(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월08일
(11) 등록번호 10-2791419
(24) 등록일자 2025년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/15 (2025.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61P 37/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/15 (2025.01)
A61P 29/00 (2023.02)
(21) 출원번호 10-2021-7037758
(22) 출원일자(국제) 2019년08월19일
심사청구일자 2021년11월18일
(85) 번역문제출일자 2021년11월18일
(65) 공개번호 10-2022-0003564
(43) 공개일자 2022년01월10일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2019/032322
(87) 국제공개번호 WO 2021/033247
국제공개일자 2021년02월25일
(56) 선행기술조사문헌
JP6372782 B2*
Zhao Cheng et al., Bone marrow-derived innate macrophages attenuate oxazolone-induced colitis, Cellular Immunology 311 (2017) 46-53*
MASUDA H. et al., J. Am. Heart Assoc., 2014, vol. 3, e000743
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
세루아쿠시아 가부시키가이샤
일본국 도쿄토 쥬오쿠 니혼바시 호리도메쵸 1-10-9
(72) 발명자
아사하라 다카유키
일본국 2591193 가나가와켄 이세하라시 시모카스야 143각코호진 도카이 다이가쿠 내
살베코프 아만켈디 에이.
일본국 2591193 가나가와켄 이세하라시 시모카스야 143각코호진 도카이 다이가쿠 내
세키 마코토
일본국 1030012 도쿄토 쥬오쿠 니혼바시 호리도메쵸 1-10-9 세루아쿠시아 가부시키가이샤 내
(74) 대리인
특허법인(유한) 다래

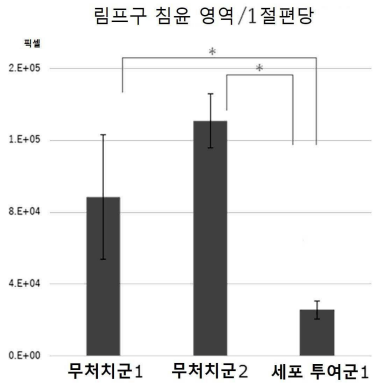
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **세포 함유 의약 조성물**

(57) 요 약

본 발명은, M2 매크로파지가 풍부화(富化)된 세포 집단과 의약상 허용될 수 있는 담체를 함유하는 의약 조성물을 제공하며, 해당 조성물은, 전신 투여했을 때에 폐에 트랩되지 않고, 장애/염증 부위에 집적한다. 따라서, 본 발명의 의약 조성물은 항염증용 의약 조성물로서 유용하다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61P 37/04 (2018.01)

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

단핵구를 무혈청 배지 중에 배지 교환 및 계대(繼代)도 하지 않고 배양하여 수득한, M2 매크로파지가 풍부화(富化)된 세포 집단과 의약상 허용될 수 있는 담체를 함유하는, 전신 투여된 경우에 장애 또는 염증 부위에 집적되는 것을 특징으로 하는 정맥 주사 투여용 의약 조성물로서, 여기서 상기 M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단은, 상기 세포 집단에 있어서의 M2 매크로파지의 비율이 7% 이상, M1 매크로파지의 비율이 10% 미만이고, 추가로 항염증성 Th2 세포 및 제어성 T 세포 중 하나 이상을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용인, 의약 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서,

전신 투여용인, 의약 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

세포 집단이 하기 특징을 갖는, 의약 조성물:

(1) 전신 투여된 경우에 폐에 트랩되지 않는다.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

염증성 질환이 자기면역 질환에 의한 것인, 의약 조성물.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 병변 부위에 집적하는 세포 집단을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, M2 매크로파지가 풍부화(富化)된 세포 집단을 함유하고, 전신 투여에 의해 항염증 효과를 발휘하는 세포 함유 의약 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 근래, 세포를 환자에게 이식함으로써, 기능이나 형태의 이상을 보완하고, 병을 치료하는 재생 의료 기술이 주목

받고 있다. 면역 억제 작용이나 항염증 작용을 갖는 세포로서 알려져 있는 간엽계 줄기세포(MSC)는, 전신 투여하면 폐나 간장, 비장에 세포가 집적하기 때문에, 전신 투여해도 장애 부위에 리크루트되지 않는다(특허문헌 1, 비특허문헌 1). 또, 생체로부터 단리된 MSC는, 유주능(遊走能)을 잃은 세포가 혼재하는 경우, 배양에 의해 유주능을 잃는 경우가 있다.

[0003] 이러한 문제를 해결한 세포로서 MUSE 세포(특허문헌 2, 비특허문헌 2)나 REC 세포(특허문헌 3, 비특허문헌 3)가 알려져 있지만, MUSE 세포나 REC 세포는 MSC로부터 특정의 마커를 갖는 세포를 분리함으로써 얻기 때문에, MSC로부터의 소팅, 증식 배양이라는 복잡한 공정을 거칠 필요가 있다.

[0004] 한편, 재생에 관여하는 세포(혈관내피 전구세포(EPC), 항염증성 매크로파지, T 세포)를 증가시키기 위한 배양 기술이 허혈성 질환에 대한 줄기세포 치료로서 제창되어 있다(특허문헌 4, 비특허문헌 4, 5). 해당 배양 기술에서는, 나이브한 말초혈의 염증성 세포가 될 수 있는 세포(단구와 타입 1 매크로파지, M1)가, 항염증성의 성질을 갖는 세포(타입 2 매크로파지, M2)로 컨버트되며, 세포 장애성 T 세포와 내추럴 킬러(NK) 세포의 감소에 의해 면역 억제성의 헬퍼 T 세포의 서브세트인 제어성 T 세포가 증가하여, 광범위한 조직의 재생에 기여한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국제공개 WO2016/161462

(특허문헌 0002) 국제공개 WO2014/027684

(특허문헌 0003) 국제공개 WO2016/017795

(특허문헌 0004) 국제공개 WO2014/051154

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Fischer UM, et al., Stem Cells Dev.2009; 18(5):683-92.

(비특허문헌 0002) Morikawa S., J. Exp. Med. 2009; 206(11):2483-2496.

(비특허문헌 0003) Mabuti Y., et al., Stem cell Reports. 2013; 1:152-165

(비특허문헌 0004) Masuda H., et al., Stem cells Translational Medicine. 2012; 1:160-171

(비특허문헌 0005) Masuda H., et al., Journal of the American Heart Association. 2014; e3

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은, 전신 투여했을 때에 폐에 트랩되지 않고, 장애 부위에 유주되는 세포가 풍부한 세포 집단과 의약상 허용할 수 있는 담체를 포함하는 의약 조성물, 특히 항염증용 의약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은, 상기 과제를 감안하여, 예의 연구를 거듭해, 체액 유래의 단핵구를, 무혈청 배양하에서 배지 교환도 계대(繼代)도 하지 않고 배양함으로써 얻어진 세포 집단이 M2 매크로파지가 풍부하고, 폐에 트랩되기 어려우며, 또 장애 부위에 집적하는 능력을 갖는 것을 발견했다. 이러한 세포 집단의 몇 가지 특성에 관한 지견을 얻어, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 즉, 본 발명은 이하와 같다.

[0009] [1] M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단과 의약상 허용될 수 있는 담체를 함유하는, 의약 조성물.

[0010] [2] 세포 집단에 있어서의 M2 매크로파지의 비율이 7% 이상인, 상기 [1] 기재의 의약 조성물.

[0011] [3] 세포 집단에 있어서의 M1 매크로파지의 비율이 10% 미만인, 상기 [1] 또는 [2] 기재의 의약 조성물.

[0012] [4] M2 매크로파지의 풍부화가, 체액 유래의 단핵구를, 무혈청 배지 중, 배지 교환 및 계대도 하지 않고 배양함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는, 상기 [1]~[3] 중 어느 것에 기재한 의약 조성물.

[0013] [5] 전신 투여용인, 상기 [1]~[4] 중 어느 것에 기재한 의약 조성물.

[0014] [6] 세포 집단이 하기 특징을 갖는, [1]~[5] 중 어느 것에 기재한 의약 조성물:

[0015] (1) 전신 투여된 경우에 폐에 트랩되지 않는다,

[0016] (2) 장애/염증 부위에 집적한다, 및

[0017] (3) 단핵구 유래이다.

[0018] [7] 염증성 질환의 예방 및/또는 치료용인, 상기 [1]~[6] 중 어느 것에 기재한 의약 조성물.

[0019] [8] 염증성 질환이 자기면역 질환에 의한 것인, 상기 [7] 기재의 의약 조성물.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 의약 조성물은, M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단을 함유하고, 전신 투여된 경우에 폐에 트랩되지 않으며, 장애/염증 부위에 집적한다. 따라서, 본 발명의 의약 조성물은, 치료에 충분한 수의 항염증 작용을 갖는 세포를, 표적이 되는 염증 또는 조직 손상 부위로 이행시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 세포 집단의 플로우 사이토메트리 해석의 결과를 나타내는 도면이다. 배양 전의 래트 PBMC 세포 현탁액(Rat Fresh PBMC), E 배양 후의 래트 PBMC 세포 현탁액(Rat E conditioned PBMC)에 대해 조사했다. 림프구 사이즈의 세포 (A), 단구 사이즈의 세포 (B), 매크로파지 사이즈의 세포 집단 (C)를 전체생존 세포획분(劃分)으로부터 게이트했다.

도 2는 E 배양 후의 세포 집단(M2 리치 MNC)에서는 M2 매크로파지가 풍부화되어 있는 것을 나타낸 그래프이다. PBMC 세포 현탁액(PBMC) 중의 대부분이 염증성의 단구/매크로파지(좌측: CD68 양성의 세포, 우측: CD11b 양성/CD11c 양성/CD163 음성의 세포)인 것을 나타냈다(A). E 배양 후, M2 매크로파지의 비율이 급격하게 증가했다(B)(각 군에서 n=6). 통계적 유의차의 검출에는 Mann-Whitney test를 이용했다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.

도 3은 플로우 사이토메트리 해석의 결과를 나타내는 도면이다.

도 4는 PBMC와 M2 리치 MNC에 있어서의 T 림프구의 존재 비율을 나타낸 그래프이다(각 군에서 n=6). 통계적 유의차의 검출에는 Mann-Whitney test를 이용했다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.

도 5는 PBMC와 M2 리치 MNC에 있어서의 CD8 양성인 세포 장애성 T 세포의 비율을 나타낸 그래프이다(각 군에서 n=6). 통계적 유의차의 검출에는 Mann-Whitney test를 이용했다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.

도 6은 M2 리치 MNC가 심근경색 조직에 생착한 것을 나타내는 도면이다. A) 경색 부위 주위에 도입된 eGFP 양성의 M2 리치 MNC를 면역조직화학적으로 추적한 대표적인 염색 화상이다. B) 경색 부위에서는, 조직에 생착한 eGFP 양성의 세포수의 현저한 증가가 관찰되었다. 그러나, C) PBMC 투여군에서는 관찰되지 않았다. 대부분의 eGFP 양성 PBMC는 비장 (D) 및 폐 조직 (E)에서 트랩되어 있었다. 스케일 바: 20㎛ (A)와 40㎛ (B). 통계적 유의차의 검출에는 Mann-Whitney test를 이용했다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.

도 7은 심근경색으로부터 28일 후의 M2 리치 MNC 투여군, PBMC 투여군, 컨트롤군, Sham-operated군에서의 래트 심(心)조직의 피크로시리우스 레드 염색의 대표적인 염색도를 나타낸다(A, D). B 및 C는, M2 리치 MNC 투여군에서는 좌심실의 경색 부위의 면적과 심실벽의 두께가 유지되어 있었던 것에 비해, PBMC 투여군과 컨트롤군에서는 실벽의 박화와 함께 경색 부위의 면적이 넓어져 있었던 것을 나타낸다. E는 간질성 섬유증의 비율을 나타낸다. 통계적 유의차는 2-way ANOVA와 포스트 호크 Turkey's 다군(多群) 비교 테스트로 행하였다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.

도 8은 M2 리치 MNC가 경색 부위에 있어서 혈관 신생과 동맥 신생을 촉진한 것을 나타내는 도면이다. 경계 영역과 경색 부위를 포함하는 6개의 랜덤으로 얻어진 20배로 촬영된 부위에서 평균의 혈관 형성을 평가했다. A) M2 리치 MNC군에서는, 통계적으로 기능적인 미소 혈관의 밀도가 증가하고, B) 1 평방 밀리미터당 αSMA로 염색

된 소동맥이 관찰되었지만, PBMC 투여군과 컨트롤군에서는 밀도의 증가도 소동맥의 형성도 관찰되지 않았다. C) 면역조직화학으로부터, E 배양 조건에서는 eGFP를 발현한 CD31 양성 세포는, 호스트의 조직 중에서 관의 길이를 신장시켰다. D) 공초점 현미경 화상의 Z축 방향으로의 3차원 재구축으로 얻어진, M2 리치 MNC 투여군과 PBMC 투여군, 컨트롤군의 경색 부위에서의 Isolectin B4와 αSMA의 대표적인 염색 화상. E) 심근경색 유발 6일 후의 경색 부위 조직에 있어서의, angpt1, angpt2, 및 pecam1과 같은 혈관 신생에 관한 유전자의 상대적인 발현(모든 값은 대수 표시). 스케일 바: 20㎛. 통계적 유의차는 크러스컬-월리스와 포스트 호크 Dunn's 다군 비교 테스트로 행하였다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.

도 9는 M2 리치 MNC 투여군(세포 투여군 1) 및 무처치군(무처치군 1, 무처치군 2)의 침샘 표본의 연속 절편에 대해 HE 염색을 행하고, 화상 해석 소프트웨어를 이용하여, 침샘 조직에 있어서의 림프구 침윤 부분의 면적을 측정해 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 결과는 평균±표준 편차로 나타냈다.(세포 투여군 1: n=3, 무처치군 1: n=5, 무처치군 2: n=5).

도 10은 E 배양 후의 세포 집단(M2 리치 MNC)에서는 M2 매크로파지가 풍부화되어 있는 것을 나타낸 그래프이다. 실험은 6회 실시(실험 1~6)하고, 어느 경우도 E 배양에 의해, M2 매크로파지의 비율이 증가했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은, 전신 투여했을 때에 폐에 트랩되지 않고, 장애/염증 부위에 유주되며, 집적하는 세포 집단(이하, 본 발명의 세포 집단이라고도 칭한다)과 의약상 허용할 수 있는 담체를 포함하는 의약 조성물(이하, 본 발명의 의약 조성물이라고도 칭한다)을 제공한다.

[0023] 본 발명의 세포 집단은, 체액 유래의 단핵구를, 무혈청 배양하에서 배지 교환도 계대도 하지 않고 배양함으로써 얻어지는, M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단이다. 따라서, 본 발명의 세포 집단은 단핵구 유래이다. 체액으로는, 말초혈, 골수액 및 제대혈이 예시될 수 있다. 단핵구란, 말초혈, 골수 또는 제대혈 등에 포함되는 백혈구 중, 원형(圓形)에 가까운 핵을 갖는 것, 또는 백혈구 중 과립구를 제외한 것을 말한다. 동물로부터 체액(말초혈, 골수 또는 제대혈)을 채취하고, 그것을 예를 들면 밀도 구배 원심법에 따라 해당 획분을 추출함으로써 단핵구 획분이 얻어질 수 있다. 밀도 구배 원심법으로는, 단핵구 획분이 형성되면 특별히 한정되지 않지만 인간의 경우는 Histopaque-1077, 래트 및 마우스의 경우는 Histopaque-1083(Sigma-Aldrich) 등이 이용된다.

[0024] 본 발명의 세포 집단이 유래하는 동물종은, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 개, 고양이, 원숭이, 토끼, 소, 말, 돼지 등을 들 수 있다. 바람직하게는 인간이다. 세포가 유래하는 개체의 연령은 특별히 한정되지 않고, 성인이어도 소아여도 태아여도 된다.

[0025] 본 발명에 있어서의 단핵구의 배양은, 단핵구를 함유하는 세포 현탁액을 사이토카인 등의 인자를 첨가한 배지 중에서 실시된다. 세포 현탁액으로는 또, 단핵구를 함유하는 체액 자체(예를 들면, 골수액, 제대혈, 말초혈)를 이용할 수도 있다. 단핵구의 배양 조건은 특별히 한정되지 않고, 통상 당분야에서 실시되는 조건으로 실시할 수 있다. 예를 들면, 각종 인자를 첨가한, 이하의 배양 조건을 들 수 있다.

[0026] 줄기세포 인자(Stem cell factor; SCF; S), 인터루킨 6(Interleukin-6; IL-6; I), FMS양 티로신 키나아제 3 리간드(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; FLT-3L; F), 트롬보포이에틴(Thrombopoietin; TPO; T) 및 혈관내피세포증식인자(Vascular endopoietin; VEGF; V)로부터 선택되는 1 또는 2 이상의 인자, 바람직하게는 3 이상의 인자, 보다 바람직하게는 4 이상의 인자의 존재하에서의 배양.

[0027] 본 발명에서 이용되는 SCF는, 248개의 아미노산으로 이루어지는 분자량 약 30,000의 당 단백질이다. 선택적 스플라이싱에 의해 가용형과 막 결합형이 존재하지만, 본 발명에서 이용하는 SCF는 EPC 등의 배양에 유용한 한 어느 타입의 SCF여도 된다. 바람직하게는 가용형이다. SCF의 유래 등은 특별히 한정되지 않지만, 안정된 공급이 예상되는 재조합체가 바람직하고, 특히 바람직하게는 인간 재조합체이다. 상업적으로 입수 가능한 것이 알려져 있다. 무혈청 배지 중의 SCF의 농도는, 이용하는 SCF의 종류에 따라서도 다르고, 단핵구의 배양에 유용한 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 10~1000ng/mL이다.

[0028] 본 발명에서 이용되는 IL-6는, B 세포의 항체 산생 세포로의 최종 분화를 유도하는 인자로서 단리된 분자량 21만의 당 단백질이고, 면역 응답, 조혈계나 신경계 세포의 증식 분화, 급성기 반응 등에 관여하는 것이 알려져 있다. 본 발명에서 이용하는 IL-6는 적절히 선택되지만, 단핵구의 배양에 이용하는 경우에는, 인간 IL-6가 바람직하고, 안정된 공급이 예상되는 재조합체가 특히 바람직하다. 상업적으로 입수 가능한 것이 알려져 있다. 무혈청 배지 중의 IL-6의 농도는, 이용하는 IL-6의 종류에 따라서도 다르고, 단핵구의 배양에 유용한 한 특별히

한정되지 않지만, 예를 들면 1~500ng/mL이다.

[0029] 본 발명에서 이용되는 FLT-3L은, 초기 조혈 제어에 있어서 중요한 역할을 담당하는 수용체형 티로신 키나아제의 리간드로서 알려져 있다. 몇 가지의 선택적 스플라이싱에 의한 산물이 알려져 있지만, 조혈계 줄기세포의 증식을 자극한다는 보고가 있다. 본 발명에서 이용하는 FLT-3L은, 단구 등의 배양에 유용한 한, 어느 타입의 FLT-3L여도 된다. 상업적으로 입수 가능한 것이 알려져 있다. 무혈청 배지 중의 FLT-3L의 농도는, 이용하는 FLT-3L의 종류에 따라서도 다르고, 단핵구의 배양에 유용한 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 10~1000ng/mL이다.

[0030] 본 발명에서 이용되는 TPO는, 조혈계 사이토카인의 일종이며, 조혈 줄기세포로부터 거핵구가 만들어지는 과정에 특이적으로 작용하여, 거핵구의 산생을 촉진하는 것이 알려져 있다. 본 발명에서 이용하는 TPO의 유래 등은 특별히 한정되지 않지만, 안정된 공급이 예상되는 재조합체가 바람직하고, 특히 바람직하게는 인간 재조합체이다. 상업적으로 입수 가능한 것이 알려져 있다. 무혈청 배지 중의 TPO의 농도는, 이용하는 TPO의 종류에 따라서도 다르고, 단핵구의 배양에 유용한 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 1~500ng/mL이다.

[0031] 본 발명에서 이용될 수 있는 VEGF는, 혈관내피 전구세포(EPC)에 특이적으로 작용하는 증식 인자이며, 주로 혈관 주위의 세포에서 산생되는 것이 알려져 있다. EPC는 단핵구 획분 중에 존재한다. 선택적 스플라이싱에 의해 사이즈가 다른 수종(數種)의 VEGF 단백질이 산생되고, 어느 타입의 VEGF라도 된다. 바람직하게는 VEGF165이다. VEGF의 유래 등은 특별히 한정되지 않지만, 안정된 공급이 예상되는 재조합체가 바람직하고, 특히 바람직하게는 인간 재조합체이다. 상업적으로 입수 가능한 것이 알려져 있다. 무혈청 배지 중의 VEGF의 농도는, 이용하는 VEGF의 종류에 따라서도 다르고, 단핵구의 배양에 유용한 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 5~500ng/mL이다.

[0032] 구체적으로는, 이하의 인자의 조합의 존재하에서의 배양을 들 수 있다.

[0033] S, I, F, T, V;

[0034] SI, SF, ST, SV, IF, IT, IV, FT, FV, TV;

[0035] SIF, SIT, SIV, SFT, SFV, STV, IFT, IFV, ITV, FTV;

[0036] SIFT, SITV, SIFV, SFTV, IFTV;

[0037] SIFTV.

[0038] 바람직하게는, 이하의 인자의 조합의 존재하에서의 배양을 들 수 있다.

[0039] SIF, SIT, SIV, SFT, SFV, STV, IFT, IFV, ITV, FTV.

[0040] 보다 바람직하게는, 이하의 인자의 조합의 존재하에서의 배양을 들 수 있다.

[0041] SIFT, SITV, SIFV, SFTV, IFTV.

[0042] 단핵구의 배지 중의 농도는, 배양에 의해 M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단이 얻어지는 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 약 $0.5\sim10\times10^6$ 세포/mL, 보다 바람직하게는 약 $1\sim7\times10^6$ 세포/mL, 가장 바람직하게는 약 $3\sim6\times10^6$ 세포/mL이다.

[0043] 본 발명에서 이용되는 배지라는 것은, 당해 분야에서 통상 이용되고 있는 배지를 이용할 수 있고, 예를 들면 단핵구의 배양용 배지로서 알려져 있는 무혈청 배지를 이용할 수 있으며, 또 무혈청 배지인 것이 바람직하다. 무혈청 배지로서 이용되는 기초 배지로는, 예를 들면, RPMI, DMEM, MEM, IMDM 등을 들 수 있다.

[0044] 본 발명의 배지에 첨가되는 각종 인자는 또, 단핵구가 유래하는 동물과 동종의 동물에서 유래하는 인자로 통일하는 것이 바람직하다. 이와 같이 단핵구 및 각종 인자의 유래를 통일함으로써, 동종이계 이식 등의 동종 이식에 적합한 세포 배양물이 얻어진다. 또, 세포 이식이 의도되는 개체 유래의 단핵구를 이용함으로써, 동종동계 이식에 적합한 세포 배양물을 얻는 것도 가능하다.

[0045] 본 발명의 세포 집단이라는 것은 항염증성 매크로파지가 풍부화되어 있는 한 그 양태는 특별히 한정되지 않지만, M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단인 것이 바람직하다. 예를 들면, 본 발명의 세포 집단은, 단핵구를 상술한 인자를 함유하는 무혈청 배지에서 배양함으로써 얻을 수 있다. 여기에서, 항염증성 매크로파지가 풍부화된 세포 집단이란, 상술한 인자를 함유하는 무혈청 배지에서 배양하기 전의 단핵구 전체에 있어서의 각각의

비율에 비해, 배양 후의 세포군 전체에 있어서의 각 세포의 비율이, 2배 이상, 바람직하게는 4배 이상, 보다 바람직하게는 5배 이상으로 증가하는 것을 말한다. 본 발명의 세포 집단은, 배양 전의 원래의 단핵구에 비해 항염증성 매크로파지의 비율이 현저하게 높아져 있기 때문에, 염증을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0046] 배지 중, 단핵구를 배양함으로써, M2 매크로파지가 풍부화된다. 해당 배양은 바람직하게는 무혈청 배지 중에서 실시되고, 보다 바람직하게는 배지 교환도 계대도 하지 않고 배양한다. 단핵구의 배양 기간은, 원하는 정도로 M2 매크로파지가 풍부화되면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 5% CO_2 분위기하, 37℃에서 3일간 이상 배양한다. 배지 교환이나 계대를 하지 않는 것이 바람직하므로, 통상 8일간 이하, 보다 바람직하게는 7일간 이하이다.

[0047] 본 발명의 세포 집단에 포함되는 항염증성 매크로파지라는 것은, 항염증성으로 조직수복에 기여하는 매크로파지이다. 바람직하게는 M2 매크로파지이고, 보다 바람직하게는 CD206 양성 또는 CD163 양성의 M2 매크로파지이다. 이들 M2 매크로파지의 마커는 동물종에 따라 다르다. 또 시판되고 있는 플로우 사이토메트리용의 형광 라벨 항체에 제한이 있다. 따라서, 인간 M2 매크로파지의 마커로서 CD206 양성 또는 CD163 양성이 이용되고, 마우스 M2 매크로파지의 마커로서 Galactin-3 양성, 또는 CD206 양성 등이 이용되며, 래트 M2 매크로파지에서는 CD163 양성이 사용되는 경우가 많다.

[0048] 본 발명의 세포 집단은, 당해 세포 집단 중의 항염증성 매크로파지의 비율이, 상기 단핵구의 배양 전의 세포 집단에 비해 통상 2배 이상, 바람직하게는 4배 이상, 보다 바람직하게는 5배 이상으로 증가하고 있다. 항염증성 매크로파지가 M2 매크로파지인 경우, 상기 단핵구의 배양에 의해 풍부화된 M2 매크로파지의 비율은 인간의 경우, 상기의 M2 매크로파지 마커로 해석한 경우, 도너에 의해 개인차가 있기는 하지만 대체로 배양 전에는 2% 이하인 것에 비해, 배양 후는 배양 전에 비해 단핵구 전체의 비율로서 대폭 증가한다. 배수에 대해서는 분모가 되는 배양 전의 PBMC에 있어서의 M2 매크로파지가 1% 미만인 경우가 많고, 그 경우라도 E 배양 후의 단핵구 중의 M2 매크로파지가 10% 이상이 되는 경우가 많기 때문에, 배율에서는 10배부터 100배로도 풍부화된다. 결과적으로, 예를 들면 인간의 경우, 배양 후의 세포 집단에 있어서의 M2 매크로파지의 비율은 5% 이상, 많은 경우 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 통상은 10% 이상이 되는 경우가 많고, 많을 때는 20% 이상으로 풍부화된다. 이러한 점에서, 본 발명의 세포 집단은, 전체 단핵구에 대해 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 바람직하게는 10% 정도, 특히 바람직하게는 15%, 더욱더 바람직하게는 20% 이상의 M2 매크로파지를 포함한다. 배양 후의 세포 집단은, 더욱 M2 매크로파지의 비율을 높이기 위해서, 소망에 따라 농축해도 된다. M2 매크로파지의 비율이 낮으면 충분한 항염증성 효과가 얻어지지 않는다.

[0049] 항염증성 매크로파지의 증폭은 예를 들면, 대상으로 하는 동물종에 따라 적절히 선택되지만, 인간의 경우, CD206(Cluster of Differentiation은 CD를 의미한다) 및/또는 CD163를; 마우스의 경우, Galactin-3 및/또는 CD206를; 래트의 경우, CD163를, 그것(그것들)에 친화성을 갖는 항체에 의해 표식하고, 플로우 사이토메트리 해석에 의해 계측할 수 있다.

[0050] 본 발명의 세포군에 있어서는, 항염증성 매크로파지의 함유량이 높아지는 한편, 염증성 매크로파지(예, M1 매크로파지)의 함유량이 저하되어 있다. 본 발명의 세포 집단은, 당해 세포 집단 중의 염증성 매크로파지의 비율이, 상기 단핵구의 배양 전의 세포 집단에 비해 1/2 이하로 대폭 감소하고, 통상은 1/4 배 이하, 바람직하게는 1/8 이하로 감소하고 있다. 염증성 매크로파지가 M1 매크로파지인 경우, 상기 단핵구의 배양에 의해 감소한 M1 매크로파지의 비율은, 배양 후의 전체 단핵구에 대해 10% 미만, 5% 미만, 바람직하게는 3% 미만, 보다 바람직하게는 2% 미만일 수 있다. M1 매크로파지의 비율이 많으면 M2 매크로파지의 비율이 상대적으로 낮아져, 충분한 항염증성 효과가 얻어지지 않는다.

[0051] 염증성 매크로파지의 감소는, 예를 들면 인간의 경우, CCR2(C-C chemokine receptor 2)를, 그것에 친화성을 갖는 항체에 의해 표식하고, 플로우 사이토메트리 해석에 의해 계측할 수 있다.

[0052] 또는, 본 발명의 세포 집단은, 추가로 항염증성의 Th2 세포나, 제어성 T 세포를 포함할 수 있다. 따라서 본 발명의 세포 집단은, 항염증성 매크로파지에 더해, 추가로 항염증성의 Th2 세포나 제어성 T 세포가 풍부화된 세포 집단일 수 있다.

[0053] 본 발명의 세포 집단에 포함되는 세포는, 적절히 단리 및/또는 정제할 수 있다. 예를 들면 인간의 경우는, 항염증성 매크로파지의 표면 마커로서 CD206나 CD163, Galactin-3가 공지이므로, 이들 세포 표면 마커에 대해 친화성을 갖는 물질(예를 들면, 항체)을 이용하여 세포 분리법에 따름으로써, 원하는 세포가 분리될 수 있다. 이와 같은 세포 분리법으로는, 예를 들면, 자기(磁氣) 세포 분리법(MACS), 형광 세포 분리법(FACS)을 들 수 있다.

표면 마커로서 인간의 경우 CD206나 CD163가, 마우스의 경우 Galactin-3나 CD206가, 래트의 경우 CD163가 공지이다.

[0054] 본 발명의 세포 집단은, 항염증성 매크로파지가 풍부화되어 있기 때문에, 항염증 작용을 발휘할 수 있다. 특히 후술의 실시예에서 나타내어지는 바와 같이, 본 발명의 세포 집단은, 전신 투여된 경우에 폐에 트랩되는 일 없이, 장애/염증 부위에 집적할 수 있다. 본 발명에 있어서의 전신 투여란, 혈관내에 직접 세포 현탁액을 투여(예, 정맥내 투여)함으로써 세포 현탁액이 전신 순환하는 것을 말한다.

[0055] 또한, 폐로의 이행/트랩이 관찰되는 경우라도, 장애/염증 부위에의 집적에 영향이 나타나지 않는 정도이면, 실질적으로 「폐에 트랩되지 않는다」고 하여 본 발명에 포함된다.

[0056] 본 발명의 세포 집단은, 해당 세포 집단과 의약상 허용될 수 있는 담체를 함유하는 의약 조성물로서 제공될 수 있다. 해당 세포 집단에는 항염증성 매크로파지가 많이 포함되어 있는 점에서 항염증 작용을 제공할 수 있고, 따라서, 본 발명은 염증성 질환의 예방 및/또는 치료용 의약 조성물로서 제공될 수 있다.

[0057] 염증성 질환으로는, 염증을 수반하는 질환이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, 알레르기 관련 질환, 호흡기 관련 질환, 허혈성 질환, 당뇨병성 관련 질환, 뼈·연골의 염증성 질환, 뇌신경 관련 질환, 소화관의 염증성 질환, 자기면역 질환 중 염증을 수반하는 것을 말한다. 구체적으로는, 각종의 자기면역 질환(류마티스 관절염(RA), SLE, 강피증, 다발성 근염, 쉐그렌 증후군, ANCA 관련성 혈관염, 베체트병, 가와사키병, 혼합성 크리오글로불린혈증, 다발성 경화증, 길랭 바레 증후군, 근무력증, 1형 당뇨병, 바세도우병, 하시모토병, 애디슨병, IPEX, APS type-II, 자기면역성 심근염, 간질성 폐렴, 기관지 천식, 자기면역성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 크론병, 궤양성 대장염, 건선, 아토피성 피부염, 용혈성 빈혈, 자기면역성 갑상선염, 특발성 소아 관절염의 다관절염형 등)을 들 수 있다.

[0058] 본 발명의 의약 조성물은, 통상, 유효 성분인 본 발명의 세포 집단과 의약상 허용될 수 있는 담체를 혼합하여 제조할 수 있다. 구체적으로는 본 발명의 세포 집단이 액상의 담체에 현탁되어 있는 양태가 예시될 수 있다. 액상의 담체는 인간에게 주입 가능한 액체이면 어느 것이어도 되고, 예를 들면, 인산 완충액이나 생리 식염수 또는 배지 등도 이용 가능하다. 또 액상의 담체에는 알부민 등 세포의 생존에 바람직한 화합물이 포함되어도 된다. 바람직하게는 알부민을 포함하는 화합물로서 환자 유래의 혈청을 들 수 있다.

[0059] 본 발명의 의약 조성물은, 유효 성분으로서, 상기 본 발명의 M2 리치 MNC를 함유하고, 해당 M2 리치 MNC에는 치료 유효량의 M2 매크로파지가 포함된다. 치료 유효량이란, 본 발명의 의약 조성물을 피험체에게 투여한 경우에, 해당 의약 조성물을 투여하고 있지 않은 피험체와 비교하여 상기와 같은 질환에 대해 치료 효과를 얻을 수 있는 M2 매크로파지의 양이다. 구체적인 치료 유효량으로는, 투여 방법, 사용 목적 및 피험체의 연령, 체중, 증상 등에 따라 적절히 설정할 수 있다.

[0060] **실시예**

[0061] 이하 실시예를 나타내어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 실시예는 본 발명의 설명을 위해 기재하는 것이며, 본 발명을 조금도 한정하는 것이 아니다.

[0062] 모든 실험은, 국가 및 연구기관의 윤리 위원회의 승인을 얻고 있다. 국립연구평의회의 실험동물 취급 지침에 의거하여, 도카이 대학 의학부의 동물 실험 위원회로부터도 승인을 얻고 있다.

[0063] 1. PBMC(래트)의 단리와 배양

[0064] 전부 120마리의 래트를 사용했다. 마취하 래트의 복부 대동맥으로부터 10mL 시린지에 장착한 헤파린화(500IU) 익상침을 이용하여 말초혈을 채취하고, Histopaque(나카라이 테스크, 교토, 일본)를 이용한 밀도 구배 원심법에 의해 말초혈 단핵구(PBMC)를 단리했다. 배양에 이용하는 무혈청 배지는, stemline™ II(Sigma-Aldrich)를 이용하고, 기지(旣知)의 방법(비특허문헌 5)에 준하여 조제했다(이하, Effective 배지, 줄여서 E 배지라고도 칭한다). 1 웰당 2×10^6 세포/2mL E 배지의 조건하, 단리한 PBMC를 5일간 배양했다(이하, 당해 배양을 Effective 배양, 줄여서 E 배양이라고도 칭한다).

[0065] 배양 후의 세포 집단은 M2 매크로파지가 풍부화된 단핵구 유래의 세포 집단이다(이하, M2 리치 MNC라고도 칭한다).

[0066] 2. 플로우 사이토메트리 해석

[0067] 플로우 사이토메트리 해석은 하기와 같이 행하였다.

[0068] 2mM EDTA/0.2% BSA/PBS 버퍼에, 4×10^5개의 PBMC와 M2 리치 MNC를 따로따로 현탁한 45μL의 세포 현탁액을, 미리 표식 항체를 등량으로 분주(分注)한 4개의 튜브에 넣고 30분간 4℃에서 배양한 후, 1mL의 2mM EDTA/0.2% BSA/PBS 버퍼로 2회 세정했다. 500μL의 고정 버퍼(BioLegend)로 실온 20분간 고정한 직후에, 세포를 FACS 버퍼로 2회 세정했다. 그 후, 세포막 투과용 버퍼(BioLegend)를, 세포를 포함한 튜브에 넣고 실온에서 15분간 배양하고, 항CD68-FITC(BIO-RAD)를 이용하여 염색하고, FACS 버퍼로 2회 세정했다. 데이터는 FACS Verse(BD Biosciences)로 취득하고, FlowJo™ 소프트웨어 버전 10.2(Tomy Digital Biology)를 이용하여 해석했다. 사용한 모든 모노클로널 형광 표식 항체의 상세를 표 1에 나타낸다.

[0069] [표 1]

Antibody	Isotype	Manufacture name & catalog #
CD3-FITC	FITC mouse IgM	BioLegent, #201403 and #401606
CD4-PE/Cy7	PE/Cy7 mouse IgG1, ƙ	BioLegent, #201516 and # 400126
CD8a-AlexaFlour 647	AlexaFlour 647 mouse IgG1	BioLegent, #201710 and #400130
CD25-PE	PE mouse IgG1, ƙ	BioLegent, #202105 and #400112
CD11b/c-PerCP/Cy5.5	PerCP/Cy5.5 mouse IgG2a	BioLegent, #201820 and #400258
CD68-FITC	FITC mouse IgG1	BIO-RAD, #MCA1209F and MCA341F
CD163- AlexaFlour 647	AlexaFlour 647 mouse IgG1	BIO-RAD, #MCA342A647 and MCA1209A647
CD34-PE	PE mouse IgG1, ƙ	Novus Biologicals, #NBP2-29455 and BioLegent, #400112

[0070]

[0071] 3. 래트 심근경색 유발 방법과 세포 이식 실험

[0072] 체중 150-200g의 6-10주령 루이스 래트(수컷)(Charles River, 일본)를 사용했다. 세포 표식 실험에는, 일본 내셔널 바이오 리소스 프로젝트(래트)로부터 입수한 Lew-CAG-eGFP 트랜스제닉 래트(수컷)를 사용했다. 동물을 2-4%의 세보플루란(마루이시 세이야쿠, 일본)으로 마취하고, 충분한 마취 후, 구내(口內)로부터 14 게이지 정맥 카테테르를 삽관하고, 설치류용 벤틸레이터로 매분 10mL/kg 60회 벤틸레이션을 행하였다(UGO Basile S.R.I., 이탈리아).

[0073] 간결하게는, 좌흉을 개흉한 후, 좌전하행지(LAD) 동맥을 기보(旣報)(Iwasaki H. et al., Circulation, 2006; 113:1311-1325)에 기재한 방법으로 Monoplane 6-0 suture(Ethicon Inc., 미국)를 이용하여 봉합했다. 봉합부로부터 떨어진 심장벽 전부(前部)의 백화와 박동 장애에 의해 심근경색을 확인했다. 흉부근을 4-0 나일론으로 봉합하고, 피부는 3-0 실크로 봉합하여 폐흉했다. 심근경색 유발 3일 후에, M2 리치 MNC(1×10^5개 세포)를 투여한 군(M2 리치 MNC 투여군)과 PBMC(1×10^5개)를 투여한 군(PBMC 투여군)으로 나누었다. 컨트롤군에는 RPMI 배지액(GIBCO)을, 미정맥(尾靜脈)으로부터 24 게이지의 angiocathether(테루모)를 이용하여 투여했다. 투여한 세포를 추적하기 위해, Lew-CAG-eGFP 트랜스제닉 래트를 이용했다.

[0074] 4. 심에코

[0075] 래트의 심에코(EchoCG)는, 2.0%의 세보플루란 마취하에서, 기록계를 탑재한 ALOKA ProSound SSD4000 모델을 사용하여 행하였다. 본 연구에서는, 모든 래트에게 베이스 라인의 흉벽 경유(經胸壁) 에코 도플러를 행하고, 심근경색 후에 생존한 래트를 1, 2, 3, 4주간의 기간 경과를 행하였다. 유두근 레벨에서의 좌심실(LV)의 2차원 단축도의 취득 방법은 상법(常法)에 따랐다(Anzai A. et al., Circulation, 2012; 125:1234-1245). 다음 식으로부터, 구출(驅出) 분획률 EF=(EDV-ESV)/EDV×100%과, 내경 단축률 FS=((LVIDd-LVIDs)/LVIDd)×100%을 계산했다(Iwasaki H. et al., Circulation, 2006; 113:1311-1325; Anzai A. et al., Circulation, 2012; 125:1234-1245). 심장 카테테르로는 microtip catheter(Miller Instruments Inc., Houston, USA)를 이용했다.

[0076] 5. M2 리치 MNC(마우스)의 조제

[0077] 실시예 6에서 사용하는 쉐그렌 증후군의 병태 모델 동물과 유전적 백그라운드가 거의 동일한 마우스(Cb6F1/Slc)를 이용하여 마우스 유래의 M2 리치 MNC를 조제했다. 기지의 방법(비특허문헌 5) 및 상기 「1. PBMC(래트)의 단리와 배양」에 준하여, 마우스로부터 PBMC를 단리하고, 단리한 PBMC를 E 배양하여 M2 매크로파지가 풍부화된 단핵구 유래의 세포 집단인 「M2 리치 MNC(마우스)」를 얻었다.

[0078] 6. M2 리치 MNC(인간)의 조제

[0079] 인간 말초혈을 이용하여 M2 리치 MNC를 조제했다. 기지의 방법(비특허문헌 5) 및 상기 「1. PBMC(래트)의 단리와 배양」에 준하여, 인간 말초혈로부터 PBMC를 단리하고, 단리한 PBMC를 E 배양하여, M2 매크로파지가 풍부화된 단핵구 유래의 세포 집단인 「M2 리치 MNC(인간)」을 얻었다.

[0080] 7. 헤마톡실린·에오신(HE 염색)

[0081] 시판의 헤마톡실린 용액 및 에오신 용액을 이용하여, 마우스의 침샘 표본의 연속 절편을 염색했다.

[0082] 8. RT-qPCR 해석

[0083] 세포 및 조직으로부터 전체 RNA를 단리하고, High Capacity cDNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems)를 이용하여 cDNA로 역전사했다. cDNA 혼합물을 밀리Q수(Millipore Corporation, Billerica, MA)로 희석하고, SYBR green master mix(Applied Biosystems)를 제조원의 매뉴얼에 따라 첨가했다. 각 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 상대적 mRNA 발현을 기보에 따라 측정했다(Bustin SA, et al., Clinical chemistry. 2009; 55(4):611-22.).

[0084] 9. 통계 해석

[0085] 모든 값은 평균±표준 편차로 나타냈다. 2군 사이의 비교에는 Mann-Whitney U test와 Kruskal Wallis test, 3군 사이의 논파라메트릭인 비교에는 Dunn's multiple comparison test를 이용했다. 타군 사이의 비교에서, 다른 시계열 사이의 값의 비교에는, 2-way ANOVA와 포스트 호크 Turkey's test를 이용했다. 모든 통계 해석은, GraphPad Prism 7.1(GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용했다. $P<0.05$를 통계적 유의차로 했다.

[0086] 실시예 1: M2 리치 MNC의 유전자 발현 프로파일

[0087] 래트 PBMC 또는 M2 리치 MNC의 산포도를 나타낸다. 각각 림프구 사이즈의 세포 (A), 단구 사이즈의 세포 (B), 매크로파지 사이즈의 세포 집단 (C)를 전체생존 세포획분으로부터 게이트했다(도 1). 염증성의 성질을 나타내는 단핵구/매크로파지 타입 1(M1 매크로파지: M1φ)은, 전체생존 세포획분 중에서 CD68 양성, 또는 CD163 음성 또한 CD11b/c 공(共)양성의 세포로서 동정(同定)했다. 항염증성 또한 매크로파지 타입 2(M2 매크로파지: M2φ)는, 전체생존 세포획분 중 CD163 양성 또한 CD11b/c 공음성의 세포로서 동정했다.

[0088] 해석의 결과, 배양 전의 PBMC 세포 현탁액에서는 M1φ의 비율이 많은 한편, M2 리치 MNC에서는 유의하게 M1φ의 비율이 감소하고 있었다(CD68 양성 세포의 비율: 20±1.85% vs 5.5±1.3%, CD163 음성 또한 CD11b/c 공양성의 세포 비율: 17±2.01% vs 1.25±0.16%)(도 2A). 그에 비해, M2 리치 MNC에서는 PBMC에 비해, 항염증성 또한 M2φ의 비율이 대폭 증가했다(CD163 양성 또한 CD11b/c 공음성 세포의 비율: 0.06±0.03% vs 13±1.5%; $P<0.007$).(도 2B, 도 3). 이 데이터는, E 배양 후의 PBMC는, 매크로파지가 고전적인 M1φ로부터 M2φ로 컨버트되었을 가능성, 및 약 3%의 세포는 M1φ와 M2φ의 중간 스테이지에 있는 것을 시사하고 있다.

[0089] 래트 M1φ에서 특이적으로 발현하는 마커로서 CD38이, 래트 M2φ 특이적인 마커로서 erg2나 arg1이 알려져 있다. RT-qPCR 해석에 의해 M2 리치 MNC에서는 PBMC에 비해, M2φ의 마커인 arg1 및 erg2의 발현량이 증가하고 있었지만, M1φ의 마커인 CD38 및 il1b의 발현량은 저하하고 있었다. 염증에 관한 유전자의 발현은, M2 리치 MNC에서는, 예를 들면 ang1, ang2, vegfb의 발현이 대폭 상승하고 있었다.

[0090] T 림프구의 서브세트, 특히 세포 장애성 T 세포의 마커인 CD8 양성 세포의 비율은, CD3 양성 세포 전체 중에서, 10%로부터 2.3%($P<0.0087$)로 감소했다(도 4, 도 5). 면역 억제성의 T 세포 서브세트 마커인 foxp3 유전자의 발현은, M2 리치 MNC에서는 PBMC와 비교하여 4배 증가하고 있었다.

[0091] 이상의 점에서, 플로우 사이토메트리와 RT-qPCR의 데이터는, E 배양한 PBMC에서는, 조직 기능의 재생능을 갖는 항염증성 세포(M2φ)와 항염증성 유전자(arg1, erg2)의 발현, 혈관 형성성 세포(CD34 양성 세포, M2φ)와 혈관 신생 유전자(Angpt1, Angpt2, Vegfb)의 발현, 및 항염증성 세포의 비율을, 세포 장애성 T 세포의 감소와 면역

억제성 유전자의 발현(Foxp3)을 증가시킴으로써 증가시키는 것을 나타냈다.

[0092] 실시예 2: 심장 허혈 부위와, 타(他) 장기에 있어서의 M2 리치 MNC의 추적

[0093] PBMC와 M2 리치 MNC를 Lew-CAG-eGFP 래트로부터 단리하고, 심근경색 유발 3일 후에, 1×10^5개의 세포를 미정맥으로부터 투여했다. 세포 투여 4주간 후에, 면역조직화학적으로 투여 세포의 트레이싱 실험을 행하였다. 조직해석에서는, M2 리치 MNC 투여군에서는, eGFP 양성 세포는 허혈부와 허혈부 주위의 조직에서 관찰되었지만(도 6A, B), PBMC 투여군에서는 관찰되지 않았다(도 6C). 또한, 많은 eGFP 양성 세포는, PBMC 투여군에서는 M2 리치 MNC 투여군에 비해, 유(柔)조직인 비장이나 폐에서 트랩되어 있었다(도 6D, E).

[0094] 실시예 3: M2 리치 MNC의 LV 퍼포먼스와 LV 재구축에의 효과

[0095] 수술 전과 수술 후 28일째에 래트의 체중 측정을 행하였다. 수술 후 4주째에서는, M2 리치 MNC 투여군의 체중은 306.4±5.9g으로, PBMC 투여군(277.6±6.1g, $P<0.0001$), 및 컨트롤(283.3±8.3g, $P<0.002$)에 비해 증가했다. Sham-operated군(281.5±7.9g, $P<0.01$)과 비교해도, M2 리치 MNC 투여군의 체중은 증가하고 있었다. 연속 심에코(EchoCG) 측정을, M2 리치 MNC 투여군(n=9), PBMC 투여군(n=11), 컨트롤군(n=9), 및 Sham-operated군(n=5)에서 행하였다. 심근경색 유발 2주째부터 28일 후까지, M2 리치 MNC 투여군의 내경 단축률(FS)은 증가한(45.5±4.6%) 것에 비해, PBMC 투여군(30.87±6.38%, $P<0.0001$), 및 컨트롤군(32.15±7.74%, $P<0.0008$)에서는 FS의 증가는 관찰되지 않았다. 허혈 부위 체적과 좌실 수축 기능(LVSDs)을 포함시킨 EchoCG 지표는, M2 리치 MNC 투여군에서는 (94.4±3.7μl와 0.35±0.03cm)로 상승했지만, PBMC 투여군에서는 (63.6±6.07μl, $P<0.004$와 0.49±0.03cm, $P<0.0002$), 컨트롤군에서는 (71.1±2.0μl, $P<0.03$과 0.46±0.03cm, $P<0.005$)로, LV 기능 수치는 악화되었다. 2D 도플러 모드 해석에서는, 승모판의 마일드, 또는 중간 정도의 기능 부전이 PBMC 투여군과 컨트롤군에서 관찰된 것에 비해, M2 리치 MNC 투여군에서는, 승모판의 기능 부전은 관찰되지 않았다.

[0096] 매우 흥미로운 점으로, 이 결과는 시리우스 레드 염색에서도 마찬가지의 결과가 얻어졌다. PBMC 투여군과 컨트롤군의 LV anterior-lateral측과 posterior-lateral측의 유두근은, 심근경색 후 손상되어 있었다(도 7A). 추가적인 조직 해석에서는, 과잉인 염증 반응에 의해, PBMC 투여군과 컨트롤군의 허혈 장애 부위는 넓어져 있고 심벽도 얇아져 있었던 한편, M2 리치 MNC 투여군에서는 유지되고 있고, LV의 재구성과 심벽의 비후(肥厚)가 M2 리치 MNC 투여군에서는 촉진된 것을 나타내고 있다(도 7A~C). 간질(間質)간의 콜라겐 단편화는 PBMC 투여군에서 유의하게 증가하고 있고, 컨트롤군에 있어서도, 통계적으로 M2 리치 MNC 투여군과의 유의차는 없기는 하지만, 조직의 섬유화가 높았다(도 7D, E).

[0097] 실시예 4: M2 리치 MNC에 의한 경색 후에 양측 「기능적 바이패스」의 형성

[0098] 래트 M2 리치 MNC의 복강내 투여 4주간 후, 「기능적 바이패스」가 관찰되었다. 이것은, LAD 봉합부로부터 떨어진 부위에 있어서, 동맥혈이 바이패스되는 현상이고, PBMC 투여군이나 컨트롤군에 있어서는 이 바이패스는 관찰되지 않으며, LV 동맥류와 주위의 조직(흉선과 흉벽 전부(前部))에의 심한 유착이 보이고, 심장의 박동을 방해하고 있었다. 이 현상이 혈관의 바이패스인지 여부를 확인하기 위해, 순간적으로 동결한 심조직의 슬라이스를 이소렉틴 B4와 aSMA로 염색했다. 공초점 현미경의 3차원 입체 재구축 화상의 해석으로부터, aSMA에 의한 혈관의 염색은, 허혈 부위에 있어서 수가 많으며, 넓은 혈관 내경의 값을 나타내고, 허혈 부위는 흉벽 유래의 소동맥(아마도 늑간동맥과 내흉동맥)에 의해 둘러싸여 있었다.

[0099] 실시예 5: 래트 심근경색에 있어서의 혈관 신생에 M2 리치 MNC가 주는 영향

[0100] 도 8A에서, 미소 혈관 밀도(MVD)를 이소렉틴 B4-FITC 염색으로 조사했다. MVD는 PBMC 투여군(260±35.7/㎟, $P<0.0001$)과 컨트롤군(298±45.5/㎟, $P<0.0001$)에 비해, M2 리치 MNC 투여군에 있어서 유의하게 높았다(558±44.4/㎟). 기능하고 있는 혈관의 형성을 조사하기 위해, 허혈 부위에 있어서의 1 평방 밀리미터당 소동맥 밀도를 계산한바, M2 리치 MNC 투여군에서는 PBMC 투여군(5.714±2.9/㎟, $P<0.03$), 및 컨트롤군(4.67±2.4/㎟, $P<0.01$)에 비해 높았다(도 8B).

[0101] 공초점 현미경을 이용한 3차원 입체 화상의 재구축으로부터, MVD 값은 M2 리치 MNC 투여군에서는 PBMC 투여군과 컨트롤군에 비해 상승하고 있었다(도 8C). 투여된 M2 리치 MNC가 호스트의 심장에서 혈관내피세포로 분화할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, Lew-CAG-eGFP 트랜스제닉 래트를 이용하여 면역조직화학적 해석을 행하였다. 결과는, 투여된 eGFP로 표식된 M2 리치 MNC는, 혈관내피세포의 마커인 CD31을 발현하고 있고, 또한, M2 리치 MNC 투여군에서는 1 평방 밀리미터당 MVD도 상승하고 있었지만, PBMC 투여군에서는 그와 같은 결과는 나타내지 않았

다(도 8D). RT-qPCR에 의한 해석으로부터, 혈관 신생에 관한 angpt1, angpt2 및 pecam1과 같은 유전자의 발현은, 세포 투여 3일 후에서, M2 리치 MNC 투여군에서는 컨트롤군에 비해 각각 3배, 9배, 5배 상승하고 있었던 것에 비해, PBMC 투여군에서는 컨트롤에 비해 그들 유전자의 발현은 2배, 1배, 2배 저하하고 있었다(도 8E).

[0102] 실시예 6: 쉐그렌 증후군 자연 발증 마우스에 있어서의 침샘 병태(림프구 침윤)의 진행에 있어서의 M2 리치 MNC가 주는 영향

[0103] 병태 모델 마우스를 이용하여, M2 리치 MNC가 폐 등에 트랩되지 않고, 효율적으로 염증 부위에 도달하여 약효를 발휘할 수 있는 것을 확인했다.

[0104] 병태 모델 동물로는, 쉐그렌 증후군 자연 발증 마우스(일본 SLC, NOD)를 이용했다. 이 마우스는 쉐그렌 증후군양의 침샘 장애를 자연 발증적으로 일으키는 것이 알려져 있다. 침샘 장애 발증 후(8주령 이후)에 M2 리치 MNC(마우스)를 미정맥내 투여하고, 침샘 분비 장애를 일으키는 20주령의 시점에서 침샘 조직의 병리 해석을 실시했다. M2 리치 MNC를 투여한 세포 투여군 1마리(세포 투여군 1), 무처치군 2마리(무처치군 1, 2) 각각으로부터 침샘 조직을 회수하고, 병리 조직학적 관찰로부터 「림프구 침윤 영역」을 특정했다.

[0105] 면적 측정치를 표준화시키기 위해, 하나의 침샘으로부터 연속 절편을 작성하고, 각각 화상 해석 소프트웨어(NIH ImageJ)를 이용하여 HE 염색한 복수의 절편(3장에서 6장)의 1 절편당 침샘 조직 면적을 산출하고, 평균치와 표준 편차(SD)를 산출했다. 또, 림프구 침윤 영역은, 화상 해석 소프트웨어로 모두 동일한 배율로 확대하여, 절편 사이의 면적을 상대 비교할 수 있도록 했다.

[0106] 1 절편당 침샘 조직의 면적은, 97,492～139,148 픽셀로 세포 투여군 및 무처치군 사이에서 유의한 차이는 없었다.

[0107] 한편, 1 절편당 림프구 침윤부의 면적에는, 세포 투여군과 무처치군에서 현저한 차이가 확인되었다(도 9).

[0108] 세포 투여군은, 무처치군에 비해 림프구 침윤부의 면적이 작은 것이 확인되었다.

[0109] 이상의 결과로부터, 래트뿐만 아니라, 마우스에 있어서도, 전신 투여한 M2 리치 MNC가 폐 등에 트랩되는 일 없이 염증 국소에 있어서 항염증 작용을 발휘하고, 조직의 기능 재생에 기여한 것이 확인되었다.

[0110] 실시예 7: 인간 PBMC의 E 배양에 의한 M2 매크로파지의 풍부화

[0111] 기지의 방법(비특허문헌 5) 및 상기 「1. PBMC(래트)의 단리와 배양」에 준하여, 인간 말초혈 유래 PBMC의 단리 및 단리된 PBMC의 E 배양을 실시했다. E 배양의 기간은 5～8일간이며, 실험에 의해, 배양 개시 후 5일째, 6일째, 7일째, 8일째에 세포를 회수했다(각각 day5, day6, day7, day8으로 표기했다).

[0112] 단핵구/매크로파지의 특이 마커인 CD11b가 양성이고, 또한 염증성의 성질을 나타내는 단핵구/매크로파지 타입 1(M1 매크로파지)은, 전체생존 세포획분 중에서 CD11b와 CCR2의 양(兩)양성 세포로서 동정했다. 항염증성의 성질을 나타내는 매크로파지 타입 2(M2 매크로파지)는, 전체생존 세포획분 중에서 CD11b와 CD206의 양양성 세포로서 동정했다.

[0113] 실험은 6회 각각 독립적으로 실시했다. 그중 실험 1, 실험 3, 실험 6이 도너 1, 실험 2와 실험 4가 도너 2, 실험 4가 도너 3으로부터 채혈한 말초혈을 이용하고 PBMC를 단리하여 E 배양했다(동일한 도너 유래의 PBMC의 채혈일은 다르다).

[0114] 해석의 결과, 표 2 및 도 10에 나타낸다.

[0115] [표 2]

실험 1

	배양 전	E 배양 후	
	PBMC	day5	day7
M1 매크로파지 (CD11b/CCR2 양양성)	24%	3%	1%
M2 매크로파지 (CD11b/CD206 양양성)	0%	25%	25%

실험 2

	배양 전	E 배양 후	
	PBMC	day5	day7
M1 매크로파지 (CD11b/CCR2 양양성)	31%	4%	2%
M2 매크로파지 (CD11b/CD206 양양성)	1%	11%	23%

실험 3

	배양 전	E 배양 후	
	PBMC	day5	day7
M1 매크로파지 (CD11b/CCR2 양양성)	25%	9%	3%
M2 매크로파지 (CD11b/CD206 양양성)	0%	16%	22%

실험 4

	배양 전	E 배양 후	
	PBMC	day6	day8
M1 매크로파지 (CD11b/CCR2 양양성)	20%	2%	2%
M2 매크로파지 (CD11b/CD206 양양성)	0%	12%	17%

실험 5

	배양 전	E 배양 후
	PBMC	day6
M1 매크로파지 (CD11b/CCR2 양양성)	19%	1%
M2 매크로파지 (CD11b/CD206 양양성)	0%	20%

실험 6

	배양 전	E 배양 후
	PBMC	day7
M1 매크로파지 (CD11b/CCR2 양양성)	13%	1%
M2 매크로파지 (CD11b/CD206 양양성)	0%	9%

[0116]

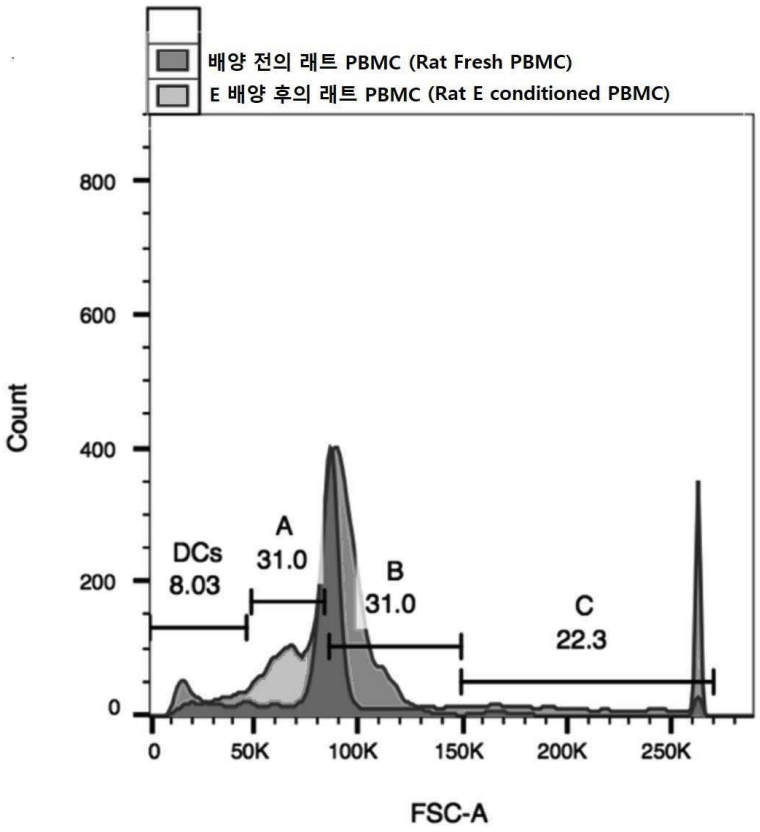
[0117] 표 2 및 도 10으로부터도 명확한 바와 같이, 다른 도너에 있어서 모두 배양 전의 PBMC에는 M2 매크로파지가 거의 검출되지 않지만, M1 매크로파지는 PBMC 세포 전체의 10-30%로 M2 매크로파지에 비해 많이 존재한다. 한편, E 배양 5일째 이후는 대체로 M2 매크로파지가 대폭 풍부화(단핵구 전체의 7% 이상, 많게는 9% 이상)되고, M1 매크로파지가 대폭 감소(단핵구 전체의 대략 5% 이하, 많게는 3% 이하)된다. 이 경향은 배양 5일째보다 6일째, 7일째 쪽이 현저했다.

[0118] **산업상 이용가능성**

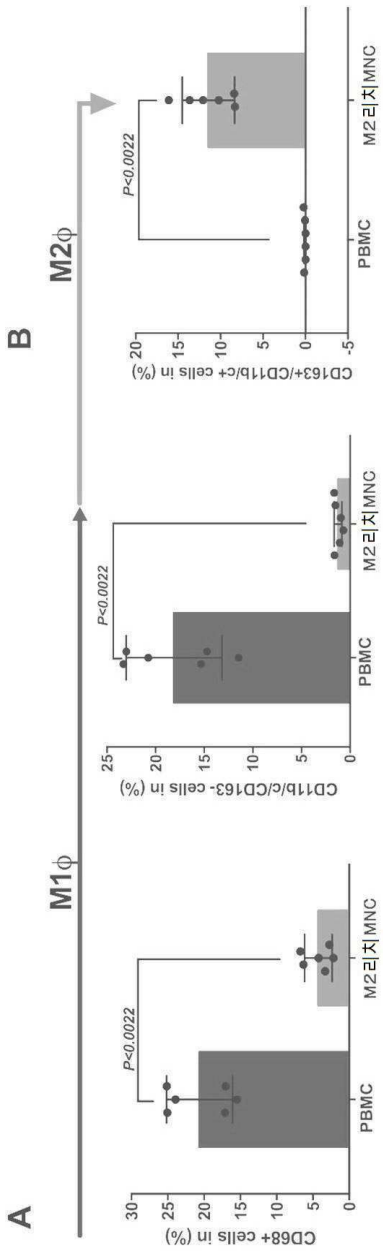
[0119] 본 발명의 의약 조성물은, M2 매크로파지가 풍부화된 세포 집단을 함유하고, 전신 투여된 경우에 폐에 트랩되지 않으며, 장애/염증 부위에 집적한다. 따라서, 본 발명의 의약 조성물은, 치료에 유효해지는 수의 항염증 작용을 갖는 세포를 표적이 되는 염증 또는 조직 손상 부위로 이행시킬 수 있다.

도면

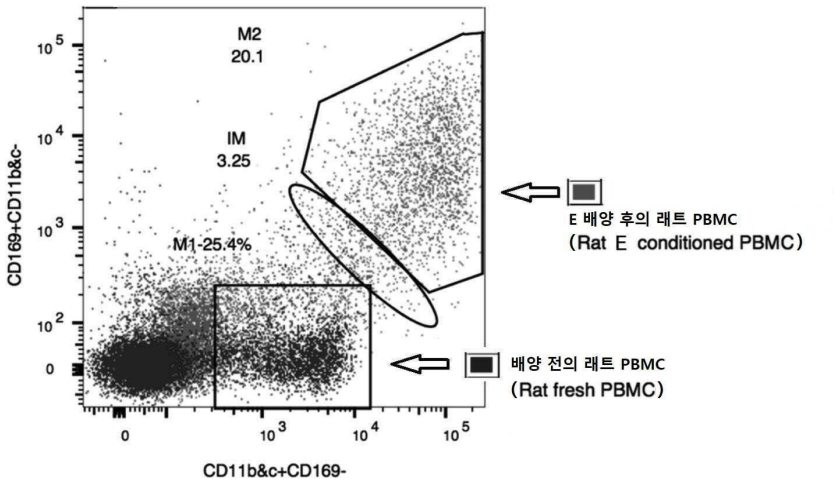
도면1


배양 전의 래트 PBMC (Rat Fresh PBMC)
E 배양 후의 래트 PBMC (Rat E conditioned PBMC)
Count
800
600
400
200
0
DCs
8.03
A
31.0
B
31.0
C
22.3
0
50K
100K
150K
200K
250K
FSC-A

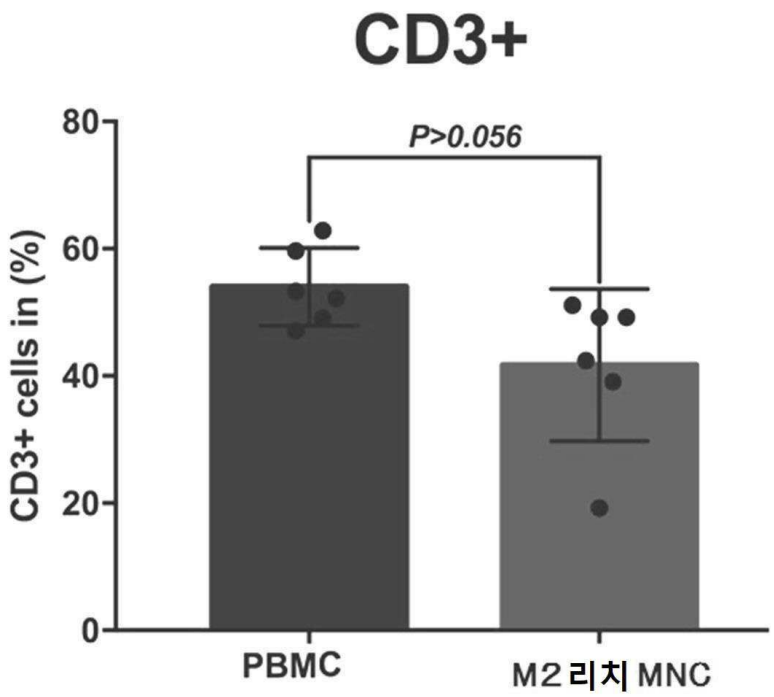
도면2


A
M1ϕ
CD68+ cells in (%)
P<0.0022
PBMC
M2리치MNC
B
M2ϕ
CD11b/c/CD163- cells in (%)
P<0.0022
PBMC
M2리치MNC
CD163+/CD11b/c+ cells in (%)
P<0.0022
PBMC
M2리치MNC

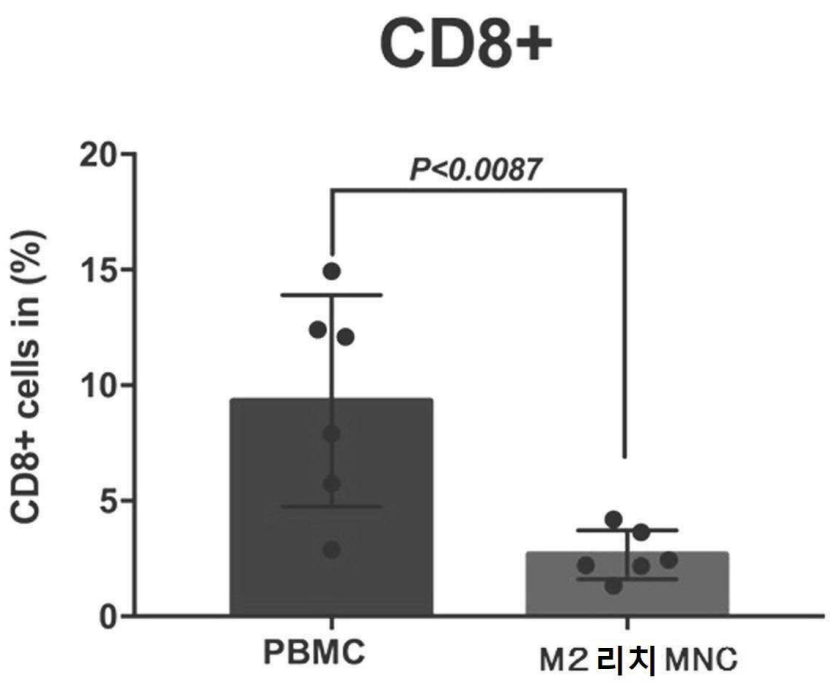
도면3


M2
20.1
IM
3.25
M1-25.4%
CD169+CD11b&c-
CD11b&c+CD169-
E 배양 후의 래트 PBMC
(Rat E conditioned PBMC)
배양 전의 래트 PBMC
(Rat fresh PBMC)

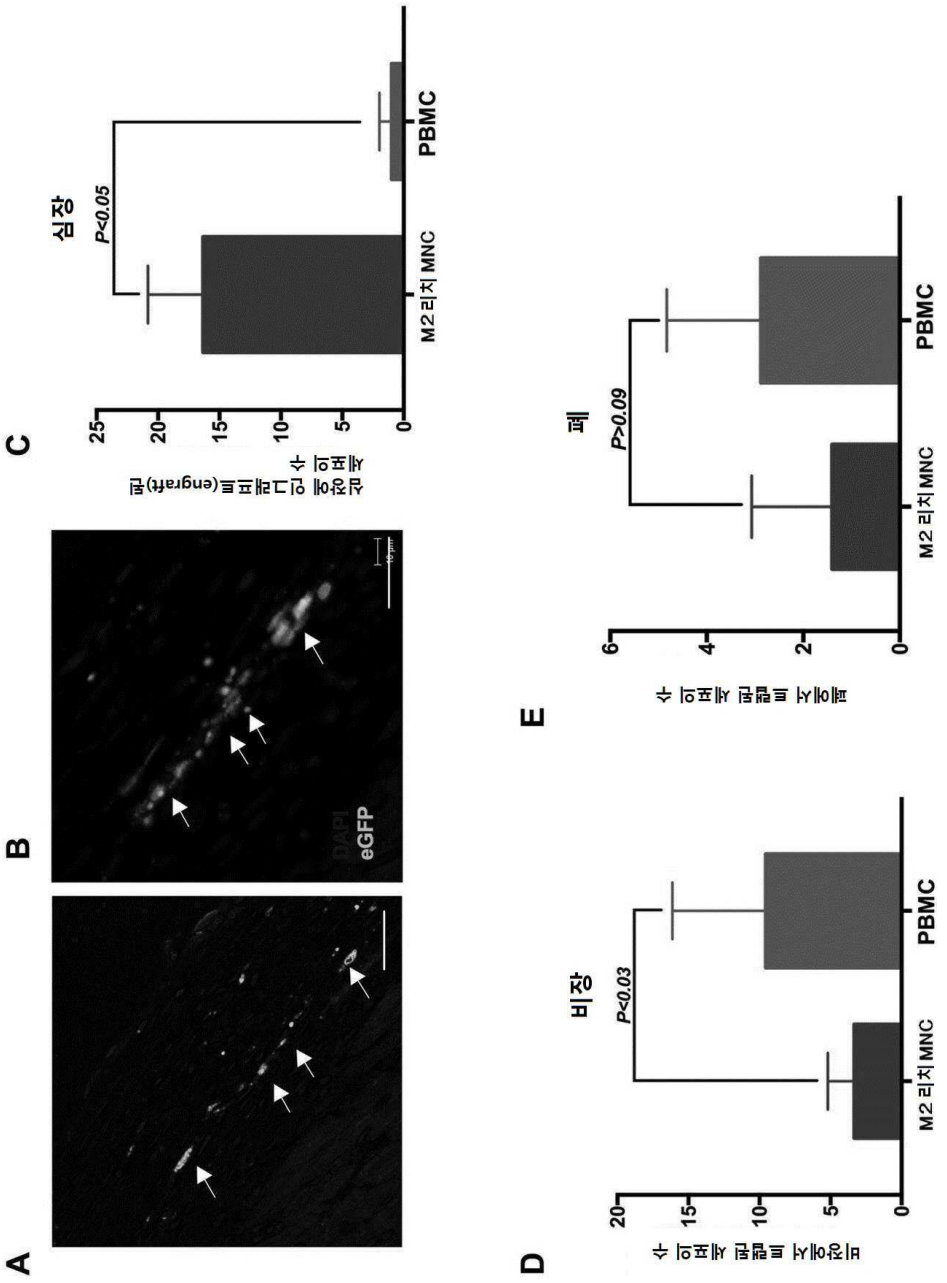
도면4


CD3+
P>0.056
CD3+ cells in (%)
PBMC
M2 리치 MNC

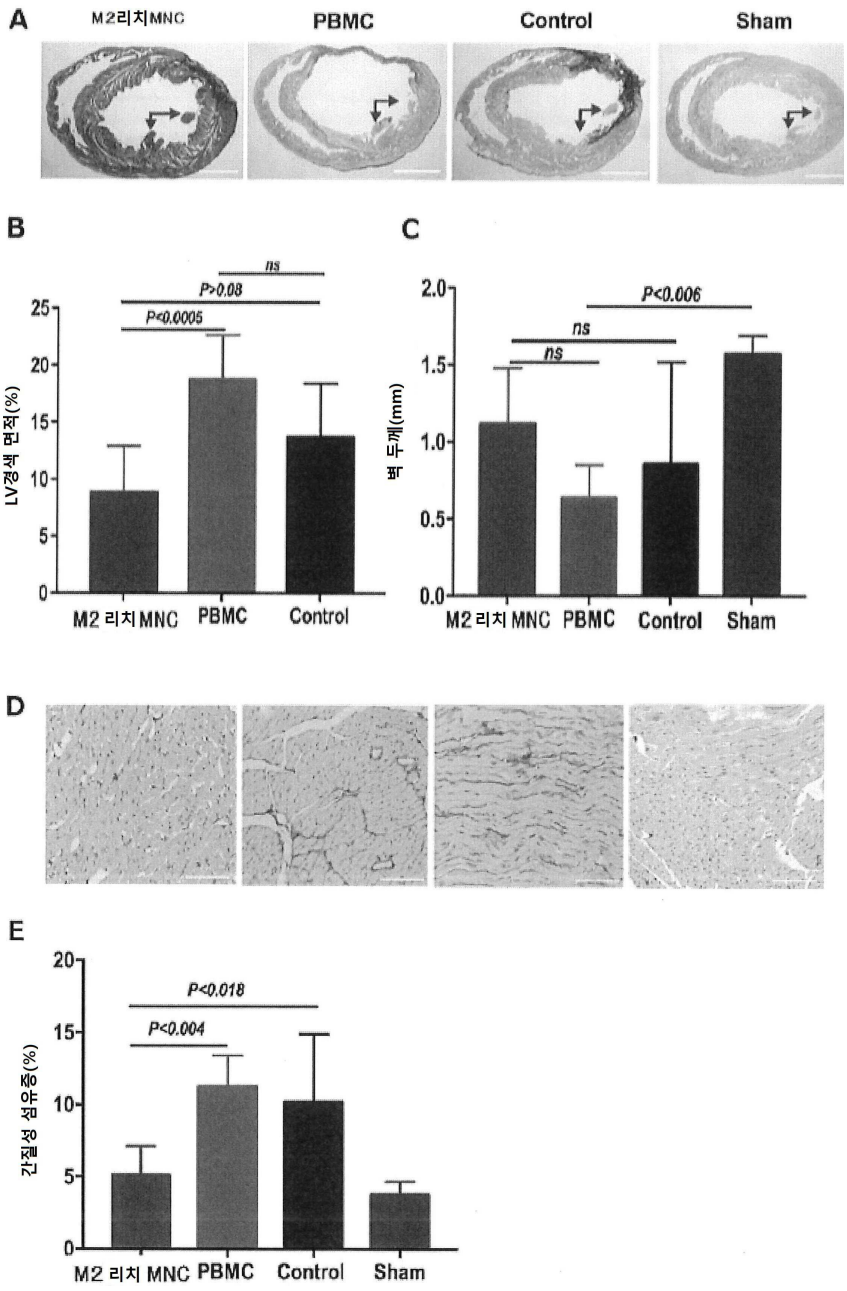
도면5



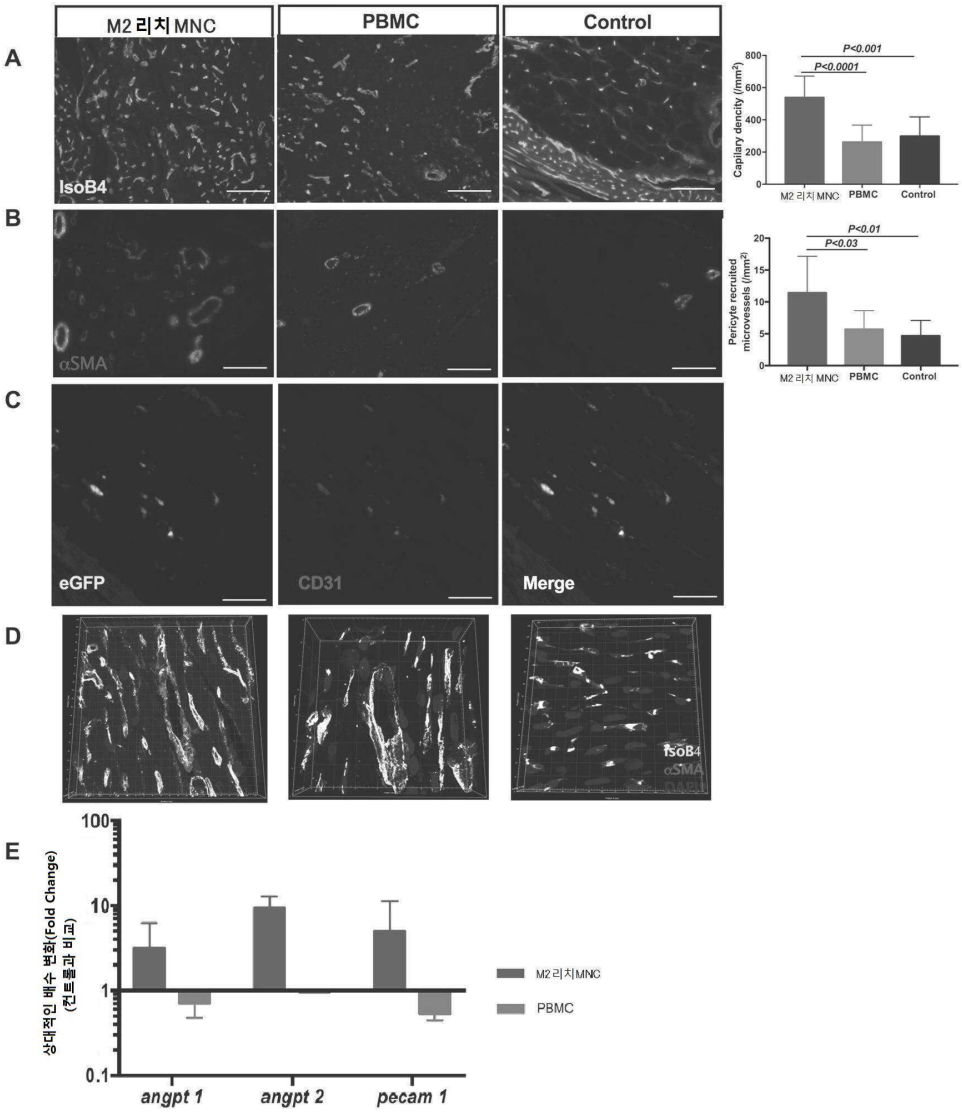
도면6


A
B
DAPI
eGFP
C
심장
P<0.05
M2 리치 MNC
PBMC
심장에 인그래프트(engraft)된 세포의 수
D
비장
P<0.03
M2 리치 MNC
PBMC
비장에서 트랙된 세포의 수
E
폐
P>0.09
M2 리치 MNC
PBMC
폐에서 트랙된 세포의 수

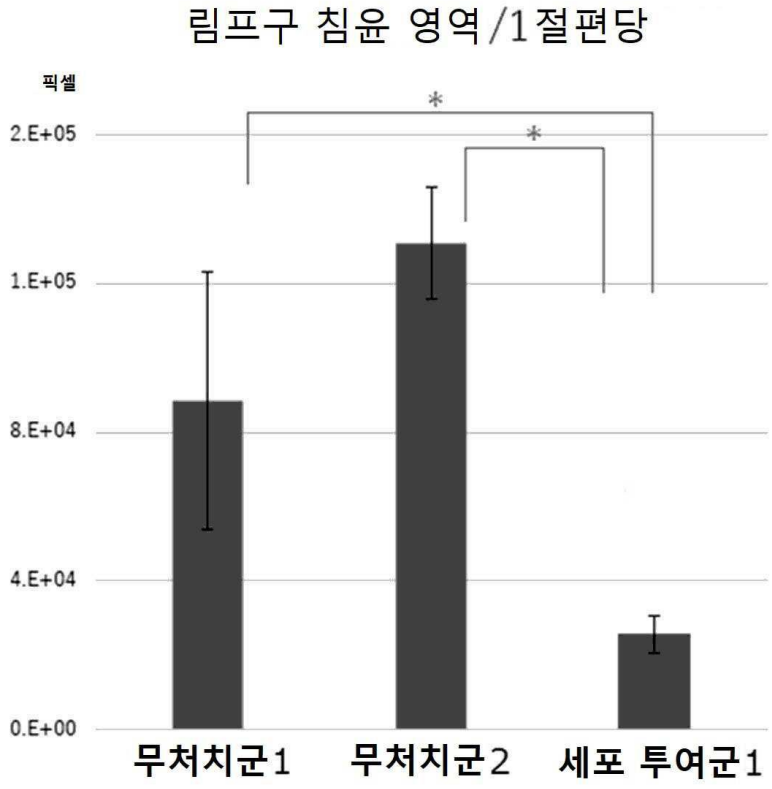
도면7


A
M2리치MNC
PBMC
Control
Sham
B
LV경색 면적(%)
P<0.0005
P>0.08
ns
M2 리치 MNC
PBMC
Control
C
벽 두께(mm)
P<0.006
ns
ns
M2 리치 MNC
PBMC
Control
Sham
D
E
간질성 섬유증(%)
P<0.018
P<0.004
M2 리치 MNC
PBMC
Control
Sham

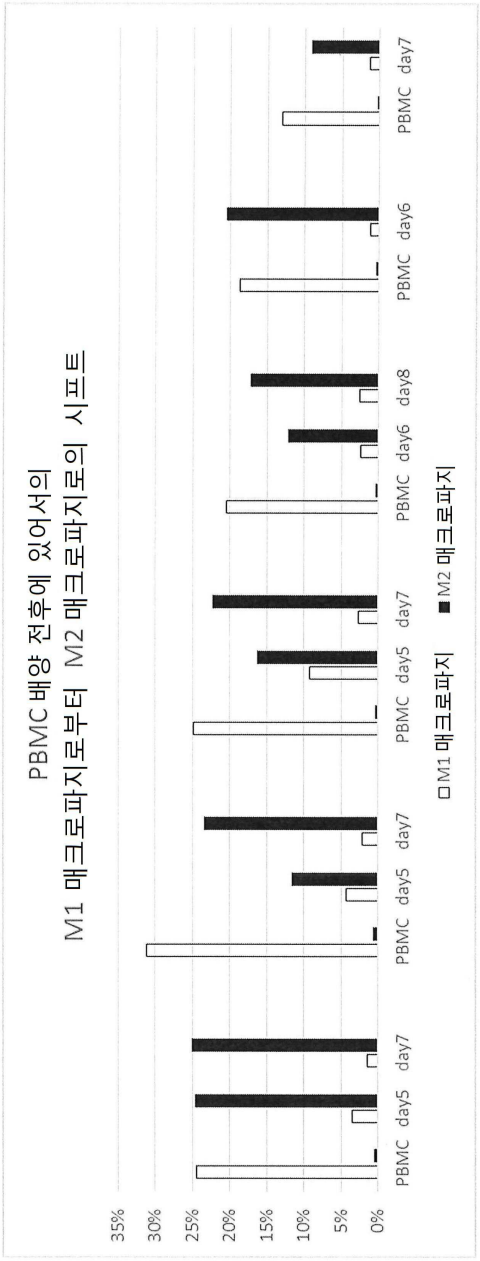
도면8


A
M2 리치 MNC
PBMC
Control
IsoB4
P<0.001
P<0.0001
Capillary dencity (/mm²)
800
600
400
200
0
M2 리치 MNC
PBMC
Control
B
αSMA
P<0.01
P<0.03
Pericyte recruited microvessels (/mm²)
20
15
10
5
0
M2 리치 MNC
PBMC
Control
C
eGFP
CD31
Merge
D
IsoB4
αSMA
DAPI
E
상대적인 배수 변화(Fold Change)
(컨트롤과 비교)
100
10
1
0.1
angpt 1
angpt 2
pecam 1
M2 리치 MNC
PBMC

도면9



도면10


PBMC 배양 전후에 있어서의
M1 매크로파지로부터 M2 매크로파지로의 시프트
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
PBMC day5 day7 PBMC day5 day7 PBMC day5 day7 PBMC day6 day8 PBMC day6 day7
□M1 매크로파지 ■M2 매크로파지