



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0152765
(43) 공개일자 2024년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
C12N 5/0664 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0050241
(22) 출원일자 2024년04월15일
심사청구일자 2024년04월15일
(30) 우선권주장
1020230048913 2023년04월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
주식회사 스템센트릭
경기도 안양시 동안구 시민대로 230, 지니센터 디
동 2449호 (관양동, 평촌아크로타워)
(72) 발명자
노규진
이성림
경상남도 진주시 진주역로73번길 33 센트럴웰가
102동 2903호
(74) 대리인
기율특허법인

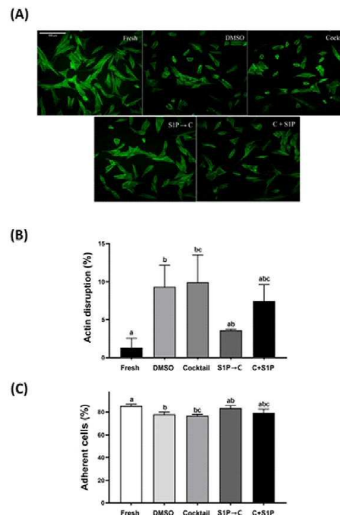
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물 및 이를 이용한 동결 보존 방법

(57) 요약

본 발명은 스펡고신-1-포스페이트를 포함함으로써, 줄기세포의 동결 보존시의 세포 생존율을 감소시키고, 줄기세포능을 유지할 수 있도록 하는 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 동결 보존 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

오성주

경상남도 창원시 성산구 대정로 84 피오르빌아파트
201동 807호

김태석

경상남도 진주시 초북로 95 초전힐스테이트 109동
203호

홍채연

경상남도 창원시 진해구 덕산로36번길 16 한길학원

조찬희

경상남도 창원시 성산구 원이대로 774 성원아파트
312동 1704호

김셋별

울산광역시 중구 함월22길 25 성안청구타운아파트
109동 502호

이상엽

전북특별자치도 전주시 완산구 홍산로 270, 1동
618호(효자동3가, 효자스위트앳씨즈)

김경민

서울특별시 서초구 동광로1길 112 롯데캐슬헤론
101동 1103호

명세서

청구범위

청구항 1

스핑고신-1-포스페이트를 포함하는 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 태줄, 치아조직, 지방조직, 골수, 제대혈, 말초혈액, 또는 활액 유래의 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물.

청구항 4

줄기세포를 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 조성물로 전처리하는 단계; 및
상기 전처리된 줄기세포를 동결 보존하는 단계를 포함하는 줄기세포의 동결 보존 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 줄기세포는 태줄, 치아조직, 지방조직, 골수, 제대혈, 말초혈액, 또는 활액 유래의 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 방법.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 전처리는 상기 조성물을 줄기세포 배양 배지에 첨가하여 수행되는 줄기세포의 동결 보존 방법.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 전처리는 줄기세포의 동결 보존 30분 내지 24시간, 30분 내지 12시간, 30분 내지 6시간, 30분 내지 3시간, 30분 내지 2시간 전에 수행되는 줄기세포의 동결 보존 방법.

청구항 9

청구항 4에 있어서, 상기 동결 보존은 동결 보호 성분을 첨가한 배지에서 수행되는 줄기세포의 동결 보존 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 동결 보호 성분은 디메틸설폭사이드(DMSO), 글루코스, 수크로스 및 에틸렌글리콜 중 적어도 하나인 줄기세포의 동결 보존 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물 및 이를 이용한 동결 보존 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 줄기세포는 자가재생 능력, 다분화능 능력 및 면역 조절 특성 등으로 인해 재생 의학에서 이상적인 후보물질로 부상했다. 다양한 조직에서 분리된 줄기세포 중에서도 치아의 도내로부터 분리된 줄기세포(DP-MSCs)는 치과에서 폐기되는 이로부터 쉽게 얻을 수 있어 치료용 줄기세포로서 큰 잠재력을 보여주고 있다. 줄기세포를 치료용으로 충분한 수로 확보하기 위해서는 줄기세포의 체외 확장이 필요하다. 그러나 신선하게 분리된 줄기세포는 한정된 수가 있으며 짧은 시간 내에 충분한 수의 세포를 생산하지 못할 수 있다. 따라서 줄기세포의 장기 보존을 위해서는 신뢰할 수 있는 기술이 필요하다. 줄기세포의 동결 보존은 이러한 요구를 충족시키는 신뢰할 수 있는 기술 중 하나이다.

[0004] 줄기세포의 동결 보존에는 다양한 보호물질이 사용된다. 보통은 세포막을 통과할 수 있는 성분인 DMSO, 에틸렌글리콜 및 글리세린 등의 투과성 보호제와 세포 외부 얼음 생성을 억제하는 설탕류인 트레할로스, 수크로스, 소르비톨 등의 비투과성 보호제를 사용한다. DMSO와 같은 투과성 보호제는 세포를 보호하고 세포의 동결 보존을 용이하게 한다. 그러나 DMSO는 세포의 세포학적 및 유전적 특성을 변경할 수 있으며, 동물 세럼은 저해를 유전적 항원 및 병원체를 전송할 수 있는 잠재적 위험이 있다. 이러한 제한 사항을 해결하기 위해 다양한 대안 보호제가 탐구되고 있다. 예를 들어, DMSO와 세럼을 사용하지 않는 혼합 용액이 줄기세포의 동결 보존을 위한 유망한 옵션으로 개발되었다.

[0005] 그러나 현재의 연구에서는 동결/해동 스트레스에 의해 유발되는 세포학적 손상을 완전히 해결하지 못하고 있다. 따라서 세포의 생존 및 증식뿐만 아니라 줄기세포의 정착 및 이식 특성에도 중요한 역할을 하는 보호제의 개발이 줄기세포의 동결 보존을 개선하는 데 필수적이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2023-0054975호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 줄기세포의 동결 보존시에 사멸을 줄이고 줄기세포능을 유지할 수 있도록 하는 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 상기 조성물을 이용한 줄기세포의 동결 보존 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 스펡고신-1-포스페이트를 포함하는 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 줄기세포는 탯줄, 치아조직, 지방조직, 골수, 제대혈, 말초혈액, 또는 활액 유래의 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물.
- [0014] 4. 줄기세포를 위 1 내지 3 중 어느 한 항의 조성물로 전처리하는 단계; 및
- [0015] 상기 전처리된 줄기세포를 동결 보존하는 단계를 포함하는 줄기세포의 동결 보존 방법.
- [0016] 5. 위 4에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 방법.
- [0017] 6. 위 4에 있어서, 상기 줄기세포는 탯줄, 치아조직, 지방조직, 골수, 제대혈, 말초혈액, 또는 활액 유래의 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 동결 보존 방법.
- [0018] 7. 위 4에 있어서, 상기 전처리는 상기 조성물을 줄기세포 배양 배지에 첨가하여 수행되는 줄기세포의 동결 보존 방법.
- [0019] 8. 위 4에 있어서, 상기 전처리는 줄기세포의 동결 보존 30분 내지 24시간, 30분 내지 12시간, 30분 내지 6시간, 30분 내지 3시간, 30분 내지 2시간 전에 수행되는 줄기세포의 동결 보존 방법.
- [0020] 9. 위 4에 있어서, 상기 동결 보존은 동결 보호 성분을 첨가한 배지에서 수행되는 줄기세포의 동결 보존 방법.
- [0021] 10. 위 9에 있어서, 상기 동결 보호 성분은 디메틸설폭사이드(DMSO), 글루코스, 수크로스 및 에틸렌글리콜 중 적어도 하나인 줄기세포의 동결 보존 방법.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 조성물 및 방법은 줄기세포의 동결 보존시의 세포 생존율을 증가시킬 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물 및 방법은 줄기세포의 동결 보존시의 줄기세포능 감소를 억제한다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1. 중간엽 줄기세포(MSCs)의 표면 마커 발현 및 분화 능력에 대한 특성화. MSCs는 유세포 분석을 사용하여 다양한 마커의 발현을 분석하고, 지방세포, 골세포, 연골세포로의 분화 능력은 관련 표지의 양성 발현에 의해 평가되었다. (A) MSCs는 MSCs의 특성과 일치하게 CD44, CD73, CD90, CD105, 및 MHC class I를 발현했다. MSCs는 또한 일반적으로 MSCs에는 발현되지 않는 CD34, CD45, 및 MHC class II를 발현하지 않았다. (B) MSCs는 지방형성 (오일 레드 O), 골형성 (알리자린 레드), 및 연골형성 (알시안 블루)의 염색에 의해 보여진 것처럼 중간 극분화 능력을 나타냈다. 척도 막대의 크기는 100 μ m를 나타내며, 한 유닛은 100 μ m를 나타낸다.
- 도 2. S1P 처리가 DP-MSCs의 투여전 자가증식 및 세포 사멸 표지자의 mRNA 상대 수준 및 세포 생존율에 미치는 영향. (A,B) S1P (10 μ M) 처리 후 1 시간 동안의 DP-MSCs에서 다능성 표지자 (NANOG 및 OCT4) 및 세포 사멸 표지자 (BAK 및 BAX)의 상대 mRNA 수준은 RT-qPCR에 의해 분석되었다. S1P 처리는 NANOG, OCT4, BAK 및 BAX의 mRNA 수준에 유의한 영향을 미치지 않았다. (C) WST-1 분석을 사용하여 S1P 처리가 세포 생존율에 미치는 효과를 평가하였다. S1P 처리는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시된다 (n = 3). 통계적 유의성은 대조군(비처리 DP-MSCs)과 비교하여 t-검정을 사용하여 결정되었다.
- 도 3. 동결/해동 후 DP-MSCs의 증식 특성. (A) 배양판에 동결/해동 후 3일 후 DP-MSCs의 형태학적 특성 (척도 막대, 200 μ m; 확대, 40배). (B) PDT를 계산하여 해동 및 배양 후 24시간에 DP-MSCs의 증식 특성. S1P→C로 동결 보존된 DP-MSCs는 DMSO와 카테일로 동결 보존된 DP-MSCs에 비해 유의하게(p < 0.05) 향상된 증식 특성을 보여 낮은 PDT를 나타냈다. 데이터는 세 개의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타내며, 서로 다른 문자(a-

c)는 그룹 간의 통계적 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

도 4. 동결/해동 후 DP-MSCs의 세포 생존율. (A) 동결 후 0시간에 DP-MSCs의 세포 생존율을 결정하기 위해 트립판 블루 염색에서 무색의 세포 수를 사용하였다. (B,C) 세포 사멸을 위해 DP-MSCs는 Annexin V-FITC/PI로 염색되었으며, 동결 후 24시간 후 배양 후 유세포 분석을 사용하여 분석되었다. S1P→C로 동결 보존된 DP-MSCs는 DMSO와 각테일로 동결 보존된 DP-MSCs에 비해 유의하게($p < 0.05$) 향상된 생존율과 더 낮은 세포 사멸을 나타냈다. 데이터는 세 개의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타내며, 서로 다른 문자(a-d)는 그룹 간의 통계적 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

도 5. 동결/해동 후 DP-MSCs의 액틴 붕괴 및 부착 능력. (A,B) 동결 후 24시간 후의 DP-MSCs에서 염색된 F-actin (녹색, Alexa 488로 결합된 phalloidin) (척도 막대 = 100 μ m; 확대 = 100배). (C) 배양판에 시약이 비부착 세포의 수를 계산하여 DP-MSCs의 부착 능력을 측정하였다. S1P→C로 동결 보존된 DP-MSCs는 DMSO와 각테일로 동결 보존된 DP-MSCs에 비해 유의하게($p < 0.05$) 더 높은 부착 능력을 보여주며, 액틴 붕괴 수준이 낮았다. (A-C) 데이터는 세 개의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타내며, 서로 다른 문자(a-c)는 그룹 간의 통계적 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 조성물은 줄기세포의 동결 보존 전에 줄기세포에 처리되는 전처리용 조성물로서, 동결 및 해동 이후에도 줄기세포가 높은 생존율을 나타내고 줄기세포능을 유지하도록 할 수 있다.

[0031] 동결 시, 줄기세포 내 물 분자는 얼음 결정을 형성함으로써 물리적 손상을 야기하고, 물의 용매 기능을 상실하여 화학적 손상까지 초래하므로 동결 보존을 위해서는 동결 보호제를 사용하여야 한다. 하지만, 줄기세포의 기능과 구조에 중요한 역할을 담당하는 액틴 골격은 동결 보호제 사용에도 불구하고 동결 보존 시 손상된다.

[0032] 본 발명의 조성물은 동결 보존에 따른 액틴 골격 손상을 억제하여 세포의 기능적 구조적 안정성을 제공한다. 이에 줄기세포의 동결 보존 전에 해당 조성물을 처리하는 경우, 동결 보존에 따른 상기 문제점을 해소할 수 있다.

[0033] 줄기세포는 그 종류, 유래 등은 제한되지 않고 모든 줄기세포가 그 처리 대상일 수 있다. 줄기세포는 예를 들면 인간을 포함한 포유류 유래의 줄기세포일 수 있다. 줄기세포는 예를 들면 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 중간엽 줄기세포 등일 수 있다.

[0034] 중간엽 줄기세포의 경우 그 유래는 제한되지 않으며, 예를 들면 탯줄, 치아조직, 지방조직, 골수, 제대혈, 말초 혈액, 또는 활액 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 스펡고신-1-포스페이트를 포함한다.

[0036] 스펡고신-1-포스페이트는 줄기세포에 독성을 나타내지 않는 농도로 처리될 수 있다. 스펡고신-1-포스페이트는 조성물에 상기 독성을 나타내지 않는 농도로 포함될 수도 있고, 조성물에는 고농도로 포함되고 처리시에는 희석되어 처리될 수도 있다.

[0037] 줄기세포에 처리되는 스펡고신-1-포스페이트의 농도는 예를 들면 1 μ M 내지 50 μ M, 1 μ M 내지 30 μ M, 1 μ M 내지 20 μ M, 2 μ M 내지 20 μ M, 5 μ M 내지 20 μ M, 5 μ M 내지 15 μ M 일 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물은 줄기세포 배양 중에 배지에 처리될 수 있다. 본 발명의 조성물은 스펡고신-1-포스페이트 및 용매만 포함할 수 있다. 용매는 물 등일 수 있다.

[0039] 또한, 줄기세포를 본 발명의 조성물에 처리할 수도 있다. 그러한 경우, 본 발명의 조성물은 스펡고신-1-포스페이트 외에 줄기세포 배양에 포함되는 일반적인 성분들을 더 포함하는 것일 수도 있다.

[0040] 본 발명의 조성물은 동결 보존되기 전에 처리되는 것으로, 예를 들면 30분 내지 24시간, 30분 내지 12시간, 30분 내지 6시간, 30분 내지 3시간, 30분 내지 2시간 전에 처리될 수 있다.

- [0042] 또한, 본 발명은 줄기세포의 동결 보존 방법에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명의 방법은 줄기세포를 상기 줄기세포의 동결 보존 전처리용 조성물로 전처리하는 단계; 및 상기 전처리된 줄기세포를 동결 보존하는 단계를 포함한다.
- [0044] 줄기세포는 그 종류, 유래 등은 제한되지 않고 모든 줄기세포가 그 처리 대상일 수 있다. 줄기세포는 예를 들면 인간을 포함한 포유류 유래의 줄기세포일 수 있다. 줄기세포는 예를 들면 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 중간엽 줄기세포 등일 수 있다.
- [0045] 중간엽 줄기세포는 그 유래는 제한되지 않으며, 예를 들면 치수, 지방, 골수, 제대혈, 또는 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0046] 줄기세포에 처리되는 스펡고신-1-포스페이트의 농도는 예를 들면 1 μM 내지 50 μM , 1 μM 내지 30 μM , 1 μM 내지 20 μM , 2 μM 내지 20 μM , 5 μM 내지 20 μM , 5 μM 내지 15 μM 일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 줄기세포 배양 중에 배지에 처리될 수 있다. 본 발명의 조성물은 스펡고신-1-포스페이트 및 용매만 포함할 수 있다. 용매는 물 등일 수 있다.
- [0048] 또한, 줄기세포를 본 발명의 조성물에 처리할 수도 있다. 그러한 경우, 본 발명의 조성물은 스펡고신-1-포스페이트 외에 줄기세포 배양에 포함되는 일반적인 성분들을 더 포함하는 것일 수도 있다.
- [0049] 상기 전처리는 예를 들면 동결 보존 30분 내지 24시간, 30분 내지 12시간, 30분 내지 6시간, 30분 내지 3시간, 30분 내지 2시간 전에 수행될 수 있다. 상기 전처리 이후에 동결 보존이 수행되는 것으로, 상기 기재된 시간이 전처리 수행 시간일 수 있다.
- [0050] 이후, 상기 전처리된 줄기세포를 동결 보존한다.
- [0051] 동결 보존은 상기 줄기세포를 동결 배지에 넣고 동결함으로써 수행될 수 있다.
- [0052] 동결 보존 수단, 조건 등은 제한되지 않고, 당 분야에 공지된 방법에 의할 수 있다. 예를 들면 -60°C 내지 -100°C 로 -0.5°C 내지 -2°C /분의 속도로 냉각시킬 수 있다.
- [0053] 동결 배지는 줄기세포 배양용 배지에 동결 보호 성분을 첨가한 것일 수 있다.
- [0054] 줄기세포 배양용 배지로는 당 분야에 공지된 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면, DMEM 등의 기본 배지일 수 있다. 또한, 배지는 기본 배지에 혈청(예를 들면 소태아혈청), 글루타민, 항생제 등이 더 첨가된 것일 수 있다.
- [0055] 동결 보호 성분으로는 당 분야에 공지된 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면 디메틸설폭사이드(DMSO), 글루코스, 수크로스, 에틸렌글리콜 등일 수 있다. 이는 단독 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수 있다.
- [0056] 동결 보호 성분의 농도는 예를 들면 0.1 μM 내지 5 μM , 0.2 μM 내지 3 μM , 0.2 μM 내지 2 μM 등일 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은 줄기세포의 동결 보존용 조성물에 관한 것이다.
- [0059] 줄기세포는 전술한 예시 중에 해당하는 것일 수 있다.
- [0060] 본 발명의 조성물은 스펡고신-1-포스페이트를 포함한다.
- [0061] 스펡고신-1-포스페이트는 줄기세포에 독성을 나타내지 않는 농도로 처리될 수 있다. 스펡고신-1-포스페이트는 조성물에 상기 독성을 나타내지 않는 농도로 포함될 수도 있고, 조성물에는 고농도로 포함되고 처리시에는 희석되어 처리될 수도 있다.
- [0062] 줄기세포에 처리되는 스펡고신-1-포스페이트의 농도는 예를 들면 1 μM 내지 50 μM , 1 μM 내지 30 μM , 1 μM 내지 20 μM , 2 μM 내지 20 μM , 5 μM 내지 20 μM , 5 μM 내지 15 μM 일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 조성물은 줄기세포 배양용 배지에 상기 스펡고신-1-포스페이트를 첨가한 것일 수 있다.
- [0064] 줄기세포 배양용 배지로는 당 분야에 공지된 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면, DMEM 등의 기본 배지일 수 있다. 또한, 배지는 기본 배지에 혈청(예를 들면 소태아혈청), 글루타민, 항생제 등이 더 첨가된 것일 수

있다.

[0065] 본 발명의 조성물은 당 분야에 공지된 동결 보호 성분을 더 포함할 수 있다. 예를 들면 디메틸설폭사이드 (DMSO), 글루코스, 수크로스, 에틸렌글리콜 등일 수 있다. 이는 단독 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수 있다.

[0066] 동결 보호 성분의 농도는 예를 들면 0.1 μM 내지 5 μM , 0.2 μM 내지 3 μM , 0.2 μM 내지 2 μM 등일 수 있다.

[0068] 또한, 본 발명은 줄기세포의 동결 보존 방법에 관한 것이다.

[0069] 본 발명의 방법은 줄기세포를 상기 줄기세포의 동결 보존용 조성물에 넣고 동결 보존하는 단계를 포함한다.

[0070] 줄기세포는 전술한 예시 중에 해당하는 것일 수 있다.

[0071] 동결 보존 수단, 조건 등은 제한되지 않고, 당 분야에 공지된 방법에 의할 수 있다. 예를 들면 -60°C 내지 -100°C 로 -0.5°C 내지 -2°C /분의 속도로 냉각시킬 수 있다.

[0073] 실시예

[0074] 재료 및 방법

[0075] 달리 명시되지 않는 한, 이 연구에 사용된 모든 화학물질과 배지는 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA) 및 Gibco(Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA)에서 각각 구입했다.

[0076] DP-MSCs 준비

[0077] 치수 유래 MSCs(DP-MSCs)는 사람의 치수 조직으로부터 분리되었다. 간단히 말해서, 세 번째 어금니는 18.5 ± 2.3 세의 기증자로부터 수집되었고, 국립 창원 경상대학교병원 구강악안면외과에서 기관윤리심의위원회의 승인을 거쳐 기부자들의 조직 기증(GNUH-IRB-2018-11-002-001)에 대한 서면 동의를 얻었다. 치수 조직은 뼈 검자로 골절 후 치관으로부터 무균 상태로 분리하고 세척한 후 페니실린-스트렙토마이신 1%(각각 10,000 IU 및 10,000 $\mu\text{g/mL}$, Pen-Strep)를 함유한 Dulbecco's 인산염 완충 식염수(DPBS)로 세척했다. 그런 다음 조직을 멸균 가위를 사용하여 작은 조각(약 1mm^3)으로 자르고 1 mg/mL 콜라게나아제 I을 사용하여 37°C 에서 60분간 처리하여 세포 외 기질을 분해하고 세포를 방출했다. 분해 후, 단일 세포 현탁액을 얻기 위해 세포 현탁액을 100 μm 및 40 μm 세포 스트레이너(Falcon[®]; Corning, Inc., 뉴욕, NY, USA)를 서서히 통과시켜 수집했다. 마지막으로, 수확된 세포는 100 mm 플라스틱 배양 접시에 고급 Dulbecco's 조정된 이글 용매 (ADMEM)를 함께 넣고, 10% 소 태아 혈청 (FBS), 1% GlutaMAX 및 1% Pen-Strep를 보충했다. 세포는 25T 플라스크(Nunc제, Roskilde, Denmark)에 37°C 에서 5% CO_2 함유 환경에서 배양하고, 3일마다 배지를 교체했다. 세포가 80-90% 합류에 도달하면 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 접시에서 세포를 분리하고 더 확장하여 균질한 세포를 얻었다. DP-MSCs는 3-5번 계대에서 실험에 사용되었다.

[0079] DP-MSCs의 특성 분석

[0080] MSCs의 마커 발현을 평가하기 위해, 세포는 트립신화를 통해 수확되고 DPBS로 세척되었다. 그런 다음, 세포들은 MSC 마커 CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대한 형광으로 표지된 항체들과 CD34, CD45, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II에 대한 항체와 함께 어두운 곳에서 4°C 에서 30분 동안 반응시키고, 유세포 분석을 사용하여 분석되었다. 데이터는 표준 유세포 분석 소프트웨어 (BD FlowJo[™] 소프트웨어 v10)를 사용하여 각 마커를 발현하는 세포의 백 분율을 결정하기 위해 분석되었다. 줄기세포들의 기질 계통으로의 분화능력을 조사하기 위해, DP-MSCs는 골모세포, 지방세포 및 연골세포로 분화되었다. 간략히 말해서, 세포들은 각각 지방세포 (10% FBS, 100 μM indomethacin, 10 μM insulin 및 1 μM dexamethasone가 포함된 DMEM), 골모세포 (10% FBS, 10 nM dexamethasone, 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid 및 10 mM sodium α -glycerophosphate가 포함된 DMEM) 및 연골세포 (STEMPROTM 연골 형성 분화키트) 분화배지에 21일간 배양되었다. 지방형성은 오일 레드 O 용액으로 염색하여 지질방울의 형성으로 확인되었다. 골형성은 알리자린 레드로 염색하여 칼슘 침착의 존재로 확인되었다. 연골형성

은 알시안 블루로 염색하여 프로테오글리칸의 존재로 확인되었다.

[0082] qRT-PCR

[0083] 다분화능 마커 (NANOG 및 OCT4) 및 세포 사멸 마커 (BAK 및 BAX)의 상대적 mRNA 발현 수준은 세 번 반복하여 qRT-PCR로 분석되었다. 10 μ M의 MS1P (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하거나 또는 사용하지 않고 1시간 동안 배양배지에서 처리된 DP-MSCs의 총 RNA는 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, South Korea)을 사용하여 추출되었다. RNA는 OPTIZEN NANO Q 분광광도계 (Mecasys, Daejeon, South Korea)를 사용하여 정량되었으며, 500 ng의 RNA를 사용하여 cDNA가 HiSenScript™ RH(-) RT PreMix Kit (iNtRON Biotechnology)을 사용하여 합성되었다. qRT-PCR은 특정 프라이머 및 RealMOD™ Green AP 5x qPCR 혼합물 (iNtRON Biotechnology)을 사용하여 수행되었다. PCR 반응 주기는 초기 활성화가 95℃에서 12 분 동안 진행되고, 이어지는 40 사이클의 PCR이 95℃에서 15초, 60℃에서 25초, 72℃에서 25초 동안 진행되었다. 증폭 곡선, 용융 곡선 및 사이클 임계 값 (Ct 값)은 Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Qiagen, Helden, Germany)을 사용하여 분석되었다. Ct 값은 ACTB 유전자의 발현 수준에 정규화되었으며, 재현성을 보장하기 위해 모든 샘플은 삼중 복제로 분석되었다. 상대적 mRNA 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산되었다. 이 연구에서 사용된 프라이머는 표 1에 나열되어 있다.

[0085] RT-PCR를 통한 전사 인자, 세포사멸 관련 유전자 및 배양된 DP-MSCs의 평가에 사용된 프라이머 목록

표 1

Gene	Primer Sequence	Product Size (bp)	Accession No.
OCT4	F: AAGCAGCGACTATGCACAAC R: AGTACAGTGCAGTGAAGTGAGG	140	NM_002701.5
NANOG	F: GCAGATGCAAGAAGTCTCCAAC R: CTGCGTCACACCAATTGCTATTC	133	AB093576.1
BAX	F: TCTGACGGCAACTTCAACTG R: AGTCCAATGTCCAGCCCATG	127	NM_001291428.1
BAK	F: GGCACCTCAACATTGCATGG R: CAGTCTCTTGCCTCCCAAG	144	NM_001188.3
GAPDH	F: AGTCAGCCGCATCTTCTTTT R: CCAATACGACCAATCCGTT	97	NM_002046.5

[0086] OCT4, octamer-binding transcription factor 4; BAX, Bcl-2-associated X protein; BAK, Bcl2-antagonist/killer.

[0088] MSCs의 동결 보존 및 해동

[0089] DP-MSCs는 1 mL 동결 보호제에 1 X 10⁶ 세포/mL의 농도로 재현탁되고, 1.8 mL 냉동 바이알(Thermo Fisher Scientific)로 옮겼다. 냉동 바이알은 동결보관용기(Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1℃ 냉동 용기, Thermo Fisher Scientific)에서 25℃에서 -80℃까지 대략 -1℃/분으로 냉각시켰고 즉시 액체질소 (LN2)에 담겼다. 세포는 5개의 실험그룹으로 나뉘었다. 동결 보존되지 않은 DP-MSCs(신선, 대조군); 10% DMSO 및 10% FBS를 포함하는 ADMEM(DMSO)를 사용하는 통상적인 방법으로 동결 보존된 DP-MSCs; 0.05M 글루코스, 0.05M 수크로스 및 1.5M 에틸렌글리콜을 포함하는 각테일 용액(ADMEM)으로 동결 보존된 DP-MSCs; 동결 1시간 전에 배지에 S1P를 첨가(10 μ M)를 하고 각테일 용액과 함께 동결 보존된 DP-MSCs (S1P→C);

[0090] 및 S1P가 첨가된 각테일 용액으로 동결 보존된 DP-MSCs(C + S1P). 동결 보존된 DP-MSCs를 순환수조에서 37℃ 1 분간 해동하고, 배양액으로 세척하여 동결 보호제를 제거한다. 세포 생존율, 세포는 즉시 0.4% 트립판 블루로 염색되고 그 비율은 트립판 블루를 제외한 생존 가능한 세포는 카운터스 자동 세포 계수기(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 의해 계산되었다. 추가 분석을 위해 모든 그룹의 DP-MSCs는 배양 플레이트에 시딩하고 24 시간 동안 배양했다.

[0092] 세포 생존율 및 증식 분석

[0093] SIP 처리 후 DP-MSCs의 생존력을 조사하기 위해 WST-1 분석은 다음과 같이 수행했다. 간단히 설명하면, DP-MSCs를 96-웰 플레이트에 시딩하고 96-웰 플레이트에 5×10^3 세포/웰의 밀도로 세포를 시드하고 24시간 동안 배양한 다음 $10 \mu\text{M}$ SIP의 유무에 관계없이 처리했다. 1시간 처리 후, WST-1 시약(Abcam, #ab65475)를 각 웰에 첨가하고 세포를 37°C 에서 2시간 동안 배양한 후 흡광도를 VersaMax[®] Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 측정했다.

[0094] 신선 또는 동결/해동 후의 DP-MSCs 초기 및 후기 세포사멸 비율을 평가하기 위해 다음을 수행했다. Annexin V-요오드화 프로피듐(PI) 분석은 죽은 세포 세포사멸 키트(Invitrogen, #V13242)로 수행했다. 간단히 말해, 세포를 24-웰 세포 배양 플레이트(5×10^4 세포/웰 밀도)에 시드했다. 수확한 배양 24시간 후 세포를 Annexin V-FITC(50 L/mL 및 100 L/mL)로 염색하고 세포는 즉시 FACSVerse[®] 유세포 분석기(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 및 FlowJo 10.1.0 소프트웨어를 사용했다. 각 샘플당 최소 10,000개의 세포가 계수되었다.

[0095] 증식을 위한 세포 주기 시간을 조사하기 위해 인구 배가 시간(PDT)을 사용했다. 요약하면, 신선 또는 동결/해동 후 DP-MSCs를 24-웰 배양 플레이트에서 삼중 배양(2×10^3 세포/웰 밀도)한 후 7일간 배양했다. 세포 수는 혈구 계수기로 측정했다. DP-MSCs의 PDT는 다음 공식을 사용하여 계산했다: $\text{PDT} = t(\log 2)/(\log N_t - \log N_0)$, 여기서 t = 배양 시간, N_0 = 초기 0 시점의 세포 수, N_t = t 시점의 세포 수이다.

[0097] F-액틴 염색

[0098] 신선 또는 동결/해동 후 DP-MSCs를 12 mm 유리 커버슬립(SPL Life Sciences, 포천, 대한민국)에 시딩한 후 인큐베이터(37°C , 24시간)에서 배양했다. 세포를 실온에서 15분 동안 PBS내 4% 파라포름알데히드로 고정하고 PBS내 0.1% Triton[™] X-100에서 추가로 15분간 투과했다. PBS로 세척한 후, 고정된 세포를 Alexa Fluor[™] 488 팔로이딘(Invitrogen)으로 염색했다. 장착을 위해 세포가 포함된 커버슬립을 다음과 같이 처리했다.

[0099] VECTASHIELD[®] 안티페이드 마운팅 배지(Vector Laboratories, Newark, CA, USA)로 처리한 다음 슬라이드에 배치했다. 염색된 세포는 니콘 이클립스 Ti-U(Nikon Corporation, Tokyo, Japan)로 이미지화 했다. 액틴 세포골격 파괴로 파괴된 세포 수와 불안정한 형태를 가진 세포의 수가 총 세포 수와 함께 수동으로 계산되었다. 액틴 파괴의 백분율은 파괴된 세포의 수를 총 세포 수로 나눈 다음 100을 곱하여 계산되었다.

[0101] 세포 부착 분석

[0102] 신선 또는 동결/해동 후 DP-MSCs를 6-웰 세포 배양 플레이트(1×10^5 세포/웰 밀도)에 시드하고 및 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포가 부착되지 않은 배양 배지를 수집하고 원심분리(350g, 5분)했다. 비부착 세포의 수는 혈구세포계를 사용하여 수동으로 세었다. 세포부착의 백분율은 다음 공식에 따라 계산되었다: $(\text{시드된 세포 수} - \text{비부착 세포 수}) \times 100 / \text{시드된 세포 수}$.

[0104] 통계 분석

[0105] 모든 실험 데이터는 GraphPad Prism version 8을 사용하여 분석되었으며, 통계 차이는 t-검정 및 일원 분산 분석(ANOVA)에 의해 분석되었고, 뒤이어 Tukey의 다중 비교 검정을 실시하였다. 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표시되고, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의하였다.

[0107] 결과

[0108] 표면 마커 발현 및 분화 가능성에 따른 DP-MSCs의 특성 분석

[0109] 사람의 치아 치수에서 분리한 DP-MSCs는 세포 표면의 특징과 마커 발현과 중배엽 계통으로의 분화 가능성을 확인했다. 유세포 분석 결과, 분리된 DP-MSCs의 MSCs 표현형은 다음과 같이 밝혀졌다. 양성 MSCs 마커(CD44,

CD73, CD90, CD105 및 MHC 클래스 I)의 발현 및 음성 마커(CD34, CD45 및 MHC 클래스 II)의 발현이 낮거나 전혀 없다(도 1A). DP-MSCs의 중배엽 계통 분화 잠재력은 계통 특이 유도 배지를 사용하여 지방세포, 골세포 및 연골세포의 분화 유도를 통해 평가되었다. 분화된 세포들은 이후 아디포사이트 내의 지질방울을 표시하기 위해 오일 레드 O, 골세포 내의 칼슘 침전을 나타내기 위해 알리자린 레드, 연골세포 내의 프로테오글리칸 생성을 나타내기 위해 알시안 블루로 염색되었다(도 1B). 모든 MSC 그룹은 중배엽 계통으로 성공적으로 분화되었고 모든 관련 세포에 대해 양성 염색 발현을 보였다. 성공적인 분화 유도 및 DP-MSCs의 특성 분석을 통해 중간엽 줄기세포의 특성을 확인했다.

[0111] SIP 처리는 DP-MSCs의 생존 가능성과 줄기성에 부정적인 영향을 미치지 않는다.

[0112] DP-MSCs에 SIP 처리의 안전성을 평가하기 위해 다능성 표지자(NANOG 및 OCT4)와 세포 자포 표지자(BAK 및 BAX)의 상대 mRNA 발현 수준을 1시간 동안 SIP에 노출한 후에 측정했다. SIP 처리는 대조군과 비교하여 NANOG, OCT4, BAK 및 BAX의 발현 수준에 차이가 없었다(도 2A, B). SIP 처리 후 24시간 동안 세포 생존율을 분석하기 위해 WST-1 분석을 수행했으며, 세포 생존율에 부정적인 영향이 없음을 발견했다(도 2C). 이러한 결과는 SIP 처리가 DP-MSCs에 안전하다는 강력한 증거를 제공한다.

[0114] SIP 전처리를 통해 동결/해동 후 DP-MSCs의 세포 생존력 향상

[0115] 다양한 방법의 보존 가능성을 평가하기 위해 해동 후 24시간 동안 배양한 후 DP-MSCs의 생존율과 형태를 분석했다. 모든 그룹의 DP-MSCs에서 주사 섬유아세포와 유사한 형태가 관찰되었으며, 이는 보존 과정으로 인한 세포 형태의 중대한 변화가 없음을 나타낸다. 배양 3일 후, SIP→C 및 C + SIP로 보존된 DP-MSCs는 DMSO 및 각테일로 보존된 것보다 높은 결합도를 보여주었다(도 3A). 신선한 또는 동결/해동 후의 DP-MSCs의 배로 시간을 계산하였으며, 결과는 DMSO ($37.63 \pm 1.1\%$), 각테일 ($37.8 \pm 1.9\%$), C + SIP ($35.4 \pm 0.9\%$)로 보존된 DP-MSCs가 대조군($31.7 \pm 0.8\%$)과 비교하여 유의하게 ($p < 0.05$) 2배로 증가하는 시간이 더 길었다. 그러나 SIP→C로 보존된 DP-MSCs의 2배로 증가하는 시간($34.2 \pm 1.2\%$)은 대조군과 유의미하게 다르지 않았으며, DMSO 및 각테일로 보존된 것보다 유의하게 ($p < 0.05$) 짧았다(도 3B).

[0116] 동결/해동 후 DP-MSCs의 생존율은 DMSO($85.7 \pm 2.8\%$), 각테일($84.0 \pm 1.0\%$), C + SIP($88.5 \pm 1.0\%$)에서 트립판 블루 염색을 통해 측정한 결과 대조군($95.6 \pm 0.9\%$)에 비해 현저히 낮은 것으로 나타났다. 그러나 SIP→C로 동결 보존된 DP-MSCs의 생존율($91.4 \pm 2.7\%$)은 대조군($91.4 \pm 2.7\%$)과 큰 차이가 없었다. 대조군보다 유의하게($p < 0.05$) 높았으며, DMSO 및 각테일(도 4A). DP-MSCs의 동결/해동 후 24시간 배양 후 DP-MSCs의 초기 및 후기 세포사멸 세포의 비율을 Annexin V-FITC 및 PI로 염색한 후 유세포 분석법을 사용하여 측정했다. DMSO($4.4 \pm 1.0\%$)와 각테일($4.7 \pm 0.9\%$)에서 초기 세포사멸 세포(Annexin V+/PI-)의 비율은 대조군($2.5 \pm 0.4\%$)보다 유의하게($p < 0.05$) 높았다. 그러나 SIP→C ($3.0 \pm 0.2\%$) 및 C + SIP ($3.6 \pm 0.4\%$)의 초기 세포 사멸 세포 비율은 대조군과 큰 차이가 없었다. 모든 동결 보존 그룹(DMSO, $3.6 \pm 0.4\%$; 각테일, $4.4 \pm 0.5\%$; SIP→C, $2.3 \pm 0.2\%$ 및 C + SIP, $3.3 \pm 0.4\%$)에서 후기 세포사멸 세포(Annexin+/PI+)의 비율은 대조군($1.3 \pm 0.2\%$)보다 유의하게($p < 0.05$) 높았다. 그럼에도 불구하고, SIP→C로 동결 보존된 DP-MSCs에서 후기 세포사멸 세포의 비율은 DMSO와 각테일로 동결 보존된 DP-MSCs보다 유의하게 ($p < 0.05$) 낮았다(도 4B,C).

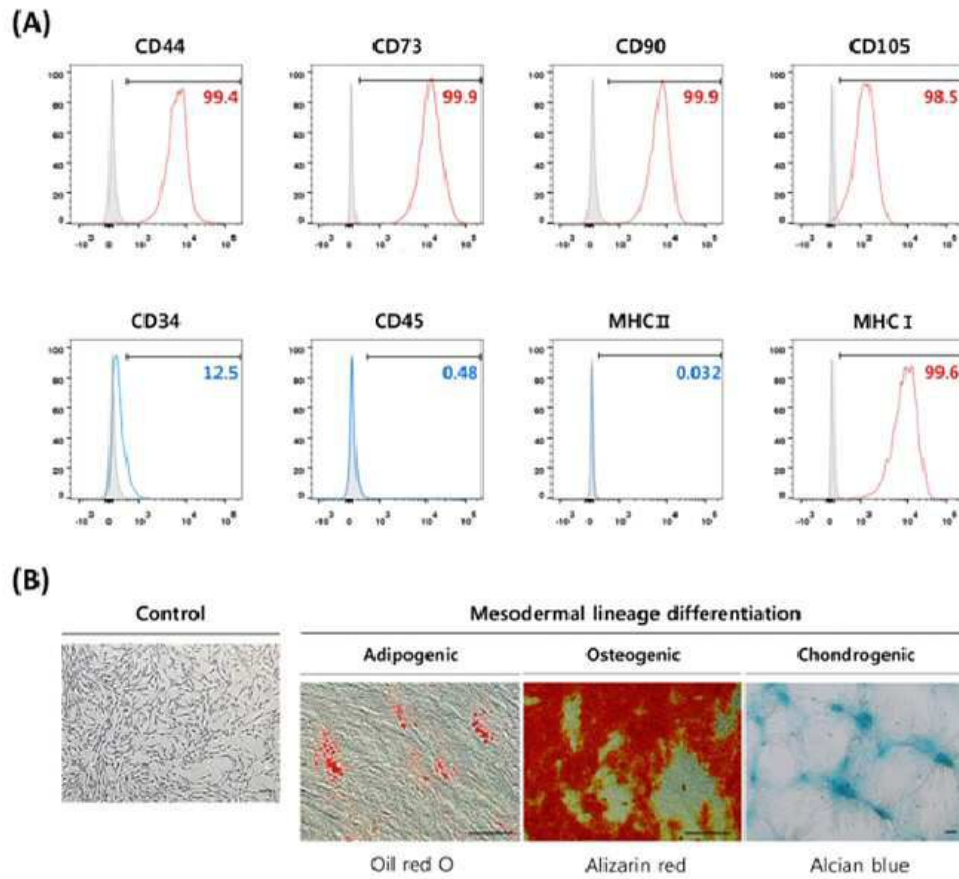
[0118] SIP 전처리를 통한 세포골격계 파괴 감소 및 접착능력 향상

[0119] DP-MSCs의 F-actin 염색은 Alexa Fluor 488 Phalloidin을 사용하여 신선한 상태 또는 동결/해동 후의 세포의 액틴 세포골격 변화를 평가하기 위해 수행되었다. 모든 그룹의 DP-MSCs는 시각적인 액틴 붕괴와 불안정한 모양을 가진 세포로 정의되는 파괴된 세포를 보여주었다(도 5A). DMSO ($9.3 \pm 2.8\%$) 및 각테일 ($9.9 \pm 3.6\%$)로 동결 보존된 DP-MSCs는 대조군($1.3 \pm 1.3\%$)과 비교하여 유의적인 액틴 붕괴 증가를 보였다($p < 0.05$). 그러나, SIP→C로 동결 보존된 DP-MSCs는 각테일과 비교하여 액틴 붕괴의 유의적으로 낮은 비율($3.6 \pm 0.1\%$)을 보였다(도 5B). 다른 말로, 다양한 그룹 간에 액틴 붕괴와 관련된 세포 수의 변동이 나타났다. 또한, 동결/해동 후 배양 후 세포 부착 능력이 평가되었다. DMSO ($77.8 \pm 2.2\%$)와 각테일 ($76.7 \pm 1.1\%$)로 동결 보존된 DP-MSCs는 대조군($85.2 \pm 1.7\%$)과 비교하여 유의적인 세포 부착 능력 감소를 보였다($p < 0.05$). 그러나, SIP→C로 동결 보존된 DP-MSCs는 각테일과 비교하여 유의적으로 더 높은 부착률($83.3 \pm 2.3\%$)을 보여주었으며, 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다(도 5C). 전체 결과는 다양한 매개변수 중 SIP가 DP-MSCs에 대한 안전한 세포보호 역

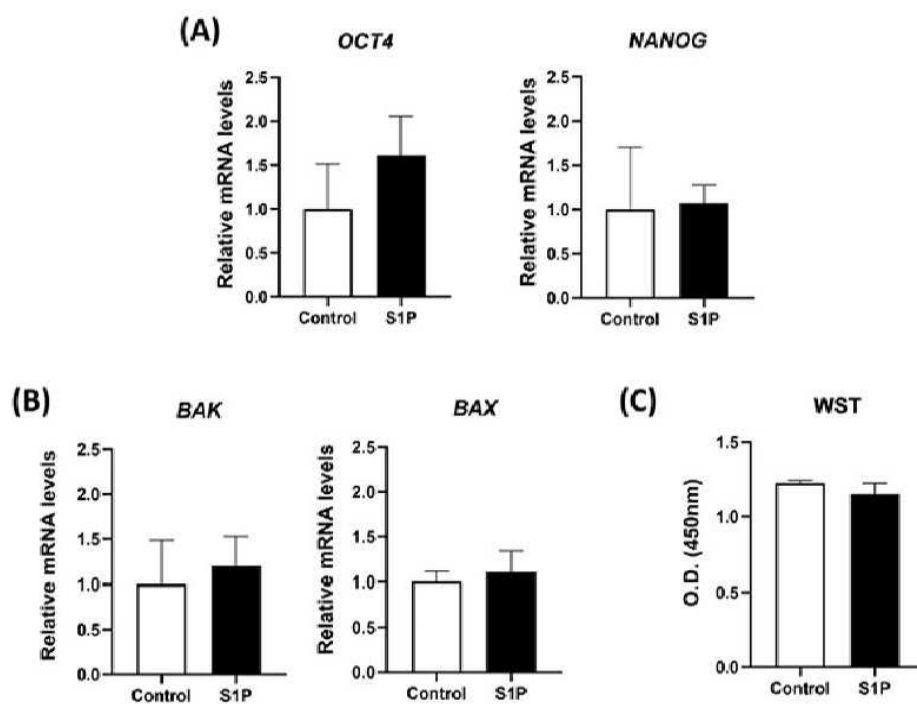
할을 갖고 있으며, 안전한 것으로 입증되었다는 것을 나타낸다.

도면

도면1

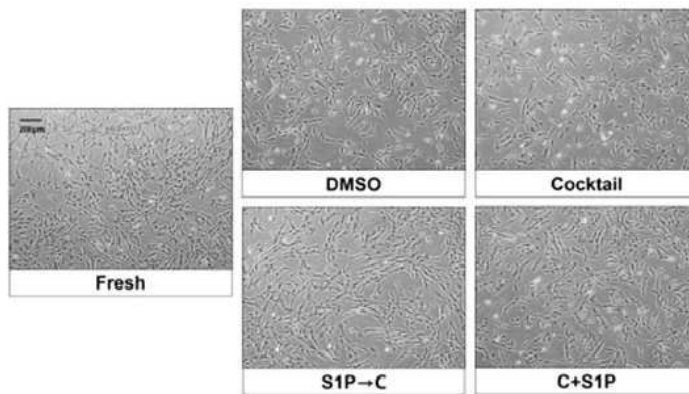


도면2

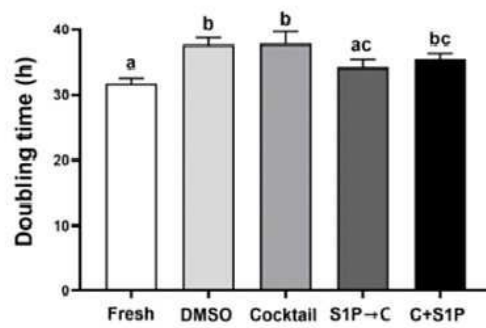


도면3

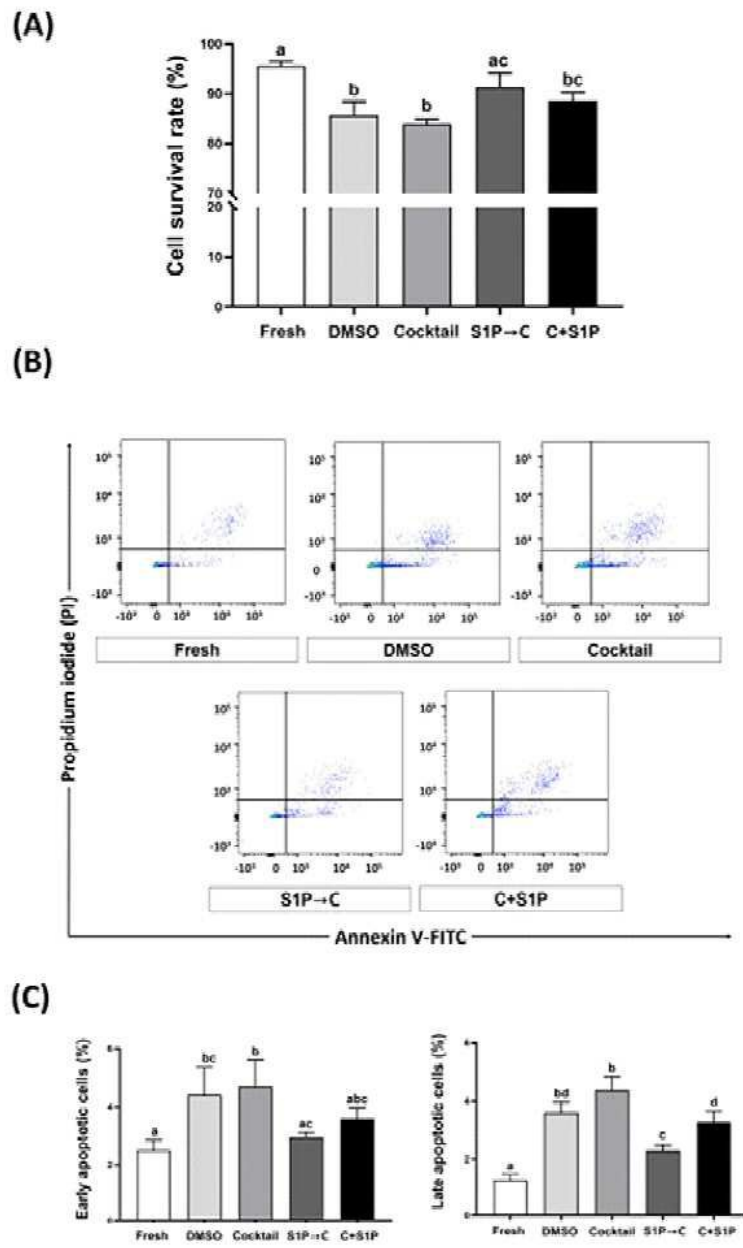
(A)



(B)

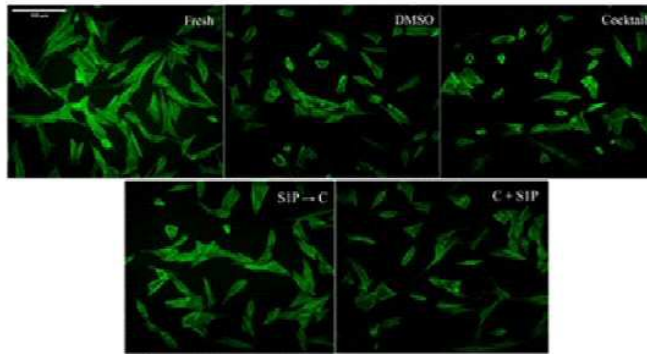


도면4

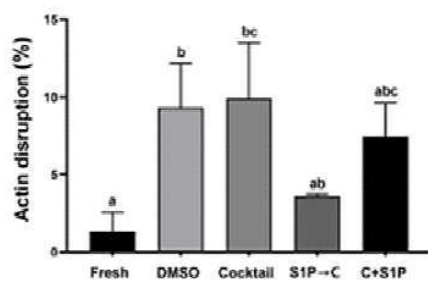


도면5

(A)



(B)



(C)

