

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 7월 28일 (28.07.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/117816 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/012751
- (22) 국제출원일: 2015년 11월 26일 (26.11.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0008605 2015년 1월 19일 (19.01.2015) KR
- (71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101 (연건동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김효수 (KIM, Hyo-Soo); 04419 서울시 용산구 독서당로 111, 105 동 T202 호 (한남동, 한남더힐), Seoul (KR). 이은주 (LEE, Eun Ju); 02719 서울시 성북구 정릉로 305, 101 동 1406 호 (정릉동, 경남아너스빌), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 (대치동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

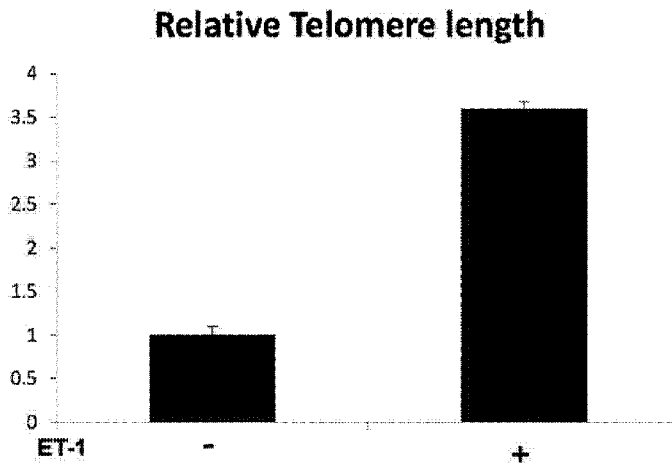
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR INCREASING STEMNESS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 발명의 명칭 : 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 증가시키는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for increasing the stemness of human mesenchymal stem cells and, more particularly, to: a method for increasing the stemness of human mesenchymal stem cells by means of endothelin-1 treatment; the human mesenchymal stem cells having increased stemness by using the method; and a composition for increasing the stemness of human mesenchymal stem cells, containing endothelin-1 as an active ingredient. In the present invention, it is confirmed that the expression of a stemness marker is increased and that a stem cell characteristic is improved such as the length of telomeres being extended, by treating human mesenchymal stem cells with endothelin-1, and thus cellular life span is extended, aging is inhibited, and the growth and viability of cells are increased, thereby enabling mass culturing of human mesenchymal stem cells such that human mesenchymal stem cells are expected to be used effectively in cell therapy or regenerative medicine.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/117816 A1



본 발명은 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 증대시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 처리함으로써 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 증가시키는 방법, 상기 방법으로 줄기세포능이 증가된 인간 중간엽 줄기세포, 및 엔도텔린-1을 유효성분으로 포함하는 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 증가용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서는 인간 중간엽 줄기세포에 엔도텔린-1을 처리함으로써 줄기세포능 마커의 발현이 증가하고, 텔로미어 길이가 연장되는 등 줄기세포의 특성을 향상시킬 수 있음을 확인함으로써, 이를 통해 세포의 수명을 연장되고, 노화를 억제할 뿐 아니라, 세포의 성장 및 생존력을 증대시켜 인간 중간엽 줄기세포를 대량으로 배양할 수 있으므로, 세포치료 또는 재생의학에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 증가시키는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 증대시키는 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 골수에서 처음 확인된 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSCs)는 전능성 세포로, 재생 의학에서 큰 잠재성을 가진다. 상기 MSCs는 생체 내 여러 유형의 중배엽 계통, 예를 들어 골세포(Osteocytes), 연골세포(Chondrocytes), 힘줄세포(tendinocytes), 지방세포(Adipocytes), 근육세포(Myocytes), 섬유아세포(Fibroblasts) 등으로 분화될 수 있다. 또한, 적절한 배지 조건에서는 신경 세포, 심근세포, 내피세포, 및 간세포로 교차 분화될 수 있다. 그리고 골수 MSCs는 클래스 II가 아닌 클래스 I MHC 항원을 발현하거나, MSCs가 면역원성 활성이 없는 것을 나타내는 상호 자극 분자들을 발현한다(Klyushnenkova E et al., J Biomed Sci, 12(1):47-57, 2005).
- [3] 이에 더하여, MSCs는 면역억제 활성을 나타내므로, 이식 촉진제, 태아 이식(fatal graft) 및 숙주 질환의 억제제로 사용될 수 있다(Le Blanc K et al., Lancet, 363(9419):1439-1441, 2004; El-Badri N.S et al., Exp Hematol, 26(2):110-116, 1998).
- [4] 이러한 MSCs는 골수, 지방 조직, 제대혈(cord blood), 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues), 인간 태반 등의 다양한 성인 조직으로부터 분리될 수 있으나 성인 조직에서 수득한 MSCs의 개수에는 한계가 있다.
- [5] 세포 치료나 재생의학에서 최소 필요한 세포의 수는 1×10^9 정도이며, 조건을 잡고 기준을 정하는 실험까지 포함한다면 그 양은 더욱 늘어난다. 기존의 다양한 기원의 중간엽 줄기세포로 이 정도의 양을 공급하려면 최소 *in vitro*에서 10번 이상의 계대가 필요하게 된다. 그러면 세포는 노화되고 변형되어 더 이상 치료의 개념에 적합하지 않게 되는 문제점이 있다. 이는 지금의 중간엽 줄기세포의 배양시스템이 가지고 있는 풀어야 할 큰 문제점이다. 그리고 이러한 세포로 조건과 기준을 잡았다 하더라도 치료에 사용할 시에는 이미 그 세포는 바닥이 나고 다른 인간의 중간엽 줄기세포를 써야 하는 경우가 발생하며, 그럴 경우 또 다른 세포이용에 따른 부가적인 실험을 다시 거쳐야 하기 때문에 중간엽 줄기세포를 세포치료제로 사용하기 위해서는, 줄기세포능(stemness)을 증가시켜 상기와 같은 문제점을 해결할 수 있는 새로운 방법의 개발이 절실한 실정이다.
- [6] 줄기세포능은 배아줄기세포와 같이 모든 세포를 생성할 수 있는 능력이 있는 만능성(pluripotency)과, 자기와 닮은 세포들을 무한정 만들어 낼 수 있는 자기재생(self-renewal) 능력을 총칭하는 의미로 당업계에서 통용된다. 따라서

텔로머라제 활성을 증가시키거나, 줄기세포성 인자(stemness acting signals)의 발현을 증가시키거나, 미분화 세포를 미분화 상태를 유지하면서 증식을 증가시키거나, 세포 이동 활성을 증가시키는 특징이 나타나는 것을 포함할 수 있다(Pittenger, M. F. et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411), 143-147).

[7]

[8] 한편, 엔도텔린(Endothelin, ET)은 혈관내피세포에서 생성되는 펩타이드로, 21개의 아미노산 잔기로 구성되며, 혈관수축펩티드로 알려져 있다. 엔도텔린은 한 분자에 2개의 S-S결합을 갖고 있으며, ET 변환효소로 ET 전구체가 변형됨으로써 생성된다. 엔도텔린-1은 1988년 돼지의 혈관내피세포배양액에서 처음 분리되었으며, 대부분의 포유류에는 3종류의 이소펩타이드(ET-1, ET-2, ET-3)가 존재한다.

[9] 엔도텔린은 일과성 혈관 확장과 이어지는 지속적인 혈관수축을 일으키는데, 일과성 혈관확장작용에 관해서는 3종류의 이소펩타이드가 거의 비슷한 효력을 나타내는 데에 비해, 혈관수축작용에 관해서는 ET-3의 효력은 ET-1과 ET-2의 100분의 1정도 밖에 안 된다. ET 수용체에는 2종류의 아형(subtype)이 알려져 있으며, 그 중 ETA는 혈관수축작용, ETB는 혈관확장작용에 관여한다.

[10]

[11] 그러나 아직까지 엔도텔린이 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)에 영향을 미치는지 여부에 대하여서는 알려진 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 엔도텔린-1(Endothelin-1)이 인간 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)의 줄기세포능(stemness)을 증가시킬 수 있는 중요한 인자임을 확인함으로써, 이를 통해 종래 중간엽 줄기세포 배양 시 세포 노화의 단점을 극복하여, 세포치료 및 재생의학에 필요한 세포를 만들어 내기 위해 활용될 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[13] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[14] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)의 줄기세포능(stemness)을 증가시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 줄기세포 배양액에 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 것이다.

[15] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 방법은 엔도텔린-1을 0.0125 내지 0.25ug/ml

농도로 처리하는 것일 수 있다.

- [16] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 인간 중간엽 줄기세포의 텔로미어(telomere) 길이를 연장시키는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 인간 중간엽 줄기세포의 수명을 연장시키고, 인간 세포의 노화를 억제하는 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 엔도텔린-1을 상기 중간엽 줄기세포의 부착배양 24 시간 후에 처리하는 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 엔도텔린-1을 처리한 후 1일 내지 5일간 배양하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 줄기세포능이 증가된 인간 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [21] 이에 더하여, 본 발명은 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 유효성분으로 포함하는, 인간 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)의 줄기세포능(stemness) 증가용 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 조성물은 세포 배양액일 수 있다.
- [23] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 세포는 인간 줄기세포일 수 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 엔도텔린-1은 0.0125 내지 0.25ug/ml 농도로 포함되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [25] 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 증가시키는 방법을 제공함으로써, 본 발명에 따라 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 처리하면 줄기세포능이 증가되어 장기 및 대량 배양이 가능하고, 분화능을 유지한 상태의 줄기세포를 높은 수율로 확보할 수 있는 장점이 있다.
- [26] 또한, 본 발명은 ET-1이 세포 노화 마커인 텔로미어의 길이를 연장시키는 효과가 있음을 규명하였으므로, 이를 노화 방지 인자로써도 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 인간 중간엽 줄기세포에서 ET-1 처리에 따른 Oct4 단백질 발현량을 western blot을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 2는 인간 중간엽 줄기세포에서 ET-1 처리에 따른 Oct4 mRNA 발현량을 real time PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 3은 ET-1이 처리된 인간 중간엽 줄기세포에서 얻어진 gDNA를 이용한 real time gDNA PCR 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 4는 ET-1이 처리된 인간 중간엽 줄기세포의 염색체 안정성을 G-banding 핵형 분석법으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell, MSC)의

줄기세포능(stemness)을 증가시키는 방법을 제공하는 것을 특징으로 하며, 이를 위해 줄기세포 배양액에 엔도텔린-1(Endothelin-1, ET-1)을 처리하여 배양하는 단계를 포함한다.

- [32] 본 발명자들은 종래 인간 중간엽 줄기세포의 계대 배양시 계대 수가 증가할수록 줄기세포의 줄기세포능이 감소하는 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 인간 중간엽 줄기세포 배양액에 엔도텔린-1을 처리함으로써 줄기세포능이 향상됨을 규명하였다.
- [33] 줄기세포능 관련 지표(마커)로는 Oct4, Nanog, Sox2, c-Myc, KLF4 등이 알려져 있는데, 이들의 발현양이 높을수록 줄기세포의 배양 수율이 우수하고 줄기세포 특성이 우수하게 유지되고 있음을 알 수 있기 때문에 연구에 유용하게 이용되고 있다. 특히, 미분화된 줄기세포가 발현하는 것으로 알려진 Oct4는 세포의 분화를 방지하는 역할을 담당하고, 세포의 자연적인 분화가 시작되면 사라지는 것으로 알려져 있다. 따라서 Oct4의 발현수준에 따라 줄기세포의 분화정도를 예측할 수 있다.
- [34] 본 발명의 일실시예에서는 인간 중간엽 줄기세포 배양액에 엔도텔린-1을 다양한 농도로 처리하고 Oct-4의 발현량을 측정한 결과, 계대 수가 증가할수록 발현수준이 감소하는 Oct-4의 단백질 및 mRNA 발현량이 증가함을 확인하였다(도 1 및 2 참조). 이러한 결과는 인간 중간엽 줄기세포에 엔도텔린-1을 처리함으로써 줄기세포능이 회복되었음을 시사하는 것이다. 또한, 줄기세포능 마커인 Oct4 등의 발현을 증가시킬 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명의 방법이 세포치료 및 재생의학에 효과적으로 적용될 수 있음을 알 수 있다.
- [35] 그리고 줄기세포능의 향상을 확인하는 또 다른 방법으로 텔로미어(Telomeres)의 길이를 확인할 수 있다. 텔로미어는 진핵세포 염색체의 말단에서 발견되며 염색체들의 분해나 말단-대-말단 융합을 방지하는 특별한 구조이다. 텔로머릭(telomeric) DNA는 짧은 염기서열의 직렬 반복(인간의 경우 TTAGGG)으로 구성된 일차적 구조로서, 그 길이는 하등 진핵세포의 수백 bp에서부터 포유동물 세포의 수천 bp까지 변화한다. 텔로머릭 DNA 부분은 동원체(centromere) 영역에서와 같이 GC의 불균형(GC-rich)을 나타낸다. 이러한 성질은 염색체가 복제될 때 종래 DNA 폴리머라제에 의한 G-가닥의 불완전 복제를 야기하여, 노출된 반대 가닥의 C-가닥이 핵산 제거 효소에 의해 분해되거나 텔로머라제에 의한 합성으로 텔로머릭 말단부위가 완성될 수 있다. 텔로미어의 주요 기능은 염색체 말단을 캡핑하는 것과 분해, 말단 대 말단 융합, 및 비정형 재조합으로부터 염색체를 보호하는 것이며, 이는 게놈의 안전성 유지 및 세포 증식 조절과도 관련되어 있다. 반복된 세포 분열 후에 텔로미어의 단축(telomere shortening)이 일어나는데, 이는 복제형 노화(senescence)나 세포자살(apoptosis)를 유도하는 세포 주기 제한점 등을 활성화하여 세포 증식을 제한하게 된다. 이는 유전적으로 불안정한 세포나 암의 기원이 될 변형세포들의 축적을 막는 순기능도 있지만, 노화나 질병이 발생할 때 장기의 항상성과 재생

그리고 생존을 제한하는 역기능도 있다. 텔로미어 단축으로 인한 조직 재생 기능의 감퇴는 줄기세포의 기능 장애와도 관련이 있으며, 텔로미어 기능 장애는 세포 고유의 제한점들을 활성화시킬 뿐 아니라, 줄기세포를 둘러싼 미세 및 거시환경을 모두 변형시켜 줄기세포의 기능손상을 유발한다(E Hiyama et al., *British Journal of Cancer*, 96: 1020-1024, 2007).

- [36] 이에 본 발명의 일실시예에서는 부착배양한 중간엽 줄기세포에 엔도텔린-1을 처리하고 24시간 이상 배양한 다음 대조군인 엔도텔린-1 미처리군과 텔로미어 길이를 비교한 결과, 인간 중간엽 줄기세포에 엔도텔린-1을 처리할 경우, 텔로미어, 즉 염색체 말단 부분 길이를 연장시킬 수 있으며(도 3 참조), 엔도텔린-1 처리로 인해 염색체 이상이 유발되는 바도 없음을 확인하였다(도 4 참조). 상기 결과로부터 인간 중간엽 줄기세포에 엔도텔린-1을 처리하면 텔로미어 길이가 연장됨으로써, 줄기세포의 수명을 연장시키고, 노화를 억제할 뿐 아니라, 세포의 성장 및 생존력을 증대시켜 세포를 대량으로 배양가능하게 하여, 종래 인간 중간엽 줄기세포 체외 배양 시의 한계점을 극복할 수 있음을 알 수 있다.
- [37] 따라서 본 발명은 엔도텔린-1을 처리하여 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 증가시키는 방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법으로 줄기세포능이 증가된 인간 중간엽 줄기세포를 제공할 수 있다. 중간엽 줄기세포의 줄기세포능이 높아진다는 것은 뼈, 인대, 근육 등 다양한 중배엽 계통(mesoderm lineage) 세포로의 분화 가능성이 높아진다는 것을 의미하므로, 세포치료제로서 더 많은 영역의 질환에 적용 가능할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명은 엔도텔린-1을 유효성분으로 포함하는 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 증가용 조성물을 제공할 수 있다.
- [38]
- [39] 본 발명에서 상기 “세포 배양액”은 인간 중간엽 줄기세포 배양액으로서, 상기 인간 중간엽 줄기세포는 골수, 지방 조직, 제대혈, 말초혈, 신생아 조직, 인간 태반 등 인체의 여러 조직과 만능 줄기세포에서 유래할 수 있으며, 골수에서 유래한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [40] 본 발명에서 용어 “줄기세포(stem cell)”는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 미분화 세포들을 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸 줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래(전이(transit)) 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.
- [41] 본 발명에서 사용되는 용어 “세포 배양액”은 배양된 세포가 포함되어 있는 배지를 의미하고, 상기 “배지”는 당업계에서 통상적으로 이용되는 동물세포용 배지를 의미한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며, 예를 들어, Eagles's MEM (Eagle's

minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다. 이에, 바람직하게는 α -MEM, Eagles's MEM, Iscove's MEM, 199 배지, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, F10, DMEM, Waymouth's MB752/1 및 McCoy's 5A로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 α -MEM 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 배지는 혈청을 추가적으로 포함할 수 있고, 본 발명의 배지에는 혈청 이외에 줄기세포를 효율적으로 배양하기 위해 통상적인 줄기세포 배양용 조성물로 당업계에 알려진 어떠한 성분도 포함될 수 있다.

[42] 또한, 본 발명에서 엔도텔린-1(ET-1)은 0.0125 내지 0.25 ug/ml의 농도로 배지 내에 포함되는 것이 바람직하고, 0.02 내지 0.09 ug/ml의 농도로 포함되는 것이 더욱 바람직하며, 0.02 내지 0.03 ug/ml의 농도로 포함되는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[43]

[44] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[45]

[46] [실시예]

[47] 실시예 1. ET-1 처리에 따른 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능 증가 효과 확인

[48] ET-1이 인간 중간엽 줄기세포의 줄기세포능(stemness)을 증가시키는지 확인하고자 줄기세포능 관련 인자로 가장 일반적인 마커 Oct4의 발현을 살펴보았다.

[49]

[50] 1-1. Western blot 결과 확인

[51] 인간 중간엽 줄기세포에서 ET-1 처리에 따른 Oct4의 단백질 발현량을 확인하기 위하여, Lonza에서 구입한 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 농도별(0, 0.0125, 0.025, 0.125, 0.25 ug/ml)로 처리한 후 단백질 발현 수치를 western blot을 수행하여 확인하였다. 이때 사용된 1차 항체 및 2차 항체의 종류 및 희석 비율은 하기 표

1에 나타낸 바와 같다.

[52] [표1]

Protein	Size(kDa)	Primary antibody	Secondary antibody	ECL
Oct4	43	santacruz anti-Oct4 antibody sc-90811:2000 Dilution	Anti-Goat IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in rabbit(Sigma-Aldrich A5420)1:3000 Dilution	~7min
Positive control(α -tubulin)	55	1:10000 Dilution	anti-mouse IgG(Whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat (Sigma-Aldrich A4416)1:2000 Dilution	~5s

[53] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 처리하면 줄기세포능 마커인 Oct4의 단백질 발현 수치가 현저하게 증가함을 확인하였으며, 특히 0.025ug/ml의 처리 농도에서 가장 높은 단백질 발현 수치를 나타냄을 알 수 있었다.

[54]

[55] 1-2. Real time PCR 결과 확인

[56] ET-1을 처리한 인간 중간엽 줄기세포에서 Oct4의 mRNA 발현율을 비교하기 위하여, 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 처리하고 24시간 후 RNA를 추출하여 상보적인 cDNA를 합성한 다음, 이를 주형으로 하기 서열번호 1 및 2의 Oct4 증폭 프라이머를 이용하여 real time PCR을 수행하였다.

[57] 서열번호 1: 5'-gaggcaacct ggagaatttg-3' (Oct4 forward primer)

[58] 서열번호 2: 5'-tagcctgggg taccaaatg-3' (Oct4 reverse primer)

[59]

[60] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 처리하였을 때 Oct4의 mRNA 발현이 증가함을 확인하였다.

[61]

[62] 실시예 2. ET-1 처리 유무에 따른 인간 중간엽 줄기세포의 텔로미어 길이 변화 확인

[63] ET-1 처리 유무에 따른 인간 중간엽 줄기세포의 텔로미어 길이 변화를 확인하기 위하여, 60mm plate에 인간 중간엽 줄기세포의 confluency가 60% 되도록 세포를 준비하고, ET-1을 처리하기 전 배양액을 새것으로 갈아준 다음, ET-1 0.025 ug/ml을 처리하고 24시간 후 배지를 갈고 3일 후 gDNA 샘플을

수거하였다. 그리고 상기 샘플을 이용하여 Real time gDNA PCR을 수행함으로써 ET-1 처리에 따른 텔로미어 길이를 비교하였다.

[64] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 처리하였을 때, 약 3배 이상 텔로미어의 길이가 길어졌음을 확인하였다.

[65]

[66] **실시예 3. ET-1 처리된 인간 중간엽 줄기세포의 염색체 안정성 확인**

[67] 상기 실시예 2로부터 인간 중간엽 줄기세포에 ET-1을 처리하면 텔로미어의 길이가 길어짐을 확인함에 따라, 염색체 이상을 유발하지 않는지 G-banding 핵형 분석법으로 염색체 안정성을 확인하였다. 이를 위해, 유전체 안정성 평가에 있어서 기본적인 검사법으로 알려져 있는 G-banding 핵형 분석법을 수행하였다. G-banding 핵형 분석법은 단백질을 분해효소인 트립신(trypsin)으로 전처리한 후, Giemsa 색소로 염색체를 염색하는 방법으로, 진정염색질(euchromatin)은 밝은 색으로, 이형염색질(heterochromatin)은 진한 색으로 염색된다. G-banding 핵형 분석법은 염색대(band)를 많이 생성하기 때문에 염색체 분석 시 가장 많이 사용되는 시험법이다.

[68] G-banding 핵형 분석 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, ET-1 처리에 의해 염색체의 이상이 유발되지 않음을 확인하였다.

[69]

[70] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

서열목록 Free Text

[71] <210> 1

[72] <211> 20

[73] <212> DNA

[74] <213> Artificial Sequence

[75]

[76] <220>

[77] <223> Oct4 forward primer

[78]

[79]

[80] <400> 1

[81] gaggcacacctggagaatttg 20

[82]

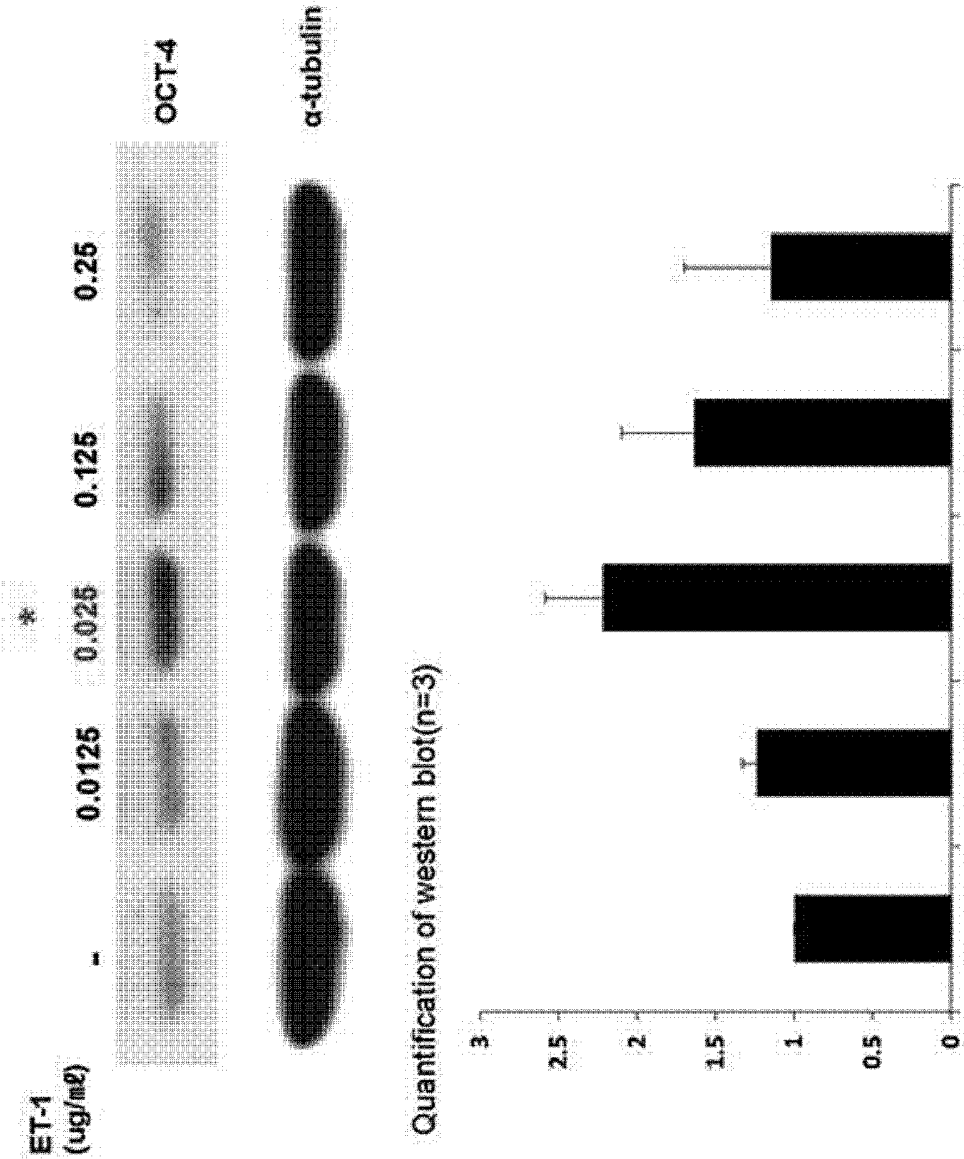
[83]

- [84] <210> 2
- [85] <211> 20
- [86] <212> DNA
- [87] <213> Artificial Sequence
- [88]
- [89] <220>
- [90] <223> Oct4 reverse primer
- [91]
- [92]
- [93] <400> 2
- [94] tagcctggggtacccaaatg 20

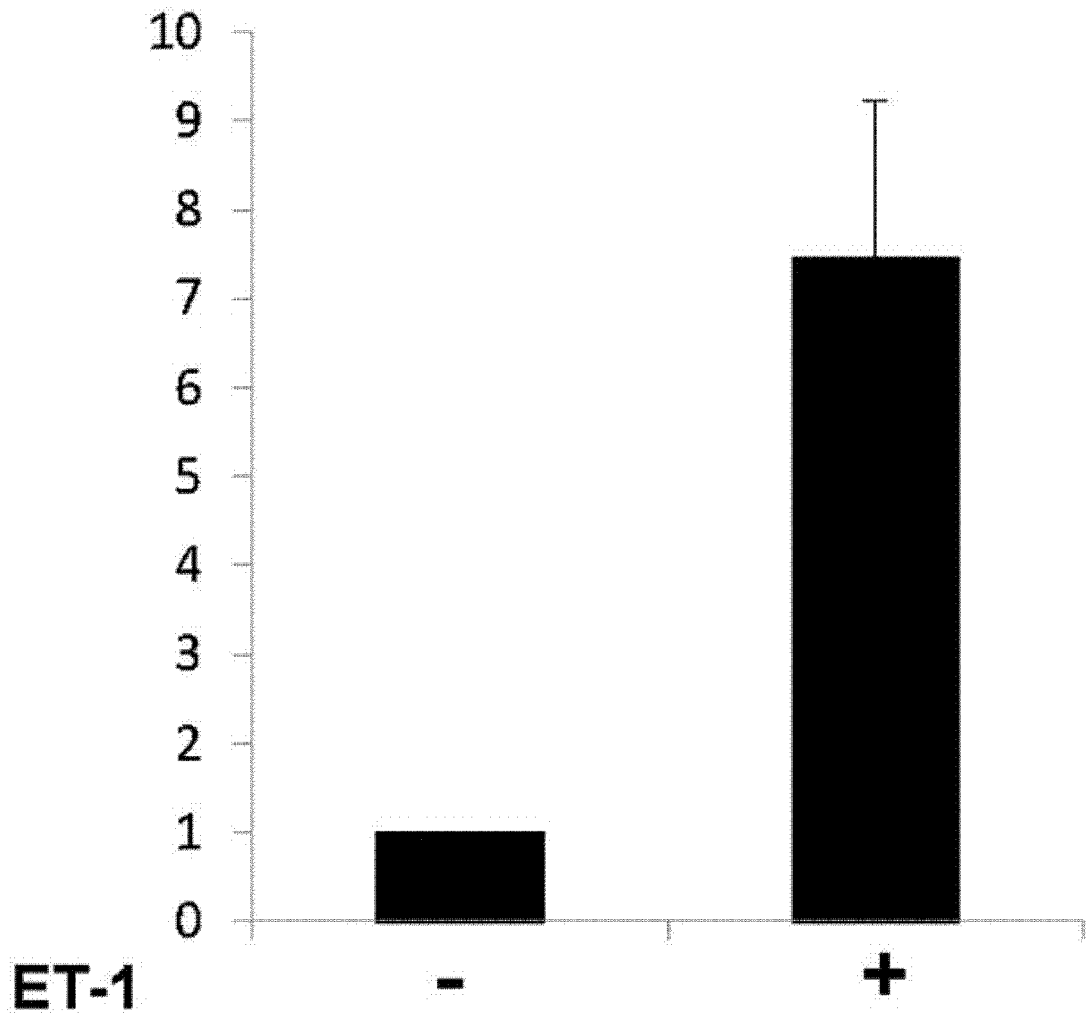
청구범위

- [청구항 1] 인간 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)의 줄기세포능(stemness)을 증가시키는 방법으로, 상기 방법은 줄기세포 배양액에 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 방법은 엔도텔린-1을 0.0125 내지 0.25ug/ml 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 방법은 인간 중간엽 줄기세포의 텔로미어(telomere) 길이를 연장시키는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 방법은 인간 중간엽 줄기세포의 수명을 연장시키는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 방법은 엔도텔린-1을 상기 중간엽 줄기세포의 부착배양 24시간 후에 처리하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 6] 제1항의 방법으로 줄기세포능이 증가된 인간 중간엽 줄기세포.
- [청구항 7] 엔도텔린-1(Endothelin-1)을 유효성분으로 포함하는, 인간 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)의 줄기세포능(stemness) 증가용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 세포 배양액인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 엔도텔린-1은 0.0125 내지 0.25ug/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

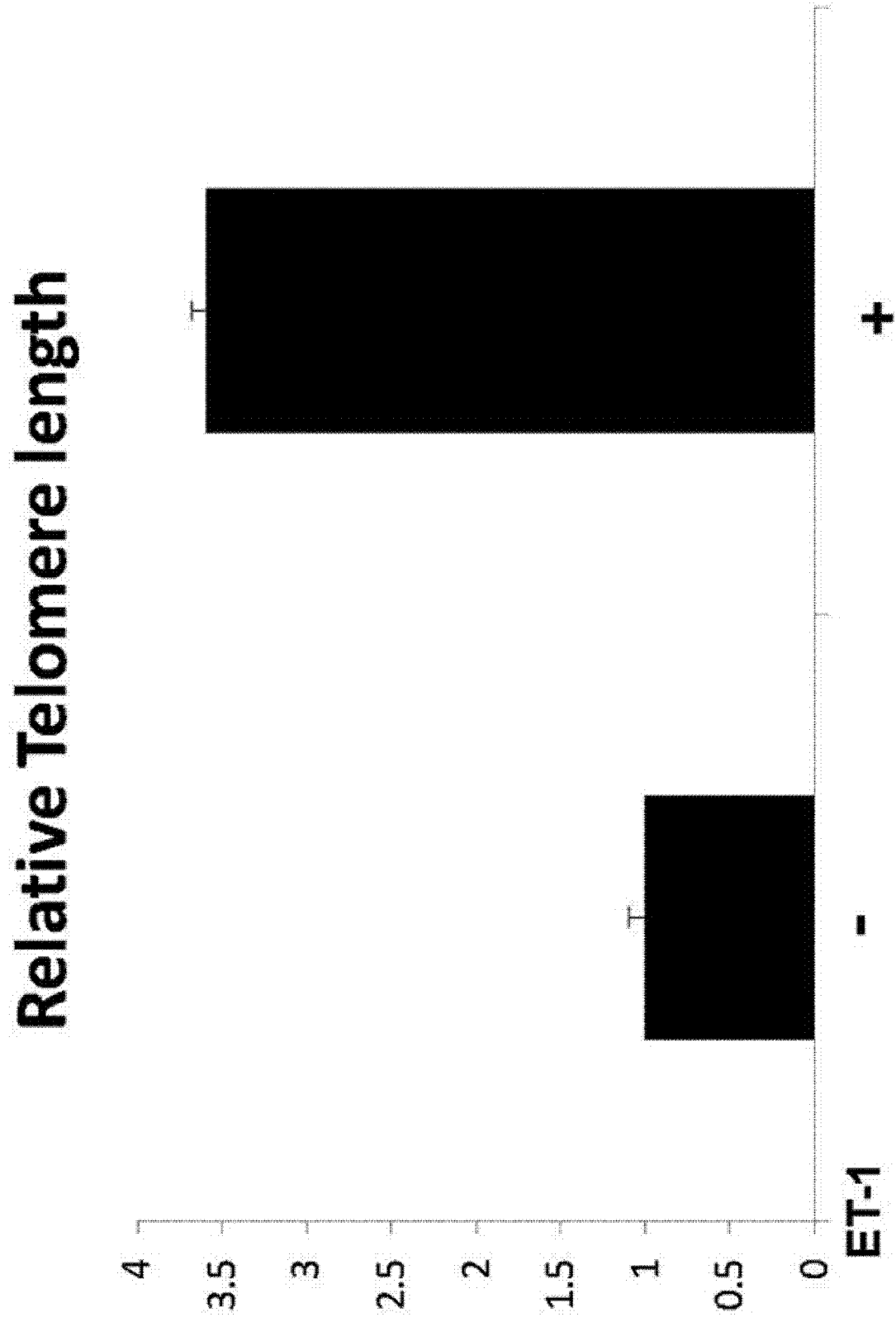
[도1]



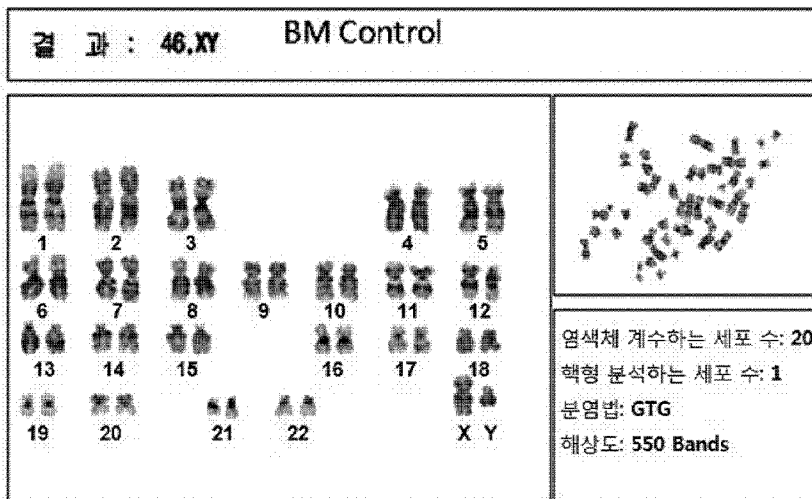
[도2]

Oct4

[도3]

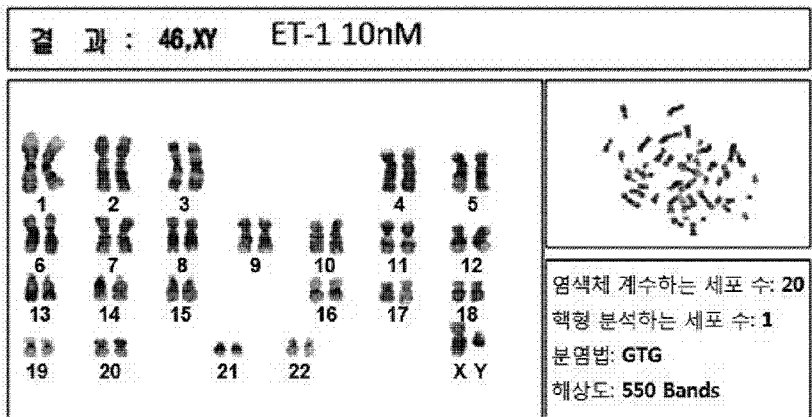


[도4]



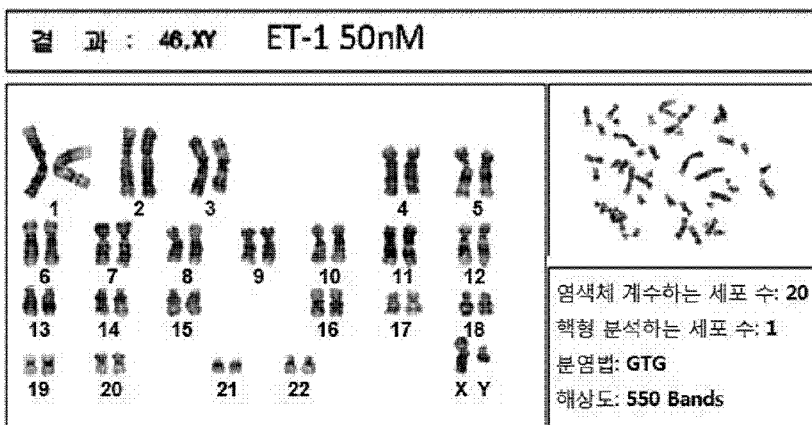
의 견

염색체 분석 결과 정상 핵형입니다.



의 견

염색체 분석 결과 정상 핵형입니다.



의 견

염색체 분석 결과 정상 핵형입니다.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/012751**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/0775(2010.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/0775; C12N 5/06; C12N 5/02; C12N 5/074; C12N 5/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mesenchymal stem cells, endothelin, cultivation, media, stemness

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0115688 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 24 October 2011 See claims 1, 5, 7 and paragraphs [0025], [0038].	1-9
X	US 2007-0082394 A1 (MOSCATELLO, D. K.) 12 April 2007 See claims 1, 3, 25, 32 and paragraph [0048].	1-9
A	KR 10-2012-0134360 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 12 December 2012 See claims 1-3.	1-9
A	KR 10-2013-0061658 A (R BIO CO., LTD.) 11 June 2013 See abstract and claim 1.	1-9
A	KR 10-0908481 B1 (CORESTEM CO., LTD.) 21 July 2009 See claim 1.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 FEBRUARY 2016 (29.02.2016)

Date of mailing of the international search report

29 FEBRUARY 2016 (29.02.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/012751

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0115688 A	24/10/2011	NONE	
US 2007-0082394 A1	12/04/2007	US 7989205 B2 WO 2007-044418 A2 WO 2007-044418 A3	02/08/2011 19/04/2007 23/04/2009
KR 10-2012-0134360 A	12/12/2012	WO 2012-165740 A1	06/12/2012
KR 10-2013-0061658 A	11/06/2013	AU 2012-346645 A1 AU 2012-346645 B2 CA 2856764 A1 CN 104114691 A EP 2811015 A1 JP 2015-500018 A KR 10-2015-0093645 A US 2014-0322811 A1 WO 2013-081436 A1	06/06/2013 27/08/2015 06/06/2013 22/10/2014 10/12/2014 05/01/2015 18/08/2015 30/10/2014 06/06/2013
KR 10-0908481 B1	21/07/2009	KR 10-2007-0104735 A WO 2007-123363 A1	29/10/2007 01/11/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/0775(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/0775; C12N 5/06; C12N 5/02; C12N 5/074; C12N 5/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중간엽 줄기 세포, 엔도텔린, 배양, 배지, 줄기세포능

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0115688 A (서울대학교병원) 2011.10.24 청구항 1, 5, 7 및 단락 [0025], [0038] 참조.	1-9
X	US 2007-0082394 A1 (MOSCATELLO, D. K.) 2007.04.12 청구항 1, 3, 25, 32 및 단락 [0048] 참조.	1-9
A	KR 10-2012-0134360 A (서울대학교병원) 2012.12.12 청구항 1-3 참조.	1-9
A	KR 10-2013-0061658 A (주식회사 알앤엘바이오) 2013.06.11 요약 및 청구항 1 참조.	1-9
A	KR 10-0908481 B1 (코아스템(주)) 2009.07.21 청구항 1 참조.	1-9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 02월 29일 (29.02.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 02월 29일 (29.02.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

특허청장

전화번호 +82-42-481-8116



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0115688 A	2011/10/24	없음	
US 2007-0082394 A1	2007/04/12	US 7989205 B2 WO 2007-044418 A2 WO 2007-044418 A3	2011/08/02 2007/04/19 2009/04/23
KR 10-2012-0134360 A	2012/12/12	WO 2012-165740 A1	2012/12/06
KR 10-2013-0061658 A	2013/06/11	AU 2012-346645 A1 AU 2012-346645 B2 CA 2856764 A1 CN 104114691 A EP 2811015 A1 JP 2015-500018 A KR 10-2015-0093645 A US 2014-0322811 A1 WO 2013-081436 A1	2013/06/06 2015/08/27 2013/06/06 2014/10/22 2014/12/10 2015/01/05 2015/08/18 2014/10/30 2013/06/06
KR 10-0908481 B1	2009/07/21	KR 10-2007-0104735 A WO 2007-123363 A1	2007/10/29 2007/11/01