

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0136606
(43) 공개일자 2023년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/20 (2006.01) A61K 31/734 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/20 (2013.01)
A61K 31/734 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7025603

(22) 출원일자(국제) 2022년01월28일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년07월26일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/004342

(87) 국제공개번호 WO 2022/163872

국제공개일자 2022년08월04일

(30) 우선권주장

JP-P-2021-013667 2021년01월29일 일본(JP)

JP-P-2021-167913 2021년10월13일 일본(JP)

(71) 출원인

국립대학법인 홋카이도 다이가쿠

일본 홋카이도 삿포로시 기따꾸 기따 8조 니시 5
조메

푸렉 가부시카가이사

일본 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89번지 1

모찌다 세이야쿠 가부시카가이사

일본 160-8515 도쿄도 신주쿠구 요즈야 1조메 7번
지

(72) 발명자

스도, 히데키

일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기따꾸 기따 8조
니시 5조메국립대학법인 홋카이도 다이가쿠 내

우케바, 다이스케

일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기따꾸 기따 8조
니시 5조메국립대학법인 홋카이도 다이가쿠 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수길, 이유리, 이석재

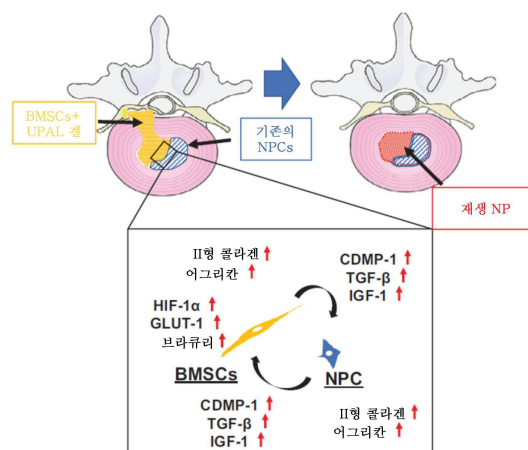
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 추간판 재생용 조성물

(57) 요약

저엔도톡신알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 추간판의 수핵 재생 촉진용 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명의 조성물은 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 추간판의 수핵 재생을 촉진한다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
A61P 19/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61L 2430/38 (2013.01)

(72) 발명자

야마다, 가즈히사

일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기따꾸 기따 8쵸
니시 5쵸메국립대학법인 홋카이도 다이가쿠 내

우라, 가츠로

일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기따꾸 기따 8쵸
니시 5쵸메국립대학법인 홋카이도 다이가쿠 내

스즈키, 히사타카

일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기따꾸 기따 8쵸
니시 5쵸메국립대학법인 홋카이도 다이가쿠 내

이요쿠, 유미

일본 6930021 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1
푸렉 가부시키키가이샤내

스야마, 다카시

일본 6930021 시마네켄 이즈모시 엔야쵸 89반치 1
푸렉 가부시키키가이샤내

명세서

청구범위

청구항 1

알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 중간판 재생용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 중간판의 수핵 재생을 촉진하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 간엽계 줄기 세포가, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상의 중간판에 적용하고, 적용 후에 조성물의 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접착시키도록 사용되고, 당해 적용 시에는 유동성을 갖는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 중간판의 수핵 부위에 적용하기 위한, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 수핵 부위로의 적용은, 수핵 결손부의 상기 조성물의 충전인, 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가교제가 2가 이상의 금속 이온 화합물인, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알긴산의 1가 금속염은, 저엔도톡신알긴산 1가 금속염인, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알긴산의 1가 금속염은, GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)이 8만 이상인, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 알긴산의 1가 금속염의 농도가 0.5w/w% 내지 5.0w/w%인, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위해서 사용되는, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 추간판 헤르니아, 추간판증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간판염, 변형성 척추증, 척추관 협착증 및 추간판 손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종인, 조성물.

청구항 15

알긴산의 1가 금속염과 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 포함하는 추간판 재생용 조성물이며, 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용되기 위한 추간판 재생용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용된 후에, 해당 조성물에 가교제를 접착시키지 않고 사용되는, 추간판 재생용 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 추간판의 수핵 재생을 촉진하는, 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포가, 적용 시에 미분화 상태이거나 및/또는 유도 분화의 처리없이 적용되는, 조성물.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, 조성물.

(a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다

(b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다

청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알긴산의 1가 금속염이, 저엔도톡신알긴산 1가 금속염인, 조

성물.

청구항 22

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알긴산의 1가 금속염은, GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)이 8만 이상인, 조성물.

청구항 23

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알긴산의 1가 금속염의 농도가 0.5w/w% 내지 5.0w/w%인, 조성물.

청구항 24

제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 추간관 변성 및/또는 추간관 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위해서 사용되는, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상이, 추간관 헤르니아, 추간관증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간관염, 만성 요통, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증에 수반하는 추간관 헤르니아(혼합성 요부 척주관 협착증) 및 추간관 손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종인, 조성물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상이, 만성 요통을 수반하는, 조성물.

청구항 27

제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 추간관성 통증을 억제하기 위해서 사용하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 추간관 재생용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 함유하는 추간관 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 등뼈(척추)는 24개의 뼈(추골)로 구성되어 있고, 그 추골과 추골 사이의 쿠션의 역할을 하는 조직을 추간관이라고 한다. 추간관은, 가령, 외상, 질병 등에 의해 변성, 손상이 발생한다. 추간관의 변성은 추간관의 세포수, 수분 함유량, 세포 외 매트릭스(타입II 콜라겐, 어그리칸 등) 등이 저하되고 있는 상태이며, 진행된다면 추간관의 쇼크 흡수체로서의 기능을 달성하지 못하게 된다. 추간관 변성 및 추간관 손상은, 구체적으로는 추간관 헤르니아, 추간관증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간관염, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 외상 등에 의한 추간관 손상 등이다. 예를 들어, 추간관 헤르니아에서는 수핵을 덮는 섬유륜이 변형 또는 균열을 발생시킴으로써 헤르니아를 형성해서 추간관 밖으로 돌출되고, 변형 또한 발생한 균열로부터 일탈한 수핵이 척수 신경을 압박하여, 통증, 마비 등을 일으킨다.

[0003] 추간관 헤르니아에 대한 치료 중 하나로 추간관 수핵 적출(절제)술이 있고, 일정한 효과가 확인되고 있다. 그러나, 추간관 수핵 적출(절제)술에서는, 추간관 수핵 적출술 후의 수술 부위에 처치를 실시하지 않기 때문에, 추간관의 변성 변화가 진행되는 경우가 있는 것이 알려져 있다. 추간관 수핵 적출술에서 수핵의 일부를 제거하면, 수핵 부위에 공동(본 명세서에 있어서 「결손부」라고도 한다)이 생긴다. 수핵에는 자기 수복능 및 재생능이 현저하게 낮기 때문에, 수핵의 공동은 물리적으로도 약해지기 쉽다. 또한, 공동 부분에는, 섬유아형 세포가 집적해서 본래의 수핵과는 역학적 특성이 다른 조직이 형성되는 경우가 있다. 이 때문에, 추간관 수핵 적출술 후에는 헤르니아의 재발률이 높다. 추간관 수핵 적출 후의 5년 이내의 재발률은 4 내지 15% 정도로 알려져 있지만, 최근 장기간 데이터에서는 10년 후에는 과반수가 재발되는 것을 알 수 있었다. 헤르니아가 재발하면 재

수술이 필요하게 되지만, 척수 신경은 1회째의 수술 후에 형성된 반흔 조직 속에 매몰되고 있고, 척수 신경의 위치를 확인하는 것이 곤란해진다.

[0004] 지금까지, 알긴산을 기반으로 한 고순도 경화성 겔을 개발하여, 겔 단독 투여(무세포)로도 추간판 조직이 자연 수복하는 것을 실증하고(특허 6487110호, Tsujimoto et al. , EBioMedicine 37(2018) 521-534), 20 내지 49세의 요추 추간판 헤르니아 환자에 대하여 헤르니아 적출술 후에 겔을 매식하는 임상 시험이 실시되고 있다.

[0005] 그런데, 간엽계 줄기 세포(Mesenchymal Stem Cells: MSC)는 세포 채취에 수반하는 윤리적 문제가 적고, 뼈·연골·지방 등에의 다양한 분화능을 갖는 점에서, 조혈 줄기세포에 이어서 임상 응용이 활발히 행해지고 있는 체성 줄기 세포 중 하나이다. MSC는 비교적 간단한 손 기술에 의해 분리할 수 있는 점에서, 주로 시험관내에서 연골이나 뼈 등으로 분화 유도 후에 국소에 이식하는 등, 재생 의료를 위한 재료로서 널리 사용되고 있다. 그리고, 임상 응용을 진척시킬 때에는, 일정한 기능을 유지하는 세포를 필요량 제조할 수 있는 것이, 제품화의 필수 조건이 된다.

[0006] 그리고, 본 발명자들은, 골수액으로부터 LNGFR, Thy-1 공양성 세포를 플로 사이토메트리에 의해 분리하고, 증식이 빠른 클론(Rapidly Expanding Clone: REC)을 얻고 있고, 도너에서 유래하는 MSC의 증식성의 차를 배제할 수 있는 정제 분리 방법을 확립했다(일본특허 제6463029호, W02016/017795, Mabuchi Y. et al. , Stem Cell Reports 1(2): 152-165, 2013)

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본특허 제6487110호
(특허문헌 0002) 일본특허 제6463029호
(특허문헌 0003) 국제공개 2016/017795호 팸플릿

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Tsujimoto T et al. , An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study, EBioMedicine 37(2018) 521-534
(비특허문헌 0002) Mabuchi Y et al. , LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. Stem Cell Reports 1(2): 152-165, 2013

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기한 바와 같이, 지금까지, 알긴산을 기반으로 한 고순도 경화성 겔을 개발하고, 요추 추간판 헤르니아 환자에 대하여 헤르니아 적출술 후에 겔을 매식하는 탐색적 의사 주도 치험이 실시되고 있다. 그러나, 자기 수복능 및 재생능이 거의 없다고 알려져 있는 수핵은, 중고년기에서는 더욱 자기 수복능이 부족하고, 그러한 환자에게는 겔 단독 치료로는 명확한 한계가 있다.

[0010] 이 때문에, 추간판 조직이 수복·재생할 수 있는 가일층의 조성물의 개발이 필요해지고 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자는, 상기 과제를 해결하기 위해서 검토를 행한 결과, 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 포함하는 조성물이, 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 알아내고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 또한, 본 발명의 다른 양태에서는, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 포함하는 조성물이, 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 알아냈다.

- [0012] 즉, 본 발명은 이하와 같다.
- [0013] [1] 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 중간판 재생용 조성물.
- [0014] [1-1] 알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 중간판 재생용 조성물.
- [0015] [2] 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 중간판의 수핵 재생을 촉진하는, [1] 또는 [1-1]에 기재된 조성물.
- [0016] [3] 상기 간엽계 줄기 세포가, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포인 [1] 내지 [2] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0017] [4] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [3]에 기재된 조성물.
- [0018] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다
- [0019] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0020] [4-1] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [3]에 기재된 조성물.
- [0021] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다
- [0022] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0023] [4-2] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [3]에 기재된 조성물.
- [0024] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다
- [0025] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0026] [4-3] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [3]에 기재된 조성물.
- [0027] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0028] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0029] [4-4] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [3]에 기재된 조성물.
- [0030] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0031] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0032] [4-5] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [3]에 기재된 조성물.
- [0033] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0034] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0035] [5] 대상의 중간판에 적용하고, 당해 적용 시에는 유동성을 갖는 [1] 내지 [4-5] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0036] [5-1] 대상의 중간판 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 조성물의 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접촉시키도

록 사용되고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 [1] 내지 [4] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

- [0037] [5-2] 대상의 추간관 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 일부분을 경화하도록 사용되고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 [1] 내지 [4] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0038] [6] 상기 수핵 부위로의 적용은, 수핵 결손부로의 상기 조성물의 충전인, [5] 내지 [5-2] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0039] [7] 상기 일부분의 경화는, 조성물의 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접촉시킴으로써 행해지는, [5-2] 또는 [6]에 기재된 조성물.
- [0040] [8] 상기 가교제가 2가 이상의 금속 이온 화합물인, [5-1] 또는 [7]에 기재된 조성물.
- [0041] [8-1] 상기 알긴산의 1가 금속염이, 저엔도톡신알긴산 1가 금속염인, [1] 내지 [8] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0042] [9] 상기 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염은, GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)이 8만 이상인, [1] 내지 [8-1] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0043] [10] 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염의 농도가 0.5w/w% 내지 5.0w/w%인, [1] 내지 [9] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0044] [11] 추간관 변성 및/또는 추간관 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위해서 사용되는, [1] 내지 [10] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0045] [12] 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상이, 추간관 헤르니아, 추간관증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간관염, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증을 수반하는 추간관 헤르니아 및 추간관 손상으로 이루어지는 군이 선택되는 적어도 1종인, [11]에 기재된 조성물.
- [0046] [12-1] 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상이, 만성 요통을 수반하는, [11] 또는 [12]에 기재된 조성물.
- [0047] [13] 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 대상의 추간관 수핵 부위에 적용되는, 추간관 재생용 조성물.
- [0048] [14] 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 추간관의 수핵 재생을 촉진하는, [13]에 기재된 조성물.
- [0049] [15] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포가, 적용 시에 미분화 상태이거나 및/또는 유도 분화의 처리 없이 적용된다[13] 또는 [14]에 기재된 조성물.
- [0050] [16] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [13] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0051] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다
- [0052] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다
- [0053] [16-1] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [13] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0054] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다
- [0055] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다
- [0056] [16-2] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [13] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0057] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다
- [0058] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다

- [0059] [16-3] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [13] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0060] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0061] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0062] [16-4] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [13] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0063] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0064] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0065] [16-5] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [13] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0066] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0067] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0068] [17] 상기 조성물이, 세포를 포매하기 위한 담체를 더 포함하는, [13] 내지 [16-5] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0069] [18] 상기 담체가, 알긴산, 히알루론산, 콘드로이틴 황산, 테르마탄 황산, 케라탄 황산, 헤파린, 헤파란 황산 및 갈락토사미노글리쿠론글리칸 황산, 그리고 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군에서 선택되는, [17]에 기재된 조성물.
- [0070] [19] 상기 담체가, 알긴산의 1가 금속염인 [17]에 기재된 조성물.
- [0071] [20] 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 조성물의 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접촉시키도록 사용되고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 [13] 내지 [19] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0072] [21] 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 일부분을 경화하도록 사용되고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 [13] 내지 [19] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0073] [22] 상기 수핵 부위로의 적용은, 수핵 결손부로의 상기 조성물의 충전인, [20] 또는 [21]에 기재된 조성물.
- [0074] [23] 상기 가교제가 2가 이상의 금속 이온 화합물인, [20] 내지 [22] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0075] [24] 상기 알긴산의 1가 금속염은, GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)이 8만 이상인, [19] 내지 [23] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0076] [25] 상기 알긴산의 1가 금속염의 농도가 0.5w/w 내지 5.0w/w인, [19] 내지 [24] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0077] [26] 상기 알긴산의 1가 금속염이, 저엔도톡신알긴산 1가 금속염인, [19] 내지 [25] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0078] [27] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위해서 사용되는, [13] 내지 [26] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0079] [28] 상기 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 추간판 헤르니아, 추간판증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간판염, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증에 수반하는 추간판 헤르니아(혼합성 요부 척주관 협착증) 및 추간판 손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종인, [27]에 기재된 조성물.
- [0080] [28-1] 상기 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 만성 요통을 수반하는, [27] 또는 [28]에 기재된 조성물.
- [0081] [29] 추간판성 동통을 억제하기 위해서 사용되는, [1] 내지 [28-1] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

- [0082] [30] 상기 추간판성 동통이, 만성 요통인 [29]에 기재된 조성물.
- [0083] [31] 알긴산의 1가 금속염과 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 포함하는 추간판 재생용 조성물이며, 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용되기 위한 추간판 재생용 조성물.
- [0084] [31-1] 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용된 후에, 조성물을 경화시키는 처치를 요하지 않는 사용을 위한, 상기 [31]에 기재된 추간판 재생용 조성물.
- [0085] [31-2] 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용된 후에, 해당 조성물에 가교제를 접촉 시키지 않고 사용되는 상기 [31] 또는 [31-1]에 기재된 추간판 재생용 조성물.
- [0086] [32] 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 추간판의 수핵 재생을 촉진하는, [31] 내지 [31-2] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0087] [33] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포가, 적용 시에 미분화 상태이거나 및/또는 유도 분화의 처리 없이 적용된다[31] 내지 [32] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0088] [34] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [31] 내지 [33] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0089] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0090] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0091] [34-1] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [31] 내지 [33] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0092] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0093] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0094] [34-2] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [31] 내지 [33] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0095] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0096] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다
- [0097] [34-3] 상기 변동 계수가 35% 이하인, [34] 내지 [34-2] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0098] [35] 상기 수핵 부위로의 적용은, 수핵 결손부로의 상기 조성물의 충전인, [31] 내지 [34] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0099] [36] 상기 알긴산의 1가 금속염은, GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)이 8만 이상인, [31] 내지 [35] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0100] [37] 상기 알긴산의 1가 금속염의 농도가 0.5w/w% 내지 5.0w/w%인, [31] 내지 [36] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0101] [38] 상기 알긴산의 1가 금속염이, 저엔도톡신알긴산 1가 금속염인, [31] 내지 [37] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0102] [39] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위해서 사용되는, [31] 내지 [38] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0103] [40] 상기 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 추간판 헤르니아, 추간판증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간판염, 만성 요통, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증에 수반하는 추간판 헤르니아(혼합성 요부 척주관 협착증) 및 추간판 손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종인, [39]에 기재된 조성물.

- [0104] [41] 상기 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 만성 요통을 수반하는, [39] 또는 [40]에 기재된 조성물.
- [0105] [42] 추간판성 동통을 억제하기 위해서 사용되는, [31] 내지 [41] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0106] [43] 상기 추간판성 동통이, 만성 요통인 [42]에 기재된 조성물.
- [0107] [44] 알긴산의 1가 금속염과 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 포함하는, 추간판성 동통 억제용 조성물이며, 대상의 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용되기 위한 조성물.
- [0108] [44-1] 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용된 후에, 조성물을 경화시키는 처치를 요하지 않는 사용을 위한, 상기 [44]에 기재된 추간판성 동통 억제용 조성물.
- [0109] [44-2] 대상의 추간판 수핵 부위에 유동성을 갖는 상태에서 적용된 후에, 해당 조성물에 가교제를 접촉 시키지 않고 사용되는 상기 [44] 또는 [44-1]에 기재된 추간판성 동통 억제용 조성물.
- [0110] [45] 상기 동통이, 추간판 헤르니아, 추간판증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간판염, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증에 수반하는 추간판 헤르니아(혼합성 요부 척주관 협착증) 및 추간판 손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종을 수반하는 동통인, [44] 내지 [44-2] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0111] [46] 상기 동통이, 만성 요통인, [44] 내지 [45]에 기재된 조성물.
- [0112] [47] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포가, 적용 시에 미분화 상태이거나 및/또는 유도 분화의 처리 없이 적용된다[44] 내지 [46] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0113] [48] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [44] 내지 [47] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0114] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0115] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다
- [0116] [48-1] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성인 것을 지표로 분리된, 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [44] 내지 [47] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0117] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0118] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다
- [0119] [48-2] 상기 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포는, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 세포에서 유래하는 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단이며, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족하는 세포 집단인, [44] 내지 [47] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0120] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다
- [0121] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다
- [0122] [48-3] 상기 변동 계수가 35% 이하인, [48] 내지 [48-2] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0123] [48-4] 상기 수핵 부위로의 적용은, 수핵 결손부로의 상기 조성물의 충전인, [44] 내지 [48-3] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0124] [49] 상기 알긴산의 1가 금속염은, GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)이 8만 이상인, [44] 내지 [48-4] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0125] [50] 상기 알긴산의 1가 금속염의 농도가 0.5w/w% 내지 5.0w/w%인, [44] 내지 [49] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0126] [51] 상기 알긴산의 1가 금속염이, 저엔도톡신알긴산 1가 금속염인, [44] 내지 [50] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0127] [52] 대상의 추간판 수핵 부위에, X선 투시 하에서 적용하고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖고, 해당

조성물에 가교제를 접촉 시키지 않고 사용된다[31] 내지 [51] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.

- [0128] [53] 대상의 추간판 수핵 부위에, X선 투시 하에서 압력계 시린지를 사용해서 적용하고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖고, 해당 조성물에 가교제를 접촉 시키지 않고 사용된다[52]에 기재된 조성물.
- [0129] [54] 양 중증 추간판 변성 모델을 사용하여, 당해 모델의 추간판에 적용한 조성물에 있어서의 추간판의 재생능을 평가하는 방법이며, 이하의 (a1) 또는 (a2)의 공정, 및 (b1) 또는 (b2)의 공정을 포함하는 방법에 의해 제작된 중증 추간판 변성 모델의 추간판에, 세포 함유 조성물을 투여하는 공정을 포함하는, 상기 평가 방법.
- [0130] (a1) 양 추간판으로부터 양 체중의 0.00004% 내지 0.00005%에 상당하는 양의 수핵 조직을 제거하고, 변성 추간판을 제작하는 공정
- [0131] (a2) 양 추간판으로부터 20mg의 수핵 조직을 제거하고, 변성 추간판을 제작하는 공정
- [0132] (b1) 상기 공정(a1) 또는 (a2)의 4주 후에, 더욱 양 체중의 0.00014% 내지 0.000175%에 상당하는 양의 수핵 조직을 제거하는 공정
- [0133] (b2) 상기 공정(a1) 또는 (a2)의 4주 후에, 더욱 70mg의 수핵 조직을 제거하는 공정
- [0134] [55] 조성물을 투여하는 공정이, 공정(b1) 또는 (b2)의 후에 행해지는, [54]에 기재된 방법.
- [0135] [56] 평가는, 조성물 투여 후에, 변성 모델로부터 채취한 추체 및 추간판에 대하여, MRI, 조직 염색, 면역 조직 화학 염색(IHC)으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 평가 방법에 의해 행하는, [54] 또는 [55]에 기재된 방법.
- [0136] 또한 본 발명은, 이하의 양태를 포함한다.
- [0137] [57] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 방법이며,
- [0138] 알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는 조성물을, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하는 것을 포함하는, 상기 방법.
- [0139] [58] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 방법이며,
- [0140] 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하는 것을 포함하는, 상기 방법.
- [0141] [59] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 방법이며,
- [0142] 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포 및 알긴산의 1가 금속염을 포함하는 조성물을, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하는 것을 포함하고, 상기 조성물은, 당해 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 상기 방법.
- [0143] [60] 추간판성 동통의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 방법이며,
- [0144] 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포 및 알긴산의 1가 금속염을 포함하는 조성물을, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하는 것을 포함하고, 상기 조성물은, 당해 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 상기 방법.
- [0145] [61] 알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는 조성물을, 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하고, 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제에 있어서 사용되기 위한 알긴산의 1가 금속염 및 간엽계 줄기 세포.
- [0146] [62] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제에 사용하기 위한, 알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포를 함유하는 조성물.
- [0147] [63] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제에 사용하기 위한, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포.
- [0148] [64] 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제에 사용하기 위한, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포 및 알긴산의 1가 금속염을 포함하는 조성물이며, 당해 조성물은, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하는 것을 포함하고, 상기 조성물은, 당해 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 상기 조성물.

[0149] [65] 추간판성 동통의 치료, 예방 또는 재발 억제에 사용하기 위한, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포 및 알긴산의 1가 금속염을 포함하는 조성물이며, 당해 조성물은, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하는 것을 포함하고, 상기 조성물은, 당해 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는 상기 조성물.

발명의 효과

[0150] 본 발명에 의해, 추간판의 수핵 재생을 촉진하는 것이 가능한 수핵 보충용 조성물이 제공된다. 본 발명의 조성물에 의하면, 추간판 수핵뿐만 아니라 섬유륜도 포함한 추간판 조직 전체의 변성 변화도 억제하는 것도 가능하게 된다. 또한, 본 발명의 조성물은, 수핵에 있어서의 타입 II 콜라겐 양성의 초자 연골형 세포의 비율을 증가시키는 효과를 갖는다. 그리고, 중고년기의 자기 수복 작용이 약한 증례, 예를 들어 50세 이상의 중고년기에 많이 보여지는 혼합성의 요부 척주관 협착증(척주관 협착증과 추간판 헤르니아를 합병)에 대해서도, 재생 촉진 효과를 얻을 수 있다. 또한, 본 발명의 일 양태에서는, 조성물 투여 시의 간편성, 신체에의 침습의 저감을 고려하여, 세포를 포매하기 위한 담체를 경화하기 위한 처리없이 사용하여, 추간판성 질환에 수반하는 동통, 특히 요통, 보다 바람직하게는 만성적인 요통을 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0151] 도 1은 알긴산 나트륨 용액(이하, 「UPAL」(저엔도톡신 고순도 알긴산 겔(Ultra-purified alginate gel)이라고 하는 경우가 있다)을 사용한 7일간의 공배양 후의, 카르복시플루오레세인디아세테이트숙신이미딜에스테르(CFDA-SE)로 표지한 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC) 및 비표지 수핵 세포(NPC)의 분리를 위한 세포 선별 데이터를 도시하는 도면.

(a): 공배양 세포의 2차원(2D) 도트 플롯. P1 게이트는 단일의 생세포의 둘레에 배치되었다.

(b): 분류된 P2 게이트 중 비표지 NPC 및 P3 게이트 중 CFDA-SE 표지 BMSC의 2D 도트 플롯.

FSC-A: 전방 산란 영역; FSC-W: 전방 산란폭; SSC-A: 측방 산란 영역; CFDA-SE-A: CFDA-SE-영역.

각 세포의 유전자 발현을 하우스키핑 유전자 GAPDH를 기준으로 하여, 대수 스케일(y축)로 플롯했다. 데이터는 4개의 다른 토끼 NPC 계통의 평균값이다.

(c): HIF-1 α , (d): GLUT-1, (e): 브라큐리, (f): CDMP-1, (g): TGF- β , (h): IGF-1, (i): II형 콜라겐 및 (j): 어그리칸.

데이터는 평균값 $\pm$ 표준 오차로 나타내고, p값은 투키-크레이머의 사후 검정을 사용한 일원 배치 분산 분석에 의해 구하였다.

도 2는 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC)가 추간판(IVD)에서 생존하는 것을 도시하는 도면.

카르복시플루오레세인디아세테이트숙신이미딜에스테르(CFDA-SE)로 표지한 이식 후의 뼈 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC)는, 수술 후 4주째 및 12주째의 추간판(IVD)에서 생존한다. IVD의 동결 절편을 4',6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색했다. 화상은 4회의 반복 시험(무상(無傷) 대조 및 BMSC+Gel, n=4; 4주간 및 12주간)의 대표이다. 스케일 바=50 μ m.

도 3은 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC)와 조합한 겔은, 추간판 절제 후의 변성 추간판(IVD)의 수분 함량을 보존하는 것을 도시하는 도면.

(a): 수술 후 4주째와 12주째의 변성 IVD의 T2 강조, 정중시상 단상. 화상은 8회의 활상의 대표 화상이다.

(b): IVD 변성의 피르만 분류. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 오차(무상의 대조, 천자, 추간판 절제, 겔, 및 BMSC+겔, n=8; 4주 및 12주)이다.

(c) NP의 변성 변화에 대한 자기 공명 이미징(MRI) 지수(수핵(NP) 면적 $\times$ 평균 신호 강도). 수치는 무상의 대조 IVD와 비교한 비율(%)로서 표현된다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 오차이고, 투키-크레이머 검정을 사용해서 사후 해석을 수반하는 일원 배치 분산 분석에 의해 p값을 구하였다.

도 4는 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC)와 조합한 겔은, 추간판 절제 후의 추간판(IVD) 변성을 예방하는 것을 도시하는 도면.

(a, b): 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 또는 사프란인 O으로 염색된 IVD의 정중시상 단절편 화상(8회의 실험 화상의 대표예)(무상 대조(Intact control), 천자(Puncture), 추간관 절제(Discectomy), 겔, BMSC+겔, n=8; 4 및 12주간).

AF: 섬유류, NP: 수핵. 스케일 바=(A): 500 μ m(위에서부터 1번째 및 3번째의 섹션), 50mm(위에서부터 2번째 및 4번째의 섹션) 및 (B): 500 μ m.

(c): 4주째와 12주째의 조직학적 변성도를 나타낸다.

데이터는 평균값 $\pm$ 표준 오차이고, p값은 투키-크레이머의 사후 검정을 사용한 일원 배치 분산 분석에 의해 구하였다.

도 5는 토끼 수핵(NP)에 있어서의 II형 콜라겐 양성 세포를 도시하는 도면.

(a): 토끼 추간관(IVD)의 정중시상 단절편을 II형 콜라겐에 대하여 염색했다. 화상은 8회의 반복 실험 결과(무상 대조, 천자, 추간관 절제, 겔, BMSC+겔, n=8; 4 및 12주간)의 대표 화상이다. 화살표는 II형 콜라겐에 대하여 양성의 세포를 나타낸다. 스케일 바=500 μ m(위에서부터 1번째 및 3번째의 섹션) 및 20 μ m(위에서부터 2번째 및 4번째의 섹션).

(b): II형 콜라겐 양성 세포의 비율. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 오차이고, p값은 투키-크레이머의 사후 검정을 사용한 일원 배치 분산 분석에 의해 구하였다.

도 6은 토끼 NP에 있어서의 수핵(NP) 마커 양성 세포를 도시하는 도면.

(a-c): 1, 7, 28일째에 HIF-1 α , GLUT-1, 브라큐리 염색한 토끼 추간관(IVD)의 수평 절편. 화상은 4회의 반복 실험(무상 대조, 추간관 절제 및 BMSC+겔, n=4; day1, 7, 28)의 대표 화상이다. 스케일 바=50 μ m.

(d-f): 전체 세포에 대한 NP 마커 양성 세포의 비율.

(g-i): CFDA-SE 양성 세포(이식된 BMSC를 대표한다)에 대한 NP 마커 양성 세포의 비율. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차이고, p값은 대응이 있는 t 검정을 사용해서 결정했다.

도 7은 추간관(IVD) 재생의 메커니즘을 도시하는 도면.

이식된 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC)는 기존의 수핵 세포(NPC)의 활성화를 초래하는 성장 인자와 세포 외 매트릭스(ECM)를 산생한다. 기존의 NPC 활성화는 또한, 증식 인자 및 ECM의 산생을 증가시킨다. 이식된 BMSC는 NPC로 분화된다. UPAL: 초정제 알긴산염(저엔도톡신 고순도 알긴산염이라고도 한다).

도 8은 REC 클론의 망라적 해석 결과를 도시하는 도면이다.

도 9는 인간의 정상 추간관 수핵 세포(NPC) 및 고순도 간엽계 세포(REC)에 있어서의 각종 유전자의 발현량을 도시하는 도면.

도 10은 이식 후 4주째의 양 모델에 있어서의 추간관의 MRI의 결과를 도시하는 도면.

도 11은 이식 후 4주째의 양 모델에 있어서의 추간관의 조직학적 검사 결과를 도시하는 도면.

도 12는 이식 후 4주째의 양 모델에 있어서의 추간관의 조직학적 검사 결과를 도시하는 도면.

도 13은 3D 공배양의 7일 후의 인간 NPC 및 REC의 발현 프로필을 도시하는 도면.

(A) REC 단리를 도시하는 개략도. CD271(LNGFR) 및 CD90(THY-1)에 대해서 염색한 인간 골수 세포의 플로 사이토메트리 프로필. 1웰로부터 수집한 세포를 35mm 배양 접시에 파종하고, 14일까지 증식시켜서, 높은 분화능 및 증식능을 갖는 균일한 세포 집단을 얻는다.

(B 및 C) 세포 선별 데이터를 사용하여, CFDA-SE 표지 REC와 비표지 NPC를 구별한다.

(B) P1 게이트는 사세포 및 잔여 찌꺼기 생세포를 배제한다.

(C) P2 게이트에서의 라벨이 없는 NPC와 P3 게이트에서의 CFDA-SE 표지 REC를 나타내는 2D 도트 플롯.

(D 내지 K) 각 세포의 유전자 발현 레벨을 하우스키핑 유전자 GAPDH의 발현 레벨에 대하여 정규화하고, 대수 스케일(y축)로 플롯했다. 4개의 다른 인간 NPC주로부터 얻어진 데이터를 평균화했다.

(D) HIF-1 α , (E) GLUT-1, (F) 브라큐리, (G) CDMP-1, (H) TGF- β , (I) IGF-1, (J) II형 콜라겐, (K) 어그리칸 데이터는 평균 $\pm$ SD값(n=4)으로서 나타낸다. 유의차는 사후 분석 투키-크레이머 검정에 의한 일원 배치 분산 분석으로 평가했다.

NPC: 수핵 세포

REC: 급속하게 증식하는 클론

CFDA-SE: 5,6-카르복시플루오레세인디아크타토속시니미딜에스테르

ANOVA: 분산 분석

FSC-A: 전방 산란 면적

FSC-W: 전방 산란폭

SSC-A: 측방 산란 면적

CFDA-SE-A: CFDA-SE 면적

도 14는 두 종류의 겔의 탄성비를 도시하는 도면.

(A) CaCl₂로 유도시킨 겔화(직경, 4.5mm; 두께, 2mm) 후의 원반상 UPAL 및 REC+UPAL 겔의 형성.

(B 및 C) 인장 압축 기계 시험 장치. 샘플을 0.5mm/분의 일정 속도로 압축했다.

(D) 응력 왜곡선. 영률은 압축값 10 내지 20% 사이의 접선의 기울기에 따라서 계산했다. 4개의 반복 시험을 행하여, 대표적인 화상을 나타낸다.

(E) 두 종류의 겔의 영률. 데이터는 평균 $\pm$ SD값(n=4)을 나타낸다. 유의차는 웰치의 검정 후, 스튜던트 t-검정에 의해 평가했다.

N.S: 유의차 없음

UPAL: 초정제 알긴산염(저엔도톡신 고순도 알긴산염이라고도 한다)

REC: 신속히 증식하는 클론

SD: 표준 편차

도 15는 각 군의 실험 스케줄 및 치료의 상세를 도시하는 도면.

(A 및 B) 최초의 수술로 20mg의 신선한 NP 조직을 처치 IVD로부터 제거하고, 중증의 변성 IVD 모델을 확립했다.

(C) 최초의 수술 4주간 후, 70mg의 변성 NP 조직을 변성 IVD로부터 더 제거했다.

(D) 변성 NP의 제거 후, UPAL 또는 REC+UPAL 용액을 추간관 내의 공극에 이식했다.

NP: 수핵

UPAL: 초정제 알긴산(저엔도톡신 고순도 알긴산이라고도 한다)

IVD: 추간관

도 16은 매식 후 4주째 및 24주째에 있어서의 치료한 IVD의 MRI 평가를 도시하는 도면.

(A) 양에 있어서의 수술 후 4주째 및 24주째의 IVD의 T2 강조, 정중시상 단 화상. 화상은 6 또는 8회의 반복 결과의 대표이다.

(B) 피르만 그레이드의 IVD 변성.

(C) NP의 변성 변화에 대한 MRI 지수(NP 면적 $\times$ 평균 시그널 강도)값. 수치는, 무처치의 대조 IVD에 관한 값에 대한 비율(%)로서 표현된다.

(D) IVD 치료를 위한 추간관 높이 지수. 수치는 무처치의 대조 IVD의 수치에 대한 비율(%)로서 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SD값으로서 나타낸다(무처치 대조, n=6; 추간관 절제, n=6; 겔, n=8; REC+gel, n=8). 유의차는

투키-크레이머 검정을 사용한 사후 분석 해석에 의한 일원 배치 ANOVA에 의해 평가했다.

NP: 수핵

MRI: 자기 공명 화상법

IVD: 추간관

ANOVA: 분산 분석

SD: 표준 편차

도 17은 매식 4주 후 및 24주 후의 치료한 IVD의 조직학적 평가를 행한 결과를 도시하는 도면.

(A 및 B) H & E 또는 사프란닌-0 염색에 의해 염색된 처리 IVD의 대표적인 정중시상 절편(무처리 대조, n=6; 추간관 절제 방법, n=6; 겔, n=8; REC+겔, n=8). 스케일 바(A); 50 μ m(위에서부터 2번째 및 4번째의 부분) 또는 1mm(위에서부터 1번째 및 3번째의 부분)(B); 1mm.

(C) 조직학적 그레이드는, 개변 Boos 분류를 통해 결정했다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 편차로 나타낸다. 유의차는 사후 분석 투키-크레이머 검정에 의한 일원 배치 분산 분석으로 평가했다.

IVD: 추간관

H & E: 헤마톡실린 & 에오신

SD: 표준 편차

AF: 섬유륜

NP: 수핵

도 18은 매식 4주 후 및 24주 후의 처리 IVD에 있어서의 II형 또는 I형 콜라겐 양성 세포를 도시하는 도면.

(A 및 B) II형 콜라겐 또는 I형 콜라겐에 대해서 염색된 처리 IVD의 대표적인 정중시상 절편(무처리 대조, n=6; 추간관 절제 방법, n=6; 겔, n=8; REC+겔, n=8). 스케일 바, 1mm (제1 및 제3 라인) 또는 50 μ m (제2 및 제4 라인).

(C 및 D) 처리된 IVD 중의 총 세포에 대한 II형 또는 I형 콜라겐 양성 세포의 비율. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 편차로 나타낸다. 유의차는 사후 분석 투키-크레이머 검정에 의한 일원 배치 분산 분석으로 평가했다.

IVD: 추간관

REC: 급속 증식 클론

SD: 표준 편차

ANOVA: 분산 분석

도 19는 NP 조직 제거 후 4주째의 조직학적 평가를 도시하는 도면.

(A) IVD로부터 제거한 NP 조직(무처리 대조, 또는 20, 50, 100, 200mg 제거)의 중시상부(H & E 또는 사프란닌-0로 염색). 양 모델에 있어서, 4주간 후에 NP 조직의 20mg 이상의 제거에 수반하여 IVD 변성이 발생했다. 스케일 바; 1mm(모두).

(B) 조직학적 그레이드는 개변 Boos 분류를 통해 결정했다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 편차.

NP: 수핵

IVD: 추간관

H & E: 헤마톡실린 및 에오신

SD: 표준 편차

도 20은 T2 강조 중간 화상상 화상을 사용한, 인접하는 추골의 추간관 높이에 대한 추간관 높이의 측정 결과를 도시하는 도면.

BC와 EF는 각각 전방 및 후방 추간관 높이이며, AB와 DE는 헤드측의 인접 추체 높이이다. 추간관 높이(BC+EF)

와 추체 높이(AB+DE)의 비로서 DHI 값을 계산하고, 무처치 대조 IVD의 DHI에 대한 처치 IVD의 DHI의 비로서 상대 DHI 값을 계산했다.

DHI: 추간관 높이 지수

IVD: 추간관

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 개요

본 발명은 알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포(예를 들어 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포)를 함유하는, 추간관 재생용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은, 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염과 간엽계 줄기 세포(예를 들어 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포)를 함유하는, 추간관 재생용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은, 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 추간관의 수핵 재생을 촉진한다. 본 발명의 조성물은 대상의 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 일부분을 경화하도록 사용된다. 본 발명의 몇 가지의 양태에서는, 본 발명의 조성물은, 대상의 수핵 부위에 적용하고, 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접촉시키도록 사용된다.

본 발명에 있어서는, 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSCs)와 겔과의 병용에 의해, 겔 단독보다 조직 수복 효과가 유의하게 촉진된 것을 토끼 유래의 간엽계 줄기 세포를 사용한 생체내 시험에서 실증하고, 그 메커니즘으로서, 겔 포매의 BMSCs와 수핵 세포의 공배양에 의해, 1) 성장 인자 산생에 의한 양 세포의 상호 활성화, 2) BMSCs의 수핵 세포로의 분화, 3) 양 세포로부터의 세포 외 기질 산생능의 향상을 명백히 하였다.

본 발명의 조성물에 포함되는 알긴산은, 감태, 대황, 다시마 등의 갈조류로부터 추출되는 다당류이며, 칼슘 등의 2가의 금속 이온을 더하면 가교하고 경화하는 성질을 갖는다. 이 성질을 이용하여, 환부에서 금속 이온과 접촉시킴으로써, 표면을 경화시켜서, 환부에 고정시키는 것이 가능하게 된다. 본 발명에 있어서, 저엔도톡신알긴산나트륨을 포함하는 조성물을 졸 상태에서 추간관 수핵 부위에 주입하고, 주입구에 가교제를 접촉시켜서 조성물의 일부를 경화시키면, 수핵의 변성을 억제하고, 수핵 재생에 바람직한 타입 II 콜라겐 양성 세포의 비율을 증가시켜서, 추간관 수핵의 재생을 촉진하는 것을 알아냈다.

본 발명에 있어서, 간엽계 줄기 세포를 알긴산(예를 들어 저엔도톡신알긴산)의 1가 금속염으로 포매함으로써, 매식된 간엽계 줄기 세포는 환부에 머물러 장기적으로 효과를 발휘한다. 즉, 매식된 고순도 간엽계 줄기 세포가 성장 인자나 세포 외 기질을 산생하고, 수핵 세포를 활성화한다. 그리고, 활성화된 수핵 세포는 성장 인자나 세포 외 기질을 산생한다. 그 결과, 매식된 간엽계 줄기 세포는 수핵 세포에 분화되고, 수핵 세포와 간엽계 줄기 세포와의 상호 작용을 통해 장애부의 재생이 촉진된다. 본 발명의 다른 양태에서는, 히알루론산 등의 생체 적합성 재료에 세포를 포매할 수 있다.

또한, 본 발명의 조성물에 포함되는 간엽계 줄기 세포에 있어서, 그 일 양태인 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포(REC)는, 두 종류의 항체와 셀 소터에 의해 골수로부터 직접 분리하는 기술에 의해 제작되는 초고순도 인간 간엽계 줄기 세포이다. 셀 소터를 사용한 분리에 의해 균일한 세포 집단이 얻어지기 때문에 품질 관리가 용이하고, 또한 증식성이 매우 높기 때문에 대량 배양에 의한 제제화가 가능하다.

본 발명은, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포를 함유하는, 추간관 재생용 조성물에도 관계된다. 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 조성물은, 미분화 상태에서 및/또는 분화 유도의 처치없이 추간관 수핵에 적용된다. 본 발명의 조성물은, 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포에 의한 수핵 세포의 활성화 및/또는 간엽계 줄기 세포의 수핵 세포로의 분화를 통해, 추간관의 수핵 재생을 촉진한다. 본 발명의 조성물은, 대상의 수핵 부위에 적용하고, 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접촉시키도록 사용될 수 있다. 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 조성물은, 대상의 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 일부분을 경화하도록 사용될 수 있다.

2. 정의

「저엔도톡신」, 「알긴산의 1가 금속염」은 후술한다.

「추간관」은, 척추로 이어지는 추골과 추골 사이에 있는 원주상의 조직이다. 추간관은, 원판상의 무혈관 조직이며, 수핵을 중심으로 해서 돌레를 섬유륜이 둘러 싸고, 또한 상하로 종관이 배치된 구조를 하고 있다.

「수핵」은, 추간관의 중심에 존재하는 겔상의 조직이며, 수핵 세포와, 주로 프로테오글리칸과 II형 콜라겐으로 구성되는 세포 외 기질과, 물을 주로 해서 함유한다. 수핵에는, 자기 수복능·재생능이 현저하게 낮다고 생각

되고 있다.

- [0163] 「수핵 보충」이란, 가령, 외상, 감염 및 그들에 대한 외과적 수술(예를 들어, 추간판 수핵 적출(절제)술) 등에 의해, 변성, 축소, 또는 제거한 수핵의 변성분, 축소분 또는 제거분을 보충하는 것을 말한다. 또한, 본 명세서에 있어서 「수핵 충전」의 단어는, 「수핵 보충」과 동일한 의미로 사용되며, 본 발명의 「수핵 보충용 조성물」은 「수핵 충전용 조성물」과 동일한 의미이다.
- [0164] 「수핵 부위」란, 수핵이 존재하는 부위, 수핵의 변성 혹은 축소가 발생하고 있는 부위, 또는 수핵의 적어도 일부를 제거함으로써 형성된 수핵의 결손부를 말하며, 수핵이 존재하는 부위의 주변부도 포함한다.
- [0165] 「대상」은, 인간 또는 인간 이외의 생물, 예를 들어 트리 및 비인간 포유 동물(예를 들어, 소, 원숭이, 고양이, 마우스, 래트, 모르모트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양 및 말)이다.
- [0166] 「적용」이란, 본 발명의 조성물을 추간판의 수핵 부위의 변성분, 축소분, 제거분, 결손부 등을 매립하기에 충분한 양으로 수핵 부위에 충전하는 것을 의미한다.
- [0167] 「포매한다」란, 생체 적합성 재료, 바람직하게는 알긴산의 1가 금속염의 용액에 세포를 현탁 또는 혼합하는 것을 말한다.
- [0168] 「일부분을 경화한다」란, 후술하는 바와 같다.
- [0169] 「저엔도톡신알긴산의 1가 금속염을 함유한다」란, 본 발명의 조성물이, 적용된 수핵 부위에 있어서, 수핵을 재생 하기에 충분한 양의 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염을 함유하는 것을 의미한다.
- [0170] 「유동성을 갖는다」란, 후술하는 바와 같다.
- [0171] 「추간판 변성 및/또는 추간판 손상」, 「치료, 예방 또는 재발 억제」란, 후술하는 바와 같다.
- [0172] 「추간판성 동통」이란, 추간판에 기인해서 발생하는 동통을 의미한다.
- [0173] 「요통」이란, 추간판의 주위에 발생하는 동통이며, 배부통·둔부통을 포함한다.
- [0174] 「만성 요통」이란, 요통의 발증으로 12주 이상 계속되는 요통을 의미한다.
- [0175] 본 발명의 조성물은, 용매를 사용해서 용액 상태에서 제공되어도 되고, 동결 건조체(특히는, 동결 건조 분말체) 등의 건조 상태에서 제공되어도 된다. 건조 상태에서 제공되는 경우, 본 발명의 조성물은, 적용 시에는 용매를 사용하여, 용액상 등의 유동성을 갖는 상태에서 사용된다. 용매는 생체에 적용 가능한 용매이면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 주사용수, 정제수, 증류수, 이온 교환수(또는 탈 이온화수), 밀리 Q수, 생리 식염수, 인산 완충 생리 식염수(PBS) 등을 들 수 있다. 바람직하게는, 인간 및 동물의 치료에 사용하는 것이 가능한 주사용수, 증류수, 생리 식염수 등이다.
- [0176] 3. 알긴산의 1가 금속염
- [0177] 본 발명에 있어서, 담체로서 사용되는 「알긴산의 1가 금속염」은 알긴산의 6위의 카르복실산의 수소 원자를, Na^+ 나 K^+ 등의 1가 금속 이온과 이온 교환하는 것으로 만들어지는 수용성의 염이다. 알긴산의 1가 금속염으로서 는, 구체적으로는, 알긴산 나트륨, 알긴산칼륨 등을 들 수 있지만, 특히, 시판품에 의해 입수 가능한 알긴산 나트륨이 바람직하다. 알긴산의 1가 금속염의 용액은, 가교제와 혼합했을 때에 겔을 형성한다.
- [0178] 본 발명에 사용하는 「알긴산」은, 생분해성의 고분자 다당류이며, D-만누론산(M)과 L-글루론산(G)이라고 하는 두 종류의 우론산이 직쇄상에 중합한 폴리머이다. 보다 구체적으로는, D-만누론산의 호모 폴리머 분획(MM 분획), L-글루론산의 호모 폴리머 분획(GG 분획) 및 D-만누론산과 L-글루론산이 랜덤하게 배열한 분획(MG 분획)이 임의로 결합한 블록 공중합체이다. 알긴산의 D-만누론산과 L-글루론산의 구성비(M/G비)는, 주로 해조 등의 유래가 되는 생물의 종류에 따라 상이하고, 또한 그 생물의 생육 장소나 계절에 의한 영향을 받고, M/G비가 약 0.4의 고G형으로부터 M/G비가 약 5의 고M형까지 고범위에 걸친다.
- [0179] 알긴산의 1가 금속염은 고분자 다당류이며, 분자량을 정확하게 정하는 것은 곤란하지만, 분자량이 너무 낮으면 점도가 낮아져, 적용한 부위의 주변 조직으로의 밀착성이 약해질 우려가 있고, 또한 분자량이 너무 높은 것은 제조가 곤란한 동시에, 용해성이 저하되는, 용액상에 했을 때에 점도가 너무 높아져 취급이 나빠지는, 장기간의 보존으로 물성을 유지하기 어려운 등의 문제를 일으키기 때문에, 일반적으로 중량 평균 분자량으로 1만 내지 1000만, 바람직하게는 2만 내지 800만, 보다 바람직하게는 5만 내지 500만의 범위이다. 본 명세서에 있어서,

「내지」를 사용해서 나타내진 수치 범위는, 「내지」의 전후에 기재되는 수치를 각각 최솟값 및 최댓값으로서 포함하는 범위를 나타낸다.

- [0180] 한편, 천연물 유래의 고분자 물질의 분자량 측정으로는, 측정 방법에 의해 값에 차이가 발생할 수 있는 것이 알려져 있다. 예를 들어, 겔 침투 크로마토그래피(GPC) 또는 겔 여과 크로마토그래피(이들을 모두 사이즈 배제 크로마토그래피 이라고도 한다)에 의해 측정된 중량 평균 분자량은, 본 발명의 실시예에서 나타내진 효과에 의하면, 바람직하게는 10만 이상, 보다 바람직하게는 50만 이상이고, 또한 바람직하게는, 500만 이하, 보다 바람직하게는 300만 이하이다. 그 바람직한 범위는, 10만 내지 500만이고, 보다 바람직하게는 50만 내지 350만이다.
- [0181] 또한, 예를 들어 겔 침투 크로마토그래피(GPC)과 다각도 광산란검출기(Multi Angle Light Scattering: MALS)를 조합한 GPC-MALS법에 의하면, 절대 중량 평균 분자량을 측정할 수 있다. GPC-MALS법에 의해 측정된 중량 평균 분자량(절대 분자량)은, 본 발명의 실시예에서 나타내진 효과에 의하면, 바람직하게는 1만 이상, 보다 바람직하게는 8만 이상, 더욱 바람직하게는 9만 이상이고, 또한 바람직하게는, 100만 이하, 보다 바람직하게는 80만 이하, 더욱 바람직하게는 70만이하, 특히 바람직하게는 50만 이하이다. 그 바람직한 범위는, 1만 내지 100만이고, 보다 바람직하게는 8만 내지 80만이고, 보다 더욱 바람직하게는 9만 내지 70만, 특히 바람직하게는 9만 내지 50만이다.
- [0182] 통상, 고분자 다당류의 분자량을 상기와 같은 방법으로 산출하는 경우, 10 내지 20% 이상의 측정 오차를 발생할 수 있다. 예를 들어, 40만이면 32 내지 48만, 50만이면 40 내지 60만, 100만이면 80 내지 120만 정도의 범위로 값의 변동이 생길 수 있다.
- [0183] 알긴산의 1가 금속염의 분자량 측정은, 통상법에 따라 측정할 수 있다.
- [0184] 분자량 측정에 겔 침투 크로마토그래피를 사용하는 경우의 대표적인 조건은, 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같다. 칼럼은, 예를 들어 GMPW-XL×2+G2500PW-XL(7.8mm I.D.×300mm)을 사용할 수 있고, 용리액은, 예를 들어 200mM 질산나트륨 수용액으로 할 수 있고, 분자량 표준으로서 폴루란을 사용할 수 있다.
- [0185] 분자량 측정에 GPC-MALS를 사용하는 경우의 대표적인 조건은, 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같다. 검출기로서, 예를 들어 RI 검출기와 광산란검출기(MALS)를 사용할 수 있다.
- [0186] 알긴산의 1가 금속염은, 갈조류로부터 추출된 당초는, 분자량이 크고, 점도가 높지만, 열에 의한 건조, 정제 등의 과정에서, 분자량이 작아지고, 점도는 낮게 된다. 제조 공정의 온도 등의 조건 관리, 원료로 하는 갈조류의 선택, 제조 공정에 있어서의 분자량의 분획 등의 방법에 의해 분자량의 다른 알긴산의 1가의 금속염을 제조할 수 있다. 또한, 다른 분자량 혹은 점도를 갖는 별도 로트의 알긴산의 1가 금속염과 혼합함으로써, 목적으로 하는 분자량을 갖는 알긴산의 1가 금속염으로 하는 것도 가능하다.
- [0187] 본 발명에 사용되는 알긴산의 1가 금속염은, 바람직하게는 알긴산의 1가 금속염을 밀리 Q수에 용해해서 1w/w% 농도의 용액으로 하고, 콘플레이트형 점도계를 사용하여, 20℃의 조건에서, 점도 측정을 행했을 때의 겔보기 점도가, 40mPa·s 내지 800mPa·s인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는, 50mPa·s 내지 600mPa·s인 것이 바람직하다. 겔보기 점도의 측정 조건은, 후술하는 조건을 따르는 것이 바람직하다. 또한, 본 명세서에 있어서 「겔보기 점도」를 단순히 「점도」라고 하는 경우가 있다.
- [0188] 본 발명에 사용하는 알긴산은, 천연 유래이거나 합성물이어도 되지만, 천연 유래인 것이 바람직하다. 천연 유래의 알긴산으로서, 예를 들어 갈조류로부터 추출되는 것을 들 수 있다. 알긴산을 함유하는 갈조류는 전 세계의 연안 지역에 무성하지만, 실제로 알긴산 원료로서 사용할 수 있는 해조는 한정되어 있어, 남미의 레소니아, 북미의 마크로키스티스, 유럽의 라미나리아나 아스코필럼, 호주의 더빌리아 등이 대표적인 것이다. 알긴산의 원료가 되는 갈조류로서는, 예를 들어 레소니아(Lessonia)속, 마크로키스티스(Macrocytis)속, 라미나리아(Laminaria)속(다시마속), 아스코필럼(Ascophyllum)속, 더빌리아(Durvillea)속, 대황(Eisenia)속, 감태(Ecklonia)속 등을 들 수 있다.
- [0189] 본 발명의 다른 양태에서는, 세포를 포매하기 위한 담체로서, 다른 생체 적합성 재료를 사용해도 된다. 예를 들어, 그 약학적으로 허용 가능한 염(생리학적 염)을 포함하는, 히알루론산(HA), 콘드로이틴 황산, 데르마탄 황산, 케라틴 황산, 헤파린, 헤파란 황산, 갈락토사미노글리쿠론글리칸(galactosaminoglycuronglycan) 황산(GGGS) 등의 1개 혹은 복수의 천연 혹은 합성 글리코사미노글리칸(GAG) 또는 무코다당류를, 세포를 포매하기 위한 담체로서 사용해도 된다. 본 발명의 다른 양태에서는, 세포를 포매하기 위한 담체로서, 특별히 한정되지 않지만, 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체, 아가로오스, 키틴, 키토산, 전분, 펙틴 등의 다당류, 젤라틴, 콜라겐,

폴리펩티드 등의 단백질, 아미노산 유도체 및 이들의 공중합체 그리고 이들의 유도체에서 선택되는 것으로서, 어느 하나 혹은 복수가 사용되어도 된다. 본 발명의 다른 양태에서는, 담체로서 콜라겐이나 젤라틴형 조성물과 같은 하이드로겔을 사용 해도 된다.

[0190] 4. 저엔도톡신 처리

[0191] 본 발명에서 사용하는 알긴산의 1가 금속염은 특별히 한정되는 것이 아니고, 예를 들어 저엔도톡신의 알긴산의 1가 금속염이다. 본 발명의 일 양태에서는, 세포를 포매하기 위한 담체는, 저엔도톡신인 것이 바람직하다. 즉, 본 발명에서 사용하는 알긴산의 1가 금속염은, 저엔도톡신의 알긴산의 1가 금속염인 것이 바람직하다. 저엔도톡신이란, 실질적으로 염증 또는 발열을 야기할 수 없는 정도로까지 엔도톡신 레벨이 낮은 것을 말한다. 보다 바람직하게는, 저엔도톡신 처리된 알긴산의 1가 금속염인 것이 바람직하다.

[0192] 저엔도톡신 처리는, 공지된 방법 또는 그것에 준하는 방법에 의해 행할 수 있다. 예를 들어, 히알루론산 나트륨을 정제하는, 스가 등의 방법(예를 들어, 일본특허공개 평9-324001호 공보 등 참조), β 1,3-글루칸을 정제하는, 요시다 등의 방법(예를 들어, 일본특허공개 평8-269102호 공보 등 참조), 알기네이트, 젤란검 등의 생체 고분자염을 정제하는, 윌리엄 등의 방법(예를 들어, 일본특허공표 제2002-530440호 공보 등 참조), 폴리사카라이드를 정제하는, 제임스 등의 방법(예를 들어, 국제공개 제93/13136호 팜플렛 등 참조), 루이스 등의 방법(예를 들어, 미국 특허 제5589591호 명세서 등 참조), 알기네이트를 정제하는, 하먼 프랭크 등의 방법(예를 들어, Appl Microbiol Biotechnol(1994) 40: 638-643 등 참조) 등 또는 이들에 준하는 방법에 의해 실시할 수 있다. 본 발명의 저엔도톡신 처리는, 그들에 한하지 않고, 세정, 필터(엔도톡신 제거 필터나 대전한 필터 등)에 의한 여과, 한외 여과, 칼럼(엔도톡신 흡착 어퍼니티 칼럼, 겔 여과 칼럼, 이온 교환 수지에 의한 칼럼 등)을 사용한 정제, 소수성 물질, 수지 또는 활성탄 등의 흡착, 유기 용매 처리(유기 용매에 의한 추출, 유기 용제 첨가에 의한 석출·침강 등), 계면 활성제 처리(예를 들어, 일본특허공개 2005-036036호 공보 등 참조) 등 공지된 방법에 의해, 혹은 이들을 적절히 조합해서 실시할 수 있다. 이들 처리의 공정에, 원심 분리 등 공지된 방법을 적절히 조합해도 된다. 알긴산의 종류 등에 맞춰서 적절히 선택하는 것이 바람직하다.

[0193] 엔도톡신 레벨은, 공지된 방법에서 확인할 수 있고, 예를 들어 리몰루스 시약(LAL)에 의한 방법, 엔토스페시(등록상표) ES-24S 세트(세이가가쿠 고교 가부시키키가이샤)를 사용하는 방법 등에 의해 측정할 수 있다.

[0194] 본 발명의 조성물에 함유되는 알긴산의 1가 금속염의 엔도톡신 처리 방법은 특별히 한정되지 않지만, 그 결과로서, 알긴산의 1가 금속염의 엔도톡신 함유량이, 리몰루스 시약(LAL)에 의한 엔도톡신 측정을 행한 경우에, 500 엔도톡신 단위(EU)/g 이하인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는, 100EU/g 이하, 특히 바람직하게는 50EU/g 이하, 특히는 30EU/g 이하이다. 저엔도톡신 처리된 알긴산 나트륨은, 예를 들어 Sea Matrix(등록상표)(모치다 세이야쿠 가부시키키가이샤), PRONOVA TMUP LVG(FMC BioPolymer) 등 시판품에 의해 입수 가능하다.

[0195] 이와 같이 저엔도톡신 처리된 알긴산 나트륨을, 본 명세서에서는 「고순도 알긴산 나트륨」(UPAL)이라고도 한다.

[0196] 5. 알긴산의 1가 금속염의 용액 조제

[0197] 본 발명의 조성물은, 알긴산의 1가 금속염의 용액을 사용해서 조제해도 된다. 알긴산의 1가 금속염의 용액은, 공지된 방법 또는 그것에 준하는 방법에 의해 조제할 수 있다. 즉, 본 발명에서 사용되는 알긴산의 1가 금속염은, 전술한 갈조류를 사용하여, 산법, 칼슘법 등 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 이들 갈조류로부터, 탄산나트륨 수용액 등의 알칼리 수용액을 사용해서 추출한 후, 산(예를 들어, 염산, 황산 등)을 첨가함으로써 알긴산을 얻을 수 있고, 알긴산의 이온 교환에 의해 알긴산의 염을 얻을 수 있다. 전술한 바와 같이, 저엔도톡신 처리를 행한다. 알긴산의 1가 금속염의 용매는, 생체에 적용 가능한 용매이면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 정제수, 증류수, 이온 교환수, 밀리 Q수, 생리 식염수, 인산 완충 생리 식염수(PBS) 등을 들 수 있다. 이들은, 멸균되고 있는 것이 바람직하고, 저엔도톡신 처리된 것이 바람직하다. 예를 들어, 밀리 Q수를 여과 멸균해서 사용할 수 있다.

[0198] 본 발명의 조성물이, 동결 건조제 등의 건조 상태에서 제공되는 경우에도, 상기의 용매를 사용해서 유동성이 있는 용액에 조제할 수 있다.

[0199] 또한, 본 발명의 조성물을 얻기 위한 조작은 모두 엔도톡신 레벨 및 세균 레벨이 낮은 환경 하에서 행하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 조작은 클린 벤치에서, 멸균 기구를 사용해서 행하는 것이 바람직하고, 사용하는 기구를 시판 중인 엔도톡신 제거제로 처리해도 된다.

[0200] 6. 본 발명의 조성물 겉보기 점도

[0201] 본 발명의 몇 가지의 양태의 조성물은, 유동성이 있는 액체상, 즉 용액상이다. 본 발명의 조성물은, 수핵 부위의 적용 시에 유동성을 갖는다. 본 발명의 양태 1개에서는, 바람직하게는 본 발명의 조성물은, 조성물을 20℃에서 1시간 정치한 후에, 21G의 주사 바늘로 주입할 수 있는 유동성을 갖는다. 이 양태의 본 발명 조성물 겉보기 점도는, 본 발명의 효과가 얻어지면, 특별히 한정되지 않지만, 점도가 너무 낮으면 적용한 부위의 주변 조직으로의 밀착성이 약해질 우려가 있기 때문에, 바람직하게는 10mPa·s 이상, 보다 바람직하게는 100mPa·s 이상, 더욱 바람직하게는 200mPa·s 이상, 특히 바람직하게는 500mPa·s 이상이다. 겉보기 점도가 너무 높으면 취급성이 나빠질 우려가 있기 때문에, 바람직하게는 50000mPa·s 이하, 보다 바람직하게는 20000mPa·s 이하이고, 더욱 바람직하게는 10000mPa·s 이하이다. 겉보기 점도가 20000mPa·s 이하일 때 시린지 등에서의 적용이 보다 용이하게 실시할 수 있다. 그러나, 겉보기 점도가 20000mPa·s 이상이어도 가압형이나 전동형의 충전 기구나 기타의 수단을 사용해서 적용 가능하다. 본 발명의 조성물 바람직한 범위는, 10mPa·s 내지 50000mPa·s, 보다 바람직하게는, 100mPa·s 내지 30000mPa·s, 더욱 바람직하게는 200mPa·s 내지 20000mPa·s, 또한 더욱 바람직하게는 500mPa·s 내지 20000mPa·s, 특히 바람직하게는 700mPa·s 내지 20000mPa·s다. 별의 바람직한 형태에서는, 500mPa·s 내지 10000mPa·s, 혹은 2000mPa·s 내지 10000mPa·s여도 된다. 본 발명의 몇 가지의 양태의 조성물은, 시린지 등으로 대상에 적용할 수도 있는 점도이다.

[0202] 알긴산류의 수용액 등 알긴산의 1가 금속염을 함유하는 조성물의 겉보기 점도의 측정은, 통상법에 따라 측정할 수 있다. 예를 들어, 회전 점도계법의, 공축 이중 원통형 회전 점도계, 단일 원통형 회전 점도계(브룩필드형 점도계), 원추-평판형 회전 점도계(콘플레이트형 점도계) 등을 사용하여 측정할 수 있다. 바람직하게는, 일본 약전(제16판)의 점도 측정법을 따르는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서 점도 측정은 20℃의 조건에서 행하는 것이 바람직하다. 후술하는 바와 같이 본 발명의 조성물이 세포 등 용매에 용해하지 않는 것을 함유하는 경우에는, 점도 측정을 정확하게 행하기 위해서, 조성물의 겉보기 점도는, 세포 등을 함유하지 않는 상태의 겉보기 점도로 하는 것이 바람직하다.

[0203] 본 발명에 있어서는, 알긴산의 1가 금속염을 함유하는 조성물의 겉보기 점도의 측정은, 특히 콘플레이트형 점도계를 사용하여 측정하는 것이 보다 바람직하다. 예를 들어, 이하와 같은 측정 조건에서 측정하는 것이 바람직하다. 시료 용액의 조제는, 밀리 Q수를 사용해서 행한다. 측정 온도는 20℃로 한다. 콘플레이트형 점도계의 회전수는, 알긴산의 1가 금속염의 1% 용액 측정 시는 1rpm, 2% 용액 측정 시는 0.5rpm으로 하고, 이것을 기준으로 해서 결정한다. 관독 시간은 알긴산의 1가 금속염의 1% 용액 측정의 경우에는 2분간 측정하고, 개시 1분에서 2분까지의 평균값으로 한다. 2% 용액 측정의 경우에는 2.5분간 측정하고, 개시 0.5분에서 2.5분까지의 평균값으로 한다. 시험 값은 3회의 측정의 평균값으로 한다.

[0204] 본 발명의 조성물 겉보기 점도는, 예를 들어 알긴산의 1가 금속염의 농도, 분자량, 또는 M/G비 등을 제어함으로써 조정할 수 있다.

[0205] 알긴산의 1가 금속염의 용액 겉보기 점도는, 용액 중의 알긴산의 1가 금속염 농도가 높은 경우에 점도가 높고, 농도가 낮은 경우에 점도가 낮아진다. 또한 알긴산의 1가 금속염의 분자량이 큰 경우에 점도가 높고, 분자량이 작은 경우에 점도가 낮아진다.

[0206] 알긴산의 1가 금속염의 용액 겉보기 점도는, M/G비에 의해 영향을 받기 때문에, 예를 들어 용액의 점도 등에 보다 바람직한 M/G비를 갖는 알긴산을 적절히 선택할 수 있다. 본 발명에 사용하는 알긴산의 M/G비는, 약 0.1 내지 5.0이고, 바람직하게는 약 0.1 내지 4.0, 보다 바람직하게는 약 0.2 내지 3.5이다.

[0207] 전술한 바와 같이, M/G비가 주로 해조의 종류로 의해 결정되는 것 등으로, 원료로서 사용할 수 있는 갈조류의 종류는 알긴산의 1가 금속염의 용액 점도에 영향을 미친다. 본 발명에서 사용되는 알긴산으로서는, 바람직하게는 레소니아속, 마크로키스티스속, 라미나리아속, 아스코필럼속, 더빌리아속의 갈조 유래이며, 보다 바람직하게는 레소니아속의 갈조 유래이며, 특히 바람직하게는 레소니아·니그레스켄스(Lessonia nigrescens) 유래이다.

[0208] 7. 간엽계 줄기 세포

[0209] 본 발명에 있어서 사용되는 간엽계 줄기 세포는, 중배엽성 조직(간엽)에서 유래하는 체성 줄기 세포이며, 뼈나 혈관, 심근의 재구축 등의 재생 의료에의 응용이 기대되고 있다.

[0210] 간엽계 줄기 세포는, 골수, 지방 조직, 태반 조직, 치수 또는 탯줄 조직 등의 다양한 조직으로부터 취득할 수 있다. 그 정제 프로세스는, 예를 들어 이하와 같다.

- [0211] 인간 또는 비인간 포유 동물(예를 들어, 소, 원숭이, 고양이, 마우스, 래트, 모르모트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양 및 말 염소, 토끼 등)로부터 채취한 소량의 지방편을 효소 처리해서 얻어지는 세포형 혼합 집단으로부터, 원심 분리에 의해 부유성의 지방 세포 집단을 분리하고, 배양액을 채운 배양기 천장면에 접촉시킨 상태에서 정치했을 때에 하상면에 침강해서 증식하는 섬유아형 세포를 계대 배양에 의해 증식시킨다.
- [0212] 또한, 본 발명에 있어서는, iPS 세포 유래의 간엽계 줄기 세포나, 시판 중인 간엽계 줄기 세포를 사용하는 것도 가능하다. 본 발명에 있어서, 간엽계 줄기 세포는, 바람직하게는 미분화 상태이거나 및/또는 유도 분화의 처리 없이 수행에 적용된다. 미분화 상태란, 분화능을 갖는 줄기 세포가 분화되지 않은 상태가 유지되고 있는 것을 말한다. 「분화 유도의 처리없이」란, 예를 들어 분화능을 갖는 줄기 세포를 분화 유도 배지를 사용해서 특정한 세포로 분화시키는 등의 처리를 하지 않는 것을 가리킨다.
- [0213] 8. 인간 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포
- [0214] (1) REC 클론
- [0215] 본 발명자는, 이전의 연구에 의해, LNGFR(CD271)이 양성인 간엽계 줄기 세포(CD271+세포), 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 간엽계 줄기 세포(CD271+CD90+세포) 중에서 증식이 빠른 고속 증식성의 세포 클론(Rapidly Expanding Clone: REC)을 분리하는 것에 성공했다.
- [0216] 이 REC는, 96웰 플레이트에 1개씩 세포를 과중해서 배양했을 때에, 2주간로 콘플루언트에 달할 수 있는 세포이며, 종래법에서 얻은 간엽계 줄기 세포와 비교하여, 증식능, 분화능 및 유주능 모두가 1000배 이상의 능력을 갖는다. 그리고, 특히 유주능을 유지하고 있기 때문에, 경정맥 내 투여가 가능하게 되고, 뼈·연골 형성 부전증 등이 위중한 전신성 질환에의 응용을 기대할 수 있다.
- [0217] 본 발명에 있어서는, 상기 REC 클론 중, 분화능이나 증식능에 있어서 변동이 적은 세포 클론을 사용할 수 있다.
- [0218] 본 발명의 세포 클론을 포함하는 세포 집단은, LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성이고, 또한 증식이 빠른 간엽계 줄기 세포 클론의 집단이고, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징을 충족한다.
- [0219] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다.
- [0220] (b) 평균 세포 사이즈가 20 μ m 이하이다.
- [0221] (2) 인간 간엽계 줄기 세포 농축 방법
- [0222] 본 발명에 있어서, LNGFR(CD271)이 양성, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 간엽계 줄기 세포를 얻기 위해서는, 예를 들어 W02009/31678호에 기재된 방법에 따를 수 있다.
- [0223] 그 방법의 개요는 이하와 같다.
- [0224] 먼저, 인간 간엽계 줄기 세포가 포함되는 세포 집단으로부터, LNGFR(CD271)이 양성(CD271+), 또는 CD271 및 CD90이 공양성(CD271+CD90+)의 세포 분획을 선별함으로써, 간엽계 줄기 세포를 고도로 농축한다. 또한, 인간 간엽계 줄기 세포가 포함되는 세포 집단에 혈구계 세포가 포함되는 경우에는, 비혈구계의 세포를 선별하기 위해서, CD45 및 CD235a가 공음성(CD45-CD235a-)의 세포를 선별하는 공정을 첨가해도 된다.
- [0225] 간엽계 줄기 세포가 포함되는 세포 집단은, 플로 사이토메트리나 어피니티·크로마토그래피에 의해 조제할 수 있다.
- [0226] 이 세포 집단을 얻기 위한 재료는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 골수, 지방 조직, 제대혈, 말초혈(G-CSF 투여 후의 말초혈을 포함한다) 등을 들 수 있다. 또한, 골수는 척추, 흉골, 장골 등의 골수를 사용하면 된다. 또한, 세포로서, ES 세포 및 iPS 세포를 들 수도 있다.
- [0227] 세포 조제 시, 재료가 간엽계 줄기 세포를 말려들게 한 세포피가 되어 있는 경우에는, 필요에 따라, 재료에 대하여 피펫팅 등에 의한 물리적 처리나, 트립신, 콜라게나아제 등에 의한 효소 처리를 행할 수 있다. 또한, 재료에 적혈구가 혼입되어 있는 경우에는, 미리 적혈구를 용혈해 두는 것이 바람직하다.
- [0228] 상기한 바와 같이 조제된 세포 집단을 사용하여, CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별한다.
- [0229] CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별하는 방법으로서, 예를 들어, 항체를 사용하는 방법을 들 수 있다.
- [0230] 항체는, CD271+ 세포 또는 CD271+CD90+ 세포를 선별하는 것이 가능한, 항CD271 항체 및/또는 항CD90 항체이다. 선별에 플로 사이토메트리를 사용하는 경우에는, FITC, PE, APC 등의 다른 형광 색소로 표지된 항CD271 항체,

또는 항CD271 항체와 항CD90 항체를, 적절히 조합하고 사용함으로써, 생세포를 단시간에 선별하는 것이 가능해진다. 또한, 플로 사이토메트리 이외에도, 자기 비즈를 사용하는 방법이나 어피니티·크로마토그래피를 사용하는 방법에 의해, CD271+CD90+ 세포를 선별하는 것이 가능하다.

[0231] 또한, 이들 방법을 사용하기 전에, 미리, 사세포를 염색하는 형광 색소(예를 들어, PI)을 세포 집단과 반응시켜서, 형광로 염색된 세포를 제거함으로써, 사세포를 제거해도 된다.

[0232] (3) REC 세포 농축

[0233] 이어서, 선별한 LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR 및 Thy1 공양성 세포를 단일 세포(클론) 배양하고, 증식이 빠른 로트를 선택함으로써, 증식능·분화능·유주능이 뛰어난 고순도 인간 간엽계 줄기 세포(REC: Rapidly Expanding Clone)를 얻는다.

[0234] 인간 골수 또는 지방·태반 용모막으로부터 단핵 세포를 조제하고, 골수 단핵 세포를 항LNGFR 단독, 또는 항LNGFR 및 항Thy1로 염색한다. 이어서, 플로 사이토메트리(셀 소터)를 사용하여, LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR 양성 및 Thy1 양성 세포를 96 구멍 배양 플레이트에 클론 소트한다. 즉, 1웰에 세포 1개씩 파종한다. 단일 세포 배양 2주간 후에 배양 플레이트를 현미경 하에서 촬영하고, 콘플루언트 또는 세미 콘플루언트가 된 웰을 선별하고, 당해 웰에 포함되는 세포를 REC로 한다.

[0235] 여기서, 「증식이 빠르다」, 「고속 증식성」이란, 96구멍 배양 플레이트의 1웰에 세포 1개씩 파종해서 배양했을 때에, 배양 개시 2주간 후 또는 그 이전에 배양 플레이트가 콘플루언트 또는 세미 콘플루언트가 되는 정도의 증식 속도(배가 시간(더블링 타임)이 26 ± 1 시간)를 갖는 것을 의미한다.

[0236] 콘플루언트란, 배양 용기 표면(배양면)의 90% 이상을 배양 세포가 덮고 있는 상태이다. 또한, 세미 콘플루언트란, 배양 용기 표면(배양면)의 70 내지 90%를 배양 세포가 덮고 있는 상태이다. 사용하는 배양 기구의 사이즈 및 종류는, 세포의 증식 속도에 따라 적절히 변경 가능하다. 지연되어 증식하고 있는 세포(Moderately/Slowly Expanding Cells), 즉 단일 세포 배양 2주 후가 되어도 세미 콘플루언트 또는 콘플루언트가 안된 세포는 파기한다. REC로서 선별한 각 웰로부터 회수한 REC를 각 웰마다 배양 플라스크에 이입하고, 또한 콘플루언트가 될 때까지 배양한다(확대 배양). 그 후, 확대 배양한 세포를 따로따로 회수한다. 1웰 유래의 REC를 1로트로 한다.

[0237] 본 발명에 있어서 사용되는 REC는, 1웰에 세포 1개씩 파종하는 클론 소트에 의해 얻어진 것이기 때문에, 증식한 세포끼리의 유전 형질은 모두 동일하다. 따라서, 본 발명에 있어서는 세포 집단 전체를 「클론」이라고 하거나, 세포 집단을 구성하는 개개의 세포를 「클론」이라고 하는 경우도 있다.

[0238] 또한, 본 발명에 있어서, 선별에 사용하기 위한 REC는 REC 마커(항Ror2)에 의해 미리 평가해 둘 수도 있다. 예를 들어, 상기 확대 배양 후, 전체 로트로부터 부착 증식한 세포를 회수하고, 각 로트의 일부(1 내지 3×10^5 개 정도)의 세포를 나누고, 항Ror2에 대한 모노클로날 항체로 단일 염색을 행한다. 항Ror2에 대한 모노클로날 항체로 단일 염색을 행하는 방법은 공지이다(WO2016/17795). 요약하면, REC 마커를 사용한 플로 사이토메트리 해석에 의해, 회수 세포에 있어서의 REC 마커 양성 세포의 비율을 구한다. 비율은, 정량적 PCR을 사용해서 Ror2의 mRNA 발현을 정량 해도 되고, 현미경에 의해 동 비율을 매뉴얼에 의해 구해도 된다. 상기 양성 비율이 일정 값(예를 들어 65%) 이상의 로트(세포 집단)를 합격으로 하고, 이것을 후술하는 선별에 사용할 수도 있다.

[0239] (4) 줄기 세포 집단의 선별

[0240] 본 발명에 있어서는, 개개의 로트 REC 클론에 대해서, 세포의 증식능, 지방 분화능, REC 특이적 마커 발현량, 세포 사이즈의 균일성을 조사하고, 각각의 상관성을 해석함으로써, 고순도로 보다 세포 성능이 높은 REC를 선별하는 것이 가능하게 되었다.

[0241] 본 발명에 있어서는, 전방 산란광의 변동 계수(Coefficient of Variation: CV값) 및 세포의 평균 사이즈를 선별의 지표로 한다.

[0242] 전방 산란광(Forward Scatter)이란, 레이저광의 축에 대하여 전방향의 작은 각도로 산란하는 광이다. 전방 산란광은, 세포 표면에서 발생하는 레이저광의 산란광, 회절광 및 굴절광으로 이루어져서, 샘플의 크기에 관한 정보가 얻어진다.

[0243] 변동 계수(Coefficient of Variation: CV)는 표준 편차를 평균값으로 나눈 값으로, 단위의 다른 데이터의 변동이나, 평균값에 대한 데이터와 변동의 관계를 상대적으로 평가할 때에 사용하는 수치이다.

[0244] 본 발명에 있어서는, 상기 CV값이 40% 이하, 바람직하게는 35% 이하의 것을 선별한다. CV값이 40% 이하의 세포

집단, 보다 바람직하게는 35% 이하의 세포 집단은, 크기가 균일한 세포에 의해 구성되어 있는 세포 집단이다. 바람직하게는, CV값은 30% 이하, 25% 이하, 또는 20% 이하이다. 또한, 본 발명에 의해 선별된 세포 집단에 있어서의 세포의 평균 사이즈는, $20\mu\text{m}$ 이하이다. 바람직하게는 $18\mu\text{m}$ 이하이며, $14\mu\text{m}$ 내지 $18\mu\text{m}$ 의 범위의 크기이다.

[0245] 본 발명은, LNGFR 양성 세포, 또는 LNGFR(CD271) 및 Thy-1(CD90)이 공양성의 고속 증식성 간엽계 줄기 세포 클론의 세포 집단의 품질을 평가하는 방법도 제공한다. 본 발명에 있어서는, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징, 바람직하게는 양쪽의 특징을 충족하는 세포 집단을, 고품질이라고 판정한다.

[0246] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 40% 이하이다.

[0247] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다.

[0248] 이와 같이 해서 평가 및 선별된 세포 집단은, 당해 집단을 구성하는 세포 클론의 수가 한정되는 것이 아니고, 예를 들어 1ml의 용액에 0.8×10^7 내지 1.2×10^7 개 정도의 세포를 갖는다.

[0249] 또한, 본 발명의 바람직한 양태에 있어서는, 이하의 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 특징, 바람직하게는 양쪽의 특징을 충족하는 세포 집단을, 고품질이라고 판정한다.

[0250] (a) 플로 사이토메트리의 전방 산란광의 변동 계수가 35% 이하이다.

[0251] (b) 평균 세포 사이즈가 $20\mu\text{m}$ 이하이다.

[0252] 이와 같이 해서 평가 및 선별된 세포 집단은, 당해 집단을 구성하는 세포 클론의 수가 한정되는 것이 아니고, 예를 들어 1ml의 용액에 0.8×10^7 내지 1.2×10^7 개 정도의 세포를 갖는다.

[0253] 9. 본 발명의 조성물 조제

[0254] 본 발명의 조성물은, 예를 들어 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염 및 상기 간엽계 줄기 세포를 유효 성분으로서 함유하는 것을 특징으로 한다. 본 발명자들은, 본 발명의 조성물을 생체의 수핵 부위에 충전한 경우에, 알긴산의 1가 금속염 자체가 수핵 조직의 재생 또는 치료 효과를 발휘하는 것을 처음으로 알아냈다. 유효 성분으로서 함유한다는 것은, 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염이 환부에 적용되었을 때에, 수핵 조직의 재생 또는 치료 효과를 발휘할 수 있는 양으로 함유되어 있으면 되고, 적어도 조성물 전체의 0.1w/v% 이상인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.5w/v% 이상, 더욱 바람직하게는, 1w/v%이다. 본 발명의 조성물 중 바람직한 알긴산의 1가 금속염 농도는, 바람직하게는 0.5w/v% 내지 5w/v%, 보다 바람직하게는 1w/v% 내지 5w/v%이며, 더욱 바람직하게는, 1w/v% 내지 3w/v%에서, 특히 바람직하게는 1.5w/v% 내지 2.5w/v%이다. 또한, 별의 양태에서는, 본 발명의 조성물 중 알긴산의 1가 금속염 농도는, 바람직하게는 0.5w/w% 내지 5w/w%, 보다 바람직하게는 1w/w% 내지 5w/w%이며, 더욱 바람직하게는, 1w/w% 내지 3w/w%로, 특히 바람직하게는 1.5w/w% 내지 2.5w/w%여도 된다.

[0255] 바람직한 엔도톡신 레벨을 나타낼 때까지 정제한 알긴산의 1가 금속염을 사용하여, 상기와 같이 조성물을 제정한 경우에는, 조성물의 엔도톡신 함유량은, 통상, 500EU/g 이하이고, 보다 바람직하게는 300EU/g 이하, 더욱 바람직하게는 150EU/g 이하이고, 특히 바람직하게는 100EU/g 이하이다.

[0256] 본 발명의 조성물 중에 함유시키는 세포수(세포 농도)은, 예를 들어 1×10^4 개/ml 이상 또는 1×10^5 개/ml 이상, 바람직하게는 1×10^4 개/ml 내지 1×10^7 개/ml의 세포이다.

[0257] 본 발명의 조성물은, 세포의 성장을 촉진시키는 인자를 포함시킬 수도 있다. 그러한 인자로서는, 예를 들어 BMP, FGF, VEGF, HGF, TGF- β , IGF-1, PDGF, CDMP(연골 유래 형태발생 단백질(cartilage-derived-morphogenetic protein)), CSF, EPO, IL, PRP(혈소판 풍부 플라스마(Platelet Rich Plasma)), SOX 및 IF 등을 들 수 있다. 이들의 인자는, 재조합법에 의해 제조해도 되고, 혹은 단백 조성물로부터 정제해도 된다. 또한, 본 발명의 몇 가지의 양태의 조성물은, 이들의 성장 인자를 포함하지 않는다. 성장 인자를 포함하지 않는 경우에도, 수핵의 재생은 충분히 양호하고, 적극적으로 세포의 성장을 촉진시키는 경우와 비교해서 보다 안전성도 높다.

[0258] 본 발명의 조성물은, 세포사를 억제하는 인자를 포함시킬 수도 있다. 세포사를 야기하는 인자로서는, 예를 들어 캐스페이스, TNF α 등을 들 수 있어, 이들을 억제하는 인자로서는, 항체나 siRNA 등을 들 수 있다. 이들의 세포사를 억제하는 인자는, 재조합법에 의해 제조 해도 되고, 혹은 단백 조성물로부터 정제 해도 된다. 또한,

본 발명의 몇 가지의 양태의 조성물은, 이들의 세포사를 억제하는 인자를 포함하지 않는다. 세포사를 억제하는 인자를 포함하지 않는 경우에도, 수핵의 재생은 충분히 양호하고, 적극적으로 세포사를 억제하는 경우와 비교해서 보다 안전성도 높다.

[0259] 또한, 본 발명의 1개의 양태에서는, 본 발명의 조성물은, 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염 이외에, 추간판의 수핵 조직에 대하여 약리 작용을 발휘하는 성분을 포함하지 않는다. 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염만을 유효 성분으로서 함유하는 조성물에 있어서도, 충분한 수핵의 재생 또는 치료 효과를 발휘할 수 있다.

[0260] 본 발명의 몇 가지의 양태에서는, 필요에 따라, 기타의 의약 활성 성분이나, 관용의 안정화제, 유화제, 침투압 조정제, 완충제, 등장화제, 보존제, 무통화제, 착색제 등, 통상 의약에 사용되는 성분을 본 발명의 조성물에 함유시킬 수도 있다.

[0261] 10. 본 발명의 조성물 경화

[0262] 본 발명의 조성물은, 수핵 부위로의 적용 후에 일부분을 경화하도록 사용된다.

[0263] 「일부분을 경화한다」란, 유동성을 갖는 본 발명의 조성물 일부분에 가교제를 접촉시켜서, 가교제와 접촉한 조성물의 전체가 아니고 일부분을 겔화하고, 굳히는 것을 말한다. 바람직하게는, 유동성을 갖는 본 발명의 조성물 표면의 적어도 일부분에 가교제를 접촉시킴으로써 본 발명의 조성물 일부분을 경화한다. 본 발명에서는, 사용하는 담체에 적합한 가교제나 경화 수단을 선택할 수 있다.

[0264] 본 발명의 몇 가지의 양태에서는, 「조성물을 수핵 부위로의 적용 후에 일부분을 경화시킨다」란, 수핵 부위의 충전과 마찬가지로 가교제의 사용 방법 및 사용 비율을 사용하여, 시험관내에서, 직경 6mm의 시험관에 저엔도톡신알긴산 나트륨 500 μ L 및 가교제를 충전해서 1시간 정치 후에, 시험관내의 조성물의 용량 적어도 5할은 겔화하고 있지 않고, 겔화하지 않은 부분은, 시험관내의 조성물의 용량 적어도 5할이 21G의 주사 바늘을 붙인 시린지로 흡인할 수 있는 것으로 나타나도 된다.

[0265] 조성물이 수핵 부위의 충전 후에도 이러한 성상을 나타내는 것에 의해, 충전 후에 추간판의 두미측으로부터 압축력을 건 경우에도 조성물이 이탈하는 일이 없다고 생각된다. 「조성물의 표면의 적어도 일부분」은, 예를 들어 수핵으로 이어지는 추간판의 표면의 개구부이며, 바람직하게는 수핵 부위에 조성물을 적용하는 데 사용한 추간판의 표면 개구부, 즉 조성물의 충전구이다. 조성물의 표면의 적어도 일부분을 겔화해서 확고히 하는 것으로, 추간판으로부터 조성물이 누출되는 것을 효과적으로 방지할 수 있다. 추간판 표면의 조성물의 충전구는, 예를 들어 추간판의 표면에 시린지의 바늘이나 메스로 제작한 조성물의 충전에 사용된 개구부, 혹은 추간판 헤르니아 적출 시에 메스 등에 의해 제작된 추간판 표면의 개구부인 것이 바람직하다. 이 양태에 있어서의 추간판과는 바람직하게는 섬유륜이다.

[0266] 본 발명의 조성물은, 바람직하게는 대상의 수핵 부위에 적용하기 전에, 조성물을 경화시키는 양의 가교제를 함유하지 않는다. 이 때문에, 본 발명의 조성물에는, 일정 시간 경과 후에도 조성물을 경화시키지 않는 양의 가교제가 포함되어 있어도 된다. 여기에서의 일정 시간이란, 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 30분 내지 12시간정도이다. 「조성물을 경화시키는 양의 가교제를 함유하지 않는다」것은, 예를 들어 조성물을 20℃에서 1시간 정치한 후에, 21G의 주사 바늘을 붙인 시린지로 주입할 수 있는 것으로 나타나도 된다. 본 발명의 몇 가지의 양태의 조성물에는, 가교제가 포함되어 있지 않다.

[0267] 가교제로서는, 알긴산의 1가 금속염의 용액을 가교함으로써, 그 표면을 고정화할 수 있는 것이면, 특별히 한정되지 않는다. 가교제로서, 예를 들어 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} 등의 2가 이상의 금속 이온 화합물, 분자 내에 2 내지 4개의 아미노기를 갖는 가교성 시약 등을 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 2가 이상의 금속 이온 화합물로 하고, CaCl_2 , MgCl_2 , CaSO_4 , BaCl_2 등을, 분자 내에 2 내지 4개의 아미노기를 갖는 가교성 시약으로서, 질소 원자 상에 리실(lysyl)기 ($-\text{COCH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$)를 갖는 것도 있는 디아미노알칸, 즉 디아미노알칸 및 그 아미노기가 리실기로 치환되어 리실아미노기를 형성하고 있는 유도체가 포함되고, 구체적으로는 디아미노에탄, 디아미노프로판, N-(리실)-디아미노에탄 등을 들 수 있지만, 입수하기 쉬운 것, 겔의 강도 등의 이유로부터, 특히 CaCl_2 용액으로 하는 것이 바람직하다.

[0268] 본 발명의 몇 가지의 양태 중 하나에서는, 본 발명의 조성물 표면에 가교제를 접촉시키는 타이밍은, 바람직하게는 본 발명의 조성물을 수핵 부위에 적용한 후이다. 본 발명의 조성물 일부분에 가교제(예를 들어, 2가 이상의 금속 이온)를 접촉시키는 방법으로서, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 시린지, 분사기(스프레이) 등으로,

2가 이상의 금속 이온의 용액을 조성물 표면에 뿌리는 방법 등을 들 수 있다. 예를 들어, 가교제는, 천천히 수 초 내지 10수초, 추간판에 형성된 조성물의 충전구에 계속 뿌려도 된다. 그 후는 필요에 따라, 충전구 부근에 잔존하는 가교제를 제거하는 처리를 첨가해도 된다. 가교제의 제거는, 예를 들어 생리 식염수 등에 의한 적용 부위의 세정이어도 된다.

[0269] 가교제의 사용량은, 본 발명의 조성물 적용량, 추간판 표면의 조성물의 충전구 크기, 추간판의 수핵의 적용 부위 사이즈, 등을 고려해서 적절히 조절하는 것이 바람직하다. 조성물의 충전구 주위 조직에 가교제의 영향을 강하게 미치게 하지 않기 위해서는, 가교제의 사용량을 과잉이 되지 않도록 조절한다. 2가 이상의 금속 이온의 사용량으로서는, 알긴산의 1가 금속염을 함유하는 조성물의 표면을 굳힐 수 있는 양이면, 특별히 한정되지 않는다. 그러나, 예를 들어 100mM의 CaCl_2 용액을 사용하는 경우에는, 추간판의 표면 충전구가 직경 1mm 정도의 경우에는, CaCl_2 용액의 사용량은 0.3ml 내지 5.0ml 정도인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.5ml 내지 3.0ml 정도이다. 추간판 표면의 충전구가 추간판 헤르니아 적출 시에 메스 등에 의해 제작되고, 변 테두리가 5mm×10mm 정도인 경우에는, 100mM의 CaCl_2 용액의 사용량은, 0.3ml 내지 10ml 정도인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는, 0.5ml 내지 6.0ml 정도이다. 적용 부위에 있어서의 본 발명의 조성물 상태를 보면서, 적절히 증감할 수 있다.

[0270] 가교제에 칼슘이 포함되는 경우, 칼슘의 농도가 높은 쪽이, 겔화가 빠르고, 또한 보다 딱딱한 겔을 형성할 수 있는 것이 알려져 있다. 그러나, 칼슘에는 세포 독성이 있기 때문에, 농도가 너무 높으면, 본 발명의 조성물의 추간판의 수핵 재생 작용에 악영향을 미칠 우려도 있다. 그래서, 알긴산의 1가 금속염을 함유하는 조성물의 표면을 굳히는데, 예를 들어 CaCl_2 용액을 사용하는 경우에는, 바람직하게는 25mM 내지 200mM, 보다 바람직하게는, 50mM 내지 150mM이 농도로 하는 것이 바람직하다.

[0271] 본 발명에 있어서는, 바람직하게는 조성물에 가교제를 첨가 후, 일정 시간 정치한 후에, 첨가한 부위에 잔존하는 가교제를 세정 등에 의해 제거하는 것이 바람직하다. 정치하는 일정 시간은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 약 1분간 이상, 보다 바람직하게는 약 4분간 이상 정치해서 조성물의 표면을 겔화시키는 것이 바람직하다. 혹은, 약 1분 내지 약 10분간, 보다 바람직하게는 약 4분 내지 약 10분간, 약 4분간 내지 약 7분간, 더욱 바람직하게는 약 5분간 정치하는 것이 바람직하다. 이 일정 시간 동안은, 조성물과 가교제를 접촉시킨 상태로 하는 것이 바람직하고, 조성물의 액면이 마르지 않도록, 가교제를 적절히 추가해도 된다.

[0272] 예를 들어, 알긴산 나트륨 용액을 CaCl_2 용액 중에 적하하고, 겔화해서 제작한 것에 알긴산 비즈가 있다. 그러나, 알긴산 비즈는, 적용 부위에 압박해서 적용할 필요가 있지만, 적용 부위의 크기에 있었던 것을 제작할 필요가 있고, 실제의 임상에서 사용하기 위해서는, 기술적으로 곤란하다. 또한, CaCl_2 용액을 가교제로서 사용한 경우, 비즈 표면의 Ca 이온이 주위 조직에 접촉하기 위해서, 칼슘의 세포 독성 문제도 있다. 이에 대해, 본 발명의 조성물은, 용액상이기 때문에, 어느 형상의 적용 부위에도 용이하게 적용할 수 있고, 적용 부위의 전체를 본 조성물로 덮을 수 있고, 주위 조직에 밀착성도 된다. 본 발명의 조성물 주위 조직에 접촉하는 부분은, 칼슘 농도를 낮게 유지하는 것이 가능하고, 칼슘의 세포 독성 문제도 적다. 본 발명의 조성물 주위 조직에 접촉하는 부분은, 가교제의 영향이 적기 때문에, 본 발명의 조성물은, 용이하게 적용 부위의 세포나 조직에 콘택트할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은, 수핵 부위에 적용한 후, 약 4주간도 경과하면, 적용한 부위에 있어서 식별할 수 없게 될 만큼 생체의 조직과 융합하고, 생체와의 친화성도 높다.

[0273] 본 발명의 조성물을 수핵 부위에 적용할 때에 가교제에 의해 일부분을 겔화시키면, 본 발명의 조성물은 환부로 일부분이 경화하고, 주위 조직에 밀착한 상태에서 국제 하고, 수핵 부위로부터의 누출을 방지할 수 있다. 이어 더해서, 본 발명의 조성물이 주위 조직에 밀착함으로써, 본 발명의 조성물 수핵 재생 효과가 보다 강력하게 발휘된다.

[0274] 수핵 부위에 충전한 보충재 전체를 겔화시켜 경화시킨 경우에는, 추간판에 두미측으로부터 압축력을 가하면 추간판 표면의 조성물의 충전구로부터 경화 겔이 이탈하는 현상이 보여진 것에 반해, 본 발명의 용액상 조성물을 수핵 부위에 충전한 경우에는, 두미측으로부터 압축력을 가한 경우에도 추간판 표면의 충전구로부터의 이탈은 없다. 즉, 실제로 본 발명의 조성물에 의해 수핵 보충을 행한 경우, 추간판에 대한 상하로부터의 압력에 대해서도, 보충한 조성물이 누출될 우려가 낮다고 할 수 있다.

[0275] 또한, 경화한 겔을 수핵 부위에 충전하는 경우에는, 경화한 겔이 척주관 내에 돌출되고, 중대한 신경 장애를 야기할 위험성이 있다. 한편, 본 발명의 용액상 조성물은, 그러한 위험성은 낮고, 합병증발증의 위험이 낮다.

- [0276] 본 발명의 일 양태에서는, 세포를 포매하는 담체를 경화하지 않고 사용해도 된다. 임상 증상이나 손상부의 크기·형상에 맞게, 가교제를 사용하지 않고 적용할 수도 있다.
- [0277] 11. 본 발명의 조성물 적용
- [0278] 본 발명의 조성물은, 인간 또는 인간 이외의 생물, 예를 들어 트리 및 비인간 포유 동물(예를 들어, 소, 원숭이, 고양이, 마우스, 래트, 모르모트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양 및 말)의 추간판의 수핵 부위에 적용하고, 수핵의 재생을 촉진하기 위해서 사용된다.
- [0279] 본 발명의 조성물의 형태는, 바람직하게는 유동성이 있는 액체상, 즉 용액상이다. 본 발명에 있어서 「유동성을 갖는다」란, 그 형태를 부정형으로 변화시키는 성질을 갖는 것을 의미하고, 예를 들어 용액과 같이, 항상 흘러 움직이는 성질을 갖는 것을 필요로 하지 않는다. 바람직하게는, 예를 들어 조성물을 시린지 등에 봉입하고, 추간판의 수핵 부위에 주입할 수 있는 것 같은 유동성을 갖는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 몇 가지 양태 중 하나에서는, 조성물을 20℃에서 1시간 정치한 후에, 14G 내지 26G의 주사 바늘을 붙인 시린지로 추간판의 수핵 부위에 주입할 수 있는 것 같은 유동성을 갖는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 21G의 주사 바늘로 주입할 수 있는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물이 동결 건조제 등의 건조 상태에서 제공되는 경우에는, 적용 시에 용매 등을 사용해서 상술한 바와 같은 유동성이 있는 조성물로 할 수 있다.
- [0280] 용액상인 본 발명의 조성물은, 시린지, 겔용 피펫, 전용 주사기, 전용 주입기, 충전 기구 등에서 추간판의 수핵 부위에 용이하게 적용할 수 있다.
- [0281] 본 발명의 조성물 점도가 높은 경우에는, 시린지로 적용하는 것이 곤란해지기 때문에, 가압형이나 전동형 등의 시린지를 사용해도 된다. 시린지 등을 사용하지 않아도, 예를 들어 주걱, 막대 등에서 수핵 부위의 결손부에 적용해도 된다. 시린지로 주입하는 경우, 예를 들어 14G 내지 27G 또는 14G 내지 26G의 바늘을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0282] 본 발명의 조성물 수핵 부위로의 적용 방법은, 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 공지된 외과적 방법에 의해 환부를 직시 하에서 노출한 후에, 혹은, 현미경 하 또는 내시경 하에서, 시린지, 충전 기구 등을 사용하여, 본 발명의 조성물을 수핵 부위에 적용할 수 있다. 바람직한 양태에 하나에서는, 예를 들어 섬유원 표면으로부터 수핵 부위에 향해서 충전 기구의 바늘 등을 삽입하고, 본 발명의 조성물을 적용해도 된다.
- [0283] 본 발명의 조성물은 용액상이기 때문에, 수핵의 축소, 수핵 부위의 공동이나 결손부등, 어느 형상의 수핵 부위에도 적합할 수 있고, 수핵의 축소, 공동 또는 결손부의 전체를 충전할 수도 있다. 수핵의 축소, 수핵 부위의 공동이나 결손부는, 추간판의 변성 또는 손상에 의해 발생한 것일 수 있고, 혹은 외과적 수술로 수핵의 적어도 일부를 제거 또는 흡인하는 것에 의해 발생한 것일 수도 있다. 바람직하게는, 수핵의 적어도 일부를 제거함으로써 형성한 수핵 결손부에, 본 발명의 조성물을 적용하는 것이 바람직하다.
- [0284] 수핵의 적어도 일部的 제거는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 직시 하, 경피적, 현미경시 하, 또는 내시경적으로 행해지는 추간판 수핵 적출술 등이어도 된다. 또한 예를 들어, 등에 2cm 내지 10cm의 절개를 가하여, 근육을 추궁이라고 하는 척추의 후방 요소 후방면으로부터 박리하고, 추궁간의 인대를 절제하고, 신경과 추간판 헤르니아를 확인하고, 신경을 압박하고 있는 헤르니아를 적출하는 방법(러브법)이어도 된다. 또한, 수핵에 레이저를 조사하고, 수핵의 용량을 감소시키는 방법이어도 된다.
- [0285] 본 발명의 조성물 수핵 부위로의 적용 후에는 전술한 바와 같이, 가교제에 의해 조성물의 일부를 경화시킬 수 있다.
- [0286] 본 발명의 조성물 적용량은, 적용하는 대상의 수핵의 적용 부위의 용적에 따라서 정하면 되고, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 0.01ml 내지 10ml, 보다 바람직하게는, 0.1ml 내지 5ml이고, 더욱 바람직하게는 0.2ml 내지 3ml이다. 본 발명의 조성물을 수핵 결손부에 적용하는 경우에는, 수핵 부위의 결손부 용적을 충분히 충족하도록 주입되는 것이 바람직하다.
- [0287] 본 발명의 조성물 적용 횟수·빈도는, 증상과 효과에 따라서 증감 가능하다. 예를 들어, 1회만의 적용이어도 되고, 1월 내지 1년에 1회의 적용을 계속해서 행해도 된다.
- [0288] 알긴산은 동물의 체내에 원래 존재하지 않는 물질이기 때문에, 동물은 알긴산을 특이적으로 분해하는 효소를 보유하고 있지 않다. 알긴산은 동물 체내에 있어서는, 통상의 가수 분해에 의해 서서히 분해되지만, 히알루론산 등의 폴리머에 비해 체내의 분해가 완만하고, 또한 수핵 내에는 혈관이 존재하지 않기 때문에, 수핵 내에 충전

한 경우, 장기간의 효과 지속을 기대할 수 있다.

- [0289] 본 발명의 조성물이, 전술한 바와 같은 세포나 성장 인자와 함께 제공되지 않는 경우에도, 본 발명의 조성물이 수핵 부위에 적용될 때에, 전술한 세포나 성장 인자, 세포사 억제 인자, 후술의 다른 약제 등이 병용해서 사용되어도 된다.
- [0290] 본 발명의 조성물은, 수핵 부위에 적용함으로써, 추간관 조직 전체 및 수핵의 변성 변화를 억제하고, 재생을 촉진하는 효과를 발휘한다. 그 때문에, 본 발명의 조성물은, 추간관의 수핵 보충용 조성물로서 바람직하게 사용된다.
- [0291] 본 발명의 조성물의 바람직한 형태 중 하나는, 추간관의 변성 억제를 위한 조성물, 보다 바람직하게는, 추간관 수핵의 변성 억제를 위한 조성물이다. 「추간관 또는 수핵의 변성」이란, 가령 등에 의해 추간관의 세포수, 수분 함유량, 세포 외 매트릭스(타입 II 콜라겐, 어그리칸 등) 등이 저하되어 형태적인 변화가 발생하고, 기능 저하를 초래하는 상태를 말하며, 진행되면 추간관의 쇼크 흡수체로서의 기능이 달성할 수 없게 된다. 본 명세서에 있어서 「변성의 억제」는, 미 처치의 경우와 비교하여, 변성 변화가 억제되고 있으면 잘, 반드시 변성이 없는 상태로 하는 것을 의미하는 것은 아니다.
- [0292] 본 발명의 조성물의 양태 중 하나는, 수핵 재생을 위한 조성물이다. 수핵 재생이란, 섬유아형 세포의 집적을 방지하고, 수핵 세포의 비율이 높은 수핵이 재생되는 것을 목적으로 하는 것이며, II형 콜라겐이나 프로테오글리칸이 많은 수핵 조직이 재생되는 것을 의도하는 것이다. 이 수핵 재생의 단어에는, 수핵의 변성을 억제하는 것도 포함된다. 본 발명의 바람직한 양태 중 하나는, 본 발명의 조성물을 적용해서 재생된 수핵의 조성이, 천연이 정상적인 수핵의 구성에 가까운 것이 바람직하다.
- [0293] 또한, 본 발명의 바람직한 양태의 조성물은, 추간관 변성 및/또는 추간관 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위해서 사용된다. 본 명세서에 있어서 「치료, 예방 또는 재발 억제」는 치료, 예방, 재발 억제, 저감, 억제, 개선, 제거, 발증율의 감소, 발증 시기의 지연, 진행 억제, 중증도의 경감, 재발률의 저하, 재발 시기의 지연, 임상 증상의 완화 등을 포함한다. 본 명세서에 있어서 「치료, 예방 또는 재발 억제」는, (만성적인) 동통의 완화를 포함한다. 본 발명의 조성물의 바람직한 형태, 특히 세포를 포매하는 담체를 경화하지 않고 사용하는 경우에는, 추간관 변성 및/또는 추간관 손상에 수반하는(만성적인) 동통(특히 요통)을 억제하기 위해서 사용된다.
- [0294] 이들 본 발명의 조성물의 바람직한 형태, 조성물의 사용 방법 등은, 상기한 기재에 따른다.
- [0295] 추간관 변성 및/또는 추간관 손상은, 예를 들어 추간관 헤르니아, 추간관증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간관염, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 요부 척주관 협착증, 추간관 손상, 요부 척주관 협착증에 수반하는 추간관 헤르니아(혼합성 요부 척주관 협착증 이라고도 하는)로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 상태 또는 질환이다. 추간관 변성 및/또는 추간관 손상이, 요통을 수반하는 것이어도 된다.
- [0296] 본 발명의 조성물은, 임상 증상이나 손상부의 크기·형상에 맞게, 세포를 포매하는 담체를 경화하지 않고 사용해도 되고, 그러한 양태에 있어서, 추간관 변성 및/또는 추간관 손상에 수반하는 동통, 특히 만성적인 요통을 억제하기 위해서 사용된다.
- [0297] 12. 치료 방법
- [0298] 본 발명은 상기 본 발명의 조성물을 사용하는, 추간관 변성 및/또는 추간관 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 치료 방법은, 추간관 변성 및/또는 추간관 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 방법이며, 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염을 함유하고, 유동성을 갖는 조성물을, 상기 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간관 수핵 부위에 적용하고, 적용한 상기 조성물의 일부분을 경화하는 것을 포함한다.
- [0299] 본 발명의 치료 방법은, 본 발명의 조성물을 수핵 부위에 적용 하기 전에, 수핵의 적어도 일부를 제거하는 공정을 포함해도 된다.
- [0300] 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상은, 예를 들어 추간관 헤르니아, 추간관증, 척추 변성 미끄럼증, 화농성 추간관염, 변형성 척추증, 척주관 협착증, 추간관 손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 상태 또는 질환이다. 본 발명의 몇 가지의 양태의 치료 방법에서는, 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상은, 추간관 헤르니아이며, 특히는, 요추 추간관 헤르니아이다. 본 발명의 몇 가지의 양태의 치료 방법에서는, 상기 추간관 변성 및/또는 추간관 손상은, 요부 척주관 협착증에 수반하는 추간관 헤르니아(혼합성 요부 척주관 협착증 이라

고도 한다)이다. 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 만성 요통이어도 된다. 추간판 변성 및/또는 추간판 손상이, 이들의 상태 또는 질환의 조합이어도 된다.

[0301] 또한, 본 발명의 몇 가지의 양태 중 하나에서는, 상기 본 발명의 조성물을 사용하는, 추간판의 변성 변화를 억제하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 바람직한 양태 중 하나에서는, 상기 본 발명의 조성물을 사용하는, 추간판의 수핵을 재생하는 방법을 제공한다.

[0302] 이들 방법은, 간엽계 줄기 세포 및 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염을 함유하고, 유동성을 갖는 조성물을, 추간판 변성 억제 또는 수핵 재생을 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하고, 적용한 조성물의 일부를 경화하는 것을 포함한다. 상기한 방법은, 본 발명의 조성물을 수핵 부위에 적용 하기 전에, 수핵의 적어도 일부를 제거하는 공정을 포함해도 된다.

[0303] 본 발명의 조성물의 바람직한 형태, 구체적인 추간판의 수핵 부위로의 적용 방법, 조성물의 경화 방법, 용어의 정의 등은, 상술한 바와 같다. 다른 추간판의 치료 방법이나 치료약을 적절히 조합해서 본 발명의 치료 방법을 행해도 된다.

[0304] 또한, 수핵 부위에 본 발명의 조성물을 적용하기 전에, 혹은 동시에, 혹은 나중에, 스트렙토마이신, 페니실린, 토브라마이신, 아미카신, 겐타마이신, 네오마이신 및 안호테리신 B 등의 항생 물질, 아스피린, 비스테로이드성 해열 진통제(NSAIDs), 아세트아미노펜 등의 항염증약, 단백 분해 효소, 부신피질 스테로이드 약, 심바스타틴, 로바스타틴 등의 HMG-CoA 환원 효소 저해제 등의 병용약을 충전하도록 해도 된다. 이들 약제는 본 발명의 조성물에 혼입되어서 사용해도 된다. 또는, 경구 혹은 비경구로 병용해서 투여되어도 된다. 기타, 근이완약, 오피오이드 진통약, 신경성 동통 완화 약 등이 필요에 따라서 경구 혹은 비경구로 병용해서 투여되어도 된다.

[0305] 본 발명은, 본 발명의 조성물을 제조하기 위한 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염의 사용에도 관한 것이다.

[0306] 본 발명의 사용은, 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 위한 조성물을 제조하기 위한 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염의 사용이며, 상기 조성물이, 대상의 수핵 부위에 적용하고, 적용 후에 일부분을 경화하도록 사용되고, 수핵 부위로의 적용 시에 유동성을 갖는다.

[0307] 본 발명은, 또한 간엽계 줄기 세포 및 저엔도톡신알긴산의 1가 금속염을 함유하고, 유동성을 갖는 조성물을, 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제를 필요로 하는 대상의 추간판 수핵 부위에 적용하고, 적용한 조성물의 일부를 경화하는, 추간판 변성 및/또는 추간판 손상의 치료, 예방 또는 재발 억제에 있어서 사용되기 위한 저엔도톡신알긴산의 1가의 금속염을 제공한다.

[0308] 13. 본 발명의 조성물 평가

[0309] 본 발명의 조성물은, 발명자들이 새롭게 확립한 양 중증 추간판 변성 모델을 사용해서 평가할 수 있다. 중증 추간판 변성 모델은, (a) 1회째의 수술에 있어서, 양 추간판으로부터 양 체중의 0.00004% 내지 0.00005%에 상당하는 양의 수핵 조직을 제거하고, 변성 추간판을 제작하는 것 및 (b) 1회째의 수술의 4주간 후에, (a)에서 제작한 변성 추간판으로부터 더욱 양 체중의 0.00014% 내지 0.000175%에 상당하는 양의 수핵 조직을 제거함으로써, 중증 추간판 변성 양 모델을 제작할 수 있다.

[0310] 바람직한 양태에서는, 체중 40 내지 50kg의 양에 대하여, (a) 1회째의 수술에 있어서, 양 추간판으로부터 20mg의 수핵 조직을 제거하고, 변성 추간판을 제작하는 것 및 (b) 1회째의 수술의 4주간 후에, (a)에서 제작한 변성 추간판으로부터 더욱 70mg의 수핵 조직을 제거함으로써, 중증 추간판 변성 양 모델을 제작할 수 있다.

[0311] 본 발명의 조성물은, 하기의 (a) 내지 (d)의 수순에서 평가할 수 있다. (a) 1회째의 수술에 있어서, 양 추간판으로부터 20mg의 수핵 조직을 제거하고, 변성 추간판을 제작하는 것, (b) 2회째의 수술로서, 1회째의 수술의 4주간 후에, (a)에서 제작한 변성 추간판으로부터 더욱 70mg의 수핵 조직을 제거함으로써 중증 추간판 변성 양 모델을 제작하는 것 (c) 2회째의 수술의 후, 발생한 공극에 대상의 조성물을 투여하는 것 및 (d) 조성물의 투여 후에, 변성 모델로부터 채취한 추체 및 추간판에 대하여 MRI, 조직 염색, 면역 조직 염색(IHC)으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 평가 방법으로, 추간판의 재생을 평가한다.

[0312] 종전의 대형 동물 모델에서는, 정상 추간판을 부분 적출함으로써 추간판 변성 모델을 제작하고 있었기 때문에 추간판이 자연 치유할 가능성이 있었다. 그러나, 이미 변성한 추간판을 부분 적출하는 이 동물 모델에 의해, 인간의 변성 추간판에 대한 본 실시예의 효과를 보다 정확하게 평가할 수 있다.

[0313] 실시예

- [0314] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단, 본 발명의 범위는 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0315] [실시예 1]
- [0316] 토끼 추간판 장애 모델에 있어서의 추간판 장애 치료 시험
- [0317] 본 실시예에서는, 골수 유래 간엽계 줄기 세포(BMSC)와 생체 흡수성 고정제 알긴산염(저엔도톡신 고순도 알긴산염, UPAL이라고도 한다) 겔을 포함하는 조성물을 사용하여, 추간판(IVD)을 절제한 후의 변성 IVD에 대한 BMSC의 이식의 재생 효과를 시험했다.
- [0318] 1. 재료 및 방법
- [0319] 1.1. 동물 실험
- [0320] 모든 동물에 대한 처치는, 홋카이도 대학의 동물 관리 사용 위원회(승인 번호: 13-0051)에 의해 승인되고, 승인된 가이드 라인에 따라서 실시했다. 숫컷의 일본 백색 토끼(20주령, 3.2 내지 3.5kg)는, 산교 라보 서비스 가부시키가이샤(도쿄, 일본)로부터 입수했다.
- [0321] 1.2. 토끼 수핵 세포(NPC)의 조제
- [0322] 수핵(NP) 시료는, 4마리의 토끼를, 정맥내 펜토바르비탈 과잉 투여를 통해 안락사시킨 후, 요부 IVD(L1/2로부터 L5/6까지; 전부로 20의 IVD)로부터 얻었다. NPC를 수핵(NP)조직으로부터 분리하고, 기보의 방법으로 배양했다[2,5,7,8]. 구체적으로는, 무균 조건 하에서, 젤라틴상 NP 조직을, 마이크로 겹자를 사용해서 섬유륜(AF)으로부터 분리했다. 조직 표본은, 10% 소 태아 혈청(Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan), 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 1.25mg/ml 편기존(Life Technologies, Waltham, MA, USA)을 둘베코 개변 이글 배지(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 함유하는 배양 배지에 넣었다. 외인성 성장 인자는 사용하지 않았다. 시료를, 0.25% 콜라게나아제를 보충한 배지(와코 준야꾸 고교, 오사카, 일본)에 재현탁하고, 진탕 인큐베이터 중, 37℃, 20% O₂ 및 5% CO₂로 4시간 인큐베이트하고, 효소 소화에 의해 분리했다. NP 조직으로부터 분리한 세포를 배양 접시 중에서 증식시켜서, 가습 대기 중, 20% O₂ 및 5% CO₂를 포함하는 37℃에서 상기 배지에서 배양했다. 배지는 주 2회 교환하고, NPC는 계대 2에서 사용했다.
- [0323] 1.3. 토끼 동종 BMSC의 조제
- [0324] 토끼 동종 BMSC으로서, Cyagen(Santa Clara, CA, USA; 카탈로그 번호: RBXMX-01, 001, 로트 번호: 151114I31)으로부터 구입한 OriCell™ 토끼 간엽계 줄기 세포를 사용했다. 이들 세포는, 특징, 해동 후의 생존성, 세포 주기, 미분화 상태의 검증, 그리고 뼈형성, 연골 형성 및 지방 형성 계통에 따른 다능 성품화능에 대해서 시험되고 있다. BMSC는 제조업자의 설명서를 따라서 배양하고, 배지는 주 2회 교환하고, BMSC를 계대 2에서 사용했다.
- [0325] 1.4. UPAL 겔 및 삼차원(3D) 배양물의 조제
- [0326] 본 실시예에서는, UPAL 겔(Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 3D 배양을 위한 알긴산염 스키펠드로서 사용했다[2]. UPAL 겔의 정제 프로세스는, 기보와 같다[2]. 구체적으로는, 해조 중의 알긴산염을, 청정화 수순 [2]에 의해 수용성 알긴산 나트륨으로 변환함으로써 추출했다. 이 알긴산 염용액은, 고점성이었기 때문에 대량의 물로 희석했다[2]. 이어서, 추출물을 여과하여, 섬유상 잔사로부터 알긴산 나트륨 용액을 분리했다[2]. 고품질의 알긴산을 분리하기 위해서, 이 용액에 산을 첨가했다[2].
- [0327] 인산 완충 생리 식염수(와코 준야꾸 고교) 및 102mM CaCl₂에 용해한 2%(w/v)UPAL액을 겔화용으로 조제했다. 3D 배양 전에, 최종 농도 20mM의 5,6카복시플루오레세인디아크테이트숙신산이미딜에스테르(CFDA-SE; CFDA-SE Cell Proliferation Assay Kit; BIO RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여, 제조업자의 설명서를 따라서 BMSC를 형광 표지했다[9]. 계속해서, 표지 BMSC 및 비표지 NPC를, 1:1(각각 1×10⁶ 세포/ml)[1,10]의 비율로 UPAL액 중에 포매하고, 2×10⁶ 세포/ml의 최종 세포 농도를 얻었다[9,10]. UPAL/세포 혼합물은, 겔화를 위해, 102mM CaCl₂로 22페이지 바늘을 통해서 넣었다. 겔 비즈는, 저산소 조건(5% O₂ 및 5% CO₂) 하에서 7일간, 상기 배지에서 배양했다[10]. 또한, NPC 및 BMSC를, 1×10⁶ 세포/ml의 세포 농도로 UPAL액중에 별도로 포매했다. 세포 농도는, 각 군에 있어서 다른 총 세포수를 사용해서 효과를 비교하는 기보의 예 [11]에 기초하여 설정했다. 겔화 후,

겔 비즈를 상기와 마찬가지로 저산소 조건 하에서 배양했다. 실험군은 이하와 같다: (a) NPC 단배양; (b) BMSC 단배양; 및 (c) NPC+BMSC 공배양.

[0328] 배양 0일 및 7일 후에, 모든 겔 비즈를, 기보의 방법 [8]에 따라 겔 및 세포가 분리될 때까지 55mM 시트르산 나트륨에 용해했다. NPC+BMSC 공배양군에서는, 회수한 세포를, Diva 소프트웨어 version 7.0(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 갖는 BD FACSAria III High speed cell sorter를 사용해서 선별했다[1,12]. 사세포 및 잔사를 제거하고, 530nm로 형광을 발하는 세포를 BMSC으로서 동정하고, 비형광 세포를 NPC로서 동정했다.

[0329] 1.5. RNA 추출 및 리얼타임 정량 역전사 폴리메라아제 연쇄 반응(qRT-PCR)

[0330] 회수한 NPC 및 BMSC를 1ml의 TRIzolTM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 용해하고, RNeasy Mini 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용해서 샘플로부터 전RNA를 추출했다. TaqManTM 유전자 표현 어세이와 커스텀 TaqManTM 유전자 표현 어세이(표 1)(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 사용하여, 리얼타임 qRT-PCR 해석을 행하였다. 각 시료에 대해서 사이클 역치(Ct)를 얻고, $2^{-\Delta Ct}$ 방법을 사용하여, 하우스키핑 유전자 GAPDH의 Ct값을 기준으로 한 각 표적 유전자의 상대적 mRNA 발현을 계산했다[1].

표 1

qRT-PCR에 관한 어플라이드 바이오시스템스에 의한 사전 설계된 프라이머 및 프로브 믹스		
유전자	유전자 기호	어세이 ID
HIF-1 α	HIF1A	Oc03398626_m1
GLUT-1	SLC2A1	Oc03399482_m1
브라큐리	T	Oc03395780_m1
CDMP-1	GDF5	Oc00433564_m1
TGF- β	TGFB1	Oc04176122_u1
IGF-1	IGF1	Oc04096599_m1
Type II 형 콜라겐	COL2A1	Oc03396134_m1
어그리칸 *	ACAN	-

* 커스텀 TaqManTM 유전자 표현 어세이

[0331]

[0332] 1.6. 토끼 변성 IVD 모델을 사용한 생체내 시험

[0333] 생체내 시험에는 합계 48마리의 토끼를 사용했다. 샘플 사이즈는, 채용한 2개의 시점의 각각에 대해서, 이전의 보고 [2,7,8]에 기초하여 결정했다. 48마리의 토끼 중 32마리를 무작위로 선택하고, IVD 변성의 정성 분석(자기 공명 화상(MRI), 조직학, 면역 조직 화학(IHC))을 행하여, 계 80의 IVD를, 무상 대조(Intact control)군, 천자(Puncture)군(변성 제작을 위한 천자만), 추간관 절제(Discectomy)군(변성 IVD에 대하여 공동을 만들기 위한 부분적 추간관 절제), 겔군(변성 IVD에 대한 부분적 추간관 절제 및 UPAL 겔 매식), BMSC+겔군(변성 IVD에 대한 부분 추간관 절제 및 BMSC와 UPAL 겔의 매식)에, 무작위로 할당했다(각 군 8의 IVD).

[0334] 4마리의 토끼 NP 조직의 동결 절편을 사용하여, 이식한 BMSC의 생존 평가를 행하고, 합계 8마리의 IVD를, 무상 대조군 및 BMSC+겔군(1군당 4마리의 IVD)에 무작위로 할당했다. 나머지 12마리의 토끼를 사용하여, HIF-1 α , GLUT-1, 브라큐리의 발현 평가를 행하였다. 이들 마커는, 건강한 인간 NPC에 발현하는 주요한 마커로서 제창되고 있다[13](토끼 NP 조직의 파라핀 절편의 IHC를 사용하고 있다). 계 36의 IVD를 무작위로, 무상 대조군, 추간관 절제군, BMSC+겔군(각 군 4의 IVD)에 할당했다.

[0335] 1.7. UPAL 용액 중의 BMSC 표지 및 포매

[0336] 생체내 실험에 있어서, 이식 세포로서 시험관내 실험과 마찬가지로인 OriCellTM 토끼 간엽계 줄기 세포를 계대 2에서 사용했다. BMSC는 이식 전에 CFDA-SE로 표지하고, 2% UPAL액 중에 포매하고, 1×10^6 세포/ml의 최종 세포 농도로 조제했다[14].

- [0337] 1.8. IVD 변성의 제작 및 세포 이식
- [0338] 20주령 토끼는, 고령의 인간 집단의 상태를 모방하기에 충분히 노화되지 않아, 균일한 노화를 갖는 고령 토끼를 얻는 것은 곤란하다. 그래서 본 실시예에서는, 변성 IVD를 얻기 위해서 토끼 추간판의 섬유륜(AF) 천자 모델을 사용했다[8,15,16]. 케타민(10mg/kg) 및 자일라진(3mg/kg)의 정맥내 주사에 의해 전신마취를 행하고, 자발 환기로 세보플루란(2 내지 3%)과 혼합한 O₂ 및 공기(3.0l/분)로 마취 유지했다. IVD 변성은 L2/3 및 L4/5 IVD에서 18개이지 바늘을 사용하는 AF 천자에 의해 제작했다. L3/4 IVD는 대조로서 무처치로 하였다.
- [0339] IVD 천자의 4주간 후, BMSC를 함유하는 UPAL 용액을, L2/3 및 L4/5의 변성 IVD의 부위에 이식했다[8]. 전신마취 하에, 전외측 후복막 어프로치로 척추를 노출시켰다. 추간판 절제군, 껌군 및 BMSC+껌군에서는, 18개이지 바늘을 천자해서 자입구를 제작한 후, 변성 NP 조직을 10ml 시린지를 사용해서 흡인하고, 나머지의 NP 조직을 마이크로 겸자(Nagashima Medical Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용해서 L2/3 및 L4/5 IVD(IVD당 약 10 내지 12mg 습중량)로 제거하고, IVD 공동을 제작했다. L3/4 IVD는 대조로서 무처치로 하였다.
- [0340] 껌군에서는 27개이지 바늘을 장착한 마이크로 시린지로(Hamilton Medical, Bonaduz, Switzerland)를 사용하여, IVD 결손을 20 μ l의 2% UPAL 용액으로 채우고, BMSC+껌군에서는 IVD 결손을 BMSC를 함유하는 UPAL 용액으로 채웠다. 특히, 26개이지 바늘이 세포 생존율 또는 조직 변성에 영향을 미치지 않는 것이 나타나 있으므로, 27개이지 바늘을 사용했다[2,7,8,17]. 이어서, 1mL의 102mM CaCl₂를 UPAL액 위에 살포해서 껌화를 유도했다. 5분 후, 수술창을 생리 식염수로 세정하고 닫았다. 천자군으로는 가짜 수술을 행하였다. IVD 변성의 분석을 위해 수술의 4주 후와 12주 후, 또는 NPC 마커의 발현 평가를 위해서, 수술의 1일 후, 7일 후 및 28일 후에, 토끼를 정맥 내 펜토바르비탈 과량 투여에 의해 도살했다. 인간 BMSC가 토끼 IVD에 미치게 하는 효과를 평가하기 위해서, 골수 유래 인간 간엽계 줄기 세포(hMSC-BM; PromoCell, Heidelberg, Germany; 카탈로그 번호: C-12974, 로트 번호: 412Z022.4)를 사용해서 같은 매식 실험도 행하였다.
- [0341] 1.9. 이식된 BMSC 생존의 평가
- [0342] 매식 후 4주째와 12주째에, CFDA-SE 형광 표지[18,19]에 기초하여 매식 BMSC의 생존 확인했다. IVD(무상 대조군 및 BMSC+껌군)를 절반으로 수평 절단하고, 액체 질소 중에서 동결하고, 5mm슬라이스로 절편화하고, 이어서 대비 염색으로서 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI; Invitrogen; P36935)로 염색했다. 특히, DAPI양성 세포는 생존 대 사멸의 NPC 및 BMSC를 특정할 수 없기 때문에, 이식 BMSC의 생존율을 정량할 수는 없었다.
- [0343] 1.10. MRI 해석
- [0344] 수술 후 4주째와 12주째에, 7.0-T MR 스캐너(Varian Unity Inova; Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA)를 사용해서 IVD의 T2 강조 정중시상 단상을 얻었다[2,8,16]. 피르만 분류(그레이드 5는 중증 변성으로서 분류했다)를 사용하여, IVD 변성을 그레이드화했다[20]. MRI 지수를 산출하기 위해서, 분석 소프트웨어 버전 12.0(AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)을 사용해서 정량 분석도 행하였다. MRI 지수(NP 면적과 평균 신호 강도와의 곱)을 NP의 변성의 정량화에 적용하고, 정량 데이터는 미처치 대조 IVD에서 얻어진 MRI 지수(상대 MRI 지수)에 대한 퍼센티지로서 나타냈다[2,8,16].
- [0345] 1.11. 조직학적 분석
- [0346] MRI 분석 후, 각 IVD를 조직학적 염색을 위해서 처리했다. 프로테오글리칸 발현을 평가하기 위해서, 정중시상 단절편(5mm 두께)을 헤마톡실린과 예오신(H & E) 그리고 사프란인O-패스트 그린에 의해 염색했다[8]. IVD의 반정량 분석을 행하여, 0(정상)부터 5(고도 변성)로 등급 분류했다[21,22]. 구체적으로는, 이 조직학적 척도는 AF 구조의 형태학적 변화에 초점을 맞추고 있다.
- [0347] 1.12. IHC 분석
- [0348] 수술 후 4주째 및 12주째에 I형 및 II형 콜라겐을 검출하기 위해서 면역 조직 화학(IHC) 염색을 행하여[8], 수술 후 1일째, 7일째, 28일째에 HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리를 검출했다. I형 및 II형 콜라겐 염색에는, I형 콜라겐(Sigma-Aldrich; C2456, RRID: AB_476836) 및 II형 콜라겐(Kyowa Pharma Chemical, Toyama, Japan; F-57)에 대한 마우스 모노클로날 항체를 적용했다. 염색은 대비 염색으로서 3,3'-디아미노벤지딘염산염(Dako) 및 Mayer's 헤마톡실린(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용해서 전개했다. HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리 염색에 대해서는, HIF-1 α 에 대한 DyLight 550 결합 토끼 폴리클로날 항체(Novus Biologicals, Centennial, CO, USA; NB100-479R, RRID: AB_1642267), GLUT-1에 대한 PE 결합 토끼 폴리클로날 항체(LS Bio, Seattle, WA, USA; LS-

A109342-100) 및 브라큐리에 대한 비결합 토끼 폴리클로날 항체(LS Bio; LS-C31179-100, RRID: AB_911118)를 적용했다. 또한, Alexa Fluor 594 결합 염소항 토끼 폴리클로날 항체(Invitrogen; A32740)을 브라큐리의 2차 항체로서 사용했다. 염색은, 대비 염색으로서 DAPI를 사용해서 전개했다.

[0349] I형 및 II형 콜라겐, HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리의 양성 세포는, 독립한 무작위로 선택한 5 시야로 따로따로 계측했다[2,8]. 시야는, 깊은 영역 및 표면 영역의 양쪽을 포함하는 NP의 폭에 미친다. 수치는 모든 평가 항목에 있어서의 총 세포수에 대한 양성 세포의 비율로, 또한 NPC 마커 평가를 위한 CFDA-SE 양성 세포수에 대한 비율로 표현된다. 모든 실험은 I형 및 II형 콜라겐 평가를 위해서 8개의 IVD 및 각 처치군으로부터의 NPC 마커 평가를 위해서 4개의 IVD에 대해서, 각각의 시점에서 행하였다.

[0350] 1.13. 통계 해석

[0351] 모든 데이터는, 평균±표준 오차(SE)로서 나타난다. 다군 비교에 대해서는 One-way 분산 분석(ANOVA) 및 투키-크레이머 사후 검정을 행하였다. 2군 비교에 대해서는 Paired t 검정을 행하였다. 모든 통계 계산은, 유의 역치 $p < 0.05$ 로, JMP Pro-version 14.0 통계 소프트웨어(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용해서 행하였다.

[0352] 2. 결과

[0353] 2.1. NPC 및 BMSC 공배양은, BMSC의 NPC에의 분화 그리고 성장 인자 및 ECM의 산생을 촉진한다

[0354] 각 세포형에 대한 NPC 및 BMSC 공배양의 효과를 조사하기 위해서, 비표지 NPC 및 CFDA-SE 표지 BMSC를, 3D 배양을 위해서 UPAL 겔 중에 포매했다. 본 발명자는, 공배양군에 있어서, 세포 소터를 사용해서 양쪽의 세포형을 수집했다. 인산 완충 식염수/세포 현탁액 분석은, 전방 산란 및 측방 산란을 사용해서 행하였다. P1 게이트는 2D 도트 플롯(도 1a)으로 그리고, 사세포 및 잔사를 제외했다. 비표지 NPC 및 CFDA-SE 표지 BMSC를, 형광 대 측방 산란 도트 플롯에 있어서 상이한 게이트를 사용해서 선별했다(도 1b). 따라서, P2 게이트를 비표지 세포 상에 설정하고, P3 게이트를 CFDA-SE 표지 세포 상에 설정하고, 교차 오염을 회피하기 위해서 2개의 게이트의 사이에 간극을 마련했다[1]. 겔 용해 및 세포 선별에 이어, (a) NPC 대조(day0), (b) NPC 단배양, (c) NPC 공배양, (d) BMSC 대조(day0), (e) BMSC 단배양 및 (f) BMSC 공배양의 6개의 타입의 세포를 얻었다. BMSC 분화의 해석에 대해서는, 6종류의 세포에 있어서, NPC 마커로서 HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리의 유전자 발현, 성장 인자로서 CDMP-1, TGF- β 및 IGF-1의 유전자 발현, 그리고 세포 외 매트릭스(ECM)로서 타입 II 콜라겐 및 어그리칸의 유전자 발현을, qRT-PCR을 사용해서 평가했다.

[0355] NPC 공배양에 있어서의 HIF-1 α 의 유전자 발현은, NPC 대조와 비교해서 유의하게 증가하고($p = 0.0218$, 투키-크레이머 검정), BMSC 공배양에서는 BMSC 대조($p = 0.0041$, 투키-크레이머 검정) 및 단배양($p = 0.0041$, 0.0116 , 투키-크레이머 검정)과 비교해서 유의하게 증가했다(도 1c).

[0356] NPC 공배양에 있어서의 GLUT-1의 발현은, NPC 대조($p < 0.0001$, 투키-크레이머 시험) 및 단배양($p < 0.0001$, 투키-크레이머 시험)과 비교해서 유의한 증가를 보이고, NPC 단배양에서는, NPC 대조($p < 0.0001$, 투키-크레이머 시험)와 비교해서 유의한 증가를 보였다. BMSC 공배양에서는, BMSC 대조($p = 0.0189$, 투키-크레이머 검정)와 비교해서 GLUT-1 발현이 유의한 증가를 보였다(도 1d). 이에 반해, 브라큐리의 유전자 발현은, 3종류의 NPC간에서 통계적 유의차를 나타내지 않았다. 또한, 브라큐리의 유전자 발현은, BMSC 공배양에 있어서만 관찰되어, BMSC 대조 및 단배양의 어느 것에 있어서도 관찰되지 않았다(도 1e).

[0357] NPC 공배양에 있어서의 CDMP-1, TGF- β 및 IGF-1의 유전자 발현은, NPC 대조($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0002$, 투키-크레이머 시험) 및 단배양($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0082$, 투키-크레이머 시험)과 비교해서 유의하게 증가하고, NPC단배양에 있어서의 발현은, NPC 대조($p = 0.0179$, $p < 0.0001$, $p = 0.0079$, 투키-크레이머 시험)와 비교해서 유의하게 증가했다. BMSC 공배양에 있어서의 발현은, BMSC 대조($p = 0.0011$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, 투키-크레이머 시험) 및 단배양($p = 0.0015$, $p = 0.0386$, $p < 0.0001$, 투키-크레이머 시험)과 비교해서 유의하게 증가했다(도 1f-h).

[0358] NPC 공배양 및 단배양에 있어서의 II형 콜라겐의 발현은, NPC 대조($p = 0.0036$, $p = 0.0035$, 투키-크레이머 시험)과 비교해서 유의하게 증가하고, BMSC 공배양에 있어서의 발현은, BMSC 대조($p = 0.004$, 투키-크레이머 시험) 및 단배양($p = 0.0226$, 투키-크레이머 시험)과 비교해서 유의하게 증가했다(도 1i). 어그리칸에 대해서는, NPC 공배양에 있어서의 유전자 발현은, NPC 대조($p = 0.0047$, 투키-크레이머 시험) 및 단배양($p = 0.0392$, 투키-크레이머 시험)과 비교해서 유의하게 증가하고, 단배양에 있어서의 발현은 NPC 대조($p = 0.0274$, 투키-크레이머 시험)와 비교해서 유의하게 증가했다. 특히, 어그리칸은 BMSC 공배양으로만 발현되었지만, BMSC 대조 또는 단일 배양에서

는 발현하지 않았다(도 1j).

[0359] 2.2. 이식 BMSC의 생존

[0360] 생체내 시험에 있어서, BMSC+젤군에서는 CFDA-SE 표지 BMSC가 관찰되었지만, 수술 후 4주째와 12주째에서는 무상 대조군에서는 관찰되지 않았다(도 2). 인간 BMSC군도 BMSC+젤군(토끼 BMSC)과 마찬가지로 조건을 나타내고, 이식된 BMSC가 이식 후 12주째에 IVD에서 생존한 것이 확인되었다. 절개하면, 젤의 압출은 인정되지 않았다.

[0361] 2.3. BMSC와 UPAL 젤의 병용은, 변성 IVD에 있어서의 추간판 절제 후의 IVD 재생을 촉진한다

[0362] 치료된 IVD에 있어서의 변성 변화를 MRI에 의해 정성적으로 분석하고, T2 강조 정중시상 단 화상을 포착했다(도 3a). BMSC+젤군에 있어서의 피르만 그레이드는, 4주째에 추간판 절제군보다 유의하게 낮고($p=0.003$, 투키-크레이머 검정), 12주째에 천자군과 추간판 절제군으로 유의하게 낮았다($p=0.0009$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정). 또한, 젤군의 변성도도 12주째에 추간판 절제군보다 유의하게 낮았다($p=0.0028$, 투키-크레이머 검정)(도 3b). 젤군과 BMSC+젤군 사이에 유의차는 관찰되지 않았다. BMSC+젤군의 MRI 지수는, 4주로 추간판 절제군($p=0.0085$, 투키-크레이머 시험) 및 12주에서의 천자, 추간판 절제 및 젤군($p=0.0002$, $p<0.0001$, $p=0$ 내지 0.248, 투키-크레이머 시험)보다 유의하게 높았다. 또한, 12주 후에는 젤군의 지수가 추간판 절제군보다 유의하게 높았다($p=0.0092$, 투키-크레이머 검정)(도 3c). 특히, 토끼 BMSC군과 인간 BMSC군 사이에서는, 피르만 그레이드 또는 MRI 지수의 어느 것에 있어서도 유의차는 관찰되지 않았다.

[0363] 조직학적 변성도 분류 전에, NP 및 AF를 포함하는 IVD의 전체 구조를 평가하고, 군간에서 육안적인 차이를 관찰했다. IVD의 조직학적 평가의 결과, 무상의 대조 표본은, 내부AF의 구조적 붕괴를 수반하지 않고, NP 조직은 전형적인 타원형을 나타냈다(도 4a 및 b). 추간판 절제군에서는, 내측은 AF가 붕괴되고, NP 조직의 섬유성 변화가 4주째와 12주째의 양쪽에서 관찰되었다. 그러나, BMSC+젤군에 있어서의 내측 AF는, NP 조직의 섬유성 변화는 최소에 남고, 4주째와 12주째의 양쪽의 시점에서 양호하게 보존되고 있는 것 같아서, 젤군에 있어서의 내측 AF도 또한, 비교적 양호하게 보존되고 있는 것 같았다(도 4a 및 b). BMSC+젤군의 조직학적 변성 스코어는, 4주째 및 12주째 모두, 천자군($p=0.0006$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 추간판 절제군($p<0.0001$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 젤군($p=0.00$, 134, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정)보다 유의하게 낮게, 12주째에 젤군의 변성 스코어는 추간판 절제군보다 유의하게 낮았다($p=0.0006$, 투키-크레이머). 또한, 토끼 BMSC군과 인간 BMSC군 사이에 유의차는 인정되지 않았다. 골극 형성은 어느 군이라도 인정되지 않았다.

[0364] 2.4. BMSC와 UPAL 젤의 병용은, 변성한 IVD에 있어서의 ECM 산생을 촉진한다

[0365] 이어서, 본 발명자는 IVD에 있어서의 ECM 산생을 평가했다. 특히, II형 콜라겐은 IVD 기능에 필요한 필수 성분이지만, IVD 변성 과정에서는 I형 콜라겐 합성의 증가가 관찰된다[23]. II형 콜라겐 양성 세포의 비율은, BMSC+젤군에서는 4주째에 있어서 천자군 및 추간판 절제군에 비해 유의하게 높고($p=0.0001$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 12주째에 있어서 천자군, 추간판 절제군 및 젤군보다 유의하게 높았다($p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정). 또한, 젤군은, 4주째에 있어서 추간판 절제군과 비교해서 유의하게 높은 비율을 나타내 ($p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 12주째에 있어서 천자군 및 추간판 절제군과 비교해서 유의하게 높았다($p=0.0231$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정)(도 5).

[0366] 한편, I형 콜라겐 양성 세포의 비율은, 4주째 및 12주째의 모두, BMSC+젤군은 천자군($p<0.0001$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 추간판 절제군($p<0.0001$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 젤군($p<0.0001$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정)보다 유의하게 낮았다. 또한 비율은, 4주에서는 젤군이 추간판 절제군보다 유의하게 낮고($p<0.0001$, 투키-크레이머 검정), 12주에서는 천자군 및 추간판 절제군보다 유의하게 낮았다($p=0.0007$, $p<0.0001$, 투키-크레이머 검정). IHC 분석에 의한 양쪽 평가에 있어서, 토끼 BMSC군과 인간 BMSC군 사이에 유의차는 관찰되지 않았다.

[0367] 2.5. 변성 IVD에 있어서의 이식 BMSC의 NPC에의 분화

[0368] 마지막으로, HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리 양성 세포를 경시적으로 관찰하고, 생체내에 있어서 이식 BMSC가 NPC로 분화되는 메커니즘을 검토했다(도 6a-c). 무상 대조군에서는, 대부분 모든 세포가 모든 시점에서 3개의 NPC 마커에 대해서 양성이었다. BMSC+젤군에서는 HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리 양성 세포가 1일째에 저레벨에서 관찰되었지만, 양성 세포수는 경시적으로 증가했다. 전체 세포수에 대한 3종류의 NPC 마커 양성 세포의 비율은, 1일째 및 7일째와 비교해서 28일째로 유의하게 높았다($p<0.0001$, $p<0.0001$, 스튜던트의 t 검정). 이에 대해, 추간판 절제군에서는, 약 20%의 세포가 모든 시점에서 양성이었다(도 6d-f). 마찬가지로, CFDA-SE 양성 세포수(이식 BMSC를 나타낸다)에 대한 3종류의 NPC 마커 양성 세포의 비율은, 1일째 및 7일째와 비교해서 28일째로 유

의하게 높았다($p<0.0001$, $p<0.0001$, 스튜던트 t-검정)(도 6g-i).

[0369]

3. 고찰

[0370]

IVD의 재생능은 현저하게 낮기 때문에, 추간판 절제에 의해 발생한 결손은 조직 수복이 불충분해서, 가일층의 IVD 변성으로 이어질 가능성이 있다[2]. 본 실시예에 있어서, UPAL 겔 단독에서도 추간판 절제 후와 비교해서 IVD 변성을 억제했지만, BMSC와 UPAL 겔을 병용하면, IVD 재생을 유도하는 것 보다 강력한 효과를 발휘했다. 또한, 인간 BMSC와 토끼 BMSC에서는, IVD 재생은 양 군간에서 동등하게 관찰되었다. 몇 가지의 이전의 연구에 있어서도, 변성 IVD에 있어서의 여러가지의 BMSC의 재생 능력이 실증되어 있다[18,24,25]. 또한, UPAL 겔은, 높은 생체 적합성 및 충분한 생체 역학적 특성을 나타내 내인성 수복 치료 전략을 지지하기 위해서 [2], 변성 IVD 부위에 BMSC를 이식한 후의 IVD 재생 및 가일층의 변성 예방을 위한 최적의 환경을 제공한다.

[0371]

본 실시예에서는, NPC 마커, 성장 인자 및 ECM의 유전자 발현은, 시험관내에서의 각 3D 단배양과 비교하여, NPC와 BMSC와의 3D 공배양으로 유의하게 증가했다. 이들 결과는 NPC와 BMSC의 공배양이 NPC로의 BMSC 분화를 유도하고, 그 결과, NPC와 BMSC 사이의 상호 활성을 유도하고, 양 세포형에 있어서의 ECM 산생의 증강을 초래하는 것을 나타낸다. 이것은, NPC와 BMSC와의 공배양이 BMSC를 자극해서 NPC형 표현형으로 분화시키는 것을 나타내고 있는 것 외의 몇가지의 시험관내 연구의 지견과도 일치하고 있고[1,12,26], 성장 인자의 산생[1,11,27] 및 ECM 합성의 업규제를 통한 NPC와 BMSC 사이의 상호 활성화를 지지한다[1,5,10,26].

[0372]

또한, 매식된 BMSC에 있어서의 NPC 마커의 발현 경시적 증가 및 추간판 절제 단독후의 결과와 비교해서 ECM 산생의 증강을 나타내는 마찬가지로 결과가, 생체내 시험에 있어서 관찰되었다. 우리들이 아는 것만으로서, 알긴 산염 및 BMSC를 생체내에서 이식했을 때의 BMSC가 NPC로 분화될 때의 메커니즘을 검토한 보고는 없지만, 어떤 연구에 있어서, 아텔로콜라겐에 매립된 이식된 MSC가 NPC로 분화할 수 있는 것이 실증되었다[28]. 구체적으로는, 녹색 형광 단백질로 표지한 자가 BMSC를 성숙 토끼 IVD에 이식하고, IHC 분석에 의해 이식 세포의 분화를 측정했다. 이식 후 48주째에, 이식 BMSC는 HIF-1 α , GLUT-1 및 MMP-2가 양성인 것이 나타나고, 이것은 BMSC가 NPC의 대표적 표현형의 특징의 몇가지를 발현하는 세포로 분화된 것을 의미한다[28].

[0373]

생체내 시험에서는, 조직학적 해석에 의해, 겔 단독의 이식은 추간판 절제 후와 비교해서 IVD 변성을 예방하는 것 및 BMSC+겔의 병용은 변성의 예방에 의해 강력한 효과를 발휘하는 것이 더욱 나타났다. 이것은 겔 단독으로는 추간판 절제 방법과 비교해서 IVD의 함수량을 보존하지만, BMSC+겔의 조합에서는 함수량 보존에 대하여 보다 강력한 효과를 초래하는 것을 시사하는 MRI 소견과 일치한다. IHC의 결과는 또한, BMSC+겔의 조합은, 변성 NP 조직에 있어서의 ECM 합성을 촉진시키는 것을 시사하고, 이것은 적절한 IVD 기능에 중요해서, I형 콜라겐의 산생 저하를 통한 변성 진행의 예방에 연결된다. 또한, 천자군(추간판 절제를 수반하지 않는 변성 IVD)과 비교한 BMSC+겔의 조직학적 결과는 BMSC 이식이 IVD 재생으로 이어지는 것을 시사했다. 모두, 이들 결과는 이식된 BMSC가 경시적으로 NPC로 분화되고, 생체내에서의 IVD 재생을 발생하는 것을 나타낸다.

[0374]

AF 재생에 관해서는, 겔군 및 BMSC+겔군은, NP에 있어서의 콜라겐 I 산생을 유의하게 감소시켰지만, 겔 및 BMSC+겔의 충전에서 천자에 의한 AF 결손은 수복되었다. IVD 변성은 NP 세포 외 매트릭스의 분해에 의해 특징지어지기 때문에[2], 본 실시예에서는 주로 NP의 보존/재생에 초점을 맞췄다.

[0375]

추간판 세포 치료에 있어서는, 이식 세포의 추간판 내에서의 생착이 얻어지지 않고, 주입 부위로부터 이식 세포가 누출하는 리스크가 보고되고 있고, 그 결과, 골극이 형성된다고 하는 보고도 있다[5,29,30]. 따라서, 추간판 절제 후의 BMSC 이식의 경우, 세포 누출을 방지하기 위해서 담체 재료가 필요하다. 본 발명에 있어서는, BMSC+겔군으로 골극 형성은 관찰되지 않았다. UPAL 겔과 BMSC를 조합하여 사용하면 즉시 경화성이라고 하는 중요한 특징을 갖고, 그 결과, 세포 누출을 방지한다고 하는 점에서 임상적으로 유용하다.

[0376]

본 발명의 결과와 이전의 보고[1,11,12,26-28]에 기초하여, 본 발명자는, IVD 재생의 메커니즘은 이하와 같다고 생각했다.

[0377]

1) 매식된 BMSC는, UPAL 겔 중으로의 포매를 통해, 추간판 밖으로 누설될 일이 없고 IVD의 공동 내에 국재화할 수 있다.

[0378]

2) 매식된 BMSC는, 성장 인자 및 ECM을 산생하고, 기존의 NPC의 활성화를 초래한다.

[0379]

3) 활성화한 NPC는 또한, 성장 인자 및 ECM의 산생을 증가시킨다.

[0380]

4) 그 결과, 매식된 BMSC는 NPC로 분화된다.

- [0381] 5) 또한, BMSC 및 기존의 NPC는 서로 활성화하고, IVD 재생을 발생한다(도 7).
- [0382] 금회의 시험관내 실험에 있어서 BMSC와 NPC가 세포 융합하고 있으면, 세포의 분리가 불가능했다고 생각되기 때문에, IVD 변성의 주된 작용 기서를 세포 결합 작용이 구성하고 있을 가능성은 낮다고 생각한다. 또한, BMSC와 NPC는 생체내에서 직접 접촉은 인정되지 않았다. 따라서, 작용의 기초가 되는 메커니즘은 성장 인자 및/또는 BMSC와 NPC 사이의 상호 작용을 조절하는 몇가지의 중요한 액성 인자에 기인할 수 있다.
- [0383] References
- [0384] [1] Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med* 2010; 5(5): 701-11.
- [0385] [2] Tsujimoto T, Sudo H, Todoh M, et al. An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: a preclinical proof-of-concept study. *EBioMedicine* 2018; 37: 521-34.
- [0386] [3] Oehme D, Ghosh P, Shimmon S, et al. Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy: a preliminary study in an ovine model. *J Neurosurg Spine* 2014; 20(6): 657-69.
- [0387] [4] Noriega DC, Ardura F, Hernandez-Ramajo R, et al. Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled trial. *Transplantation* 2017; 101(8): 1945-51.
- [0388] [5] Naqvi SM, Buckley CT. Differential response of encapsulated nucleus pulposus and bone marrow stem cells in isolation and coculture in alginate and chitosan hydrogels. *Tissue Eng Part A* 2015; 21(1-2): 288-99.
- [0389] [6] Sudo H. Exploratory clinical trial on the safety and capability of dMD-001 in lumbar disc herniation. https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/icdr_e/ctr_view.cgi?recptno=R000039018. Accessed December 10, 2019.
- [0390] [7] Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, et al. Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. *Am J Pathol* 2014; 184(3): 753-64.
- [0391] [8] Sudo H, Minami A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum* 2011; 63(6): 1648-57.
- [0392] [9] Sato M, Uchida K, Nakajima H, et al. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(1): R31.
- [0393] [10] Ouyang A, Cerchiari AE, Tang X, et al. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2017; 35(1): 61-73.
- [0394] [11] Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine(Phila Pa 1976)* 2004; 29(14): 1508-14.
- [0395] [12] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006; 24(3): 707-16.
- [0396] [13] Risbud MV, Schoepfiin ZR, Mwale F, et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J Orthop Res* 2015; 33(3): 283-93.
- [0397] [14] Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res* 2008; 26(5): 589-600.

- [0398] [15] Lei T, Zhang Y, Zhou Q, et al. A novel approach for the annulus needle puncture model of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Am J Transl Res* 2017; 9(3): 900-9.
- [0399] [16] Ura K, Sudo H, Iwasaki K, Tsujimoto T, Ukeba D, Iwasaki N. Effects of intradiscal injection of local anesthetics on intervertebral disc degeneration in rabbit degenerated intervertebral disc. *J Orthop Res* 2019; 37(9): 1963-71.
- [0400] [17] Qian J, Ge J, Yan Q, Wu C, Yang H, Zou J. Selection of the optimal puncture needle for induction of a rat intervertebral disc degeneration model. *Pain Physician* 2019; 22(4): 353-60.
- [0401] [18] Wang H, Zhou Y, Huang B, et al. Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(5 6): 908-20.
- [0402] [19] Polzer H, Volkmer E, Saller MM, et al. Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(2): 156-65.
- [0403] [20] Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine(Phila Pa 1976)*2001; 26(17): 1873-8.
- [0404] [21] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006; 27(3): 335-45.
- [0405] [22] Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus: an experimental study. *Spine(Phila Pa 1976)*1998; 23(14): 1531-8.
- [0406] [23] Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 4): 652-5.
- [0407] [24] Wang F, Nan LP, Zhou SF, et al. Injectable hydrogel combined with nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells for the treatment of degenerative intervertebral disc in rats. *Stem Cells Int* 2019: 8496025.
- [0408] [25] Omlor GW, Lorenz S, Nerlich AG, Guehring T, Richter W. Disc cell therapy with bone-marrow-derived autologous mesenchymal stromal cells in a large porcine disc degeneration model. *Eur Spine J* 2018; 27(10): 2639-49.
- [0409] [26] Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine(Phila Pa 1976)*2004; 29(23): 2627-32.
- [0410] [27] Yang SH, Wu CC, Shih TT, Sun YH, Lin FH. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine(Phila Pa 1976)*2008; 33(18): 1951-7.
- [0411] [28] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine(Phila Pa 1976)*2005; 30(21): 2379-87.
- [0412] [29] Li YY, Diao HJ, Chik TK, et al. Delivering mesenchymal stem cells in collagen microsphere carriers to rabbit degenerative disc: reduced risk of osteophyte formation. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(9 10): 1379-91.
- [0413] [30] Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6(5): 348-55.
- [0414] [31] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;

8(4): 315-7.

- [0415] [32] Raynaud CM, Maleki M, Lis R, et al. Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. Stem Cells Int 2012; 2012: 658356.
- [0416] [33] Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. J Orthop Res 2010; 28: 1267-75.
- [0417] [실시에 2]
- [0418] 수핵 세포(NPC)와 고순도 간엽계 줄기 세포(REC)의 공배양(시험관내)에 의한 유전자 발현의 변화
- [0419] 1. 재료와 방법
- [0420] 1.1. 인간의 정상 추간판 수핵 세포(NPC)
- [0421] 인간의 정상 추간판 수핵 세포(NPC)는 홋카이도 대학 병원에 있어서의 사춘기 특발성 측만증의 청년 환자(15.3 ±3.3세)의 척추 전방 고정술의 즈음에 얻어진 세포를 사용했다.
- [0422] 1.2. 고도로 균일성을 갖는 고순도 간엽계 줄기 세포의 조제
- [0423] (1) 플로 사이토메트리에 의한 전방 산란광(FSC)의 CV값 측정
- [0424] 공지 방법(WO2016/17795)에 의해 미리 조제해 둔 복수의 REC 클론을, 플로 사이토메트리에 의한 전방 산란광의 CV값 측정에 사용했다.
- [0425] 플로 사이토메트리에 있어서의 FSC는 세포의 표면적 또는 크기에 비례한다. 본 실시예에서는, FSC의 CV값을 지표로 해서 세포 사이즈의 변동을 평가했다.
- [0426] (a) 개개의 REC 클론에 대하여 PI 염색을 행하여, PI 음성의 생세포 집단에 게이트를 설정하여, 사세포를 해석의 대상으로부터 제외했다.
- [0427] (b) PI 음성의 생세포 집단을 FSC/SSC의 사이트 그래프로 전개하고, 메인의 세포 집단에 게이트(P1)를 설정하여, 티끌이나 노이즈를 해석의 대상으로부터 제외했다.
- [0428] (c) P1 게이트 내의 세포 집단을 FSC의 히스토그램에서 전개하고, 마커(M1)를 설정하고, CV값을 계측했다.
- [0429] (2) 세포 증식능 및 지방 분화능의 평가
- [0430] 세포 증식능의 평가를 위해, 1×10^5 개의 REC 세포를 100mm 배양 접시에 파종하고, 37℃, 5% CO₂ 환경 하에서 5일간 배양하고, 그 후 셀 카운터를 사용해서 세포수 및 평균 세포 사이즈를 계측했다.
- [0431] 배양액은 FBS, basic FGF, Hepes, 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지(후지 필름 와코준야쿠사)를 사용했다.
- [0432] 또한, 지방 분화능의 평가를 위해, 5×10^4 개의 REC 세포를 24웰 플레이트에 파종하고, 37℃, 5% CO₂ 환경 하에서 2일간 배양하고, 그 후 지방 분화 유도 배지에 치환하고, 14일간 더 배양했다. 배양 14일 후에 오일 레드 O 염색을 행하여, 화상 해석에 의해 지방적 면적을 산출했다. 또한, 지방 분화 유도 배지는, 상기 배양 배지에 텍사메타손, 인도메타신, IBMX를 첨가한 배지를 사용했다.
- [0433] (3) 망라적 해석
- [0434] 복수의 REC 클론에 대해서, FSC의 CV값, 세포 증식률(증식능), 평균 세포 사이즈, 지방 분화능을 조사한바, FSC의 CV값이 낮은 REC 클론(CV=35% 이하)은 증식능, 분화능이 모두 높고, 평균 세포 사이즈가 작은 것을 알 수 있다(평균 세포 사이즈: 20μm 이하)(도 8).
- [0435] 반면에, FSC의 CV값이 높은 REC 클론(CV=35% 이상)은, 증식능, 분화능이 모두 낮게, 평균 세포 사이즈가 큰 것을 알 수 있다.
- [0436] CV값 30% 내지 35%의 클론의 평균 증식률은 6.4이고, CV값 25% 내지 30%의 클론의 평균 증식률은 9.2, CV값

25% 이하의 클론의 평균 증식률은 15.1이었다. 또한 평균 세포 사이즈가 $18\mu\text{m}$ 내지 $20\mu\text{m}$ 의 클론의 평균 증식률은 7.0이고, 평균 세포 사이즈가 $16\mu\text{m}$ 내지 $18\mu\text{m}$ 의 클론의 평균 증식률은 12.7, 평균 세포 사이즈가 $16\mu\text{m}$ 이하의 클론 평균 증식률은 21.3이었다.

[0437] 이하, 본 실시예에서는 FSC의 CV값이 낮은 REC 클론(CV=25% 이하)을 사용했다.

[0438] 1.3. REC를 포함하는 UPAL 조성물의 조제

[0439] NPC와 형광 표지된 고순도 간엽계 세포(REC)를 각 단독군과 혼합군으로 군 분류하고, 초고순도 알긴산(UPAL: 모치다 세이야쿠 제공)의 3차원 겔 중에서 공배양 또는 단독 배양하고, 배양 전(day0)과 배양 7일 후에, 3차원 겔을 용해 후, 셀 소터에서 하기의 세포로 분리했다.

[0440] (a) NPC 대조군(day0)

[0441] (b) NPC 단독 배양군

[0442] (c) NPC 공배양군

[0443] (d) REC 대조군(day0)

[0444] (e) REC 단독 배양군

[0445] (f) REC 공배양군

[0446] 상기 6군의 세포에 대해서 정량적 PCR 해석(qRT-PCR)에 의해 하기의 유전자 발현을 측정했다.

[0447] 수핵 세포의 마커

[0448] HIF-1 α

[0449] GLUT-1

[0450] 브라큐리

[0451] 성장 인자

[0452] CDMP-1

[0453] TGF- β

[0454] IGF-1

[0455] 세포 외 기질

[0456] 타입 II 콜라겐

[0457] 어그리칸

[0458] 유전자 발현량의 측정법은, 실시예 1에 준하여 행하였다.

[0459] 2. 결과

[0460] REC와 수핵 세포를 공배양하면, 단독 배양한 경우와 비교해서 분화 지표(HIF-1 α , GLUT-1, 브라큐리)가 수핵 세포, 간엽계 줄기 세포의 양쪽에서 상승했다(도 9).

[0461] 성장 인자(CDMP-1, TGF β , IGF-1) 및 세포 외 기질(타입 II 콜라겐, 어그리칸)에 대해서도 마찬가지이었다.

[0462] 수핵 세포와 고순도 간엽계 줄기 세포는 상호 작용해서 활성화하고, 간엽계 줄기 세포는 수핵 세포에 분화되어 가는 것이 시사된다.

[0463] [실시예 3]

[0464] 양 추간판 변성 모델에 있어서의 재생 촉진 효과(MRI 해석)과 조직학적 해석

[0465] 1. 재료와 방법

[0466] 7마리의 양 (40-50kg)은 GLP 준거로 수술했다.

[0467] 추간판 L1/L2(제1 요추와 제2 요추 사이의 추간판), 추간판 L2/L3(제2 요추와 제3 요추 사이의 추간판), 추간판

L3/L4(제3 요추와 제4 요추 사이의 추간판) 및 추간판 L4/L5(제4 요추와 제5 요추 사이의 추간판)를 이하의 4군으로 나누었다.

- [0468] 대조군(n=6): 무치치군
- [0469] 추간판 절제군(n=6): 수핵 조직의 적출만
- [0470] 겔군(n=8): 수핵 조직의 적출 후, 알긴산 겔을 매식
- [0471] REC+겔군(n=8): 수핵 조직의 적출 후, REC와 알긴산 겔을 매식
- [0472] 무치치군을 제외하여, 각 군의 추간판으로부터 20mg의 수핵 조직을 마취 하에 적출하고, 중증의 추간판 변성을 발생시켰다.
- [0473] 최초의 수핵 조직 적출로부터 4주간 후, 또한 70mg의 수핵 조직을 마취 하에 적출하고, 추간판 내의 공극에, 최종 세포 농도 1×10^6 cell/ml(100μ l)로 UPAL에 현탁된 REC(실시에 2, 1.2항으로 조제한 REC)를 주입했다.
- [0474] 매식 수술의 4주간 후, 양을 안락사시켰다.
- [0475] 처치 추간판의 변성 정량 평가 목적으로 3테슬라의 자기 공명 화상법(MRI)을 사용해서 분석하고, 그 후 추간판은 H & E 염색 및 사프란-0 염색에 의한 조직학적 평가, 또한 면역 조직 화학적 평가에 의한 타입 II 콜라겐 발현의 평가를 행하였다.
- [0476] 모든 데이터는 평균±표준 오차로 나타내고, 각 군간의 차는 일원 배치 분산 분석(ANOVA)과 투키-크레이머 사후 분석 검정으로 검정했다.
- [0477] 2. 결과
- [0478] 양 추간판의 환부에 겔 및 REC+겔을 매식 후, 4주간 후에 MRI로 추간판 변성을 평가한 결과, 피르만 분류에서는 무치치군(추간판 절제군)에 비교해서 겔 및 REC+겔군으로 유의하게 낮고, 또한 MRI 지수에서는 무치치군(추간판 절제군)에 비교해서 REC+겔군으로 유의하게 높았다(도 10). 조직 염색에 의한 조직학적 변성 스코어(Boos 분류)은 무치치군(추간판 절제군)에 비교해서 겔 및 REC+겔군으로 유의하게 낮게, 또한 겔군과 REC+겔군의 비교에서는 REC+겔군이 유의하게 낮았다(도 11). 면역 조직 화학 분석에서는, II형 콜라겐 양성 세포의 비율이 무치치군(추간판 절제군) 및 겔군보다 REC+겔군으로 유의하게 높았다(도 12).
- [0479] REC를 포함하는 UPAL 겔을 매식하면, 고도로 변성한 IVD에서는 추간판 절제 후의 IVD 변성을 억제하고, 타입 II 콜라겐 양성 세포는 REC+겔군으로 유의하게 높았다. 따라서, UPAL 겔을 병용한 REC는, 자발적 IVD 재생을 촉진하는 것이 나타났다. 또한, 본 발명자는, REC와 UPAL 겔과의 병용이 성장 인자 및 ECM 산생과 함께 내인성 NPC 활성화를 촉진하고, NPC에의 분화를 촉진하고, IVD 재생을 증강하는 것을 실증했다.
- [0480] [실시에 4]
- [0481] 본 실시예에서는, 중증의 IVD 변성을 나타내는 양 모델에 있어서, 골수 유래 고순도 간엽계 줄기 세포(REC)과 UPAL 겔과의 조합이, 추간판 절제 후(24주까지) 인 시투에서 IVD 재생을 증강하는 것을 실증했다. 또한, 본 실시예에서는, 건강한 인간 NPC 및 REC를, UPAL 겔 중의 3D 시스템 중에서 공배양하여, IVD 재생의 기초를 이루는 메커니즘을 평가했다. 또한 NPC 및 시판 중인 BMSC의 공배양 및 NPC와 REC 세포의 공배양을 행하고, NPC에 대한 REC 및 시판 중인 BMSC의 효과를 비교했다. 본 발명자들의 지견은, 변성 인간 IVD에 있어서의 헤르니아의 치료를 위한, REC와 인 시투 경화성 겔과의 조합의 임상 응용성을 시사하는 것이다.
- [0482] 1. 재료 및 방법
- [0483] 1.1. 시험 디자인
- [0484] 본 실시예에 있어서의 시험 디자인은, 이하의 내용에서 행하였다.
- [0485] (i) 시험관내에서의 인간 NPC와 REC의 3D 공배양을 통한 IVD 재생의 메커니즘 검토
- [0486] (ii) REC 및 시판 인간 BMSC와 NPC와의 3D 공배양을 통한, NPC에 대한 REC와 시판 인간 BMSC의 효과의 비교
- [0487] (iii) UPAL과 REC+UPAL 겔의 역학 특성의 측정
- [0488] (iv) 생체내에서의 추간판 절제 후의 중증 변성 IVD의 재생 능력의 평가

- [0489] (v) 이식 IVD에 있어서의 종양 형성의 평가
- [0490] 본 발명자들은, 중간관 절제 후에 UPAL 겔 중에 포매된 REC를 이식함으로써, 자발적인 IVD 재생을 촉진하면 가정했다.
- [0491] 홋카이도 대학 대학원의학 연구과의 윤리 위원회에 의해, 건강한 인간 IVD의 사용이 승인되었다. 동물 실험 수준은, 홋카이도 대학 및 Hamri 가부시키키가이샤(이바라키현)의 동물 실험 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되고, 이들의 위원회에 의해 권장되는 가이드 라인에 따라서 실시했다.
- [0492] 건강한 인간 NPC 및 REC를, UPAL 겔 중의 3D 시스템 중에서 공배양하여, IVD 재생의 기초를 이루는 메커니즘을 평가했다. 배양 0일 후 및 7일 후에, NPC 마커(HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리를 포함한다), 성장 인자(CDMP-1, TGF- β 및 IGF-1을 포함한다), 그리고 ECM 성분(II형 콜라겐 및 어그리칸을 포함한다)의 발현을, qRT-PCR(n=4)을 사용해서 전체 세포 타입에 있어서 분석했다(2, 9, 30, 31). 또한, NPC 및 시판 중인 BMSC를 공배양하고, NPC에 대한 REC 및 시판 중인 BMSC의 효과를 비교했다.
- [0493] 이어서, 비구속 압축 시험을 사용하여, UPAL 및 REC+UPAL 겔의 역학 특성을 평가했다. 원판상 겔을 0.5mm/분의 일정 속도로 압축하고, 영률을 계산했다(n=4)(3,15,32,33). 동물 실험에서는, 양 14마리(계 56회의 IVD)를 이하의 4군으로 분류했다. 4주간의 결과는 실시예 3에도 기재하고 있다.
- [0494] 무처리 대조군(4주간, n=6; 24주간, n=6): 무처리군
- [0495] 중간관 절제군(4주간, n=6; 24주간, n=6): 수핵 조직의 적출만, 중간관 절제군 이라고도 한다
- [0496] 겔군(4주간, n=8; 24주간, n=8): 수핵 조직의 적출 후, 알긴산 겔을 매식
- [0497] REC+겔군(4주간, n=8; 24주간, n=8): 수핵 조직의 적출 후, REC와 알긴산 겔을 매식
- [0498] 중증으로 변성한 IVD를 제작하기 위해서, 본 발명자들은, 처치한 IVD로부터 20mg의 NP 조직을 제거했다. 본 발명자들은 더욱, 최초의 수술의 4주간 후에, 변성 IVD로부터 70mg의 NP 조직을 제거했다. 예비 실험에서는, 양 모델에 있어서 20mg 이상의 NP 조직을 제거하면 4주간 후에 IVD 변성이 발생했기 때문에, 제거하는 조직의 초기량을 20mg으로 설정했다(도 19). 제2회째의 제거량은, 이전의 토끼 모델에서의 실험(2,3)에 의한 정상 및 변성 IVD의 제거량의 비에 기초하여, 70mg으로 설정했다. 2회째의 중간관 절제 후, UPAL 또는 REC와 UPAL과의 조합을 함유하는 용액을 중간관 내의 공극에 이식했다. 양은 이식의 4주 후(실시예 3) 및 24주 후에 안락사시켰다. IVD 변성을 평가하기 위해서, 3.0-T MRI(2,3,15,37,38)를 사용해서 IVD를 정성적으로 분석했다. 그 후, 조직학적 분석을 위해서 IVD를 H & E 및 사프란-0로 염색하고, ECM 성분의 분석 위해서, II형 및 I형 콜라겐의 레벨을 IHC에 의해 평가했다. 마지막으로, 조직 표본(2,3,15)을 사용해서 종양 형성 해석을 행하였다.
- [0499] 1.2. 통계 해석
- [0500] 정량 데이터를 위한 샘플 사이즈는, 투키-크레이머 검정을 사용하여, α 레벨 0.05 및 0.8의 파워로 파워 분석에 의해 결정했다. 통계 해석은 JMP Pro version 14.0 소프트웨어(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용해서 행하고, 값은 $p < 0.05$ 일 경우에 유의하다고 간주했다. 모든 데이터는, 평균 $\pm$ SD값으로서 나타난다. 다군 비교를 위해서 일원 배치 분산 분석(ANOVA)과 투키-크레이머 사후 검정을 행하였다. 2군간 비교에는 스튜던트의 t 검정 또는 맨-휘트니의 U 검정 및 웰치의 검정을 사용했다. 본 발명자들은 시료의 무작위화를 행하여, 시험되는 시료에 대하여 맹검화했다.
- [0501] 1.3. 시험관내에서의 REC 및 시판 인간 BMSC와 인간 NPC의 3D 공배양
- [0502] REC의 조제
- [0503] 본시험에서는, 가부시키키가이샤 재팬·티슈·엔지니어링으로부터 제공된 동결GMP 준거 REC를 사용했다. REC 및 시판 중인 인간 BMSC의 비교 분석에 있어서, REC의 3개의 클론, 즉 REC-02 프로토타입 #003-P6-191220, REC-02 HLWF-1-P6-210114 및 REC-02 QRKF-1-P6-210210을 계대 6에서 조제했다. 세포는 3D 배양 전에 37℃의 온욕 중에서 해동했다.
- [0504] 시판 중인 인간 BMSC의 조제
- [0505] 시판 중인 인간 BMSC(hMSC-BM; PromoCell, Heidelberg, Germany; C-12974, 로트 번호: 412Z022.4)는 기보에 따라 입수했다(2). 뼈형성, 연골 형성 및 지방 생성 계통에 속하는 이들 세포의 특성, 해동 후의 생존성, 세포주기, 미분화 상태, 다분화능을 시험했다. BMSC는 완전 배양 배지, 즉 20% HyClone소 태아 혈청(FBS; Cytiva,

Tokyo, Japan), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1.25mg/mL 편기존(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% HEPES(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) 및 0.1% bFGF(Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 보충한, L-글루타민 및 페놀레드(DMEM; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)를 함유하는 돌베코 개변 이글 배지(저글루코오스 레벨; 2mg/mL)를 사용하여, 제조업자의 지시서에 따라서 배양했다. 배지는 주에 2회 교환하고, 제4 계대 프로세스로부터의 BMSC를 사용했다(합계 6 계대는 REC와 마찬가지로였다).

[0506] UPAL 겔 및 3D 배양물의 조제

[0507] UPAL 겔(Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan)은 3D 배양을 위한 알긴산염 스캐폴드로서 사용했다(2,3).

[0508] 인산 완충 식염수(PBS; FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)에 용해한 2% (w/v)UPAL 용액을 조제하고, CaCl_2 용액(102mM)을 사용해서 겔화했다. REC 또는 시판 중인 BMSC를, 1×10^6 세포/mL(2,31,49)의 최종 세포 농도로 UPAL 용액과 혼합했다. 세포-UPAL 혼합 용액을, 겔화를 위해서 22게이지 바늘을 사용하여, 102mM CaCl_2 용액 중에 피펫으로 넣었다. 비즈상으로 얻어진 두 종류의 겔을, 배지와 함께 가습 환경(20% O_2 , 5% CO_2 , 37°C) 중에서 7일간 배양했다. 배지는 3일마다 교환했다. 3D 배양의 7일 후에 세포를 회수하기 위해서, 기보와 같이(2,3,35), 55mM 시트르산 나트륨을 사용해서 용해하고, 원심 분리(4°C에서 10분간 $110 \times g$)한 후, 겔 비즈로 세포를 회수했다. 또한, 전술한 바와 같이, 정상 조건 하에서 7일간 평면 배양(2D 배양)으로서 조제한 REC 및 시판 중인 BMSC를 대조군으로서 사용했다(즉, 이하의 4군을 실험군으로서 설정했다:1) 2D 배양 REC, 2) 3D 배양 REC, 3) 2D 배양 BMSC 및 4) 3D 배양 BMSC).

[0509] 세포 증식능의 해석

[0510] 2D 또는 3D 배양의 7일 후, 얻어진 4종류의 세포를 2차 배양을 위해서 다시 파종했다. 세포를 집밀 상태가 된 단계에서 회수하고, 세포수가 배가되기에 필요한 시간으로서 정의되는 배가 시간(T_d)에 기초하여 세포 증식능을 평가했다. T_d 는, 이하의 식을 사용해서 계산했다.

[0511] $T_d = (t_2 - t_1) \times \ln(2) / \ln(N_2/N_1)$

[0512] (여기서, N_2 및 N_1 은 시간 t_2 및 t_1 에 있어서의 셀수이다.)

[0513] 플로 사이토메트리 해석

[0514] PBS(2%의 FBS를 포함한다)를 4개의 타입의 세포 각각에 첨가하고, 1×10^6 세포/mL의 최종 밀도로 세포 현탁액을 조제했다. 이어서, 세포를 항CD90 항체(PE 항 인간 CD90(Thy1), BioLegend, San Diego, CA, USA) 및 항CD45 항체(FITC 항 인간CD45, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)로 염색했다. 또한, 음성 대조로서 마우스IgG1 항체(마우스 IgG1-PE, BioLegend; mouse IgG1-FITC, Beckman Coulter)를 사용해서 염색을 행하였다. 요오드화 프로피디움(PI)을 사용해서 사세포를 검출했다. 플로 사이토메트리 분석은 CytoFLEX System(Beckman Coulter)을 사용해서 행하고, 세포 생존율 그리고 각 세포 표면 항원의 균일성 및 양성을 평가했다. 데이터의 분석에는 FlowJo 소프트웨어(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용했다.

[0515] 건강한 인간 NPC의 조제

[0516] 홋카이도 대학 병원에서도 사춘기 특발성 측만증 때문에 척추 전방 고정술을 받은 9명의 환자(평균 연령 $\pm$ SD, 15.3 ± 3.3 세)로부터 인간 NP 샘플을 얻었다. 본 연구에 참가한 참가자에게서 설명에 따른 동의를 취득하고, 동의서를 제작하고, 보존했다. 샘플은, 외과 수술 시에 취득했다. 모든 IVD는 MRI를 통해 수술 전에 분석하고, 피르만 분류(36)를 사용해서 변형 변화에 대해서 평가했다. 모든 IVD는 그레이드 1로 분류되고, 모든 샘플이 비변성 IVD인 것이 시사되었다.

[0517] 세포를 인간 NP 샘플로부터 단리하고, 기보와 같이 배양했다(2,3). 먼저, 각 겔형 NP를 해부 현미경 하에서 AF로부터 분리하고, 조직 표본을 배지 안에 두었다. 조제물을 원심 분리(1,000rpm, 3분)에 의해 2회 세정하고, 0.25% 콜라게나아제를 보충한 배지에 재현탁했다. 세포 단리를 위해서, 조제물을 진탕 인큐베이터 안에서 인큐베이트하고(37°C, 4시간), 이어서 원심 분리(1,000rpm, 3분)를 2회 행하였다. 매트릭스로부터 분리한 세포를 10cm의 조직 배양 접시에 넣고, 상기와 마찬가지로 인큐베이트했다. 배지는 주에 2회 교환하고, 제4 계대로부터의 NPC를 사용했다.

- [0518] REC 및 시판 인간 BMSC의 조제
- [0519] 상기 REC(REC-02_프로토타입 #003-P6-191220) 및 시판 중인 인간 BMSC도 또한, 3D 공배양에 사용했다. 2개의 타입의 세포를, 상기 2D 배양과 동일한 방법에 의해 제조업자의 지시에 따라서 배양했다. 배지는 주에 2회 교환했다. 제2 계대 유래의 세포(REC, 합계 8계대; BMSC, 합계 4계대)의 양쪽을 사용했다.
- [0520] 3D 공배양과 단배양
- [0521] 본 발명자들은 2% UPAL 용액을 조제하고, 기보와 같이(2,3), 겔화를 위해서 CaCl_2 용액(102mM)을 사용했다. 3D 배양 전에, REC 및 BMSC를, 제조업자의 매뉴얼 (2,15,29)을 참조하여, 20mM CFDA-SE(CFDA-SE 세포 증식 어세이 키트; BIO RAD, Hercules, CA, USA)에서 형광 표지했다. 그 후, 표지 세포 및 비표지 NPC를 UPAL 용액과 동일한 비율(각 세포 1×10^6 세포/mL)(2, 31, 49)로 혼합하고, 최종 세포 농도를 2×10^6 세포/mL로 하였다. 세포-UPAL 혼합 용액은, 22게이지 바늘을 사용해서 102mM의 CaCl_2 용액에 넣고 겔화시켰다. 얻어진 겔을, 저산소 조건(5% O_2 및 5% CO_2)(2, 49) 하에서 7일간 배양했다. 또한, 3개의 타입의 세포를, 1×10^6 세포/mL의 농도로 각각 따로따로 UPAL 용액 중에 혼합했다. 세포 농도는 기보의 결과 (2)에 기초하여 선택했다. 겔화후, 겔 비즈를 저산소 조건 하에서 상기와 동일한 방법에서 배양하고, 이하의 실험군을 사용했다(1군당 n=4).
- [0522] (a) 단배양 NPC
- [0523] (b) 단배양 BMSC
- [0524] (c) 단배양 REC
- [0525] (d) 공배양 NPC+BMSC
- [0526] (e) 공배양 NPC+REC.
- [0527] 배양 첫날 및 7일 후에, 모든 겔 비즈를 55mM 시트르산 나트륨에 용해하고, 겔을 세포로부터 분리시켰다. 공배양 군에서는, 회수한 세포를, Diva 소프트웨어 버전 7.0(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 사용하는 BD FACSAria III High speed cell sorter를 사용해서 선별했다(2, 31). 잔사 및 사세포를 제거한 후, 530nm의 형광 세포를 REC 및 BMSC으로서 선택하고, 비형광 세포를 NPC로서 선택했다.
- [0528] RNA 추출과 qRT-PCR
- [0529] 회수한 10종류의 세포 타입(대조 NPC, 단배양 NPC, 시판 중인 BMSC와 공배양한 NPC, REC와 공배양한 NPC, 대조 BMSC, 단배양 BMSC, 공배양 BMSC, 대조 REC, 단배양 REC 및 공배양 REC)을, 1mL의 TRIzol(등록상표)(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)에 용해하고, RNeasy Mini키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용해서 시료로부터 전RNA를 추출했다. 리얼타임 qRT-PCR은, TaqMan(등록상표)유전자 발현 어세이(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)(표 3)를 사용해서 행하였다. 각 샘플에 대해서 사이클 역치(C_t)값을 얻었다. 또한, 각 표적 유전자, NPC 마커, 증식 인자 및 ECM 성분의 상대적 mRNA 발현 레벨을 $2^{-\Delta C_t}$ 법 (2)를 통해 계산했다. 발현 레벨은 하우스키핑 유전자 GAPDH(2,31)의 발현량에 의해 표준화했다.
- [0530] 1.4. 비구속 압축 시험을 사용한 겔의 탄성 분석
- [0531] UPAL 및 REC-UPAL 겔의 역학 특성을, 비구속 압축 시험을 사용해서 평가했다. 직경 4.5mm, 두께 2mm의 두 종류의 원반상 겔을 제작했다(도 14의 (a)). 샘플을 인장-압축 기계 시험기(Autograph AG-X; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)에 넣고, 겔이 찌그러질 때까지, 100 N로드셀을 사용해서 0.5mm/분의 일정 속도로 압축했다(도 14, B 및 C)(3, 15). 영률은, 얻어진 응력-왜곡선(도 14의 D)에 기초하여, 압축값 10 내지 20%(n=4 겔/군) 사이의 근사 직선을 사용해서 계산했다(도 14E)(3, 15, 32, 33).
- [0532] 1.5. 변성 IVD의 양 모델에 있어서의 생체내 시험
- [0533] 본 실시예에서는, 양 모델을 포함하는 모든 수순을, 의약품 GLP 적합 실험실(Hamri Co., Ltd.)에서 행하였다(3). 14마리의 수컷, 서퍽 양(2세, 체중 40 내지 60kg)을 사용하여, IVD 변성의 정성 분석을 행하였다(3). 전 부 56의 IVD를 무작위로 무처리 대조(4주, n=6; 24주, n=6), 추간판 절제(4주, n=6; 24주, n=6), 겔(4주, n=8; 24주, n=8) 및 REC+겔(4주, n=8; 24주, n=8)군으로 할당했다. 먼저, NP 조직 제거 수술을 행하고, 중증으로 변성한 IVD 모델을 제작했다. 케타민(0.2mg/kg) 및 자일라진(20mg/kg)의 4:1 혼합물을 0.5mL/kg의 속도로 근육내 주사함으로써 마취 유도를 행하고, 흡입 마취(이소플루란)에 의해 마취의 유지를 달성했다. 수술은 우측방

후복막 어프로치로 행하고, L1부터 L5까지의 추체와 IVD를 노출했다. 고형 해면질 스크루(ZIMMER BIOMET, Warsaw, IN, USA)를, 추골 표식으로 해서 L2추체에 삽입했다. 추간관 절제군, 겔군, REC+겔군에서는 AF 절개(5×3mm) 후에 NP 조직 20mg을 적출하고, IVD 변성을 야기했다(도 15, A, B)(3, 8).

[0534] 변성한 NP 조직의 제거와 이식

[0535] 첫회 수술로부터 4주간 후, 동일한 어프로치를 사용해서 추체와 IVD를 노출했다. 본 발명자들은 더욱, 상기한 바와 같이 AF 절개 후에 IVD 공동을 제작하기 위해서, 3개의 처치군으로부터 얻어진 변성 IVD에서 70mg의 NP 조직을 추출했다(도 15C). 추간관 절제 후, 추간관 내의 공극에 겔군에는 2% UPAL 용액 110 내지 120 μ L을 이식하고, REC+겔군에는, REC와 UPAL 용액과의 혼합물(최종 농도, 1×10^6 세포/mL) 110 내지 120 μ L을 이식했다(도 15D)(2). 즉시 102mM의 CaCl_2 용액을 혼합물의 표면에 주입하고, 5분 후에 겔화를 확인했다. 매식 4주 및 24주 후에, 펜토바르비탈을 사용해서 양을 안락사시켜서, 요부 척주를 한 덩어리로서 적출했다(3).

[0536] MRI

[0537] 3.0-T MR 스캐너(MAGNETOM Prisma; Siemens, Munich, Germany)를 사용해서, T2 강조 정중시상 절편 화상을 얻었다. 처치된 IVD의 시그널 변화를 평가하기 위해서, 본 발명자들은, 5개의 그레이드(1: 정상 내지 5: 고도로 변성)를 포함하는 피르만 분류(36)를 사용하여, IVD 변성의 정도를 스코어화했다. 또한, Analyze 14.0 소프트웨어(AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)를 사용해서, MRI 지수 값(NP의 평균 시그널 강도와 NP 면적과의 곱)을 측정하고, NP 조직의 휘도를 정량화했다. 또한, 3개의 처치군(2, 3, 15, 37, 38) 모두에 있어서, 무처치 대조군에 있어서의 MRI 지수의 비율인 상대적 MRI 지수를 평가했다. 두께측이 인접하는 추체의 높이에 대한 추간관의 높이의 비인 DHI도 측정했다(4, 39). 무처치 대조군의 DHI의 퍼센티지 값인 상대 DHI를 결정했다.

[0538] 조직학적 분석

[0539] MRI 촬영 후, 샘플을 10% 포르말데히드 중에서 고정하고, 10% EDTA(pH7.5)로 탈염하고, 파라핀 중에 포매했다. 시상 5마이크로미터 두께의 파라핀 절편을 크실렌으로 탈 파라핀화하고, 알코올로 처리하고, 물로 행구어, H & E 및 사프란-0로 염색했다. IVD 변성의 정도를, 개변 Boos' 분류(3, 40, 41)를 사용해서, 0(정상)부터 36(고도로 변성)까지 스코어화했다.

[0540] IHC

[0541] IVD 중의 II형 및 I형 콜라겐의 발현은, IHC에 의해 결정했다. 절편을 크실렌 중에서 탈 파라핀화하고, 항원 활성화를 위해서 0.1% 트립신으로 30분간 처리했다. 이어서, 절편을 메탄올 중의 3% H_2O_2 로 10분간 처리하고, 계속해서, 단백질 블록 무혈청 용액(DAKO, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용해서 30분간 단백질의 블로킹을 행하였다. 염소항 I형 콜라겐(1:40; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)을 항 I형 콜라겐 항체와 함께 사용해서, 항hCL(II) 및 정제IgG(1:400; Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan)을 항II형 콜라겐 항체와 함께 1차 항체로서 사용했다. 세포를 PBS로 세정한 후, II형 콜라겐을 위한 EnVision⁺ System-HRP 표지 폴리머 항 마우스(DAKO) 및 I형 콜라겐을 위한 Histofine(등록상표) Simple Stain Max PO(G)(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)를 2차 항체로서 사용했다. 마지막으로, 절편을 DAB(DAKO) 및 헤마톡실린으로 염색했다. II형 및 I형 콜라겐 양성 세포의 수를, 5개의 무작위로 선택한 시야에서 결정하고, 전체 세포에 있어서의 양성 세포율을 계산했다(2,3,15).

[0542] 종양 형성 분석

[0543] 이식 IVD에 있어서의 이식 세포 및 기존 세포의 종양 형성을 평가하기 위해서, (i) 침윤성 증식, (ii) 핵분열, (iii) 2핵 세포 및 (iv) 핵소체의 평가를 행하였다.

[0544] 24주간의 평가 기간 중, 무처치 대조 및 REC+겔군에 있어서의 H & E 염색 표본을 사용해서, 양성 세포의 총 수를, 15의 무작위로 선택된 시각화 시야(400배의 배율로 15의 시각화 시야; 26.5의 시각화 시야, 총계 5mm²)에 있어서 결정하고, 평방 밀리미터당 수를 계산했다.

[0545] 2. 결과

[0546] 2.1. 시험관내에서의 REC 및 시판 인간 BMSC와 인간 NPC의 3D 공배양의 결과

[0547] REC와 시판 중인 인간 BMSC의 비교

[0548] 겔에 내장하기 전후의 REC 및 시판 중인 인간 BMSC에 관한 안정성 확인의 결과 상세를 표 2 및 3에 나타낸다.

[0549] 세포의 총 수에 대한 PI-미염색 세포의 비율을, 세포 생존율로서 정의했다. REC와 BMSC 사이의 비에 유의차는 없었다($p=0.6087$, 표 2). 셀 직경에 비례하는 전방 산란광의 변동 계수(CV)를 계산하고, 셀 사이즈의 균일성을 평가했다. %CV값은, BMSC보다 REC에 있어서 유의하게 낮았다($p=0.0366$, 표 2). 세포 증식능은 Td를 계산함으로써 평가했다. Td는 BMSC보다 REC에 있어서 유의하게 짧았다($p=0.0074$, 표 2). 세포 표면 항원 확인 시험은, CD90 양성 세포의 비율이 BMSC보다 REC에 있어서 유의하게 높은 것을 나타냈다($p=0.0004$). 군간에서 CD45양성 세포에 유의차는 인정되지 않았다($p=0.0907$, 표 2).

[0550] 본 발명자들은 더욱, 1주간의 배양 후에 REC 및 시판 중인 BMSC를 비교했다(표 3). 2D 및 3D 배양 후의 Td에 관해서, REC와 BMSC 사이에 유의차는 없었다(각각, $p=0.3339$, $p=0.6996$). 그러나, CD90 양성 세포율은, 2D 및 3D 배양 모두에, BMSC보다 REC에서 유의하게 높았다(각각, $p=0.0039$, $p=0.0007$). CD45 양성 세포에 관해서는, 그 비율은 2D 배양 후의 BMSC보다 REC에서 유의하게 낮았다($p=0.0038$). 3D 배양 후의 REC와 BMSC 사이에 유의차는 없었다($p=0.3221$). 중간관내 이식 후의 세포 환경을 시험관내에서 모방한 상태인 알긴산염과의 3D 배양 환경 하에서, REC는 BMSC에 비하여 간엽계 줄기 세포에 특징적인 세포 표면 마커의 발현이 유지되고 있었던 점에서, REC는 알긴산염 환경 하에서도 안정적으로 간엽계 줄기 세포의 형질을 유지하고 있는 것을 나타내고 있다.

표 2

REC와 시판 중인 인간 BMSC의 비교

	REC	BMSC	P 값
세포 생존율 확인 시험 (%)	94.7 ± 1.1	94.0 ± 1.8	0.6087
세포 사이즈 확인 시험 (%)	34.9 ± 1.0	40.5 ± 3.0	0.0366
세포 배가 시간 (hr)	34.5 ± 5.4	51.9 ± 2.6	0.0074
세포 표면 항원 확인 시험 (%)	99.6 ± 0.1	98.3 ± 0.2	0.0004
CD90(상), CD45(하)	0.0 ± 0.0	0.03 ± 0.02	0.0907

[0551]

[0552] 데이터는 평균 $\pm$ SD(n=3)이다. P값은 스튜던트 t 검정에 의해 결정했다.

표 3

1주간 배양 후의 REC와 시판 중인 BMSC의 비교

		REC	BMSC	P 값
세포 배가 시간 (hr)	2D 플레이트 배양	54.2 ± 14.9	44.7 ± 1.5	0.3339
	UPAL 겔 내의 3D 배양	57.9 ± 14.5	54.2 ± 5.0	0.6996
CD90(%)	2D 플레이트 배양	99.6 ± 0.1	99.0 ± 0.1	0.0039
	UPAL 겔 내의 3D 배양	92.8 ± 6.6	49.0 ± 4.6	0.0007
CD45(%)	2D 플레이트 배양	0.0 ± 0.0	0.05 ± 0.02	0.0038
	UPAL 겔 내의 3D 배양	0.07 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.3221

[0553]

[0554] 데이터는 평균 $\pm$ SD(n=3)이다. P가값은 스튜던트 t 검정에 의해 결정했다.

[0555] REC와 인간 NP 세포(NPC)와의 공배양

[0556] 본 발명자들은, REC와 인간 NPC와의 공배양의 효과, 및 다른 세포형인 시판 중인 인간 BMSC와 인간 NPC와의 공배양의 효과를 검토하고, 양자를 비교했다. 5,6-카복시플루오레세인디아세이트숙신이미딜에스테르(CFDA-SE)로 표지한 REC또는 BMSC 및 비표지 NPC를, UPAL 겔에 포매하고, 3차원(3D) 배양을 행하였다(2,15,27). 7일간의 배양 후, 겔을 용해하고, 세포 선별기를 사용해서 잔사 및 사세포를 제거했다. 이어서, 세포를 CFDA-SE 양성 세포, REC, BMSC, 비표지 세포 및 NPC에 분류했다. 세포 선별 후, 이하의 10종류의 세포를 얻었다.

[0557] (a) 대조 NPC(비배양)

- [0558] (b) 단배양 NPC
- [0559] (c) 시판 중인 BMSC와 공배양한 NPC
- [0560] (d) REC와 공배양한 NPC
- [0561] (e) 대조 BMSC(비배양)
- [0562] (f) 단배양 BMSC
- [0563] (g) 공배양 BMSC
- [0564] (h) 대조 REC(비배양)
- [0565] (i) 단배양 REC
- [0566] (j) 공배양 REC
- [0567] BMSC 및 REC의 분화, 세포간 상호 작용, 그리고 ECM 산생을 분석하기 위해서, NPC 마커(HIF-1 α , GLUT-1, 브라큐리를 포함한다), 증식 인자(CDMP-1, TGF- β , IGF-1을 포함한다) 및 ECM 성분(II형 콜라겐 및 어그리칸을 포함한다) 발현을, 리얼타임 정량 역전사 폴리메라아제 연쇄 반응(qRT-PCR)에 의해 측정했다(표 4)(2,9,30,31).

표 4

프라이머 및 프로브 혼합물

유전자	유전자 기호	어세이 ID
HIF-1 α	HIF1A	Hs00153153_m1
GLUT-1	SLC2A1	Hs00892681_m1
브라큐리	T	Hs00610080_m1
CDMP-1	GDF5	Hs00167060_m1
TGF- β 1	TGFB1	Hs00998133_m1
IGF-1	IGF1	Hs01547656_m1
II형 콜라겐	COL2A1	Hs00264051_m1
어그리칸	ACAN	Hs00153936_m1
GAPDH	GAPDH	Hs02786624_g1

- [0568]
- [0569] REC와 공배양한 NPC에 있어서, 3개의 NPC 마커인 HIF-1 α , GLUT-1 및 브라큐리의 발현 레벨은, 대조 NPC, 단일 배양 NPC 및 시판 BMSC와 공배양한 NPC에 있어서의 발현 레벨보다 유의하게 높았다. GLUT-1 발현 레벨은, 시판 BMSC와 공배양한 NPC에 있어서, 대조 NPC보다 유의하게 높았다(도 13, D 내지 F). CDMP-1 및 IGF-1의 발현 레벨은 REC와 공배양한 NPC에 있어서, 대조 NPC, 단일 배양 NPC 및 시판 BMSC와 공배양한 NPC와 비교해서 유의하게 증가했다. TGF- β 발현 레벨은, REC와 공배양한 NPC에 있어서, 대조 및 단일 배양 NPC에 있어서의 발현 레벨과 비교해서 유의하게 증가했다. 시판 중인 BMSC와 공배양한 NPC는, 대조 NPC 및 단배양 NPC와 비교하여, CDMP-1 및 IGF-1 발현이 유의한 증가를 보였다(도 13, G 내지 I). II형 콜라겐 및 어그리칸의 발현 레벨은, REC와 공배양한 NPC에 있어서, 대조 및 단배양 NPC보다 유의하게 높고, 시판되는 BMSC와 공배양한 NPC에 있어서의 발현 레벨도, 대조 및 단배양 NPC에 있어서의 발현 레벨보다 유의하게 높았다(도 13, J 및 K).
- [0570] 공배양 REC에 있어서의 3개의 NPC 마커 모든 발현량은, 대조 및 단배양 REC에 비하여 유의하게 높았다(도 13, D 내지 F). CDMP-1, TGF- β , IGF-1의 발현량도, 공배양 REC에서는 대조 및 단배양 REC에 비하여 유의하게 증가하고 있었다(도 13, G 내지 I). 마찬가지로, II형 콜라겐 및 어그리칸의 발현 레벨은, 대조 및 단배양 REC보다 공배양 REC에 있어서 유의하게 높았다(도 13, J 및 K).

- [0571] 2.2. 비구속 압축 시험을 사용한 겔의 탄성 분석의 결과
- [0572] UPAL 겔에 매립된 REC의 효과
- [0573] REC-UPAL 및 UPAL 겔의 역학 특성을 평가 및 비교하기 위해서, 비구속 압축 시험을 행하였다(3,15,32,33). 두 종류의 원통상 겔 샘플(직경 4.5mm, 두께 2mm)을 조제하고, 축 압축 응력대 왜곡의 비(도 14, A 내지 C)를 계산했다. 압축 레벨 10 내지 20%이고, 영률은 UPAL 및 REC-UPAL 겔에서 각각 $18.0 \pm 3.5 \text{ kPa}$ 및 $18.8 \pm 2.1 \text{ kPa}$ 이며, 2 구간에서 역학 특성에 유의차는 없었다($p=0.6942$)(도 14, D 및 E). 또한, 이들 2개의 값은 정상적인 인간 NP 조직의 값(3, 32)과 동등했다.
- [0574] 2.3. 변성 IVD의 양 모델에 있어서의 생체내 시험의 결과
- [0575] REC와 UPAL 겔과의 병용은 IVD 재생을 높인다
- [0576] IVD의 재생 능력은, 겔, 또는 REC+겔의 이식 후의 양 모델에서 평가했다(도 15). 양은 생체 재료를 포함하는 추간판 절제 후의 IVD 연구에 널리 사용되고 있다(3, 34, 35). 14마리의 양 유래의 56 IVD를 이하의 군으로 나누었다.
- [0577] 무처치 대조군($n=6$ IVD)
- [0578] 추간판 절제군(추간판 절제군)($n=6$ IVD)
- [0579] 겔군($n=8$ IVD)
- [0580] REC+겔군($n=8$ IVD)
- [0581] IVD 변성 모델을 제작하기 위해서, 최초의 수술 중에 20mg의 NP 조직을 제거하고(도 15, A 및 B), 예비 실험의 결과에 기초하여, 제거해야 할 양을 20mg으로 설정했다(도 19). 최초의 수술의 4주간 후(변성 변화의 관찰후)에, NP 조직을 다시 제거했다(도 15C). 이어서, IVD 결손에 UPAL 또는 REC+UPAL 용액을 이식하고, 제2 추간판 절제 후에 102mM의 CaCl_2 를 폭로해서 겔화시켰다(도 15D). 이식한 요추를, 이식의 4주간 후 및 24주간 후에 여러가지 분석을 위해 채취했다.
- [0582] 치료된 IVD에 있어서의 변성 변화는, MRI를 통해 얻어진 T2 강조 중앙시상 단면 화상을 사용해서 평가했다(도 16A). IVD의 형태학적 분석을 위해, 매립 IVD(2,3,15,36 내지 38) 및 추간판 높이 지수(DHI)에 있어서의 신호의 변화를 평가하기 위해서, 피르만 스코어 및 MRI 지수를 평가했다. 피르만 스코어에 기초하면, 겔군의 변성 스코어는 24주째에서 추간판 절제군보다 유의하게 낮고, REC+겔군의 변성 스코어는 4주째 및 24주째 모두 추간판 절제군, 겔군보다 유의하게 낮았다(도 16의 B).
- [0583] MRI 지수는 4주째에서 REC+겔군이 추간판 절제군보다 유의하게 높은 값이었다. 24주째에서는, 추간판 절제군에 비해 겔군의 MRI 지수가 유의하게 높고, REC+겔군은 추간판 절제군, 겔군에 비하여 유의하게 높았다(도 16C).
- [0584] 또한, 치료된 IVD의 추간판 높이를, MRI 화상을 사용하여 측정했다. 추간판의 높이, 상부 인접 추체의 높이에 대한 비, 즉 DHI를, IVD의 전방 및 후방에서 측정했다. 이어서, 상대 DHI, 즉 무처치 대조군의 DHI값에 대한 3개의 처치군의 DHI값의 비를 결정했다(도 20)(4,39). 3개의 처치군의 DHI값은, 4주째 및 24주째의 양쪽에서, 무처치 대조군의 DHI값보다 유의하게 낮았다. 매식 4주 후에는 3군간에 유의차는 없었지만, 매식 24주 후에는 겔군의 DHI는 추간판 절제군보다 유의하게 높고, REC+겔군은 추간판 절제군, 겔군보다 유의하게 높았다(도 16D).
- [0585] 조직학적 분석은, 헤마톡실린 & 에오신(H & E) 및 사프라닌-0 염색을 사용해서 행하였다. 무처치 대조군에 있어서의 4주간 및 24주간의 양쪽에서, IVD는 방추형을 나타내고, NP 조직에 있어서의 섬유성 변화는 없고, 섬유륜(AF)은 중심 구조이며, 사프라닌-0로 균일하게 염색되었다. 추간판 절제군에서는, 현저한 반흔 조직, 섬유성 변화, 조직 결손, 종판의 붕괴·파괴가 인정되고(도 17, A, B), 겔군의 개변 Boos' 분류(3,40,41)에 기초하여 판정한 조직학적 변성도는 4주, 24주 모두에 추간판 절제군보다 유의하게 낮고, 4주, 24주 모두에 REC+겔군이 추간판 절제군, 겔군보다 유의하게 낮았다(도 17의 C).
- [0586] 치료한 IVD에 있어서의 II형 및 I형 콜라겐의 발현 레벨을 면역 조직 화학법(IHC)에 의해 평가했다(도 18, A 및 B). 무작위로 선택된 5개의 시각화 시야에 있어서의, 세포의 총 수에 있어서의 II형 및 I형 콜라겐 양성 세포율을, NP 조직에 있어서 평가했다(2,3,15). II형 콜라겐은 NP 조직에 있어서의 필수적인 ECM 성분이며, 변성의 진행에 수반하여, I형 콜라겐에 의해 치환된다. II형 콜라겐의 분석에서는, NP 조직이 무처치 대조군에 있어서 균일하게 염색되었지만, REC+겔군에 있어서는, 조금 감소하고 있었다. 겔군에서는 비염색 영역이 점재하

는 것이 관찰되어, 중간판 절제군에서는 광범위한 비염색 영역이 관찰되었다. II형 콜라겐 양성 세포의 비율은 4주, 24주 모두에 REC+겔군이 겔군, 중간판 절제군보다 유의하게 높고, 24주에서는 겔군이 중간판 절제군보다 유의하게 높았다(도 18C). 반대로, I형 콜라겐 양성 세포의 비율은, 4주간의 평가 기간에 있어서 REC+겔군이 중간판 절제군보다 유의하게 낮게, 24주간의 평가 기간에 있어서 중간판 절제군, 겔군보다 유의하게 낮았다. 또한, 이들의 세포 비율은, 24주에서는 겔군이 중간판 절제군에 비하여 유의하게 낮았다(도 18의 D).

[0587] REC+겔 주입의 IVD에 미치게 하는 영향

[0588] 24주간의 평가 기간 중, 무처리 대조와 REC+겔군의 조직학적 표본으로 종양 형성을 분석했다. 양 군의 전체 표본에 있어서, 핵분열과 함께 침윤성 증식을 평가하고, 2핵 세포수와 평방 밀리미터당 핵소체 수를 측정했다. 양 군 모두 침윤성 증식, 핵분열상, 핵소체는 인정되지 않았다. 무처리 대조군 및 REC+겔군의 2핵 세포수는 각각 0.03 ± 0.07 및 0.23 ± 0.25 였다. 즉, 값은 $<1/\text{mm}^2$ 이고, 군 사이에 유의차는 관찰되지 않았다($p=0.3311$)(표 5).

표 5

평방 밀리미터당 2핵 세포 수

무처리 대조	REC + 겔	P 값
0.03 ± 0.07	0.23 ± 0.25	0.3311

[0589]

[0590] 데이터는 평균값 $\pm$ 표준 편차이며, 웰치 검정의 후, 맨-휘트니의 U 검정에 의해 P값을 구하였다.

[0591] 3. 고찰

[0592] 본 실시예에서는, 세포 증식능, 세포 사이즈 균일성 및 세포 표면 항원의 발현에 관해서, 시판품으로서 입수 가능한 인간 BMSC와 비교하여, REC의 우수한 특성이 나타났다. 또한, 본 실시예는 NPC 마커, 성장 인자 및 ECM 성분의 발현 레벨에 관한 것으로, 시판 중인 BMSC와의 NPC의 3D 공배양에 있어서 관찰되는 발현 레벨과 비교하여, 인간 NPC 및 REC의 3D 공배양에 있어서 유의하게 증가한 것을 실증했다. REC와 UPAL 겔과의 병용의 유효성은, 양 요추 모델의 IVD 변성 부위에서 관찰되었다. UPAL 겔 단독으로는, 중간판 절제군과 비교해서 IVD 변성을 억제했지만, REC와 겔과의 병용은 IVD 재생을 보다 효과적으로 증강했다.

[0593] 본 실시예에 있어서, REC의 NPC와의 공배양에 의해 REC의 NPC에의 분화를 초래하고, 그에 의해서 양쪽의 세포형에 있어서의 ECM 성분 산생을 개선하는 것이 시사되었다. 토끼에 있어서의 결과(실시예 1)에서도 마찬가지로 결과가 관찰되었다. 즉, 실시예 1에서는 UPAL 겔 중에 포매된 BMSC의 이식후에 NPC 마커의 발현이 증가한 것 및 중간판 절제군과 비교하여, BMSC+UPAL 겔군에서는 ECM의 산생이 증가하고 있었던 것이 밝혀졌다(2).

[0594] 상기 결과 및 이전의 연구(2, 31, 47, 48, 50 내지 52)의 결과에 기초하면, UPAL 겔 중에 포매된 REC의 이식에 의한 IVD 재생의 기초를 이루는 메커니즘으로서, 이하의 가능성이 시사되었다.

[0595] 1) REC가 겔에 포매되어서 IVD 결손에 이식될 수 있다.

[0596] 2) REC는 성장 인자 및 ECM 성분을 산생하고, 그에 의해, 기존의 NPC를 활성화한다(파라크리 메커니즘).

[0597] 3) NPC는 보다 많은 ECM 및 성장 인자를 산생한다.

[0598] 4) 결과로서, REC는 NPC에 직접 분화된다.

[0599] 5) 마지막으로, REC 및 NPC는 IVD 재생을 초래하는 정의 세포간 피드백 루프를 갖는다.

[0600] IVD 수복에 사용되는 생체 재료/히드로겔은, 생물학적 및 기계적으로 적합한 것인 필요가 있다.

[0601] 본 실시예에서는, 요부 IVD의 생체 역학과 기하학적 배치가 인간의 것과 동등한 점에서(3,4,34), 후보 히드로겔을 전임상 동물 모델에 이식하기 위한 양 요추 모델을 선택했다. 본 발명자들은, 지금까지, 중간판 절제 후의 양 요부 IVD에 매립한 UPAL 겔이 적절한 생체 역학적 특성을 나타내고, 재료의 돌출을 초래하지 않고, 중간판 절제 후의 AF의 붕합을 필요로 하지 않는 것을 나타냈다(3). 본 실시예에 있어서, 비구속 압축 시험은 UPAL군과 REC-UPAL군 사이의 영률에 유의차가 없는 것을 밝히고, UPAL 겔에 매립된 REC가 겔의 역학 특성을 변화시키지 않은 것을 나타냈다. 신속한 치유를 초래하는 그 결정적인 능력을 위해서, UPAL 겔과 REC와의 조합은, AF를

봉합하지 않고 세포 누출을 방지한다고 하는 점에서 임상적 이점을 제공한다.

- [0602] UPAL 겔을 이식한(및 이식하지 않은) 동물에 있어서의 MRI 및 조직학적 평가는, UPAL 겔 단독의 이식 후에 IVD 변성이 억제된 것을 나타낸다. 또한, REC와 UPAL 겔의 조합은, UPAL 겔 단독과 비교하여, 또한 효과적으로 변성을 방지했다. 또한, 무처치군과 REC+겔군 사이에서 2핵 세포수에 유의차는 없고, REC와 겔의 조합은 종양 형성을 유도하지 않는 것이 시사되었다. 또한, IHC의 결과는, REC와 겔의 병용이 정상적인 IVD의 기능에 필수적인 ECM 합성을 증강하고, I형 콜라겐의 산생을 억제함으로써 IVD 변성의 진행을 억제한 것을 시사한다. 이들 결과는, IVD 변성의 토끼 모델을 사용해서 얻어진 결과(실시예 1)와 일치하고, UPAL 겔 중에 포매된 BMSC가 보다 효과적으로 변성을 억제한 것을 실증했다(2). 실시예 1에서도, AF 바늘 천자를 통해 변성한 IVD를 제작한 추간판 절제를 받지 않은 동물과 비교하여, BMSC+UPAL 겔 이식 후의 변성의 조직학적 악성도 스코어가 낮은 것이 나타났다. 이것은 BMSC 이식이 IVD 재생을 초래한 것을 시사한다(2). 종합하면, 본 발명자들의 지견은, UPAL 겔 중에 포매된 REC의 이식이 생체내에서의 IVD 재생을 증강하는 것을 나타내는 것이다(2).
- [0603] 실시예 4에 있어서의 참조 문헌
- [0604] 1. J.N.Katz, Lumbar disc disorders and low-back pain:Socioeconomic factors and consequences.J.Bone Joint Surg.Am.88, 21-24(2006).
- [0605] 2. D.Ukeba, H.Sudo, T.Tsujimoto, K.Ura, K.Yamada, N.Iwasaki, Bone marrow mesenchymal stem cells combined with ultra-purified alginate gel as a regenerative therapeutic strategy after discectomy for degenerated intervertebral discs.EBioMedicine 53, 102698(2020).
- [0606] 3. T.Tsujimoto, H.Sudo, M.Todoh, K.Yamada, K.Iwasaki, T.Ohnishi, N.Hirohama, T.Nonoyama, D.Ukeba, K.Ura, Y.M.Ito, N.Iwasaki, An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair:A preclinical proof-of-concept study.EBioMedicine 37, 521-534(2018).
- [0607] 4. S.R.Sloan Jr, C.Wipplinger, S.Kirnaz, R.Navarro-Ramirez, F.Schmidt, D.McCloskey, T.Pannellini, A.Schiavinato, R.Hartl, L.J.Bonassar, Combined nucleus pulposus augmentation and annulus fibrosus repair prevents acute intervertebral disc degeneration after discectomy.Sci.Transl.Med.12, eaay2380(2020).
- [0608] 5. P.Heindel, A.Tuchman, P.C.Hsieh, M.H.Pham, A.D' Oro, N.N.Patel, A.M.Jakoi, R.Hah, J.C.Liu, Z.Buser, J.C.Wang, Reoperation rates after single-level lumbar discectomy.Spine 42, E496-E501(2017).
- [0609] 6. J.Sherman, J.Cauthen, D.Schoenberg, M.Burns, N.L.Reaven, S.L.Griffith, Economic impact of improving outcomes of lumbar discectomy.Spine J.10, 108-116(2010).
- [0610] 7. P.Kambin, L.F.Cohen, M.Brooks, J.L.Schaffer, Development of degenerative spondylosis of the lumbar spine after partial discectomy.Comparison of laminotomy, discectomy, and posterolateral discectomy.Spine 20, 599-607(1995).
- [0611] 8. D.Oehme, P.Ghosh, S.Shimmon, J.Wu, C.McDonald, J.M.Troupis, T.Goldschlager, J.V.Rosenfeld, G.Jenkin, Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy:a preliminary study in an ovine model.J.Neurosurg.Spine 20, 657-669(2014).
- [0612] 9. S.M.Naqvi, C.T.Buckley, Differential response of encapsulated nucleus pulposus and bone marrow stem cells in isolation and coculture in alginate and chitosan hydrogels.Tissue Eng.Part A 21, 288-99(2015).
- [0613] 10. D.C.Noriega, F.Ardura, R.Hernandez-Ramajo, M.A.Martin-Ferrero, I.Sanchez-Lite, B.Toribio, M.Alberca, V.Garcia, J.M.Moraleda, A.Sanchez, J.Garcia-Sancho, Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells:A randomized controlled trial.Transplantation 101, 1945-1951(2017).
- [0614] 11. R.D.Bowles, H.H.Gebhard, R.Hartl, L.J.Bonassar, Tissue-engineered intervertebral discs produce new matrix, maintain disc height, and restore biomechanical function to the rodent spine.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.108, 13106-13111(2011).

- [0615] 12. P.A.Revell, E.Damien, L.Di Silvio, N.Gaurav, C.Longinotti, L.Ambrosio, Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers.J.Mater.Sci.Mater.Med.18, 303-308(2007).
- [0616] 13. I.Hussain, S.R.Sloan, C.Wipplinger, R.Navarro-Ramirez, M.Zubkov, E.Kim, S.Kirnaz, L.J.Bonassar, R.Hartl, Mesenchymal stem cell-seeded high-density collagen gel for annular repair:6-week results from in vivo sheep models.Neurosurgery 85, E350-E359(2018).
- [0617] 14. B.Pennicooke, I.Hussain, C.Berlin, S.R.Sloan, B.Borde, Y.Moriguchi, G.Lang, R.Navarro-Ramirez, J.Cheetham, L.J.Bonassar, R.Hartl, Annulus fibrosus repair using high-density collagen gel:An in vivo ovine model.Spine 43, E208-E215(2018).
- [0618] 15. D.Ukeba, K.Yamada, T.Tsujimoto, K.Ura, T.Nonoyama, N.Iwasaki, H.Sudo, Bone marrow aspirate concentrate combined with in situ forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration in rabbits.J.Bone Joint Surg.Am.103, e31(2021).
- [0619] 16. K.Ura, K.Yamada, T.Tsujimoto, D.Ukeba, N.Iwasaki, H.Sudo, Ultra-purified alginate gel implantation decreases inflammatory cytokine levels, prevents intervertebral disc degeneration, and reduces acute pain after discectomy.Sci.Rep.11, 638(2021).
- [0620] 17. A.J.Friedenstein, U.F.Deriglasova, N.N.Kulagina, A.F.Panasuk, S.F.Rudakowa, E.A.Luria, I.A.Ruadkow, Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.Exp.Hematol.2, 83-92(1974).
- [0621] 18. Y.Mabuchi, S.Morikawa, S.Harada, K.Niibe, S.Suzuki, F.Renault-Mihara, D.D.Houlihan, C.Akazawa, H.Okano, Y.Matsuzaki, LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells.Stem Cell Rep.1, 152-165(2013).
- [0622] 19. M.F.Pittenger, A.M.Mackay, S.C.Beck, R.K.Jaiswal, R.Douglas, J.D.Mosca, M.A.Moorman, D.W.Simonetti, S.Craig, D.R.Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.Science 284, 14-147(1999).
- [0623] 20. J.Kim, J.W.Kang, J.H.Park, Y.Choi, K.S.Choi, K.D.Park, D.H.Baek, S.K.Seong, H.K.Min, H.S.Kim, Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells.Arch.Pharm.Res.32, 117-126(2009).
- [0624] 21. W.J.C.Rombouts, R.E.Ploemacher, Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture.Leukemia 17, 160-170(2003).
- [0625] 22. C.Brown, C.McKee, S.Bakshi, K.Walker, E.Hakman, S.Halassy, D.Svinarich, R.Dodds, C.K.Govind, G.R.Chaudhry, Mesenchymal stem cells:Cell therapy and regeneration potential.J.Tissue Eng.Regen.Med.13, 1738-1755(2019).
- [0626] 23. T.Squillaro, G.Peluso, U.Galderisi, Clinical trials with mesenchymal stem cells:An update.Cell Transplant.25, 829-848(2016).
- [0627] 24. S.Morikawa, Y.Mabuchi, Y.Kubota, Y.Nagai, K.Niibe, E.Hiratsu, S.Suzuki, C.M.-Hara, N.Nagoshi, T.Sunabori, S.Shimmura, A.Miyawaki, T.Nakagawa, T.Suda, H.Okano, Y.Matsuzaki, Prospective identification, isolation, and sytemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow.J.Exp.Med.11, 2483-2496(2009).
- [0628] 25. D.D.Houlihan, Y.Mabuchi, S.Morikawa, K.Niibe, D.Araki, S.Suzuki, H.Okano, Y.Matsuzaki, Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α .Nat.Protoc.7, 2103-2111(2012).
- [0629] 26. Y.Mabuchi, Y.Matsuzaki, Prospective isolation of resident adult human mesenchymal stem cell population from multiple organs.Int.J.Hematol.103, 138-144(2016).
- [0630] 27. S.Harada, Y.Mabuchi, J.Kohyama, D.Shimojo, S.Suzuki, Y.Kawamura, D.Araki, T.Suyama, M.Kajikawa,

C.Akazawa, H.Okano, Y.Matsuzaki, FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells.Stem Cells 39, 318-330(2021).

- [0631] 28. K.Yamada, K.Maeda, Y.M.Ito, F.Inage, T.Isoe, N.Yokota, O.Sugita, N.Sato, K.K.Tha, N.Iwasaki, H.Sudo, Exploratory clinical trial on the safety and capability of dMD-001 in lumbar disc herniation:Study protocol for a first-in-human pilot study.Contemp Clin Trials Commun.23, 100805(2021).
- [0632] 29. M.Sato, K.Uchida, H.Nakajima, T.Miyazaki, A.R.Guerrero, S.Watanabe, S.Roberts, H.Baba, Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis.Arthritis Res.Ther.14, R31(2012).
- [0633] 30. M.V.Risbud, Z.R.Schoepflin, F.Mwale, R.A.Kandel, S.Grad, J.C.Iatridis, D.Sakai, J.A.Hoyland, Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells:recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting.J Orthop.Res.33, 283-293(2015).
- [0634] 31. S.Strassburg, S.M.Richardson, A.J.Freemont, J.A.Hoyland.Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype.Regen.Med.5, 701-711(2010).
- [0635] 32. J.C.Iatridis, M.Weidenbaum, L.A.Setton, V.C.Mow, Is the nucleus pulposus a solid or a fluid-Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc.Spine 21, 1174-1184(1996).
- [0636] 33. Y.Zeng, C.Chen, W.Liu, Q.Fu, Z.Han, Y.Li, S.Feng, X.Li, C.Qi, J.Wu, D.Wang, C.Corbett, B.P.Chan, D.Ruan, Y.Du, Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc degeneration.Biomaterials 59, 53-65(2015).
- [0637] 34. S.Reitmaier, H.Schmidt, R.Ihler, T.Kocak, N.Graf, A.Ignatius, H.-J.Wilke, Preliminary investigations on intradiscal pressures during daily activities:an in vivo study using the merino sheep.PLoS One 8, e69610(2013).
- [0638] 35. A.A.Hegewald, F.Medved, D.Feng, C.Tsagogiorgas, A.Beierfuß, G.A.Schindler, M.Trunk, C.Kaps, D.S.Mern, C.Thome, Enhancing tissue repair in annulus fibrosus defects of the intervertebral disc:Analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model.J.Tissue Eng.Regen.Med.9, 405-414(2015).
- [0639] 36. C.W.Pfirrmann, A.Metzdorf, M.Zanetti, J.Hodler, N.Boos, Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration.Spine 26, 1873-1878(2001).
- [0640] 37. H.Sudo, A.Minami, Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits.Arthritis Rheum.63, 1648-1657(2011).
- [0641] 38. K.Ura, H.Sudo H, K.Iwasaki, T.Tsujimoto T, D.Ukeba, N.Iwasaki N, Effects of intradiscal injection of local anesthetics on intervertebral disc degeneration in rabbit degenerated intervertebral disc.J.Orthop.Res.37, 1963-1971(2019).
- [0642] 39. D.S.Lu, Y.Shono, I.Oda, K.Abumi, K.Kaneda, Effects of chondroitinase ABC and chymopapain on spinal motion segment biomechanics.An in vivo biomechanical, radiologic, and histologic canine study.Spine 22, 1828-1834(1997).
- [0643] 40. N.Boos, S.Weissbach, H.Rohrbach, C.Weiler, K.F.Spratt, A.G.Nerlich, Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs:2002 Volvo Award in basic science.Spine 27, 2631-2644(2002).
- [0644] 41. S.Reitmaier, L.Kreja, K.Gruchenberg, B.Kanter, J.Silva-Correia, J.M.Oliveira, R.L.Reis, V.Perugini, M.Santin, A.Ignatius, H.J.Wilke, In vivo biofunctional evaluation of hydrogels for disc regeneration.Eur.Spine J.23, 19-26(2014).
- [0645] 42. H.Wang, Y.Zhou, B.Huang, L.-T.Liu, M.-H.Liu, J.Wang, C.-Q.Li, Z.-F.Zhang, T.-W.Chu, C.-J.Xiong,

Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 20, 908-920(2014).

- [0646] 43. F.Wang, L.-P.Nan, S.-F.Zhou, Y.Liu, Z.-Y.Wang, J.-C.Wang, X.-M.Feng, L.Zhang, Injectable hydrogel combined with nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells for the treatment of degenerative intervertebral disc in rats. *Stem Cells Int.* 2019, 8496025(2019).
- [0647] 44. G.W.Omlor, S.Lorenz, A.G.Nerlich, T.Guehring, W.Richter, Disc cell therapy with bone marrow-derived autologous mesenchymal stromal cells in a large porcine disc degeneration model. *Eur. Spine J.* 27, 2639-2649(2018).
- [0648] 45. M.Dominici, K.L.Blanc, I.Mueller, I.Slaper-Cortenbach, F.Marini, D.Krause, R.Deans, A.Keating, D.Prockop, E.Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317(2006).
- [0649] 46. C.M.Raynaud, M.Maleki, R.Lis, B.Ahmed, I.Al-Azwani, J.Malek, F.F.Safadi, A.Rafii, Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int.* 2012, 658356(2012).
- [0650] 47. Y.Yamamoto, J.Mochida, D.Sakai, T.Nakai, K.Nishimura, H.Kawada, T.Hotta, Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine* 29, 1508-1514(2004).
- [0651] 48. S.-H.Yang, C.-C.Wu, T.T.-F.Shih, Y.-H.Sun, F.-H.Lin, In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine* 33, 1951-1957(2008).
- [0652] 49. A.Ouyang, A.E.Cerchiari, X.Tang, E.Liebenberg, T.Alliston, Z.J.Gartner, J.C.Lotz, Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *J. Orthop. Res.* 35, 61-73(2017).
- [0653] 50. M.V.Risbud, T.J.Albert, A.Guttapalli, E.J.Vresilovic, A.S.Hillibrand, A.R.Vaccaro, I.M.Shapiro, Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine* 29, 2627-2632(2004).
- [0654] 51. S.M.Richardson, R.V.Walker, S.Parker, N.P.Rhodes, J.A.Hunt, A.J.Freemont, J.A.Hoyland, Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 24, 707-716(2006).
- [0655] 52. D.Sakai, J.Mochida, T.Iwashina, T.Watanabe, T.Nakai, K.Ando, T.Hotta, Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: Potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 30, 2379-2387(2005).
- [0656] 53. T.J.DiStefano, J.O.Shmukler, G.Danias, J.C.Iatridis, The functional role of interface tissue engineering in annulus fibrosus repair: bridging mechanisms of hydrogel integration with regenerative outcomes. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6, 6556-6586(2020).
- [0657] 54. T.C.Schmitz, E.Salzer, J.F.Crispim, G.T.Fabra, C.LeVisage, A.Pandit, M.Tryfonidou, C.L.Maitre, K.Ito, Characterization of biomaterials intended for use in the nucleus pulposus of degenerated intervertebral discs. *Acta Biomater.* 114, 1-15(2020). 573
- [0658] [실시예 5]
- [0659] 래트 추간판 수핵 결손 모델에 있어서의 알긴산 나트륨 및 간엽계 줄기 세포의 보충에 의한 염증 억제 및 동통 억제 효과
- [0660] 1. 래트 추간판 천자 변성 모델의 제작
- [0661] 래트 추간판 천자 변성 모델(Mohd Isa et al. *Sci Adv* 2018)을 피험 물질 투여에 관한 실험(IHC 분석, 조직학적 분석, 동통 관련 행동 분석)에 사용한다. 계 60마리의 12주령 암형 SD 래트(260-300g)를, 피부 절개만의 군(sham군), 추간판 천자만의 군(punch군), 추간판 천자 후에 UPAL을 매식하는 군(UPAL군), 추간판 천자 후에

UPAL과 REC를 매식하는 군(REC군)으로 무작위로 할당한다(n=3, 각 시점·각 군). 5% 이소플루란 흡입에 의한 마취 도입 후에, 케타민과 메테토미딘의 혼합물(케타민:메테토미딘=75mg/kg:0.5mg/kg)의 복강내 주사에 의해 마취를 유지한다. 검자를 사용한 꼬리부 잡기 시험으로 마취 심도를 확인한 후, Co4/5-5/6의 키(등)측 피부를 절개한다. 결합 조직을 박리해서 Co4/5 -5/6을 노출하고, 19 G 바늘을 사용해서 Co4/5-5/6의 추간판을 손상한다(직경 1mm, 깊이 2mm).

[0662] Gel군, REC군에 있어서는, 건조시킨 섬유상의 UPAL(400-600mPa/s, Mochida Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 생리 식염수(0.9%, Otsuka)에 용해해서 2%(w/v)로 조제하고, 4 μ l의 UPAL 용액을 26 G 바늘을 설치한 마이크로 시린지로(Hamilton)를 사용해서 천자부와는 다른 경로로 추간판 내 중심부에 주입한다. REC군은 농도를 1x10⁶/ml로 설정한다. 수술 부위를 생리 식염수로 세정하고, 근막, 결합 조직, 피부를 봉합 폐쇄한다.

[0663] 2. 면역 조직학적 평가

[0664] 래트 추간판의 면역 조직학적 평가를 실시하고, 수술 후 1, 4, 7 및 28일 후의 TNF- α , IL-6 및 TrkA 양성 세포를 검출한다. 래트(각 시점·각 군 n=3)를 이소플루란 흡입에 의해 깊이 마취하고, 경추 탈구로 안락사시킨다.

[0665] 꼬리 전체(Co 4/5-Co 5/6)를 외과적으로 적출하고, 무균 조건 하에서 연부 조직을 제거해서 미망치와 추간판만을 채취한다. 채취한 추간판은 4%(w/v) 파라포름알데히드로 고정하고(실온에서 48시간), 파라핀에 포매한다. 추간판 중앙에서 검체를 횡단하고, 관상 단 중앙의 횡단면 절편(두께 5 μ m)을 얻는다. 절편을 크실렌으로서 탈파라핀화한 후, 프로테이나제 K(Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 중에서 배양한다(37 $^{\circ}$ C, 15분간). 계속해서, 1% 과산화수소 메탄올(w/v)로 블로킹하고(37 $^{\circ}$ C, 30분간), 2%(w/v) 소 혈청 알부민 중에서 배양(실온, 30분간)한 후, 1차 항체와 4 $^{\circ}$ C로 밤새 배양한다. 항TNF- α 마우스 모노클로날 항체(ab220210, Abcam), 항IL-6 마우스 모노클로날 항체(ab9324, Abcam), 항TrkA토끼 모노클로날 항체(ab86474, Abcam)를 사용한다.

[0666] 발색에는, TNF- α 분석에서는 Histofine(등록상표) Fast Red II(Nichirei Bioscience), IL-6 분석에서는 HistoGreen Substrate kit for Peroxidase(Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan), TrkA 분석에서는 Histofine(등록상표)DAB(Nichirei Bioscience)을 사용한다. 시인성을 향상시킬 목적으로 세포핵의 대비 염색을 행하고, TNF- α 또는 TrkA 염색에서는 헤마톡실린을, IL-6 염색에서는 페스트 레드를 각각 사용한다. 광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여, TNF- α , IL-6 또는 TrkA 양성 세포를 무작위로 선택된 5 시야로 개별로 계수하고, 각 염색에 있어서의 양성 수핵 또는 섬유륜 세포수를, 시야 중의 전 수핵 또는 섬유륜 세포수에 대한 백분율로서 계산한다. 전 평가는, 맹검화된 2명의 독립된 관찰자에 의해 행한다. 각 관찰자는, 1검체에 대해서 3회의 평가를 실시해서 검체마다의 평균값을 산출하고, 각 군간의 비교를 행한다.

[0667] 3. 조직학적 평가

[0668] 수술 후 28일의 추간판 조직 변성을 평가한다. 래트(n=3)을 면역 조직학적 평가와 동일한 방법에서 안락사시켜서, 추간판을 채취한다. 채취한 추간판을 4% (w/v) 파라포름알데하이드로 48시간 고정하고, 크리스텐센 탈회액으로 2주간 탈회한 후, 수돗물로 24시간 세정하고, 파라핀 포매한다(Mohd Isa et al. Sci Adv 2018). 래트 추간판의 화살상단 정중 표본(두께 5 μ m)을 사용해서 조직학적 스코어(Rutges et al. Osteoarthritis Cartilage 2013)를 평가하기 위해서 헤마톡실린 & 에오신, 사프란인 O 또는, 알시안 블루(AB)로 염색한다. AB 염색은 점수에 직접 관여하지 않지만, 세포 외 기질의 평가에 적합한 염색이기 때문에 보조 목적으로 실시한다. 모든 평가는, 맹검화된 2인의 독립된 관찰자에 의해 행한다. 각 관찰자는 1검체에 대해서 3회의 평가를 실시해서 개체의 평균값을 산출한 뒤에, 각 군간을 비교한다.

[0669] 4. 동통 관련 행동 분석

[0670] 면역 조직학적 평가로 수술 후 28일째까지 생존시킨 래트 12마리(각 군n=3) 및, 조직학적 분석에 사용한 래트 12마리(각 군n=3)의, 계 24마리의 래트(각 군n=6)을 동통 관련 행동 분석에 사용한다. 전체 래트에 하그리브스, 본 프레이, 테일 플릭 시험을 실시한다. 각 시험의 24시간 전 및 시험 직전에, 20분간 각 래트를 개별로 시험 환경에서 지내게 해서 환경에 익숙해지게 한다. 모든 시험은, 맹검화된 동일한 검자에 의해 행한다. 각 래트에서 복수회의 측정을 행해서 평균값을 산출하고, 얻어진 결과를 군간에서 비교한다.

[0671] 4.1 하그리브스 시험

[0672] 하그리브스 시험은, 하그리브스 시험 장치(Ugo Basile Biological Instruments, Gemonio, Italy)를 사용하여, 시술 전 2일째(Day-2)와 수술 후 2, 7, 14, 27일째에 실시한다(Mohd Isa et al. Sci Adv 2018). 래트는 유리

판(Ugo Basile Biological Instruments) 상에 사방 및 상방을 둘러싼 개별의 작은방(상방에 공기 구멍 있음)에 넣는다. 열자극으로서 적외선 빔을 피부 절개부의 복측에 조사한다. 열자극에 대한 도피 행동을 나타낼 때까지의 잠복 시간을 기록한다. 빔의 강도는 최대 출력의 50%로 설정한다. 조직 손상을 방지할 목적으로, 컷오프 시간을 20초간으로 설정한다. 동일 래트에 있어서 각 시점에서 4회의 측정을 실시하지만, 각 측정간에 적어도 1분의 휴식을 끼운다.

[0673] 4.2 본 프레이 시험

[0674] 본 프레이 시험은 다이내믹 플랜타 측각계(dynamic plantar aesthesiometer)(Ugo Basile Biological Instruments)를 사용하여, 시술 전 2일째(Day-2)와 수술 후 2, 7, 14, 27일째에 실시한다. 금속망 위에 하그리브스 시험에서 사용한 것과 같은 작은방을 설치해서 래트를 넣는다. 직경 0.5mm의 필라멘트를 피부 절개부의 복측에 맞추고, 0g로부터 개시해서 5g까지 직선적으로 증가하는 힘을 10초간 걸어서 첨가해도 되는, 그 후는 5g의 힘을 시험 개시부터 30초후까지 일정한력에서 첨가한다. 래트가 어떠한 도피 행동을 나타낼 때까지의 잠복 시간을 기록한다. 동일 래트에 있어서 각 시점에서 5회의 측정을 실시하지만, 각 측정간에 적어도 10초의 휴식을 끼운다.

[0675] 4.3 테일 플릭 시험

[0676] 테일 플릭 시험은 열 유속 라디오미터(heat flux radiometer)(Ugo Basile Biological Instruments사제)를 사용해서 행한다. 하그리브스 시험과 동일 일정으로 시행된 것에 의한 과도한 열자극에 의한 조직 손상을 피하기 위해서, 시술 전 1일째(Day-1)와 수술 후 3, 8, 15, 28일째에 실시한다(Mohd Isa et al. Sci Adv 2018). 각 래트를 수건에 싼 상태에서 10분간 달랜 후, 몸부는 수건으로 덮은 채 미만을 장치 상에간격, 미의 원위단으로부터 5cm 근위부 복측에 적외선 빔을 조사한다. 열자극에 대한 미 뿌리쳐 반응까지의 잠복 시간을 기록한다. 조직 손상을 방지하는 목적에서, 컷오프 시간을 20초간으로 설정한다. 동일 래트에 있어서 각 시점에서 4회의 측정을 실시하지만, 각 측정간에 적어도 15초의 휴식을 끼운다.

[0677] 5. 통계 분석

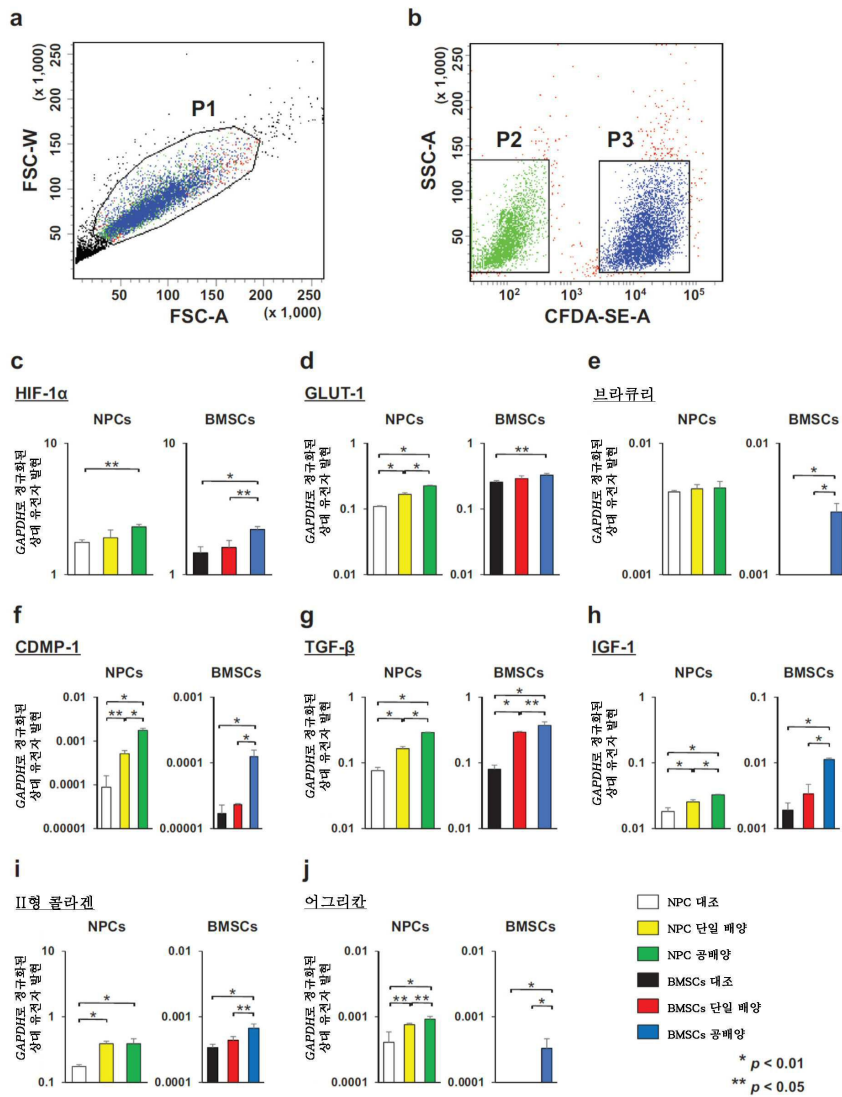
[0678] 모든 데이터는 평균±표준 오차(SE)로서 표기한다. 다군간 비교에는 one-way ANOVA를 사용한다. 2군 비교에는 대응이 없는 스튜던트-t 검정을 사용한다. 모든 ANOVA의 결과는, 투키-크레이머 사후 분석 검정 또는 크러스컬-월리스 검정을 사용해서 더 평가한다. 차에 대해서는, 5%의 유의 수준으로 통계적으로 유의하다고 간주한다($P < 0.05$).

[0679] 6. 결과

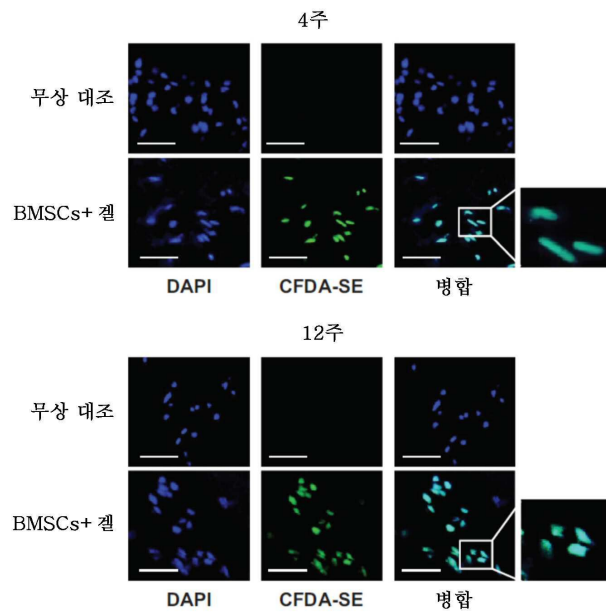
[0680] UPAL과 REC를 매식하는 군(REC군)에 있어서, 동통 억제 효과가 확인될 수 있다.

도면

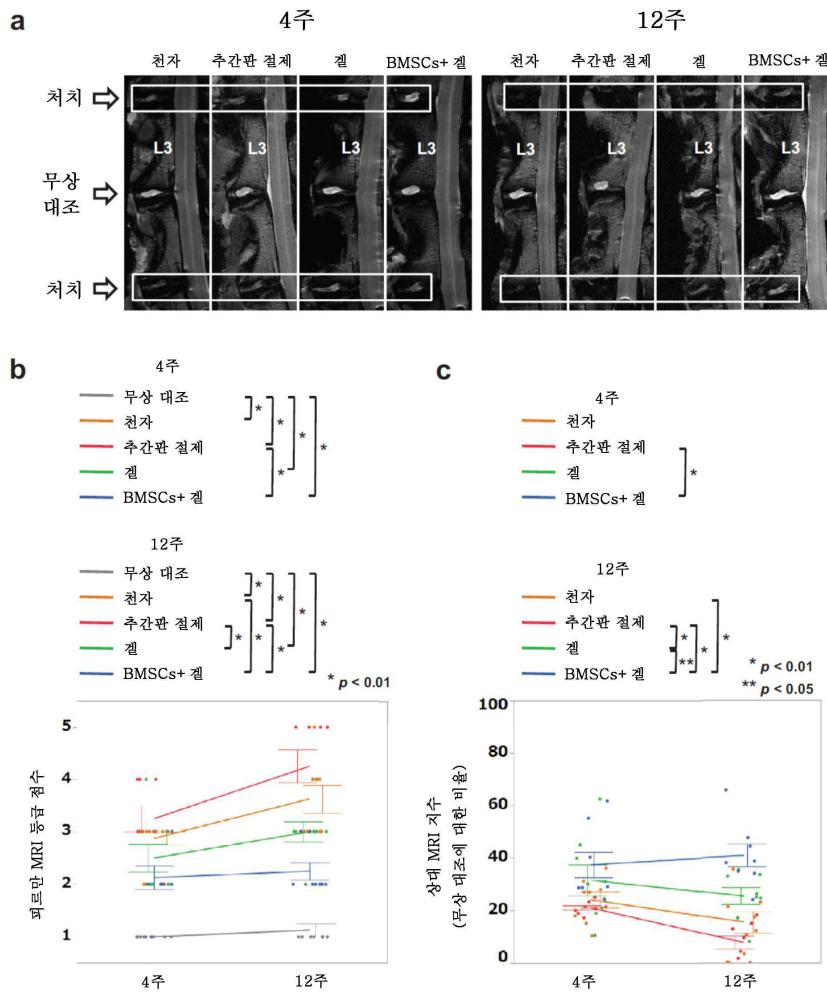
도면1



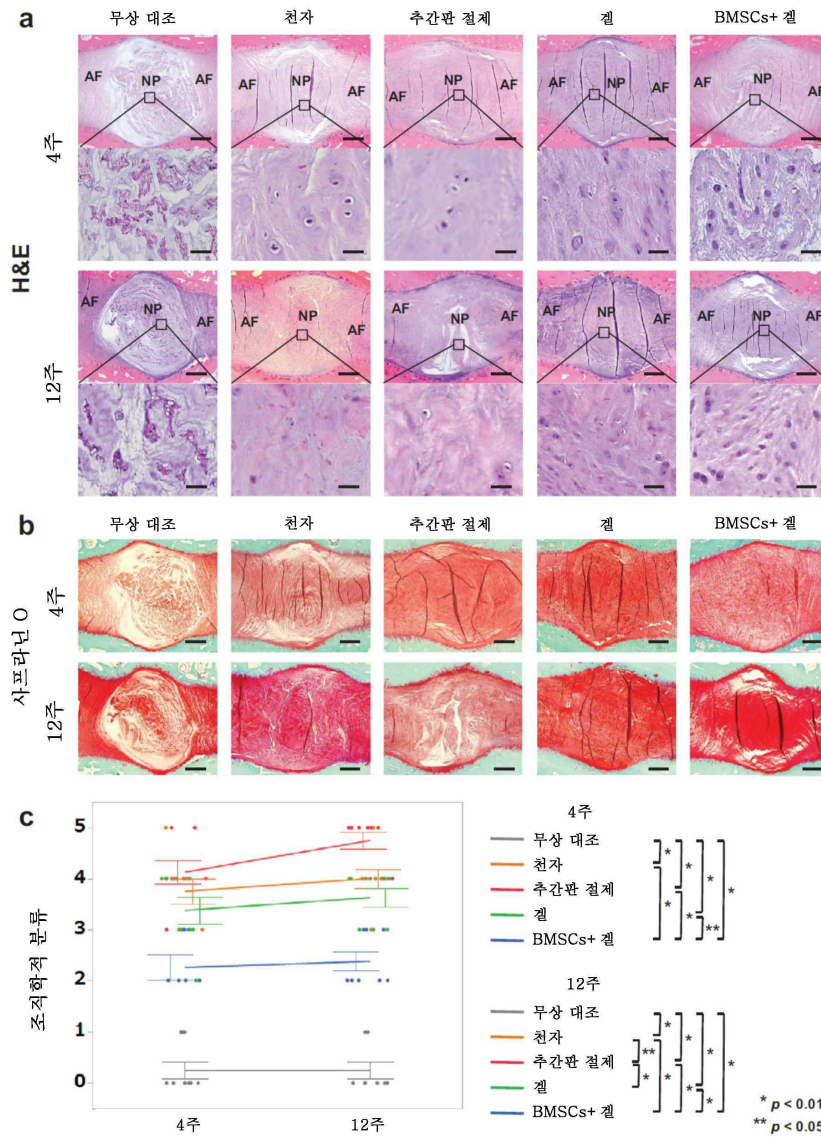
도면2



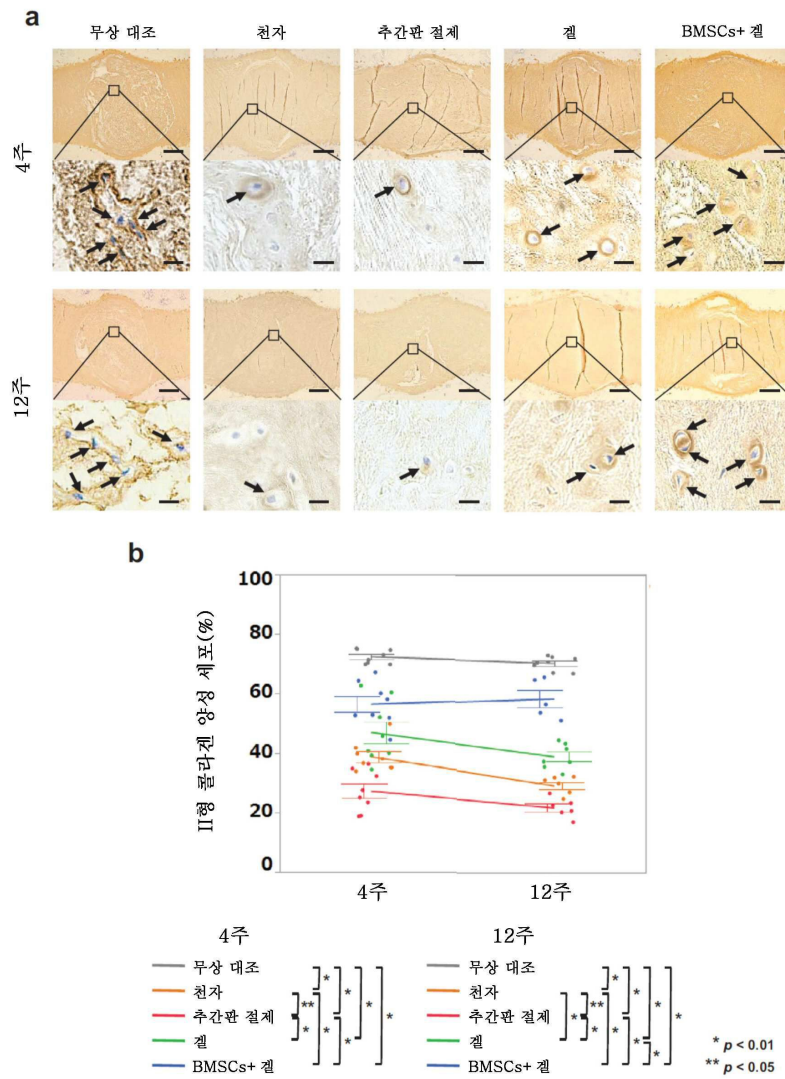
도면3



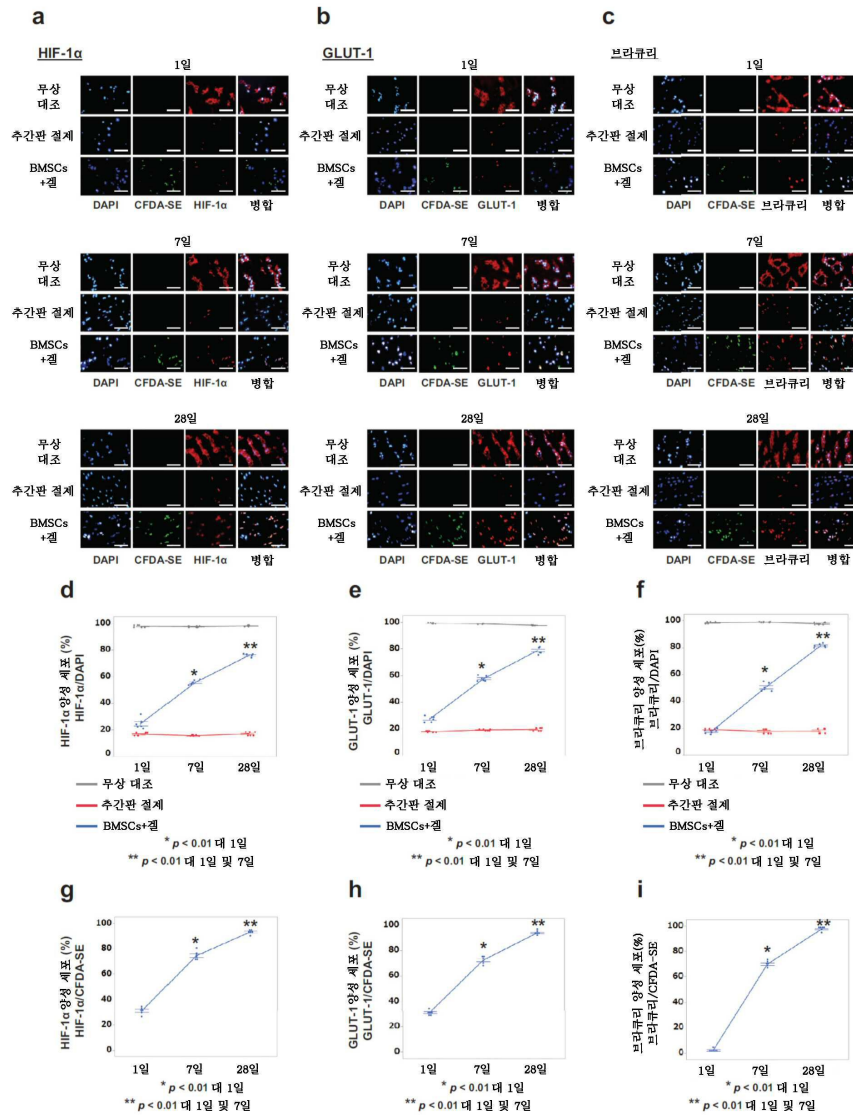
도면4



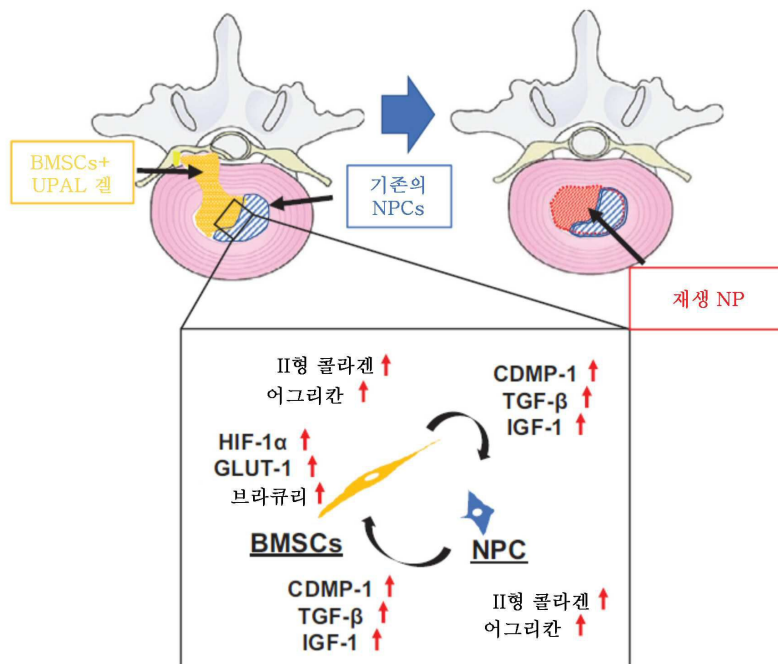
도면5



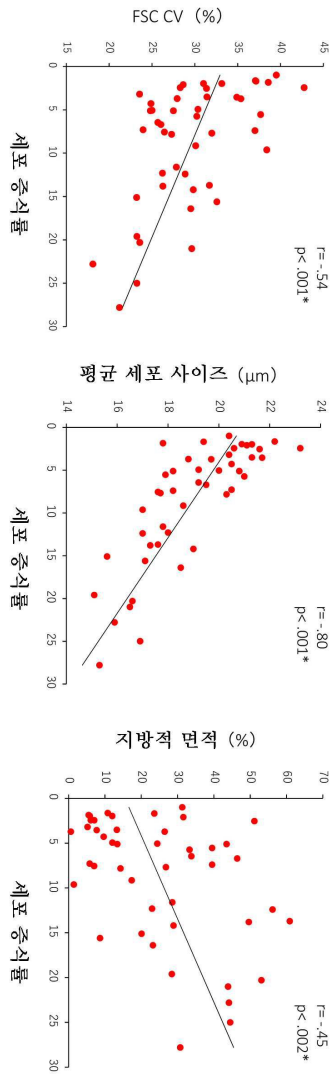
도면6



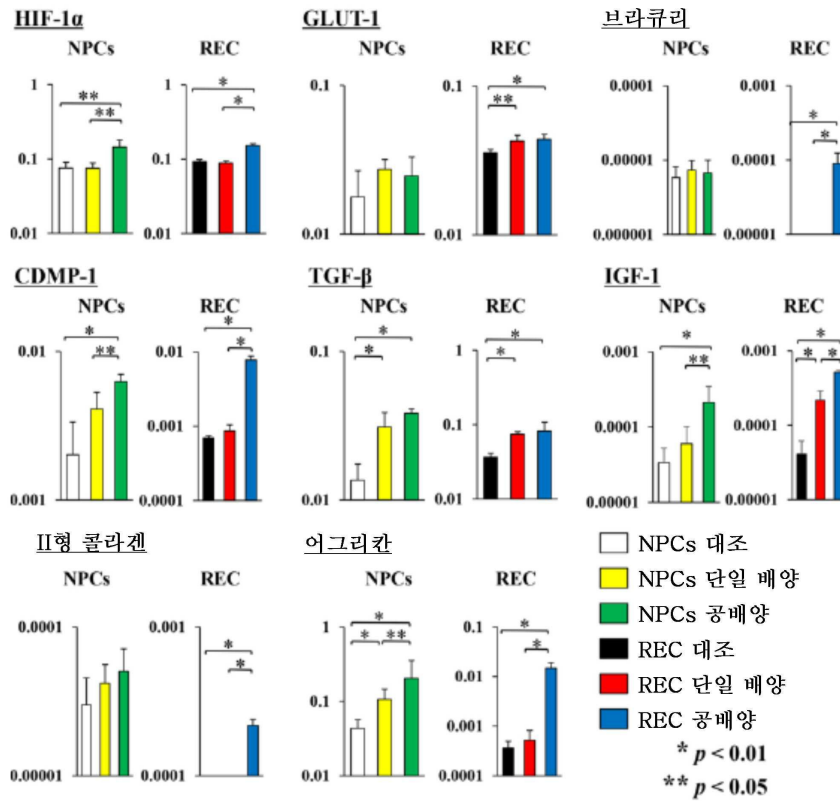
도면7



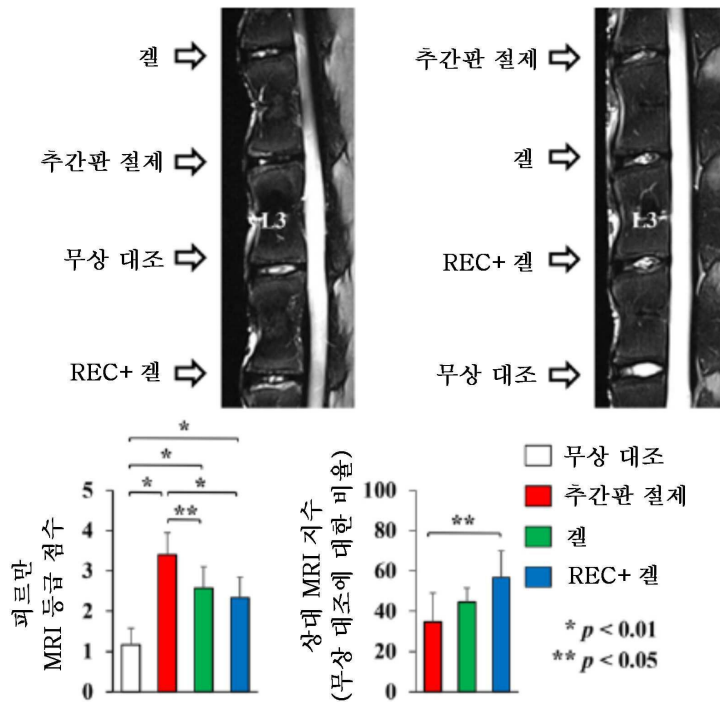
도면8



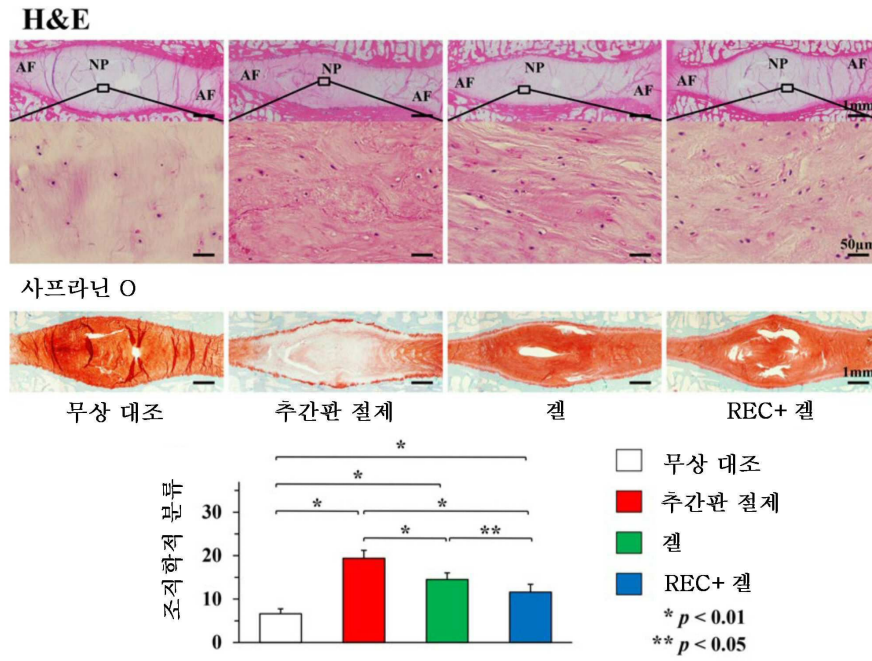
도면9



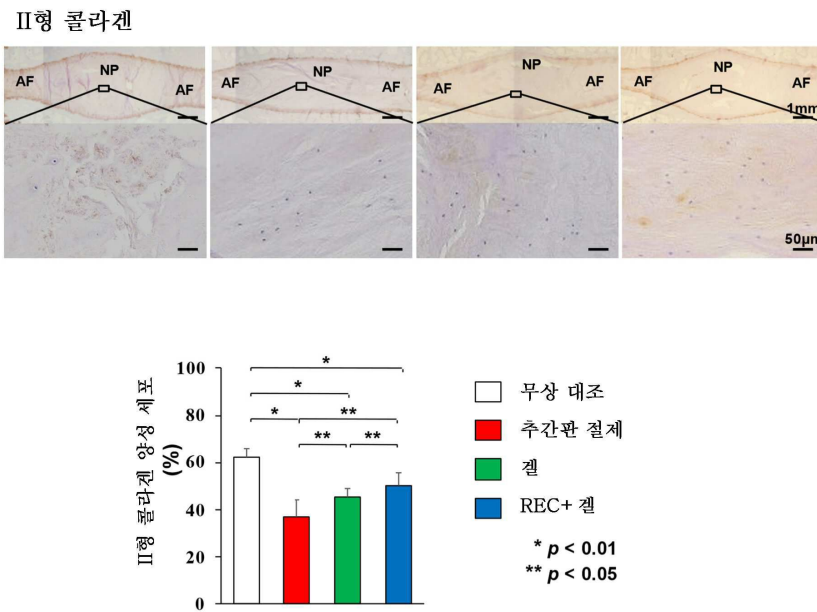
도면10



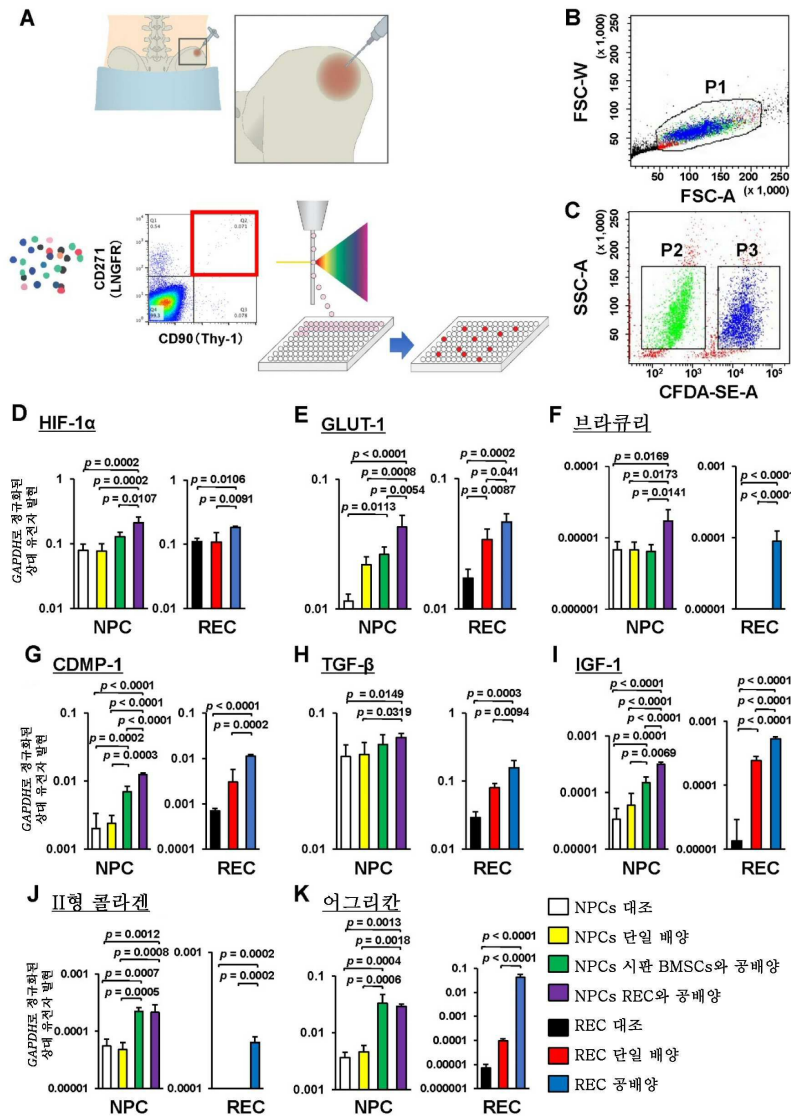
도면11



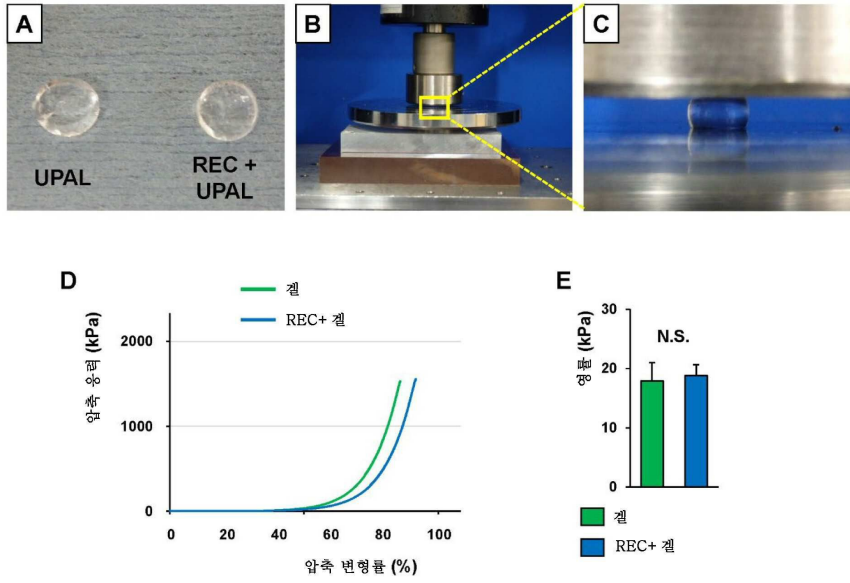
도면12



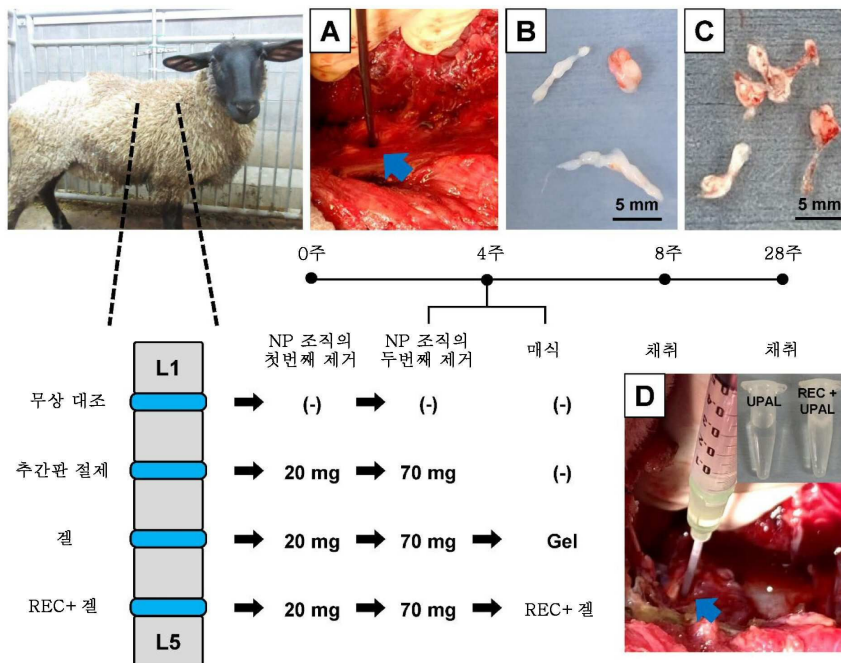
도면13



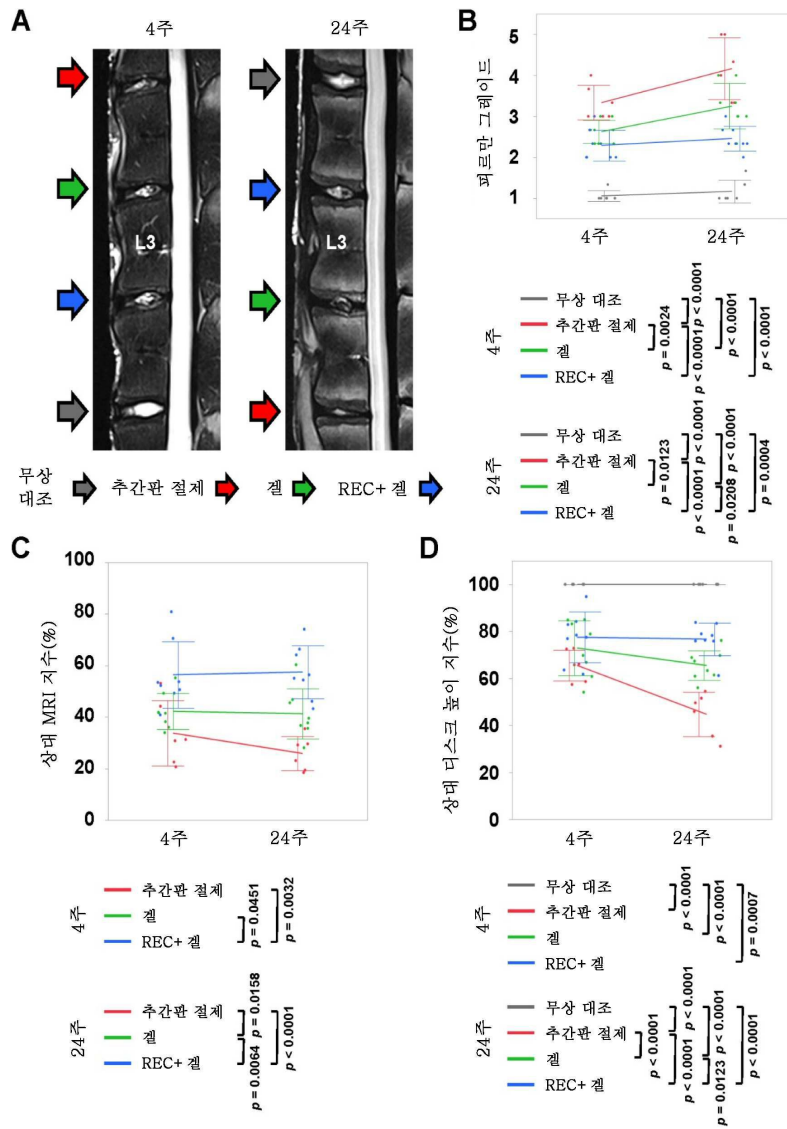
도면14



도면15



도면16

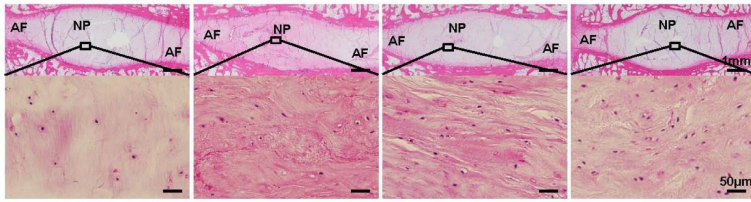


도면17

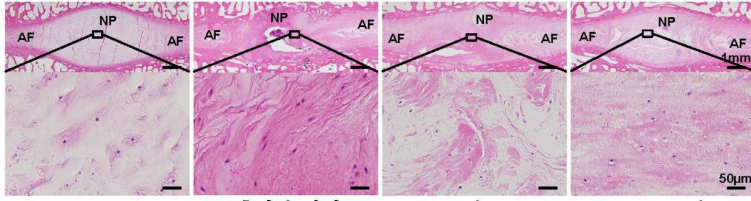
A

헤마톡실린 및 에오신

4주



24주



무상 대조

추간판 절제

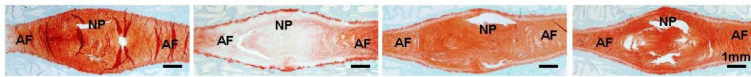
겔

REC+ 겔

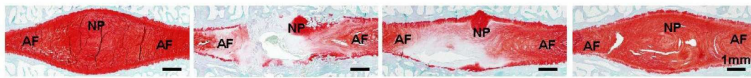
B

사프란닌-O

4주



24주



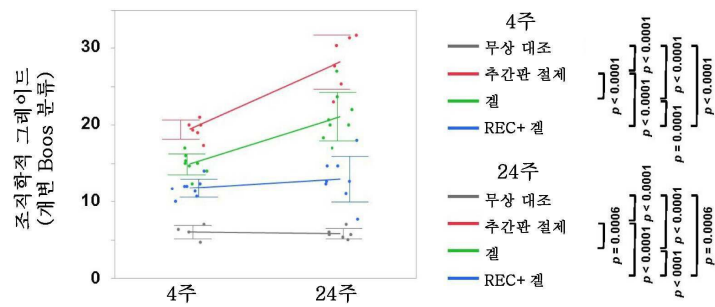
무상 대조

추간판 절제

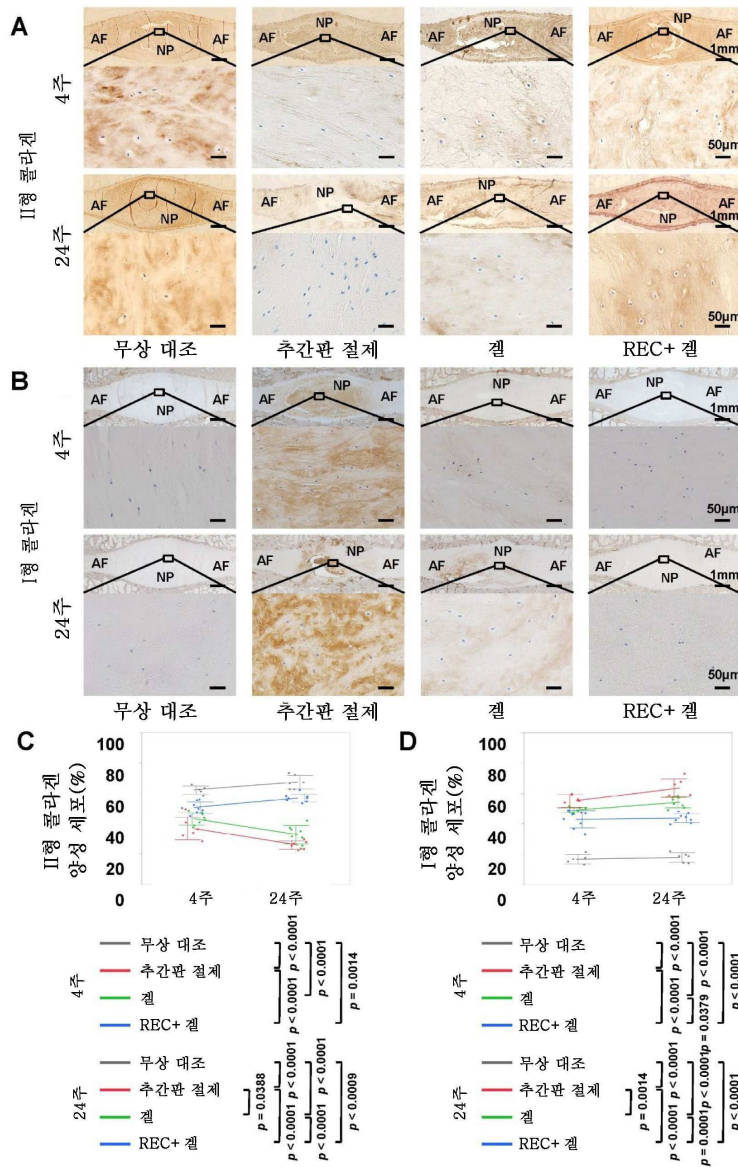
겔

REC+ 겔

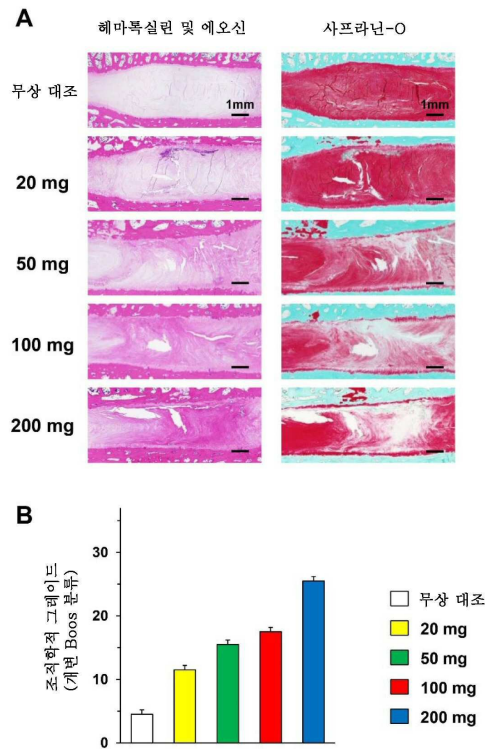
C



도면18



도면19



도면20

