(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0103718
(43) 공개일자 2020년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) *C12Q 1/6809* (2018.01)
G01N 33/537 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0656 (2013.01)
C12Q 1/6809 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-7019897
(22) 출원일자(국제) 2018년12월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년07월09일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2018/053760
(87) 국제공개번호 WO 2019/122931
국제공개일자 2019년06월27일
(30) 우선권주장
1721738.1 2017년12월22일 영국(GB)

(71) 출원인
킹스칼리지런던
영국런던더블유씨2알2엘에스스트랜드
(72) 발명자
와트, 피오나
영국 에스이1 9알티 런던, 킹스 칼리지 런던, 가이스 타워 28층, 줄기세포 및 재생의학 센터
필리페오스, 크리스티나
영국 에스이1 9알티 런던, 킹스 칼리지 런던, 가이스 타워 28층, 줄기세포 및 재생의학 센터
린츠, 마그너스
영국 에스이1 9알티 런던, 킹스 칼리지 런던, 가이스 타워 28층, 줄기세포 및 재생의학 센터
(74) 대리인
김동완

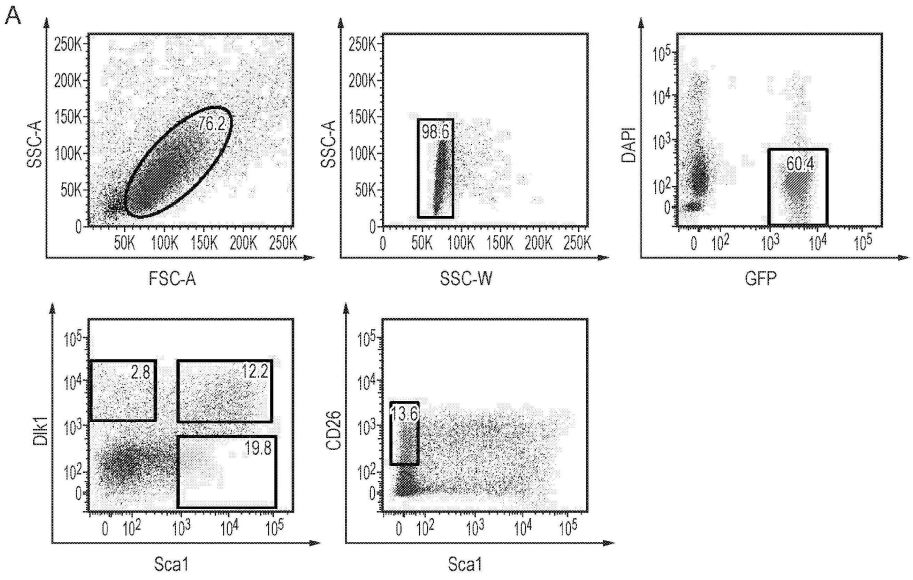
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **인간 피부 섬유아세포의 분리 방법**

(57) 요 약

(a) 인간 피부 섬유아세포를 포함하는 세포 집단을 제공하는 단계; 및 (b) CD39, CD36 및 CD26으로부터 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커의 발현에 기초하여 인간 피부 섬유아세포를 아집단으로 분리하는 단계를 제공한다. 또한 인간 피부 유두 섬유아세포의 분리된 집단 및 그의 미용적 및 치료적 용도가 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 33/537 (2013.01)
G01N 33/56966 (2013.01)
G01N 33/6881 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2509/10 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 인간 피부 섬유아세포를 포함하는 세포 집단을 제공하는 단계; 및

(b) CD39, CD36 및 CD26에서 선택된 하나 또는 그 이상의 세포 표면 마커의 발현에 기반하여 인간 피부 섬유아세포를 아집단으로 분리하는 단계;

를 포함하는 인간 피부 섬유아세포를 선별하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포는 유세포 분석법으로 분리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포는 CD90을 발현하는 세포를 선별하여 세포 집단으로부터 분리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포는 CD45- CD31- CD324- CD90+ 세포 표면 표현형을 지니는 세포를 선별하여 다른 인간 진피 세포로부터 분리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

선행 항 중 한 항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포의 첫 번째 아집단은 CD39+CD26- 세포 표면 표현형을 지니는 세포를 선별하여 분리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 첫 번째 아집단은 유두 섬유아세포를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

선행 항 중 한 항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포의 두 번째 아집단은 CD39- 또는 CD39+CD26+ 세포 표면 표현형을 지니는 세포를 선별하여 분리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 두 번째 아집단은 망상 섬유아세포를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

선행 항 중 한 항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포의 세 번째 아집단은 CD36을 발현하는 세포를 선별하여 분리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 세 번째 아집단은 지방전구 섬유아세포를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

선행 항 중 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 시험관 내 세포 배양 단계에서 분리된 하나 이상의 아집단을 확장시키는 단계를 더욱 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아집단은 Wnt, 형질전환 성장 인자(transforming growth factor) 베타, 섬유아세포 성장 인자 또는 헤지호그 신호전달 경로를 모듈레이트 하는 작용제의 존재 하에 시험관 내에서 배양됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

선행 항 중 한 항에 있어서, COL6A5, COL23A1, HSPB3, WNT5a, RSPO1, LEF1, RGS5, MFAP5, PRG4, CD9, CD11a, CD29, CD34, CD44, CD47, CD59, CD70, CD73, CD81, CD87, CD105, CD141, CD142, CD147, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, 데코린, 루미칸 및 디시알로갱글리오사이드 GD2에서 선택된 하나 또는 그 이상의 추가적 마커의 아집단 내의 발현을 결정하는 단계를 더욱 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

선행 항 중 한 항에 정의된 방법으로 수득되거나 수득할 수 있는 인간 피부 섬유아세포의 분리된 아집단.

청구항 15

CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26- 세포 표면 표현형의 발현에 의해 특성화 되는 인간 피부 유두 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 16

CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39- 또는 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26+ 세포 표면 표현형의 발현에 의해 특성화 되는 인간 피부 망상 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 17

CD45- CD31- CD324- CD90+ CD36+ 세포 표면 표현형의 발현에 의해 특성화 되는 인간 피부 지방전구 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 18

의약으로 사용하기 위한 제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 정의된 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 19

피부 장애를 치료하기 위한 제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 정의된 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 20

상처 치유를 촉진하기 위한 제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 정의된 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 21

켈로이드성 흉터, 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 피부 궤양 또는 수포성 표피박리증을 치료하기 위한 제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 정의된 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단.

청구항 22

제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 피험자의 피부에 투여하는 단계를 포함하는 인간 피험자에서 피부 노화 또는 흉터를 예방 또는 치료하기 위한 미용적 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포는 피험자에게 자가 조직임을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 22항에 있어서, 인간 피부 섬유아세포는 피험자에게 동종 이계임을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

(a) 제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단에 작용제를 접촉시키는 단계;

(b) 작용제의 존재 하에서 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단의 활성을 결정하는 단계;

를 포함하는 인간 피부 섬유아세포 활성을 모듈레이트 시키는 작용제를 식별하기 위한 스크리닝 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 다수의 후보 작용제를 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단과 접촉시키고 인간 피부 섬유아세포의 활성을 모듈레이트하는 작용제를 선별함을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 27

상처 치유를 촉진하기 위해 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26- 세포 표면 표현형의 발현에 의해 특성화 되

는 인간 피부 유두 섬유아세포 의 분리된 집단.

청구항 28

흉터 위험성 감소로 상처 치유를 촉진하기 위해 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26- 세포 표면 표현형의 발현에 의해 특성화 되는 인간 피부 유두 섬유아세포 의 분리된 집단.

청구항 29

흉터의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26- 세포 표면 표현형의 발현에 의해 특성화 되는 인간 피부 유두 섬유아세포 의 분리된 집단.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부과 분야에 관한 것으로 더욱 상세하게는 피부 상태, 노화 및 상처 치유에서의 섬유아세포의 역할에 관한 것이다. 본 발명은 보다 구체적으로 인간 피부 섬유아세포를 아집단(subpopulation)으로 선별하고 배양을 통해 유익한 아집단을 확장시키는 방법 및 시험관 내에서 독성학적 및 미용적 스크리닝을 위해 의학적 및 미용적 방법으로 선별된 집단의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 후생 동물 체제(metazoan body plan)의 패러다임은 상피와 중간엽 엘레먼트의 결합이 3차원 장기 구조로 되는 것이다. 포유류 피부는 이 패턴의 원형을 나타낸다. 표피, 층화된 편평 상피는 중간엽 조직인 진피 위를 덮고 있다. 표피 및 다른 상피 내의 세포 계통 관계가 상세하게 연구되었으나 대체로 다른 중간엽 조직과 진피를 포함하는 세포의 기능적 정체성은 아직 특화되지 않았다.

[0003] 섬유아세포는 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 구조 단백질을 대부분의 중간엽 조직의 세포 외 매트릭스로 합성하고 통합시키는 세포이다. 진피는 조직학적으로 쉽게 식별되는 뚜렷한 층을 지닌다 : 유두(papillary) 진피는 표피에 가장 가까운 반면, 그 밑의 망상 진피는 더 두꺼우며 섬유성 세포 외 매트릭스의 상당 부분을 포함한다.

[0004] 망상 진피 아래에는 피하 또는 피부 백색 지방 조직이 있다. 마우스 및 인간 진피에서 확인된 다른 섬유아세포 아집단은 모낭(hair follicle) 기저부에서의 진피 유두 세포(dermal papilla cell), 혈관과 밀접한 관련이 있는 기모근(arrector pili muscle) 및 주피세포(pericytes)를 포함한다.

[0005] 유두 및 망상 섬유아세포는 뚜렷한 정체성을 가지고 있는 것으로 오랫동안 여겨져 왔다. 마우스 진피의 경우 유두 및 망상 섬유아세포는 기능적으로 뚜렷한 계통(lineage)을 나타내고 있으며, 배아 발달 동안 다관능(multipotent) 전구체(progenitor) 집단에서 발생하는 것이 상처 치유 및 피부 재구성 에세이에 의한 항상성 조건 하의 계통 추적을 통해 입증되고 있다.

[0006] 유두 섬유아세포는 새로운 모낭 형성을 위해 요구되는 반면에 망상 섬유아세포는 상처 복구의 초기 이벤트를 매개하고, 알파-평활근 액틴과 같은 소위 섬유아세포 활성화 마커를 발현한다.

[0007] 인간 진피에 대한 이전의 연구는 더마토미를 지닌 망상 진피로부터 유두를 기계적으로 분리시켰다. 진피의 이들 분리된 영역으로부터 유래된 외식편(explant) 배양의 분석은 배양 및 유전자 발현에서 섬유아세포 행태의 차이를 나타냈다.

[0008] 그러나 유두 및 망상 진피로부터 별도로 배양된 섬유아세포를 구별하는 마커를 표지하려는 이전의 시도는 직접 피부로부터 프라이머리 섬유아세포 아집단의 예상되는 분리를 허용하는 세포 표면 마커를 생성하지 않았다. 따라서 인간 피부 섬유아세포를 피부 상태의 치료에 유용한 아집단으로 분리하는 새로운 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0009] 따라서 하나의 측면에서 본 발명은

[0010] (a) 인간 피부 섬유아세포를 포함하는 세포 집단을 제공하는 단계; 및

[0011] (b) CD39, CD36 및/또는 CD26과 같은 하나 이상의 세포 표면 마커의 발현에 기반하여 인간 피부 섬유아세포를 아집단으로 분리하는 단계;

[0012] 를 포함하는 인간 피부 섬유아세포를 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (b)에서 예를 들면 시험관 내 세포 배양 단계에서 분리된 하나 이상의 아집단을 확장시키는 단계를 더욱 포함한다. 바람직하게는 확장된 아집단은 확장 후에 그들의 기능적 특성을 유지한다.

[0014] 바람직하게는 인간 피부 섬유아세포는 유세포 분석에 의해 분리된다. 대안적인 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 자성 비드, 컬럼 및/또는 미세 유체(microfluidic)를 사용하여 분리된다.

[0015] 하나의 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 CD90을 발현하는 세포를 선별함으로써 세포 집단으로부터 분리된다. 예를 들면 인간 피부 섬유아세포는 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+를 지니는 세포를 선별함으로써 다른 인간 피부 세포로부터 분리될 수 있다.

[0016] 하나의 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포의 첫 번째 아집단은 세포 표면 표현형 CD39+CD26-를 지니는 세포를 선별함으로써 분리된다. 첫 번째 아집단은 유두(papillary) 섬유아세포를 포함할 수 있다.

[0017] 또 다른 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포의 두 번째 아집단은 세포 표면 표현형 CD39+CD26+를 지니는 세포를 선별함으로써 분리된다. 두 번째 아집단은 망상(reticular) 섬유아세포를 포함할 수 있다. 인간 피부 섬유아세포의 또 다른 아집단은 세포 표면 표현형 CD39-를 지니는 세포를 선별함으로써 분리될 수 있다. 이러한 아집단은 또한 망상 섬유아세포를 포함할 수 있다.

[0018] 추가적인 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포의 세 번째 아집단은 CD36을 발현하는 세포를 선별함으로써 분리된다. 바람직하게는 세 번째 아집단은 더 낮은 망상 섬유아세포와 지방전구 섬유아세포를 포함한다.

[0019] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 정의된 방법에 의해 수득되거나 수득 가능한 인간 피부 섬유아세포의 분리된 아집단을 제공한다.

[0020] 또 다른 측면에서 본 발명은 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-의 발현을 특징으로 하는 인간 유두 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0021] 다른 측면에서 본 발명은 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39-의 발현을 특징으로 하는 인간 피부 망상 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0022] 또 다른 측면에서 본 발명은 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26+의 발현을 특징으로 하는 인간 피부 망상 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0023] 또 다른 측면에서 본 발명은 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD36+의 발현을 특징으로 하는 인간 피부 지방전구 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0024] 또 다른 측면에서 비멘틴(vimentin)을 발현하고 CD45- CD31- CD324- 및 CD90-인 피부 세포는 또 다른 잠재적으로 유용한 세포의 아집단을 나타낸다.

[0025] 또 다른 측면에서 본 발명은 예를 들어 Wnt 또는 헤지호그(Hedgehog) 신호 전달 경로의 약리학적 모듈레이션에 의한 섬유아세포 아집단의 시험관 내 확장을 제공한다. 아집단은 Wnt 신호 전달, 세포 외 매트릭스 생성/리모델링 및 염증과 관련된 유전자의 차별적 발현으로 특징화될 수 있다.

[0026] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단 및 임의로 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0027] 또 다른 측면에서 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0028] 또 다른 측면에서 본 발명은 피부 질병의 치료에 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0029] 또 다른 측면에서 본 발명은 상처 치유 촉진에 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0030] 또 다른 측면에서 본 발명은 켈로이드성(keloidal) 또는 비-켈로이드성 흉터, 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 피부 궤양 또는 수포성 표피박리증과 같은 유전적 피부 장애의 치료에 사용하기 위한 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다.

[0031] 또 다른 측면에서 본 발명은 예를 들면 상처 치유 촉진, 켈로이드성 또는 비-켈로이드성 흉터, 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 피부 궤양 또는 수포성 표피박리증과 같은 유전적 피부 장애 등의 피부 장애 예방 또는 치료를 위한 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단의 용도를 제공한다.

[0032] 또 다른 측면에서 본 발명은 예를 들면 상처 치유 촉진, 켈로이드성 또는 비-켈로이드성 흉터, 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 피부 궤양 또는 수포성 표피박리증과 같은 유전적 피부 장애 등의 피부 장애 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단의 용도를 제공한다.

[0033] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 약제학적으로 허용 가능한 양으로 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 피험자 내에서 피부 장애를 예방 또는 치료(예를 들어 상처 치유 촉진, 켈로이드성 또는 비-켈로이드성 흉터, 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 피부 궤양 또는 수포성 표피박리증과 같은 유전적 피부 장애의 치료) 하는 방법을 제공한다.

[0034] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 인간 피부 섬유아세포의 분리된 집단을 피험자의 피부에 투여하는 단계를 포함하는 인간 피험자에서 피부 노화 또는 흉터를 예방 또는 치료하기 위한 미용적 방법을 제공한다.

[0035] 하나의 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 피험자에게 자가 조직이다. 대안적인 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 피험자에게 동종 이계이다.

[0036] 추가적인 실시형태에서 섬유아세포 아집단은 시험관 내 독성학 및/또는 미용적 스크리닝에 사용된다.

[0037] 또 다른 측면에서 본 발명은 샘플에서 인간 피부 섬유아세포의 하나 이상의 아집단을 식별하는 방법을 제공하며, 여기에는 인간 피부 섬유아세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 (세포-표면 또는 세포 내) 마커 예를 들면 상기 섬유아세포 상의 CD39, CD36 및/또는 CD26에서 선택된 하나 이상의 세포-표면 마커의 발현을 결정하는 단계를 포함한다.

[0038] 또 다른 측면에서 본 발명은 인간 피부 섬유아세포 아집단 확인을 위한 본 명세서에 기재된 하나 이상의 (세포-표면 또는 세포 내) 마커 예를 들면 CD39, CD36 및/또는 CD26에서 선택된 하나 이상의 세포 표면 마커 또는 이의 리간드(예를 들면 항체)의 용도를 제공한다.

[0039] 또 다른 측면에서 본 발명은 본 명세서에 정의된 하나 이상의 (세포-표면 또는 세포 내) 마커 예를 들면 CD39, CD36 및/또는 CD26에서 선택된 하나 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 하나 이상의 시약을 포함하는 샘플에서 인간 피부 섬유아세포의 하나 이상의 아집단을 식별 및/또는 분리하기 위한 키트를 제공한다. 하나의 실시형태에서 키트는 마커(들)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 리간드 (예를 들면 항체)를 포함한다.

[0040] 또 다른 실시형태에서 키트는 마커를 암호화시킨 뉴클레오타이드 서열의 특이적인 증폭에 적합한 하나 이상의 시약 예를 들어 마커를 암호화시킨 mRNA 또는 cDNA의 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 증폭에 적합한 뉴클레오타이드 프라이머를 포함한다.

[0041] 또 다른 측면에서 본 발명은 예를 들면 상처 치료, 상처 치유 촉진, 흉터 위험성 감소로 상처 치유 촉진 및/또는 흉터의 예방 또는 치료와 같은 피부 장애의 예방 및 치료에 사용하기 위한 인간 피부 유두 또는 망상 섬유아세포의 분리된 집단을 제공한다. 하나의 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-의 발현을 특징으로 하는 인간 유두 섬유아세포이다.

[0042] 또 다른 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39-의 발현을 특

징으로 하는 인간 피부 망상 섬유아세포이다. 또 다른 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26+의 발현을 특징으로 하는 인간 피부 망상 섬유아세포이다.

도면의 간단한 설명

[0043] (도 1) 마우스 섬유아세포 아집단의 전사체 분석.

A) 유세포 분석법에 의한 마우스 출생 후 2 일 (P2) 섬유아세포 아집단의 분리. PdgfraHBeGFP+ 세포를 Dlk1, Sca1 및 CD26의 발현에 따라 분리하고 구분하였다.

B) 마이크로어레이 혼성화(Affymetrix)에 의해 결정된 전체 유전자 발현 패턴의 주요 성분 분석. 번갈아 나오는 지방전구세포(Dlk1+Sca1+) 집단 클러스터와 그 외곽의 지방전구세포(Dlk1-Sca1+) 집단에 주목한다(아스테릭; 패널 D 및 E에서 또한 아스테릭으로 표시됨).

C) 유동 선별된 집단에서 마커 발현의 qPCR 검증. 유전자 발현은 GAPDH로 정규화되고 3개의 생물학적 복제물의 평균±S.D로 나타내었다.

D) 마이크로어레이 샘플에서의 마커 발현 수준; 3개의 생물학적 복제물에 대한 발현 수준을 각각 나타내었다. 외곽 부위의 지방전구세포(Dlk1-Sca1+) 집단이 표시된다(아스테릭).

E) 분리된 마우스 P2 섬유아세포 아집단에 대한 전반적 유전자 발현 패턴의 계층적 클러스터. 외곽의 지방전구세포(Dlk1-Sca1+) 집단을 표시한다(아스테릭).

(도 2) 마우스 섬유아세포 아집단 내에서 Wnt, ECM 및 면역 신호 전달과 관련된 유전자의 차등 발현.

A) 마우스 섬유아세포 아집단 내에서 차별적 발현 경로의 유전자 온톨로지(Gene Ontology, GO) 기간 분석.

B-D) (B) Wnt 신호 전달, (C) 염증 및 (D) ECM 조절에 관련된 유전자의 차등 발현(Affymetrix 마이크로어레이)을 나타내는 히트맵.

E) 선별된 차등 발현 유전자의 Q-PCR 검증.

F) 지방 생성에 관련된 유전자의 발현(Affymetrix 마이크로어레이)을 비교하는 히트맵.

G, H) qPCR 분석은 지방전구세포 내에서의 CD36 발현 상향 조절(G) 및 유두 섬유아세포 내에서의 CD39 발현 상향 조절(H)을 나타낸다. 유전자 발현(E, G, H)은 GAPDH로 정규화되고 3 개의 생물학적 복제물에 대해 평균±S.D로 나타내었다(*p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0005).

(도 3) 인간 진피 내에서 유전자 발현의 공간적 프로파일링.

A) 3 개의 별개의 개체 내에서 유두 및 망상 진피로부터 유전자 발현 패턴의 계층적 클러스터링. RNA 서열분석에 의해 발현을 정량화 하였다(청색: 유사, 적색: 유사하지 않음).

B) 유두 진피에서 상향 조절된 유전자 (> 3배).

C) 망상 진피에서 상향 조절된 유전자 (> 10배).

D) 유두 진피에서 발현이 2 배 이상 상향 조절된 세포 표면 마커. 발현 수준은 3 개의 생물학적 복제물에 대해 개별적으로 표시되며 (녹색: 높음, 적색: 낮음) 6개의 서로 다른 배양 섬유아세포주 및 7개의 서로 다른 배양 세포주에서의 발현을 비교하였다.

E) 망상 진피 내에서 2배 이상 상향 조절된 세포 표면 마커. F) 인간 성인 진피와 마우스 P2 진피 사이에 보존된 유두 진피 내에서 상향 조절된 세포 표면 마커.

(도 4) 스페이셜 전사체학에 의해 확인된 섬유아세포 아집단 마커 후보에 대한 인간 진피의 항체 면역 형광 표지.

A, B) COL6A5의 발현은 유두 진피로 제한된다. 표피의 기저층에는 항-케라틴 14 가 표지되어 있다(COL6A5: 녹색, 케라틴 14: 적색).

C, D) 유두 진피 내에는 APCDD1의 발현이 풍부하다(APCDD1: 녹색, 케라틴 14: 적색).

E, F) 유두 진피 내에는 HSPB3의 발현이 풍부하다(HSPB3: 녹색, 케라틴 14: 적색).

G, H) 상부 진피 내에서 우세한 혈관 구조 내에는 WIF1의 발현이 풍부하다 (WIF1: 녹색, 케라틴 14: 적색).

I, J) 하피(피하 지방) 내에는 CCD36의 발현이 매우 풍부하다.

K, L) 유두 진피 내에는 CD39의 발현이 풍부하다 (CD39: 녹색, 포도플라닌: 적색). 스케일 바 : 200㎛

(도 5) 인간 피부 섬유아세포 아집단은 시험관 내에서 기능적 차이를 유지한다.

A, B) LUM 및 COL6A5의 발현은 비분획화 된 진피 세포 현탁액과 비교하여 CD90+ 집단 내에서 풍부하다. 유전자 발현은 GAPDH로 정규화되었고 3 개의 생물학적 복제물에 대해 평균±S.D로 나타내었다.

C) lin-CD90+CD39+ 및 lin-CD90+CD36+ 세포는 시험관 내에서 형태학적 차이를 나타내지만 공여자의 상이한 신체 부위와 연령 간에는 일치하지 않는다 (스케일 바 : 50 ㎛).

D, E) Lin-CD90+CD39+ 세포는 단일 계대 배양 후 CD39 발현을 상실한다 (D). 그러나 CD90 및 CD36의 발현은 유지된다 (E).

F) 배양에서 LUM의 보유 및 COL6A5의 상실을 나타내는 Q-PCR. 유전자 발현은 GAPDH로 정규화 되었고 3개의 생물학적 복제물에 대해 평균±S.D로 나타내었다.

G-L) Wnt 신호 전달 (G), 염증 및 면역 (H) 및 ECM 리모델링 (I)에 관련된 유전자의 발현. 유전자 발현은 GAPDH로 정규화되었고 3개의 생물학적 복제물에 대해 평균±S.D로 나타내었다.

J-N) 배양에서 IFNɣ 자극에 반응하는 세포 표면 마커의 발현 조절 (청색: CD39+IFNɣ, 황색: CD36+IFNɣ, 적색: 염색되지 않은 대조군). 상단 로우 : 대표적인 플로우 프로트. 하단 로우 : 3 개의 독립적인 실험으로부터의 데이터 정량화 (*p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0005, ****p <0.0001).

(도 6) DED에서 표피 성장을 지원하는 다른 섬유아세포 아집단의 능력 비교.

A-J) 탈-상피화 피부(DED) 오르가노타입 배양물의 H&E 염색 (A-E) 및 면역형광 염색 (F-J)을 나타낸 것으로 섬유아세포 부재 (A, F), 비분획화(lin-CD90+) 섬유아세포 (B, G), CD90+CD39+(유두 풍부) 섬유아세포 (C, H), CD90+CD39-(유두 고갈) 섬유아세포 (D, I) 및 CD90+CD36+(지방전구) 섬유아세포 (E, J) 접종시킨 것이다.

(F-J) 케라틴 14(녹색)는 각질세포를 나타내고 비멘틴(흰색)은 중간엽 세포(섬유아세포)를 나타낸다. 최소 3번의 생물학적 복제물에 대해 실험을 반복하고 대표 이미지를 나타내었다. CD90+CD39+ 세포의 경우 세번의 실험 중 두 번은 유두세포 집단(CD90+CD39+CD26-)을 더욱 풍부하게 하기 위해 CD26- 세포에 대한 추가적 선택을 포함하였다. 스케일 바: 200 ㎛.

K-M) 표피 두께의 정량화 (K); 표피 300 ㎛ 이내의 섬유아세포 밀도 (L); 및 표피와는 다른 깊이에서 섬유아세포의 상대적 풍부도 (M).

(도 7) 인간 성인 피부 섬유아세포의 단일 세포 RNA 서열 분석.

A) 인간 진피로부터 계통(lin) 음성 세포 및 lin-CD90+ 세포의 분리. 전방 산란, 측면 산란 및 DAPI 염색에 대해 게이트화 함으로써 단일 라이브 세포를 분리하였다. CD31-CD45-ECad-에 대해 게이트화 함으로써 계통(lin) 음성 세포를 분리하였다.

B) 유전자 발현 패턴의 PCA 분석

C, D) 유전자 발현 패턴의 tSNE 분석 (적색: lin-, 청색: lin-CD90+)

D) 5개의 피부 섬유아세포 아집단을 식별하는 tSNE 분석의 자동 클러스터링.

E) 5 개의 클러스터 각각에서 차등 발현되는 마커의 발현 패턴 (적색: 고발현, 황색: 저발현).

F) 5 개의 피부 섬유아세포 아집단 각각에서 마커 유전자의 차등 발현을 나타내는 바이올린 플롯.

G-J) 성인 인간 피부에서 후보 섬유아세포 마커에 대한 면역 염색. 스케일 바 : 200㎛.

K-O) lin-CD39+CD26- 및 CD39- 피부 섬유아세포에서 CD39 (K) COL6A5 (L) WNT5A (M) RSPO1 (N) 및 LEF1 (O)의 발현.

유전자 발현은 GAPDH 및 TBP에 대해 정규화되고 3 개의 생물학적 복제물에 대해 평균±S.D로 나타내었다. (*p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0005, ****p <0.0001).

(도 8) 성인 인간 피부 섬유아세포의 세포 표면 마커 스크리닝

인간 진피로부터 분리된 계통 음성 세포를 242개의 정제된 단일 클론 항체 및 상응하는 이소형 대조군을 함유하는 BD Lyoplate 인간 세포 표면 마커 스크리닝 패널(BD Biosciences, cat. 560747)을 사용하여 분석하였다. 히트는 면역 형광 염색으로 확인하였다; 밝게 염색된 세포는 표면 마커의 높은 발현을 나타낸다(**). 세포 표면 마커 전사체는 단일 세포 RNA 서열 분석 데이터의 tSNE 분석에서 유전자 발현 오버레이에 의해 독립적으로 관찰되었다(적색: 고발현, 황색: 저발현).

도 9는 생체 외에서 14일 동안 배양된 상이한 섬유아세포 아집단으로 접종된 상처 피부의 콜라겐 밀도를 나타낸다.

도 10은 생체 외에서 14일 동안 배양된 상이한 섬유아세포 아집단으로 접종된 상처 피부의 이미지를 나타낸다.

도 11은 생체 외에서 14일 동안 배양된 상이한 섬유아세포 아집단으로 접종된 상처 피부의 이미지를 나타낸다.

도 12는 생체 외에서 14일 동안 배양된 상이한 섬유아세포 아집단으로 접종된 상처 피부의 이미지를 나타낸다.

도 13은 상이한 섬유아세포 아집단으로 재구성된 탈세포화된 진피에서의 콜라겐 침착의 이미지를 나타낸다.

도 14는 상이한 섬유아세포 아집단으로 재구성된 탈세포화된 진피에서의 콜라겐 밀도를 나타낸다.

도 15는 콜라겐 혼성화 펩타이드(CHP)를 사용하여 검출된 상이한 섬유아세포 아집단으로 재구성된 탈세포화된 진피에서의 콜라겐 섬유 구조의 이미지를 나타낸다.

도 16은 상이한 섬유아세포 아집단으로 재구성된 탈세포화된 진피의 표피에서 R-스폰딘 1 발현의 이미지를 나타낸다.

도 17은 상이한 섬유아세포 아집단에 의한 켈로이드 흉터 리모델링을 보여주는 이미지를 나타낸다. 스케일 바 = 2.5 mm.

도 18은 탈세포화된, 상이한 섬유아세포 아집단이 주입된, 및 시험관 내에서 3 주 동안 배양된 켈로이드 흉터 조직의 두께를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 하나의 측면에서 본 발명은 인간 피부 섬유아세포를 분별하는 방법에 관한 것이다. 따라서 상기 방법은 전형적으로 특정 세포 표면 마커의 발현에 기초하여 인간 피부로부터 섬유아세포를 하나 이상의 아집단으로 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] **인간 피부 섬유아세포를 포함하는 세포 집단**

[0046] 하나의 실시형태에서 본 발명의 방법의 첫 번째 단계는 인간 피부 섬유아세포를 포함하는 세포 집단을 제공하는 단계를 포함한다. 전형적으로 세포 집단은 인간 피부 샘플로부터 유래되며, 즉 세포 집단은 인간 피부 세포를 포함한다. 하나의 실시형태에서 세포 집단은 인간 진피의 효소적 소화에 의해 수득된다. 따라서 바람직한 실시형태에서 세포 집단은 해리된 세포, 즉 원래의 조직 환경으로부터 분리되어 액상 배지에 분산된 세포를 포함한다.

[0047] 하나의 실시형태에서 세포 집단은 세포 현탁액을 포함한다. 예를 들어 본 방법은 인간 피부 샘플을 소화하여 적합한 수성 완충액에 분산된 세포 현탁액을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 현탁액을 선택적으로 여과 및/또는 원심 분리하여 세포 펠렛을 수득한 다음, 원하는 수성 완충액 예를 들면 인산염-완충 식염수(PBS) 내에 재현탁시킨다.

[0048] 전형적으로 세포 집단(예를 들어 세포 현탁액)은 인간 피부 섬유아세포 뿐만 아니라 인간 피부로부터 유래된 다른 (즉, 비 섬유아세포) 세포 유형을 포함한다. 일부 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포 아집단으로의 분리 전에 인간 피부 섬유아세포를 다른 인간 피부 유형으로부터 먼저 분리할 수 있다.

[0049] 대안적인 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포 아집단으로의 분리는 다른 피부 세포 유형으로부터 인간 피부 섬유아세포의 분리와 동시에 발생할 수 있다. 즉 인간 피부 섬유아세포 아집단이 인간 피부 세포를 포함하는 세포 현탁액으로부터 분별화되는 단일 분리 단계이다. 대안적인 실시형태에서 관심있는 섬유아세포는 외식편 배양에서 진피로부터 분리시켜 수집된다.

[0050] **인간 피부 섬유아세포 분리**

[0051] 본 발명의 방법에서 인간 피부 섬유아세포는 특정 세포 표면 마커의 발현에 기초하여 아집단으로 분리된다. 이는 인간 피부 섬유아세포가 특정 세포 표면 표현형을 발현하는 아집단, 예를 들면 특정 마커의 발현 및/또는 다른 마커의 발현 부재로 선별되거나 분별됨을 의미한다.

[0052] 예를 들어 인간 피부 섬유아세포 아집단은 CD90, CD39, CD36 또는 CD26을 개별적으로 발현하는 세포를 선택하거나 CD90, CD39, CD36 또는 CD26의 개별적인 발현이 없는 인간 피부 섬유아세포를 선택함으로써 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서 인간 섬유아세포 아집단은 상기 마커 중 2 개 이상의 발현의 조합 및 발현의 부재에 기초하여 분리될 수 있다.

[0053] 하나의 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 유세포 분석에 의해 분리된다. 예를 들어 유세포 분석법은 인간 피부 섬유아세포를 다른 피부 세포로부터 분리하고/하거나 인간 피부 섬유아세포를 아집단으로 분리하기 위해 사용될 수 있다. 형광 세포 분석법 또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)는 표면 마커에 따라 세포를 식별하고 분리하는데 특히 유용한 특수 유형의 유세포 분석법이며 본 발명의 바람직한 실시형태에서 사용될 수 있다.

[0054] 각 세포의 특정 광 산란 및 형광 특성에 기초하여 생물학적 세포의 이종의(heterogeneous) 혼합물을 동시에 하나의 세포 또는 2 개 이상의 컨테이너로 분류하는 방법을 제공한다. 따라서 FACS는 개별 세포로부터의 형광 신호의 신속하고 객관적이고 정량적인 레코딩 뿐만 아니라 특히 관심있는 세포의 물리적 분리를 제공한다.

[0055] 형광 세포 분석법에서 세포 현탁액은 좁고 빠르게 흐르는 액체 스트림의 중심에 혼입된다. 스트림은 세포의 직경을 기준으로 세포 사이에 큰 간격이 있도록 배열된다. 바이브레이션 메커니즘은 세포의 스트림이 개별 액적(droplet)으로 파쇄되게 한다. 액적 당 하나 이상의 세포가 있을 확률이 낮도록 시스템이 조정된다. 스트림이 작은 액적으로 파쇄되기 직전에 스트림은 각 세포의 관심있는 형광 특성이 측정되는 형광 측정 스테이션을 통과한다.

[0056] 스트림이 액적에 침입하는 지점에 전기 충전 링이 배치된다. 바로 이전의 형광 강도 측정에 기초하여 링에 전하가 배치되고, 스트림으로부터 떨어질 때 액적 상에 반대 전하가 포획된다. 전하를 띤 액적은 정전기 변형 시스템을 통과하여 전하에 따라 액적을 컨테이너로 전환시킨다.

[0057] 일부 시스템에서 전하는 스트림에 직접 적용되며 액적은 스트림과 동일한 부호의 전하를 유지한다. 액적이 분리된 후 스트림은 중성으로 돌아 간다. 유세포 분석법을 사용하는 한 가지 일반적인 방법은 세포 위에서 또는 세포 내에서 표적에 결합하는 형광 표지된 항체를 사용하여 주어진 표적으로 세포를 식별하는 것이다.

[0058] 이러한 기술은 형광의 양이 표적의 양과 관련되는 경우에 정량적으로 사용될 수 있으며 이에 따라 형광의 상대적인 양 및 따라서 표적의 상대적인 양에 기초하여 분류할 수 있다.

[0059] 따라서 본 발명의 바람직한 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포를 포함하는 세포 집단은 하나 이상의 형광 표지된 항체(예를 들어 FACS에 사용하기에 적합한)와 접촉될 수 있다. 형광-표지된 항체는 인간 피부 섬유아세포 세포 표면 마커(예를 들어, CD90, CD39, CD36 또는 CD26)에 직접 결합하거나 세포 표면 마커에 특이적인 프라이머리 항체에 결합하는 세컨더리 항체일 수 있다(예를 들면 프라이머리 마우스 IgG 항-인간 CD39, CD36 또는 CD26 항체는 인간 피부 섬유아세포에 직접 결합하고, 세컨더리 형광 래트 항-마우스 IgG 항체는 프라이머리 항체에 결합한다).

[0060] 따라서 인간 피부 섬유아세포는 유세포 분석법(예를 들어, FACS)을 사용하여 CD39, CD36 및/또는 CD26으로부터 선택된 마커의 조합을 발현하는 아집단으로 구분될 수 있다. 다색 형광법(예를 들어 상이한 파장의 형광 표지로 표지된 상이한 세포 표면 단백질에 대한 항체를 사용하는)을 사용하여 단일 FACS 단계에서 마커 조합의 발현에 기초하여 인간 피부 섬유아세포를 선별할 수 있다.

[0061] 대안적인 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포 아집단은 세포 표면 마커의 발현에 기초하여 세포를 분리하기에 적합한 임의의 다른 방법에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어 적합한 방법은 자성 비드, 컬럼 및/또는 미세 유체의 사용을 포함할 수 있다. 이러한 방법에서 세포-표면 마커에 특이적인 리간드(예를 들어 항체)는 고형상(예를 들어 자기 비드)에 고정화시킬 수 있으며 세포 집단은 이에 접촉된 현탁액에서 인간 피부 섬유아세포를 포함한다.

[0062] 관심있는 마커를 발현하는 인간 피부 섬유아세포는 이어서 고형상에 결합하여 유지된다. 마커가 없는 다른 인간 피부 섬유아세포는 고형상에 결합하지 않으므로 상등액을 세척함으로써 원하는 아집단으로부터 분리될 수 있다.

원하는 인간 섬유아세포 아집단은 필요한 경우 고형상으로부터 용출될 수 있다.

[0063] **인간 피부 섬유아세포**

[0064] 인간 피부 섬유아세포는 특징적인 세포 표면 마커의 발현에 기초하여 다른 인간 피부 세포 유형과 구별될 수 있다. 예를 들어 하나의 실시형태에서 CD90 발현은 인간 피부 섬유아세포의 마커로서 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 lin- CD90+ 세포 또는 lin- CD90- 세포로서 식별될 수 있다. Lin- CD90- 세포는 지방전구, 섬유아세포 및 단핵구/대식세포의 혼합된 특성을 지닌 세포 집단이다.

[0065] lin- 세포 표면 표현형은 CD45, CD31 및 CD324의 발현이 결여된 세포로 언급된다. CD45 발현은 면역 세포를 나타낼 수 있으며 CD31은 내피 세포에서 전형적으로 발현되고 CD324는 각질 세포에서 발현될 수 있다. 따라서 인간 피부 섬유아세포는 하나의 실시형태에서 예를 들면 CD45- CD31- CD324- CD90+ 세포로 식별된다.

[0066] 따라서 본 발명의 하나의 실시형태에서 인간 피부 섬유아세포는 CD90+ (예를 들면 CD45- CD31- CD324- CD90+) 세포를 선별함으로써 다른 인간 피부 세포 유형으로부터 우선 분리될 수 있다. 이어서 전체 인간 피부 섬유아세포 집단은 예를 들어 CD39, CD36 및/또는 CD26 발현에 기초하여 아집단으로 분리될 수 있다.

[0067] 대안적으로 예를 들면 CD90+CD39+ CD26-(CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-) 세포, CD90+CD39-(CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39-) 세포, CD90+ CD36+(CD45- CD31- CD324- CD90+ CD36+) 세포 등을 선별함으로써 인간 피부 섬유아세포 아집단은 하나 이상의 유세포 분석 단계에서 다른 인간 피부 세포 유형으로부터 분리될 수 있다.

[0068] 추가적인 실시형태에서 원하는 특성을 지니는 섬유아세포는 Wnt 또는 헤지호그와 같은 신호 전달 경로의 약리학적 모듈레이션에 의해 선택적으로 배양 확장된다. 이것은 단일 세포 또는 외식편 형태의 비 분획화 세포의 사전 FACS 농축 또는 플레이팅과 연관되어 있다.

[0069] **마커**

[0070] 본 발명의 실시형태에서 하나 이상의 세포 표면 마커의 발현이 결정될 수 있다. 일반적으로 세포는 각각의 세포 표면 마커의 발현에 대해 양성(+) 또는 음성(-)이 되는 것으로 결정된다. 양성(+)은 전형적으로 세포가 세포 표면 마커의 최소(예를 들면 검출 가능한) 수준을 발현한다는 것을 의미한다. 예를 들어 세포 표면 마커에 특이적인 형광-표지된 항체가 예를 들면 유세포 분석(FACS)에 의해 검출될 수 있는 충분한 양으로 세포에 결합되면 세포는 세포 표면 마커에 대해 양성(+) 인 것으로 간주될 수 있다.

[0071] 유사하게 세포가 마커를 최소(예를 들면 검출 가능한) 수준 이하로 발현하는 경우 세포는 세포 표면 마커에 대해 음성(-) 인 것으로 간주될 수 있다. 따라서 세포 집단의 세포 표면 표현형은 특정 마커 예를 들면 CD45-CD90+CD39-의 발현 및/또는 발현의 부재에 기초하여 분류될 수 있다.

[0072] 유세포 분석에 사용하기에 적합한 본 명세서에 논의된 마커에 대한 항체는 공지되어 있으며 전형적으로 상업적 공급자로부터 이용 가능하거나 실험 동물이 적합한 항원으로 면역화 되는 것과 같은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 적합한 항체는 하기 실시예에 기재되어 있다.

[0073] CD26

[0074] CD26은 다양한 세포 표면에서 발현되는 세포막 당단백질 및 세린 엑소펩티다아제이다. CD26은 또한 디펩티딜 펩티다제-4 및 아데노신 디아미나제 복합 단백질 2로도 알려져 있다. 인간 CD26의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P27487(UniProt) 및 NP_001926(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD26은 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD26+ 및 CD26- 세포는 예를 들어 Kelemen 등, Am J Clin Pathol. 2008년 1월; 129 (1): 146-56에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0075] CD36

[0076] CD36은 클래스 B 스캐빈저 수용체 패밀리의 구성원인 막 단백질이다. CD36은 또한 혈소판 당단백질 4, 지방산 트랜스로카제, 스캐빈저 수용체 클래스 B 멤버 3(SCARB3), 당단백질 88(GP88), 당단백질 IIIb(GPIIIB) 또는 당단백질 IV(GPIV)로도 알려져 있다. 인간 CD36의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P16671(UniProt) 및 NP_000063, NP_001001547, NP_001001548, NP_001120915 및 NP_001120916(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD36은 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD36+ 및 CD36- 세포는 예를 들어 Cserti-Gazdewich 등, Cytometry B Clin Cytom. 2009년 3월; 76(2): 127-34에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0077] CD39

[0078] CD39는 또한 엑토뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제-1(ENTPD1)로도 알려진 세포 표면-국소화된 엑토뉴클레오티다제이다. 인간 CD36의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P49961(UniProt) 및 NP_001091645, NP_001157650, NP_001157651, NP_001157653 및 NP_001157654(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD39는 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD39+ 및 CD39- 세포는 예를 들어 Mandapathil 등, Journal of Immunological Methods, Volume 346, Issues 1-2, 2009년 7월 31일, Pages 55-63에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0079] CD90

[0080] CD90은 면역 글로불린 슈퍼 패밀리의 멤버인 Thy-1로도 알려진 N-글리코실화 된 글리코포스파티딜이노시톨(GPI) 앵커 보존 세포 표면 단백질이다. 인간 CD90의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P04216(UniProt) 및 NP_001298089, NP_001298091 및 NP_006279(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD90은 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD90+ 및 CD90- 세포는 예를 들어 Nakamura 등, British Journal of Dermatology 154(6):1062-1070 (2006)에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0081] CD45

[0082] CD45는 백혈구 공통 항원(LCA) 및 단백질 티로신 포스파타제, 수용체 유형 C(PTPRC)로도 알려져 있다. CD45는 성숙한 적혈구를 제외한 거의 모든 조혈 세포에서 발현되는 막 당단백질이다. 인간 CD45의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P08575(UniProt) 및 NP_001254727, NP_002829 및 NP_00563578(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD45는 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD45+ 및 CD45- 세포는 예를 들어 Janossy 등, Clinical and Vaccine Immunology 9(5):1085-1094 (2002)에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0083] CD31

[0084] CD31은 혈소판 내피 세포 부착 분자 1(PECAM-1)로도 알려진 세포 표면 단백질이다. 인간 CD31의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P16284(UniProt) 및 NP_000433(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD31은 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD31+ 및 CD31- 세포는 예를 들어 Khan 등, Cytometry 64B(1): 1-8 (2005) 및 Mock 등, Mucosal Immunology (2014) 7, 1440-1451에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0085] CD324

[0086] CD324는 또한 카드헤린-1, E-카드헤린, CDH1 또는 우보모룰린으로도 알려진 세포-세포 접착성 당단백질이다. 인간 CD324의 아미노산 서열은 예를 들어 데이터베이스 접근 번호 P112830(UniProt) 및 NP_001304113, NP_001304114 및 NP_001304115(NCBI RefSeq)에 개시되어 있다. CD324는 유세포 분석에 의해 검출될 수 있으며 CD324+ 및 CD324- 세포는 예를 들어 US 9534058에 개시된 방법으로 분류될 수 있다.

[0087] **인간 진피의 전사 프로파일링에 의해 확인된 추가 마커**

[0088] 본 명세서에 기재된 실시예에서 인간 진피로부터의 섬유아세포의 단일 세포 RNA 서열 분석을 사용하여 섬유아세포 아집단의 추가 마커를 확인하였다. 이들 추가 마커는 세포 표면 마커 뿐만 아니라 세포 내 마커를 포함할 수 있으며 섬유아세포 아집단을 추가로 특성화 하는데 사용될 수 있다.

[0089] 예를 들어 일부 실시형태에서 유동화-분류된 섬유아세포 아집단(시험관 내 배양 확장 단계 전 또는 후에)은 하나 이상의 추가 마커의 발현에 대해 예를 들면 아집단의 동종성 및/또는 아집단의 특징적 물성의 보유를 확인하기 위한 검증 단계를 통해 분석될 수 있다.

[0090] 추가 마커의 분석은 세포 아집단 내에서 RNA 및/또는 상응하는 폴리펩타이드 서열의 검출을 위한 임의의 적합한 방법, 예를 들면 RT-PCR, RNA-Seq, 유전자 발현 어레이, 노던/웨스턴 블롯, ELISA 및 면역세포화학에 의해 수행될 수 있다. 이들 추가 마커의 발현은 진피 내의 공간 구획화에 의해 제한되지 않는 섬유아세포의 추가 아집단을 식별할 수 있다. 예를 들어 이러한 추가 마커를 발현하는 섬유아세포는 피부의 하나 이상의 영역 내에서 발견될 수 있다.

[0091] 하나의 실시형태에서 섬유아세포 또는 이의 아집단(들)은 COL6A5, COL23A1 및/또는 HSPB3의 발현을 통해 분석될 수 있다. 전형적으로 이들 마커의 발현은 유두 섬유아세포와 관련이 있다. COL6A5는 콜라겐 VI의 α5 체인이며 특히 피부 섬유아세포에 대한 로버스트 마커를 나타낸다. 유두 섬유아세포의 추가 마커는 WNT5a, RSPO1 및 LEF1

을 포함할 수 있다. 이들 마커를 암호화 하는 서열에 대한 데이터베이스 접근 번호는 하기 표 2에 나타나 있다.

[0092] 다른 실시형태에서 섬유아세포 또는 이의 아집단(들)은 CD70(예를 들어 데이터베이스 접근 번호 NM_001252.4 및 NP_001243.1 참조) 및/또는 CD34(데이터베이스 접근 번호 NM_001025109.1 및 NP_001020280.1 참조)의 발현을 통해 분석될 수 있다. 일부 경우에, 이들 마커의 발현은 망상 섬유아세포, 예를 들어 세포 표면 표현형 CD39+CD26+를 지니는 세포와 관련되어 있다.

[0093] 또 다른 실시형태에서 섬유아세포 또는 이의 아집단(들)은 RGS5(G 단백질 신호 전달의 조절 인자 5)의 발현을 통해 분석될 수 있다. RGS5를 암호화하는 mRNA 및 폴리펩타이드 서열의 예는 데이터베이스 접근 번호 NM_001195303.2, NP_001182232.1, NM_001254748.1 NP_001241677.1, NM_001254749.1, NP_001241678.1, NM_003617.3 및 NP_003608.1을 참조한다. 이 마커의 발현은 주피세포(pericyte)와 관련될 수 있다.

[0094] 또 다른 실시형태에서 섬유아세포 또는 이의 아집단(들)은 MFAP5(마이크로 피브릴 관련 단백질 5) 및/또는 PRG4(프로테오글리칸 4)의 발현을 통해 분석될 수 있다. MFAP5를 암호화하는 mRNA 및 폴리펩타이드 서열의 예는 데이터베이스 접근 번호 NM_001297709.1 및 NP_001284638.1을 참조한다. PRG4를 암호화하는 mRNA 및 폴리펩타이드 서열의 예는 데이터베이스 접근 번호 NM_001127708.2 및 NP_001121180.2를 참조한다.

[0095] 추가의 실시형태에서 섬유아세포는 하나 이상의 팬-섬유아세포 마커, 예를 들면 PDGFRα(혈소판 유래 성장 인자 수용체-알파), PDGFRβ(혈소판 유래 성장 인자 수용체-베타), 데코린 또는 루미칸의 발현을 통해 분석될 수 있다. 분석되는 섬유아세포 집단에서 발견되는 추가 마커는 CD9, CD11a, CD29, CD44, CD47, CD59, CD73, CD81, CD87, CD105, CD141, CD142, CD147, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ 및 디시알로갱글리오사이드 GD2를 포함한다. 이러한 세포 표면 마커는 또한 전술한 바와 같은 분류 방법(예를 들면 유세포 분석)에서 사용될 수 있다.

[0096] **인간 피부 섬유아세포 아집단**

[0097] 본 명세서에 기재된 방법에서 인간 피부 섬유아세포는 상기 언급된 임의의 추가 마커를 포함하여 본 명세서에 기재된 마커의 조합 발현을 기반으로 아집단으로 분류될 수 있다. 인간 피부 섬유아세포의 분리된 아집단은 특정 세포 표면 표현형, 예를 들어 CD45-CD90+CD39+CD26-의 발현에 의해 특정화될 수 있다.

[0098] 세포 집단이 그의 자연 환경으로부터 분리됨을 의미하는 '분리됨'에 의해, 예를 들어 인간 피부 섬유아세포의 아집단은 공급원 샘플(예를 들면 인간 피부 샘플) 내의 인간 피부 섬유아세포의 전체 집단 및/또는 다른 피부 세포로부터 분리(separate)시킨 것이다.

[0099] 하나의 실시형태에서 분리된 세포 집단은 세포 표면 표현형 CD90+ CD39+ CD26-, 바람직하게는 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-의 발현을 특징으로 한다. 전형적으로 이러한 아집단은 인간 유두 섬유아세포를 포함한다.

[0100] 또 다른 실시형태에서 분리된 세포 집단은 세포 표면 표현형 CD90+ CD39-, 바람직하게는 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39-의 발현을 특징으로 한다. 전형적으로 이러한 아집단은 인간 피부 망상 섬유아세포를 포함한다.

[0101] 또 다른 실시형태에서 분리된 세포 집단은 세포 표면 표현형 CD90+ CD39+ CD26+, 바람직하게는 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26+의 발현을 특징으로 한다. 전형적으로 이러한 아집단은 인간 피부 망상 섬유아세포를 포함한다.

[0102] 또 다른 실시형태에서 분리된 세포 집단은 세포 표면 표현형 CD90+ CD36+, 바람직하게는 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD36+의 발현을 특징으로 한다. 전형적으로 이러한 아집단은 인간 피부 지방전구 섬유아세포를 포함한다.

[0103] 또 다른 실시형태에서 분리된 세포 집단은 세포 표면 표현형 CD90+ CD39+ CD26-, 바람직하게는 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-의 발현을 특징으로 한다. 전형적으로 이러한 아집단은 인간 유두 섬유아세포를 포함한다.

[0104] 또 다른 실시형태에서 분리된 세포 집단은 비멘틴+ 및 lin- CD90-에 의해 특징되어 지나 CD74(대식세포 억제 인자 수용체), HLA-DR 및/또는 CLDN5 및 TEK(TIE2)를 발현하는 것이다. 전형적으로 이러한 아집단은 지방전구 섬유아세포 및 주피세포에 기여할 수 있는 능력을 지니는 세포를 포함한다.

[0105] **분리된 섬유아세포 아집단의 확장**

[0106] 일부 실시형태에서 본 발명의 방법은 단계 (b) 내에서, 예를 들면 시험관 내 세포 배양 단계에서 분리된 하나

이상의 아집단을 확장시키는 단계를 포함한다. 분리된 세포 집단은 공지된 세포 배양 방법, 예를 들어 Driskell 등, J Invest Dermatol. 2012년 4월; 132(4): 1084-1093에 개시된 방법을 사용하여 확장될 수 있다. 바람직하게는 확장된 아집단은 확장 후에도 그들의 기능적 특성을 유지한다.

[0107] 일부 실시형태에서 섬유아세포 아집단의 특성은 예를 들어 Wnt, TGFbeta, FGF 또는 헤지호그 신호전달 경로의 약리학적 모듈레이션에 의해 배양 내에서 유지되거나 변형될 수 있다. 이러한 경로를 억제하기에 적합한 화합물은 예를 들어 Lichtenberger 등, '표피 b-카테닌 활성화는 뚜렷한 섬유아세포 계통에 대한 파라크린 신호전달을 통해 진피를 개조한다.' Nature Communications (2016) 7:10537 |DOI: 10.1038/ncomms10537에 개시되어 있다.

[0108] 예를 들어 PD173074(Tocris)는 적합한 FGFR 저해제이고, IPI4182(Infinity Pharmaceuticals)는 헤지호그 신호전달을 억제하고 RepSox(Sigma Aldrich) 및 SB431542(Tocris)는 TGF-베타 저해제로 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 이들 경로의 작용제는 SUN 11602(기본 섬유아세포 성장 인자 모방체); TGF 베타; 20(S)-하이드록시콜레스테롤 및 SAG 21k(헤지호그 경로의 작용제); 및 정제된 Wnt 단백질 또는 CHIR99021 및 LiCl(WNT 신호 전달의 활성화제)과 같은 GSK3의 저해제를 포함한다.

[0109] **치료적 및 미용적 적용**

[0110] 본 명세서에 기재된 분리된 인간 피부 섬유아세포 집단은 다양한 미용적 및 치료적 방법으로 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서 분리된 세포 집단은 피험자에게 투여하기 전에 생체 외에서 확장될 수 있다. 다른 실시형태에서 분리된 세포 집단은 피험자에게 직접, 즉 생체 외 확장 없이 투여될 수 있다.

[0111] 추가의 실시형태에서 세포는 생물학적(예를 들어 탈세포화된 인간 진피) 또는 불활성(예를 들어 하이드로겔) 무세포성 스캐폴드와 조합될 수 있다. 각각의 경우에 분리된 세포 집단은 원래의 세포 집단을 수득한 피험자에게 (즉, 자가 세포 요법으로) 투여되거나, 분리된 세포 집단은 상이한 피험자에게 (즉, 동종 이계 세포 요법으로) 투여될 수 있다.

[0112] 분리된 인간 피부 섬유아세포 집단은 다양한 피부 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어 분리된 인간 피부 섬유아세포 집단은 상처 치유를 촉진하거나 켈로이드성 또는 비-켈로이드성 흉터, 경피증, 이식편 대 숙주 질환, 피부 궤양 또는 수포성 표피박리증과 같은 유전적 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 분리된 인간 피부 섬유아세포 아집단은 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다.

[0113] 예를 들어 유두 섬유아세포(예를 들어, CD90+ CD39+ CD26- 세포)는 단독으로 또는 다른 섬유아세포 아집단(예를 들어 세포 표면 마커, 망상 섬유아세포, 지방전구 섬유아세포 또는 비멘틴+ lin- CD90- 세포의 조합에 의해 본 명세서에 정의된 분리된 섬유아세포 아집단 중 임의의 하나)과 조합하여 사용될 수 있다.

[0114] 하나의 실시형태에서 인간 피부 유두 섬유아세포 아집단은 예를 들어 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-에 의해 특정화되는 분리된 집단과 같은 것으로 사용될 수 있다.

[0115] 분리된 인간 피부 섬유아세포 집단은 또한 다양한 미용적 방법, 예를 들어 인간 피험자의 피부 노화, 주름 또는 흉터 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서 분리된 인간 피부 섬유아세포 집단은 피험자의 피부에서 섬유증을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어 세포 집단은 비강 주름, 미간 주름, 이마의 깊은 주름 및 여드름 흉터와 같은 안면 윤곽 기형을 수정하는데 사용될 수 있다.

[0116] 하나의 실시형태에서 인간 피부 유두 섬유아세포 아집단은 예를 들어 세포 표면 표현형 CD45- CD31- CD324- CD90+ CD39+ CD26-에 의해 특정화되는 분리된 집단과 같은 것으로 사용될 수 있다.

[0117] 본 명세서에 기재된 분리된 인간 피부 섬유아세포 아집단은 공지된 방법으로 예를 들어 전체 인간 피부 섬유아세포 요법에 대한 기존의 임상 시험에서 수행된 방법으로 피험자에게 적용될 수 있다. 예를 들어 본 명세서에 기재된 세포 집단은 임상 시험 NCT01743053, NCT01115634, NCT02493816 및 NCT00642642 (clinicaltrials.gov에서 입수 가능)에 기재된 방법을 사용하여 피험자에게 투여될 수 있다.

[0118] 섬유아세포-기반 세포 요법을 수행하는 방법은 예를 들어, Leavitt T 등, 흉터 없는 상처 치유: 적절한 세포 및 신호의 발견, Cell Tissue Res. 2016년 9월; 365 (3): 483-93 및 Weiss RA, 자가 세포 요법: 피부 필러를 대체하는가? Facial Plast Surg Clin North Am. 2013년 5월; 21(2): 299-304에 또한 개시되어 있다.

[0119] FDA 승인된 섬유아세포 요법의 예는 Fibrocell Technologies, Inc.의 LAVIV®(azficel-T)이며 이는 DMEM에 현탁된 자가 섬유아세포를 포함한다. 본 발명에 따른 섬유아세포 아집단은 유사한 방식으로 투여될 수 있다.

[0120] 분리된 인간 피부 섬유아세포 아집단은 피험자에게 투여하기 위한 임의의 적합한 약제학적으로 허용되는

부형제, 희석제 또는 담체와 조합될 수 있다. 전형적으로 세포 집단은 예를 들어 완충된 Dulbecco 변형 Eagles 배지(DMEM)와 같은 적합한 멸균 완충 용액과 같은 액상 배지 내에 제형화된다. 분리된 인간 피부 섬유아세포 아집단을 포함하는 약제학적 제제는 임의의 적합한 경로, 바람직하게는 주사, 예를 들면 피험자 피부로의 피내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0121] 당업자는 치료될 상태, 피험자 등의 성질에 따라 세포 집단의 적합한 투여량을 결정할 수 있다. 예를 들어 단일 용량은 10,000 내지 1억 개의 세포, 바람직하게는 약 2천만 개의 세포를 포함할 수 있다. 전형적으로, 이러한 용량은 0.1 내지 10 ml의 용액, 예를 들어 약 1 ml의 적합한 멸균 완충 용액 내에서 (예를 들어 주사에 의해) 투여된다.

[0122] 상기 치료적 및 미용적 적용에서 섬유아세포 아집단의 효능은 시험관 내 및 생체 내 동물 모델을 포함하여 전임상 및 임상 연구에서 확인될 수 있다. 예를 들어 켈로이드 이식 동물 모델을 포함하여 켈로이드 유래 섬유아세포의 활성 분석에 기초한 켈로이드 흉터의 적합한 모델은 J. Liu 등, '인간 지방조직 유래 줄기세포는 파라크린 신호전달에 의해 켈로이드 모델에서 켈로이드 섬유아세포 및 섬유증의 활성을 억제한다' Burns (2017) [Epublication, http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2017.08.017]에 개시되어 있다.

[0123] 이러한 모델에서 본 발명에 따른 섬유아세포 아집단의 효과가 또한 결정될 수 있다. 켈로이드 흉터의 치료는 일반적으로 Ogawa R. '켈로이드 및 비대성 흉터는 망상 진피에서 만성 염증의 결과이다' Int J Mol Sci. 2017년 3월 10; 18(3)에 개시되어 있다. 따라서 켈로이드 흉터의 치료에서 섬유아세포 아집단의 효과를 결정하기 위한 적합한 연구는 섬유아세포 아집단 주사와 함께 시험관 내 켈로이드 외식편, 콜라겐 겔 수축 분석 및 섬유아세포 아집단으로부터 배양 배지로 처리된 켈로이드 섬유아세포의 확장 분석을 포함한다.

[0124] 상처 치유에 대한 섬유아세포 아집단의 효과는 또한 적절한 시험관 내 및 생체 내 모델에서 결정될 수 있다. 예를 들어 마이그레이션 에세이, 생검 상처의 시험관 내 외식편 배양, 세포 외 매트릭스 분비 에세이 및 생체 내 절개 상처 치유 모델은 이들의 효과를 결정하기 위해 섬유아세포 아집단을 사용하여 수행될 수 있다.

[0125] **스크리닝 방법**

[0126] 추가의 실시형태에서 본 명세서에 기재된 섬유아세포 아집단은 당업자가 살아있는 동물에서 화합물을 시험하는 것을 회피할 수 있게 시험관 내 독성학적 및 미용적 스크리닝에 사용된다. 예를 들어 활성제는 시험관 내에서 섬유아세포 아집단 상에서 시험될 수 있으며 이들의 효과가 결정된다.

[0127] 따라서 하나의 측면에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 분리된 섬유아세포 아집단에 작용제를 시험관 내에서 적용하는 단계, 이의 하나 이상의 효과를 결정하는 단계를 포함하는 미용적 또는 치료적 제제를 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0128] 예를 들어 상기 방법은 활성제의 존재 하에서 섬유아세포 아집단의 세포 생존능, 특징적인 마커의 발현 또는 기능적 특성(예를 들어 세포가 제거된 인간 진피를 다시 채울 수 있는 능력)을 결정하는 단계에 관련될 수 있다. 고 처리량 스크리닝 방법을 사용하여 심각한 독성 효과 없이 섬유아세포 아집단의 바람직한 기능적 특성을 향상시킬 수 있는 제제를 확인할 수 있다.

[0129] **인간 피부 섬유아세포 아집단 식별**

[0130] 추가의 실시형태에서 본 명세서에 기재된 임의의 세포-표면 및/또는 세포 내 마커는 샘플에서 인간 피부 섬유아세포의 아집단을 식별하기 위해 사용될 수 있다. 전형적으로 이러한 방법은 샘플 내의 인간 피부 섬유아세포의 서브세트에서 마커 중 하나 또는 조합 (예를 들어 mRNA 및/또는 단백질) 발현의 결정과 관련되어 있다.

[0131] 예를 들어 상기 방법은 상기 섬유아세포상의 CD39, CD36 및/또는 CD26에서 선택된 하나 이상의 세포 표면 마커의 발현을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서 상기 방법은 하나 이상의 세포 내 마커, 예를 들어 상기 및 실시예에 기재된 인간 진피의 전사 프로파일링에 의해 확인된 하나 이상의 추가 마커의 발현을 결정하는 단계를 포함한다.

[0132] 샘플 내에서 이러한 마커의 발현은 세포의 아집단에서 mRNA 및/또는 상응하는 폴리펩타이드 서열의 검출을 위한 임의의 적합한 방법, 예를 들어 RT-PCR, RNA-Seq, 유전자 발현 어레이, 노던/웨스턴 블롯, ELISA 및 면역 세포화학에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는 방법은 인간 피부 섬유아세포 아집단을 보다 적절하게 특성화하기 위해서 다수의 이러한 마커를 결정하는 단계, 예를 들어 RT-PCR 또는 ELISA에 의해 수행된다.

[0133] 예를 들어 하나의 실시형태에서 유두 섬유아세포는 COL6A5, COL23A1 HSPB3, WNT5a, RSPO1 및/또는 LEF1의 발현

에 의해 예를 들면 이들 마커 중 하나 이상을 암호화하는 mRNA를 검출함으로써 확인될 수 있다. 망상 섬유아세포는 CD70 및/또는 CD34의 발현에 의해 확인될 수 있다.

[0134] **키트**

[0135] 또한 샘플에서 인간 피부 섬유아세포의 하나 이상의 아집단을 확인 및/또는 분리하기 위한 키트가 제공된다. 이러한 키트는 본 명세서에 정의된 하나 이상의 마커에 특이적인 시약을 포함할 수 있다. 바람직하게는 키트는 복수의 마커에 특이적인 시약을 포함한다. 적합한 시약은 마커(들)에 특이적으로 결합하는 리간드 (예를 들어, 항체) 또는 예를 들어 마커를 암호화하는 mRNA 또는 cDNA와 같은 마커 서열의 특이적 증폭을 지시하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 같은 이다.

[0136] 키트는 예를 들어 검출 방법을 수행하기에 적합한 추가 시약을 포함할 수 있다. 예를 들면 2차 항체와 같은 ELISA 분석용 시약, 완충액 또는 형광 라벨 또는 역전사 효소, Taq 폴리머라제, 데옥시리보뉴클레오타이드 (dNTP) 및 적합한 완충제와 같은 RT-PCR을 수행하기 위한 시약이다.

[0137] 바람직한 실시형태에서 키트는 CD39, CD36 및/또는 CD26에 특이적인 시약의 조합을 포함한다. 예를 들어 키트는 CD39, CD36 및 CD26에 특이적인 항체 또는 프라이머를 포함할 수 있다. 키트는 임의로 CD90, CD45, CD31 및/또는 CD324에 특이적인 시약 (예를 들어 항체 또는 프라이머)을 추가로 포함할 수 있다.

[0138] 또 다른 실시형태에서 키트는 유두 섬유아세포의 마커에 특이적인 시약의 조합을 포함한다. 예를 들어 키트는 COL6A5, COL23A1 HSPB3, WNT5a, RSPO1 및/또는 LEF1에 특이적인 하나 이상의 뉴클레오타이드 프라이머를 포함할 수 있다. 바람직하게는 키트는 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개의 프라이머 쌍을 포함하고, 각 프라이머 쌍은 COL6A5, COL23A1 HSPB3, WNT5a, RSPO1 및/또는 LEF1 mRNA 또는 cDNA의 증폭에 적합하다. 유두 섬유아세포 특이적 마커의 증폭에 적합한 프라이머 쌍의 예는 하기 표 1에 제시되어 있다:

표 1

[0139]

유전자	정방 프라이머 **5'-3'**	역방 프라이머 **5'-3'**
Lef1	ATCACACCCGTCACACATCC (서열번호: 1)	GGGGTGATCTGTCCAACACC (서열번호: 2)
RSPO1	TCTGCTCTGAAGTCAACGGC (서열번호: 3)	GCCTCACAGTGCTCGATCTT (서열번호: 4)
Wnt5a	CGCGAAGACAGGCATCAAAG (서열번호: 5)	CGTATGTGAAGGCCGTCTCG (서열번호: 6)
Col6A5	TGCGCTGAACCTTCGACTG (서열번호: 7)	AGCGTGGAAATTGTCTGTTCTG (서열번호: 8)
Col23A1	AGGACAAGATGGAGCTGCTG (서열번호: 9)	ATCTTTCCCAGTGTCGCCAG (서열번호: 10)
HSPB3	GGGCACGGCTATAAACCACT (서열번호: 11)	TCCTTCTGCCAACCTTCCAC (서열번호: 12)

[0140] 따라서 특정 실시형태에서 키트는 서열번호: 1 내지 서열번호: 12 중 하나 이상의 서열을 지니는 하나 이상의 프라이머를 포함할 수 있다. 바람직하게는 키트는 서열번호: 1 내지 서열번호: 12 중 적어도 2, 4, 6, 8, 10 또는 12개를 포함한다.

[0141] 당업자는 공지된 방법을 사용하여 원하는 마커의 특이적 증폭에 적합한 대안적인 프라이머 서열을 쉽게 확인할 수 있다. 다양한 다형성 변이체를 포함하여 본 명세서에 기재된 마커의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 예를 들어 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 공개적으로 접근 가능한 서열 데이터베이스로부터 입수 가능하다:

표 2

[0142]

유전자	명칭	데이터베이스 접근 번호 (인간 mRNA 서열)
Lef1	림프 인핸서 결합 인자 1	NM_016269.4, NM_001166119.1, NM_001130714.2, NM_001130713.2
RSPO1	R-스폰딘-1	NM_001038633.3, NM_001242908.1, NM_001242909.1, NM_001242910.1
Wnt5a	윙리스-형 MMTV 통합 사이트 패밀리, 멤버 5A	NM_001256105.1 NM_003392.4
Col6A5	콜라겐 타입 VI 알파 5 체인	NM_001278298.1 NM_153264.6
Col23A1	콜라겐 타입 XXIII 알파 1 체인	NM_173465.3
HSPB3	열 충격 단백질 패밀리 B (소) 멤버 3	NM_006308.2

[0143] 추가의 실시형태에서 키트는 다음 마커의 임의의 조합, 예를 들면 CD90, CD70, CD34, RGS5, PRG4, MFAP5, 비멘틴, 루미칸 또는 데코린의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 마커 조합에 특이적인 시약(예를 들어 항체 또는 프라이머)을 포함한다.

[0144] 본 발명은 하기 실시형태에 의해 한정되는 것은 아니며 단지 실시예로서 설명하는 것이다.

[0145] (실시예)

[0146] (실시예 1)

[0147] 유동화 분류된 마우스 섬유아 세포 아집단의 전사 프로파일링, 미세 해부된 인간 진피의 공간적 프로파일링 및 프라이머리 인간 진피 섬유아세포의 단일 세포 RNA 서열분석을 조합적으로 사용하여 본 발명자들은 인간 피부 섬유아세포 아집단의 잠재적 분리를 가능케 하는 마커를 정의한다.

[0148] 본 발명자들은 상부 및 하부 진피로부터 잠재적으로 분리된 섬유아세포의 Wnt 신호전달 차이, 인터페론 자극에 대한 차등 반응성, 3차원 기관형 세포 배양에서 완전히 층화된(stratified) 인간 표피의 발달을 지원하는 능력의 차이에 따라 서로 구별되는 특성을 나타냄을 규명한다.

[0149] 본 발명자들의 발견은 과도한 섬유증을 특징으로 하는 상처 치유 및 인간 질병 상태의 조사와 상당한 관련이 있으며 치료적 적용을 위해 특정 섬유아세포 아집단의 생체 외 확장 또는 생체 내 제거를 촉진할 수 있는 세포 표면 마커를 제공할 수 있다.

[0150] **재료 및 방법**

[0151] **조직학**

[0152] 성형수술을 받는 동의한 환자들로부터 여분의 수술 잔여 피부를 수득하였다. 이 작업은 영국 국립 연구 윤리 서비스 위원회에 의해 윤리적으로 승인되었다(HTA 라이센스 번호: 12121, REC 번호: 14/NS/1073). 조직학을 위해 조직 샘플을 최적 컷팅 온도 화합물(OCT, Life Technologies)에 매립하고 -80 ℃에 저장하였다. Thermo Cryostar Nx70 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 10-16 mm 섹션을 절단하였다.

[0153] 섹션을 4% 파라포름알데히드에 고정시키고, PBS 중 에서10% 당나귀 혈청, 0.1% 어류 피부 젤라틴, 0.1% Triton X-100 및 0.5% Tween-20(모두 Sigma-Aldrich)의 용액으로 블로킹하고, 블로킹 완충액에 희석된 프라이머리 항체로 4 ℃ 에서 하룻밤 라벨링 하였다. 섹션을 PBS로 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 세컨더리 항체 및 DAPI로 라벨링 하고 PBS로 세척한 후 형광 마운팅 배지(DAKO)로 장착하였다.

[0154] **항체**

[0155] 면역 형광 표지 및 유세포 분석에 다음의 프라이머리 항체가 사용되었다: 항-마우스 CD26 PerCP-Cy5.5 (eBioscience 45-0261-80), 항-인간 CD26 PE-Cy5 (Biolegend 302708), 항-마우스 CD133 PE (eBioscience 12-1331-80), 항-마우스 CD133 APC (eBioscience 17-1331-81), 항-마우스 CD140a APC (eBioscience 17-1401-81),

항-마우스 Ly-6A/E AF700 (eBioscience 56-5981-82), 항-마우스 Dlk1 PE (MBL Int/Caltag medsystems D187-5), 항-인간 CD31 PE (eBioscience 12-0319-41), 항-인간 CD31 APC-Cy7 (Biolegend 303119), 항-인간 CD36 FITC (eBioscience 11-0369-41), 항-인간 CD36 PE (Biolegend 336206), CD39 (eBioscience 14-0399-82), 항-인간 CD39 PE (eBioscience 1112-0399-41), 항-인간 CD39 APC (Biolegend 328210), 항-인간 CD45 AF700 (eBioscience 111256-9459-41), 항-인간 CD45 APC-Cy7 (Biolegend 368516), 항-인간 CD90 PE (eBioscience 12-0909-41), 항-인간 CD90 APC (Biolegend 328114), 항-인간 CD324 PerCP/Cy5.5 (Biolegend 324113), 항-인간 CD86 PE (Biolegend 305405), 항-인간 CD40 APC/Cy7 (Biolegend 334323), 항-인간 HLA-DR Pacific Blue™ (Biolegend 327016), 항-인간 CD80 Brilliant Violet 605™ (Biolegend 305225), 항-인간 CD274 (PD-L1, B7-H1) PE-Cyanine7 (eBioscience 25-5983-41), K14 (Cambridge Bioscience 906001), PDGFR-α (R&D Systems AF307-NA), 비멘틴 (Cell Signaling 5741S), 포도플라닌 (R&D Systems AF3244), Col6A5 (Abcam Ab122836), APCDD1 (Abcam Ab171851), HSPB3 (Abcam Ab150844), WIF-1 (R&D Systems MAB134), MFAP5 (Atlas 항체 HPA010553), 및 PRG4 (Atlas 항체 HPA028523).

[0156] 다음의 세컨더리 항체가 사용되었다: 항-마우스AF555 (Invitrogen A31570), 항-마우스AF647 (Invitrogen A31571), 항-염소AF488 (Invitrogen A110550), 항-염소AF555 (Invitrogen A21432), 항-래빗 AF488 (Invitrogen A21206), 항-래빗 AF555 (Invitrogen A31572), 항-래트 AF488 (Invitrogen A21208), 항-래트 AF555 (Invitrogen A21434) 및 항-치킨 AF488 (Invitrogen A11039).

[0157] **현미경 관찰**

[0158] Leica DM IL LED 조직 배양 현미경을 사용하여 현미경 사진을 촬영하였다. 공초점 현미경 관찰은 10X 또는 20X 대물 렌즈를 사용하는 Nikon A1 Upright Confocal 현미경으로 수행되었다. H&E 염색 섹션의 이미지화는 Hamamatsu NanoZoomer 슬라이드 스캐너(Hamamatsu)를 사용하여 수행되었다. 이미지 처리는 Nikon Elements, Image J(Fiji), Photoshop CS6(Adobe) 및 Icy 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.

[0159] **신생 마우스 섬유아세포의 분리**

[0160] P2 진피는 전술한 바와 같이 채취하였다. 팔다리, 꼬리 및 머리가 제거되었다. 복부 피부의 후방 절개 전방을 생성하고 피부를 사체에서 분리하였다. 피부를 트립신/EDTA(Sigma-Aldrich) 및 Dispase(Sigma-Aldrich) (50:50)의 용액에서 37 ℃에서 1시간 동안 배양한 후, 표피를 벗겨내어 폐기하였다. 진피를 갈아서 FAD 기본 배지(Gibco) 내의 0.25 % 콜라게나제로 37 ℃에서 1시간 동안 배양하였다.

[0161] 생성된 세포 현탁액을 70 μm 세포 스트레이너(SLS)를 통해 여과하고, 1800 rpm에서 4분 동안 25 ℃에서 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 펠렛을 PBS로 3회 세척하였다. 최종적으로 펠렛을 Amniomax 배지(Gico)에 재현탁 시키고 세포를 유세포 분석 및 RNA 추출에 사용하였다.

[0162] **인간 성인 섬유아세포의 분리**

[0163] 인간 성인의 수술적 폐기된 피부를 5mm 직경의 조각으로 절단하고 37 ℃에서 1 시간 동안 디스파제와 함께 배양하였다. 표피를 벗겨내어 폐기하고 진피를 전체 피부 해리 키트(Miltenyi)의 효소를 사용하여 37 ℃에서 밤새 소화시켰다. 생성된 세포 현탁액을 70 μm 세포 스트레이너를 통해 여과하고, 4 ℃에서 10분 동안 1500 rpm으로 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 펠렛을 4 ℃에서 4분 동안 1500 rpm에서 PBS로 1회 세척하였다. 펠렛을 RNA 추출을 위해 유세포 분석을 위한 PBS + 1% FCS 또는 RNA 추출을 위한 2-머캅토에탄올(Qiagen)을 함유하는 라이시스 완충액 내에 재현탁 시켰다.

[0164] **세포 배양**

[0165] 인간 성인 피부 섬유아세포는 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM) + 10% (v/v) FBS, 2 mM L-글루타민 및 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신(Gibco) 또는 Amniomax C100(Gibco) 보충물과 함께 Amniomax C100 배지에서 배양되었다. 배양 플라스크를 5% CO_2와 함께 가습된 분위기 하에서 37 ℃에서 배양하고 80 % 컨플루언트일 때 3-5일 마다 계대시켰다. 모든 연구에서 1-6 계대 사이의 세포를 사용하였다. 프라이머리 정상 인간 각질세포(NHK, 스트레인 km)의 보존 배양은 외과적으로 폐기된 포피로부터 수득되었으며 3T3-J2 피더 세포 상에서 성장시켰다.

[0166] NHK는 계대 2-5 사이의 DED 실험에 사용되었다. 3T3-J2 섬유아세포는 James Rheinwald 박사(미국, 하버드 피부연구 센터, 피부과)로부터 입수하였으며 인증되지 않았다. 모든 세포 스톡은 마이코플라즈마 오염에 대해 일상적으로 시험되었으며 음성이었다. NHK를 1 개의 Ham's F12, 3 개의 DMEM, 10^{-4} μM 아데닌, 10 % (v/v) FBS,

0.5 μg/ml^{-1} 하이드로코르티손, 5 μg/ml^{-1} 인슐린, 10^{-10} M 콜레라 독소 및 10ng ml^{-1} EGF 를 함유하는 완전한 FAD 배지 내에서 전술한 바와 같이 유사 분열로 불활성화된 3T3-J2 세포에서 배양하였다.

[0167] 유세포 분석법에 의한 분석을 위해 채취하기 이전에 INF-γ-자극 분석을 위해 인간 피부 섬유아세포를 성장 배지 내에서 72시간 동안 1000 U/ml INF-γ(Sigma-Aldrich)로 자극하였다.

[0168] 탈-표피 진피(DED)는 전술한 바와 같이 제조되었다. 간단히, 성인의 인간 피부를 1-2 cm^{2}로 나누고, 52 ℃에서 20 분 동안 가열하고, 집게로 표피를 진피로부터 분리하였다. 진피는 10 회 이상의 동결-해동 사이클에 의해 세포를 고갈시키고 60Gy로 1회 조사 하였다. 섬유아세포가 DED에 접종되기 전에, 조직을 6-웰 행잉(hanging) 세포 배양 삽입물(Millipore)에 넣고 DMEM으로 평형화 시켰다.

[0169] 5×10^5 세포/DED인 섬유아세포를 표피 표면으로부터 U-100 인슐린 주사기 (BD)를 사용하여 DED에 주입한 다음, DMEM에 완전히 침지시켜 72 시간 동안 배양하였다. 배지는 공기-액체 계면을 지니는 FAD 배지로 교환하였고 1×10^6 각질 세포가 DED 위에 접종되었다. DED는 48 시간마다 배지를 교환하면서 3 주 동안 FAD 배지 및 공기-액체 계면과 함께 배양물에서 유지시켰다.

[0170] **유세포 분석**

[0171] 분해된 피부 세포를 4 ℃에서 45분 동안 PBS + 1% FCS 중의 항체로 표지시켰다. 사멸된 세포를 배제하기 위해 DAPI를 사용하였다. 실험 설정 동안 형광 마이너스 1(FMO) 대조군을 사용하였다. 배양 후, 세포를 4 ℃에서 4분 동안 1500 rpm으로 원심 분리하고 PBS + 1% FCS에서 3회 세척하였다. 펠렛을 PBS + 1% FCS에 재현탁 시키고 50 μm 세포 스트레이너를 통해 여과하였다.

[0172] BD FACSCanto Ⅱ 유체 및 LSRFortessa 세포 분석 시스템을 사용하여 데이터 수집을 수행하였다. BD FACSAria™ Ⅱ 및 BD FACSAria™ Ⅲ Fusion 세포 분류기에서 세포 분류를 수행하였다. 게이트 설정 및 컴펜세이션을 위해, 라벨링되지 않은 세포, 단일 라벨링된 세포 및 컴펜세이션 비드(BD)가 대조군으로서 사용되었다. FlowJo 소프트웨어 버전 7.6.5(Tree Star, Ashland, OR)를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다.

[0173] **정량적 RT-PCR**

[0174] Qiagen RNeasy 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 전체 RNA를 분리하고 QuantiTect 역전사 키트(Qiagen) 또는 Superscript Ⅲ First-Strand Synthesis(Thermofisher)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 37 ℃의 PCR 블록에서 20분 동안 반응 30㎕ 당 1㎕의 RNAse H를 첨가함으로써 반응의 마지막에 추가 RNAse H 처리를 완료하였다.

[0175] RT-qPCR 반응은 TaqMan 프로브와 함께 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 프로브의 표준 프로토콜을 사용하거나 qPCR 프라이머(공개된 또는 프라이머 3로 디자인됨)를 사용하는 SYBR-Green Master Mix(Life Technologies)를 사용하여 CFX384 Real-Time System(Bio-Rad)에서 수행되었다.

[0176] 델타 CT 방법을 사용하여 수치를 GAPDH, 18S 또는 TBP 발현 수준으로 정규화하였다. 달리 언급되지 않는 한, 각각의 반응은 적어도 세번의 생물학적 복제로 완료되었다. 다음의 TaqMan 프로브가 사용되었다: CD36 Mm01135198_m1; AKAP12 Mm00513511_m1; CHODL Mm00507273_m1; 마우스 GAPDH 내인성 대조군(4352339E), CD39 Mm00515447_m1; Akr1c18 Mm00506289_m1, IL6 Mm00446190_m1, NRK Mm00479081_m1.

[0177] **Affymetrix 마이크로어레이**

[0178] cDNA를 단편화하고 Affymetrix GeneChip® 라벨링 키트로 라벨링 시켰다. 라벨링 된 DNA 표적 및 단편화된 cDNA를 마우스 유전자 2.0 ST 어레이(Affymetrix)에서 혼성화 시켰다. 마이크로어레이는 GeneChip® 스캐너 3000(Affymetrix)에서 스캔되었다.

[0179] **RNA 서열분석**

[0180] 공간적 RNA 서열분석은 (3개의 개별 개인로부터의) 신선한 인간 피부 샘플을 사용하여 수행되었다. 피부 샘플을 37 ℃에서 1시간 동안 Dispase Ⅱ(Stemcell Technologies)와 함께 배양하여 표피의 분리를 허용하였다. 진피는 해부 현미경 하에서 미세 해부에 의해 유두(100 mm 이상), 망상(200-500 mm) 진피로 분리되었다.

[0181] 분리된 유두 및 망상 진피 샘플을 이어서 2-머캅토에탄올(PureLink RNA 마이크로 스케일 키트, Invitrogen)을 포함하는 용해 완충액으로 이송시키고 기계적 균질화기(Polytron, Kinematica)를 사용하여 2분 동안 균질화 시켰다. 후속 RNA 추출은 PureLink 마이크로 키트를 사용하여 제조사 지침에 따라 수행되었다. 라이브러리 준비는

SmartSeq2 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0182] 단일 세포 RNA 서열분석을 위해, 단일 세포를 유세포 분석법에 의해 (상기와 같이) 분리하고 2μl 용해 완충제 (0.2 % (v/v)) Triton X-100 및 2 U/ul 재조합 RNase 저해제(Clontech)를 함유하는 96 웰 플레이트의 개별 웰로 분류하였다. SmartSeq2로 라이브러리 준비를 수행한 후 Nextera XT 프로토콜(Illumina)을 수행하였다. TruSeq SBS v3 케미스트리를 사용하여 Ilumina Hiseq2000 또는 Hiseq 25000에서 서열분석을 수행하였다. 리드는 Tophat2로 매핑되었다. featureCounts를 사용하여 유전자 특이적 발현을 정량화 시켰다.

[0183] **그래프화 및 통계적 분석**

[0184] 그래프는 Excel 및 GraphPad Prism 6 소프트웨어를 사용하여 생성되었다. 데이터는 평균의 평균±표준오차(SEM)이다. Bonferroni 사후 테스트 또는 스튜던트 검정을 통한 일원분산분석 지표 검정이 실험에 대해 수행되었으며 $P<0.05$는 유의미한 것으로 간주되었다. 단일 세포 서열분석 데이터의 통계 분석 및 시각화는 Seurat Package for R(Satija Lab)을 사용하여 수행되었다.

[0185] **결과**

[0186] **신생아 마우스 섬유아세포 아집단 내에서 Wnt, ECM 및 면역 신호전달과 관련된 유전자의 차등 발현**

[0187] 본 발명자들은 출생 후 2일(P2)에 PdgfraHBeGFP 리포터 마우스의 배면 피부로부터 분리된 GFP+ 섬유아세포를 세포 표면 마커 CD26, Sca1 및 Dlk1의 발현에 근거하여 유세포 측정법으로 분리시킬 수 있다고 이전에 보고한 바 있다. 이러한 세포 집단을 구별하는 추가 마커 및 신호 경로를 식별하기 위해 본 발명자들은 유동화 분류된 P2 GFP+ 섬유아세포의 전사체 분석을 수행하였다(도 1). 망상 섬유아세포는 Dlk1+Sca1- 세포를 게이트화 함으로써 분리되었다.

[0188] 2 개의 분리된 지방전구세포 집단은 Sca1에 대해 양성이며 Dlk1: Dlk1+ Sca1+ 세포 및 Dlk1-Sca1+ 세포를 사용하여 서로 분별될 수 있다. 유두 세포는 CD26+ Sca1-로서 분리되었다. 각 집단의 80,000 개의 세포를 3개의 개별 마우스로부터 분류하였다 (도 1A). RNA를 추출하고 CD26, Sca1 및 Dlk1 발현의 Affymetrix 마이크로어레이 분석 및 qPCR 검증을 수행하였다(도 1B-E). 마커 발현은 유동화 분류 집단에서 분리된 mRNA(도 1C) 내에서 및 마이크로어레이(도 1D) 내에서 확인되었다.

[0189] 주성분 분석(PCA)을 사용하여 상이한 세포 집단 사이의 관계를 평가하였다(도 1B). 샘플은 분화된 상태에 따라 PC1 (y) 축을 따라 정렬된다. 2 개의 Sca1+(지방전구세포) 집단은 PC1에서 가장 가깝게 위치하였다. Dlk1-Sca1+ 샘플 중 하나는 Dlk1+Sca1+ 샘플과 클러스터화 되어 있고(아스테릭, 도 1B) 마이크로어레이 내의 다른 Dlk1-Sca1+ 샘플보다 Dlk1 수준이 높았으나(아스테릭, 도 1D) 이는 유동화 분류 시 기술적 문제를 나타내는 것 같았다.

[0190] 따라서 이 샘플은 후속 분석에서 제외되었다. 유전자 발현 수준의 계층적 클러스터링은 특이한 Dlk1-Sca1+ 샘플(아스테릭)을 제외하고는 서로 다른 마우스의 동일한 세포 집단이 함께 클러스터화 되어 있음을 확인하였다(도 1E).

[0191] 차등적으로 발현된 유전자의 유전자 온톨로지(GO) 텀(term) 분석(도 2A)은 유두 섬유아세포에서 Wnt 신호 전달 경로의 상향 조절을 나타내는 종래의 관찰을 확인시켰다. 망상 섬유아세포에 대한 최고 GO 텀은 ECM 조직이고, 이와 일치하여 주요 역할을 수행하는 세포는 피부 ECM 침착이다. 반면에 Dlk1-Sca1+ 최고 GO 텀은 근육에 관련되어 있으며 이는 기반 육상층(panniculus carnosus) 근육 내의 섬유/지방생성 전구체의 존재를 반영할 수 있다.

[0192] Dlk1+Sca1+ 세포의 주요 경로는 주화성(chemotaxis) 및 염증과 관련이 있다. Dlk1+Sca1+ 세포는 Dlk1-Sca1+ 세포보다 피브릴린(FBN1)과 같은 섬유소 ECM 단백질을 암호화하는 유전자의 더 높은 수준을 발현 하였다(도 2E). 섬유성 염증에 관련된 유전자(예를 들어 IL-6, CCL7 및 CXCL12)는 Dlk1-Sca1+ 세포보다 Dlk1+Sca1+ 세포에서 더 크게 상향 조절되었다(도 2B). 차등 발현된 Wnt, ECM 및 염증 관련 유전자의 예를 보여주는 히트맵이 도 2B-D에 도시되어 있다.

[0193] 여러 유전자의 차등 발현은 Q-PCR에 의해 확인되었다: Wnt 경로 유전자 Tcf4, Lef1 및 Axin 2는 다른 집단보다 CD26+ Sca1- 유두 섬유아세포에서 더욱 상향 발현되는 반면에, Cxcl1 및 Cxcl12는 유두 섬유아세포에서 현저하게 하향 조절되었다(도 2E).

[0194] Sca1+ 마우스 피부 섬유아세포는 생체 내 및 배지 내에서 지방 세포로 분화하는 능력을 지닌다. 그러나

Dlk1+Sca1- 섬유아세포는 또한 지방생성 활성을 지닌다. 2개의 지방전구세포 집단의 본질에 대한 통찰력을 얻기 위해, 지방생성 마커 패널의 발현을 비교하였다(도 2F). Dlk1+Sca1+ 및 Dlk1-Sca1+ 집단은 다른 집단보다 Pparg 및 Fabp4와 같은 공지된 지방전구세포 마커를 높은 수준으로 발현하였다(도 2F).

[0195] 그러나 망상 섬유아세포(Dlk1+Sca1-)는 지방전구세포 마커 CD24를 최고 수준으로 포함하였다(도 2F). 두 Sca1+ 집단은 상이한 섬유아세포 아집단 보다 지방산 수송체 CD36을 높은 수준으로 발현하는 반면에(도 2G), CD39는 CD26+Sca1- 세포에서 선택적으로 상향 조절되었다(도 2H).

[0196] 본 발명자들은 신생 마우스 유두 섬유아세포가 상승된 Wnt 유전자 특성을 지님으로써 다른 섬유아세포 집단과 구별하는 반면에 Dlk1+Sca1+ 세포는 ECM 및 염증성 유전자를 상향 발현하는 것으로 결론지었다. 두 Sca1+ 집단이 지방세포로 분화될 수 있으나 이들은 별개의 유전자 발현 프로파일을 지니며 지방전구세포 마커 CD24를 발현하는 세포는 망상 (Dlk1+Sca1-) 집단 내에 존재한다.

[0197] **인간 진피의 공간적 전사 프로파일링**

[0198] 인간 섬유아세포 아집단의 마커를 식별하기 위해 본 발명자들은 유전자 발현의 공간적 차이가 마우스와 인간 사이에 보존된다는 가설을 수립하였다. 이것을 테스트하기 위해 본 발명자들은 인간의 피부 샘플(별도의 개인으로부터 3개의 성인 여성 유방 샘플)로부터 표피를 효소적으로 제거하고 해부 현미경 하에서 망상 진피로부터 유두를 미세하게 해부하였다.

[0199] 상부 100mm("유두") 및 200-500mm("망상") 인간 피부층으로부터 RNA를 개별적으로 추출하고 증폭 및 RNA 서열분석을 수행하였다. 유전자 발현의 계층적 클러스터링은 유두 및 망상 진피의 세포가 별개의 유전자 발현 프로파일을 지니며 상이한 개인으로부터 분리된 동일한 공간적 위치의 샘플이 서로 관련됨을 나타내었다(도 3A).

[0200] 팬-섬유아세포 마커를 식별하기 위해 본 발명자들은 공지된 RNA-서열 데이터와 상부 및 하부 인간 진피의 유전자 발현 프로파일을 6개의 배양된 인간 섬유아세포주와 7개의 비-섬유아세포 세포주에서 비교하였다. 팬-섬유아세포 마커를 진피 층 및 모든 배양된 섬유아세포주에서 높은 수준으로 발현되나 다른 배양된 세포 유형에서는 검출되지 않는 유전자로 한정하였다.

[0201] 이들 기준을 충족시키는 유일한 세포 표면 마커는 공지된 마커 CD90(CD90이 또한 인간 ES 세포에서 발현되지만), PDGFRα 및 PDGFRβ였다. 그러나 분석은 작은 류신-풍부 프로테오글리칸 루미칸(LUM) 및 데코린(DCN)을 분비된 팬-섬유아세포 마커로서 확인하였다.

[0202] 다음으로 본 발명자들은 유두와 망상 섬유아세포에 대한 새로운 마커를 찾기 위해 인간 진피의 다른 층에서 차등적으로 발현된 유전자를 분석하였다(도 3B, C). 유두 진피에서 가장 고도로 농축된 마커 중 하나는 콜라겐 VI의 α5 사슬(COL6A5)이었다. 콜라겐 VI는 대부분의 결합 조직 내에 존재하며 이는 구조적으로 독특한 미세 섬유를 형성하기 위해 조립되고 기저막과 관련하여 종종 발견된다.

[0203] COL23A1은 또한 유두 대 망상 진피에서 과발현 되었다. 이러한 분석은 또한 유두 진피에서 Wnt 경로(WIF1, APCDD1, RSPO1, AXIN2)의 구성 요소의 증가된 발현을 확인하며 이는 마우스와 인간 사이의 차등 Wnt 신호전달의 진화적 보존을 의미한다(도 2B 참조).

[0204] 하부 진피는 특징적인 ECM 시그니처를 지니지 않았다; 그러나 시크리토글로빈 수퍼 패밀리의 몇몇 멤버(SCGB2A2, SCGB1D2, SLC12A2)가 높게 발현되었다. 모낭-특이적 유전자(KRTAP11-1, TCHH)는 망상 진피에서 가장 강력하게 농축되었으며 이는 RNA 분리 전에 표피가 제거될 때 진피 내에 매립되어 남아있는 저층의 모낭 때문일 가능성이 높다. 유방 상피 마커 MUCL1의 높은 발현은 또한 하부 진피의 특징이었으며 이는 제제 내에 잔류하는 유선(mammary) 상피 세포를 나타낸다.

[0205] 기능 연구의 경우, 섬유아세포 아집단을 구별하는 세포 표면 마커가 매우 중요하다. 따라서 본 발명자들은 유두(도 3D) 및 망상(도 3E) 인간 진피 내에서 풍부한 세포 표면 마커를 식별하기 위해 차등 발현 유전자의 목록을 필터링 하였다. CD3γ, CD3δ 및 CD3ε는 유두 진피에서 상당히 풍부하였으나 이는 섬유아세포 아집단보다는 T 세포의 함량의 차이를 반영했을 가능성이 높다.

[0206] 본 발명자들은 또한 마우스와 인간 피부 계통 모두에서 차등적으로 발현되는 세포 표면 마커를 확인하였다(도 3F). 망상 계통의 보존된 마커는 확인되지 않았다; 그러나 CD39는 마우스 및 인간 모두에서 유두 진피 계통의 보존된 마커로서 확인되었다.

[0207] RNA 서열분석에서 확인된 유전자의 차등 발현을 확인하기 위해, 본 발명자들은 3명 개인의 피부 섹션에서 항체

라벨링을 수행하였다. 본 발명자들은 COL6A5 발현이 유두 피부 섬유아세포로 제한됨을 확인하였다(도 4A, B). 이러한 발현 패턴은 두 개의 개별적인 보고서에 설명되어 있으며 따라서 COL6A5는 유두 피부 섬유아세포에 대한 강력한 마커이다. APCDD1(도 4C, D), HSPB3(도 4E, F) 및 WIF1(도 4G, H)에 대한 면역 염색으로 유두 진피에서 이들 마커의 차등 발현을 확인하였다(도 3B).

[0208] 마우스 섬유아세포 아집단에서의 그들의 발현과 일치하여(도 2G, H), CD36은 유두 진피에서 하부 망상 진피 및 피하에서 우선적으로 발현되었으며(도 4I, J) 및 CD39는 유두 진피에서 우선적으로 발현되었다(도 4K, L).

[0209] 본 발명자들은 신생아 마우스와 성인 인간 진피에 망상 및 유두 진피의 섬유아세포에 차등 유전자 발현이 존재하고 차등 Wnt 신호 전달은 진화적으로 보존된 특성이며 CD36 및 CD39는 상이한 섬유아세포 아집단의 잠재적인 분리를 위한 표면 마커라고 결론 내렸다.

[0210] **유동화 분류된 인간 섬유아세포의 기능적 이종성**

[0211] 세포가 배양에서 뚜렷한 특징을 유지한다면 치료적 적용을 위해서는 특정 피부 섬유아세포 아집단의 생체 외 확장이 바람직할 것이다. 마우스와 인간 섬유아세포에 대한 본 발명자들의 분석에 근거하여 본 발명자들은 lin-(즉, CD31-CD45-E-카드헤린), CD90+CD39+(유두) 또는 lin-CD90+CD36+(낮은 망상/피하)인 인간 섬유아세포를 유동화 분류하였으며 최대 4대의 계대 배양에 대해 배양 내 확장에 따른 특성을 비교하였다(도 5).

[0212] 본 발명자들은 LUM 및 COL6A5의 발현이 전체 진피에 비해 CD90+ 섬유아세포 내에서 풍부하다는 것을 확인 하였다(도 5A, B). 단일 계대 후, CD39 및 COL6A5의 발현이 완전히 상실되었다; 그러나, CD90, LUM 및 CD36의 발현은 유지되었다(도 5C-E). 이것은 배양 자체가 세포의 경쟁성 보다는 섬유아세포 마커의 상실로 이어진다는 것을 나타낸다.

[0213] CD39 및 COL6A5의 발현은 배양에서 빠르게 상실되었으나 lin-CD90+CD39+ 및 lin-CD90+CD36+ 집단은 배양에서 형태학적인 차이를 나타내었다. 일부 샘플에서 CD39+ 세포는 스핀들(spindle) 형상을 나타내는 반면에 CD36+ 세포는 보다 상피 형상을 나타내었다(도 5F).

[0214] 그러나 이러한 차이는 조직 샘플 간에 일관되지 않았으며 상이한 연령 및 신체 부위 피부로부터의 세포 분리를 잠재적으로 반영하였다(도 5F). qPCR으로 몇몇 ECM 성분(도 5I) 및 염증 매개체(도 5H)를 암호화하는 유전자의 발현이 CD36+ 세포에서 계속 더 높게 발현되는 것으로 나타났다. 그러나 유두 진피와 관련된 Wnt 경로 유전자의 발현 증가는 상실되었다(도 5G).

[0215] 염증 매개체의 차등 발현의 기능적 중요성을 조사하기 위해(도 5H) 본 발명자들은 인터페론 자극 분석을 수행하였다(도 5J-N). 본 발명자들은 CD39+ 세포에서 PDL-1 및 CD40의 상향 조절의 현저한 감소와 함께 lin-CD90+CD36+(피하)와 비교하여 lin-CD90+CD39+(상피)의 반응에서 명백한 차이를 관찰하였다. 이것은 상부 피부 섬유아세포에 대한 항-염증성 표현형과 일치한다.

[0216] 마우스 연구를 통해 표피 줄기세포 구획화의 조절 및 유지에 있어서 기저 각질세포와 상부 피부 섬유아세포 사이의 상호 Wnt 신호전달의 역할을 확인하였다. 유두 Wnt 유전자 특성은 배양에서 소실되었으나(도 5G), 유두 진피로부터 유래된 배양 섬유아세포는 3차원 오르가노타입 배양에서 망상 진피로부터의 섬유아세포보다 정상 층화 표피의 형성에 기여하는 것으로 이미 알려져 있었다.

[0217] 따라서 본 발명자들은 탈세포화된 인간의 진피 (DED)를 재집단화(repopulate)하고 설계상으로 정상적인 표피의 형성에 기여하는 배양된 섬유아세포 아집단의 특성을 평가하기 위해 기능적 에세이를 수행하였다. 유동화 분류된 lin-CD90+CD39+, lin-CD90+CD39- 및 lin-CD90+CD36+ 세포를 배지에서 확장시킨 후 DED의 상부 표면에 도입하였다. 이어서 프라이머리 인간 각질 세포를 진피의 표면에 첨가하고 기상-액상 계면에서 배양하였다.

[0218] 배양 3주 후, 섬유아세포 부재 상태에서 표피는 정상 표피보다 생존 가능한 세포층이 적었으며 건강한 조직의 특징인 표피능(rete ridges)으로 알려진 기복(undulation)이 없었다(도 6A, F). 분획화 되지 않은 섬유아세포(CD90+)의 첨가는 부분적 표피능을 지닌 더 두꺼운 표피의 형성을 유도하였다(도 6B, G).

[0219] 섬유아세포 아집단이 예상대로 분리될 때, lin-CD90+CD39+ 세포는 lin-CD90+CD39- 세포(도 6D, I) 및 lin-CD90+CD36+ 세포(도 6E, J) 보다 다층 상피의 형성에 보다 효과적으로 기여하였다(도 6C, H, K). 접종 후, lin-CD90+CD39+는 상부 진피로 대부분 한정되어 있는 반면에 lin-CD90+CD39- 및 lin-CD90+CD36+ 세포는 중간 및 깊은 진피로 확장되었으며(도 6L, M) 섬유아세포 밀도는 lin-CD90+CD39+ 세포로 재구성된 DED에서 가장 높았다(도 6L).

[0220] 요약하면 본 발명자들의 기능 분석은 배양과 관련된 유전자 발현의 변화와 관계 없이, 전향적으로 분리된 섬유아세포 아집단이 면역학적 기능의 차이와 3 차원 오르가노타입 세포 배양에서 설계적으로 정상적인 표피 형성 능력의 차이를 유지함을 나타낸다.

[0221] **인간 피부 섬유아세포의 단일 세포 전사 프로파일링은 공간 격리되지 않은 아집단을 식별한다**

[0222] 인간 진피의 다른 층에서 섬유아세포에 대한 본 발명자들의 분석은 섬유아세포가 이종(heterogeneous)이라는 개념을 지지하지만, 유두와 망상 진피 사이에서 공간적으로 격리된 섬유아세포 아집단 만을 검출할 수 있다. 따라서 섬유아세포 아집단의 보다 포괄적인 평가를 수행하기 위해서 본 발명자들은 표피의 효소적 제거 후 인간 진피로부터 계통 lin- 및 lin-CD90+ 세포 모두를 분리하였다(도 7A).

[0223] 프라이머리 인간 진피의 5개의 샘플에 대해 세포의 12.2 %(S.D. 6.7 %)는 CD90+이고, 9.4 %(S.D. 4.7 %)는 lin-CD90+이고, 39.6 %(S.D. 16.4 %)는 lin-CD90-이었다. 따라서 섬유아세포는 소량의 피부 세포를 구성하며, 대부분은 CD31+ 내피 세포(8.1 %, S.D. 5.2 %), CD45+(11.6 %, S.D. 7.4 %) 조혈 세포, 땀샘, 신경 세포, 모낭으로부터의 각질 세포 등의 다양한 세포 유형이다.

[0224] 추가적 섬유아세포 아집단을 한정하기 위해 본 발명자들은 총 184개의 세포에 대해 단일 세포 RNA 서열 분석을 수행하였다. 섬유아세포를 풍부하게 하기 위해 세포의 절반을 유동화 분류된 lin-CD90+ 세포로 하였다. 그러나, CD90-인 잠재적으로 신규한 섬유아세포 서브 세트를 배제하지 않기 위해 세포의 절반은 lin-CD90+/-이었다.

[0225] 각각의 개별 세포에 대한 tSNE 분석(도 7B-D)을 유전자 발현의 전체 패턴에 대해 수행하였다; 이 방법은 유사한 유전자 발현으로 세포를 그룹화 시킨다. tSNE 분석의 자동화된 클러스터링(도 7D)은 5개의 세포 그룹을 식별 하였으나 그룹 1(적색)은 5 개의 세포만 포함하였다.

[0226] 섬유아세포 아집단을 특성화하기 위해 각 그룹에서 유의미하게 과발현된 유전자를 전산을 통해 확인하였다. 중간엽 세포 마커인 비멘틴은 모든 그룹에서 발현되어 표피 세포가 프로파일링 되지 않았음을 확인 하였다(도 7E, F). 공간 전사체학에 의해 본 발명자들이 확인한(도 3) 팬-섬유아세포 마커인 데코린(DCN) 및 루미칸(LUM)은 그룹 5를 제외하고 모든 그룹에서 발현되었다.

[0227] 그룹 5 또한 lin-CD90+ 세포를 함유하지 않았다. 공간 전사체학 프로파일링에 의해 유두 진피에 국한된 것으로 확인된(도 3B) COL6A5, COL23A1 및 HSPB3는 그룹 3에서 매우 풍부 해졌으며 이는 이러한 그룹이 유두 섬유아세포를 나타낸다는 것을 의미한다.

[0228] MHC 클래스 Ⅱ의 구성요소인 CD74 및 HLA-DR4 모두와 타이트한 정션의 구성 요소인 CLDN5는 그룹 5로 표시되었다. 비록 이들 세포는 비멘틴+ 및 lin-이었으나 DCN 및 LUM 결여 및 CD74(대식세포 억제 인자 수용체) 와 HLA-DR의 발현은 대식세포/수지상 세포의 특성을 나타낸다.

[0229] 그러나 그룹 5 세포의 또 다른 마커인 CLDN5는 내피 마커이다. 흥미롭게도, 작은 정도의 CD36과 Pparg(PPARG)의 발현은 지방전구세포 마커가 또한 그룹 5에서 풍부해지고 이는 지방전구세포의 적어도 일부가 CD90-임을 시사한다. 또한 그룹 5 세포의 아집단은 TEK(TIE2)를 발현하고 TIE2-발현 단핵구/대식세포에 상응할 수 있다.

[0230] 그룹 2는 가장 큰 세포 클러스터 중 하나이지만 특정 마커는 거의 없었다. 그 중 하나인 RGS5는 주피세포의 마커로서 진피 전체에 RGS5 표지 혈관-관련 주피세포에 대한 항체로서 잘 특성화되어 있다(도 7J). RGS5 양성 세포는 그룹 2의 중간 이상 상부로 제한되었으며, 그룹 2의 중간 이하 하부에 있는 세포는 선택적으로 세포 정체성을 나타낸다는 것을 시사한다. 유두 세포가 CD39+CD26-임을 기초로 하여 유두 세포를 유동화 분류함으로써(도 7G, H) 본 발명자들은 유두 마커 COL6A5, WNT5A, RSPO1 및 LEF1의 발현을 풍부하게 할 수 있었다(도 7K-O).

[0231] 본 발명자들은 섬유아세포 아이덴티티가 유두 섬유아세포의 경우를 제외하고는 진피 내 공간 구획에 의해 제한되지 않는다는 결론을 내렸으며 단일 세포 RNA 서열분석에 의해 추가적인 섬유아세포 아집단을 확인할 수 있다.

[0232] **논 의**

[0233] 본 발명의 결과는 섬유아세포가 세포 외 매트릭스의 합성과 유지 및 인접 세포의 조화와 조절에 특화된 기능을 지닌 단일 동종(homogenous) 세포형이라기 보다 관련 세포형의 패밀리를 나타낸다는 새로운 개념을 수립한다.

[0234] 공간 및 단일-세포 전사 프로파일링의 조합을 통해, 본 발명자들은 인간 진피 내에서 적어도 4개의 섬유아세포 아집단을 확인하였다. 이들 중 첫 번째는 lin- CD90+ CD39+ CD26-의 세포 표면 표현형을 지니며 COL6A5와 같은 특정 콜라겐 사슬의 발현을 특징으로 하여 상부 진피에 국한되어 있다.

[0235] 두 번째는 lin-CD90+ CD39+ CD26+이며 나머지 진피 전체에 위치한다. 나머지 그룹은 주피세포에 상응하는 lin-CD90+CD39-RGS5+ 세포; 하부 진피에 위치하고 지방전구세포를 나타내는 lin-CD36+ 세포; 및 아직 특성화되지 않은 섬유아세포 아 집단인 lin-CD90+CD39-RGS5- 세포; 이다.

[0236] 마우스 진피의 이전 연구와 달리, 진피 유두 관련 섬유아세포는 본 발명자들의 데이터 세트에서 우세하지 않았으며 이는 마우스 피부와 비교하여 사람의 유방 피부에서 모낭의 상당히 낮은 밀도를 반영하는 것이다. 마우스 진피 발달에 대한 이전 연구에서 확인된 많은 세포 표면 마커는 인간에서는 보존되지 않았다. 이러한 보존의 결여는 인간과 마우스 사이의 조혈 줄기세포에 대한 세포 표면 마커의 보존이 어렵기 때문에 충분히 예측된 것이다.

[0237] 그러나 흥미롭게도 피부 섬유아세포 동일성에 대한 3가지 연구 모두에서 CD26이 주요 계통 마커로서 확인되었지만, 표시된 아집단은 상이한 것으로 나타난다: 마우스 발달의 초기 단계 동안에 CD26은 상부 피부 계통을 표시하고; 성인 마우스에서 CD26 발현은 진피의 큰 구획에 존재한다.

[0238] 여기 본 발명자들은 인간 성인 진피의 큰 구획에 존재하는 반면 최상부 (유두) 섬유아세포로부터 배제된 CD26의 발현을 시연하였다. CD26은 염증 반응의 조절제로서 관련되어 있으며 CD26+ 섬유아세포는 피부 섬유증에 기여하는 것으로 보고되어 있다.

[0239] 섬유아세포 세포 식별의 상세는 세포-세포 컨택 및 확산성 세포 신호전달 매개체를 포함하는 세포의 공간 컨텍스트로부터 발산하는 외인성 시그널 및 전사성 및 후생적(epigenetic) 조절 네트워크를 포함하는 내인성 메커니즘의 조합을 반영하는 것으로 보인다. 전자와 관련하여 본 발명의 결과는 피부 섬유아세포 아집단 아이덴티티 조절에서 Wnt 경로를 통한 신호전달이 주요한 역할을 한다는 것이다.

[0240] 본 발명자들은 상부 피부 마우스와 인간 섬유아세포 계통에서 Wnt 신호가 상향 조절됨을 발견하였다. Wnt 신호전달은 마우스 및 인간 진피의 정상적 발달에 필요하며 본 발명은 모낭 발달 및 재생에 있어서 Wnt 신호전달의 중심적인 역할을 증명하였다. 표피 Wnt 신호전달은 피하 지방세포층의 조절에 또한 관련되며 표피의 유지에 결정적이다.

[0241] 본 발명자들은 유두 진피 섬유아세포와 기저 각질세포 간에 유두 진피 섬유아세포의 세포 아이덴티티 유지에 결정적인 상호 시너지적인 Wnt-매개 크로스토크가 존재함을 제안한다. 배양에서 이러한 신호전달의 소실로 유두 세포 마커의 급속한 소실을 설명할 수 있다.

[0242] Wnt 경로 구성요소의 차등 발현에 추가하여 본 발명자들은 마우스 및 진피로부터 분리된 인간 섬유아세포의 아집단 내에서 ECM 및 면역조절 유전자의 차등 발현을 관찰하였다. 본 발명자들은 상부 및 하부 피부 섬유아세포의 시험관 내 확장에 따르는 세포 기능의 보존을 관찰하였으며, 콜라겐 연쇄 발현의 차이, 인터페론 자극에 대한 면역학적 반응 및 3D-재구성된 오르가노타입 세포 배양 내에서 층화 편평 상피의 정상적인 발달에 기여하는 능력의 차이를 입증하기 위한 것이다.

[0243] 흥미롭게도 섬유아세포 기능의 차이가 배양에서 보존되는 반면에 적어도 초기 계대에 대해서는 주요 아집단 마커의 발현이 급격히 소실되었다.

[0244] 이러한 발견은 섬유아세포가 피부에 존재하는 세포의 작은 구획을 구성함을 관찰함으로써 배양된 섬유아세포로 수행된 실험에 기반하여 질병 과정의 이해를 위한 연구에 기여하는 것이다. 또한 배양 또는 이식 실험 내에서 나타난 표피 줄기세포의 특성은 생체 내에서 표현되는 것과는 상이하다는 이전의 연구들과 유사성을 지닌 것이다.

[0245] 진피와 같은 포유동물 조직이 기능적 아이덴티티의 상이함을 지닌 섬유아세포를 함유한다는 새로운 개념은 광범위한 병리학적 상태의 이해에 중대한 영향을 미친다.

[0246] 성인의 상처 치유는 모발 및 땀샘과 같은 정상적인 피부 부속체(appendage)를 지니지 않는 ECM-풍부 흉터의 형성으로 특징지어 진다.

[0247] 마우스에서의 계통 추적은 섬유아세포 이동의 초기 파동이 알파 평활근 액틴을 발현하는 하부 (망상) 계통 섬유아세포로부터 유래됨을 입증한다. 정상적인 상처 치유의 조절 및 켈로이드 흉터, 경피증 및 이식편 대 숙주 질환과 같은 질병 상태의 이해에 대한 잠재적 전략을 제공함으로써 이것이 인간에게 보존되는지 여부를 결정하는 것은 큰 관심사가 될 것이다.

[0248] 섬유아세포 아집단의 양 또는 기능의 전환은 정상 표피능(rete ridge)의 소실로 인한 진피-표피 접합부의 진피

화 및 평탄화를 포함하는 피부 구조에서의 연령-관련 변화의 특징적 역할을 할 수 있다.

[0249] 인간 질병에 대한 섬유아세포 아집단의 차등적 기여에 대한 이해는 치료를 위한 새로운 전략을 제공할 수 있다. 이러한 맥락에서 유해한 섬유아세포 아집단의 작용이 아마도 이들 아집단에 특이적인 신호전달 경로 또는 단일 클론 항체-매개 절제의 저해를 통해 억제될 수 있음을 예상할 수 있다. 이러한 개념을 지지하여, 마우스에서 상처 치유시 섬유아세포의 수를 실험적으로 감소 시키면 섬유증의 정도를 감소시킬 수 있다.

[0250] 대안적으로 유익한 아집단은 아마도 세포 신호전달 경로의 조작을 통해 생체 외에서 확장될 수 있다. 섬유아세포 치료법의 시험은 치유가 어려운 궤양 및 수포성 표피박리증의 치료를 위해 이미 진행중이다. 주목할만한 것은 유두 섬유아세포가 조직-엔지니어링된 피부 대체물의 조합에 보다 효과적인 것으로 예측된다는 것이다.

[0251] 요약하면 마우스 진피의 이전 연구와 상응하여, 섬유아세포 아집단이 인간 진피 내에서 식별될 수 있음을 본 발명자들은 공간 및 단일 세포 전사 프로파일링의 조합을 통해 규명하였다. 본 발명자들은 이러한 아집단의 잠재적 분리를 허용하는 세포 표면 마커를 식별하고 기능적 구체화를 입증하였다. 이러한 발견은 섬유아세포 기능장애에 의해 특징되어지는 질병의 이해 및 치료에 중요한 영향을 미친다.

[0252] **(실시예 2)**

[0253] **(방법)**

[0254] **섬유아세포 분리**

[0255] 프라이머리 섬유아세포를 상기한 바와 같이 분리시켰다. 계통 음성(CD45-, CD31-, e-카드헤린-) 세포의 고갈 후 유세포 분석법에 의해 세포의 상이한 아집단을 분리하였다. 이어서 섬유아세포를 CD90+ 양성으로 분류한 후 이들 각각의 세포 표면 마커를 사용하였다.

[0256] **상처 치유 생체외 외식편**

[0257] 성형 수술에 동의한 환자의 성인 수술 잔여 피부를 St George's University Hospitals NHS Foundation Trust에서 수득하였으며 이 연구는 영국 국립 연구 윤리 서비스 위원회에 의해 윤리적으로 승인되었다(HTA 라이센스 번호: 12121, REC 번호: 14/NS/1073). 과도한 지방 조직을 제거하고 10% 요오드 소독제 용액에 침지시켜 피부를 살균한 후, 70% 알코올로 2회 교체시키고 마지막으로 멸균 인산염 완충 식염수(PBS, Gibco)로 처리하였다.

[0258] 피부를 $1cm^2$ 조각으로 절단하고 4mm 펀치 생검을 사용하여 각각의 중앙에 부분 두께 상처를 생성하였다. 섬유아세포를 상처에 접종시키기 전에 조직을 6-웰 행잉(hanging) 세포 배양 삽입물에 넣고 기상-액상 인터페이스를 지니는 DMEM으로 평형화 시켰다.

[0259] 다른 공여자로부터의 프라이머리 섬유아세포 아집단(200,000 세포)을 10㎕의 DMEM에 재현탁시키고 상처에 피펫팅 하였다. 외식편을 2주 동안 5% CO_2와 함께 가습된 분위기에서 37 ℃에서 인큐베이션시킨 다음 절편 전에 최적의 컷팅 온도 화합물(OCT, Life Technologies)에 엠베드시켰다.

[0260] **탈-표피화 진피(DED) 오르가노타입 배양**

[0261] 탈-표피화 진피(DED)를 상기한 바와 같이 제조하였다(Rikimaru 등, Experimental dermatology 6, 214-221 (1997)). 간단히 말해서 정상적인 인간 성인의 피부 또는 절제된 켈로이드 흉터를 1-2 cm^2로 자르고, 52 ℃에서 20분 동안 가온시킨 후 표피를 집게로 진피로부터 분리하였다. 진피는 10회의 동결-해동 사이클에 의해 세포가 고갈되었으며 60Gy로 1회 조사되었다.

[0262] 섬유아세포를 DED에 접종시키기 전에 조직을 6-웰 행잉 세포 배양 삽입물(Millipore)에 넣고 DMEM으로 평형화 시켰다. 표피 표면으로부터 U-100 인슐린 주사기(BD)를 사용하여 상이한 프라이머리 섬유아세포 아집단(5×10^5 세포)을 각각의 DED에 주입하였다.

[0263] 이어서 DED를 5 % CO_2를 지니는 가습된 분위기 하에서 37 ℃에서 DMEM에 완전히 침지시키고 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 배지를 기상-액상 인터페이스를 지닌 FAD 배지로 교체하고 1×10^6 각질 세포를 DED 위에 접종하였다. DED는 48 시간마다 배지 교체와 함께 3주 동안 기상-액상 인터페이스를 지닌 FAD 배지와 함께 배양에서 유지되었다. 섹션화 전에 샘플을 OCT에 삽입하였다.

[0264] **콜라겐 분석**

[0265] 콜라겐 정량화를 위해, 16 μm의 동결 절편을 표준 방법을 사용하여 Picrosirius 레드로 염색하였다(Lattouf 등, J Histochem Cytochem. 2014; 62 (10): 751-8). 간략하게는 섹션을 4% 파라포름알데히드/PBS로 (상온에서 10분) 고정시키고 물로 2회 세척한 후 Picrosirius 레드 용액[피크산 포화 수용액 내의 0.1 % Sirius 레드 F3B(Sigma)] 내에서 1시간 동안 염색시켰다.

[0266] 염색 후, 섹션을 산성 수(0.5% 아세트산)로 2회 세척하고, 탈수시킨 후 자일렌으로 클리어링하고 DPX 장착 배지(Sigma)로 충전하였다. 이미지는 평면 편광 하에서 Zeiss Axiophot 현미경 및 AxioCam HRc 카메라로 촬영하여 콜라겐 섬유를 검은 배경에 대해 녹색, 주황색 및 노란색으로 표시하였다. 정량화를 위한 선형 반응을 제공하도록 광의 강도를 조정하였다.

[0267] 총 콜라겐 섬유의 정량화는 Fiji 이미징 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 색상 임계 값 도구(색조 0-100, 채도 0-255 및 조도 230-255)를 사용하여 콜라겐 픽셀을 선택하고 선택에 따라 바이너리 이미지를 만들고 측정하였다.

[0268] 콜라겐 혼성화 펩타이드(CHP) 염색(Hwang 등, 2017; Li & Yu, 2013)의 경우, 16mm 크라이오섹션은 4% 파라포름알데히드/PBS로 고정시키고(실온에서 10 분) 0.1% Triton X-100/PBS에 통과시키고(실온에서 10 분), 5% BSA/PBS로 블로킹 시킨 후(실온에서 1 시간) 지시된 프라이머리 항체 및 5mM B-CHP(BIO300, 3Helix)로 4 ℃에서 하룻밤 염색하였다. 제조자의 지침에 따라 B-CHP 프로브를 80℃에서 5분 동안 가온시킨 후 프라이머리 항체 믹스에 추가하여 조직 섹션에 즉시 적용하였다.

[0269] 섹션을 PBS로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 적절한 세컨더리 항체 및 스트렙트아비딘-AlexaFluor647(S32357, Thermo Fisher)과 함께 인큐베이션 시켰다. PBS로 섹션을 세척하고 실온에서 10분 동안 DAPI(1 μg/ml 1:50,000으로 희석)로 인큐베이션 시킨 후, 샘플을 ProLong® Gold Antifade Mountant(Thermo Fisher)로 충전하였다. 공초점 현미경은 Nikon A1 공초점 현미경으로 20x 배율을 사용하여 수행되었다.

[0270] **결과**

[0271] **상이한 섬유아세포 아집단이 접종된 상처 피부, 생체 외 14일간 배양**

[0272] 섬유아세포 아집단은 생체 외 상처 치유에 상이한 영향을 미친다(도 9 내지 12 참조). 유두 CD39+ CD26- 및 망상 CD39- 세포 만이 재-상피화에 기여할 수 있었다. 그러나 CD39- 세포는 다른 아집단보다 훨씬 더 많은 콜라겐을 분비하였다. 이것은 섬유증에 걸리기 쉬운 사람들에게 임상적으로 영향을 줄 수 있다. 따라서 상처에 CD39+ CD26- 세포를 주입하면 흉터 조직 형성의 위험 없이 보다 빠른 치유를 촉진할 수 있다.

[0273] **탈 섬유화된 진피에서의 콜라겐 침착의 차이는 상이한 섬유아세포 아집단으로 재구성됨**

[0274] 총 콜라겐 밀도를 계산하기 위해 편광된 빛 하에서 콜라겐 다발이 녹색, 적색 또는 황색으로 나타나는 Picrosirius Red로 섹션을 염색시켰다(도 13 참조). 이러한 이미지를 정량화하기 위해 바이너리 이미지에서 총 콜라겐 신호를 검은색 픽셀로 변환하고 프레임의 총 픽셀 수를 측정하였다. CD39+ CD26- 유두 섬유아세포로 재집단화된 DED는 다른 섬유아세포 아집단에 비해 더 증가된 총 콜라겐 밀도를 나타내었다(도 14 참조).

[0275] **상이한 섬유아 세포 아집단으로 재구성된 탈세포화 진피에서 콜라겐 섬유 구조의 차이**

[0276] 성숙화 및 리모델링화 콜라겐 섬유 내에서 접근 가능한 콜라겐 삼중 나선 내로 콜라겐 혼성화 펩타이드(CHP)를 끼워 넣는다. 언폴드 콜라겐 분자에 대한 매우 특이적인 프로브이므로 두꺼운 3중 나선 성숙 콜라겐에 결합하지 않는다. CD39+ CD26- 유두 섬유아세포는 다른 섬유아세포 아집단과 비교하여 DED에서 보다 새로운 콜라겐 섬유를 생산 및/또는 기존 콜라겐을 리모델링하는 것으로 나타난다(도 15 참조).

[0277] **탈세포화된 진피에서의 표피 WNT 신호전달은 상이한 섬유아세포 아집단을 재구성시킴**

[0278] CD39+ CD26- 유두 섬유아세포는 표피에서 더 높은 수준의 R-스폰딘1을 자극한다(도 16 참조).

[0279] **섬유아세포 아집단에 의한 켈로이드 흉터 리모델링**

[0280] 켈로이드 조직을 탈세포화시키고 상이한 섬유아세포 아집단을 주입하여 시험관 내에서 3주 동안 배양하였다. 유두 섬유아세포(CD39+ CD26-)(c)는 다른 분리된 집단보다 흉터 조직 두께를 더 축소시켰다(도 17, b, d, e 및 f 참조). 비분획화(b) 및 CD36+ 망상/지방전구(f) 섬유아세포는 섬유아세포가 첨가되지 않은 대조군 조직과 비교할 때 흉터 리모델링에 영향을 미치지 않았다(도 18 참조).

[0281] **논 의**

[0282] 결과는 상처 치유, 콜라겐 침착 및 흉터 형성에서 개별 섬유아세포 아집단의 차등 효과를 나타낸다. 상처 치유 모델에서 유두(CD39+ CD26-) 섬유아세포는 콜라겐 생성을 증가시키지 않으나 재상피화를 향상시켰다. 유두(CD39+ CD26-) 섬유아세포는 또한 켈로이드 조직 리모델링 동안 다른 집단보다 흉터 조직 두께를 더욱 축소시켰다.

[0283] 이것은 흉터의 위험을 줄이면서 상처 치유를 촉진하기 위해 이러한 아집단의 사용을 제안하는 것이다. 대조적으로 탈세포화된 진피 유두(CD39+ CD26-) 섬유아세포는 다른 섬유아세포 아집단에 비해 콜라겐 생성이 증가하여 손상된 콜라겐, 예를 들어 자외선 노출에 의한 콜라겐 손상을 복구하는데 사용된다.

[0284] **참고문헌**

[0285] 1 Kretzschmar, K. & Watt, F. M. Lineage tracing. *Cell* **148**, 33-45, doi:10.1016/j.cell.2012.01.002 (2012).

[0286] 2 Driskell, R. R. & Watt, F. M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology* **25**, 92-99, doi:10.1016/j.tcb.2014.10.001 (2015).

[0287] 3 Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* **6**, 392-401, doi:10.1038/nrc1877 (2006).

[0288] 4 Parsonage, G. *et al.* A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in immunology* **26**, 150-156, doi:10.1016/j.it.2004.11.014 (2005).

[0289] 5 Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 349-363, doi:10.1038/nrm809 (2002).

[0290] 6 Watt, F. M. & Fujiwara, H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a005124 (2011).

[0291] 7 Harper, R. A. & Grove, G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science* **204**, 526-527 (1979).

[0292] 8 Festa, E. *et al.* Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* **146**, 761-771, doi:10.1016/j.cell.2011.07.019 (2011).

[0293] 9 Driskell, R. R., Jahoda, C. A., Chuong, C. M., Watt, F. M. & Horsley, V. Defining dermal adipose tissue. *Experimental dermatology* **23**, 629-631, doi:10.1111/exd.12450 (2014).

[0294] 10 Lee, J. & Tumbar, T. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Seminars in cell & developmental biology* **23**, 906-916, doi:10.1016/j.semcdb.2012.08.003 (2012).

[0295] 11 Sennett, R. & Rendl, M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Seminars in cell & developmental biology* **23**, 917-927, doi:10.1016/j.semcdb.2012.08.011 (2012).

[0296] 12 Paquet-Fifield, S. *et al.* A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2795-2806, doi:10.1172/JCI38535 (2009).

[0297] 13 Driskell, R. R. *et al.* Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* **504**, 277-281, doi:10.1038/nature12783 (2013).

[0298] 14 Rinkevich, Y. *et al.* Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science* **348**, aaa2151, doi:10.1126/science.aaa2151 (2015).

[0299] 15 Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *Journal of cellular physiology* **200**, 134-145, doi:10.1002/jcp.10474 (2004).

[0300] 16 Janson, D. G., Saintigny, G., van Adrichem, A., Mahe, C. & El Ghalbzouri, A. Different gene

expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol* **132**, 2565-2572, doi:10.1038/jid.2012.192 (2012).

[0301] 17 Lee, D. Y. & Cho, K. H. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Archives for dermatological research = Archiv fur dermatologische Forschung* **296**, 296-302, doi:10.1007/s00403-004-0529-5 (2005).

[0302] 18 Rognoni, E. *et al.* Inhibition of beta-catenin signalling in dermal fibroblasts enhances hair follicle regeneration during wound healing. *Development* **143**, 2522-2535, doi:10.1242/dev.131797 (2016).

[0303] 19 Natarajan, A., Lemos, D. R. & Rossi, F. M. Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration. *Cell cycle* **9**, 2045-2046, doi:10.4161/cc.9.11.11854 (2010).

[0304] 20 Mastrogiannaki, M. *et al.* beta-Catenin Stabilization in Skin Fibroblasts Causes Fibrotic Lesions by Preventing Adipocyte Differentiation of the Reticular Dermis. *J Invest Dermatol* **136**, 1130-1142, doi:10.1016/j.jid.2016.01.036 (2016).

[0305] 21 Rivera-Gonzalez, G. C. *et al.* Skin Adipocyte Stem Cell Self-Renewal Is Regulated by a PDGFA/AKT-Signaling Axis. *Cell stem cell* **19**, 738-751, doi:10.1016/j.stem.2016.09.002 (2016).

[0306] 22 Kuniyasu, A. *et al.* CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS letters* **537**, 85-90 (2003).

[0307] 23 Saalbach, A., Kraft, R., Herrmann, K., Haustein, U. F. & Anderegg, U. The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1. *Archives for dermatological research = Archiv fur dermatologische Forschung* **290**, 360-366 (1998).

[0308] 24 Fitzgerald, J., Holden, P. & Hansen, U. The expanded collagen VI family: new chains and new questions. *Connective tissue research* **54**, 345-350, doi:10.3109/03008207.2013.822865 (2013).

[0309] 25 Gara, S. K. *et al.* Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *The Journal of biological chemistry* **283**, 10658-10670, doi:10.1074/jbc.M709540200 (2008).

[0310] 26 Fitzgerald, J., Rich, C., Zhou, F. H. & Hansen, U. Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *The Journal of biological chemistry* **283**, 20170-20180, doi:10.1074/jbc.M710139200 (2008).

[0311] 27 Sabatelli, P. *et al.* Expression of the collagen VI alpha5 and alpha6 chains in normal human skin and in skin of patients with collagen VI-related myopathies. *J Invest Dermatol* **131**, 99-107, doi:10.1038/jid.2010.284 (2011).

[0312] 28 Martinelli-Boneschi, F. *et al.* COL6A5 variants in familial neuropathic chronic itch. *Brain : a journal of neurology*, doi:10.1093/brain/aww343 (2017).

[0313] 29 Collins, C. A., Kretzschmar, K. & Watt, F. M. Reprogramming adult dermis to a neonatal state through epidermal activation of beta-catenin. *Development* **138**, 5189-5199, doi:10.1242/dev.064592 (2011).

[0314] 30 Lichtenberger, B. M., Mastrogiannaki, M. & Watt, F. M. Epidermal beta-catenin activation remodels the dermis via paracrine signalling to distinct fibroblast lineages. *Nature communications* **7**, 10537, doi:10.1038/ncomms10537 (2016).

[0315] 31 Kretzschmar, K., Weber, C., Driskell, R. R., Calonje, E. & Watt, F. M. Compartmentalized Epidermal Activation of beta-Catenin Differentially Affects Lineage Reprogramming and Underlies Tumor Heterogeneity. *Cell reports* **14**, 269-281, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.041 (2016).

[0316] 32 Karakikes, I. *et al.* Interaction of HLA-DR and CD74 at the cell surface of antigen-presenting cells by single particle image analysis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 4886-4896, doi:10.1096/fj.12-211466 (2012).

[0317] 33 Findley, M. K. & Koval, M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB life* **61**, 431-437, doi:10.1002/iub.175 (2009).

[0318] 34 Brocks, T. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor protects from nonmelanoma epidermal tumors by regulating the number of antigen-presenting cells in skin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **31**, 526-543, doi:10.1096/fj.201600860R (2017).

[0319] 35 Kluger, M. S., Clark, P. R., Tellides, G., Gerke, V. & Pober, J. S. Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **33**, 489-500, doi:10.1161/ATVBAHA.112.300893 (2013).

[0320] 36 Patel, A. S. *et al.* TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. *EMBO molecular medicine* **5**, 858-869, doi:10.1002/emmm.201302752 (2013).

[0321] 37 Bondjers, C. *et al.* Transcription profiling of platelet-derived growth factor-B-deficient mouse embryos identifies RGS5 as a novel marker for pericytes and vascular smooth muscle cells. *The American journal of pathology* **162**, 721-729, doi:10.1016/S0002-9440(10)63868-0 (2003).

[0322] 38 Rendl, M., Lewis, L. & Fuchs, E. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. *PLoS biology* **3**, e331, doi:10.1371/journal.pbio.0030331 (2005).

[0323] 39 Driskell, R. R., Giangreco, A., Jensen, K. B., Mulder, K. W. & Watt, F. M. Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development* **136**, 2815-2823, doi:10.1242/dev.038620 (2009).

[0324] 40 Driskell, R. R. *et al.* Clonal growth of dermal papilla cells in hydrogels reveals intrinsic differences between Sox2-positive and -negative cells in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* **132**, 1084-1093, doi:10.1038/jid.2011.428 (2012).

[0325] 41 Enshell-Seijffers, D., Lindon, C. & Morgan, B. A. The serine protease Corin is a novel modifier of the Agouti pathway. *Development* **135**, 217-225, doi:10.1242/dev.011031 (2008).

[0326] 42 Ng, Y. Y., Baert, M. R., de Haas, E. F., Pike-Overzet, K. & Staal, F. J. Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells. *Methods in molecular biology* **506**, 13-21, doi:10.1007/978-1-59745-409-4_2 (2009).

[0327] 43 Boonacker, E. & Van Noorden, C. J. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *European journal of cell biology* **82**, 53-73, doi:10.1078/0171-9335-00302 (2003).

[0328] 44 Hu, M. S. & Longaker, M. T. Dipeptidyl Peptidase-4, Wound Healing, Scarring, and Fibrosis. *Plastic and reconstructive surgery* **138**, 1026-1031, doi:10.1097/PRS.0000000000002634 (2016).

[0329] 45 Ohtola, J. *et al.* beta-Catenin has sequential roles in the survival and specification of ventral dermis. *Development* **135**, 2321-2329, doi:10.1242/dev.021170 (2008).

[0330] 46 Grzeschik, K. H. *et al.* Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* **39**, 833-835, doi:10.1038/ng2052 (2007).

[0331] 47 Kishimoto, J., Burgeson, R. E. & Morgan, B. A. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes & development* **14**, 1181-1185 (2000).

[0332] 48 Myung, P. S., Takeo, M., Ito, M. & Atit, R. P. Epithelial Wnt ligand secretion is required for adult hair follicle growth and regeneration. *J Invest Dermatol* **133**, 31-41, doi:10.1038/jid.2012.230 (2013).

[0333] 49 Silva-Vargas, V. *et al.* Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Developmental cell* **9**, 121-131, doi:10.1016/j.devcel.2005.04.013 (2005).

[0334] 50 Donati, G. *et al.* Epidermal Wnt/beta-catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E1501-1509, doi:10.1073/pnas.1312880111 (2014).

[0335] 51 Watt, F. M., Lo Celso, C. & Silva-Vargas, V. Epidermal stem cells: an update. *Current opinion in genetics & development* **16**, 518-524, doi:10.1016/j.gde.2006.08.006 (2006).

[0336] 52 Watt, F. M. & Jensen, K. B. Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO molecular medicine* **1**, 260-267, doi:10.1002/emmm.200900033 (2009).

[0337] 53 Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321, doi:10.1038/nature07039 (2008).

[0338] 54 Jumper, N., Paus, R. & Bayat, A. Functional histopathology of keloid disease. *Histology and histopathology* **30**, 1033-1057, doi:10.14670/HH-11-624 (2015).

[0339] 55 Lee, J. Y., Yang, C. C., Chao, S. C. & Wong, T. W. Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar. *The American Journal of dermatopathology* **26**, 379-384 (2004).

[0340] 56 Gilchrest, B. A. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol* **135**, 867-875 (1996).

[0341] 57 El-Domyati, M. *et al.* Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental dermatology* **11**, 398-405 (2002).

[0342] 58 Dulauroy, S., Di Carlo, S. E., Langa, F., Eberl, G. & Peduto, L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nature medicine* **18**, 1262-1270, doi:10.1038/nm.2848 (2012).

[0343] 59 Kirsner, R. S. *et al.* Spray-applied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: a phase 2, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **380**, 977-985, doi:10.1016/S0140-6736(12)60644-8 (2012).

[0344] 60 Wong, T. *et al.* Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **128**, 2179-2189, doi:10.1038/jid.2008.78 (2008).

[0345] 61 Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Human dermal fibroblast subpopulations; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **16**, 300-309, doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00369.x (2008).

[0346] 62 Jensen, K. B., Driskell, R. R. & Watt, F. M. Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis. *Nature protocols* **5**, 898-911, doi:10.1038/nprot.2010.39 (2010).

[0347] 63 Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-343 (1975).

[0348] 64 Jones, P. H. & Watt, F. M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73**, 713-724 (1993).

[0349] 65 Rikimaru, K., Moles, J. P. & Watt, F. M. Correlation between hyperproliferation and suprabasal integrin expression in human epidermis reconstituted in culture. *Experimental dermatology* **6**, 214-221 (1997).

[0350] 66 Picelli, S. *et al.* Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nature protocols* **9**, 171-181, doi:10.1038/nprot.2014.006 (2014).

[0351] 67 Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions,

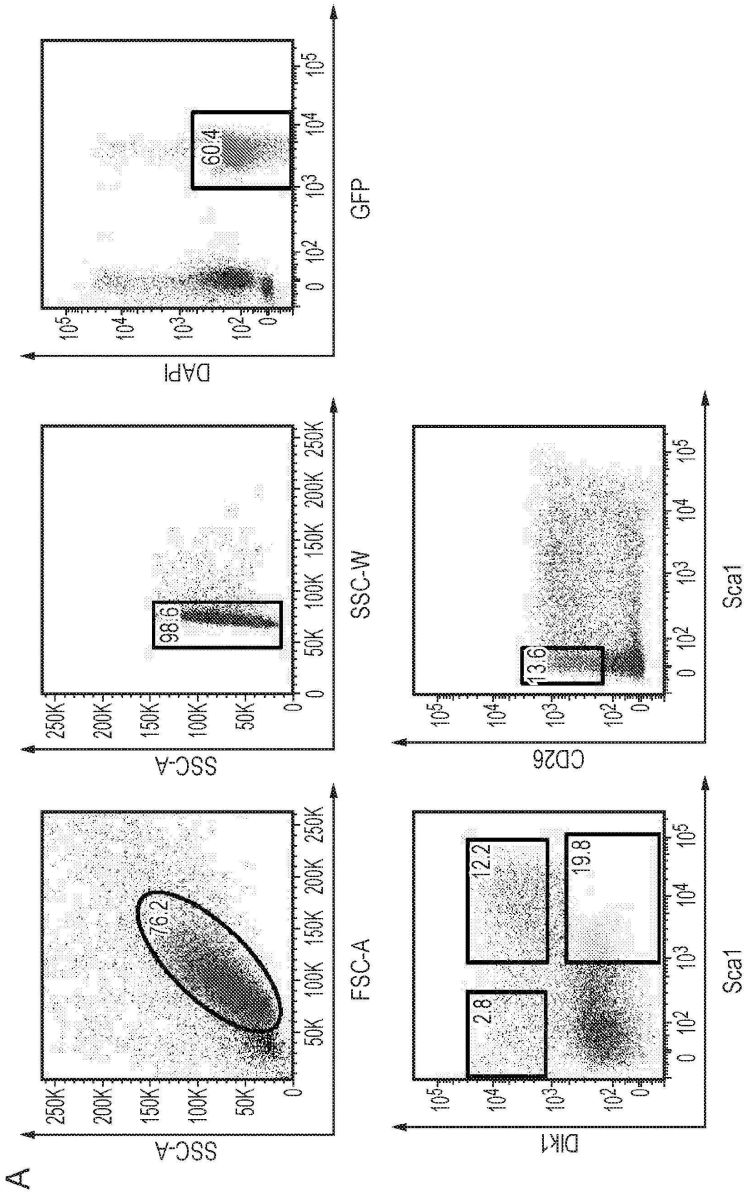
deletions and gene fusions. *Genome biology* **14**, R36, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36 (2013).

[0352] 68 Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923-930, doi:10.1093/bioinformatics/btt656 (2014).

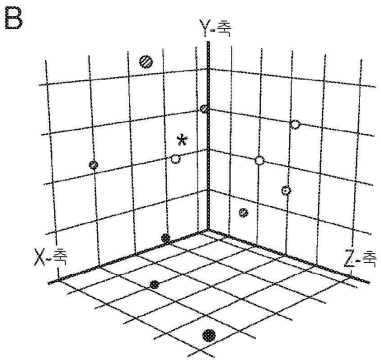
[0353] 상기 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다. 본 발명의 범주 및 사상을 벗어나지 않으면서 본 발명의 설명된 방법 및 시스템의 다양한 수정 및 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명은 특정 바람직한 실시예와 관련하여 설명되었으나 청구된 본 발명은 이러한 특정 실시예에 의해 과도하게 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 당업자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위한 설명된 모드의 다양한 변형이 하기 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

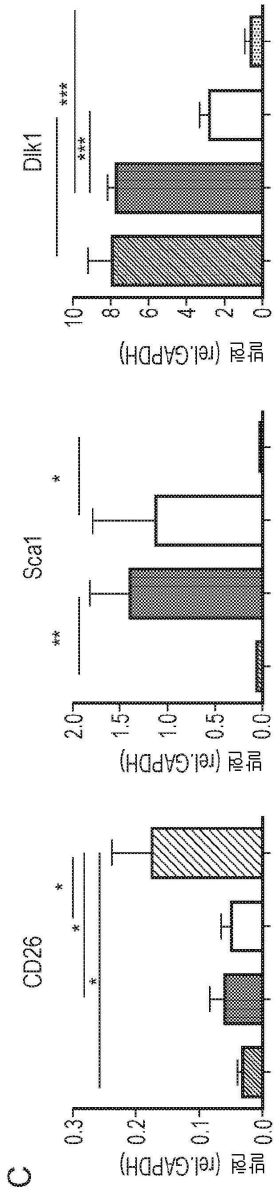
도면1a



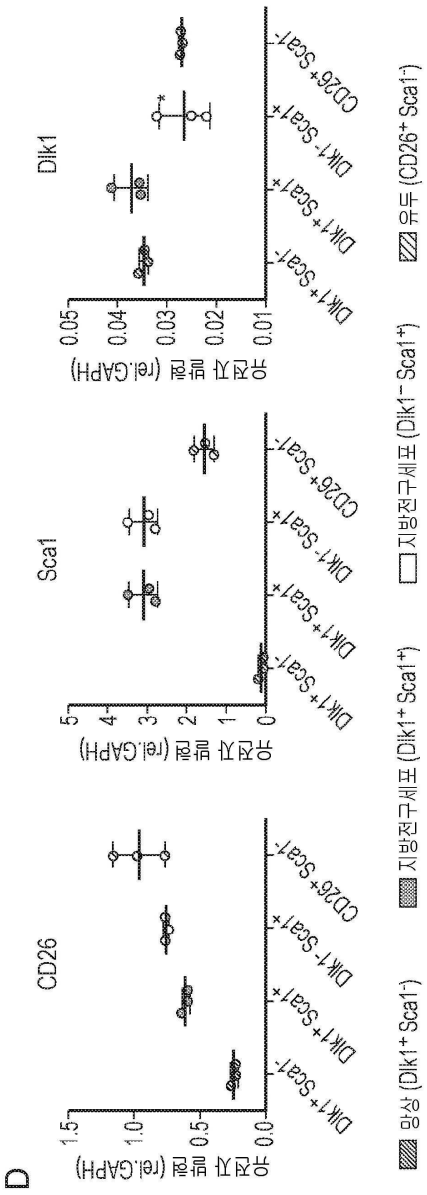
도면1b


B
Y-축
X-축
Z-축

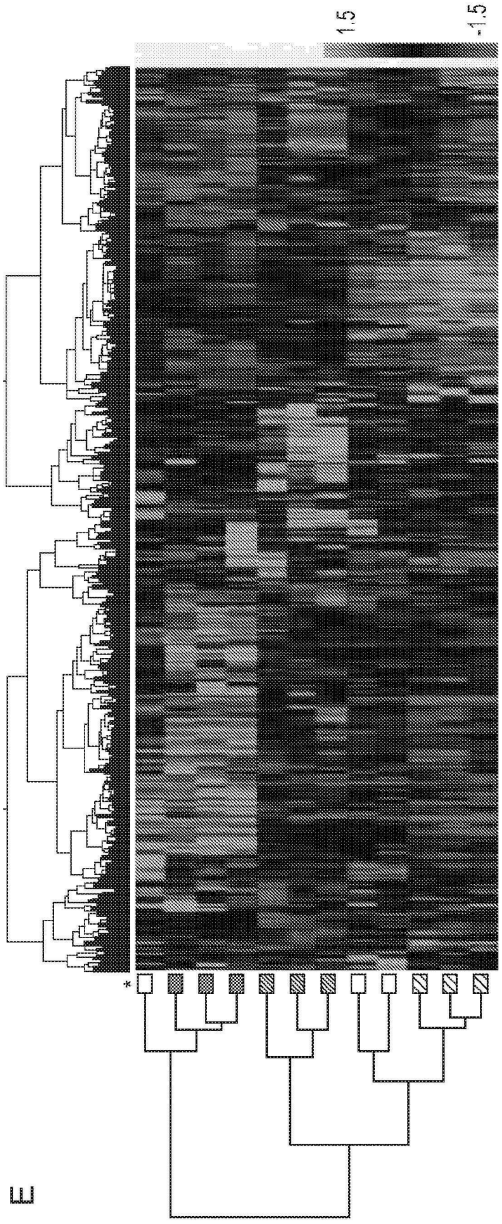
도면1c


Dlk1
***
***
10
8
6
4
2
0
발현 (rel.GAPDH)
Sca1
**
*
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
발현 (rel.GAPDH)
CD26
*
*
*
0.3
0.2
0.1
0.0
발현 (rel.GAPDH)
C

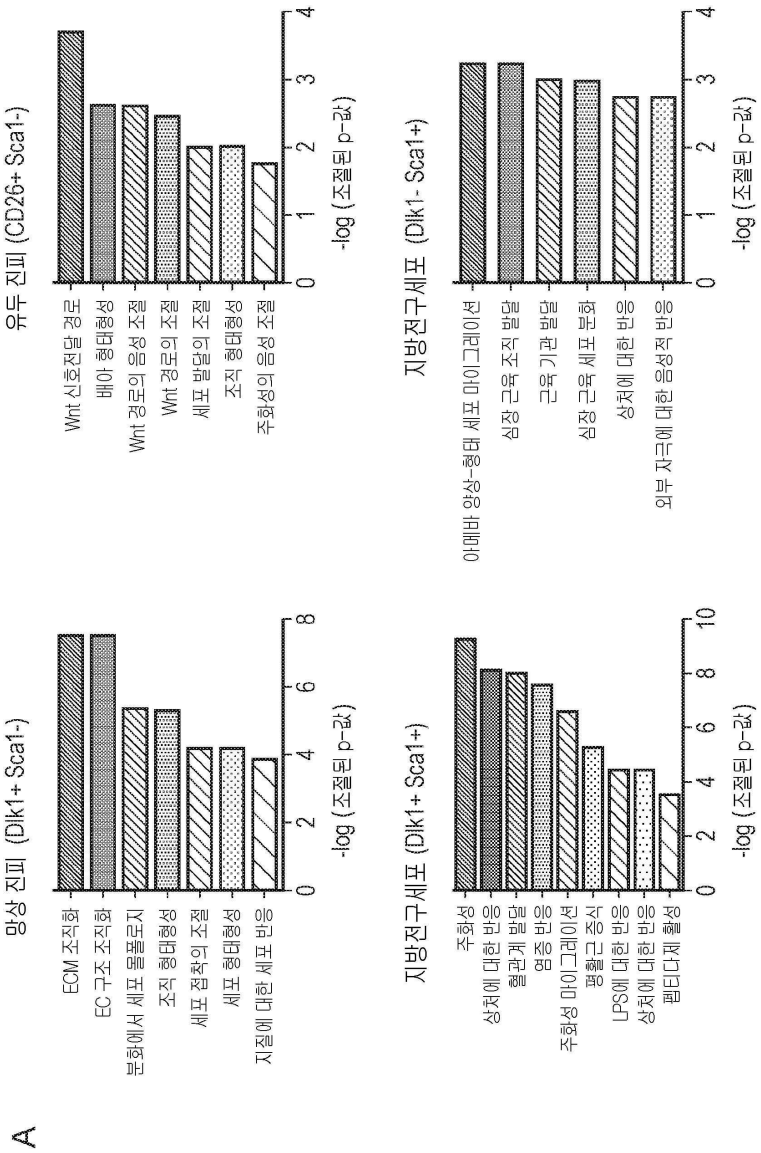
도면1d


D
CD26
Sca1
Dlk1
유전자 발현 (rel.GAPH)
DLK1+Sca1-
DLK1+Sca1+
DLK1-Sca1+
CD26+Sca1-
일상 (Dlk1+Sca1-)
지방전구세포 (Dlk1+Sca1+)
지방전구세포 (Dlk1-Sca1+)
유두 (CD26+Sca1-)

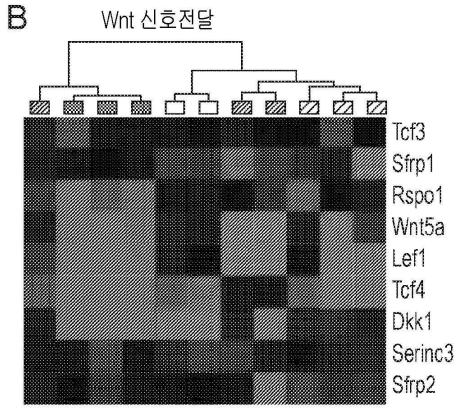
도면1e



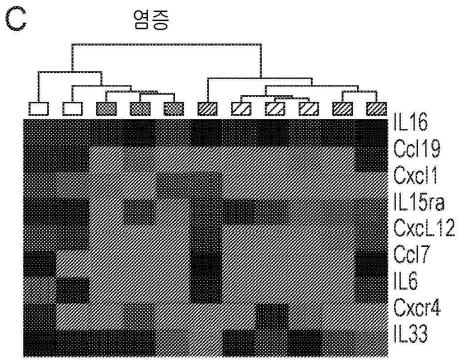
도면2a


A
유두 진피 (CD26+ Sca1-)
Wnt 신호전달 경로
배아 형태형성
Wnt 경로의 음성 조절
Wnt 경로의 조절
세포 발달의 조절
조직 형태형성
주화성의 음성 조절
-log (조절된 p-값)
지방전구세포 (Dlk1- Sca1+)
아메바 양상-형태 세포 마이그레이션
심장 근육 조직 발달
근육 기관 발달
심장 근육 세포 분화
상처에 대한 반응
외부 자극에 대한 음성적 반응
-log (조절된 p-값)
망상 진피 (Dlk1+ Sca1-)
ECM 조직화
EC 구조 조직화
분화에서 세포 몰폴로지
조직 형태형성
세포 접착의 조절
세포 형태형성
지질에 대한 세포 반응
-log (조절된 p-값)
지방전구세포 (Dlk1+ Sca1+)
주화성
상처에 대한 반응
혈관계 발달
염증 반응
주화성 마이그레이션
편평근 증식
LPS에 대한 반응
상처에 대한 반응
펩티다제 활성
-log (조절된 p-값)

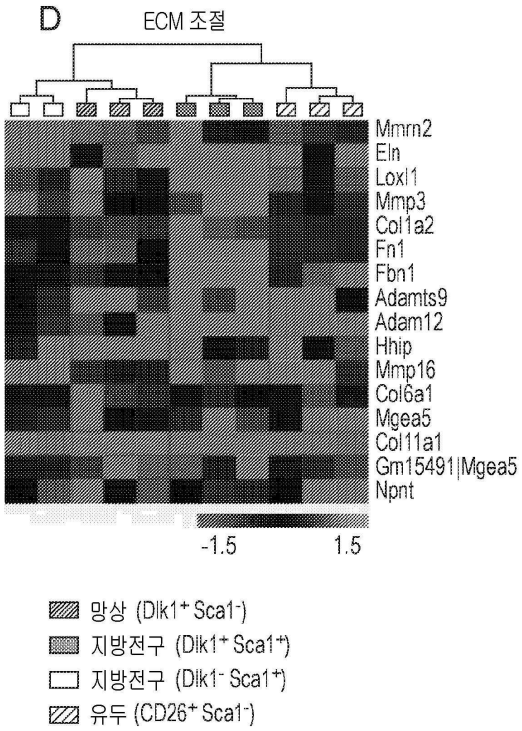
도면2b


B
Wnt 신호전달
Tcf3
Sfrp1
Rspo1
Wnt5a
Lef1
Tcf4
Dkk1
Serinc3
Sfrp2

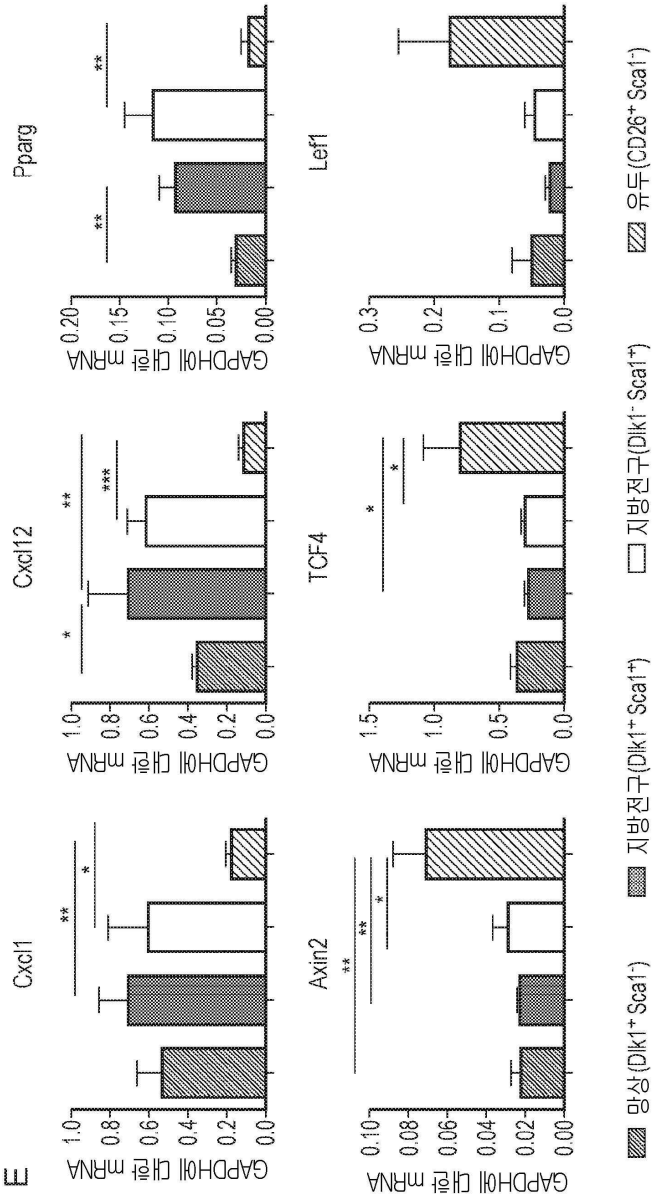
도면2c


C
염증
IL16
Ccl19
Cxcl1
IL15ra
CxcL12
Ccl7
IL6
Cxcr4
IL33

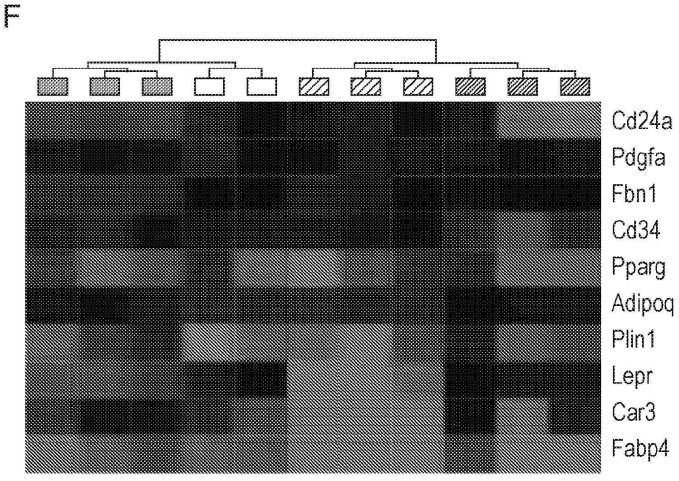
도면2d


D
ECM 조절
Mmrn2
Eln
Loxl1
Mmp3
Col1a2
Fn1
Fbn1
Adamts9
Adam12
Hhip
Mmp16
Col6a1
Mgea5
Col11a1
Gm15491|Mgea5
Npnt
-1.5
1.5
망상 (Dlk1+ Sca1-)
지방전구 (Dlk1+ Sca1+)
지방전구 (Dlk1- Sca1+)
유두 (CD26+ Sca1-)

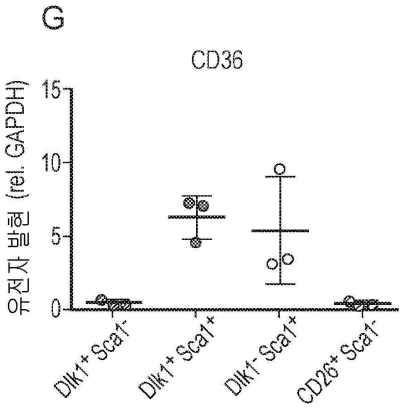
도면2e


E
Cxcl1
Cxcl12
Axin2
TCF4
Pparg
Lef1
GAPDH에 대한 mRNA
망상(Dlk1+ Sca1-)
지방전구(Dlk1+ Sca1+)
지방전구(Dlk1- Sca1+)
유두(CD26+ Sca1-)

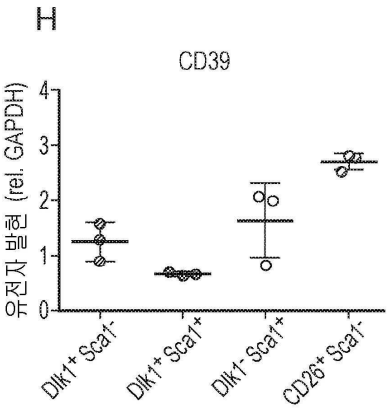
도면2f


F
Cd24a
Pdgfa
Fbn1
Cd34
Pparg
Adipoq
Plin1
Lepr
Car3
Fabp4

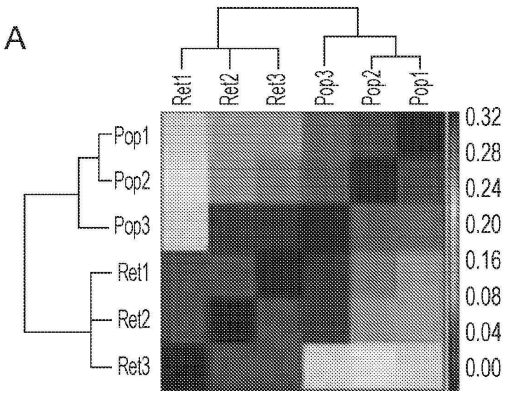
도면2g



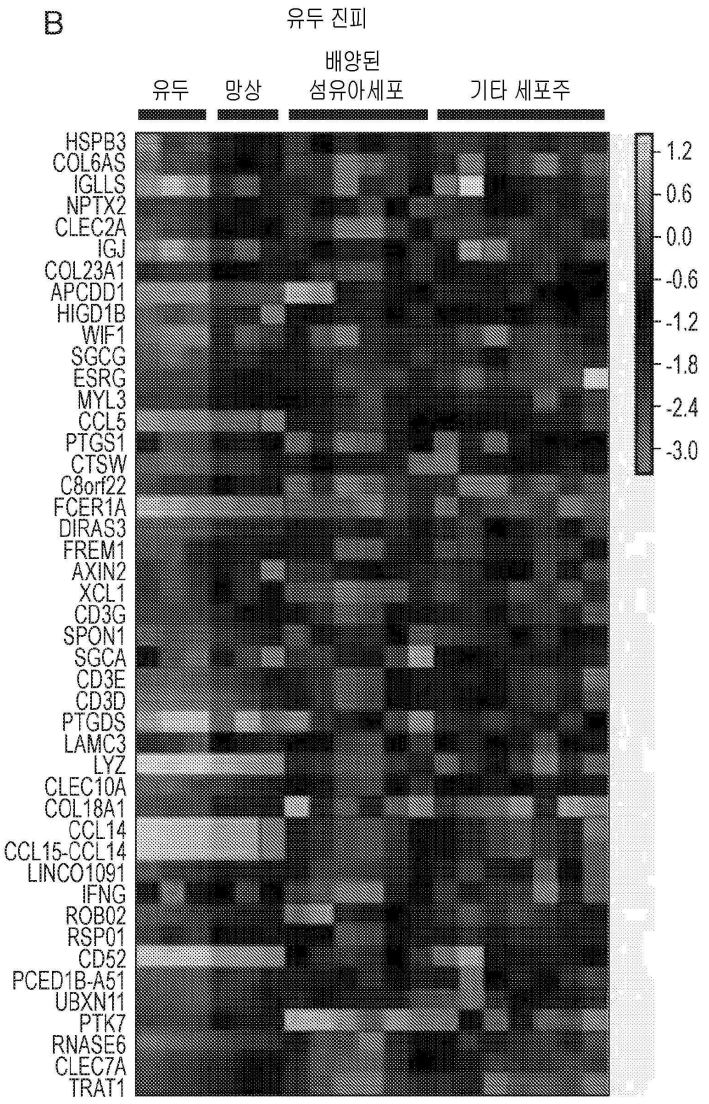
도면2h



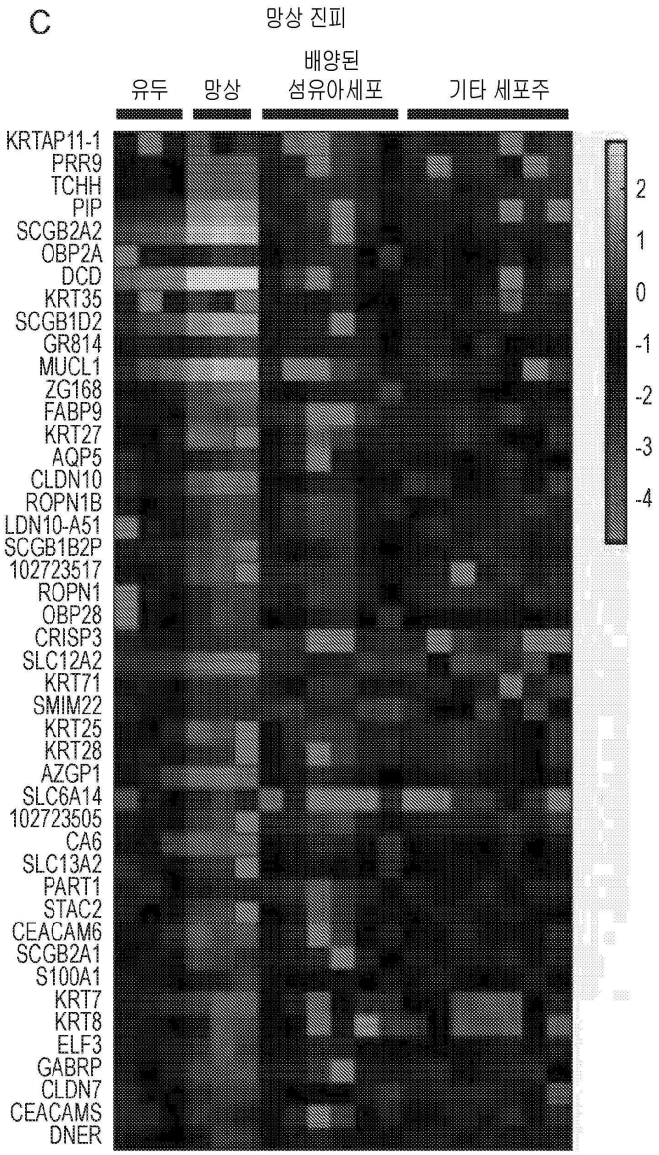
도면3a



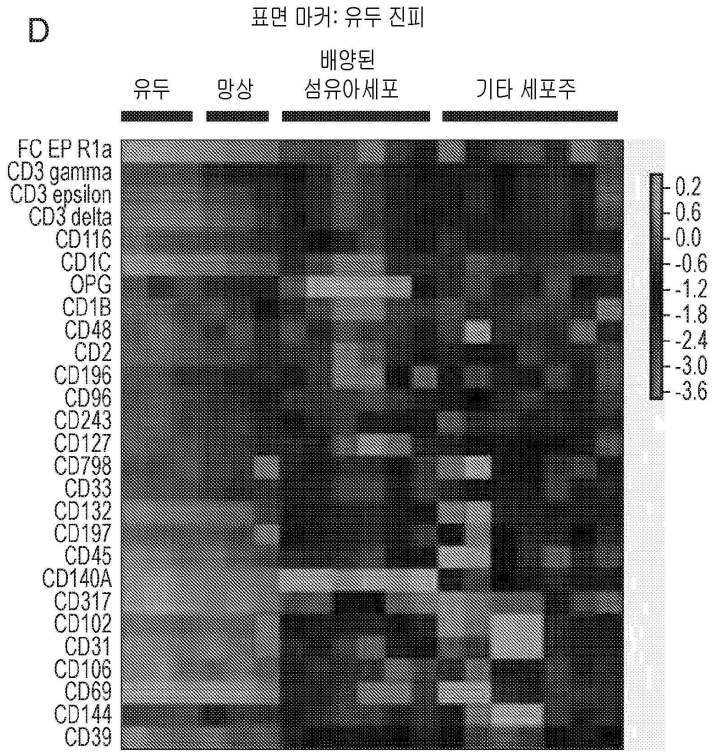
도면3b


B
유두 진피
유두
망상
배양된
섬유아세포
기타 세포주
HSPB3
COL6A5
IGLL5
NPTX2
CLEC2A
IGJ
COL23A1
APCDD1
HIGD1B
WIF1
SGCG
ESRG
MYL3
CCL5
PTGS1
CTSW
C8orf22
FCER1A
DIRAS3
FREM1
AXIN2
XCL1
CD3G
SPON1
SGCA
CD3E
CD3D
PTGDS
LAMC3
LYZ
CLEC10A
COL18A1
CCL14
CCL15-CCL14
LINC01091
IFNG
ROBO2
RSPO1
CD52
PCED1B-AS1
UBXN11
PTK7
RNASE6
CLEC7A
TRAT1
1.2
0.6
0.0
-0.6
-1.2
-1.8
-2.4
-3.0

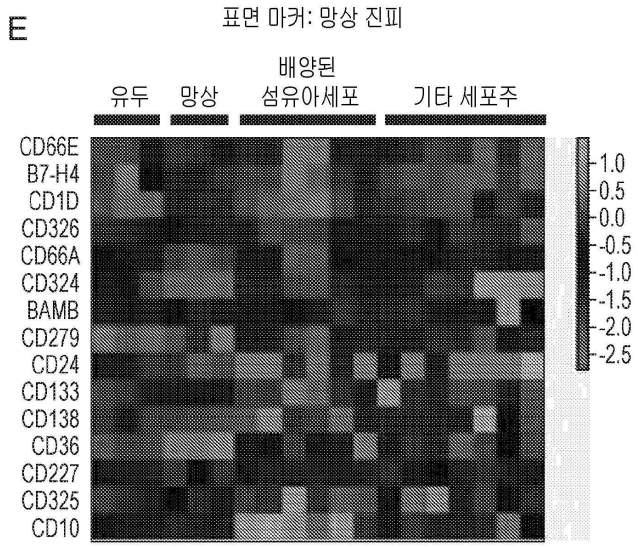
도면3c


C
망상 진피
배양된
유두
망상
섬유아세포
기타 세포주
KRTAP11-1
PRR9
TCHH
PIP
SCGB2A2
OBP2A
DCD
KRT35
SCGB1D2
GR814
MUCL1
ZG168
FABP9
KRT27
AQP5
CLDN10
ROPN1B
LDN10-A51
SCGB1B2P
102723517
ROPN1
OBP28
CRISP3
SLC12A2
KRT71
SMIM22
KRT25
KRT28
AZGP1
SLC6A14
102723505
CA6
SLC13A2
PART1
STAC2
CEACAM6
SCGB2A1
S100A1
KRT7
KRT8
ELF3
GABRP
CLDN7
CEACAMS
DNER
2
1
0
-1
-2
-3
-4

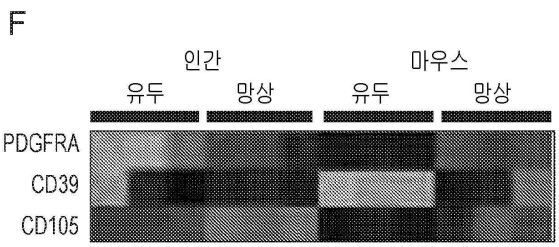
도면3d



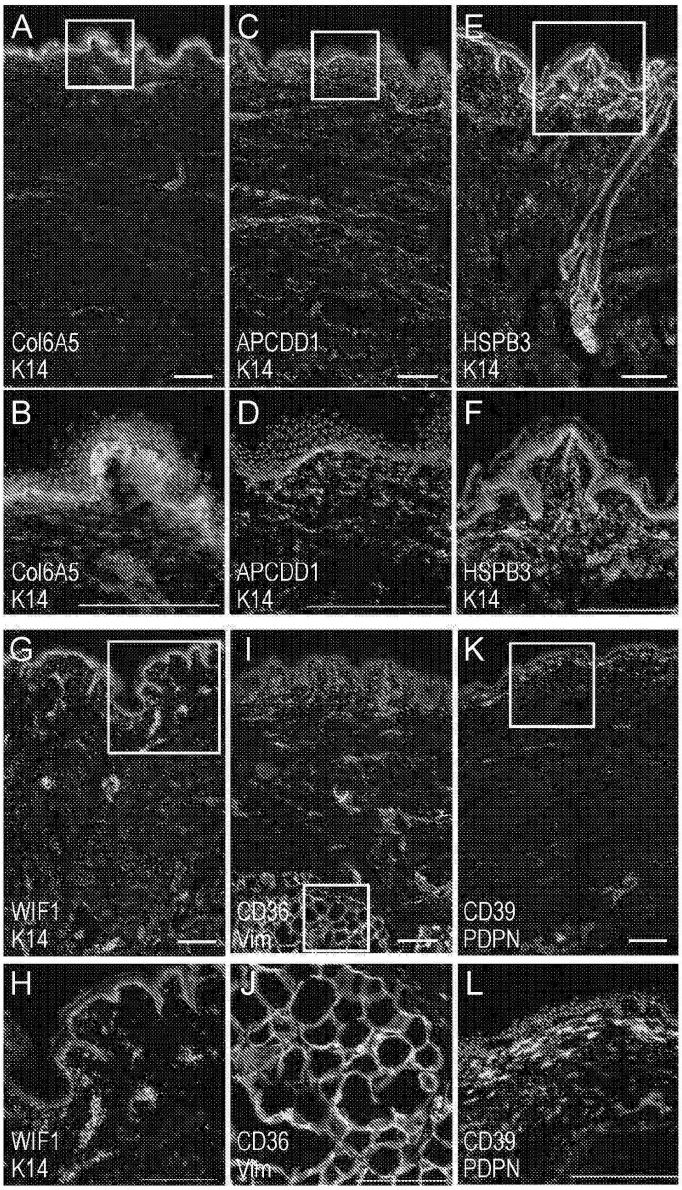
도면3e



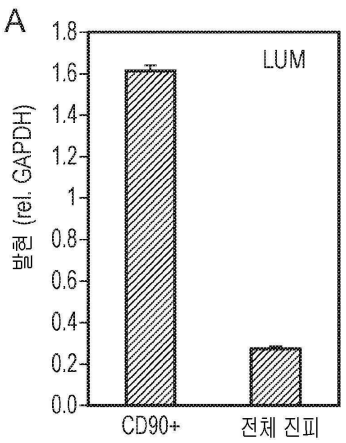
도면3f



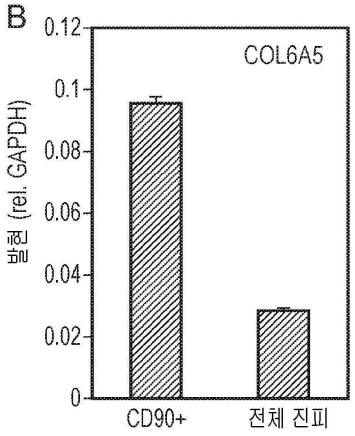
도면4


A
Col6A5
K14
C
APCDD1
K14
E
HSPB3
K14
B
Col6A5
K14
D
APCDD1
K14
F
HSPB3
K14
G
WIF1
K14
I
CD36
Vim
K
CD39
PDPN
H
WIF1
K14
J
CD36
Vim
L
CD39
PDPN

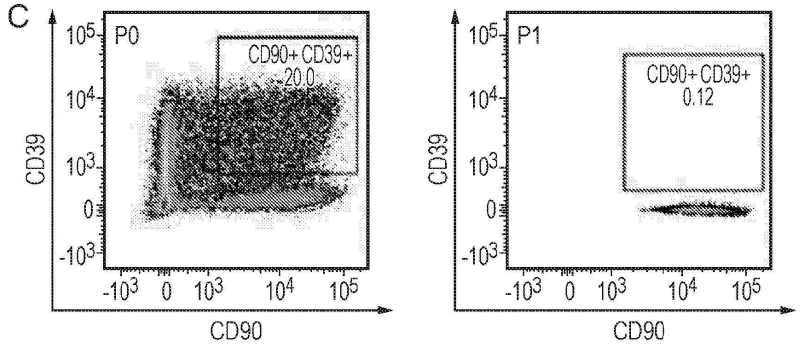
도면5a


A
LUM
발현 (rel. GAPDH)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CD90+
전체 진피

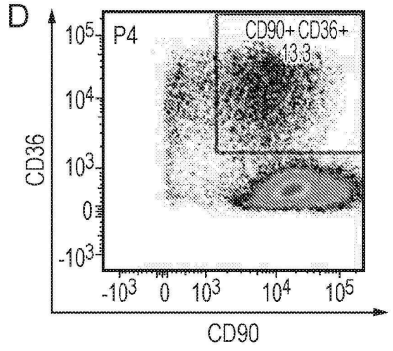
도면5b



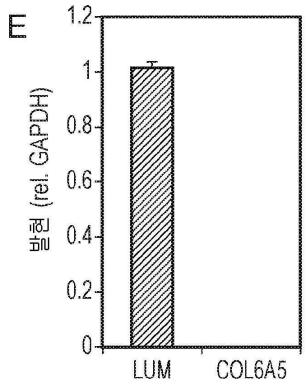
도면5c



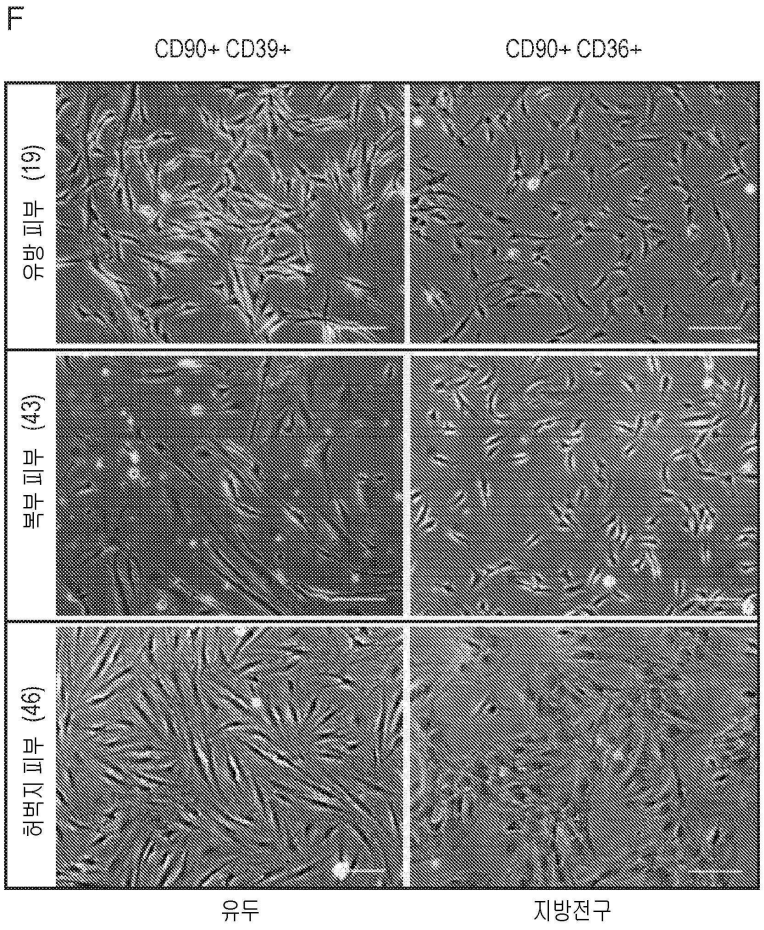
도면5d



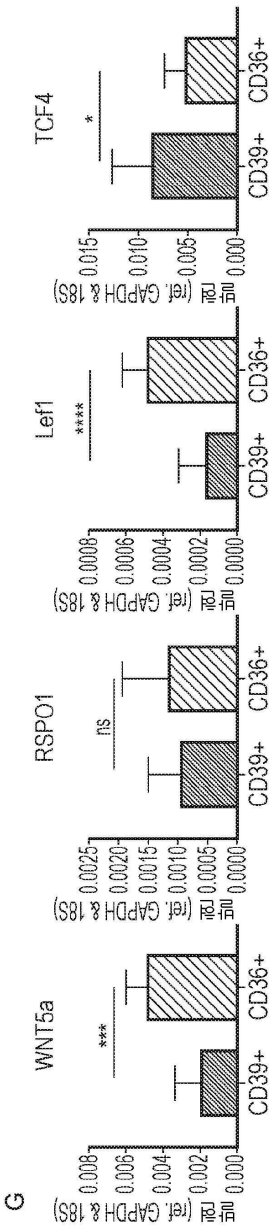
도면5e



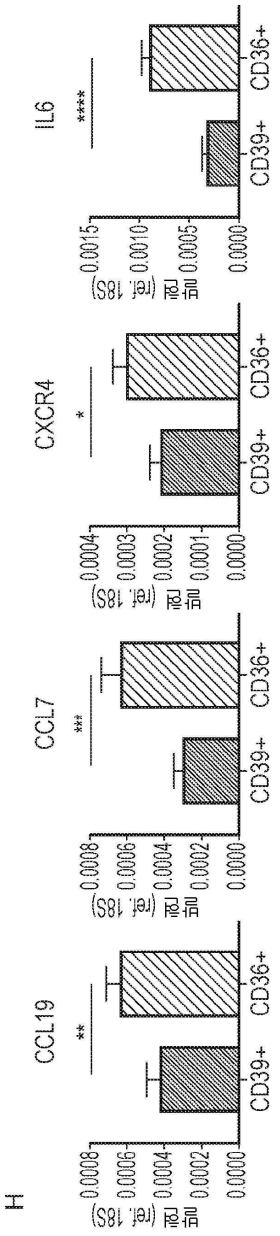
도면5f



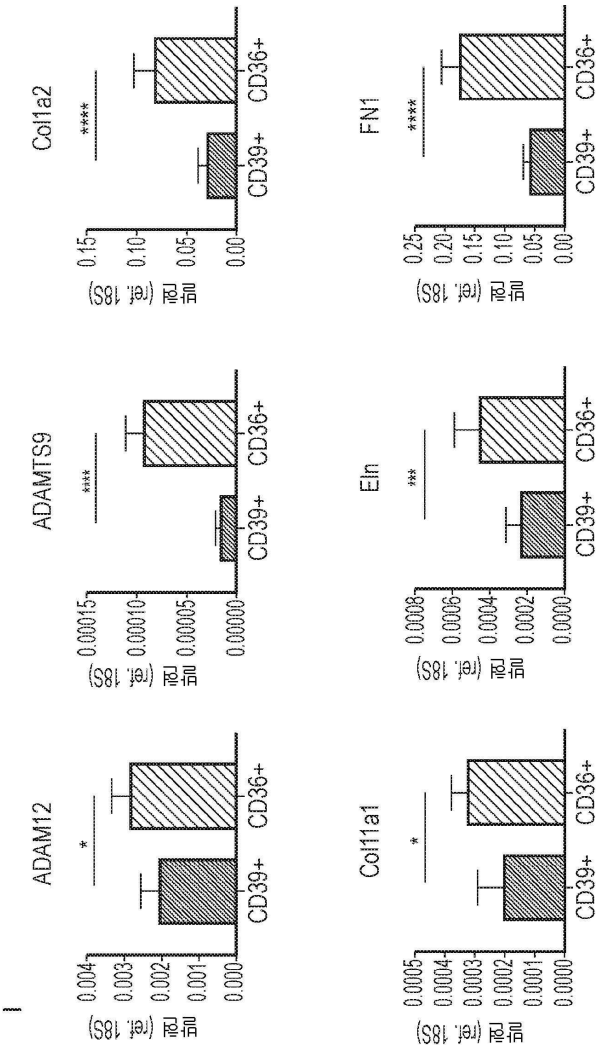
도면5g


G
WNT5a
RSPO1
Lef1
TCF4
발현 (ref. GAPDH & 18S)
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0.0000
0.015
0.010
0.005
0.000
***
ns
****
*
CD39+
CD36+

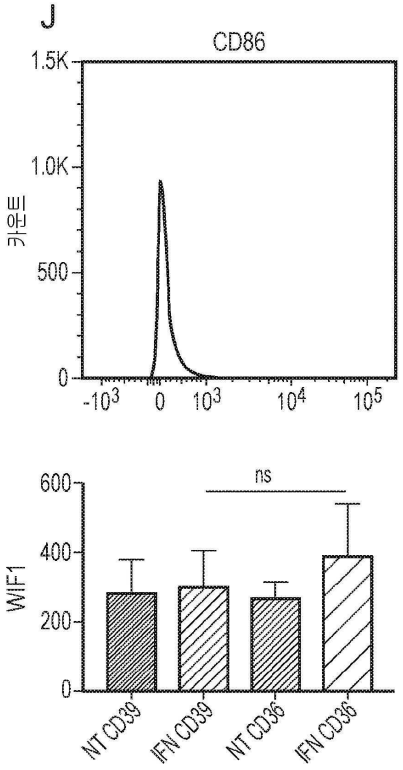
도면5h


H
CCL19
CCL7
CXCR4
IL6
**
***
*
****
CD39+
CD36+
발현 (ref. 18S)
0.0000
0.0002
0.0004
0.0006
0.0008
0.0001
0.0003
0.0005
0.0010
0.0015

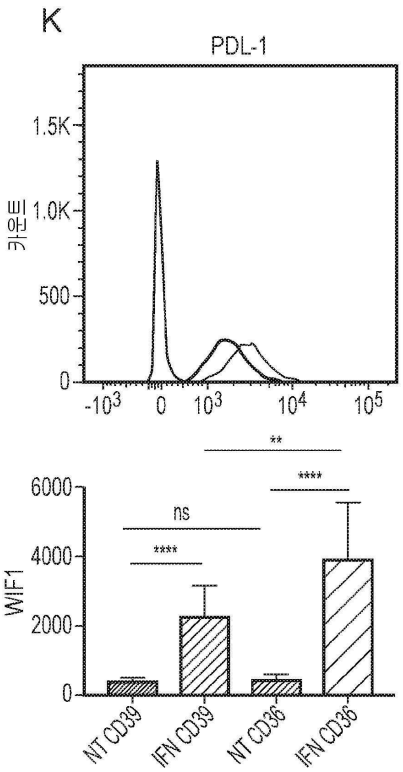
도면5i



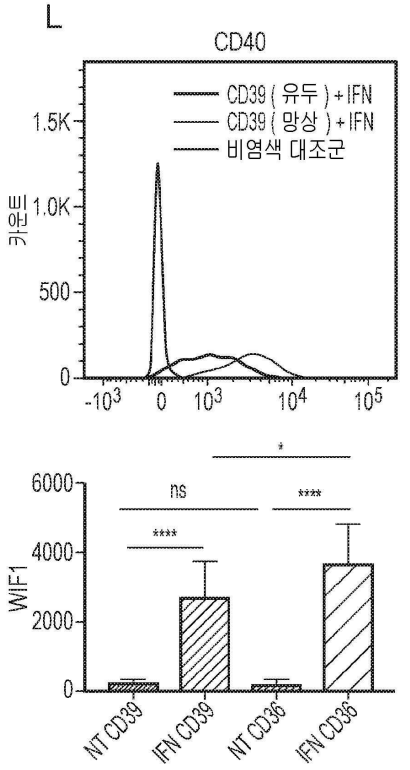
도면5j


J
CD86
1.5K
1.0K
500
0
카운트
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
600
400
200
0
WIF1
ns
NT CD39
IFN CD39
NT CD36
IFN CD36

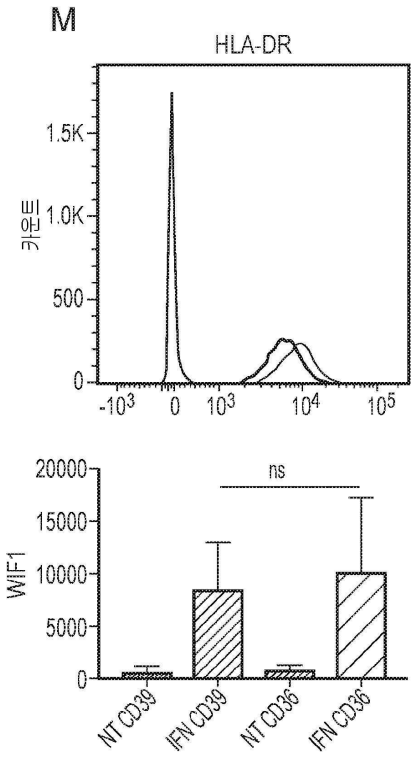
도면5k


K
PDL-1
1.5K
1.0K
500
0
카운트
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
**
****
6000
4000
2000
0
WIF1
ns
****
NT CD39
IFN CD39
NT CD36
IFN CD36

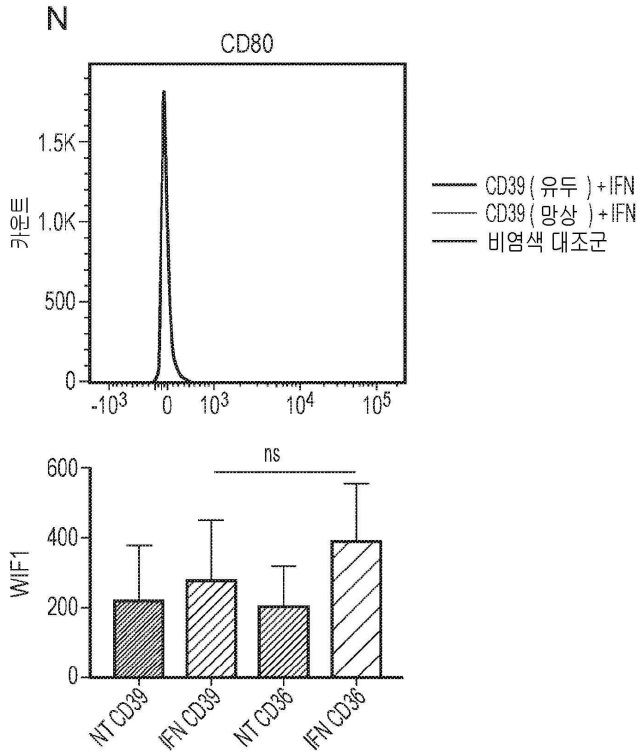
도면51


L
CD40
CD39 (유두) + IFN
CD39 (망상) + IFN
비염색 대조군
카운트
1.5K
1.0K
500
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
*
ns
****
****
6000
4000
2000
0
WIF1
NT CD39
IFN CD39
NT CD36
IFN CD36

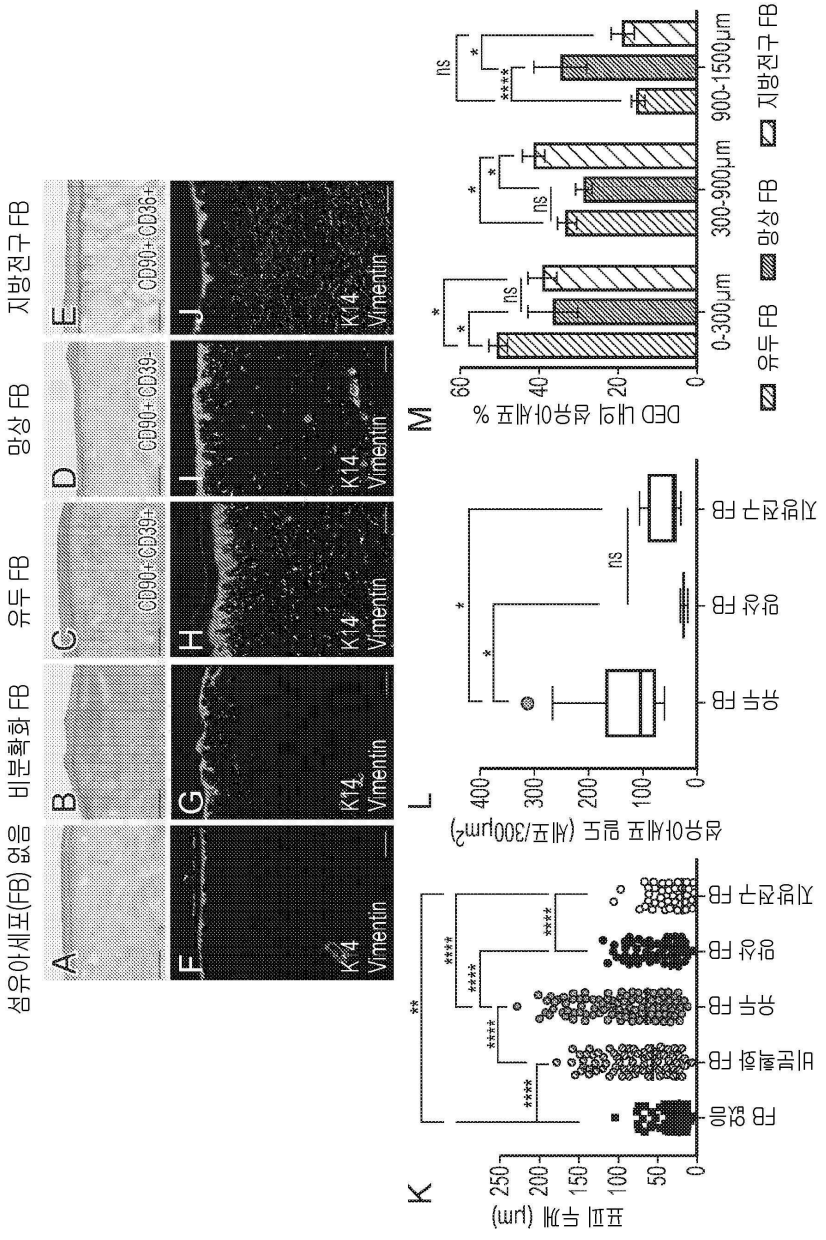
도면5m


M
HLA-DR
카운트
1.5K
1.0K
500
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
ns
20000
15000
10000
5000
0
WIF1
NT CD39
IFN CD39
NT CD36
IFN CD36

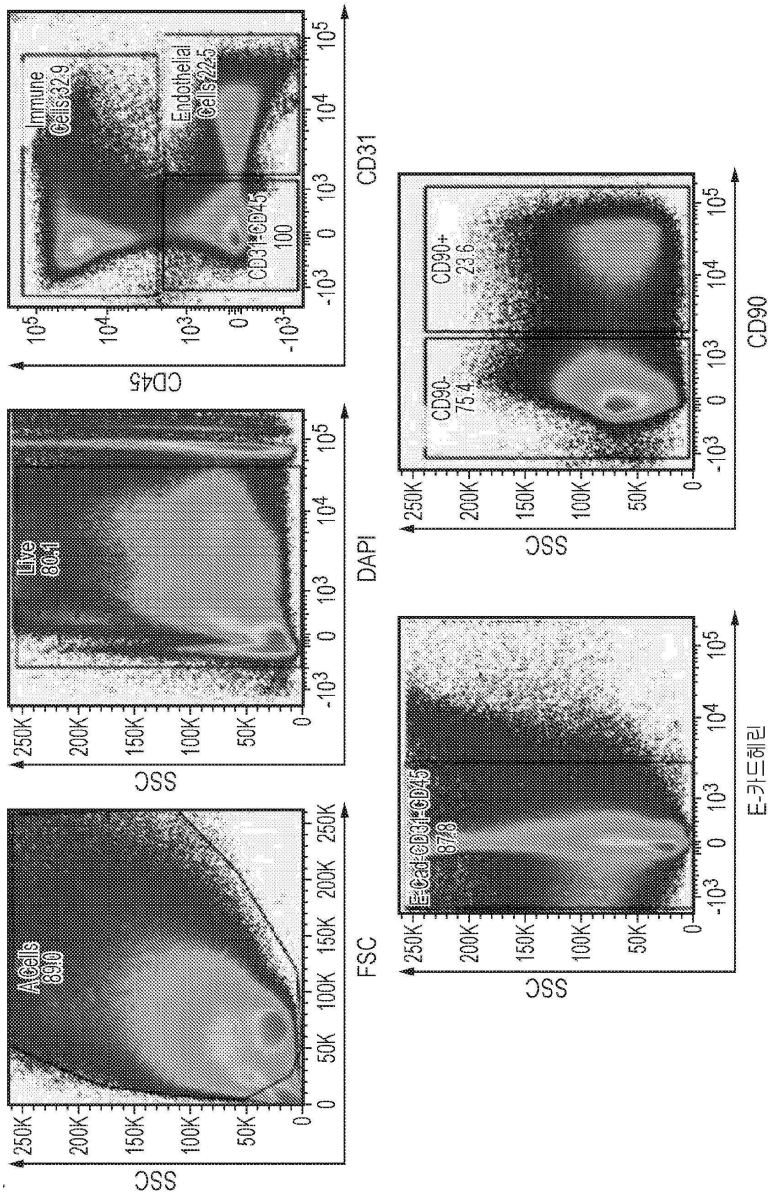
도면5n


N
CD80
1.5K
1.0K
500
0
카운트
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
CD39 (유두) + IFN
CD39 (망상) + IFN
비염색 대조군
ns
600
400
200
0
WIF1
NT CD39
IFN CD39
NT CD36
IFN CD36

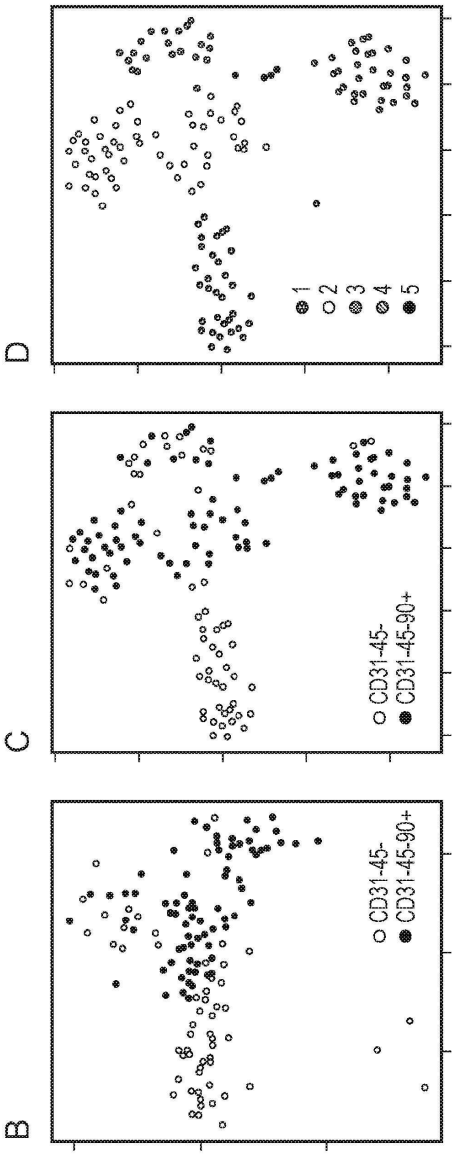
도면6


섬유아세포(FB) 없음
비분화화 FB
유두 FB
망상 FB
지방전구 FB
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K4
K14
Vimentin
CD90+CD39+
CD90+CD36+
K
표피 두께 (μm)
FB 없음
비분화화 FB
유두 FB
망상 FB
지방전구 FB
L
섬유아세포 밀도 (세포/300μm²)
M
DED 내의 섬유아세포 %
0-300μm
300-900μm
900-1500μm
유두 FB
망상 FB
지방전구 FB
ns

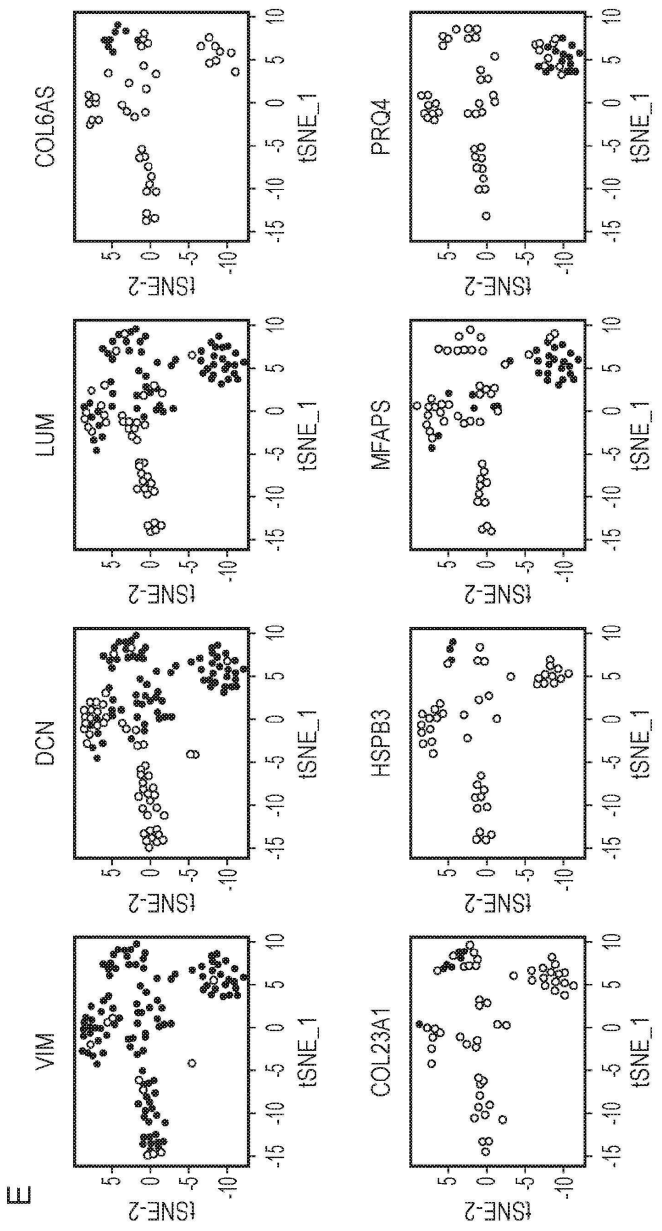
도면7a


A Cells
89.0
SSC
FSC
Live
80.1
DAPI
CD45
CD31+CD45-
10.0
Immune
Cells32.9
Endothelial
Cells22.5
CD31
E-Cad-CD31+CD45-
97.8
E-카드헤린
CD90-
75.4
CD90+
23.6
CD90

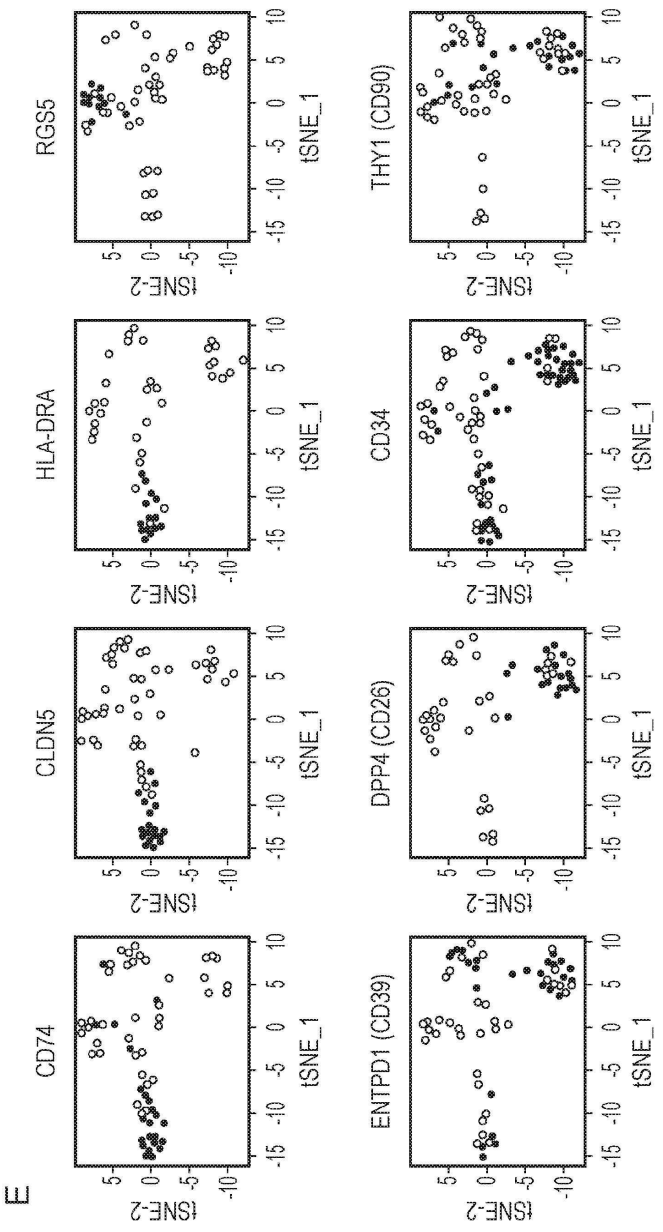
도면7b



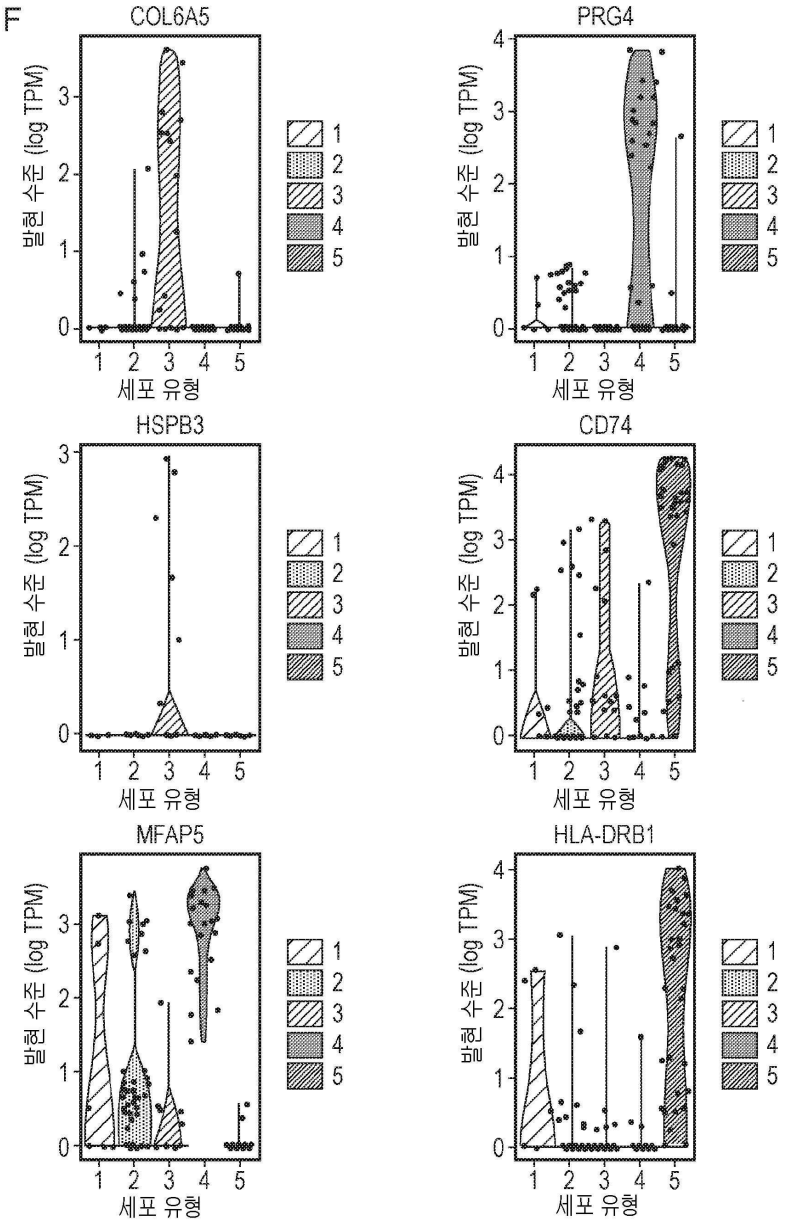
도면7c



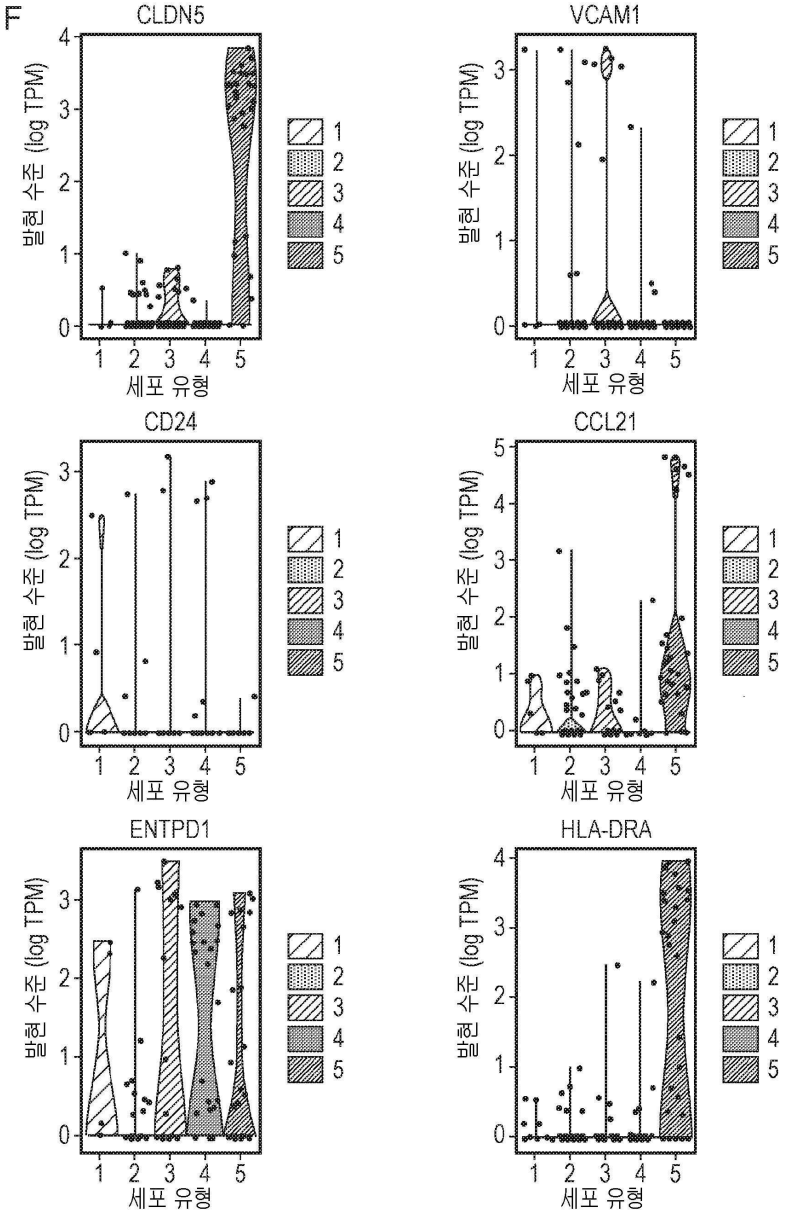
도면7d


E
CD74
CLDN5
HLA-DRA
RGS5
ENTPD1 (CD39)
DPP4 (CD26)
CD34
THY1 (CD90)
tSNE_1
tSNE-2

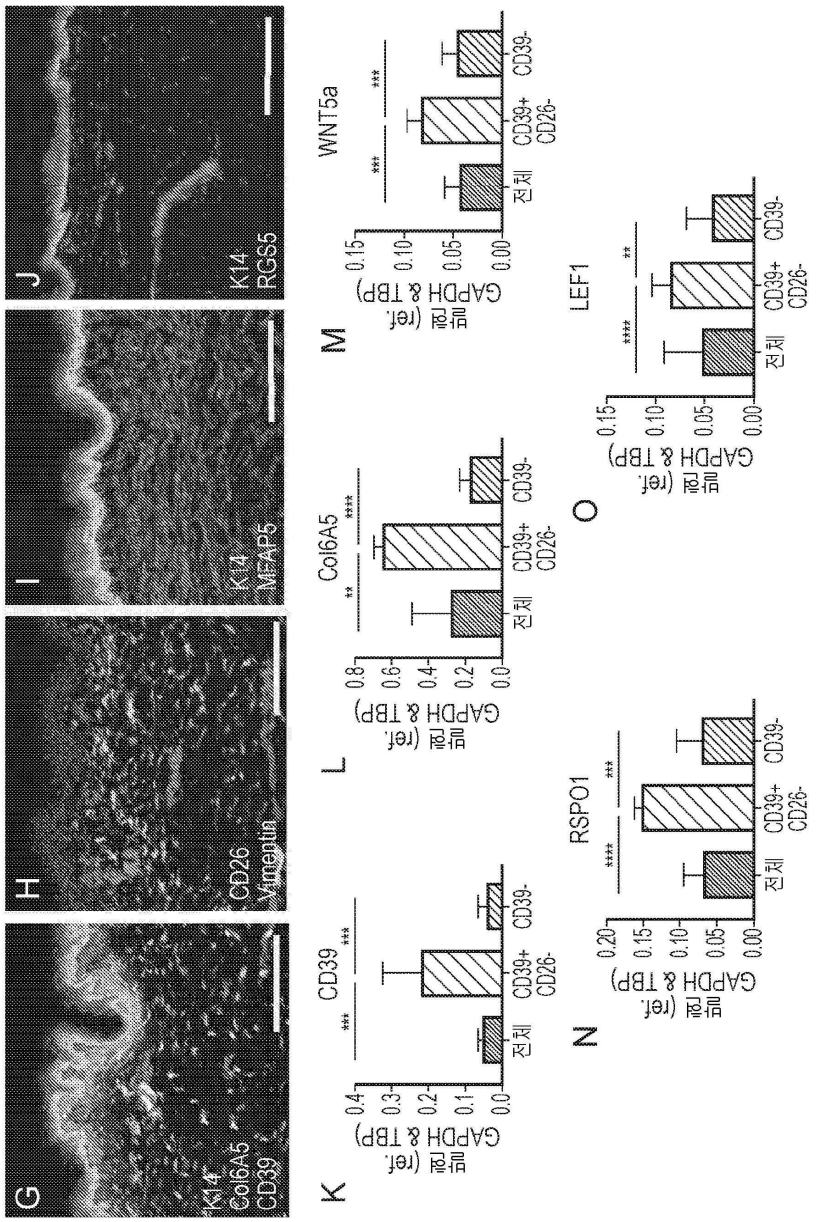
도면7e


F
COL6A5
PRG4
HSPB3
CD74
MFAP5
HLA-DRB1
발현 수준 (log TPM)
세포 유형
1
2
3
4
5

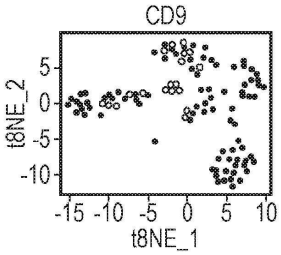
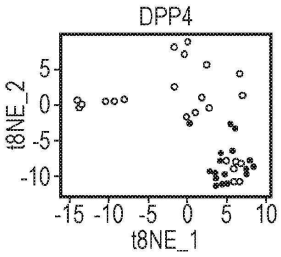
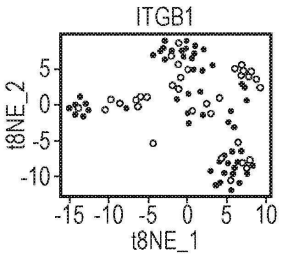
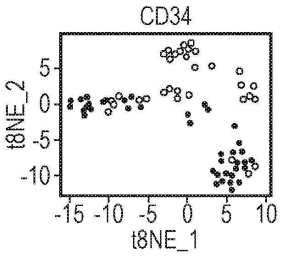
도면7f


F
CLDN5
VCAM1
CD24
CCL21
ENTPD1
HLA-DRA
발현 수준 (log TPM)
세포 유형
1
2
3
4
5

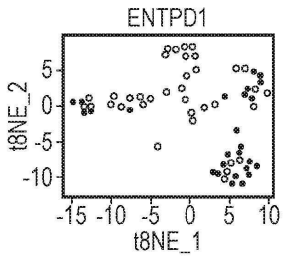
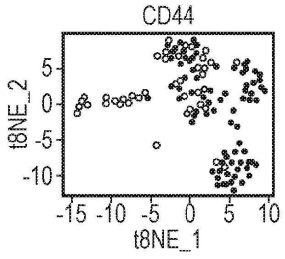
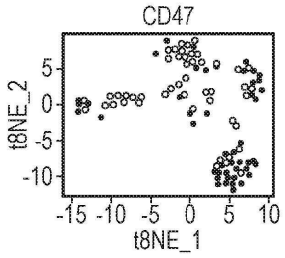
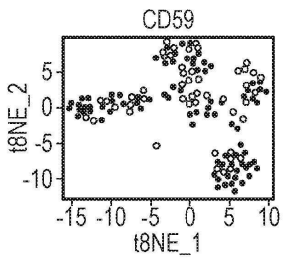
도면7g


G
K14
Col6A5
CD39
H
CD26
Vimentin
I
K14
MFAP5
J
K14
RGS5
K
CD39
상대량 (ref. GAPDH & TBP)
전체
CD39+ CD26-
CD39-
L
Col6A5
M
WNT5a
N
RSPO1
O
LEF1

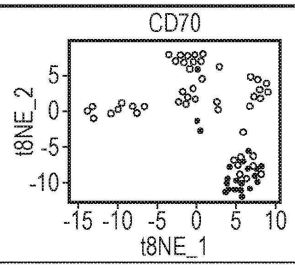
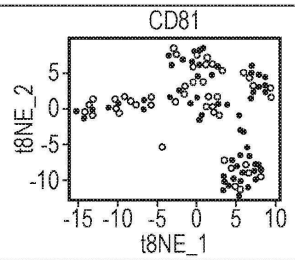
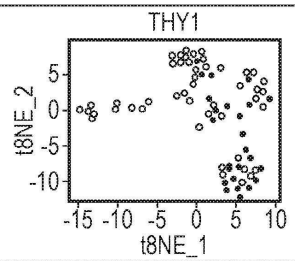
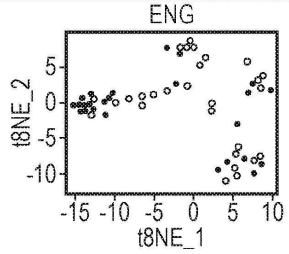
도면8a

리오플레이트 스크리닝 히트	발현	단일 세포 RNA 서열
CD9	**	
CD11a		
CD26	낮음	
CD29 (Int B1)	낮음	
CD34		

도면8b

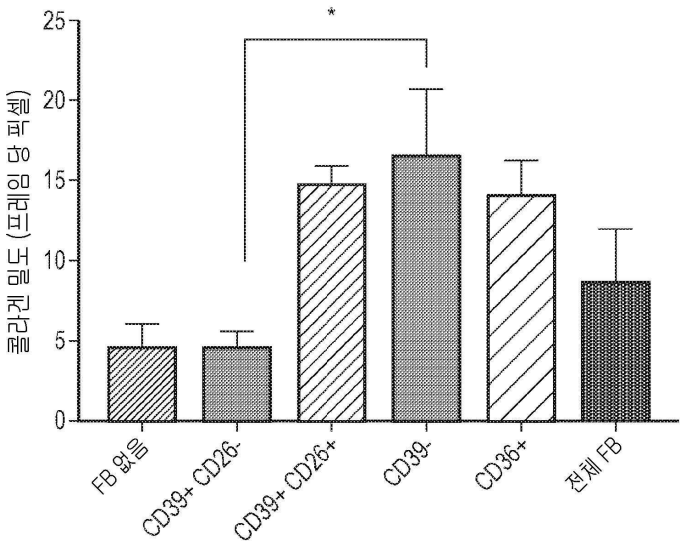
CD39	**	
CD44	**	
CD47	낮음	
CD59	**	

도면8c

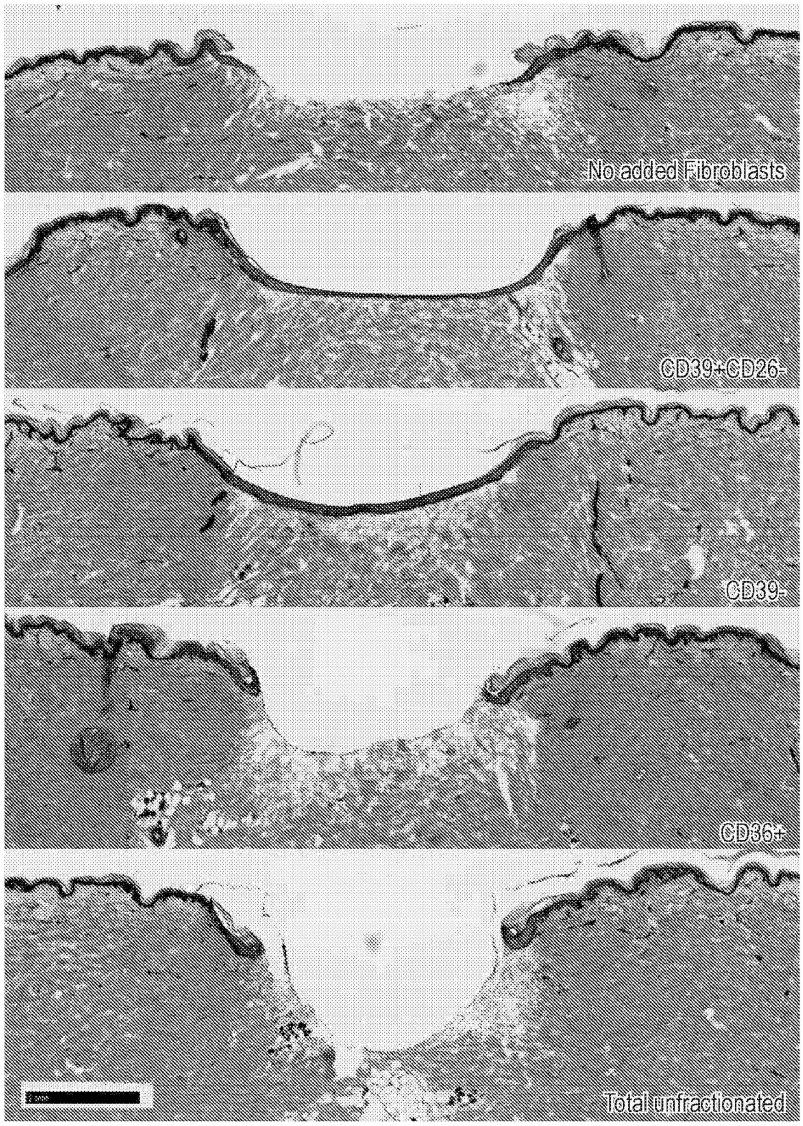
CD70		
CD73		
CD81	**	
CD87		
CD90	●	
CD105		
CD141	**	
CD142		
CD147		
HLA-A,B,C		

도면9

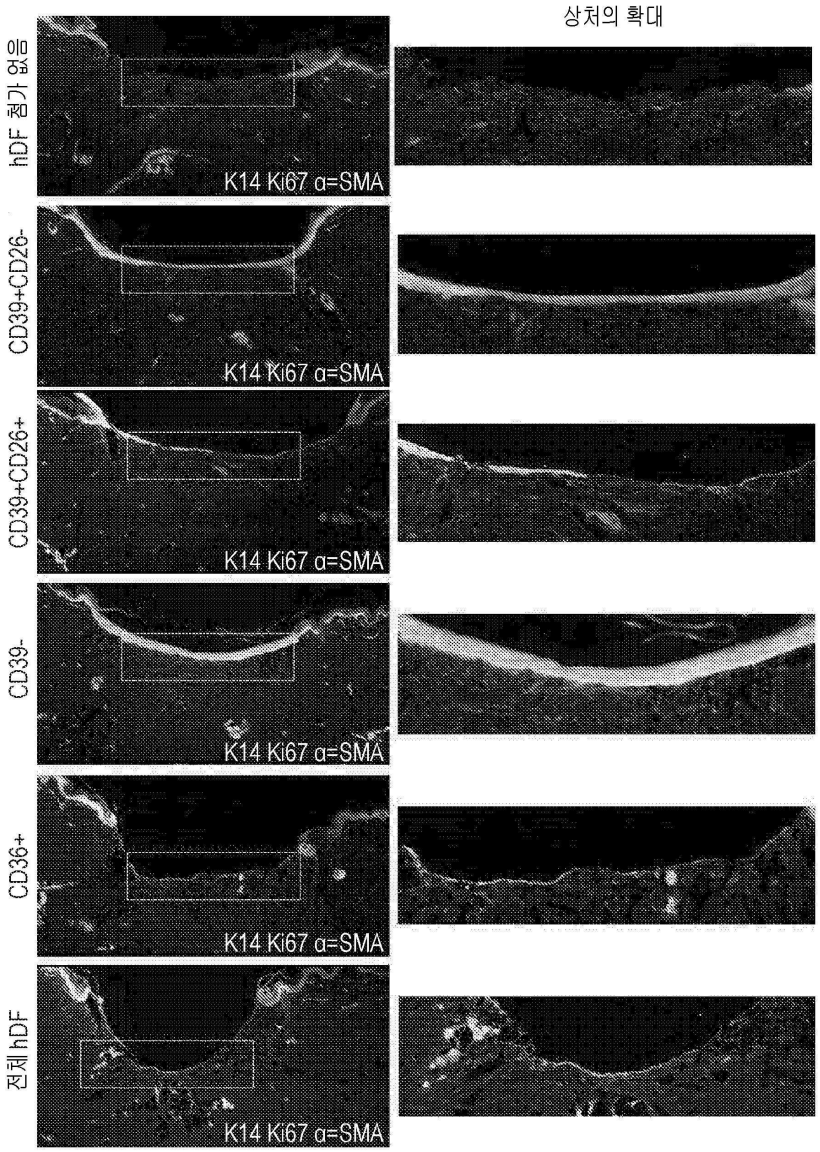
HLA DR, DP, DQ	낮음	
디시알로갱글리오사이드 GD2	**	



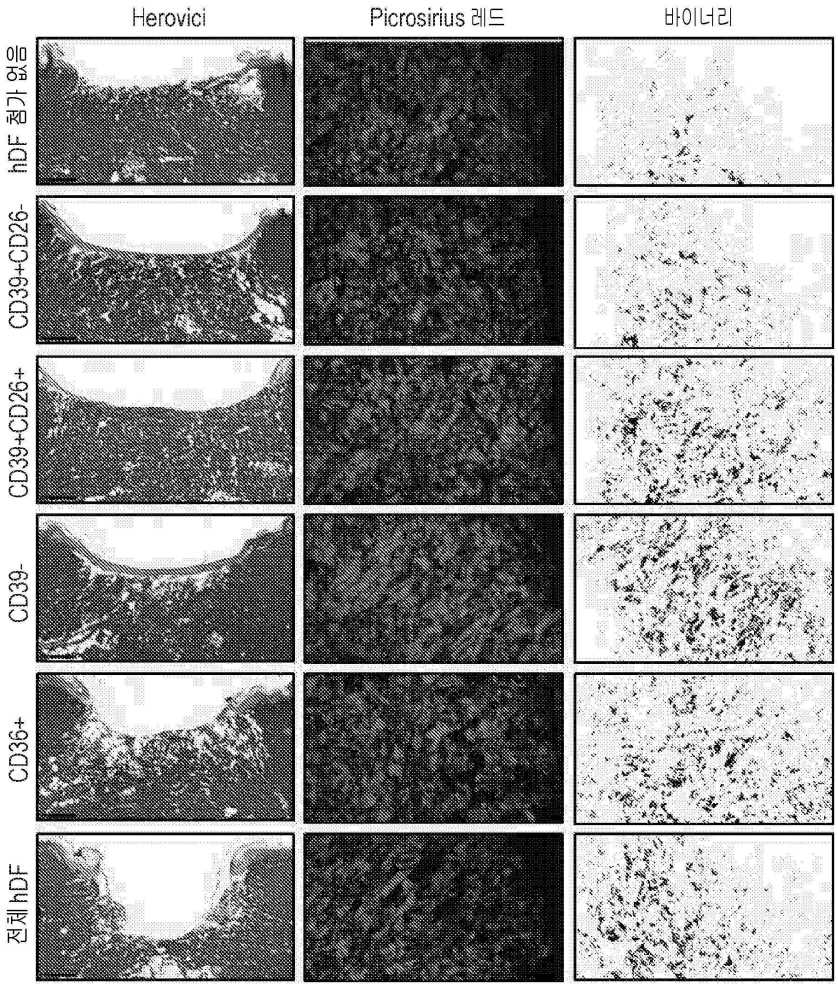
도면10


No added Fibroblasts
CD39+CD26-
CD39-
CD36+
Total unfractionated

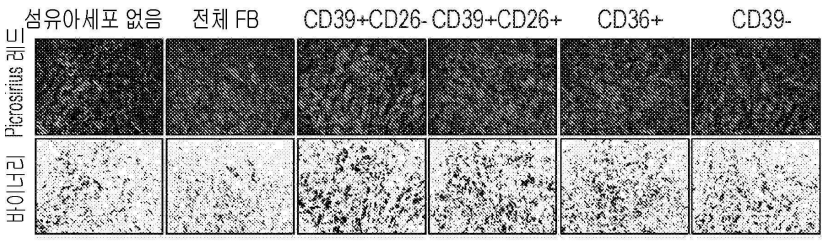
도면11

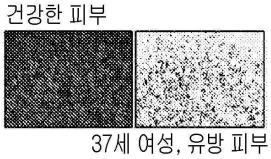

상처의 확대
hDF 첨가 없음
CD39+CD26-
CD39+CD26+
CD39-
CD36+
전체 hDF
K14 Ki67 α=SMA

도면12

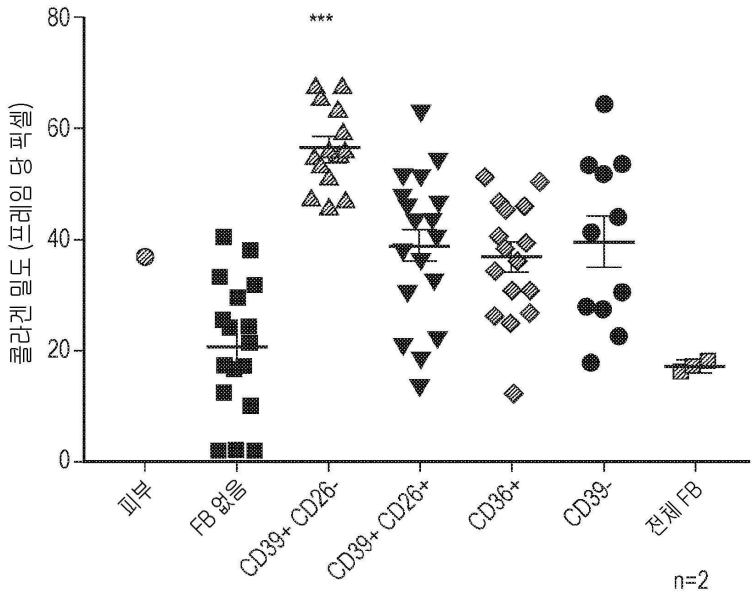

Herovici
Picrosirius 레드
바이너리
hDF 첨가 없음
CD39+CD26-
CD39+CD26+
CD39-
CD36+
전체 hDF

도면13

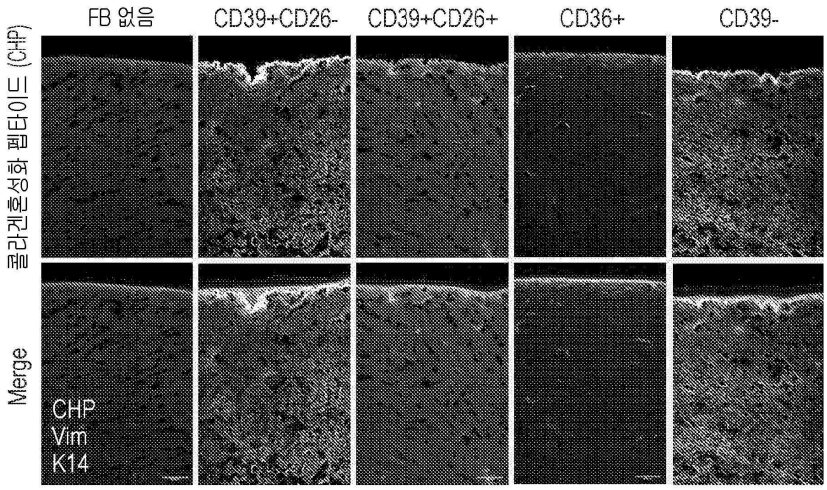

섬유아세포 없음
전체 FB
CD39+CD26-
CD39+CD26+
CD36+
CD39-
Picrosirius 레드
바이너리


건강한 피부
37세 여성, 유방 피부

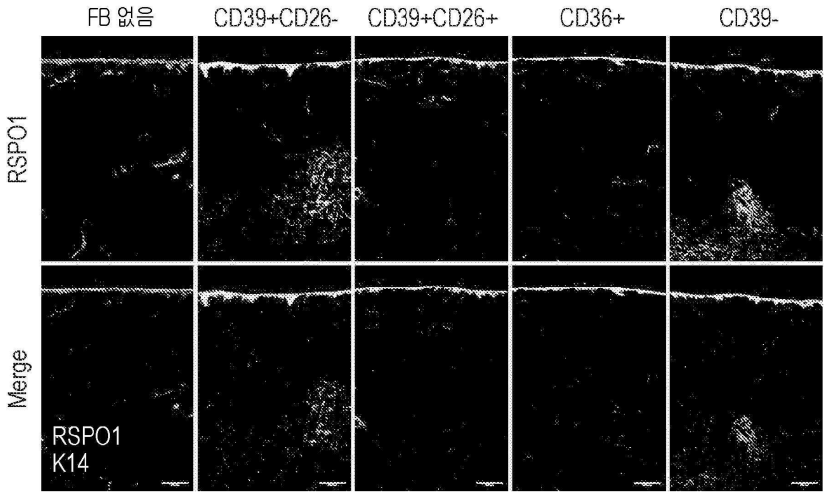
도면14



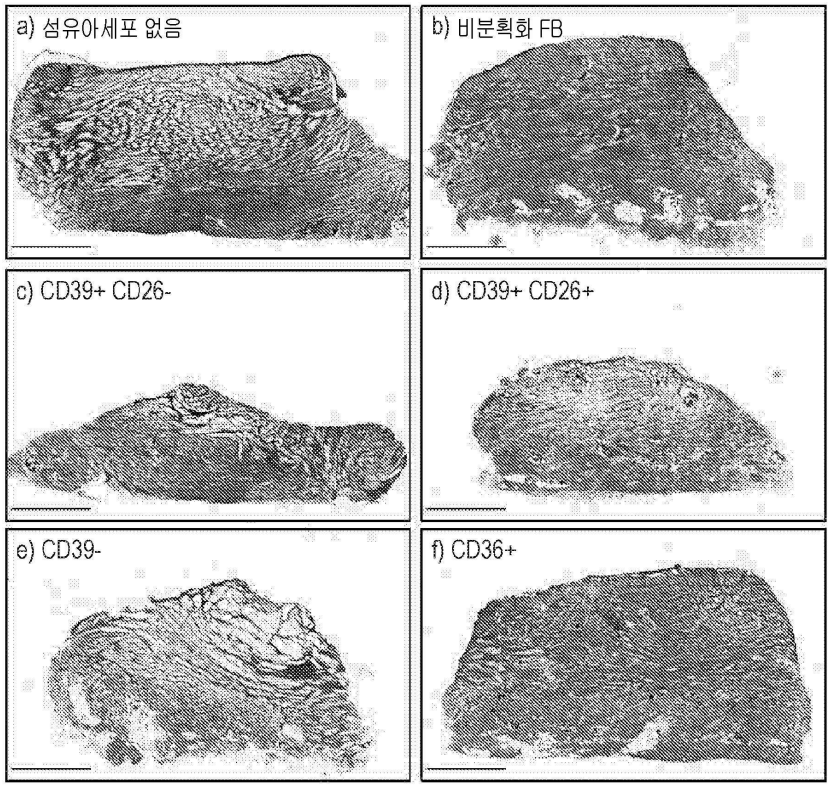
도면15



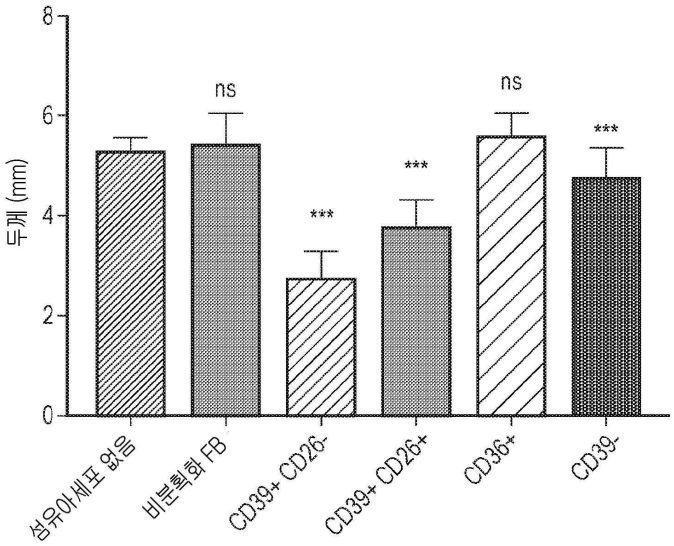
도면16



도면17


a) 섬유아세포 없음
b) 비분획화 FB
c) CD39+ CD26-
d) CD39+ CD26+
e) CD39-
f) CD36+

도면18


두께 (mm)
8
6
4
2
0
ns
ns
***
***
***
섬유아세포 없음
비분획화 FB
CD39+ CD26-
CD39+ CD26+
CD36+
CD39-