(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0065147
(43) 공개일자 2015년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/50 (2015.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01) *A61P 17/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0170045
(22) 출원일자 2014년12월01일
심사청구일자 2014년12월01일
(30) 우선권주장
61/910,207 2013년11월29일 미국(US)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
송순욱
경기도 성남시 분당구 동판교로 123 107동 702호 (백현동, 백현마을1 단지판교푸르지오그랑블아파트)
전명신
서울 송파구 올림픽로 289, 2704호 (신천동, 잠실시그마타워)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

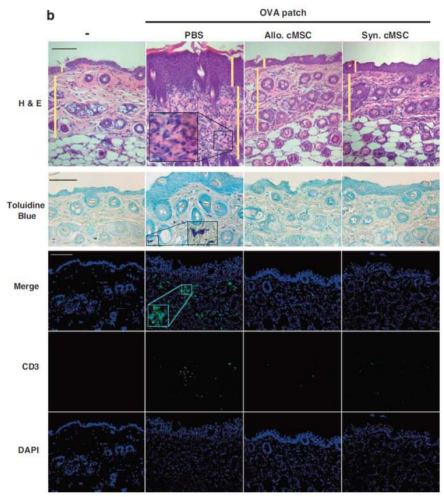
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **클로날 중간엽 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 층분리 배양법에 의하여 분리된 줄기세포는 T 세포의 증식 및/또는 IFN-γ 및 IL-4의 생산을 억제할 수 있으며, B 세포의 증식 및/또는 IgE 생산을 억제할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 클래스 전환 DNA 재조합 및/또는 플라즈마 세포 분화를 억제하고, OVA로 유도된 아토피성 피부염 동물 모델에서 그 증상을 현저히 완화시키는 바, 효과적인 아토피성 피부염 치료제로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도5b



(72) 발명자

이택기

경기도 양주시 고읍로 36-10 산내들마을우남퍼스트빌아파트 102동 1301호

나광민

경기 광명시 하안로 237, 806동 1003호 (하안동, 하안주공8단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0019637
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 인하대학교 산학협력단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 차세대 성체줄기세포의 면역세포조절 기능연구
기 여 율 60/100
주관기관 인하대학교
연구기간 2011.06.01 ~ 2014.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2011-0013452
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 인하대학교 산학협력단
연구사업명 이공분야기초연구사업
연구과제명 단일클론 중간엽줄기세포의 T 세포 면역조절 기전연구
기 여 율 40/100
주관기관 인하대학교
연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 Sca-1, CD44, CD73, 및 CD105에 양성의 면역학적 특성을 나타내었으며, MHC (major histocompatibility complex) class II, CD45, CD103, 및 CD117에 음성의 면역학적 특성을 나타내는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 지방세포, 연골세포 또는 골세포로의 분화능을 가지는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 T 세포의 증식 및/또는 인터페론-γ (IFN-γ) 및 인터루킨-4 (IL-4)의 생산을 억제하는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 B 세포의 증식 및/또는 IgE 생산을 억제하는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 클래스 전환 DNA 재조합 및/또는 플라즈마 세포 분화를 억제하는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 탯줄, 태반, 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막, 및 탈락막으로 구성된 군에서 선택되는 것으로부터 유래된 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 줄기세포는 이종, 동종이계, 또는 자가 줄기세포인 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 층분리 배양법은,

(i) 줄기세포를 포함하는 샘플을 제 1용기에 배양하여 상층액을 수득하는 단계;

(ii) 제1용기의 상층액을 제 2용기에 옮기는 단계;

(iii) 상기 제2용기에 존재하는 세포를 배양하여 상층액을 수득하는 단계;

(iv) (ii) 및 (iii) 단계를 3회 이상 반복하는 단계;

(v) 단일 세포 유래 콜로니를 분리하는 단계; 및

(vi) 상기 콜로니로부터 성장 배지로 세포를 옮기고, 세포를 배양하는 단계;를 포함하는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 층분리 배양법은

(vii) 세포를 3 내지 25 계대로 확장시키는 단계를 추가로 포함하는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 배양용기는 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기인 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 용기는 평평한 바닥을 갖는 것인, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 10 에 있어서 상기 용기는 세포 접착제로 코팅된 것인, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 세포 접착제는 하전된 아미노산 중합체를 포함하는 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 세포 접착제는 콜라겐, 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트, 폴리글루타메이트 또는 이들의 조합인 것인, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아토피성 습진으로도 알려진 아토피성 피부염 (Atopic dermatitis, AD)은 매우 흔한 염증성 피부 질환으로 전 세계적으로 아이들의 ~5-20%에 영향을 미칩니다. AD의 발생빈도는 특히 아프리카, 동부 아시아, 서유럽, 및 북

유럽 등지에서 지난 20년 동안 증가하였다. 급성 AD의 발병 기전은 $CD4^+$ T 세포 및 호산구의 피부 침투, 및 면역 글로불린 E (IgE) 및 Th2 사이토카인의 증가를 그 특징으로 하는 Th2-지배적 염증반응과 관련된다. AD에 대해 알려진 치료법은 현재까지 전무하다. 다만, 피부연화제, 국소 글루코코르티코스테로이드 (glucocorticosteroids), 칼시뉴린 억제제, 광선치료, 면역억제제와 같은, AD에 대한 간접적 치료 방법이 존재할 뿐이다. 이러한 치료법은 염증을 감소시키나, 부작용을 초래한다. 따라서, AD 치료를 위한 새로운 치료 방법의 개발이 시급하다.

[0003] 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cells, MSCs)는 T 세포 증식의 억제, 수상 세포 기능 억제, B 세포 증식과 말단 분화의 억제, 및 NK (natural killer) 세포 및 대식세포와 같은 다른 면역 세포들의 면역제어를 포함하는, 면역 억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0004] MSCs의 면역 반응 조절 기능에 기인하여, 중간엽 줄기세포는 이식편대 숙주 질환 (graft-versus-host disease, GVHD), 콜라겐-유도 관절염 (collagen-induced arthritis, CIA), 실험적 자가면역 뇌척수염 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus, SLE), 패혈증, 급성 췌장염 (acute pancreatitis, AP), 대장염, 및 다발성 경화증 (multiple sclerosis, MS)과 같은 염증 관련 질환의 환자를 치료하기 위한 치료적 소스로 여겨진다.

[0005] 중간엽 줄기세포의 면역제어 메커니즘의 관점에서, MSC-매개 면역 억제는 염증전 사이토카인 인터페론 (IFN)-γ 단독, 또는 종양 괴사인자 (TNF)-α, 인터루킨-1α, 또는 인터루킨-1β와 함께 분비됨에 따라 면역세포에 의한 MSCs의 예비적인 활성이 요구되는 것으로 알려져 있다. In vivo GVHD 모델에서, 상기 중간엽 줄기세포가 질병의 발생을 억제하기 위해서는 IFN- γ 가 필수적이라는 것을 보여줌으로써, 상기와 같은 가설을 증명하였다. 따라서, Th1-매개 질환들이 MSCs에 의하여 치료될 수 있는 질환으로 선택되어 왔다. 그러나, Th2-관련 질환에 대한 MSCs의 효과는 광범위하게 연구되지 않았다. 최근의 몇몇 연구는 비염과 천식 등의 알레르기 질환에 대한 중간엽 줄기 세포의 효과를 증명하고 있다. 그러나 AD에 대한 중간엽 줄기세포의 효과는 명확히 연구된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 층분리 배양법 (subfractionation culturing method, SCM)을 이용하여 마우스 골수로부터 동종이계 및 동계의 클로날 MSCs (cMSCs)를 동정하고, cMSC 계통을 확립하였다.

[0007] 또한, 상기 확립된 MSCs가 피부 질환 중 알러지성 염증에 면역제어 효과를 나타낼 수 있을 것으로 예상하고, 난백 알부민으로 유도된 아토피 동물모델 마우스에서 동계 및 동종이계의 cMSCs의 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양상은 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 상기 줄기세포는 Sca-1, CD44, CD73, 및 CD105에 양성의 면역학적 특성을 나타내었으며, MHC (major histocompatibility complex) class II, CD45, CD103, 및 CD117에 음성의 면역학적 특성을 나타낼 수 있다.

[0011] 상기 줄기세포는 지방세포, 연골세포 또는 골세포로의 분화능을 가질 수 있다. 상기 줄기세포는 T 세포의 증식 및/또는 IFN-γ 및 IL-4의 생산을 억제할 수 있으며, B 세포의 증식 및/또는 IgE 생산을 억제할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 클래스 전환 DNA 재조합 및/또는 플라즈마 세포 분화를 억제할 수 있다.

[0012] 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게 탯줄, 태반, 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막, 및 탈락막으로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0013] 또한, 상기 줄기세포는 이종, 동종이계, 또는 자가 줄기세포일 수 있다.

[0014] 상기 층분리 배양법은

[0015] (i) 줄기세포를 포함하는 샘플을 제 1용기에 배양하여 상층액을 수득하는 단계;

[0016] (ii) 제1용기의 상층액을 제 2용기에 옮기는 단계;

[0017] (iii) 상기 제2용기에 존재하는 세포를 배양하여 상층액을 수득하는 단계;

[0018] (iv) (ii) 및 (iii) 단계를 3회 이상 반복하는 단계;

[0019] (v) 단일 세포 유래 콜로니를 분리하는 단계; 및

[0020] (vi) 상기 콜로니로부터 성장 배지로 세포를 옮기고, 세포를 배양하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 방법은 (vii) 세포를 3 내지 25 계대로 확장시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 상기 배양용기는 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기인 것일 수 있고, 용기는 평평한 바닥일 수 있다. 상기 용기는 세포 접착제로 코팅된 것일 수 있으며, 상기 세포 접착제는 하전된 아미노산 중합체일 수 있다. 상기 세포 접착제는 콜라겐, 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트, 폴리글루타메이트 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0023] 또한 본 발명의 일 양상은 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 의약외품을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명의 일 양상은 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 층분리배양법에 의하여 분리된 줄기세포는 T 세포의 증식 및/또는 IFN-γ 및 IL-4의 생산을 억제할 수 있으며, B 세포의 증식 및/또는 IgE 생산을 억제할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 클래스 전환 DNA 재조합 및/또는 플라즈마 세포 분화를 억제하고, OVA로 유도된 아토피성 피부염 동물 모델에서 그 증상을 현저히 완화시키는 바, 효과적인 아토피성 피부염 치료제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1는 cMSCs 의한 T 세포 증식 및 사이토 카인 생성의 억제를 나타내는 도이다.

cMSCs의 존재 또는 부재하에서, Balb/c 마우스로부터의 비장세포를 항-CD3 및 항 CD28 항체로 자극 하였다. 세포를 3 일 동안 배양 하였다. 최종 16 시간 배양 기간 동안, 1 μCi ^{3}H 티미딘을 첨가하고, T 세포 증식은 티미딘 혼합에 의해 결정 하였다.

두 동계 (a)과 동종의 (b) cMSCs는 수-의존적으로 T 세포 증식을 유의적으로 억제하였다. 유사한 결과를 3 개의 독립적인 실험에서 수득하였다.

M, cMSCs; S, 비장 (splenocytes), * P <0.001.

도 2는 cMSCs에 의한 세포-세포 접촉t- 및 NO-매개 T 세포 억제를 나타낸 도이다.

동종 cMSCs의 존재하에서, Balb/c 마우스로부터의 비장세포를 항-CD3 및 항 CD28 항체로 자극하였다. 0.4 mm 기공막과 함께 24-트렌스웰 플레이트를 사용하여 cMSCs로부터 비장 세포를 분리하였다. 자극 48 시간 후, IFN-γ와 IL-4 단백질 수준을 ELISA로 측정하였다.

(a) cMSCs은 세포-세포 접촉에 의존적으로 IFN-γ와 IL-4의 생산을 억제 하였다. (b) IFN-γ와 IL-4의 mRNA 역시 cMSCs 의해 억제되었다. (C) NO 참여를 증명하기 위하여, 1M L-NMMA을 배양 배지에 추가하였다. NO 억제제 L-NMMA는 cMSC-매개 T-세포 증식 및 IFN-γ 생산을 회복시켰으나, IL-4 생산을 회복시키지 못하였다. 유사한 결과를 3 개의 독립적인 실험에서 수득 하였다. CC, co-culture; TW, Transwell, * P <0.001.

도 3은 cMSCs 의한 B 세포의 증식 및 IgE 생성의 억제 효과를 나타낸 도이다.

(a) Balb/c 마우스로부터 정제된 B 세포는 IL-4의 존재 하에서 LPS 또는 항-CD40 항체 중 하나로 자극하였다. 세포를 3 일 동안 배양 하였다. 최종 16 시간 배양 기간동안, 1 μCi ^{3}H 티미딘을 첨가하고, B 세포 증식은 티미딘 혼합으로 결정하였다. cMSCs 수-의존적으로 B 세포 증식을 약간 억제 하였다.

(b) IgE 생산을 측정하기 위해, 세포를 5 일 동안 배양하고, 배양 배지의 IgE를 ELISA로 측정하였다. IgE의 생산은 세포-세포 접촉에 의존적으로 cMSCs 의해 억제되었다.

(c) IgE 생산 B 세포를 측정하기 위하여, 세포를 3 일 동안 배양하였다. 마지막 6 시간 배양 기간 동안, 브레펠딘 A(brefeldin A)을 첨가 하였다. 세포 내 IgE 생산을 유동 세포 계측법을 통해 검출 하였다. IgE 생성 B 세포는 cMSCs에 의하여 감소 하였다. 유사한 결과를 2 내지3의 독립적 실험으로 수득하였다. M, cMSCs; B, B 세포; CC, co-culture; TW, Transwell, * P <0.001

도 4는 cMSCs 의한 이소타입 클래스 전환 (isotype class switching) 및 B 세포 분화의 억제효과를 나타낸 도이다.

(a) RNA를 자극된 B 세포로부터 분리하였다. LPS/IL-4-자극된 B 세포에서, cMSCs에 의해 ε-GLT 및 ε-PST의 mRNA 수준은 현저하게 감소한 반면, 항-CD40/IL-4 자극 하에서, cMSCs에 의해 전사체는 약하게 감소하였다.

(b) B 세포의 분화에 대한 다른 전사인자fmf 실시간 PCR에 의해 분석 하였다.

(c) 4 일간 배양된 B 세포에서 cMSCs 는 BLIMP-1 및 AID 단백질 발현을 억제하였다.

유사한 결과를 2-3 독립적 실험으로 수득 하였다. * P<0.001.

도 5는 cMSCs에 의한 AD 억제 효과를 나타낸 도이다.

(a) AD 마우스 모델 처리의 모식도이다. 마우스는 0, 7, 및 14일에 OVA/Alum로 면역화하였으며, 21일경에 1주동안 OVA 패치로 피부 감작하였다. 감각 절차 사이에 3회 cMSCs를 정맥주사로 주입하였다. 43일에 마우스를 희생시키고, 피부 병변을 회수하였다.

(b) PBS 또는 cMSCs 처리한 마우스의 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색 결과이다. 톨루이딘 블루 염색 (하단 패널)는 쥐의 피부의 비만 세포의 침윤을 나타낸다. 피부 표본에서의 T 세포를 FITC-결합된 항-CD3 항체에 의해 동정 하였다. 데이터는 3 개의 실험을 대표한다.

도 6은 피부 병면 및 배액 림프절로의 cMSCs의 이동을 나타낸 결과이다.

(a) PBS 대조군 마우스 및 OVA-유도 AD 마우스에서 CM-Dil-염색된 cMSCs를 처리하는 모식도이다. 0, 7, 및 14일에 PBS 또는 OVA/Alum로 마우스를 면역화시키고, 21일경에 1주일동안 PBS 또는 OVA 패치로 피부 감작시켰다. 28일경, PBS 대조군 마우스 및 OVA-유도 AD 마우스에 CM-Dil-염색된 cMSCs을 정맥주사하였다.

(b) 마우스를 31일에 희생시키고, 피부과 폐조직을 회수하였다. 폐와 OVA-유도된 피부 병변에서 cMSCs를 검출하였다.

(c) OVA 패치는 마우스 피부의 좌측에 한하여 처리하였다. CM-DiI-염색된 cMSCs 주사 3일 후, 우측 림프절에 비하여 좌측 액와 림프절에서, 더 많은 cMSCs가 검출되었다. CM-DiI-표지된 cMSCs는 HPF (high-powered-field, x400)에서 계수하였다. 비슷한 결과를 2 독립적인 실험으로 수득하였다. *P<0.001. 모든 사진에서 Scale bar=100 ㎛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명의 일 양상은 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어 “줄기세포”는, 다양한 신체 조직으로 분화할수 있는 능력을 갖는 미분화 세포로서, 이는 만능 줄기 세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류될 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 그 종류를 제한하지 않으나, 바람직하게는 중간엽 줄기세포일 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 사용된 용어 “중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)”는 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포 또는 신경세포와 같은 외배엽성 세포로도 분화하는 능력을 가진 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)이다. 상기 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 탯줄, 태반, 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막 및 탈락막으로 구성된 군에서 선택되는 것으로부터 유래될 수 있다. 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 인간, 태아 또는 인간을 제외한 포유동물로부터 유래될 수 있다. 상기 인간을 제외한 포유동물은 보다 바람직하게는 개과 동물, 고양이과 동물, 원숭이과 동물, 소, 양, 돼지, 말, 랫트, 마우스 또는 기니피그 등일 수 있으며, 그 유래를 제한하지 않는다.

[0032] 상기 줄기세포는 Sca-1, CD44, CD73, 및 CD105에 양성의 면역학적 특성을 나타내었으며, MHC (major histocompatibility complex) class II, CD45, CD103, 및 CD117에 음성의 면역학적 특성을 나타낼 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 지방세포, 연골세포 또는 골세포로의 분화능을 가질 수 있다.

[0033] 상기 줄기세포는 지방세포, 연골세포 또는 골세포로의 분화능을 가질 수 있다. 상기 줄기세포는 T 세포의 증식 및/또는 IFN-γ 및 IL-4의 생산을 억제할 수 있으며, B 세포의 증식 및/또는 IgE 생산을 억제할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 클래스 전환 DNA 재조합 및/또는 플라즈마 세포 분화를 억제할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 이종, 동종이계, 또는 자가 줄기세포일 수 있다.

[0034] 상기 줄기세포는 신체 샘플로부터 분리할 수 있다.

[0035] 본원에서 사용된 바와 같이, "신체 샘플"은 단일 유형의 세포를 격리하고자 하는 포유류로부터 수득된 임의의 샘플을 의미한다. 이러한 신체 샘플로는 뼈 골수 샘플, 말초 혈액, 제대혈, 지방조직 샘플 및 사이토카인-활성화된 말초 혈액일 수 있다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 세포의 소스 및 치료를 논의하기 위한 "포유류" 또는 "대상"은 인간, 국내 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 랫, 마우스, 토끼 등을 포함하는 포유류 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유류는 인간이다.

[0037] 본원에서 사용된 바와 같이, "세포 샘플"는 뼈 골수 샘플, 말초 혈액, 제대혈, 지방조직 샘플 및 사이토카인-활성화된 말초 혈액을 포함하는 여러 유형의 세포 혼합물을 포함하는 임의의 샘플을 의미한다.

[0038] 본원에서 사용된 바와 같이, "균일한" 집단은 일반적으로 동일한 유형의 세포가 집단 내에 존재하는 것을 제시한다. "실질적으로 균일한"이라는 것은 약 80 %의 균질성 또는 약 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95%, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 % 또는 99.9 %의 균일성을 의미할 수 있다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, "MSC"는 골수 간질세포 또는 중간엽 줄기세포를 의미한다.

[0040] 상기 층분리 배양법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0041] (i) 줄기세포를 포함하는 샘플을 제 1용기에 배양하여 상층액을 수득하는 단계;

[0042] (ii) 제1용기의 상층액을 제 2용기에 옮기는 단계;

[0043] (iii) 상기 제2용기에 존재하는 세포를 배양하여 상층액을 수득하는 단계;

[0044] (iv) (ii) 및 (iii) 단계를 3회 이상 반복하는 단계;

[0045] (v) 단일 세포 유래 콜로니를 분리하는 단계; 및

[0046] (vi) 상기 콜로니로부터 성장 배지로 세포를 옮기고, 세포를 배양하는 단계.

[0047] 상기 방법은 (vii) 세포를 3 내지 25 계대로 확장시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0048] 상기 배양용기는 코팅제가 처리된 배양용기 또는 코팅제가 처리되지 않은 배양용기인 것일 수 있고, 용기는 평평한 바닥일 수 있다. 상기 용기는 세포 접착제로 코팅된 것일 수 있으며, 상기 세포 접착제는 하전된 아미노산 중합체일 수 있다. 상기 세포 접착제는 콜라겐, 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트, 폴리글루타메이트 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물는, 당업자에게 공지의 방법으로 제제화하는 것이 가능하다. 예를 들면, 필요에 따라서 물 혹은 그 이외의 약학적으로 허용할 수 있는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약리학상 허용되는 담체 혹은 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당 조합해, 일반적으로 인정된 제약 실시에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화하는 것에 의해 제제화하는 것을 생각된다. 상기 제제에 있어서 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것이다. 또한, 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시에 따라 처방할 수가 있다.

[0050] 주사용의 수용액으로서는, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약을 포함한 등장용액, 예를 들면 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 들 수 있어 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로는 에탄올, 폴리 알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다.

[0051] 유성액으로서는 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다. 또한, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면, 염산 프로 카인, 안정제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화 방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다.

[0052] 환자의 체내에의 투여는 바람직하게는 비경구투여이며, 구체적으로는 정맥에의 1회 내지 3회의 투여가 기본이지만 그 이상의 투여라도 좋다. 또, 투여 시간은 단시간이라도 장시간 지속 투여라도 좋다. 더욱 구체적으로는, 주사제형, 경피투여형등을 들 수 있다. 주사제형의 예로서는 예를 들면, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 선택적 동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하주사, 뇌실내 주사, 뇌내 주사, 골수액강내 주사, 정맥내 주사등에 의해 투여할 수가 있지만, 바람직하게는 정맥내 주사 또는 복강내 주사이다. 정맥내 주사의 경우, 통상의 수혈의 요령에서의 이식이 가능해져 환자를 수술할 필요가 없고, 나아가 국소 마취도 필요없기 때문에, 환자 및 의사 쌍방의 부담이 가볍다. 또 병동에서의 이식 조작이 가능한 점으로써 매우 적합하다. 장래의 구급의료의 발전을 고려하면, 구급 반송중, 혹은 발증 현장의 투여도 생각할 수 있다.

[0053] 아토피성 피부염 환자를 치료하기 위하여 본 발명의 클로날 BMSCs는 치료적 유효량을 환자에게 투여할 수 있으며, 상기 치료적 유효량은 특별히 제한되는 것은 아니나, 1×10^4 cell/kg 내지 1×10^8 cell/kg인 것이 바람직하고, 1×10^5cell/kg 내지 1×10^7cell/kg인 것이 더욱 바람직하고, 5×10^5 cell/kg 내지 5×10^6 cell/kg인 것이 가장 바람직하다. 상기 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구 투여 방법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥내 투여가 가장 바람직하다.

[0054] 또한 본 발명의 일 양상은 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)을 통하여 수득한 줄기세포를 포함하는, 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0055] 상기 화장료 조성물은 본 발명의 상기 줄기세포 이외에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일,

염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0056] 상기 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 줄기세포는 0.01 내지 15중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[0057] 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0058] 아토피 피부염을 치료하기 위하여, 상기 줄기세포 또는 이의 배양액을 적당히 희석하여 피부에 직접 도포할 수도 있으며, 본 발명의 피부질환 치료용 약학적 조성물이 환부에 효과적으로 적용될 수 있도록 연고제로 제조할 수 있다. 상기 연고제는 본 발명의 아토피 피부염 치료용 약학적 조성물을 무기물질과 배합한 다음, 이를 지용성 기제로 코팅하여 제조한다. 상기 무기물질은 항균성, 소염효과, 표피재생 효과 등이 우수한 소재를 사용하는 것이 바람직하고, 이들의 구체적인 예로는 산화아연, 탄산아연, 산화철 등이 있다. 또한, 수용성 물질인 본 발명의 아토피 피부염 치료용 약학적 조성물을 안전하게 함침 할 수 있는 세라믹 담체를 추가로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 세라믹 담체로는 제올라이트, 활석, 석고, 모려분 및 이들의 혼합물이 바람직하게 사용된다. 이러한 세라믹 담체는 수용성 성분의 함침성이 우수하여 피부에 수용성 성분의 공급을 원활히 할 수 있다.

[0059] **<u>층분리 배양기술</u>**

[0060] 본 발명에서 층분리 배양법 (subfractionation culturing method)라고 명명되는 방법으로서 신체 샘플 또는 인간 골수와 같은 공급원에서 다중계통 줄기세포(MLSC)의 매우 균일한 집단을 분리하는 방법을 이용한다. 1ml 뼈 골수 천자액(aspirate)에서 총 16 개의 골수 세포주를 확립하였다. 16개 중에서, FACS 분석에 의해 별도의 표현형을 나타내는 4개의 세포주에 대해 특성화하였다. 이들 세포주 모두는 자기-재생 기능 및 중배엽, 외배엽, 내배엽 계통 세포로의 분화능과 같은 다중계통 줄기세포의 특징을 나타내었다.

[0061] 골수 MSC는 조혈 세포에 의한 오염 없이 분리하기 어려운 것으로 알려져 있다. 임상 설정에 적용하기 위해서는, 면역근원의 문제를 해결하고 임상적 효과를 정확하게 평가하기 위해 MSC의 균일한 집단을 갖는 것이 중요하다. 전통적으로, MSC의 균일한 집단의 분리는 MSC-특이적 항체 칼럼 정제에 의해 실행되었다. 그러나, 이러한 완전한 MSC-특이적 항체가 아직도 가능하지 않기 때문에 이 방법은 충분하지 않다.

[0062] 뼈 골수 샘플과 같은 생체 샘플로부터 클로날 줄기세포를 분리하기 위한 본 발명의 원리는, 다중계통 줄기세포 또는 전구세포가 낮은 세포 밀도를 갖고, 따라서 이들이 이에 따라 샘플에서 다른 세포들과 분리될 수 있다는 것이다. 예를 들어, 성숙한 MSC는 신속 자기-재생(RS) 세포보다 크다. RS 세포는 다중계통의 분화를 위하여 더 큰 능력을 갖는 것으로 알려져 있다.

[0063] 다른 양태에서, 더 접착력이 높은 줄기세포를 얻기 위해 콜라겐 또는 폴리리신-코팅된 배양 접시가 사용되었다. 본 발명자는, 양(+) 또는 음(-)으로 임의 하전된 배양 표면은 코팅하지 않은 접시 표면에 비해 줄기세포의 표면에 접착을 촉진하는 것을 밝혀냈다. 코팅하지 않은 접시보다 각각 약 2 내지 3배 많은 세포가 콜라겐 또는 폴리리신-코팅된 배양 접시에 부착되었다. 단일 세포-유도된 뼈 골수 세포 콜로니의 수득과 관련하여, 다른 인간 골수 천자액 및 3개의 상이한 혈통의 마우스 골수 샘플에서 유사한 결과가 수득되었으며, 이는 이 프로토콜이 다른 뼈 골수 천자액과 일관적이며 또한 다른 종에서의 클로날 줄기세포의 분리에 적용될 수 있음을 보여주고 있다.

[0064] 따라서, 하나의 실시양태에서, 배양 접시의 바닥은 양(+)으로 하전된 아미노산, 예컨대 폴리리신, 폴리아르기닌, 또는 음(-)으로 하전된 아미노산, 예컨대 폴리아스파테이트, 폴리글루타메이트, 또는 이들의 조합에 의해 코팅되어서, 줄기세포 또는 전구세포가 접시의 바닥에 접착하는 것을 도와줄 수 있다.

[0065] 더 무겁거나 더 밀집된 세포의 대부분이 최초 2개의 2시간의 배양 단계에서 제거될 수 있기 때문에, 본 발명의 층분리 배양 방법을 실시하기 위해서는, 적혈구 또는 백혈구와 같은 임의의 유형의 세포를 샘플로부터 미리 제거하도록 임의의 유형의 원심분리도 사용할 필요가 없다. 이 점에서, 이는 세포들 사이의 임의의 물질을 소화시키는 임의의 효소로 세포를 미리 처리할 필요가 없다. 따라서, 본 발명의 시스템의 장점들 중 하나는, 세포 배양액 중에 피콜(Picoll), 휘콜(Ficoll) 또는 휘콜-히파크(Ficoll-hypaque)와 같은 오염을 도입할 수 있거나 줄기세포에 손상을 줄 수 있는 통상적으로 사용되는 밀도-구배 원심분리 및 단핵세포 분획 단계들을 회피할 수 있는 것이다. 따라서, 본 발명의 층분리 배양 방법은, 신체 샘플, 바람직하게는 골수 샘플로부터 매우 균일한 클

로날 줄기세포를 분리하기 위한 단순하고 효과적이고 경제적인 프로토콜이다.

[0066] 대안적으로, MSC 분리의 종래 밀도-구배 원심분리에 의한 분리/분획된 단핵세포는, 단일 세포-유도된 콜로니를 수득하고 줄기세포 또는 전구세포의 균일한 집단을 분리하기 위해서 배양 용기 D1 내에 가할 수 있다. 따라서, 분획 배양 방법에서는 종래 밀도-구배 원심분리법에 의해 분획된 단핵세포가 이용될 수 있다.

[0067] 본원은, 생체 샘플, 특히 예시되어 있는 골수 샘플에 존재하는 줄기세포 또는 전구세포에는 여러 유형이 존재한다는 것을 나타내는, 단일 세포 유도된 줄기세포주의 세포 표면 단백질 발현에서의 특징의 다양성에 대해 설명한다. 분리된 클로날 줄기세포는 일반적으로 CD34, HLA-DR, CD73, CD31, CD166, HLA 클래스 I에 대해서는 네거티브이거나, 또는 약간 포지티브이며, CD44, CD29, CD105에 대해서는 매우 포지티브 이었다. 그러나, D4 및 D5의 배양 용기로부터의 일부 세포주는 분명한 수준의 표면 단백질을 보여 주지만, 이는 뼈 골수에서 일부 다른 다중계통 줄기세포 또는 전구세포가 존재할 수 있는 것을 보여주고 있다. 훙(Hung) 등은, 뼈 골수가 표면 마커 분석에서 다른 많은 군의 MSC를 포함할 수 있다고 가정하였다[24]. 다양한 표면 마커를 갖는 이러한 MSC는 세포의 여러 분화 능력을 나타낼 수 있다. 따라서, 본 발명의 층분리 배양 방법에 의해 단일 세포 유도된 균일한 줄기세포의 분리로 인해, 이러한 군의 세포가 뼈 골수 또는 다른 특이적으로 분리된 신체 샘플 중에 존재하고 배양 조건이 세포 확장 동안 그의 능력이 변화시키지 않는 한, 조직 특이적 줄기세포 또는 관계된 전구세포의 분리가 가능하게 된다. MSC 치료 및 세포 이식 처리의 안전성과 유효성은, 본원에 제시된 바와 같이, 특정 성질을 갖는 세포 하위-집단을 특징지을 수 있음으로써 향상된다.

[0068] 본원은, 재생 기능 및 외배엽, 중배엽 및 내배엽 계통 세포로의 다중계통 분화능을 갖는, 단일 세포로부터 유래하는 클로날 줄기세포 라인의 매우 균일한 집단을 임의의 다른 신체 샘플, 특히 골수로부터 분리하는 새로운 방법을 제시한다. 줄기세포를 분리하기 위해 항체를 이용할 필요 없이 밀도-구배 원심분리 및 단핵세포 분획 단계를 제거함으로써, 본 발명의 하위-분획 배양 방법은 단순하고 효율적이고 경제적 절차로 및 치료 상황에 대해 더욱 안전하게 더 균일한 클로날 줄기세포의 집단을 생성시킨다.

[0069] 내배엽 세포 계통을 위한 유도, 분화/형질전환제

[0070] 내배엽 세포 계통을 위한 유도, 분화/형질전환제는, 간, 폐, 췌장, 갑상선 및 장 세포와 같은 유형의 세포를 위해, 간세포 성장 인자, 온코스타틴-M(oncostatin-M), 상피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자-4, 베이직 섬유아세포 성장 인자, 인슐린, 트랜스페린(transferrin), 셀렌산(selenius acid), BSA, 리놀렌산, 아스코베이트 2-포스페이트, VEGF 및 덱사메타손과 같은 제제를 포함한다.

[0071] 중배엽 세포계통을 위한 유도, 분화/형질전환제

[0072] 중배엽 세포 계통을 위한 유도, 분화/형질전환제는, 연골세포, 뼈세포, 지방세포, 근육 세포 및 혈액 세포와 같은 유형의 세포를 위해, 인슐린, 트랜스페린, 셀렌산, BSA, 리놀렌산, TGF-β1, TGF-β3, 아스코베이트 2-포스페이트, 덱사메타손, β-글리세로포스페이트, 아스코베이트 2-포스페이트, BMP 및 인도메타신과 같은 제제를 포함한다.

[0073] 외배엽 세포 계통을 위한 유도, 분화/형질전환제

[0074] 외배엽 세포 계통을 위한 유도, 분화/형질전환제는, 신경세포, 피부 세포, 뇌 세포 및 눈 세포와 같은 유형의 세포를 위해, 디부티릴 사이클린 AMP, 이소부틸 메틸잔틴, 인간 상피 성장 인자, 베이직 섬유아세포 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자-8, 뇌-유도된 신경영양(neurotrophic) 인자 및/또는 다른 신경영양 인자와 같은 제제를 포함한다.

[0075] 본 발명은 본원에서 설명된 특정 실시양태들에 의해 범위가 제한되지 않는다. 사실상, 이러한 본원의 설명에 덧붙여, 당업자에게는 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 본 발명의 다양한 변형이 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위에 속하는 것이다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 이를 제한하고자 하여 제공되는 것은 아니다.

[0076] **실시예**

[0077] **실시예 1- 방법**

[0078] 실시예 1.1 - cMSC 배양

[0079] C3H/HeN 및 Balb/c 마우스의 골수로부터 종래 수립된 SCM 프로토콜을 이용하여 cMSCs를 분리하였다.

[0080] 구체적으로, DMEM (Dulbecco뭩 modified Eagle뭩 Medium)-저 글루코스 (GIBCO-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD), 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 5 ml의 배양 배지로 골수강을 세척함으로써, 5주령의 BALB/c, C3H 및 C57/BL6 마우스의 경골 및 대퇴골로부터 마우스 골수 샘플을 회수하였다. 그 다음 15-ml의 완전 성장 배지를 혼합액에 첨가하였다. 이 혼합액을 100-mm 배양 용기에 배양하였다. 37 ℃에서 50 ml/l CO_2에서 2시간 동안 배양 한 후, 상층액만을 새로운 중간 100-mm 배양 용기에 옮겼다. 2시간 배양 후, 상층액을 중간 배양 용기 에서 새로운 배양 용기에 (D1)으로 옮긴 후, 다시 2시간 배양하였다. 상층액을 그 다음 D1으로부터 새로운 배양 용기 (D2)로 옮기고, 1일동안 배양한 후, D2로부터 새로운 배양 용기 (D3)로 옮기고 다시 1일간 배양하였다. 이러한 과정을 1일 및 2일로 2회 순차적으로 배양하였다 (각각 D4 및 D5). 7 내지 14일간의 배양 후, 배양 용기에 나타나는 잘 분리된 단일-세포-유래 콜로니를 분리하고 2-3분간 클로닝 실린더 (GIBCO-BRL) 내에서 트립신/EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)을 처리하고, 6-웰 플레이트로 옮긴 후, 더 큰 배양 플라스크로 옮겨 확장을 계속하였다. 세포가 약 80% 내지 90%의 컨플루언스 (confluence)에 도달하면, 이들을 trypsin/EDTA로 회복시키고, 50-100 cells/cm^2까지 계대배양하였다.

[0081] 또한, 상기 수득된 cMSCs를 37 ℃, 5% CO_2 조건에서, DMEM (Dulbecco뭩 modified Eagle Medium) 저 글루코스, 10% FBS (Gibco, Grand Island, NY, USA), 및 1x 항생제 항진균제 용액 (Gibco)을 이용하여 유지하였다. 본 발명에서는 12-25 계대의 세포를 사용하였다. cMSCs는 세포 표면 항원 및 지방세포, 연골세포 및 골 세포로의 분화 잠재력에 따라서 특정하였다. 하기의 항체는 BD Bioscience (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다: CD44 (IM7), CD45 (30F11), CD73 (TY/11.8), CD105 (FAB1320F), CD117 (2B8), MHC II (2G9), Sca-1 (D7). cMSCs 내의 마이코플라즈마는 마이코 플라즈마 검출 키트 (e-Myco, iNtRON, Sungnam, Korea)를 이용하여 조사하였다. 사용된 cMSCs는 마이코플라즈마가 없는 계통이다.

[0082] 실시예1.2 - T 세포의 증식 및 사이토카인 분석

[0083] cMSC의 T 세포 증식에 대한 영향을 조사하기 위해, Balb/c 마우스 유래 $2x10^5$의 비장세포를 1 ㎍의 항 CD3, 항 CD28 항체 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 및 $1x10^4$ cMSCs를 함께 96-웰 플레이트에서 3일 간 자극하였다. 최종 12-16 시간 배양 동안, 1 μCi/well ^{3}H-티미딘을 첨가하였으며, T 세포 증식을 티미딘 혼합을 통하여 결정하였다. 사이토카인을 검출하기 위해, $1x10^6$ 비장세포를 1 ㎍/ml의 항-CD3 및 항-CD28 항체와, $5x10^4$ cMSCs를 함께 24-웰 플레이트 상에서 자극하였다. 트랜스웰 실험을 위해, 24 트렌스웰 플레이트 및 0.4 mm 기공막 (Corning, Oneonta, NY, USA)으로 cMSCs로부터 비장 세포를 분리하였다. 자극 48 시간 후, IFN-γ와 IL-4 수준을 제조사의 프로토콜 (BD Bioscience, San Diego, CA, USA)에 따라 ELISA로 측정 하였다.

[0084] 실시예1.3 - B 세포 증식 및 항체 어세이

[0085] 순수한 B 세포를 EasyStep magnetic beads (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada)를 이용하여 분리하였다. 정제된 세포 ($2x10^5$ cells)를 96-웰 플레이트에서, 30 ng/ml 재조합 IL-4 (Creagene, Seoul, Korea) 및$1x10^4$ cMSCs 존재하에, 10 ㎍/ml LPS 또는 5 ㎍/ml 항-CD40으로 자극하였다. 배양 3일 후, B 세포 증식을 ^{3}H-티미딘 (1 μCi/well) 혼합으로 결정하였다. 유세포 분석기를 사용하여, 배양 3 일 후 B 세포 분열을 CFSE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 모니터링 하였다. 항체 생산을 검출하기 위하여, 24 웰 플레이트에서, $5x10^4$ cMSCs와 함께 LPS/IL-4 또는 항-CD40/IL-4으로 $1x10^6$ 정제된 B 세포를 자극하였다. 트랜스웰 실험을 위해, 24 트렌스웰 플레이트 및 0.4 mm 기공막 (Corning)으로 cMSCs로부터 B 세포를 분리하였다. 5일 후, IgE

및 IgG1 수준을 제조사의 프로토콜 (BD Bioscience, San Diego, CA, USA)에 따라 ELISA로 측정 하였다. IgE 생산 B 세포를 측정하기 위하여, 세포를 3일동안 배양하고, 브레펠딘 A (brefeldin A)를 최종 6시간의 배양 동안 첨가한 후, 세포 내 IgE의 생산을 유동 세포 계측법을 통해 검출하였다.

[0086] 실시예 1.4 - 아질산염 분석

[0087] NO 생산은 배양 48 시간 후 수집된 상층액에서 측정했다. 간략하게, Griess의 시약 50 ㎕ (Sigma, St. Louis, MO, USA으로부터 시약 제조)을 배양 배지 50 ㎕에 첨가하고, 자동화된 플레이트 판독기를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 판독하였다. 아질산염 농도는 NaNO2 표준 곡선으로부터 계산하였다.

[0088] 실시예 1.5- 아토피 피부염의 유발

[0089] BALB/c 마우스를 실험에 사용하였다. 동물 관리 및 모든 실험 절차는 Korea Academy of Medical Science에서 출판한 출판 동물 실험에 대한 안내서에 따라 실시하였다. 각 그룹당 6마리의 마우스를 사용하였다.

[0090] 마우스를 4mg의 수산화 알루미늄 (ImjectAlum; Pierce, Rockford, IL, USA)과 혼합된 10 ㎍의 닭 OVA (grade V; Sigma)를 200 ㎕의 용량으로, 1주 간격으로 3 차례 (즉, 0, 7, 14일) 면역화 시켰다. 마우스를 21일에 OVA 패치를 이용하여 피부감작시켰다. 100 ㎕의 PBS에 준비된 OVA (10 ㎍)를 1x1cm 멸균 거즈에 포함시키고, 마우스의 면도한 등에 배치하고 투명 드레싱 (Tegaderm; 3M, St. Paul, MN, USA)으로 피부에 고정시켰다. 패치는 매일 변경하고, 피부는 7 일간 OVA와 접촉을 유지하였다. 그 후, cMSCs ($2x10^5$ cells)를 정맥 내 29 일, 31 일 및 33에 마우스에게 주사하였다. 피부를 7 일 동안 OVA에 다시 노출시켰다. 43일경에 혈청, 피부 생검 표본 각각을 ELISA 및 조직학적 검사를 위해 수득 하였다. 피부에서 비만 세포, T 세포, 및 호산구를 각각 톨루이딘 블루, 항 CD3 항체, 및 H & E 염색으로 결정하였다. 세포는 현미경을 사용하여 슬라이드 당 세개의 무작위로 선택된 필드에서 계수하였다. 마우스 당 두 개의 슬라이드를 조사하였다. 세 개의 필드는 먼저 x100 배율로 전체 슬라이드를 스캔하여 확인 하였다. 양성으로 염색된 세포는 고배율 필드 (HPF, x400)에서 계수 하였다. AD 실험은 동계 cMSCs를 사용하여 2회, 동계 cMSCs를 사용하여 3회 수행되었다. 유사한 결과가 얻어졌다.

[0091] 실시예 1.6 - AD 정도 수치화

[0092] 피부염의 정도를 하기의 수치 절차에 따라 육안으로(macroscopically) 평가하고, 0 (증상없음), 1 (가벼움) 2 (보통) 3 (중증)의 점수를 가기의 5가지 증상에 대한 개별 점수의 합으로 표시하였다: (1) 가려움증/가려움, (2) 홍반/출혈, (3) 부종, (4) 벗겨짐/짓무름, 및 (5) 인설/건조함.

[0093] 실시예 1.7 - CM-DiI 라벨링

[0094] 마우스에서의 cMSCs의 검출을 위하여, cMSCs를 CellTracker CM-DiI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 라벨링 하였다. 천만 세포를 DPBS에 1 ㎍/ml 의 CM-DiI 염료와 함께 재현탁하고, 5분간 37℃에서 배양한 후, 4℃에서 15분단 더 염색하였다. 세포는 DPBS로 2회 세척하고, 이식을 위하여 DPBS의 1 ㎖에 재현탁 하였다.

[0095] 실시예 1.8 - cMSCs의 in vivo 주입 및 추적

[0096] CM-DiI-표지된 cMSCs의 검출 실험을 위하여, 마우스는 1 주 간격으로 3회 닭 OVA/Alum 10㎍으로 면역화하였다. 마우스를 21일에 OVA 패치로 피부 감작하였다. 병변과 비병변을 구분하기 위하여, 패치를 마무스의 왼쪽에만 배치시켰다. 그룹 당 3마리의 마우스를 사용했다. 1 주후, 꼬리 정맥 주사를 통하여 $1x10^6$ CM-DiI-표지된 cMSCs를 주입하였다. MSC 주입3 일에서 마우스를 희생하고, 다양한 기관 (폐, 피부, 림프절)를 분리하였다. 각 기관을 OCT 화합물에 포함시키고, 신속하게 액체 질소로 동결한 후, -80 ℃에서 보관하였다. 7-mm 조각으로 섹션을 절단하였다. 표지된 MSCs는 공초점 현미경 (Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 시각화하였다. CM-DiI-표지된 cMSCs은 현미경을 사용하여 슬라이드에 무작위로 선택된 3개의 필드에서 계수하였다. 마우스 당 2 개의 슬라이드를 조사하였다. 3 개의 필드는 우선 x100 배율로 전체 슬라이드를 스캔하여 확인 하였

다. 양성으로 염색된 세포는 고배율 필드 (HPF, x400)에서 세포를 계수하여 정량화 하였다. 두 독립적인 실험에서 유사한 결과를 얻었다.

[0097] 실시예 1.9 - RNA의 분리 및 RT-PCR 분석

[0098] B 세포로부터 총 RNA를 easy-BLUE (iNtRON)를 이용하여 추출하고, 제조사의 지시에 따라 QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이요아혀 cDNA를 제조하였다. cDNA는 SYBR Green Quantitative PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 증폭하였다. 프라이머 (QuantiTect Primer Assays)는 모두 시중에 판매하는 것을 이용하였으며, Qiagen로 검증하였다. 반응은 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)로 수행하였다; PCR 수행을 위한 조건은 하기와 같다: DAN 폴리머라아제의 활성화를 위하여 핫스타트를 10분간 95 ℃에서, 사이클링을 95 ℃에서 15초간, 총 40 사이클을 위하여 60 ℃에서 1분간.

[0099] ε-GLT, ε-PST, 및 GAPDH에 대한 PCRdms 표준 절차에 의하여 수행되었다. 간략하게, PCR를 총 20 ㎕의 용량으로 하기와 같이 수행하였다: (1) 변성: 5분간 94℃; (2) 증폭: ε-GLT, ε-PST을 위하여 35 사이클, GAPDH을 위하여 25 사이클, 30초간 94℃, 30초간 58 ℃, 및 30초간 72℃; 및 (3) 확장: 10분간 72 ℃. 그 다음 각 샘플의 10 ㎕를 1 % 아가로스 겔에 로딩하고, 에티듐 브로마이드로 염색하고, 자외선을 이용하여 시각화하였다. PCR 프라이머는 하기와 같다:

[0100] ε-GLT: sense primer 5'-GCACAGGGGGCAGAAGAT-3' 및 antisense 5'-CGTTGAATGATGGAGGAT-3'

[0101] ε-PST: sense primer 5'-CCAGGGTCATGGAAGCAGTG-3' 및 antisense 5'-CTCTGGCCCTGCTTATTGTTG-3' 및

[0102] GAPDH: sense primer 5'-CATCTTCCAGGAGCCAGACC-3'및 antisense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

[0103] 실시예 1.10 - 면역블롯팅

[0104] B 세포 용해물을 SDS-PAGE을 이용하여 준비하고, 면역블롯팅을 수행하였다. AID, BLIMP-1, 및 β-Actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)으로부터 구매하였다.

[0105] **실시예 2- 결과**

[0106] 실시예 2.1 - 골수 유래 클로날 BMSCs의 분리 및 특성

[0107] 상기 방법에서 설명한 바와 같이, 본 발명자가 새롭게 확립한 분리 프로토콜인, SCM을 이용하여 동종이계 (C3H/HeN) 및 동계 (Balb/c) 마우스의 골수로부터 cMSCs를 분리하였다. cMSC의 세포 표면 에피토프는 유동 세포계측법으로 분석 하였다. 그 결과, cMSCs는 Sca-1, CD44, CD73, 및 CD105에 매우 강하게 양성을 나타내었으며, MHC (major histocompatibility complex) class II, CD45, CD103, 및 CD117에 대하여 음성을 나타내었다. 동계 cMSCs는 지방세포와 연골세포로 분화된 반면, 동종 cMSCs는 골 세포와 연골 세포로 분화되었다.

[0108] 실시예 2.2 - cMSCs가 T-세포의 증식 및 사이토카인의 생산을 억제함을 확인

[0109] 다음으로, cMSCs의 면역억제 가능성을 테스트하기 위해 T 세포 증식을 조사했다. cMSCs의 존재하에서, 항 CD3, 항 CD28 항체로 비장세포를 자극하였다. T 세포 증식은 티미딘 혼합에 의해 측정 하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0110] 도 1에 도시된 바와 같이, T 세포 증식은 1 : 100 (cMSC/splenocytes)의 공배양 조건에서도 동종이계 및 동계의 cMSCs에 의하여 유의적으로 억제되었다. IFN-γ 및 IL-4의 생산은 동종이계 및 동계의 cMSCs에서 모두 유의적으로 억제되었으며, 이러한 억제는 세포-세포 접촉에 의존하였다. Transwell 시스템을 하였을 때, cMSCs는 사이토카인의 생산을 억제하지 않았다 (도 2a). cMSCs에 의한 사이토카인 억제는 전사수준에서 발생하였다 (도 2b). 각각 IFN-γ 및 IL-4에 대한 전사인자인, T-bet 및 GATA-3은 각각 cMSCs에 의해 억제되었다. T 세포 증식 및 IFN-γ 생산의 억제는 NO (nitric oxide) 억제제인, L-NMMA 존재하에서 회복되었으며, 이는 T 세포 증식 및 IFN-γ 생산의 억제가 NO에 의존적임을 나타낸다 (도 2c). 그러나 IL-4의 생산 억제는 NO에 의존적이지 않았다.

cMSCs에 의한 Th2-타입 전사인자인 GATA-3 및 c-Maf의 억제가 NO 억제제에 의하여 회복되었음에도 불구하고, IL-4의 발현은 여전히 cMSCs에 의하여 억제되었다. cMSCs는 IL-4 사이토카인의 생산을 IFN-γ의 발현과는 상이하게 조절한다.

[0111] 실시예 2.3 - cMSCs에 의한 B-세포 증식 및 IgE 생산 억제 확인

[0112] 중간엽 줄기세포에 의한 IgE의 조절에 대하여 아직 보고된 바가 없다. 이에 따라, 본 발명자들은 cMSCs 가 B 세포의 IgE 생산을 직접적으로 억제하는지 여부를 조사하였다.

[0113] In vitro IgE의 유도를 위하여, 정제된 B 세포를 IL-4의 존재하에서 리포 폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS) 또는 항 CD40 항체로 자극하였다. 이러한 조건 하에서, 먼저 동종 cMSCs가 B 세포 증식에 영향을 미치는지 조사 하였다. cMSCs를 B 세포와 함께 공동 배양 하고 증식 및 세포분열을 측정하였다. cMSCs 두 조건 모두에서 B 세포의 증식을 억제하지만, 세포 분열은 LPS보다 항 CD40 항체의 존재하에서 cMSCs 의해 더욱 현저하게 차단되었다 (도 3a). 배양 배지에서의 IgE의 생산은 cMSCs에 의하여 크게 억제되고, 이러한 억제는 세포-세포 접촉에 의존적이었다 (도 3b). 또한 유동 세포 계측법을 이용하여 IgE 생산 세포의 수를 측정하였다. IgE 생산 세포는 cMSCs에 의하여 현저하게 억제되었다 (도 3c). 유사한 결과가 동계 cMSCs에도 확인되었다. 이러한 결과는 cMSCs가 세포-세포 접촉을 통해 B 세포 증식뿐만 아니라, IgE의 생산을 억제한다는 것을 제안한다.

[0114] 실시예 2.4 - cMSCs 의한 클래스 전환 DNA 재조합 및 플라즈마 세포 분화의 억제 확인

[0115] 이소타입-특이적 프로모터로부터 생식세포 전사는 클래스 전환 DNA 재조합 (class switch DNA recombination, CSR)이 필요하다. cMSCs에 의한 IgE의 억제가 CSR의 억제를 반영하는지 여부를 조사 하였다. 생식세포 전사체 (germline transcripts, GLTs) 및 포스트-스위치 전사체 (post-switch transcripts, PSTs)의 수준을 2, 3일에 역전사 PCR를 통하여 조사하였다. ε-GLT 및 ε-PST를 IgE 이소타입 클래스 전환의 특징으로 간주하였다.

[0116] 도 4a에 도시된 바와 같이, ε-GLT 및 ε-PST의 수준은 LPS/IL-4에 의하여 자극된 조건 하에서, cMSCs에 의하여 유의적으로 감소한 반면, 항-CD40/IL-4 자극하에서는 cMSCs에 의하여 두 전사체가 약하게 감소하였다. 이러한 결과는 자극에 따라, cMSCs가 다른 메카니즘을 통해 IgE 생성을 억제하는 것을 나타낸다.

[0117] BCL-6, PAX5, AID (activation-induced cytidine deaminase), XBP1, 및 BLIMP-1와 같은 다양한 인자들은 CSR 및 플라즈마 세포의 분화에 중요하다. 이에 따라서, 이들의 mRNA의 발현을 실시간 RT PCR을 통하여 측정하였다. 자극 하에서, BCL-6 및 PAX5의 발현 수준은 감소한 반면, XBP-1, AID, 및 BLIMP-1의 발현 수준은 증가하였으며, 이는 두 조건 하에서 B 세포가 CSR 및 플라즈마 세포로의 분화 과정에 있다는 것을 나타낸다. 그러나, PAX5 and XBP-1의 발현은 cMSCs에 의하여 변화하지 않은 반면, cMSCs의 존재하에서, BLIMP-1의 발현은 유의적으로 감소하였고, BCL6의 발현은 약간 증가하였다. 흥미롭게도, cMSCs에 의하여 Blimp-1의 단백질 및 mRNA의 발현은 유의적으로 감소한 반면, AID의 mRNA 수준은 증가하였으나, 단백질 수준은 유의적으로 감소하였다 (도 4b 및 c). 이러한 결과는 Blimp-1 및 AID 각각, 전사단계에서, 및 전사후 단계에서 cMSCs에 의하여 조절됨을 시사한다. 종합적으로, 이러한 결과는 cMSCs는 AID 및 BLIMP-1의 억제를 통하여 CSR 및 B 세포 분화 모두에 영향을 미치는 것을 나타낸다.

[0118] 실시예 2.5 - 마우스 모델에서, cMSCs가 아토피성 피부염을 억제함을 확인

[0119] AD 마우스 모델에서 동종 이식 거부 반응을 제외하기 위하여, 동종 및 동계 cMSCs 모두를 사용하여 실험을 수행하였다. T 세포 및 B 세포가 모두 억제된 cMSCs를 사용하여, 동종 및 동계 cMSCs의 AD에 대한 치료 효과를 검토하였다. OVA-유도 AD 마우스 모델을 사용하였다. 마우스는 1, 7 및 14일에 10 ㎍의 OVA로 복강내 감작하였으며, 100㎕ PBS 중 10㎍ 의 OVA로 패치에 의하여 피부 (epicutaneously) 감작하였다. 피부 감작은 OVA에 1주일간 노출되는 것으로 이루어졌다. cMSCs ($2x10^5$ cells)를 피부 감작 과정 사이에 3차례 정맥내로 주입하였다 (도 5a).

[0120] PBS 대조군 그룹에 비하여 동종 및 동계 cMSCs를 처리한 마우스에서, 피부의 세포 침윤이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5b). 피부 병변과 표피와 진피의 두께의 정도 점수 (Severity score)는 cMSCs에 의하여 크게 감소하였다 (도 5c). 비만 세포, T 세포 및 호산구를 각각 톨루이딘 블루, 항 CD3 항체, 및 H & E 염색을 이용하

여 확인하였다. 이들 세포 또한, cMSCs에 의하여 현저히 감소 하였다 (그림 5b 및 c). 총 IgE 수준 및 OVA 특이적 IgE의 수준은 두 cMSCs가 처리된 마우스의 혈청에서 현저하게 감소하였다. 두 cMSCs에 의하여 IgG2a의 총 수준은 현저하게 증가하였으나, OVA-특이적 IgG2a은 영향을 받지 않았다 (도 5d). 림프절 및 피부에서의 IL-4 발현도 조사 하였다. 이들 조직에서의 IL-4 mRNA 발현은 cMSCs에 의하여 현저히 감소하였으며, 이러한 결과는 in vitro 결과와 일치하는 것이다. 림프절에서 IFN-γ, IL-10 및 TGF-β의 발현은 cMSCs에 의해 변하지 않았다. 조절 T 세포에 대한 마커인 Foxp3의 발현 역시 cMSCs에 의해 영향을 받지 않았다 (도 5F).

[0121] 이러한 결과는 동종 및 동계 cMSCs 모두 AD에 대한 치료 효과를 나타냄을 뒷받침한다.

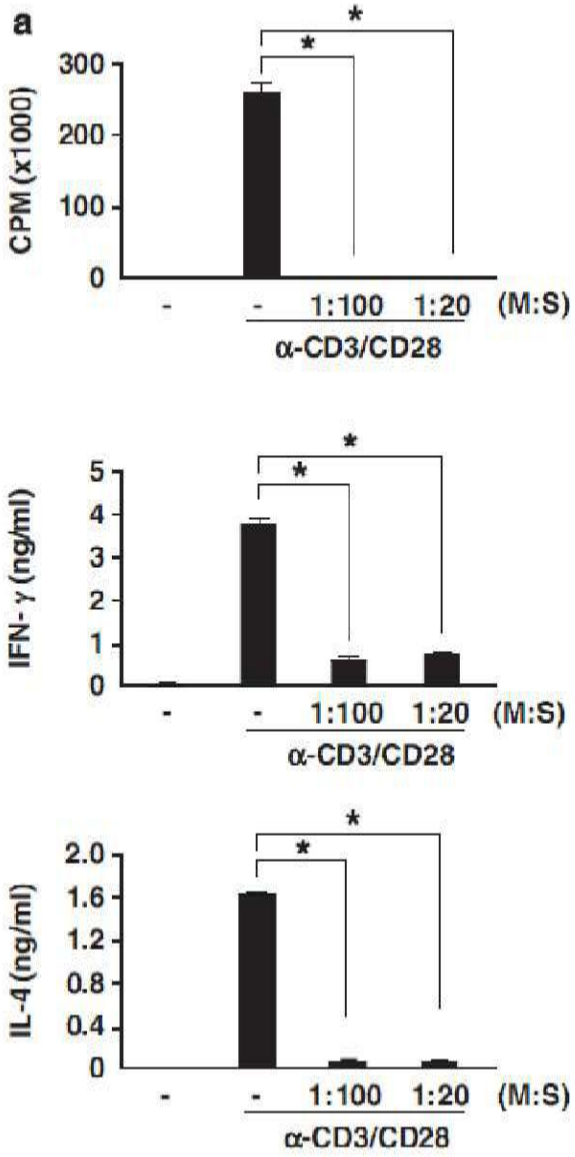
[0122] 실시예 2.6 - AD 마우스 모델에서, cMSCs가 피부 병변 및 배액 림프절 (draining lymph nodes)로 이동함을 확인

[0123] cMSC의 in vivo 이동 패턴을 검사하기 위하여, CM-DiI-염색된 cMSC를 PBS 대조군 마우스 및 AD 마우스의 정맥에 주입하였다 (도 6a). 3일 후, CM-DiI-cMSCs를 공초점 현미경으로 분석 하였다. 폐에서의 cMSCs는 PBS 및 AD 마우스에서 차이가 없는 반면 (도 6b), AD 마우스의 감작된 피부에서 cMSCs가 검출되었으나, PBS가 주입 된 대조군 마우스의의 피부에서는 검출되지 않았다. 이러한 결과는 cMSCs가 염증 영역으로 이동함을 나타낸다. AD 마우스에서의 병변 피부와 비병변 피부 사이의 cMSC 이동 패턴을 비교하기 위해, OVA 패치를 마우스의 좌측에만 부착 하였다 (도 6a). CM-DiI 염색된 cMSC을 주입하고 3일 후, 액와 림프절 (axillary lymph nodes)을 분석하였다. 병변 근처에 위치한 좌측 림프절에서 더 많은 cMSCs가 검출되었다 (도 6c). 이러한 결과는 병변 근처 림프절 통해 염증의 영역으로 cMSCs가 이동하며, 억제된 효과기세포 (effector cell)를 통하여 IL-4를 억제할 수 있음을 시사한다 (도 5e).

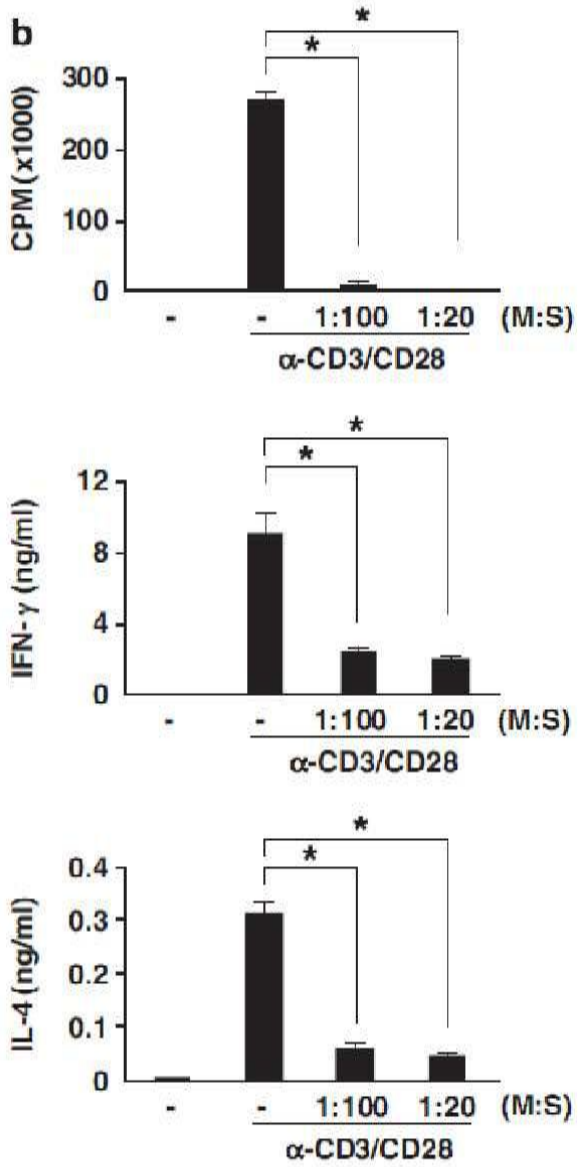
[0124] 당업계의 숙련자에게는, 통상의 실험을 사용하면 본원에 특별히 기재된 발명의 특정 실시양태들에 대한 많은 등가 형태를 인식할 것이며 또는 확인할 수 있다. 이러한 등가형태는 특허청구범위의 범위 내에 포함되는 것이다.

도면

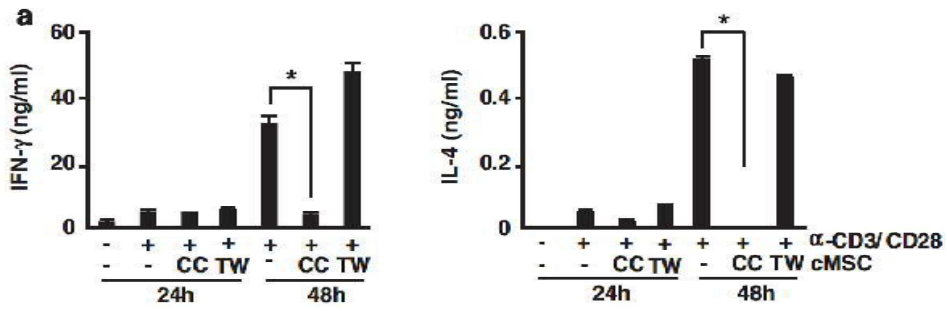
도면1a


a
CPM (x1000)
300
200
100
0
*
*
-
-
1:100
1:20
(M:S)
α-CD3/CD28
IFN-γ (ng/ml)
5
4
3
2
1
0
*
*
-
-
1:100
1:20
(M:S)
α-CD3/CD28
IL-4 (ng/ml)
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0
*
*
-
-
1:100
1:20
(M:S)
α-CD3/CD28

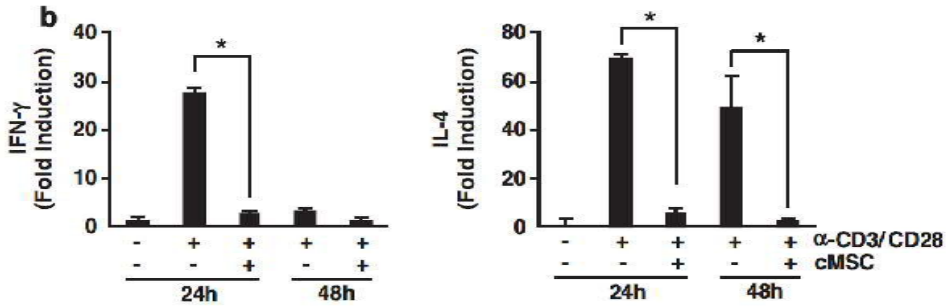
도면1b


b
CPM (x1000)
300
200
100
0
*
*
-
-
1:100
1:20
(M:S)
α-CD3/CD28
IFN-γ (ng/ml)
12
8
4
0
IL-4 (ng/ml)
0.4
0.3
0.2
0.1

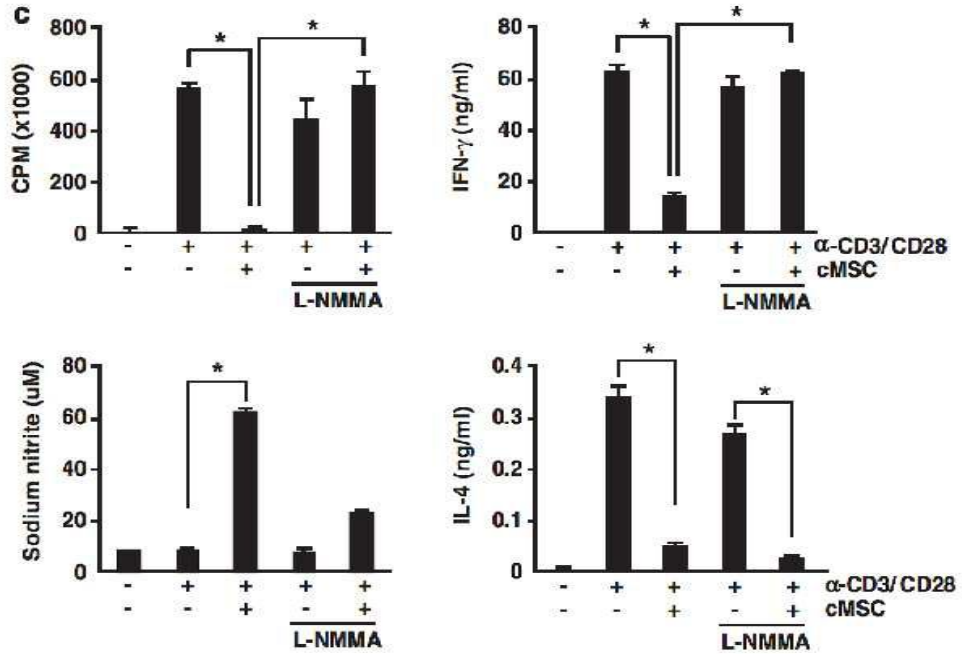
도면2a


a
IFN-γ (ng/ml)
60
40
20
0
IL-4 (ng/ml)
0.6
0.4
0.2
CC
TW
24h
48h
α-CD3/ CD28
cMSC

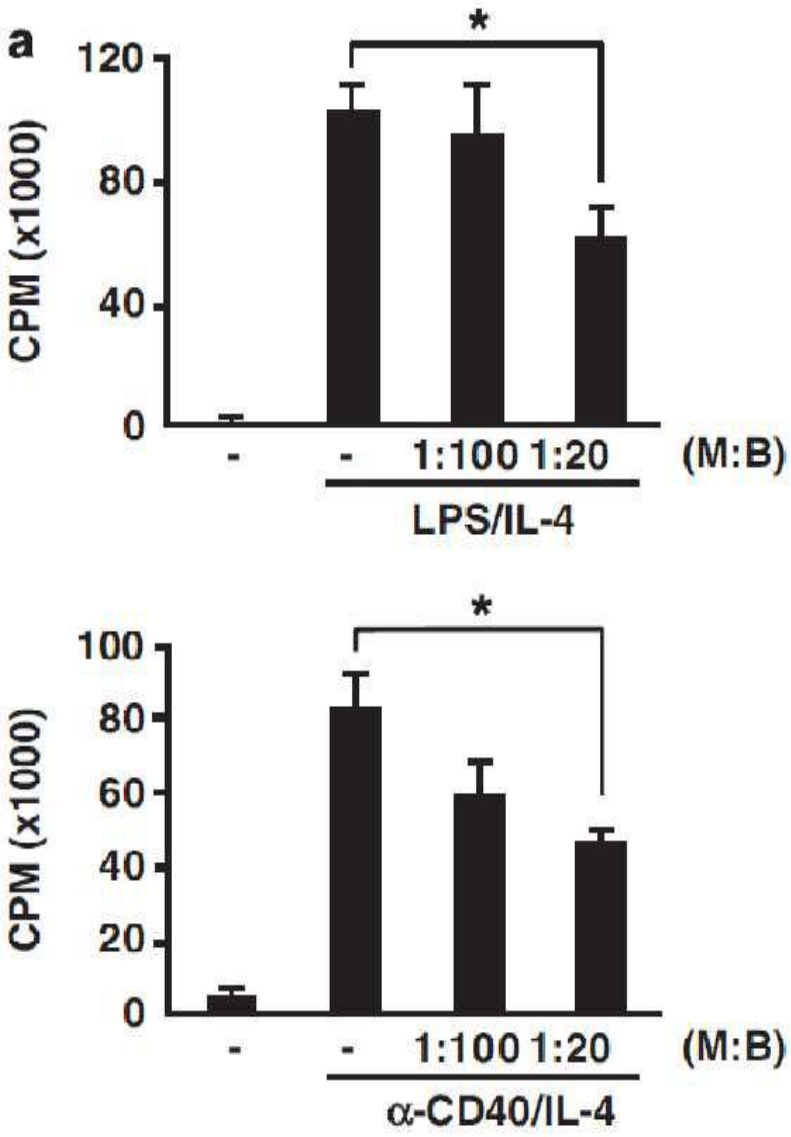
도면2b


b
IFN-γ (Fold Induction)
IL-4 (Fold Induction)
α-CD3/CD28
cMSC
24h
48h

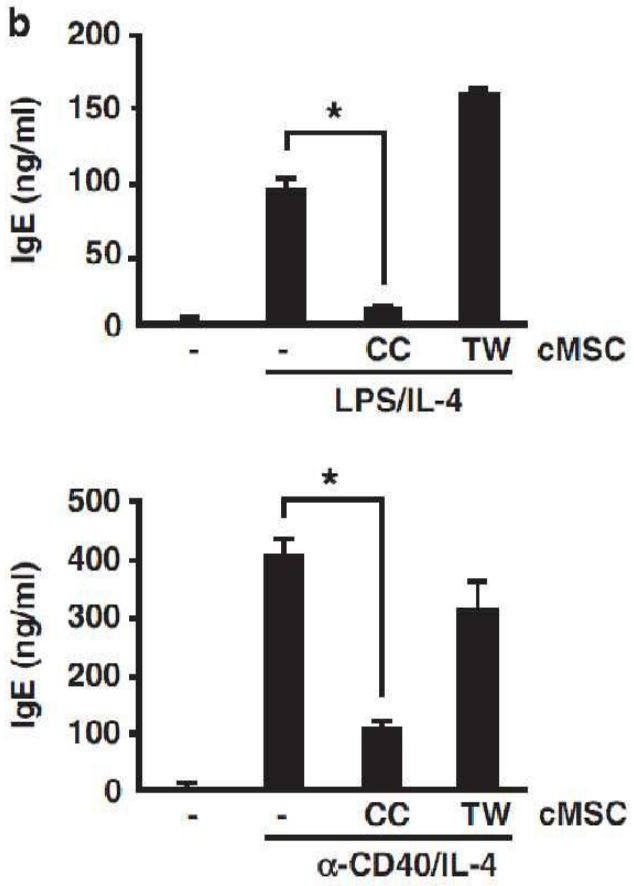
도면2c


c
CPM (x1000)
IFN-γ (ng/ml)
Sodium nitrite (uM)
IL-4 (ng/ml)
α-CD3/CD28
cMSC
L-NMMA

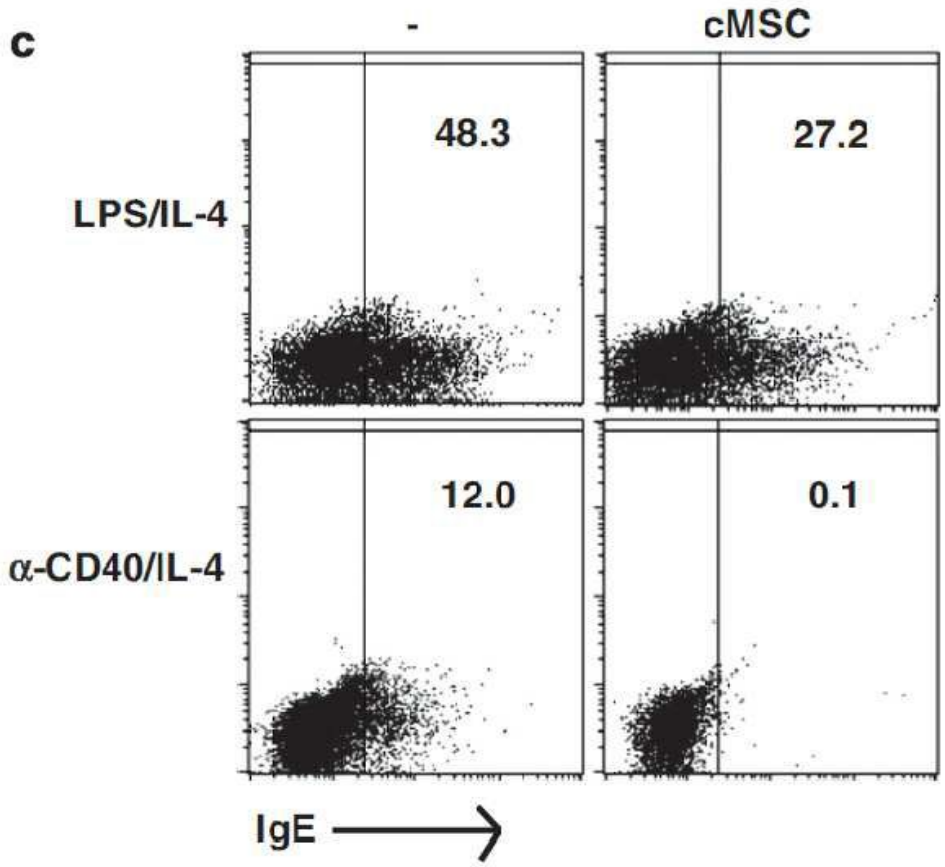
도면3a


a
CPM (x1000)
120
80
40
0
*
-
-
1:100
1:20
(M:B)
LPS/IL-4
CPM (x1000)
100
80
60
40
20
0
*
-
-
1:100
1:20
(M:B)
α-CD40/IL-4

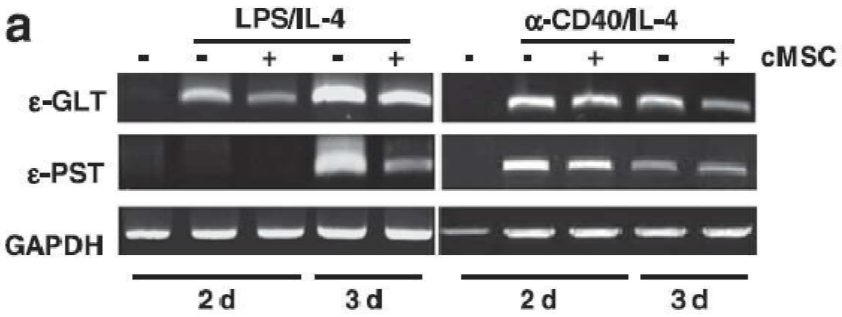
도면3b


b
IgE (ng/ml)
200
150
100
50
0
*
-
-
CC
TW
cMSC
LPS/IL-4
IgE (ng/ml)
500
400
300
200
100
0
*
-
-
CC
TW
cMSC
α-CD40/IL-4

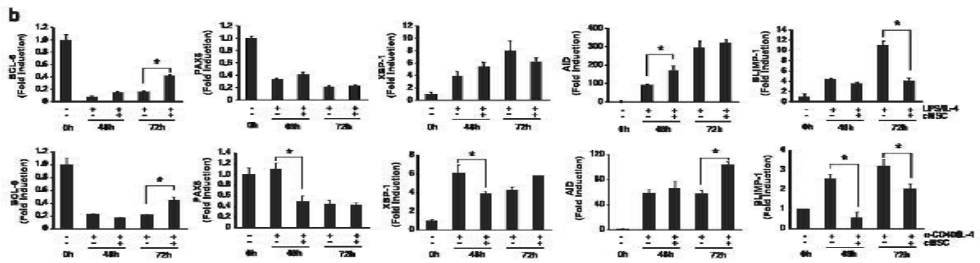
도면3c



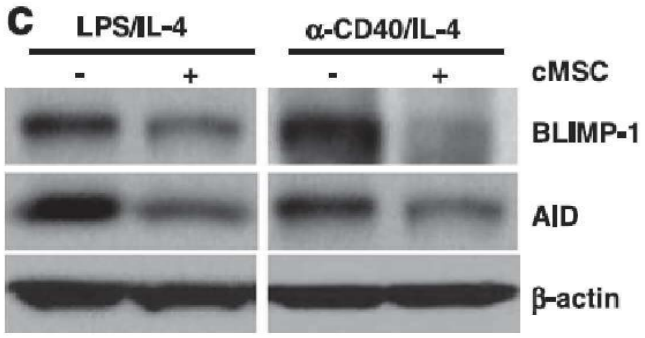
도면4a



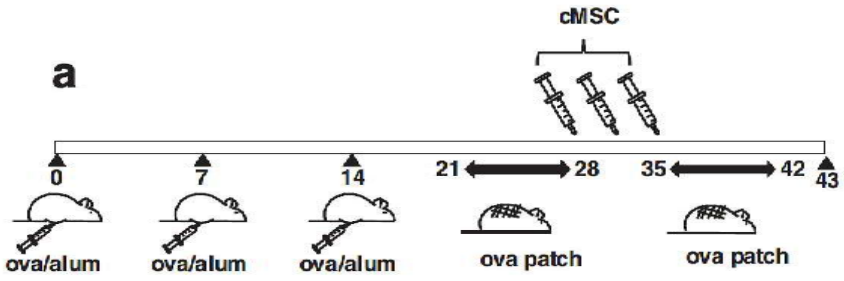
도면4b



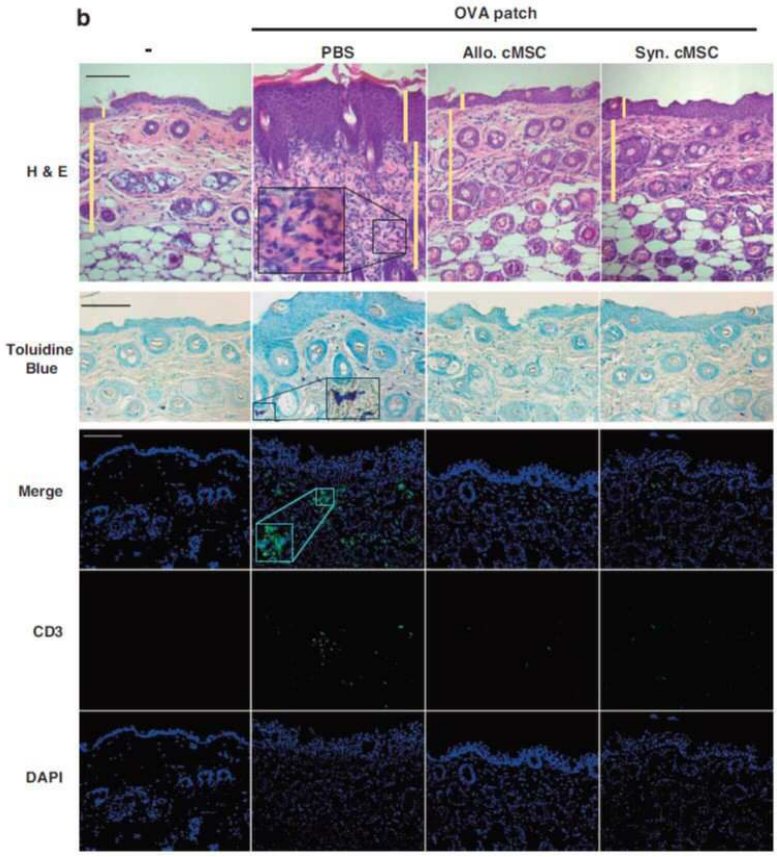
도면4c


c
LPS/IL-4
α-CD40/IL-4
-
+
-
+
cMSC
BLIMP-1
AID
β-actin

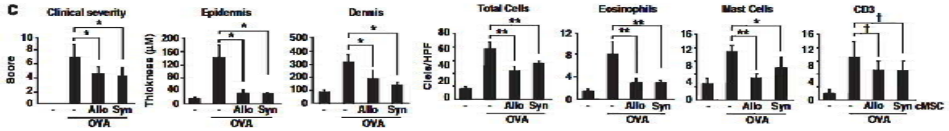
도면5a


a
cMSC
0
7
14
21
28
35
42
43
ova/alum
ova/alum
ova/alum
ova patch
ova patch

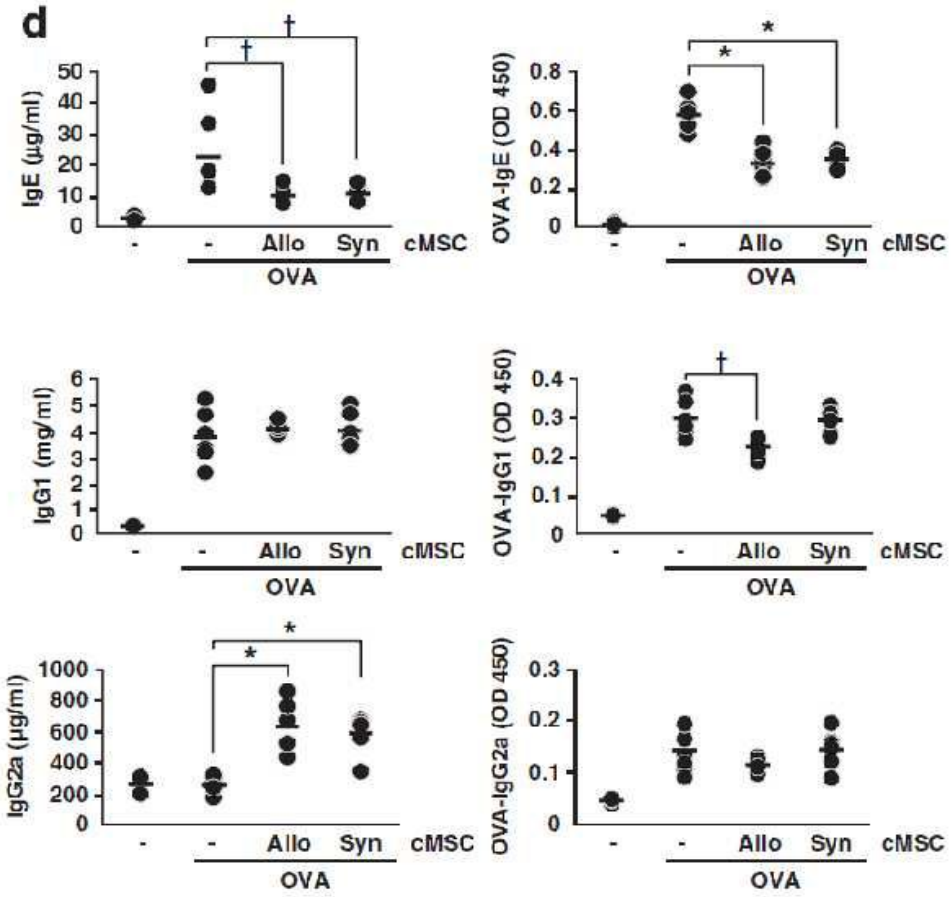
도면5b


b
OVA patch
-
PBS
Allo. cMSC
Syn. cMSC
H & E
Toluidine Blue
Merge
CD3
DAPI

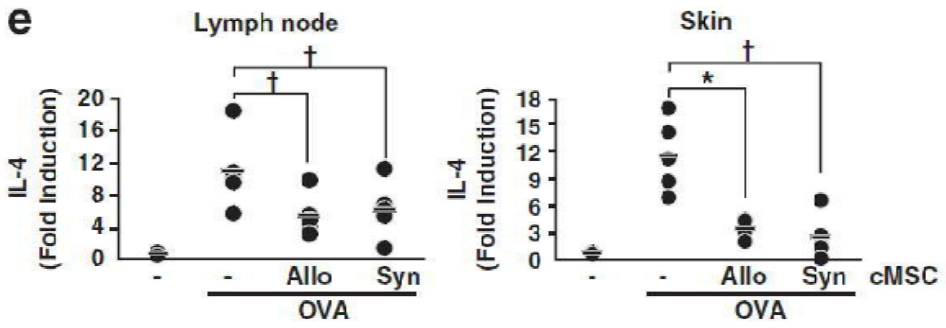
도면5c


c
Clinical severity
Score
Epidermis
Thickness (μM)
Dermis
Total Cells
Cells/HPF
Eosinophils
Mast Cells
CD3
- Allo Syn
OVA
- Allo Syn cMSC

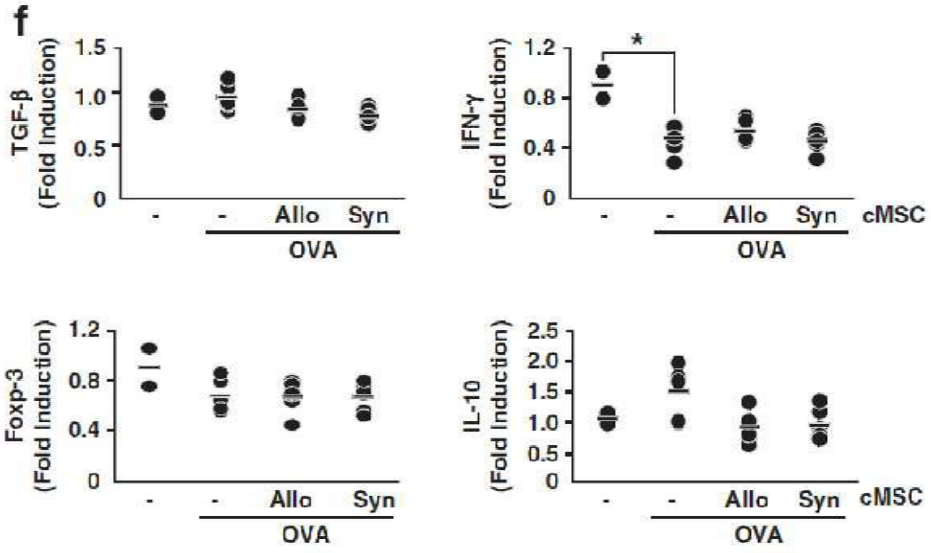
도면5d


d
IgE (μg/ml)
OVA-IgE (OD 450)
IgG1 (mg/ml)
OVA-IgG1 (OD 450)
IgG2a (μg/ml)
OVA-IgG2a (OD 450)
-
-
Allo
Syn
cMSC
OVA

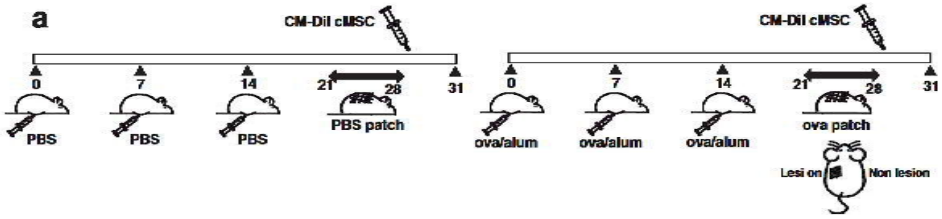
도면5e


e
Lymph node
Skin
IL-4
(Fold Induction)
-
-
Allo
Syn
cMSC
OVA

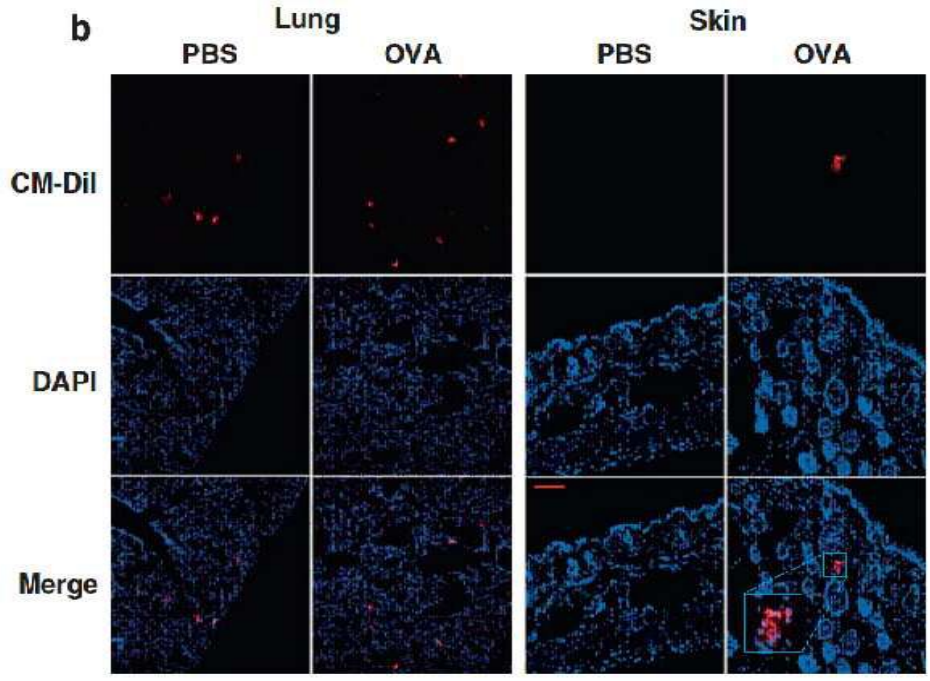
도면5f



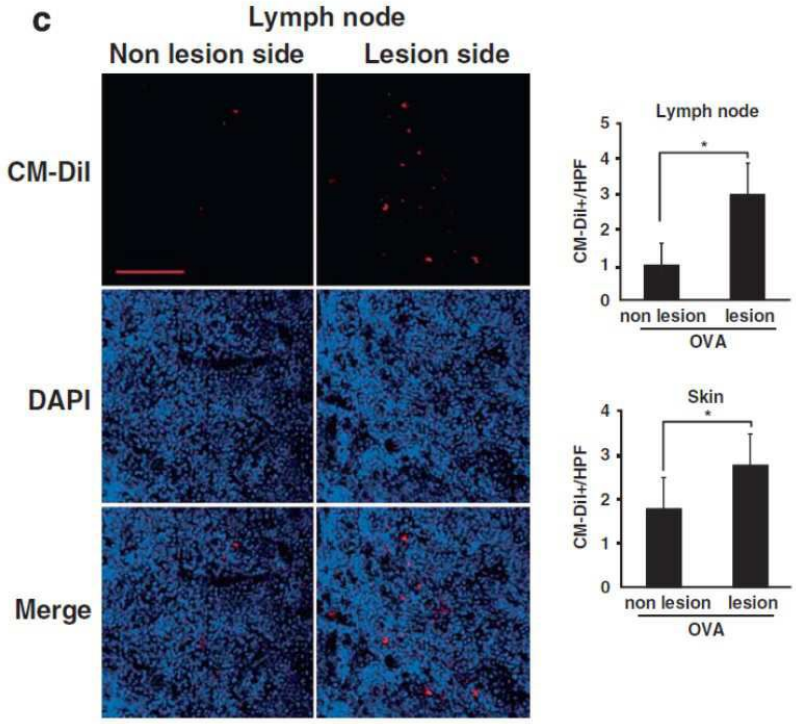
도면6a



도면6b



도면6c


c
Lymph node
Non lesion side
Lesion side
CM-DiI
DAPI
Merge
Lymph node
CM-DiI+/HPF
non lesion
lesion
OVA
Skin
CM-DiI+/HPF
non lesion
lesion
OVA