



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0115009
(43) 공개일자 2017년10월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/12 (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0121790(분할)
(22) 출원일자 2017년09월21일
심사청구일자 2017년09월21일
- (62) 원출원 특허 10-2016-0012698
원출원일자 2016년02월02일
심사청구일자 2016년08월23일

- (71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- (72) 발명자
김유희
경기도 파주시 동패로 117, 202동 503호 (동패동, 벽산아파트)
- 유경하
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 4 항

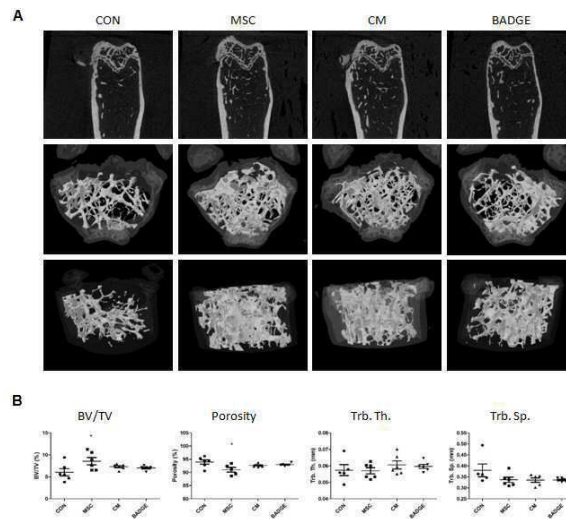
(54) 발명의 명칭 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 이의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효성분으로 포함하는 골다공증, 내장비만 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 약학 조성물은 골아세포 분화 증진, 지방 세포 분화 억제, 골수 지방 감소, 내장 지방 축적 억제, 체중 감소 효과를 보임으로써 골다공증 및/또는 내장비만에 대한 현저한 예방 및 치료 효과를 보인다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 5/0662 (2013.01)

(72) 발명자

우소연

서울특별시 마포구 독막로 209, 103동 1501호 (신수동, 세양청마루아파트)

조정아

서울특별시 강남구 개포로110길 43, 104동 605호 (일원동, 한신아파트)

박민화

대구광역시 달서구 구마로12길 89, 502동 107호 (본동, 월성주공5단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049823

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업> 바이오, 의료기술개발사업> 세포재생기술개발사업

연구과제명 편도 줄기세포의 응용 원천기술 발굴을 위한 융합연구

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2057468

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업> (구)일반연구자지원사업> (구)기본연구지원사업

연구과제명 골수재건을 위한 새로운 조혈모세포 공급원의 발굴

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지를 유효 성분으로 포함하는 내장비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 내장 비만은 정소주변지방, 장간막지방 및 후복강지방의 지방 축적에 의한 것인 내장비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 혈청 배지에서 배양된 배양액, 배양상층액 또는 이의 농축물인 내장비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내장비만 예방 또는 치료는 내장지방 축적 억제에 의한 것인 내장비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 골다공증, 내장 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뼈의 발생, 성장 및 대사과정에는 뼈의 형성(bone modeling)과 재형성(remodeling) 과정이 중요한 역할을 한다. 뼈의 형성은 태생기부터 시작하여 이후 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속되어 20대에서 30대 초반까지 최대 골량을 형성하게 된다. 이후 약 30년 동안은 뼈를 제거하고 다시 이를 보충하는 골재형성 과정을 반복하게 되는데 이때는 골형성과 골흡수가 서로 짝을 이루어 균형을 유지하게 된다. 이 시기가 지난 후에는 골 흡수에 따른 골소실을 골형성이 충분히 따라갈 수 없어 결국 연 0.3 ~ 0.5 % 정도의 골량 감소를 겪게 되며, 특히 여성의 경우에는 폐경 초기에 연 2 ~ 3 %의 상당한 골손실을 겪게 된다.

[0003] 골다공증은 골밀도와 골질에 의해 결정되는 골강도의 약화로 인해 골절의 위험성이 증가하는 골격계 질환이다. 1 차성(원발성) 및 2 차성(속발성) 골다공증으로 나누어지며, 1차성 골다공증은 여성의 폐경과 관련되어 발생하는 I 형과 성별에 관계없이 연령 증가로 발생하는 II 형으로 구분된다. 이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 또한 전 세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있고 현재 골흡수 억제제의 개발이 활발히 진행되고 있다. 또한, 최근에는 줄기세포를 직접 손상된 조직에 이식하는 방법 이외에 줄기세포의 배양액에 포함된 매개성 물질의 탁월한 측분비 효과가 생체내 또는 생체의 실험에서 입증되고 있다. 줄기세포는 인체 내에서 일생 동안 세포의 성장과 재생에 관련된 다양한 성장인자와 사이토카인 등을 분비하고, 줄기세포 배양액에는 이러한 단백질 성분들이 함유되어 있으며, 세포이식 시의 부작용인 면역거부반응을 회피할 수 있으므로, 줄기세포 배양액은 치료제로 개발하기에 유리한 장점을 가지기 때문에 관련 연구개발이 진행되고 있다.

[0004] 한편, 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다.

[0005] 치료 방법으로서 최근 줄기세포 및 조직공학을 이용한 이식치료법이 개발되고 있다. 하지만, 이러한 이식 치료

기법으로는 치료효과가 뛰어나고 인체의 면역반응을 일으키지 않는 안정한 세포 치료제를 개발하기 어렵다는 문제가 있다. 그 동안 여러 가지 줄기세포를 이용하여 세포 치료제로써 활용하기 위한 시도들이 진행되고 있지만, 면역 조절 능력에 대한 확인은 아직 부분적으로만 진행되고 있다. 또한, 최근에는 줄기세포를 직접 손상된 조직에 이식하는 방법 이외에 줄기세포의 배양액에 포함된 매개성 물질의 탁월한 측분비 효과가 생체내 또는 생체의 실험에서 입증되고 있다. 줄기세포는 인체 내에서 일생 동안 세포의 성장과 재생에 관련된 다양한 성장인자와 사이토카인 등을 분비하고, 줄기세포 배양액에는 이러한 단백질 성분들이 함유되어 있으며, 세포이식 시의 부작용인 면역거부반응을 회피할 수 있으므로, 줄기세포 배양액은 치료제로 개발하기에 유리한 장점을 가지기 때문에 관련 연구개발이 진행되고 있다.

[0006] 상기와 같은 줄기세포 관련 연구를 진행하기 위해서는 줄기세포의 원활한 공급이 필요하다. 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 세포능이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0007] 또한, 줄기세포들은 그 유래에 따라 그 특성이 상이하다.

[0008] 따라서 특정 질환에 대한 치료를 위해 질환에 따라 치료에 적합한 특성을 가지는 줄기세포를 선택하고 이의 특성을 이용하여 특정 질환에 대한 치료 방법을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0135263호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0033471호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효 성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효 성분으로 포함하는 내장 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 골다공증, 내장 비만 등의 내분비계 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 적합한 종류의 줄기세포를 확인하던 중, 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두가 골아세포 분화 증진 및 지방세포 분화 억제에 효과를 가지며 골과 지방의 항상성 조절에 효과가 있음을 확인하고, 이로써 골다공증 및 내장 비만과 같은 내분비계 질환의 치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에 서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를

의미한다.

- [0014] 본 발명에 있어서, "편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지"는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하여 수득된 배양액 자체, 또는 그로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포가 제거된 배양 상층액을 의미하며, "편도 유래 중간엽 줄기세포 배양 상층액", "편도 유래 중간엽 줄기세포 조건 배양액" 또는 "편도 유래 중간엽 줄기세포 배양 배지"와 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 골다공증이란 골밀도와 골질에 의해 결정되는 골강도의 약화로 인해 골절의 위험성이 증가하는 골격계질환을 의미한다. 본 발명에 따른 골다공증은 바람직하게 노인성 골다공증이다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 내장 비만은 체내 장기를 둘러싸고 있는 체강 내에 축적되는 지방의 축적이 심하여 건강에 위험을 줄 수 있는 상태를 의미한다. 내장 비만에 따른 지방 축적은 정소주변지방, 장간막지방 및 후복강지방의 지방 축적을 포함한다. 내장지방이 많으면 우리 몸의 인슐린 작용을 방해하고 염증 물질이 늘어나 다양한 합병증을 발생시킬 수 있으며, 예컨대 당뇨, 관상동맥질환, 이상지질혈증(콜레스테롤 이상) 등을 유발할 수 있다.
- [0017] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효 성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두를 유효 성분으로 포함하는 내장 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두는 타 유래 중간엽 줄기세포와 대비하여 현저한 골아 세포 분화 증진, 지방 세포 분화 억제 및 골수 지방 감소 효과를 보여 골다공증, 특히 노인성 골다공증의 진행 억제에 현저한 효과를 보인다.
- [0020] 또한, 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두는 타 유래 중간엽 줄기세포와 대비하여 현저한 내장 지방 축적 억제, 체중 감소 효과를 보여 내장 비만 치료에 현저한 효과를 보인다.
- [0021] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 타 유래 줄기세포와 대비하여 기원 조직인 편도의 획득이 용이하며 수술 후 버려지는 편도 조직의 재활용이 가능하고 초기 수득율이 매우 높다는 점에서 주입해야 하는 세포, 조정 배지 및 이들 모두의 양을 자유롭게 조절할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 또는 이들 모두는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포, 조직, 이의 조정 배지 및 이들 모두를 포함하며, 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 골다공증 및/또는 내장비만에 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서 골다공증 및/또는 내장비만은 상기 언급된 바와 같다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에서 알려진 방법에 따라 편도로부터 추출 가능하다. 예컨대, 대한민국특허 제10-1508413호 등에 기재된 방법에 따라 편도로부터 추출가능하다.
- [0025] 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하고, 세포를 제거한 후 수득된 배양액, 배양 상층액 또는 이의 농축물이거나 이의 동결건조물일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 유래 중간엽 줄기 세포를 혈청 배지에서 계대 배양한 후, 수득될 수 있다. 바람직하게, 5 중량% 내지 12 중량%의 혈청 배지에서 배양되어 수득될 수 있다. 또한, 이를 추가로 무혈청 배지에서 배양하여 수득될 수 있다.
- [0027] 편도 유래 중간엽 줄기세포는 줄기세포 배양용 배지를 사용하여 통상적으로 배양될 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 조직으로부터 수득된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 혈청 배지에서 계대배양하여 사용하거나, 무혈청 배지에서 추가로 배양하여 수득될 수 있다. 이를 그대로 사용하거나 또는 원심분리나 필터를 이용한 여과에 의해 줄기세포 및 거대분자를 제거한 후에 수득된 상층액을 사용할 수 있다. 또한, 수득된 상층액은 그대로 사용하거나 또는 농축하여 수득된 농축물로 사용할 수 있다.
- [0028] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양을 위한 배양용 배지 및 배양 조건은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 통상의 지식을 가진 자가 적절하게 선택하거나 변형하여 이용할 수 있다.
- [0029] 상기 혈청 배지는 편도 유래 중간엽 줄기세포와 동일한 세포형을 유지하고 보관하는데 적합한 배지로서, 혈청이 보충된 DMEM 배지일 수 있다. 혈청은 우태아혈청(FBS)일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 혈청 배지의 총 중

량에 대해 1 내지 10 중량%일 수 있다. 필요에 따라, 항생제, 항진균제 및 마이코플라스마 억제제 등을 포함할 수 있으며, 이들은 배지의 총 중량에 대해 1 중량%일 수 있다. 항생제는 페니실린-스트렙토마이신 등 세포 배양에서 통상적으로 사용되는 항생제를 포함하고, 항진균제는 암포테리신-B(fungizone) 등을 포함하며, 마이코플라스마 억제제는 겐타마이신, 시프로플록사신, 타일로신 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0030] 상기 무혈청 배지 중에서의 배양은 혈청 배지에서의 배양액을 제거하고, 세포를 인산염 완충용액으로 세척한 후에 수행될 수 있다.
- [0031] 바람직하게, 상기 혈청 배지는 5 내지 12% 우태아혈청 및 1%의 항생제가 보충된 DMEM 배지일 수 있다.
- [0032] 바람직하게, 상기 무혈청 배지는 DMEM 배지일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도로부터 단리된 편도 조직을 잘게 자른 후, 편도 조직을 배양 플레이트의 바닥에 부착시키고, 10% 우태혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지 중에서 37°C 및 5% CO₂ 상태의 배양기에서 배양하는 단계, 세포의 밀도가 80%의 포화상태(confluence)에 도달했을 때, 세포를 분리하고 계대 배양시키는 단계; 배양된 세포가 70 % 내지 90 % confluence에 도달하였을 때 배지를 교환하는 단계; 세포를 추가로 1 내지 3일 배양하는 단계;에 의해 획득될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액은 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양액을 원심분리나 여과시켜 세포를 제거 및 농축하는 단계에 의해 획득될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 골다공증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 골다공증의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 1 ml 당 1.0×10^5 개 내지 1.0×10^{10} 개, 바람직하게는 1.0×10^6 개 내지 1.0×10^8 개의 세포를 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액, 에멀전, 로션, 연고, 동결건조제 등 다양한 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 편도 유래 중간엽 줄기세포, 이의 조정 배지 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제로는 이에 한정되지 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다. 이외에도, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소투여용 제제의 경우에는 기제(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife®) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [0039] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 10^5 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 5×10^5 내지 10^8 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 골다공증 및/또는 내장비만 예방 또는 치료용 약학 조성물은 골아세포 분화 증진, 지방 세포 분화 억제, 골수 지방 감소, 내장 지방 축적 억제, 체중 감소 효과를 보임으로써 골다공증 및/또는 내장비만에 대한 현저한 예방 및 치료 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골아세포로의 분화 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 골아세포 분화 관련 인자들의 시간에 따른 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 지방세포로의 분화를 phase contrast microscopy로 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 지방세포로의 분화를 오일 레드 O 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 지방 세포 분화 관련 인자들의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 편도 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 지방 세포 분화 억제 효과를 비교한 결과를 나타낸다.

도 7은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 의한 골다공증 치료 효과를 확인하기 위한 노인성 골다공증 동물 모델 실험 타임테이블을 나타낸다.

도 8은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 골유지능 증진 효과를 확인 결과를 나타낸다.

도 9는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 골수에서의 지방 감소 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 10는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 내장 지방 감소 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0043] <실시예 1> 지방 및 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제조

[0044] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, T-MSC)는 이대목동병원 이비인후-두경부 외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻었다. 이는 대한민국 등록 특허 제10-1508413호와 같이 제조되었으며, 편도 유래 중간엽 줄기세포 (7~8 passage)는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 하에 배양되었다.

[0045] 지방 유래 중간엽 줄기세포(AT-MSC)는 RNL Bio에서 제공되는 동일 계대의 세포를 사용하였으며, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 하에 배양되었다.

[0046] <실시예 2> 지방 및 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 (Conditioned medium) 제조

[0047] 조정 배지를 제조하기 위해 편도 유래 중간엽 줄기세포는 80 % confluency까지 배양되었고, 이에 도달한 후에 신선한 배양 배지로 교환되었다. 세포는 48 시간 추가로 배양되었고 조정 배지가 회수되었다. 조정 배지는 30분간 3800g로 원심분리에 의해 10배 농축되었다.

[0048] 상기와 동일하게 지방 유래 중간엽 줄기 세포에 대해서도 조정 배지가 제조되었다.

[0049] <실시예 3> 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 골아 세포 분화 촉진 확인

- [0050] 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 골아 세포로의 분화 촉진을 확인하였다.
- [0051] 골아세포 분화를 위하여 MC3T3-E1 마우스의 골아 전구 세포주는 ATCC로부터 구매되고 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 무-아스코르브산 α-MEM 배지에서 배양되었다.
- [0052] 골아세포의 분화는 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 50 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate 및 0.1 µM 텍사메타손을 함유하는 α-MEM 배지에서 골형성 유도가 수행되었다. 배지는 매 3일 내지 4일에 교환되었다.
- [0053] 상기 실시예 2에서 제조된 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지는 10배 농축한 후, 골아세포 분화 배지의 1/10 (1X CM), 1/40 (0.25X CM), 1/160 (0.0625X CM)의 양으로 첨가되었다.
- [0054] 골아세포에서의 matrix mineralization은 알리자린 레드 S 염색 (Alizarin Red S staining)에 의해 확인되었다. 분화가 수행된 세포는 PBS 워싱 후 60 % 이소프로판올로 5분간 상온에서 고정되었다. 세포는 증류수를 첨가하여 제조된 2 % 알리자린 레드 S (Sigma-Aldrich) 용액 (pH 4.1-4.3)에 5분간 반응시키거나 메트릭스의 염색이 눈에 보일 때까지 염색되었다. 세포는 4회 증류수로 워싱되었다. 착색은 570 nm 흡광도로 측정 전 10 % 세틸피리디늄클로라이드로 용리되었다.
- [0055] 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0056] 도 1의 A는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 첨가에 따른 골아 세포로의 분화를 확인한 결과를 보여준다. 도 1의 A에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 첨가는 MC3T3-E1 세포의 분화를 크게 증진시켰으며, 이는 타 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지인 지방 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지를 첨가한 실험군과 대비하여도 현저한 효능을 보이는 것이 확인되었다.
- [0057] 도 1의 B는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 첨가 농도에 따른 골아 세포의 분화를 확인한 결과를 보여준다. 도 1의 B에서 확인되는 바와 같이, 첨가되는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 농도 의존적으로 골아 세포 분화가 촉진되는 것이 확인되었다.
- [0058] <실시예 4> 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 골아 세포 분화 관련 인자들의 발현 변화 확인
- [0059] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정배지 처리에 따른 골아 세포 분화 관련 인자들의 발현 변화를 확인하였다.
- [0060] RT-PCR을 통해 세포 분화일에 따라 세포를 취합하여 (0, 1, 2, 3, 5, 7, 및 14일)에 따른 골아세포 분화 관련 인자들의 발현 변화를 확인하였다.
- [0061] RNA 추출은 제조사의 매뉴얼에 따라 Nucleospin RNA 키트(Macherey-Nagel, Duren, Germany)를 사용하여 추출되었다. RNA 시료의 농축 및 정제는 Biophotometer D30 (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하여 수행되었다. cDNA 합성을 위해, 1 µg RNA는 1 × RT 버퍼, 1 mM dNTP 혼합물, 0.5 µM 올리고dT프라이머, 0.5 U/µl RNase 억제제 및 ReverTra Ace 역전사 효소 (Toyobo)에 혼합되고 30 °C에서 10분, 42 °C에서 20분 99 °C에서 5분간 처리되었다.
- [0062] 표적 유전자의 발현은 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 측정되었다. 각 반응을 위해 프라이머 (0.4 µM)와 1×SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo)가 cDNA에 첨가되었다. cDNA를 증폭하기 위해 시료는 15 초간 95 °C 변성 및 1 분간 60 °C에서 증폭 및 signal acquisition을 40회 수행하였다. Cycle threshold 값이 획득되었고, 표적 유전자의 상대적 발현 수준이 결정되었다.
- [0063] 골아 세포 분화 관련 인자로서, Osterix, BSP-1 및 BSP-2의 발현변화가 확인되었으며, 이들의 발현 변화를 확인하기 위한 프라이머 서열은 하기와 같았다.

Osterix Forward primer	(서열번호 1)GGAAAGGAGGCACAAAGAAGC
Osterix Reverse primer	(서열번호 2)CCCCTTAGGCACTAGGAGC
BSP-1 Forward primer	(서열번호 3)AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA
BSP-1 Reverse primer	(서열번호 4)GTGAGATTCGTACGATTCATCCG
BSP-2 Forward primer	(서열번호 5)AACGGGTTTCAGCAGACAAC
BSP-2 Reverse primer	(서열번호 6)CCTCGTAGCCTTCATAGCCA
Cyclophilin Forward primer	(서열번호 7)CGTTTGGGTCCAGGAATGG
Cyclophilin Reverse primer	(서열번호 8)TACAGGACATTGCGAGCAGA

- [0064]
- [0065] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0066] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지의 처리는 Osterix의 발현을 크게 감소시켰

다. 또한, 비-콜라겐 매트릭스 단백질인 BSP-1 및 BSP-2의 발현을 크게 증가시켰다.

[0067] 위 결과로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지가 골아세포로의 분화 인자들의 발현 변화에 영향을 미침이 확인되었다.

[0068] <실시예 5> 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 지방 세포 분화 억제 확인

[0069] 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 지방 세포로의 분화 억제를 확인하였다.

[0070] 지방 세포로 분화 억제를 확인하기 위해 3T3-L1 마우스 지방 전구 세포주는 Korean Cell Line Bank에서 구매되었고, 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM high glucose 배지에서 배양되었다.

[0071] 상기 전구 지방 세포주는 4 mg/ml 인슐린, 0.22 µM 덱사메타손(dexamethasone), 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴 (IBMX), 및 0.1 µg/ml 비오틴을 포함하는 배지에서 분화가 유도되었다. 분화 유도 3일 후 세포는 인슐린만을 포함하는 배양 배지로 배양되었다. 실험 시작 후 6일까지 분화가 진행되고, 세포는 매 3일 내지 4일마다 성장 배지를 교환하며 유지되었다. 위 분화 과정에 있어서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지가 위의 골아세포 분화 때와 같이 농도별로 처리되었다.

[0072] 상기 지방 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따른 전구지방 세포의 분화는 phase contrast microscopy (200 x magnification)을 이용하여 지방세포의 분화가 확인되었으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0073] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 지방 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지 처리에 따라 농도 의존적으로 세포 내 지방구 형성이 억제되는 것이 확인되었으며, 이로부터 지방 세포로 분화가 억제되는 것이 확인되었다.

[0074] 또한, 지방 축적을 확인하기 위해, 오일 레드 O 염색이 수행되었다.

[0075] 상기 분화가 진행된 세포는 PBS로 워싱되고 4 % 파라포름알데히드로 5분간 상온에서 고정되었다. 고정액은 버려졌고, 고정된 세포는 완전히 건조되었다. 오일 레드 O(Sigma-Aldrich)는 증류수와 6:4의 비율로 혼합된 8.5 mM stock 용액을 제조하기 위해 이소프로판올에 용해되었고 working solution 제조를 위해 0.45 µm 필터로 필터되었다. working solution은 고정된 세포에 첨가되었고 10분간 상온에서 반응되었다. 오일 레드 O 용액은 제거되고 고정된 세포는 증류수로 4회 워싱되었다. 착색은 540 nm 흡광도에서 측정되기 전에 100 % 이소프로판올로 용리되었다.

[0076] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 처리에 따라 농도 의존적으로 지방 세포로의 분화가 억제되는 것이 확인되었다.

[0077] <실시예 6> 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 지방 세포 분화 관련 인자들의 발현 변화 확인

[0078] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 처리에 따른 지방 세포 분화 관련 인자들의 발현 변화 확인하였다.

[0079] 실시예 2와 유사하게 RT-PCR을 수행하였으며, 분화를 진행한지 10일이 지난 후 세포를 취합하여 이를 이용하여 지방 세포 분화 관련 인자들의 발현 변화를 확인하였다.

[0080] 위 지방 세포 분화 관련 인자들로서 PPAR γ, C/EBP α, SREBP-1c, G3PDH, ACC, FAS, leptin 및 adiponectin의 발현 변화가 확인되었으며, 하기 서열의 프라이머들이 이용되었다.

PPAR γ Forward primer	(서열번호 9)GGAAGACCACTCGCATTCTT
PPAR γ Reverse primer	(서열번호 10)GTAATCAGCAACCATTGGGTCA
C/EBPα Forward primer	(서열번호 11)CAAGAACAGCAACGAGTACCG
C/EBPα Reverse primer	(서열번호 12)GTCACGTGGTCAACTCCAGCAC
SREBP-1c Forward primer	(서열번호 13)AGCAGCCCTAGAACAACAC
SREBP-1c Reverse primer	(서열번호 14)CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT
G3PDH Forward primer	(서열번호 15)GGGTCCCAGCTTAGGTTTCAT
G3PDH Reverse primer	(서열번호 16)CATTTCTCGCCTTGACTGTG
ACC Forward primer	(서열번호 17)TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
ACC Reverse primer	(서열번호 18)TGGAGAGCCCCACACACA
FAS Forward primer	(서열번호 19)CTGGACTCGCTCATGGGTG
FAS Reverse primer	(서열번호 20)CATTTCTGAGTTTCCGAG
Leptin Forward primer	(서열번호 21)GTGGCTTTGGTCTATCTGTC
Leptin Reverse primer	(서열번호 22)CGTGTGTGAAATGTCAATTGATCC
Adiponectin Forward primer	(서열번호 23)GTTCCCAATGTACCCATTGCG
Adiponectin Reverse primer	(서열번호 24)TGTTGCAGTAGAACTTGCCAG

[0081]

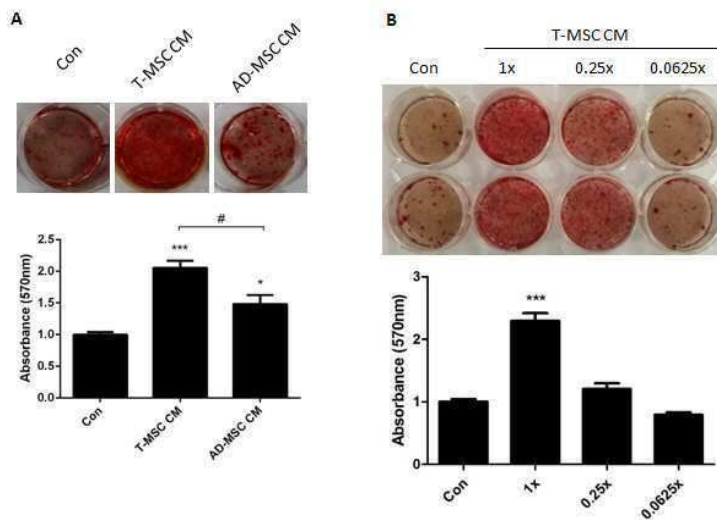
[0082] 상기 RT-PCR 수행 결과를 도 5에 나타내었다.

- [0083] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 조정 배지 처리에 따라 지방 분화와 관련된 인자인 PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c, G3PDH, ACC, FAS, leptin 및 adiponectin 모두 그 발현이 감소되는 것이 확인되었다.
- [0084] <실시예 7> 중간엽 줄기세포 처리에 따른 지방 세포 분화 억제 및 PPAR γ 발현 변화 확인
- [0085] 실시예 5와 유사하게 지방세포에 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포를 처리(1x CM)하여, 지방 세포로의 분화 억제 효과를 실시예 5 및 실시예 6에서와 같이 Oil red O 염색 및 RT-PCR을 통해 확인하였다.
- [0086] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6의 A는 Oil red O 염색 결과를 나타내며, 도 6의 B는 RT-PCR 실험 결과를 나타낸다.
- [0087] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 처리한 실험군이 지방 유래 중간엽 줄기세포를 처리한 실험군과 대비하여 지방 세포로의 분화 억제 효과가 큰 것이 확인되었으며, PPAR γ 의 발현이 크게 억제되는 것이 확인되었다.
- [0088] <실시예 8> 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 노인성 골다공증 진행 경감 효과 확인
- [0089] 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 노인성 골다공증 진행 경감 효과를 확인하였다.
- [0090] 실험을 위한 타임테이블은 도 7과 같으며, 구체적으로 하기와 같이 실험이 수행되었다.
- [0091] SAMP6 동물(Japan SLC, Shizuoka Prefecture, Japan)은 12시간 주간/야간 주기로 온도 21-23 °C 및 습도 51-54 %에서 키워졌다. 음식 및 물은 자유식으로 제공되었다. 실험 및 절차는 이화여자대학교 동물 윤리위원회의 승인 하에 수행되었고, 모든 실험은 관련 규제 및 가이드라인 하에 수행되었다.
- [0092] 7 개월의 노령 마우스는 치료 그룹 간 몸무게의 다양성을 최소화하기 위해 평균 몸무게를 매칭하여 4 그룹으로 분리되었다. 대조군 (200 μ l DMEM), 편도유래 중간엽 줄기세포 (200 μ l DMEM 하의 0.8×10^6 개 세포) 또는 편도 유래 중간엽 줄기세포 조정 배지(0.8×10^6 개 세포의 48시간 배양 조정 배지로부터 200 μ l로 20배 농축한 조정 배지)는 2주 동안 주 2회 꼬리 정맥을 통해 주사되었다. 골수 지방 조직(MAT)을 감소시키는 것으로 알려진 합성 PPAR γ antagonist인 bisphenol-A-diglycidyl ether (BADGE, Sigma-Aldrich)은 14일 동안 복강내 주사 (30 mg/kg)으로 투여되었다.
- [0093] 몸무게는 측정되었고, 혈액 및 소변은 6시간 동안 금식 후 7, 8, 9달 연령에서 수집되었다. 실험 수행에 따라 9달 연령이 된 마우스는 희생되고 추가적인 분석을 위해 조직이 적출되었다.
- [0094] 조직 분석을 위하여 Micro-CT 촬영이 2D 및 3D로 수행되었다. 마우스 대퇴골은 4 % 파라포름알데히드로 4 °C에서 밤샘으로 고정되었고, micro-CT 스캔은 SkyScan 1172 기기 및 Bruker microCT (Kontich, Belgium) 프로그램으로 수행되었다.
- [0095] 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8의 A에 나타낸 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 투여한 그룹은 음성 대조군 및 양성대조군으로 BADGE를 투여한 그룹보다도 골 유지능이 높게 나타남이 확인되었다.
- [0096] 또한 위 3D Micro-CT 이미징 결과로부터 뼈 부피(bone volume)/조직 부피(tissue volume)(BV/TV, %), 다공성(porosity) (%), 뼈 잔기둥 두께(trabecular thickness) (Trb. Th., mm) 및 뼈 잔기둥 간 간격(trabecular separation) (Trb. Sp., mm)이 측정되었으며, 그 결과를 도 8의 B에 나타내었다.
- [0097] 도 8의 B에서 확인되는 바와 같이, 뼈 부피/조직 부피의 비율은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 투여한 그룹에서 높게 나타났다. 또한, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 투여한 그룹에서 다공성은 감소하고, 뼈 잔기둥 두께는 증가하고, 뼈 잔기둥 간 간격은 감소하였음이 확인되어 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지를 투여한 그룹의 노인성 골다공증 치료 효과가 확인되었다.
- [0098] <실시예 9> 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 골수에서 지방 생성 감소 확인
- [0099] 상기 실시예 8에서 희생된 마우스 대퇴골은 분리되고 PBS 하 4 % 파라포름알데히드 용액으로 고정되었다. 탈석회 및 파라핀 포매 대퇴골은 얇게 잘려졌고 H&E 염색 대상이 되었다. 원위 대퇴골 H&E 염색 섹션이 촬영되었고 지방 침투는 NIH ImageJ software를 이용하여 계산되었다.

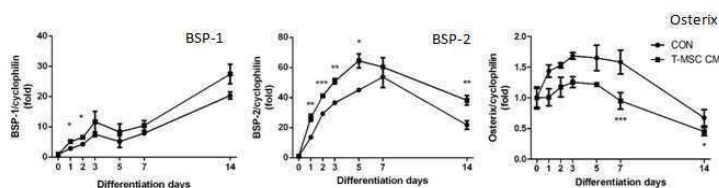
- [0100] 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0101] 도 9의 A는 H&E 염색 결과를 보여주며, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 의해 지방 세포의 생성이 크게 감소되었음이 확인되었다.
- [0102] 상기 H&E 염색 결과로부터 지방 %, 지방의 평균 크기 및 mm^2 당 지방세포의 수가 확인되었으며, 그 결과를 도 9의 B에 나타내었다.
- [0103] 도 9의 B에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따라 골수에서의 지방 비율이 감소되었고, 지방의 평균 크기 및 mm^2 당 지방 세포의 수가 크게 감소됨이 확인되었다.
- [0104] <실시예 10> 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 내장 지방의 축적 감소 확인
- [0105] 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지 투여에 따른 몸무게 변화 확인을 통해 내장 지방 축적 감소 효과를 확인하였다.
- [0106] 내장 지방 조직의 무게 감소를 확인하기 위해, 조직은 분리되고 장간막 지방(mesenteric, mAT), 정소주변 지방(epididymal, eAT), 복막 뒤 지방(retroperitoneal, rAT)에서의 조직 무게가 측정되었다.
- [0107] 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0108] 도 10에서 확인되는 바와 같이, 장간막 지방(mesenteric, mAT), 정소주변 지방(epididymal, eAT), 복막 뒤 지방(retroperitoneal, rAT)에서 조직의 무게가 감소된 것이 확인되었다.
- [0109] 위 결과로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이의 조정 배지가 내장 지방의 축적 감소에 효과가 있음이 확인되었다.

도면

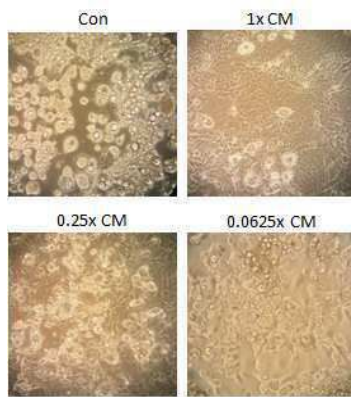
도면1



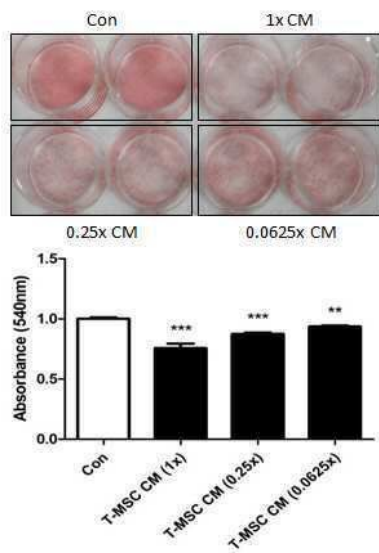
도면2



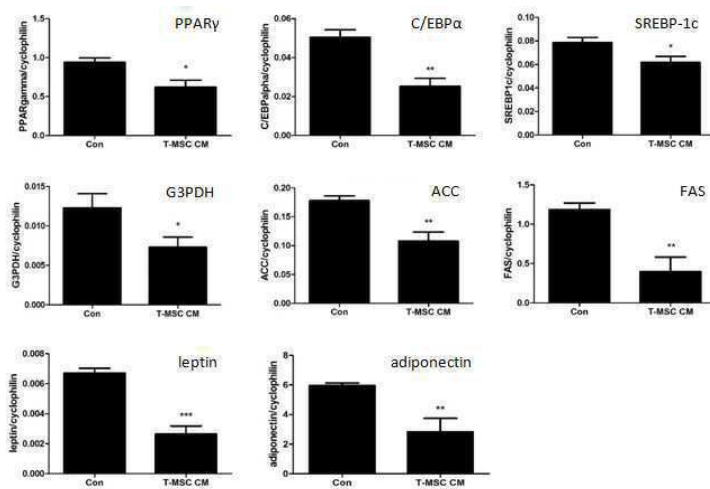
도면3



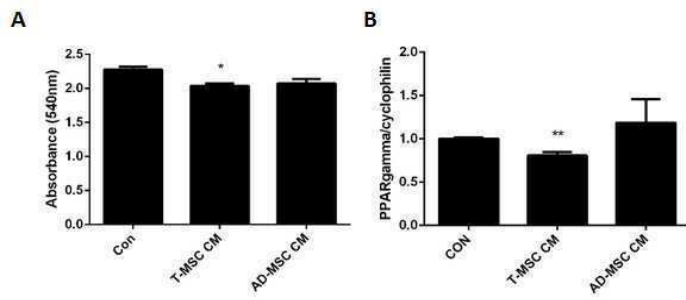
도면4



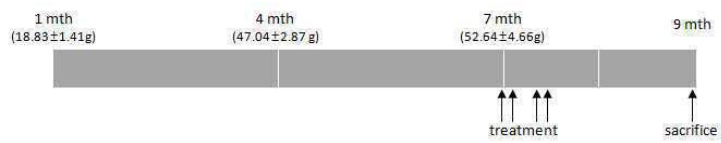
도면5



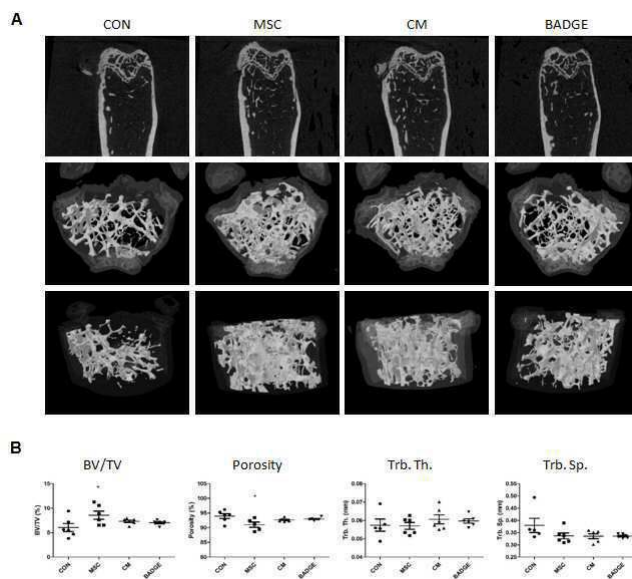
도면6



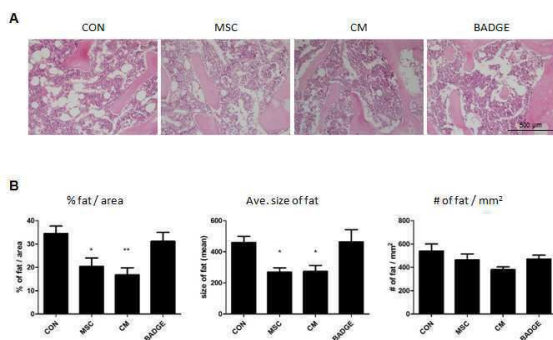
도면7



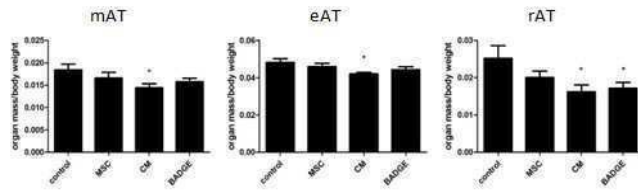
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> A COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING OF OSTEOPOROSIS
COMPRISING TONSIL-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL OR CONDITIONED
MEDIUM THEREOF
- <130> P15-183-EWHA
- <160> 24
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Osterix Forward primer
- <400> 1
- ggaaaggagg cacaaagaag c 21
- <210> 2
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Osterix Reverse primer
- <400> 2
- ccccttaggc actaggagc 19
- <210> 3
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> BSP-1 Forward primer
- <400> 3
- agcaagaaac tcttcaagc aa 22

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BSP-1 Reverse primer
 <400> 4

gtgagattcg tcagattcat ccg 23

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BSP-2 Forward primer
 <400> 5

aacgggtttc agcagacaac 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BSP-2 Reverse primer
 <400> 6

cctcgtagcc ttcatagcc 20

<210> 7
 <211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Cyclophilin Forward primer
 <400> 7

cgttttgggt ccaggaatgg 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cyclophilin Reverse primer

<400>	8	
tacaggacat	tgcgagcaga	20
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR gamma Foward primer	
<400>	9	
ggaagaccac	tcgcattcct t	21
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR gamma Reverse primer	
<400>	10	
gtaatcagca	accattgggt ca	22
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C/EBP alpha Forward primer	
<400>	11	
caagaacagc	aacgagtacc g	21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C/EBP alpha Reverse primer	
<400>	12	
gtcactggtc	aactccagca c	21
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SREBP-1c Forward primer	
<400>	13	
	agcagcccct agaacaaca c	21
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SREBP-1c Reverse primer	
<400>	14	
	cagcagtgag tctgccttga t	21
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G3PDH Forward primer	
<400>	15	
	gggtcccagc ttaggttcat	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G3PDH Reverse primer	
<400>	16	
	cattctcggc cttgactgtg	20
<210>	17	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ACC Forward primer	
<400>	17	
	tgacagactg atcgagaga aag	23
<210>	18	

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACC Reverse primer
 <400> 18
 tggagagccc cacacaca 18
 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FAS Forward primer
 <400> 19
 ctggactcgc tcatgggtg 19
 <210> 20
 <211> 21
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FAS Reverse primer
 <400> 20
 catttcctga agtttcgca g 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> leptin Forward primer
 <400> 21
 gtggctttgg tcctatctgt c 21
 <210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> leptin Reverse primer
 <400> 22

cggtgtgtgaa atgtcattga tcc

23

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> adiponectin Forward primer

<400> 23

gttcccaatg taccattcg c

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> adiponectin Reverse primer

<400> 24

tggtgcagta gaacttgcca g

21