(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0092075
(43) 공개일자 2020년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2333/485 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0009179
(22) 출원일자 2019년01월24일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내 (반포동)
(72) 발명자
조영애
서울특별시 강남구 개포로110길 50, 107동 2303호(일원동, 래미안 루체하임)
김현경
경기도 용인시 기흥구 흥덕2로117번길 14, 607동 1003호(영덕동, 흥덕마을6 단지자연앤스위첸아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

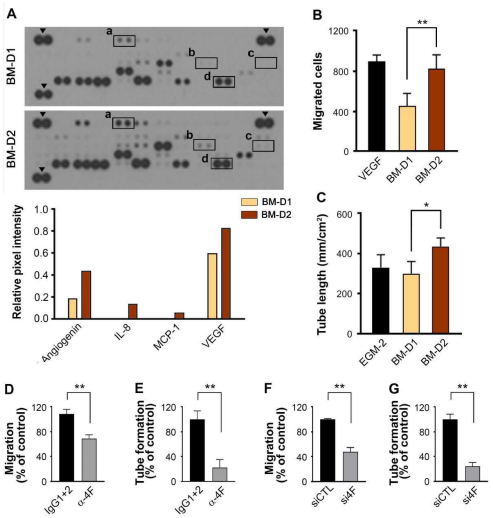
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법**

(57) 요 약

본 발명은 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가를 위한 바이오마커로서 줄기세포의 파라크린 인자인 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 분비 수준을 측정하여 혈관신생에 촉진적인 줄기세포 치료(proangiogenic stem cell therapy)에 유효한 줄기세포를 효율적으로 평가하고 선정할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
G01N 2333/515 (2013.01)
G01N 2333/523 (2013.01)
G01N 2333/5421 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 52017A01620012
부처명 식품의약품안전처
연구관리전문기관 식품의약품안전평가원
연구사업명 2017년 연구용역
연구과제명 줄기세포의 혈관신생 및 조혈재생 효과에 대한 유효성 평가 지표 연구
기 여 율 50/100
주관기관 가톨릭대학교 산학협력단
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 52015A015400077
부처명 과학기술통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업_줄기세포연구사업
연구과제명 중간엽 줄기세포의 혈관 세포 분화 유도
기 여 율 50/100
주관기관 가톨릭대학교 산학협력단
연구기간 2006.01.01 ~ 2016.07.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

개체로부터 수득한 줄기세포에 대해 안지오제닌(angiogenin), IL-8(interleukin-8), MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) 및 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는, 줄기세포의 혈관 재생 유효성(vascular regenerative efficacy) 평가 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준은 소정의 기준(reference) 발현 수준과 비교하여 발현 수준이 높은 양상을 나타내는 것인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 자가(autologous) 유래 또는 동종(allogenic) 유래인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 제대(umbilical cord), 제대혈, 골수, 양수 또는 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 또는 유도만능줄기세포를 포함하는, 혈관 재생 유효성 평가 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 줄기세포는 제대(umbilical cord)의 와튼제대교질(Wharton's jelly) 유래 또는 골수 유래의 중간엽 줄기세포, 또는 유도만능줄기세포 유래의 중간엽 줄기세포인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 허혈성 질환(ischemic disease) 치료 용도로서 사용되는 것인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 허혈성 질환은 허혈성 심장질환, 허혈성 심근경색, 허혈성 심부전, 허혈성 장염, 허혈성 혈관질환, 허혈성

안질환, 허혈성 망막증, 허혈성 녹내장, 허혈성 신부전, 허혈성 뇌졸중 및 허혈성하지질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준은 ELISA, 웨스턴 블로팅, 도트 블로팅, 또는 PCR을 수행하여 측정하는 것인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성을 평가하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준 측정 전에 인 비트로 배양하여 증식시키는 것인, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준을 이용한 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)는 말초 동맥 질환(허혈), 심근 경색 및 뇌졸중(뇌경색)과 같은 질환에서 혈관신생 촉진을 위한 전도 유망한 세포치료의 원천으로서 광범위하게 연구되어 왔다. 내피세포로의 교차분화(transdifferentiation) 잠재력이 이들 질환 치료를 위한 잠재적 능력의 하나로 간주되어 왔으나, 이 쟁점은 논란의 여지가 있다. MSC가 혈관 주위(perivascular) 전구 세포로 기능하여 초기(nascent) 혈관을 안정화시킬 수 있음이 밝혀졌다(Au P *et.al.*,*Blood*, 111:4551-4558, 2008). 신생-혈관(neovasculature) 내로의 MSC 생착(engraftment)이 낮기 때문에, MSC의 다른 능력이 재생 의학에서 보다 중요하다고 제안되어 왔다(Walter MN *et.al.*,*J. Stem Cells Regen. Med.*, 11:18-24, 2015).

[0004] MSC의 유익한 효능은 주로 조절 및 영양(trophic) 활성에 관여하는 광범위한 생리활성 사이토카인 및 성장 인자의 분비에 기인함에 관한 결과들이 보고되어 왔다(Kinnaird T *et.al.*,*Circulation*, 109:1543-1549, 2004; Boomsma RA *et.al.*, *PLoS One*, 7:e35685, 2012). MSC에 의해 분비된 인자의 광범위한 레퍼토리(repertoire)는 MSC 세크레톰(secretome)으로 알려져 있다(Ranganath SH *et.al.*,*Cell Stem Cell*, 10:244-258, 2012). MSC 세크레톰은 허혈성 조직에서의 측부순환 혈관(collateral vessel) 성장, 골 재생, 심근 경색 후 심혈관 수복 및 파라크린 기전(paracrine mechanism)을 통한 상처 치유를 향상시킬 수 있음이 밝혀졌다(Linero I *et.al.*,*PLoS One*, 9:e107001, 2014; Timmers L *et.al.*, *Stem Cell Res.*, 6:206-214, 2011; Chen L *et.al.*, *PLoS One*, 3:e1886, 2008). 따라서, MSC에 의해 분비된 주요 인자들의 확인 및 심혈관 치료법에서 이들의 기능적 역할 규명은 보다 예측 가능한 임상 결과와 더불어 더 강력한 MSC-기반 치료법을 디자인하는 데 유용한 접근법이 될 수 있다.

[0005] 일관성 없는 줄기세포효능은 MSC의 임상 적용을 위한 장애 요인 중 하나로서 오랫동안 지적되어 왔다(Phinney DG *et.al.*,*J. Cell Biochem.*, 113:2806-2812, 2012). MSC의 특성 차이는 이들의 조직 기원에 따라 달라지는 것으로 보고되어 왔다(Kern S *et.al.*,*Stem Cells*, 24:1294-1301, 2006). MSC의 공여자 집단 간의 세포 이질성(cellular heterogeneity) 역시 치료법의 표준화에 있어서 장애 요인이 되었다. 이에, 현재까지 집단 내(intra-population) 이질성 문제를 극복하고자, 재생 잠재력이 높은 MSC를 선택하는 여러 기준이 제안되어 왔다(Du W *et.al.*,*Stem Cell Res. Ther.*, 7:49, 2016). 따라서, MSC의 임상적 유용성을 향상시키기 위한 세포 준비 과정

및 표준화된 기능 분석을 위한 신뢰할 수 있는 프로토콜개발이 필요한 실정이다. MSC의 기능적 이질성은 지난 10년 동안 주목받아 왔고, MSC의 공여자에 따른 변화(variation)는 면역억제능(immunosuppressive potency), 뼈 형성능, MSC 세크레톰의 구성에서 입증된 바 있다. (Salem B *et.al.*,*Cytotherapy*, 17:1675-1686, 2015; Siddappa R *et.al.*, *J. Orthop. Res.*, 25:1029-1041, 2007). MSC 세크레톰 분석 및 이들의 치료 효과와의 관련성 규명은 MSC-기반 치료법의 임상 효과를 개선하기 위한 더 효과적인 MSC와 더 나은 MSC 증폭(expansion) 조건을 선정할 기회를 제공할 수 있다.

[0006] MSC는 골수, 지방 조직 및 제대(umbilical cord)와 같은 여러 조직으로부터 분리될 수 있다. 이 중에서도 제대의 와튼제대교질(Wharton's jelly)로부터 유래된 중간엽 줄기세포(WJ-MSC)는 생명 윤리 문제가 없고, 신생(young) 세포이며, 낮은 면역원성(immunogenicity)을 지니고, 기타 성인 조직-유래 MSC에 비해 더 빠른 증식력을 갖는 등의 여러 장점이 있다. WJ-MSC는 상처 복구, 신경보호(neuroprotection), 신경발생(neurogenesis) 및 혈관신생(neurogenesis)과 관련된 성장 인자 및 사이토카인들을 분비할 수 있다. 이전 연구에서, 본 발명자들은 마우스 하지 허혈 모델에서 WJ-MSC의 혈관 재생 효과를 입증하고, 동일한 연령의 상이한 공여자의 제대로부터 유래된 WJ-MSC가 일부 단백질의 분비 수준이 상이함에 대해 보고한바 있다(Choi M *et.al.*,*Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 45:560-570, 2013).

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 혈관 재생에 유효한 줄기세포를 평가 및 선정하고자 예의 연구 노력한 결과, 혈관 재생 유효성 평가를 위한 바이오마커로서 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 4종의 인자를 선정하고, 상기 인자의 분비 수준이 높은 공여자(donor)의 줄기세포를 배양한 컨디션드 배지에 의해 혈관내피세포의 이동능 및 맥관 형성이 현저히 증가하고, 이들 줄기세포 이식에 의해 하지 허혈 마우스 모델에서 모세혈관 생성이 증가함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009]
(비특허문헌 0001) 1. Au P et.al.,Blood, 111:4551-4558, 2008

(비특허문헌 0002) 2. Walter MN et.al.,J. Stem Cells Regen. Med., 11:18-24, 2015

(비특허문헌 0003) 3. Kinnaird T et.al.,Circulation, 109:1543-1549, 2004

(비특허문헌 0004) 4. Boomsma RA et.al.,PLoS One, 7:e35685, 2012

(비특허문헌 0005) 5. Ranganath SH et.al.,Cell Stem Cell,10:244-258, 2012

(비특허문헌 0006) 6. Linero I et.al.,PLoS One, 9:e107001, 2014

(비특허문헌 0007) 7. Timmers L et.al.,Stem Cell Res., 6:206-214, 2011

(비특허문헌 0008) 8. Chen L et.al.,PLoS One, 3:e1886, 2008

(비특허문헌 0009) 9. Phinney DG et.al.,J. Cell Biochem., 113:2806-2812, 2012

(비특허문헌 0010) 10. Kern S et.al.,Stem Cells, 24:1294-1301, 2006

(비특허문헌 0011) 11. Du W et.al.,Stem Cell Res. Ther., 7:49, 2016

(비특허문헌 0012) 12. Salem B et.al.,Cytotherapy, 17:1675-1686, 2015

(비특허문헌 0013) 13. Siddappa R et.al.,J. Orthop. Res., 25:1029-1041, 2007

(비특허문헌 0014) 14. Choi M et.al.,Int. J. Biochem. Cell. Biol., 45:560-570, 2013

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 바이오마커의 발현 수준을 기반으로 한 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법을 제공하기

위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이오마커의 발현 수준을 기반으로 한 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가 방법을 제공한다.

[0013] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0014] 하나의 양태로서, 본 발명은 개체로부터 수득한 줄기세포에 대해 안지오제닌(angiogenin), IL-8(interleukin-8), MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) 및 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는, 줄기세포의 혈관 재생 유효성(vascular regenerative efficacy) 평가 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 용어 "줄기세포(stem cell)"는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 미분화 세포들을 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸 줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래(전이(transit)) 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.

[0016] 본 발명에서 상기 줄기세포는 이에 제한되지는 않으나 자가(autologous) 유래 또는 동종(allogenic) 유래일 수 있다.

[0017] 또한, 상기 줄기세포는 제대(umbilical cord), 제대혈(umbilical cord blood), 골수(bone marrow), 양수(amniotic fluid) 또는 지방(adipose) 조직 유래의 성체 줄기세포, 또는 유도만능줄기세포 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0018] 구체적으로, 상기 줄기세포는 제대(umbilical cord)의 와튼제대교질(Wharton's jelly) 유래 또는 골수 유래의 중간엽 줄기세포, 또는 유도만능줄기세포 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어 "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)"는 생체내 여러 유형의 중간엽 계통, 예를 들어 골세포(Osteocytes), 연골세포(Chondrocytes), 힘줄세포(Tendinocytes), 지방세포(Adipocytes), 근육세포(Myocytes), 및 섬유아세포(Fibroblasts) 등으로 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미하며, 골수, 지방 조직, 제대혈, 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues), 인간 태반 등의 다양한 성인 조직으로부터 분리될 수 있다. 또는 유도만능줄기세포로부터 유래할 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어 "와튼제대교질(Wharton's jelly)"은 제대(umbilical cord; 태아와 태반을 연결하는 끈 모양의 구조물, 탯줄)를 구성하는 주요성분으로, 중배엽에서 발생한 태생적 교양결합직으로 성상세포가 섬유망상구조를 취하며, 그 사이에 풍부한 교질을 유지하고 있다. 양막하층, 혈관주위층, 중심색상의 3개의 부분으로 구별된다.

[0021] 본 발명에서 있어서, "혈관 재생"은 손상된 혈관을 줄기세포를 이용하여 손상을 복구하는 것으로, 줄기세포를 이용하여 혈관신생, 즉 손상된 혈관의 재생을 촉진하고 이미 손상된 혈관이 지속적인 외력 등에 의해 추가로 손상되는 것을 방지하는 것을 의미한다.

[0022] 상기 혈관신생은 기관 또는 손상을 받은 조직에 혈액을 공급하기 위하여 새로운 혈관을 형성하는 자연치유 과정으로, 혈관내피세포의 증식 및 이동성을 유도함으로써 이루어질 수 있다. 상기 "혈관내피세포(endothelial cell)"는 혈관 내강이 배접하여 내막을 구성하는 한 층의 세포로서, 손상된 혈관에서 상기 혈관내피세포의 증식능은 혈관 재생능을 의미하는 것이다.

[0023] 상기 혈관신생은 여러 인자들이 서로 밀접하게 연관되어 혈관내피세포의 증식을 촉진하거나 억제하면서 일어난다. 혈관신생은 많은 질환에서 병의 진행과 치료에 중요한 역할을 하며, 예컨대 암이나 당뇨성망박증의 경우에는 혈관 생성 억제가, 반대로 심근경색이나 뇌경색의 경우에는 혈관 생성 증가가 필요하다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 혈관신생 관련 인자, 즉 혈관 재생 유효성 평가를 위한 바이오마커로서 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 4종의 인자를 줄기세포의 분비 사이토카인 프로파일 분석을 통해 선정하였다(도 1a 내지 도 4).

[0025] 또한, 상기 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 분비 수준이 높은 공여자의 줄기세포, 구체적으로 와튼제대교질 유래의 중간엽 줄기세포 또는 골수 유래의 중간엽 줄기세포를 배양한 컨디션드 배지(conditioned media)를 혈관

내피세포에 적용하여 혈관내피세포의 이동능 및 맥관 형성 정도를 확인한 결과, 대조군과 비교하여 혈관내피세포의 이동능 및 맥관 형성이 현저히 증가함을 확인하였으며, 생체내 메트리겔 플러그 어세이와 하지 허혈 마우스 모델에 상기 컨디션드 배지를 확보하였던 줄기세포 자체를 이식 적용하였을 경우에도 모세혈관 생성이 증가함을 확인하였다(도 2, 도 5, 도 6 및 도 9의 A 내지 도 9의 C).

[0026] 한편, 상기 컨디션드 배지에 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 4종의 인자를 타겟으로 한 블로킹 항체 및 siRNA를 적용한 경우에는 대조군과 비교하여 혈관내피세포의 이동능 및 맥관 형성이 현저히 억제됨을 확인하였다(도 7 및 도 9의 D 내지 도 9의 G).

[0027] 따라서, 혈관 재생을 위한 유효한 줄기세포 선정에 있어서, 상기 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 4종의 인자를 바이오마커로 유용하게 사용할 수 있으며, 상기 4종의 인자의 발현 수준이 대조군 또는 소정의 기준(reference) 발현 수준과 비교하여 높은 양상을 나타내는 줄기세포를 혈관 재생 용도를 위한 세포치료제로 유용하게 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0028] 본 발명에 있어서, 혈관 재생에 유효한 줄기세포로 평가 및 선정된 상기 줄기세포는 이에 제한되지는 않으나, 허혈성 질환(ischemic disease) 치료 용도로서 사용될 수 있다. 상기 허혈성 질환은 이에 제한되지는 않으나, 허혈성 심장질환, 허혈성 심근경색, 허혈성 심부전, 허혈성 장염, 허혈성 혈관질환, 허혈성 안질환, 허혈성 망막증, 허혈성 녹내장, 허혈성 신부전, 허혈성 뇌졸중 및 허혈성 하지질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 혈관 재생에 유효한 줄기세포 평가 및 선정을 위한 상기 4종의 바이오마커, 구체적으로 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준 측정은 이에 제한되지는 않으나, 개체로부터 수득한 세포 시료, 구체적으로 줄기세포 또는 조직 시료를 이용하여 측정할 수 있다.

[0030] 상기 줄기세포는 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준 측정 전에 인 비트로에서 배양하여 증식시킬 수 있으며, 상기 줄기세포는 이에 제한되지는 않으나, 제대(umbilical cord)의 와튼제대교질 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래의 중간엽 줄기세포 또는 iPSC(induced pluripotent stem cells) 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.

[0031] 상기 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 발현 수준은 이에 제한되지는 않으나, 세포 배양액 또는 세포 추출물로 정량할 수 있으며, ELISA, 웨스턴 블로팅, 도트 블로팅, 또는 PCR을 수행하여 측정될 수 있다.

[0032] 상기 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 4종 인자의 발현 수준은 하나 이상의 대조군 또는 소정의 기준(reference) 발현 수준과 비교할 수 있다. 상기 소정의 기준 발현 수준은 같은 개체로부터의 다른 조직에서 수득되거나, 또는 다른 개체로부터의 같은 조직 또는 다른 조직에서 수득된 시료 중의 상기 4종 인자의 발현 수준 시험을 통해 도출할 수 있다. 상기 조직은 이에 제한되지는 않으나 지방 조직, 심장 조직, 혈관 조직, 또는 조혈 조직일 수 있다. 예를 들어, 소정의 기준 발현 수준은 허혈성 질환 증상을 나타내지 않는 개체로부터 측정한 상기 4종 인자의 발현 수준일 수 있다.

[0033] 인 비보(*in vivo*) 어세이, 인 비트로(*in vitro*) 어세이, 또는 다른 기능적 혈관 신생 어세이에 있어서, 소정의 기준 발현 수준은 혈관 신생과 관련된 한 명 이상의 다른 개체의 혈관 신생 촉진 능력에 관련된 정의된 발현 수준 또는 평균 발현 수준일 수 있다. 특정 대상 개체의 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 4종 인자의 발현 수준은 이에 제한되지는 않으나, 상기 소정의 기준 발현 수준과 비교하여 차이가 적어도 약 1.5배, 2배, 5배, 10배, 20배, 또는 50배 이상 높은 양상을 나타내는 것일 수 있다. 부가적인 대조군은 혈관 신생과 관련이 없는 하나 이상의 인자의 발현 수준 시험을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따르면, 줄기세포의 혈관 재생 유효성 평가를 위한 바이오마커로서 줄기세포의 파라크린 인자인 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 분비 수준 측정을 통해, 혈관신생 촉진을 위한 줄기세포 치료(proangiogenic stem cell therapy)에 유효한 줄기세포를 효율적으로 평가하고 선정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1a 내지 도 1g는 상이한 공여자 타입 중 와튼제대교질 유래-중간엽 줄기세포(WJ-MSC)의 혈관신생 촉진 세크레톰 프로파일(proangiogenic secretome profile)을 비교하여 나타낸 것이다. 55종의 혈관신생-관련 단백질(angiogenesis-related protein)을 제조사가 제공한 기준점(reference spot)을 기준으로 상대적으로 정량화하였다.

도 2는 상이한 공여자 타입들 간에 WJ-MSC의 혈관신생 촉진 분비 프로파일에서의 현저한 변화를 나타낸 것이다. 상이한 공여자-유래 제대(umbilical cord)로부터 분리된 WJ-MSC를 20% FBS를 함유하는 DMEM 배양 배지에서 24시간 동안 배양한 다음 무혈청 EBM-2 배지에서 48시간 동안 배양하여 컨디션드 배지(CM)를 수집하였다. (A) 각 컨디션드 배지에 포함된 혈관신생-관련 단백질은 인간 혈관신생 어레이 키트(Human Angiogenesis Array kit)를 이용하여 항체-기반 단백질 어레이(antibody-based protein array)로 분석하였다. 여기에서, 대표적인 인자 8종, 안지오제닌, 안지오포이에틴-1(angiopoietin-1), FGF-7, IL-8, MCP-1, PDGF-AA, 세르핀 F1(serpin F1) 및 VEGF의 분비 수준을 나타내었다. 각 단백질의 분비 수준은 기준점에 의해 표준화되었다. (B) 9명의 공여자 타입 중 공여자 2(D2)와 공여자 6(D6)의 대표 이미지를 표시하였으며, 화살표는 기준점을 나타낸다. (C 내지 E) 2명의 상이한 공여자(D2 및 D6)로부터의 WJ-MSC의 컨디션드 배지는 HUVEC 세포의 증식, 이동(migration) 및 맥관형성(tube formation)에 대한 어세이로 평가되었다. (C) 혈청 기아 상태의 HUVEC 세포를 1% FBS가 첨가된 컨디션드 배지의 존재 하에서 48시간 동안 배양한 다음 MTS 어세이를 실시하였다. (D) HUVEC 세포의 이동은 보이든 챔버(Boyden chamber)의 바텀(bottom) 챔버에서 각 컨디션드 배지의 존재 하에서 측정되었다. (E) HUVEC 세포의 맥관(tube) 형성은 메트리겔(matrigel)에 HUVEC 세포를 지시된 컨디션드 배지로 12시간 동안 인큐베이션(incubation)하여 수행하였다. 이때, 상기 (D)에서 VEGF(5ng/㎖)를 양성대조군으로 사용하고, 상기 (C) 및 (E)에서 EGM-2를 양성대조군으로 사용하였다.

도 3은 WJ-MSC 배양에서 FBS의 변화에 따른 세크레톰 프로파일을 비교하여 나타낸 것이다. (A) D2 또는 D6 WJ-MSC를 FBS 타입 A 또는 타입 B를 함유하는 DMEM 배지에서 유지시킨 후 무혈청 EBM-2 배지에서 48시간 동안 배양하여 컨디션드 배지를 수집하였다. 상기 수집한 컨디션드 배지는 인간 혈관신생 어레이 키트를 사용하여 분석하였다. (B) 기준점으로 표준화된 8종의 혈관신생 촉진 인자(proangiogenic factor), 안지오제닌, 안지오포이에틴-1, FGF-7, IL-8, MCP-1, PDGF-AA, 세르핀 F1 및 VEGF의 상대적 분비 수준을 나타낸 그래프이다.

도 4는 추가 공여자 타입의 WJ-MSC에서 4종의 혈관신생 촉진 인자의 분비 수준을 비교하여 나타낸 것이다. (A) 추가 공여자(D10, D11, D12 및 D13)로부터 분리된 WJ-MSC로부터 수집된 컨디션드 배지를 인간 혈관신생 어레이 키트를 사용하여 분석하였다. 박스(box)의 영문자는 멤브레인에서 선택된 주요 혈관신생 촉진 인자의 위치를 나타낸 것이며, 화살표는 기준점을 나타낸다. (B) 각 단백질의 분비 수준은 기준점에 의해 표준화되었다.

도 5는 상이한 공여자 타입의 WJ-MSC가 인 비트로 및 인 비보에서 차별적인 혈관신생 촉진 활성을 보이는 결과를 나타낸 것이다. (A) 혈청 기아상태의 HUVEC 세포를 지시된 컨디션드 배지가 있는 바텀 챔버로 이동하도록 하였다. 이때, VEGF(5ng/㎖)를 양성대조군으로 사용하였다. 대표 이미지(왼쪽)와 이동된 세포의 정량화 결과(오른쪽)를 나타낸 것이다. 스케일 바(scale bar)는 125㎛이다. (B) HUVEC 세포의 맥관(tube) 형성은 메트리겔(matrigel)에 HUVEC 세포를 지시된 컨디션드 배지로 12시간 동안 인큐베이션하여 수행하였다. 대표 이미지(왼쪽), 맥 관(tube) 길이(중간) 및 필드(field) 당 평균 분기(branch)의 수(오른쪽)를 나타내었다. 스케일 바는 250㎛이다. (C) 생체 내 메트리겔 플러그 어세이. 지시된 WJ-MSC(5×10^6개의 세포) 또는 PBS(CTL)를 함유하는 메트리겔을 마우스의 등쪽(dorsal) 부위에 주입하였다 (n=3). 7일 후, 메트리겔 플러그를 제거하고 균질화한 후 드라브킨스 용액(Drabkin's solution)을 사용하여 헤모글로빈(Hb)을 측정하였다. 대표 이미지(왼쪽)와 Hb의 정량화 결과(오른쪽)를 나타낸 것이다.

도 6은 마우스 하지 허혈(murine hindlimb ischemia) 모델에서 WJ-MSC의 혈관 재생 효과는 혈관신생 촉진 인자의 분비능에 의존함을 나타낸 것이다. 마우스 (BALB/c nu/nu)는 대퇴동맥(femoral artery) 및 정맥 절제술을 시행하여 하지 허혈을 유도하였다. 수술 후 6시간 이내에, 상이한 공여자 타입 D13 또는 D10 또는 PBS (CTL)의 WJ-MSC (PBS 중 5×10^5)를 하지 허혈 위치에 근육 내(intramuscularly) 주사하였다 (n=5). (A) 수술 후 0, 7, 14 및 21일째에 LDPI를 사용하여 혈류를 측정 하였다(왼쪽). LDPI 지수(index)는 비-허혈성 하지(non-ischemic hindlimb)에 대한 허혈성 비율로 결정되었다(오른쪽). 21일째, D13 WJ-MSCs-처리군은 D10 WJ-MSCs-처리군 또는 PBS-처리군과 비교하여 관류(perfusion)에서 현저한 개선을 나타냈다. 여기에서, *는 D10 WJ-MSC 대비(vs.) $P < 0.05$이고, **는 PBS 대비 $P < 0.01$이다. (B) 허혈 후 21일째 허혈성 사지에서 수확된 조직을 CD31 항체(녹색)로 염색하여 모세혈관 밀도(capillary density)를 분석하였다. 대표 사진(왼쪽)과 혈관 농도의 정량화 결과(오른쪽)를 나타낸 것이다. 스케일 바는 50㎛이다.

도 7은 안지오제닌, VEGF, MCP-1 및 IL-8이 WJ-MSC의 혈관신생 촉진 효과의 핵심 매개자(key mediator)임을 나타낸 것이다. (A) 및 (B) 5㎍/㎖의 안지오제닌(α-Angiogenin), IL-8(α-IL-8), MCP-1(α-MCP-1) 및 VEGF(α-VEGF)에 대한 중화 항체를 각각 준비된 컨디션드 배지에 30분간 처리하였다. 이때, IgG1 또는 IgG2를 각각 대조군으로 사용하였으며, α-4F는 상기 4가지 항체(α-Angiogenin, α-IL-8, α-MCP-1 및 α-VEGF)를 조합하여 처리한 것을 나타낸다. (A) HUVEC 세포를 항체-처리된 컨디션드 배지가 있는 바텀 챔버로 이동하도록 하였다. 여기에서, ***는 대조군 IgG2 대비(vs.) P < 0.001이고, ##는 대조군 IgG1+2 대비 P < 0.01이다. 이동된 세포의 퍼센트는 각 IgG-처리된 대조군의 세포 이동을 기반으로 하여 계산하였다. (B) 메트리겔에서의 HUVEC 세포의 맥관(tube) 형성은 항체-처리된 컨디션드 배지에서 12시간 동안 인큐베이션하여 수행되었다. 맥관 길이의 퍼센트는 각 IgG-처리된 대조군의 관 형성을 기반으로 하여 계산하였다. 여기에서, §§는 대조군 IgG1 대비(vs.) P < 0.01이고, *는 대조군 IgG2 대비 P < 0.05이며, ##는 대조군 IgG1+2 대비 P < 0.01이다. (C 및 D) 지시된 siRNA로 WJ-MSC를 트랜스펙션 시켰으며, 배양하여 컨디션드 배지를 수집하였다. si4F는 4가지 siRNA(siAngiogenin, siIL-8, siMCP-1 및 siVEGF)를 조합하여 처리한 것을 나타낸다. (C) HUVEC 세포는 지시된 컨디션드 배지가 있는 바텀챔버로 이동되었다. 그래프는 siCTL-처리된 대조군과 비교하여 지시된 컨디션드 배지로 이동된 HUVEC 세포의 퍼센트를 나타낸 것이다. ** 및 ***는 각각 siCTL (100 nM) 대비 P < 0.01 및 P < 0.001이며, ###는 siCTL (400 nM) 대비 P < 0.001이다. (D) 메트리겔에서의 HUVEC 세포의 맥관 형성은 지시된 컨디션드 배지에서 12시간 동안 인큐베이션하여 수행되었다. 그래프는 siCTL-처리된 대조군과 비교하여 지시된 컨디션드 배지에서 형성된 맥관 길이의 퍼센트를 나타낸 것이다. **는 siCTL (100 nM) 대비 P < 0.01이고, ##는 siCTL (400 nM) 대비 P < 0.01이다.

도 8은 혈관신생 촉진 인자에 대한 siRNA를 처리하여 넉다운후 수득한 컨디션드 배지의 도트 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. 컨디션드 배지는 지시된 siRNA로 트랜스펙션된 WJ-MSC로부터 수득하였다. 항-안지오제닌(anti-angiogenin), 항-IL-8, 항-MCP-1 및 항-VEGF 항체를 사용하여 도트 블롯 분석으로 각 인자의 넉다운 여부를 확인하였다.

도 9는 선정된 4종의 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF가 골수 유래-중간엽 줄기세포(BM-MSC)의 혈관신생 촉진 효과 역시 매개함을 나타낸 것이다. (A) 두 명의 상이한 공여자(BM-D1 및 BM-D2, 패시지 4) 유래의 BM-MSC 배양 상층액으로부터 수집된 컨디션드 배지를 인간 혈관신생 어레이 키트를 사용하여 분석하였다. 여기에서, a는 안지오제닌, b는 IL-8, c는 MCP-1, d는 VEGF, 4종의 혈관신생 촉진 인자를 나타낸다. 각 단백질의 분비 수준은 기준점에 의해 표준화되었다(아래쪽). 화살표는 양성대조군을 나타낸다. (B) 혈청 기아상태의 HUVEC 세포를 BM-MSC의 컨디션드 배지가 있는 바텀 챔버로 이동하도록 하였다. 이때, VEGF(5ng/㎖)를 양성대조군으로 사용하였다. (C) HUVEC 세포의 맥관 형성은 메트리겔에서 HUVEC 세포를 BM-MSC의 지시된 컨디션드 배지로 12시간 동안 인큐베이션하여 수행되었다. EGM-2는 대조군으로서 사용되었다. (D 및 E) BM-MSC의 컨디션드 배지에 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF에 대한 중화 항체(α-4F)를 동시에 공동-처리(co-treatment)하였다. 이때, IgG1 및 IgG2가 대조군으로서 사용되었다. HUVEC 세포의 이동 (D) 및 맥관 형성 (E) 어세이는 항체들을 공동-처리한 컨디션드 배지를 사용하여 수행되었다. (F 및 G) BM-MSC를 대조군(siCTL) 또는 조합된 siRNA(si4F; siAngiogenin, siIL-8, siMCP-1 및 siVEGF)로 트랜스펙션(transfection)시켰으며, 배양하여 컨디션드 배지를 수집하였다. HUVEC 세포의 이동 (F) 및 맥관 형성 (G) 어세이는 수집한 컨디션드 배지를 사용하여 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예 1> 실험 재료 준비 및 실험 방법

[0040] DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), M199, 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 및 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)은 Gibco BRL사(Grand Island, NY)로부터 구입하였고, EGM-2MV BulletKit 배지(medium)는 Cambrex사(Walkersville, MD)로부터 구입하였다. 우태아혈청(Fetal bovine serum)은 Gibco사, Merck사(Darmstadt, Germany) 또는 Wisent Bioproduct사(Quebec, Canada)에서 구입하였다. 헤파린(heparin)은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였고, ECGS(endothelial cell growth supplement)는 BD Biosciences사(San Jose, CA)에서 구입하였다. IL-8(#MAB331), MCP-1(#MAB679), VEGF(#MAB293), 마우스 IgG1(# MAB002) 및 IgG2(#MAB004)에 대한 중화 항체는 R&D System사(Minneapolis, MN)로부터 구입하였고, 안지오제닌(#26-2F)에 대한 중화 항체는 Millipore사(Billerica, MA)로부터 구입하였다. HRP-컨쥬게이션된 이차 항체들(Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies)은 GeneTex, Inc.(Irvine, CA)로부터 구입하였고, 화학발광 기질

(chemiluminescent substrate) ECL 키트는 GE Healthcare(Piscataway, NJ)로부터 구입하였다.

[0041] (세포 배양)

[0042] WJ-MSC의 분리 및 특성 규명은 Choi M *et.al.*,*Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 45:560-570 (2013)에 기술된 바와 같이 수행되었다. WJ-MSC에 대한 인간 제대(umbilical cord) 샘플은 가톨릭대학교 의과대학의 생명윤리위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인 절차(승인 번호: MC12TISI0156)에 따라 수집되었다. 인간 BM-MSC(가톨릭마스터세포(Catholic MASTER Cells))는 CIC(Catholic Institute of Cell Therapy, Seoul, Korea)에서 수득하였으며, 다분화(multidifferentiation) 잠재력(지방 형성(adipogenic), 연골 형성(chondrogenic) 및 골 형성(osteogenic) 분화 및 세포 표면 항원(CD90 및 CD73에 대해서는 양성(positive)인 반면, CD34 및 CD45에 대해서는 음성(negative)임)에 대한 인증을 받았다. MSC는 FBS(20%), 페니실린(100 units/㎖) 및 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 가습 대기(humidified atmosphere) 조건하에서 배양하였다. 100㎜ 배양 디쉬(45 cells/㎟)에 2.5X10^5개의 MSC를 씨딩하였으며, MSC의 패시징(passaging)은 1:3의 비율로 2~3일마다 분주하였다. 패시지(passage) 4~5(PDL 4~8)의 세포를 인 비트로 실험에 사용하였다. 패시지 6(PDL 8~11)의 세포를 인 비보 실험에 사용하였다. 인간 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells) 세포의 일차 배양(primary culture) 및 유지는 Choi M *et.al.*,*Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 45:560-570 (2013) 및 Jaffe EA *et.al.*,*J. Clin. Invest.*, 52:2745-2756 (1973)에 기술된 바와 같이 수행되었다. HUVEC 세포 수득을 위한 인간 제대(umbilical cord) 샘플은 가톨릭 대학교 성빈센트병원(VC14TIS10208)의 IRB가 승인한 절차에 따라 수집되었다. HUVEC 세포는 FBS(20%), ECGS(30 ㎍/mL, BD Biosciences) 및 헤파린(90 ㎍/mL, Sigma)이 첨가된 M199 배지에서 배양하였다. 패시지 3~6의 HUVEC 세포를 인 비트로 어세이에 사용하였다.

[0043] (컨디션드 배지의 준비)

[0044] 배양 배지가 있는 100㎜ 배양 디쉬(36 cells/mm^2)에 2×10^5개의 MSC를 씨딩(seeding) 하였다. 24시간 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 무혈청(serum free) EBM-2를 첨가하고, 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양 상층액(컨디션드 배지)을 수집한 후 4℃, 3,200 rpm 조건으로 15분간 원심분리하였으며, 사용할 때까지 -70 ℃에서 보관하였다.

[0045] (항체-기반 단백질 어레이 분석)

[0046] 컨디션드 배지의 분비 프로파일 분석은 제조사의 지시에 따라 인간 혈관신생 어레이 키트(Human Angiogenesis Array kit; ARY007, R&D system)를 사용하여 수행하였다.

[0047] (세포 증식 어세이)

[0048] 혈청이 첨가된 M199 배지 내 2,000개의 세포/웰(cells/well)의 밀도로 HUVEC 세포를 준비하여 젤라틴(gelatin)이 코팅된 96-웰 플레이트에 씨딩하였다. 24시간 후, EBM-2 배지에서 세포를 4시간 동안 혈청 기아상태를 만들고, 1% FBS(Gibco)가 첨가된 각각의 컨디션드 배지를 첨가하였다. 세포를 48시간 동안 배양하고, MTS 세포 증식 어세이 키트(MTS Cell Proliferation Assay Kit; Promega Corp., Madison, WI)를 사용하여 증식 정도를 평가하였다.

[0049] (세포 이동 어세이)

[0050] 세포 이동 어세이(Cell migration assay)는 Kim HK *et.al.*,*Mol. Cancer.Ther.*, 7:2133-2141 (2008)에 기술된 바와 같이 변형된(modified) 보이든 챔버(Boyden chamber) 키트를 사용하여 수행하였다. 혈청 기아상태의 HUVEC 세포(2X10^4개의 세포)를 트립신 처리하여 어퍼 챔버(upper chamber)에 넣고, MSC로부터의 컨디션드 배지를 바텀 챔버(bottom chamber)에 첨가하여 세포 이동을 유도하였다. 5시간 후, 이동된 세포를 고정하고, Diff-Quik 용액(Sysmex Co., Kobe, Japan)으로 염색하였다. 무작위로 선택된 5개의 필드(field) 상에서 이동된 세포를 사진 촬영하고 계수하였다. 이동 활성(migration activity)과 관련된 주요 인자(key factor)를 확인하고자, 37℃에서 30분 동안 컨디션드 배지를 중화 항체로 전처리하였다..

[0051] (맥관 형성(tube formation) 어세이)

[0052] 미리 냉각된(prechilled) 메트리겔(matrigel, BD Bioscience)을 미리 냉각된 48 웰 플레이트(150㎕) 또는 96 웰 플레이트(50㎕)의 각 웰에 넣고 30분 동안 인큐베이션(incubation) 하였다. 혈청 기아 상태의 HUVEC 세포를 트립신 처리하여 각 컨디션드 배지에 현탁시키고, 이를 굳혀진(solidified) 메트리겔(30 cells/㎟)의 상단에 첨

가하였다. 12시간 후, 형성된 맥관을 사진 촬영하고, 맥관 길이 및 분기점(branch points)의 수를 결정하고자 이미지 J 소프트웨어(Image J software; http://rsb.info.nih.gov/ij/)를 사용하여 이미지를 분석하였다. 맥관 형성 활성과 관련된 주요 인자를 조사하고자, 37℃에서 30분 동안 컨디션드 배지를 중화 항체로 전처리하였다.

[0053] (인 비보 메트리겔 플러그 어세이)

[0054] 모든 절차는 가톨릭대학교 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)(CUMC-2015-0025-03)의 정책에 따라 수행되었다. 7주령 BALB/c(nu/nu) 마우스(SLC, Japan)의 등쪽(dorsal) 부위에 각각의 WJ-MSC(50 ㎕의 PBS 중 $5X10^6$개의 세포)를 함유하며, 페놀 레드가 없고(phenol red-free), 성장 인자가 결핍된(growth factor-depleted) 차가운(ice-cold) 0.4 mL의 메트리겔(BD Biosciences)을 피하 주사하였다. 7일 후, 마우스를 안락사시키고 메트리겔 플러그를 제거하였다. 형성된 기능성 혈관을 정량화하고자, 메트리겔 플러그를 증류수에서 균질화(homogenization) 하고 14,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 드라브킨스 시약(Drabkin's reagent, Sigma)과 혼합하여 헤모글로빈을 측정하였다. 30분 동안 인큐베이션한 후, 혼합물의 흡광도를 540 nm 파장에서 측정하였다.

[0055] (하지 허혈 마우스 모델)

[0056] 7주령 수컷 마우스(20-25g, BALB/c nu/nu; SLC)를 아이소플루레인(isoflurane)(유도(induction)의 경우 5%, 유지(maintenance)의 경우 2%)으로 마취시키고 대퇴동맥(femoral artery) 및 정맥 절제술을 시행하였다. 수술 후 6시간 이내에, 상이한 두 타입의 공여자로부터 수득한 PBS 중 $5X10^5$개의 WJ-MSC 또는 PBS(대조군)를 하지 허혈 위치에 근육 내 주사하였다(n=5). 수술 후 0, 7, 14 및 21일째에 LDPI(laser doppler blood perfusion imager; Moor Instruments Ltd. Millwey, Axminster, UK)를 사용하여 혈류를 측정하였다. 무릎 관절에서부터 발가락까지의 부위의 혈류를 정량화하였고, LDPI 지수는 비-허혈성 하지(non-ischemic hindlimb)에 대한 허혈성 비율로 결정되었다. 조직학적 및 면역 형광법(immunofluorescent)적으로 평가하고자, 수술 후 21일째에 마우스를 희생시키고, 하지 근육을 제거하였으며 OCT 컴파운드(compound)로 즉시 동결시킨 다음 동결 절편(cryosection)을 만들었다. 혈관 형성을 결정하고자, 조직 절편은 항-CD31 항체(BD Biosciences) 및 FITC-컨쥬게이션된 항-랫트 IgG(Millipore)로 면역염색 되었다. 핵(nuclei)을 DAPI(Sigma)로 염색한 후, 형광 현미경(Olympus BX51, Middlesex, UK)을 이용하여 슬라이드(slide)를 관찰하였다. 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 혈관 밀도를 정량화하였다. 캡쳐된 컬러 이미지를 RGB 스택(stack)에 적용하여 이미지를 각 채널(channel)로 분할하였다. 임계값(thresholding)을 사용하여 각각의 개별 이미지를 분할한 후(마우스=3/group, 각 그룹당 30개 이미지), 필드당 혈관 영역의 비율을 Image J로 계산하였다.

[0057] (RNA 간섭)

[0058] 안지오제닌, IL-8, MCP-1, VEGF 및 대조군 siRNA(siCTL)를 타겟으로 하는 siRNA(small interfering RNA)는 Bioneer Co.(Daejeon, Korea)에서 수득하였다. 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF를 타겟으로 한 siRNA 서열과 음성대조군으로 사용한 포유류 유전자와 상동성을 보이지 않는 siCTL의 siRNA 서열은 하기 표 1에 나타내었다. MSC를 24시간 동안 36개의 세포(36 cells/㎟) 밀도로 배양한 후, 제조사의 지시에 따라 리포펙타민 RNAiMAX 트랜스펙션 시약(lipofectamineRNAiMAX Transfection Reagent; Invitrogen)을 사용하여 100 nM 농도의 siRNA를 세포에 트랜스펙션 시켰다. 4시간 후, 세포를 PBS로 2회 세척하여 트랜스펙션 배지를 제거하고, 이후 새로운 배지로 배양하였다. 배양 48시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 새로운 EBM-2 배지로 배양하였다. 48시간 후, 컨디션드 배지를 수집하고, 3,200 rpm에서 15분간 원심분리하여 정화(clarified)하였다. 이후, 컨디션드 배지는 인 비트로 혈관신생 어세이(angiogenesis assay) 또는 96-웰 바이오-도트 장치(96-well Bio-dot apparatus; Bio-Rad Laboratories)를 이용한 니트로셀룰로오스 멤브레인으로의 블로팅에 사용되었다. 5% 탈지유(skim milk)로 멤브레인을 블로킹한 후, 특이적 일차 항체들을 처리하고 HRP-컨쥬게이션된 이차 항체들을 이후 처리하여 인큐베이션 하였다. ECL 키트(GE Healthcare)를 사용하여 면역반응성(immunoreactive) 도트(dot)를 시각화하였다.

표 1

[0059]

siRNA	종류	염기서열	서열번호
안지오제닌	센스	5'-ACG UUG UUGUUG CUU GUG A dTdT-3'	1
	안티센스	5'-U CAC AAG CAA CAACAA CGU dTdT-3'	2
IL-8	센스	5'-GCC AAG GAG UGC UAA AGA A dTdT-3'	3
	안티센스	5'-U UCU UUA GCA CUC CUU GGC dTdT-3'	4
MCP-1	센스	5'-GUC ACC UGC UGU UAU AAC U dTdT-3'	5

	안티센스	5'-A GUU AUA ACA GCA GGU GAC dTdT-3'	6
VEGF	센스	5'-GGA GUA CCC UGA UGA GAU C dTdT-3'	7
	안티센스	5'-G AUC UCA UCA GGG UAC UCC dTdT-3'	8
siCTL	센스	5'-GUU CAG CGU GUC CGG CGA G dTdT-3'	9
	안티센스	5'-C UCG CCG GAC ACG CUG AAC dTdT-3'	10

[0061] <실시예 2> 상이한 공여자-유래 와튼제대교질 유래 중간엽 줄기세포 간의 혈관신생 촉진 인자 프로파일 및 활성의 변화 분석

[0062] 와튼제대교질 유래 중간엽 줄기세포(Warton's jelly mesenchymal stem cell, WJ-MSC)는 9명의 상이한 공여자 타입의 인간 제대로부터 분리하였다. 이들의 컨디션드 배지(CM)는 무혈청 배지에서 배양한 후 수집하였다. 혈관신생 촉진 인자 프로파일을 비교하고자, 제조사의 지시에 따라 인간 혈관신생 어레이 키트(Human Angiogenesis Array kit)를 사용하여 CM을 분석하였다(도 1a 내지 도 1g). 각 단백질의 분비 수준은 기준점에 의해 표준화되었다.

[0063] 55종의 인자 중 8종의 인자, 안지오제닌, 안지오포이에틴-1, FGF-7, IL-8, MCP-1, PDGF-AA, 세르핀 F1 및 VEGF가 공여자에 따른 분비의 다양성이 보이기는 하나, 상당히 높은 수준으로 분비됨을 확인하였다(도 2의 A). 이때, 상기 8종 인자의 선정 기준은 9명의 공여자 타입 중 3~8명의 공여자 타입이 0.5보다 높은 상대적 픽셀 강도(pixel intensity)에서 분비 수준을 가져야 한다. 상기 8종 인자의 분비 프로파일은 공여자 간에 다양하였다. 인간 혈관신생 어레이 키트를 이용하여 상기 8종의 인자가 조직 근원에 관계없이 일부 MSC에서 상당히 많이 분비됨을 확인하였으며, 공여자의 성별 유형에 따른 뚜렷한 차이가 없음도 확인하였다(표 2). 세크레톰 프로파일과 혈관신생 촉진 활성 간의 상관관계를 테스트하고자, 9명의 공여자 타입 중 상위 및 하위의 분비 수준을 갖는 두 가지의 WJ-MSC 타입을 선택하였다. 상기 8종의 모든 사이토카인은 공여자 2(D2)의 WJ-MSC에 비해 공여자 6(D6)의 WJ-MSC에서 훨씬 높은 수준으로 분비되었다(도 2의 B). 공여자 D6 및 공여자 D2로부터 수득한 컨디션드 배지의 혈관신생 촉진 활성은 HUVEC 세포를 이용한 세포증식, 세포이동 및 맥관 형성 어세이로 평가되었다. 흥미롭게도, 공여자 D2와 비교하여 공여자 D6의 컨디션드 배지는 상당히 높은 수준으로 HUVEC 세포의 증식, 이동 및 맥관 형성을 유도하였다(도 2의 C 내지 도 2의 E). 상기 결과는 혈관신생 촉진 사이토카인 프로파일 및 상이한 공여자-유래 MSC의 능력(potency)이 서로 간에 다양함을 나타내었다. 이를 토대로, 혈관신생 촉진 활성과 공여자 타입에 따른 분비 사이토카인 프로파일 간에 상관관계가 있음을 유추할 수 있었다.

표 2

[0064]

성별	남성	WJ-MSC (n=6)	BM-MSC (n=6)
		D2, D3, D6, D7, D9, D12	공여자(donor) 6명
	여성	WJ-MSC (n=7)	BM-MSC (n=8)
		D1, D4, D5, D8, D10, D11, D13	BM-D1, BM-D2, 공여자 6명

[0066] <실시예 3> 상이한 FBS 조건하에서 WJ-MSC의 세크레톰 프로파일 비교 분석

[0067] 상기 실시예 2에서 상이한 공여자 타입에 따라 MSC의 분비 사이토카인 프로파일에 영향을 미침을 확인하였다. 이에 추가로, 상이한 우태아혈청이 MSC의 분비 프로파일에도 영향을 미치는지 그 여부를 조사하였다. FBS는 MSC의 배양에 필요한 성장 인자와 필수 영양소를 제공하는 것으로 알려져 있으나, 이의 조성은 생물학적 산물의 한계로서 항상 동일하지는 않다. 본 발명자들은 세포가 상이한 FBS를 포함하는 배지에서 배양되었다 할지라도 효율적인 바이오마커가 일관되게 분비되어야 한다고 가설을 설정하였다. 따라서, 컨디션드 배지 준비 전에 다른 두 회사의 FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양된 공여자 D2 및 D6의 MSC 간의 혈관신생을 촉진하는 사이토카인의 분비 수준을 비교하였다.

[0068] 분비 수준에 약간의 변화가 있었으나, 주요 패턴은 바뀌지 않았다(도 3). 공여자 D2로부터의 컨디션드 배지와 비교하여 공여자 D6로부터의 컨디션드 배지가 인 비트로 상에서 혈관신생을 촉진하는 활성이 더 강력하였으므로, 두 FBS 조건 모두에서 공여자 D2의 컨디션드 배지에 비해 공여자 D6의 컨디션드 배지에서 더 높고 차별적으로 분비되는 사이토카인을 선택하였다. 또한, 본 발명자들은 효율적인 바이오마커를 선정하고자,

0.5보다 높은 상대적 픽셀 강도에서 인자의 분비 수준을 고려하였다. 본 발명자들은 8종의 인자 중, 안지오포이에틴-1, FGF-7, PDGF-AA, 세르핀 F1이 상기 조건을 충족시키지 못함을 확인하였다. 이에, 최종적으로 본 발명자들은 혈관신생 촉진 효능에 대한 MSC의 가능한 바이오마커로서 4종의 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF을 선정하였다.

[0070] <실시예 4> 와튼제대교질 유래-중간엽 줄기세포(WJ-MSC)의 효능에 대한 혈관신생 촉진 바이오마커로서의 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 분비 수준 분석

[0071] 상기 실시예 3에서 혈관신생 촉진 바이오마커로서, 4종의 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF를 선정하였으며, WJ-MSC의 혈관신생 촉진 효능에 대한 상기 4종 인자의 분비 수준을 검증하고자, 4명의 추가 공여자의 상이한 제대로부터 유래된 WJ-MSC를 추가 조사하였다. 컨디션드 배지를 수득한 후, 세크레톰 프로파일을 분석하여 상기 4종 인자의 분비 수준을 비교하였다.

[0072] 도 4에 나타낸 바와 같이, 공여자 D12 및 D13으로부터의 두 MSC는 공여자 D10 및 D11로부터의 두 MSC에 비해 상기 4종 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF를 더 높은 수준으로 분비함을 확인하였다. 전반적으로, 공여자 D13은 다른 공여자 타입의 세포와 비교하여 분비 수준이 높음을 확인하였다. 이들 공여자에 따른 상이한 MSC에서 유래된 컨디션드 배지의 혈관신생 촉진 활성을 인 비트로 상에서 비교하고자, 개개의 컨디션드 배지에서 유도된 HUVEC 세포의 이동 및 관 형성 정도를 확인하였다. 어세이에 따라 공여자 D10 및 D11 간에 또는 공여자 D12 및 D13 간의 혈관 신생 활성의 인 비트로 결과에서 약간의 차이가 있기는 하였으나, 대략적으로 공여자 D12의 컨디션드 배지와 공여자 D13의 컨디션드 배지는 공여자 D10 및 D11의 컨디션드 배지보다 더 높은 활성을 보였다(도 5의 A 및 도 5의 B). 테스트된 혈관신생 촉진 활성에 있어서, 공여자 D13의 컨디션드 배지는 공여자 D10 및 D11의 컨디션드 배지에 비해 현저하게 더 강력한 활성을 나타내었다.

[0073] 마지막으로, 컨디션드 배지 대신에 MSC를 사용하여 인 비보에서 혈관신생 촉진 활성을 테스트하였다. 메트리겔 플러그 어세이는 차가운 메트리겔과 혼합된 WJ-MSC를 마우스에 이식함으로써 인 비보 상에서 수행되었다. 7일 후, 상기 메트리겔 플러그를 마우스에서 제거하여 메트리겔 플러그의 무게 및 헤모글로빈(Hb)의 함량을 측정하였다(도 5의 C).

[0074] 상기 메트리겔 플러그는 처음에 무혈관(avascular) 상태이므로, 메트리겔 플러그에 형성된 모든 혈관을 쉽게 관찰할 수 있다. WJ-MSC가 함유되어 있는 모든 메트리겔 플러그는 대조군 메트리겔 플러그와 대조적으로 적색을 나타내었다. 또한, 공여자 D12 및 D13 메트리겔 플러그가 공여자 D10 및 D11에 비해 혈관이 더 많이 형성되었음이 육안으로 관찰되었다. 이에 따라, 공여자 D13의 메트리겔 플러그가 공여자 D10의 메트리겔 플러그에 비해 헤모글로빈 함유량이 현저히 높음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 상이한 공여자 제대로부터 유래된 WJ-MSC가 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF를 상이한 수준으로 분비하고, 상기 4종 인자의 분비 수준이 인 비트로 및 인 비보에서 혈관신생 촉진 활성과 높은 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

[0076] <실시예 5> 와튼제대교질 유래-중간엽 줄기세포(WJ-MSC)의 혈관 재생 유효성과 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 분비 수준의 상관관계 분석

[0077] 상기 실시예 4에서 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 인자의 분비 수준이 인 비트로및 인 비보 모델에서 혈관신생 촉진 활성과 높은 상관관계가 있음을 확인하였으며, 이를 기반으로 질환 모델에서 상기 4종 인자의 분비 수준이 혈관 재생 효과에도 큰 영향을 미치는지를 확인하였다. 구체적으로, 상기 4종 인자의 분비 수준이 혈관 재생 효과에 영향을 미치는지 그 여부를 확인하고자, 대퇴동맥 및 정맥 절제술을 시행하여 유도된 하지 허혈 마우스 모델을 사용하였다. 수술 후 6시간 이내에, 공여자 D10 또는 D13의 WJ-MSC 또는 PBS(대조군)를 허혈성 대퇴근 영역의 네 개의 주사 지점에 국소 주사하였다.

[0078] 하지 혈류의 연속 LDPI(laser-Doppler perfusion imaging) 분석은 공여자 D10의 WJ-MSC를 주사한 실험군 또는 PBS를 주사한 대조군과 비교하여 공여자 D13의 WJ-MSC를 주사한 허혈/비-허혈성 하지 혈류의 비율이 현저히 증가한 것으로 나타났다(도 6의 A). 허혈성 조직에서 MSC-매개 혈관신생을 평가하고자, 수술 후 21일째 조직을 채취하고 항-CD31 항체(녹색 형광)로 면역조직화학 염색법으로 염색하여 모세혈관 밀도를 측정하였다. 공여자 D10의 WJ-MSC 또는 PBS가 처리된 그룹과 비교하여 공여자 D13의 WJ-MSC가 처리된 그룹에서 CD31-양성 모세혈관이 증가됨을 확인하였다(도 6의 B). 상기 결과를 통해, 허혈에 있어서 WJ-MSC의 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF

인자의 분비 수준이 MSC의 치료적 혈관 재생 유효성과 높은 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

[0080] <실시예 6> 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 분비 수준에 따른 와튼제대교질 유래-중간엽 줄기세포(WJ-MSC)의 혈관신생 촉진 활성의 검증

[0081] 상기 실시예 3에서 선정된 4종의 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF가 WJ-MSC의 혈관신생 촉진 효과를 매개하는 주요 인자인지의 여부를 확인하고자, 블로킹 항체 또는 siRNA를 처리하여 WJ-MSC의 혈관신생 촉진 효과가 차단되는지 그 여부를 확인하였다. 구체적으로, 어세이 전에 상기 4종의 인자가 상대적으로 높은 수준으로 분비되는 공여자 D13의 컨디션드 배지에 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF에 대한 중화 항체를 전처리하였다.

[0082] 예측한 바와 같이, 항-IL-8, 항-MCP-1 또는 항-VEGF에 대한 중화 항체의 단일 처리에 의해 공여자 D13의 컨디션드 배지로 유도된 내피세포의 이동이 현저히 억제됨을 확인하였다. 또한, 항-안지오제닌에 대한 중화 항체를 이용한 단일 처리에 의해서도 공여자 D13의 컨디션드 배지에 의해 유도된 내피세포의 이동이 억제되었으나, 그 억제는 통계적으로 유의하지 않았다. 상기 4가지 항체(α-Angiogenin, α-IL-8, α-MCP-1 및 α-VEGF; α-4F)를 조합하여 처리한 경우에 내피세포(EC)의 이동을 가장 효과적으로 억제함을 확인하였다(도 7의 A). 또한, 공여자 D13의 컨디션드 배지에 의해 유도된 HUVEC 세포의 맥관 형성에서도, 블로킹 항체를 단일 또는 조합하여 처리한 경우 유사한 억제 패턴이 관찰되었다(도 7의 B).

[0083] 다음으로, siRNA를 처리하여 WJ-MSC의 혈관신생 촉진 효과에 대한 4종 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 영향을 평가하였다. WJ-MSC에 상기 4종의 인자를 타겟으로 한 siRNA를 개별적으로 또는 동시에 처리하였다. 컨디션드 배지를 수득한 후 도트 블롯 분석을 통해 상기 4종 인자의 결핍 정도를 확인하였다.

[0084] 그 결과, 상기 4종의 인자가 컨디션드 배지에서 현저히 결핍되어 있음을 확인하였다(도 8). 내피세포의 이동 및 관 형성에 있어서 컨디션드 배지를 적용해 본 결과, siCTL로 트랜스펙션된 대조군의 컨디션드 배지와 비교하여 siAngiogenin-, siMCP-1-, siIL-8-, 또는 siVEGF이 트랜스펙션된 MSC로부터의 컨디션드 배지가 HUVEC 세포의 이동 및 맥관 형성을 감소시킴을 확인하였다(도 7의 C 및 도 7의 D). 조합된 siRNA(siAngiogenin, siMCP-1, siIL-8 및 siVEGF; si4F)가 트랜스펙션된 MSC로부터의 컨디션드 배지를 HUVEC 세포에 처리한 경우에 이의 이동 및 맥관 형성이 가장 많이 감소됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF가 WJ-MSC의 혈관신생 촉진 활성을 위한 주요 인자임을 알 수 있었다.

[0086] <실시예 7> 혈관신생 촉진 유효성 예측을 위한 바이오마커로서 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF 인자의 이용 가능성 분석

[0087] 골수 유래-중간엽 줄기세포(BM-MSC)는 자가 및 동종 세포 치료를 위한 주요 세포 원천이다. 이에, 상기 실시예 3에서 선정한 4종의 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF를 다양한 조직 기원으로부터 유래된 MSC의 혈관신생 촉진 활성을 예측하기 위한 바이오마커로 적용 가능한지를 규명하고자, 상기 선정된 4종의 인자가 BM-MSC의 혈관신생 촉진 효과에 있어 중요한 역할을 수행하는지 그 여부를 테스트하였다. 이러한 주요 혈관신생 촉진 인자를 확인하고자, 14명의 공여자로부터 수득한 BM-MSC의 분비 프로파일을 동일한 인간 혈관신생 어레이 키트를 이용하여 분석하였다.

[0088] 그 결과, 대표적인 두 BM-MSC 타입 또한 공여자 타입 중 상기 4종 인자의 분비 수준에 차이를 나타낸 반면, 다른 인자들의 경우 유사한 분비 패턴을 보였다(도 9의 A). 이들 BM-MSC 타입에서 IL-8 및 MCP-1의 수준은 WJ-MSC와 비교하여 상대적으로 낮은 것으로 나타났으나, Roubelakis MG *et.al.*,*PLoS One*, 8:e54747(2013)에 보고된 BM-MSC의 경우, 본 발명에서 테스트된 BM-MSC 타입과 비교하여 IL-8의 분비 수준이 높았다. 이는 바이오마커로서 상기 인자의 잠재적 중요성을 시사한다.

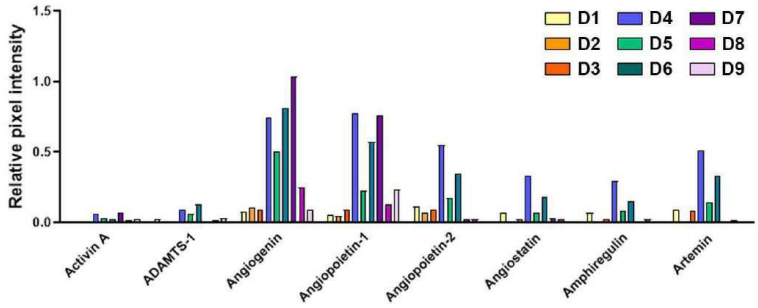
[0089] WJ-MSC를 이용하여 실험한 바와 같이, 세크레톰 프로파일과 혈관신생 촉진 활성 간의 상관관계를 확인하고자, HUVEC 세포를 이용하여 세포 이동 및 맥관 형성 어세이를 통해 혈관신생 촉진 인자의 차이 나는 분비 수준을 갖는 두 BM-MSC 타입의 혈관신생 촉진 활성에 대해 테스트하였다.

[0090] 그 결과, 상기 4종 인자를 높은 수준으로 분비하는 공여자 BM-D2의 BM-MSC의 컨디션드 배지가 상기 4종 인자를 낮은 수준으로 분비하는 공여자 BM-D1의 BM-MSC로부터의 컨드션드 배지와 비교하여 HUVEC 세포 이동 및 맥관 형성이 현저히 높은 것으로 확인되었다(도 9의 B 및 도 9의 C). 상기 4종 인자를 타겟으로 하는 조합된 블로킹 항체(α-4F)로 전처리된 컨디션드 배지는 HUVEC 세포의 이동 및 맥관 형성을 현저히 억제 시켰다(도 9의 D 및 도

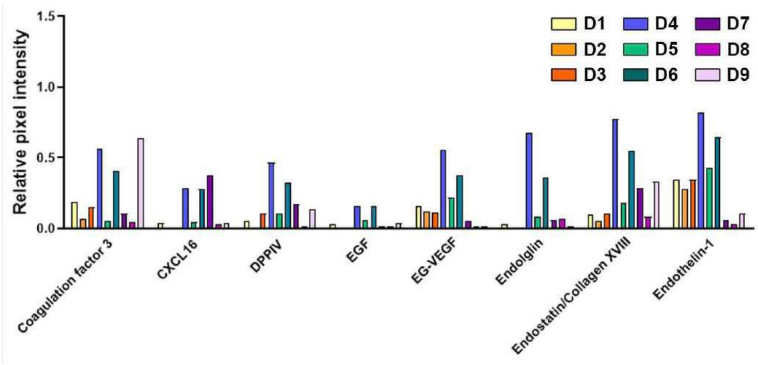
9의 E). 또한, siCTL을 트랜스펙션시킨 BM-MSC로부터 수득한 컨디션드 배지와 비교하여, 상기 4종 인자를 타겟으로 한 siRNA(si4F)를 트랜스펙션 시킨 BM-MSC로부터 수득한 컨디션드 배지가 HUVEC 세포의 이동 및 맥관 형성을 두드러지게 감소시키는 것으로 나타났다(도 9의 F 및 도 9의 G). 상기 결과를 통해, BM-MSC의 혈관신생 촉진 활성을 예측하기 위한 바이오마커로서, 상기 4종 인자, 안지오제닌, IL-8, MCP-1 및 VEGF를 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

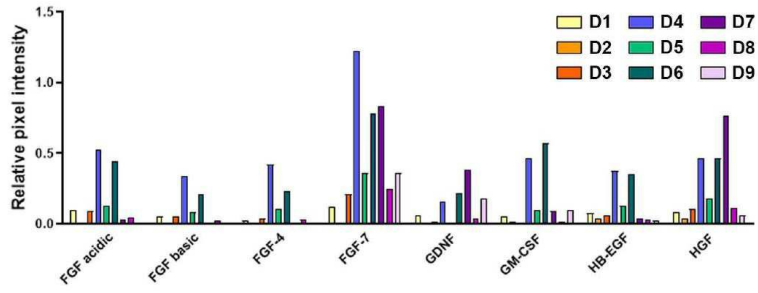
도면1a



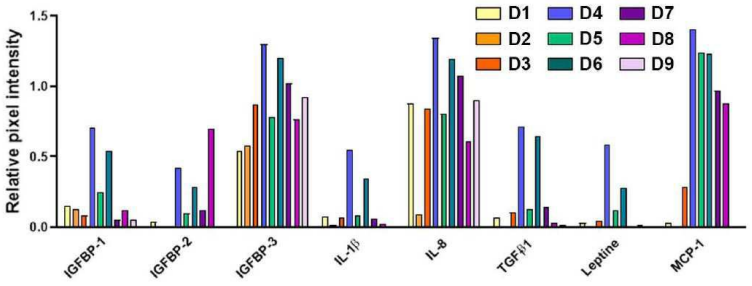
도면1b



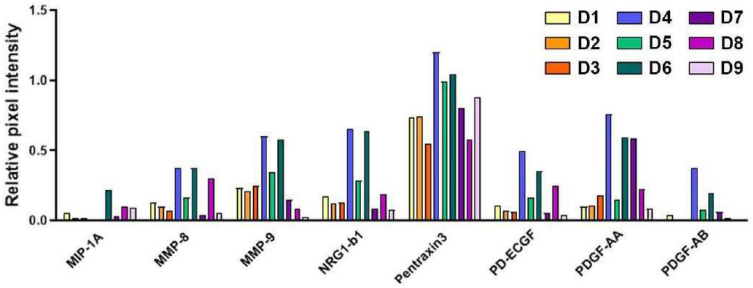
도면1c



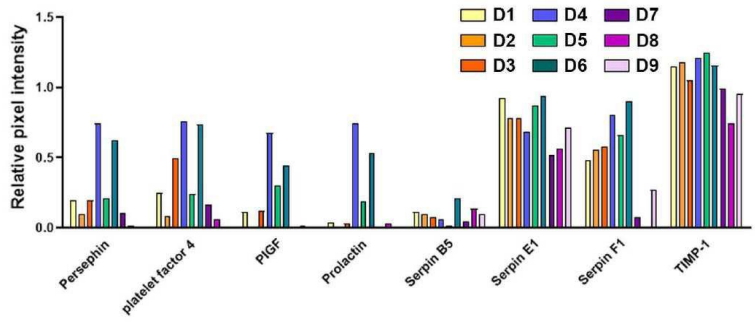
도면1d



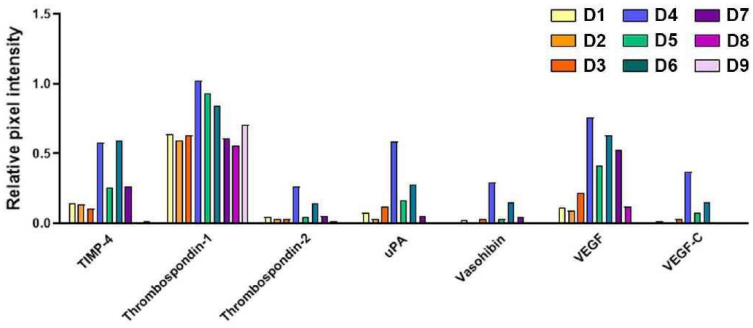
도면1e



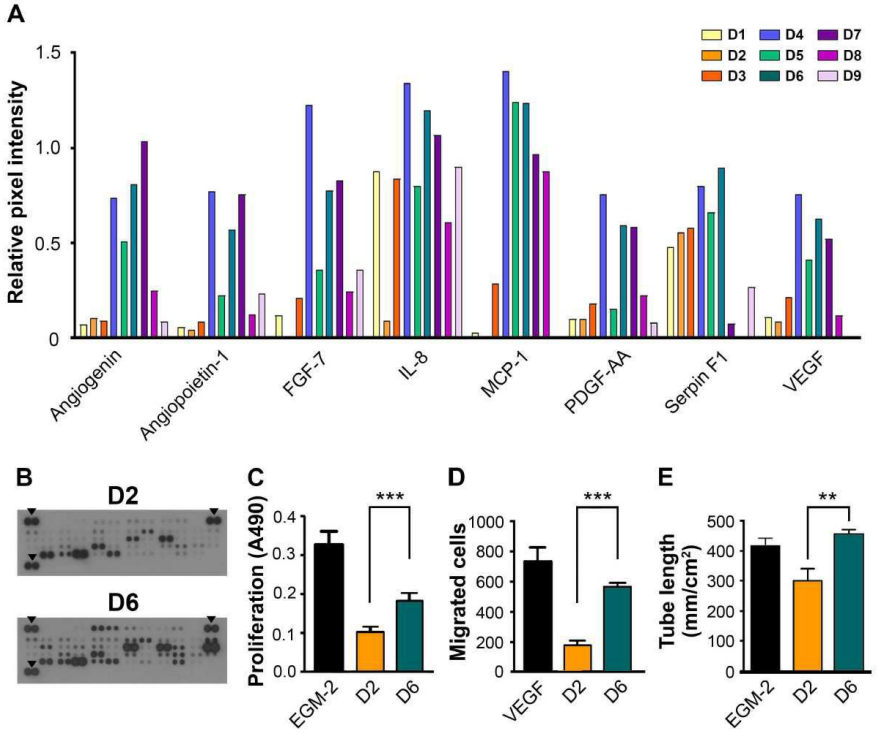
도면1f



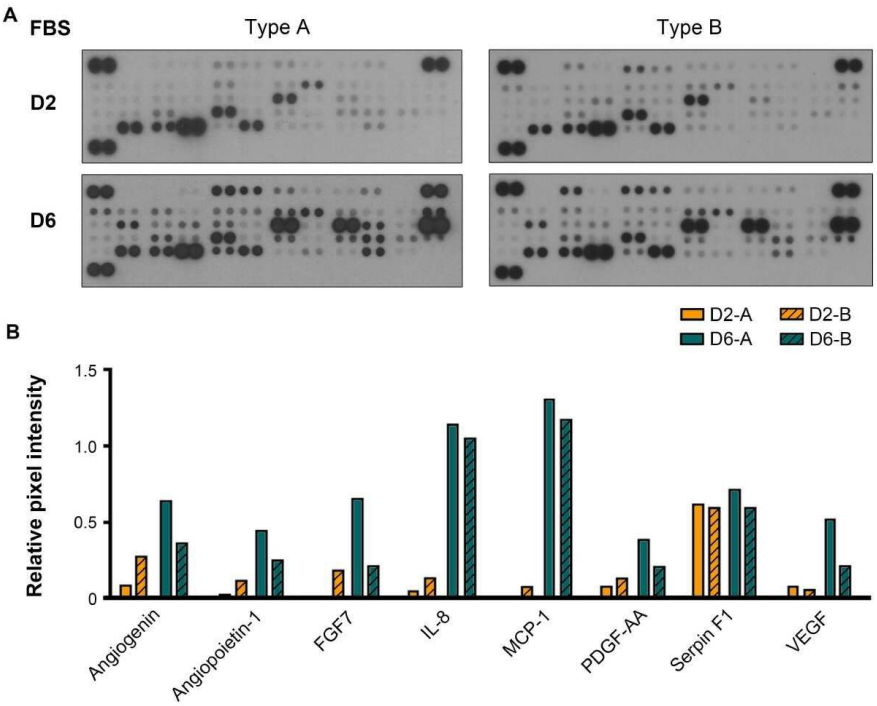
도면1g



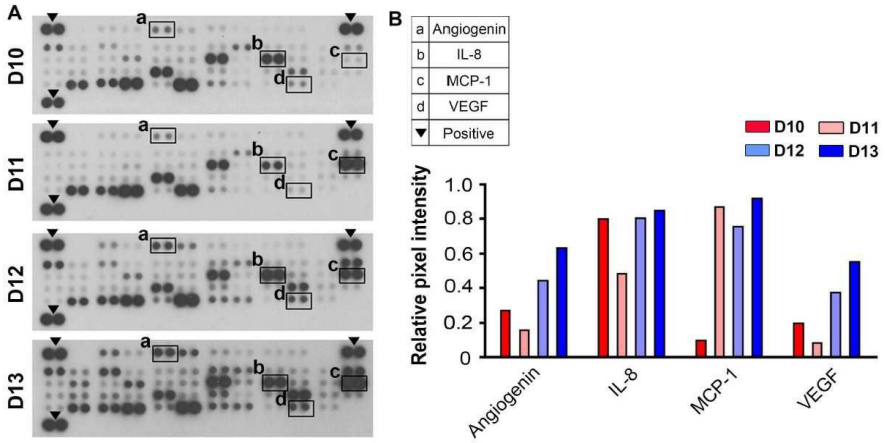
도면2


A
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
Relative pixel intensity
1.5
1.0
0.5
0
Angiogenin
Angiopoietin-1
FGF-7
IL-8
MCP-1
PDGF-AA
Serpin F1
VEGF
B
D2
D6
C
Proliferation (A490)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
EGM-2
D2
D6
D
Migrated cells
1000
800
600
400
200
0
***
VEGF
D2
D6
E
Tube length (mm/cm²)
500
400
300
200
100
0
**
EGM-2
D2
D6

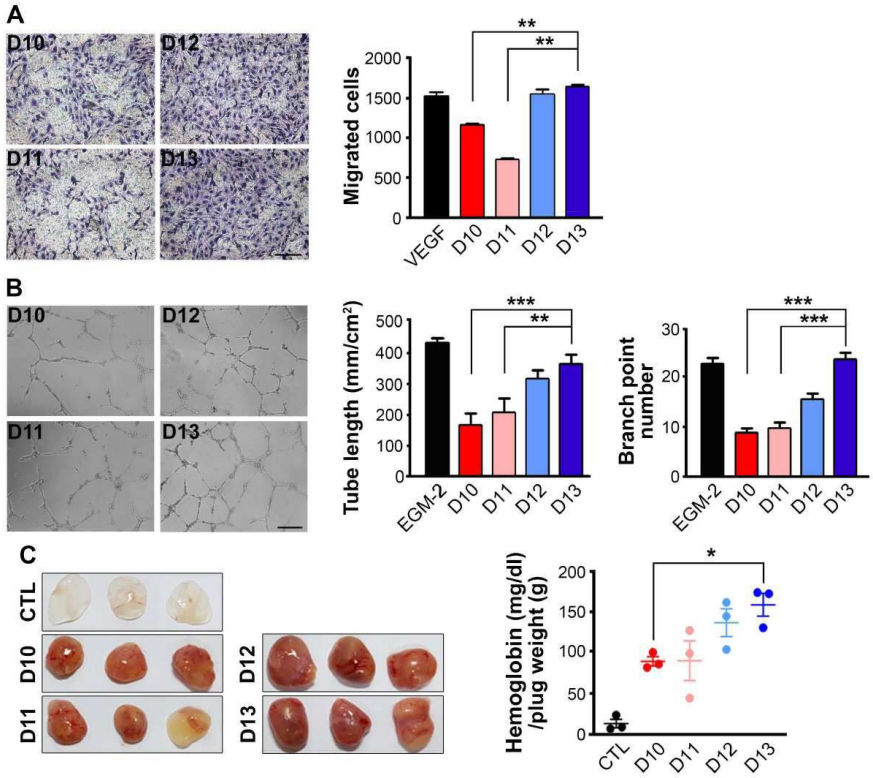
도면3


A
FBS
Type A
Type B
D2
D6
B
D2-A
D2-B
D6-A
D6-B
Relative pixel intensity
1.5
1.0
0.5
0
Angiogenin
Angiopoietin-1
FGF7
IL-8
MCP-1
PDGF-AA
Serpin F1
VEGF

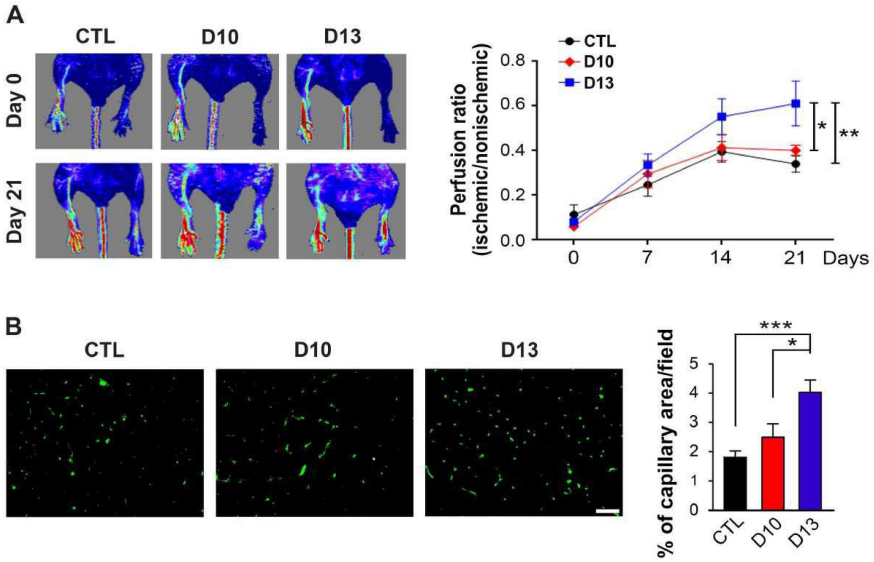
도면4


A
D10
D11
D12
D13
a
b
c
d
B
a Angiogenin
b IL-8
c MCP-1
d VEGF
▼ Positive
D10 D11
D12 D13
Relative pixel intensity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Angiogenin
IL-8
MCP-1
VEGF

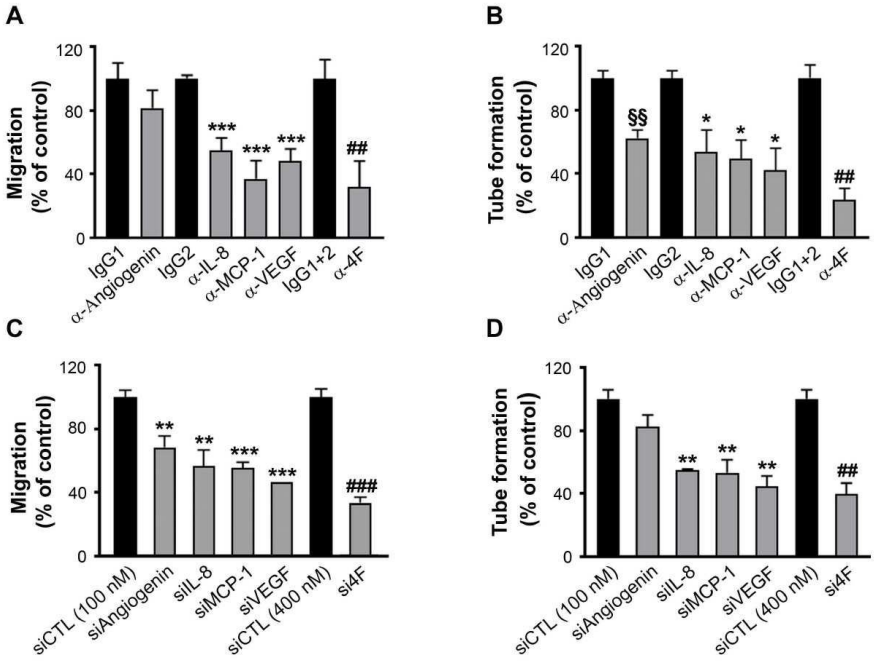
도면5


A
D10
D12
D11
D13
Migrated cells
2000
1500
1000
500
0
**
**
VEGF
D10
D11
D12
D13
B
D10
D12
D11
D13
Tube length (mm/cm²)
500
400
300
200
100
0
***
**
EGM-2
D10
D11
D12
D13
Branch point number
30
20
10
0
***
***
EGM-2
D10
D11
D12
D13
C
CTL
D10
D11
D12
D13
Hemoglobin (mg/dl) /plug weight (g)
200
150
100
50
0
*
CTL
D10
D11
D12
D13

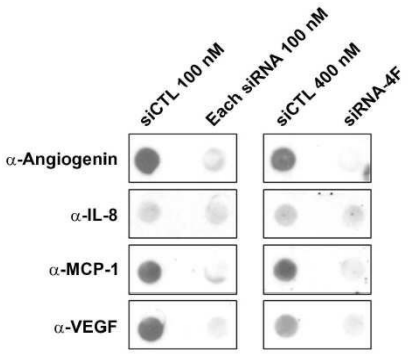
도면6


A
CTL
D10
D13
Day 0
Day 21
Perfusion ratio (ischemic/nonischemic)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
7
14
21
Days
*
**
B
CTL
D10
D13
% of capillary area/field
***
*
5
4
3
2
1
0

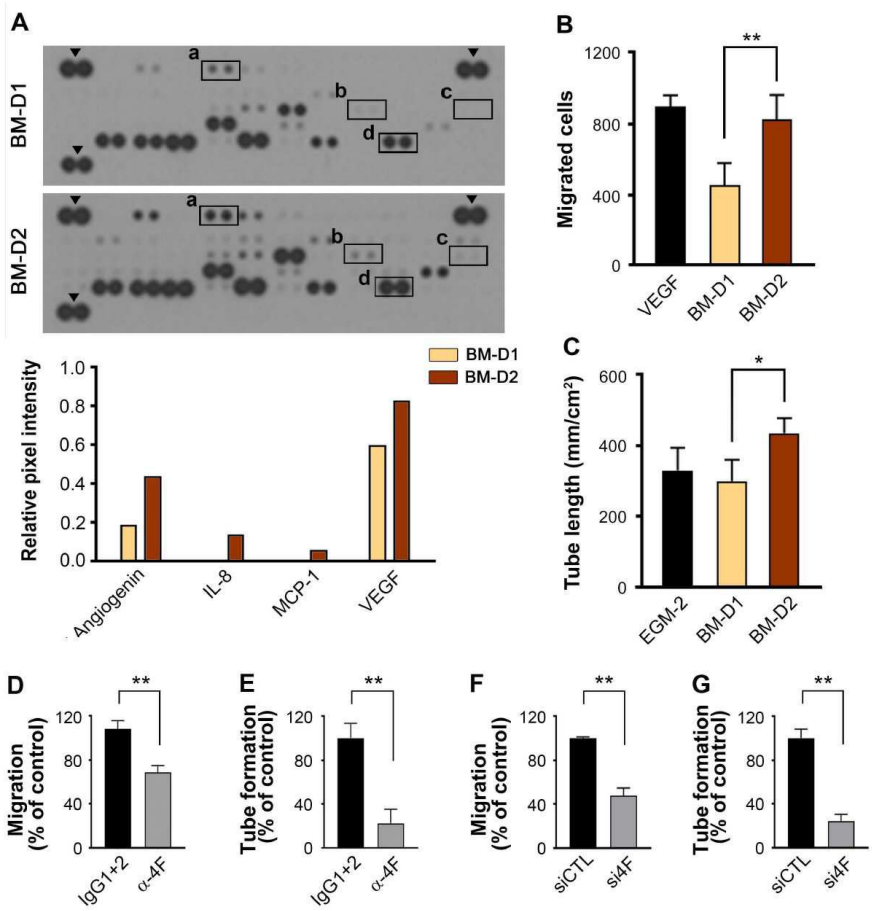
도면7


A
Migration (% of control)
120
80
40
0
IgG1
α-Angiogenin
IgG2
α-IL-8
α-MCP-1
α-VEGF
IgG1+2
α-4F
***
***
***
##
B
Tube formation (% of control)
§§
*
*
*
##
C
Migration (% of control)
**
**
***
***
###
siCTL (100 nM)
siAngiogenin
siIL-8
siMCP-1
siVEGF
siCTL (400 nM)
si4F
D
Tube formation (% of control)
**
**
**
##

도면8



도면9



서 열 목 록

<110> CATHOLIC UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Method for evaluating a vascular regenerative efficacy of stem cells

<130> P17U11C0739

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for angiogenin, sense

<400> 1

acguuguugu ugcuugugad tdt 23

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for angiogenin, antisense

<400> 2

ucacaagcaa caacaacgud tdt 23

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for IL-8, sense

<400> 3

gccaaggagu gcuaaagaad tdt 23

<210> 4

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for IL-8, antisense

<400> 4

uucuuuagca cuccuuggcd tdt 23

<210> 5

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for MCP-1, sense

<400> 5

gucaccugcu guuauaacud tdt 23

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for MCP-1, antisense

<400> 6

aguuauaaca gcaggugacd tdt 23

<210> 7

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> siRNA targeting for VEGF, sense

<400> 7

ggaguacccu gaugagaucd tdt 23

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for VEGF, antisense

<400> 8

gaucucauca ggguacuccd tdt 23

<210> 9

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for siCTL, sense

<400> 9

guucagcgug uccggcgagd tdt 23

<210> 10

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA targeting for siCTL, antisense

<400> 10

cucgccggac acgcugaacd tdt 23