(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0090030
(43) 공개일자 2024년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0160287
(22) 출원일자 2022년11월25일
심사청구일자 2022년11월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(72) 발명자
정은재
서울시 강남구 광평로 31길 수서 삼성아파트 103동 501호
정석
서울특별시 중구 퇴계로 72 남산SK리더스뷰 메이플동 1601호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에스알비

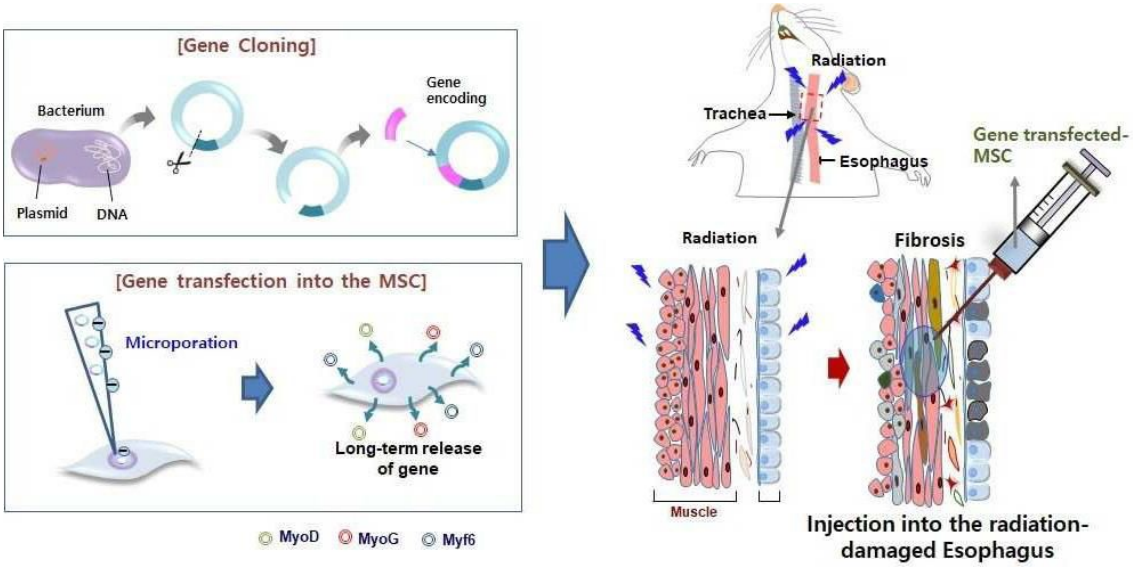
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **방사선 치료에 의하여 손상된 근육 재생을 위한 고기능성 세포 치료제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 근육분화능 향상 유전자인 MyoG, MyoD 및 Myf6가 공동 도입된 벡터로 형질감염(transfection)된 줄기세포 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명을 이용하면 손상된 근육 조직을 재생할 수 있고, 특히 두경부암 치료를 위한 방사선 조사로 인하여 손상된 식도 근육층의 손상 정도를 개선하거나, 손상을 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
C07K 14/4716 (2013.01)
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
(72) 발명자
김혜정
서울 강서구 마곡 중앙로 33 1402동 803호

김인걸
인천광역시 서구 청라한울로 96, 332동 2003호 (청라동, 청라제일풍경채2차에듀앤파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465037194
과제번호 HI22C1323000022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 재생의료 임상연구 기반조성 사업
연구과제명 이물반응/섬유증 제어를 위한 면역조절 생리활성 나노입자 활용 ECM/CNF 기반 인공식도용 3D 프린팅 바이오잉크 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 서울대학교병원
연구기간 2022.07.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

MyoG 유전자를 포함하는 제1폴리뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는, 근육 조직 재생을 위한 줄기세포 생산용 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1뉴클레오타이드는 서열번호 1의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고,

상기 제2뉴클레오타이드는 서열번호 2의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고,

상기 제3뉴클레오타이드는 서열번호 3의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것인, 벡터.

청구항 3

MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 뉴클레오타이드가 포함된 벡터로, 형질전환된 근육 조직 재생용 줄기세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제1뉴클레오타이드는 서열번호 1의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고,

상기 제2뉴클레오타이드는 서열번호 2의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고,

상기 제3뉴클레오타이드는 서열번호 3의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것인, 줄기세포.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 근육 조직 재생용 줄기세포의 제조 방법:

MyoG 유전자를 포함하는 제1폴리뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 뉴클레오타이드를 포함한 재조합 벡터를 준비하는 준비 단계; 및

상기 재조합 벡터를 줄기세포에 형질감염하는 형질감염 단계.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 형질감염 단계는 인산화칼슘 형질감염, 미세주입법, 리포솜 주입법, 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 제트 분사(Jet injection)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 7

MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드가 포함된 벡터로, 형질전환된 줄기세포를 포함하는 섬유화 질환의 예방, 개선 또는 치료용 세포치료제.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 섬유화 질환은 식도, 폐, 신장, 간, 심장, 혈관, 관절, 장, 피부, 연조직, 골수, 음경, 복막, 근육, 척추, 고환, 난소, 유방, 갑상선, 고막, 췌장, 담낭, 방광 및 전립선 섬유화로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포치료제.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 세포치료제는 경구(Oral), 복강내(Intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 정맥내(Intravenous), 피하(subcutaneous) 및 피내(Intradermal)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 경로로 대상체에 투여 가능한 것인, 세포치료제.

청구항 10

MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드로 이루어지는 그룹에서 선택되는 1종 이상의 뉴클레오타이드가 포함된 벡터로 형질전환된 줄기세포를 포함하는, 삼킴장애의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 조성물은 경구(Oral), 복강내(Intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 정맥내(Intravenous), 피하(subcutaneous) 및 피내(Intradermal)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 경로로 대상체에 투여 가능한 것인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 근육분화능 향상 유전자인 MyoG, MyoD 및 Myf6가 공동 도입된 벡터로 형질감염(transfection)시켜 손상된 근육 조직을 재생할 수 있고, 특히 두경부암 치료를 위한 방사선 조사로 인하여 손상된 식도 근육층의 손상 정도를 개선하거나, 손상을 예방 또는 치료할 수 있는 줄기세포 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 세포 성장의 비정상적인 조절을 특징으로 하는 질환의 일 그룹이다. 100가지가 넘는 서로 다른 유형의 암이 존재하며, 이들은 처음에 영향을 받은 세포의 유형에 따라 분류되며, 그 예로는, 방광암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암(신세포암), 백혈병, 소세포폐암, 비-소세포폐암, 췌장암, 전립선암, 갑상선암, 피부암, 비-호지킨 림프종, 흑색종 및 두경부암이 있다.

[0003] 그 중 두경부암(head and neck cancer; HNC)은 세계적으로 6번째로 가장 흔한 암으로, 전세계적으로 해마다 640,000건이 넘는 발병률을 가진다. 두경부 편평세포암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)은 모든 두경부암 중 90% 이상을 차지하고 있어 두경부암 중 대부분을 이루고, 해부학적 영역 전체를 통해 점막 표면에서 발생한다. 이들은 비강, 부비동(paranasal sinus), 구강, 비인두(nasopharynx), 구강인두(oropharynx), 하인두(hypopharynx) 및 후두(larynx)의 종양을 포함한다. 두경부암 환자 중 35% 내지 45%는 결국 두경부 편평세포암종 질환으로 인해 사망한다. 미국에서만도 두경부 편평세포암종은 모든 악성 종양 중 약 4%를 차지한다. 이는 매해 두경부 편평세포암종을 새로 진단받는 100,000명 중 약 17명에 해당한다.

[0004] 상부소화기 암을 포함한 대부분의 두경부암은 표준치료로서 방사선 치료가 있으며, 일반적으로 방사선 치료는 수술적 요법과 병행하여 환자에게 수행된다. 두경부암의 수술 케이스는 매년 증가 추세에 있으며, 두경부암에 대한 방사선 요법은 턱, 얼굴, 목의 정상적인 뼈와 연조직을 방사선에 노출시켜 방사선 섬유증으로 알려진 조직 손상을 유발한다. 방사선 섬유증은 피부, 결합 조직, 근육, 신경 및 혈관을 포함하는 모든 연조직에서 발생할 수 있다. 한편, 구강, 인두, 식도 등 상부소화기 방사선 치료 후 발생하는 대표적인 부작용으로는 삼킴장애가 있다. 이는 식도의 점막 및 근육층의 조직 섬유화로 인한 기능 저하로서, 환자에게 영구적인 불편과 고통을 초래한다.

[0005] 방사선 치료는 이온화된 방사선에 의하여 조직내 줄기 세포의 사멸, 염증반응 및 섬유아세포의 활성화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 결과적으로 방사선에 노출된 조직에는 콜라겐 및 기타 세포외 기질 성분의 과도한 침착이 발생하여 영구적인 조직 흉터를 남기게 된다.

[0006] 따라서, 방사선 치료 혹은 다양한 원인에 의해 손상된 조직, 특히 피부, 결합 조직, 근육, 신경 및 혈관을 포함하는 모든 연조직에서 발생할 수 있는 방사선 섬유증이나 이로 인한 삼킴장애를 개선, 예방, 또는 치료할 수 있는 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 식도 근육이 식도의 근본적 기능 회복을 위해 가장 중요한 타겟 조직임에 착안하여, 방사선 조사 후 손상된 식도 근육층의 주요 유전자를 복원하여 줄기세포와 함께 손상된 식도 조직을 궁극적으로 치료할 수 있는 치료제를 만들기 위해 노력하였다.

[0008] 그 결과 전사 인자인 MyoG, MyoG 및 Myf6 유전자를 조합한 벡터를 줄기세포에 형질감염(transfection)시키면 유전자를 각각 이입한 벡터를 줄기세포에 형질감염시킨 것보다 줄기세포의 근육 조직 재생 효과와 이로 인한 식도 섬유화 개선 효과가 우수해짐을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 MyoG, MyoD 및 Myf6 유전자를 포함하는 근육 조직 재생을 위한 줄기세포 생산용 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 MyoG, MyoD 및 Myf6 유전자가 이입된 벡터로 형질감염된 근육 조직 재생용 줄기세포를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 삼킴장애 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 근육 조직 재생용 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 MyoG, MyoD 및 Myf6 유전자를 포함하는 줄기세포의 근육 조직 재생 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 근육분화능 향상 유전자인 MyoG, MyoD 및 Myf6가 공동 도입된 벡터로 형질감염(transfection)시켜 손상된 근육 조직을 재생할 수 있고, 구체적으로 두경부암 치료를 위한 방사선 조사로 인하여 손상된 식도 근육층의 손상 정도를 개선하거나, 손상을 예방 또는 치료할 수 있는 줄기세포 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

[0015] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0016] 본 발명의 일 예는 근육 조직 재생을 위한 줄기세포 생산용 벡터에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에 있어서 근육 조직 재생을 위한 줄기세포 생산용 벡터는 MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서 벡터는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미할 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λλλλΔ및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수도 있다.

[0019] 본 발명에 있어서 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 발현벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서 벡터는 목적 유전자 발현을 위한 요소(elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자(operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보좀 결합 부위(ribosome binding site; RBS), IRES(Internal Ribosome Entry Site) 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 상기 프로모터 이외의 전사

조절 서열(예를 들어, 인핸서 등)을 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pLλ프로모터, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0022] 본 발명에 있어서 벡터는 유전자 치료용 발현벡터를 의미할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "유전자 치료(gene therapy)"는 유전자 이상에 의하여 유발되는 각종 질환을 치료하기 위하여, 유전자 이상이 있는 세포에 정상 유전자를 삽입하거나 새로운 기능을 제공하여 그의 기능을 정상화시키는 방법을 의미할 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서 조직은 식도, 심장, 폐 및 간으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 기관의 일부를 의미하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 식도의 일부일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 있어서 MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드는 서열번호 1의 염기서열 또는 서열번호 1의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 실질적 동일성은 각각의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열이 각각의 뉴클레오타이드 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서 서열번호 1의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 1의 염기서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서 MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드는 서열번호 2의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서 서열번호 2의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열은 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 2의 염기서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드는 서열번호 3의 염기서열 또는 이와 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서 서열번호 3의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열은 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열이 서열번호 3의 염기서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 용어 “MyoG 유전자”는 조직의 다양한 세포 유형에 대하여 근육 생성을 유도할 수 있는 근육 특이적 전사 인자를 암호화하는 유전자를 의미할 수 있다. MyoG 유전자로부터 미오게닌(myogenin)이 발현될 수 있으며, 근육 분화, 세포 주기 및 근위축에 역할하는 전사 활성화제로 작용할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 용어 “MyoD 유전자”는 근육 분화를 조절하는 데에 중요한 역할을 하는 근육 특이적 전사 인자

를 암호화하는 유전자를 의미할 수 있다. MyoD 유전자로부터 MyoD 단백질(또는 근아세포 결정 단백질 1)이 발현될 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 용어 “Myf6 유전자”는 근형성 과정에 관여하는 것으로 알려진 근육 생성 인자(MRF) 계열의 전사 인자를 암호화하는 유전자를 의미할 수 있다. Myf6 유전자로부터 Myf6 단백질(또는 Mrf4이나 허큘린(herculin))이 발현될 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 일 예는 근육 조직 재생용 줄기세포에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 있어서 근육 조직 재생용 줄기세포는 MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드가 포함된 벡터로, 형질전환된 것일 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 용어 "줄기세포"는 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다. 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포, 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 및 다분화능 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 성체 줄기세포일 수 있으며, 예를 들어, 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 있어서 중간엽 줄기세포의 유래는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직일 수 있으며, 예를 들어, 골수일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 또 다른 일 예는 다음의 단계를 포함하는 근육 조직 재생용 줄기세포의 제조 방법에 관한 것이다:

[0040] MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 준비하는 준비 단계; 및 상기 재조합 벡터를 줄기세포에 형질감염하는 형질감염 단계.

[0041] 본 명세서에서 용어 “형질감염(Transfection)”은 벡터를 숙주 세포 내로 혼입시킬 수 있는 모든 기전을 지칭한다. 성공적인 형질감염으로 인해, 숙주 세포가 해당 벡터에 의해 수반된 모든 작동성 유전자를 발현시킬 수 있는 능력이 생긴다. 형질감염은 안정적이거나 일시적일 수 있다. 일시적 형질감염의 한 가지 예는 벡터가 숙주 세포 게놈 내에 통합되지 않는, 특정 세포 내에서의 벡터 발현을 포함한다. 또 다른 한편, 안정적 형질감염은 벡터가 벡터가 숙주 세포 게놈 내에 통합되는, 특정 세포 내에서의 벡터 발현을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서 형질감염 단계는 인산화칼슘 형질감염, 미세주입법, 리포 솜 주입법, 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 제트 분사(Jet injection)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행될 수 있으며, 예를 들어, 전기천공법일 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서 전기 천공법은 세포의 상태 및 유전자의 크기와 종류 마다 조건을 다르게 하여 유전자의 도입 효율을 최적화 할 수 있다는 장점이 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 일 예는 근육 조직 재생을 위한 줄기세포를 포함하는 섬유화 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0045] 본 명세서에서 용어 “섬유화(fibrosis)”질환은 정상적인 조직이 파괴되면서 섬유성 결합조직으로 대체되는 섬유화로 인하여 조직의 기능을 상실하는 것을 의미할 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구현예에서, 섬유화 질환은 식도, 폐, 신장, 간, 심장, 혈관, 관절, 장, 피부, 연조직, 골수, 음경, 복막, 근육, 척추, 고환, 난소, 유방, 갑상선, 고막, 췌장, 담낭, 방광 및 전립선 섬유화로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어, 식도 섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 일 구현예에서, 섬유화 질환은 방사선 조사에 의해서 유발된 것일 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서 근육 조직 재생을 위한 줄기세포는 근육 세포의 생성 및 근육 세포의 분화 촉진을 통하여 근육 조직의 재생을 촉진시킬 수 있으며, 특히, 식도 근육 조직의 재생을 촉진시킴으로써 삼킴장애를 개선, 예방 또는 치료할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 용어 “삼킴장애”는 두경부암 환자의 방사선 치료 후 흔히 발생하는 부작용으로서 식도의 점막

및 근육층의 조직이 섬유화하여 식도의 기능 저하로 인하여 음식물이나 물의 삼킴이 곤란해지는 것을 의미한다.

[0050] 본 발명의 약제학적 조성물은 MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드가 포함된 벡터로, 형질전환된 근육 조직 재생용 줄기세포의 약제학적 유효량 및/또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 근육 조직 재생용 줄기세포의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0052] 본 발명의 일 구체예에서, 식도 조직에 적용하기 위한 세포치료제는 형질전환된 줄기세포를 3 X 10^4 내지 7 X 10^7 cells/mL, 3 X 10^4 내지 7 X 10^6 cells/mL, 3 X 10^4 내지 7 X 10^5 cells/mL, 3 X 10^4 내지 6 X 10^5 cells/mL, 4 X 10^4 내지 7 X 10^7 cells/mL, 4 X 10^4 내지 7 X 10^6 cells/mL, 4 X 10^4 내지 7 X 10^5 cells/mL, 4 X 10^4 내지 6 X 10^5 cells/mL, 5 X 10^4 내지 7 X 10^7 cells/mL, 5 X 10^4 내지 7 X 10^6 cells/mL, 5 X 10^4 내지 7 X 10^5 cells/mL, 5 X 10^4 내지 6 X 10^5 cells/mL 또는 5 X 10^5 cells/mL 농도로 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 X 10^5 cells/mL 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 일 구체예에서, 식도 조직에 적용하기 위한 약제학적 조성물은 형질전환된 줄기세포를 3 X 10^4 내지 7 X 10^7 cells/mL, 3 X 10^4 내지 7 X 10^6 cells/mL, 3 X 10^4 내지 7 X 10^5 cells/mL, 3 X 10^4 내지 6 X 10^5 cells/mL, 4 X 10^4 내지 7 X 10^7 cells/mL, 4 X 10^4 내지 7 X 10^6 cells/mL, 4 X 10^4 내지 7 X 10^5 cells/mL, 4 X 10^4 내지 6 X 10^5 cells/mL, 5 X 10^4 내지 7 X 10^7 cells/mL, 5 X 10^4 내지 7 X 10^6 cells/mL, 5 X 10^4 내지 7 X 10^5 cells/mL, 5 X 10^4 내지 6 X 10^5 cells/mL 또는 5 X 10^5 cells/mL 농도로 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 X 10^5 cells/mL 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수도 있다.

[0055] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 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.

[0056] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있다.

[0057] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0058] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캅셀제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명의 또 다른 일 예는 MyoG 유전자를 포함하는 제1폴리뉴클레오나타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2폴리뉴클레오타이드, Myf 유전자를 포함하는 제3폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 그룹에서 선택된 1종 이상이 포함된 벡터로 형질감염된 줄기세포를 포함하는, 섬유화 질환의 예방, 개선 및 치료용 세포치료제인 것일 수 있다.

[0060] 본 명세서 상의 용어 “세포 치료제” 란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous),

동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식·선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 섬유화 질환의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미하는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에서, 세포 치료제는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 경구(Oral) 또는 비경구, 예를 들어, 복강내(Intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 정맥내(Intravenous), 피하(subcutaneous) 및 피내(Intradermal)를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 경로로 대상체에 투여 가능한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에서, 세포치료제는 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.

[0063] 본 발명의 일 구현예에서, 세포치료제는 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 줄기세포를 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에서, '치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)'은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다.

[0065] 본 발명의 일 구현예에서, 세포치료제는 세포치료제 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에서, 세포치료제는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0067] 본 발명의 일 구현예에서, 세포치료제 또는 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 상기 약학적 조성물의 경구투여를 위한, 경구를 위한 액상제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 또 다른 일 예는 MyoG 유전자를 포함하는 제1뉴클레오타이드, MyoD 유전자를 포함하는 제2뉴클레오타이드 및 Myf6 유전자를 포함하는 제3뉴클레오타이드가 포함된 벡터로, 형질전환된 줄기세포의 근육 조직 재생 용도에 관한 것이다.

발명의 효과

[0069] 본 발명은 근육분화능 향상 유전자인 MyoG, MyoD 및 Myf6가 공동 도입된 벡터로 형질감염(transfection)된 줄기세포 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명을 이용하면 손상된 근육 조직을 재생할 수 있고, 특히 두경부암 치료를 위한 방사선 조사로 인하여 손상된 식도 근육층의 손상 정도를 개선하거나, 손상을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 본 발명의 일 실험예에 따라 근육 조직 재생을 위한 줄기세포 생산용 벡터, 이를 형질감염시킨 줄기세포의 제조 과정 및 이의 줄기세포를 식도 조직에 적용하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2a 내지 도 2e는 본 발명의 일 실험예에 따라 MyoD, MyoG 및 Myf6 유전자를 각각 혹은 공동으로 이입한 중간엽 줄기세포의 GFP 발현을 확인한 형광 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실험예에 따라 H&E 염색(H&E staining)을 통해 식도 조직의 전체적 외관을 촬영한 사진이다.

도 4는 본 발명의 일 실험예에 따라 데스민 면역 염색을 통한 각 그룹별 식도 근육층의 조직학적 변화를 관찰하여 촬영한 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실험예에 따라 a-SMA 발현을 확인하기 위한 형광 사진 및 발현수준을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실험예에 따라 근육층의 두께를 확인하기 위해 데스민(Desmin) 면역 염색 후 촬영한 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실험예에 따라 CD68 면역 염색 결과를 촬영한 사진이다.

도 8은 본 발명의 일 실험예에 따라 특이적 근육 유전자 발현 양상을 qPCR로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 본 발명에서 사용하는 용어는 단지 특정한 실시예들을 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 발명의 설명에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0072] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 발명에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0073] 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 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0075] **준비예. 근육 조직 재생용 줄기세포의 준비**

[0076] 유전자 클로닝은 비바이럴 벡터인 pEGFPN1 벡터를 사용하였다. 첫번째로 pEGFP N1 벡터의 multi cloning site를 Xho1과 BamH1으로 각각 절단하였다. MyoG 유전자를 PCR하여 증폭할 때 양 말단에 각각 Xho1과 BamH1 염기서열을 첨가하여 PCR을 수행하였고, 증폭된 MyoG PCR 산물을 준비된 벡터에 클로닝하였다. MyoD 유전자 역시 PCR하여 증폭할 때 양 말단에 각각 Xho1과 BamH1 염기서열을 첨가하여 PCR을 수행하였고, 증폭된 MyoD PCR 산물을 준비된 벡터에 클로닝하였다. Myf6 유전자의 클로닝을 위해서는 벡터인 pEGFPN1을 HindIII와 BamH1으로 각각 절단하였다. Myof 유전자를 PCR하여 증폭할 때 양 말단에 각각 Xho1과 BamH1 염기서열을 첨가하여 PCR을 수행하였고,

증폭된 Myf6 PCR 산물을 준비된 벡터에 클로닝하였다. 마지막으로 세개의 유전자를 vector에 연결하여 pEGFP N1-MyoD-MyoG-Myf6 를 클로닝하였다.

표 1

[0078]

서열번호	명명	서열목록	비고
1	MyoG NM_002479	Atggagctgtatgagacatccccctacttctaccaggaaccccgcttctatgatggggaaaactacct gcctgtccacctccagggcttcgaaccaccaggctacgagcggacggagctcaccctgagccccgagg ccccagggcccctt gaggacaaggggctggggaccccgagcactgtccaggccagtgcctgccgtgg gcgtgtaaggtgtgtaagaggaagtcggtgtccgtggaccggcggcgggcggccacactgagggagaa gcgcaggctcaagaaggtgaatgaggccttcgaggccctgaagagaagcaccctgctcaaccccaacc agcggctgcccaaggtggagatcctgcgcagtgccatccagtacatcgagcgcctccaggccctgctc agctccctcaaccaggaggagcgtgacctccgctaccggggcgggggcgggccccagccaggggtgcc cagcgaatgcagctctcacagcgcctcctgcagtccagagtggggcagtgcactggagttcagcgcca acccaggggatcatctgctcacggctgaccctacagatgcccacaacctgcactccctcacctccatc gtggacagcatcacagtggaagatgtgtctgtggccttcccagatgaaaccatgcccaactgag	676 nt
2	MyoD X56677.1	atggagctactgtcgccaccgctccgcgacgtagacctgacggcccccgacggctctctctgctcctt tgccacaacggacgacttctatgacgacccgtgtttcgactccccggacctgcgcttcttcgaagacc tggacccgcgcctgatgcacgtgggcgcgctcctgaaacccgaagagcactcgcacttccccgcggcg gtgcacccggccccgggcgcacgtgaggacgagcatgtgcgcgcgcccagcgggcaccaccaggcggg ccgctgcctactgtgggcctgcaaggcgtgcaagcgcaagaccaccaacgccgaccgccgcaaggccg ccaccatgcgcgagcggcgccgcctgagcaaagtaaatgaggcctttgagacactcaagcgctgcacg tcgagcaatccaaaccagcggttgcccaaggtggagatcctgcgcaacgccatccgctatatcgaggg cctgcaggctctgctgcgcgaccaggacgccgcgccccctggcgcagccgccttctatgcgccgggcc cgctgccccc gggccgcggcggcgagcactacagcggcgactccgacgcgtccagcccgcgctccaac tgctccgacggcatgatggactacagcggccccccgagcggcgcccggcggcggaactgctacgaagg cgcctactacaacgaggcgcccagcgaacccaggcccgggaagagtgcggcggtgtcgagcctagact acctgtccagcatcgtggagcgcatctccaccgagagccctgcggcgcccgccctcctgctggcggac gtgccttctgagtcgcctccgcgcaggcaagaggctgccgcccccagcgagggagagagcagcggcga ccccacccagtcaccggacgccgccccgcagtgccctgcgggtgcgaaccccaacccgatataccagg tgctctga	960 nt
3	Myf6 NM_002469	atgatgatggaccttttt gaaactggctcctatttcttctacttggatggggaaaatgttactctgca gccattagaagtggcagaaggctctcctttgtatccagggagtgatggtaccttgtccccctgccagg accaaatgccccc ggaagcggggagcgacagcagcggagaggaacatgtcctggcgccccc gggcctg cagcctccacactgccccggccagtgtctgatctgggcttgcaagacctgcaagagaaaatctgcccc cactgaccggcgaaaagccgccaccctgcgcgaaaggaggaggctaaagaaaatcaacgaggccttcg aggcactgaagcggcgaactgtggccaaccccaaccagaggctgcccaaggtggagattctgcggagc gccatcagctatattgagcggctgcaggacctgctgcaccggctggatcagcaggagaagatgcagga gctgggggtggacccctt cagctacagacccaaacaagaaaatcttgagggtgcggatttcctgcgca cctgcagctcccagtggccaagtgtttccgatcattccaggggctcgtgataacggctaaggaagga ggagcaagtattgattcgtcagcctcgagtagccttcgatgcctttcttccatcgtggacagtatttc ctcggaggaacgcaaactcccctgcgtggaggaagtggtgg	721 nt

[0080] **실험예 1. 유전자가 도입된 중간엽 줄기세포의 GFP 발현**

[0081] 중간엽 줄기세포에 MyoD, MyoG 및 Myf6 유전자를 각각 혹은 공동으로 전기천공법을 통해 이입하고 형광현미경를 이용하여 중간엽 줄기세포의 GFP 발현을 확인한 결과를 도 2a 내지 도 2e에 나타내었다. 도 2a는 유전자를 이입하지 않은 대조군, 도 2b는 MyoD 유전자를 이입한 줄기세포, 도 2c는 MyoG 유전자를 이입한 줄기세포, 도 2d는 Myf6 유전자를 이입한 줄기세포 및 도 2e는 MyoD+MyoG+Myf6 유전자를 모두 이입한 줄기세포의 형광 발현을 나타낸 것이다.

[0082] 도 2a 내지 도 2e에서 확인할 수 있듯이, 형광현미경을 통해 MyoD,MyoG,Myf6,각각을 조합한 MyoD-MyoG-Myf6 유전자가 이입된 것을 확인할 수 있었다.

[0084] **실험예 2. H&E 염색을 통한 식도 조직 관찰**

[0085] 마우스의 식도에 방사선을 2회 조사한 후 준비된 줄기세포를 주사주입하였고, 주사주입 4주 경과 후, 식도 조직을 채취하여 H&E staining을 통해 조직을 관찰한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0086] 도 3에서 확인할 수 있듯이, Saline 그룹은 정상식도와 달리 루멘(lumen)이 불규칙적이며, 점막하층이 비대칭적으로 두꺼워진 모습을 관찰할 수 있었다. 이는 2회의 방사선 조사로 인하여 식도조직이 상당한 변형되었음을 의미한다. 다만, 유전자가 도입된 중간엽줄기세포가 주입된 그룹들에서는 식도의 변형이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 보다 자세하게, 상피세포 기저층내의 세포질성 액포(cytoplasmic vacuoles) (노란색 화살표)는 Saline 그룹, MyoD, MyoG, Myf6 유전자가 개별 도입된 줄기세포를 주입받은 마우스 그룹에서 간헐적으로 관찰되었다. 또한 점막 상피세포의 과형성(hyperplasia)이 간헐적으로 관찰되었다. 그러나, MyoD, MyoG, Myf6 유전자가 공동 도입된 줄기세포를 주입받은 마우스 그룹에서는 상피세포의 과형성이 거의 관찰되지 않았으며, 식도 점막층의 형태가 정상 그룹과 유사한 형태로 회복됨을 확인할 수 있었다.

[0088] **실험예 3. 점막하층의 병리학적 변화 관찰**

[0089] 방사선 조사 후 식도 조직 손상의 경우, 점막하층(IEL)에서 뚜렷한 병리학적 변화가 관찰되었고, 이는 손상된 조직내로 섬유아세포의 침투로 인한 ECM 침착 및 콜라겐의 비대한 증식을 masson's trichrome 염색을 통해 확인하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 아울러, 점막하층의 두께를 정량화하여 그 결과를 도 4의 그래프 및 표 2에 나타내었다.

표 2

[0090]

(um)	Normal	Saline	MyoD	MyoG	Myf6	MyoD+MyoG+Myf6
Thickness of collagen positive layer	19.60±1.67	56.80±7.46	26.20±3.89	27.20±5.54	29.00±5.00	26.60±5.45

[0092] 도 4 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, 방사선 조사 후 saline 그룹에서 식도 점막하층내 콜라층의 비대한 증식을 관찰할 수 있었다. 반면 각 유전자가 도입된 중간엽줄기세포를 주입받은 그룹에서는 일괄적으로 콜라겐층이 대조군에 비해 유의미하게 감소하였고, 이는 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 발현양상을 분석함으로써 증명되었다. 분석 결과는 도 4 하단의 그래프 및 표 3에 나타내었다.

표 3

[0093]

		Saline	MyoD	MyoG	Myf6	MyoD+MyoG+Myf6
Relative expression of mRNA	IL-1 beta	1.0	0.30±0.18	0.65±0.38	0.42±0.09	0.35±0.12
	Col I	1.0	0.71±0.08	0.72±0.20	0.78±0.33	0.52±0.09
	TGF-beta	1.0	0.31±0.08	0.49±0.11	0.38±0.10	0.37±0.15

[0095] 도 4 및 표 3에서 확인할 수 있듯이, IL-1 beta는 세가지 실험그룹 (MyoD, Myf6, combination)에서 대조군에 비하여 유의미하게 감소하였다. Col type 1의 경우 combination 그룹에서만 대조군에 비하여 유의미한 감소를 나타내었다. 보다 의미있게는 조직 섬유화에 특이적 유전자로 알려진 TGF-beta는 4가지 실험군 모두 saline 그룹보다 유의미한 감소를 나타내었다. 이는 중간엽줄기세포의 항-섬유화 효과(anti-fibrosis effect)에 기인하는 것으로 추정된다.

[0097] **실험예 4. a-SMA 발현 확인**

[0098] a-SMA 발현을 확인하여 그 결과를 도 5 및 표 4에 나타내었다.

표 4

[0099]

(%)	Normal	Saline	MyoD	MyoG	Myf6	MyoD+MyoG+Myf6
FluorescenceOf a-SMA^{+}	10.32±1.56	0.32±0.14	2.38±0.73	2.40±1.00	1.26±0.75	4.76±0.80

[0101] **실험예 5. 데스민(Desmin) 면역염색을 통한 조직학적 변화 확인**

[0102] 데스민 면역염색을 이용하여 식도 근육층의 조직학적 변화를 관찰한 결과를 도 6 및 표 5에 나타내었다.

표 5

[0103]

(um)	Normal	Saline	MyoD	MyoG	Myf6	MyoD+MyoG+Myf6
Esophageal muscle thickness	92.46±8.43	209.43 ±21.68	132.65 ±10.68	137.29 ±12.65	158.67 ±22.84	107.91±18.45

[0105] 도 6 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, Saline 그룹의 경우 내측 윤상근 및 외측 세로근(inner circular & outer longitudinal muscle)의 층구조가 붕괴되어 비대해진(hyperatrophy) 모습의 근육조직이 관찰되었다. 특이적으로, 3가지 유전자가 공동으로 이입된 그룹에서는 근육층의 구조가 정상화되었으며, 각기 단독 주입된 그룹들에 비해 식도 근육층의 두께가 유의하게 감소하였다.

[0107] **실험예 6. CD-68 면역 염색**

[0108] 점막하층에서 발현되는 대식세포(macrophage)의 분포를 CD-68 면역 염색법으로 정량 평가하여 도 7 및 표 6에 나타내었다.

표 6

[0109]

(/mm^{2})	Normal	Saline	MyoD	MyoG	Myf6	MyoD+MyoG+Myf6
CD68-positive cells	2.62±1.15	31.20±2.86	18.20±3.70	20.60±5.17	20.20±5.07	16.02±2.12

[0111] 도 7 및 표 6에서 확인할 수 있듯이, 대조군인 saline 그룹의 경우 4주 차에 대식세포의 발현이 급격히 증가였지만 유전자가 이입된 4가지 그룹 모두 대식세포의 발현은 유의하게 감소하였다. 이는 중간엽줄기세포의 면역-조절 효과(immuno-modulatory effect)에 근거한 결과로 추정되고, 특별히 각 실험군간 대식세포 발현의 유의미한 차이는 발견되지 않았다.

[0113] **실험예 7. qPCR을 통한 특이적 근육 유전자의 발현 양상 확인**

[0114] 특이적 근육 유전자의 발현 양상을 qPCR로 분석한 결과를 도 8 및 표 7에 나타내었다.

표 7

[0115]

Relative expression of mRNA	Saline	MyoD	MyoG	Myf6	MyoD+MyoG+Myf6
Mrf4	1	2.35±1.10	2.97±0.92	1.15±0.60	2.75±0.96
Myf5	1	1.42±0.74	1.92±0.97	2.27±0.94	4.02±1.42

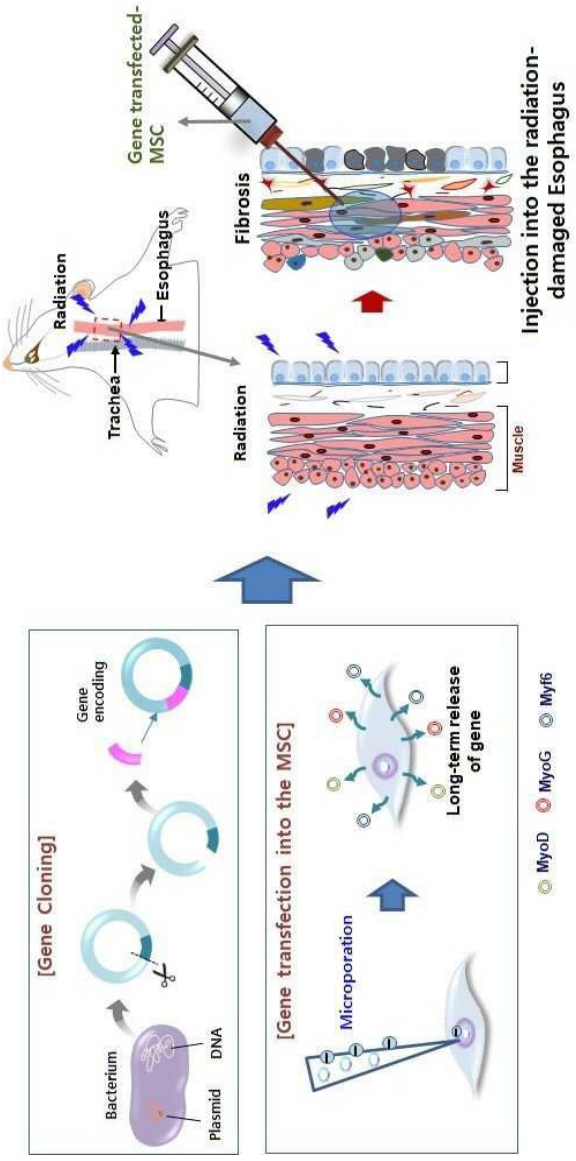
Myogenin	1	2.72±0.91	4.85±1.29	2.65±1.09	6.12±0.90
Calponin	1	4.15±1.26	4.05±0.89	5.82±1.31	7.58±1.71
SM22a	1	1.52±0.43	1.14±0.45	1.28±0.41	2.11±0.68

[0117] 도 8 및 표 7에서 확인할 수 있듯이, 전사 인자인 Myf5 유전자는 도 4에서 확인하였던 조직염색 결과와 유사한 경향성을 보였다. 또한 Myogenin 유전자의 발현은 MyoG-그룹이 나머지 두 유전자 그룹에 비하여 유의미하게 증가하였다.

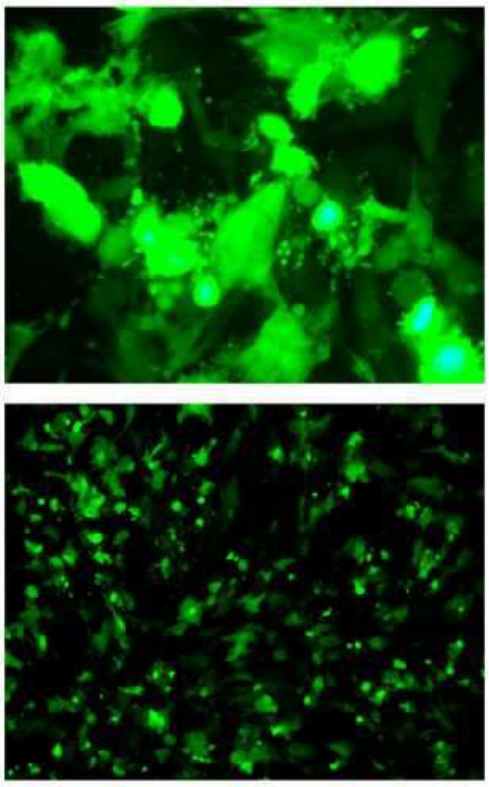
[0118] 평활근(Smooth muscle)에 관련된 대표적 유전자인 칼포닌(calponin)과 SM22a도 세가지 유전자가 공동 도입된 그룹(MyoD+MyoG+Myf6)이 단독으로 유전자가 도입된 다른 그룹들에 비하여 유의미한 차이를 나타내었다. 이는 근육 분화능 향상 유전자의 이입이 식도 근육층의 손상된 DNA내 근육 유전자의 복구 및 조직의 재생에 영향을 주었다는 결과를 뒷받침한다.

도면

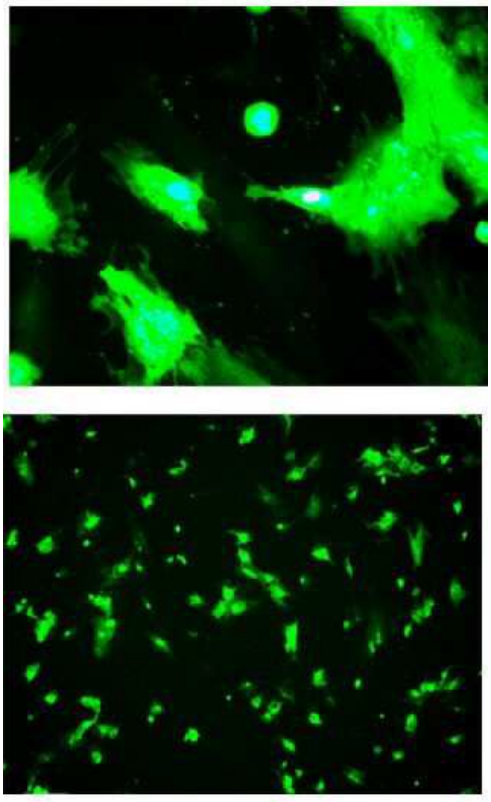
도면1



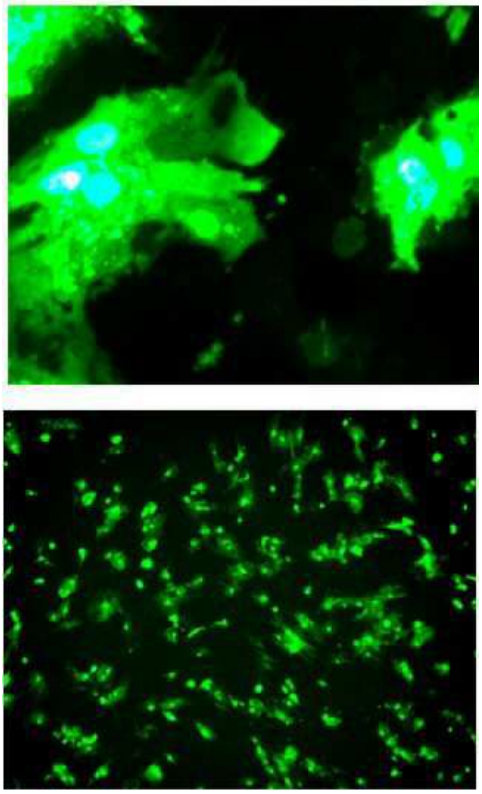
도면2a



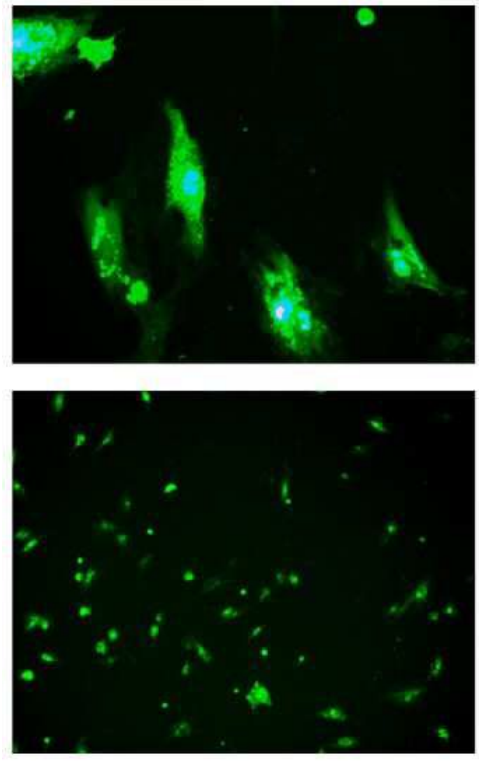
도면2b



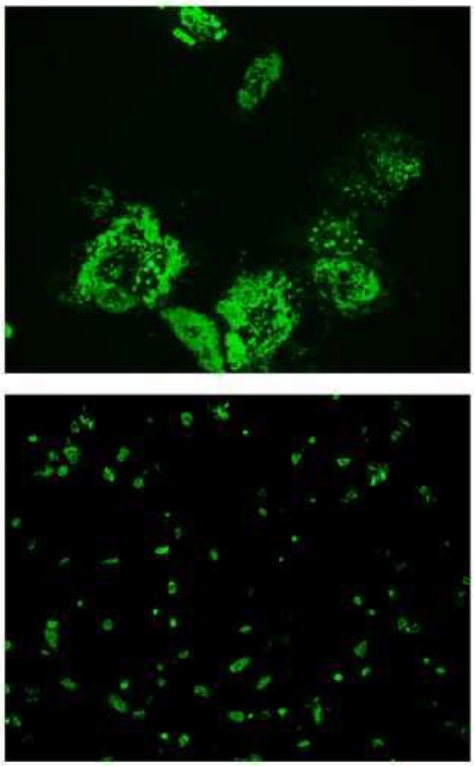
도면2c



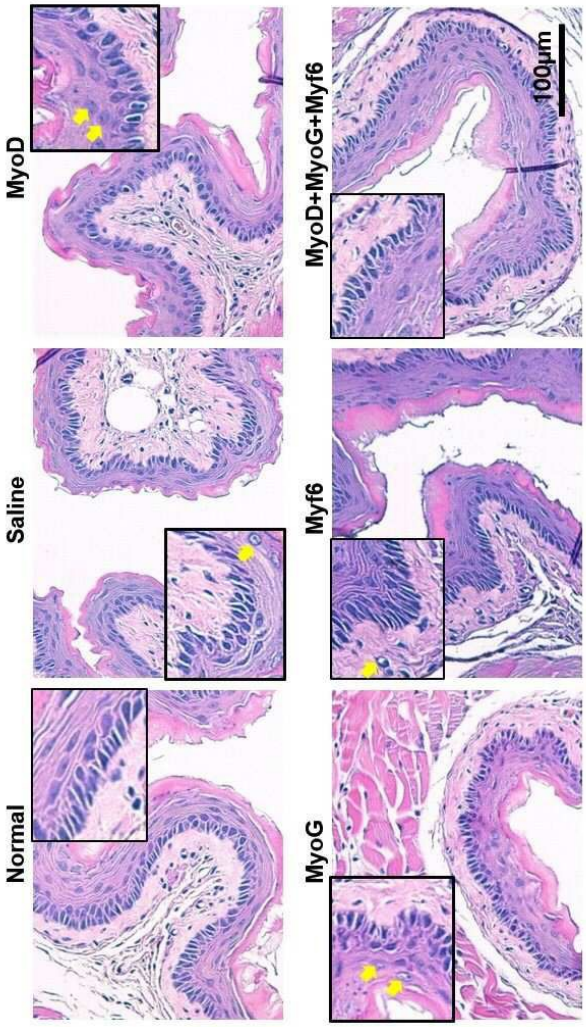
도면2d



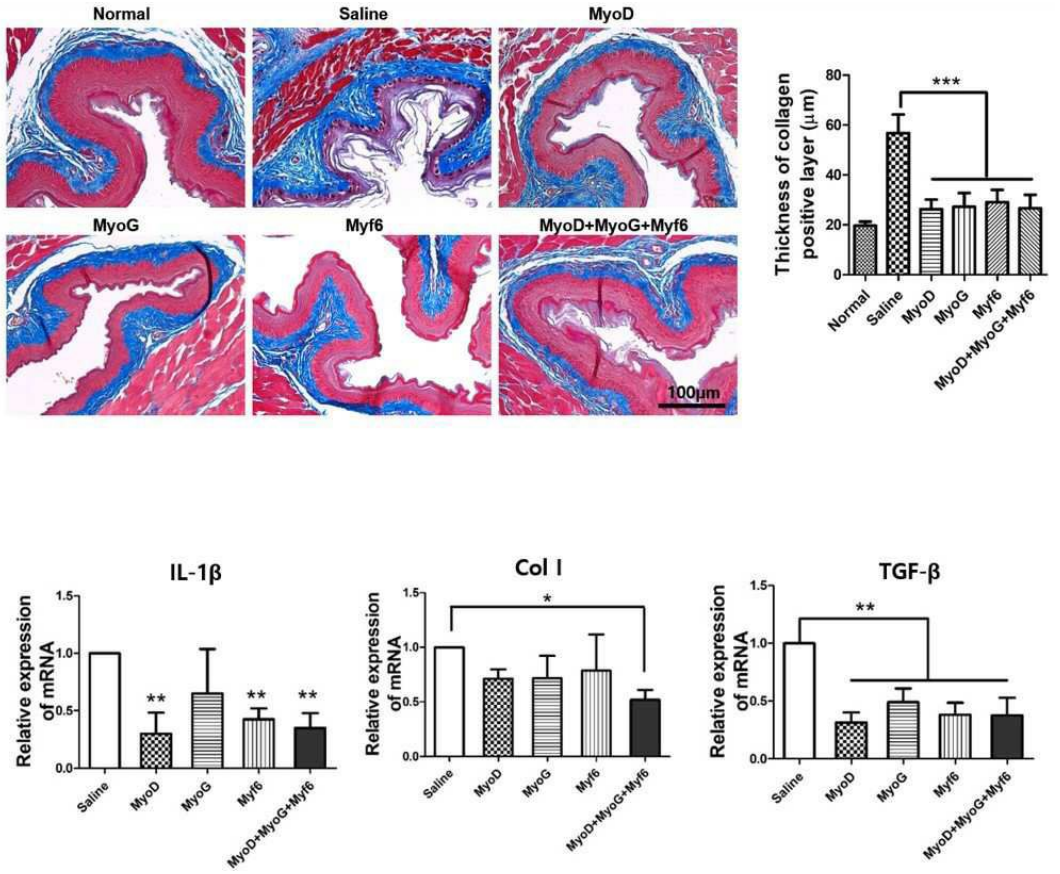
도면2e



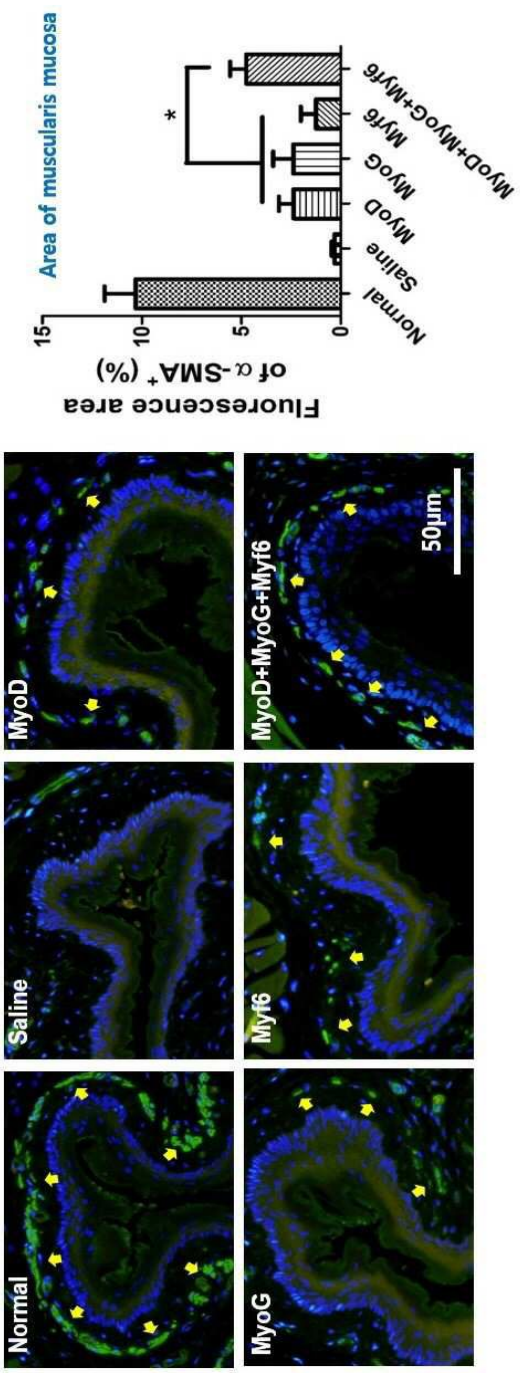
도면3



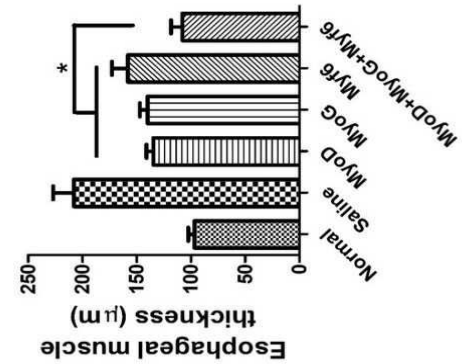
도면4

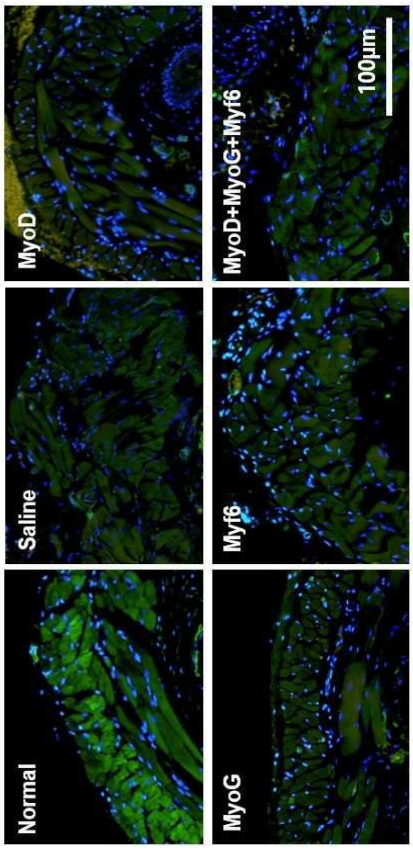

Normal
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6
100μm
Thickness of collagen positive layer (μm)
***
Normal
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6
IL-1β
Relative expression of mRNA
**
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6
Col I
*
TGF-β
**

도면5

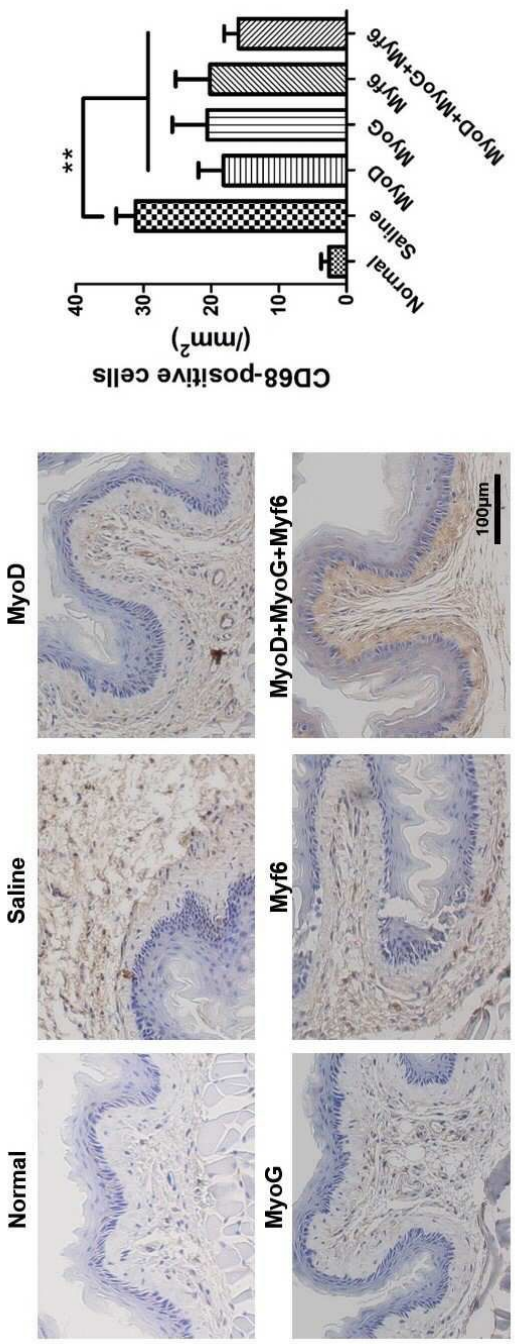

Area of muscularis mucosa
Fluorescence area of α-SMA+ (%)
15
10
5
0
*
Normal
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6
MyoD
MyoD+MyoG+Myf6
50μm
Saline
Myf6
Normal
MyoG

도면6


Esophageal muscle thickness (μm)
250
200
150
100
50
0
*
Normal
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6


MyoD
MyoD+MyoG+Myf6
100μm
Saline
Myf6
Normal
MyoG

도면7


CD68-positive cells
(/mm²)
0
10
20
30
40
**
Normal
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6
Normal
Saline
MyoD
MyoG
Myf6
MyoD+MyoG+Myf6
100μm

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.