수행하고 1x10⁶ UCB-MSC (IC+MSC group; n=10) 또는 PBS 비히클(IC group; n=10)을, 방광의 dorm) 및 전방벽의 점막하 층(submucosal layer) 내로 500-μm 시린지 및 26-게이지 바늘을 이용하여 직접적으로 주입하였다.

[0086] UCB-MSCs, PBS 주입 일주일 후, 연속적으로 방광내압측정(cystometry)을 수행하여 CSCs 이식의 치료적 효능을 평가하였다. 모든 랫트들을 희생시켜 방광을 조직학적으로 평가하였다. 인도메타신을 매 12시간마다 피하로 투여하여 줄기세포 주입 전 1일째부터 Wnt 시그널링을 방지하였다. 유사하게, 매일 5mg/kg 게피티니브(Gefitinib)(Santa-Cruz-Biotechnology-Inc. Santa Cruz, CA, USA) 및 4mg/kg 소라페닙(Sorafenib)을 각각 피하 주사함으로써 EGF 및 VEGF(vascular endothelial growth factor) 수용체 (EGF-R 및 VEGF-R) 시그널링 활성을 방해하였다.

[0087] 3. 방광내압측정(Cystometry)

[0088] 규제 하 연속적 랫트 배치(placing a conscious rat)에 의해, 연속적 방광내압 측정을 수행하였다. 앞쪽 중앙선

절개(midline suprapubic incision)로 방광을 노출시키고, 압력 변환기와 연결된, 팽창성 폴리에틸렌 50 튜브 (Clay-Adams, Parsippany, NJ, USA)를 이용하여 평가하였다. 평균 식염수를 50 μ L/분의 비율로 시린지 펌프 (Harvard-Apparatus, Holliston, MA, USA)를 통해 주입하였다. 그 후, UDS-120XLT urodynamic measurement system (Laborie-Medical-Technologies, Toronto, Canada)을 이용하여 분석을 수행하였다. 방광 내 압력을 분석하여, 압력분석기 및 PC-기반 데이터 획득 시스템을 이용하여 기록하였다.

4. 조직학적 분석 및 면역조직화학적 분석

4% 파라포름알데하이드에서 24시간 고정 후, 각 방광을 30% 수크로스에서 24 시간동안 동결보호하고 (cryoprotect), 저온유지장치(cryostat)(Leica, Lussloch, Germany)를 이용하여 20- μ m 절편으로 자른 후 H&E(hematoxylin and eosin)으로 염색하였다. 방광에서의 온전한 상피, 신경 섬유(nerve fibers)의 위치화, 및 혈관신생(angiogenesis)에 대하여 각각 pan-specific cytokeratin (CK, Sigma, St Louis, MO), neurofilament 200 (N200, Abcam, Cambridge, UK), 및 CD 31 (Santa-Cruz-Biotechnology-Inc.)에 대한 항체 염색을 이용하여 추가적으로 확인하였다. 색원체로서 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 UltraVision LP 검출 시스템으로 반응을 가시화하였다.

비만세포(mast cell)의 침입을 Toluidine blue staining (Kit Info, company)을 이용하여 검출하였다. 각 슬라이드를 현미경으로 확인하고, 광현미경 이미지로부터 10개의 임의로 선택된 대표적인 영역들을 캡처하여 정량적 디지털 이미지 분석을 Image Pro 5.0 software (Media-Cybernetics, Rockville, MD, USA)를 이용하여 수행하였다.

면역형광 분석을 위해, 방광의 상피 및 기질(stromal) 조직을 사이토케라틴(cytokeratin) 및 비멘틴(vimentin)(Santa-Cruz-Biotechnology-Inc.) 특이적 항체로 각각 염색하고, Alexa 488-컨쥬게이트된 항-마우스 또는 래빗 항체들(Molecular Probes, Grand Island, NY, USA)를 이용한 가시화를 수행하였다. 핵을 DAPI(4,6-diamino-2-phenylindole)로 대조-염색하였다. The active status of Wnt 시그널링의 활성 상태를 non-phospho β -catenin (Santa-Cruz-Biotechnology-Inc.)로 면역형광 분석함으로써 검출하였다.

5. 역전사 효소 및 RT 정량적 PCR (RQ-PCR)

방광 조직으로부터 전체 RNA 분리; 및 RQ-PCR을 이용한, 타겟 유전자의 발현 수준 정량적 평가를 수행하였다.

6. 통계학적 분석

방광내압의 차이 및 RQ-PCR 결과들을 Bonferroni post-hoc test를 이용하여 Student's t test 또는 one-way ANOVA로 분석하였다. GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 모든 분석을 수행하였고 통계학적으로 유의미함은 $p < 0.05$ 또는 0.01로 정의하였다. RQ-PCR 분석에서 사용된 모든 프라이어머들은 요청에 따라 가능하다.

실시예 1 : 방광 기능의 평가

연속적 방광 내압 분석 결과를 도 1에 도시하였다.

모의 대조군과 비교하여 IC 그룹에서 대부분의 랫들이 증가하는 수축빈도와 함께 불규칙한 배뇨 빈도(voiding frequency)를 나타냄을 보여주었다(각각 201.8 ± 81.7 vs 330.0 ± 143.6 sec; $p = 0.016$) (도 1). UCB-MSC의 단일 주입은 그들의 내부 수축 간격(inter-contraction intervals)을 현저히 증가시켰고(343.1 ± 131.6 vs 201.8 ± 81.7 ; $p = 0.005$), 이는 IC 랫트 동물 모델 상에서 UCB-MSC 치료 효능이 우수함을 의미한다.

실시예 2 : 조직학적 분석 및 면역조직화학 분석

상피 벗겨짐(denudation), 혈관형성, 및 신경 세포, 염증의 비정상적 증가를 포함하는 IC 환자에서 관찰되는 조직학적 특징들을 분석하여 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0102] 모의-실험군 랫트와 비교하여, IC 그룹에서의 방광 조직들은 심각한 염증을 보였고(도 2A), Toluidine blue 염색된 비만 세포의 침윤이 나타났는데(도 2B), 이는 UCB-MSC 투여에 의해 현저하게 없어졌다. 사이토케라틴으로 백백하게 염색된 상피층에서는, 상피 특이적 단백질이 IC+PBS 그룹에서 눈에 띄게 감소하였는데(도 2B), 이는 IC 동물 모델에서 상피 벗겨짐이 일어남을 의미한다.

[0103] 특히, UCB-MSC의 투여는 상피의 내벽(lining)을 개선시키고 요로상피의 강도(intensity)를 지속시켰다. 게다가, 랫트 IC 모델의 방광조직에서 N200+ neurofilament 및 CD31+ vessel 의 비정상적 증가가 관찰되었는데, IC+MSC 그룹에서는 그 정도가 덜 하였다(도 3).

[0104] 이와 함께, 이러한 결과들은 HCl 매개된 랫트 IC 모델이 IC 환자군에서 발견된 유사한 조직학적 교체(alternation)를 재생산하고, 그리고 MSC 치료가 대부분의 방광에서의 상피 벗겨짐 및 염증, 신경 네트워크, 혈관신생의 비정상적 교체를 포함하는 IC 특징적 병리들을 치료함을 의미한다.

[0105] 실시예 3 : 인간 UCB-MSCs 이식

[0106] UCB-MSC의 이식 및 운명을 관찰하기 위해, 주입 전에 줄기세포를 PKH26 붉은 형광 염료로 라벨링하였다.

[0107] 그 결과, IC+MSC 그룹의 대부분의 방광에서 붉은 형광 세포가 관찰되었고, 이들의 대부분은 요로상피의 기저층(basal layer) 근처 고유판(lamina propria)에서 넓게 분포되어 있었지만 근육층에서는 덜 하였다(데이터 도시 않음). 특히, UCB 유래 세포들은 방광에서 사이토케라틴+ 상피세포 및 비멘틴+ 기질세포 두 가지 모두 함께 위치화하였다(co-localized)(도 4A 및 4B).

[0108] 이는 이식된 UCB-MSC이 유로상피 및 근처 기질 조직 내로 직접 분화함으로써 손상된 방광을 재생시킴을 의미한다.

[0109] 실시예 4 : MSC 주입에 의한 Wnt의 상향조절 및 성장인자의 하향조절

[0110] 나아가, IC 손상에 대한 UCB-MSC의 이로운 효과를 설명하는 분자적 메커니즘을 알아보고자 하였다.

[0111] 유로상피 손상에 대한 반응에 있어서, Shh 및 Wnt 시그널링 캐스케이드가, 유로상피의 기저층에 주로 존재하는 내생성 줄기세포를 자극함으로써 방광 재생을 활성화시켰다. 그러므로 방광 재생에 관여하는 다운스트림 성장인자 및 시그널링 구성요소의 발현을 조사하였다(도 5 및 도 6).

[0112] 모의 대조군과 비교하여, 몇몇 Shh 및 Wnt 시그널링 구성요소들은 IC 그룹의 방광에서 일반적으로 하향 조절되었다. 또한, MSCs의 주입은 Smo(smoothened)를 포함하는 그들의 대부분을 현저히 상향 조절되게 하였다(도 5 A): Wnt2b, Wnt5a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt11(도 5 B) 및 관련 성장인자들 Notch1, Fgf16(fibroblast growth factor 16), Egf, Igf2(insulin-like growth factor 2)(도 5 C).

[0113] 유전자 발현 결과와 일치하는 것처럼, IC+MSC 그룹의 방광은 비인산 베타 카테닌(non-phospho β -catenin protein)의 증가, Wnt 시그널링 활성 상태를 나타내는 대리 마커(도 5 D 및 도 7)의 증가를 보여주었다. 흥미롭게도, 증가된 비인산 베타 카테닌 단백질(non-phospho β -catenin protein)이 기저 유로상피층에 위치한 세포(내생성 방광 줄기세포에 대한 주요한 자리)의 핵에 축적됨을 확인하였다(도 5 D). 게다가, 투여된 UCB-MSC는 유로상피의 기저층에서 숙주의 초기 Oct4 발현 줄기세포의 출현을 유도하였다(도 5 E).

[0114] 실시예 5 : IC 방광에서 MSC 치료 상 Wnt, EGFR, 및 VEGFR 시그널링 캐스케이드(신호 연쇄반응)의 중요성

[0115] Wnt 및 다운 스트림 성장 인자들의 생물학적 중요성을 알아보기 위해, 인도메타신(indomethacin), 게페티니브(Gefitinib), 및 소라페닙(Sorafenib)을 이용하여 Wnt, EGFR, 및 VEGFR 시그널링 활성을 각각 방지하였다.

[0116] 그 결과, 모든 3개의 작은 분자들이 IC+MSC 그룹의 방광에서 방광 배뇨 기능의 회복을 현저히 방해하였다(도 8 A). 따라서, 비록 주입된 줄기세포가 손상된 방광에 잘 이식되었지만, 상피층의 재생은 Wnt, EGFR 및 VEGFR 화학적 저해제의 투여에서 심각하게 손상되었다(도 8 B).

[0117] Wnt 시그널링 활성의 억제는 비인산 베타 카테닌 단백질(non-phospho β -catenin protein)의 재생에 의해 확인되었다(도 9).

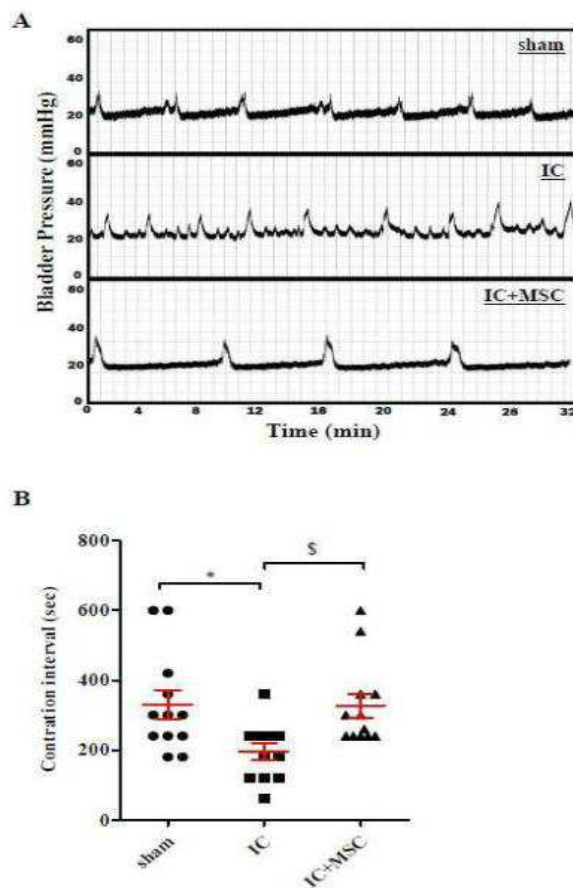
[0118] 또한, RQ-PCR를 이용한 유전자 발현 분석으로, 인도메타신의 처리가 Igf1, Fgf16, 및 Egf 성장인자들의 상향조절을 방지하는 반면, Wnt 단백질의 발현에 거의 영향을 주지 않음을 확인하였다 (도 10 및 도 11). 대신에, 게피티니브 및 소라페닙의 투여는 Shh-Wnt 시그널링 구성요소들에 대한 유전자 발현에 강한 영향을 끼쳤다 (도 10).

[0119] 이러한 결과를 통해 IC 방광에 UCB-MSC의 투여에 따른 유로상피 재생은 주로 Wnt 시그널링 캐스케이드의 자극에 의존적임을 알 수 있었다. 이를 도 12에 도식화하여 나타내었다.

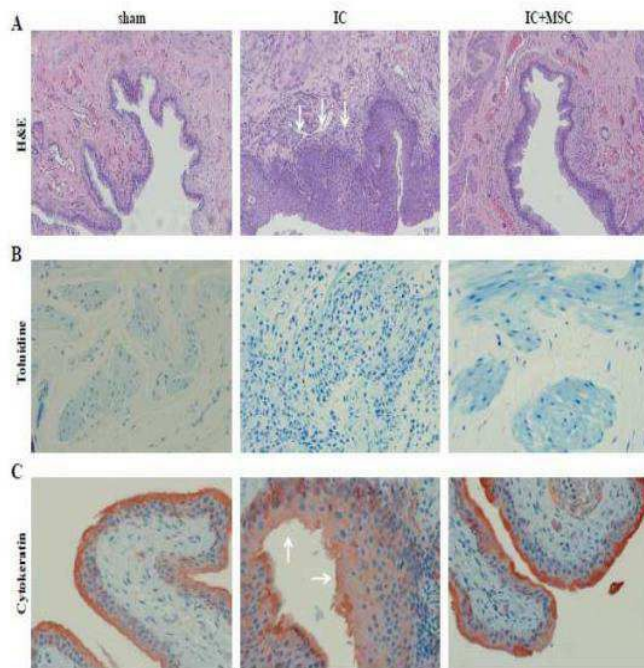
[0120] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

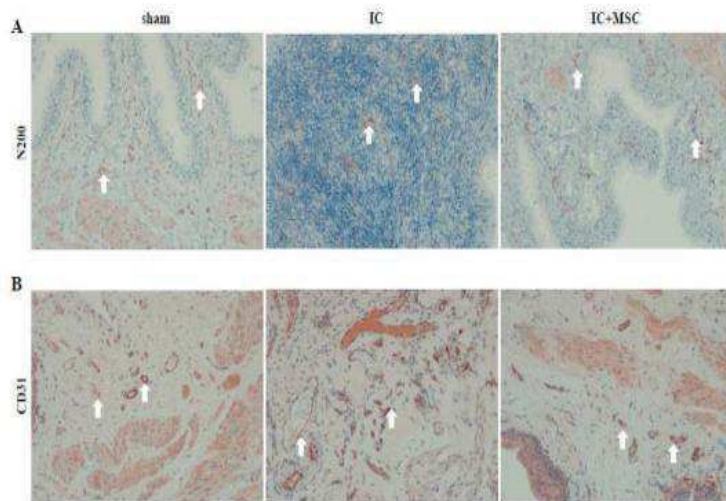
도면1



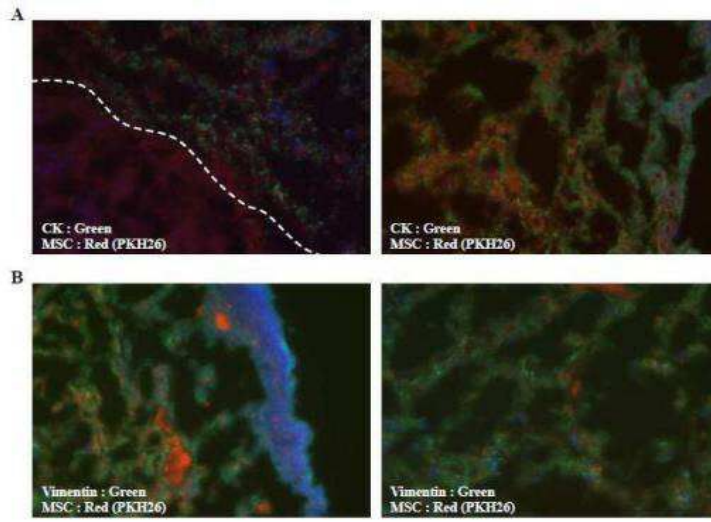
도면2



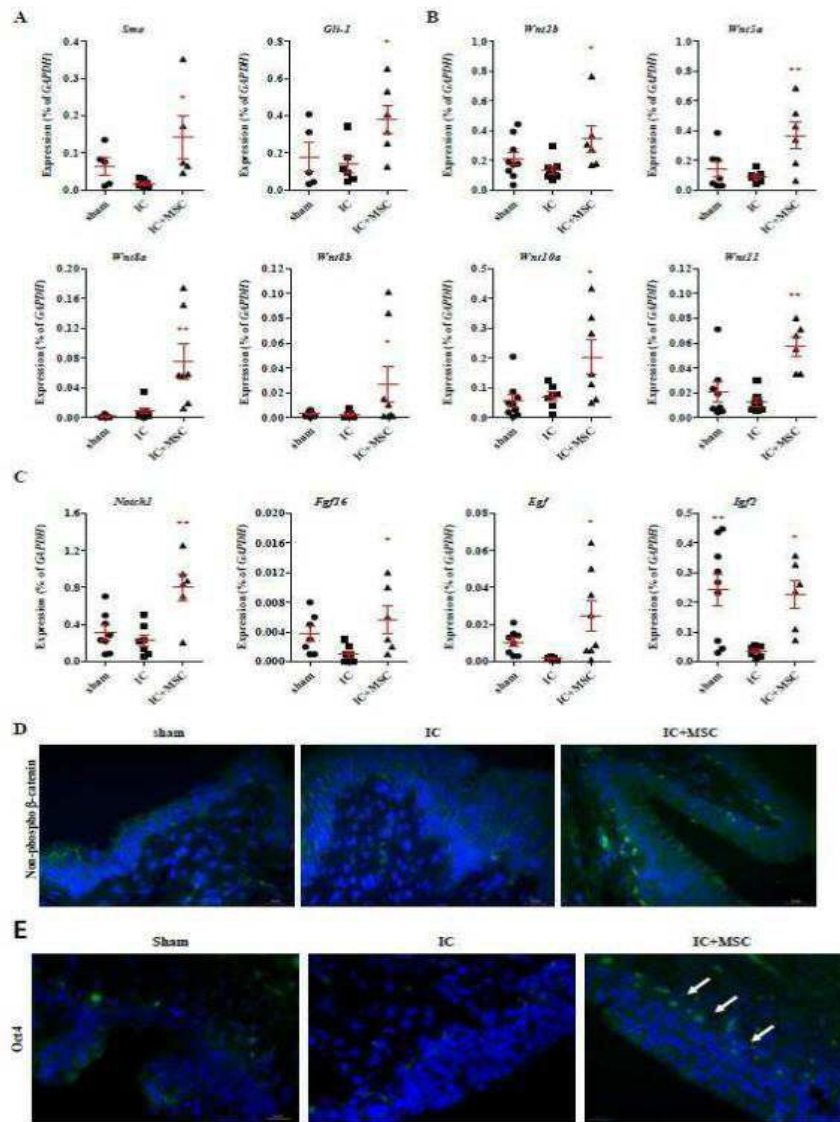
도면3



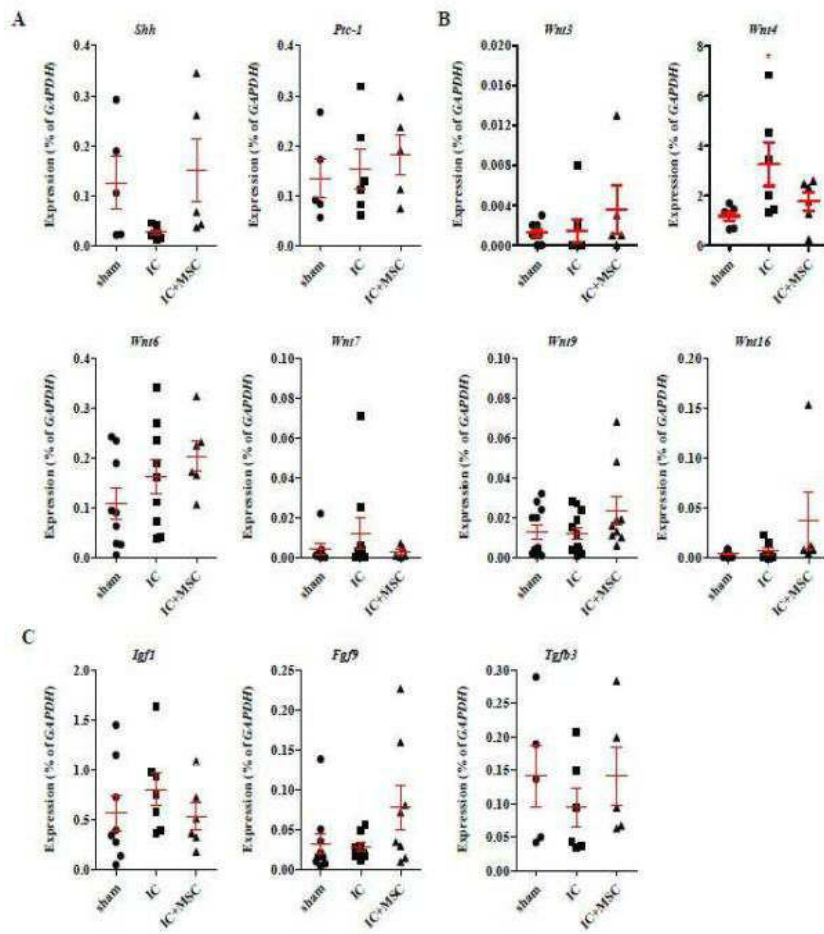
도면4



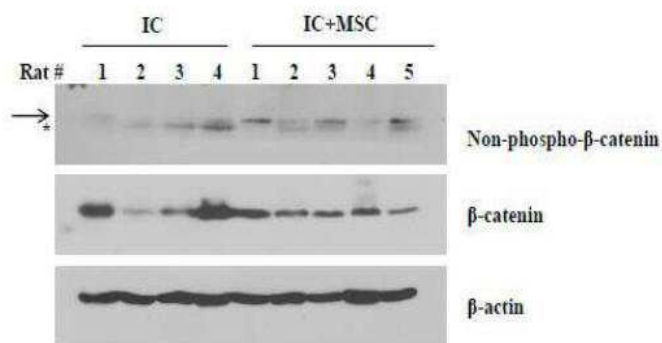
도면5



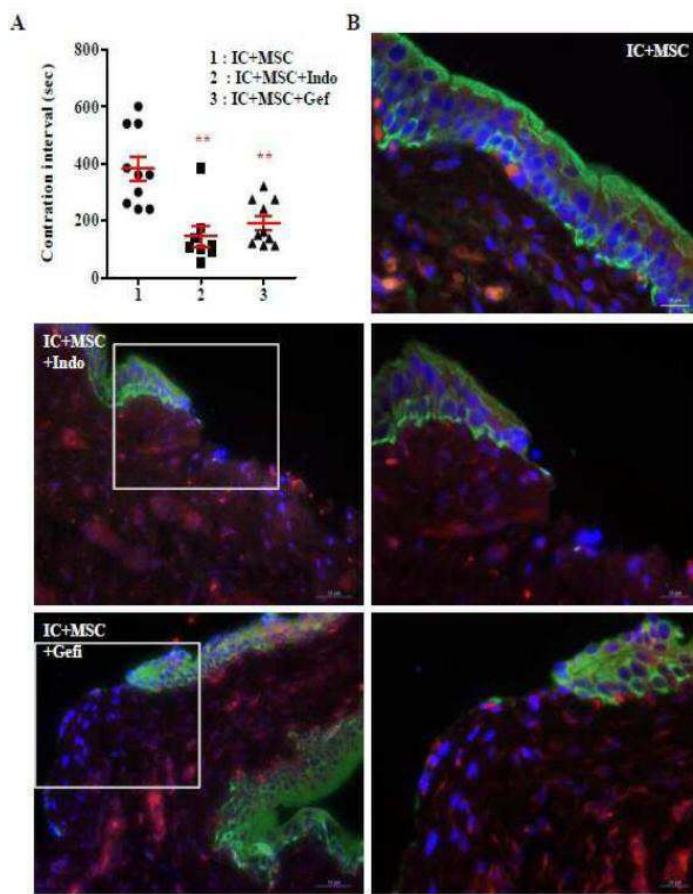
도면6



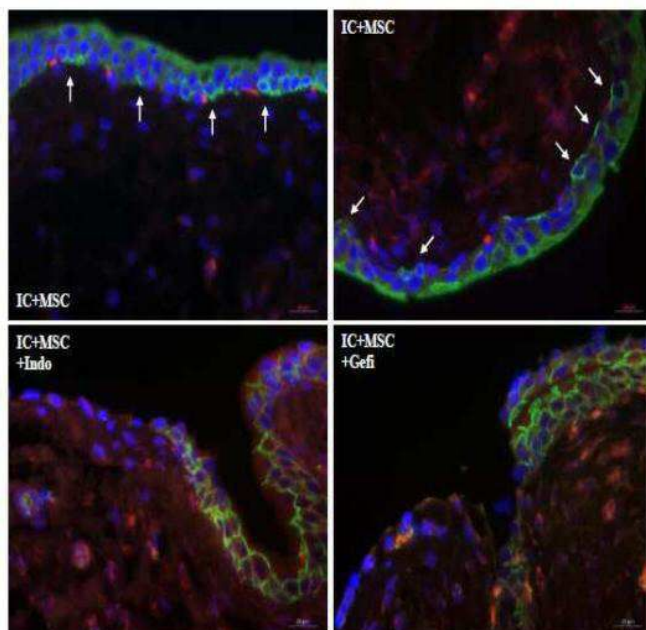
도면7



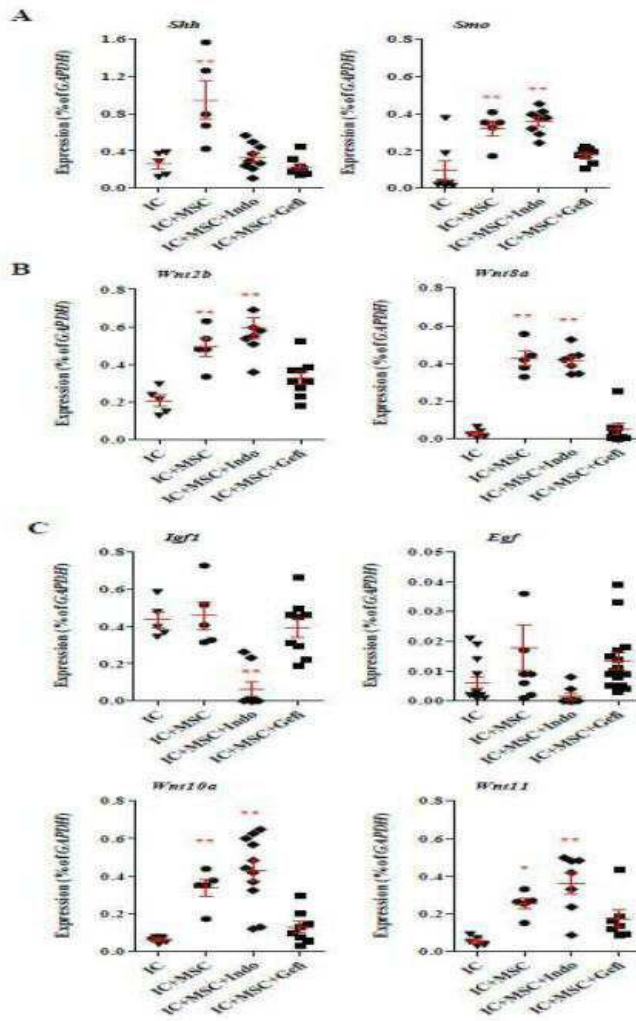
도면8



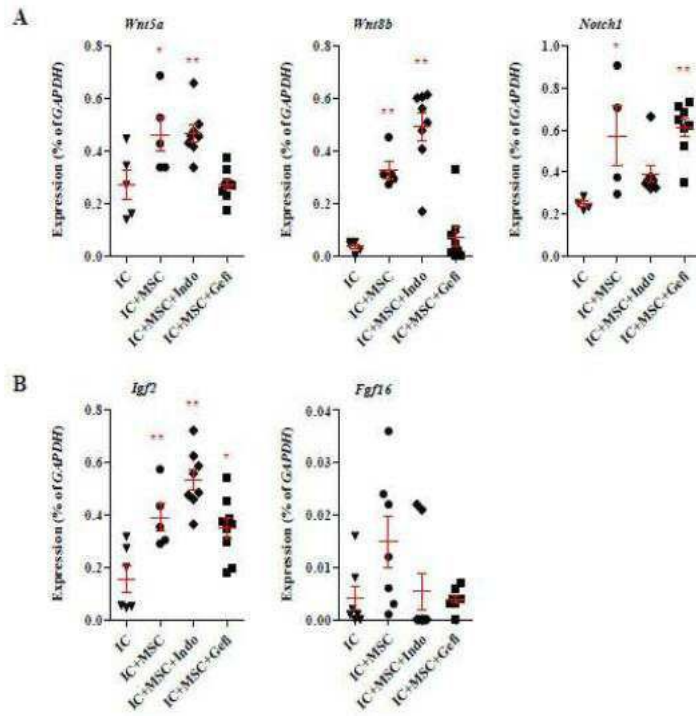
도면9



도면10



도면11



도면12

