



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월31일
(11) 등록번호 10-2723986
(24) 등록일자 2024년10월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61L 27/38 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 25/02 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7033876
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월25일
심사청구일자 2022년03월10일
- (85) 번역문제출일자 2020년11월25일
- (65) 공개번호 10-2021-0005152
- (43) 공개일자 2021년01월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2019/017594
- (87) 국제공개번호 WO 2019/208688
국제공개일자 2019년10월31일
- (30) 우선권주장
JP-P-2018-084565 2018년04월25일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170116219 A*
KR1020180008526 A*
WO2006093151 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
홋카이도 코리츠 다이가쿠 호진 샷포르 이카 다이가쿠
일본 0608556 홋카이도 샷포르시 추오쿠 미나미 1조 니시 17초메 291-85
- (72) 발명자
치켄지 타카코
일본 홋카이도 0608556 샷포르시 추오쿠 미나미 1조 니시 17초메 샷포르 메디컬 유니버시티 내 후지미야 미네코
일본 홋카이도 0608556 샷포르시 추오쿠 미나미 1조 니시 17초메 샷포르 메디컬 유니버시티 내 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 14 항

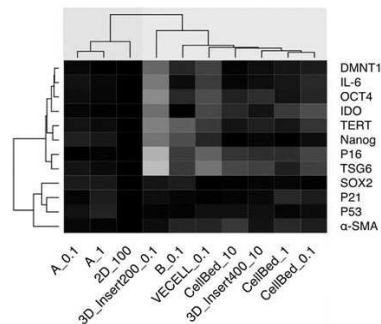
심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 생체 이식용 세포 시트 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하인 간엽 줄기 세포를 그 표면에 갖는 생체 이식용 세포 시트에 관한 것이다. 또한 본 발명은 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체에 간엽계 줄기 세포를 3.0×10^5 세포/cm² 이하의 세포 수로 파종하는 공정 및 간엽계 줄기 세포를 배양하여 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하인 세포 시트를 제조하는 공정을 포함하는 생체 이식용 세포 시트의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



활성화제 없이 2D MSC를 1로 했을 때의 mRNA expression

(52) CPC특허분류

A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3878 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12M 21/08 (2013.01)
C12N 5/0663 (2013.01)
C12N 5/0667 (2013.01)
A61L 2430/32 (2013.01)
C12N 2533/30 (2024.08)

(72) 발명자

사이토 유키

일본 홋카이도 0608556 삿포로시 추오쿠 미나미 1
조 니시 17초메 삿포로 메디컬 유니버시티 내

나카노 마사코

일본 홋카이도 0608556 삿포로시 추오쿠 미나미 1
조 니시 17초메 삿포로 메디컬 유니버시티 내

코나리 나오토

일본 홋카이도 0608556 삿포로시 추오쿠 미나미 1
조 니시 17초메 삿포로 메디컬 유니버시티 내

오타니 미호

일본 홋카이도 0608556 삿포로시 추오쿠 미나미 1
조 니시 17초메 삿포로 메디컬 유니버시티 내

명세서

청구범위

청구항 1

평균 세포 밀도가 3.0×10^3 세포/cm² ~ 3.0×10^4 세포/cm²의 간엽 줄기 세포를 그 표면에 갖고 생체 적합성 지지체를 포함하는 생체 이식용 세포 시트로서,

상기 지지체가 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체이고,

상기 세포 시트는 세포 배양 담체에 간엽 줄기 세포를 제조되는 세포 시트의 평균 세포 밀도의 10 배량에서 1/10 배량 범위의 세포 수로 과종하는 공정 및

간엽 줄기 세포를 배양하여 세포 시트를 제조하는 공정을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것인, 세포 시트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 담체가 나노 미터 ~ 마이크로 미터 단위의 평균 섬유 직경을 갖는 섬유에 의해 세포와의 접촉면에 형성된 개구부를 갖는 세포 시트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 개구부의 평균 직경이 500nm ~ 1000 μm인 세포 시트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 지지체는 생분해성 고분자로 이루어진 나노 섬유를 함유하여 이루어지는 세포 배양 담체인 세포 시트.

청구항 5

제1항에 있어서, 신장 질환의 치료에 이용하기 위한 세포 시트.

청구항 6

제5항에 있어서, 신장 섬유 피막하에 적용하는 세포 시트.

청구항 7

제1항에 있어서, 뇌 손상 또는 신경 변성 질환의 치료에 이용하기 위한 평균 밀도가 3.0×10^3 세포/cm² ~ 1.5×10^4 세포/cm²의 간엽 줄기 세포를 그 표면에 가지는 세포 시트.

청구항 8

제7항에 있어서, 뇌 손상 부위, 변성 부위 또는 그 근처에 적용하는 세포 시트.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포가 골수 또는 지방 조직 유래의 간엽 줄기 세포인 세포 시트.

청구항 10

섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체에, 간엽 줄기 세포를 제조되는 세포 시트의 평균 세포 밀도의 10 배량에서 1/10 배량 범위의 세포 수로 과종하는 공정; 및

간엽 줄기 세포를 배양하여 세포 시트를 제조하는 공정을 포함하는 생체 이식용 세포 시트의 제조 방법으로서,

상기 세포 시트는 평균 세포 밀도가 3.0×10^3 세포/cm² ~ 3.0×10^4 세포/cm²의 간엽 줄기 세포를 그 표면에 갖고 생체 적합성 지지체를 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포 배양 담체가 나노 미터 ~ 마이크로 미터 단위의 평균 섬유 직경을 갖는 섬유에 의해 세포와의 접촉면에 형성된 개구부를 갖는 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 개구부의 평균 직경이 500nm ~ 1000 μm인 제조 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 세포 배양 담체가 생분해성 고분자로 이루어진 나노 섬유를 함유하여 이루어지는 세포 배양 담체인 제조 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 간엽 줄기 세포가 골수 또는 지방 조직 유래의 간엽 줄기 세포인 제조 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 이식에 이용하기 위한 세포 시트 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간엽 줄기 세포 (Mesenchymal stem cell, 이하 MSC라고도 함)는 분화능과 자기 복제 능력을 갖는 줄기 세포이며, 조골 세포, 연골 세포, 지방 세포, 근육 세포 등 간엽계에 속하는 세포로 분화뿐만 아니라, 신경 세포나 간세포 등에도 배엽을 넘어 분화하는 능력을 가진다. 또한 MSC는 자신이 생산하는 액성 인자에 의한 파라클라인 효과 및 세포 접촉 상호 작용도 있을 것으로 알려져 있다. MSC는 이러한 작용에 따라 표적 조직이나 세포의 복구·재생 기능 및 항염증 등의 면역 제어 기능을 발휘하고 그 결과 다양한 질환에 대한 치료 효과를 나타내는 것으로 생각되고 있다.

[0003] MSC는 분리 배양이 쉽고 증식 능력이 왕성하고 단기간에 이식 가능한 세포 수를 확보할 수 있는 점, 면역 거부 없는 자가 이식이 가능하다는 점, 윤리적 문제도 적은 점, 낮은 면역원성으로 인해 전처치를 필요로 하지 않고 동종 이식이 현실인 점 등에서 이상적인 세포 이식 요법의 재료로서 다양한 질환에 대한 치료에의 응용의 검토가 진행되고 있다.

[0004] MSC를 이용한 세포 이식 요법의 적용이 기대되는 질환 중 하나가 신장 질환, 특히 만성 신장 질환이다. 만성 신

장 질환은 단백뇨로 대표되는 신장 손상 및 사구체 여과율을 지표로 한 신기능 저하 중 하나 또는 모두가 3 개월 이상 지속되는 상태를 말하며, 일본에서 성인 8 명 중 1 명이 앓고 있다. 만성 신장 질환의 증상이 진행하여 말기 신부전에 이르면 약 치료의 효과는 기대할 수 없이 많은 환자는 투석을 피할 수 없게 된다. 인공 투석은 대중 요법이기 때문에 만성 신부전에 빠진 환자는 평생 투석 계속해야 해서 환자에게 미치는 신체적 및 경제적 부담은 크다. 또한 투석 의료비의 증가는 의료 경제에 우려할 문제가 되고 있다.

[0005] 본 발명자들은 MSC를 이용한 세포 이식 요법을 확립하는 과정에서 환자, 예를 들어 당뇨병 환자의 MSC가 이상한 MSC라는 점, 구체적으로는 전술한 바와 같은 다양한 능력을 잃은 또는 이들의 능력이 정상적인 MSC에 비해 감소의 결과로 질병 치료 효과를 잃거나 또는 치료 효과가 정상적인 MSC에 비해 감소한 MSC라는 점, 포유류의 태아 부속물의 추출물이 상기 비정상적인 MSC를 활성화하여 치료 효과를 회복시킬 수 있고 활성화된 MSC를 이용한 자가 이식 치료가 가능해진다는 점 등을 밝히고, 포유류의 태아 부속물의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 이상한 MSC에 대한 활성화제를 발명하고 특허 출원한 바 있다(특허 문헌 1). 이 활성화제는 특히 치료가 필요할 단계의 환자에 대해서도 MSC의 자가 이식을 가능하게 하는 점에서 중요한 의의를 가진다.

[0006] 한편, 세포 이식 요법에서 사용하는 MSC의 양을 줄이기 위해 필요로 하는 부위에 MSC를 집중시킬 수 있는 국소 적용 가능한 제제 형태의 검토가 진행되고 있다. 신장 질환에 대한 MSC를 이용한 세포 이식 요법으로는 MSC를 포함한 세포 시트 조성물을 신장에 적용함으로써 신장 질환을 치료하는 방법이 보고되었다 (특허 문헌 2). 이 세포 시트 조성물은 자극 응답성 배양 기재 상에 MSC를 파종하여 배양한 후 박리 자극으로 세포를 박리하여 제조된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 국제 공개 W02015/137419 호 팜플렛
- (특허문헌 0002) 일본특허공개공보 2017-132744 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 치료 효과가 높은 MSC를 포함한 새로운 생체 이식용 세포 시트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 특정 배양 담체에서 특정 낮은 세포 밀도가 되도록 MSC을 배양함으로써 높은 질환 치료 효과를 갖는 MSC 세포 시트를 제조할 수 있는 것으로 나타나, 다음 각 발명을 완성시켰다.

- [0010] (1) 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하인 MSC를 그 표면에 가지는, 생체 이식용 세포 시트.
- [0011] (2) 또한 생체 적합성 지지체를 포함하는, (1)에 기재된 세포 시트.
- [0012] (3) 지지체가 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체인, (2)에 기재된 세포 시트.
- [0013] (4) 세포 배양 담체가 나노 미터 ~ 마이크로 미터 단위의 평균 섬유 직경을 갖는 섬유에 의해 세포와의 접촉면에 형성된 개구부를 갖는, (3)에 기재된 세포 시트.
- [0014] (5) 개구부의 평균 직경이 500nm ~ 1000 μm인, (4)에 기재된 세포 시트.
- [0015] (6) 지지체가 생분해성 고분자로 이루어진 나노 섬유를 함유하여 이루어지는 세포 배양 담체인, (2)내지 (5) 중 어느 한 항에 기재된 세포 시트.
- [0016] (7) 신장 질환의 치료에 이용하기 위한 평균 세포 밀도가 1.0×10^3 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm²인 MSC를 그 표면에 가지는, (1) 내지 (6) 중 어느 한 항에 기재된 세포 시트.
- [0017] (8) 신장 섬유 피막 하에 적용하기 위한 (7)에 기재된 세포 시트.

- [0018] (9) 뇌 손상 또는 신경 변성 질환의 치료에 이용하기 위한 평균 밀도가 0.5×10^3 세포/cm²~ 1.5×10^4 세포/cm²인 MSC를 그 표면에 가지는, (1) 내지 (6) 중 어느 한 항에 기재된 세포 시트.
- [0019] (10) 뇌 손상 부위, 변성 부위 또는 이들의 근방에 적용하기 위한 (9)에 기재된 세포 시트.
- [0020] (11) MSC가 골수 또는 지방 조직 유래의 MSC인 (1) 내지 (10) 중 어느 한 항에 기재된 세포 시트.
- [0021] (12) MSC가 질환이 있는 대상에서 분리된 MSC인 (1) 내지 (11) 중 어느 한 항에 기재된 세포 시트.
- [0022] (13) 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체 상에 MSC를 3.0×10^5 세포/cm² 이하의 세포 수로 과중하는 공정 및
- [0023] MSC를 배양하여 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하인 세포 시트를 제조하는 공정을 포함하는 생체 이식용 세포 시트의 제조 방법.
- [0024] (14) 세포 배양 담체가 나노 미터 ~ 마이크로 미터 단위의 평균 섬유 직경을 갖는 섬유에 의해 세포와의 접촉면에 형성된 개구부를 갖는 (13)에 기재된 제조 방법.
- [0025] (15) 개구부의 평균 직경이 500nm ~ 1000 μm 인 (14)에 기재된 제조 방법.
- [0026] (16) 세포 배양 담체가 생분해성 고분자로 이루어진 나노 섬유를 함유하고 있는 세포 배양 담체인 (13) 내지 (15) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.
- [0027] (17) MSC가 골수 또는 지방 조직 유래의 MSC인 (13) 내지 (16) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.
- [0028] (18) MSC가 질환 대상에서 분리된 MSC인 (13) 내지 (17) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 의하면, 치료 효과가 높은 세포 시트를 제조할 수 있으며, 또한 MSC의 이식 요법에서 필요로 하는 MSC의 세포 수를 기존보다 크게 줄일 수 있다. 또한 기존 신장 이식 이외의 근본적인 치료법이 없고 평생 인공 투석을 해야 했던 말기 신부전에 이른 만성 신장 질환도 치료할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0030] [도 1] 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체 (이하, 3 차원 배양 담체라고도 함) 또는 비교예의 세포 배양 담체 상에서 활성화제의 존재 하에서 배양한 변형성 고관절증 환자 MSC (이하, OA-MSC는) 유전자 발현 프로파일을 클러스터 분석한 결과를 나타낸 도면이다.
- [도 2] 비히클(Vehicle)을 투여하거나 세포 시트를 이식한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 혈청 크레아티닌의 추이를 나타내는 그래프이다.
- [도 3] 비히클을 투여하거나 세포 시트를 이식한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트 이식 후 11 주까지의 생존율 추이를 나타내는 그래프이다. 굵은 선은 각 군의 평균치를 세선은 각 군의 95 % CI (신뢰 구간)을 나타낸다.
- [도 4] 비히클을 투여하거나 세포 시트를 이식한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 광학 현미경 관찰 사진이다. 상단에 사구체, 하단에 세뇨관/간질이 나타난다.
- [도 5] 비히클을 투여한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 전자 현미경 관찰 사진이다. 사구체가 나타난다.
- [도 6] 비히클을 투여한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 전자 현미경 관찰 사진이다. 세뇨관이 나타난다.
- [도 7] 비히클을 투여한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 전자 현미경 관찰 사진이다. 세뇨관이 나타난다.
- [도 8] 세포 시트를 이식한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 전자 현미경 관찰 사진이다. 사구체가 나타난다.
- [도 9] 세포 시트를 이식한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 전자 현미경 관찰 사진

이다. 세포관이 나타난다.

[도 10] 비히클을 투여한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 광학 현미경 관찰 사진이다. 신장 표층부가 나타난다.

[도 11] 세포 시트를 이식한, 항암제 처치 후의 당뇨병성 신증 랫트의 신장 조직 절편의 광학 현미경 관찰 사진이다. 신장 표층부가 나타난다.

[도 12] 세포 시트를 이식한, 당뇨병성 신증 랫트의 혈청 크레아티닌과 요소 질소의 추이를 나타내는 그래프이다.

[도 13] 세포 시트를 이식한, 당뇨병성 신증 마우스 소변 알부민/크레아티닌 비율을 나타낸 그래프이다.

[도 14] 평균 세포 밀도가 다른 세포 시트의 MSC를 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 염색 현미경 관찰 사진이다.

[도 15] 세포 시트 B, G 및 H에서 MSC에서 OCT4, Nanog, p16ink4a 및 TERT의 각각의 유전자의 상대적 발현량을 세포 시트 B의 MSC의 그것과 비교하여 나타낸 그래프이다.

[도 16] 평균 세포 밀도가 다른 세포 시트를 이식한 급성 신장 손상 랫트의, 이식 후 10 일째까지 생존 기간과 세포 시트의 평균 세포 밀도와의 관계를 나타내는 도면이다.

[도 17] 평균 세포 밀도가 다른 세포 시트를 이식한 급성 신장 손상 랫트의, 이식 후 10 일째까지 생존 평균치의 추이를 나타내는 그래프이다. 랫트는, 이식한 시트의 평균 세포 밀도에 따라 3 군으로 나누었다.

[도 18] 신장 피막 처리를 실시한 또는 실시하지 않은 급성 신장 손상 랫트의, 이식 후 10 일째까지 생존 평균치의 추이를 나타내는 그래프이다.

[도 19] 평균 세포 밀도가 다른 세포 시트를 이식한 알츠하이머 모델 마우스의 신기한 물체 인식 시험의 결과를 나타내는 그래프이다. 마우스는 이식한 시트의 평균 세포 밀도에 따라 두 그룹으로 나누었다.

[도 20] 평균 세포 밀도가 다른 세포 시트의 지방 조직 유래 MSC를 DAPI 염색한 현미경 관찰 사진이다.

[도 21] 마우스 지방 조직 유래 MSC의 세포 시트를 이식한 급성 신장 손상 랫트의, 이식 후 24 시간 후 혈중 요소 질소를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 생체 이식용 세포 시트

[0032] 본 발명의 제 1 측면은 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하인 MSC를 그 표면에 갖는 생체 이식용 세포 시트 (이하, 간단히 세포 시트로 나타냄)에 관한 것이다.

[0033] 세포 시트는 그 표면에 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하인 MSC (MSC 집단)가 있다. MSC의 평균 세포 밀도는 세포 시트 단위 면적당의 MSC 세포 수의 산술 평균값이며, 세포 시트의 표면을 현미경 등으로 관찰하여 확인되는 MSC 수를 계산하여 합계 수를 세포 시트 전체 면적으로 나눈셈하거나, 세포 시트의 표면을 현미경 등으로 관찰하여 단위 면적당 MSC의 수를 계산하여 산출할 수 있다.

[0034] 본 발명에서 세포 시트 표면에 존재하는 MSC의 평균 세포 밀도는 3.0×10^4 세포/cm² 이하이면 좋고, 예를 들면 0.1×10^3 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm², 0.1×10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm², 0.1×10^3 세포/cm²~ 1.5×10^4 세포/cm², 0.1×10^3 세포/cm²~ 1.0×10^4 세포/cm², 0.1×10^3 세포/cm²~ 0.5×10^4 세포/cm², 0.3×10^3 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm², 0.5×10^3 세포/cm² ~ 3.0×10^4 세포/cm², 1.0×10^3 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm², 3.0×10^3 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm², 6.0×10^3 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm², 1.0×10^4 세포/cm²~ 3.0×10^4 세포/cm², 0.3×10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm², 0.5×10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm², 1.0×10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm², 3.0×10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm², 6.0×10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm² 등으로 적절하게 설정할 수 있다. 세포 시트 표면에 MSC의 평균 세포 밀도는 바람직하게는 0.5×10^3 ~ 3.0×10^4 세포/cm², 보다 바람직하게는 0.5×10^3 ~ 2.0×10^4

세포/cm², 더 더욱 바람직하게는 2.0 × 10³ 세포/cm²~2.0×10⁴ 세포/cm², 더욱 바람직하게는 2.0 × 10³ 세포/cm² ~1.8×10⁴ 세포/cm², 더 더욱 바람직하게는 3.0 × 10³ 세포/cm²~1.6×10⁴ 세포/cm², 더욱 바람직하게는 3.0 × 10³ 세포/cm²~1.0×10⁴ 세포/cm², 특히 바람직하게는 3.0 × 10³ 세포/cm²~8.0×10³ 세포/cm²이다.

- [0035] 평균 세포 밀도는 세포 시트 표면의 MSC의 점유율 (컨플루언스)로 나타낼 수 있다. 컨플루언스 또는 100 %의 컨플루언스는 세포 시트 표면이 MSC로 완전히 덮인 상태이며, MSC는 밀접하여 서로 접촉한 상태에 있다. 이에 대한 상대적인 세포 밀도가 % 컨플루언스이며, 세포 시트 표면의 MSC가 차지하는 면적의 합계를 시트 전체 면적으로 나눠 산출할 수 있다.
- [0036] 인간의 골수 유래 MSC의 경우 평균 세포 밀도 2.0 × 10⁴ 세포/cm²는 60 %의 컨플루언스에 해당한다. 마찬가지로, 평균 세포 밀도 1.0 × 10³ ~ 2.0 × 10⁴ 세포/cm²는 10 ~ 60 %의 컨플루언스에 1.0 × 10³ 세포/cm² ~1.6×10⁴ 세포/cm²는 10 ~ 50 % 컨플루언스, 1.0 × 10³ 세포/cm²~1.0×10⁴ 세포/cm²는 10 ~ 40 %의 컨플루언스에 3.0 × 10³ 세포/cm²~1.0×10⁴ 세포/cm²는 20 ~ 40 % 컨플루언스, 3.0 × 10³ 세포/cm²~8.0×10³ 세포/cm²는 20 ~ 35 %의 컨플루언스에 해당한다.
- [0037] 따라서 평균 세포 밀도가 2.0 × 10⁴ 세포/cm² 이하의 MSC를 그 표면에 갖는 본 발명의 세포 시트는 세포 밀도가 60 % 컨플루언스 이하의 MSC는 그 표면에 갖는 세포 시트로 나타낼 수도 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 세포 시트는 세포 밀도가 10 ~ 60 %의 컨플루언스, 10 ~ 50 %의 컨플루언스, 10 ~ 40 %의 컨플루언스, 20 ~ 40 %의 컨플루언스, 20 ~ 35 %의 컨플루언스의 MSC가 그 표면에 있다.
- [0038] 세포 시트는 평균 세포 밀도가 3.0 × 10⁴ 세포/cm² 이하의 MSC를 그 표면에 갖는 것인 한, MSC 이외의 세포를 포함할 수 있다. MSC 이외의 세포는 MSC의 분리원인 조직에서 유래하는 세포도 좋고, 또한 MSC와의 병용에 의한 바람직한 효과를 기대하고 첨가된 세포여도 좋다. 후자의 세포는, 예를 들어 혈관 내피 세포, 섬유세포, 상피계 세포 등이며, 치료 대상 질환 및 이식이 예상되는 부위에 따라 적절히 선택된다.
- [0039] 본 발명의 세포 시트의 하나의 예는 MSC 자신이 생산하는 세포의 매트릭스 또는 배양시 배지에 첨가된 세포의 매트릭스를 통해 MSC가 서로 접촉하여 이루어지는 시트이다.
- [0040] 본 발명의 세포 시트의 다른 예는 또한 생체 적합성 지지체를 포함한 세포 시트이다. 이 예에서, 세포 시트는 세포의 매트릭스를 통해 서로 접촉한 MSC와 지지체를 조합한 것으로서도 좋고, 또는 시트상의 지지체의 표면에 MSC가 접촉하는 MSC 세포체의 일부분 또는 전체가 지지체의 표면에 오목부나 개구부에 묻히는 등 지지체와 MSC가 일체화 된 것이라도 된다. 본 발명에서 "MSC를 그 표면에 갖는" 세포 시트에는 MSC 세포체의 일부분 또는 전체가 지지체 표면의 오목부나 개구부에 묻히는 등의 상태에 있는 것도 그 일체형으로 포함된다. 이와 같이, 본 발명의 세포 시트는 MSC가 세포의 매트릭스를 통해 서로 접촉한 상태 또는 지지체와 일체화된 상태로 있는 것으로, 세포 배양을 위해 그 위에 MSC가 단순히 파종된 것에 불과한 배양 담체와는 구별된다.
- [0041] 본 발명의 세포 시트에 포함된 지지체는 생체 적합성 재료로 구성된 시트 모양의 것이면 좋고, 그 생체 내에 이식시 취급이 용이한 한, 그 형태, 크기나 두께에 제한은 없다. 생체 적합성 재료의 예로는 폴리 불화 에틸렌, 폴리스티렌 등의 고분자 화합물, 실리카 등의 무기 화합물, 생분해성 폴리머 등을 들 수 있으며, 생분해성 폴리머가 바람직하다. 생분해성 폴리머로는, 예를 들면 합성 고분자 재료로는 폴리 글리콜산, 폴리 젯산, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리 카프로락톤, 폴리디옥사논, 기타 젯산-글리콜산 공중합체 등의 상기 공중합체; 무기 재료로는 β인산 3칼슘, 탄산 칼슘 등; 천연 고분자 재료로는 콜라겐, 젤라틴, 알긴산, 히알루론산, 아가로오스, 키토산, 피프린, 피브로인, 키틴, 셀룰로오스, 실크 등을 들 수 있다.
- [0042] 본 발명의 세포 시트에 포함되는 지지체의 바람직한 예는 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 시트 형태의 세포 배양 담체이다. 특히 나노 미터 (nm) ~ 마이크로 미터 (μm) 단위의 평균 섬유 직경을 갖는 섬유로 이루어진 시트 형상의 3 차원 배양 담체가 바람직하다. 세포 배양 담체 또는 배양 담체는 세포 배양시에 사용되는 세포가 접촉하는 발판이 되는 담체이다. 또한 "평균 섬유 직경"은 배양 담체를 세포 접촉면의 측면에서, 일반적으로 위에서 관찰할 때 섬유의 길이 방향에 직교하는 방향의 길이로 측정되는 섬유 직경의 산술 평균값을 말한다. 또한, 특히 지정이 없는 한, 본 명세서에서 평균이란 수 평균을 의미한다. 또한 나노 미터 (nm) ~ 마이크로 미터 (μm) 단위의 평균 섬유 직경을 갖는 섬유로 이루어진 3 차원 배양 담체로서 당해 섬유에 의해 세포와 접촉하는 면 상에 형성된 개구부를 갖는 것도 본 발명에서 바람직한 지지체의 예이다. 여기에서 "개구부"는 상기 섬

유에 의해 형성되는 담체의 세포와의 접촉면 상에 존재하는 움푹 들어간 부분을 말한다.

- [0043] 개구부의 평균 직경은 섬유끼리 접하고 있는 경우는 배양 담체를 위에서 관찰할 때 인정되는, 섬유를 윤곽으로 한 도형의 지름의 평균값을 말한다. 도형의 지름이란 도형이 다각형인 경우에는 각 정점으로부터의 대각선 길이의 산술평균치에, 도형이 원형인 경우에는 그 직경에, 도형이 타원형 또는 그와 유사한 형상인 경우에는 그 장경에 상당한다.
- [0044] 또한 섬유끼리 접해 있지 않은 경우, 개구부의 평균 직경은 ASTM-F316에 규정된 방법에 의해 얻어지는 평균 유량 공경을 말하며, 이것은 예를 들어 플로미터(콜터사제 등)를 사용하여 민플로포인트법에 의해 측정할 수 있다.
- [0045] 3 차원 배양 담체를 구성하는 섬유의 평균 섬유 직경은 nm ~ μm 단위의 범위 내에서, 바람직하게는 10nm ~ 500 μm , 보다 바람직하게는 10nm ~ 300 μm 의 범위 내에 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 평균 섬유 직경은, 예를 들어 10nm ~ 1 μm , 100nm ~ 1 μm , 500nm ~ 1 μm , 1 μm ~ 10 μm , 1 μm ~ 100 μm , 1 μm ~ 300 μm 또는 1 μm ~ 500 μm 의 범위 내에서, 바람직하게는 10nm ~ 1 μm , 1 μm ~ 10 μm 또는 10 μm ~ 300 μm 중 하나의 범위 내에 있으면 좋다. 본 발명은 일반적으로 나노 섬유라는 섬유를 사용할 수도 있다.
- [0046] 세포의 접촉면 상에 개구부를 갖는 3 차원 배양 담체에서 개구부의 평균 직경은 500nm ~ 1000 μm 이면 되고, 바람직하게는 700nm ~ 600 μm , 보다 바람직하게는 900nm ~ 400 μm 의 범위 내에 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 개구부의 평균 직경은, 예를 들어 500nm ~ 100 μm , 5 μm ~ 100 μm , 10 μm ~ 100 μm , 20 μm ~ 100 μm , 100 μm ~ 200 μm , 100 μm ~ 400 μm , 100 μm ~ 600 μm 의 범위 내에서, 바람직하게는 500nm ~ 100 μm 또는 100 μm ~ 400 μm 의 범위 내에 있으면 좋다.
- [0047] 특정 실시예에서, 3 차원 배양 담체는 60 % 이상, 바람직하게는 70 % 이상, 보다 바람직하게는 75 % 이상, 특히 바람직하게는 80 % 이상의 공극율을 갖는다.
- [0048] 다른 실시예에서, 3 차원 배양 담체의 개구부의 평균 면적은 0.1 ~ 100 μm^2 , 바람직하게는 0.2 ~ 60 μm^2 더 바람직하게는 0.5 ~ 30 μm^2 이다. 개구부가 구멍일 경우, 개구부 면적은 구멍 면적에 상당한다.
- [0049] 3 차원 배양 담체는 섬유가 3 차원적으로 집적된, 즉 섬유가 3 차원 방향으로 겹겹이 쌓인 구조를 가지는 것이며, 섬유의 배치가 규칙적이든 아니든 좋고 섬유끼리 결합되어 있거나 결합되어 있지 않아도 좋다.
- [0050] 3 차원 배양 담체는 세포 접촉면에 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 것이면 좋고, 세포와 접촉하지 않는 부분, 일반적으로 섬유로 이루어진 3 차원 구조 아래에 베이스가 되는 부재를 가지고 있어도 좋다. 베이스 부재는 상기 3 차원 구조를 유지할 수 있는 것이면 어떤 구조도 좋고, 예를 들면, 부직포, 편물, 직물, 다공성 발판 재료 등 일 수 있다. 또한 지지체로 사용되는 3 차원 배양 담체는 생체 적합성 재료로 구성된 시트 모양의 것이면 좋고, 세포 배양 및 그에 따른 생체 내에 이식시 취급이 용이한 한, 그 형태, 크기와 두께에 제한은 없지만, 예를 들면 세포 배양 용기와 일체로 성형되어 있는 것 등의 생체 이식에 이용할 수 없는 형태의 것을 포함하지 않는다.
- [0051] 3 차원 배양 담체의 세포 접촉면은 그 주된 부분이 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 부분이면 되고, 구체적으로는 배양 담체를 세포 접촉면의 측면에서 일반적으로 위에서 관찰한 때의 배양 담체의 면적의 50 % 이상이 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 부분이 차지하고 있으면 된다. 따라서 3 차원 배양 담체는 세포 접촉면의 일부에 '섬유로 이루어진 3 차원 구조'가 아닌 부분, 예를 들어 3 차원 구조를 가지지 않는 평탄한 막 모양의 부분 등을 접촉면에 있어서 당해 부분의 면적이 50 %에 미치지 않는 범위에서, 바람직하게는 40 % 미만의 범위에서, 더욱 바람직하게는 30 % 미만의 범위에서 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 사용 가능한 3 차원 배양 담체의 예로는 베셀 주식회사의 VECCELL (등록상표) (폴리 테트라 플루오로 에틸렌, 평균 섬유 직경 : <1 μm 평균 구멍 크기 : 1 ~ 20 μm^2 , 개구부의 평균 직경 : 20 ~ 100 μm , 공극률 : 80 ~ 90 %), 일본 바이린 주식회사의 Cellbed (등록상표) (고순도 실리카 섬유, 평균 섬유 직경 : 1 μm , 평균 유량 공경 : 7 ~ 8 μm , 공극률 : > 95 %), 3D Biotek의 3DInsert-PS 시리즈 (폴리스티렌 섬유, 평균 섬유 직경 : PS-200은 ~150 μm , PS-400은 ~ 300 μm , 개구부의 평균 직경 : PS-200은 200 μm , PS-400은 400 μm), 국제 공개 W02014/196549 호 팜플렛에 기재된 세포 배양기재, 국제 공개 W02016/068266 호 팜플렛 및 이에 대응하는 미국 출원인 미국 특허 출원 공개 US2017/319747 호 공보에 기재된 세포 배양기재 (생분해성 폴리머, 평균 섬유 직경 50nm ~ 5 μm), Liu L, Kamei K et al. Biomaterials 124 (2017) 47-54에 기재된 세포 배양기재 (폴

리 글리콜산, 평균 섬유 직경 : $345 \pm 91\text{nm}$, 평균 구멍 크기 : $0.68 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$, 평균 구멍 면적에서 산출되는 개구부 평균 직경 : $0.93 \mu\text{m} ((0.68 \mu\text{m}^2 / \pi)^{1/2}) \times 2$), 네오베르 및 네오베르나노 (폴리글리콜산, 군제 주식회사)와 같은 시판되는 조직 보강제 등을 들 수 있다. 위의 각 문헌은 참조에 의해 그 전체로서 본 명세서에 포함된다.

[0053] 본 발명의 세포 시트는 생체 내에서 질병이 발생하고 있는 부위, 발생할 우려가 있는 부위, 또는 질환의 원인이 되는 부위 또는 그 근방에 이식함으로써 생체에 국소 투여 할 수 있으며, 이를 통해 MSC를 이용한 세포 이식 요법이 효과적인 질환, 예를 들어 당뇨병 및 그 합병증, 뇌 혈관 질환, 뇌 변성 질환, 탈수초성 질환, 기능성 발작성 질환, 인지증성 질환(認知症性疾患), 말초 신경 질환, 심혈관 질환, 자가 면역 질환, 간 · 담도 · 췌장 질환, 위 · 십이지장 질환, 소장 · 대장 질환, 갑상선 질환, 혈액 · 조혈 질환, 폐 질환, 급성 신장 장애 및 만성 신장 질환, 안과 질환, 피부 질환, 근육 · 뼈 질환, 외상 및 GVHD (이식편대숙주병)을 치료 및/또는 예방할 수 있다. 세포 시트의 국소 투여에 의해 치료 및/또는 예방될 수 있는 질환으로는 구체적으로, 제 1 형 당뇨병과 제 2 형 당뇨병 및 그 합병증, 예를 들어 당뇨병성 신증, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신경 장애, 당뇨병성 괴저 등; 뇌졸중(뇌경색 및 뇌출혈) 등의 뇌 혈관 질환, 파킨슨 병, 헌팅턴 질환, 대뇌 기저핵 변성, 다계통위축증, 척수 소뇌 변성증, 근육 위축 측삭 경화증 같은 뇌 퇴행성 질환; 다발성 경화증, 급성 산재성 뇌척수염, 시신경 척수염 등의 탈수초성 질환; 간질이나 뇌성 마비 등의 기능성 발작성 질환; 혈관성 치매, 알츠하이머병, 레비소체형 치매, 전두측두형 치매, 당뇨병성 치매 등 치매성 질환; 길랑-바레 증후군, 말초 신경 장애, 안면신경 마비, 삼차 신경통, 배뇨 장애, 발기 장애, 자율 신경 실조증 등의 말초 신경 질환; 심근 경색, 협심증, 폐색성 동맥경화증, 심근증 등의 심혈관 질환; 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부 근염, 피부 경화증, 혼합성 결합 조직 질환, 류마티스 다발성 근육통, 호산구 증가증, 베체트 병, 사르코이도시스(sarcoidosis), Still 병, 척추 관절염, 가와사키 병 등의 자가 면역 질환; 급 · 만성 간염, 간경변, 자가 면역성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 급 · 만성 췌장염, 자가 면역성 췌장염 등의 간 · 담도 · 췌장 질환; 급성 · 만성 위염, 위 · 십이지장 궤양 등의 위 · 십이지장 질환; 크론 병, 궤양성 대장염, 허혈성 대장염, 과민성 대장 증후군 등의 소장 · 대장 질환; 바세도병, 급성 · 만성 갑상선염 등의 갑상선 질환; 자가 면역성 용혈성 빈혈, 진성 다혈증, 특발성 혈소판 감소성 자반증 등 혈액 · 조혈 장애; 만성 폐쇄성 폐 질환, 간질성 폐렴, 폐 섬유증, 진폐, 기관지 천식, 호산구성 폐렴, ARDS (급성 호흡 곤란 증후군) 등의 폐 질환; 체액량 감소나 허혈에 수분하는 급성 신장 장애, ANCA 관련 신염, 현미경적 다발혈관염, 다발혈관염성 육아종증, 호산구성다발혈관염성 육아종증, 악성 고혈압, 클리오글로불린혈증, 감염 후 사구체신염, IgA 신증, 급성 간질성 신염, 약제성신장해, 골수종 신장, 통풍신, 횡문근융해증, 급성 세뇨관 괴사 등의 급성 신장 손상; 막성신증, 막성 증식성 사구체 신장염, 미세변화형 신 증후군, 소장 사구체 경화증, 루푸스 신장염, 아밀로이드-시스, 신장 경화증, 자반병성 신장염, IgG4 관련 신장 질환, 쇼그렌 증후군, 강피증신장, 만성 간질성 신염, 다발성낭종신 등의 만성 신장 질환; 황반변성증, 시신경염, 포도막염 등의 안 질환; 아토피성 피부염, 수포성 질환, Stevens-Johnson 증후군 등 피부 질환; 중증 근무력증, 근위축증, 변형성 고관절증, 대퇴골두괴사, 골다공증, 수근관 증후군 등의 근육 · 골 질환; 척수 손상, 뇌좌상 등의 외상; 육창 등의 창상, 구강 내 궤양, GVHD (이식편대숙주병), 봉합 부전, 장기의 손상을 들 수 있다. 본 발명의 세포 시트가 적용되는 질환은 바람직하게는 당뇨병성 신증, 급성 신장 장애, 만성 신장 질환, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신경 장애, 당뇨병성 괴저, 알츠하이머 병, 당뇨병성 치매 류마티스 관절염, 다발성 근염과 창상이다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 치료 및/또는 예방은 질환 또는 증상의 치유, 일시적 관해, 예방 등을 목적으로 하는 의학적으로 허용되는 모든 유형의 치료적 및/또는 예방적 개입을 포함한다. 즉, 질환 또는 증상의 치료 및/또는 예방은 질병 또는 증상의 진행을 지연 또는 정지, 병변의 퇴축 또는 소실, 발병의 예방 또는 재발의 방지 등을 포함한 다양한 목적의 의학적으로 허용되는 개입을 포함한다.

[0055] 본 발명의 세포 시트는 그의 유효량이 대상에게 국소 투여된다. 여기에서 "유효량"은 질환을 치료 및/또는 예방하는데 효과적인 양을 의미한다. 소요 유효량은 질환의 종류, 국소 투여되는 장기 또는 조직, 증상의 중증도, 환자 및 기타 의학적 요인에 의해 적절하게 조절된다. 바람직한 실시예에서, 세포 시트의 유효량은 시트에 포함된 MSC 수로 환산하여 투여되는 개체의 체중 1kg 당 10^2 세포 ~ 10^9 세포, 바람직하게는 10^4 세포 ~ 10^6 세포이다.

[0056] 본 발명의 세포 시트의 바람직한 태양의 하나는 신장 질환의 치료에 이용하기 위한 평균 세포 밀도가 1.0×10^3 세포/cm² ~ 3.0×10^4 세포/cm², 바람직하게는 2.0×10^3 세포/cm² ~ 3.0×10^4 세포/cm², 보다 바람직하게는 $2.0 \times$

10^3 세포/cm²~ 2.0×10^4 세포/cm², 더욱 바람직하게는 2.0×10^3 세포/cm²~ 1.8×10^4 세포/cm², 더 더욱 바람직하게는 3.0×10^3 세포/cm²~ 1.6×10^4 세포/cm², 더욱 바람직하게는 3.0×10^3 세포/cm²~ 1.0×10^4 세포/cm², 특히 바람직하게는 3.0×10^3 세포/cm²~ 8.0×10^3 세포/cm²의 MSC를 그 표면에 갖는 세포 시트이다. 본 구체예에서, 세포 시트는 신장, 바람직하게는 신장의 섬유 피막 하에 부착하도록 이식되고, 그 때, 박리한 신장의 게로타 근막과 지방층을 신장 실질에서 가급적 멀리하는 것이 바람직하다. 세포 시트를 신장 질환 환자의 신장 이식함으로써 신장 질환과 이에 따른 증상의 진행을 억제 또는 방지하는 것, 나아가 이를 개선할 수 있다. 예를 들어 심한 만성 신장 질환, 특히 말기 신부전에 도달한 신장의 섬유 피막 하에 세포 시트를 이식함으로써 신장 장애의 진행을 억제하고 사망률을 감소시킬 수 있다.

[0057] 본 발명의 세포 시트의 바람직한 또 다른 측면은 뇌 손상 또는 신경 변성 질환의 치료에 이용하기 위한 평균 세포 밀도가 0.5×10^3 세포/cm²~ 1.5×10^4 세포/cm²인, 바람직하게는 1.0×10^3 세포/cm²~ 1.5×10^4 세포/cm²인, 더욱 바람직하게는 1.8×10^3 세포/cm²~ 0.5×10^4 세포/cm²인 MSC를 그 표면에 갖는 세포 시트이다. 본 구체 예에서, 세포 시트는 뇌 손상 부위, 변성 부위 또는 그 근방에 부착하도록 이식된다. 세포 시트를 뇌 손상 또는 신경 변성 질환 환자의 뇌에 이식함으로써, 뇌 손상, 신경 변성 질환 및 이에 따른 증상의 진행을 억제 또는 방지하고, 나아가 이를 개선할 수 있다. 예를 들면 신경 변성 질환의 변성 부위에 세포 시트를 이식함으로써 인지 기능을 개선할 수 있다.

[0058] 본 발명의 세포 시트는 기존의 MSC를 포함한 세포 시트와 달리, MSC의 평균 세포 밀도가 크게 낮다. 아래의 실시예에서 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체에서 MSC를 낮은 세포 밀도로 배양함으로써 개별 MSC의 치료 효과가 현저하게 증가되는 것을 발견하였다. 놀랍게도, 저밀도 배양된 MSC를 포함한 세포 시트는 기존의 MSC를 포함한 세포 시트보다 세포 수가 훨씬 적음에도 불구하고 시트 전체의 치료 효과는 기존의 세포 시트보다 높다.

[0059] 본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 세포 시트를 이를 필요로 하는 대상에게 국소 투여하는 것을 포함하는 MSC를 이용한 세포 이식 요법이 유효한 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법도 다른 형태로 포함한다. 본 실시예에서 각 용어의 의미는 위에서 설명한 바와 같다.

[0060] 세포 시트의 제조 방법

[0061] 본 발명의 세포 시트는 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체에 MSC, 예를 들면 질환이 있는 대상에서 분리된 MSC를 3.0×10^5 세포/cm² 이하의 세포 수로 과종하는 공정; 및 MSC를 배양하여 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하의 세포 시트를 제조하는 공정을 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 이 제조 방법은 본 발명의 또 다른 측면이다.

[0062] 용어 "대상" 및 "질환이 있는 대상에서 분리된 MSC"은 모두 특허 문헌 1 인 국제 공개 WO2015/137419 호 팜플렛 및 이에 대응하는 미국 출원인 미국 특허 출원 공개 US2017/0071984 호 공보에 기재된 각 용어와 같은 의미를 가지는 것으로 해석된다. 이 문헌은 참조에 의해 그 전체로서 본 명세서에 포함되지만, 이러한 문헌 및 본 명세서에서 각 용어의 의미를 간략히 다음과 같다.

[0063] "대상"은 MSC를 갖는 모든 동물을 의미하며, 바람직하게는 포유 동물의 개체, 예를 들어, 인간, 침팬지 등의 영장류, 마우스, 쥐, 기니피그, 햄스터 등의 설치류, 소, 염소, 양, 돼지 등 우제목, 말 등의 기제목, 토끼, 개, 고양이 등의 개체이며, 더욱 바람직하게는 인간 개체이다.

[0064] 본 발명에 있어서 세포 시트의 제조에 사용되는 MSC는 정상인 대상에서 분리된 MSC 이어도, 질환이 있는 대상에서 분리된 MSC 이어도 좋다. 또한, 본 발명에서 사용되는 MSC는 유도 만능 줄기 세포 (iPS 세포), 배아 줄기 세포 (ES 세포), 배아 종양 세포 (EC 세포), 배아 생식 줄기 세포 (EG 세포) 등의 다능성 줄기 세포에서 분화 유도하여 얻은 것이어도 된다.

[0065] 특허 문헌 1에 기재되어 있는 바와 같이, 어떤 종류의 질환을 가지고 있는 대상 및 노화한 대상의 MSC는 정상인의 MSC에 비해 치료 효과가 낮은 것으로 알려져 있으며, 이러한 대상으로 자기 MSC를 그대로 이식하여 높은 치료 효과는 기대할 수 없다. 한편, 본 발명의 제조 방법에 있어서 3 차원 배양 담체에서의 저밀도 배양하여 개별 MSC의 치료 효과를 높일 수 있기 때문에 이러한 치료 효과가 낮은 MSC를 원료로도 치료 효과가 높은 세포 시트를 제조할 수 있다. 치료 효과가 낮은 MSC를 갖는 대상이 앓고 있는 질환은 만성 질환이며, 그 예는 특허 문헌

1에 MSC가 이상화하는 질환으로 기재되어있다.

- [0066] MSC는 그의 이후 세포 이식 요법의 안전성을 고려하면 세포를 투여하는 개체와 동종 또는 근연 종의 개체에서 채취하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 인간의 개체에 세포 이식을 할 경우, 바람직하게는 동종인 사람에서 채취된 세포가, 보다 바람직하게는 투여를 받는 동일한 인간 개체에서 채취된 세포, 즉 자기 MSC가 사용된다.
- [0067] 본 발명에 있어서 세포 시트의 제조에 사용되는 MSC는 대상의 골수액, 지방 조직, 태아 부속 조직, 치수 등의 시료에서 일반적인 방법으로 채취할 수 있다. 예를 들어, 시료로서 골수액을 사용하는 경우, 밀도구배 원심법, 골수과중법 등의 공지의 방법에 의해 MSC를 분리하는 것이 가능하다. 본 발명의 바람직한 실시예 중 하나에서 MSC는 골수 또는 지방 조직 유래의 MSC이다.
- [0068] 본 발명의 제조 방법은 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체에 MSC를 3.0×10^5 세포/cm² 이하의 세포 수로 과중하는 공정을 포함한다. 본 공정은 일반적으로 세포 배양용 용기 내에 전술한 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 시트 형태의 세포 배양 담체를 두고 배지를 첨가하여 세포 배양 담체를 침지시키고, 그 위에 세포 수를 조절 한 MSC를 과중함으로써 실시할 수 있다.
- [0069] 세포 배양 용기의 밑면은 3 차원 배양 담체를 펼친 상태로 배치할 수 있는 정도의 크기이면 좋지만, 3 차원 배양 담체를 펼친 상태로 둘 때 3 차원 배양 담체로 덮이지 않는 부분이 적은 것이 바람직하다. 특정 실시예에서, 세포 배양 용기의 바닥은 3 차원 배양 담체와 같은 모양이거나 또는 3 차원 배양 담체가 내접하는 형상이다.
- [0070] 과중되는 MSC의 세포 수는 제조되는 세포 시트의 평균 세포 밀도에 따라 적절하게 조절된다. 일반적으로 과중되는 MSC의 세포 수는 제조되는 세포 시트 평균 세포 밀도의 10 배량에서 1/10 배량의 범위이면 되고, 10 배량에서 1 배량의 범위가 바람직하다. 예를 들어 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm²의 세포 시트를 제조하는 경우 과중되는 MSC의 세포 수는 3.0×10^5 세포/cm²~ 3.0×10^3 세포/cm²이다. 또한 평균 세포 밀도가 2.0×10^4 세포/cm²의 세포 시트를 제조하는 경우 과중되는 MSC의 세포 수는 2.0×10^5 세포/cm²~ 2.0×10^3 세포/cm²이며, 이는 평균 세포 밀도가 1.0×10^4 세포/cm²의 세포 시트를 제조하는 경우 과중되는 MSC의 세포 수는 1.0×10^5 세포/cm²~ 1.0×10^3 세포/cm²이며, 이는 평균 세포 밀도가 5.0×10^3 세포/cm²의 세포 시트를 제조하는 경우 과중되는 MSC의 세포 수는 5.0×10^4 세포/cm²~ 5.0×10^2 세포/cm²이며, 이는 평균 세포 밀도가 1.0×10^3 세포/cm²의 세포 시트를 제조하는 경우 과중되는 MSC의 세포 수는 1.0×10^4 세포/cm²~ 1.0×10^2 세포/cm²이며, 이는 평균 세포 밀도가 0.5×10^3 세포/cm²의 세포 시트를 제조하는 경우 과중되는 MSC의 세포 수는 0.5×10^4 세포/cm²~ 0.5×10^2 세포/cm²이다.
- [0071] 또한, 상기의 과중 세포 수는 3 차원 배양 담체의 면적 당 수치이며, 실제 과중 세포 수는 세포 배양 용기의 바닥 면적을 3 차원 배양 담체의 면적으로 나누어 산출되는 값을 곱함으로써 산출된다.
- [0072] 배지는 MSC 배양에 통상적으로 사용되는 배지, 예를 들면 α -MEM, DMEM 등을 이용할 수 있다. 이 매체는 MSC의 증식에 필요한 각종 성분, 예를 들면 혈청 성분 등을 함유해도 좋다.
- [0073] 본 발명의 제조 방법은 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 배양 담체에서 MSC를 배양하여 평균 세포 밀도가 3.0×10^4 세포/cm² 이하의 세포 시트를 제조하는 공정을 포함한다.
- [0074] 3 차원 배양 담체에서의 MSC의 배양은 24 시간 ~ 144 시간, 바람직하게는 24 시간 ~ 96 시간, 보다 바람직하게는 48 ~ 96 시간 진행된다. 배양 공정에서 배양 온도 및 가스 농도는 MSC 배양에 통상적으로 사용 온도 및 가스 농도의 범위 내이면 좋고, 온도는 예를 들어 25 °C ~ 37 °C, 바람직하게는 30 °C ~ 37 °C, 보다 바람직하게는 37 °C이며, 산소 농도는 예를 들어 2 % ~ 30 %, 바람직하게는 2 % ~ 20 %이다. 배양 담체에 과중되는 세포 수를 상기 범위로 조절하고 배양 시간 및 온도 등의 배양 조건을 필요에 따라 조절함으로써 원하는 평균 세포 밀도를 가지는 세포 시트를 제조할 수 있다.
- [0075] 상기의 방법으로 제조된 세포 시트는 3 차원 배양 담체를 지지체로 포함한 상태로 사용해도 되고, 3 차원 배양 담체에서 박리 가능한 경우에는 떼어내 사용하여도 좋고, 또는 3 차원 배양 담체에서 떼어낸 후, 필요에 따라 다른 지지체와 함께 사용해도 된다. 세포 시트를 박리하는 것이 가능한 배양 담체로는, 예를 들면 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드) 기타, 온도, pH, 빛 등의 자극에 의해 분자 구조가 변화하는 고분자로 표면을 피복한 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체를 들 수 있다.

- [0076] 세포 시트가 지지체를 포함하지 않는 경우, 즉 MSC가 서로 접촉되는 세포 시트의 경우 배양 담체는 시트 형태일 필요는 없다. 이 경우, 3 차원 배양 담체는 배양시 세포가 섬유로 이루어진 3 차원 구조에 접촉할 수 있는 것인 한 형상에 제한은 없다. 3 차원 배양 담체는 세포 배양 용기 내에 설치되어 사용되는 인서트 모양의 형상이어도 좋고, 또는 세포 배양 용기의 내면, 예를 들어 웰의 밑면 등에 섬유로 이루어진 3 차원 구조가 일체적으로 성형된 형상이어도 좋다.
- [0077] 세포 시트의 MSC는 미분화 상태로 유지하여도 좋고, 또는 원하는 세포로 분화시킬 수 있다. MSC의 미분화 상태의 유지는 미분화 상태의 유지에 적합한 배지, 예를 들면 HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (써모 피셔 사이언 티픽), MesenCult (상표) MSC Basal Medium (STEMCELL Technology), Stromal Cellutions (상표) Media (DV Biologics), MSC 전용 배지 kit (MSCGM BulletKit, Lonza) 등을 이용하여 MSC를 배양함으로써 할 수 있다. 또한 MSC의 분화는 원하는 세포로의 분화 유도 작용을 가지는 요소를 더한 분화 유도 배지에서의 배양 등의 일반적으로 알려진 방법으로 할 수 있다. 예를 들어, 조골 세포로의 분화에서는 Bone Morphogenetic Proteins (BMP) 4, BMP2 등이, 지방 세포로의 분화에 있어서는 텍사메타손, 3-이소부틸-1-메틸 크산틴, 인슐린 등이 분화 유도 인자로 사용된다.
- [0078] 제조 방법의 활성화제의 이용
- [0079] 제조되는 세포 시트의 치료 효과를 더 높이기 위해, 본 발명의 제조 방법에 있어서, 포유 동물의 태아 부속물의 추출물을 유효 성분으로 하는 활성화제를 포함하는 배지를 이용하여 MSC의 배양을 실시하는 것이 바람직하다.
- [0080] 본 발명에서 사용 가능한 "포유 동물의 태아 부속물의 추출물"의 하나의 예는 참조에 의해 그 전체로서 본 명세서에 포함되는 특허 문헌 1인 국제 공개 WO2015/137419호 팜플렛 및 이에 대응하는 미국 출원인 미국 특허 출원 공개 US2017/0071984호 공보에 기재된 추출물이다. 이 추출물은 포유 동물, 바람직하게는 인간의 태아 배출 후 후산으로 모체로부터 배출되거나 또는 제왕 절개에 의해 모체로부터 적출된 태아 부속물, 바람직하게는 제대 조직, 태반 조직 또는 난막을 그대로 또는 절단 또는 과쇄하여 증류수, 생리식염수, 인산완충식염수, 세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지 등의 추출 매체 속에 침지시키는 등의 방법으로 제조된 추출물이다. 추출물은 특히 기증자인 포유 동물 유래의 증식 능력을 갖는 세포를 포함하지 않는 것이 바람직하다. 구체적인 추출 조작 및 조건은 특허 문헌 1에 기재된 조작 및 조건에 따르게 된다.
- [0081] 또한 "포유 동물의 태아 부속물의 추출물"의 또 다른 예는 태아 부속물, 일반적으로 태반에서 생리 활성 물질을 제조할 때 당업자가 통상적으로 사용하는 처리, 예를 들어 산이나 효소를 이용한 가수 분해 등의 처리를 태아 부속물에 실시함으로써 제조되는 것이며 얻는다. 이러한 추출물의 예는 메루스몬 제약 회사에서 판매되고있는 인간 태반 산 가수 분해물인 태반 제제 "메루스몬", 주식회사 일본생물제제에서 판매되고있는 인간 태반 제제 "라엔넛쿠", 기타 시판 태반 제제와 플라센타 추출물이라 불리는 다양한 시판품이다.
- [0082] 본 발명에서 "포유 동물의 태아 부속물로부터의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 활성화제"는 위의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 MSC의 치료 효과를 증대시키기 위한 물질을 말하며, 이하 이것을 "활성화제"로 나타낸다.
- [0083] 배양에 사용되는 배지 중의 활성화제의 농도는 단백질 변환 최종 농도에서 0.01 µg/mL ~ 500 µg/mL이면 충분하지만, 바람직하게는 0.02 µg/mL ~ 300 µg/mL, 보다 바람직하게는 0.04 µg/mL ~ 100 µg/mL이며, 특정 실시예에서 0.05 µg/mL ~ 10 µg/mL 일 수 있다.
- [0084] 다음의 실시예에 따라 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명은 이러한 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0085] **[실시예]**
- [0086] **참고예 1 3 차원 배양 담체 상, 활성화제 존재 하에서의 MSC 배양**
- [0087] **1) 활성화제의 준비**
- [0088] 특허 문헌 1의 기재에 따라 인간 태반 조직에서 활성화제를 제조하였다. 간결하게는, 세절된 인간 태반 조직을 습 중량 50g에 대하여, 100mL의 비율로 무혈청 배지 (alpha-MEM)에 넣고 4 °C에서 72 시간 동안 진탕했다. 원심 분리하여 상층액을 회수하여 태반 조직 추출물인 활성화제를 얻었다.
- [0089] **2) MSC의 배양**
- [0090] 변형성 고관절증 환자의 인공 관절 치환술 시 채취한 골수 유래 MSC (OA-MSC)를 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지 (15 % FBS, 1 % 페니실린, 1 % 스트렙토마이신, 4500mg/L 포도당 및 L- 글루타민을 함유하는 DMEM)

에서 배양하였다. 세포를 회수하여 각각 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 갖는 세포 배양 담체인 Preset VECCELL 6well (등록상표) (베델 주)에 8×10^4 세포/well, Cellbed 24well (등록상표) (일본 바이린 주식 회사)에 2×10^4 세포/well, 3D-insert PS-200 12well 및 3D-insert PS-400 12well (3DBiotek 사)에 3.8×10^4 세포/well을 파종하고, 또한 비교예의 배양 담체인 세포 배양기재 A (평균 섬유 직경 0.1 ~ 0.5 μm , 공극률 70 % 이하, 평균 구멍 면적 0.2 μm^2 , 24well)에 2×10^4 세포/well을 파종하고, 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지를 이용하여 37 °C에서 72 시간 배양 하였다. 기재 A는 그 일부에 섬유로 이루어진 3 차원 구조를 가지고 있지만, 3 차원 구조가 없는 평탄한 막 모양의 부분이 세포 접촉면의 약 50 %를 차지하는 기재이다. 배지를 제거한 후 단백질 환산으로 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 상기 활성화제를 포함하거나 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지를, 각각 Preset VECCELL 6well에 2mL, Cellbed 24well 및 기재 A에 0.6mL, 3D-insert PS-200 12well 및 3D-insert PS-400 12well에 1mL를 가하여 37 °C에서 4 일간 배양하였다. 이 배양을 1 ~ 3 회 실시한 후, 세포를 회수하여 계대수 1 ~ 3의 OA-MSC를 준비했다.

[0091] 또한 평판 모양의 2 차원 세포 배양 담체 인 Corning (등록상표) Costar (등록상표) 세포 배양 6well 플레이트 (Thermo Fisher Science 사)에 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지에서 배양한 OA-MSC 6×10^4 세포/well 을 파종하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 활성화제의 존재 하에서 배양 하였다. 이 배양을 1 회 더 반복하여 계대수 2의 대조 OA-MSC를 준비했다.

[0092] **실시예 1 세포 시트의 제조**

[0093] 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지 (15 % FBS, 1 % 페니실린, 1 % 스트렙토마이신, 4500mg/L 포도당과 L-글루타민을 함유하는 DMEM)에서 OA-MSC를 배양하였다. 세포를 회수하고 2 차원 배양 담체 (Corning (등록상표) Costar (등록상표) 세포 배양 6well 플레이트, Thermo Fisher Science 사)에 2.5cm \times 2.5cm의 세포 배양기재 B를 넣고 8×10^4 세포의 MSC를 파종하여 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 활성화제를 포함하는 MSC 배양 배지 2mL를 가하여 37 °C에서 72 시간 배양함으로써, 계대수 1의 OA-MSC의 시트를 제조하였다. 이 방법으로 제조된 MSC 시트는 대략 8,500 세포/ cm^2 의 MSC를 포함한다. 또한 세포 배양기재 B는 국제 공개 WO2016/068266 호 팜플렛 및 Liu L, Kamei K et al. Biomaterials 124 (2017) 47-54에 기재된 방법으로 제조된 폴리글리콜산으로 이루어진 베이스 부재에 폴리글리콜산으로 이루어진 나노 섬유를 함유하는 3 차원 배양 담체이다.

[0094] **실시예 2 MSC 유전자 발현 분석**

[0095] 참고예 1 및 실시예 1에서 제조한 MSC를 회수하고 Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 역전사 반응에 의해 clone DNA를 합성하고 OCT4, Nanog, SOX2, DNMT1, TERT, IL-6, IDO, TSG-6, p16ink4a, p21, p53, α -SMA 및 18sRNA은 표 1에 나타낸 염기 서열 로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 실시간 PCR을 실시했다.

[0096] 표 중의 (F)는 포워드 프라이머 (R) 리버스 프라이머를 의미한다.

[0097] [표 1]

유전자	핵산서열	서열번호
OCT4(F)	GACAGGGGAGGGGAGGAG	1
OCT4(R)	CTTCCCTCCAACCAGTTGCC	2
NANOG(F)	TGGACACTGGCTGAATCCTTC	3
NANOG(R)	CGTTGATTAGGCTCCAACCAT	4
SOX2(F)	GGGAAATGGGAGGGGTGCAA	5
SOX2(R)	TTGCGTGAGTGTGGATGGGA	6
DNMT1(F)	CGTAAAGAAGAATTATCCGAGG	7
DNMT1(R)	GTTTTCTAGACGTCCATTAC	8
TERT(F)	CGGAAGAGTGTCTGGAGC	9
TERT(R)	GGATGAAGCGGAGTCTGGA	10
IL-6(F)	GATGAGTACAAAAGTCTGATCCA	11
IL-6(R)	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	12
IDO(F)	GCATTTTTCAGTGTCTTCGCATA	13
IDO(R)	TCATACACCAGACCGTCTGATAGC	14
TSG-6(F)	CCCATTGTGAAGCCAGGGCCCAACTG	15
TSG-6(R)	GGAAGCTCATCTCCACAGTATCTTCCC	16
P16INK4a(F)	AGCATGGAGCCTTCGGCTGA	17
P16INK4a(R)	CCATCATCATGACCTGGATCG	18
P21(F)	GAGACTCTCAGGGTCGAAAA	19
P21(R)	TTAGGGCTTCCTCTTGGAGA	20
TP53(F)	TGACTGTACCACCATCCACTA	21
TP53(R)	AAACACGCACCTCAAAGC	22
alpha-SMA(F)	GCAGCCCAGCCAAGCACTGT	23
alpha-SMA(R)	TGGGAGCATCGTCCCCAGCA	24
RNA18S(F)	ATCGGGGATTGCAATTATTC	25
RNA18S(R)	CTCACTAAACCATCCAATCG	26

[0098]

[0099]

18sRNA를 하우스키핑 유전자로 하여 2 차원 배양 담체 상에서 100 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 대조 OA-MSC를 바탕으로 ΔΔCT값을 산출하고, 유전자 발현 프로파일을 분석하여 클러스터 화했다. Preset VECELL에서 0.1 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 OA-MSC (VECELL_0.1) Cellbed에서 0.1, 1 또는 10 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 OA-MSC (각각 CellBed_0.1, CellBed_1, CellBed_10), 3D-insert PS-200에 0.1 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 OA-MSC (3D.insert200_0.1), 3D- insert PS-400에서 10 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 OA-MSC (3D.insert400_10), 기재 A에서 0.1 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 OA-MSC (A_0.1), 기재 A에서 1 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 OA-MSC (A_1), 기재 B에서 0.1 µg/mL의 활성화제의 면전에서 배양한 OA-MSC (B_0.1) 및 2 차원 배양 담체에서 100 µg/mL의 활성화제의 존재 하에서 배양한 대조 OA-MSC (2D_100)의 결과를 도 1에 나타낸다.

[0100]

2D_100과 비교하여 3 차원 배양 담체에서 활성화제 존재 하에서 배양 된 OA-MSC는 모두 줄기 세포성에 관여하는 유전자로 알려진 DNMT1, Nanog, SOX2 및 OCT4, 면역 제어·항염증 기능에 관여하는 유전자로 알려진 IDO, TSG6 및 IL-6, 텔로미아제 활성화에 관여하는 유전자로 여겨지는 TERT의 발현량이 증가하고 세포 노화에 관여하는 유전자로 알려진 P53, 세포 골격에 관여하는 유전자로 알려진 α-SMA의 발현량이 감소하고 있는 것으로 확인됐다. OCT4, SOX2, Nanog, DNMT1, IDO, TSG6, IL-6 및 TERT는 모두 치료효과가 높은 MSC에서 발현이 향진하는 마커이며, P53 및 α-SMA는 치료효과가 높은 MSC에서 발현이 억제되는 마커이다. 또한 p16ink4a는 본 발명자들이 찾아낸 OCT4, SOX2, Nanog, IDO 및 TSG6와 높은 상관관계를 보이는 치료 효과의 긍정적인 마커이다. 이러한 결과로 보아 어떤 3차원 배양담체에서 배양한 OA-MSC도 2차원 배양담체에서 배양한 OS-MSC보다 치료 효과가 높을 것으로 사료되었다. 한편, A_1 및 A_0.1은 2D_100과 유사한 유전자 발현 프로파일을 나타냈으며, 기재 A에서 배양한 OA-MSC의 치료 효과는 통상적인 2차원 배양담체에서 배양한 OA-MSC와 비슷할 것으로 추측되었다.

[0101]

실시예 3 세포 시트의 신장병 치료 효과 (급성 신장 손상을 병발한 당뇨병성 신증)

[0102]

당뇨병성 신증을 앓고있는 14 월령 수컷 OLETF 랫트 (호시노 시험 동물)에 리톡시맙 (중외제약) 5mg/마리를 1 일 1 회 4 일간 꼬리 정맥 투여하였다. 리톡시맙 초회 투여 후 10 ~ 14 일 후, 리톡시맙을 투여한 랫트의 신장

에 실시예 1의 MSC 시트를 이식한 (MSC 시트 군, n = 6). 리튬시뮬 투여만을 한 군을 비히클로 하였다 (비히클 군, n = 7). 이소플루란 흡입 마취 하, 측와위 랫트의 최하위 갈비뼈 아래부터 피부를 절개하고 근층을 절개하여 한쪽 신장을 체외로 이끌어 냈다. 게로타 근막, 지방층 및 섬유 피막을 부신이 손상되지 않도록 조심스럽게 절개하여 신장 표면에서 떼어 신장 문부로 끌어 들였다. 2.5cm × 2.5cm의 MSC 시트 1 장과 1/3로 자른 동 MSC 시트 1 장을 신장 전체를 감싸듯이 부착했다. 다른 쪽 신장에도 마찬가지로 MSC 시트를 부착했다. MSC 시트 이식일, 이식 후 3 주와 6 주 시 랫트에서 혈액을 채취하여 효소법 (SRL)을 이용하여 혈청 크레아티닌을 측정했다.

[0103] 이식 후 11 주 생존해 있던 동물 (비히클 군, MSC 시트 군 모두 n = 2)의 혈청 크레아티닌의 추이를 도 2에 나타낸다. 비히클 군에서는 혈청 크레아티닌의 경시적인 상승이 인정되는 반면, MSC 시트 군에서는 혈청 크레아티닌 수치의 상승은 인정되지 않았다. 최근 6 주간의 신장 기능 유지는 인간에서 5 년간 투석 시작 지연에 해당하며, MSC 시트의 높은 치료 효과를 나타내고 있다. 또한 이식 후 11 주까지의 생존율을 나타내는 카플란 마이어 곡선을 도 3에 나타낸다. MSC 시트 군은 비히클 군에 비해 높은 생존율을 보였다.

[0104] 또한 이식 후 11 주 동물에서 적출한 신장 조직 절편을 만들고 PAS 염색 표본의 광학 현미경 관찰 및 전자 현미경 관찰을 실시했다. 비히클 군에서는 대부분의 사구체 경화가 확인되었으며 메산기움(mesangium) 세포 및 포도사이트(podocyte)의 이상이 관찰되었다 (도 4 좌측 상단, 도 5). 또한 세뇨관에서는 세뇨관 간질의 염증 세포 침윤, 세뇨관 상피 세포의 이상, 세뇨관 상피의 탈락, 기저막의 비후 등이 인정되었다 (도 4 좌측 하단, 도 6, 도 7). 한편, MSC 시트 군에서는 정상적인 사구체가 잔존하고 (도 4 우측 상단) 메산기움 세포 및 포도사이트가 정상화되었다 (도 8). 또한 세뇨관 상피 세포의 재생 상 (도 4 우측 하단 화살표), 미세 용모가 명료한 근위 세뇨관 상피, 세뇨관 간질의 염증 세포의 감소 (도 9)이 인정되는 등 치료를 나타내는 조직학적 소견이 확인되었다. 또한 MSC 시트 군에서는 신장 표면에 새로운 피막형 구조의 형성, 그 외측에 다수의 모세 혈관의 재생이 확인되었다 (도 10, 도 11).

[0105] 본 시험에서 사용한 랫트는 당뇨병성 신증에 항암제 치료로 급성 신장 손상을 유도할 수 있는 정도를 갖춘 심각한 만성 신장 질환을 발병하는 모델 동물이며, 신부전 제 4 기 (신부전기)에 해당하는 매우 심각한 말기 신장 장애를 보였다. 본 발명의 세포 시트는 이 같은 심각한 질병에 뛰어난 치료 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0106] 실시예 4 세포 시트의 신장병 치료 효과 (당뇨병성 신증)

[0107] 당뇨병성 신증을 앓고 있는 14 월령 수컷 OLETF 랫트 신장에 실시예 1에서 제조된 세포 시트를 실시예 3과 동일하게 하여 신장 섬유 피막 하에 이식하였다(n = 2/군). 배후 피부와 근막을 절개한 가짜 수술을 한 랫트를 Sham 군으로 하였다. MSC 시트 이식일, 이식 후 4 주 및 11 주 시 랫트에서 혈액을 채취하여 효소법 (SRL)을 이용하여 혈청 크레아티닌을, UV 법 (SRL)를 사용하여 요소 질소 (BUN)을 측정했다.

[0108] 혈청 크레아티닌 및 BUN의 추이를 도 12에 나타낸다. Sham 군에서는 혈청 크레아티닌 및 BUN의 경시적인 상승이 인정되는 반면, MSC 시트 군에서는 관찰되지 않았다. 본 발명의 시트는 급성 신장 장애를 동반하지 않는 당뇨병성 신증에서도 우수한 치료 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0109] 실시예 5 세포 시트의 신장병 치료 효과 (당뇨병성 신증)

[0110] 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지 (10 % FBS, 1 % 페니실린, 1 % 스트렙토 마이신, 4500mg/L 포도당과 L- 글루타민을 함유하는 DMEM)에서 OA-MSC를 배양하였다. 세포를 회수하고 2 차원 배양 담체 (Thermo Scientific (상표) Nunc (상표) Lab-Tek™, 8well, Thermo Fisher Science 사)에 1 × 0.8cm의 네오베루나노 (군제 주식회사)를 넣고 4 × 10³ 세포의 MSC를 파종하여 활성화제를 포함하지 않는 200 μL의 MSC 배지를 첨가하여 37 °C에서 24 시간 배양함으로써, 계대 1 OA-MSC 시트를 제조하였다. 이 방법으로 제조된 MSC 시트는 4781 세포/cm² (조제한 각 시트의 평균 세포 밀도 3923 ~ 5884 세포/cm²의 평균 값)의 MSC를 포함한다.

[0111] 당뇨병성 신증을 앓고 있는 16 주령의 웅성 KK-Ay 마우스의 두 신장에 게로타 근막, 지방층 및 섬유 피막을 부신이 손상되지 않도록 조심스럽게 절개하여 신장 표면에서 떼어 상기에서 제작한 MSC 시트를 신장 전체를 감싸듯이 부착하여 이식했다 (n = 12). 대조군으로, 미처치의 당뇨병성 신증을 앓고 있는 동일 주령의 KK-Ay (n = 9)을 마련했다. MSC 시트 이식 전과 이식 후 4 주 시에 마우스의 소변을 채취하고 면역 비타법 (오리엔탈 효모공업주식회사)를 이용하여 소변 알부민을, 효소법 (오리엔탈 효모공업주식회사)를 이용하여 소변 크레아티닌을 측정했다.

[0112] MSC 시트 이식 전과 MSC 시트 이식 후 4 주 시의 소변 중 알부민/크레아티닌 비율의 차이를 도 13에 나타낸다. 소변 중 알부민/크레아티닌 비는 미 처리 군에서는 증가하였으나, MSC 시트 군에서는 오히려 감소하는 경향이 나타났다. 본 실시예에서 사용된 세포 시트는 실시예 1에서 제조된 세포 시트보다 평균 세포 밀도가 낮음에도 불구하고 실시예 1에서 제조된 세포 시트뿐만 아니라 당뇨병성 신증에 우수한 치료 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0113] **실시예 6 세포 시트의 신장병 치료 효과 (허혈 재관류에 의한 급성 신장 장애)**

[0114] 1) 세포 시트의 제조

[0115] 실시예 1의 방법에 준하여 표 2에 나타내는 세포 수의 MSC를 2.5cm × 2.5cm의 기재 B에 파종하여 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지에서 배양하여 다른 평균 세포 밀도의 MSC를 갖는 세포 시트를 제조하였다.

[0116] [표 2]

세포 시트	파종세포수(/cm ²)	평균세포밀도수(/cm ²)	
A	80000	53612	고 (높음)
B	100000	47073	
C	35600	38247	
D	17800	17898	중 (중간)
E	6700	6619	
F	2222	2697	
G	777	981	저 (낮음)
H	8900	8581	-

[0117]

[0118] 세포 시트 A ~ G 상의 MSC를 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 염색하여 현미경 관찰을 실시했다 (도 14). MSC를 같은 배양 담체 상에서 컨플루언스에 도달할 때까지 배양했을 때의 세포 밀도를 100 %로 했을 때의 각 세포 시트의 % 컨플루언스를 측정된 결과, 시트 A ~ C가 90 % ~ 70 % 컨플루언스, D ~ F가 60 % ~ 10 % 컨플루언스, G가 10 % 미만 컨플루언스였다.

[0119] 2) 유전자 발현 분석

[0120] 실시예 2와 동일하게 하여 세포 시트 B, G 및 H의 MSC에서 OCT4, Nanog, p16ink4a 및 TERT의 발현량을 실시간 PCR로 측정하였다 (도 15). 평균 세포 밀도가 낮을수록 모든 유전자의 발현량이 많아 평균 세포 밀도가 낮은 세포 시트의 개별 MSC의 치료 효과는 평균 세포 밀도가 높은 세포 시트의 개별 MSC보다 높은 것으로 추정되었다.

[0121] 3) 허혈재관류에 의한 급성 신장 손상 모델 랫트의 이식 시험

[0122] 마취 하 5 주령의 웅성 SD 랫트에 복부 정중선 절개를 실시했다. 먼저 오른쪽 신장을 식별하고 오른쪽 신장 동맥을 혈관용 클램프로 차단했다. 차단 후 바로 상기 1)에서 제조한 세포 시트 A ~ G의 각각을, 실시예 3 과 동일하게 하여 신장 섬유 피막 하에 이식했다. 60 분의 차단 후 혈관 클램프를 열고 차단을 해제했다. 왼쪽 신장에 대해서도 상기 마찬가지로 왼쪽 신장 동맥을 차단하여 세포 시트를 이식하고 60 분간 차단 후 차단을 해제했다 (n = 1 또는 2/군). 또한 세포 시트를 이식하지 않고 게로타 근막, 지방층 및 섬유 피막을 신장 표면에서 떼어 신장 문부로 끌어당긴 군(Sham-신장 피막 처리 있음)와 끌어 당긴 후 원래대로 되돌린 군(Sham-신장 피막 처리 없음)을 마련했다.

[0123] 이식 후 10 일째까지의 각 랫트의 생존 기간과 세포 시트의 평균 세포 밀도와 관계도를 도 16에, 평균 세포 밀도 그룹 (고, 중, 저)마다의 생존율을 나타내는 카플란 마이어 곡선도를 도 17에 나타낸다. 평균 세포 밀도가 중간 정도인 시트 D ~ F를 이식한 랫트가 모든 이식 후 10 일째까지 생존했으나, 평균 세포 밀도가 높은 시트 A ~ C를 이식한 쥐 중 절반 및 평균 세포 밀도가 낮은 시트 G를 이식한 쥐는 모두 10 일까지 사망했다. MSC의 절대 수가 많은 시트 A ~ C의 위 결과는 개별 MSC의 치료 효과가 낮은 것으로 추정된다. 또한 개별 MSC의 치료 효과가 가장 높은 것으로 추정되는 시트 G의 상기 결과는 치료 효과의 발휘에 필요한 세포의 절대 수가 부족하고 있기 때문으로 추정된다.

[0124] 또한 이식 후 10 일째까지 Sham-신장 피막 처리군과 Sham-신장 피막 무처리군의 생존율을 나타내는 카플란 마이어

어 곡선을 도 18에 나타낸다. Sham-신장 피막 처리군은 Sham-신장 피막 무처리군보다 생존율의 저하 속도가 작았기 때문에 게로타 근육, 지방층 및 섬유 피막을 신장 표면에서 떼어 신장 실질로부터 멀리하여 급성 신장 손상의 영향이 완화되는 것으로 확인되었다.

[0125] 실시예 7 세포 시트의 알츠하이머 병 치료 효과

[0126] 1) 세포 시트의 제조

[0127] 실시예 6의 1)의 방법에 준하여, 표 3에 나타낸 세포 수의 MSC를 2.5cm × 2.5cm의 기재 B에 파종하여 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지에서 배양하여 다른 평균 세포 밀도의 MSC를 갖는 세포 시트를 제조하였다.

[0128] [표 3]

세포 시트	파종세포수 (×10 ⁴ cells/cm ²)	평균세포밀도수 (×10 ⁴ cells/cm ²)
a	8.67	3.19
b	0.65	1.45
c	0.87	0.41
d	0.22	0.37
e	0.07	0.18

[0129]

[0130] 2) 알츠하이머 모델 마우스에 이식 시험

[0131] 15 월령의 옹성 APP/PS1 마우스 (찰스 리버)를 이소플루란 흡입 마취 하에, bregma level에서 lambda level까지 8mm × 5mm 크기의 개창부가 생기도록 개두하였다. 8mm × 5mm 크기로 자른 세포 시트를 개창부에서 각각 1장 너 표면에 붙여 5 분간 정치한 후 두개골을 다시 봉합했다.

[0132] 이식 후 3 주째에 신기한 물체 인식 시험을 실시했다. 신기한 물체 인식 시험의 내용은 다음과 같다. 0 일째에 아무것도 들어 있지 않은 상자에 마우스를 5 분간 넣어 환경에 적응시켰다. 1 일째에 2 개의 동일한 물체를 넣은 상자에 마우스를 5 분간 넣고(Familiarization), 1 시간 후 하나의 물질을 신기한 물체로 바꾸어 5 분에 신기한 물체 또는 기존 물질을 탐색하는 각 시간을 측정하였다. 두 물체의 총 탐색 시간에 대한 신기한 물체 탐색 시간의 비율 (Preference index; 신기/(신기 + 기존 물체 탐색 시간) × 100 %)을 산출하고, 50 % 이상을 인지 가능 양호로 하였다. 물체의 위치는 시험을 통해 동일한 위치에 설치했다.

[0133] 이식한 시트의 평균 세포 밀도에 따라 두 그룹으로 나누어 Preference index를 플롯 한 결과를 도19에 나타낸다. 1.50 × 10⁴ 세포/cm² 이하의 시트를 이식한 마우스에서는 Preference index가 높고 인지기능은 양호하다는 점에서 본 발명의 세포 시트가 알츠하이머에 대해서도 치료 효과를 나타낸다는 것이 확인되었다.

[0134] 실시예 8 마우스 지방 조직 유래 MSC를 이용한 세포 시트의 신장 질환에 대한 효과

[0135] 1) 세포 시트의 제조

[0136] C57BL/6 (수컷, 10 주령)의 부고환 주위 지방을 채취하여 잘게 다진 후 0.4PZ units/mL의 리베라제 (상표)와 PBS를 지방 1g 당 1mL 첨가하여 37 °C에서 2 시간 방치했다. 10 % FBS를 포함하는 DMEM 배지를 5mL 첨가하여 현탁 후 300g × 5 분 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 지방 1g에서 회수한 세포 펠렛을 15cm dish 1 장에 파종하여 10 % FBS, 1 % PS를 포함한 DMEM 배지에서 4 일간 배양 배지를 교환한 후 접촉 세포(마우스 지방 조직 유래 MSC)를 회수하였다.

[0137] 6 × 10⁴/cm², 3 × 10⁴/cm², 4 × 10³/cm²의 마우스 지방 조직 유래 MSC를 각각 1 × 0.8cm의 네오베루나노 (군제 주식회사)에 파종하여 활성화제를 포함하지 않는 MSC 배양 배지 2mL를 넣고 37 °C에서 24 시간 배양함으로써 배양 후 최종 세포 밀도 (평균 ± 표준 오차, DAPI 염색 세포 수)가 45480 ± 4953/cm², 27541 ± 5475/cm², 3800 ± 908/cm²의 계대수 1의 세포 시트를 작성했다. 각 세포 시트의 MSC를 DAPI 염색한 현미경 관찰 사진을 도 20에 나타낸다.

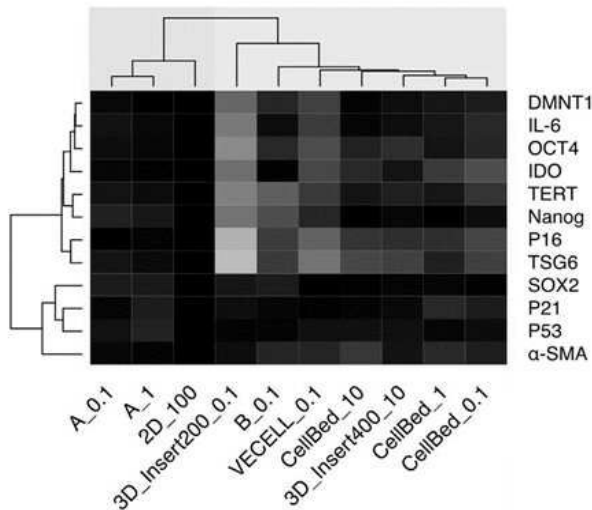
[0138] 2) 허혈재관류에 의한 급성 신장 손상 모델 쥐에 이식 시험

[0139] 마취 하 10-11 주령의 수컷 C57BL6 마우스 오른쪽 후배부에 절개를 넣고 오른쪽 신장을 노출시켰다. 오른쪽 신장 동맥 정맥을 결찰하고 오른쪽 신장 동맥 정맥을 절제하고 오른쪽 신장을 적출했다. 출혈이 없는 것을 확인하고 신장을 몸의 원래 위치로 되돌려 피부를 폐창시켰다. 다음 왼쪽 후배부에 절개를 넣어 왼쪽 신장을 노출시켜 왼쪽 신장 동맥 정맥을 비침습적 혈관용 클립으로 혈류를 차단했다. 22 분간 차단 동안 게로타 근막, 지방층 및 섬유 피막을 부신이 손상되지 않도록 조심스럽게 절개하여 신장 표면에서 떼어 신장 문부로 끌어 들었다. 45480 세포/cm²의 세포 시트 (n = 4), 27541 세포/cm²의 세포 시트 (n = 4) 또는 3800 세포/cm²의 세포 시트 (n = 3)을 신장 전체를 감싸도록 부착하고 왼쪽 신장 허혈 시작 22 분 후 클립을 제거하고 혈액을 채관류시켰다. 대조군으로서 세포 시트를 이식하지 않고 오른쪽 신장 적출 후 왼쪽 신장을 22 분 동안 허혈하고 재관류시킨 군 (Sham 군 : n = 3), 및 미처치의 정상 마우스 (n = 4)를 준비 했다.

[0140] 세포 시트 부착 후 24 시간 후에 마우스에서 혈액을 채취하여 UV 법 (SRL)를 사용하여 요소 질소 (BUN)을 측정 했다. 결과를 도 21에 나타낸다. 높은 세포 밀도 (45480 세포/cm²)의 세포 시트를 이식한 군의 BUN은 Sham 군과 비슷한 수준이며, 급성 신장 손상의 진행이 인정된 반면, 중간 세포 밀도 또는 낮은 세포 밀도 (27541 세포/cm², 3800 세포/cm²)의 세포 시트를 이식한 군의 BUN은 정상 마우스와 같은 정도였다. 이상에서 마우스 지방 조직 유래 MSC를 이용한 본 발명의 세포 시트는 인간 골수 유래 MSC를 이용한 본 발명의 세포 시트와 마찬가지로 급성 신장 손상의 진행을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

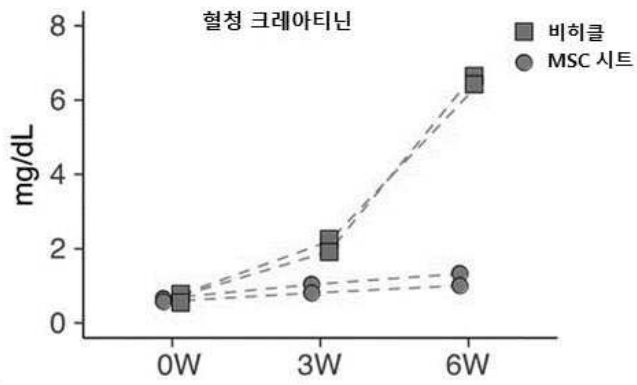
도면

도면1

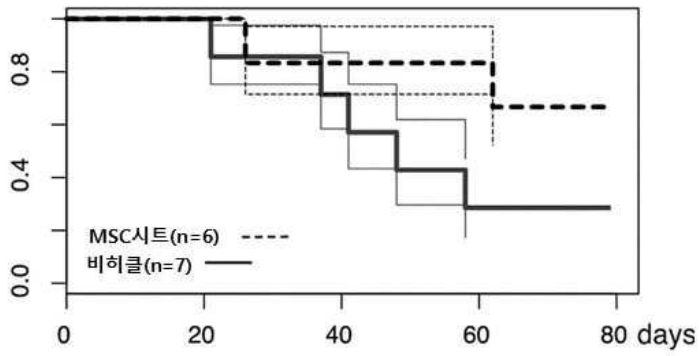


활성화제 없이 2D MSC를 1로 했을 때의 mRNA expression

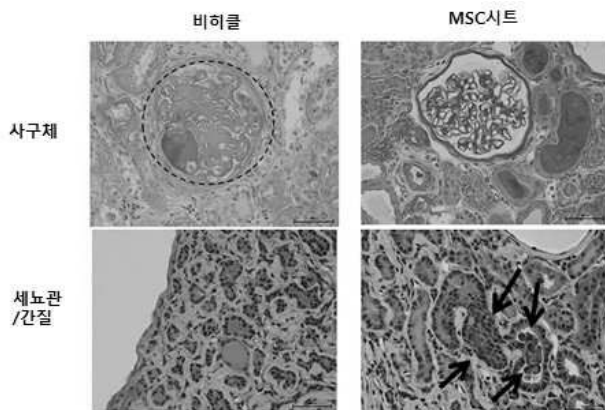
도면2



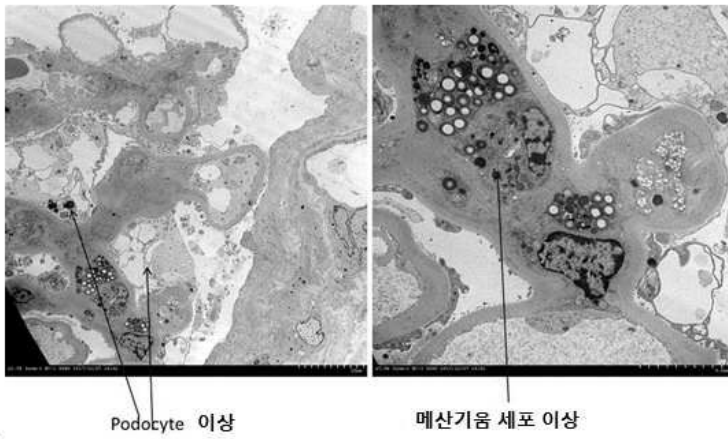
도면3



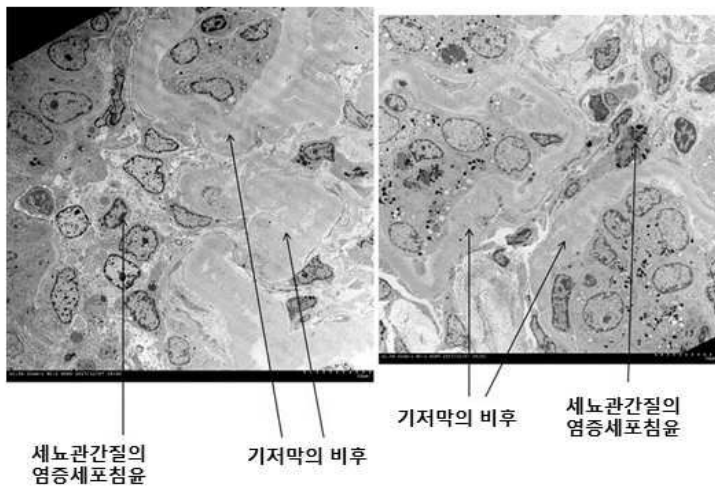
도면4



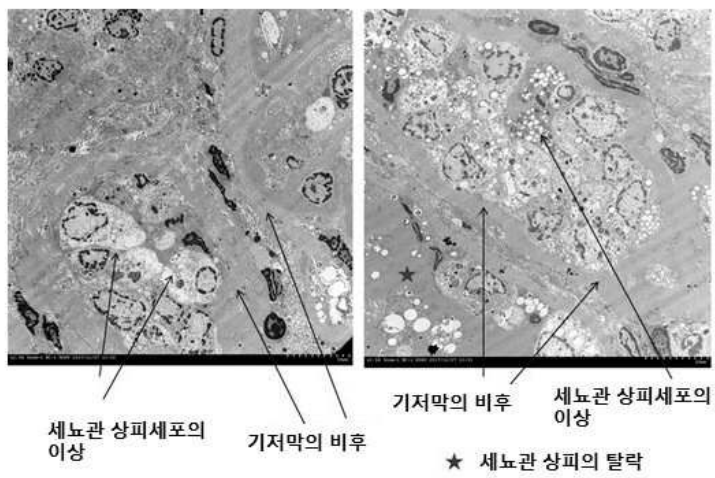
도면5



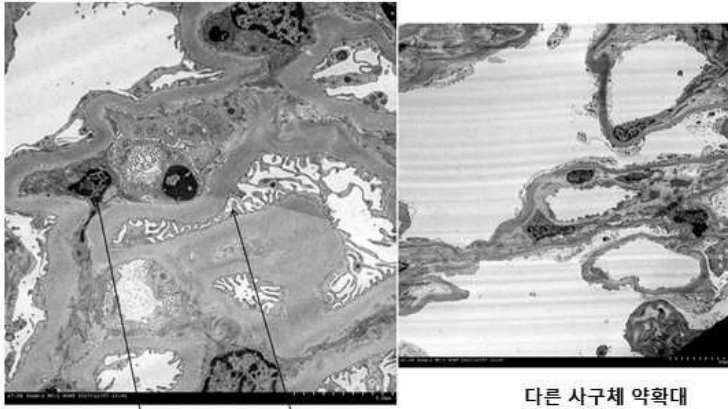
도면6



도면7



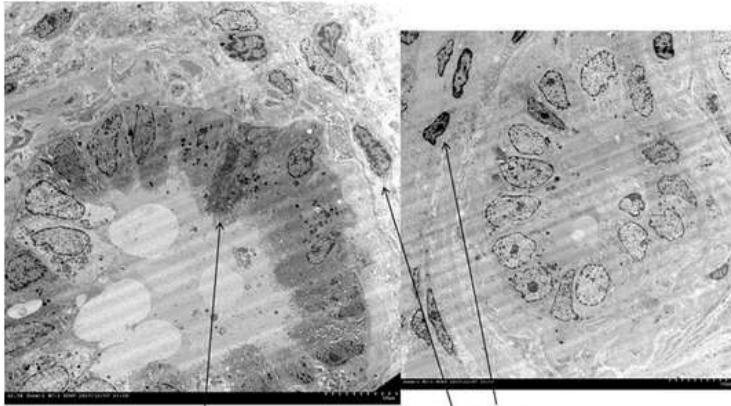
도면8



메산기음 세포가 정상화되고, Podocyte의 발이 단단하다

다른 사구체 약화대
거의 정상

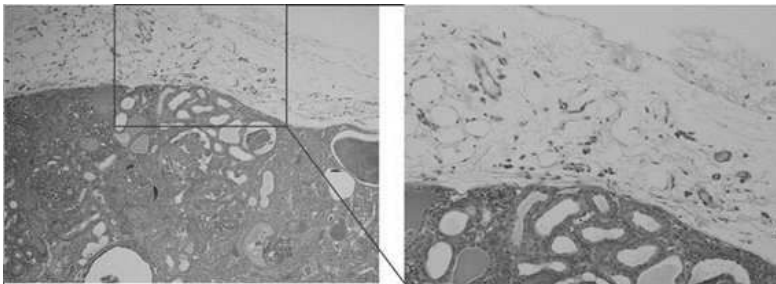
도면9



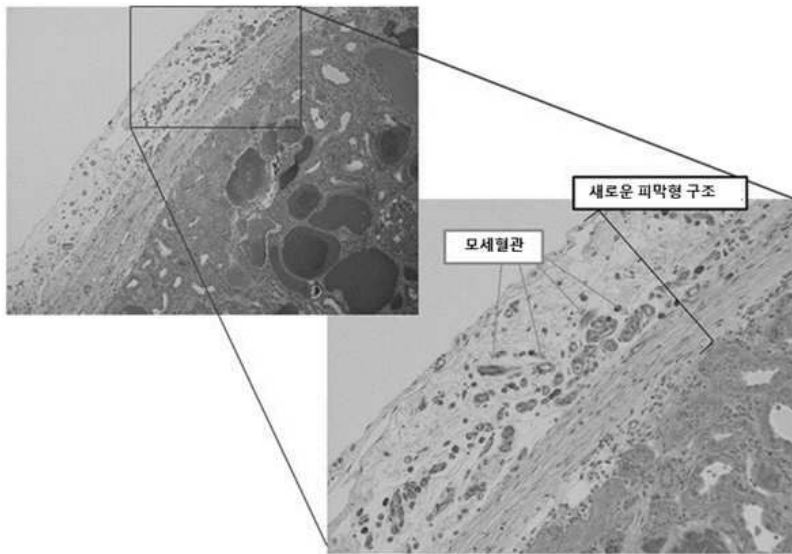
미세용모가 명료한 근위세뇨관 상피

세뇨관간질의 염증세포의 감소

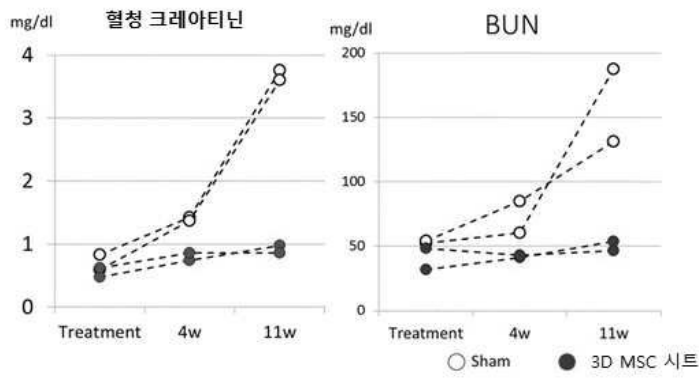
도면10



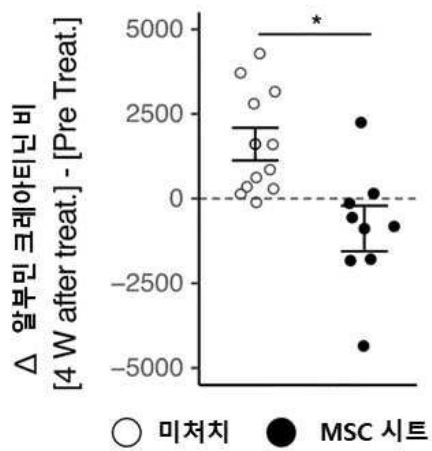
도면11



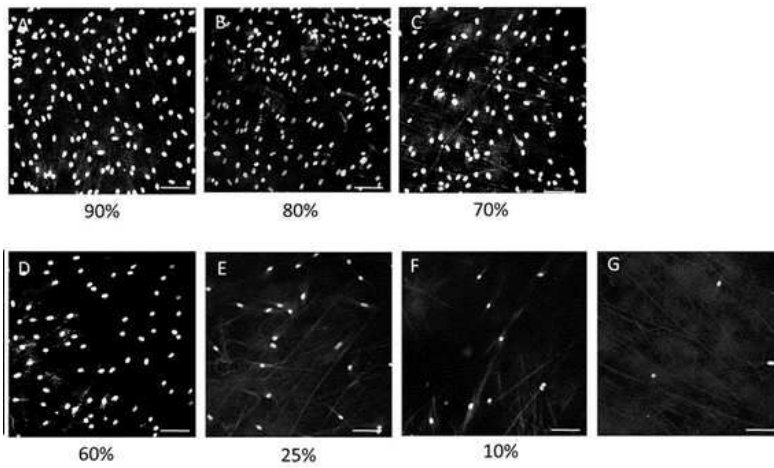
도면12



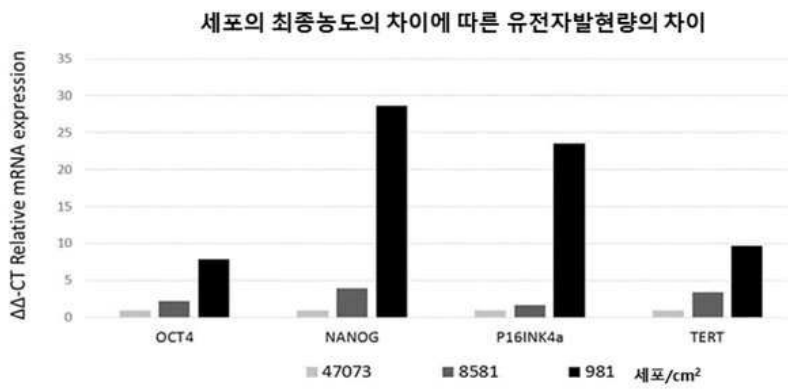
도면13



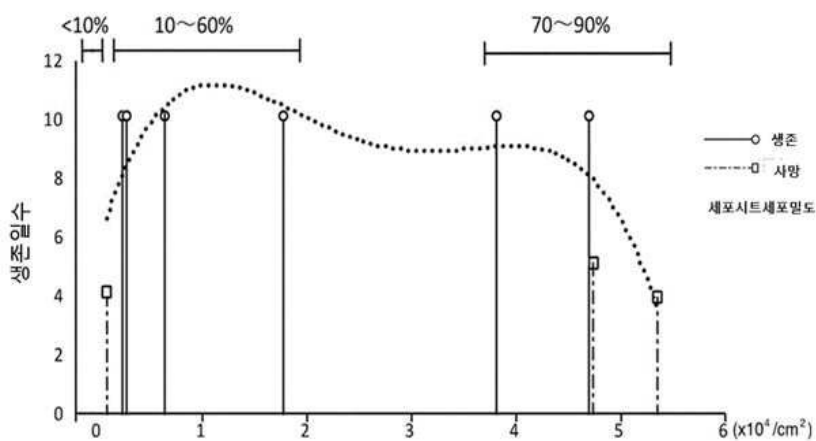
도면14



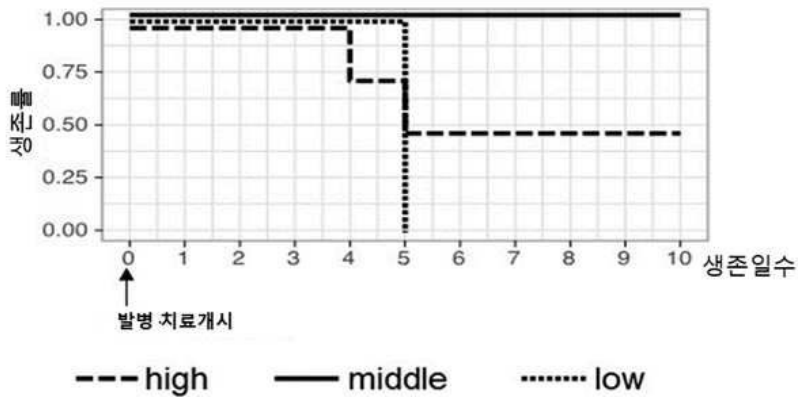
도면15



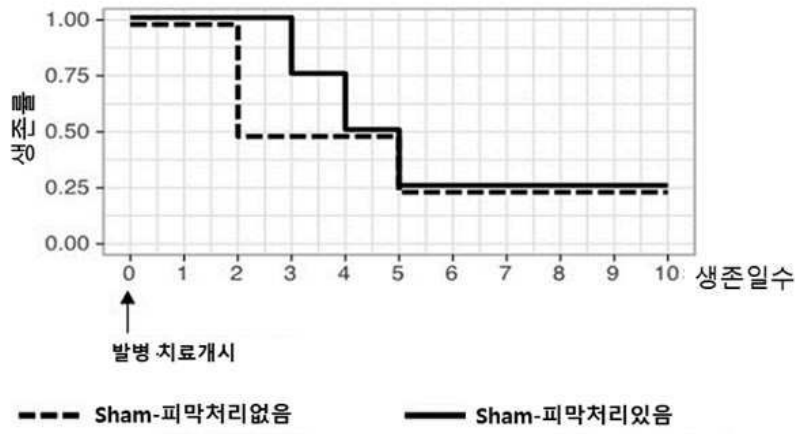
도면16



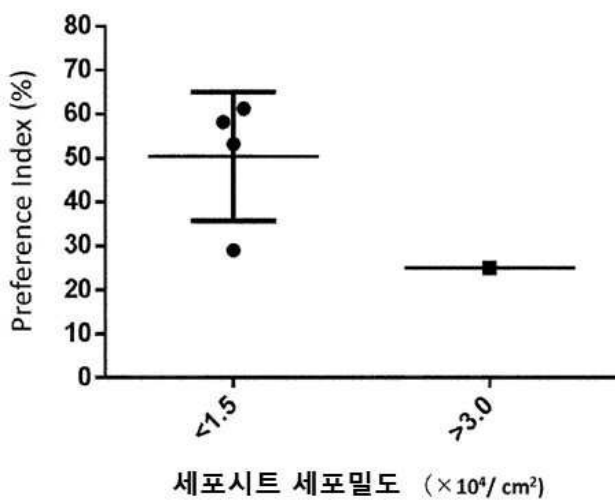
도면17



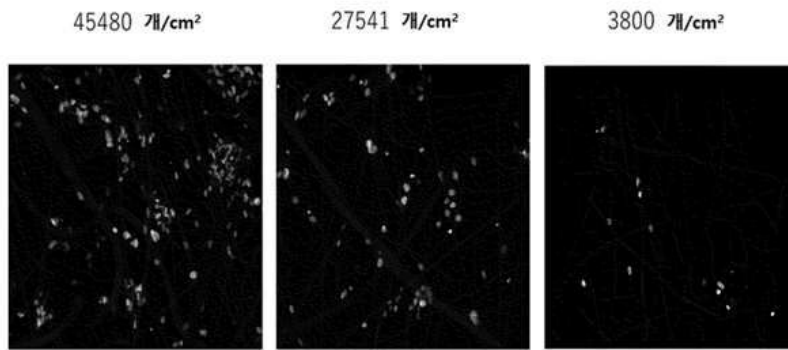
도면18



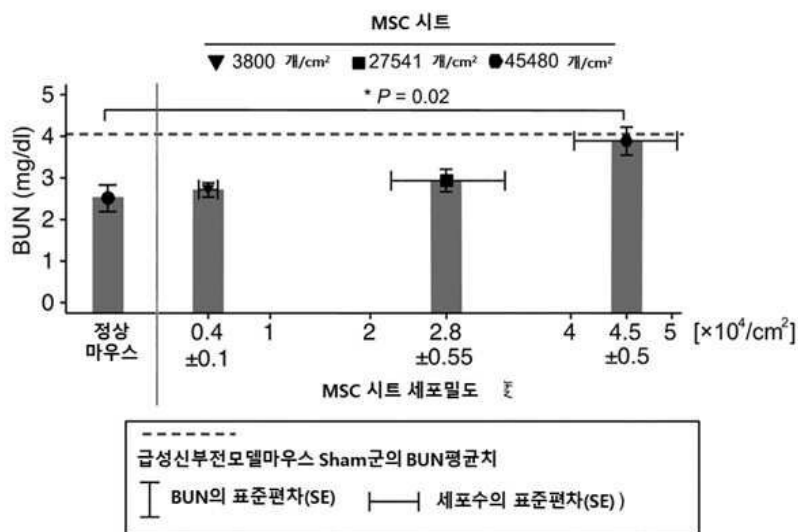
도면19



도면20



도면21



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY

<120> CELL SHEET FOR TRANSPLANTATION AND METHOD FOR PRODUCING SAME

<130> P17SM01WO

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCT4 Forward Primer

<400> 1

gacaggggag gggaggag	18
<210> 2	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OCT4 Reverse Primer	
<400> 2	
cttcctcca accagttgcc c	21
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NANOG Forward Primer	
<400> 3	
tggacactgg ctgaatcctt c	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NANOG Reverse Primer	
<400> 4	
cgttgattag gctccaacca t	21
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SOX2 Forward Primer	
<400> 5	
gggaaatggg aggggtgcaa	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> SOX2 Reverse Primer
 <400> 6
 ttgcgtgagt gtggatggga 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNMT1 Forward Primer
 <400> 7
 cgtaaagaag aattatccga gg 22
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNMT1 Reverse Primer
 <400> 8
 gttttctaga cgtccattca c 21

 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TERT1 Forward Primer
 <400> 9
 cggaagagtg tctggagc 18
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TERT1 Reverse Primer
 <400> 10
 ggatgaagcg gagtctgga 19
 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 Forward Primer
 <400> 11
 gatgagtaca aaagtcctga tcca 24

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 Reverse Primer
 <400> 12
 ctgcagccac tggttctgt 19

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IDO Forward Primer
 <400> 13
 gcattttca gtgttcttcg cata 24

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IDO Reverse Primer
 <400> 14
 tcatacacca gaccgtctga tagc 24

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSG-6 Forward Primer
 <400> 15
 cccattgtga agccagggcc caactg 26

<210> 16

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSG-6 Reverse Primer
 <400> 16
 ggaagctcat ctccacagta tcttccc 27
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P16INK4a Forward Primer
 <400> 17
 agcatggagc cttcggctga 20

 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P16INK4a Reverse Primer
 <400> 18
 ccatcatcat gacctggatc g 21
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P21 Forward Primer
 <400> 19
 gagactctca gggtcgaaaa 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P21 Reverse Primer
 <400> 20

ttagggcttc ctcttgaga 20

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TP53 Forward Primer
 <400> 21
 tgactgtacc accatccact a 21
 <210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TP53 Reverse Primer
 <400> 22
 aaacacgcac ctcaaagc 18
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aSMA Forward Primer
 <400> 23
 gcagcccagc caagcactgt 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aSMA Reverse Primer
 <400> 24
 tgggagcatc gtcccagca 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> RNA18S Forward Primer

<400> 25

atcggggatt gcaattattc

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA18S Reverse Primer

<400> 26

ctcactaac catccaatcg

20