(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0083932
(43) 공개일자 2019년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 35/545* (2014.01)
A61K 8/14 (2006.01) *A61K 8/98* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/545 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0001978
(22) 출원일자 2018년01월05일
심사청구일자 2018년01월05일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김수
서울특별시 강동구 양재대로 96길 79 둔촌신동아아파트 102동 708호
유진호
서울특별시 송파구 양재대로 1218올림픽선수촌아파트 201동 2204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

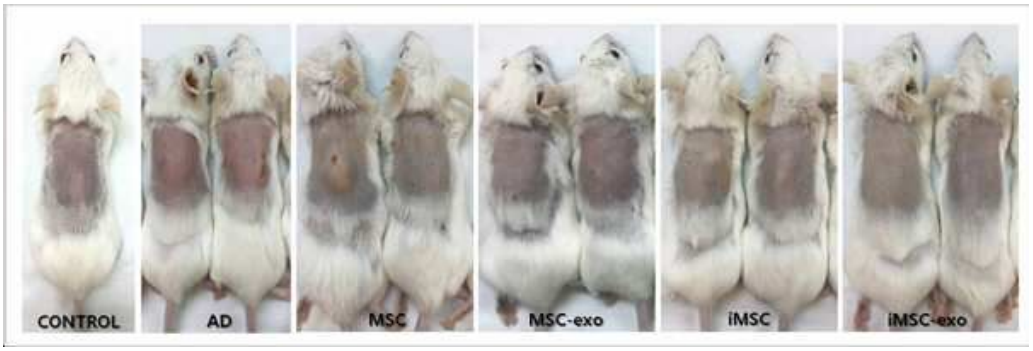
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 및 이로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 피부질환의 개선, 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC), 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물 및 줄기세포 치료제에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 등을 이용하는 경우, 기존 중간엽 줄기세포보다 개선된 면역조절 기능을 갖는 피부질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물 및 줄기세포 치료제를 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 8/14 (2013.01)
A61K 8/981 (2013.01)
A61K 9/127 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자
오연목
서울특별시 용산구 이촌로 181 한강대우아파트 104동 1101호
이슬기
경기도 성남시 중원구 하대원동 현대아파트 103동 906호
박효정
서울특별시 광진구 자양로 116, 1225호
박아름
경기도 화성시 봉담읍 상봉길 35-10 동문굿모닝힐 아파트 103동 2201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015K1A4A3046807
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관유치사업
연구과제명 아산-미네소타 이식 이노베이션 센터
기 여 율 1/1
주관기관 서울아산병원
연구기간 2015.09.01 ~ 2021.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)[iMSC], 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 분리된 엑소좀(iMSC-derived exosome, iMSC-Exo)을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 피부질환은 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)[iMSC], 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 분리된 엑소좀(iMSC-derived exosome, iMSC-Exo)을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 피부질환은 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀.

청구항 6

다음 단계를 포함하는, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC)로부터 분리된 엑소좀(iMSC-Exo)의 제조방법:

(a) 유도만능 줄기세포를 중간엽 줄기세포로 분화시키는 단계;

(b) 상기 중간엽 줄기세포를 세포배양 배지에서 배양하는 단계; 및

(c) 상기 중간엽 줄기세포의 배양액으로부터 엑소좀을 분리하는 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 (a) 단계의 분화는 유도만능 줄기세포를 세포외기질-코팅된 배양 용기에서 배양하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 (b) 단계의 세포배양 배지는 엑소좀이 제거된 우태아혈청을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC), 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 분리된 엑소좀(iMSC-Exo)을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 (iMSC), 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 유래된 엑소좀 (iMSC-exo)을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아토피성 습진으로도 알려진 아토피성 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 매우 흔한 염증성 피부 질환으로, 전 세계적으로 어린이 인구의 5-20%에서 발병하는 것으로 알려져 있다. 급성 AD의 발병 기전은 CD4+T 세포 및 호산구의 피부 침투, 면역 글로불린 E(IgE) 및 Th2 사이토카인의 분비 증가를 매개로 하는 Th2 염증반응과 관련된다는 보고가 있다. AD에 대해 알려진 직접적인 구체적 치료법은 현재까지 없는 실정으로, AD 치료를 위한 새로운 치료 방법의 개발이 시급하다.

[0004] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)는 뼈, 연골 그리고 지방 등으로 분화할 수 있는 다분화능을 갖는 높은 증식성의 부착성 세포로, 항염증 및 면역조절 능력이 있는 것으로 알려져 있다. 중간엽 줄기세포는 T 세포와 B 세포의 증식 및 분화 억제, 수지상 세포(dendritic cell), 자연살해 (natural killer, NK) 세포 및 대식세포(macrophage)와 같은 면역 세포들의 기능 억제 등 면역 억제 효과를 나타낸다. 최근, 중간엽 줄기세포를 조혈모세포와 함께 이식하여 조혈모세포의 생착률을 증가시키는 연구가 보고되었으며, 이식편대 숙주 질환(graft-versus-host disease, GVHD), 콜라겐-유도 관절염(collagen-induced arthritis, CIA), 실험적 자가면역 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 패혈증, 급성 췌장염(acute pancreatitis, AP), 대장염, 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS) 및 류마티스 관절염 등의 질환에서 중간엽 줄기세포가 염증을 감소시키고 자가면역성 과다반응을 억제한다고 보고되고 있다.

[0005] 엑소좀(Exosome)은 지질-이중층으로 구성된 소포(vesicle)로, 세포가 세포 외로 분비하는 물질의 구성체이다. 엑소좀은 세포-세포 간의 커뮤니케이션 및 세포성 면역을 중재하는 기능적인 역할을 수행하기 위해, 세포 내의 생체분자인 단백질, 생체활성 지질 및 RNA(miRNA)를 수송(운반)하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 엑소좀은 알츠하이머 등 신경질환의 바이오마커로도 연구되고 있으며, 뇌척수액과 혈액을 분리하는 혈액뇌관문(blood-brain barrier, BBB)을 투과할 정도로 선택적 투과성이 높아 특정 약물의 나노전달체(nanocarrier)와 같은 약물 전달 시스템의 개발에도 활용되고 있다.

[0006] 한편, 중간엽 줄기세포로부터 분비된 엑소좀은 세포-세포 커뮤니케이션(cell-to-cell communication)에 관여하고 줄기세포가 가지는 재생의학적인 치료 효능을 보인다고 알려져 있으며, 최근에는 중간엽 줄기세포 자체를 사용하지 않고 중간엽 줄기세포가 분비하는 엑소좀을 이용하여 다양한 질환의 치료효과에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.

[0007] 본 발명자들은 중간엽 줄기세포 및 이로부터 유래한 엑소좀을 이용한 아토피성 피부염 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)로부터 분화된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)[iMSC]가 기존 중간엽 줄기세포보다 개선된 항염증 활성 및 피부질환 개선 효과를 가지며, 이로부터 유래된 엑소좀(iMSC-Exo)이 아토피성 피부염을 비롯한 피부질환의 개선 효과를 나타냄을 규명하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1399056호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1663912호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Martin H Hoogduijin Arthritis Res Ther. 2015;17(1):88

(비특허문헌 0002) 호동환 외. 대한신경과학회지 2015;33(2):75-81.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)로부터 분화된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)[iPSC-MSC, iMSC], 이의 배양물 및/또는 이로부터 유래한 엑소좀(iPSC-derived mesenchymal stem cell-derived exosome, iMSC-Exo)을 포함하는 피부질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 iMSC 및/또는 iMSC-Exo를 포함하는 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC) 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀(iMSC-Exo)을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 분리된 엑소좀(iMSC-Exo)의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 iMSC 및/또는 iMSC-Exo를 포함하는 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)[iMSC], 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 분리된 엑소좀(iMSC-derived exosome, iMSC-Exo)을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 항염증 활성이 강화된 중간엽 줄기세포를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 유도만능 줄기세포로부터 분화된 중간엽 줄기세포가 기존 중간엽 줄기세포보다 개선된 항염증 활성 및 피부질환 개선 효과를 가지며, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 및 이로부터 유래한 엑소좀(iMSC-Exo)이 아토피성 피부염을 비롯한 피부질환의 개선 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0019] 본 명세서에서 용어 '유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)'란, 체세포와 같은 이미 분화된 세포에 역분화(dedifferentiation)를 유도하여 초기의 미분화된 상태로 돌아가, 전분화능(pluripotency)을 가지게 된 세포를 의미한다. 상기 역분화는 특정 유전자(예를 들어, Sox2, c-Myc, Klf4, Oct-4 등)를 도입하여 발현시키거나 상기 특정 유전자가 도입된 세포에서 만들어진 역분화 유도 단백질을 주입하여 유도될 수 있다. 상기 전분화능은 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer), 즉 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm) 및 외배엽(ectoderm) 기원의 조직 또는 기관으로 분화할 수 있는 능력을 의미한다.

[0020] 본 발명의 유도만능 줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등 모든 포유동물 유

래의 유도만능 줄기세포를 포함하나, 바람직하게는 인간 유래의 유도만능 줄기세포이다.

[0021] 본 명세서에서 용어 '중간엽 줄기세포'란, 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부, 신경 등의 세포로 분화할 수 있는 다능성(multipotent)을 갖는 줄기세포를 의미한다. 상기 중간엽 줄기세포는 유도만능 줄기세포로부터 분화되거나, 골수, 지방조직, 제대조직, 제대혈, 골격근, 말초혈액, 윤활막, 양수 등에서 분리될 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어 '유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포'란, 유도만능 줄기세포로부터 분화된 중간엽 줄기세포(iMSC)를 의미한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 체내(예를 들어, 골수, 지방조직, 제대조직, 제대혈, 골격근, 말초혈액, 윤활막 또는 양수 등)로부터 분리된 중간엽 줄기세포와 비교하여 (i) 인돌아민 2,3-다이옥시제나아제(indoleamine 2,3-dioxygenase)의 발현이 증가되고, (ii) 염증성 사이토카인의 분비가 감소된 특징을 갖는다.

[0024] 상기 염증성 사이토카인은 IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-6R α로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 염증성 사이토카인이다.

[0025] 본 명세서에서 용어 '배양물'이란, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에서 배양하여 수득한 배양액, 또는 상기 배양액의 건조, 여과 및/또는 농축물을 의미한다. 상기 배양물은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포를 포함 또는 불포함 할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 용어 '엑소좀(exosome)'이란 세포가 세포 외로 분비하거나, 세포 내에 존재하는 지질-이중층으로 구성된 막 구조를 갖는 소낭(membrane vesicle)으로, 거의 모든 진핵 생물의 체액에 존재한다. 엑소좀의 직경은 30-1000 nm 정도이며, 다중소포체(multivesicular bodies)가 세포막과 융합될 때 세포로부터 방출되거나, 세포막으로부터 곧바로 방출된다. 엑소좀이 응고, 세포-세포간 커뮤니케이션 및 세포성 면역을 중재하는 기능적 역할을 수행하기 위해, 세포 내의 생체분자인 단백질, 생체활성 지질 및 RNA(miRNA)를 수송하는 역할을 하는 것은 잘 알려져 있다. 본 발명에서 상기 엑소좀은 미세소포체(microvesicle)를 포괄하는 개념이다. 엑소좀의 마커 단백질로는 CD63, CD81 등이 알려져 있고, 그 외에는 EGFR과 같은 세포 표면의 수용체, 신호전달에 관련 분자, 세포 부착 관련 단백질, MSC 연관 항원, 열 충격 단백질(heat shock protein), 소포 형성과 관련된 Alix 등의 단백질이 알려져 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC) 또는 이의 배양물로부터 분리한 엑소좀은 상술한 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC) 내에 존재하거나, iMSC로부터 iMSC의 배양물(또는 배양액)으로 분비된 엑소좀을 의미한다.

[0028] 본 명세서에서 용어, '유효성분으로 포함하는'이란 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, 이의 배양물 또는 이로부터 분리한 엑소좀이 피부질환의 개선, 예방 또는 치료 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.

[0029] 본 명세서에서 용어 '피부질환'이란, 피부에서 발생되는 비정상적인 상태 또는 증상을 의미한다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 피부질환은 염증성 피부질환이다. 상기 염증성 피부질환은 면역세포가 매개하는 염증반응으로 인해 가려움증, 홍반 등과 같은 증상을 나타내는 피부질환을 의미한다.

[0031] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 염증성 피부질환은 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는 피부질환이다.

[0032] 본 명세서에서 용어, “아토피성 피부염"은 만성적으로 재발하는 심한 가려움증이 동반되는 피부 습진 질환으로, 피부염의 일종이다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 피부질환 또는 질병을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 “치료”는 (a) 피부질환 또는 질병의 발전의 억제; (b) 피부질환 또는 질병의 경감; 및 (c) 피부질환 또는 질병의 제거를 의미한다.

[0035] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, 이의 배양물 또는 이로부터 분리한 엑소좀의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담

체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어, "약제학적 유효량"은 상술한 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 (iMSC), 이의 배양물, 또는 iMSC 또는 iMSC 배양물로부터 분리한 엑소좀의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0037] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 예컨대 정맥내 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 국소 투여, 비강 내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여, 경막 내 투여, 안구 투여, 피부 투여 및 경피 투여 등의 방법으로 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.0001-1000 ㎎/㎏ 범위 내이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, 이의 배양물 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물은 상기 피부질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과 유효성분 및 대상질환이 동일하므로, 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 본 발명의 조성물의 투여로 피부질환 또는 질병이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 본 발명의 조성물은 화장료 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 개선용 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 유효 성분으로서의 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0046] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0047] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로

플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0050] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양물로부터 분리된 엑소좀을 제공한다.

[0054] 본 발명의 상기 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 종래의 중간엽 줄기세포와는 구별되는 세포학적(면역학적) 특징을 가진 중간엽 줄기세포다. 본 발명의 실시예에서 입증한 바와 같이, 일반 중간엽 줄기세포(MSC)와, 본 발명의 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC)의 인돌아민 2,3-다이옥시제나아제(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)의 발현량을 비교한 결과, MSC에 비해 iMSC에서 IDO 발현이 높게 발현됨을 확인하였다(도 3). 또한, MSC와 iMSC의 배양액을 각각 수거하여 염증관련 사이토카인 단백질 분비량을 비교한 결과, 본 발명의 iMSC는 MSC와 비교하여 현저히 감소된 IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-6Rα의 분비를 나타냄을 확인하였다(도 4).

[0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC)로부터 분리된 엑소좀(iMSC-Exo)의 제조방법을 제공한다:

[0057] (a) 유도만능 줄기세포를 중간엽 줄기세포로 분화시키는 단계;

[0058] (b) 상기 중간엽 줄기세포를 세포배양 배지에서 배양하는 단계; 및

[0059] (c) 상기 중간엽 줄기세포의 배양액으로부터 엑소좀을 분리하는 단계.

[0061] 상기 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 분리된 엑소좀의 제조방법을 단계별로 설명한다.

[0062] 단계 (a): 중간엽 줄기세포로의 분화 유도

[0063] 먼저, 유도만능 줄기세포를 중간엽 줄기세포로 분화시킨다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 분화는 유도만능 줄기세포를 세포외기질-코팅된 배양 용기에서 배양하여 수행된다.

[0065] 본 명세서에서 용어 '세포외기질(extracellular matrix)'은 세포가 성장하고 분화하는데 요구되는 생화학적 인자(biochemical factors)를 저장하고 적절히 공급해 줌과 동시에 세포가 인식할 수 있는 물리적 환경을 의미한다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포외기질은 세포외기질 단백질이다.

[0067] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 세포외기질 단백질은 비트로넥틴(vitronectin), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 콜라겐(collagen) 등을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0068] 본 발명의 특정 구현예에 있어서, 상기 세포외기질 단백질은 비트로넥틴이다.

[0069] 상기 분화의 유도는 유도만능 줄기세포에 분화 유도 인자(예컨대, 우태아혈청, bFGF, MEM-NEAA 및 β-머캅토에탄올)를 포함하는 세포배양 배지를 이용하여 중간엽 줄기세포로 분화를 유도할 수 있다.

[0070] 상기 세포배양 배지는 동물세포 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며, 예를 들어, DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), DMEM과 F12의 혼합물, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium), α-MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640(Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), Way-mouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다.

[0072] 단계 (b): 중간엽 줄기세포의 배양

[0073] 다음, 상기 중간엽 줄기세포를 세포배양 배지에서 배양한다.

[0074] 상기 세포배양에 사용되는 배지는 동물세포 배양에 통상적으로 이용되는 상술한 어떠한 배지도 이용가능하다.

[0075] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포배양 배지는 엑소좀이 제거된 우태아혈청을 함유하는 세포배양 배지이다. 상기 세포배양 배지에 엑소좀을 제거한 우태아혈청을 함유시키는 이유는 일반적으로 세포배양에 사용하는 우태아혈청에는 우태아혈청에서 유래한 엑소좀이 다량 포함되어 있기 때문에, 본 발명의 중간엽 줄기세포가 분비하는 엑소좀 외에 배지 내에 포함된 우태아혈청에서 유래한 엑소좀이 혼입되는 것을 방지하기 위함이다.

[0076] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 배양은 12시간 내지 120시간, 24시간 내지 96시간, 48시간 내지 96시간, 또는 60시간 내지 84시간, 가장 구체적으로는 72시간 동안 배양될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0078] 단계 (c): 엑소좀의 분리

[0079] 마지막으로, 상기 중간엽 줄기세포의 배양액으로부터 엑소좀을 분리한다.

[0080] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 분리는 원심분리를 실시하여 중간엽 줄기세포의 배양액으로부터 엑소좀을 분리할 수 있다.

[0081] 보다 구체적으로는 상기 중간엽 줄기세포의 배양 배지를 200-400 x g에서 5 내지 20분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포 잔여물을 제거한 뒤, 상층액을 취하여 9,000-12,000 x g로 60-80분간 고속원심분리한 후, 다시 상층액을 취하여 90,000-120,000 x g로 80-100분간 원심분리하고 상층액을 제거함으로써 하층에 남아 있는 엑소좀을 얻을 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 중간엽 줄기세포 배양 배지를 수거하여 300 x g에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하고, 상층액을 취하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기(high speed centrifuge)를 이용하여 10,000 x g, 4 ℃에서 70분간 원심분리한다. 원심분리 된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000 x g, 4 ℃에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거함으로써 하층에 남아있는 엑소좀을 분리하였다.

[0083] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC) 또는 이로부터 분리된 엑소좀(iMSC-Exo)을 유효성분으로 포함하는 줄기세포치료제를 제공한다.

[0084] 본 명세서에서 용어 '줄기세포치료제'는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 의미하며, 줄기세포치료제는 조직재생, 장기 기능 회복 또는 면역세포의 기능조절의 목적으로 사용된다.

[0085] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포치료제는 줄기세포의 다능성을 통해 회복을 기대할 수 있는 질환(예를 들어, 심장, 간, 관절, 신경계 또는 면역 관련 질환)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.

[0086] 상기 줄기세포 치료제는 상술한 본 발명의 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, 이의 배양물 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 포함하는 약제학적 조성물, 화장료 조성물과 구성성분을 공통으로 하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0088] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0089] (a) 본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, 이의 배양물 또는 이로부터 분리된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 피부질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 피부질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0090] (b) 본 발명은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포, 이의 배양물또는 로부터 분리된 엑소좀 및 상기 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 줄기세포치료제를 제공한다.

[0091] (c) 본 발명의 조성물을 이용하는 경우, 기존 중간엽 줄기세포보다 개선된 면역조절기능을 갖는 피부질환용 조성물 및 줄기세포치료제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1은 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포(iMSC) 및 상기 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀(iMSC-Exo)의 제조를 도식화하여 나타낸다.

도 2는 MSC, iPSC 및 iMSC의 표면항원 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 MSC 및 iMSC의 IDO 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 MSC 및 iMSC의 사이토카인 분비량을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 중간엽 줄기세포로부터 분리한 엑소좀(MSC-Exo) 및 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 분리한 엑소좀(iMSC-Exo)의 크기를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 MSC-Exo 및 iMSC-Exo의 CD63 및 CD9의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 MSC-Exo 및 iMSC-Exo의 전자현미경 이미지를 나타낸다.

도 8은 아토피 피부염 동물모델의 제조과정을 도식화하여 나타낸다.

도 9는 아토피 피부염 동물모델의 아토피 병변에 대한 iMSC 및 iMSC-Exo의 영향을 확인한 결과를 나타낸다.

도 10은 아토피 피부염 동물모델에서 iMSC 및 iMSC-Exo의 처리에 의한 피부임상 점수 결과를 나타낸다.

도 11은 아토피 피부염 동물모델에서 iMSC 및 iMSC-Exo의 처리에 의한 경피수분손실 정도를 나타낸다.

도 12는 아토피 피부염 동물모델에서 iMSC 및 iMSC-Exo의 처리에 의한 피부조직의 변화를 나타낸다. 스케일바는 200 um을 의미한다.

도 13은 아토피 피부염 동물모델에서 iMSC 및 iMSC-Exo의 처리에 의한 혈중 IgE 농도를 나타낸다.

도 14는 아토피 피부염 동물모델에서 iMSC 및 iMSC-Exo의 처리에 의한 림프구의 IL-17 분비량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0095] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0097] **실시예 1: 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 제조 및 분석**

[0098] 지지세포 (배양보조세포)를 사용하지 않은 상태로 넉아웃 제노프리 혈청 대체물, 글루타맥스, 비필수 아미노산,

베타-머캅토에탄올, 항생제 및 bFGF(basic fibroblast growth factor)를 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 배양한 유도만능 줄기세포(서울아산병원 줄기세포센터에서 수립한 섬유아세포(fibroblast), 말초혈액 단핵세포(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC), 중간엽 줄기세포(MSC) 기원의 유도만능 줄기세포(iPSC) 세포주)를 비트로넥틴(vitronectin)으로 미리 코팅한 배양 디쉬 (dish)에 부착시킨 다음, 10% FBS (v/v), 5 ng/ml basic FGF, 0.1 mM MEM NEAA(Minimum Essential Media Non-Essential Amino Acids), β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol)(1X), 100 unit/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배양액을 이용하여 37℃에서 중간엽 줄기세포로의 분화를 유도하였다. 배양 7일째, TrypLE express(1X)를 처리하여 단일세포로 해체시킨 다음, 세포 배양 플레이트로 세포를 옮겨 7일 동안 추가 배양하였다. 매 2일마다 배지를 교체하면서, 편평하고 길쭉한 외형을 보이는 중간엽 줄기세포(iMSC)로의 분화를 관찰하였다(도 1).

[0099] 14일 동안의 중간엽 줄기세포(iMSC)로의 분화 유도가 끝나면 유세포분석법(Flow cytometry)을 이용하여 중간엽 줄기세포의 특이적 표면 항원 표지자인 CD34 (BD Biosciences, Catalog No.: 348053), SSEA4(BD Biosciences, Catalog No.:560128) 음성 발현과 CD73 (BD Biosciences, Catalog No.:550257) 및 CD105 (BD Biosciences, Catalog No.:560839)의 양성 발현을 각각 확인하였다. 그 결과, iMSC는 CD34와 SSEA4 음성 발현, CD73 및 CD105 양성 발현의 전형적인 중간엽 줄기세포(MSC)의 특징을 갖고 있음을 확인하였다(도 2). 대조군으로 사용된 MSC는 서울아산병원 줄기세포센터에서 태아의 제대조직으로부터 분리하여 수립한 제대 조직 유래 중간엽 줄기세포다.

[0100] 또한, 상기 MSC 및 iMSC에서 인돌아민 2,3-다이옥시제나아제(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)를 실시간(real-time) RT-PCR을 이용하여 정량하였다. 그 결과, MSC에 비해 iMSC에서 IDO 발현이 높게 발현됨을 확인하였다(도 3).

표 1

[0101] 인돌아민 2,3-다이옥시제나아제(IDO) 검출용 프라이머 서열

Forward primer (서열목록 제1서열)	5'-GCCCTTCAAGTGTTTCACCAA-3'
Reverse primer (서열목록 제2서열)	5'-GCCTTTCCAGCCAGACAAATAT-3'

[0103] 상기 인돌아민 2,3-다이옥시제나아제는 트립토판을 키뉴레닌(kynurenine)으로 전환시키는 효소로서 세포 주변부의 트립토판을 고갈시키고 면역세포의 증식을 방해하여 염증반응 및 면역반응을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 IDO 발현이 높게 발현되는 본 발명의 iMSC는 면역반응 억제 활성이 높음을 알 수 있다.

[0104] 또한, 상기 MSC 및 iMSC의 배양액을 각각 수거하여 염증관련 사이토카인 단백질 분비량을 측정하고 비교하였다.

[0105] 염증관련 사이토카인의 측정은 Magnetic Luminex® Screening Assay 실험 방법에 따라 진행하였다. 먼저 MSC 및 iMSC의 배양액을 볼텍싱(vortexing)한 후 원심분리하여 상층액을 희석제(diluent)로 1/2희석하여 각각의 시료를 준비하였다. 이를 비드-항체 혼합물(bead-Ab Mixture)과 상온에서 2시간 반응하였으며, 반응 완료 후 Luminex 기기(Luminex, Austin, TX, USA)로 측정하였다. 시료 내 각 피분석물들은 특정 번호 비드(bead)에 붙어있는 해당 항체와 각각 독립적으로 반응하고, 검출 항체와 2'(streptavidin-PE) 반응(sandwich assay) 결과로 각 피분석물 양에 비례한 해당 비드(bead) 표면에 붙은 피코에리트린 (Phycoerythrin, PE)의 형광량을 측정하였다. Luminex 기기는 비드(bead)를 한개씩 흘려주면서 몇 번 비드(bead) 인지 또 그 비드(bead) 표면의 PE 형광 세기를 측정하여 피분석물 각각의 반응 결과값(MFI)을 얻었다. 표준(standard) 농도 별 반응 측정값(MFI)을 계산 software 'MasterPlex QT 2010 (MiraiBio, Hitachi, CA, USA)'에서 best fit 방법으로 표준 곡선(standard curve)을 구하였으며, 표준 곡선을 기준으로 해당 시료의 결과 농도 값을 희석배수를 반영하여 계산하였다.

[0106] 그 결과 iMSC는 MSC와 비교하여 감소된 IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-6Rα의 분비를 나타내었다 (도 4).

[0107] 상기 결과들로부터 본 발명의 유도만능 줄기세포로부터 유래된 iMSC는 기존의 일반적인 MSC와 비교하여 구별되는 세포학적 특징(면역학적 특징)을 가지는 신규한 중간엽 줄기세포임을 알 수 있다.

[0109] **실시예 2: 유도만능 줄기세포 분화 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 분리 및 확인**

[0110] 중간엽 줄기세포의 특성이 확인된 iMSC를 엑소좀이 제거된 FBS(Exosome-depleted FBS)를 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 배양하였다. 72시간 동안 배양한 후, iMSC 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분 동안 원심분리하여 남아있는 세포와 세포 찌꺼기를 제거하였다. 상층액을 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속 원심분리기(high speed centrifuge)를 이용하여 10000xg, 4℃에서 70분 동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리된 상층액을 초고속원심분리기(ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4℃에서 90분 동안 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하고, 하층에 남아있는 엑소좀을 PBS(phosphate buffered saline)로 희석하여 사용하였다.

[0111] MSC 및 iMSC의 배양액으로부터 각각 분리된 엑소좀을 각각 nanoparticle tracking assay (NanoSight NS300, Malvern)를 통해 엑소좀의 수와 크기 분포를 확인하였다(도 5). 웨스턴 블랏으로 엑소좀 특이적인 표면항원인 CD9 및 CD63 발현을 확인하였으며(도 6), 전자 현미경을 이용하여 엑소좀의 형태를 확인하였다(도 7).

[0112] 따라서, 일반적인 MSC와 본 발명의 iMSC로부터 각각 유래한 엑소좀은 엑소좀으로서의 동일한 특성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0114] **실시예 3: 아토피 질환 유도 마우스 제작 및 투여**

[0115] 실험에 사용한 동물은 8주령 암컷 BALB/c 마우스(오리엔트바이오, 대한민국)를 구입하여 일주일 동안 순화기간을 거친 후 9주령에 실험에 사용하였다. 아토피 피부염을 유도하기 위하여 BALB/c 마우스의 등쪽 윗부분까지 최대한 제모기로 제모하였다. 털이 제거된 등 부위 피부조직 1x1 cm^2에 Af(*Aspergillus fumigatus*) 추출물 40 μg을 24시간 간격으로 5일 동안 도포하였다. 2주 동안의 휴지기를 가진 후, 19일째에 24시간 간격으로 반복 5회 도포하여 아토피피부염 동물모델의 제작을 완료하였다.

[0116] 아토피피부염 동물모델 제작 완료 후, MSC, iMSC, MSC-Exo (중간엽 줄기세포 유래 엑소좀) 또는 iMSC-Exo(유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀)를 피하(subcutaneous) 주입하였다. MSC 또는 iMSC의 주입량은 마리당 $2X10^6$ 개이고, MSC-Exo 또는 iMSC-Exo의 주입량은 마리당 12 μg이다. 주입 후, 5일 째 마우스를 희생하여 분석하였다(도 8).

[0118] **실시예 4: 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 (iMSC)와 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 엑소좀 (iMSC-Exo)의 아토피 피부염 치료 활성 평가**

[0119] **① 아토피 증상 개선**

[0120] iMSC 및 iMSC-Exo의 아토피 개선 수준을 확인하기 위해, 아토피 피부염 유발하지 않은 음성 대조군(CONTROL, 생리식염수 처리), 아토피 피부염을 유발한 양성 대조군(AD, Af 처리), MSC 처리군, MSC-Exo 처리군, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군을 관찰하고 비교하였다. 그 결과, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군은 음성 대조군과 유사한 수준의 아토피 개선 효과를 나타냈다(도 9).

[0121] 이로부터 본 발명의 iMSC 및 iMSC-Exo는 아토피 피부염을 비롯한 피부질환의 개선 또는 치료효능이 탁월함을 알 수 있다.

[0123] **② 피부 임상 점수 및 경피 수분 손실 평가**

[0124] 피부 임상 점수는 건조(dryness), 인설(scaling), 미란(erosion), 찰과상(excoriation) 및 출혈의 5가지 항목으로 나누어 책정하였다. 각 항목에서 병변이 없는 상태를 0점, 경증 1점, 중등도 2점, 중증 3점으로 책정하고 이를 합산하여 피부 임상 점수를 계산하였다. 그 결과, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군은 양성 대조군(AD)이나 MSC, MSC-exo 처리군과 비교하여 개선된 피부임상 점수를 나타냈다(표 2 및 도 10).

표 2

[0125] 피부임상 점수

CONTROL	AD	MSC	MSC-exo	iMSC	iMSC-exo
0.1	4.1	1.6	2.1	1.6	1.8

[0127] 또한, 동일 투여군에서 피부장벽손상을 평가하기 위해 경피수분손실(transepidermal water loss, TEWL)을 VapometerSWL-3® (Delfin technologies)을 이용하여 측정하였다. 그 결과, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군은 양성 대조군(AD), 음성대조군(CONTROL) 및 MSC, MSC-exo 처리군과 비교하여 경피수분손실 정도가 현저히 감소되어 아토피 증상이 호전됨을 확인되었다(표 3 및 도 11).

표 3

[0128] 경피수분손실(TEWL) 정도

CONTROL	AD	MSC	MSC-exo	iMSC	iMSC-exo
3.4	13.3	4.2	4.4	3.6	3.5

[0130] 따라서, 본 발명의 iMSC 및 iMSC-Exo는 피부임상증상을 개선하고, 경피수분손실 정도를 현저히 감소시키므로 아토피 피부염을 비롯한 피부질환의 개선 또는 치료효능이 탁월함을 알 수 있다.

[0132] **③ 피부조직 관찰**

[0133] 음성 대조군, 양성 대조군, MSC 처리군, MSC-Exo 처리군, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군의 피부조직을 분리하였다. 분리된 피부조직을 10% 포르말린 용액으로 고정하고 파라핀블록을 제작한 후, 5 μm 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편화하였다. 피부조직의 변화와 염증세포침윤을 관찰하기 위해, 피부 절편을 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin) 으로 염색하고 현미경 400배 배율에서 관찰하였다. 그 결과, 양성 대조군과 비교하여 iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군에서 각질층의 손상이 개선되고 표피층 및 진피층의 두께가 감소되었다(도 12).

[0134] 따라서, 본 발명의 iMSC 및 iMSC-Exo는 피부 각질층의 손상을 개선하고, 표피층 및 진피층의 두께를 감소시키므로 아토피 피부염을 비롯한 피부질환의 개선 또는 치료효능이 탁월함을 알 수 있다.

[0136] **④ 혈청 IgE 측정**

[0137] 음성 대조군, 양성 대조군, MSC 처리군, MSC-Exo 처리군, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군의 마우스를 개복하고 바늘을 삽입하여 후대정맥에서 0.5-0.7 ml 가량의 혈액을 채혈하였다. 원심분리를 실시하여, 분리한 혈액으로부터 혈청을 분리하였다. ELISA 실험 키트(eBioscience)를 이용하여 분리된 혈청의 총 IgE를 측정하였다. 양성 대조군과 비교하여 iMSC 처리군의 혈청 IgE 수준은 감소되었으나 iMSC-Exo 처리군의 혈청 IgE 수준은 변화가 크지 않음을 확인하였다(도 13).

[0138] 상기 결과 및 상술한 실시예의 임상증상 개선효과에 기초하여 판단하건대, 본 발명의 iMSC, iMSC-Exo의 피부질환의 개선 효능은 주로 IgE에 의하여 매개되는 것이 아님을 알 수 있다.

[0140] **⑤ T세포 면역반응 확인**

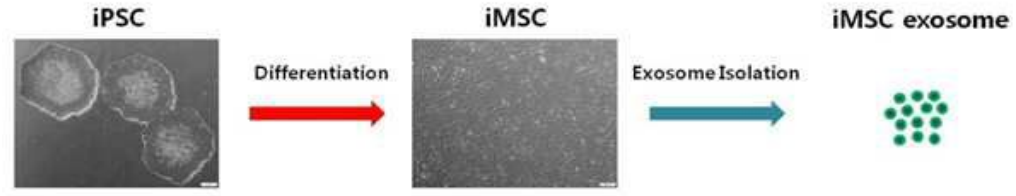
[0141] iMSC 및 iMSC-Exo에 의한 T 세포 면역반응 확인하기 위하여, 음성 대조군, 양성 대조군, iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군의 마우스의 림프절에서 림프구를 분리하였다. 분리된 림프구를 CD3/CD28 자극하고 배양액을 채취하여 ELISA 키트(eBioscience)를 통해 사이토카인 분비를 측정하였다. Th17에서 생성되는 주요 사이토카인인 IL-17A의 경우, 양성대조군과 비교하여 iMSC 처리군 및 iMSC-Exo 처리군에서 음성 대조군과 유사한 수준으로 현

저히 감소하였다(도 14).

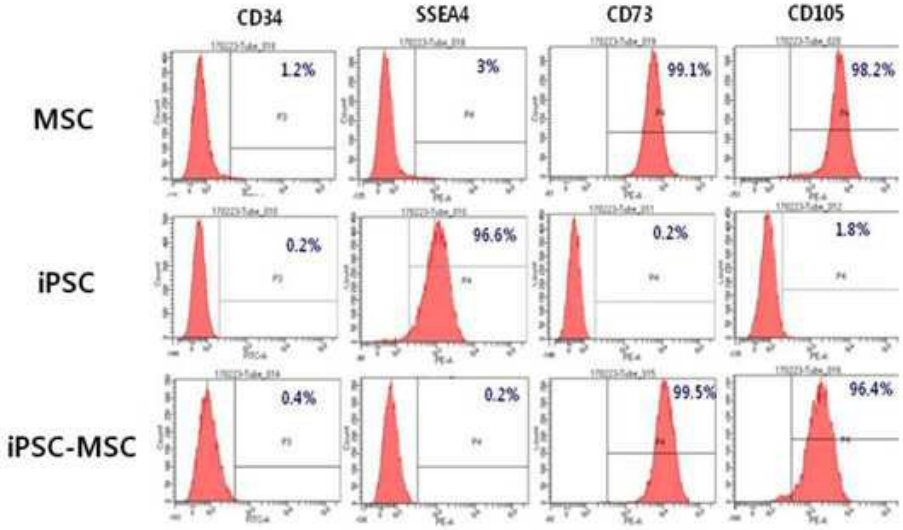
[0142] 상기 결과 및 상술한 실시예의 임상증상 개선효과, 그리고 혈청 IgE 수준 변화에 기초하여 판단하건대, 본 발명의 iMSC, iMSC-Exo의 피부질환의 개선 효능은 주로 IgE에 의하여 매개되는 것이 아니라 IL-17A 등 T 세포의 면역반응을 억제시킴으로써 매개되는 것으로 추정된다.

도면

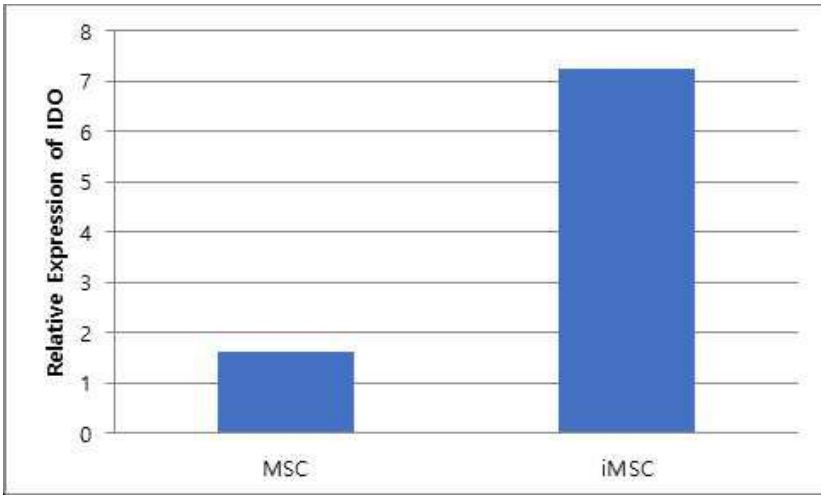
도면1



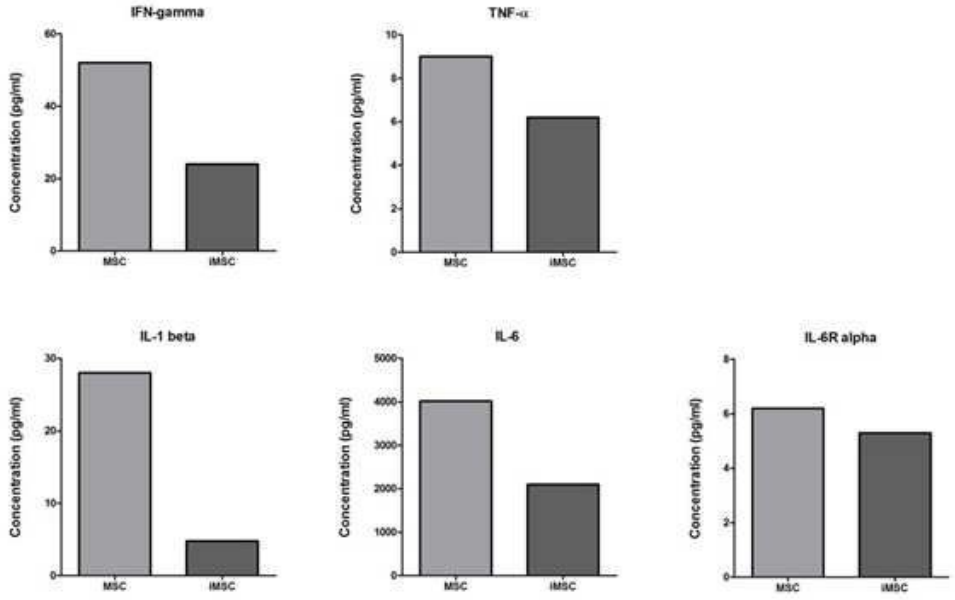
도면2



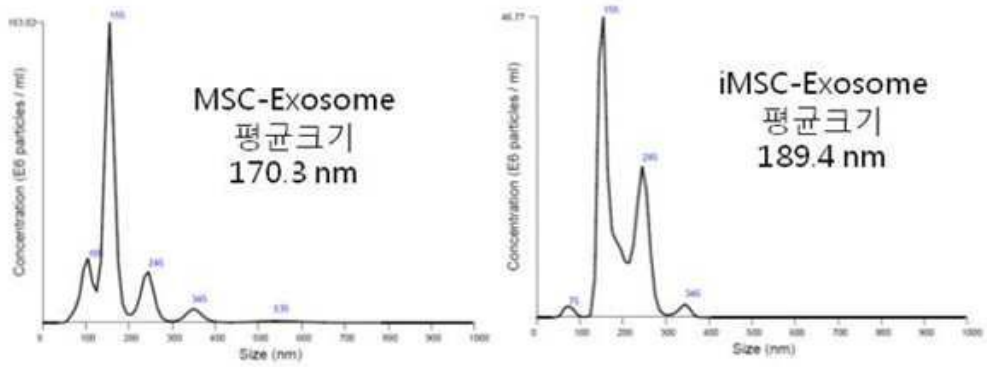
도면3



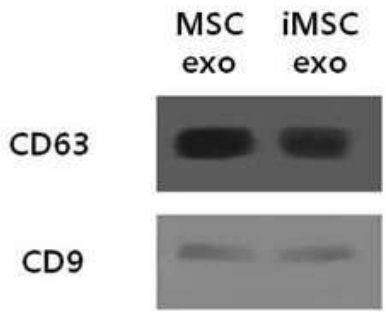
도면4


IFN-gamma
TNF-α
IL-1 beta
IL-6
IL-6R alpha
Concentration (pg/ml)
MSC
iMSC

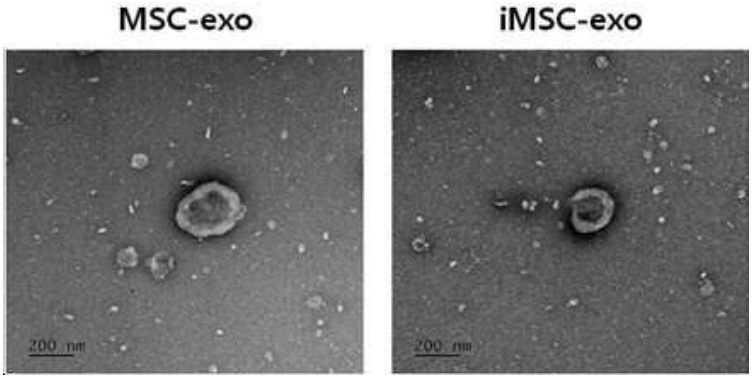
도면5


MSC-Exosome
평균크기
170.3 nm
iMSC-Exosome
평균크기
189.4 nm
Concentration (E6 particles / ml)
Size (nm)

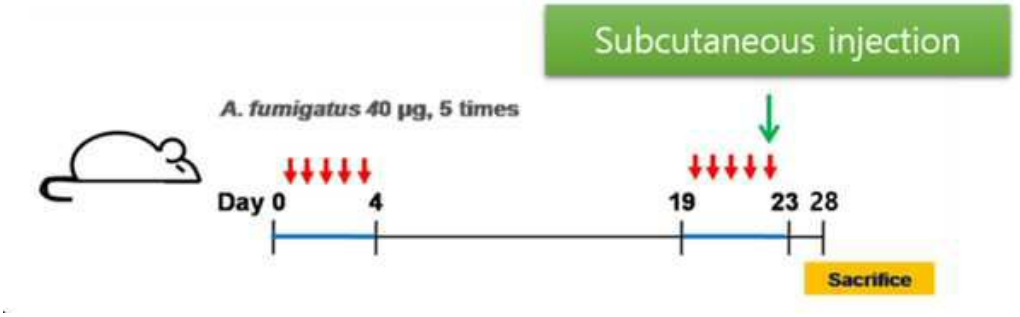
도면6


MSC exo
iMSC exo
CD63
CD9

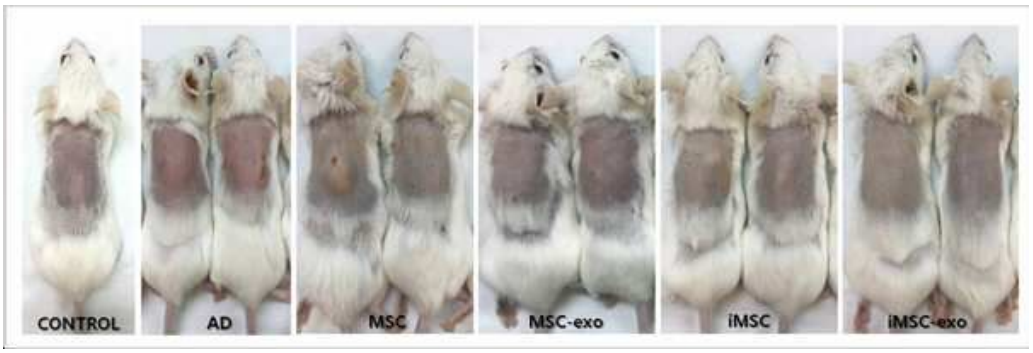
도면7


MSC-exo
iMSC-exo
200 nm
200 nm

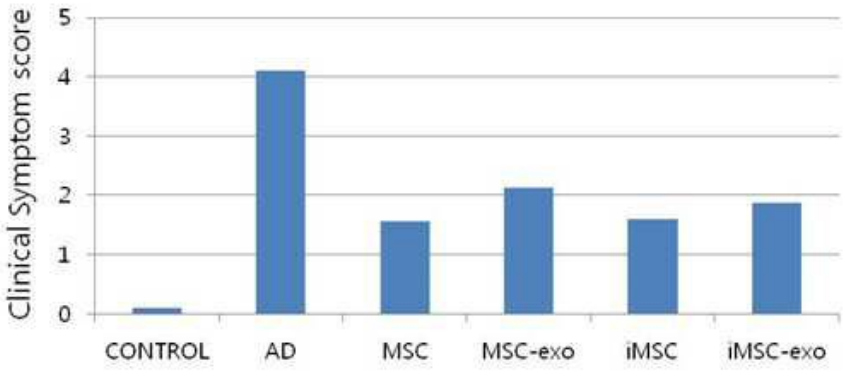
도면8


Subcutaneous injection
A. fumigatus 40 μg, 5 times
Day 0
4
19
23
28
Sacrifice

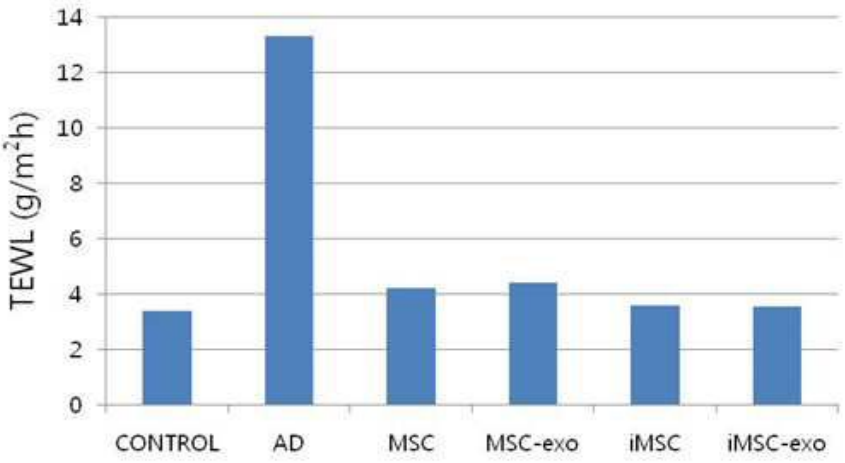
도면9


CONTROL
AD
MSC
MSC-exo
iMSC
iMSC-exo

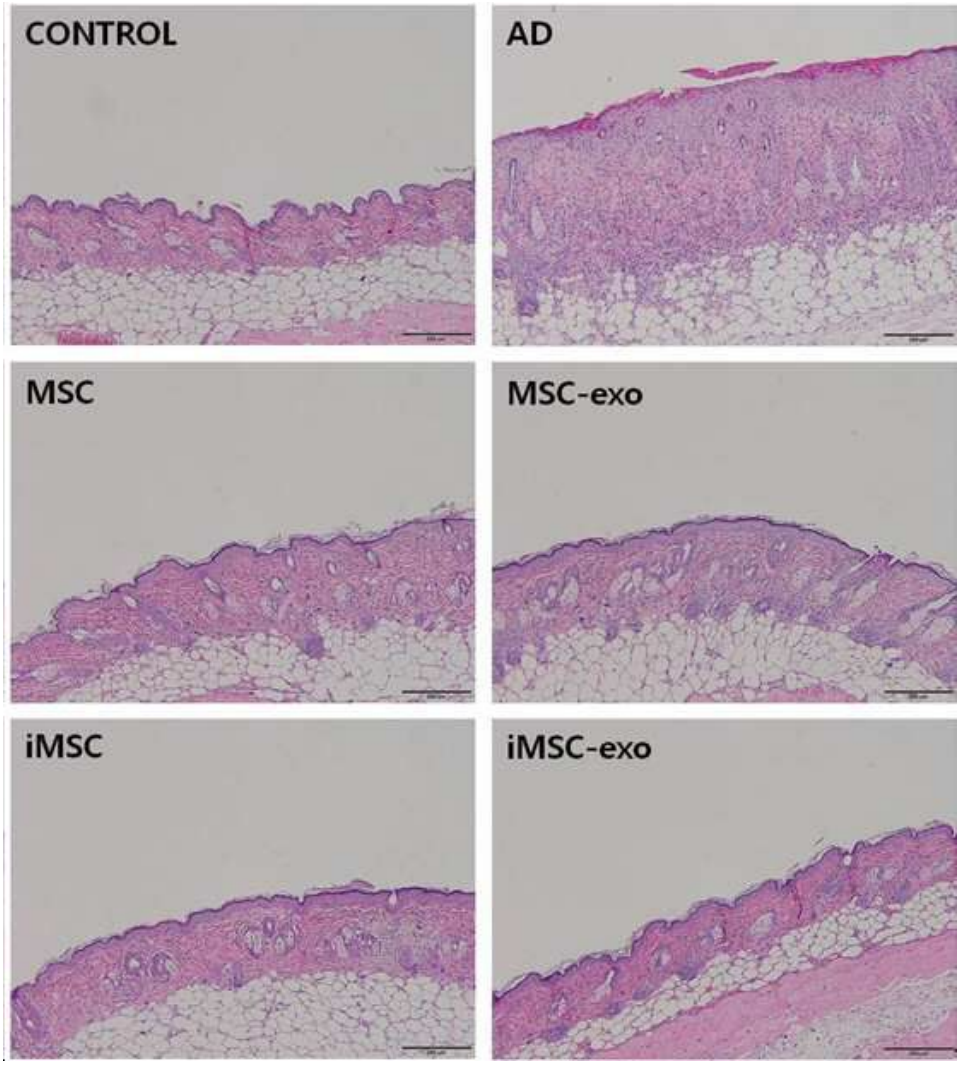
도면10


Clinical Symptom score
5
4
3
2
1
0
CONTROL
AD
MSC
MSC-exo
iMSC
iMSC-exo

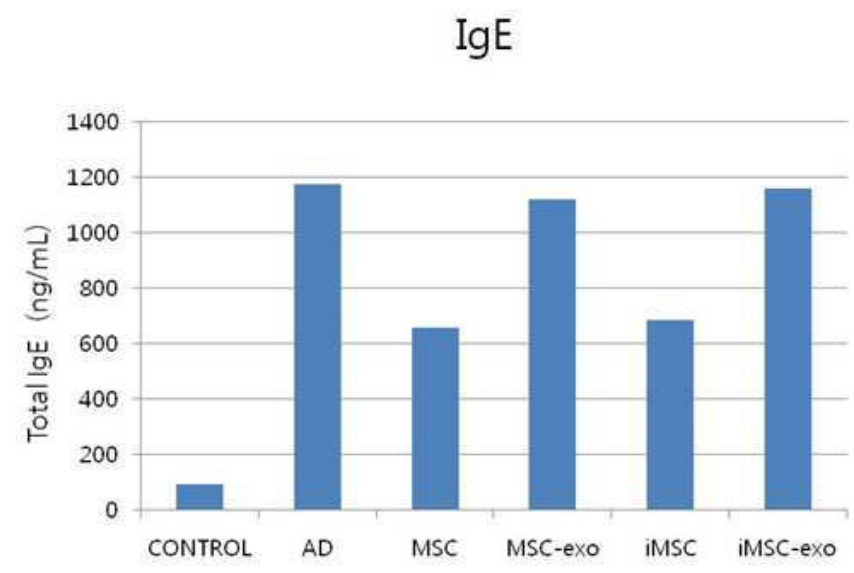
도면11


TEWL (g/m²h)
14
12
10
8
6
4
2
0
CONTROL
AD
MSC
MSC-exo
iMSC
iMSC-exo

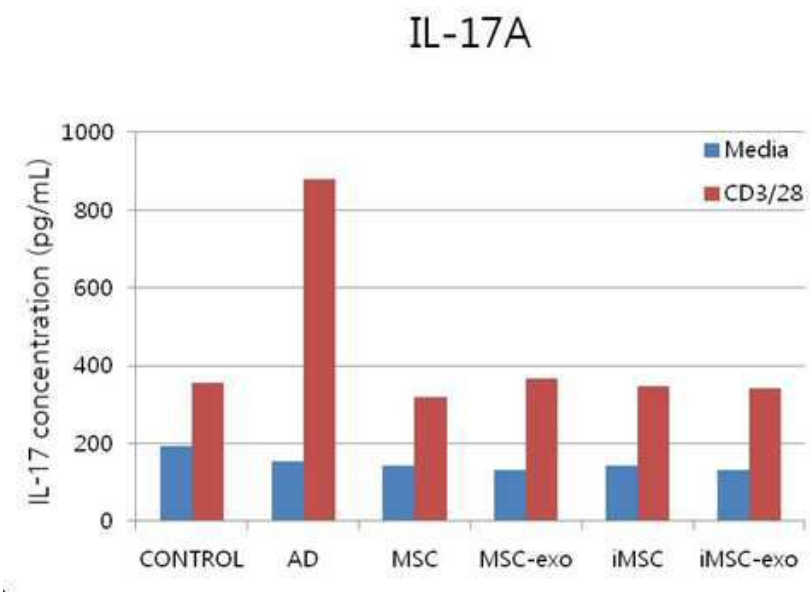
도면12


CONTROL
AD
MSC
MSC-exo
iMSC
iMSC-exo

도면13


IgE
Total IgE (ng/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
CONTROL
AD
MSC
MSC-exo
iMSC
iMSC-exo

도면14



서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Composition for Improving Skin Conditions, or Preventing or Treating Skin Diseases comprising Induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cell and Exosomes derived therefrom

<130> PN170323

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for detection of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene

<400> 1

gcccttcaag tgtttcacca a 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for detection of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene

<400> 2

gcctttccag ccagacaaat at 22