(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0095575
(43) 공개일자 2021년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0008508
(22) 출원일자 2021년01월21일
심사청구일자 2021년01월21일
(30) 우선권주장
1020200009279 2020년01월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
신동명
서울특별시 강동구 고덕로 131, 105동 2904호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
임지선
서울특별시 강동구 진황도로 107, 802호(길동, 도고하임)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 15 항

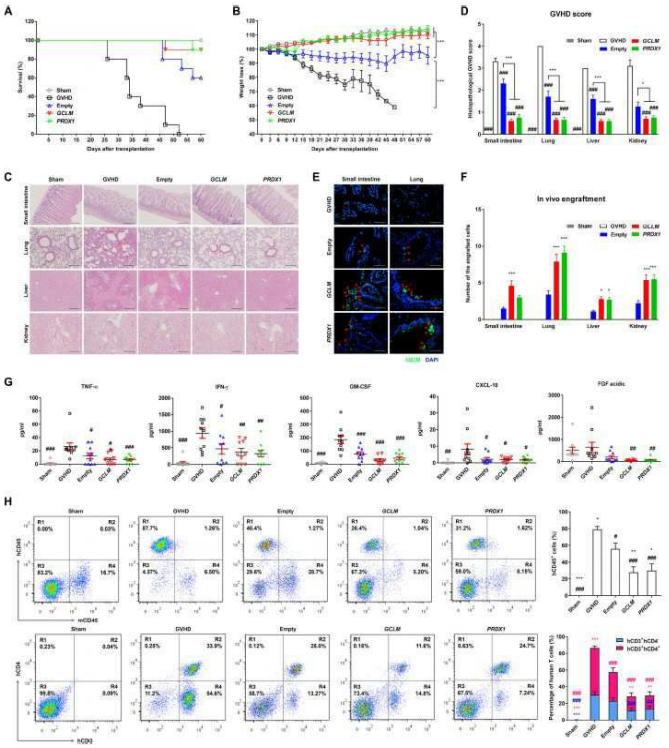
(54) 발명의 명칭 **CREB1-NRF2 경로 조절을 통해 기능 향상된 줄기세포를 이용한 난치성 면역질환 치료 용도**

(57) 요 약

본 발명은 CREB1-NRF2 경로 조절을 통해 기능 향상된 줄기세포를 이용한 난치성 면역질환 치료 용도에 관한 것으로, 구체적으로, CREB1-NRF2 경로를 통해 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD)의 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs) 치료 효과를 결정하는 글루타치온(glutathione; GSH)의 역할 규명에 대한 것

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도6



이다. 본 발명자들은 MSCs에서 CREB1 및 NRF2 신호전달계가 GSH 수준을 유지시키는데, 이는 GVHD 치료 효과를 결정한다는 것을 밝혀냈다. 또한, CREB1-NRF2에 의해 GSH 수준 및 GSH 회복능(GSH-recovering capacity; GRC)이 향상된 MSCs는 자가재생, 이동, 전-혈관신생, 항염증 및 T-세포 억제능이 개선되는 것을 확인하였다. 인간화된 마우스 모델에서 CREB1-NRF2 표적 유전자들이 과발현된 MSCs의 투여시, GVHD가 상당히 개선되었는데, 생존율 향상, 체중 감소 개선 및 GVHD 표적 기관에서 조직병리학적 손상 감소를 나타냈다. 또한, CREB1의 화학적 활성제인 포스콜린(Forskolin; Fsk)으로 처리한 MSCs의 항-천식 효과를 확인하였다. 한편, 항산화능 증진 MSC 세포 특이적 신호전달체계로 CREB1-NRF2 경로와 함께, 항-천식 치료 효능을 결정하는 ATF2 바이오마커를 발굴하였으며, 이에 대한 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 유효성 평가를 완료하였다.

(52) CPC특허분류
A61P 37/06 (2018.01)
G01N 33/5041 (2013.01)
G01N 33/5073 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465026787
과제번호	HI18C2391010018
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발(R&D)
연구과제명	줄기세포 기능 증진 융합 기술과 치료 기전 분석 기술을 활용한 저활동성 방광 줄기세포 치료 고도화 기반 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교산학협력단
연구기간	2018.10.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 분리된 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)에 시험물질을 접촉시키는 단계;

(2) 상기 시험물질을 접촉한 중간엽줄기세포에서 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cyclic adenosine monophosphate; cAMP) 반응성 인자 결합 단백질 1(CREB1) 및 핵 인자 적혈구 2 유사 2(nuclear factor erythroid 2 like 2; NRF2)의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

(3) 대조구 시료와 비교하여 상기 CREB1 및 NRF2의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 난치성 면역질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 유래 중간엽줄기세포, 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 중간엽줄기세포, 골수(bone marrow; BM) 유래 중간엽줄기세포 또는 지방(adipose) 유래 중간엽줄기세포인 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 난치성 면역질환은 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD) 또는 천식인 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 GCLM, GCLC, GSR, PRDX1 및 ATF2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 과발현하는 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상된 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 자가재생, 세포이동, 전-혈관형성, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진된 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 유래 중간엽줄기세포, 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 중간엽줄기세포, 골수(bone marrow; BM) 유래 중간엽줄기세포 또는 지방(adipose) 유래 중간엽줄기세포인 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 난치성 면역질환은 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD) 또는 천식인 것

을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

CREB1 및 NRF2의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포 활성은 자가재생, 세포이동, 전-혈관형성, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성 촉진용 조성물.

청구항 12

분리된 중간엽줄기세포에 CREB1 및 NRF2의 활성화제를 처리하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 방법은 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)을 향상시키는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포 활성은 자가재생, 세포이동, 전-혈관형성, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 유래 중간엽줄기세포, 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 중간엽줄기세포, 골수(bone marrow; BM) 유래 중간엽줄기세포 또는 지방(adipose) 유래 중간엽줄기세포인 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CREB1-NRF2 경로 조절을 통해 기능 향상된 줄기세포를 이용한 난치성 면역질환 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동종 조혈모세포이식(Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; allo-HSCT)은 백혈병과, 림프종, 재생불량성 빈혈, 면역 결핍 질환 및 몇몇 고형암과 같은 질환을 가진 환자에 대한 치료법으로서, 1968년 이후로 성공적으로 사용되고 있다. allo-HSCT 이후, 생존율이 개선되었음에도 불구하고, 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD)은 이식 후 이환율 및 사망률을 상당히 야기한다. GVHD는 공여 T-세포 활성화에 따른 면역 조절 장애를 특징으로 하는 다기관 질환으로, 사이토카인 폭풍으로 최고조에 달하게 된다. 활성화된 효과 T-세포는 다른 면역 세포들과 함께, 인터루킨(interleukin; IL)-1, IL-2, 종양 괴사 인자-α(tumor necrosis factor-α; TNF-α) 및 인터페론-γ(interferon-γ; IFN-γ)를 포함하는 염증성 사이토카인을 방출하여 말단 기관 손상을 유발한다. GVHD에 대한 표준 예방 및 치료는 동종 T 세포 상에 심한 억제 효과를 가진 면역억제 약물을 사용하는 것이지만, 상기 치료는 잠재적으로 생명을 위협하는 감염 및 종양 재발의 위험을 증가시킨다. 더욱 중요한 것은, 환자의 약 50%가 1차 치료에 반응하지 않고, 스테로이드 불응성 급성 GVHD를 가진 환자들은 예후가 좋지 않아, 90%에 가까운 장기적 사망율을 보인다. 이에, GVHD에 대한 새로운 치료법을 개발하는 것은 임상에 있어서 시급하다.

[0003] GVHD에 있어서 세포 면역 치료의 잠재적 표적으로, 많은 면역 조절 세포들이 밝혀지고 있다. 임상 시험 결과, 생체 외(*ex vivo*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 유도된 조절 T (regulatory T; T_{reg}) 세포의 주입이 급성 GVHD의 발생을 상당히 감소시키는 것으로 확인되었다. 또한, 임상 시험에서는 동종 반응성 T 세포의 결핍 및 T_{reg} 세포의 유도를 촉진하기 위한, 자연 살해(natural killer; NK) 세포 주입 및 생체 내(*in vivo*) NK 활성화의 효과를

조사하였다. 추가적으로, 조혈성(골수 유래 억제 세포) 및 기질성 기원(중간엽 줄기/기질 세포; MSCs)의 다양한 골수 억제 개체군 뿐만 아니라, $FoxP3^{neg}IL\text{-}10^{+}$ (FoxP3-음성) 조절 T 및 NK T 세포의 치료 효과가 전임상 및 임상 단계에서 평가되고 있다.

[0004] 특히, 선천 및 적응 면역 세포에 있어서, MSCs가 광범위한 면역 억제 및 면역 조절 특성을 보이므로, 제대 및 성체 조직 유래 MSCs에 기반한 세포 치료는 치료 불응성 GVHD에 있어 유망한 전략이다. 최근에, 본 발명자들은 저산소증 및 칼슘 이온으로 프라이밍된 소형 세포(Small cells primed with Hypoxia and Calcium ions; SHC)라고 일컫는 과정을 통해 제조된 인간 MSCs가 GVHD의 인간화 마우스 모델에서 향상된 치료 효과를 나타내는 것으로 보고하였다. 하지만, GVHD 치료를 위한 MSC 주입은 전임상 및 임상 시험에서 상반되는 결과를 나타냈다. 이러한 상반되는 데이터는 GVHD에서 MSCs의 치료 효과를 나타내는 세포 내인성 및 외인성 인자들에 대한 이해를 개선할 필요가 있음을 강력히 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2019-0138244 (2019.12.12 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 분리된 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)에서 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cyclic adenosine monophosphate; cAMP) 반응성 인자 결합 단백질 1(CREB1) 및 핵 인자 적혈구 2 유사 2(nuclear factor erythroid 2 like 2; NRF2)의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 난치성 면역질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 CREB1 및 NRF2의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진용 조성물, 이를 이용한 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 분리된 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)에 시험물질을 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉한 중간엽줄기세포에서 CREB1 및 NRF2의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조구 시료와 비교하여 상기 CREB1 및 NRF2의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 난치성 면역질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 CREB1 및 NRF2의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 분리된 중간엽줄기세포에 CREB1 및 NRF2의 활성화제를 처리하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 CREB1-NRF2 경로 조절을 통해 기능 향상된 줄기세포를 이용한 난치성 면역질환 치료 용도에 관한 것으로, 구체적으로, CREB1-NRF2 경로를 통해 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD)의 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs) 치료 효과를 결정하는 글루타치온(glutathione; GSH)의 역할 규명에 대한 것이다. GVHD는 동종 조혈모세포 이식의 주요 합병증이다. GSH는 GVHD 발병과, GVHD를 치료하기 위해 세포 면역치료에 사용되는 MSCs의 핵심 기능을 유지하는데 중요한 역할을 수행한다. 하지만, MSCs에서의 GSH에 대한 분자

적 및 기능적 중요성은 여전히 잘 알려지지 않았다. 본 발명자들은 MSCs에서 CREB1 및 NRF2 신호전달계가 GSH 수준을 유지시키는데, 이는 GVHD 치료 효과를 결정한다는 것을 밝혀냈다. 또한, CREB1-NRF2에 의해 GSH 수준 및 GSH 회복능(GSH-recovering capacity; GRC)이 향상된 MSCs는 자가재생, 이동, 전-혈관신생, 항염증 및 T-세포 억제능이 개선되는 것을 확인하였다. 인간화된 마우스 모델에서 CREB1-NRF2 표적 유전자들이 과발현된 MSCs의 투여시, GVHD가 상당히 개선되었는데, 생존율 향상, 체중 감소 개선 및 GVHD 표적 기관에서 조직병리학적 손상 감소를 나타냈다. 또한, CREB1의 화학적 활성제인 포스콜린(Forskolin; Fsk)으로 처리한 MSCs의 항-천식 효과를 확인하였다. 한편, 항산화능 증진 MSC 세포 특이적 신호전달체계로 CREB1-NRF2 경로와 함께, 항-천식 치료 효능을 결정하는 ATF2 바이오마커를 발굴하였으며, 이에 대한 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 유효성 평가를 완료하였다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 CREB1이 높은 GSH 수준을 나타내는 MSCs에서 활성화된다는 결과를 나타낸다.

도 2는 살아있는 세포에서 GSH 동역학에 대한 고효율 실시간 측정 결과를 나타낸다.

도 3은 FSK 프라이밍이 hES-MSC GSH 동역학 및 면역조절 기능을 향상시킨다는 결과를 나타낸다.

도 4는 NRF2가 CREB1-매개 GSH 동역학의 중요한 작용자(effector)라는 결과를 나타낸다.

도 5는 CREB1-NRF2 의존성 GSH 조절자들의 과발현이 MSC 면역조절 기능을 향상시킨다는 결과를 나타낸다.

도 6은 높은 GRC MSC는 GVHD에서 치료 효과를 향상시킨다는 결과를 나타낸다.

도 7은 FSK 프라이밍의 천식 치료 효능 평가를 위한 실험 모식도를 나타낸다.

도 8은 BALF(Bronchoalveolar lavage fluid) 내 면역 세포 측정 및 관찰 결과를 나타낸다.

도 9는 폐 조직의 조직학적 염색 결과를 나타낸다.

도 10은 Human β2-microglobin (hB2MG) 단백질의 면역염색 결과를 나타낸다.

도 11은 항산화 물질로 줄기세포능이 강화된 MSC에서 ATF2의 RNA, 단백질의 발현양을 확인한 결과를 나타낸다.

도 12는 ATF2 shRNA를 안정적으로 발현하는 MSC 세포주를 확보하고, GSH Recovery Assay (GRA)를 통하여 해당 세포주에서 GSH 회복능이 감소함을 확인한 결과를 나타낸다.

도 13은 ATF2의 발현이 저하된 MSC의 CFU-F (자가재생 활성), 주화성(Chemotaxis) (이동 활성, 혈관형성능)을 확인한 결과를 나타낸다.

도 14는 ATF2 shRNA를 안정적으로 발현하는 세포주를 확보하여 ATF2의 줄기세포능 영향 여부를 재확인한 결과를 나타낸다.

도 15는 ATF2의 발현이 저하된 MSC의 CFU-F, 주화성, 항염증성(TNF-α ELISA), 다분화능(multi-potency)을 확인한 결과를 나타낸다.

도 16은 Human β2-microglobin (hB2MG) 단백질의 면역염색 통해 이식한 줄기세포의 폐조직 내 생착을 확인한 결과를 나타낸다.

도 17은 ATF2 유전자 넉-다운(knock-down)에 의한 UC-MSC 항천식 치료 효능 감소를 검증하기 위하여 반복 실험을 실시한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명자들은 게놈-와이드 유전자 발현 프로파일링 및 고효율(high-throughput) 생존 세포 GSH 모니터링 분석을 수행하여, CREB1이 레독스(redox) 항상성의 주요 조절자로 잘 알려진 NRF2의 매개를 통해, MSCs 내 GSH 동역학 유지에 필수적이라는 것을 확인하였다. NRF2는 GSH 합성 및 재순환에 관여하는 표적 유전자들을 전사시킴으로써 GSH 항상성을 조절하였다. 결과적으로, CREB1-NRF2 신호전달계는 GVHD의 인간화 마우스 모델에서 MSCs의 치료 효과를 결정하는 MSCs의 기능성을 강화시켰다. 종합하면, 상기 결과들은 MSCs 내에서 GSH 합성을 촉진하면서, CREB1-NRF2 경로를 통해 적절한 GSH 동역학을 유지하는 것이, GVHD를 포함한 동종 이식 질환의 치료에 유리하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0016] 본 발명은 (1) 분리된 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)에 시험물질을 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉한 중간엽줄기세포에서 CREB1 및 NRF2의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조구 시료와 비교하여 상기 CREB1 및 NRF2의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 난치성 면역질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0017] 상세하게는, 상기 중간엽줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 유래 중간엽줄기세포, 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 중간엽줄기세포, 골수(bone marrow; BM) 유래 중간엽줄기세포 또는 지방(adipose) 유래 중간엽줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 상세하게는, 상기 난치성 면역질환은 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD) 또는 천식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치거나 또는 단백질 사이의 결합에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 또한, 본 발명은 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0021] 바람직하게는, 상기 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 GCLM, GCLC, GSR, PRDX1 및 ATF2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 과발현할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 바람직하게는, 상기 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 바람직하게는, 상기 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 자가재생, 세포이동, 전-혈관형성, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 유래 중간엽줄기세포, 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 중간엽줄기세포, 골수(bone marrow; BM) 유래 중간엽줄기세포 또는 지방(adipose) 유래 중간엽줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 바람직하게는, 상기 난치성 면역질환은 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD) 또는 천식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서, "배양액"은 생체 외에서 줄기세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지, 상기 배지에 포함된 배양된 줄기세포의 분비물 등을 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium: CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예들 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, αMEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0027] 또한, 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명은 상기 줄기세포, 이의 분비물, 배지 성분을 모두 포함하는 형태, 분비물 및 배지성분만을 포함하는 형태, 분비물만을 분리하여 단독으로 또는 줄기세포와 함께 사용하는 형태, 또는 줄기세포만을 투여하여 체내에서 분비물을 생성하는 형태로 사용하는 것도 모두 가능하다.

[0029] 상기 줄기세포는 통상적으로 당업계에 공지된 어떠한 방법을 이용하여 획득할 수 있다.

[0030] 본 발명의 CREB1 및 NRF2를 과발현하는 중간엽줄기세포는 특정 질환의 치료를 위한 세포치료제로 이용될 수 있으며, 상기 처리는 상기 분자들의 직접적인 처리 또는 전-처리일 수 있다.

[0031] 상기 "세포치료제"란, 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가(autologous), 동종(allogenic),

이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 여타 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0032] 상기 세포 치료제는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 CREB1 및 NRF2의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0036] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포 활성은 자가재생, 세포이동, 전-혈관형성, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이밍(Priming)"은 줄기세포의 치료 효능을 증진시키기 위하여 반응성(활성)이 향상되는 현상을 의미한다.

[0038] 또한, 상기 활성 촉진용 조성물은 치료를 위한 세포치료제와 혼합하여 생체 내 주입함으로써 세포치료제의 생체 내 효과를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 줄기세포 자체에 본 조성물을 처리한 후 기능이 증가된 세포치료제를 생체 내 이식하는 방법으로도 사용될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 분리된 중간엽줄기세포에 CREB1 및 NRF2의 활성화제를 처리하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성 촉진 방법을 제공한다.

[0040] 바람직하게는, 상기 방법은 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)을 향상시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포 활성은 자가재생, 세포이동, 전-혈관형성, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 유래 중간엽줄기세포, 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 중간엽줄기세포, 골수(bone marrow; BM) 유래 중간엽줄기세포 또는 지방(adipose) 유래 중간엽줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0044] **<실험예>**

[0045] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0046] **1. 연구 승인**

[0047] 모든 동물 실험들은 울산대학교 의과대학의 동물실험윤리위원회로부터 승인받았다(IACUC-2018-12-184). 서울아

산병원의 인체실험윤리위원회에서 승인한 가이드라인에 따라 부모의 서면 동의를 얻은 후, 건강하고, 정상적이며, 만삭인 출생아로부터 인간 탯줄(umbilical cord; UC) 샘플을 얻었다. UC 수집 전, 모든 임산부로부터 사전 동의를 얻었다.

[0048] **2. 세포 배양 및 MSCs의 시험관 내(in vitro) 특성 분석**

[0049] H9-hESCs로부터 분화된 hES-MSCs는 rat tail collagen type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 코팅된 플레이트 상의 EGM2-MV medium (Lonza, San Diego, CA, USA)에서 배양되었다. 10% 열 불활화된 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 인간 상피 성장인자(5 ng/ml; Sigma-Aldrich), basic FGF(10 ng/ml) 및 long-R3 인슐린 유사 성장인자-1(50 ng/ml; ProSpec, Rehovot, Israel)을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM에서, 인간 UC-MSCs을 배양하였다. Lonza (Basel, Switzerland)로부터 구입한 인간 BM-MSCs는 제조사의 지시에 따라 배양하였다. 본 발명에 사용된 모든 MSCs는 37℃에서 5% CO_2의 습윤 대기에서 유지시켰다.

[0050] 세포 생존율을 측정하기 위해, MTT 분석(Sigma-Aldrich)을 수행하였다. MSCs의 세포 증식, 자가-재생(CFU-F), 다능성, 표면 마커 발현, 트랜스웰 이동, 마트리젤을 이용한 시험관 내 혈관형성의 정량화, 시험관 내 항염증, 면역 조절 및 동종 MLR 분석은 이전에 보고된 대로 수행하였다. 챔버 하단에 PDGF-AA (10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 또는 SDF1 chemokines (150 ng/ml; R&D Systems)이 포함된 8 μm pore Boyden chamber (Corning)을 사용하여, 주화성 활성을 측정하였다. 세포 기능 분석은 Image Pro 5.0 software (Media-Cybernetics, Rockville, MD, USA)를 이용하여 디지털 이미지 분석을 통해 정량화하였다.

[0051] **3. MLR 분석**

[0052] 여러 다른 인간 PBMCs는 STEMCELL Technologies로부터 구입하였다. X-RAD 320 x-ray irradiator (Precision X-Ray Inc., North Branford, CT, USA)를 사용하여, 인간 PBMCs 자극세포는 5.0 gray (Gy)에서 불활성화되었다. 불활성화된 PBMCs (1×10^5)는 인간 MSCs (2×10^4) 및 PBMCs 반응세포 (1×10^5)를 포함하는 96-웰 배양 플레이트의 각 웰에 첨가되었다. 혼합물은 추가로 5일 동안 5% CO_2에서 37℃로 반응시켰다. CFSE Cell Division Tracker Kit (#423801; BioLegend, San Diego, CA, USA)를 사용하여 세포 증식 활성을 분석하였고, BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 $CD3^+$ T cells (#300412; BD Biosciences)의 백분율을 분석하였다. FACS 데이터 분석은 FlowJo software 7.6.5 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA)을 사용하여 수행하였다..

[0053] **4. 인간화된 GVHD 동물 모델**

[0054] GVHD 동물 모델은 이전에 보고된 대로 제작하였다. 간단히 설명하면, 9주령 수컷 NOD/ShiLtJ-*Prkdc*^{em1AMC}*Il2rg*^{em1AMC} (NSGA) 마우스(26-29 g)는 JOONGAH BIO (JABIO, Suwon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea)로부터 구입하였고, X-RAD 320 X-ray irradiator (Precision X-ray, North Branford, CT, USA)를 사용하여 2.0 Gy로 조사하였으며, 조사 후 24시간 내에, 2.5×10^6 인간 PBMCs (#70025; STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) 또는 동일 부피의 포스페이트-완충된 식염수(phosphate-buffered saline; PBS; Sham group)을 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 18일 후, 공 대조군-, *GCLM*- 또는 *PRDX1*-발현 컨스트럭트를 가진 5×10^5 인간 UC-MSCs를 100 μL PBS에 현탁시켰고, 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. Sham 및 GVHD 그룹에 대해, 대조군으로 PBS를 단독 주입하였다. GVHD의 임상 증상은 체중 감소, 생존율, 허리 구부러짐 및 털 질감을 측정하여 매일 평가하였고, 이틀마다 기록하였다. 그룹 당 5마리 마우스를 2번의 독립적 실험에 사용하였다. 조직학적 및 다중 사이토카인 분석을 위해, MSC 투여 6주 후, 모든 그룹의 마우스로부터 표적 기관(폐, 간, 신장 및 소장) 및 말초 혈액을 수집하였다. 마우스는 치료 그룹에 임의로 배정하였고, 조사, 세포 이식, 또는 비히클 주입 및 일일 검사의 순서는 임의로 진행하였다. 치료 그룹은 GVHD 유도 절차에 관련된 연구자에게는 숨겼다. 모든 GVHD 증상, 조직학적 분석 및 유전자 발현 측정은 블라인드된 연구자에 의해 수행되었다.

[0055] **5. GVHD 동물 평가**

[0056] GVHD 표적 기관에 대한 조직학적 평가는 이전에 보고된 대로 수행하였다. 공여 T 세포 증식에 있어서, NSG 마우스 혈액으로부터 분리된 세포는 500 μl PBS에 재현탁되었고, 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate)- 또는 피코에리트린(phycoerythrin)-접합된 1차 항체들로 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 인간 항원 CD3 (#300412), CD4 (#300512) 및 CD45 (#555483)과, 마우스 항원 CD45 (#553079)에 대한 1차 항체들은 BD Biosciences로부터 구입하였다. 세포의 형광 세기는 BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences)

를 사용하여 분석하였다. 데이터는 FlowJo software 7.6.5 (FlowJo)를 사용하여 분석하였다.

[0057] 다중 사이토카인 분석을 위해, Magnetic Luminex Screening Assay Human Premixed Multi-Analyte Kit (#LXSAHM-28, R&D Systems)를 사용하여, 인간화된 GVHD 마우스 유래 혈청을 분석하였다. 28-plex 인간 사이토카인들의 측정 및 정량화는 KOMA BIOTECH Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하였고, Varioskan Flash Reader (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0058] **6. 살아있는 세포에서 GRC의 실시간 관측**

[0059] 인간 MSCs는 Greiner CELLSTAR 96-well plates (# 655090; Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria)에 웰 당 1×10^3 세포의 밀도로 접종되었다. 12시간 추가 배양 후, 2 μM FreSHtracer (Cell2in, Inc., Seoul, Korea)가 포함된 배양 배지에서, 37℃로 5% CO_2 배양기에서 2시간 동안 세포들을 표지하였다. ×200 또는 ×400 배율을 가진 Operetta High-Content Imaging System (HH12000000; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여, 200 μM diamide (Sigma-Aldrich) 처리 3분 전부터 처리 42분 후까지 세포의 타임-랩스 이미지를 기록하였다. FreSHtrace의 FR 수치를 얻기 위해서, 430 및 520 nm에서 여기되는 형광 방출을 510 및 580 nm에서 각각 검출하였다. 공초점 모드를 가진 Harmony High-Content Imaging and Analysis Software 3.1 (PerkinElmer)를 사용하여, 형광 신호를 분석하였다.

[0060] **7. 전사체(Transcriptome) 분석**

[0061] 배양 배지에서 2시간 동안, 2 μM FreSHtracer로 표지된 hES-ESCs를, FreSHtracer의 580 nm 대비 510 nm에서의 형광 세기의 비율(F_{510}/F_{580} ratio; FR)에 따라, AriaIII Flow Cytometer System (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하여 GSH^{High} 및 GSH^{Low} 분획으로 분리하였다. DNase I (QIAGEN) 처리를 포함하는 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여, FACS-분리된 세포 유래 총 RNA를 분리하였다. Affymetrix GeneChip Human (for hESC-derived M-MSCs) 20 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)을 사용하는 분석을 위해, 1 마이크로그램의 총 RNA를 적용하였다. 마이크로어레이 이미지 데이터는 GeneChip GCS3000 Scanner and Command Console software (Affymetrix)로 가공하였다. 6개의 샘플(각 그룹에서 3개의 독립적인 샘플)의 CEL 파일을 가져온 후, Affymetrix Expression Console Software에서 구현된 강력한 multi-average (RMA) 방법을 사용하여 데이터를 요약하고 표준화하였다.

[0062] 유전자 네트워크, 생체 기능 및 표준 경로에 대한 전사체 데이터베이스의 기능적 분석을 위해, 기본 설정으로 MetaCore microarray software (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA) 또는 geneset enrichment analysis (GSEA; Broad Institute, Cambridge, MA, USA)을 사용하였다. MetaCore 분석에 있어서, $p < 0.05$인, 15배 이상 상향- 또는 하향-조절된 유전자들은 유의적으로 변화가 있는 것으로 정의하였다. GSEA에 있어서, 유전자 세트들은 공개된 문헌으로부터 얻거나, 선별된 기능적 유전자 세트(C2) 데이터베이스에서 필터링하였다. 유의적 차이는 오류 발견 비율(false discovery rate; FDR) <0.25을 기반으로 결정하였다.

[0063] **8. 유전자 발현 분석**

[0064] 표적 유전자들의 mRNA 수준의 정량적 측정은 이전에 보고된 대로 50 ng의 총 RNA를 사용하여 수행하였다. 표적 유전자들의 상대 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 측정하였고, *GAPDH*는 내재성 대조군 유전자로서 사용되었다.

[0065] **9. 웨스턴 블랏팅**

[0066] RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로, 세포 추출물(30 ㎍)을 제조하였고, SDS-PAGE 젤 상에서 분리하였다. 표시된 단백질들의 발현 수준은 특정 항체들을 프로브로 하여 측정하였다. 표시된 단백질들에 대한 신호 밀도는 National Institutes of Health ImageJ software를 사용하여 측정하고 정량화하였다.

[0067] **10. 면역염색**

[0068] NRF2 단백질을 검출하기 위해서, 인간 MSCs는 4% 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich)로 30분 동안 고정시켰고, NRF2에 특이적인 항체(#Ab62352; Abcam)로 염색하였으며, 이후 Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibody (#A11008, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 표지하였다. 핵은 DAPI (Sigma-Aldrich)로 대비염색하였다. 이미지들은 ZEISS LSM800 confocal microscope system (Carl Zeiss, Munich, Germany)를 사용하여

획득하였다.

[0069] **11. ChIP 분석**

[0070] ChIP 분석은 Magna ChIP G Kit (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여, 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 자세한 과정은 NRF2에 대한 ChIP 등급 항체(#Ab62352; Abcam)를 사용하여, 이전에 보고된 대로 수행하였다.

[0071] **12. 이소성(Ectopic) 발현 및 RNA 간섭**

[0072] 인간 *GCLM, GCLC, PRDX1* 및 *GSR* 유전자에 대한 오픈 리딩 프레임(Open reading frame; ORF) 컨스트럭트들은 구입하였고(Dharmacon, Lafayette, CO, USA; GCLM: #OHS1770-202318473; GCLC: #OHS6085-213573328; PRDX1: #OHS1770-202312884; GSR: #OHS6085-213573329), Gateway Technology reaction (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여, pLX304 lentiviral vector (Addgene plasmid 25890)에 클로닝하였다. 표시된 유전자들의 침묵을 위해, 각 표적에 대해 2개의 독립적인 shRNAs를 디자인하였고, pLenti6/Block-iT lentiviral vector (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)에 클로닝하였다. ORFs 또는 shRNA 컨스트럭트를 포함하는 렌티바이러스는 이전에 보고된 대로 제조하였다. 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 분석은 렌티바이러스 감염 4일 후에 수행하였다. 각 shRNA에 대한 올리고뉴클레오티드 서열을 표 1에 나타냈다.

표 1

[0073]

Oligonucleotides (shRNA)	Target sequences
Human *NRF2*_#1	AGTTTGGGAGGAGCTATTATC
Human *NRF2*_#2	CCGGCATTTCACTAAACACAA
Human *CREB1*_#1	GCAAATGACAGTTCAAGCCC
Human *CREB1*_#2	GTACAGCTGGCTAACAATGG
Human *GCLC*	GCGATGAGGTGGAATACATGT
Human *GCLM*	GCGAGGAGCTTCATGATTGTA
Human *GSR*	GCCCTGGGTTCTAAGACATCA
Human *PRDX1*	GCACCATTGCTCAGGATTATG
Human *ATF2*_#1	GAAGAAGTGGGTTTGTTTA
Human *ATF2*_#2	GCATCATTACAGGTTCCCAAT
Human *JUNB*_#1	CCCATCAACATGGAAGACCAA
Human *JUNB*_#2	GCCTCTCTCTACACGACTACA

[0074] **13. cAMP 양 또는 PKA와 CREB1 활성의 정량화**

[0075] Dr. Youngsup Song(University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea)으로부터 제공받은, 8개 일련의 CRE(8× CRE-Luc)을 포함하는 루시퍼라제 리포터를 사용하여, CREB1의 생물학적 활성을 측정하였다. Parameter cAMP Assay Kit (R&D Systems)를 사용하여, 20 μg 세포 추출물에서 cAMP의 세포 내 양을 측정하였고, PKA Kinase Activity Assay Kit (Abcam)를 사용하여, 5×10^5 세포로 제조된 세포 추출물로부터 PKA 키나아제 활성을 측정하였다. 분석은 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0076] **14. 통계적 분석**

[0077] 데이터는 Bonferroni post-hoc test와 함께, non-parametric Mann-Whitney test 또는 ANOVA (one- or two-way)를 사용하여 분석하였다. 모든 분석은 GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. $p < 0.05$는 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

[0078] **<실시예 1> 높은 GSH 수준을 나타내는 MSCs에서 상향조절되는 CREB1 활성**

[0079] 최근에, 본 발명자들은 최초로 GSH에 대한 가역적 화학 프로브인, FreSHtracer(fluorescent real-time thiol tracer)에 대해 보고하였는데, 이는 GSH와의 빠른 가역적 및 비율 계량적 반응으로 인해, 살아있는 세포에서 GSH 수준을 실시간으로 관측할 수 있다. 본 발명에서, 본 발명자들은 배아줄기세포(ESCs) 유래 인간 MSCs(hES-

MSCs)를 유세포 분석기를 통해 분리하였고, 이들을 GSH에 대한 FreSHtracer의 형광 반응에 기반하여 GSH^{High} 및 GSH^{Low} 서브집단으로 나누어서, MSCs에서 레독스 항상성의 분자적 특성을 밝혀냈다(도 1A). 보고에 따르면, 580 nm 대비 510 nm에서의 형광 세기 비율(F_{510}/F_{580} ratio; fluorescence ratio [FR])은 GSH 농도와 관련되는 것으로 알려졌다. GSH^{High} 및 GSH^{Low} hES-MSCs의 전사체 분석 결과, 149개의 차등적으로 발현하는 유전자들이 확인되었다(GSH^{High} versus GSH^{Low} hES-MSCs에 있어서, 70개 상향조절 및 79개 하향조절). MetaCore 경로 방법을 사용한 유전자 온톨로지(Gene-Ontology; GO) 분석 결과, 조혈모세포 이동, 세포 부착 및 염증 반응과 관련된 경로 및 과정에 연관된 유전자들이 GSH^{High} 및 GSH^{Low} 세포에서 차등적으로 발현되는 것을 확인하였다(도 1B). MetaCore 유전자 네트워크 분석 결과, CREB1-관련(도 1C) 또는 유비퀴틴- 및 RelA-관련 유전자 네트워크는 GSH^{High} hES-MSCs에서 특징적으로 나타났다.

[0080] GSH 수준 조절에 있어, CREB1의 중요성을 추가적으로 조사하기 위해서, 본 발명자들은 게놈-와이드 연구로부터 CREB1-결합 표적 유전자들을 수집하여 유전자 세트들을 선별한 후, 상기 선별된 CREB1 표적들을 기반으로 다른 GSH 수준에서 hES-MSCs의 전사체를 비교하였다. 유전자세트 증폭 분석(Geneset enrichment analysis; GSEA) 결과, GSH^{High} hES-MSC 샘플의 전사체는 DNA 대사, 복제 및 복구 과정에 관련된 CREB1 표적들로 명백히 증폭되어 있었다(도 1D). 특히, cAMP-의존성 전사 인자 ATF2(activating transcription factor 2)과, JUN, JUNB 및 FOS Like-1 (FOSL1)를 포함하는 전사인자 복합체 AP-1이 CREB1 유전자 네트워크에서 차등적으로 조절되는 인자라는 것이 밝혀졌다(도 1C). 상기 유전자들의 전사 수준 및 인산화된 활성 단백질은 GSH^{High} hES-MSCs에서 증가되었다(도 1E 및 도 1F). 또한, 인산화된 CREB1 단백질 및 8개 일련의 cAMP 반응 인자(cAMP response elements; CRE)를 포함하는 CREB1 리포터의 활성은 GSH^{High} hES-MSCs에서 증가되었다(도 1F 및 도 1G). 상기 결과와 일치하게도, cAMP 수준 및 CREB1의 상류 활성자인 cAMP-의존성 단백질 키나아제 A(cAMP-dependent protein kinase A; PKA) 활성은 GSH^{High} hES-MSCs에서 증가되었는데(도 1H), 이는 높은 GSH 수준을 나타내는 hES-MSCs에서 CREB1이 활성화된다는 것을 뒷받침한다.

[0081] **<실시예 2> 살아있는 세포에서 GSH-회복능의 실시간 측정**

[0082] CREB1 유전자 네트워크의 생물학적 관련성을 조사하기 위해서, 본 발명자들은 Operetta high-content imaging analysis system을 사용하여, 모든 단일 세포에서 GSH 변화를 실시간 추적할 수 있도록, FreSHtacer-기반 GSH 분석 방법을 개선하였다. 티올-특이적 산화제인 디아미드(diamide)와 같은 산화적 손상에 노출시킨 후, 약 1시간 동안 GSH 동역학의 패턴을 정량화하여, 여러 조건하에서 MSC GSH-회복능(GSH-recovering capacity; GRC)을 측정하고 정량화하였다(도 2A). hES-MSCs를 2 μM FreSHtracer로 2시간 동안 평형화시킨 후, 디아미드로 처리하면, FR은 디아미드 첨가 후 급격히 감소하였고, 용량 의존적 방식에 따라 점차적으로 미처리 수준으로 회복되었다. 상기 데이터로부터, 본 발명자들은 추후 GRC 분석을 위한 디아미드의 최적 용량은 200 μM이라는 것을 확인하였다. 예상대로, hES-MSCs에서 GRC는 GSH 합성효소 억제제인 부티오닌 설폭시민(buthionine sulfoximine)의 전처리(도 2B)와, 글루타치온 환원효소 억제제인 3-비스(2-클로로에틸)-1-니트로소우레아(3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea)의 전처리에 의해 심각하게 손상되었다. 다만, 세포-투과성 GSH인, 글루타치온 에틸 에스테르(glutathione ethyl ester; GSH-EE)는 GSH 수준을 증가시켰는데(도 2C), 이는 GRC 분석이 GSH 항상성에 대한 세포 능력을 측정하는데 적절하다는것을 나타낸다.

[0083] 다음으로, 본 발명자들은 고효율(high-throughput) GRC 분석을 수행하여, GSH^{High} hES-MSCs에서 전사적으로 상향조절되는 것으로 최초로 밝혀진 CREB1 표적 유전자들인 *JUN*, *JUNB*, *FOSL1* 및 *ATF2*의 역할을 조사하였고, 이후 GSH^{High} hES-MSCs에서, 단백질 수준도 더욱 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 1F). 각 유전자에 대한 침묵 결과, hES-MSCs의 기본 GSH 수준은 심각하게 감소하였고, 디아미드 처리 후 GRC는 손상되었다(도 2D-G). 또한, 본 발명자들은 상기 방법에 의해 생성되는 MSCs에 대한 GVHD 치료 효과를 뒷받침하는, SHC 과정에 의해 생산되는 MSCs의 원시성을 평가하기 위해서, GRC 분석의 유용성을 조사하였다. SHC 과정을 사용하여 배양된 인간 탯줄(umbilical cord; UC) 유래 MSCs(SHC-MSCs)는 단순히 배양된(naive) UC-MSCs에 비해 기본 GSH 수준 및 GRC 활성이 더 높았다(도 2H). 상기 결과와 일치하게도, FACS-분리된 GSH^{High} hES-MSCs는 GSH^{Low} 세포보다 크기가 더 작았고(도 2I), GSH^{High} hES-MSCs의 전사체는 SHC-MSCs에서 상향조절되는 유전자들로 구성된 유전자세트로 특징적

으로 증폭되어 있었다(도 2J). GSH^{High} hES-MSCs는 SHC-MSCs에 대한 바이오마커 서브세트의 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 즉, 본 발명자들은 가역적 GSH 화학 프로브와 고함량 생존 세포 이미지 분석을 조합하여, 살아있는 세포에서 GSH 동역학을 측정하고 정량화하기 위한 강력한 기술을 개발하게 되었다.

[0084] **<실시예 3> MSCs의 레독스 항상성 및 면역 조절 활성을 조절하는 CREB1**

[0085] GRC 방법을 사용하여, 본 발명자들은 MSCs에서 GSH 동역학의 조절에 있어 CREB1의 기능적 역할을 확인하였다. *CREB1*의 침묵 결과, hES-MSCs에서 기본 GSH 수준 및 GRC는 심각하게 감소하였고(도 3A), 이합체화 도메인-의존적 방식으로 B-ZIP 단백질의 DNA 결합을 방지하는, CREB1의 우성-음성(dominant-negative; DN) 억제제의 과발현과, GSH 동역학의 결핍이 유사하게 관측되었다(도 3B). CREB1-DN 과발현 세포는 단지 최소한의 CREB1 루시퍼라제 리포터 활성을 나타낸다. UC-MSCs에서 *CREB1* shRNA (sh*CREB1*)로 형질감염 또는 CREB1-DN의 발현은 GSH 수준을 격감시키고, GRC를 손상시켰는데, 이는 GSH 동역학의 조절에 있어서 CREB이 중요한 역할을 한다는 점을 뒷받침한다. 또한, 두 개의 MSC 타입에서 CREB1 활성화제인 포스콜린(Forskolin; Fsk)으로 전처리하면, 기본 GSH 수준 및 GRC가 증가되었는데(도 3C), 이는 MSC GSH 동역학을 유지하는데 CREB1이 중요한 역할을 한다는 점을 뒷받침한다.

[0086] 이와 관련하여, 2 μM FSK로 12시간 동안 전처리한 hES-MSCs(FSK-hES-MSCs)는 클론 생성 전구세포의 표지자인, 콜로니-형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성이 미처리(NT) 대조군 세포 보다 상당히 높게 나타났다(도 3D). FSK 프라이밍은 hES-MSC의 다능성에는 최소한으로 영향을 미키는 것으로 나타났다. FSK-hES-MSCs는 혈소판-유래 성장 인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 높은 주화성을 나타냈는데, 이는 PDGF 수용체(PDGFR) 억제제인 STI571에 의해 상당히 억제되는 것으로 나타났다(도 3E). 또한, FSK 프라이밍은 성체줄기세포의 이동 및 호밍(homing)을 조절하는 주요 케모카인인, 기질 유래 인자 1(stromal-derived factor 1; SDF1)에 대한 주화성을 향상시켰다. FSK-hESMSCs에서 SDF1 케모카인에 대한 개선된 반응성은 SDF1 수용체 CXCR4 길항제인 AMD3100에 의해 상당히 손상되었는데, 이는 CXCR4 신호전달 활성에 대한 의존성을 나타낸다(도 3F). 또한, 2 μM FSK로 12시간 동안 전처리한 인간 UC-MSCs에서, PDGF-AA 및 SDF1에 대한 반응으로 FSK의 주화성에 대한 유익한 효과가 관측되었다. 더구나, 마트리젤 튜브 형성 분석에 있어서, FSK-hES-MSCs 유래 조건 배지(conditioned medium; CM)는 내피 세포의 혈관생성능을 개선시켰다(도 3G). 이전 보고에서는, MSCs가 피토헤마글루티닌(phytohaemagglutinin; PHA)을 촉진하여, 인간 말초 단핵구 세포(peripheral mononuclear cells; PBMCs)의 시험관 내(*in vitro*) 증식을 억제한다고 밝혀냈다. 중요하게도, 본 발명에서는 PBMCs에서 FSK-hES-MSCs가 $CD3^{+}$ T 세포의 미토젠-작용 증식을 억제하는 것을 확인하였다(도 3H).

[0087] 추가적으로, 본 발명자들은 인간 골수(bone marrow; BM)-유래 MSCs(BM-MSCs) 상에서 FSK의 효과를 시험하였다. 상기 데이타와 일치하게도, 2 μM FSK로 12시간 동안 전처리한 BM-MSCs(FSK-BM-MSCs)는 세포 내 GSH 수준 및 GRC가 증가하는 것을 나타냈다. 또한, FSK 프라이밍은 CFU-F 활성, PDGF-AA 또는 SDF1에 대한 주화성 및 면역조절능과 관련된 BM-MSCs 기능성을 촉진시켰다. 종합하면, 상기 결과는 인간 ESCs, UC 및 BM을 포함하는 여러 기원 유래 MSCs의 핵심 기능을 유지시키는데, CREB1이 중요한 역할을 수행한다는 것을 증명한다. 이와 일치하게도, 유전자 발현 및 GRC 분석을 통해 검증된 다른 표적인 JUN의 침묵은 다능성, 증식, CFU-F 및 PDGF에 대한 주화성을 포함하는 MSCs의 핵심 기능을 심각하게 손상시켰는데, 이는 MSC 기능에 있어 CREB1 유전자 네트워크의 연관성을 추가적으로 뒷받침한다.

[0088] **<실시예 4> CREB1-매개 GSH 동역학의 중요한 작용자인 NRF2**

[0089] 다음으로, 본 발명자들은 MSCs에서 CREB 하류 작용자(effector)의 기능을 조사하였다. CREB1은 *NRF2* 프로모터에 결합하여, cAMP 신호전달 경로를 통한 *NRF2* 전사를 조절하는 것으로 보고되었다. NRF2는 GSH 경로 유전자들을 포함하는 항산화 반응의 주요 조절자이므로, 본 발명자들은 NRF2가 CREB1-매개 GSH 동역학에 있어 역할을 수행하는지 확인하였다. hES-MSCs에서 FSK 프라이밍은 *NRF2* 전사체 수준을 증가시켰고(도 4A), 이는 NRF2 단백질 수준의 용량 의존적 증가를 유도하였다(도 4B). FSK-hES-MSCs에서 NRF2 단백질 대다수는 핵에 위치하였는데, 이는 NRF2 경로의 활성화를 나타낸다(도 4C). 또한, FSK 프라이밍에 의한 NRF2의 유도 및 활성화는 UC- 및 BM-MSCs에서도 관측되었다. *CREB1* 침묵 및 *CREB1*-DN 발현 모두, NRF2 단백질의 FSK-매개 상향조절 및 핵 이동을 억제하였는데, 이는 FSK의 효과가 CREB1 의존적이라는 점을 뒷받침한다(도 4B 및 도 4C). *NRF2* shRNA (sh*NRF2*)를 가진 hES-ESCs는 기본 GSH 수준 및 GRC 활성이 크게 손실되는 것으로 나타났는데(도 4D), 이는 MSC GSH 항상성에 있어 NRF2가 주요 역할을 한다는 것을 뒷받침한다.

[0090] NRF2는 레독스 항상성을 조절하는 여러 유전자들의 전사를 직접 조절한다. hES-MSCs 및 UC-MSCs 모두에서, FSK

처리는 *GCLC*, *GCLM*, *GSR*, *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *MGST2* 및 *ALAS1*를 포함하는 NRF2 레독스 항상성 표적들의 서브세트를 상향조절하였다(도 4E). 크로마틴 면역침전(chromatin-immunoprecipitation; ChIP) 분석 결과, hES-MSCs에서 상기 유전자들의 프로모터들은 NRF2와 결합하고, FSK 프라이밍은 상기 위치에서 NRF2 결합을 더욱 촉진하는 것으로 밝혀졌다(도 4F). 상기 관심 유전자 중에서, GSH 합성(*GCLM* 및 *GCLC*) 및 레독스 순환(*GSR* 및 *PRDX1*)에 관여하는 유전자들의 FSK에 의한 유도는 *NRF2*의 발현에 의존적이었고(도 4G), sh*CREB1* 및 *CREB1*-DN 발현에 의해 억제되었다(도 4H). 또한, hES-MSCs에서 *NRF2* 침묵은 상기 유전자들의 발현을 전사체 및 단백질 수준 모두에서 감소시켰다(도 4I 및 도 4J). 상기 CREB1-NRF2 표적들은 FSK-BM-MSCs에서 상향 조절되었다. 상기 결과를 기반으로, 본 발명자들은 이후 연구를 위해 CREB1-NRF2 표적으로 *GCLM*, *GCLC*, *GSR* 및 *PRDX1*을 선택하였다.

[0091] 상기 CREB1-NRF2 표적 유전자들의 이소성 발현은 세포 내 GSH 수준 및 GRC를 강화시켰으며, 각 유전자의 침묵에 의해서는 심각하게 손상되었는데, 이는 상기 유전자들이 hES-MSCs의 레독스 항상성을 결정한다는 것을 뒷받침한다. *NRF2*-침묵된 hES-MSCs에서 GRC 결핍은 각 CREB1-NRF2 표적의 이소성 발현에 의해 충분히 회복되었다(도 4K). 종합하면, 상기 결과는 CREB1-NRF2 케스케이드는 GSH 합성 및 레독스 순환을 담당하는 유전자들을 직접 표적함으로써, MSC GSH 동역학을 조절한다는 것을 뒷받침한다.

[0092] **<실시예 5> MSCs에서 원시성(primitiveness)을 유도하는 CREB1-NRF2 표적들의 과발현**

[0093] 다음으로, 본 발명자들은 MSC 기능성에 있어서 CREB1-NRF2 표적들의 역할을 연구하였다. *CLM*, *GCLC*, *PRDX1* 및 *GSR*을 포함하는 표적 유전자 각각을 과발현하는 hES-MSCs는 세포 증식에 있어서는 큰 영향이 없었으나, 빈 컨스트럭트를 발현하는 대조군 MSCs에 비해 CFU-F 및 PDGF-반응 주화성 능력은 상당히 높게 나타났다.

[0094] 본 발명자들은 다른 조직 기원의 MSCs에서 CREB1-NRF2 표적들에 대해 유사한 역할을 관측하였다. UC-MSCs에서 *GCLM*, *GCLC*, *PRDX1* 및 *GSR*을 침묵시키거나, 과발현시키면, 각 표적 유전자의 침묵에 의해서는 세포 내 GSH 수준 및 GRC가 심각하게 손상되었고(도 5A), 각 표적 유전자의 과발현에 의해서는 세포 내 GSH 수준 및 GRC가 강화되었다(도 5B). hES-MSCs와 유사하게, 상기 유전자들 각각의 이소성 발현은 전체 GSH 수준 및 GRC에 있어 *NRF2* 침묵-유도된 결핍을 회복시켰다(도 5C). 이와 관련하여, *GCLM*, *GCLC*, *PRDX1* 및 *GSR*의 이소성 발현은 UC-MSCs가 산화적 스트레스-유도 세포 사멸에 대해 내성을 갖도록 하였다.

[0095] 기능적 분석에서, 각각의 CREB1-NRF2 표적을 과발현하는 UC-MSCs는 CFU-F, 증식 및 PDGF 주화성 능력이 상당히 증가하는 것으로 나타났다. FSK 프라이밍에서도 유사하게, *GCLM*, *GCLC*, *PRDX1* 및 *GSR*의 과발현은 UC-MSCs의 면역조절 활성을 촉진하였고, PBMCs에서 $CD3^+$ T 세포의 PHA-작용 증식을 억제하였다(도 5D 및 도 5E). 본 발명자들은 동종 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR) 분석을 사용하여 동종 자극 반응에 대한 상기 세포들의 면역조절 특성을 확인하였는데, 표적 유전자들을 과발현하는 UC-MSCs는 동종 자극에 따라 PBMCs 증식을 강하게 억제하는 것으로 나타났다(도 5F 및 도 5G). 또한, 각각의 CREB1-NRF2 표적 유전자를 갖는 UC-MSCs 유래 CM은 지질다당류로 자극한 이후, 폐포대식세포주인 MH-S 세포에서 TNF-α 유도를 강하게 억제하였는데(도 5H), 이는 상기 세포들에서 항염증 능력이 증가되었다는 것을 나타낸다. 종합하면, 상기 시험관 내(*in vitro*) 기능성 분석 결과는 *GCLM*, *GCLC*, *PRDX1* 및 *GSR*이 MSCs에서 레독스 항상성을 보호하는 주요 하류 작용자이고, 이는 산화적 미세환경 하에서의 세포 생존능 뿐만 아니라 증식, 자가재생, 이동, 전혈관생성, 항염증 및 면역조절 능력을 촉진하여, 이들의 치료능력에 있어 중요하다는 것을 증명한다.

[0096] **<실시예 6> 높은 GSH 및 GRC를 가진 MSCs의 치료 효과 향상**

[0097] 생체 내(*in vivo*) 영향을 조사하기 위해서, 본 발명자들은 인간 PBMCs로 이식된 인간화된 GVHD 마우스 모델 내로 상기 세포들을 주입하여, 공 대조군, *GCLM* 또는 *PRDX1*-발현 컨스트럭트를 갖는 인간 UC-MSCs의 치료 결과를 비교하였다. 이식 8주 후, 인간 PBMCs 단독(GVHD) 이식된 모든 마우스는 죽었는데, PBMCs로 이식되고, 공 대조군 (60%), *GCLM* (90%) 및 *PRDX1* (90%)를 발현하는 UC-MSCs를 주입한 GVHD 마우스의 대다수는 살아남았다(도 6A). 미처리 GVHD 그룹의 마우스는 심각한 체중 감소를 나타냈는데, 이는 UC-MSC 처리에 의해 완화되었다(도 6B). *GCLM*- 및 *PRDX1*-과발현 UC-MSCs를 주입한 GVHD 마우스는 공 대조군 MSCs를 주입한 GVHD 마우스에 비해 생존율 및 체중 감소가 나아졌다(도 6B). 임상 점수 및 소장, 폐, 신장 및 간을 포함하는 대표적인 GVHD 표적 기관들에 대한 조직학적 분석 결과, GVHD 마우스에서 *GCLM*- 및 *PRDX1*-과발현 UC-MSCs의 주입은 면역세포 침습을 감소시키고, 소장의 융모 탈피와, 폐 및 간의 섬유증과 같은 특정 조직 손상을 감소시키는 것으로 나타났다(도 6C 및 도 6D). 즉, *GCLM*- 및 *PRDX1*-과발현 UC-MSCs를 주입한 마우스에서는 공 대조군 MSCs을 주입한 마우스에 비해 조직 손상이 개선되었다(도 6D).

[0098] 인간 β2-마이크로글로빈의 면역형광 염색 분석 결과, *GCLM*- 및 *PRDX1*-과발현 UC-MSCs의 GVHD 표적 기관 내 호밍(homing) 및 생착은 공 대조군 세포에 비해 개선된 것으로 밝혀졌다(도 6E 및 도 6F). GVHD 발생 시점에 NSG 마우스로부터 혈청을 수집하였고, 다중 사이토카인 분석을 통해 사이토카인 수준을 측정하였다. 시험관 내(in vitro)에서 관측된 항염증 및 면역조절 활성과 일치하게도, TNF-α, IFN-γ, 과립구 대식세포 콜로니 형성 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF), CXCL-10 및 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF)-acidic을 포함하는 인간 사이토카인들 및 염증 사이토카인들은 공 대조군 MSCs의 주입에 비하여 *GCLM*- 및 *PRDX1*-과발현 UC-MSCs의 주입에 의해 보다 효과적으로 감소되었다(도 6G). 모든 MSC 치료 그룹은 미처리 GVHD에 비해 CCL-2, CCL-4, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10 및 IL-23과 같은 케모카인들 및 사이토카인들의 수준이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 말초 혈액의 유세포 분석 결과, UC-MSCs의 주입은 GVHD 마우스에서 인간 $CD45^+$, $CD3^+$ 및 $CD3^+CD4^+$ 세포의 수를 감소시키는 것으로 나타났고, *GCLM*- 및 *PRDX1*-과발현 UC-MSCs의 주입은 GVHD 마우스에서 상기 인간 세포를 더욱 감소시키는 것으로 나타났다(도 6H). 종합하면, 상기 결과는 *GCLM* 및 *PRDX1*에 의해 조절되는 UC-MSC GSH 동역학의 개선은 GVHD에서 MSCs의 치료 능력을 향상시킨다는 것을 증명한다.

[0099] **<실시예 7> FSK 프라이밍의 천식 치료 효능 평가**

[0100] 앞서 살펴본 연구 결과에 이어, GVHD 뿐만 아니라 다양한 적응증 확대를 위하여 중증 천식에서의 치료 효능을 검증하였다.

[0101] 중증 천식 마우스모델을 제작하기 위하여 6주령의 BALB/C 마우스 (오리엔트바이오, 가평, 경기도, 한국)들은 마취 후 Ova (Ovalbumin) 100ug+Alum (Imject Alum Adjuvant) 2mg을 0일차(실험시작일), 7일차에 복강주사로 감작하여 장애를 일으켰다.

[0102] CREB1 활성을 높이기 위하여 CREB1의 화학적 활성제인 Forskolin(Fsk)을 2uM의 농도로 12hr 처리한 후, 17일차에 N.T-MSC와 Fsk-MSC 각 1×10^5 개의 세포를 100ul의 용량으로 Ova+Alum 유도 천식 쥐에 정맥 주사하였다. 14, 15, 16, 21, 22, 23일차에 50ug의 OVA를 PBS 30ul에 용해하여 비강 내(Intranasal, I.N) 투여하였다.

[0103] 1주일 후 (24일차), BALF(Bronchoalveolar lavage fluid, 기관지폐포세척액) 내 면역세포를 측정 및 관찰, 폐조직의 조직학적 염색, Human β2-microglobin (hB2MG) 단백질의 면역염색 (Immunofluorescence staining)을 통해 이식한 줄기세포의 생착률과 항 천식 치료 효능을 평가하였다(도 7).

[0104] **1. BALF(Bronchoalveolar lavage fluid) 내 면역 세포 측정 및 관찰**

[0105] OVA+Alum 유도 천식 쥐의 BALF를 채취하여 cytospin을 통해 세포를 슬라이드에 부착시킨 후, 딥퀵 염색(Diff Quik Stain) 후 BALF 내 면역 세포의 수를 측정하였고, 대식세포(Macrophage), 중성구(Neutrophil), 림프구(lymphocytes), 호산구(eosinophil)을 관찰하여 천식모델의 유도와 함께 Fsk의 항 천식 효과를 평가하였다. NT 그룹 (Fsk non-treated MSC)에 비해 Fsk primed MSC를 투여한 그룹에서 BALF 내 면역세포의 수가 유의적으로 감소한 것을 관찰하였다(도 8).

[0106] **2. lung tissue 조직학적 염색**

[0107] 조직 병리평가를 위해서, 폐에 대하여 오른쪽 심실을 통해서 5 ml PBS를 관류시키고 기관지를 통하여 1 ml PBS를 투입 팽창시켰다. 상기 투입 팽창시킨 폐는 10% 중성 완충 포르말린 용액에서 24 시간 동안 담금으로써 고정한 후, 폐조직을 파라핀에 포매시키고 4 μm 두께로 절편화하여 기관지 및 혈관 주위 영역에서 염증의 크기를 헤마토실린 및 에오신 염색으로 시험한 후 비교 관찰한 결과, Fsk primed 세포를 주입한 그룹에서 세기관지와 폐포 주변의 염증 반응이 효과적으로 억제되는 것을 확인하여, Fsk primed UC-MSC의 항 천식 효과를 확인하였다(도 9).

[0108] **3. Human β2-microglobin (hB2MG) 단백질의 면역염색 (Immunofluorescence staining)**

[0109] 주입한 MSC의 생착은 인간 β2-마이크로글로불린(ab15976; Abcam, USA)의 면역 형광분석으로 결정하였고, FITC-표지된 이차 항체를 사용하여 시각화하였다. 핵은 4'-6-다이아미노-2-페닐인돌(DAPI; SIGMA, USA)를 사용하여 상대적으로 염색하여 관찰한 결과, $\beta2M^+$ 주입 세포가 폐포에 생착되어 있음을 확인하였고, N.T.-MSC에 비해 Fsk-MSC 그룹에서 더 높은 생착률을 보임을 확인하였다(도 10).

[0110] **<실시예 8> 줄기세포 항산화능 조절 핵심 유전자로서 CREB1의 신규 타겟 ATF2 발굴과 시험관 내(in vitro) 유효**

성 평가

[0111] 앞에서 언급한 GSH 농도별 MSC transcriptome 분석 연구에서 CREB1-NRF2 경로와 함께 발굴된 ATF2의 기능 연구를 위하여, 항산화 물질로 줄기세포능이 강화된 MSC에서 타겟의 RNA, 단백질의 발현 양을 확인하였다(도 11).

[0112] ATF2 shRNA를 안정적으로 발현하는 MSC 세포주를 확보하고, GSH Recovery Assay (GRA)를 통하여 해당 세포주에서 GSH 회복능이 감소함을 확인하였다(도 12).

[0113] ATF2의 발현이 저하된 MSC의 CFU-F (자가재생 활성), 주화성(Chemotaxis) (이동 활성, 혈관형성능)을 확인하였다. 또한, ATF2의 발현 저하로 인해 자가재생능과 생착률, 혈관형성능이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 세포증식능에는 영향 미치지 않았다(도 13).

[0114] ATF2 shRNA를 안정적으로 발현하는 세포주를 확보하여 ATF2의 줄기세포능 영향 여부를 재확인하였다. UC-MSC에서도 GSH 회복능이 감소함을 확인하였다(도 14).

[0115] ATF2의 발현이 저하된 MSC의 CFU-F, 주화성, 항염증성(TNF-α ELISA), 다분화능(multi-potency)을 확인하였고, MSC에서 ATF2의 발현 저하로 인해 자가재생능에 미미한 감소와 생착률과 항염증성이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 세포증식능과 다분화능에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(도 15).

[0116] **<실시예 9> 줄기세포 항산화능 조절 ATF2 유전자의 생체 내(in vivo) 항 천식 치료 효능 평가**

[0117] OVA + Alum 유도 천식 질환 모델에 ATF2 유전자 특이적 shRNA와 공 대조군 shRNA를 발현하는 1×10^5 UC-MSC를 정맥 내 주사한 후, 1 주일 뒤에 BALF 내 면역세포 계수, 전-염증성 사이토카인들 측정과 폐 조직의 조직학적 염색과 유전자 발현 발현을 조사하여, 이식한 줄기세포의 항 천식 치료 효능을 평가하였다.

[0118] 각 그룹의 대식세포(Macrophage), 중성구(Neutrophil), 림프구(lymphocytes), 호산구(eosinophil)을 비교 관찰하여 천식모델이 유도된 것과 ETvec, shATF2의 효과를 확인하였다. 또한 Human β2-microglobin (hB2MG) 단백질의 면역염색 (Immunofluorescence, IF staining)을 통해 이식한 줄기세포의 폐조직 내 생착을 확인하였다(도 16).

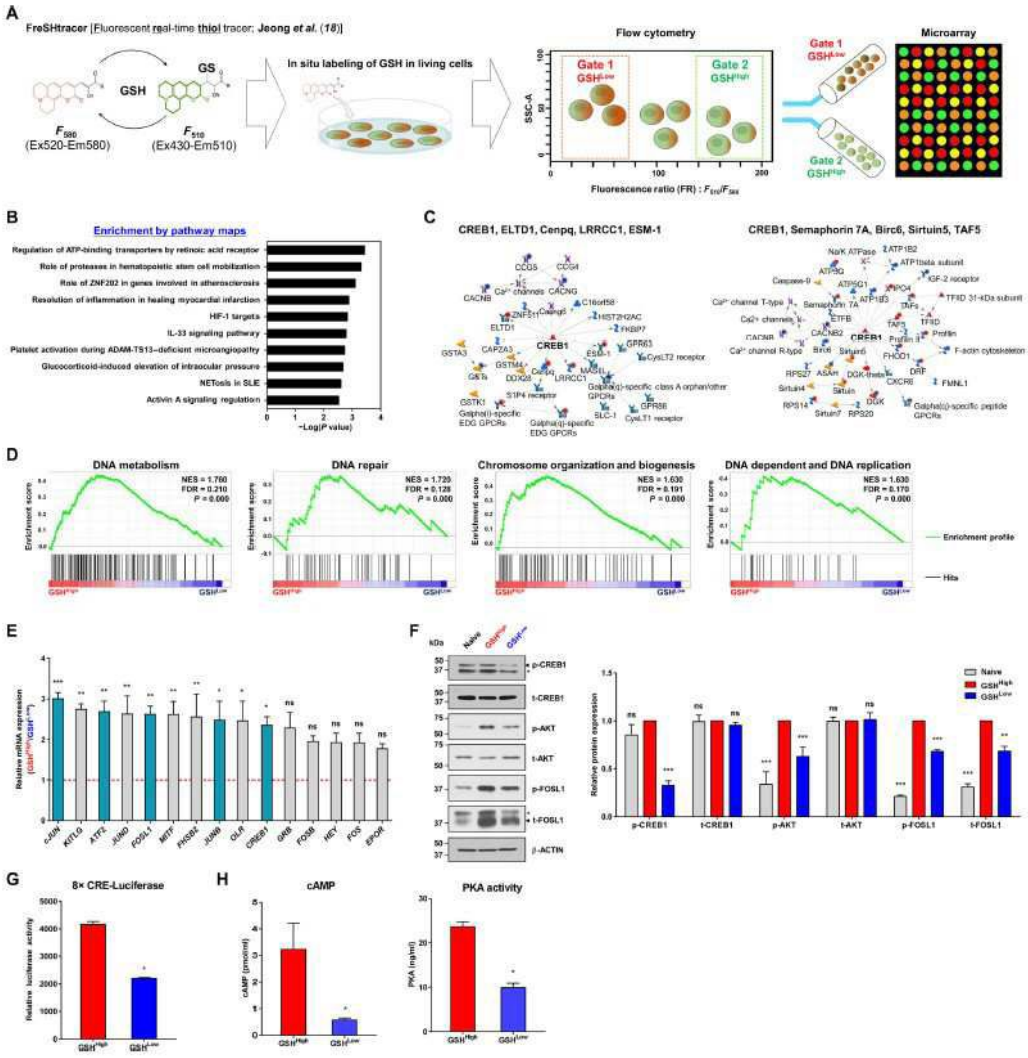
[0119] ATF2 유전자 넉-다운(knock-down)에 의한 UC-MSC 항천식 치료 효능 감소를 검증하기 위하여 반복 실험을 실시한 결과, 동일한 결과를 관찰하였다(도 17).

[0120] 이를 통하여, 항산화능 증진 MSC 세포 특이적 신호전달체계로 CREB1-NRF2 경로와 함께, 항천식 치료 효능을 결정하는 ATF2 바이오마커를 발굴하였으며, 이에 대한 시험관내(*in vitro*)및 생체 내(*in vivo*) 유효성 평가를 완료하였다.

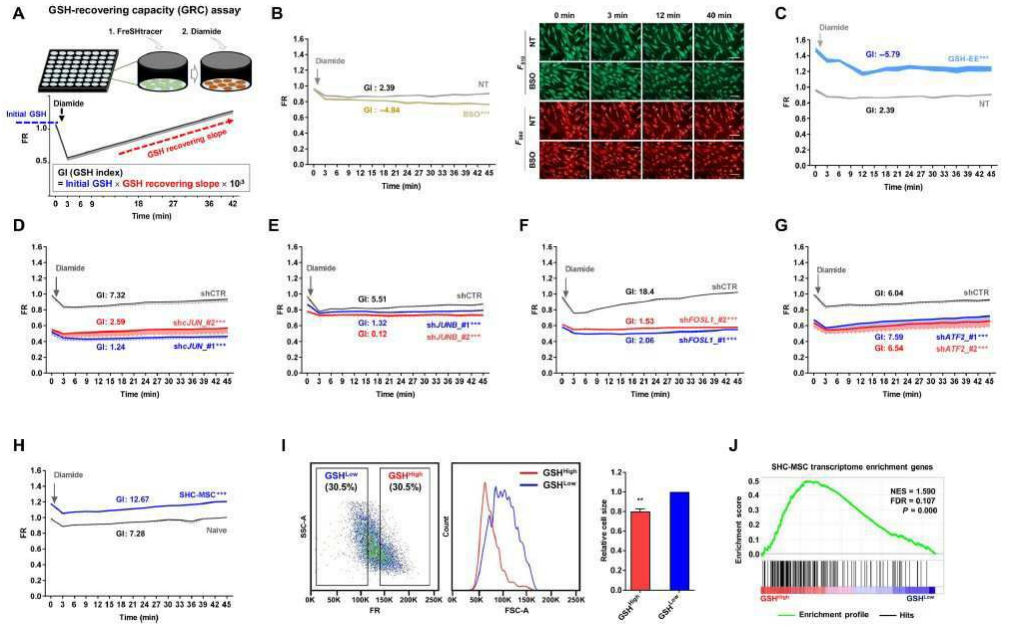
[0121] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

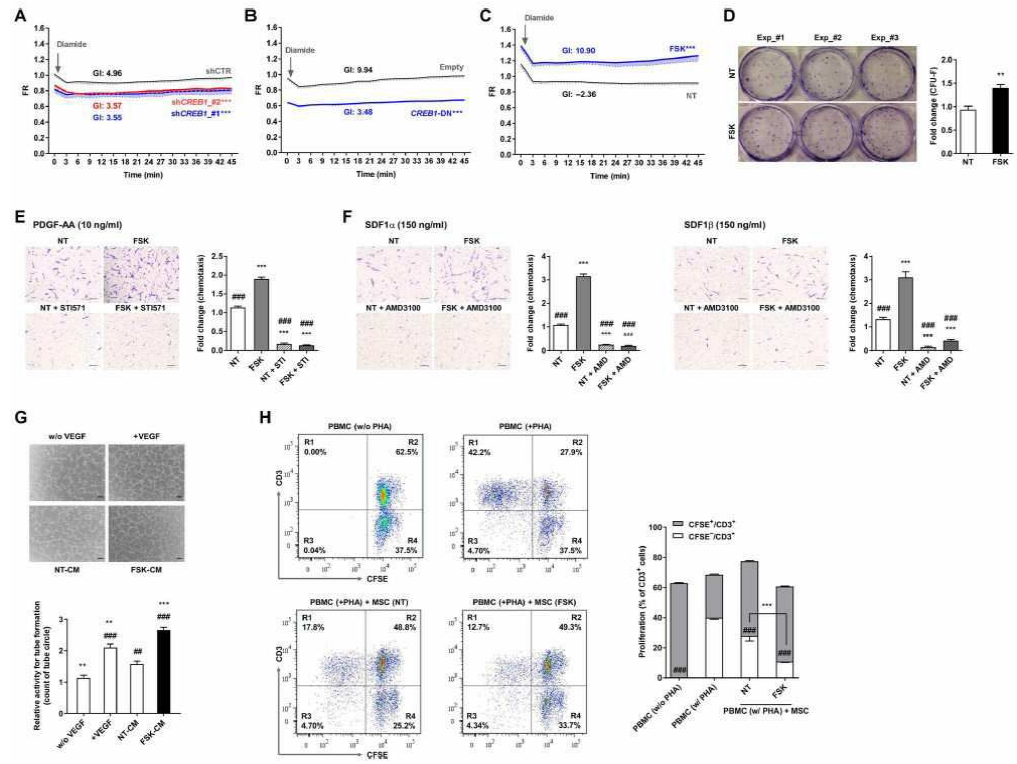
도면1


A
FreSHtracer [Fluorescent real-time thiol tracer; Jeong et al. (18)]
GSH
GS
F580 (Ex520-Em580)
F510 (Ex430-Em510)
In situ labeling of GSH in living cells
Flow cytometry
Gate 1 GSHLow
Gate 2 GSHHigh
SSC-A
Fluorescence ratio (FR) : F510/F580
Microarray
B
Enrichment by pathway maps
Regulation of ATP-binding transporters by retinoic acid receptor
Role of proteases in hematopoietic stem cell mobilization
Role of ZNF202 in genes involved in atherosclerosis
Resolution of inflammation in healing myocardial infarction
HIF-1 targets
IL-33 signaling pathway
Platelet activation during ADAM-TS13–deficient microangiopathy
Glucocorticoid-induced elevation of intraocular pressure
NETosis in SLE
Activin A signaling regulation
-Log(P value)
C
CREB1, ELTD1, Cenpq, LRRCC1, ESM-1
CREB1, Semaphorin 7A, Birc6, Sirtuin5, TAF5
D
DNA metabolism
DNA repair
Chromosome organization and biogenesis
DNA dependent and DNA replication
NES = 1.760 FDR = 0.210 P = 0.000
NES = 1.729 FDR = 0.128 P = 0.000
NES = 1.630 FDR = 0.191 P = 0.000
NES = 1.630 FDR = 0.170 P = 0.000
Enrichment score
Enrichment profile
Hits
E
Relative mRNA expression
c-SRC KITLG ATF2 JUND FOSL1 MITF PHB2 JUNB OLR CREB1 GKB FOSB HEY FOS EPOR
F
kDa
Naive
GSHHigh
GSHLow
p-CREB1
t-CREB1
p-AKT
t-AKT
p-FOSL1
t-FOSL1
β-ACTIN
Relative protein expression
G
8× CRE-Luciferase
Relative luciferase activity
H
cAMP
cAMP (pmol/ml)
PKA activity
PKA (ng/ml)

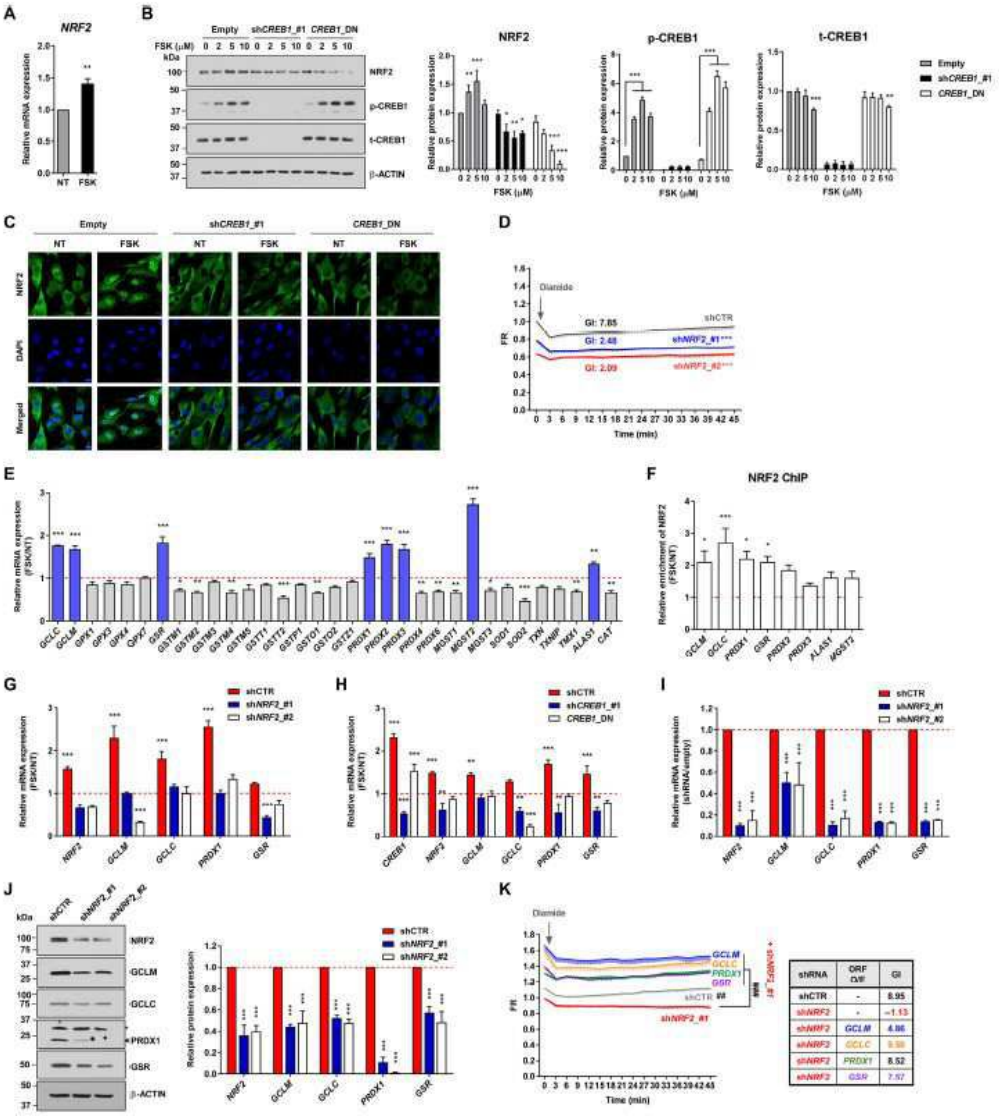
도면2



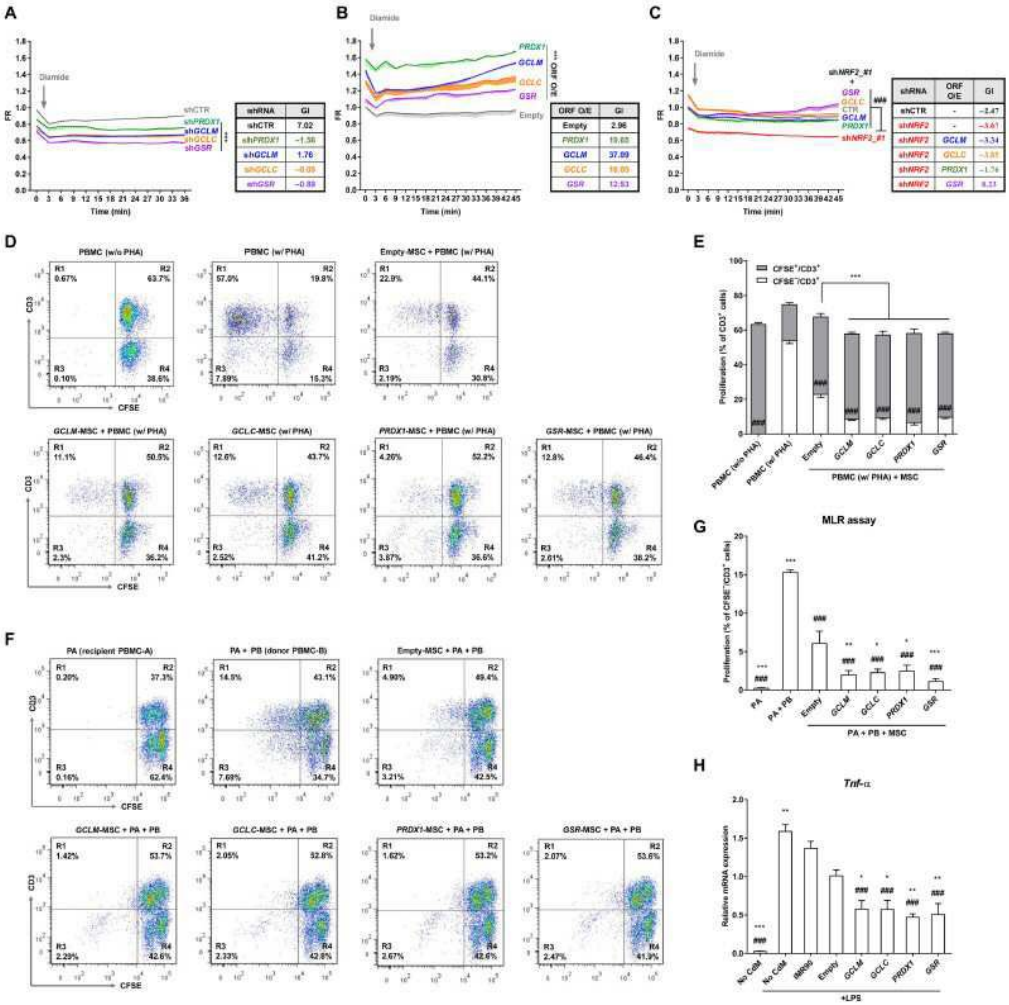
도면3



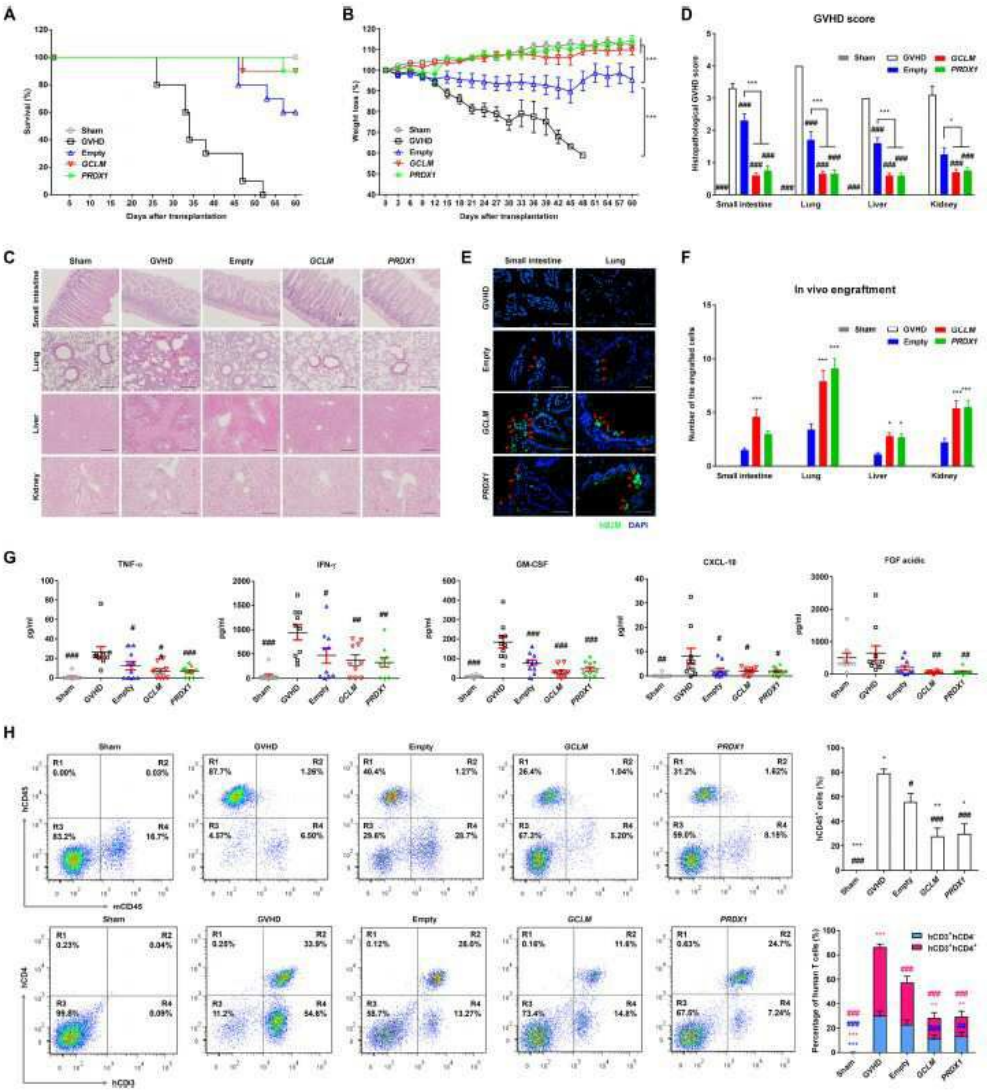
도면4



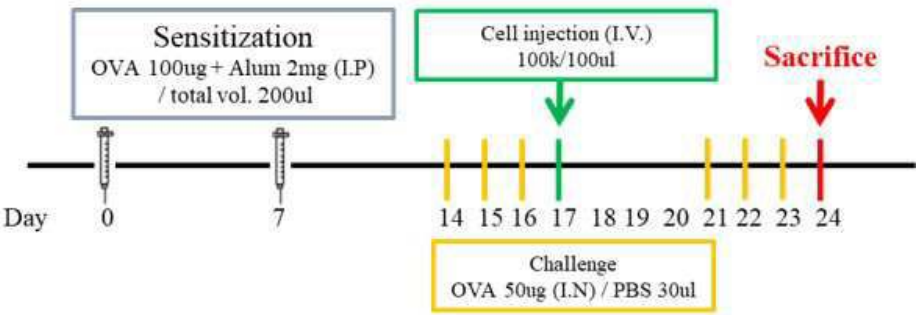
도면5


A
B
C
D
E
F
G
H
Diamide
Time (min)
shCTR
shPRDX1
shGCLM
shGCLC
shGSR
shNRF2_#1
shNRF2_#2
PRDX1
GCLM
GCLC
GSR
Empty
shRNA
GI
ORF O/E
PBMC (w/o PHA)
PBMC (w/ PHA)
Empty-MSC + PBMC (w/ PHA)
GCLM-MSC + PBMC (w/ PHA)
GCLC-MSC (w/ PHA)
PRDX1-MSC + PBMC (w/ PHA)
GSR-MSC + PBMC (w/ PHA)
CD3
CFSE
PBMC (w/ PHA) + MSC
MLR assay
PA (recipient PBMC-A)
PA + PB (donor PBMC-B)
Empty-MSC + PA + PB
GCLM-MSC + PA + PB
GCLC-MSC + PA + PB
PRDX1-MSC + PA + PB
GSR-MSC + PA + PB
PA + PB + MSC
Tnf-α
No Cell
siRNA
+LPS

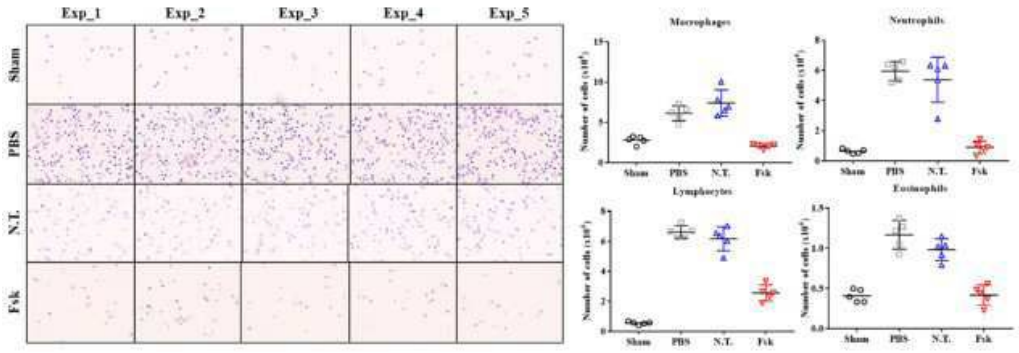
도면6


A
B
D
GVHD score
C
Sham
GVHD
Empty
GCLM
PRDX1
E
Small intestine
Lung
F
In vivo engraftment
G
TNF-α
IFN-γ
GM-CSF
CXCL-10
FGF acidic
H

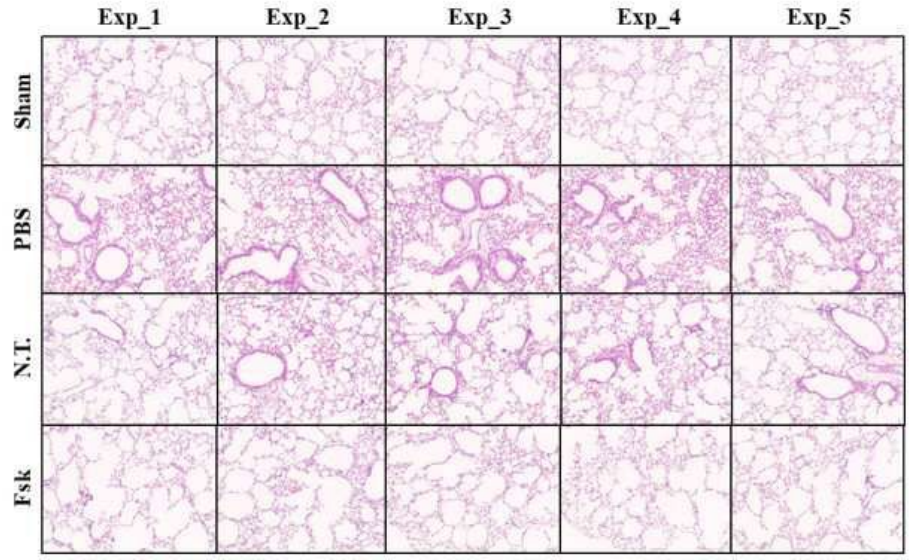
도면7


Sensitization
OVA 100ug + Alum 2mg (I.P)
/ total vol. 200ul
Cell injection (I.V.)
100k/100ul
Sacrifice
Day
0
7
14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
Challenge
OVA 50ug (I.N) / PBS 30ul

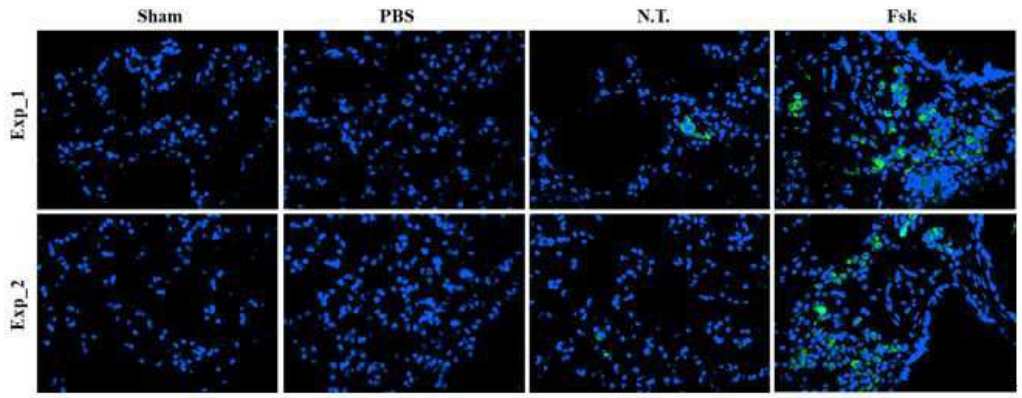
도면8


Exp_1
Exp_2
Exp_3
Exp_4
Exp_5
Sham
PBS
N.T.
Fsk
Macrophages
Neutrophils
Lymphocytes
Eosinophils
Number of cells (x10⁴)
Sham
PBS
N.T.
Fsk

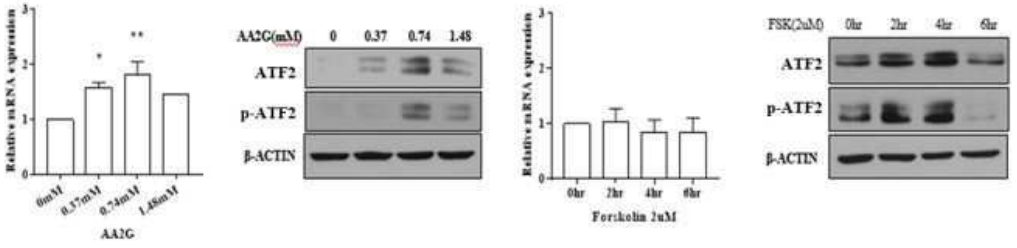
도면9


Exp_1
Exp_2
Exp_3
Exp_4
Exp_5
Sham
PBS
N.T.
Fsk

도면10


Sham
PBS
N.T.
Fsk
Exp_1
Exp_2

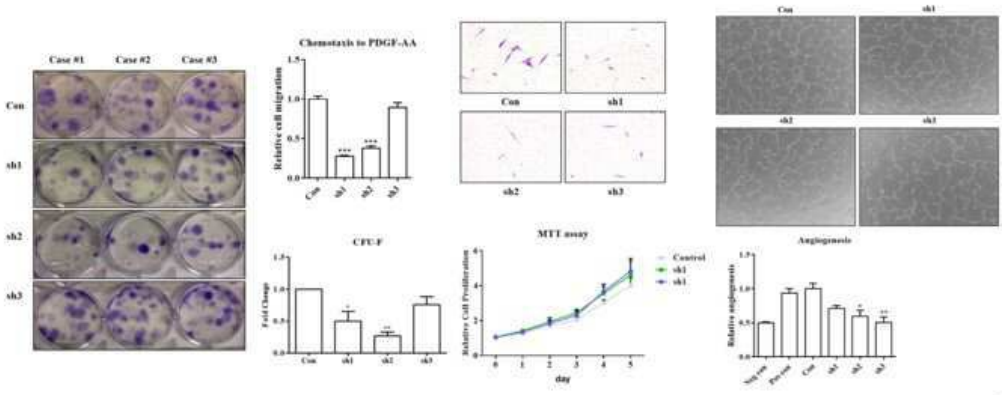
도면11



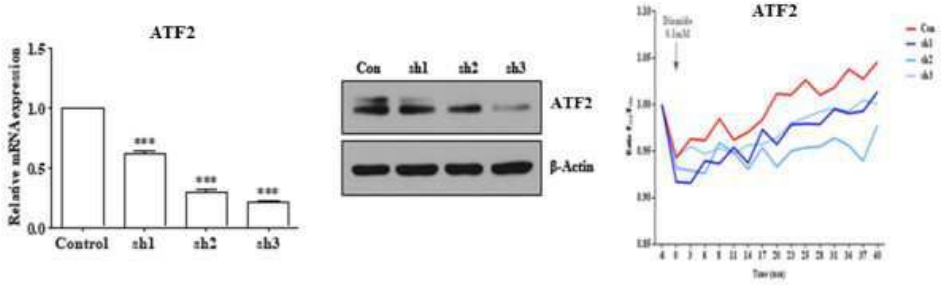
도면12



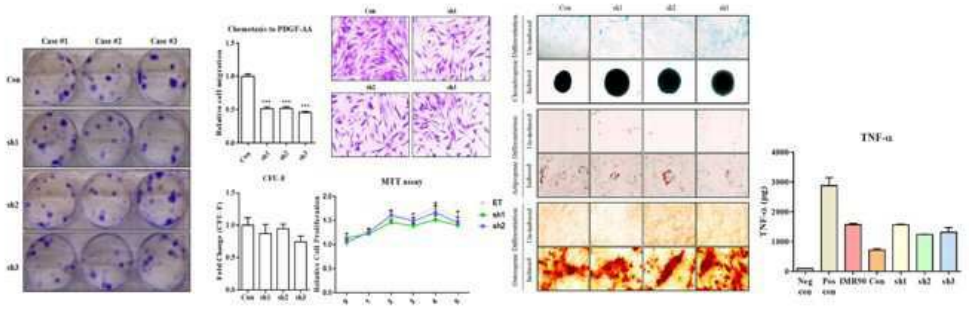
도면13



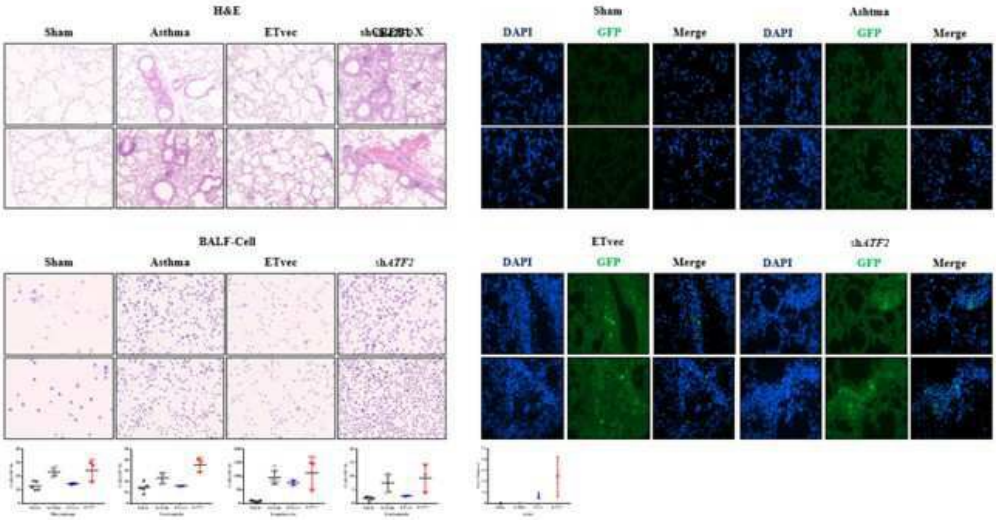
도면14



도면15



도면16



도면17

