



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0003325
(43) 공개일자 2018년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01) A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01) A61K 35/34 (2015.01)
A61K 35/35 (2014.01) A61K 35/51 (2015.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 31/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0082997
(22) 출원일자 2016년06월30일
심사청구일자 2016년06월30일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
주명수
서울특별시 강남구 선릉로 120, 9동 701호(대치동, 개포우성아파트)
신동명
경기도 광명시 목감로 58, 116동2504호(광명동, 광명해모로이연)
김아람
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 서울아산병원 신관 11층 비뇨기과 의국(풍납동)
(74) 대리인
특허법인충현

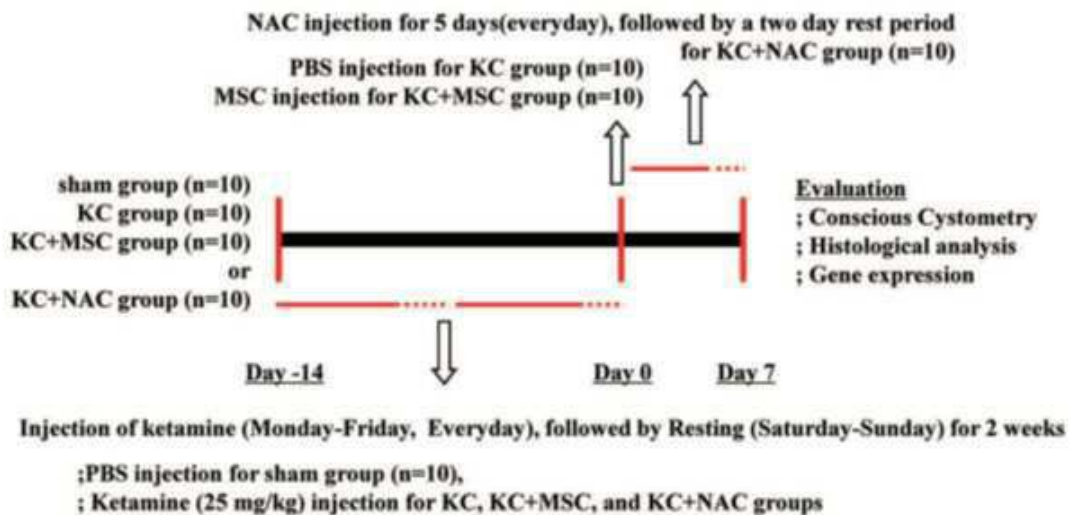
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 중간엽 줄기세포를 포함하는 케타민 유도 방광염 치료 또는 예방용 약학 조성물

(57) 요약

중간엽 줄기 세포 (Mesenchymal stem cell, MSC)의 케타민 유도 방광염(Ketamine-induced cystitis, KC)의 예방 및/또는 치료를 위한 새로운 용도에 관한 것으로, 중간엽 줄기 세포를 유효성분으로 포함하는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료용 조성물 및 이와 관련된 방법 및 용도가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4178 (2013.01)
A61K 31/4412 (2013.01)
A61K 31/69 (2013.01)
A61K 35/34 (2013.01)
A61K 35/35 (2013.01)
A61K 35/51 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C2321
부처명	보건산업진흥원
연구관리전문기관	보건복지부
연구사업명	서울아산병원_연구사업
연구과제명	단일세포 오믹스 기반에 의한 간질성 방광염 환자 맞춤형 바이오마커 개발
기 여 율	1/1
주관기관	보건복지부
연구기간	2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

중간엽 줄기 세포(Mesenchymal Stem Cell, MSC)를 유효성분으로 포함하는, 케타민 유도 방광염 (Ketamine-induced cystitis, KC)의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기 세포는 제대 유래 중간엽 줄기 세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기 세포, 골수 유래 중간엽 줄기 세포, 지방 유래 중간엽 줄기 세포, 근육 유래 중간엽 줄기 세포, 신경 유래 중간엽 줄기 세포, 피부 유래 중간엽 줄기 세포, 양막 유래 중간엽 줄기 세포, 태반 유래 중간엽 줄기 세포 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 케타민 유도 방광염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 중간엽 줄기 세포는 제대혈 유래의 것인, 케타민 유도 방광염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 케타민 유도 방광염은 케타민, 이의 대사산물, 또는 이들의 조합의 투여에 의해서 발생하는 것인, 케타민 유도 방광염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 아세틸시스테인 (N-acetylcysteine; NAC), 퍼페니돈 (Pirfenidone), 볼테조미브 (Bortezomib), 아나킨라 (Anakinra), 및 로살탄 (Losartan)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는, 케타민 유도 방광염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 6

아세틸시스테인 (N-acetylcysteine; NAC), 퍼페니돈 (Pirfenidone), 볼테조미브 (Bortezomib), 아나킨라 (Anakinra), 및 로살탄 (Losartan)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는, 케타민 유도 방광염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

중간엽 줄기 세포 (Mesenchymal stem cell, MSC)의 케타민 유도 방광염(Ketamine-induced cystitis, KC)의 예방 및/또는 치료를 위한 새로운 용도에 관한 것으로, 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료용 조성물 및 이와 관련된 방법 및 용도가 제공된다.

배경 기술

[0003]

방광은 요의 저장, 요 구성물의 유지, 및 적절한 간격으로 요의 배출을 위한 막성 근육 기관이다. 이의 구조는 상피, 고유판 (Lamina propria), 고유 근육 (즉, 배뇨근) 및 방광주위 연조직을 포함한 4 개의 기본적인 층으로 구성된다.

- [0004] 방광의 내부를 형성하며 요와 접촉하는 상피는 이행상피 또는 요로상피라고 칭하며 요와 혈액 사이의 화학적인 구배를 유지시키는 기능을 한다. 상피의 하부에 존재하는 것은 고유관, 즉, 결합조직과 혈관의 층이다. 얇으며 종종 불연속인 평활근의 층, 즉, 점막내 근육이 고유관 내부에 있다. 이러한 평활근의 표면층은 방광의 벽을 형성하는 두꺼운 평활근 다발로 구성되는 심층 근육인 고유근육 또는 배뇨근과는 구별된다. 방광주위 연조직은 방광의 외층을 포함하며 지방, 섬유조직 및 혈관으로 구성된다. 방광의 기능부전은 일반적이며, 감염된 개체에 쇠약 효과를 줄 수 있다.
- [0005] 간질성 방광염 (Interstitial cystitis, IC)은 통증, 예를 들면 골반통의 증후, 및 하부 요로 증후군(LUTS), 예를 들면 증가된 빈뇨/절박뇨를 특징으로 하는, 원인이 밝혀지지 않은 만성 방광 질환이다. 보다 최근의 용어는 이 복합 증후를 집합적으로 개시하기 위해 IC와 함께 통증성 방광 증후군(PBS) 또는 방광 통증 증후군(BPS)를 포함하는 것으로, 즉IC/PBS/BPS로 변화되고 있다.
- [0006] 한편, 케타민은 비경쟁적인 N-methyl-d-aspartic acid (NMDA) 수용체 대항제이고 몇 년 동안 전신 마취약으로 사용되었다. 케타민은 기분전환용 약으로 남용되어 사용되어왔기 때문에, 케타민 남용자의 숫자는 지난 몇 년 동안 상당히 증가했다. 장기간의 케타민 남용은 비뇨기계에 대하여 심각한 영향을 줄 수 있으며, 이로 인하여 방광염을 유발할 수 있다 (이하, 케타민 유도 방광염 (ketamine-induced cystitis; KC)). 위와 같이 부적절한 케타민의 투여는 치골상 통증 (suprapubic pain), 및 빈뇨, 요절박, 야뇨증, 배뇨통 같은 하부 요로 증후군을 갖는 것이 될 수 있다. 케타민 유도 방광염은 또한 감소된 방광 준수 (decreased bladder compliance), 배뇨근 과활동성 (detrusor overactivity), 낮은 방광 용량 (low bladder capacity), 수신증 (hydronephrosis), 그리고 신기능 장애 (impaired renal function)와 연관되는 것일 수 있다.
- [0007] 케타민 유도 방광염의 병인은 현재까지 완전히 밝혀지지 않았고, 그리하여 작은 치료법들이 케타민에 의해 유도된 방광염의 증상을 완화하기 위해서 효과적이었다. 특히, 케타민 남용자들은 방광 생체 조직 검사에서 얇고 벗겨진 요로상피, 염증, 섬유 형성, 그리고 마스트 세포 침윤으로 특징화되는 방광경 (cystoscopic)에 의한 발견과 조직학적 변화와 동일한 것을 나타냈다. 케타민과 이의 대사산물들은 요로에 직접적으로 해로운 효과를 나타내어 만성 점막하 배뇨근 염증과 방광 상피 세포의 투과성 장벽에의 기능 장애를 일으켜서 간질성 방광염 유사 증상을 초래할 수 있다고 보고되어 있다. 그러나 기존의 간질성 방광염 치료법은 케타민 유도 방광염의 치료에 효과가 없었으며, 케타민 유도 방광염을 치료하기 위한 몇 가지 치료법이 제안되었지만, 역시 치료 효과를 거두지 못하였다.
- [0008] 따라서, 케타민 유도 방광염을 치료하기 위한 치료법의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본원발명은 케타민 유도 방광염을 치료 또는 예방하기 위한 중간엽 줄기 세포의 용도에 관한 것이다.
- [0011] 일 예는 중간엽 줄기 세포를 포함하는 케타민 유도 방광염을 치료 및/또는 예방하기 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [0012] 다른 예는 중간엽 줄기 세포를 케타민 유도 방광염의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 케타민 유도 방광염의 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0013] 다른 예는 중간엽 줄기 세포의 케타민 유도 방광염의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [0014] 다른 예는 섬유화 저해제를 유효성분으로 포함하는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 과제를 해결하기 위하여, 중간엽 줄기 세포의 케타민 유도 방광염 질환의 치료적 용도를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 예는 중간엽 줄기 세포를 유효성분으로 포함하는, 케타민 유도 방광염의 치료 및/또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 다른 예는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 중간엽 줄기세포의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료방법을 제공한다.

[0019] 특히, 상기 케타민 유도 방광염은 케타민 복용에 의하여 유도되며, 이는 기저층 근처의 요로상피가 얇아 지거나 벗겨지는 증상, 및 방광 조직에서 염증, 섬유 형성, 마스트 세포 침윤, 및 세포 사멸의 증가 등을 특징으로 한다

발명의 효과

[0021] 케타민 유도 방광염에 대해서 아직까지 명확한 원인과 병태생리 (Pathophysiology)가 정확하게 밝혀져 있지 않고 적절한 치료제가 없는 실정에서, 본 발명의 중간엽 줄기 세포를 포함하는 약학적 조성물은 케타민 유도 방광염을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있는 기술을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 하기의 실시예의 시험 설계를 개략적으로 보여주는 모식도이다. (KC: 케타민 유도 방광염 (Ketamine-induced cystitis)이 유발된 그룹; Sham (대조구): 케타민 유도 방광염이 유발 없이 PBS를 투여한 그룹; KC + MSC: 케타민 유도 방광염이 유발된 그룹에 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 투여한 그룹)

도 2는 실시예 1(제대혈 유래 중간엽 줄기세포 투여)에서의 방광 내압 측정 결과를 보여주는 그래프이다.

도 3는 실시예 1에서 측정된 방광 수축 간격 (contraction interval)을 보여주는 그래프이다 (모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시됨).

도 4은 실시예 1에서 측정된 방광의 최대 수축 압력을 보여주는 그래프이다 (모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시됨).

도 5는 마스트-세포 염색 결과를 보여주는 것으로, 상단은 마스트 세포를 검출하기 위해서 Toluidine blue로 염색한 결과를 보여주는 사진이고 (붉은 화살표 X100 배율), 하단은 마스트 세포의 상대적 개수를 나타낸 그래프이다.

도 6의 상단은 방광 부분에서 세포 사멸 세포들을 TUNEL assay로 염색한 결과 (녹색)를 보여주는 사진이고 (X100 (위) 및 X200 (아래) 배율; 핵은 DAPI에 의해서 염색되어 파란색으로 표시됨), 하단은 상기 형광 결과를 정량화한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 7의 상단은 방광 부분의 섬유화 확인을 위하여 Masson's trichrome stain에 의한 염색 결과를 보여주는 사진으로 (X40 (위) 및 X100 (아래) 배율), 푸른 색이 섬유화된 조직을 나타내며, 하단은 섬유화를 정량화한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 8은 방광 부분에서의 GFP 단백질을 안정적으로 발현하는 중간엽 줄기 세포를 형광 면역조직학적 방법으로 검출한 결과를 보여주는 사진이다.

도 9는 중간엽 줄기 세포의 투여 후 1주일인 시점에서의 KC 방광 조직에서 GFP+ 세포 (녹색)와 베타-카테닌 (b-catenin+) 요로상피 세포 (붉은 색) 그리고 비멘틴(vimentin+) 기질 조직 (붉은색)을 보여주는 형광이미지로서, 이들 세포 및 조직의 공동위치화 (colocalization)를 보여준다 (핵은 DAPI로 염색 (푸른색)됨, GFP+ MSC : GFP 단백질을 발현하는 중간엽 줄기세포, Vimentin+ : Vimentin 단백질을 발현하는 요로상피 세포, b-catenin+ : b-catenin 단백질을 발현하는 기질 조직).

도 10은 방광 조직에서 염증에 관계된 유전자의 RQ-PCR 분석 결과를 보여주는 그래프로서, 각 유전자의 발현은 % Gapdh로 표시 (% Gapdh : 세포 내부의 Gapdh의 mRNA양에 대비하여 각 유전자의 mRNA 양을 %로 표시) 되었고 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다 (KC 그룹과 비교할 때 $n \geq 5$, $*p < 0.05$, $***p < 0.01$, $****p < 0.001$).

도 11은 방광 조직에서 섬유 형성에 관계된 유전자의 RQ-PCR 분석 결과를 보여주는 그래프로서, 각 유전자의 발현은 % Gapdh로 표시되었고 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다 (KC 그룹과 비교할 때 $n \geq 5$, $*p < 0.05$, $***p < 0.01$, $****p < 0.001$).

도 12의 상단은 방광 조직에서의 인산화된 Smad2 (p-Smad2) 및 인산화된 Smad3 단백질 (p-Smad3)의 형광 면역조직학적 검출 결과를 보여주는 형광이미지 (배율 X400; 핵은 DAPI로 염색됨 (푸른색))이고, 하단은 인산화된 Smad2 및 Smad3를 발현하는 세포수를 보여주는 그래프이다.

도 13은 실시예 5 (N-acetylcysteine 투여)에서의 방광 내압 측정 결과를 보여주는 그래프이다. . (KC + NAC: 케타민 유도 방광염이 유발된 그룹에 N-acetylcysteine를 투여한 그룹)

도 14는 실시예 5에서 측정된 방광 수축 간격 (contraction interval) 결과를 보여주는 그래프이다 (모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시됨).

도 15는 실시예 5에서 측정된 최대 수축 압력을 보여주는 그래프이다 (모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시됨).

도 16은 NAC 투여시의 방광내 섬유화 면적을 보여주는 그래프로써, KC 그룹과 KC+MSC 그룹의 결과를 대조군 (sham)의 결과에 대한 상대값으로 나타내었다 (데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냄).

도 17은 TGF β 의 활성화 확인을 위한 조직학적 분석 결과로서, 좌측은 인산화된 Smad2 발현 세포 개수를, 우측은 인산화된 Smad3 발현 세포 개수를 보여주는 그래프이다 (모든 정량 데이터는 대조군 결과에 대하여 정규화되었으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냄).

도 18은 마스트-세포의 침윤 (좌측) 및 세포사멸 (우측)에 관한 조직학적 분석결과를 보여주는 그래프이다 (모든 정량 데이터는 대조군에 대하여 정규화되었으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냄).

도 19는 방광 조직에서 염증과 관련된 유전자들의 RQ-PCR 분석결과를 보여주는 그래프로써, 유전자 발현은 % Gapdh으로 표시되어 있고 평균 $\pm$ 표준편차로 나타나 있다.

도 20은 섬유화와 관련된 유전자들의 RQ-PCR 분석결과를 보여주는 그래프로써, 유전자 발현은 % Gapdh으로 표시되어 있고 평균 $\pm$ 표준편차로 나타나 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 케타민 유도 방광염과 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 중간엽 줄기 세포의 용도가 제공된다.
- [0025] 일 예는 중간엽 줄기 세포를 포함하는 케타민 유도 방광염을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 다른 예는 중간엽 줄기 세포를 투여하는 단계를 포함하는 케타민 유도 방광염의 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 명세서에서 제안되는 중간엽 줄기 세포를 사용한 요법은 하기하는 효과에 의하여, 케타민 유도 방광염의 치료 및/또는 예방적 기능을 발휘할 수 있다:
- [0028] (i) 중간엽 줄기 세포들은 최소한 일주일간 요로상피의 기저층 근처의 고유층에 잘 융합되었고 그들은 직접적으로 요로상피 세포들로 분화함,
- [0029] (ii) 중간엽 줄기 세포들은 KC 방광의 섬유화에 관계되는 각 단계의 작용기전을 저해함,
- [0030] (iii) TGF β 신호의 활성화 상태를 나타내는 대리 마커인 인산화 된 Smad2와 Smad3 단백질의 양 증가함,
- [0031] (iv) 염증 반응과 관련된 Tnf- α (tumor necrosis factor- α), Cxcl10 (chemokine C-X-C motif ligand 10), 그리고 Il4 (interleukin 4), 세포 사멸과 관련된 Card10 (caspase recruitment domain family member 10), 조직 섬유 형성에 관련된 Tgf- β 1, - β 3 (transforming growth factor β -1, -3), Smad2 (SMAD family member 2), 그리고 Snail, Snai2, Snai3 (snail family zinc finger-1, -2, -3), 항-염증 시토카인 Il10 (interleukin 10)로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 유전자의 발현 감소함,
- [0032] (v) 항-염증 시토카인 Il10 (interleukin 10)의 유전자의 발현 증가.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0035] 본 명세서에 사용된 바로서, "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 이롭거나 바람직한 임상적 결과는, 비제한적으로, 증상의 완화 및/또는 제거, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정

화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 및/또는 일시적 완화 및/또는 경감 (부분적이거나 전체적으로), 질병이 없는 상태로 회복 등을 포함한다.

- [0036] "약학적 유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 유효물질의 적절한 처리량을 의미하는 것일 수 있다. 약학적 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적에 따라서, 유효물질의 약학적 유효량은 질병 상태의 제거, 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 진행 속도 지연에 적절한 양을 의미할 수 있다
- [0037] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0039] 중간엽 줄기 세포
- [0040] 본 발명은 줄기세포 (Stem cells)의 케타민 유도 방광염의 치료적 효과와 관련된 특정 기능을 이용하는 것이다.
- [0041] 줄기세포란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포로서, 배아 줄기세포 및 성체 줄기세포로 구분된다.
- [0042] "성체줄기세포 (adult stem cell)"는 제대혈(탯줄혈액) 또는 성인의 골수, 혈액, 신경 등에서 추출해낸 줄기세포로, 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포를 의미한다. 상기 성체줄기세포는 조혈모세포 (hematopoietic stem cell), 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell), 신경줄기세포(neural stem cell) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 성체줄기세포는 포유류, 예컨대 사람의 성체줄기세포일 수 있다. 성체줄기세포는 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 경향이 강한 대신에 여러 종류의 성체줄기세포를 사용하여 실제 의학에서 필요로 하는 다양한 장기 재생을 할 수 있을 뿐 아니라 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성을 지니고 있어서, 난치병/불치병 치료에 유리하게 적용될 수 있다.
- [0043] "중간엽 줄기 세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포의 한 종류로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 성체 줄기세포 중 조혈모세포는 주로 부유상태(non-adherent)로 존재하지만 중간엽 줄기 세포는 주로 부착성 세포들이다. 일 예에서, 중간엽 줄기세포는 제대혈 유래 중간엽 줄기 세포, 제대 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기 세포, 지방 유래 중간엽 줄기 세포, 근육 유래 중간엽 줄기 세포, 신경 유래 중간엽 줄기 세포, 피부 유래 중간엽 줄기 세포, 양막 유래 중간엽 줄기 세포, 태반 유래 중간엽 줄기 세포 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 제대혈 유래 중간엽 줄기 세포일 수 있다.
- [0044] 상기 중간엽 줄기 세포는 포유류, 예컨대 인간 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 적용되는 대상으로부터 유래하는 중간엽 줄기 세포 (자가 유래 중간엽 줄기세포), 또는 적용되는 대상과 동종 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0045] 제대혈이란 출산 때 탯줄에서 나오는 탯줄혈액을 말하는 것으로, 백혈구와 적혈구혈소판 등을 만드는 조혈모세포 및 혈관내피 전구세포를 다량 함유하고, 연골과 뼈근육신경 등을 만드는 중간엽 줄기 세포도 갖고 있어 의료 가치가 매우 높다. 제대혈의 특성은 조혈모세포 수가 골수나 말초혈에 비하여 높은 농도로 존재할 뿐 아니라, 그 성숙도가 더욱 미숙하며 골수에서 발견되는 조혈모세포보다도 증식, 자기 복제 및 분화능력이 훨씬 뛰어나다는 것이다. 또한, 버려지는 제대 (Umbilical cord)에서 간단한 기술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있으므로, 본 발명의 바람직한 일 태양은 인간 제대혈 유래 혈액에서 분리한 중간엽 줄기 세포를 이용하는 것이다.
- [0046] 한편, 본 발명에 따른 중간엽 줄기 세포는 당업계에서 공지된 방법에 따라 분리, 증식 및/또는 배양될 수 있다.
- [0047] 적절한 배지는 동물 세포 및 특히, 포유동물 세포의 배양을 위해 개발되거나, 또는 동물 세포 성장에 필요한 적절한 성분, 예컨대 동화성 탄소, 질소 및/또는 미량 영양소와 함께 실험실 내에서 제조될 수 있는 임의의 이용 가능한 배지를 사용할 수 있다.
- [0048] 상기 배지는 동물 세포 성장에 적절한 임의의 기본 배지, 비제한적인 예로서, 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM(Minimal Essential Medium), DMEM(Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이

용되는 배지라면 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게는, α -MEM 배지(GIBCO), K-SFM 배지, DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), DMEM/F12 배지, PCM 배지, M199/F12(mixture)(GIBCO), 및 MSC 확장배지(Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 이러한 기본 배지에, 탄소, 질소 및 미량 영양소의 동화성 공급원, 비제한적인 예로서, 혈청 공급원, 성장 인자, 아미노산, 항생제, 비타민, 환원제, 및/또는 당 공급원이 첨가될 수 있다. 그러나 당업계에서 통상의 지식을 가진 자가 다양한 조직 기원 유래 줄기세포에 가장 적합한 배지를 선택 또는 조합하여 공지의 방법으로 적절히 배양할 수 있음은 자명할 것이다. 본 발명의 일 실시예에서는 DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다.

[0049] 또한, 이 분야의 통상의 지식에 기초하여 적합한 배양 환경, 시간, 온도 등의 조건을 조절하면서 배양할 수 있음은 자명하다.

[0050] 하기하는 바와 같이, 케타민 유도 방광염의 치료에 있어서 방광 조직의 항섬유화가 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.

[0051] 따라서, 다른 예는 섬유화 저해제를 유효성분으로 포함하는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 다른 예는 섬유화 저해제를 케타민 유도 방광염의 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0052] 다른 예에서, 중간엽 줄기세포와 함께, 방광 조직의 섬유화 저해제를 유효성분으로 추가로 사용할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공되는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물은 방광 조직의 섬유화 저해제를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 제공되는 케타민 유도 방광염의 예방 및/또는 치료 방법은 섬유화 저해제를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0053] 상기 섬유화 저해제는 아세틸시스테인 (N-acetylcysteine, NAC), 퍼페니돈 (Pirfenidone; 5-Methyl-1-phenylpyridin-2-one), 볼테조밋 (Bortezomib; [(1R)-3-methyl-1-({(2S)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl)amino}butyl]boronic acid; CAS Number 179324-69-7), 아나킨라 (Anakinra; CAS Number 143090-92-0), 로살탄 (Losartan; (2-butyl-4-chloro-1-{{2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl}methyl)-1H-imidazol-5-yl)methanol; CAS Number 114798-26-4) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 섬유화 저해제는 효과를 0.1 mg/kg 내지 400 mg/kg, 1 mg/kg 내지 400 mg/kg, 또는 10 mg/kg 내지 400 mg/kg 의 1회 투여량으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 상기 아세틸시스테인은 무산소 라디칼 (oxygen-free radicals)의 제거제(scavenger) 역할을 하며, TGF β 의 구조를 직접적으로 변경하여 TGF β 의 전-섬유화 활성 (pro-fibrotic activity)을 약화시키고 이를 통해 케타민 유도 방광염의 치료 효과를 나타내는데, 이것은 실시예 5에서 확인하였다.

[0056] 케타민 유도 방광염

[0057] 본 발명은 상기 설명한 중간엽 줄기 세포, 예컨대, 제대혈 유래 중간엽 줄기 세포의 케타민 유도 방광염 치료적 용도에 관한 것이다. 이러한 치료 효과는 중간엽줄기세포의 TGF β 신호전달 체계 하향 조절능, 손상된 세포의 재생, 회복의 촉진능 등에 의하여 달성되는 것일 수 있다.

[0058] 케타민은 비경쟁적인 N-methyl-d-aspartic acid (NMDA) 수용체 대항제이고 몇 년 동안 전신 마취약으로 사용되었다. 이것은 기분전환용 약으로 남용되어왔기 때문에, 케타민 남용자의 숫자는 지난 몇 년 동안 상당히 증가했다. 장기간의 케타민 남용은 비뇨기계에 대하여 현저하게 영향을 줄 수 있다.

[0059] 본 명세서에 제안된 중간엽 줄기세포를 이용한 치료에 적용 가능한 케타민 유도 방광염은 케타민 및/또는 이의 대사산물 (예컨대, norketamine 등)의 1회 또는 2회 이상 (예컨대, 2회 내지 100회, 2회 내지 50회, 2회 내지 30회, 2회 내지 20회, 2회 내지 10회, 2회 내지 5회, 5회 내지 100회, 5회 내지 50회, 5회 내지 30회, 5회 내지 20회, 5회 내지 10회, 10회 내지 100회, 10회 내지 50회, 10회 내지 30회, 또는 10회 내지 20회) 반복 투여에 의하여 유발되는 방광염을 의미할 수 있다.

[0060] 상기 케타민 유도 방광염은 치골상 통증, 빈뇨 (urinary frequency), 요절박 (urinary urgency), 야뇨증 (nocturia), 배뇨통 (dysuria), 혈뇨 (hematuria) 등과 같은 하부 요로 증후군 등의 증상을 갖는 것 수 있다

[0061] 상기 케타민 유도 방광염은 케타민 및/또는 이의 대사산물의 투여에 따른 감소된 방광 적합성 (reduced bladder compliance), 배뇨근 과활동성 (detrusor overactivity), 낮은 방광 용량 (low bladder capacity), 수신증

(hydronephrosis), 또는 신기능 장애 (impaired renal function)와 연관되는 것일 수 있다.

- [0062] 중간엽 줄기세포를 케타민 유도 방광염 대상에게 투여시, 케타민 유도 방광염에서 관찰되는 감소된 상호 수축 간격을 증가시키거나 증가된 최대 수축 압력을 감소시키고 (도 3 및 도 4); 케타민 유도 방광염에서 관찰되는 마스트 세포의 침윤, 세포 사멸, 섬유화 정도, 및/또는 염증을 감소시키며 (도 5 내지 도 12), 중간엽 줄기 세포가 케타민 유도 방광염의 방광에 이식되어 고유관과 요로상피에 위치하여 기저층 근처의 고유층에 융합되어 직접적으로 요로상피 세포들로 분화하는 효과를 가짐을 확인하였다. 이러한 결과는 중간엽 줄기세포의 케타민 유도 방광염 치료에 있어서의 우수한 효과를 입증하는 것이다.
- [0063] 앞서 설명한 바와 같이, 기존의 간질성 방광염 치료법은 케타민 유도 방광염의 치료에 효과가 없었으며, 케타민 유도 방광염을 치료하기 위한 몇 가지 치료법이 제안되었지만, 치료 효과를 거두지 못하였다. 이러한 점을 고려할 때, 본 명세서에서 제안되는 중간엽 줄기세포를 이용한 케타민 유도 방광염의 치료 기술은 매우 의미 있는 것이라고 할 수 있다.
- [0064] 본 명세서에서 제공되는 유효성분 (중간엽 줄기세포) 또는 이를 포함하는 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여의 다양한 투여 경로로 투여 대상에게 투여될 수 있으며, 예컨대, 투여 대상의 병변 부위에 주입 또는 이식되거나, 혈관투여 (정맥투여 또는 동맥투여), 피하투여 등의 비경구 투여 경로로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 상기 약학 조성물의 투여 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물, 예컨대, 케타민 유도 방광염을 앓고 있는 포유동물 (e.g., 인간), 및/또는 상기 동물에서 유래한 (분리된) 조직, 세포 또는 이들의 배양물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 일 예에서 본 명세서에서 제공되는 케타민 유도 방광염의 치료 방법에 있어서, 치료 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 제공되는 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 제형화 된, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 현탁액, 유제, 동결건조 제제, 외용제, 좌제, 멸균 주사 용액, 이식용 제제 등의 비경구용 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0068] 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제를 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 사용 목적, 형태 등에 따라서 적절히 선택될 수 있으며, 예컨대, 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스 (sucrose), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리 식염수, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 등의 식물성 오일, 에틸올레이트 등의 주사 가능한 에스테르, 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween), 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 조성물 사용량은 치료 대상의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 암의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성, 및 상기 특정한 치료제에 대한 감수성에 의존적일 수 이 있으며, 이를 고려하여 적절히 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 중간엽 줄기세포는 치료 대상에 대하여 1 kg 질량당 $0.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 개의 세포가 투여될 수 있다. 바람직하게는, 상기 중간엽 줄기세포는 치료 대상에 대하여 1 kg 질량당 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 개의 세포가 투여될 수 있다.
- [0070] 다른 예는 상기 중간엽 줄기 세포를 포함하는 본 발명은 케타민 유도 방광염 예방 및/또는 치료용 키트 또는 패키징된 제형 형태를 포함할 수 있다. 상기 키트는 적절한 포장에 들어 있는 1회 투여 분량 또는 복수회 투여 분량이 1회 투여 분량으로 분량된 형태의 중간엽 줄기 세포를 포함할 수 있으며, 임의로 여기에 더하여, 상기 중간엽 줄기 세포의 직접 주입 또는 이식에 적절한 기구 (예컨대 주사기 등)를 함께 포함하는 형태일 수 있다.
- [0071] 이하에서는 참고예와 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명할 것이다.

[0073] <참고예 1> 케타민 유도 방광염 (Ketamine-induced cystitis, KC) 래트 모델의 준비

[0074] 본 명세서에서 수행된 모든 동물 실험들은 울산대학교 의과대학 기관의 동물 관리 및 사용 위원회에 의해서 승인되었다 (IACUC-2013-12-134). KC를 유도하기 위해서, 10주 된 암컷 흰래트 (Sprague-Dawley rats) (OrientBio, 가평, 경기도, 대한민국)에 25 mg/kg의 ketamine hydrochloride (Huons, 성남시, 경기도, 대한민국, EK1352-11)를 5일 동안 매일 정맥 내 주사를 통해 주입하였고, 이어서 2일간의 휴식기를 두었다. 이와 같은 주입 과정을 1 주기로 하여 총 2 주기를 수행하였다. 대조 그룹 (sham group) (n=10)으로, 케타민 대신 PBS를 상기와 동일한 과정으로 주입한 group을 준비하였다. 마지막으로 케타민을 주입하고 2일 후에, 래트들의 복부를 절개하고 1×10^6 개의 제대혈-유래 중간엽 줄기 세포 (KC+MSC group; n=10) 또는 PBS 비히클 (KC group; n=10)을 방광의 전면 벽 (anterior wall) 또는 돔의 점막하 조직층에 26 게이지의 바늘이 장착된 500 μ m 주사기를 이용하여 직접적으로 주입하였다.

[0075] 중간엽 줄기 세포 (참고예 2 참조) 주입 일주일 후에, 방광 내압 측정 (conscious cystometry), 조직학적 분석 및 유전자 발현 분석에 의하여 중간엽 줄기 세포의 치료 결과를 조사하였다 (하기의 실시예 1 내지 실시예 5 참조). 조직 섬유 형성을 저해하기 위해서, 200 mg/kg N-acetylcysteine (NAC, Sigma)를 매일 복강 내의 주사를 통해서 케타민이 주입된 래트에게 5일 동안 투여하였고, 이어서 2일의 회복기를 두었다 (KC+NAC group, n=10).

[0077] <참고예 2> 인간 제대혈에서 유래한 중간엽 줄기 세포의 배양

[0078] 인간 제대혈은 어머니의 고지에 입각한 동의 하에 신생아가 태어난 후에 탯줄 정맥으로부터 수집되었다. (주) 메디포스트가 인간 제대혈에서 유래한 중간엽 줄기 세포를 제공하였고, 상기 제공된 세포를 2 mM l-glutamine, 20 mM HEPES (pH 7.3), MEM 비필수 아미노산 용액, penicillin/streptomycin (Cellgro, Pittsburgh, PA), 1 mg/mL ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone), 5 ng/mL human epidermal growth factor, 10 ng/mL basic fibroblast growth factor, 그리고 50 mg/mL Long R3 insulin-like growth factor-1 (Prospec, Rehovot, Israel)들이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium high-glucose (DMEM; Hyclone, Pittsburgh, PA)에서 5% CO₂ 및 37°C의 가습된 환경에서 배양하였다. 6 계대 (passages) 미만의 중간엽 줄기 세포를 이식에 사용하여 다분화능을 확인하였다. 녹색 형광 단백질 (GFP)를 안정적으로 발현하는 제대혈-중간엽 줄기 세포를 확립하기 위해서, 세포들을 pLenti6.2/V5-DESTTM Gateway® lentiviral vector (Invitrogen)에서의 GFP를 발현하는 카세트를 포함하는 렌티 바이러스로 감염시키고, 이어서 6 mg/ml Blasticidin (Invitrogen)이 첨가된 배양 배지에서 배양하였다.

[0079] <참고예 3> 통계적 분석

[0080] 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 기록하였고 GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 차이점과 유의성은 one-way ANOVA와 Bonferroni post hoc 실험으로 확인하였다. P-values가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0082] <실시예 1> 방광내압측정 (Cystometry)을 통한 방광 기능의 평가

[0083] 최근에, 케타민을 2주 동안 매일 주입한 경우 KC 방광에서 관찰된 병적 특성을 유도할 수 있음이 보고되었다. KC 동물 모델을 이용하여, 소변을 배출하고 수축하는 방광의 능력을 측정하는 방광 내압 측정 분석(conscious cystometric analysis)을 수행하여 중간엽 줄기 세포의 이식이 케타민 유도 방광염이 걸린 방광 (KC bladder)의 배뇨 기능 (Voiding function)을 개선할 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0084] 상기 방광 내압 측정 분석은 통제하의 의식이 있는 래트에 대하여 방광 내압 측정법을 사용하여 수행하였다. 위 래트들이 마취된 후에 방광을 노출하기 위해서 정중선 치골 절개 (midline suprapubic incision)하였다. 방광에는 압력 변환기에 연결된 공기 주입식의 폴리에틸렌 50 튜브 (Clay-Adams, Parsippany, NJ, USA)를 사용하여 접근하였다. 살균된 식염수는 마이크로 주입 펌프 (Harvard-Apparatus, Holliston, MA, USA)를 통해서 40 μ L/분의 속도로 주입하였다. 요동력학 (urodynamics)은 UDS-120XLT 요동력학 측정 시스템 (Laborie-MedicalTechnologies, Toronto, Canada)을 사용하여 측정하였다. 방광내의 압력은 압력 분석기와 컴퓨터에 기초한 데이터 획득 시스템을 사용하여 기록하였다. 수축 배뇨는 소변의 손실을 일으키는 방광 압력에서의 증가로 정의된다. 수축 간격은 32분 동안 방광의 최대 수축압력 간 시간 간격을 평균한 값으로 나타냈다. 최대 수축 압

력 (mmHg)은 수축기동안 최대 압력에서 측정하였다. 불규칙적인 수축 주기의 증가가 관찰되었을 때 배뇨근 과활성 (Detrusor over-activity)으로 진단하였다. 상기 시험 과정을 도 1에 개략적으로 나타내었다.

[0085] 상기 얻어진 결과를 도 2 (방광 압력), 도 3 (수축 간격; 배뇨 패턴 분석에 의하여 수량화 됨 (n=10); 및 도 4 (최대수축압력; 배뇨 패턴 분석에 의하여 수량화 됨 (n=10))에 각각 나타냈다. 도 2 및 3에서 알 수 있는 바와 같이, 2주 동안 매일 케타민이 주입된 래트들 (KC 그룹)은 대조군 (sham 그룹) 래트들에 비하여 증가되고 불규칙한 배뇨 주기와 감소된 수축간 간격 (inter-contraction interval) (각각 118.8 ± 34.3 vs 306.5 ± 138.5 초)을 나타냈다. 반면, 중간엽 줄기 세포의 단회 주입(single injection) (KC+MSC group)의 경우는 수축간 간격이 KC 그룹에 비하여 상당히 증가 (각각 339.0 ± 131.2 vs 118.8 ± 34.3 초)하였다. 또한, 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, KC 그룹은 정상적인 대조군 래트들에 비해서 상당히 높은 최대 수축 압력 값 (27.6 ± 6.8 vs. 21.5 ± 5.6 mmHg; 도 4)을 나타냈으나, KC 그룹에 중간엽 줄기 세포를 주입한 경우 KC 그룹 래트에서 증가된 최대 수축 압력 값이 감소하였다 (18.5 ± 1.0 vs. 27.6 ± 6.8 mmHg; $p < 0.05$). 또한, KC 그룹에서 배뇨근 과활성을 가진 래트의 빈도를 100%로 했을 때, 중간엽 줄기 세포를 주입한 KC + MSC 그룹에서의 배뇨근 활성을 갖는 래트의 빈도는 20%까지 감소하였다. 위와 같은 결과들을 종합해 보면, 중간엽 줄기 세포의 단회 이식 (single transplantation)을 통해 KC 방광에서 관찰된 손상된 배뇨 기능을 회복시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0087] <실시예 2> 중간엽 줄기 세포 치료의 효과에 대한 조직학적 분석

[0088] KC 래트 모델에서의 방광은 마스트 세포 침윤 (infiltration), 조직 세포 사멸 (apoptosis), 및 조직 섬유화가 증가된 특징을 갖는다. KC 래트 모델에서 중간엽 줄기 세포의 이식에 의한 효과를 알아보기 위해서 다음과 같이 조직학적 및 면역조직 화학적 분석을 수행하였다.

[0089] 4% (v/v) 파라포름알데하이드에서 24시간 동안 고정 후, 각각의 방광을 파라핀에 함몰시키고, 마이크로톰 (microtome)으로 3 μ m 두께의 조각으로 절단하고, 슬라이드에 부착해서, 헤마톡실린과 에오신 (Hematoxylin & Eosin, H&E)으로 염색하였다. 톨루이딘 블루 (Toluidine blue) 염색 (Toluidine blue-0, Daejung Chemicals & Metals Co., 서울, 대한민국)과 Masson's trichrome 염색 (Junsei Chemical, 도쿄, 일본)에 의하여 마스트 세포 침윤과 섬유화를 각각 확인하였다. 세포 사멸을 측정하기 위해서, terminal dUTP nick-end labeling (TUNEL) (Roche, Mannheim, 독일)에 특이적인 항체를 사용하여 방광을 표지하고, 이어서 Alexa 488-결합된 항-마우스 또는 항-토끼 항체 (Molecular Probes, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 시각화하였다. 방광에서의 GFP 형광 신호를 검출하여 주입된 중간엽 줄기 세포를 추적하였다.

[0090] 상기 얻어진 결과를 도 5 내지 도 7에 나타냈다. 도 5는 마스트 세포의 침윤을 확인할 수 있는 톨루이딘 블루 염색 이미지 (상단) 및 이로부터 정량화된 마스트 세포의 상대적 개수를 나타낸 그래프 (하단; 대조군 (sham)의 마스트 세포 개수를 1로 하여 나타냄)를 보여주고, 도 6은 세포 사멸 (apoptosis)을 확인할 수 있는 TUNEL 염색 이미지 (상단) 및 이를 정량화한 그래프 (하단; 대조군 (sham)의 세포 사멸의 수준을 1로 하여 나타냄)를 보여 주며, 도 7은 조직 섬유화를 확인할 수 있는 Masson's trichrome 염색 이미지 (상단) 및 이로부터 정량화한 조직에서의 섬유화 면적을 나타낸 그래프 (하단)를 보여준다.

[0091] 도 5 및 도 6에서 확인되는 바와 같이, KC 그룹의 방광은 sham 그룹과 대비했을 때 톨루이딘 블루 (Toluidine blue)로 염색된 마스트 세포의 침윤과 TUNEL로 염색된 사멸한 세포의 수가 급격히 증가했다. 특히, 중간엽 줄기 세포의 이식에 의하여 KC 방광에서 관찰되는 마스트 세포의 침윤과 세포 사멸이 상당히 감소하는 것이 관찰되었다. 또한, 도 7에서 확인되는 바와 같이, 중간엽 줄기 세포 처리 (KC+MSC)에 의하여 KC의 중요한 특징으로 알려진 방광 조직 섬유화가 비처리군 (KC)과 비교하여 현저하게 저해되었다. 이러한 결과들을 바탕으로 중간엽 줄기 세포의 단회 주입은 마스트 세포의 침윤, 세포 사멸, 및 섬유화와 같은 비정상적 변형을 억제하여 KC 상태의 방광을 치료하는데 유리한 효과를 발휘함을 확인할 수 있다.

[0093] <실시예 3> KC 방광에서 중간엽 줄기 세포의 조직 생착 (Tissue engraftment)

[0094] 이식 후의 중간엽 줄기 세포의 생착과 그 이후 분화 상태 (fate)를 조사하기 위해서, GFP 형광 단백질을 안정적으로 발현하는 중간엽 줄기 세포 (GFP+)를 주입하여 이를 추적하였다. 구체적으로, 참고예 1 및 참고예 2를 참조하여 GFP 형광 단백질을 안정적으로 발현하는 중간엽 줄기 세포를 KC 래트에 주입하고, 일주일 후에 방광 절편을 형광 현미경으로 관찰하였다. 비교를 위하여 중간엽 줄기세포를 주입하지 않은 KC 래트에 대해서도 동일한

시험을 수행하였다

[0095] 상기 얻어진 형광이미지를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, GFP+ 세포들은 고유판 (lamina propria)에 주로 위치하였고 요로상피에 부분적으로 위치하였으나, 근육층에는 거의 존재하지 않았다.

[0096] 또한, 세포를 항-비멘틴 항체 (Cell Signaling Technology) 및 베타 카테닌 (b-catenin) 항체 (Cell Signaling Technology)로 면역 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 구체적으로, GFP+ 세포들의 상피, 간질, 근육의 분화는 각각 베타 카테닌, 비멘틴, 및 α -smooth muscle actin (α -SMA) (Santa Cruz Biotechnology)에 대한 항체로 표지하여 조사하였다. 면역 염색은 Alexa 488- 또는 564-결합된 항-마우스 또는 항-토끼 항체 (Molecular Probes, Grand Island, NY)를 사용하여 시각화하였다. 핵은 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)로 대조 염색하였다. 각 슬라이드에서 무작위로 선택된 10개의 대표적 위치에서 Image Pro 5.0 software (Media-Cybernetics, Rockville, MD)를 사용하여 정량적 디지털 이미지 분석 (Quantitative digital image analysis)을 수행하였다.

[0097] 상기 얻어진 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타난 바와 같이, 고유판과 요로상피에 존재하는 GFP+ 세포들 (녹색으로 표지)은 비멘틴 (기질 세포 마커; 붉은 색으로 표지; 상단 좌측 (x200 배율))과 β -catenin 단백질 (상피 세포 마커; 붉은 색으로 표지; 상단 우측(x200 배율))과 각각 공동위치화 되어있음을 관찰했다. 도 9의 상단의 현미경 사진 중에서 이중 점선 박스로 표시한 부분을 X400 배율로 확대하여 관찰한 사진은 하단 왼쪽과 아래쪽에 각각 나타나 있다.

[0098] 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같은 결과들은 주입된 중간엽 줄기 세포들은 최소한 일주일간 요로상피의 기저층 근처의 고유층에 잘 융합되었고 그들은 직접적으로 요로상피 세포들로 분화할 수 있음을 나타낸다.

[0100] <실시예 4> 중간엽 줄기 세포 치료에 의한 KC 방광의 조직 섬유화 저해 시험

[0101] 중간엽 줄기 세포 치료의 이점의 기본 메커니즘을 확인하기 위해서, 실시간 정량적 (Real-time quantitative, RQ)-PCR 분석을 수행하여 염증, 세포 사멸, 그리고 조직 섬유화에 관계되어 있는 유전자의 발현을 조사하였다.

[0102] RQ-PCR은 이하와 같은 방법으로 수행되었다. 방광 조직에서 유래한 전체 RNA는 RNeasy-Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 유전체 DNA (Genomic DNA)는 DNA-free Kit (Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 제조사의 지침에 따라서 Taqman Reverse-Transcription-Reagents (Applied-Biosystems)를 사용하여 mRNA (400 ng)를 역전사하였다. 역전사 반응을 하여 얻은 cDNA를 3 분 동안 95℃에서 반응하고, 그 이후에 하기에 기재된 각각의 프라이머를 사용하여 95℃에서 15초 반응과 60℃에서 1분 반응을 45회 반복하였다. iQTM SYBR Green PCR Master Mix (BIO-RAD)와 함께 iQ5 Optical System (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용한 RQ-PCR을 수행하여 (Song M, Heo J, Chun JY, et al. The paracrine effects of mesenchymal stem cells stimulate the regeneration capacity of endogenous stem cells in the repair of a bladder-outlet-obstruction-induced overactive bladder. Stem Cells Dev 2014;23:654-663), 목표 유전자 발현을 정량화하였다. 상기 RQ-PCR에서 각각의 유전자를 증폭하기 위해서 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0104] rGapdh_qRT_F1 : AGA GAG AGG CCC TCA GTT GCT (서열번호 1)

[0105] rGapdh_qRT_R1 : GGA TGG AAT TGT GAG GGA GAT G (서열번호 2)

[0106] rCxc110_qRT_F1 : GGC CAT AGG AAA ACT TGA AAT CA (서열번호 3)

[0107] rCxc110_qRT_R1 : CAT TGT TCT TCT TCA TTG TGG CAA T (서열번호 4)

[0108] rCard10_qRT_F1 : CGG AGG AAG CCA CAG ACA GT (서열번호 5)

[0109] rCard10_qRT_R1 : TGC CGG CGG AGT ATG GA (서열번호 6)

[0110] rTnfa_qRT_F1 : CCC AGA CCC TCA CAC TCA GAT C (서열번호 7)

[0111] rTnfa_qRT_R1 : CGC TTG GTG GTT TGC TAC GA (서열번호 8)

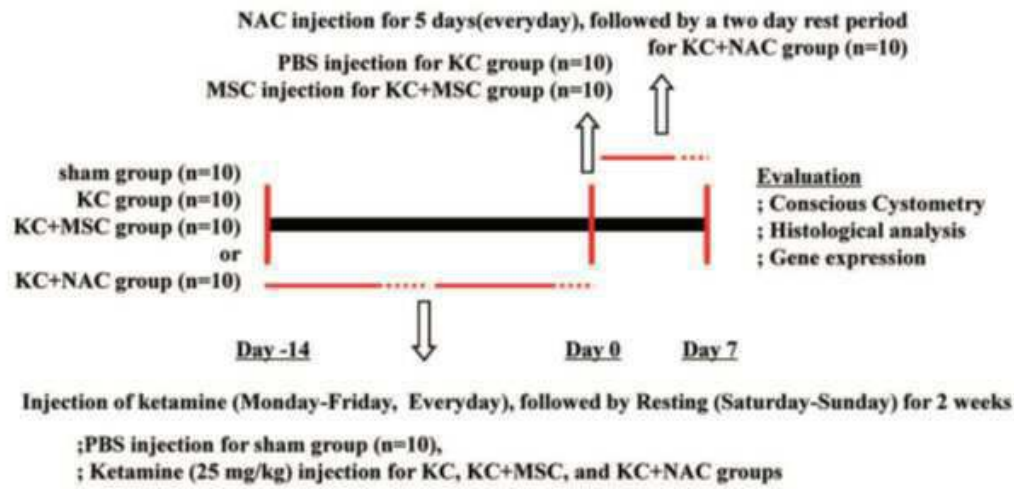
[0112] rIl14_qRT_F1 : GAG AAG CTG CAC CGT GAA TG (서열번호 9)

- [0113] rI14_qRT_R1 : TCC CTC GTA GGA TGC TTT TTA GG (서열번호 10)
- [0114] rI110_qRT_F1 : CCC TGG GAG AGA AGC TGA AGA (서열번호 11)
- [0115] rI110_qRT_R1 : CCA CTG CCT TGC TTT TAT TCT CA (서열번호 12)
- [0116] rTgfb1_qRT_F1 : ATC GAC ATG GAG CTG GTG AAA (서열번호 13)
- [0117] rTgfb1_qRT_R1 : GGA CTG GCG AGC CTT AGT TTG (서열번호 14)
- [0118] rTgfb2_qRT_F1 : CAT CCC GCC CAC TTT CTA CAG (서열번호 15)
- [0119] rTgfb2_qRT_R1 : GAT TTG AAG CAT TCT TCT CCA TTG T (서열번호 16)
- [0120] rTgfb3_qRT_F1 : CCG CAA CTT GGA GGA GAA CTG (서열번호 17)
- [0121] rTgfb3_qRT_R1 : GGT TCG TGG ACC CAT TTC C (서열번호 18)
- [0122] rSmad2_qRT_F1 : GTG ATC CCG TGG ACT GTG CTA (서열번호 19)
- [0123] rSmad2_qRT_R1 : CTC CAC AAG GTG CTT TAA CTG ATG (서열번호 20)
- [0124] rSnai1_qRT_F1 : TCG GAT GTG AAG AGA TAC CAG TGT (서열번호 21)
- [0125] rSnai1_qRT_R1 : GAC TCT TGG TGT TTG TGG AGC AA (서열번호 22)
- [0126] rSnai2_qRT_F1 : CCC CTG CCT TCA TCT GAC ACT (서열번호 23)
- [0127] rSnai2_qRT_R1 : TGG AGT CTC TCC TCT TCG TCA CT (서열번호 24)
- [0128] rSnai3_qRT_F1 : GCC CCT AGT GTG ACT CTC AAA GA (서열번호 25)
- [0129] rSnai3_qRT_R1 : CGT CTG AGC CCA GGA TTG G (서열번호 26)
- [0131] 상기 얻어진 유전자 발현량을 도 10 (염증 또는 세포 사멸 관련 유전자 발현량)과 도 11 (섬유화 관련 유전자 발현량)에 나타내었다.
- [0132] 도 10에서 확인되는 바와 같이, KC 그룹의 방광 조직은 염증 관련 유전자 [tumor necrosis factor alpha (Tnf- α), chemokine C-X-C motif ligand 10 (Cxcl10), 및 interleukin 4 (I14)]와 세포 사멸 유전자 [caspase recruitment domain family member 10 (Card10)]에 관계된 전사물의 양이 대조군 (sham 그룹)과 비교할 때 상당히 높게 나타난 반면 KC+MSC 그룹에서의 방광 조직에서는 급격하게 감소하였다. 또한, 위와 같은 결과와 연결되어 중간엽 줄기 세포를 주입한 KC+MSC 그룹의 방광 조직에서는 항-염증 시토카인 인 interleukin 10 (I110)의 발현이 상당히 증가하였으며, 이러한 결과는 중간엽 줄기 세포의 단회 주입을 통해 KC 손상에 의해서 유도된 염증과 세포 사멸을 완화시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0133] 또한, 도 11에서와 같이, transforming growth factor β -1, -3 (Tgf- β 1, - β 3), SMAD family member 2 (Smad2), 그리고 snail family zinc finger-1, -2, -3 (Snai1, Snai2, Snai3) 등의 조직 섬유화에 관련된 유전자들의 발현량이 KC 방광에서 현저하게 증가되어 있는 반면, 중간엽 줄기 세포의 주입을 한 경우에는 발현량 증가가 상당히 저해되어 대조군과 유사한 수준으로 회복됨이 확인되었다.
- [0134] 섬유화 조직은 TGF β 신호가 활성화된 특징을 가지므로, TGF β 신호의 활성화 상태를 나타내는 대리 마커인 인산화 된 Smad2와 Smad3 단백질의 수준을 측정하여 섬유화 조직을 확인하였다. 상기 인산화된 Smad2와 Smad3 단백질의 수준은 항-p-Smad2 항체 (Ser465/467, Cell Signaling Technology) 또는 항-p-Smad3 항체 (Ser423/425, Cell Signaling Technology)를 사용하는 면역조직 화학적 분석에 의하여 측정하였다 (실시예 2 및 실시예 3 참조).
- [0135] 상기 얻어진 인산화된 Smad2 및 Smad3 단백질을 나타낸 형광 이미지 (상단)와 인산화된 Smad2 및 Smad3를 발현하는 세포 비율 (하단)을 도 12에 나타내었다. 도 12 하단은 상단의 형광 이미지에서 양성을 나타내는 부분을 수치화 하고, 대조구의 수치와 비교하여 KC 및 KC + MSC를 상대적 비율로 나타냈다. 도 12에 나타난 바와 같이, KC 그룹의 방광에서만 인산화 된 단백질의 핵 염색이 관찰되었고, KC+MSC와 대조군에서는 관찰되지 않았으며, 이러한 결과는 도 12에서 얻어진 결과와 부합하는 것이다.

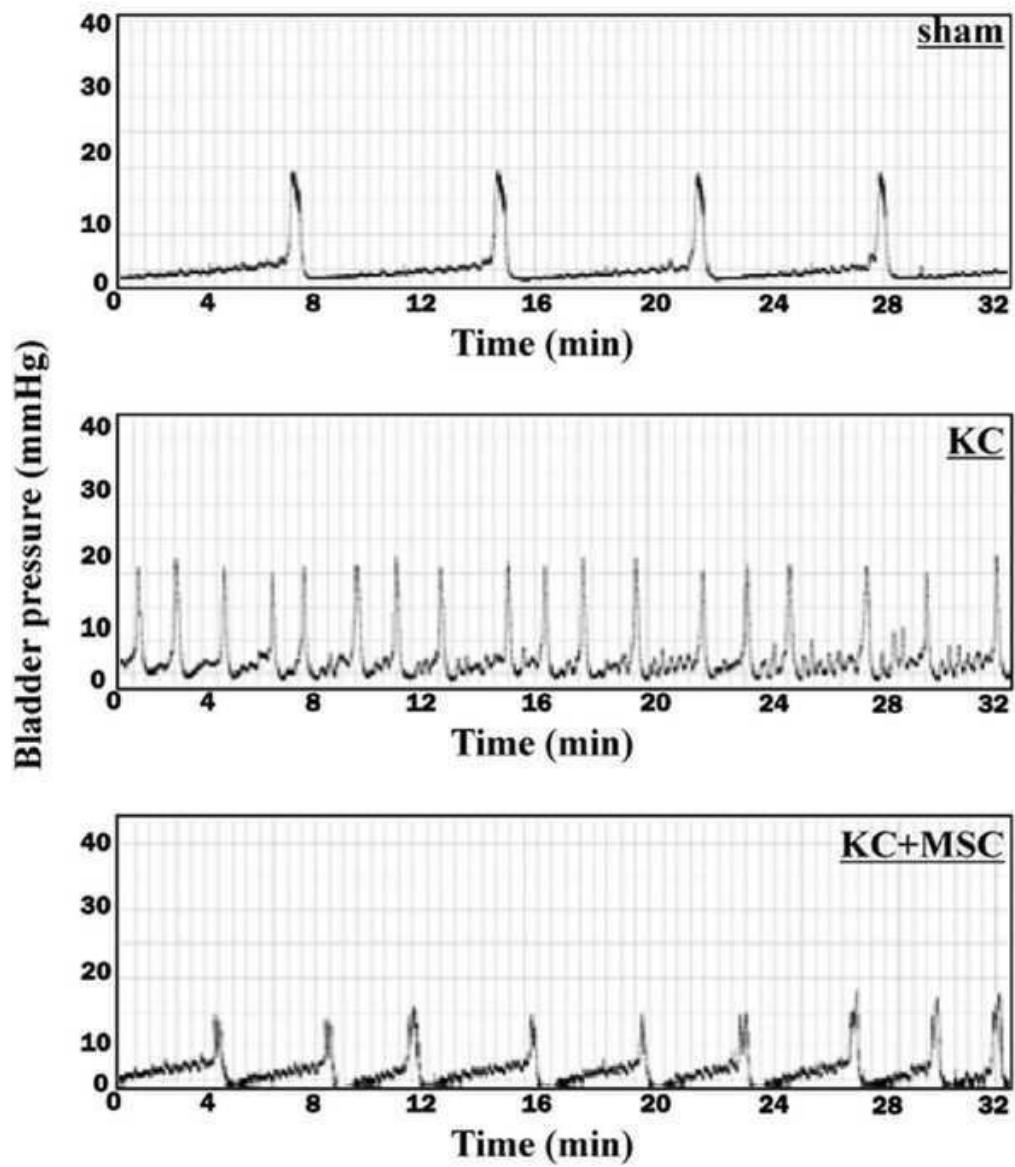
- [0136] 위와 같은 결과들을 종합하여, KC 방광에 중간엽 줄기 세포의 주입은 KC 방광에서 발생하는 염증과 조직 섬유화를 효과적으로 저해할 수 있음을 알 수 있다.
- [0138] **<실시예 5> 항-섬유화 요법의 KC 방광 치료 효과 시험**
- [0139] KC 방광의 치료에서의 항섬유화의 역할을 확인하기 위해서, 항-섬유 형성 효과를 가진 소분자 화합물인 N-acetylcysteine (NAC)를 KC 동물 모델에 처리하여 항섬유화가 KC 방광 치료에 미치는 유리한 효과를 조사하였다. 구체적으로 참고예 1의 MSC 처리와 유사하게, 매일 복강 내의 주사를 통해서 케타민이 주입된 래트에게 200 mg/kg N-acetylcysteine (NAC, Sigma)를 5일 동안 투여하였고, 이어서 2일의 회복기를 두었다 (KC+NAC group, n=10). 이 조건에서 소변을 배출하고 수축하는 방광의 능력을 측정하는 방광 내압 측정 분석을 실시예 1과 같은 방법으로 수행하였다.
- [0140] 상기 얻어진 결과를 도 13 (방광 내압), 도 14 (방광 수축 간격; 배뇨 패턴 분석을 통하여 정량화함) 및 도 15 (최대수축압력; 배뇨 패턴 분석을 통하여 정량화함)에 나타내었다. 도 13 내지 15에서 알 수 있듯이, 중간엽 줄기 세포 치료와 유사하게, 5일간 200 mL/kg의 투여량으로 매일 NAC를 주입한 경우 KC 그룹의 방광에서 관찰된 배뇨 기능의 결함을 상당히 개선되어 방광 기능이 개선됨을 확인할 수 있다.
- [0141] 실시예 2에서와 같은 방법으로 조직학적 그리고 면역조직 화학적 분석을 수행하여 NAC 처리에 따른 조직학적 변화 (섬유화, TGF β 신호의 활성화, 및 마스터 세포 침윤 및 세포 사멸)를 관찰하였으며, 얻어진 결과를 도 16 (섬유화 면적), 도 17 (TGF β 신호의 활성화 정도) 및 도 18 (마스터 세포 침윤 및 세포 사멸)에 나타내었다. 도 16과 도 17에서 볼 수 있는 것처럼, NAC 처리는 KC 방광에서 유도된 섬유화 (도 16)와 TGF β 신호의 활성화 (도 17)를 저해하였다. 또한, 도 18에서 볼 수 있는 바와 같이, NAC 처리는 마스터 세포 침윤과 세포 사멸을 포함한 KC 방광의 특징적인 병태생리적 특징의 대부분을 정상 상태로 되돌리는데 효과적이었다.
- [0142] 또한, NAC 처리에 따른 다양한 유전자의 발현 변화를 실시예 4에서와 같은 방법으로 RQ-PCR을 수행하여 확인하였다. 상기 얻어진 결과를 도 19에 나타내었다. 도 19에서 볼 수 있는 바와 같이 NAC의 처리는 염증과 섬유 형성과 관련된 유전자 발현을 감소시켰다. 이러한 결과들을 종합해 보면, KC 방광의 치료에 있어서 항섬유화 활성이 중요함을 알 수 있으며, 중간엽 줄기 세포와 소분자 화합물 (NAC)이 이러한 활성을 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0144] 이상 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

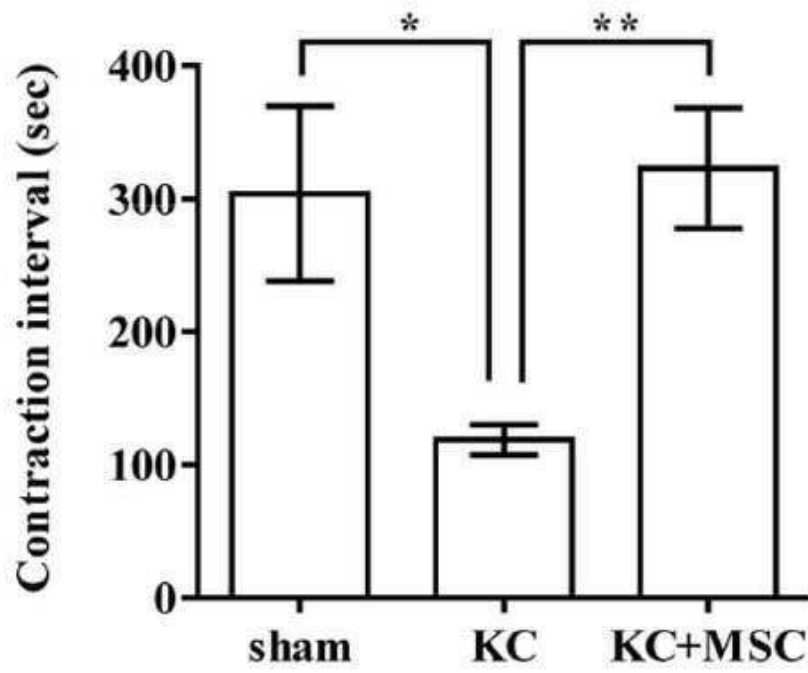
도면1



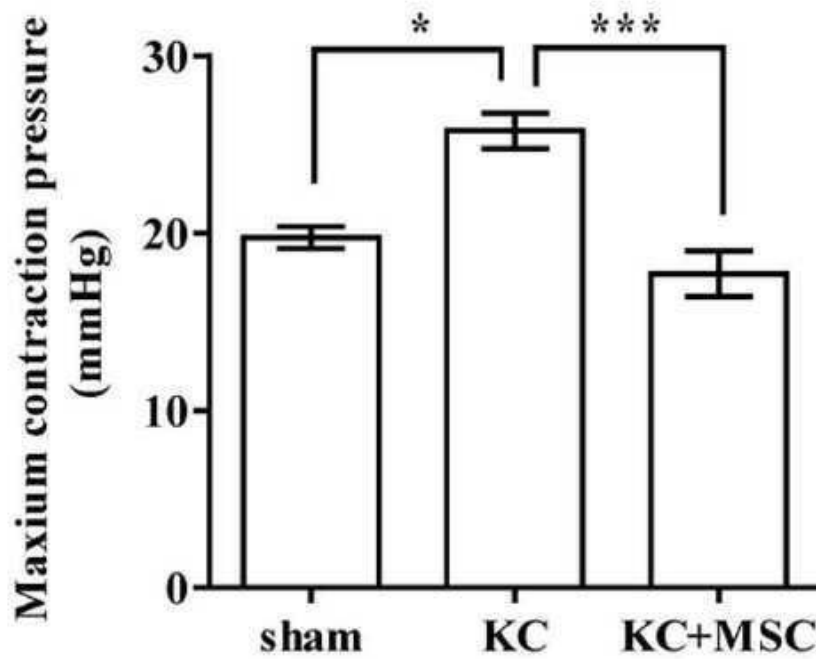
도면2



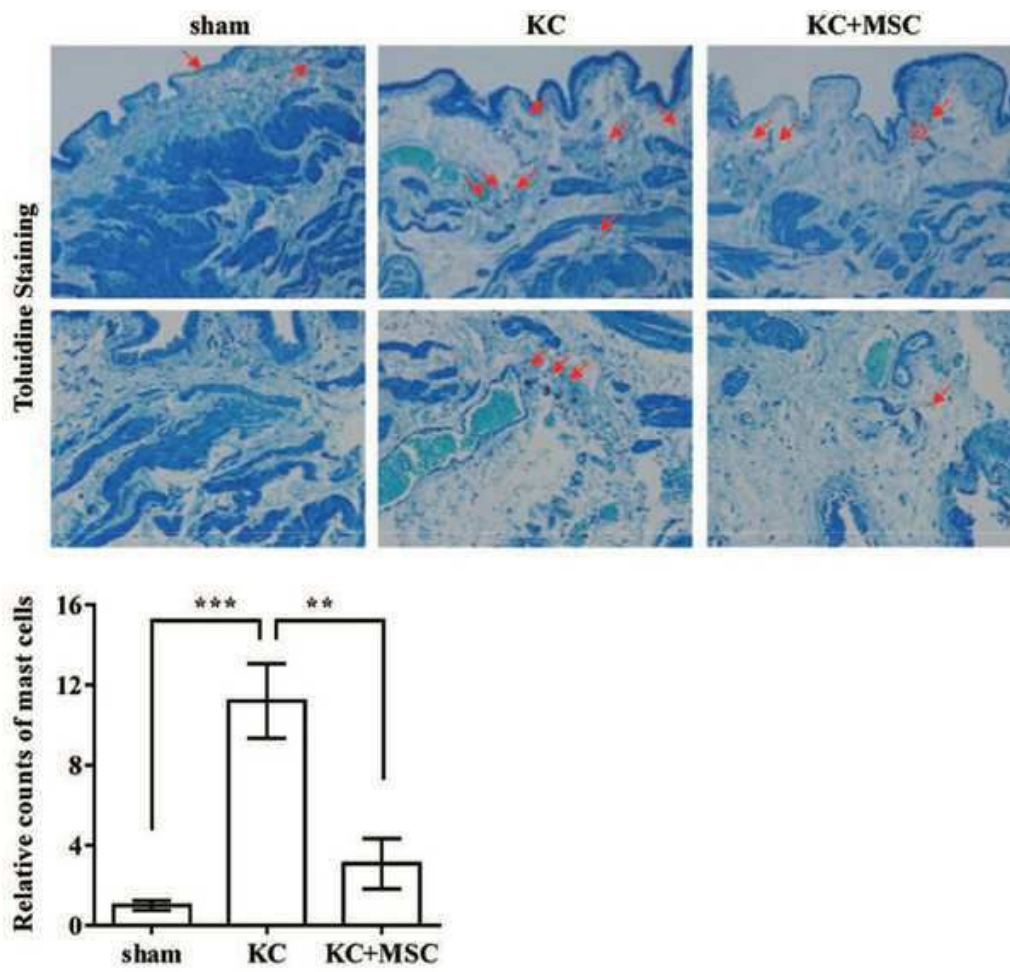
도면3



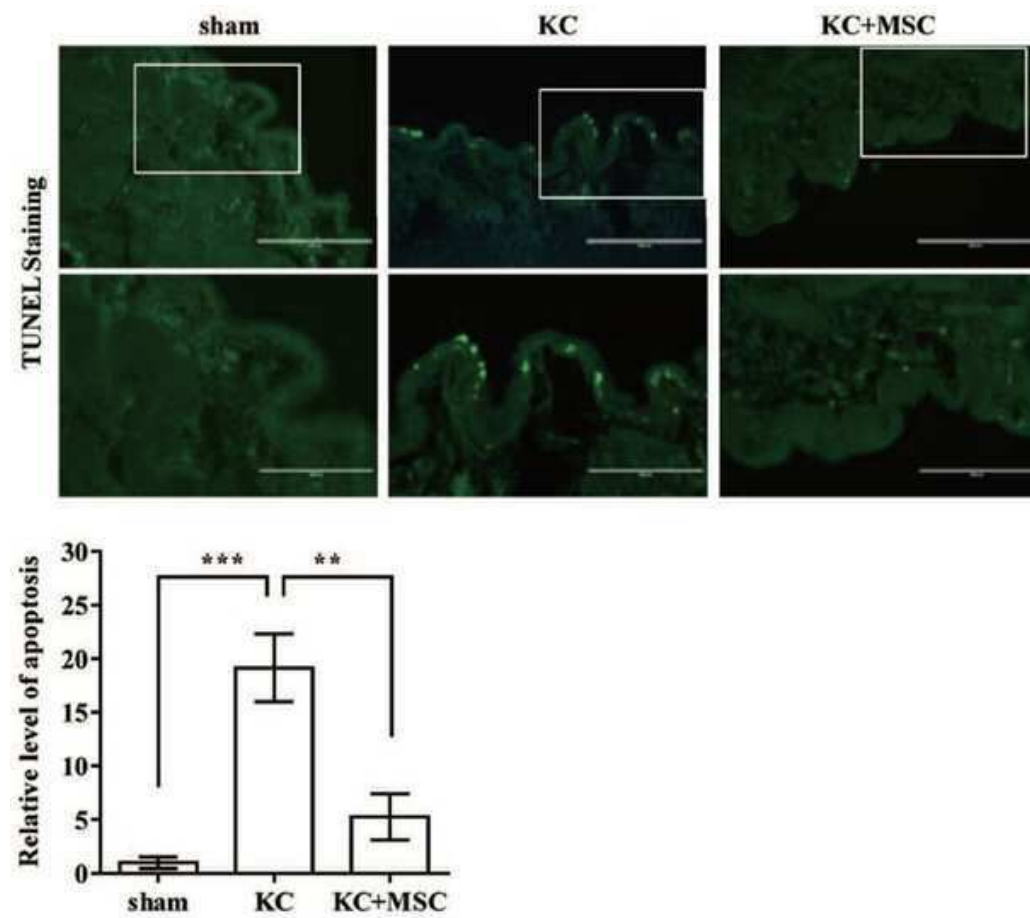
도면4



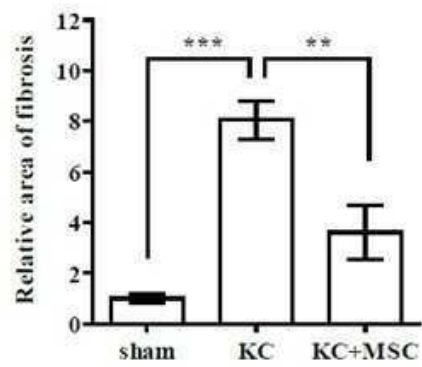
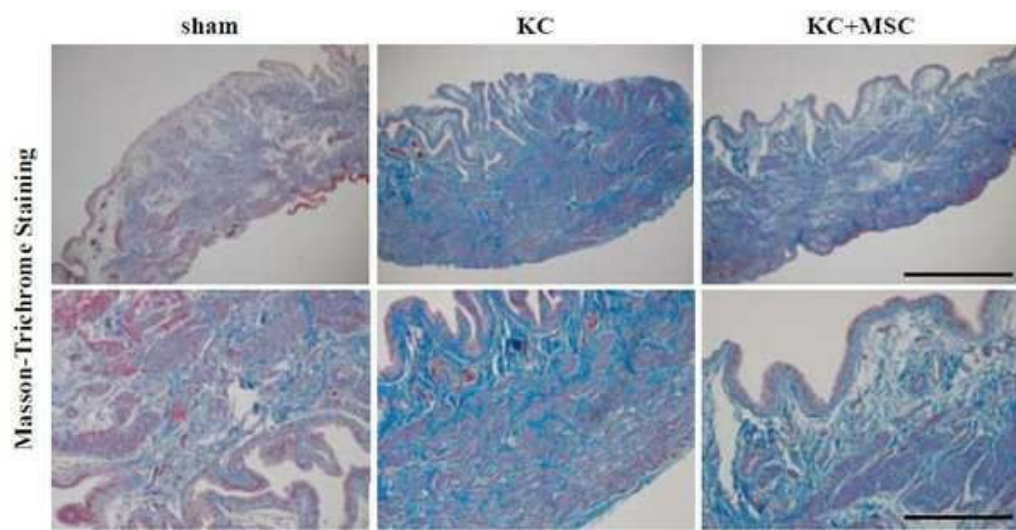
도면5



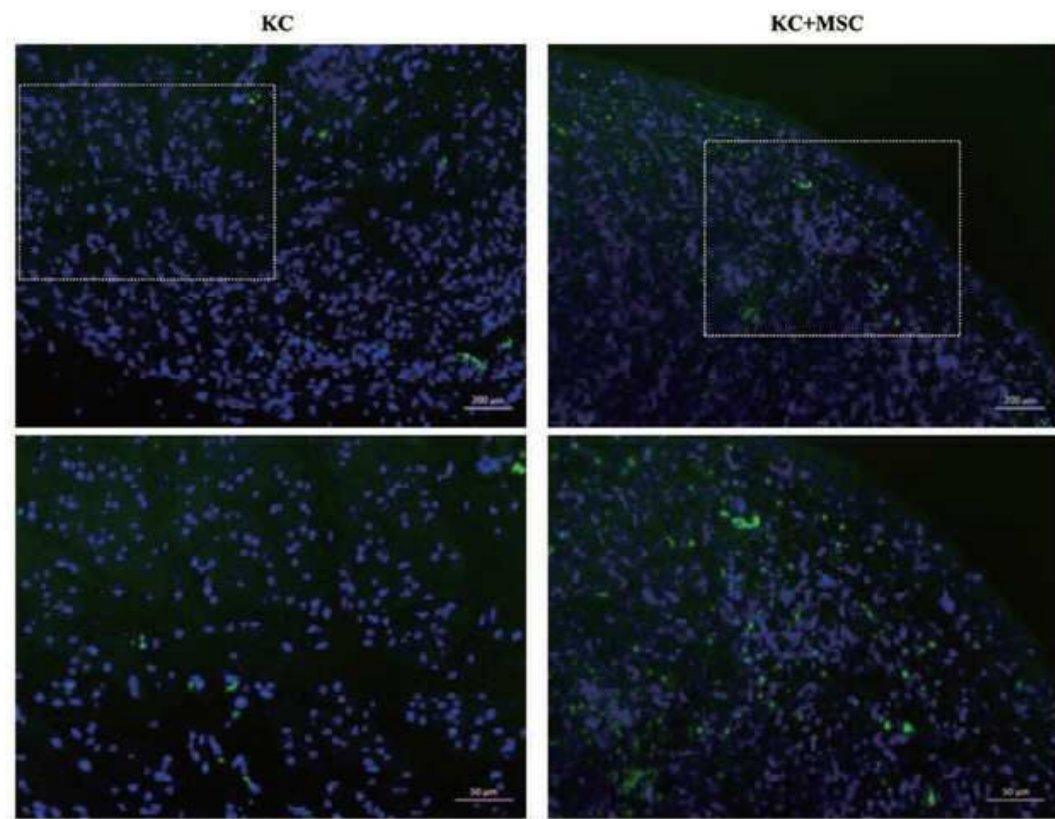
도면6



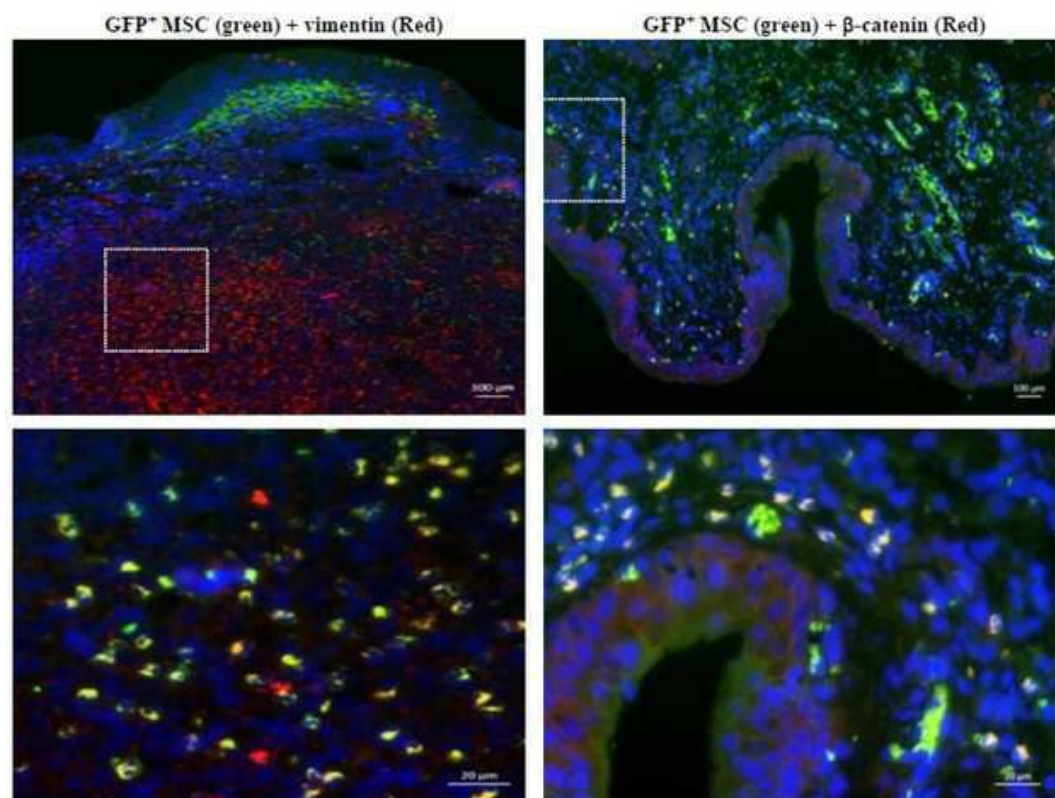
도면7



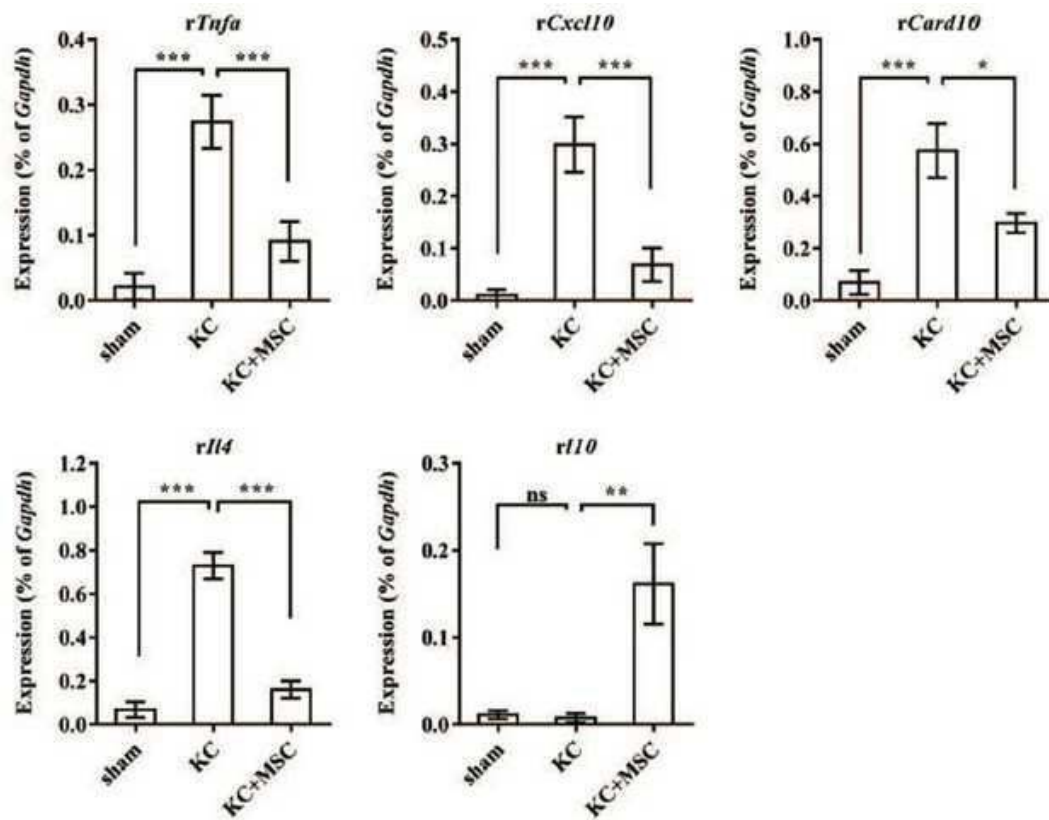
도면8



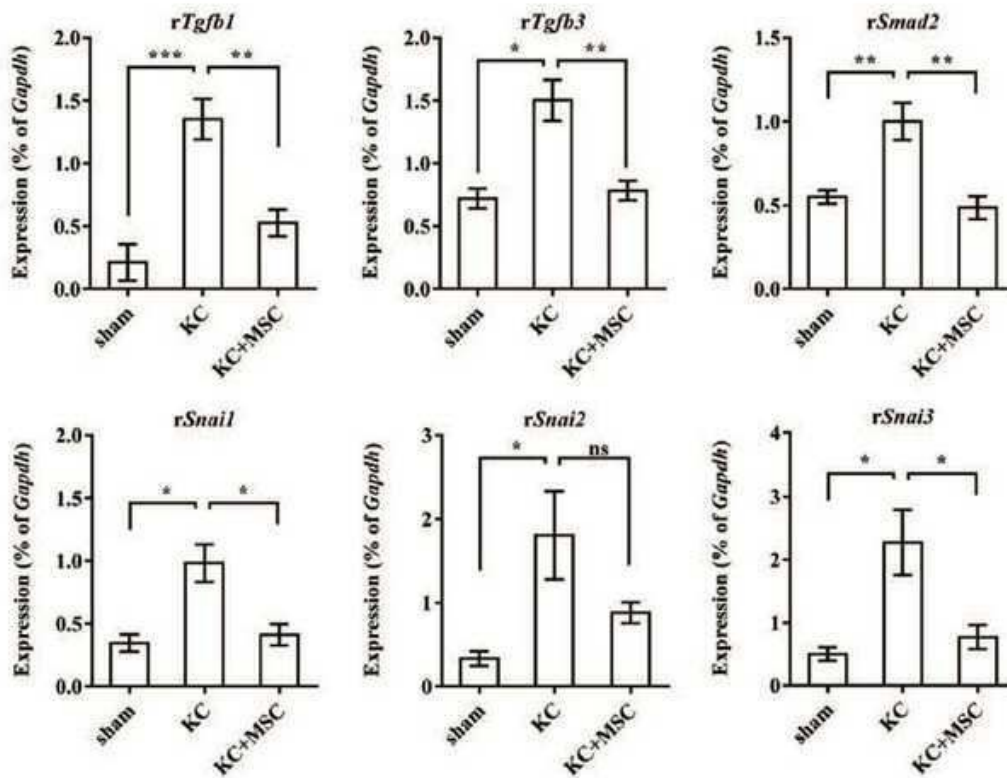
도면9



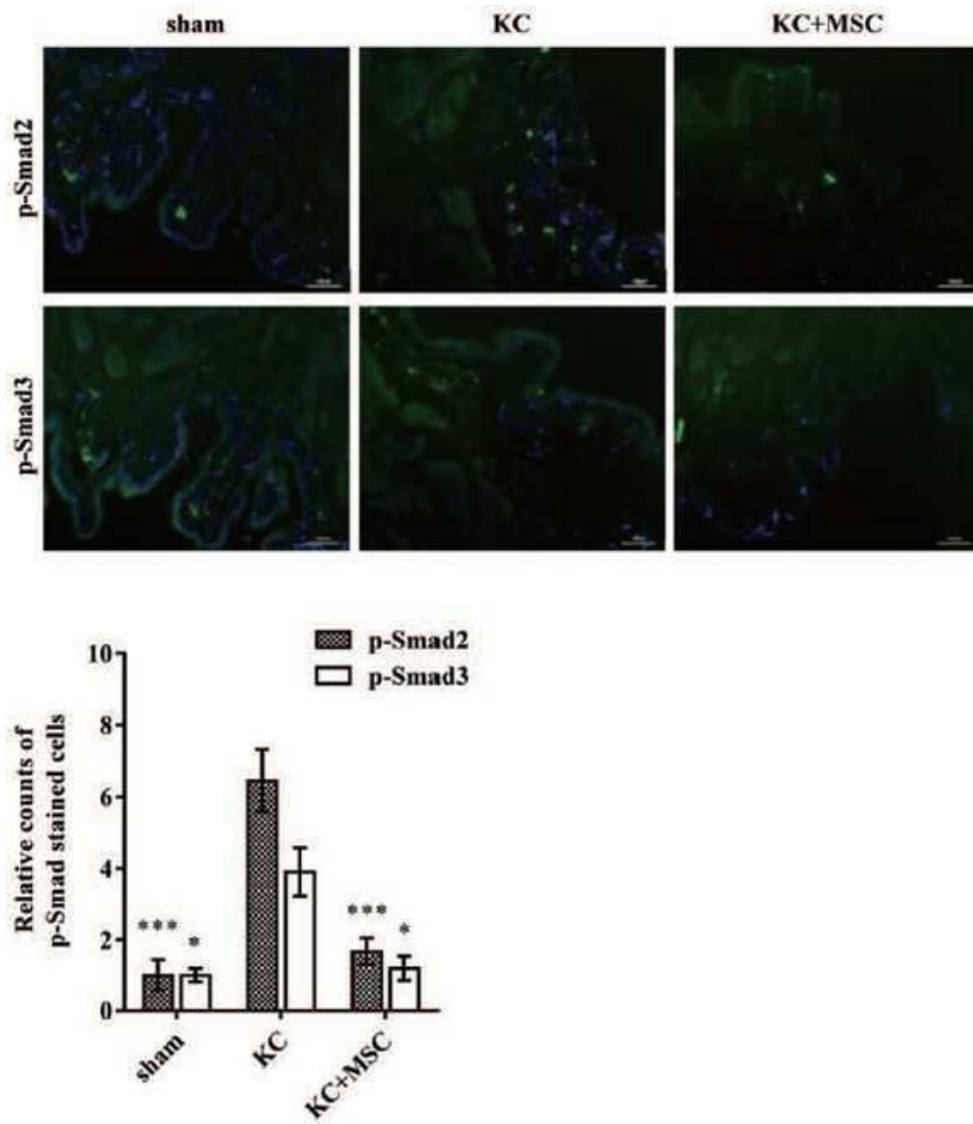
도면10



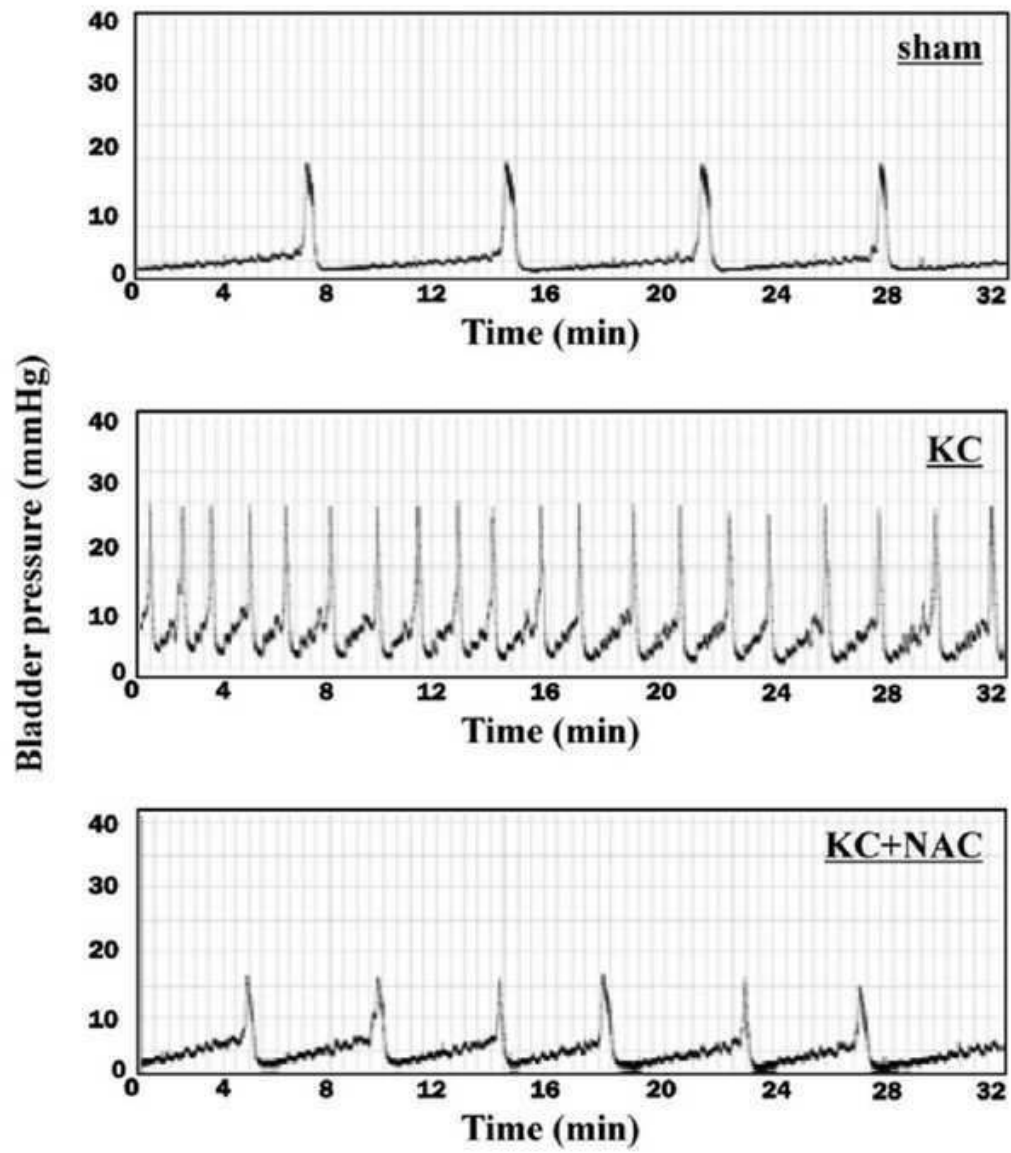
도면11



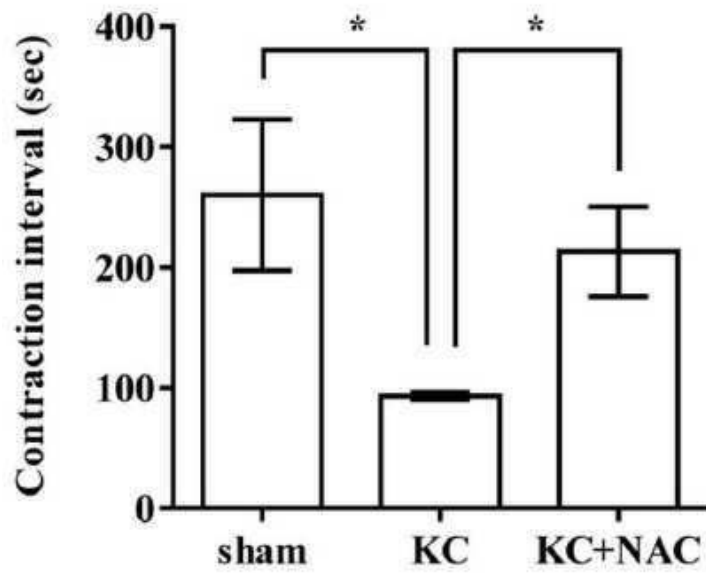
도면12



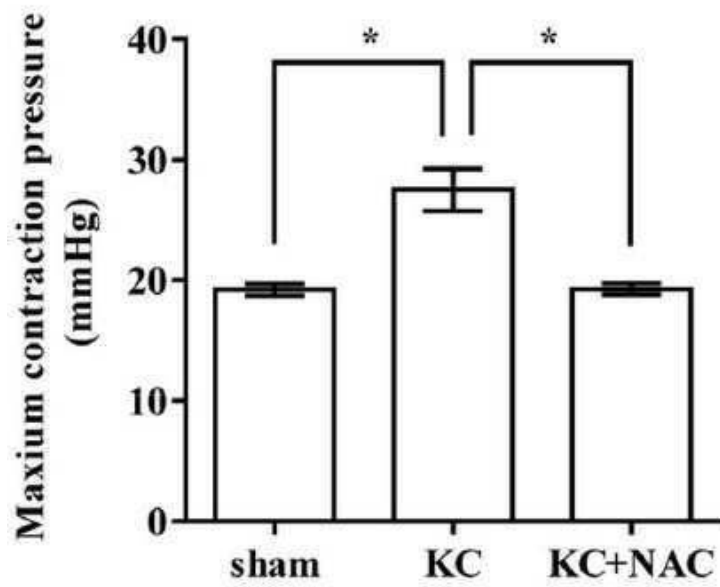
도면13



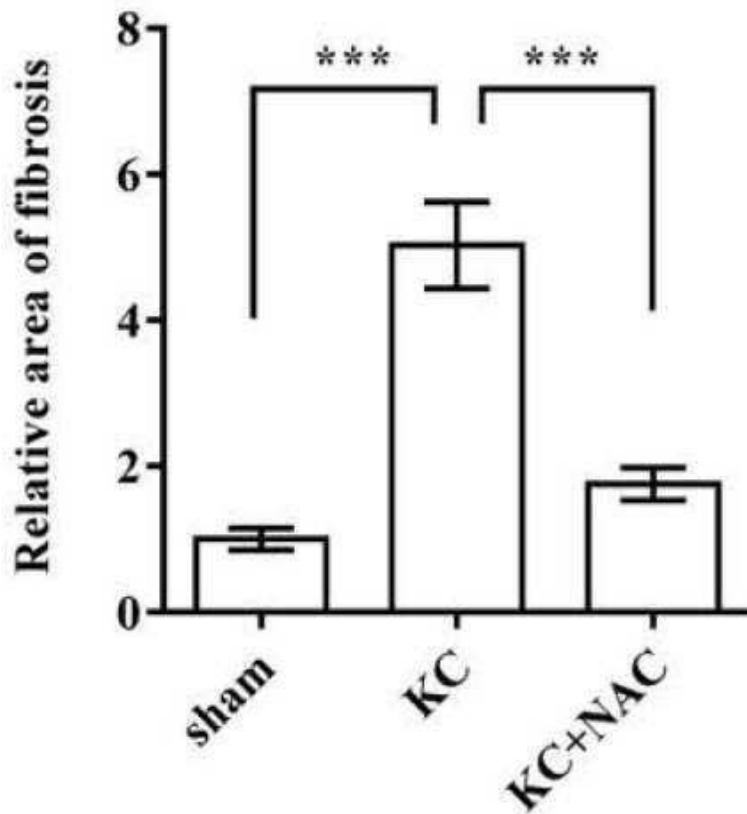
도면14



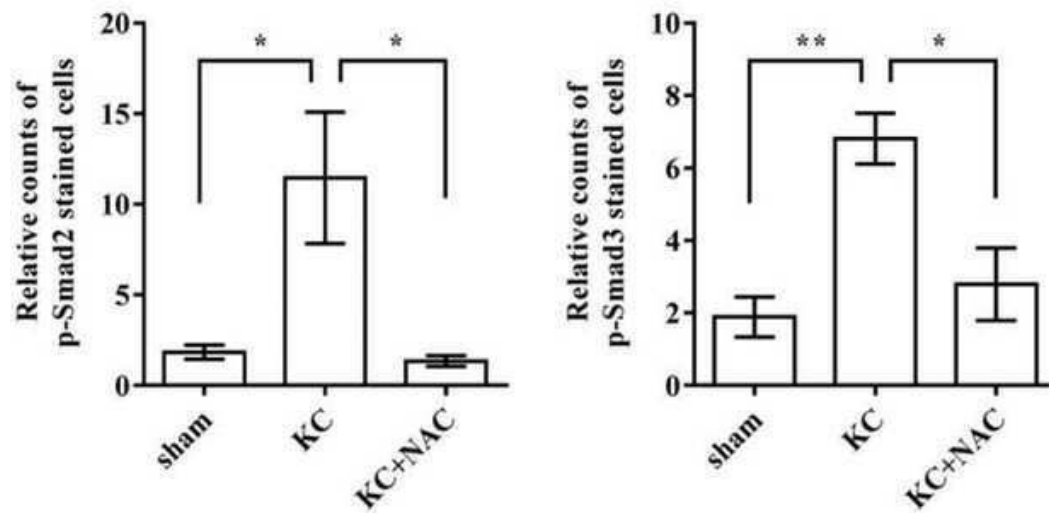
도면15



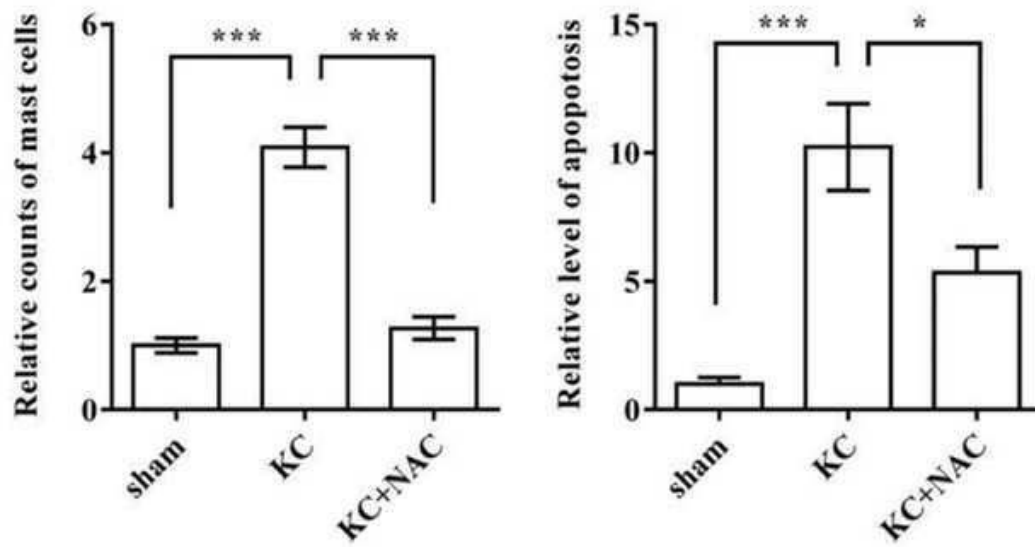
도면16



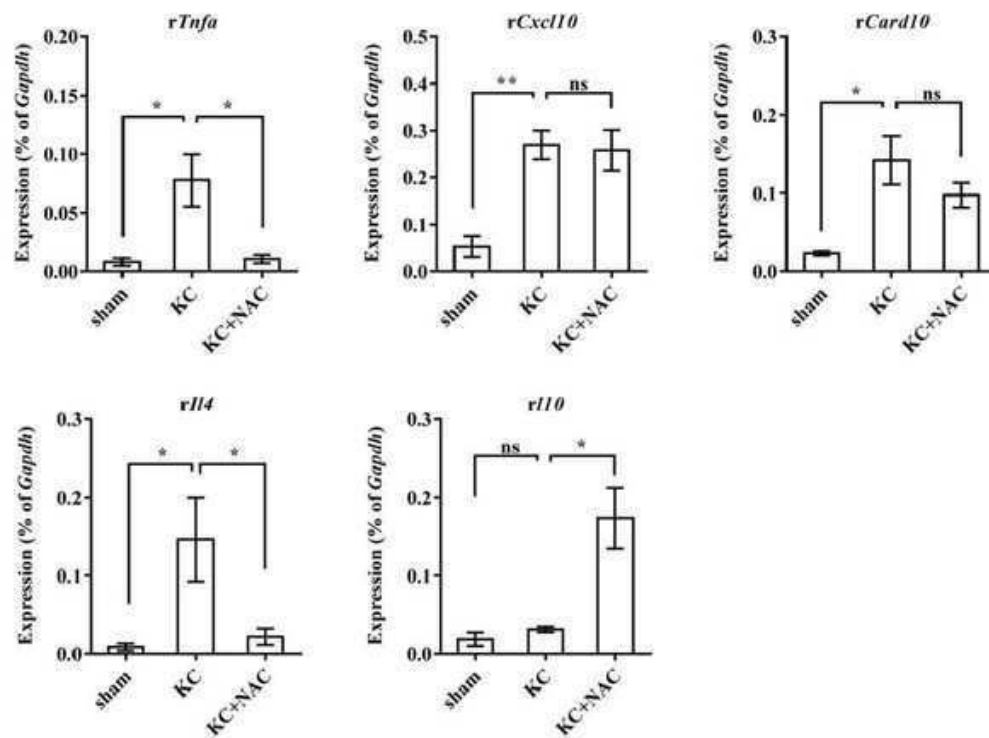
도면17



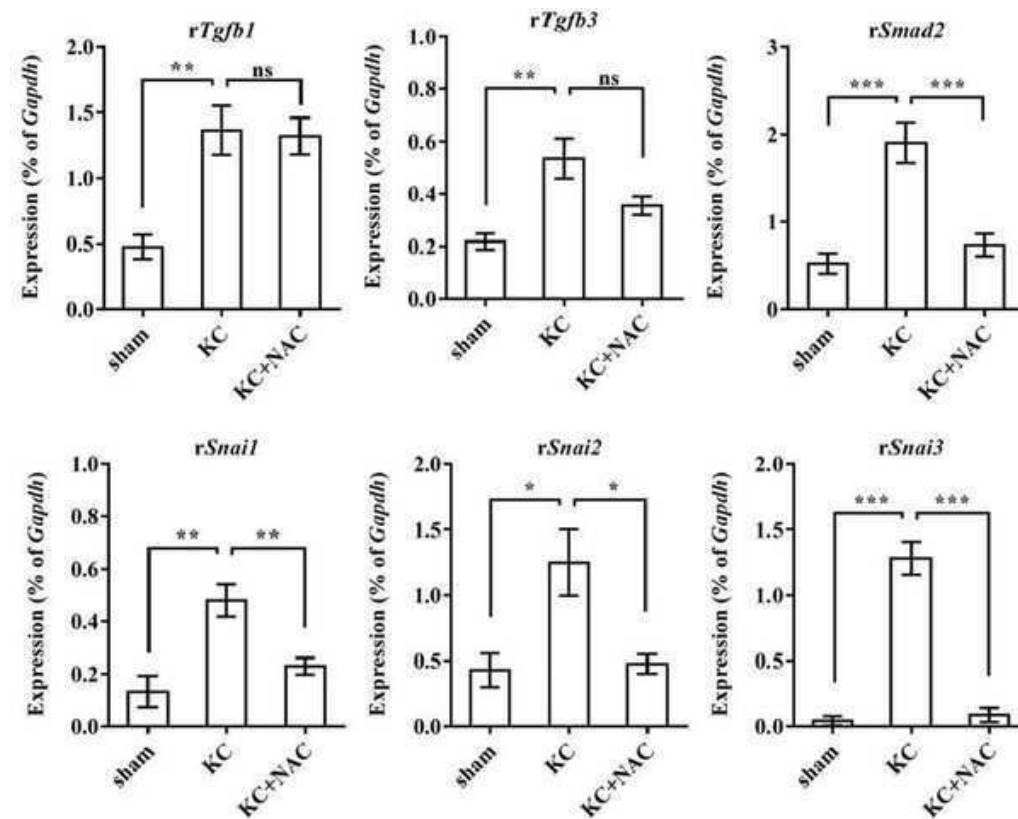
도면18



도면19



도면20



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Pharmaceutical composition for treatment or prevention of

Ketamine-induced cystitis comprising of mesenchymal stem cells

<130> DPP20160462KR

<160> 26

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rGapdh_qRT_F1 primer

<400> 1

agagagaggc cctcagttgc t

21

<210>

2

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rGapdh_qRT_R1 primer
 <400> 2
 ggatggaatt gtgaggaga tg 22
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rCxcl10_qRT_F1 primer
 <400> 3
 agagagagc cctcagttgc t 21
 <210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rCxcl10_qRT_R1 primer
 <400>
 > 4
 cattgttctt cttcattgtg gcaat 25
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rCard10_qRT_F1 primer
 <400> 5
 cggaggaagc cacagacagt 20
 <210> 6
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rCard10_qRT_R1 primer
 <400> 6
 tgccggcgga gtatgga 17
 <210> 7

<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rTnfa_qRT_F1 primer	
<400>	7	
tgccggcgga gtatgga		17
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rTnfa_qRT_R1 primer	
<400>	8	
cgcttggtgg ttgctacga		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rI14_qRT_F1 primer	
<400>	9	
gagaagctgc accgtgaatg		20
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rI14_qRT_R1 primer	
<400>	10	
tcctcgtag gatgctttt agg		23
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rI110_qRT_F1 primer	
<400>	11	

ccctgggaga gaagctgaag a	21
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> rIl10_qRT_R1 primer	
<400> 12	
ccactgcctt gcttttattc tca	23
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> rTgfb1_qRT_F1 primer	
<400> 13	
atcgacatgg agctggtgaa a	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> rTgfb1_qRT_R1 primer	
<400> 14	
ggactggcga gccttagttt g	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> rTgfb2_qRT_F1 primer	
<400> 15	
catcccgccc actttctaca g	21
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> rTgfb2_qRT_R1 primer
 <400> 16
 gatttgaagc attcttctcc attgt 25
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rTgfb3_qRT_F1 primer
 <400> 17

 ccgcaacttg gaggagaact g 21
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rTgfb3_qRT_R1 primer
 <400> 18
 ggttcgtgga cccatttcc 19
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSmad2_qRT_F1 primer
 <400> 19
 gtgatcccggt ggactgtgct a 21
 <210> 20
 <211> 24

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSmad2_qRT_R1 primer
 <400> 20
 ctccacaagg tgctttaact gatg 24
 <210> 21
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSnail_qRT_F1 primer
 <400> 21
 tcggatgtga agagatacca gtgt 24
 <210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSnail_qRT_R1 primer
 <400> 22
 gactcttggt gtttggag caa 23

 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSnai2_qRT_F1 primer
 <400> 23
 cccctgcctt catctgacac t 21
 <210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSnai2_qRT_R1 primer
 <400> 24
 tggagtctct cctcttcgtc act 23
 <210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSnai3_qRT_F1 primer

 <400> 25
 gccctagtg tgacttcaa aga 23

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rSnai3_qRT_R1 primer
<400> 26
cgtctgagcc caggattgg

19