

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0085571 (43) 공개일자 2016년07월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 5/077</i> (2010.01) <i>A61K 35/34</i> (2015.01) (52) CPC특허분류 <i>C12N 5/0658</i> (2013.01) <i>A61K 35/34</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0002742 (22) 출원일자 2015년01월08일 심사청구일자 2015년01월08일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 박세영 서울특별시 도봉구 시루봉로 71, 110동 201호 (방학동, 청구아파트) 정성철 서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아) (뒷면에 계속) (74) 대리인 안소영

전체 청구항 수 : 총 17 항

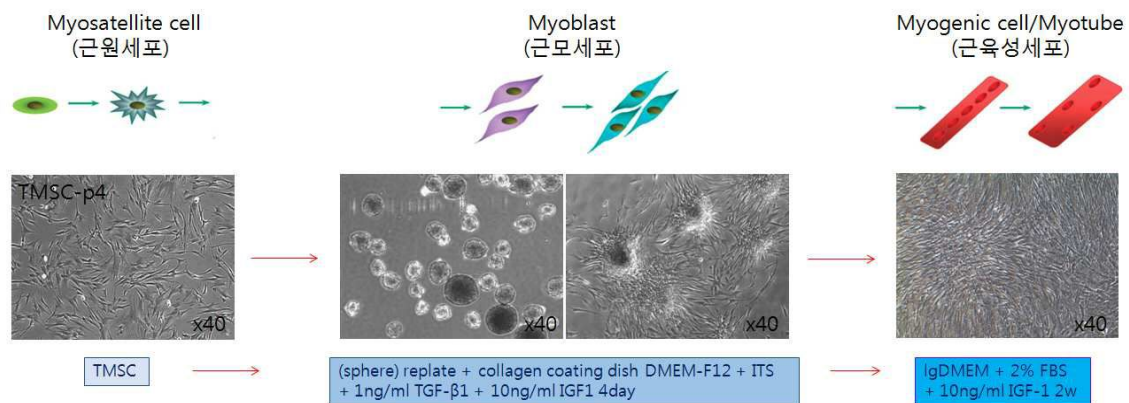
(54) 발명의 명칭 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포의 분화방법

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모 세포, 근육 세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

본 발명의 분화 방법은 근모 세포 및 근육 세포로의 높은 분화능을 보여 다량의 근모 세포 및 근육 세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 조직적합성이 높으며 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2500/25 (2013.01)

C12N 2501/15 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

(72) 발명자

김한수

서울특별시 영등포구 의사당대로 110, E동 503호
(여의도동, 미성아파트)

최병욱

서울특별시 강남구 삼성로 151, 7동 1001호 (대치
동, 선경아파트)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동
2001호 (두정동, 이안더센터럴)

유경하

서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호
(삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)

정남희

서울특별시 마포구 대흥로24다길 15-5 (염리동)

최윤영

서울특별시 성북구 송인로12길 14 (길음동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0135010014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-희귀질환사업

연구과제명 샤르코-마리-투스병의 신규 바이오마커 및 맞춤형 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수아미노산 및 TGF- β (Transformation growth factor- β)를 포함하는 배양 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 세포 응집체 형성은 비코팅된 배양접시 cm^2 당 4×10^6 내지 8×10^6 개의 세포를 부유 상태에서 1 내지 7일 동안 배양하는 것인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 2일 내지 7일 동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 상기 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement)는 5 ug/ml 내지 15 ug/ml 인슐린(Insulin), 2 ug/ml 내지 8 ug/ml 트랜스페린(transferrin) 및 4 내지 8 ng/ml 셀레늄(selenium)의 농도로 상기 성분을 포함하며; 0.5 내지 2 % 비필수아미노산; 및 100 pg/ml 내지 10 ng/ml TGF- β 가 첨가되는 배지에서 배양하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양 배지는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법.

청구항 6

- (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수아미노산 및 TGF- β 를 포함하는 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 분화된 근모세포를 FBS(fetal bovine serum) 및 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포(myogenic cell) 분화 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 1 내지 7일 동안 수행되며, 상기 (b) 단계의 배양은 2 내지 7일 동안 수행되고, 및 상기 (c) 단계의 배양은 14 내지 21일동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포 분화 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 (b) 단계의 상기 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement)는 5 ug/ml 내지 15 ug/ml 인슐린(Insulin), 2 ug/ml 내지 8 ug/ml 트랜스페린(transferrin) 및 4 내지 8 ng/ml 셀레늄(selenium)의 농도로 상기 성분을 포함하며; 0.5 내지 2 % 비필수아미노산; 및 100 pg/ml 내지 10 ng/ml TGF- β 가 첨가되는 배지에서 배양하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육세포 분화 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 (c) 단계는 1 내지 3 % FBS(fetal bovine serum) 및 1 ng/ml 내지 100 ng/ml IGF-1(Insulin-like growth factor-1)가 첨가된 배지에서 배양하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육세포 분화 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양 배지는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지이고, 상기 (c) 단계의 배양배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육세포 분화 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 제조된 근모 세포.

청구항 12

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 제조된 근육 세포.

청구항 13

제11항에 따른 근모 세포를 유효성분으로 포함하는 근육 손상 및 결핍 유발 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 근육 손상 및 결핍 유발 질환은 외상에 의한 근육 손상 및 결핍; 유전적 근육 손상 및 결핍; 또는 선천적 근육 손상 및 결핍에 의해 유발되는 것인 근육 손상 및 결핍 유발 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 근육 손상 및 결핍 유발 질환은 샤르코마리투스병(Charcot Marie Tooth disease , CMT), 근육성 질환(Muscular dystrophy), 선천성근이영양증(Muscular dystrophies), 대사성근병증 또는 피부근육염(Dermatomyositis) 중으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 근육 손상 및 결핍 유발 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제12항에 따른 근육 세포를 유효성분으로 포함하는 근육 손상 및 결핍 유발 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 근육 손상 및 결핍 유발 질환은 샤르코마리투스병(Charcot Marie Tooth disease , CMT), 근육성 질환(Muscular dystrophy), 선천성근이영양증(Muscular dystrophies), 대사성근병증 또는 피부근육염(Dermatomyositis) 중으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 근육 손상 및 결핍 유발 질환 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모 세포 및 근육 세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의

각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되고, 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있는 특성이 있으며, 분화 자극에 따라 상이한 세포로도 분화될 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0003] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포이며, 일부 줄기세포는 다분화능 또는 단분화능의 잠재력을 지닌다.

[0004] 상기 줄기세포들이 가지는 분화능을 기초로 세포 치료제로 이용 가능성이 있어 이와 관련된 연구 개발이 활발히 진행 중이다. 하지만, 배아 줄기세포를 이용한 세포 치료제의 경우 윤리적 문제나 조직 적합성 불일치 문제가 제기되고 있으며, 역분화 줄기세포를 세포 치료제로 사용할 경우 종양 발생 가능성의 문제가 있다.

[0005] 이에 따라, 분화능이 낮은 것으로 알려져 있지만 상대적으로 안전한 중간엽 줄기세포를 이용한 연구가 많이 진행되고 있다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)는 성체 골수 등에 있는 multi-potential non-hematopoietic progenitor cell로서 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 이러한 중간엽 줄기세포를 이용하여 다양한 조직 재생을 위한 임상 연구가 진행되고 있으며, 장기 이식 분야에도 적용가능성을 보이고 있다.

[0006] 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이다. 하지만 가장 비침습적인 방법인 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이기 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다.

[0007] 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 증식능력이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다.

[0008] 한편, 선천적, 유전적 근육의 결손 내지 손실 또는 외상, 종양 제거 등에 의한 조직의 결실에 따른 근육 관련 질환에서 줄기세포로부터 분화된 세포 치료제를 이용하여 관련 질환을 치료하려는 연구 개발이 진행되고 있다. 이와 관련하여, 특히 근육에서 추출한 muscle satellite cell를 근원세포로 분화시켜 이식하려는 연구가 다수 진행되고 있지만, 세포의 배양기간이 짧아 세포의 양적 확보가 어려운 단점이 있다. 또한, 근육 세포 분화용 배지를 이용하여 성체 줄기세포로부터 근육 세포로 분화를 유도하는 연구들이 일부 있지만, 분화 효율 면에서 그 이용이 매우 제한적이다.

[0009] 특히, 일부 중간엽 줄기세포는 근원 세포(Myosatellite cell)의 특성을 지니지 못하여 완전한 근육 세포로 분화가 어려워, 특정 유래를 선택하여 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포로 분화능을 조절하기 위한 연구가 필요하다. 또한, 상이한 유전적 기원, 유래 및/또는 배경을 가지는 중간엽 줄기세포들의 경우 중간엽 줄기세포를 규정하는 일부 기준들에 대해서는 서로 유의적 차이를 나타내지 아니하지만 통상적으로 각각의 생체 내 활성화에 있어서는 매우 큰 차이를 나타내는바, 특정 유래의 줄기세포로부터 분화 방법 및 분화된 세포 특성에 대한 확인 역시 필요하다.

[0010] 이에 따라, 근육 세포로의 높은 분화능을 보일 수 있는 특정 줄기세포로부터 최적의 분화 방법을 확인하여 인체 적용에 적합한 근육 세포를 확보하는 방안에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0103132호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0031300호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수 아미노산 및 TGF- β (Transformation growth factor- β)를 포함하는 배양 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 근모 세포에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명은 또한 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수 아미노산 및 TGF- β 를 포함하는 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 분화된 근모세포를 FBS(fetal bovine serum) 및 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포(myogenic cell) 분화 방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 근육 세포에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명자들은 인체 적용에 적합한 근모 세포 및 근육 세포의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 편도 유래 중배엽 줄기 세포로부터 근모 세포 및 근육 세포를 단기간에 대량 생산하는 방법을 발명하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에 서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 근원 세포(myosatellite cell)는 근육조직에서 볼 수 있는 가장 원시적인 세포(satellite cell)로, 정상근육에서 진정기(quiescent) 상태로 있다가 근육에 손상이 가해지면 활성화되어 증식(proliferation)하거나 분화(differentiation)하여 근모 세포(myoblast)를 만들 수 있는 세포를 의미한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 근모세포(myoblast)란 근육세포로 분화하는 과정 중의 전구세포(precursor cell)로 근원세포와 마찬가지로 증식을 하며 세포 간에 융합이 일어나서 myotube를 형성하고 근육세포(myogenic cell, myocyte)로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 근육 세포 (myogenic cell, myocyte)란 근모세포의 분화 과정을 통해, 근모세포로부터 생성된 근조직을 구성할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0021] 본 발명은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수 아미노산 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement)는 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄을 포함하는 첨가제로 무혈청(serum free) 또는 무단백질(protein free)의 분화용 배양액에서 혈청 성분을 대체하기 위한 첨가제이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 비필수아미노산은 체내에서 대사적으로 합성되지 않는 아미노산으로, 바람직하게 글리신, L-알라닌, L-아스파르트산, L-아스파라진, L-글루탐산, L-프롤린 또는 L-세린 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 형질전환 성장 인자 (Transformation growth factor- β , TGF- β)는 세포 분화의 조절에 중요한 역할을 하는 성장 인자로 세포들의 성장을 활성화한다.
- [0025] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법에 있어서, 상기 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계는 근모 세포 분화를 위해 분화 유도 세포 응집체인 구형상체(sphere)를 형성하는 단계이다. 본 발명에 있어서, 세포 부유는 비코팅된 배양 접시에서 cm^2 당 4×10^6 내지 8×10^6 개의 세포를 부유 상태에서 1 내지 7일 동안 배양하여 수행되는 것이 바람직하다. 세

포 응집체의 유도는 줄기세포사이의 상호작용을 증대하고, 배아체(embryonic body, EB)와 유사한 형태를 제조함으로써 이로부터 근모세포를 보다 더 적절하게 유도하기 위해 진행된다. 상기 (a) 단계의 배양 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640), MEM(Minimum Essential Media) 또는 Ham F10 으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지이다.

[0026] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법에 있어서, 상기 (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수아미노산 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계는 세포 응집체로부터 근모 세포를 유도한다. 상기 근모 세포를 유도하기 위한 배양은 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 폴리디라이신(poly-D-lysine) 또는 폴리엘라이신(poly-L-lysine), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine) 중 선택된 어느 하나 이상이 코팅된 배양배지에서 배양할 수 있으며, 5 ug/ml 내지 50 ug/ml의 콜라겐이 코팅된 배지에서 수행하는 것이 바람직하다. 상기 (b) 단계의 배양은 2일 내지 7일 동안 수행되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 (b) 단계의 상기 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement)는 (농도: 5 내지 15 ug/ml insulin, 2 내지 8 ug/ml transferrin, 4 내지 8 ng/ml selenium), 0.5% 내지 2% 비필수아미노산 (상업적으로 이용가능한 비필수 아미노산을 이용하였을 때, 배지 총 중량에 대한 중량 %) 및 TGF- β 는 100 pg/ml 내지 10 ng/ml의 농도로 포함되는 것이 바람직하다.

[0027] 또한, 상기 (b) 단계의 배양 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12), RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640), MEM(Minimum Essential Media) 또는 Ham F10 으로부터 선택된 어느 하나 일 수 있으며, 바람직하게 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지이다.

[0028] 본 발명의 근모세포 분화 방법은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 사용하여, 타 성체 줄기세포를 사용한 방법과 대비하여 현저한 분화능을 보이며, 이미 미분화된 상태에서 근원세포(myosatellite cell)의 성격을 가지고 있다는 점에서 타 유래 줄기세포를 사용하는 것과 대비하여 현저한 분화 효과를 가진다. 이러한 효과는 특히 근모 세포 분화에 전반적으로 발현되어지는 표지인자들의 높은 발현 패턴을 통해 확인가능하며, 본 발명의 분화 방법에 따라 분화된 근모세포는 다핵의 근육 세포(myogenic cell)를 형성하여 근섬유 (muscle fiber) 등을 형성할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양 배지에 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 세포 응집체를 ITS 첨가제 (Insulin-transferrin-selenium supplement), 비필수아미노산 및 TGF- β 를 포함하는 배지에서 배양하여 근모세포를 유도하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 분화된 근모세포를 FBS(fetal bovine serum) 및 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포(myogenic cell) 분화 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계 및 (b) 단계는 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 분화 방법과 같이 적용될 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, IGF-1(Insulin-like growth factor-1)는 인슐린과 유사 작용을 하는 성장인자로 근육 내 세포의 증식과 분화, 근조직 내 핵의 수, 근섬유의 크기 증가, 근육의 재생의 기능을 가진다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 1 내지 7일 동안 수행되며, 상기 (b) 단계의 배양은 2 내지 7일 동안 수행되고, 및 상기 (c) 단계의 배양은 14 내지 21일동안 수행되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 (c) 단계의 상기 FBS는 상업적으로 이용가능한 FBS를 배양배지 총 중량에 대해 1 내지 3 중량%의 저농도 (fetal bovine serum) 및 상기 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 첨가된 배지에서 배양하는 것이 바람직하다.

[0032] 또한, 상기 (c) 단계의 배양배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640), MEM(Minimum Essential Media) 또는 Ham F10 으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지이다.

[0033] 본 발명의 근육 세포 분화 방법은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 사용하여, 타 유래의 성체 줄기세포를 사용한 방법과 대비하여 현저한 분화능을 보이며, 이미 미분화된 상태에서 근원세포(myosatellite cell)의 성격을 가지는 편도 유래 줄기세포를 이용하여 타 분화 방법과 대비하여 우수한 분화능을 가진다. 이러한 효과는 특히 근육 세포 분화에 전반적으로 발현되어지는 표지인자들의 높은 발현 패턴을 통해 확인가능하다. 본 발명의 미분화된 상태의 편도유래 줄기세포에서는 전능성 표지 인자인 Klf4(Kruppel-like factor 4), Rex1(reduced expression

1) 및 Activin이 발현되며 분화가 진행되면서 발현이 감소된다. 또한, 미분화된 상태의 편도유래 줄기세포에서는 근육 생성 초기 발현 인자인 Pax7(Paired box protein) 및 Myf6(myogenic factor 6)가 발현되어, 편도 유래 줄기세포 자체로써 근원세포(myosatellite cell)의 성격을 띠기 때문에, 근모세포 및 근육 세포로써 현저한 분화능 및 증식능을 가지며 더욱이 이러한 Pax7(Paired box protein) 및 Myf6(myogenic factor 6)들은 분화가 진행되면서 감소된다.

[0034] 본 발명은 또한, 상기 근모 세포 분화 방법에 따라 제조된 근모 세포를 제공한다. 본 발명에 따라 제조된 근모 세포는 편도 유래 줄기세포와 대비하여 근육 생성 초기 발현 인자인 Pax7(Paired box protein) 및 Myf6(myogenic factor 6)를 발현하며; 분화 제조된 근모세포에서 Desmin, α -actinin, Dystrophin, MHC(Myosin Heavt chain) 및 α -SMA(α -Smooth muscle actin)이 증가하는 특성을 가져, 전체적으로 근모세포로의 우수한 특성을 가진다.

[0035] 본 발명은 또한 상기 근육 세포 분화 방법에 따라 제조된 근육 세포를 제공한다. 본 발명에 따라 제조된 근육 세포는 근육 발생에 따라 Dystrophin 및 Myogenin의 증가된 발현을 가지며, MyoD, Desmin, α -actinin, MHC(Myosin Heavt chain) 및 α -SMA(α -Smooth muscle actin)이 근원 세포와 대비하여 증가된 특성을 가져, 전체적으로 근육 세포로의 특성을 가진다.

[0036] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 근모 세포 분화 방법 또는 근육 세포 분화 방법에 따라 제조된 근모 세포 또는 근육 세포를 유효성분으로 포함하는 근육 손상 및 결핍 유발 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 근육 손상 및 결핍 유발 질환에 사용될 수 있다.

[0037] 상기 근육 손상 및 결핍 유발 질환은 외상에 의한 근육 손상 및 결핍; 유전적 근육 손상 및 결핍; 또는 선천적 근육 손상 및 결핍에 의해 유발되는 질환이다. 근육 손상 및 결핍 유발 질환은 예컨대, 선천적으로 혹은 유전적으로 근육의 결손을 가지고 있거나, 외상, 종양제거 등으로 조직이 손실되었을시 발생 가능한 질환이다. 바람직하게, 샤르코마리투스병(Charcot Marie Tooth disease, CMT), 근육성 질환(Muscular dystrophy), 선천성근이영양증(Muscular dystrophies), 대사성근병증 또는 피부근육염(Dermatomyositis)으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0038] 상기 근육 손상 및 결핍 유발 질환 치료용 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제, 분무제 등이 바람직하다. 또한, 상기 근육 손상 및 결핍 유발 질환 치료용 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 분화 방법은 근모 세포 및 근육 세포로의 높은 분화능을 보여 다량의 근모 세포 및 근육 세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 조직적합성이 높으며 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모 세포 및 근육 세포로 분화를 위한 분화 단계별 방법 및 세포 형태를 나타낸 도이다.

도 2는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모 세포 및 근육 세포로의 분화 단계별 세포 특성을 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 근모 세포 및 근육 세포로 분화시키면서 단계별 세포 특성을 면역 형광염

색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 근모 세포 및 근육 세포로 분화시키면서 단계별 세포 특성 및 분화능을 면역형광염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 근모 세포 및 근육 세포로 분화시키면서 단계별 세포 특성을 웨스턴 블랏팅을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0042] <실시예 1> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양
- [0043] 편도유래중간엽줄기세포(tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC)는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)을 얻어, 줄기세포를 분리하여 10% FBS (Hyclone), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO), 0.1 mM β -머캅토에탄올(Sigma), 1% 비필수아미노산(GIBCO)이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)에서 배양하였다.
- [0044] <실시예 2> 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포 분화
- [0045] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포의 분화는 하기 단계를 거쳐 수행되었다.
- [0046] 분화를 유도하기 위한 첫 번째 단계로 구형상체(sphere)를 형성하였다. 구형상체는 100 mm 페트리접시(petri dish)에 cm^2 당 4×10^6 내지 8×10^6 개의 세포를 부유하여 2~3일 동안 세포응집을 유도함으로써 제조하였다.
- [0047] 상기 형성된 구형상체는 10 ug/ml 콜라겐(Sigma)이 코팅된 배양접시에 재부착(replating)되었고, ITS 배양액 보충제(final concentrations: 10 ug/ml insulin, 5.5 ug/ml transferrin, 6.7 ng/ml selenium, Life technologies), 1% 비필수아미노산(GIBCO) 및 1ng/ml TGF- β (Sigma)가 첨가된 DMEM/F12 배양액 내에서 4일 동안 배양되었다. 이를 통해 근모 세포 (Myoblast)를 제조하였다.
- [0048] 또한, 상기 분화된 근모세포는 2% FBS 및 10 ng/ml IGF-1 (Sigma)이 첨가된 DMEM 배양액에서 14일 동안 추가로 배양되었다. 이를 통해, 근육 세포(myogenic cell, myotube)를 제조하였다.
- [0049] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근모세포 (myoblast)를 거쳐 근육 세포(Myogenic cell/Myotube)의 분화 과정에 대한 전반적인 프로토콜 및 세포 Morphology는 도 1에 나타내었다.
- [0050] <실시예 3> PCR을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포로의 분화능 및 특성 확인
- [0051] 편도 유래 중배엽 줄기세포로부터 근육세포로의 분화 특성을 알아보기 위하여 Pluripotent marker, Myosatellite marker 및 Myogenic marker의 발현 정도를 분석하였다.
- [0052] RNeasy mini kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 제조자의 지시서에 따라 총 RNA를 추출하였다. Superscript II (Invitrogen)와 oligo-d(T)20 프라이머를 이용하여 42 °C에서 1시간, 72°C에서 15분 반응하여 cDNA를 합성하였다. cDNA로부터의 표적 서열(primer)은 premix kits (Invitrogen, Bioneer)를 사용하여, 95°C에서 3분 동안 최초 변성(denaturation) 시키고, 95°C에서 30초간 변성시키고, 53~60°C에서 45초간 어닐링(annealing) 후 72°C에서 45초간 증폭(extension)하는 과정을 35회 반복하였다. 증폭된 cDNA는 1.2% 아가로스 겔에서 분리하고 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하여 확인하였다.
- [0053] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 미분화된 편도 유래 중배엽 줄기세포가 Klf4, Rex1 및 activin 유전자를 발현하는 것을 확인하였다. 상기 유전자들은 전능성 표지인자(pluripotent marker)에 해당하며, Myoblast cell에서도 일부 발현되었으나 분화가 진행되면서 감소하였다. 또한, Pax7과 Myf6의 발현이 미분화된 편도 유래 중배엽 줄기세포와 Myoblast cell에서 확인되어 근원 세포(Myosatellite cell)로 이용할 수 있음이 확인되었다. 또한, 편도 유래 중배엽 줄기 세포로부터 Myogenic cell로 분화시 Myogenic marker인 Myogenin 및 Dystrophin의 발현이 증가하는 것을 확인하여, 근육 세포로의 분화를 확인하였다.
- [0054] 상기 실험 결과를 통해, 편도 유래 중배엽 줄기세포는 전능성을 확인하였고 근원세포의 특성도 이미 가지고 있었으며 이로부터 분화된 세포는 근모세포와 근육 세포의 특성이 있음이 확인되었으며, 편도 유래 중배엽 줄기세

포로부터 근모 세포 및 근육 세포로의 우수한 분화능 및 증식능을 확인하였다.

[0055] <실시예 4> 면역 형광분석을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포로의 분화능 및 특성 확인

[0056] 편도 유래 중배엽 줄기세포의 분화 단계별 변화를 면역형광염색을 통해 확인하였다. 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 분화 단계별 세포는 커버 슬립(cover slip) 위에서 배양되어 제조되었으며, 분화를 마친 후 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde) 용액으로 15분간 실온에서 고정한 후 PBS로 세척되었다. 세척된 세포는 0.1% Tween-20 및 2% 소혈청알부민(Bovine serum albumin)을 첨가한 PBS 용액에서 1시간 처리되었고, 발현을 확인하고자 하는 항체는 생산자가 지시한 비율대로 희석되었고 PBS에 첨가한 후 실온에서 1시간 또는 냉장 상태에서 밤새 반응이 이루어졌다. 뒤이어 다시 PBS 용액으로 세척된 뒤, 실온 또는 냉장 상태에서 TRITC (tetrarhodamine isothiocyanate) 또는 FITC (fluorescein isothiocyanate) 접합체의 2차 항체를 1차 항체로 동일 방법에 의해 처리되었다. 대조 염색으로 세포핵을 염색하기 위해 DAPI가 첨가된 마운팅용액(Vectashield)이 사용되었고 마운팅 후 형광현미경으로 관찰되었다.

[0057] 면역 형광 분석은 Pax7, Desmin, α -actinin, Dystrophin, MHC, α -SMA에 대해서 수행되었으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0058] Pax-7은 초기 배발달 시기에 신경능 발달과 낭배형성에 중요한 역할을 하며 근육전구세포의 조절을 통하여 근육 생성에 중요한 역할을 하는 전사인자로, 근육생성의 초기에 발현되는 것으로 알려져 있다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 미분화된 편도 유래 중배엽 줄기세포(TMSC)에서 부분적으로 발현을 보였으나 분화가 진행되면서 발현이 감소된 것을 확인하였다.

[0059] 데스민(desmin)은 살코미어에 있는 Z-line 근접한 곳에서 찾을 수 있는 intermediate filament로 골격근, 평활근, 심근조직에서 볼 수 있는 단백질이다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 미분화된 편도 유래 중배엽 줄기세포(TMSC)에서는 발현하지 않았지만 근모세포단계(TMSC-derived myoblast) 및 근육 세포 단계(TMSC-derived myogenic cell)에서 강하게 발현되는 것이 확인되었다.

[0060] 알파액티닌(α -actinin)은 skeletal muscle의 Z-line과 smooth muscle의 dense body에 액틴필라멘트가 부착하는데 필수적인 마이크로필라멘트 단백질이다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 근모세포에서부터 발현이 나타나기 시작하여 근육 세포에서 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[0061] 디스트로핀(dystrophin)은 막대모양의 세포질단백질로 근섬유의 가장 바깥쪽 근필라멘트층과 살코미어사이에 위치하며, 세포막을 통과하여 세포외기질을 감싸는 근섬유의 세포골격과 접해있는 단백질복합체의 필수적인 부분이다. 디스트로핀도 데스민(desmin)과 마찬가지로 미분화 상태의 편도 유래 중배엽 줄기세포에서 발현하지 않았지만 근모 세포단계 및 근육 세포 단계에서 강한 발현을 나타내는 것을 확인하였다.

[0062] 마이오신헤비체인(Myosin Heavy Chain, MHC)은 근육세포에서 흔하게 발견되는 단백질로, 근육의 수축과 이완에 관여하며 액틴과 결합하여 actomyosin을 형성한다. 또한 알파 스무스 머슬 액틴(α -Smooth muscle Actin, α -SMA)은 근섬유아세포(myofibroblast) 형성의 표지인자로 사용되며, 섬유화에도 중요한 역할을 하고 혈관평활근 세포 내에 우세하게 존재하는 액틴 아이소폼이다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, MHC 및 α -SMA는 미분화상태에서 일부 형광 발현이 확인되었으나, Myoblast 및 Myotube로 분화가 진행됨에 따라 형광 발현이 더 증가함이 확인되었다. 또한, 근육 세포로 분화되었을 때의 마이오신과 액틴의 형태로부터 세포 간 융합에 따른 myotube 형태 형성을 확인하였다.

[0063] 또한, 근육 생성의 초기에만 발현하는 Pax7과 근육 생성의 중간단계인 근모세포에서부터 근육 세포까지 발현을 나타내는 α -actinin의 면역 형광 분석 결과 및 발현량을 수치화한 결과를 도 4에 나타내었다. Pax7은 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 높은 발현량을 나타내다가 분화를 시킨 근모 세포와 근육 세포에서 발현되지 않음을 확인하였다. α -actinin는 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 발현되지 않다가 분화를 유도한 근모세포 및 근육 세포에서 발현량이 증가되는 것을 확인하였다.

[0064] <실시예 5> 웨스턴블롯팅을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육 세포로의 분화능 및 특성 확인

[0065] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 근육세포로의 분화를 웨스턴블롯팅을 통해 확인하였다.

[0066] 상기 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포와 분화 단계별 세포를 취하여 단백질 분해효소 억제제(Roche)가 포함된 라이시스 완충액에 넣고 파쇄하였다. 전체 단백질(10-30 μ g)을 확인하고자하는 1차 항체로 면역블롯팅하고, GAPDH (Abcam)를 내부 대조군으로 사용하였다. LAS-3000 (Fuji film)를 이용하여 밴드의 세기를 정량화하고

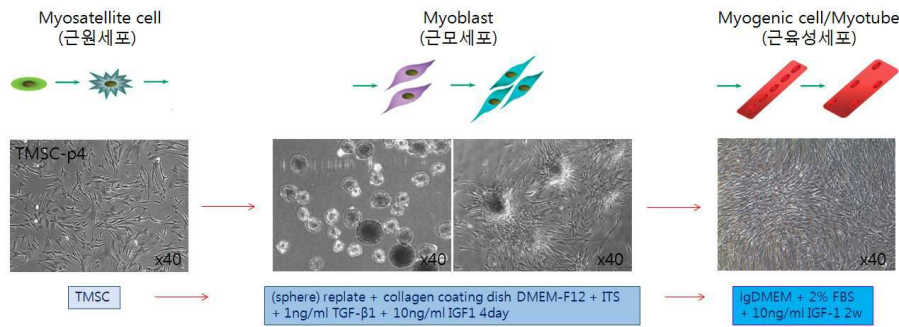
GAPDH의 세기로 표준화하였다.

[0067]

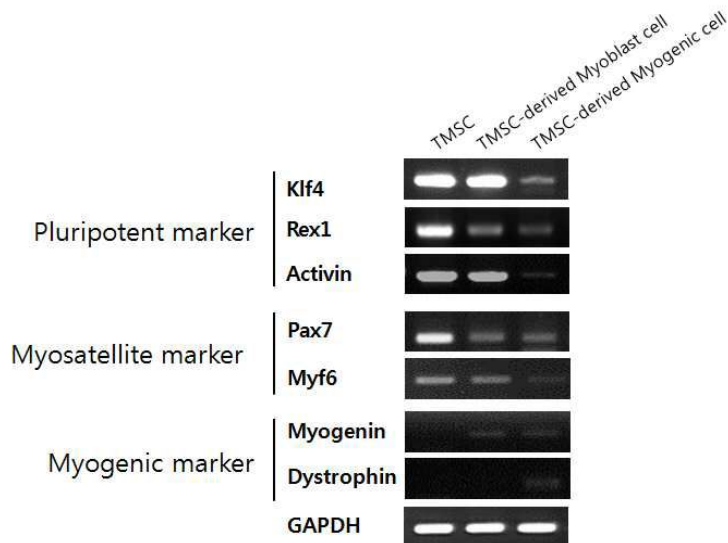
그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 확인되는 바와 같이, 마이오디(MyoD), α -actinin, desmin, α -SMA 단백질이 미분화된 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 매우 낮은 발현량을 보였으나, 분화가 진행되면서 그 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

도면

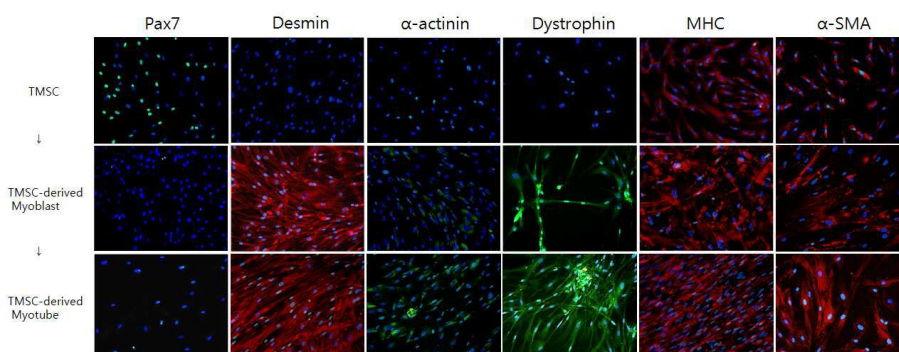
도면1



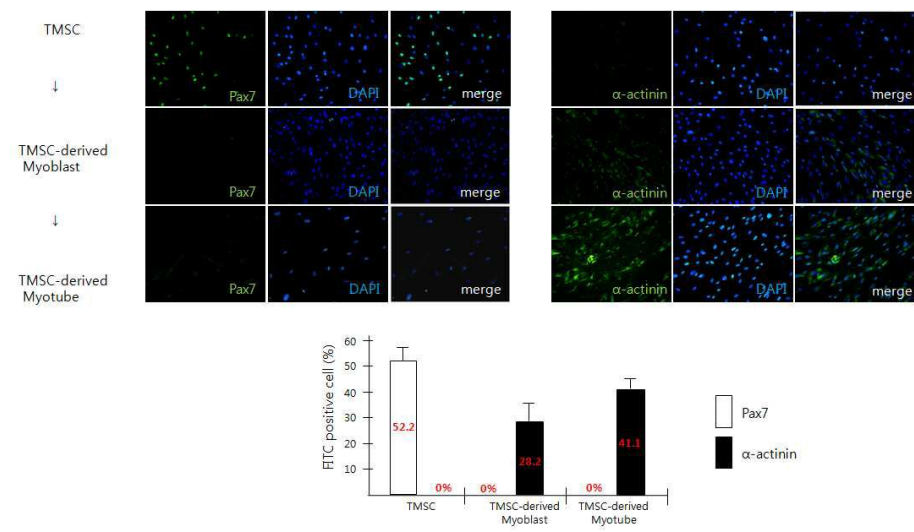
도면2



도면3



도면4



도면5

