(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148883
(43) 공개일자 2022년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034047
(22) 출원일자(국제) 2021년03월19일
심사청구일자 2022년09월29일
(85) 번역문제출일자 2022년09월29일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/011546
(87) 국제공개번호 WO 2021/200299
국제공개일자 2021년10월07일
(30) 우선권주장
JP-P-2020-065052 2020년03월31일 일본(JP)

(71) 출원인
후지필름 가부시키가이샤
일본 도쿄도 미나토쿠 니시 아자부 2쵸메 26방 30고
(72) 발명자
이시도메 다카마사
일본 효고켄 아마가사키시 다카타쵸 6방 1고
야마네 마사유키
일본 효고켄 아마가사키시 다카타쵸 6방 1고
(74) 대리인
특허법인코리아나

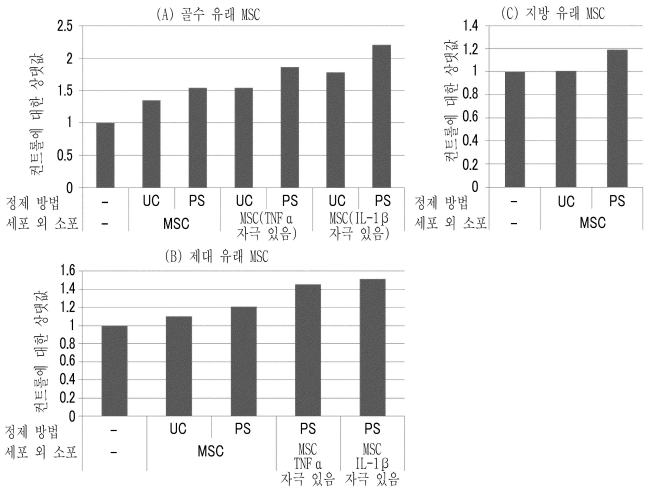
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제 및 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명의 과제는, 세포 노화 억제 활성이나 생체 조직 수복 촉진 활성이 높은 세포 외 소포의 집단에 의하여 구성된 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제, 및 피부 외용 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명은, 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는, 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제, 및 피부 외용 조성물이며, 세포 외 소포가 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이거나, 또는/및 세포 외 소포가 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것에 관한 것이다.

대 표 도 - 도14



(52) CPC특허분류
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제로서,

세포 외 소포가 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이거나, 또는/및 세포 외 소포가 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 간엽계 줄기세포가, iPS 세포에서 유래하는 것, 혹은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수, 양막 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 간엽계 줄기세포가, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 세포 외 소포가, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질이, Tim 단백질인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 Tim 단백질이, Tim4 단백질, Tim3 단백질 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 세포 노화 억제 또는 생체 조직 수복 촉진이, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 및 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 작용에 의한 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제.

청구항 9

염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 세포 외 소포를 얻는 것, 또는/및 간엽계 줄기세포 유래의 세포 외 소포로부터 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 세포 외 소포를 얻는 것을 포함하는, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 간엽계 줄기세포가, iPS 세포에서 유래하는 것, 혹은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수, 양막 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

상기 간엽계 줄기세포가, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서,

상기 세포 외 소포가, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서,

상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질이, Tim 단백질인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 Tim 단백질이, Tim4 단백질, Tim3 단백질 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 15

청구항 9에 있어서,

상기 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 16

청구항 9에 있어서,

상기 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용이, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 및 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 작용에 의한 것인, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법.

청구항 17

간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는, 유전자 발현 조절제로서,

세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이거나, 또는/및 세포 외 소포가 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것이며, 또한

유전자가, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소 유전자, 히알루론산 분해 효소 유전자, 엘라스틴 유전자, 및 엘라스틴 분해 효소 유전자로부터 선택되는 적어도 1종의 유전자인, 유전자 발현 조절제.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제를 함유하는 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 간엽계 줄기세포 유래 세포 외 소포를 이용한 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포 노화란, 세포가 분열을 정지하거나, 세포 외 기질(基質)의 산생(産生)이 저하되거나, 혹은 주변 조직을 상해하는 인자가 방출되는 현상이다. 생체 조직은, 개개의 세포가 증식되어, 세포 외 기질을 산생함으로써 유지되고 있기 때문에, 세포 노화는 조직의 열화에 큰 영향을 준다. 예를 들면, 세포 분열에 의한 DNA 복제 에러의 축적, 산화 스트레스, 방사선, 암유전자의 활성화 등에 의하여 DNA에 손상이 발생하면, DNA 손상 응답에 의하여, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자 등의 세포 증식 억제 유전자의 발현이 항진되어, 세포 노화가 야기된다고 생각되고 있다. 또, 예를 들면, 표피 세포나 섬유 아세포, 콜라겐, 히알루론산, 엘라스틴 등의 세포 외 매트릭스 등으로 구성되어 있는 피부는, 자외선이나 건조, 스트레스, 가령(加齢) 등에 의하여 특히 세포 외 매트릭스, 섬유 아세포의 기능이 저하되고, 주름이나 처짐, 기미 등의 증상이 발생한다고 생각되고 있다.

[0003] 세포에서 유래하는, 지질(脂質) 이중막으로 구성되는 소형막 소포인 세포 외 소포(Extracellular vesicle)는, 내포하는 mRNA나 microRNA와 같은 핵산, 혹은 단백질의 운반을 통한 세포 간 정보 전달을 담당하고 있다고 생각되고 있다(비특허문헌 1).

[0004] 또, 간엽계 줄기세포(Mesenchymal stem cell, 이하 "MSC"라고 약기하는 경우가 있다)는, 중배엽(中胚葉) 유래의 조직(간엽계)에 속하는 세포에 대한 분화능을 갖는 줄기세포이다. MSC는 지방, 골수, 및 제대(臍帶) 매트릭스 등으로부터 분리하는 것이 가능하지만, 모두, 접착성이 있는, CD105, CD73, 및 CD90이 양성, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, 및 HLA-Class II(DR)가 음성, 뼈, 지방, 및 연골에 대한 분화능을 갖는다는 공통점을 갖는다고 일반적으로 생각되고 있다.

[0005] 최근, 세포 외 소포가 다양한 질환에 관여하고 있을 가능성이 시사되고 있다. 또, 초원심법에 의하여 취득된 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포가 세포 증식을 촉진시키는 것(비특허문헌 2), 진피의 수복(비특허문헌 3)이나 인대의 수복(비특허문헌 4)을 촉진시키는 것이 보고되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 국제 공개공보 WO2016/088689

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Thery C(2019) Nat Cell Biol, 21(1):9-17

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Arsalan S et al. STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volume 24, Number 14, 2015

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Bocheng Zhang et al. Cell Transplantation Volume 29:1-14

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Connie S. Chamberlain al. Stem Cells. 2021; 39:55-61.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 그러나, 초원심법에 의하여 취득된 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성이나 생체 조직 수복 촉진 활성에 대하여 본 발명자가 검증한 결과, 이들 활성이 약하여 산업 이용하기에는 불충분하다는 것을 알 수 있었다. 상기 상황을 감안하여, 본 발명의 과제는, 보다 세포 노화 억제 활성이나 생체 조직 수복 촉진 활성이 높은 세포 외 소포의 집단에 의하여 구성된 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제, 피부 외용(外用) 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은, 상기의 과제를 해결하기 위하여, 다양한 세포 외 소포의 취득 방법으로 선택적으로 회수한 세포 외 소포에 대하여 예의 검토한 결과, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포의 집단 또는/및 포스파티딜세린(PS)에 대한 친화성을 갖는 물질을 이용한 방법(PS 어피니티법)에 의하여 취득된 PS 양성이라는 특장(特長)을 갖는 세포 외 소포의 집단이, 세포 노화 억제제로서 높은 세포 노화 억제 활성을 갖는 것, 유전자 발현 조절제로서 높은 유전자 발현 조절 활성을 갖는 것, 생체 조직 수복 촉진제로서 높은 생체 조직 수복 촉진 활성을 갖는 것을 알아내, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0010] 즉 본 발명은, 그 기본적 양태는,

[0011] (1) 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제로서,

[0012] 세포 외 소포가 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이거나, 또는/및 세포 외 소포가 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0013] (2) 상기 간엽계 줄기세포가, iPS 세포에서 유래하는 것, 혹은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수(齒髓), 양막(羊膜) 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것인, 상기 (1)에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0014] (3) 상기 간엽계 줄기세포가, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것인, 상기 (1) 또는 (2)에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0015] (4) 상기 세포 외 소포가, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0016] (5) 상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질이, Tim 단백질인, 상기 (4)에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0017] (6) 상기 Tim 단백질이, Tim4 단백질, Tim3 단백질 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것인, 상기 (5)에 기재된 세

포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0018] (7) 상기 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (1) 또는 (2)에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제;

[0019] (8) 상기 세포 노화 억제 또는 생체 조직 수복 촉진이, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 및 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 작용에 의한 것인, 상기 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제이다.

[0020] 또 본 발명은, 이러한 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제로서의 세포 외 소포의 제조법이기도 하며, 구체적으로는,

[0021] (9) 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 세포 외 소포를 얻는 것, 또는/및 간엽계 줄기세포 유래의 세포 외 소포로부터 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 세포 외 소포를 얻는 것을 포함하는, 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0022] (10) 상기 간엽계 줄기세포가, iPS 세포에서 유래하는 것, 혹은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수, 양막 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것인, 상기 (9)에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0023] (11) 상기 간엽계 줄기세포가, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것인, 상기 (9) 또는 (10)에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0024] (12) 상기 세포 외 소포가, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (9) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0025] (13) 상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질이, Tim 단백질인, 상기 (9) 내지 (12) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0026] (14) 상기 Tim 단백질이, Tim4 단백질, Tim3 단백질 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것인, 상기 (13)에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0027] (15) 상기 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (9) 또는 (10)에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0028] (16) 상기 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용이, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 및 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 작용에 의한 것인, 상기 (9) 내지 (15) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법이다.

[0029] 또 본 발명은, 유전자 발현 조절제이기도 하며, 구체적으로는,

[0030] (17) 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는, 유전자 발현 조절제로서, 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이거나, 또는/및 세포 외 소포가 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것이며, 또한

[0031] 유전자가, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소 유전자, 히알루론산 분해 효소 유전자, 엘라스틴 유전자, 및 엘라스틴 분해 효소 유전자로부터 선택되는 적어도 1종의 유전자인, 유전자 발현 조절제이다.

[0032] 또 본 발명은, 이러한 유전자 발현 조절제로서의 세포 외 소포의 제조법이기도 하며, 구체적으로는,

[0033] (18) 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 세포 외 소포를 얻는 것, 또는/및 간엽계 줄기세포 유래의 세포 외 소포로부터 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여

세포 외 소포를 얻는 것을 포함하는, 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0034] (19) 상기 간엽계 줄기세포가, iPS 세포에서 유래하는 것, 혹은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수, 양막 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것인, 상기 (18)에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0035] (20) 상기 간엽계 줄기세포가, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것인, 상기 (18) 또는 (19)에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0036] (21) 상기 세포 외 소포가, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (18) 내지 (20) 중 어느 하나에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0037] (22) 상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질이, Tim 단백질인, 상기 (21)에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0038] (23) 상기 Tim 단백질이, Tim4 단백질, Tim3 단백질 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것인, 상기 (22)에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0039] (24) 상기 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (18) 내지 (20) 중 어느 하나에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법;

[0040] (25) 상기 유전자가, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소 유전자, 히알루론산 분해 효소 유전자, 엘라스틴 유전자, 및 엘라스틴 분해 효소 유전자로부터 선택되는 적어도 1종의 유전자인, 상기 (18) 내지 (24) 중 어느 하나에 기재된 유전자 발현 조절 작용을 갖는 세포 외 소포의 제조 방법이다.

[0041] 또 본 발명은, 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물이기도 하며, 구체적으로는,

[0042] (26) 상기 (1) 내지 (8) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제를 함유하는 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물이다.

[0043] 또 본 발명은, 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조법이기도 하며, 구체적으로는,

[0044] (27) 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 세포 외 소포를 얻는 것, 또는/및 간엽계 줄기세포 유래의 세포 외 소포로부터 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 세포 외 소포를 얻는 것을 포함하는, 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0045] (28) 상기 간엽계 줄기세포가, iPS 세포에서 유래하는 것, 혹은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수, 양막 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것인, 상기 (27)에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0046] (29) 상기 간엽계 줄기세포가, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것인, 상기 (27) 또는 (28)에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0047] (30) 상기 세포 외 소포가, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (27) 내지 (29) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0048] (31) 상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질이, Tim 단백질인, 상기 (27) 내지 (30) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0049] (32) 상기 Tim 단백질이, Tim4 단백질, Tim3 단백질 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것인, 상기 (31)에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0050] (33) 상기 세포 외 소포가, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것인, 상기 (27) 내지

(29) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법;

[0051] (34) 상기 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용이, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 및 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 작용에 의한 것인, 상기 (27) 내지 (33) 중 어느 하나에 기재된 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물의 제조 방법이다.

발명의 효과

[0052] 본 발명에 의하여, 간엽계 줄기세포로부터 세포 노화 억제 작용 또는 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제, 피부 외용 조성물이 제공된다. 본 발명이 제공하는 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 및 피부 외용 조성물은, 세포 노화 관련 유전자 또는 생체 조직 수복 관련 유전자의 유전자 발현을 조절하고, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용 등에 의하여 세포 노화를 억제하여, 생체 조직의 수복을 촉진한다. 또, 본 발명이 제공하는 유전자 발현 조절제는, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소 유전자, 히알루론산 분해 효소 유전자, 엘라스틴 유전자, 및 엘라스틴 분해 효소 유전자로부터 선택되는 적어도 1종의 유전자의 발현 조절 작용을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은, 초원심 분리법에 의하여 취득된 MSC 유래 세포 외 소포의 입자경 분포를 NTA에 의하여 해석한 결과이다.

도 2는, PS 어피니티법에 의하여 취득된 MSC 유래 세포 외 소포의 입자경 분포를 NTA에 의하여 해석한 결과이다.

도 3은, 정량 PCR에 사용한 프라이머를 나타낸 도이다.

도 4는, p21 유전자(세포 증식 억제 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포(TIG3 세포)를 이용하여, 골수 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 5는, p53 유전자(세포 증식 억제 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포를 이용하여, 골수 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 6은, MMP-1 유전자(콜라겐 분해 효소 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포를 이용하여, 골수 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 7은, p21 유전자(세포 증식 억제 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포를 이용하여, 제대 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 8은, p53 유전자(세포 증식 억제 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포를 이용하여, 제대 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 9는, MMP-1 유전자(콜라겐 분해 효소 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포를 이용하여, 제대 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 10은, 정량 PCR에 사용한 프라이머를 나타낸 도이다.

도 11은, p16 유전자(세포 증식 억제 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 피부 유래 섬유 아세포(TIG3S 세포)를 이용하여, (A) 골수 유래 MSC, 또는 (B) 지방 유래 MSC로부터 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 12는, p21 유전자(세포 증식 억제 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 피부 유래 섬유 아세포를 이용하여, (A) 골수 유래 MSC, (B) 제대 유래 MSC, 또는 (C) 지방 유래 MSC로부터 각각 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 13은, MMP-1 유전자(콜라겐 분해 효소 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 피부 유래 섬유 아세포를 이용하여, (A) 골수 유래 MSC, (B) 제대 유래 MSC, 또는 (C) 지방 유래 MSC로부터 각각 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 14는, COL1A1 유전자(I형 콜라겐 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 피부 유래 섬유 아세포를 이용하여, (A) 골수 유래 MSC, (B) 제대 유래 MSC, 또는 (C) 지방 유래 MSC로부터 각각 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 15는, COL3A1 유전자(III형 콜라겐 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 피부 유래 섬유 아세포를 이용하여, (A) 골수 유래 MSC, (B) 제대 유래 MSC, 또는 (C) 지방 유래 MSC로부터 각각 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

도 16은, HAS1 유전자(히알루론산 합성 효소 유전자)의 mRNA 발현량을 지표로 하여, 인간 피부 유래 섬유 아세포를 이용하여, (A) 골수 유래 MSC, (B) 제대 유래 MSC, 또는 (C) 지방 유래 MSC로부터 각각 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명의 기본은, 상기한 바와 같이, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 세포 외 소포 또는/및 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 및 유전자 발현 조절제이다.

[0055] 세포 외 소포(이하, "EV"라고 약기하는 경우가 있다)는, 세포에서 유래하는, 지질 이중막으로 구성되는 소형막 소포이다. 당해 세포 외 소포는, 통상 20nm~1000nm의 직경을 갖는 것을 들 수 있으며, 50nm~800nm인 것이 바람직하고, 50nm~500nm인 것이 보다 바람직하며, 50nm~200nm인 것이 특히 바람직하다. 상기 세포 외 소포로서는, 예를 들면, Nature Reviews Immunology 9, 581-593(August 2009), "비만 연구" Vol. 13 No. 2 2007 토픽 아오키 나오토 등에 기재한 바와 같이, 그 발생 기원이나 소형막 소포의 크기 등에 의하여 다양하게 분류되는 것을 들 수 있다. 구체적으로는, 엑소좀, 미(微)소포, 엑토좀, 막 입자, 엑소좀 형태 소포, 아포토시스 소체(小體), 아디포좀 등을 들 수 있으며, 엑소좀 및 미소포가 바람직하고, 엑소좀이 보다 바람직하다.

[0056] 상기 엑소좀은, 세포에서 유래하는, 지질 이중막으로 구성된 소형막 소포이고, 예를 들면, 50nm~200nm의 직경을 갖는 것을 들 수 있으며, 50nm~150nm인 것이 바람직하고, 50nm~100nm인 것이 보다 바람직하다. 또한, 엑소좀은, 후기 엔도좀에서 유래한다고 생각되고 있다.

[0057] 상기 미소포는, 세포에서 유래하는, 지질 이중막으로 구성된 소형막 소포이고, 예를 들면, 100nm~1000nm의 직경을 갖는 것을 들 수 있으며, 100nm~800nm인 것이 바람직하고, 100nm~500nm인 것이 보다 바람직하다. 또한, 미소포는, 세포막에서 유래한다고 생각되고 있다.

[0058] MSC는, 골 아세포, 지방 세포, 줄기세포, 연골 세포 등의 중배엽 유래의 조직(간엽계)에 속하는 세포에 대한 분화능을 갖는 줄기세포이다. MSC는, 지방, 골수, 제대 매트릭스 등으로부터 분리하는 것이 가능하고, 본 발명에서 사용하는 MSC(이하, "본 발명에 관한 MSC"라고 약기하는 경우가 있다)는, 예를 들면, 중배엽 유래의 조직으로부터 분리하는 방법이나 iPS 세포, ES 세포 등의 줄기세포로부터 유도하는 방법에 의하여 얻어진다. 본 발명에 관한 MSC로서는, 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 치수, 양막 및 태반으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직에서 유래하는 것, iPS 세포에서 유래하는 것이 바람직하게 사용된다. 본 발명에 관한 MSC는, 회수, 농축, 정제, 단리(單離), 완충액 등에 의한 희석, 여과 멸균 등의 전처리를 행한 것이어도 된다. 이들 전처리는, 통상의 방법에 따라 적절히 행하면 되고 또, 본 발명에 관한 MSC는, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 것이 바람직하다. 당해 염증성 사이토카인으로서는, 생체 내에 있어서의 염증 증상을 야기할 수 있는 사이토카인이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18, 인터페론 γ를 들 수 있으며, 종양 괴사 인자 α(TNFα), 인터류킨 1, 인터페론 γ가 바람직하고, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1이 보다 바람직하며, 종양 괴사 인자 α가 특히 바람직하다. 상기 염증성 사이토카인에 의한 자극은, 적어도 1개 이상의 상기한 바와 같은 사이토카인을 이용하면 되고, 2개 이상의 사이토카인을 이용해도 된다.

[0059] <본 발명에 관한 세포 외 소포>

[0060] 본 발명이 제공하는 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제, 피부 외용 조성물에 있어서의 유효 성분인 세포 외 소포(이하, "본 발명에 관한 세포 외 소포"라고 약기하는 경우가 있다.)는, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 본 발명에 관한 MSC에서 유래하는 세포 외 소포(이하, "자극 MSC 유래 세포 외 소포"라고 약기하는 경우가 있다), 또는/및 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하여 취득한 세포 외 소포(이하, "PS 양성 세포 외 소포"라고 약기하는 경우가 있다)이다.

[0061] 자극 MSC 유래 세포 외 소포는, 상기 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 EV를 포함하는 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양 상등액으로부터 단리함으로써 얻어진다.

[0062] 자극 MSC 유래 세포 외 소포의 취득 방법은, 시료로부터 EV를 단리하는 통상의 방법이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, 어피니티법(예를 들면, PS 어피니티법), 분획 원심 분리법(예를 들면, 펠릿 다운법, 수크로스 쿠션법, 밀도 구배 원심법 등의 초원심법), 면역 침강법, 크로마토그래피법(예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피법, 젤 침투 크로마토그래피법), 밀도 구배법(예를 들면, 자당 밀도 구배법), 전기 영동법(예를 들면, 오거넬라 전기 영동법), 자기(磁氣) 분리법(예를 들면, 자기 활성화 세포 선별(MACS)법), 한외(限外) 여과 농축법(예를 들면, 나노막 한외 여과 농축법), 퍼콜 구배 단리법, 마이크로 유체 디바이스를 이용한 방법, PEG 침전법 등을 들 수 있으며, 높은 정제도의 세포 외 막소포가 얻어지는 어피니티법, 또는 이론적으로 치우침이 없는 회수가 가능한 분획 원심 분리법이 바람직하고, 어피니티법 또는 초원심법이 보다 바람직하며, 어피니티법이 특히 바람직하다. 어피니티법 중에서도, PS 어피니티법이 바람직하다. 어피니티법 및 분획 원심 분리법은, 예를 들면, 일본 공개특허공보 2016-088689에 기재된 방법에 준하여 행하면 된다. 이들 단리 방법은, 1종만을 이용해도 되고, 2종 이상을 조합해도 된다. 또, 1종의 단리 방법에 의한 단리를 2회 이상 반복해도 된다.

[0063] 상기 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 EV를 포함하는 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양 상등액은, 예를 들면, 상기 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 본 발명에 관한 MSC를 세포 배양에 의하여 증식시키고, 증식시킨 세포를 다시 EV 산생 배지(培地)에 의하여 배양함으로써 얻어진다. 상기 염증성 사이토카인에 의한 본 발명에 관한 MSC에 대한 자극은, 상기 염증성 사이토카인 공존하, 본 발명에 관한 MSC를 배양함으로써 행하면 된다. 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양이나 EV 생산 배지에 의한 배양은, 이 분야에서 행해지는 통상의 방법에 따라 행하면 되고, 이용되는 배지나 배양 조건은 특별히 한정되지 않는다.

[0064] PS 양성 세포 외 소포는, 포스파티딜세린이 세포 외 소포의 막 표면에 노출되어 있는 것이라고 생각되는, PS 양성(PS를 함유한다)의 상기 세포 외 소포이다.

[0065] 상기 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질(이하, "PS 친화성 물질"이라고 약기하는 경우가 있다)로서는, 세포 외 소포의 막을 구성하는 포스파티딜세린에 대하여 특이적으로 결합되는 것이 가능한 물질이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, Annexin V; MFG-E8; Tim1 단백질(T세포 면역 글로불린·뮤신 도메인 함유 분자 1, T-cell immunoglobulin-mucin-domain 1), Tim2 단백질(T세포 면역 글로불린·뮤신 도메인 함유 분자 2, T-cell immunoglobulin-mucin-domain 2), Tim3 단백질(T세포 면역 글로불린·뮤신 도메인 함유 분자 3, T-cell immunoglobulin-mucin-domain 3), Tim4 단백질(T세포 면역 글로불린·뮤신 도메인 함유 분자 4, T-cell immunoglobulin-mucin-domain 4) 등의 Tim 단백질을 들 수 있으며, 효율적으로 세포 외 소포를 취득 가능한 점에서, Tim 단백질이 바람직하고, Tim4 단백질, Tim3 단백질, 및 Tim1 단백질로부터 선택되는 것이 보다 바람직하며, Tim4 단백질, Tim1 단백질이 더 바람직하고, Tim4 단백질이 특히 바람직하다.

[0066] PS 양성 세포 외 소포는, EV를 포함하는 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양 상등액(이하, "EV를 포함하는 세포 배양 상등액"이라고 약기하는 경우가 있다)으로부터, 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하여 단리하는 것, 또는 EV를 포함하는 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양 상등액으로부터 예를 들면 초원심법 등의 이 분야의 통상의 방법에 의하여 EV를 취득한 후, 얻어진 EV로부터 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하여 단리함으로써 얻어진다. 그중에서도, EV를 포함하는 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양 상등액으로부터 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하여 직접 단리하는 것이 바람직하다.

[0067] 또, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액은, 예를 들면, 본 발명에 관한 MSC를 세포 배양에 의하여 증식시키고, 증식시킨 세포를 다시 EV 산생 배지에 의하여 배양함으로써 얻어진다. 본 발명에 관한 MSC의 세포 배양이나 EV 생산 배지에 의한 배양은, 이 분야에서 행해지는 통상의 방법에 따라 행하면 되고, 이용되는 배지나 배양 조건은 특별히 한정되지 않는다.

[0068] 포스파티딜세린에 대한 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 세포 외 소포를 취득하는 방법(이하, "PS

어피니티법"이라고 약기하는 경우가 있다)의 개요를 이하에 기재한다. 또, PS 어피니티법으로서는, 예를 들면, 특허문헌 1에 구체예가 기재되어 있다.

[0069] PS 어피니티법은, 칼슘 이온 존재하, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액과 PS 친화성 물질을 접촉시켜, 당해 세포 배양 상등액 중의 세포 외 소포와 PS 친화성 물질의 복합체(이하, "본 발명에 관한 복합체"라고 약기하는 경우가 있다)를 형성시킨 후, 당해 복합체로부터 PS 친화성 물질을 분리하여, PS 양성 세포 외 소포를 취득함으로써 이루어진다.

[0070] PS 어피니티법의 바람직한 방법은, 구체적으로는 하기 공정을 포함한다.

[0071] (1) 칼슘 이온 존재하, EV를 포함하는 세포 배양 상등액과 PS 친화성 물질을 접촉시켜, 당해 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포와 PS 친화성 물질의 복합체(본 발명에 관한 복합체)를 형성시키는 것(이하, "복합체 형성 공정"이라고 약기하는 경우가 있다),

[0072] (2) 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액으로부터, 복합체 형성 공정에서 얻어진 본 발명에 관한 복합체를 분리하는 것(이하, "복합체 분리 공정"이라고 약기하는 경우가 있다),

[0073] (3) 본 발명에 관한 복합체로부터 PS 양성 세포 외 소포를 분리하고, PS 양성 세포 외 소포를 취득하는 것(이하, "취득 공정"이라고 약기하는 경우가 있다).

[0074] PS 어피니티법에 있어서의 EV를 포함하는 세포 배양 상등액, PS 친화성 물질은, 상기한 것과 동일하고, 바람직한 것이나 구체예도 동일하다.

[0075] 복합체 형성 공정에서 이용되는 PS 친화성 물질은, 불용성 담체(擔體)에 고정화(결합)된 것인 것이 바람직하다. 이 경우, 본 발명에 관한 복합체는, 복합체 분리 공정에 있어서, 공지의 B/F 분리법에 의하여, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액으로부터 분리할 수 있다.

[0076] PS 친화성 물질을 불용성 담체에 고정화하는 방법의 예를 이하에 설명하지만, 예를 들면 특허문헌 1에 기재된 방법에 의하여 얻을 수 있다.

[0077] PS 친화성 물질을 고정화하는 불용성 담체로서는, 예를 들면, 면역학적 측정법에서 이용되는 불용성의 담체를 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면, 폴리스타이렌, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리메타크릴산 메틸, 폴리아크릴아마이드, 폴리글리시딜메타크릴레이트, 폴리프로필렌, 폴리올레핀, 폴리이미드, 폴리유레테인, 폴리에스터, 폴리 염화 바이닐, 폴리에틸렌, 폴리클로로카보네이트, 실리콘 수지, 실리콘 러버, 아가로스, 텍스트란, 에틸렌-무수 말레산 공중합물 등의 유기물; 유리, 산화 규소, 규소, 다공성 유리, 불투명 유리, 알루미나, 실리카젤, 금속 산화물 등의 무기 물질; 철, 코발트, 니켈, 마그네타이트, 크로마이트 등의 자성체 등; 및 이들 자성체의 합금을 재료로 하여 조제된 것을 들 수 있다. 또, 이들 담체의 사용 형태로서는, 예를 들면, 입자(비즈), 마이크로플레이트, 튜브, 디스크상 편(片) 등을 들 수 있다. 상기 불용성 담체의 형태는, 입자(비즈)인 것이 바람직하고, 입자의 크기는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 10nm~100㎛인 것을 들 수 있으며, 100nm~10㎛인 것이 바람직하다.

[0078] PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체의 결합 방법으로서는, 단백질을 담체에 결합시키는 자체 공지의 방법을 들 수 있다. 예를 들면, 어피니티 결합에 의하여 결합시키는 방법, 화학 결합에 의하여 결합시키는 방법(예를 들면, 일본 특허공보 3269554호, WO2012/039395 공보에 기재된 방법), 물리적 흡착에 의하여 결합시키는 방법(예를 들면, 일본 공고특허공보 평5-41946호에 기재된 방법) 등을 들 수 있으며, 물리적 흡착에 의하여 결합시키는 방법 및 어피니티 결합에 의하여 결합시키는 방법이 바람직하고, 간편한 점에서 물리적 흡착에 의하여 결합시키는 방법이 보다 바람직하다.

[0079] PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체를 물리적 흡착에 의하여 결합시키는 방법으로서는, 자체 공지의 방법에 따라, PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체가 결합되는 조건하에서, PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체를 접촉시키면 된다.

[0080] 상기 불용성 담체에 결합시키는 PS 친화성 물질의 양은, 예를 들면 불용성 담체가 입자(비즈)인 경우, 불용성 담체 1mg에 대하여, 예를 들면 0.1㎍~50㎍이면 되며, 0.1㎍~30㎍이 바람직하고, 0.1㎍~20㎍이 보다 바람직하다.

[0081] PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체의 물리적 흡착은, 예를 들면, PS 친화성 물질을 함유하는 용액과 상기 불용성 담체를 접촉시킴으로써 행하면 된다.

[0082] PS 친화성 물질을 함유하는 용액에 있어서, PS 친화성 물질을 용해시키는 용액으로서는, PS 친화성 물질을 안정적인 상태에서 용해시키는 용액이면 되고, 예를 들면 정제수, 예를 들면 pH6.0~9.8, 바람직하게는 7.0~9.6에 완충 작용을 갖는 완충액(예를 들면 MOPS 등의 굿 완충액, 탄산 완충액, PBS, TBS, TBS-T, HBS 등)을 들 수 있다. 또, 이들 완충액 중의 완충제 농도로서는, 통상 5~100mM, 바람직하게는 10~100mM의 범위로부터 적절히 선택하면 된다. NaCl을 함유시키는 경우의 농도는, 예를 들면 100~200mM을 들 수 있으며, 140~160mM이 바람직하다. 또, PS 친화성 물질을 함유하는 용액 중에는, PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체의 결합을 방해하지 않는 양이면, 예를 들면 당류, NaCl 등의 염류, Tween 20 등의 계면활성제, 방부제, 단백질 등이 포함되어 있어도 된다.

[0083] PS 친화성 물질과 상기 불용성 담체를 물리적 흡착에 의하여 결합시키는 방법의 구체예로서는, 예를 들면 이하의 방법을 들 수 있다. 예를 들면, 비즈(입자) 담체 1mg과, 0.1μg~50μg, 바람직하게는 0.1μg~30μg, 보다 바람직하게는 0.1μg~20μg 함유하는 상기 PS 친화성 물질을 함유하는 용액을 접촉시키고, 2℃~37℃, 바람직하게는 4℃~11℃에서 0.5~48시간, 바람직하게는 0.5~24시간 반응시킨다.

[0084] 상기와 같이 하여 얻어진 PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체는, 통상 이 분야에서 행해지는 블로킹 처리에 제공해도 된다.

[0085] 복합체 형성 공정은, 칼슘 이온의 존재하에 행한다. 칼슘 이온은, PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포를 접촉시킬 때에 존재시킨다. PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포를 접촉시킬 때의 칼슘 이온 농도는, 통상 0.5mM~100mM, 바람직하게는 1.0mM~10mM, 보다 바람직하게는 2.0mM~5.0mM이다.

[0086] PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포의 본 발명에 관한 복합체가 형성되어, 복합체 분리 공정을 실시하기까지, 즉, 본 발명에 관한 복합체를 분리하는 공정에 제공하기까지의 본 발명에 관한 복합체를 함유하는 용액 중에는, 상기한 바와 같은 농도의 칼슘 이온이 필요하다.

[0087] 칼슘 이온의 유래는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 염화 칼슘, 수산화 칼슘, 탄산 수소 칼슘, 아이오딘화 칼슘, 브로민화 칼슘, 아세트산 칼슘 등을 들 수 있으며, 염화 칼슘, 탄산 수소 칼슘, 아이오딘화 칼슘이 바람직하고, 염화 칼슘, 탄산 수소 칼슘이 보다 바람직하다.

[0088] PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포를 접촉시킬 때에 칼슘 이온을 존재시키는 방법으로서는, PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포를 접촉시킬 때의 칼슘 이온 농도가 상기한 범위가 되도록, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액, 또는/및 PS 친화성 물질을 함유하는 용액에, 상기한 바와 같은 칼슘 이온을 함유시키면 된다. 또, PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포를 접촉시킬 때의 칼슘 이온 농도가 상기한 범위가 되는 양의 칼슘 이온을 함유시킨 용액(이하, "본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액"이라고 약기하는 경우가 있다.)과, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액과, PS 친화성 물질을 함유하는 용액을 혼합시켜도 된다.

[0089] 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액에 있어서, 칼슘 이온을 용해시키는 용액으로서는, PS 양성 세포 외 소포와 PS 친화성 물질의 결합을 방해하지 않는 것이면 되고, 예를 들면 물, pH7.0~pH8.0에 완충 작용을 갖는 완충액을 들 수 있으며, pH7.2~pH7.6에 완충 작용을 갖는 완충액(예를 들면 TBS, HBS 등) 등이 바람직하다. 또한, 인산 버퍼는 칼슘과 결합되어 침전이 발생하므로 바람직하지 않다. 또, 이들 완충액 중의 완충제 농도로서는, 통상 5mM~50mM, 바람직하게는 10mM~30mM의 범위로부터 적절히 선택된다. NaCl을 함유시키는 경우의 농도는 통상 100mM~200mM, 바람직하게는 140mM~160mM의 범위로부터 적절히 선택된다.

[0090] 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액 중에는, PS 양성 세포 외 소포와 PS 친화성 물질의 결합을 방해하지 않는 양이면, 예를 들면 당류, NaCl 등의 염류, 계면활성제, 방부제, BSA 등의 단백질 등이 포함되어 있어도 된다. 계면활성제로서는, 예를 들면 Tween 20 등을 들 수 있으며, 당해 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액에 있어서의 계면활성제의 농도는, 통상 0.00001%~0.2%, 바람직하게는 통상 0.0005%~0.1%이다.

[0091] 복합체 형성 공정에 있어서, PS 친화성 물질(상기 불용성 담체에 고정화되어 있어도 된다) 1μg과 접촉시키는 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액의 양은, 통상 0.1ml~100ml이며, 0.1ml~10ml가 바람직하고, 0.1ml~1.0ml가 보다 바람직하다. 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액과 PS 친화성 물질을 접촉시킬 때의 온도는, 통상 2~37℃이며, 4~37℃가 바람직하고, 4~30℃가 보다 바람직하다. 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액과 PS 친화성 물질의 접촉 시간은, 통상 0.5~24시간이며, 0.5~8시간이 바람직하고, 0.5~4시간이 보다 바람직하다.

[0092] 복합체 형성 공정에 있어서, PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체를 이용하는 경우의 당해 담체의 양으로서

는, 본 발명에 관한 복합체를 형성시킬 때의 용액 1mL당 통상 0.1mg~20mg이며, 0.3mg~10mg이 바람직하고, 0.5mg~6.0mg이 보다 바람직하다.

[0093] 복합체 형성 공정은, 예를 들면 이하의 방법으로 행하면 된다. 즉, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액과, PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체와, 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액을 혼합 후의 용액 1mL당 통상 0.1mg~20mg, 바람직하게는 0.3mg~10mg, 보다 바람직하게는 0.5mg~6.0mg이 되는 양의 PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체와, 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액과 당해 담체와 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액을 혼합 후의 용액 중의 칼슘 이온 농도가 통상 0.5mM~100mM, 바람직하게는 1.0mM~10mM, 보다 바람직하게는 2.0mM~5.0mM이 되는 양의 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 용액과, PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체 1mg당 통상 0.1ml~100ml, 바람직하게는 0.1ml~10ml, 보다 바람직하게는 0.1ml~1.0ml의 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액을, 통상 4.0~37℃, 바람직하게는 4.0~25℃, 보다 바람직하게는 4.0℃~11℃, 통상 0.5~24시간, 바람직하게는 0.5~8.0시간, 보다 바람직하게는 0.5~4.0시간 접촉시켜, 담체에 결합된 PS 친화성 물질과 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액 중의 PS 양성 세포 외 소포의 복합체(본 발명에 관한 복합체)를 형성시킨다.

[0094] 복합체 분리 공정은, 본 발명에 관한 복합체와 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액을 분리하여 본 발명에 관한 복합체를 취득할 수 있으면 어떠한 방법이어도 되지만, 예를 들면 이하와 같은 방법을 들 수 있다.

[0095] (1) PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체의 당해 담체가 자기 담체인 경우: 복합체 형성 공정에 의하여 얻어진 본 발명에 관한 복합체를 포함하는 용기를, 필요하면 마그넷 스탠드에 설치하고, 자력을 이용하여 관벽에 본 발명에 관한 복합체를 집합시켜, 상등액을 제거함으로써 이들을 분리하는 방법. (2) PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체인 당해 담체가 비즈상인 경우: 복합체 형성 공정에 의하여 얻어진 본 발명에 관한 복합체를 포함하는 용기를 원심 분리 처리하고, 본 발명에 관한 복합체를 침전으로서 집합시킨 후, 상등액을 제거함으로써 이들을 분리하는 방법. (3) 여과에 의하여 본 발명에 관한 복합체와 상기 EV를 포함하는 세포 배양 상등액을 분리하는 방법.

[0096] 복합체 분리 공정의 구체예로서는, 예를 들면 이하의 방법을 들 수 있다.

[0097] 자기 담체를 불용성 담체로서 이용하는 경우, 복합체 형성 공정을 행한 용기를 필요하면 마그넷 스탠드에 설치하고, 자력을 이용하여 관벽에 얻어진 본 발명에 관한 복합체를 집합시켜, 상등액의 시료를 제거한다.

[0098] 복합체 분리 공정 후, 필요하면 얻어진 본 발명에 관한 복합체를 칼슘 이온 함유 세정 용액을 이용하여 세정해도 된다(이하, "세정 조작"이라고 약기하는 경우가 있다). 세정 조작에 의하여, PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체 표면에 부착된 세포 유래 성분 등의 생체 시료 중의 협잡물(夾雜物)을 제거할 수 있다. 세정 방법으로서는, 칼슘 이온 함유 세정 용액을 사용하는 것 이외에는, 통상 이 분야에서 행해지고 있는 세정 방법을 사용할 수 있다.

[0099] 당해 세정 조작에 있어서 이용되는 칼슘 이온 함유 세정 용액으로서는, 칼슘 이온을 통상 0.5~100mM, 바람직하게는 1~10mM, 보다 바람직하게는 2mM~5mM 함유하고 PS 양성 세포 외 소포와 불용성 담체에 고정화된 PS 친화성 물질의 결합에 영향을 주지 않는 용액이면 어느 것이어도 되며, 예를 들면, 칼슘 이온을 통상 0.5mM~100mM, 바람직하게는 통상 1mM~10mM, 보다 바람직하게는 통상 2mM~5mM 함유하거나, pH7.0~pH8.0, 바람직하게는 pH7.2~pH7.6에 완충 작용을 갖는 칼슘을 침전시키지 않는 완충액(예를 들면 TBS, TBS-T, HBS)을 들 수 있다. 또한, 인산 버퍼는 칼슘과 결합되어 침전이 발생하므로 바람직하지 않다. 또, 이들 완충액 중의 완충제 농도로서는, 통상 5mM~50mM, 바람직하게는 10mM~30mM의 범위로부터 적절히 선택되고, NaCl을 함유하는 경우의 농도는 통상 100mM~200mM, 바람직하게는 140mM~160mM의 범위로부터 적절히 선택된다. 이 용액 중에는, PS 양성 세포 외 소포와 불용성 담체에 고정화된 PS 친화성 물질의 결합을 방해하지 않는 양이면, 예를 들면 당류, NaCl 등의 염류, 계면활성제, 방부제, 단백질 등이 포함되어 있어도 된다. 계면활성제로서는, 예를 들면 tween 20(후지필름와코 준야쿠(주)) 등을 들 수 있으며, 당해 세정 용액에 있어서의 계면활성제의 농도는, 통상 0.00001%~0.2%, 바람직하게는 통상 0.0005%~0.1%이다.

[0100] PS 친화성 물질을 고정화하는 불용성 담체로서 자성 입자를 이용한 세정 조작을 예로 들어, 세정 조작의 구체예를 설명한다. 즉, 복합체 분리 공정에 의하여 얻어진 본 발명에 관한 복합체를 포함하는 용기 내에 본 발명에 관한 칼슘 이온 함유 세정 용액을 더하여, 교반한다. 그 후, 상기 용기를, 마그넷 스탠드에 설치하고, 자력을 이용하여 관벽에 본 발명에 관한 복합체를 집합시켜, 상기 용기 내의 용액을 버린다. 이들 세정 조작은, 필요에 따라 수회 반복하여 행해도 된다.

[0101] 취득 공정은, 본 발명에 관한 복합체로부터 PS 양성 세포 외 소포를 취득할 수 있는 방법이면 어느 것이어도 되

고, 칼슘 이온 농도를 저하시키는 방법이 바람직하다. 칼슘 이온의 농도를 저하시키는 방법으로서는, 예를 들면 칼슘 이온 킬레이트제를 사용하는 방법을 들 수 있다. 즉, 복합체 분리 공정 후, 필요하면 세정 조작 후, 반응계 중의 칼슘 이온(본 발명에 관한 복합체와 결합되어 있는 칼슘 이온 및 본 발명에 관한 복합체를 함유하는 용액으로부터 반입된 칼슘 이온)에 칼슘 이온 킬레이트제를 작용시켜 칼슘 이온을 킬레이트시키고, 반응계 중의 칼슘 이온의 유효 농도를 저하시킴으로써, 본 발명에 관한 복합체로부터 PS 양성 세포 외 소포를 분리시키면 된다.

[0102] 이 방법에 이용되는 칼슘 이온 킬레이트제로서는, 칼슘 이온을 킬레이트할 수 있는 화합물이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, EDTA(에틸렌다이아민 사아세트산), NTA(나이트릴로 삼아세트산), DTPA(다이에틸렌트라이아민 오아세트산), GLDA(L-글루탐산 이아세트산), HEDTA(하이드록시에틸에틸렌다이아민 삼아세트산), GEDTA(에틸렌글라이콜비스(β-아미노에틸에터)-N,N,N,N,-사아세트산), TTHA(트라이에틸렌테트라민-N,N,N',N'',N''',N'''-육아세트산), HIDA(2-하이드록시에틸이미노 이아세트산), DHEG(N,N-비스(2-하이드록시에틸)글라이신), CyDTA(trans-1z, 2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate) 등을 들 수 있으며, EDTA, GEDTA, CyDTA가 바람직하다.

[0103] 상기 칼슘 이온 킬레이트제는, 통상 용액으로서 이용한다. 상기 칼슘 이온 킬레이트제를 용해시키는 용액으로서는, 상기 칼슘 이온 킬레이트제를 용해시키는 것이면 되고, 예를 들면, 정제수, 완충액 등을 들 수 있다. 완충액으로서는, 통상 pH7.0~pH8.0, 바람직하게는 pH7.2~pH7.6에 완충 작용을 갖는 완충액(예를 들면 PBS, TBS, HBS 등)이 바람직하다. 또, 이들 완충액 중의 완충제 농도로서는, 통상 5mM~50mM, 바람직하게는 10mM~30mM의 범위로부터 적절히 선택되고, NaCl을 함유시키는 경우의 농도는 통상 100mM~200mM, 바람직하게는 140mM~160mM의 범위로부터 적절히 선택된다. 칼슘 이온 킬레이트제를 함유하는 용액(이하, "칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액"이라고 약기하는 경우가 있다)은, 예를 들면 당류, NaCl 등의 염류, 방부제, 단백질 등이 포함되어 있어도 된다.

[0104] 상기 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액 중의 상기 칼슘 이온 킬레이트제의 농도로서는, 통상 0.5mM~500mM이며, 0.5mM~100mM이 바람직하고, 0.5mM~50mM이 보다 바람직하다. 또, 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액의 pH는, 통상 pH6.0~pH9.0이며, pH7.0~pH8.0이 바람직하고, pH7.2~pH7.6이 보다 바람직하다.

[0105] 칼슘 이온 킬레이트제를 본 발명에 관한 복합체와 결합되어 있는 칼슘 이온에 작용시키기 위해서는, 상기 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액을(예를 들면 펠릿상의) 본 발명에 관한 복합체와 접촉시켜, 본 발명에 관한 복합체와 결합되어 있는 칼슘 이온과 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액 중의 칼슘 이온 킬레이트제를 반응시킴으로써 행해진다.

[0106] 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액과 본 발명에 관한 복합체의 접촉은, 예를 들면 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액에 본 발명에 관한 복합체를 현탁시키는 방법(PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체의 불용성 담체가 비즈인 경우 등), 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액에 본 발명에 관한 복합체를 침지시키는 방법(PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체의 불용성 담체가 디스크상 편, 튜브인 경우 등) 등에 의하여 행할 수 있다.

[0107] 본 발명에 관한 복합체와 접촉시키는 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액의 양으로서는, 본 발명에 관한 복합체와 접촉 후의 용액 중의 칼슘 이온의 농도가 유효 농도 미만이 되어, 본 발명에 관한 복합체로부터 세포 외 소포가 분리되는 양이면 된다.

[0108] 본 발명에 관한 복합체에 칼슘 이온 킬레이트제를 작용(접촉)시키는 온도나 시간으로서는, 통상 4.0℃~37℃이며, 10℃~30℃가 바람직하고, 20℃~30℃가 보다 바람직하며, 통상 1~10분간이고, 5~15분간이 바람직하다.

[0109] 취득 공정을, 불용성 담체에 Tim 단백질을 결합시킨 담체(Tim 담체)를 이용하는 방법을 예로 들어 설명하면, 이하와 같다. 즉, 복합체 분리 공정 후, 필요하면 추가로 세정 조작 후, 얻어진 본 발명에 관한 복합체에, 통상 0.5mM~500mM, 바람직하게는 0.5mM~100mM, 보다 바람직하게는 0.5mM~50mM의 칼슘 이온 킬레이트제를 함유하는 용액을 Tim 담체 1mg당 통상 10μL~500μL, 바람직하게는 20μL~200μL, 보다 바람직하게는 50μL~100μL 첨가하고, 통상 4.0℃~37℃, 바람직하게는 10℃~30℃, 보다 바람직하게는 20℃~30℃에서 통상 1~30분간, 바람직하게는 5~15분간 반응시켜, 본 발명에 관한 복합체로부터 PS 양성 세포 외 소포를 분리시킨다.

[0110] 취득 공정을 실시함으로써, 본 발명에 관한 복합체와 접촉시킨 칼슘 이온 킬레이트제 함유 용액은, PS 친화성 물질을 고정화한 불용성 담체와, 본 발명에 관한 복합체로부터 분리(유리)된 세포 외 소포가 함유하고 있게 된다. 따라서, 당해 용액으로부터 PS 친화성 물질을 고정화한 담체를 제거하고, 용액만을 회수하면, PS 양성 세포

외 소포를 함유하는 용액을 얻을 수 있다.

[0111] 본 발명에 관한 세포 외 소포는, 자극 MSC 유래 세포 외 소포가 바람직하고, 상기 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 포스파티딜세린에 대하여 친화성을 갖는 물질을 이용하는 방법에 의하여 얻어지는 것이 보다 바람직하고, 종양 괴사 인자 α(TNFα), 인터류킨 1, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 12, 인터류킨 18 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 Tim 단백질을 이용한 PS 어피니티법에 의하여 얻어지는 것이 더 바람직하고, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 1 및 인터페론 γ로부터 선택되는 적어도 1종의 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 Tim4 단백질, Tim3 단백질 또는 Tim1 단백질을 이용한 PS 어피니티법에 의하여 얻어지는 것이 보다 더 바람직하고, 종양 괴사 인자 α 또는 인터류킨 1에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 Tim4 단백질을 이용한 PS 어피니티법에 의하여 얻어지는 것이 특히 바람직하고, 종양 괴사 인자 α에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포에서 유래하는 것이며, 또한 Tim4 단백질을 이용한 PS 어피니티법에 의하여 얻어지는 것이 가장 바람직하다.

[0112] <본 발명의 세포 노화 억제제>

[0113] 본 발명의 세포 노화 억제제는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분으로서 포함한다. 본 발명의 세포 노화 억제제에 의하면, 세포 노화 관련 유전자의 유전자 발현이 조절되는 것에 의한 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 및 엘라스틴 산생 촉진 작용 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 세포 노화 억제 작용에 근거하여, 세포 노화를 억제할 수 있다.

[0114] 상기 세포 노화 관련 유전자로서는, 세포 노화에 관련되는 유전자이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자 등의 세포 증식 억제 유전자; I형 콜라겐 유전자(COL1A1 유전자, COL1A2 유전자), III형 콜라겐 유전자(COL3A1 유전자), V형 콜라겐 유전자(COL5A1 유전자, COL5A2 유전자), XVII형 콜라겐 유전자(COL17A1 유전자) 등의 콜라겐 유전자; MMP-1 유전자, MMP-2 유전자, MMP-3 유전자, MMP-8 유전자, MMP-9 유전자, MMP-13 유전자 등의 콜라겐 분해 효소 유전자; 히알루론산 합성 효소 1 유전자(HAS1 유전자), 히알루론산 합성 효소 2 유전자(HAS2 유전자) 등의 히알루론산 합성 효소 유전자; HYAL1 유전자, HYAL2 유전자, HYAL3 유전자 등의 히알루론산 분해 효소 유전자; ELN 유전자 등의 엘라스틴 유전자; MMP-2 유전자, MMP-9 유전자 등의 엘라스틴 분해 효소 유전자를 들 수 있으며, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소가 바람직하고, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자, MMP-1 유전자, COL1A1 유전자, COL3A1 유전자, HAS1 유전자가 보다 바람직하다. 상기 세포 증식 억제 유전자란, 세포 증식의 억제에 관한 유전자이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면 세포 증식 억제 인자를 코딩하는 유전자를 들 수 있다. 세포 증식 억제 인자를 코딩하는 유전자의 발현을 조절함으로써, 세포 분열에 관여하는 사이클린 키나아제가 저해되어, 세포 증식이 억제된다고 생각된다.

[0115] 본 발명에 있어서의 세포 노화 관련 유전자의 유전자 발현의 조절이란, 상기 세포 노화 관련 유전자의 발현 촉진 및/또는 발현 억제를 의미하고, 구체적으로는, 예를 들면 콜라겐 유전자의 발현 촉진, 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현 촉진, 엘라스틴 유전자의 발현 촉진, 세포 증식 억제 유전자의 발현 억제, 콜라겐 분해 효소 유전자의 발현 억제, 히알루론산 분해 효소 유전자의 발현 억제, 엘라스틴 분해 효소 유전자의 발현 억제를 들 수 있으며, 콜라겐 유전자의 발현 촉진, 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현 촉진, 세포 증식 억제 유전자의 발현 억제, 콜라겐 분해 효소 유전자의 발현 억제가 바람직하고, COL1A1 유전자의 발현 촉진, COL3A1 유전자의 발현 촉진, HAS1 유전자의 발현 촉진, p53 유전자의 발현 억제, p21 유전자의 발현 억제, p16 유전자의 발현 억제, MMP-1 유전자의 발현 억제가 보다 바람직하다.

[0116] 본 발명의 세포 노화 억제제가 억제하는 세포 노화의 대상이 되는 세포는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 섬유 아세포를 들 수 있으며, 진피 섬유 아세포가 보다 바람직하다.

[0117] 본 발명의 세포 노화제 중에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 세포 노화 억제 활성(세포 노화 억제 효과)이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않는다. 또, 본 발명의 세포 노화제의 형태 및 본 발명에 관한 세포 외 소포 이외의 성분 배합의 유무 등에 대해서는, 전혀 제한되지 않는다. 또, 본 발명에 있어서의 세포 노화 억제 활성은, 상기 세포 노화 관련 유전자의 발현량을 지표로 하여 평가할 수 있다.

[0118] 본 발명의 세포 노화 억제제는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분으로서 포함하는 것이며, 예를 들면

의약 조성물로서 제공된다. 본 발명의 세포 노화 억제제의 투여 제형은, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 함유하는 용액을 그대로, 혹은 필요에 따라 약학적으로 허용되는 담체, 첨가제와 함께 액제, 현탁화제, 리포화제 등으로서 제제화되거나, 나아가서는, 동결 건조에 의하여 분말물로서, 약학적으로 허용되는 첨가제와 함께 정제 등의 고형제로서 제제화된 것을 들 수 있다.

[0119] 제제화에 있어서 사용되는 약학적으로 허용되는 담체나 첨가물로서는, 예를 들면, 등장화제, 증점제, 당류, 당 알코올류, 방부제(보존제), 살균제 또는 항균제, pH 조절제, 안정화제, 킬레이트제, 유성 기제(基劑), 젤 기제, 계면활성제, 현탁화제, 결합제, 부형제, 활택제, 붕괴제, 발포제, 유동화제, 분산제, 유화제, 완충제, 용해 보조제, 항산화제, 감미제, 산미제, 착색제, 정미(呈味)제, 향료 또는 청량화제 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0120] 또한, 대표적인 담체, 첨가물 등을 예시하면, 예를 들면, 이하의 것을 들 수 있다. 담체로서는, 예를 들면, 물, 함수 에탄올 등의 수성 담체를 들 수 있다. 등장화제로서는, 예를 들면, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 염화 마그네슘 등의 무기 염을 들 수 있다. 다가 알코올로서는, 예를 들면, 글리세린, 프로필렌글라이콜, 폴리에틸렌글라이콜 등을 들 수 있다. 증점제로서는, 예를 들면, 카복시바이닐 폴리머, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 알진산, 폴리바이닐알코올(완전, 또는 부분 비누화물), 폴리바이닐피롤리돈, 매크로골 등을 들 수 있다.

[0121] 당류로서는, 예를 들면, 사이클로덱스트린, 포도당, 과당, 유당 등을 들 수 있다. 당 알코올류로서는, 예를 들면, 자일리톨, 소비톨, 만니톨 등의 당 알코올을 들 수 있다. 방부제, 살균제 또는 항균제로서는, 예를 들면, 다이뷰틸하이드록시톨루엔, 염화 벤잘코늄, 염화 벤제트늄, 글루콘산 클로르헥시딘, 데하이드로아세트산 나트륨, 파라옥시벤조산 메틸, 파라옥시벤조산 에틸, 파라옥시벤조산 프로필, 파라옥시벤조산 뷰틸 당을 들 수 있다. pH 조절제로서는, 예를 들면, 염산, 붕산, 아미노에틸설폰산, 시트르산, 아세트산, 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 칼슘, 수산화 마그네슘, 탄산 수소 나트륨, 탄산 나트륨, 붕사, 트라이에탄올아민, 모노에탄올아민, 다이아이소프로판올아민, 황산, 황산 마그네슘, 인산, 폴리 인산, 프로피온산, 옥살산, 글루콘산, 푸마르산, 락트산, 타타르산, 말산, 석신산 등을 들 수 있다.

[0122] 안정화제로서는, 예를 들면, 다이뷰틸하이드록시톨루엔, 트로메타몰, 나트륨폼알데하이드설폭실레이트(론갈리트), 토코페롤, 파이로 아황산 나트륨, 모노에탄올아민, 모노스테아르산 알루미늄, 모노스테아르산 글리세린, 아황산 수소 나트륨, 아황산 나트륨 등을 들 수 있다. 또, 기제로서는, 예를 들면, 올리브유, 옥수수유, 대두유, 참기름, 면실유 등의 식물유; 중쇄 지방산 트라이글리세라이드 등의 유성 기제; 매크로골 400 등의 수성 기제; 카복시바이닐 폴리머, 검(gum) 등의 젤 기제를 들 수 있다. 계면활성제로서는, 예를 들면, 폴리소베이트 80, 경화 피마자유, 글리세린 지방산 에스터, 세스퀴올레산 소비탄 등을 들 수 있으며, 현탁화제로서는, 예를 들면, 표백 밀랍이나 각종 계면활성제, 아라비아 고무, 아라비아 고무 분말, 잔탄검, 대두 레시틴 등을 들 수 있다.

[0123] 또한, 결합제로서는, 예를 들면, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스나트륨, 폴리바이닐피롤리돈, 폴리바이닐알코올 등을, 또, 부형제로서는, 예를 들면, 자당, 유당, 전분, 옥수수 전분, 결정 셀룰로스, 경질 무수 규산 등을 들 수 있고, 활택제로서는, 예를 들면, 자당 지방산 에스터, 스테아르산 마그네슘, 탤크 등을 들 수 있으며, 붕괴제로서는, 예를 들면, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로스, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨 등을 들 수 있고, 유동화제로서는, 예를 들면, 메타규산 알루미늄산 나트륨, 경질 무수 규산 등을 들 수 있다.

[0124] 본 발명의 세포 노화 억제제에 있어서는, 바람직하게는 액제, 현탁제 또는 리포화제로서 제제화되는 것이 바람직하고, 기본적으로는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 포함하는 용액을 필요에 따라 상기한 담체, 첨가제와 함께, 예를 들면, 생리 식염수, 5% 포도당 용액, 리포 유제(乳劑) 등으로 혼합하여 얻어진다. 또한, 동결 건조 분말을 이용하여, 용시(用時) 용해, 또는 현탁형의 제제로 할 수도 있다.

[0125] 본 발명의 세포 노화 억제제가 액제, 현탁제 또는 리포화제인 경우, 그 pH는, 의약상, 약리학적으로, 또는 생리학적으로 허용되는 범위 내이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, pH2.5~9.0, 바람직하게는 3.0~8.5, 더 바람직하게는 3.5~8.0이 되는 범위를 들 수 있으며, 적절히 pH 조정제로 조정할 수 있다.

[0126] 본 발명의 세포 노화 억제제의 투여 경로는, 제형에 따라, 경구 투여, 피하 투여, 근육 내 투여, 정맥 내 투여, 동맥 내 투여, 수강(髓腔) 내 투여, 복강 내 투여를 들 수 있다. 그 투여량은, 대상이 되는 환자 상태(체중, 연령, 증상, 컨디션 등), 및 투여 제형 등에 따라 상이하지만, 통상, 성인에게 투여하는 경우에는, 입자수로서, 1

$\times 10^{5}$~1×10^{17}개/회이며, 5×10^{5}~5×10^{16}개/회가 바람직하고, 1×10^{6}~1×10^{16}개/회가 더 바람직하며, 5×10^{6}~5×10^{15}개/회가 특히 바람직하다. 또한, 본 용량을 1회 투여량으로 하여, 하루 복수회 투여해도 되고, 본 용량을 복수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0127] 또, 본 발명의 세포 노화 억제제는, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등의 피부 외용제로서 제제화되어도 된다. 피부 외용제에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 세포 노화 억제 활성이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, $1x10^{6}$개/mL~$1x10^{15}$개/mL가 바람직하고, $1x10^{7}$개/mL~$1x10^{14}$개/mL가 보다 바람직하며, $1x10^{8}$개/mL~$1x10^{13}$개/mL가 특히 바람직하다.

[0128] 피부 외용제의 제형은 임의이며, 예를 들면, 로션 등의 가용화계나 칼라민 로션 등의 분산계, 크림이나 유액 등의 유화계로서 제공할 수 있다. 또한, 분사제와 함께 충전하는 에어졸 형태, 펌프 스프레이제, 연고제, PAP제, 테이프제, 주사제 등의 다양한 제형으로 제공할 수도 있다. 또, 피부 외용제에는, 본 발명에 관한 세포 외 소포 외에, 그 용도와 필요에 따라, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등에 통상 배합되는 임의의 성분(기재(基材))이 배합되어 있어도 되고, 예를 들면 물, 유성 성분, 보습제, 분체, 색소, 유화제, 가용화제, 젤화제, 세정제, 자외선 흡수제, 항염증제, 항알레르기제, 증점제, pH 조정제, 킬레이트제, 약제(약효 성분), 향료, 수지, 방균 곰팡이 방지제, 방부제(보존제), 항산화제, 수신(瘦身)제, 알코올류, 계면활성제, 자외선 흡수제, 보습제, 에멀리언트제, 비타민류, 착색료, 천연 추출물 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위에 있어서, 다른 세포 노화 억제 작용을 갖는 화합물 등을 적절히 배합할 수 있다. 또, 이들 임의의 성분의 함유량도 특별히 한정되지 않으며, 원하는 제형이나 용도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0129] <본 발명의 생체 조직 수복 촉진제>

[0130] 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분으로서 포함한다. 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제에 의하면, 생체 조직 수복 관련 유전자의 발현이 조절되어, 세포가 증식되고 교원(膠原) 섬유나 탄성 섬유 등의 생체 조직을 구성하는 섬유의 수복이 촉진되는 것 등에 의하여, 항상적 기능이 저하 또는 소실된 생체 조직의 수복이 촉진된다. 구체적으로는, 세포 증식 억제 유전자의 유전자 발현이 조절되는 것에 의한 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용에 의한 교원 섬유(콜라겐 섬유)의 수복 촉진 작용, 엘라스틴 산생 촉진 작용 혹은 분해 억제 작용에 의한 탄성 섬유(엘라스틴 섬유)의 수복 작용, 및 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용으로부터 선택되는 적어도 1종의 생체 조직 수복 촉진 작용에 근거하여, 생체 조직의 수복을 촉진시킬 수 있다.

[0131] 상기 생체 조직 수복 관련 유전자로서는, 생체 조직 수복 관련 유전자이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자 등의 세포 증식 억제 유전자; I형 콜라겐 유전자(COL1A1 유전자, COL1A2 유전자), III형 콜라겐 유전자(COL3A1 유전자), V형 콜라겐 유전자(COL5A1 유전자, COL5A2 유전자), XVII형 콜라겐 유전자(COL17A1 유전자) 등의 콜라겐 유전자; MMP-1 유전자, MMP-2 유전자, MMP-3 유전자, MMP-8 유전자, MMP-9 유전자, MMP-13 유전자 등의 콜라겐 분해 효소 유전자; 히알루론산 합성 효소 1 유전자(HAS1 유전자), 히알루론산 합성 효소 2 유전자(HAS2 유전자) 등의 히알루론산 합성 효소 유전자; HYAL1 유전자, HYAL2 유전자, HYAL3 유전자 등의 히알루론산 분해 효소 유전자; ELN 유전자 등의 엘라스틴 유전자; MMP-2 유전자, MMP-9 유전자 등의 엘라스틴 분해 효소 유전자를 들 수 있으며, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소가 바람직하고, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자, MMP-1 유전자, COL1A1 유전자, COL3A1 유전자, HAS1 유전자가 보다 바람직하다. 상기 세포 증식 억제 유전자란, 세포 증식의 억제에 관한 유전자이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면 세포 증식 억제 인자를 코딩하는 유전자를 들 수 있다. 세포 증식 억제 인자를 코딩하는 유전자의 발현을 조절함으로써, 세포 분열에 관여하는 사이클린 키나아제가 저해되어, 세포 증식이 억제된다고 생각된다.

[0132] 본 발명에 있어서의 생체 조직 수복 관련 유전자의 발현의 조절이란, 상기 생체 조직 수복 관련 유전자의 발현 촉진 및/또는 발현 억제를 의미하고, 구체적으로는, 예를 들면 콜라겐 유전자의 발현 촉진, 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현 촉진, 엘라스틴 유전자의 발현 촉진, 세포 증식 억제 유전자의 발현 억제, 콜라겐 분해 효소 유전자의 발현 억제, 히알루론산 분해 효소 유전자의 발현 억제, 엘라스틴 분해 효소 유전자의 발현 억제를 들 수 있으며, 콜라겐 유전자의 발현 촉진, 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현 촉진, 세포 증식 억제 유전자의 발현 억제, 콜라겐 분해 효소 유전자의 발현 억제가 바람직하고, COL1A1 유전자의 발현 촉진, COL3A1 유전자의 발현 촉진, HAS1 유전자의 발현 촉진, p53 유전자의 발현 억제, p21 유전자의 발현 억제, p16 유전자의 발현 억제, MMP-1 유전자의 발현 억제가 보다 바람직하다.

[0133] 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제가 수복을 촉진시키는 조직으로서는, 교원 섬유나 탄성 섬유를 갖는 조직이나 히알루론산을 갖는 조직을 들 수 있으며, 구체적으로는, 예를 들면, 진피, 인대, 결합 조직, 동맥, 폐 등이며, 진피, 인대가 바람직하다.

[0134] 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제 중에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 생체 조직 수복 촉진 활성(생체 조직 수복 촉진 효과)이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않는다. 또, 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제의 형태 및 본 발명에 관한 세포 외 소포 이외의 성분 배합의 유무 등에 대해서는, 전혀 제한되지 않는다. 또, 본 발명에 있어서의 생체 조직 수복 촉진 활성은, 상기 생체 조직 수복 관련 유전자의 발현량을 지표로 하여 평가할 수 있다.

[0135] 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분으로서 포함하는 것이며, 예를 들면 의약 조성물로서 제공된다. 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제의 투여 제형은, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 함유하는 용액을 그대로, 혹은 필요에 따라 약학적으로 허용되는 담체, 첨가제와 함께 액제, 현탁화제, 리포화제 등으로서 제제화되거나, 또, 동결 건조에 의하여 분말물로서, 약학적으로 허용되는 첨가제와 함께 정제 등의 고형제로서 제제화된 것이다.

[0136] 제제화에 있어서 사용되는 약학적으로 허용되는 담체나 첨가물로서는, 상술한 본 발명의 세포 노화 억제제와 동일한 것을 들 수 있으며, 바람직한 것도 동일하다. 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제에 있어서는, 바람직하게는 액제, 현탁제 또는 리포화제로서 제제화되는 것이 바람직하고, 기본적으로는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 포함하는 용액을 필요에 따라 상기한 담체, 첨가제와 함께, 예를 들면, 생리 식염수, 5% 포도당 용액, 리포 유제 등으로 혼합하여 얻어진다. 또한, 동결 건조 분말을 이용하여, 용시(用時) 용해, 또는 현탁형의 제제로 할 수도 있다.

[0137] 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제가 액제, 현탁제 또는 리포화제인 경우, 그 pH는, 의약상, 약리학적으로, 또는 생리학적으로 허용되는 범위 내이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, pH2.5~9.0, 바람직하게는 3.0~8.5, 더 바람직하게는 3.5~8.0이 되는 범위를 들 수 있으며, 적절히 pH 조정제로 조정할 수 있다.

[0138] 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제의 투여 경로는, 제형에 따라, 경구 투여, 피하 투여, 근육 내 투여, 정맥 내 투여, 동맥 내 투여, 수강 내 투여, 복강 내 투여를 들 수 있다. 그 투여량은, 대상이 되는 환자 상태(체중, 연령, 증상, 컨디션 등), 및 투여 제형 등에 따라 상이하지만, 통상, 성인에게 투여하는 경우에는, 입자수로서, 1×10^{5}~1×10^{17}개/회이며, 5×10^{5}~5×10^{16}개/회가 바람직하고, 1×10^{6}~1×10^{16}개/회가 더 바람직하며, 5×10^{6}~5×10^{15}개/회가 특히 바람직하다. 또한, 본 용량을 1회 투여량으로 하여, 하루 복수회 투여해도 되고, 본 용량을 복수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0139] 또, 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제는, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등의 피부 외용제로서 제제화되어도 된다. 피부 외용제에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 생체 조직 수복 촉진 활성이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, $1x10^{6}$개/mL~$1x10^{15}$개/mL가 바람직하고, $1x10^{7}$개/mL~$1x10^{14}$개/mL가 보다 바람직하며, $1x10^{8}$개/mL~$1x10^{13}$개/mL가 특히 바람직하다.

[0140] 피부 외용제의 제형은 임의이며, 상술한 본 발명의 세포 노화 억제제를 피부 외용제로서 제공하는 것과 동일하다. 또, 피부 외용제에는, 본 발명에 관한 세포 외 소포 외에, 그 용도와 필요에 따라, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등에 통상 배합되는 임의의 성분(기재)이 배합되어 있어도 되고, 상술한 본 발명의 세포 노화 억제제를 피부 외용제로서 제공하는 것과 동일하다. 또한, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위에 있어서, 다른 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 화합물 등을 적절히 배합할 수 있다. 또, 이들 임의의 성분의 함유량도 특별히 한정되지 않으며, 원하는 제형이나 용도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0141] <본 발명의 피부 외용 조성물>

[0142] 본 발명의 세포 노화 억제용 또는 생체 조직 수복 촉진용 피부 외용 조성물(이하, "본 발명의 피부 외용 조성물"이라고 약기하는 경우가 있다)은, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분으로서 포함하고, 피부에 외용되는 모든 외용 조성물을 의미한다. 본 발명의 피부 외용 조성물은, 구체적으로는, 예를 들면, 화장료, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등의 용도에 적용할 수 있다.

[0143] 본 발명의 피부 외용 조성물 중에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 세포 노화 억제 활성(세포 노화 억제 효과) 또는 생체 조직 수복 촉진 활성(생체 조직 수복 촉진

효과)이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 피부 외용 조성물 중에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유량은, 예를 들면, $1x10^{6}$개/mL~$1x10^{15}$개/mL가 바람직하고, $1x10^{7}$개/mL~$1x10^{14}$개/mL가 보다 바람직하며, $1x10^{8}$개/mL~$1x10^{13}$개/mL가 특히 바람직하다.

[0144] 본 발명의 피부 외용 조성물의 제형은 임의이며, 예를 들면, 로션 등의 가용화계나 칼라민 로션 등의 분산계, 크림이나 유액 등의 유화계로서 제공할 수 있다. 또한, 분사제와 함께 충전하는 에어졸 형태, 펌프 스프레이제, 연고제, PAP제, 테이프제, 주사제 등의 다양한 제형으로 제공할 수도 있다.

[0145] 구체적으로는, 유액, 크림, 로션, 화장수, 팩, 미용액, 세정료, 젤, 메이크업 화장료 등의 각종 화장료; 액제, 연고, 분말, 과립, 에어졸제, 펌프 스프레이제, 첨부제, PAP제, 테이프제 등의 다양한 형태의 화장료, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등을 예시할 수 있다.

[0146] 본 발명의 피부 외용 조성물에는, 본 발명에 관한 세포 외 소포 외에, 그 용도와 필요에 따라, 피부 화장료 등의 화장료, 경피 의약품, 경피 의약 부외품, 및 세정료 등에 통상 배합되는 임의의 성분(기재)이 배합되어 있어도 되고, 예를 들면 물, 유성 성분, 보습제, 분체, 색소, 유화제, 가용화제, 젤화제, 세정제, 자외선 흡수제, 항염증제, 항알레르기제, 증점제, pH 조정제, 킬레이트제, 약제(약효 성분), 향료, 수지, 방균 곰팡이 방지제, 방부제(보존제), 항산화제, 수신제, 알코올류, 계면활성제, 자외선 흡수제, 미백제, 보습제, 에멀리언트제, 비타민류, 착색료, 천연 추출물 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위에 있어서, 다른 세포 노화 억제 작용을 갖는 화합물이나 생체 조직 수복 촉진 작용을 갖는 화합물 등을 적절히 배합할 수 있다. 또, 이들 임의의 성분의 함유량도 특별히 한정되지 않으며, 원하는 제형이나 용도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0147] 본 발명의 피부 외용 조성물이 억제하는 세포 노화의 대상이 되는 세포는, 상기 본 발명의 세포 노화 억제제가 억제하는 세포 노화의 대상이 되는 세포 또는 본 발명의 생체 조직 수복 촉진제가 수복을 촉진시키는 조직과 동일하고, 바람직한 것도 동일하다.

[0148] 본 발명의 피부 외용 조성물의 제조는, 본 발명에 관한 세포 외 소포나 본 발명의 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제의 제조 방법에 준하여 행하면 되고, 구체예나 바람직한 방법도 동일하다.

[0149] 본 발명의 피부 외용 조성물은, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 포함함으로써, 세포 노화 억제 활성 또는 생체 조직 수복 촉진 활성이 발휘된다. 본 발명의 피부 외용 조성물을 예를 들면 얼굴의 피부나 두피에 적용한 경우, 적어도 1종의 상기 세포 노화 관련 유전자 또는 상기 생체 조직 수복 관련 유전자의 발현이 조절되는 것에 의한, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 엘라스틴 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용 등에 근거하여, 노화에 따른 주름이나 처짐 등의 개선, 탈모 또는 박모(薄毛)의 치료 또는 예방 등, 혹은 기능 장해나 기능 부전에 빠진 세포나 생체 조직, 장기의 기능 재생을 도모하는 것 등을 기대할 수 있다.

[0150] <본 발명의 유전자 발현 조절제>

[0151] 본 발명의 유전자 발현 조절제는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분으로서 포함하는 것이며, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자 등의 세포 증식 억제 유전자; I형 콜라겐 유전자(COL1A1 유전자 유전자, COL1A2 유전자), III형 콜라겐 유전자(COL3A1 유전자), V형 콜라겐 유전자(COL5A1 유전자, COL5A2 유전자), XVII형 콜라겐 유전자(COL17A1 유전자) 등의 콜라겐 유전자; 히알루론산 합성 효소 1 유전자(HAS1 유전자), 히알루론산 합성 효소 2 유전자(HAS2 유전자) 등의 히알루론산 합성 효소 유전자; ELN 유전자 등의 엘라스틴 유전자; MMP-1 유전자, MMP-2 유전자, MMP-3 유전자, MMP-8 유전자, MMP-9 유전자, MMP-13 유전자 등의 콜라겐 분해 효소 유전자; HYAL1 유전자, HYAL2 유전자, HYAL3 유전자 등의 히알루론산 분해 효소 유전자; MMP-2 유전자, MMP-9 유전자 등의 엘라스틴 분해 효소 유전자로부터 선택되는 적어도 1종의 유전자(이하, "발현 조절 대상 유전자"라고 약기하는 경우가 있다)의 유전자 발현 조절의 용도에 적용된다. 상기 발현 조절 대상 유전자로서는, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소 유전자가 바람직하고, p53 유전자, p21 유전자, p16 유전자, MMP-1 유전자, COL1A1 유전자, COL3A1 유전자, HAS1 유전자가 보다 바람직하다.

[0152] 또, 본 발명의 유전자 발현 조절제에 의한 유전자 발현 조절이란, 상기 발현 조절 대상 유전자의 발현 촉진 및/또는 발현 억제를 의미하고, 콜라겐 유전자의 발현 촉진, 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현 촉진, 엘라스틴 유전자의 발현 촉진, 세포 증식 억제 유전자의 발현 억제, 콜라겐 분해 효소 유전자의 발현 억제, 히알루론산 분해 효소 유전자의 발현 억제, 엘라스틴 분해 효소 유전자의 발현 억제를 들 수 있으며, 콜라겐 유전자의 발현

촉진, 히알루론산 합성 효소 유전자의 발현 촉진, 세포 증식 억제 유전자의 발현 억제, 콜라겐 분해 효소 유전자의 발현 억제가 바람직하고, p53 유전자의 발현 억제, p21 유전자의 발현 억제, p16 유전자의 발현 억제, MMP-1 유전자의 발현 억제, COL1A1 유전자의 발현 촉진, COL3A1 유전자의 발현 촉진, HAS1 유전자의 발현 촉진이 보다 바람직하다.

[0153] 본 발명의 유전자 발현 조절제가 유전자 발현을 조절하는 대상이 되는 세포는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 섬유 아세포, 줄기세포, 상피 세포, 혈관 내피 세포, 간엽계 간질(間質) 세포, 간엽계 줄기세포 등을 들 수 있으며, 진피 섬유 아세포, 상피 세포, 혈관 내피 세포, 간엽계 간질 세포, 간엽계 줄기세포가 바람직하고, 진피 섬유 아세포, 혈관 내피 세포, 간엽계 간질 세포, 간엽계 줄기세포가 보다 바람직하다.

[0154] 본 발명의 유전자 발현 조절제 중에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 본 발명의 유전자 발현 조절 활성(본 발명의 유전자 발현 조절 효과)이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않는다. 또, 본 발명의 유전자 발현 조절제의 형태 및 본 발명에 관한 세포 외 소포 이외의 성분 배합의 유무 등에 대해서는, 전혀 제한되지 않는다.

[0155] 본 발명의 유전자 발현 조절제는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 유효 성분(주약(主藥))으로서 포함하는 것이며, 그 투여 제형은, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 함유하는 용액을 그대로, 혹은 필요에 따라 약학적으로 허용되는 담체, 첨가제와 함께 액제, 현탁화제, 리포화제 등으로서 제제화되거나, 또, 동결 건조에 의하여 분말물로서, 약학적으로 허용되는 첨가제와 함께 정제 등의 고형제로서 제제화된 것이다.

[0156] 제제화에 있어서 사용되는 약학적으로 허용되는 담체나 첨가물로서는, 상술한 본 발명의 세포 노화 억제제와 동일한 것을 들 수 있으며, 바람직한 것도 동일하다.

[0157] 본 발명의 유전자 발현 조절제에 있어서는, 바람직하게는 액제, 현탁제 또는 리포화제로서 제제화되는 것이 바람직하고, 기본적으로는, 본 발명에 관한 세포 외 소포를 포함하는 용액을 필요에 따라 상기한 담체, 첨가제와 함께, 예를 들면, 생리 식염수, 5% 포도당 용액, 리포 유제 등으로 혼합하여 얻어진다. 또한, 동결 건조 분말을 이용하여, 용시(用時) 용해, 또는 현탁형의 제제로 할 수도 있다.

[0158] 본 발명의 유전자 발현 조절제가 액제, 현탁제 또는 리포화제인 경우, 그 pH는, 의약상, 약리학적으로, 또는 생리학적으로 허용되는 범위 내이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, pH2.5~9.0, 바람직하게는 3.0~8.5, 더 바람직하게는 3.5~8.0이 되는 범위를 들 수 있으며, 적절히 pH 조정제로 조정할 수 있다.

[0159] 본 발명의 유전자 발현 조절제의 투여 경로는, 제형에 따라, 경구 투여, 피하 투여, 근육 내 투여, 정맥 내 투여, 동맥 내 투여, 수강 내 투여, 복강 내 투여를 들 수 있다. 그 투여량은, 대상이 되는 환자 상태(체중, 연령, 증상, 컨디션 등), 및 투여 제형 등에 따라 상이하지만, 통상, 성인에게 투여하는 경우에는, 입자수로서, 1×10^{5}~1×10^{17}개/회이며, 5×10^{5}~5×10^{16}개/회가 바람직하고, 1×10^{6}~1×10^{16}개/회가 더 바람직하며, 5×10^{6}~5×10^{15}개/회가 특히 바람직하다. 또한, 본 용량을 1회 투여량으로 하여, 하루 복수회 투여해도 되고, 본 용량을 복수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0160] 또, 본 발명의 유전자 발현 조절제는, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등의 피부 외용제로서 제제화되어도 된다. 피부 외용제에 있어서의 본 발명에 관한 세포 외 소포의 함유율은, 본 발명에 관한 세포 외 소포에 의한 본 발명의 유전자 발현 조절 활성이 발휘되는 한 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, $1x10^{6}$개/mL~$1x10^{15}$개/mL가 바람직하고, $1x10^{7}$개/mL~$1x10^{14}$개/mL가 보다 바람직하며, $1x10^{8}$개/mL~$1x10^{13}$개/mL가 특히 바람직하다.

[0161] 피부 외용제의 제형은 임의이며, 예를 들면, 로션 등의 가용화계나 칼라민 로션 등의 분산계, 크림이나 유액 등의 유화계로서 제공할 수 있다. 또한, 분사제와 함께 충전하는 에어졸 형태, 펌프 스프레이제, 연고제, PAP제, 테이프제, 주사제 등의 다양한 제형으로 제공할 수도 있다. 또, 피부 외용제에는, 본 발명에 관한 세포 외 소포 외에, 그 용도와 필요에 따라, 경피 의약품, 경피 의약 부외품 등에 통상 배합되는 임의의 성분(기재)이 배합되어 있어도 되고, 예를 들면 물, 유성 성분, 보습제, 분체, 색소, 유화제, 가용화제, 젤화제, 세정제, 자외선 흡수제, 항염증제, 항알레르기제, 증점제, pH 조정제, 킬레이트제, 약제(약효 성분), 향료, 수지, 방균 곰팡이 방지제, 방부제(보존제), 항산화제, 수신제, 알코올류, 계면활성제, 자외선 흡수제, 보습제, 에멀리언트제, 비타민류, 착색료, 천연 추출물 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위에 있어서, 다른 본 발명의 유전자 발현 조절 작용을 갖는 화합물 등을 적절히 배합할 수 있다. 또, 이들 임의의 성분의 함유량도 특별히 한정되지 않으며, 원하는 제형이나 용도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0162] 본 발명의 유전자 발현 조절제의 제조는, 본 발명에 관한 세포 외 소포나 본 발명의 세포 노화 억제제 또는 생체 조직 수복 촉진제의 제조 방법에 준하여 행하면 되고, 구체예나 바람직한 방법도 동일하다.

[0163] 실시예

[0164] 이하, 실시예 및 비교예에 근거하여 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 예에 의하여 결코 한정되지 않는다.

[0165] 실시예 1. 초원심법에 의한 골수 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0166] (1) 세포 배양

[0167] 골수 유래 간엽계 줄기세포인 Poietics™ 인간 간엽계 줄기세포(LONZA사)를, 15% FBS(Selborne Biological Sevice Pty.사) 함유 MEMα(L-글루타민, 페놀 레드 함유, 후지필름 와코 준야쿠(주))를 증식 배지로서 이용하여 배양했다. 그 후, 배양한 골수 유래 간엽계 줄기세포를 세포수 3×10^5로 100mm 세포 배양용 디시(Corning International사)에 파종하고, 5% CO_2, 37℃의 조건으로 설정한 세포 배양용 인큐베이터 내에서 72시간 배양하여, 세포수 3×10^6까지 증식시켰다.

[0168] (2) 염증성 사이토카인에 의한 자극

[0169] (1)에서 증식시킨 골수 유래 간엽계 줄기세포에 TNFα(R&D systems사)를 종(終)농도 20ng/mL로 첨가하여 자극하고, 24시간 더 배양했다.

[0170] (3) 세포 외 소포의 산생

[0171] (2)에서 배양한 골수 유래 간엽계 줄기세포를, 세포 외 소포 산생 배지인 10% GIBCO: Fetal Bovine Serum, exosome-depleted, One Shot™ format(Thermo Fisher Scientific사) 함유 D-MEM(후지필름 와코 준야쿠(주)) 20mL로 치환하고, 5% CO_2, 37℃의 조건으로 설정한 세포 배양용 인큐베이터 내에서 120시간 배양을 행했다. 그 후, 얻어진 배양 상등액을 50mL의 원심관에 회수하여 2000×g으로 20분간 원심하여, 상등액을 회수했다.

[0172] (4) 초원심법에 의한 세포 외 소포의 취득

[0173] 이어서, (3) 및 회수한 배양 상등액을, 초원심 분리기(Beckman: Optima™ L-100XP)를 이용하여 110,000×g으로 70분간 원심 분리했다. 얻어진 펠릿에 1mL의 PBS를 첨가하고, 재차 110,000×g으로 70분간 원심 분리했다. 최종적으로 얻어진 펠릿을 EV-Save™ 세포 외 소포 블로킹 시약(후지필름 와코 준야쿠(주))을 첨가한 PBS에 의하여 용해했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0174] 실시예 2. 초원심법에 의한 제대 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0175] "Poietics™ 인간 간엽계 줄기세포(LONZA사)" 대신에, "제대 유래 간엽계 줄기세포인 Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix(PromoCell사)"를 이용한 것 이외에는, 실시예 1과 동일한 방법에 의하여 초원심법에 의하여 세포 외 소포를 취득했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0176] 비교예 1. 초원심법에 의한 골수 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0177] "실시예 1의 (2) 염증성 사이토카인에 의한 자극"을 행하지 않았던 것 이외에는, 실시예 1과 동일한 방법에 의하여, 초원심법에 의하여 세포 외 소포를 취득했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0178] 비교예 2. 초원심법에 의한 제대 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0179] "Poietics™ 인간 간엽계 줄기세포(LONZA사)" 대신에, "제대 유래 간엽계 줄기세포인 Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix(PromoCell사)"를 이용한 것 이외에는, 비교예 1과 동일한 방법에 의하여, 초원심법에 의하여 세포 외 소포를 취득했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0180] 실시예 3. PS 어피니티법에 의한 골수 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0181] "실시예 1의 (4) 초원심법에 의한 세포 외 소포의 취득" 대신에, 하기 수순에 따라 PS 어피니티법에 의하여 세포 외 소포를 취득한 것 이외에는, 실시예 1과 동일한 방법에 의하여 세포 외 소포를 취득했다. 실시예 1의 (3)에서 회수한 배양 상등액 1mL로부터, MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS(후지필름 와코 준야쿠(주))를 이용하여, 당해 키트에 첨부된 설명서에 기재된 수순에 따라 세포 외 소포를 단리하여, EV-Save™ 세포 외 소포 블로킹 시약(후지필름 와코 준야쿠(주))을 첨가한 1mM EDTA 함유 PBS(Phosphate-buffered saline) 내에 세포 외 소포를 얻었다. 그 후, 비바 스핀 500(싸토리우스사, 분획 분자량: 100,000(100K), 막 재질: PES)을 이용하여, EV-Save™ 세포 외 소포 블로킹 시약을 첨가한 PBS에 버퍼 교환을 행했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0182] 실시예 4. PS 어피니티법에 의한 제대 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0183] "Poietics™ 인간 간엽계 줄기세포(LONZA사)" 대신에, "제대 유래 간엽계 줄기세포인 Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix(PromoCell사)"를 이용한 것 이외에는, 실시예 3과 동일한 방법에 의하여 PS법에 의하여 세포 외 소포를 취득했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0184] 실시예 5. PS 어피니티법에 의한 제대 유래 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0185] "Poietics™ 인간 간엽계 줄기세포(LONZA사)" 대신에, "제대 유래 간엽계 줄기세포인 Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix(PromoCell사)"를 사용하고, "실시예 1의 (2) 염증성 사이토카인에 의한 자극"을 행하지 않았던 것 이외에는, 실시예 1과 동일한 방법에 의하여 PS법에 의하여 세포 외 소포를 취득했다. 이하, 얻어진 용액을 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS법)"이라고 기재하는 경우가 있다.

[0186] 실험예 1-7. 나노 트랙킹 해석법에 의한 세포 외 소포 입자수의 측정

[0187] 실시예 1-5 및 비교예 1-2에서 각각 얻어진 "세포 외 소포 용액"의 단위 체적당 입자수를, NanoSight(Malvern Panalytical사)를 이용하여, 나노 입자 트랙킹 해석법(Nano Tracking Analysis법)에 의하여, NanoSight의 설명서에 기재된 수순에 따라 측정하여, 평균 입자경과 단위 체적당 평균 입자수[개/mL]를 산출했다. 측정에 이용한 "세포 외 소포 용액" 및 얻어진 평균 입자경과 단위 체적당 평균 입자수를 하기 표 1에 나타낸다. 또, 얻어진 입경 분포의 그래프를 실험예 2의 결과와 함께 도 1에 나타낸다. 도 1의 그래프에 있어서, 세로축은 입자수, 가로축은 입경을 각각 나타낸다.

[0188] [표 1]

	측정한 세포 외 소포 용액	평균 입자경 [nm]	단위 체적당 평균 입자수 [개/mL]
실시예 1	실시예 1에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)"	176.9±7.3	4.46×10^{10}
실시예 2	실시예 2에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)"	146.6±1.5	7.66×10^{10}
실시예 3	비교예 1에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)"	136.2±1.1	4.86×10^{10}
실시예 4	비교예 2에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)"	143.3±1.8	2.40×10^{11}
실시예 5	실시예 3에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)"	141.6±0.4	5.00×10^{10}
실시예 6	실시예 4에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)"	143.1±1.5	1.57×10^{11}
실시예 7	실시예 5에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)"	140.3±3.8	1.41×10^{11}

[0189]

[0190] 실시예 6-11. PS 어피니티법으로 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성의 평가

[0191] 실시예 1에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)" 및 실시예 3에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)"을 이용하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p21 유전자, p53 유전자, MMP-1 유전자의 mRNA 발현량을 각각 정량 PCR에 의하여 측정함으로써 세

포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가했다. 구체적으로는, 이하의 방법에 의하여 실시했다. 10% FBS(Biosera사) 함유 DMEM(후지필름 와코 준야쿠(주))에 인간 태아 폐 유래 섬유 아세포인 TIG3 세포(JCRB로부터 분양, 70회 이상 분열 후의 것)를 현탁시키고, 96 well plate(Corning사)에 1웰당 세포수 2×10^3, 배지량 100μL로 각각 파종했다. 세포 파종으로부터 16시간 후, 하기 표 2에 기재된 "세포 외 소포 용액"을 종농도 3×10^9개/mL가 되는 양으로 각각의 웰에 첨가하고, 96시간 배양했다. PureLink™ RNA Mini 키트(ThermoFisher Scientific사)를 이용하여, 당해 키트에 첨부된 설명서에 기재된 수순에 따라 RNA를 각각 추출했다. 추출한 RNA 50ng으로부터, ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(도요보(주))를 이용하여, 당해 키트에 첨부된 설명서에 기재된 수순에 따라 cDNA를 합성했다. 합성한 cDNA를 이용하여, KOD SYBR qPCR Mix(도요보(주))에 의하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p21 유전자, p53 유전자, MMP-1 유전자 및 내부 표준인 GAPDH의 mRNA 발현량을, 각각 정량 PCR에 의하여 측정했다. 정량 PCR에 사용한 프라이머를 도 3에 각각 나타낸다.

[0192] 도 4는 p21 유전자의 mRNA 발현량, 도 5는 p53 유전자의 mRNA 발현량, 도 6은 MMP-1 유전자의 mRNA 발현량의 결과이다. 각 유전자의 발현량은, 각 유전자에 대한 프라이머를 이용하여 행한 qPCR로부터 얻어진 수치를 GAPDH에 대하여 노멀라이징하고, 컨트롤에 대한 상댓값(△△ct값)으로서 나타내며, 각 도면의 세로축으로 했다. 도면 중, 가로축의 "EV(-) 정제 방법(-)"은, EV 비첨가의 TIG3 세포(컨트롤)를 이용한 경우의 결과, "EV(MSC) 정제 방법(UC)"은, 비교예 1에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)"을 이용한 경우의 결과, "EV(MSC TNFα 자극 있음) 정제 방법(UC)"은, 실시예 1에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)"을 이용한 경우의 결과, "EV(MSC) 정제 방법(PS)"은, 실시예 3에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)"을 이용한 경우의 결과를 각각 나타낸다. 각 실시예에 있어서 측정에 이용한 세포 외 소포 용액, 발현량을 확인한 mRNA, 결과를 나타낸 도면의 번호를, 비교예 3-5의 것과 함께 하기 표 2에 각각 나타낸다.

[0193] [표 2]

	측정에 이용한 세포 외 소포 용액	발현량을 확인한 mRNA	결과를 나타낸 도면
실시예 6	실시예 1에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	p21	도 4
실시예 7	실시예 3에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)”	p21	도 4
비교예 3	비교예 1에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	p21	도 4
실시예 8	실시예 1에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	p53	도 5
실시예 9	실시예 3에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)”	p53	도 5
비교예 4	비교예 1에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	p53	도 5
실시예 10	실시예 1에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 6
실시예 11	실시예 3에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 6
비교예 5	비교예 1에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	MMP-1	도 6

[0194]

[0195] 비교예 3-5. 초원심법으로 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성의 평가

[0196] "세포 외 소포 용액"으로서 비교예 1에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)"을 이용한 것 이외에는, 실시예 6-11과 동일한 방법에 의하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p21 유전자, p53 유전자, MMP-1 유전자의 mRNA 발현량을 각각 정량 PCR로 측정함으로써 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가했다. 각 비교예에 있어서 측정에 이용한 세포 외 소포 용액, 발현량을 확인한 mRNA는, 상기 표 2에 기재한 바와 같다. 정량 PCR의 결과를 실시예 6-11의 결과와 함께, 도 4-6에 각각 나타낸다.

[0197] 실시예 12-18. PS 어피니티법으로 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성의 평가

[0198] "세포 외 소포 용액"으로서 실시예 2에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)", 실시예 4에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS법, TNFα 자극)" 및 실시예 5에서 얻어진 "세포 외

소포 용액(제대 유래 MSC, PS법)"을 종농도 7.5×10^{9}개/mL가 되는 양 이용한 것 이외에는, 실시예 6-11과 동일한 방법에 의하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p21 유전자, p53 유전자, MMP-1 유전자의 mRNA 발현량을 각각 정량 PCR로 측정함으로써 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가했다. 각 실시예에 있어서 측정에 이용한 세포 외 소포 용액, 발현량을 확인한 mRNA, 결과를 나타낸 도면의 번호를, 비교예 6-8의 조건과 함께 하기 표 3에 각각 나타낸다. 정량 PCR의 결과를 비교예 6-8의 결과와 함께, 도 7-9에 각각 나타낸다.

[0199] [표 3]

	측정에 이용한 세포 외 소포 용액	발현량을 확인한 mRNA	결과를 나타낸 도면
실시예 12	실시예 2에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	p21	도 7
실시예 13	실시예 4에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	p21	도 7
비교예 6	비교예 2에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	p21	도 7
실시예 14	실시예 2에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	p53	도 8
실시예 15	실시예 4에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	p53	도 8
비교예 7	비교예 2에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	p53	도 8
실시예 16	실시예 2에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 9
실시예 17	실시예 4에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 9
비교예 8	비교예 2에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	MMP-1	도 9
실시예 18	비교예 5에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)”	MMP-1	도 9

[0200]

[0201] 비교예 6-8. 초원심법으로 취득한 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성의 평가

[0202] "세포 외 소포 용액"으로서 비교예 2에서 얻어진 "세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)"을 종농도 7.5×10^{9}개/mL가 되는 양 이용한 것 이외에는, 실시예 6-11과 동일한 방법에 의하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p21 유전자, p53 유전자, MMP-1 유전자의 mRNA 발현량을 각각 정량 PCR에 의하여 측정함으로써 평가했다. 각 비교예에 있어서 측정에 이용한 세포 외 소포 용액, 발현량을 확인한 mRNA는, 상기 표 3에 기재한 바와 같다. 정량 PCR의 결과를 실시예 12-18의 결과와 함께, 도 7-9에 각각 나타낸다.

[0203] 도 4-9로부터, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포나 PS 어피니티법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포는, 간엽계 줄기세포의 종류에 관계없이, 초원심법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포보다 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자의 mRNA 발현량을 억제했다. 즉, 간엽계 줄기세포를 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가함으로써, 취득되는 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성이 높아지는 것, PS법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포는 초원심법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포보다 높은 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 특히, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 PS법에 의하여 취득된 세포 외 소포는 현저하게 높은 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 갖는 것을 알 수 있었다.

[0204] 실시예 19-28 및 비교예 9. 간엽계 줄기세포로부터의 세포 외 소포의 취득

[0205] 하기 표 4에 기재된 조건(간엽계 줄기세포, 취득 방법, 자극)에 따른 것 이외에는, 실시예 1-5 및 비교예 1-2와 동일한 방법에 의하여, 각각 세포 외 소포를 취득했다. 표 4 중, "골수 유래 MSC"는 "골수 유래 간엽계 줄기세포인 Poietics™ 인간 간엽계 줄기세포(LONZA사)", "제대 유래 MSC"는 "제대 유래 간엽계 줄기세포인 Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix(PromoCell사)", "지방 유래 MSC"는 "지방 유래 간엽계 줄기세포인 Human Adipose-Derived Stem Cells(LONZA사)", "PS법"은 PS 어피니티법, "자극"은 염증성 사이토카인에 의한 자극을 각각 나타낸다.

[0206] [표 4]

	간엽계 줄기세포	취득 방법	자극	조제한 세포 외 소포 용액의 약칭
실시예 19	골수 유래 MSC	PS 법	-	“세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”
실시예 20	지방 유래 MSC	PS 법	-	“세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”
비교예 9	지방 유래 MSC	초원심법	-	“세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)
실시예 21	골수 유래 MSC	초원심법	TNFα (1ng/mL)	“세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”
실시예 22	제대 유래 MSC	초원심법	TNFα (20ng/mL)	“세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”
실시예 23	골수 유래 MSC	초원심법	IL-1β (1ng/mL)	“세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, IL-1β 자극)”
실시예 24	제대 유래 MSC	초원심법	IL-1β (1ng/mL)	“세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, IL-1β 자극)”
실시예 25	골수 유래 MSC	PS 법	TNFα (1ng/mL)	“세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”
실시예 26	제대 유래 MSC	PS 법	TNFα (20ng/mL)	“세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”
실시예 27	골수 유래 MSC	PS 법	IL-1β (1ng/mL)	“세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”
실시예 28	제대 유래 MSC	PS 법	IL-1β (1ng/mL)	“세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”

[0207]

[0208] 실시예 29-69 및 비교예 10-26. 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성의 평가

[0209] 실시예 19-28 및 비교예 9에서 얻어진 세포 외 소포 용액을 이용하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p16 유전자, p21 유전자, MMP-1 유전자, I형 콜라겐 유전자(COL1A1 유전자), III형 콜라겐 유전자(COL3A1 유전자), HAS1 유전자의 mRNA 발현량을 각각 정량 PCR에 의하여 측정함으로써 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 평가했다. 구체적으로는, 이하의 방법에 의하여 실시했다. 10% FBS(Biosera사) 함유 DMEM(후지필름 와코 준야쿠(주))에 인간 피부 유래 섬유 아세포인 TIG3S 세포(JCRB로부터 분양, 50회 이상 분열 후의 것)를 현탁시키고, 96 well plate(Corning사)에 1웰당 세포수 3×10^3, 배지량 100μL로 각각 파종했다. 세포 파종으로부터 16시간 후, 하기 표 5 및 6에 기재된 "세포 외 소포 용액"을 종농도 2×10^8개/mL가 되는 양으로 각각의 웰에 첨가하고, 96시간 배양했다. 그 후, PureLink™ RNA Mini 키트(ThermoFisher Scientific사)를 이용하여, 당해 키트에 첨부된 설명서에 기재된 수순에 따라 RNA를 각각 추출했다. 추출한 RNA 50ng으로부터, ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(도요보(주))를 이용하여, 당해 키트에 첨부된 설명서에 기재된 수순에 따라 cDNA를 합성했다. 합성한 cDNA를 이용하여, KOD SYBR qPCR Mix(도요보(주))에 의하여, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자인 p16 유전자, p21 유전자, MMP-1 유전자, I형 콜라겐 유전자(COL1A1 유전자), III형 콜라겐 유전자(COL3A1 유전자), HAS1 유전자 및 내부 표준인 GAPDH의 mRNA 발현량을, 각각 정량 PCR에 의하여 측정했다. 도 10에 사용한 프라이머의 배열을 나타낸다. 도 11은 p16 유전자의 mRNA 발현량, 도 12는 p21 유전자의 mRNA 발현량, 도 13은 MMP-1 유전자의 mRNA 발현량, 도 14는 I형 콜라겐 유전자의 mRNA 발현량, 도 15는 III형 콜라겐 유전자의 mRNA 발현량, 도 16은 HAS1 유전자의 mRNA 발현량의 결과이다. 각 유전자의 발현량은, 각 유전자에 대한 프라이머를 이용하여 행한 qPCR로부터 얻어진 수치를 GAPDH에 대하여 노멀라이징하고, 컨트롤에 대한 상댓값(△△ct값)으로서 나타내며, 각 도면의 세로축으로 했다. 도면 중, 가로축의 "정제 방법(-) 세포 외 소포(-)"는, 세포 외 소포 비첨가의 TIG3S 세포(컨트롤)를 이용한 경우의 결과, "정제 방법"의 "UC"는 초원심법, "PS"는 PS 어피니티법, "세포 외 소포"의 "MSC"는 염증성 사이토카인에 의한 자극 없음, "MSC TNFα"는 TNFα에 의한 자극 있음, "MSC IL-1β"는 IL-1β에 의한 자극 있음을 각각 나타낸다. 각 실시예 및 비교예에 있어서 발현량을 확인한 mRNA, 및 결과를 나타낸 도면의 번호를 하기 표 5 및 표 6에 각각 나타낸다.

[0210] [표 5]

	측정에 이용한 세포 외 소포 용액	발현량을 확인한 mRNA	결과를 나타낸 도면
비교예 10	비교예 1 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	p16	도 11 의 (A)
실시예 29	실시예 19 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”	p16	도 11 의 (A)
비교예 11	비교예 9 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)”	p16	도 11 의 (B)
실시예 30	실시예 20 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”	p16	도 11 의 (B)
비교예 12	비교예 1 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	p21	도 12 의 (A)
실시예 31	실시예 19 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”	p21	도 12 의 (A)
실시예 32	실시예 25 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	p21	도 12 의 (A)
비교예 13	비교예 2 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	p21	도 12 의 (B)
실시예 33	실시예 5 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)”	p21	도 12 의 (B)
실시예 34	실시예 22 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	p21	도 12 의 (B)
실시예 35	실시예 26 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	p21	도 12 의 (B)
실시예 36	실시예 24 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, IL-1β 자극)”	p21	도 12 의 (B)
실시예 37	실시예 28 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	p21	도 12 의 (B)
비교예 14	비교예 9 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)”	p21	도 12 의 (C)
실시예 38	실시예 20 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”	p21	도 12 의 (C)
비교예 15	비교예 1 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	MMP-1	도 13 의 (A)
실시예 39	실시예 19 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”	MMP-1	도 13 의 (A)
실시예 40	실시예 21 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 13 의 (A)
실시예 41	실시예 25 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 13 의 (A)
실시예 42	실시예 23 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, IL-1β 자극)”	MMP-1	도 13 의 (A)
실시예 43	실시예 27 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	MMP-1	도 13 의 (A)
비교예 16	비교예 2 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	MMP-1	도 13 의 (B)
실시예 44	실시예 5 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)”	MMP-1	도 13 의 (B)
실시예 45	실시예 22 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 13 의 (B)
실시예 46	실시예 26 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	MMP-1	도 13 의 (B)
실시예 47	실시예 24 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법, IL-1β 자극)”	MMP-1	도 13 의 (B)
실시예 48	실시예 28 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	MMP-1	도 13 의 (B)
비교예 17	비교예 9 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)”	MMP-1	도 13 의 (C)
실시예 49	실시예 20 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”	MMP-1	도 13 의 (C)

[0211]

[0212] [표 6]

	측정에 이용한 세포 외 소포 용액	발현량을 확인한 mRNA	결과를 나타낸 도면
비교예 18	비교예 1 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (A)
실시예 50	실시예 19 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (A)
실시예 51	실시예 21 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, TNFα 자극)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (A)
실시예 52	실시예 25 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (A)
실시예 53	실시예 23 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법, IL-1β 자극)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (A)
실시예 54	실시예 27 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (A)
비교예 19	비교예 2 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (B)
실시예 55	실시예 5 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (B)
실시예 56	실시예 26 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (B)
실시예 57	실시예 28 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (B)
비교예 20	비교예 9 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (C)
실시예 58	실시예 20 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”	I 형 콜라겐	도 14 의 (C)
비교예 21	비교예 1 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (A)
실시예 59	실시예 19 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (A)
실시예 60	실시예 25 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (A)
실시예 61	실시예 27 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (A)
비교예 22	비교예 2 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (B)
실시예 61	실시예 5 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (B)
실시예 62	실시예 26 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (B)
실시예 63	실시예 28 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (B)
비교예 23	비교예 9 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (C)
실시예 64	실시예 20 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”	III 형 콜라겐	도 15 의 (C)
비교예 24	비교예 1 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, 초원심법)”	HAS1	도 16 의 (A)
실시예 65	실시예 19 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(골수 유래 MSC, PS 법)”	HAS1	도 16 의 (A)
비교예 25	비교예 2 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, 초원심법)”	HAS1	도 16 의 (B)
실시예 66	실시예 5 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법)”	HAS1	도 16 의 (B)
실시예 67	실시예 26 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, TNFα 자극)”	HAS1	도 16 의 (B)
실시예 68	실시예 28 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(제대 유래 MSC, PS 법, IL-1β 자극)”	HAS1	도 16 의 (B)
비교예 26	비교예 9 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, 초원심법)”	HAS1	도 16 의 (C)
실시예 69	실시예 20 에서 얻어진 “세포 외 소포 용액(지방 유래 MSC, PS 법)”	HAS1	도 16 의 (C)

[0213]

[0214] 도 11-14로부터, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포나 PS 어피니티법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포는, 간엽계 줄기세포의 종류에 관계없이, 초원심법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포보다 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자의 mRNA 발현량을 억제했다. 즉, 간엽계 줄기세포를 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가함으로써, 취득되는 세포 외 소포의 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성이 높아지는 것, PS법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포는 초원심법에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 취득한 세포 외 소포보다 높은 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 특히, 염증성 사이토카인에 의하여 자극을 가한 간엽계 줄기세포로부터 PS법에 의하여 취득된 세포 외 소포는 현저하게 높은 세포 노화 억제 활성 및 생체 조직 수복 촉진 활성을 갖는 것을 알 수 있었다.

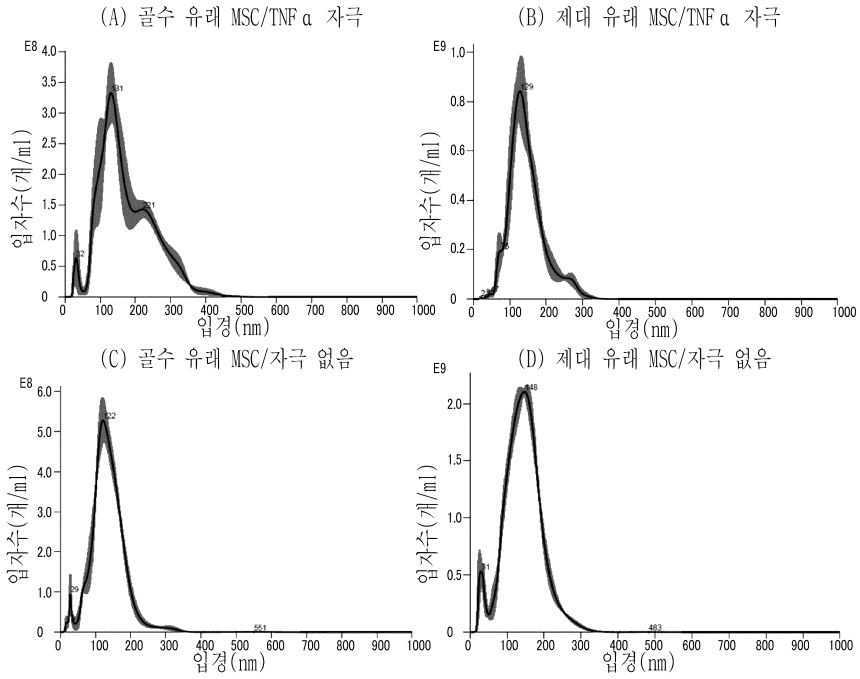
산업상 이용가능성

[0216] 본 발명에 의하여 간엽계 줄기세포로부터 세포 노화 억제 작용을 갖는 세포 외 소포를 유효 성분으로 하는 세포 노화 억제제, 생체 조직 수복 촉진제, 유전자 발현 조절제, 및 피부 외용 조성물이 제공된다. 본 발명이 제공하는 세포 노화 억제제 및 피부 외용 조성물은, 세포 노화 관련 유전자 및 생체 조직 수복 관련 유전자의 유전자

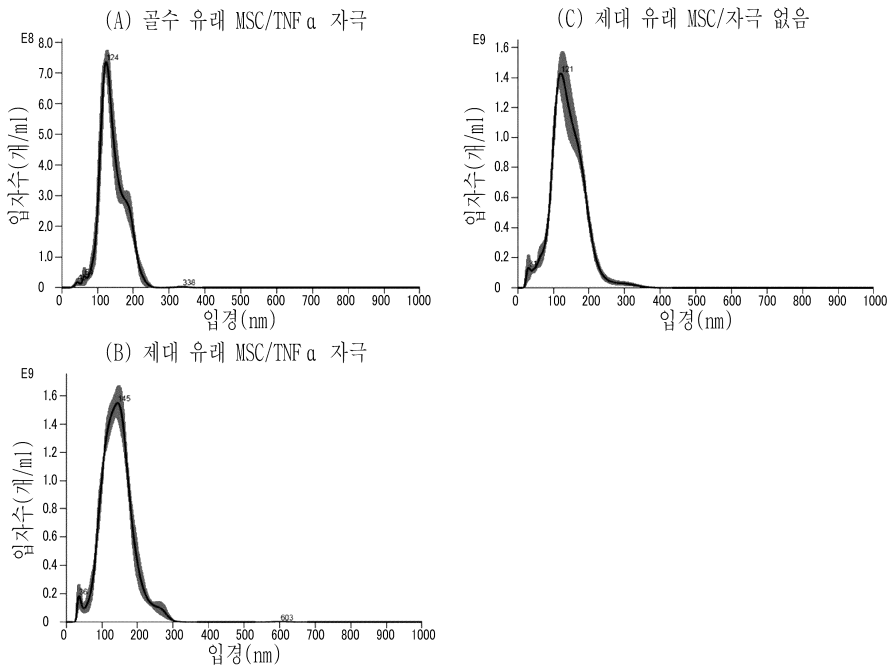
발현을 조절하고, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용 등에 의하여 세포 노화가 억제되는 점에서 산업상 이용가능성은 다대(多大)한 것이다. 또, 본 발명이 제공하는 유전자 발현 조절제는, 세포 증식 억제 유전자, 콜라겐 유전자, 콜라겐 분해 효소 유전자, 히알루론산 합성 효소 유전자, 히알루론산 분해 효소 유전자, 엘라스틴 유전자, 엘라스틴 분해 효소 유전자로부터 선택되는 적어도 1종의 유전자 발현이 조절된다. 본 발명이 제공하는 생체 조직 수복 촉진제는, 세포 증식 촉진 작용, 콜라겐의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 히알루론산의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용, 엘라스틴의 산생 촉진 혹은 분해 억제 작용 등에 의하여, 예를 들면 기능 장해나 기능 부전에 빠진 세포나 생체 조직, 장기의 기능 재생을 도모할 수 있다.

도면

도면1



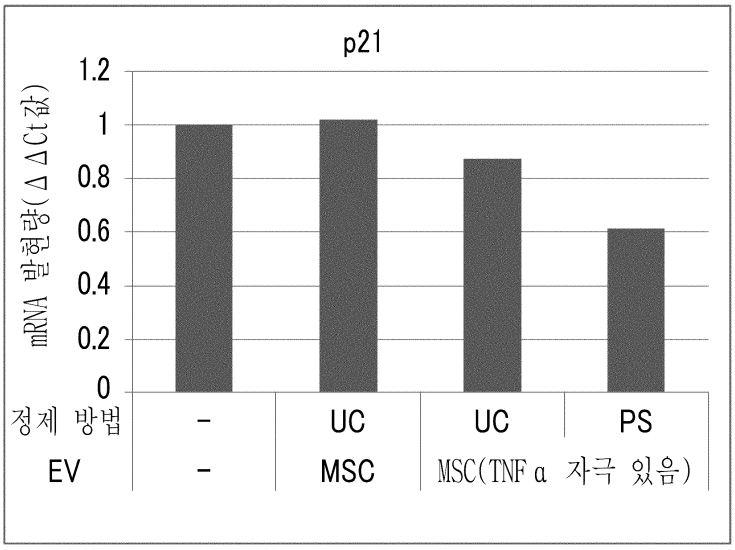
도면2



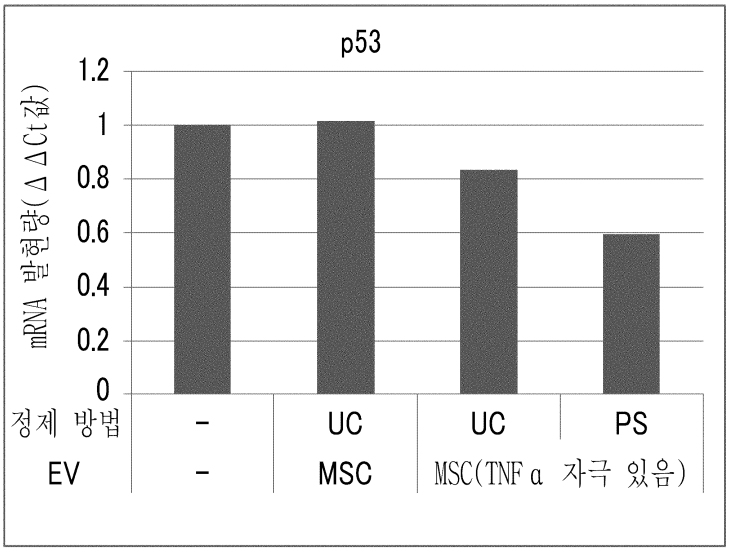
도면3

	정방향	역방향
p21	gacaccactggagggtgact	caggtccacatggtcttcct
p53	gcccaacaacaccagctcct	cctgggcatccttgagttcc
MMP-I	catcgtgttgcagctcatga	atgggctggacaggattttg

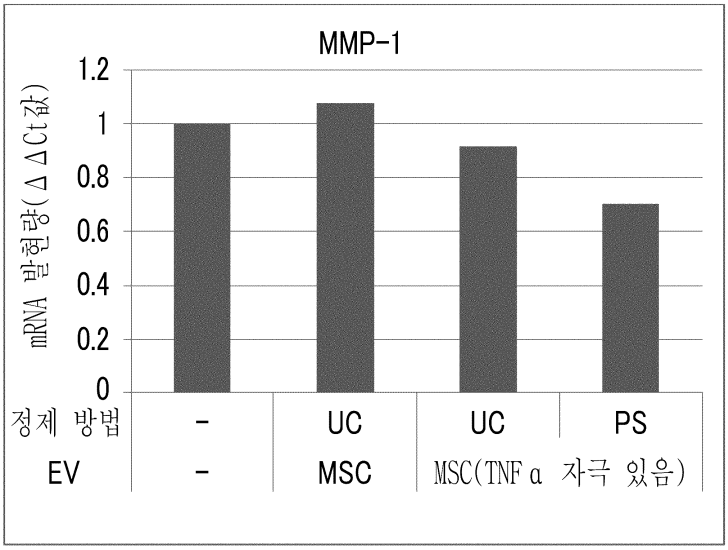
도면4



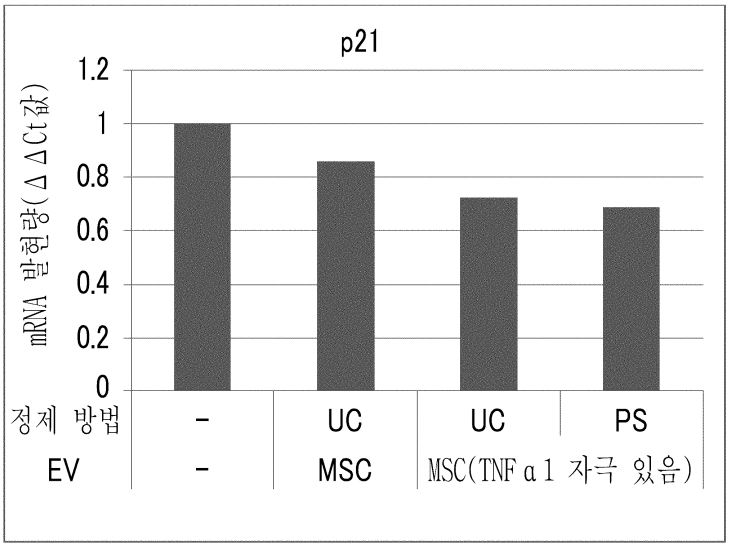
도면5


p53
mRNA 발현량(ΔΔCt값)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
EV
-
-
UC
MSC
UC
MSC(TNFα 자극 있음)
PS

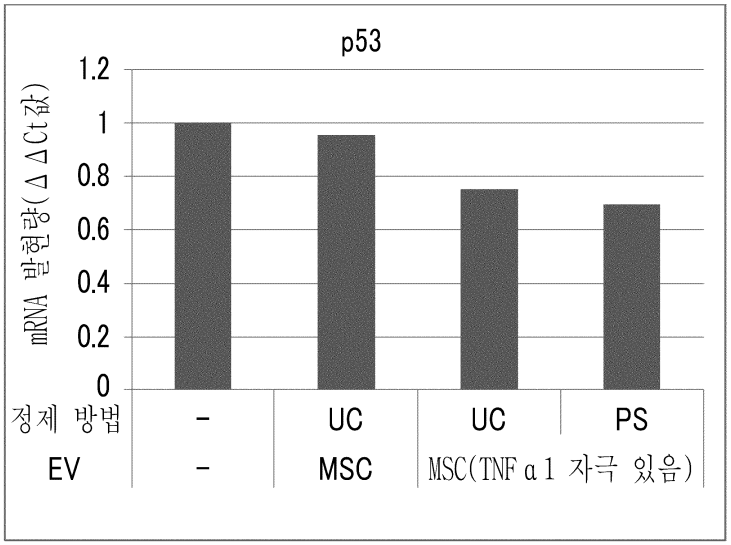
도면6


MMP-1
mRNA 발현량(ΔΔCt값)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
EV
-
-
UC
MSC
UC
MSC(TNFα 자극 있음)
PS

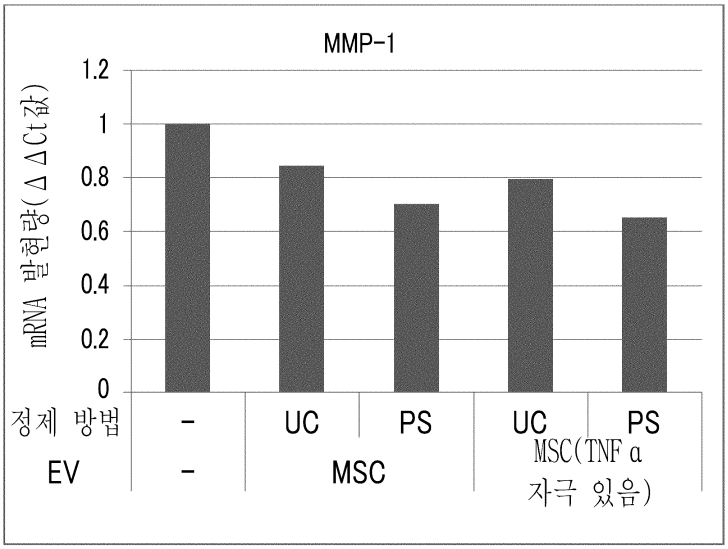
도면7


p21
mRNA 발현량(ΔΔCt값)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
EV
-
-
UC
MSC
UC
MSC(TNFα1 자극 있음)
PS

도면8


p53
mRNA 발현량(ΔΔCt값)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
EV
-
-
UC
MSC
UC
MSC(TNFα1 자극 있음)
PS

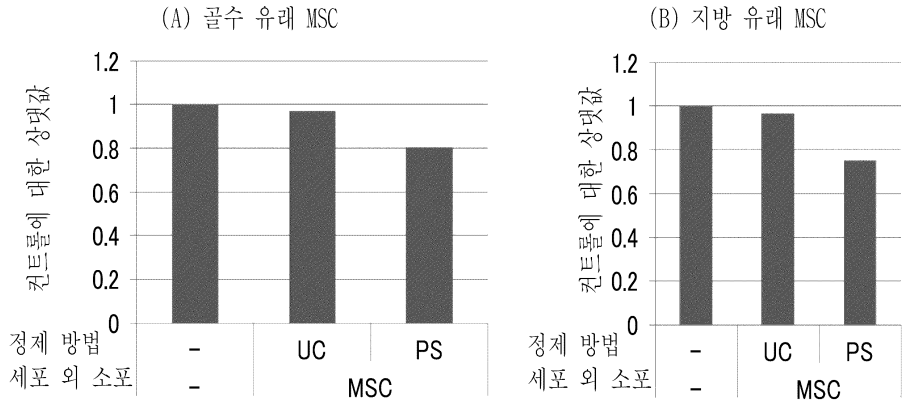
도면9



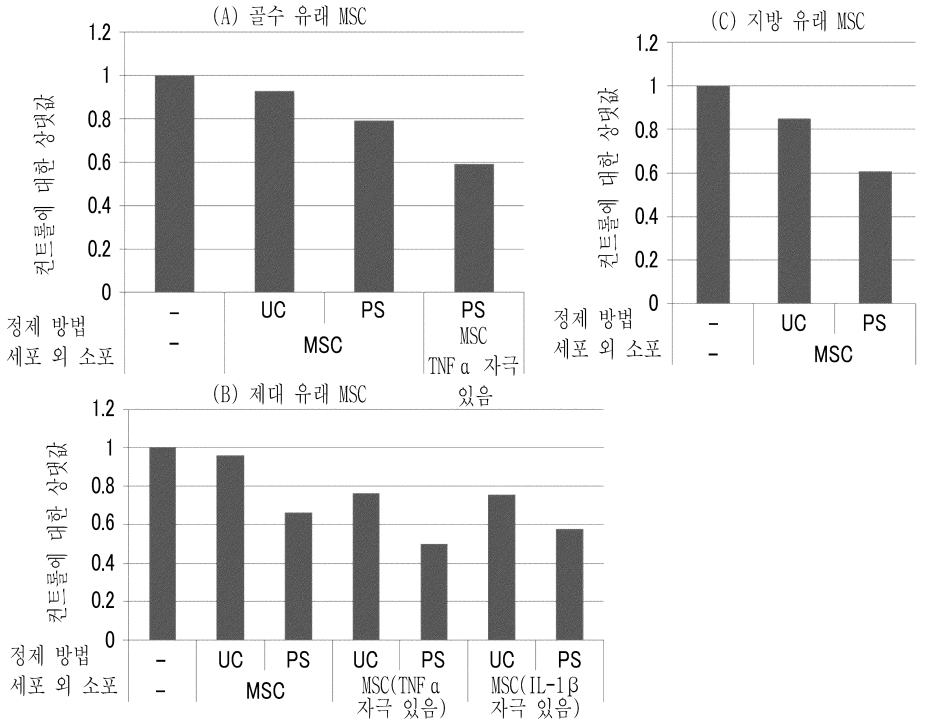
도면10

유전자	정방향 프라이머	역방향 프라이머
GAPDH	cctctgacttcaacagcgac	cgttgtcataccaggaaatgag
p21	gacaccactggagggtgact	caggtccacatggtcttcct
p53	gcccaacaacaccagctcct	cctgggcatccttgagttcc
p16	tggacctggctgaggagctg	cctgtaggaccttcggtgac
MMP-I	catcgtgttgcagctcatga	atgggctggacaggattttg
HAS I	cttcaaggcgctcggagat	gttaaggatccgcacgtccc
I형 콜라겐	cctgggcatccttgagttcc	acgtcgaagccgaattcct
III형 콜라겐	attgctgggatcactggagcac	cctggtttcccactttcacccttg

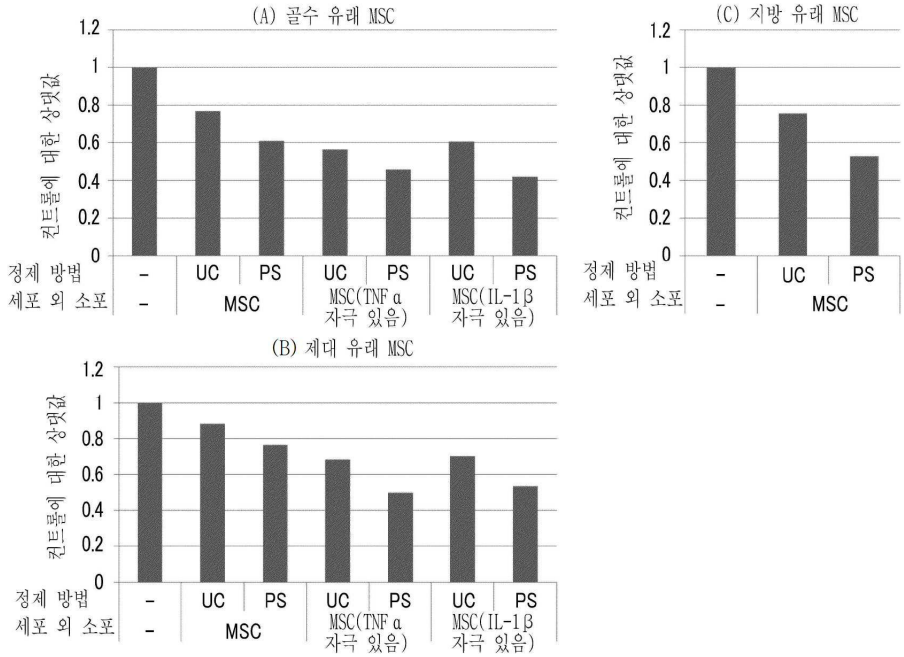
도면11



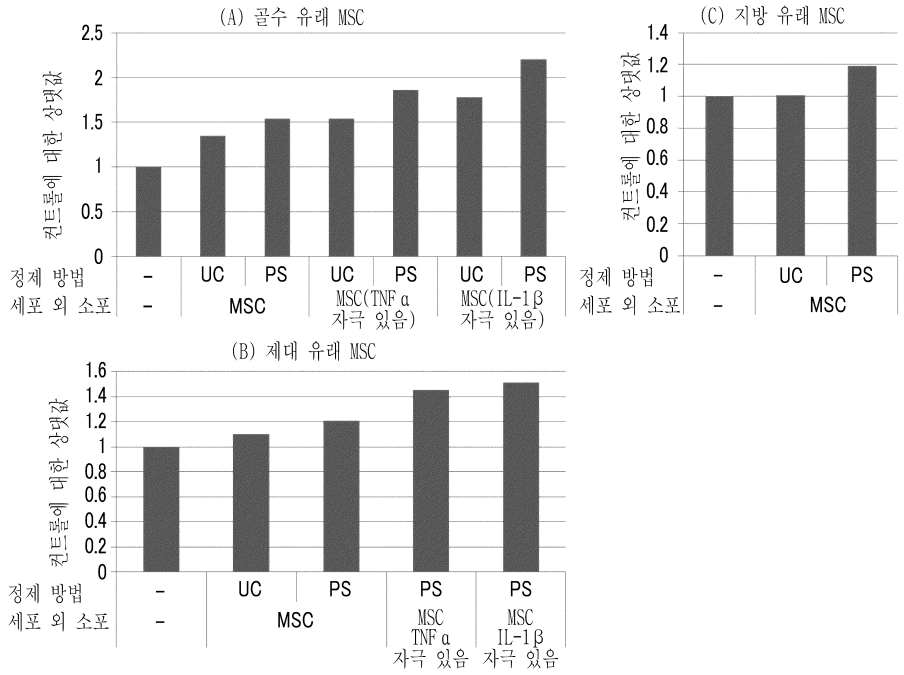
도면12


(A) 골수 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
PS
MSC
TNF α 자극
있음
(C) 지방 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
(B) 제대 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
UC
PS
MSC(TNF α
자극 있음)
UC
PS
MSC(IL-1β
자극 있음)

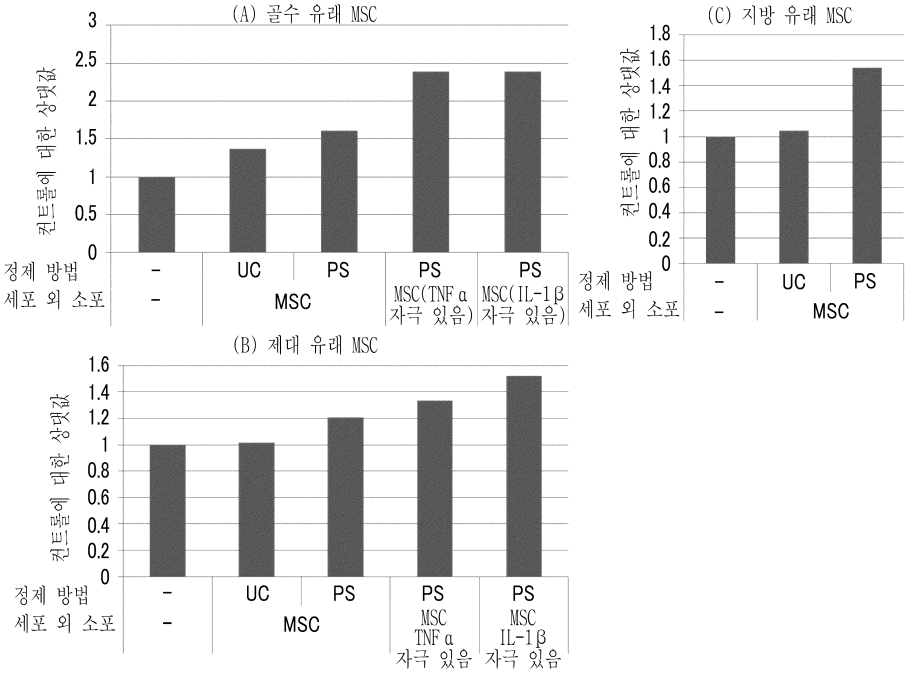
도면13


(A) 골수 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
UC
PS
MSC(TNF α
자극 있음)
UC
PS
MSC(IL-1β
자극 있음)
(C) 지방 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
(B) 제대 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
UC
PS
MSC(TNF α
자극 있음)
UC
PS
MSC(IL-1β
자극 있음)

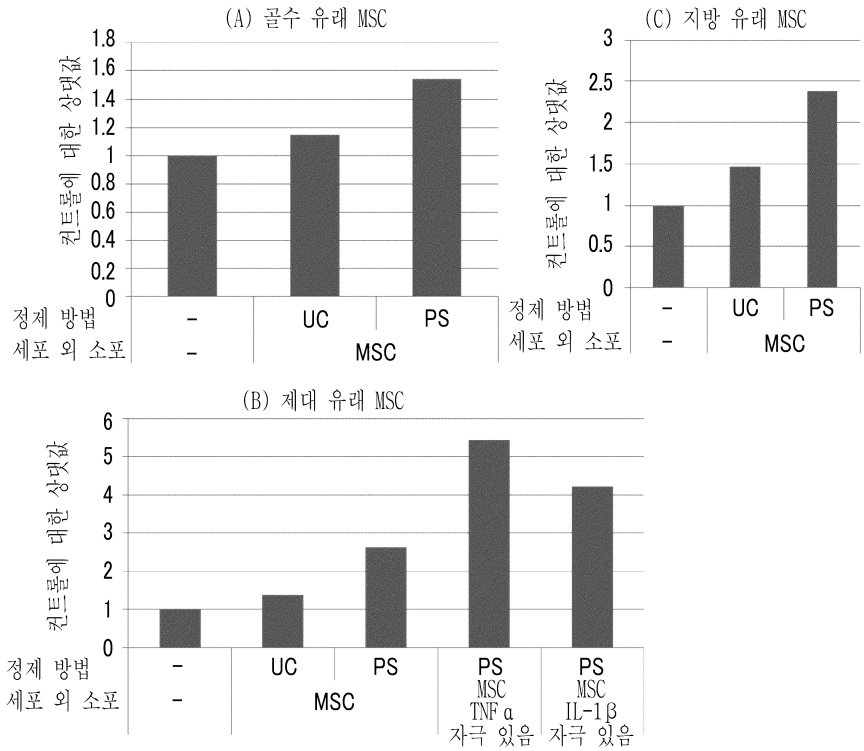
도면14


(A) 골수 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
2.5
2
1.5
1
0.5
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
UC
PS
MSC(TNF α 자극 있음)
UC
PS
MSC(IL-1β 자극 있음)
(C) 지방 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
(B) 제대 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
PS
MSC TNF α 자극 있음
PS
MSC IL-1β 자극 있음

도면15


(A) 골수 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
PS
MSC(TNF α 자극 있음)
PS
MSC(IL-1β 자극 있음)
(C) 지방 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
(B) 제대 유래 MSC
컨트롤에 대한 상댓값
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
정제 방법
세포 외 소포
-
-
UC
PS
MSC
PS
MSC TNF α 자극 있음
PS
MSC IL-1β 자극 있음

도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> FUJIFILM Corporation

<120> Inhibitor for cellular aging, promoter for biological tissue repairg, regulator for gene expression and method for producing the promoter, the inhibitor and promoter

<130> 2163PCT

<150> JP2020065052

<151> 2020-03-31

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 1

gacaccactg gagggtgact 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 2

caggtccaca tggtcttcct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 3

gcccaacaac accagctcct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 4

cctgggcatc cttgagttcc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 5

catcgtgttg cagctcatga 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 6

atgggctgga caggattttg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 7

cctctgactt caacagcgac 20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 8

cgttgtcata ccaggaaatg ag 22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 9

tggacctggc tgaggagctg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 10

cctgtaggac cttcggtgac 20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 11

cttcaaggcg ctcggagat 19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 12

gttaaggatc cgcacgtccc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 13

cctgggcatc cttgagttcc 20

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 14

acgtcgaagc cgaattcct 19

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 15

attgctggga tcactggagc ac 22

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide primer

<400> 16

cctggtttcc cactttcacc cttg 24