



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0084078
(43) 공개일자 2022년06월21일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 2330/10 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7015011</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년04월06일
심사청구일자 2022년05월03일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년05월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2020/016228</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/145002
국제공개일자 2021년07월22일</p> <p>(30) 우선권주장
PCT/JP2020/002197 2020년01월16일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
퓨렉 가부시키키가이샤
일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1</p> <p>(72) 발명자
마츠자키 유미
일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1 퓨렉 가부시키키가이샤 나이
스야마 다카시
일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1 퓨렉 가부시키키가이샤 나이</p> <p>(74) 대리인
특허법인코리아나</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **고순도 간엽계 줄기세포**

(57) 요약

LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는, 상기 세포 집단.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

명세서

청구범위

청구항 1

LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는, 상기 세포 집단.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

변동 계수가 30 % 이하인, 세포 집단.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

평균 세포 사이즈가 14 μm ~ 18 μm 인, 세포 집단.

청구항 4

LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단의 품질을 평가하는 방법으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는 세포 집단을, 고품질이라고 판정하는, 상기 방법.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

변동 계수가 30 % 이하인, 평가 방법.

청구항 6

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서,

평균 세포 사이즈가 14 μm ~ 18 μm 인, 평가 방법.

청구항 7

LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로부터, 임상에 적용 가능한 세포 집단을 선발하는 방법으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는 세포 집단을, 치료용 간엽계 줄기세포 집단으로서 선발하는, 상기 방법.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

변동 계수가 30 % 이하인, 선발 방법.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,
 평균 세포 사이즈가 14 μm ~ 18 μm 인, 선발 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 균일성을 가지며 증식이 빠른 인간 간엽계 줄기세포의 고순도 세포 집단에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간엽계 줄기세포 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) 는, 세포 채취에 수반하는 윤리적 문제가 적고, 뼈·연골·지방 등으로의 다양한 분화능을 갖는 점에서, 조혈 줄기세포에 이어 임상 응용이 활발히 실시되고 있는 체성 줄기세포의 하나이다. MSC 는, 비교적 간단한 손재주에 의해 분리할 수 있는 점에서, 주로 시험관 내에서 연골이나 뼈 등으로 분화 유도 후에 국소에 이식하는 등, 바이오 머티리얼의 재료로서 널리 사용되고 있다.

[0003] 그리고, 임상 응용을 진행할 때에는, 일정한 기능을 유지하는 세포를 필요량 제조할 수 있는 것이, 제품화의 필수 조건이 된다.

[0004] 그러나, 출발 재료 (인간 골수액 등) 의 성질에 편차가 있는 경우, 즉 도너에게서 유래하는 성질에 차이가 있는 경우에는, 제품으로서의 세포 제조의 성질은 크게 영향을 받는다.

[0005] 이 때문에, 편차가 적은 고순도의 간엽계 줄기세포를 얻는 것이 중요하다.

[0006] 본 발명자들은, 골수액으로부터 LNGFR, Thy-1 공양성 (共陽性) 세포를 플로 사이토메트리에 의해 분리하여, 증식이 빠른 클론 (Rapidly Expanding Clone : REC) 을 얻고 있고, 도너에게서 유래하는 MSC 의 증식성의 차를 배제할 수 있는 정제 분리 방법을 확립하였다 (일본 특허 제6463029호, WO 2016/017795, Mabuchi Y.et al., Stem Cell Reports 1 (2) : 152-165, 2013). 이 방법에서는, 예를 들어 Ror2 의 발현을 지표로 하여 REC 를 분리 선별하고 있다.

[0007] 또, 정제가 끝난 간엽계 줄기세포 조성물 및 간엽계 줄기세포 조성물을 정제하는 방법도 알려져 있고 (일본 특허 6025329호), 이 방법에서는, 직경이 150 μm 이하인 간엽계 줄기세포가 정제되어 있다.

[0008] 그러나, REC 의 클론에는 분화능이나 증식능에 있어서 여전히 편차가 관찰된다. 또, 증식성이 우수한 REC 라고 해도 계대 (繼代) 에 의한 열화는 피할 수 없어, 유효한 품질 관리 방법이 요구되고 있었다. 그리고, Ror2 의 발현을 지표로 한 경우에도 증식능과의 상관에는 개선의 여지가 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 일본 특허 제6463029호
- (특허문헌 0002) 국제 공개 2016/017795호 팜플렛
- (특허문헌 0003) 일본 특허 제6025329호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Mabuchi Y Morikawa S, Harada S ; Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. Stem Cell Reports 1 (2) : 152-165, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 그래서 본 발명에 있어서는, 고순도이며 균일성이 높은 REC 의 선별 방법, 및 세포 성능을 담보하는 지표를 확립할 것이 요구되고 있었다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자는, 상기 과제를 해결하기 위해 검토를 실시한 결과, 인간 골수액으로부터 LNGFR 및 Thy-1 이 모두 양성인 세포를 얻어, 단일한 세포로부터 수 많은 REC 의 클론을 제조하여, 분화능 및 증식능의 측정을 반복하는 동안에, 세포의 크기와 균일성이, 각각의 클론의 분화능 및 증식능과 보다 강하게 상관하는 것을 알아내었다.

[0013] 또 본 발명자는, 각 클론을 구성하는 세포의 크기와 그 편차를 플로 사이토메트리에 있어서의 전방 산란광 (FSC) 을 지표로 분석하여, 사이즈가 작고 FSC 의 CV 값이 작을수록, 증식능, 분화능이 우수한 것을 알아내어, 이 지표를 기초로 각 클론의 선별을 실시함으로써 일정한 범위 내의 기능을 갖는 세포를 제조할 수 있는 것을 알아내었다.

[0014] 즉, 본 발명은 이하와 같다.

[0015] (1) LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는, 상기 세포 집단.

[0016] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

[0017] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

[0018] (2) 변동 계수가 30 % 이하인, (1) 에 기재된 세포 집단.

[0019] (3) 평균 세포 사이즈가 14 μm ~ 18 μm 인, (1) 또는 (2) 에 기재된 세포 집단.

[0020] (4) LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단의 품질을 평가하는 방법으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는 세포 집단을, 고품질이라고 판정하는, 상기 방법.

[0021] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

[0022] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

[0023] (5) 변동 계수가 30 % 이하인, (4) 에 기재된 방법.

[0024] (6) 평균 세포 사이즈가 14 μm ~ 18 μm 인, (4) 또는 (5) 에 기재된 방법.

[0025] (7) LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단으로부터, 임상에 적용 가능한 세포 집단을 선별하는 방법으로서, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족하는 세포 집단을, 치료용 간엽계 줄기세포 집단으로서 선별하는, 상기 방법.

[0026] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.

[0027] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.

[0028] (8) 변동 계수가 30 % 이하인, (7) 에 기재된 방법.

[0029] (9) 평균 세포 사이즈가 14 μm ~ 18 μm 인, (7) 또는 (8) 에 기재된 방법.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 의해, 세포의 크기에 균일성을 갖고, 게다가 증식능, 분화능이 우수한 간엽계 줄기세포 집단을 선별할 수 있었다. 선별된 세포 집단은 임상에 적용할 수 있는 품질을 갖고 있으며, 심근경색, 뇌경색, 척수 손상, 뼈 또는 연골 형성 관련 질환, 이식편대 숙주병 (GVHD), 간경변, 표피 수포증, 하지허혈 등의 치료에 사용하는 것이 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1 은 본 발명에 있어서 REC 를 선별하는 수법의 개요를 나타내는 도면이다.

도 2 는 플로 사이토메트리에 의한 전방 산란광 (FSC) 의 CV 값의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 3 은 세포 증식능 및 지방 분화능을 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4 는 REC 클론의 망라적 해석 결과를 나타내는 도면이다.

도 5 는 본 발명의 해석 결과의 정리를 나타내는 도면이다.

도 6 은, REC 클론의 망라적 해석 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0033] 1. 개요
- [0034] 본 발명자는, 이전의 연구에 의해, LNGFR (CD271) 이 양성인 간엽계 줄기세포 (CD271+ 세포), 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 간엽계 줄기세포 (CD271+CD90+ 세포) 중에서, 증식이 빠른 고속 증식성의 세포 클론 (Rapidly Expanding Clone : REC) 을 단리하는 것에 성공하였다.
- [0035] 이 REC 는, 96 웰 플레이트에 1 개씩 세포를 파종하여 배양했을 때에, 2 주 동안에 컨플루언트에 이를 수 있는 세포이고, 종래법으로 얻은 간엽계 줄기세포와 비교하여, 증식능, 분화능 및 유주능 (遊走能) 의 전부가 1000 배 이상의 능력을 갖는다. 그리고, 특히 유주능을 유지하고 있기 때문에, 경정맥 내 투여가 가능해져, 뼈·연골 형성 부전증 등의 위중한 전신성 질환으로의 응용을 기대할 수 있다.
- [0036] 그러나, 이와 같은 REC 클론이어도, 그 중에는, 분화능이나 증식능에 있어서 편차가 관찰되는 경우가 있다.
- [0037] 본 발명은, 이와 같은 편차가 적은 세포 클론, 및 당해 세포 클론의 선별 방법을 제공하는 것이다.
- [0038] 본 발명의 세포 클론을 포함하는 세포 집단은, LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성이고, 또한, 증식이 빠른 간엽계 줄기세포 클론의 집단이며, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징을 만족한다.
- [0039] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.
- [0040] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.
- [0041] 2. 인간 간엽계 줄기세포 농축 방법
- [0042] 본 발명에 있어서, LNGFR (CD271) 이 양성, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 간엽계 줄기세포를 얻기 위해서는, 예를 들어 WO 2009/31678호에 기재된 방법에 따를 수 있다.
- [0043] 그 방법의 개요는 이하와 같다.
- [0044] 먼저, 인간 간엽계 줄기세포가 포함되는 세포 집단으로부터, LNGFR (CD271) 이 양성 (CD271+), 또는 CD271 및 CD90 이 공양성 (CD271+CD90+) 인 세포 분획을 선별함으로써, 간엽계 줄기세포를 고도로 농축한다. 또한, 인간 간엽계 줄기세포가 포함되는 세포 집단에 혈구계 세포가 포함되는 경우에는, 비혈구계의 세포를 선별하기 위해, CD45 및 CD235a 가 공음성 (共陰性) (CD45-CD235a-) 인 세포를 선별하는 공정을 추가해도 된다.
- [0045] 간엽계 줄기세포가 포함되는 세포 집단은, 플로 사이토메트리나 아피니티·크로마토그래피에 의해 조제할 수 있다.
- [0046] 이 세포 집단을 얻기 위한 재료는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 골수나 말초혈 (G-CSF 투여 후의 말초혈을 포함한다) 등을 들 수 있다. 또한, 골수는, 척추, 흉골, 장골 등의 골수를 사용하면 된다.
- [0047] 세포 조제시, 재료가 간엽계 줄기세포를 말려들게 한 세포 덩어리가 되어 있는 경우에는, 필요에 따라, 재료에 대해 피펫팅 등에 의한 물리적 처리나, 트립신, 콜라게나아제 등에 의한 효소 처리를 실시할 수 있다. 또, 재료에 적혈구가 혼입되어 있는 경우에는, 미리 적혈구를 용혈해 두는 것이 바람직하다.
- [0048] 상기와 같이 조제된 세포 집단을 사용하여, CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별한다.
- [0049] CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별하는 방법으로는, 예를 들어, 항체를 사용하는 방법을 들 수 있다.
- [0050] 항체는, CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별하는 것이 가능한, 항 CD271 항체 및/또는 항 CD90 항체이다. 선별에 플로 사이토메트리를 사용하는 경우에는, FITC, PE, APC 등의 상이한 형광 색소로 표지된 항 CD271 항체, 또는 항 CD271 항체와 항 CD90 항체를, 적절히 조합하여 사용함으로써, 생세포를 단시간에 선별하는 것이 가능해진다. 또, 플로 사이토메트리 이외에도, 자기 비드를 사용하는 방법이나 아피니티·크로마

토그래피를 사용하는 방법에 의해, CD271+CD90+ 세포를 선별하는 것이 가능하다.

- [0051] 또한, 이들 방법을 사용하기 전에, 미리, 사 (死) 세포를 염색하는 형광 색소 (예를 들어, PI) 를 세포 집단과 반응시키고, 형광으로 염색된 세포를 제거함으로써, 사세포를 제거해도 된다.
- [0052] 3. REC 세포 농축
- [0053] 다음으로, 선별한 LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR 및 Thy1 공양성 세포를 단일 세포 (클론) 배양하여, 증식이 빠른 로트를 선택함으로써, 증식능·분화능·유주능 이 우수한 고순도 인간 간엽계 줄기세포 (REC : Rapidly Expanding Clone) 를 얻는다.
- [0054] 도 1 에 단클론 배양법에 의한 REC 분리 공정을 예시한다.
- [0055] 인간 골수 또는 지방·태반 용모막으로 단핵세포를 조제하고, 골수 단핵세포포를 항 LNGFR 단독, 또는 항 LNGFR 및 항 Thy1 로 염색한다. 다음으로, 플로 사이토메트리 (셀 소터) 를 사용하여, LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR 양성 및 Thy1 양성 세포를 96 구멍 배양 플레이트에 클론 소트한다. 즉, 1 웰에 세포 1 개씩 과중한다. 단일 세포 배양 2 주일 후에 배양 플레이트를 현미경하에서 촬영하고, 컨플루언트 또는 세미 컨플루언트가 된 웰을 선별하여, 당해 웰에 포함되는 세포를 REC 로 한다.
- [0056] 여기서, 「증식이 빠르다」, 「고속 증식성」이란, 96 구멍 배양 플레이트의 1 웰에 세포 1 개씩 과중하여 배양했을 때에, 배양 개시 2 주일 후 또는 그 이전에 배양 플레이트가 컨플루언트 또는 세미 컨플루언트가 될 정도의 증식 속도 (배가 시간 (더블링 타임) 이 26 ± 1 시간) 를 갖는 것을 의미한다.
- [0057] 컨플루언트란, 배양 용기 표면 (배양면) 의 90 % 이상을 배양 세포가 덮고 있는 상태이다. 또, 세미 컨플루언트란, 배양 용기 표면 (배양면) 의 70 ~ 90 % 를 배양 세포가 덮고 있는 상태이다. 사용하는 배양 기구의 사이즈 및 종류는, 세포의 증식 속도에 따라 적절히 변경 가능하다. 느리게 증식하고 있는 세포 (Moderately/Slowly Expanding Cells), 즉 단일 세포 배양 2 주 후가 되어도 세미 컨플루언트 또는 컨플루언트가 되지 않았던 세포는 과기한다. REC 로서 선별한 각 웰로부터 회수한 REC 를 각 웰마다 배양 플라스크에 이입하고, 추가로 컨플루언트가 될 때까지 배양한다 (확대 배양). 그 후, 확대 배양한 세포를 따로 따로 회수한다. 1 웰 유래의 REC 를 1 로트로 하고, 이것을 후술하는 선별에 사용한다.
- [0058] 여기서, 본 발명의 세포는, 1 웰에 세포 1 개씩 과중하는 클론 소트에 의해 얻어진 것이기 때문에, 증식된 세포끼리의 유전 형질은 모두 동일하다. 따라서, 본 발명에 있어서는 세포 집단을 전체를 「클론」이라고 하는 경우도 있고, 세포 집단을 구성하는 개개의 세포를 「클론」이라고 하는 경우도 있다.
- [0059] 또, 본 발명에 있어서, 선별에 사용하기 위한 REC 는, REC 마커 (항 Ror2) 에 의해 미리 평가해 둘 수도 있다. 예를 들어, 상기 확대 배양 후, 전체 로트로부터 부착 증식된 세포를 회수하여, 각 로트의 일부 ($1 \sim 3 \times 10^5$ 개 정도) 의 세포를 나누고, 항 Ror2 에 대한 모노클로날 항체로 단일 염색을 실시한다. 항 Ror2 에 대한 모노클로날 항체로 단일 염색을 실시하는 수법은 공지이다 (WO 2016/17795). 요약하면, REC 마커를 사용한 플로 사이토메트리 해석에 의해, 회수 세포에 있어서의 REC 마커 양성 세포의 비율을 구한다. 비율은, 정량적 PCR 을 사용하여 Ror2 의 mRNA 발현을 정량해도 되고, 현미경에 의해 동 비율을 매뉴얼에 의해 구해도 된다. 상기 양성 비율이 일정값 (예를 들어 65 %) 이상의 로트 (세포 집단) 를 합격으로 하고, 이것을 후술하는 선별에 사용할 수도 있다.
- [0060] 4. 본 발명의 줄기세포 집단의 선별
- [0061] 본 발명에 있어서는, 개개의 로트의 REC 클론에 대해, 세포의 증식능, 지방 분화능, REC 특이적 마커 발현량, 세포 사이즈의 균일성을 조사하고, 각각의 상관성을 해석함으로써, 고순도이며 보다 세포 성능이 높은 REC 를 선별하는 것이 가능해졌다.
- [0062] 본 발명에 있어서는, 전방 산란광의 변동 계수 (Coefficient of Variation : CV 값) 및 세포의 평균 사이즈를 선별의 지표로 한다.
- [0063] 전방 산란광 (Forward Scatter) 이란, 레이저광의 축에 대해 앞방향의 작은 각도로 산란하는 광이다. 전방 산란광은, 세포 표면에서 발생하는 레이저광의 산란광, 회절광 및 굴절광으로 이루어지고, 샘플의 크기에 관한 정보가 얻어진다.
- [0064] 변동 계수 (Coefficient of Variation : CV) 는, 표준 편차를 평균값으로 나눈 값으로, 단위가 상이한 데이터의

편차나, 평균값에 대한 데이터와 편차의 관계를 상대적으로 평가할 때에 사용하는 수치이다.

- [0065] 본 발명에 있어서는, 상기 CV 값이 35 % 이하인 것을 선별한다. CV 값이 35 % 이하인 세포 집단은, 크기가 균일한 세포에 의해 구성되어 있는 세포 집단이다. 바람직하게는, CV 값은 30 % 이하, 25 % 이하, 또는 20 % 이하이다.
- [0066] 또, 본 발명에 의해 선별된 세포 집단에 있어서의 세포의 평균 사이즈는, 20 μm 이하이다. 바람직하게는 18 μm 이하이고, 14 μm ~ 18 μm 의 범위의 크기이다.
- [0067] 본 발명은, LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR (CD271) 및 Thy-1 (CD90) 이 공양성인 고속 증식성 간엽계 줄기세포 클론의 세포 집단의 품질을 평가하는 방법도 제공한다. 본 발명에 있어서는, 이하의 (a) 및 (b) 의 적어도 1 개의 특징, 바람직하게는 양방의 특징을 만족하는 세포 집단을, 고품질이라고 판정한다.
- [0068] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35 % 이하이다.
- [0069] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μm 이하이다.
- [0070] 이와 같이 하여 평가 및 선별된 세포 집단은, 당해 집단을 구성하는 세포 클론의 수가 한정되는 것은 아니고, 예를 들어 1 ml 의 용액에 $0.8 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^7$ 개 정도의 세포를 갖는다.
- [0071] 또, 당해 세포 집단은, 치료용 간엽계 줄기세포 집단으로서, 예를 들어 이하의 질환의 치료 목적으로 한 임상에 적용하는 것이 가능하다. 단, 질환은 이것들에 한정되는 것은 아니다.
- [0072] 유전자 질환 (표피 수포증, 저포스파타아제증 등)
- [0073] 뼈관절 질환 (무릎 연골 결손, 변형성 슬관절증, 추간관 헤르니아 등)
- [0074] 심질환 (심근경색, 허혈성 심부전 등)
- [0075] 간장 질환 (간경변, 비알코올성 지방성 간염 등)
- [0076] 실시예
- [0077] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단, 본 발명의 범위는 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0078] [실시예 1]
- [0079] 1. 플로 사이토메트리에 의한 전방 산란광 (FSC) 의 CV 값 측정
- [0080] 공지 방법 (WO 2016/17795) 및 도 1 에 나타내는 스킴에 의해 미리 조제해 둔 REC 클론 (클론 번호 : 1 ~ 45) 을, 플로 사이토메트리에 의한 전방 산란광의 CV 값 측정에 사용하였다.
- [0081] 플로 사이토메트리에 있어서의 FSC 는 세포의 표면적 또는 크기에 비례한다. 본 실시예에서는, FSC 의 CV 값을 지표로 하여 세포 사이즈의 편차를 평가하였다. 도 2 에, 플로 사이토메트리에 의한 전방 산란광의 CV 값 측정 결과를 나타낸다.
- [0082] (a) 개개의 REC 클론에 대해 PI 염색을 실시하고, PI 음성의 생세포 집단에 게이트를 설정하여, 사세포를 해석의 대상으로부터 제외하였다.
- [0083] (b) PI 음성의 생세포 집단을 FSC/SSC 의 사이토그램으로 전개하고, 메인의 세포 집단에 게이트 (P1) 를 설정하여, 먼지나 노이즈를 해석의 대상으로부터 제외하였다.
- [0084] (c) P1 게이트 내의 세포 집단을 FSC 의 히스토그램으로 전개하고, 마커 (M1) 를 설정하여, CV 값을 측정하였다.
- [0085] 2. 세포 증식능 및 지방 분화능의 평가 (도 3)
- [0086] (1) 세포 증식능의 평가 방법
- [0087] 1×10^5 개의 REC 세포를 100 mm 배양 접시에 파종하고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 환경하에서 5 일간 배양하고, 그 후, 셀 카운터를 사용하여 세포수 및 평균 세포 사이즈를 측정하였다. 또한, 배양액은, FBS, 염기성 FGF (basic FGF), Hepes, 페니실린-스트렙토마이신 (Penicillin-Streptomycin) 을 첨가한 DMEM 배지 (후지 필름 와코 순약

사) 를 사용하였다.

[0088] (2) 지방 분화능의 평가 방법

[0089] 5×10^4 개의 REC 세포를 24 구멍 플레이트에 과중하여, 37 °C, 5 % CO₂ 환경하에서 2 일간 배양하고, 그 후, 지방 분화 유도 배지로 치환하고, 추가로 14일간 배양하였다. 배양 14 일 후에 오일 레드 0 염색을 실시하고, 화상 해석에 의해 지방 방울 면적을 산출하였다. 또한, 지방 분화 유도 배지는, (1) 의 배양 배지에 덱사메타손 (Dexamethasone), 인도메타신 (Indomethacin), IBMX 를 첨가한 배지를 사용하였다.

[0090] 3. 망라적 해석

[0091] 1 회의 소팅으로 얻어진 REC, 45 클론에 대해 망라적 해석을 실시하였다 (도 4).

[0092] 각각의 REC 클론에 대해, FSC 의 CV 값, 세포 증식율 (증식능), 평균 세포 사이즈, 지방 분화능을 조사한 결과, FSC 의 CV 값이 낮은 REC 클론 (#3, #5, #15, #16, #17) 은 증식능, 분화능이 모두 높고, 평균 세포 사이즈가 작은 것을 알 수 있었다.

[0093] 한편으로, FSC 의 CV 값이 높은 REC 클론 (#7, #32, #39, #40, #44) 은, 증식능, 분화능이 모두 낮고, 평균 세포 사이즈가 큰 것을 알 수 있었다.

[0094] CV 값 30 % ~ 35 % 의 클론의 평균 증식율은 6.4 이고, CV 값 25 % ~ 30 % 의 클론의 평균 증식율은 9.2, CV 값 25 % 이하의 클론의 평균 증식율은 15.1 이었다. 또 평균 세포 사이즈가 18 μ m ~ 20 μ m 인 클론의 평균 증식율은 7.0 이고, 평균 세포 사이즈가 16 μ m ~ 18 μ m 인 클론의 평균 증식율은 12.7, 평균 세포 사이즈가 16 μ m 이하인 클론의 평균 증식율은 21.3 이었다.

[0095] 이들 결과로부터, FSC 의 CV 값 및 평균 세포 사이즈를 지표로 하여, 증식능, 분화능이 모두 높은, 고품질인 REC 클론의 선별이 가능해졌다.

[0096] 4. 전형적 해석예의 정리 (도 5)

[0097] FSC 의 CV 값이 낮고, 평균 세포 사이즈가 작은 클론 A 는, 지방 분화능, 증식능이 모두 높은, 고품질인 REC 클론이다.

[0098] FSC 의 CV 값이 높고, 평균 세포 사이즈가 큰 클론 B 는, 지방 분화능, 증식능이 모두 낮은, 규격 외인 REC 클론이다.

[0099] [실시예 2]

[0100] 2 종의 골수액 로트 (# 18TL158166 과 # 8F5040) 를 2 개의 방법 (CD271 과 CD90 공양성 및 CD271 단독) 으로 소트하고, 얻어지는 Colony, REC, MEC, SEC 의 비율을 비교하였다 (도 6).

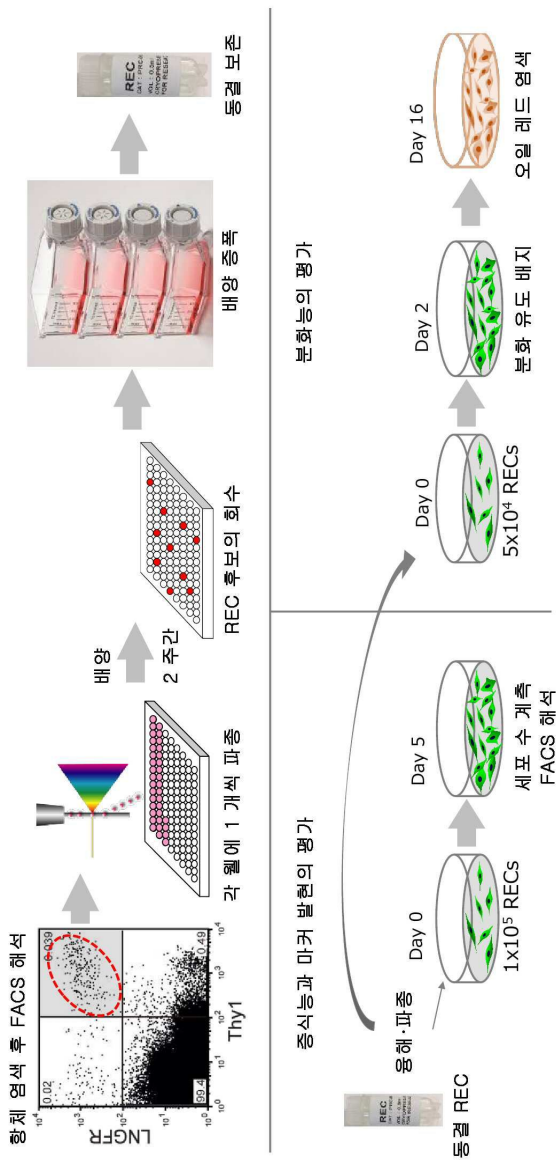
[0101] 도 6 에 있어서, 좌패널은 셀 소팅의 결과를 나타낸다. 프레임으로 둘러싼 부분의 세포를 96-well 의 플레이트에 과중하여, 얻어지는 콜로니의 비율을 오른쪽 표의 "Colony" 에 나타냈다. 얻어진 콜로니 중, 증식이 빠른 콜로니 (REC), 중간 정도의 콜로니 (MEC), 증식이 늦은 콜로니 (SEC) 의 비율을 표 중에 나타냈다.

[0102] LNGFR, CD90 공양성을 지표에 소트한 경우와 비교하여, LNGFR 단독으로 소트한 경우, 콜로니가 얻어지는 비율은 많았지만, REC 가 얻어지는 비율은 낮았다.

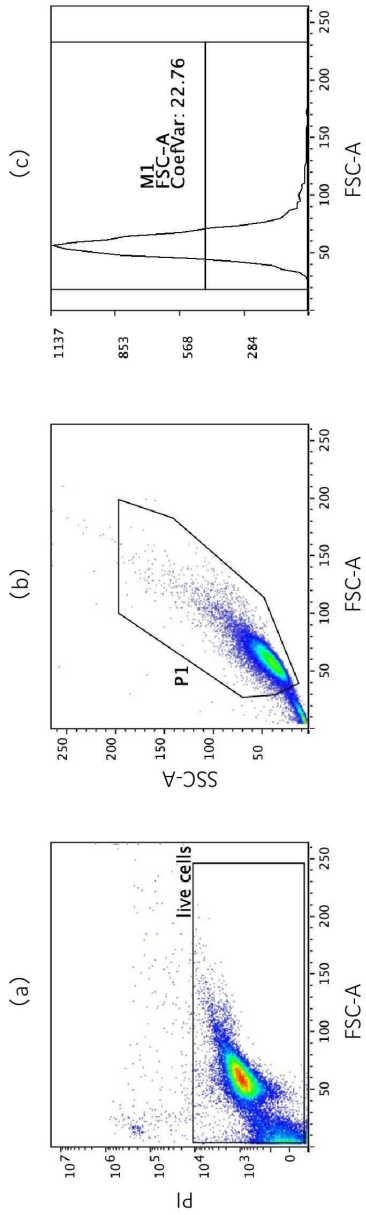
[0103] 그러나, LNGFR 양성 단독으로 소트해도, REC 를 분리할 수 있는 것을 알 수 있었다.

도면

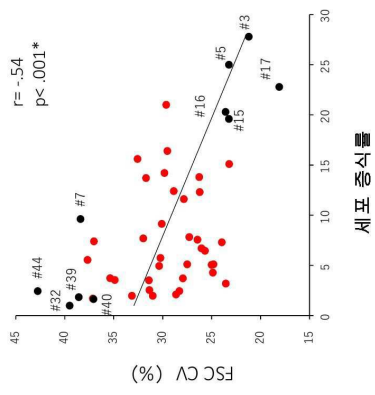
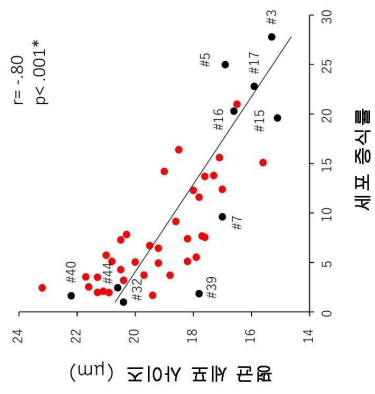
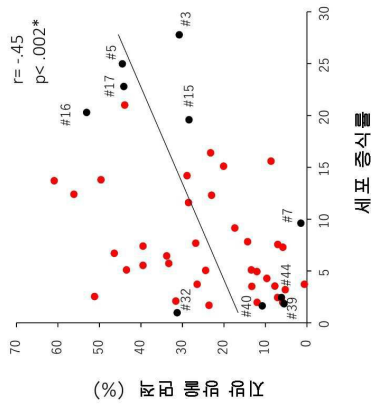
도면1



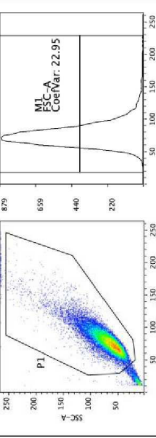
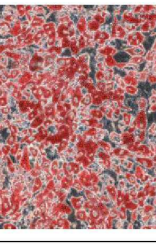
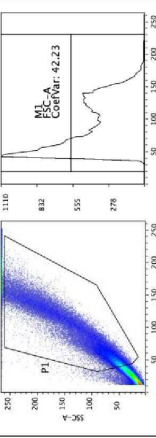
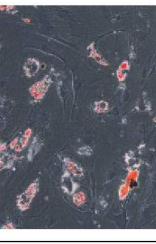
도면2



도면4



도면5

	FSC CV 값	지방 분화능	중식능	평균 세포 사이즈 (μm)
(A)			25.0	16.9
(B)			2.4	20.9

도면6

