(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0029569
(43) 공개일자 2021년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 35/32* (2015.01) *A61K 35/28* (2015.01)
*A61P 1/16* (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 35/32* (2013.01)
*A61K 35/28* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0110968
(22) 출원일자 2019년09월06일
심사청구일자 2019년09월06일

(71) 출원인
**경상국립대학교산학협력단**
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
**주식회사 스템센트릭**
경기도 안양시 동안구 시민대로 230, 지니센터 디동 2449호 (관양동, 평촌아크로타워)
(72) 발명자
**노규진**
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 102동 2903호 (가좌동, 센트럴웰가)
**김경민**
서울특별시 서초구 동광로1길 112, 101동 1103호 (방배동, 롯데캐슬헤론)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**김순웅**

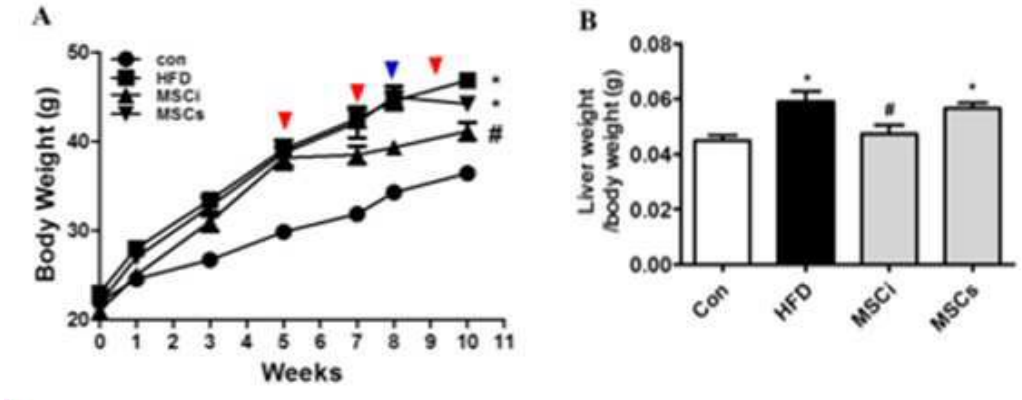
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **치아 주변조직 유래 다분화능 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 초자화 동결보존된 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 체중 감소, 혈청 아디포카인 농도 감소, 간의 조직학적 소견 회복 및 간 내 지질대사효소를 개선시켜 비만 또는 비알코올성 지방간에 대한 현저한 예방 및 치료 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 유효성분인 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 안전성이 검증된 중배엽성 줄기세포이면서, 가장 비침습적인 방법으로 세포를 얻을 수 있어, 비만 또는 비알코올성 지방간에 대한 세포 치료제로서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*A61P 1/16* (2018.01)
*A61P 3/04* (2018.01)
(72) 발명자
**장시정**
경상남도 진주시 동부로43번길 10-13, 102동 305호(호탄동, 삼성아파트)
**이성림**
경상남도 진주시 새평거로 25 (더 퀸즈 웰가) 102동 1602호
**박봉욱**
경상남도 진주시 새평거로 112, 102동 1204호(평거동, 진주평거 엘크루)
**이현정**
경상남도 진주시 진주대로404번길 25, 202호 (가좌동)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 치낭조직, 치배줄기조직 및 치근 유두조직으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 사랑니 (wisdom teeth) 주변조직인 것을 특징으로 하는, 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 초자화 동결보존된 것을 특징으로 하는, 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 5

치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간 치료용 줄기세포 치료제.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 치낭조직, 치배줄기조직 및 치근 유두조직으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 비만 또는 비알코올성 지방간 치료용 줄기세포 치료제.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초자화 동결보존된 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0003] 비만 (Obesity)은 체내에 과잉상태인 에너지가 지방으로 축적되어 체지방이 비정상적으로 많아 대사이상이 유발되어 나타나는 현상으로, 그 원인은 신경내분비적 원인, 약물원인, 활동량 감소, 유전적 질환으로 추정된다. 비만은 당뇨병, 심장병, 고혈압, 뇌졸중 등 합병증을 일으키는 원인으로 인식되는 만성 질환으로, 주로 식욕억제제와 지방흡수 억제제를 통한 치료가 이루어진다. 한편, 이러한 비만 약물 요법 시행 시에는 비만 약물의 부작용 측면에서 의존성 발생, 심혈관 질환의 위험 및 기분장애의 발생 우려를 염두에 두어야 한다. 예를 들어, 식욕억제제인 시부트라민 (sibutramine)의 경우 국내 비만치료제 시장에서 대표적인 치료제였으나 심혈관 질환의 위험을 높일 가능성이 있어 판매 중단된 상태이다. 따라서, 부작용이 적으면서도 비만을 유발하는 병태생리의 단계를 효과적으로 조절할 수 있는 치료제의 개발이 절실히 필요하다.

[0004] 비알코올성 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 만성 간 질환 중에서 가장 흔한 질환으로, 제2형 당뇨병, 비만 및 대사증후군과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 서구화된 식습관 및 비만, 당뇨

병 인구의 증가로 우리나라에서도 비알코올성 지방간 질환 환자가 급격하게 증가하고 있으며, 글로벌데이터(GlobalData) 사에 따르면 비알코올성 지방간 치료제 시장은 오는 2026년까지 약 253억달러 규모에 이를 것으로 전망된다. 이는 연평균 45%씩 성장하는 수치이다. 그러나, 비알코올성 지방간 질환은 정확한 병리기전이 규명되지 않았고, 현재까지 보고된 약물 치료의 효과도 연구 대상수가 충분하지 않으며, 아직까지 공식적인 승인치료제도 없는 실정이다. 따라서, 장기간 사용시에도 안정성이 확보되며, NAFLD에 대한 뚜렷한 치료 효과를 발휘할 수 있는 새로운 치료법이 필요하다.

[0005] 한편, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 (dental tissue-derived mesenchymal stem cells)는 중간엽 줄기세포의 한 종류로, 최근의 연구에 의하면 중간엽 줄기세포는 중배엽뿐 아니라 외배엽 (주로 신경세포) 혹은 내배엽 (간세포, 췌장세포 등)으로도 분화할 수 있음이 밝혀져 다분화능 (Multipotency)을 가지는 것으로 인정되고 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 10-1551900

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 비만 또는 비알코올성 지방간의 새로운 치료제를 개발하고자 노력한 결과, 초자화 동결보존된 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 고지방식이 동물모델에 투여 후 체중 감소, 혈청 아디포카인 농도 감소 및 간의 조직학적 소견이 회복되어 비만 또는 비알코올성 지방간 개선에 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간 치료용 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간 치료용 줄기세포 치료제를 제공한다.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명의 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 체중 감소, 혈청 아디포카인 농도 감소, 간의 조직학적 소견 회복 및 간 내 지질대사효소를 개선시켜 비만 또는 비알코올성 지방간에 대한 현저한 예방 및 치료 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 유효성분인 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 안전성이 검증된 중배엽성 줄기세포이면서, 가장 비침습적인 방법으로 세포를 얻을 수 있어, 비만 또는 비알코올성 지방간에 대한 세포 치료제로서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

## 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 대조군과 고지방식이로 비만 및 NAFLD가 유도된 각 실험군 마우스의 체중 (A), 간 조직 (B)의 무게를 측정한 결과를 나타낸 것이다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 2는 대조군과 각 실험군 마우스 간 조직의 조직학적 분석 결과를 나타낸 것으로, 각 행에 해당하는 H&E 염색 결과는 각각 서로 다른 마우스의 조직학적 소견을 나타낸다 (scale bar = 50 μm, Magnification = x 400).

도 3은 간 조직에 대한 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 것으로, 간 조직에서의 안드로겐 수용체 (androgen receptor, AR) 발현 정도를 확인한 결과 (A) 및 상기 발현량을 정량화한 결과 (B)에 해당한다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 4는 비만 지표인 혈청 아디포카인 (adipokine)의 수준에 대한 ELISA 분석 결과를 나타낸 도이다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0018] 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0021] 본 발명에서 용어, "줄기세포 (stem cells)"란 조직을 구성하는 각 세포로 분화 (differentiation) 되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하는 것으로, 특정 분화 자극 (환경)에 의해 특정 세포로 분화가 진행되는 세포를 의미한다.

[0022] 본 발명에서 용어, "중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)"는 중간엽 줄기세포 혹은 성체 줄기세포라고도 하며 배아 이외의 조직에서 분리 및 배양된 줄기세포를 통칭하는 것이다. 간엽줄기세포는 이미 분화가 완료된 대부분의 조직에 소량으로 존재하는 것으로 현재까지 제대혈, 탯줄, 치아, 눈, 태반, 모낭, 허파, 간 등 연구된 거의 모든 조직에서 이의 존재가 확인된 바 있다.

[0023] 본 발명에서 용어, "치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 (dental-tissue derived mesenchymal stem cells)"는 치아 및 치아 주변조직에서 유래한 성체 줄기세포, 중간엽 줄기세포와 형태가 유사한 세포 (mesenchymal stem cell-like cells)를 모두 포함하는 개념이며, 골수나 탯줄 등에 존재하는 다른 성체줄기세포에 비하여 조직의 손상을 최소화하고 (비침습적) 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어 본 발명의 유효성분으로 사용하였다. 상기 치아 주변조직은 이에 제한되지는 않으나 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 맹출 중인 치아의 치낭조직, 치배줄기조직, 미성숙 영구치의 치근 유두조직일 수 있으며, 바람직하게는 사랑니 (wisdom teeth) 주변조직일 수 있다.

[0024] 또한, 상기 조직은 중간엽 줄기세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 중간엽 줄기세포는 치아 치수 줄기세포 (dental pulp stem cells, DPSCs), 탈락 유치 줄기세포 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs), 치주인대 줄기세포 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs), 치배줄기 세포 (dental follicle stem cells, DFSCs) 및 치근단유두 줄기세포 (stem cells from apical papilla, SCAP)로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 한편, 이와 같은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 임플란트 주위염, 신경손상, 잇몸뼈 소실 등을 치료 또는 개선하기 위해 재생의학적으로 임상에 적용된 바는 있으나, 현재까지 비만 또는 비알코올성 간질환에 대한 의학적 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 치아 주변조직은 인체로부터 분리되어 초자화 동결보존된 것을 특징으로 하며, 상기 초자화 동결보존 방법은 본 발명자들의 선행특허인 한국 등록특허 10-1551900 (특허문헌 1)에 기술된 방법을 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 중간엽 줄기세포의 분리방법은 당업계에 공지되어 있는방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대 치아 주변조직으로부터 분리되고 정제될 수 있고, 분리된 중간엽 줄기세포는 필요에 따라 배양할 수도 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 비만은 대한비만학회에서 제시한 비만기준인 체지방지수 25 $kg/m^2$ 이상임을 의미하며 이

로 인해 수반된 동맥경화, 제 2형당뇨, 심근경색을 포함한 각종 대사증후군 및 심혈관질환을 의미하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 또한, 상기 비알코올성 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올에 기인하지 않은 간 세포 내의 지방 함량이 간 무게의 5% 이상인 경우로서, 간 조직 내에 지방 (트리글리세리드, 지방산 등)의 단순 축적이 일어난 상태, 간 지방증(hepatic steatosis) 상태, 간 조직 내의 지방 축적이 심해진 결과 간 조직 내에 염증반응이 일어난 질병 상태를 의미하나, 이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명에 있어서, "치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물"은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 자체일 수도 있으며, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 이외에 배양액, 줄기세포 배양 시 당업계에서 일반적으로 사용되는 물질을 포함하는 조성물을 포함하는 것이다. 또한, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포가 분비하는 물질 또는 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출한 물질을 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 대체하여 사용하는 것도 포함하는 의미이다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 이외에 약학적으로 허용 가능한 통상의 담체를 포함할 수 있고, 주사제의 경우 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 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 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있고, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소 적용이 가능하며, 본 발명에 따른 조성물의 비경구 투여용 조성물 (예, 주사제)은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어, 멸균 정제수, 약 pH 7의 완충액, 또는 생리식염수 중에 분산 및/또는 용해시켜 생체 내에 주입될 수 있으며, 필요할 경우, 보존제, 안정화제 등과 같은 통상의 첨가제를 포함할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에서 중간엽 줄기세포의 양은 $10^4$ 내지 $10^{10}$ cells/회로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 $10^5$ 내지 $10^9$ cells/회로 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 $10^6$ 내지 $10^8$ cells/회, 가장 바람직하게는 $5 \times 10^7$ 내지 $10^8$ cells/회로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 용량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 체중 감소, 혈중 아디포카인 농도 감소 및 간의 조직학적 회복을 유도하여 고지방식 섭취 또는 대사 증후군에 의하여 발생한 비만 또는 이에 따른 비알코올성 지방간을 개선시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서는, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 투여하는 경우 고지방식이 동물모델의 체중이 감소하고, 간조직의 지방침착 소견이 현저히 개선되며, 혈청 아디포카인인 TNF-α와 IL-1β가 감소하여, 비만 및 비알코올성 지방간을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 한편, 상기 혈청 아디포카인은 비만 상태에서 활성화된 지방 세포 (adipocytes)로부터 분비되며, TNF-α와 IL-1β를 비롯한 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)으로 이루어져 있다. 비알코올성 지방간의 경우 간에서 국소적으로 비만과 유사한 병리학적 증상을 나타낸다고 보고되어 있는바, 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 지방대사 활성화를 통해 아디포카인 농도를 감소시키고, 이를 통해 비만 또는 비알코올성 지방간을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 비만 또는 비알코올성 지방간 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 당업계에 공지

된 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간 치료용 줄기세포 치료제를 제공한다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 치아 주변조직은 이에 제한되지는 않으나 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 맹출 중인 치아의 치낭조직, 치배줄기조직, 미성숙 영구치의 치근 유두조직일 수 있으며, 바람직하게는 사랑니(wisdom teeth) 주변 조직일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어, "세포 치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품 (미국 FDA규정)이며, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아 있는 자가, 동종 또는 이종 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물 또는줄기세포 치료제의 투여로 비만 또는 비알코올성 지방간을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 약학적 조성물 또는줄기세포 치료제의 투여로 비만 또는 비알코올성 지방간이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다. 통계 분석은 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 one-way ANOVA followed by Tukey's test에 따라 이루어졌다. 결과는 평균 ± 표준 오차로 나타내었다. $P<0.05$인 경우 유의적인 것으로 판단하였다.

[0047] **실시예 1. 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 준비**

[0048] 모든 화학물질은 SigmaAldrich®(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 배지는 Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하여 사용하였다. 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 수득하기 위하여 본 발명자들은 새로운 동결 프로토콜을 확립하였으며, 이를 초자화 동결보존방법으로 명명하였다. 상기 방법은 에틸렌 글라이콜 (Ethylene glycol), 수크로오스 (Sucrose) 및 글루코오스를 함유하는 조직의 초자화 동결보존용 조성물을 이용하여 조직 내의 세포를 효과적으로 보존하기 위한 것으로서, 본 발명자들의 선행특허인 한국 등록특허 10-1551900 (특허문헌 1)에 기술되어 있고 이는 그 전체로 본원에 참고로 인용된다.

[0049] 보다 구체적으로, 20세 전후의 매복지치 환자에게서 발치된 후 폐기되는 치아 주변 조직을 경상대학교병원 구강악안면외과에서 제공받아 이용하였고, 멸균된 메스를 사용하여 추출된 사랑니에서 치아 조직을 분리하고 초자화 동결시켜 최소 3개월간 보관한 후 해동하였다. 조직 해동시 액체질소에 보관된 동결용 튜브를 37℃의 물에서 1~2분간 해동한 후, 동결 보존제를 완전히 제거하기 위하여 100 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신, 0.25 ㎍/㎖ 암포테리신 B (amphotericin B, Invitrogen)가 함유된 DPBS를 이용하여 1500rpm에 5분간 원심분리하여 수차례 세척하였다. 상기 치아 주변조직에서 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cell)을 분리하기 위하여 collagenase type IV (Sigma, USA)를 30분간 효소처리 하였다. 처리된 조직을 100 ㎛ cell strainer (BD FalconTM, USA), 40 ㎛ cell strainer (BD FalconTM, USA)에 각각 한차례 거른 후, 15ml 코니컬 튜브 (15ml polypropylene conical tube; BD FalconTM, USA)에 옮긴 다음 페니실린/스트렙토마이신, 암포테리신B (amphotericin B, Gibco, USA)가 함유된 DPBS를 이용하여 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 두 차례 세척하였다.

[0050] 10% FBS (fetal bovine serum), 1% L-글루타민 (Glutamax™ 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 4mL DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)을 사용하여 25 T-플라스크 (NuncTM, Roskilde, Denmark) 내에서 5% $CO_2$, 37℃와 습한 (humidity) 조건으로 상기 초자화 동결보존된 치아 주변조직에서 유래된 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 배지는 3일에 한번씩 교체하였다. 동물에 투여하기 바로 직전에, 계대배양 4~5회의 세포를 0.25% 트립신/EDTA로 배양용기 바닥에서 떼어낸 후 DPBS로 세척하였다. 혈구계수기 (hemocytometer)를 사용하여 분리한 세포들을 계수하고, 세포 $1\times10^6$ 개를 차가운 DPBS 200 ㎕에 희석하여 이후 실험에 사용하였다 (이하, MSCs라 한다).

[0052] **실시예 2. 고지방식 섭취를 통한 동물모델 제조**

[0053] 20-22g의 8주령 수컷 C57BL/6J 마우스 40마리를 Central Lab Animal Inc. (Seoul, Korea)로부터 구매하여 사용하였다. 모든 마우스는 12시간의 명암주기를 유지하여 방 온도는 25±2℃, 습도 30-40%로 사육하였고 물과 음식에 대해 자유롭게 접근 가능하게 하였다. 마우스들은 무작위로 하기 4 그룹으로 나누었다:

[0054] 1. 대조군 (Con) (n=10): 10주간 정상식이

[0055] 2. HFD 그룹 (n=10): 10주간 60 kcal%의 지방을 포함하는 고지방식이 + 10주 후 200 μl PBS 복강내 투여

[0056] 3. MSCi 그룹 (n=10): 10주간 60 kcal%의 지방을 포함하는 고지방식이 + 고지방식이 5주, 7주 및 9주 후 $1\times10^6$/200 μl MSCs를 각각 복강내 투여

[0057] 4. MSCs 그룹 (n=10): 10주간 60 kcal%의 지방을 포함하는 고지방식이 + 고지방식이 8주 후 $1\times10^6$/200 μl MSCs를 5일 연속 복강내 투여.

[0058] 매주 모든 마우스들의 체중을 측정하고, 10주 후 0.5 μL/g tiletamine-zolazepam (Zoletil®및 0.5 μL/g xylazine (Rompun, Bayer Korea Ltd., Seoul, Korea)를 주입하여 희생시켰다. 심장 천자 (cardiac puncture)하여 마우스의 혈액을 수집하고, 헤파린이 포함된 PBS로 관류하여 잔류 혈액을 제거하였다. 간 조직을 수득하고 조직 무게/체중 계산을 위해 무게를 측정하였다. 모든 동물 실험은 경상대학교의 실험동물 처치와 사용에 관한 가이드라인을 따라 수행하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0059] 도 1의 A에 나타낸 바와 같이, HDF 그룹의 체중은 고지방식이 3주부터 대조군보다 유의하게 더 높았다 ($p<0.05$). MSCi 그룹의 체중은 MSC의 첫번째 투여시 HFD 그룹과 비교하여 체중이 현저히 낮았다 ($p<0.05$). 간 중량의 경우, 도 1의 B에 나타낸 바와 같이, HFD 그룹의 간 중량은 대조군에 비해 현저히 증가하였고 ($p<0.05$), MSCi 그룹은 HFD 그룹에 비해 현저히 감소한 간 중량을 나타냈으며 ($p<0.05$), 반면 MSCs 그룹은 HFD 그룹과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다.

[0061] **실시예 3. MSC 투여 전후의 조직학적 분석**

[0062] 간에 대한 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 치료적 효과를 확인하기 위하여, 조직학적 분석을 수행하였다. 간 조직을 4% 포름알데하이드에 고정시키고 탈수시킨 다음 파라핀에 끼워 5 μm 두께의 절편으로 절단하였다. 자일렌 (xylene)을 사용하여 조직 절편에서 파라핀 성분을 제거한 후, 에탄올로 재수화 (rehydration)한 뒤 H&E (hematoxylin and eosin)으로 염색하였다. 염색된 모든 조직은 탈수, 세척과정을 거쳐 permount (Fisher scientific, NH, USA)로 마운팅한 뒤 광학현미경 (Nikon Eclipse 80i) 및 Photo Imaging System (Canon 600D)으로 염색 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0063] 도 2에 나타낸 바와 같이, 간조직의 조직학적 분석 결과 대조군은 정상 간조직의 특성을 나타낸 반면, HFD 그룹은 거대수포성 지방증 (macrovesicular steatosis) 및 심각한 증상인 미세소포형 지방증 (microvesicular steatosis)을 모두 나타냄을 확인하였다. 미세소포형 지방증은 NAFLD의 조직학적 특징에 해당한다. 한편, MSCs 및 MSCi 그룹 모두에서 심각한 지방침착소견을 보이던 간조직이 줄기세포 투여 후 정상모델과 유사한 수준으로 회복되어 간지방증이 개선됨을 확인하였으며, 특히 MSCi 그룹이 MSCs 그룹보다 현저히 개선됨을 확인하였다.

[0065] **실시예 4. MSC 투여에 따른 지질 항상성 평가**

[0066] **4-1. 웨스턴 블랏**

[0067] 지질 항상성 (lipid homeostasis)에 대한 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 투여의 효과를 확인하기 위하여 간 조직에 대하여 웨스턴 블랏을 실시하고 간과 지방 조직에서 지질 산화를 통해 지방 분해를 유도하는 안드로겐 수용체 (androgen receptor, AR)의 발현 정도를 분석하였다. 각 실험군의 간 조직을 수집하고 사용 전까지 -80℃에 보존하였다. 각 조직을 RIPA 완충액 (PIERCE, Rockford, IL, USA)을 이용하여 용균 (lysed)시켜 추출된 단백질을 BCA 단백질 분석 키트 (PIERCE)를 이용하여 정량하였다. 단백질 50 ㎍을 SDS-PAGE에 로딩하고 니트로셀룰로오스 막 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 이동시켰다. 상기 막을 1:1000으로

희석된 1차 모노클로날 항-안드로겐 수용체 (ab133273, Abcam), 1:5000으로 희석된 베타-액틴 (a5441, sigma)으로 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 이후, 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 1:10000으로 희석된 HRP-결합된 염소 항-마우스 (Invitrogen), 염소 항-래빗 (Invitrogen) 2차 항체를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 막은 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 현상하였고, ImageJ software (NIH, USA)를 사용하여 베타-액틴에 대한 타겟 단백질의 광학 밀도 (optical density)를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0068] 도 3에 나타낸 바와 같이, 간에서 AR의 농도는 유의하게 감소하였으나 ($p<0.05$), MSC 투여 후 유의하게 증가함을 확인하였다. 상기 결과를 통해 지질 산화를 포함하는 지질 대사는 AR 회복을 통해 간 조직에서 증가함을 확인하였다.

[0070] **4-2. ELISA**

[0071] 체중 감소 및 AR 발현 회복 간의 관련성을 확인하기 위하여 비만 지표인 혈청 아디포카인 (adipokine)의 수준을 ELISA 방법으로 측정하였다. 실시예 2에 기재한 방법으로 심장 천자 (cardiac puncture)하여 마우스의 혈액을 수집하고, 400 xg에서 10분간 원심분리하여 혈청을 수집하고 사용 전까지 -80℃에 보존하였다. 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포가 고지방식이에 의해 유도된 비만 및 비알코올성 지방간을 개선할 수 있는지 확인하기 위하여 ELISA를 통해 마우스 혈청에 있는 TNF-α (ADI-900-047, ENZO), IL-1β을 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0072] 도 4에 나타낸 바와 같이, 혈청 아디포카인인 TNF-α와 IL-1β 모두 HFD 그룹에서 유의하게 증가하였으나 ($p<0.05$) MSC 투여 후 감소함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 투여가 비만에서 염증 상태를 감소시키고, 그에 따라 비만을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

[0074] NAFLD를 유도시키는 다양한 동물 모델 중에서, 고지방식이 동물 모델은 인간 NAFLD와 가장 유사한 병리학적 특징을 가지며, 체중 증가, 혈당 증가 및 대사성 질병 증가와 같은 유사한 생리적 변화를 나타내는 것으로 보고되어 있다.

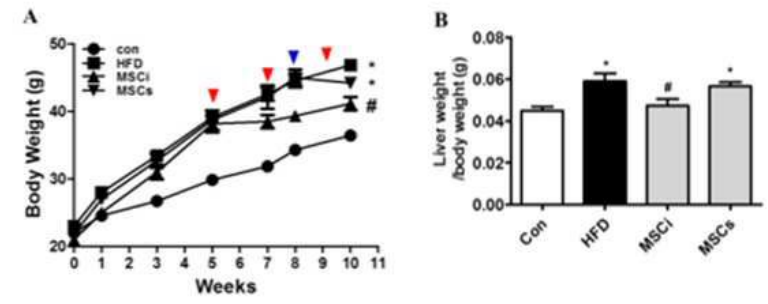
[0075] 본 발명자들은 비만 및 NAFLD의 새로운 치료제를 개발하기 위하여 고지방식이로 유도한 동물 모델을 제조하고, 상기 동물 모델에 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 투여 후 체중 감소, 혈중 아디포카인 수준의 정상화, 간 내 지질대사효소의 개선을 통해 비만 및 NAFLD가 개선될 수 있음을 확인하였다.

[0076] 뿐만 아니라, 본 발명의 유효성분인 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 가장 비침습적인 방법으로 세포를 얻을 수 있어, 본 발명은 비만 또는 비알코올성 지방간에 대한 세포 치료제로서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

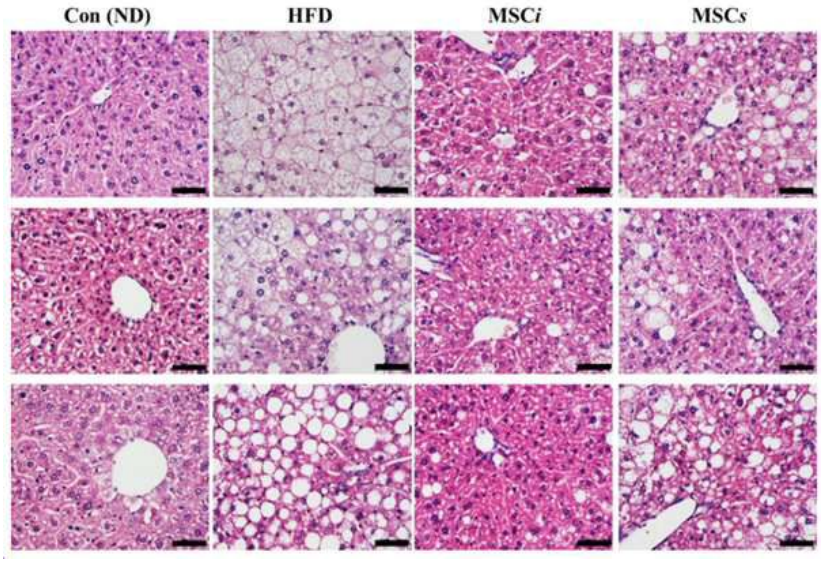
[0078] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

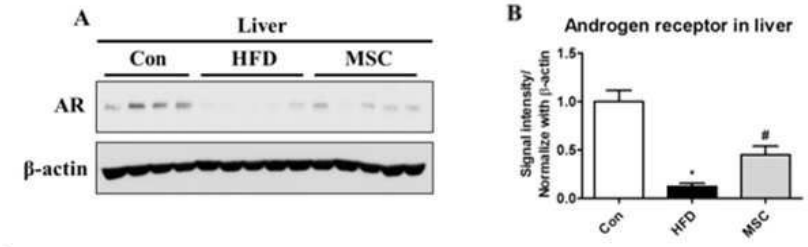
도면1



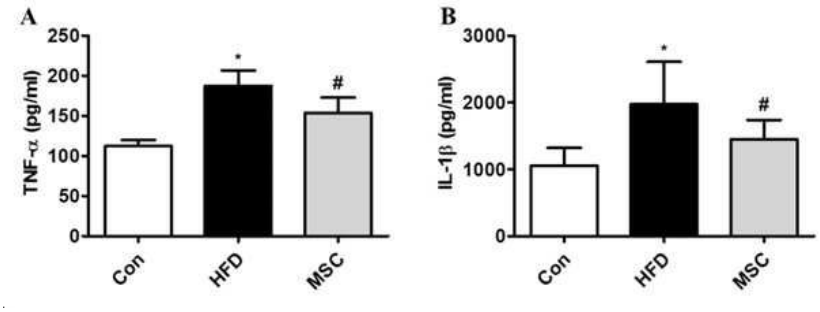

도면2




도면3



도면4


A
TNF-α (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
*
#
Con
HFD
MSC
B
IL-1β (pg/ml)
3000
2000
1000
0
*
#
Con
HFD
MSC