



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0006413
(43) 공개일자 2023년01월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/981 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0107789(분할)
(22) 출원일자 2022년08월26일
심사청구일자 2022년08월26일
- (62) 원출원 특허 10-2022-0080615
원출원일자 2022년06월30일
심사청구일자 2022년06월30일
- (30) 우선권주장
1020210087135 2021년07월02일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
송채준
서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호 (반포본동, 주공아파트)
- 고윤영
서울특별시 양천구 목동동로 339, B904호(목동, 목동트윈빌)
- 이찬미
서울특별시 구로구 구일로2길 60, 203동 201호(구로동, 구일우성아파트)
- (74) 대리인
특허법인 무한

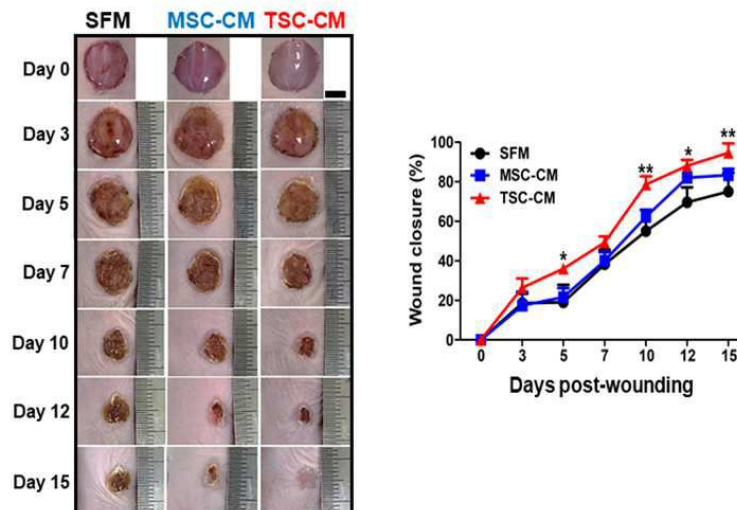
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인간영양막세포 유래물을 유효성분으로 포함하는 피부재생 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간영양막세포의 배양액 및 이의 유래물을 제조하는 방법과 이에 의해 제조된 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 제공하며, 상기 인간영양막세포 배양액 또는 이의 유래물을 포함하는 조성물은 피부재생 및 피부상처 치유를 촉진하는 효과를 갖는다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C12N 5/0605 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345350435
과제번호	2020R1I1A1A01063168
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	융모막 Trophoblast 유래 엑소좀의 골재생 효능 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 피부재생 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 피부재생 촉진용 조성물은 인간중간엽줄기세포를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 피부재생 촉진용 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피부재생 촉진용 조성물은 피부 결손부위 또는 피부 상처의 회복을 촉진하는 것인, 피부재생 촉진용 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항의 피부재생 촉진용 조성물을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 5

제 4항의 화장료 조성물은, 스킨, 스킨 소프트너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디로션, 바디클렌저, 비누 또는 파우더로 제형화되는 것을 특징으로 하는 것인, 화장품 조성물.

청구항 6

- (a)인간영양막세포를 체외배양하는 단계;
 - (b)상기 배양된 인간영양막세포를 포함하는 용액을 원심분리하여 상층액을 수거하는 단계; 및
 - (c)상기 수거된 상층액을 다공성 필터를 이용하여 멸균 정제하여 배양액을 수득하는 단계;
- 를 포함하는, 피부재생 촉진용 조성물의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,
상기 (a)단계의 상기 체외배양은 50 내지 100%의 세포밀도(confluency)로 48 내지 72시간 배양 후 배양액을 교체하는 것인, 피부재생 촉진용 조성물의 제조방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 (c)단계의 다공성 필터의 공극지름은 0.2 μm 이하인, 피부재생 촉진용 조성물의 제조방법.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 단계 이후에,

(d) 300G에서 10분, 2,000G에서 10분, 10,000G에서 30분, 100,000G에서 70분동안 원심분리하는 단계; 및

(e) 상기 원심분리를 동일하게 1회 더반복하는 단계;

를 더 포함하는, 피부재생 촉진용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간영양막세포(Trophoblasts) 유래물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 태반 속 융모막 세포층 중 영양막세포로부터 제조한 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 피부재생 및 피부상처 치유 촉진 효능 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 양막(amnion membrane)은 태반을 구성하고 있는 가장 안쪽에 있는 막으로, 양수와 태아를 둘러싸고 있어 태아를 외부의 병원균으로부터 보호하고 양수와 태아의 생체항상성을 유지하여 태아가 정상적으로 성장/발달할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 한다. 1910년 Davis가 처음 양막을 생체 재료로 사용한 후(Davis JW et al., Johns Hopkins Hosp Rep, 15; 307, 1910) 화상, 창상 및 안과 수술 후 상처 치유의 목적으로 널리 사용되고 있다 (Faulk WP et al., The Lancet, 315(8179):1156-1158, 1980, Mohammadi AA et al., Burns, 39(2):349-353, 2013, Dua HS et al., Survey of Ophthalmology, 49(1):51-77, 2004). 양막은 표피세포 성장인자 (epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor, FGF), 전환 성장인자 (transforming growth factor, TGF- β), 신경 성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 간장 성장인자 (hepatic growth factor, HGF)등을 포함하고 있는 것으로 알려져 있으며 그 자체로 콜라겐으로 구성된 세포외 기질과 상피세포로 구성되어 있다. 또한, 항염증 (anti-inflammation), 항균 (anti-bacterial) 성분을 포함하고 있으며 혈관생성 조절 성분 (angiogenic modulatory properties)들이 존재한다(Hao Y et al., Cornea, 19(3):348-352, 2000).

[0004] 엑소좀(exosome)은 세포밖 소포체, 세포외 소포(EVs, extracellular vesicles), 분비성 미세소포 등으로 알려졌으며 세포 간 정보교환을 위해 세포들이 외부 환경으로 분비하는 나노 크기의 소포체이다(Thery C et al., J Extracel Vesic. 2018;7(1):1535750.) 엑소좀은 단백질, 지질, 핵산, 대사물질 등 생물학적 활성을 보이는 다양한 물질들을 포함하여 이러한 기능적 수하물을 운반하는 매개체로 세포 간 소통의 역할을 수행하는 것으로 알려졌다. 최근에는 엑소좀 내 miRNA가 생체 내 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려지기도 하였다(Yanez-Mo M et al., J Extracel Vesic. 2015;4:27066, Colombo M et al., Ann Rev Cell Dev Biol. 2014;30:255-89, Valadi H et al., Nat Cell Biol. 2007;9(6):654-9). 엑소좀은 다양한 체액에서도 발견되어 질병의 진단에도 사용되고 있으며, 비교적 안정적으로 제조와 보관이 가능하여 진단 및 치료제로 개발되고 있다.

[0005] 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cells, MSCs)는 성체줄기세포로 수정란이나 난자를 이용하지 않기 때문에 윤리적 논란에서 자유로워 활용도가 높고, 자가 중간엽줄기세포를 세포치료제 및 이식에 사용할 경우 면역거부반응을 줄일 수 있다. 줄기세포의 종류를 중간엽줄기세포(MSC), 조혈줄기세포(HSC), 신경줄기세포(NSC), 배아유래줄기세포(ES-derived cells) 등으로 구분하여 임상연구 비율을 분석하였을 때, 중간엽줄기세포가 69%로 전체 임상연구의 최대 다수를 차지하고 있었고, 조혈줄기세포가 13%, 신경줄기세포가 4% 이었다. 이렇듯 배아줄기세포 연구와는 다르게 중간엽줄기세포 치료법은 상당수가 이미 임상 활용 단계에 와 있으며, 해외를 비롯한 많은

연구소들의 성체줄기세포 연구는 이미 파킨슨병, 연골손상, 소경, 암, 척수손상 등 60종 이상의 병을 치료한 결과가 발표되었고 현재 세계적으로 약 300종의 병에 대해서도 임상시험이 진행 중이다. 우리나라도 중간엽줄기세포를 이용하여 뇌졸중치료제, 파킨슨병 진행 억제, 퇴행성 관절염 치료, 간경변 줄기세포 신약 개발, 뼈, 연골 관련 질환 치료, 혈액 관련 질환, 심혈관계 질환 등 여러 임상 분야에 적용되어 활발하게 진행되고 있다. 하지만, 중간엽줄기세포는 여러 조직으로부터 획득은 가능하나, 얻을 수 있는 세포의 양이 매우 적을 뿐만 아니라 수명이 짧아 미분화 능력을 잃어버리며 퇴화되어 버리는 치명적인 단점이 있다. 또한, 체외 상태에서 배양 시 증식이 매우 느려 임상에 이용할 만큼의 양을 확보하기가 어렵고, 체외 배양 시 사용되는 동물유래 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)으로 임상 적용에 한계점이 있는 실정이다.

[0006] 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호해 주는 뼈는 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 성장이 끝난 성인의 뼈는 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 되는데, 이를 골재형성(bone remodeling)이라고 한다(Yamaguchi A. et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso., 50(6Suppl):664-669, 2005). 이러한 뼈의 순환은 성장과 스트레스에 의해 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 그 기능을 유지하는데 필수적이다. 성인에서는 매년 골격의 약 10-30%가 골흡수-골형성의 리모델링을 통하여 재형성된다.

[0007] 골재형성은 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast) 및 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)가 관여하며 서로 밀접한 연관성으로 골의 항상성이 유지된다. 예를 들어, 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ ligand), 및 그의 유도 수용체인 OPG(osteoprotegerin)과 같은 물질의 분비를 통해 골흡수를 담당하는 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내의 골 항상성을 유지한다. 이러한 골의 항상성이 물리적 영향, 호르몬 체계 등에 의해 유지되지 않은 경우 및 골조직 손상시 동반되는 골질환의 치료와 관련하여 과거에는 주로 골 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사 이상만을 중심으로 연구가 진행되어 왔으며, 그 기전 규명에 있어서 진전을 보지 못하였다. 일반적으로, 골다공증의 치료 및 예방을 위하여 칼슘이 함유된 식이요법이 추천되며, 폐경기의 여성들에게는 에스트로겐 또는 비타민 D 투여가 추천되고 있다. 그 외에, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 계열 약물이 파골세포를 억제하고 사멸을 유도하는 골흡수 억제제로서 새로운 대체 치료제로 주목받고 있다. 그러나, 골질환 치료제로 널리 사용되는 칼슘보강제는 부갑상선 호르몬의 분비를 억제하며 골흡수에 의한 골량 감소를 방지하나, 골량 유지의 개인 차이가 심한 것으로 알려져 있다(Heandry R.P. principles of bone biology, Academic press, 1007-1017, 1996). 또한, 에스트로겐이나 칼시토닌을 이용한 호르몬 요법의 경우 골밀도를 증가시키고 직각암의 발생을 감소시킨다는 보고도 있으나, 유방암, 심근경색, 정맥 혈전증 등의 부작용이 보고된 바 있다(Nelson, H.D et al., JAMA, 288:872-881, 2002; Lemay, A., J.Obstet. Gynaecol. Can., 24:711-7152-3). 또한, 비스포스포네이트 제제의 경우, 최근 복용하는 환자에서 턱뼈의 괴사, 중증 심방세동, 뼈나 관절의 무력화 또는 근골격의 통증이 발생하는 사례가 해마다 증가되고 있다(Coleman RE., Br J Cancer, 98:1736-1740(2008)). 따라서 부작용 발현이 적으면서도 효과적으로 골흡수를 억제할 수 있는 새로운 골질환 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 중간엽줄기세포의 수급과 생체 외 배양 조건은 대량 생산을 위한 제품화 과정과 임상 적용에서의 문제를 가지고 있었다. 이에, 본 발명자들은 태반 속 융모막 세포층 중 하나인 영양막으로부터 획득되는 세포의 배양액을 이용하여 중간엽줄기세포의 증식 및 FBS와 같은 동물유래물질 배제 조건 하의 체외배양 조건을 확립하였다.

[0010] 또한, 인간영양막세포의 배양액 및 이의 유래물에서 피부 및 골재생 촉진효과를 확인하여 이를 유효성분으로 하는 조성물을 제공한다.

[0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 피부재생 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 피부재생 촉진용 조성물은 인간중간엽줄기세포를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 피부재생 촉진용 조성물은 피부 결손부위 또는 피부 상처의 회복을 촉진하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 피부재생 촉진용 조성물 중 어느 하나를 포함하는 화장품 조성물이 제공된다.
- [0017] 일 측에 따르면 상기 화장품 조성물은 스킨, 스킨 소프트너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디로션, 바디클렌저, 비누 또는 파우더로 제형화되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면,
- [0019] (a)인간영양막세포를 체외배양하는 단계;
- [0020] (b)상기 배양된 인간영양막세포를 포함하는 용액을 원심분리하여 상층액을 수거하는 단계; 및
- [0021] (c)상기 수거된 상층액을 다공성 필터를 이용하여 멸균 정제하여 배양액을 수득하는 단계;
- [0022] 를 포함하는, 피부재생 촉진용 조성물의 제조방법이 제공된다.
- [0023] 일 측에 따르면, 상기 (a)단계의 상기 체외배양은 50 내지 100%의 세포밀도(confluency)로 48 내지 72시간 배양 후 배양액을 교체하는 것일 수 있다.
- [0024] 일 측에 따르면, 상기 (c)단계의 다공성 필터의 공극지름은 0.2 μ m이하일 수 있다.
- [0025] 일 측에 따르면,
- [0026] 상기 단계 이후에,
- [0027] (d) 300G에서 10분, 2,000G에서 10분, 10,000G에서 30분, 100,000G에서 70분동안 원심분리하는 단계; 및
- [0028] (e) 상기 원심분리를 동일하게 1회 더반복하는 단계;
- [0029] 를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 인간영양막세포 배양액 및 유래물은 줄기세포 증식 촉진효과를 가져 동물유래물질인 FBS가 없는 조건에서의 인간 중간엽줄기세포의 체외배양을 가능하게 한다.
- [0032] 또한, 본 발명의 인간영양막세포 유래물은 조골세포 분화와 골재생 촉진효과를 가져 골질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있고, 피부재생 촉진효과를 가져 피부재생 촉진 또는 피부상처 치료용 조성물로 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 제조 프로토콜에 따른 NTA(Nanoparticle Tracking Analysis)분석결과와 골재생 효능에 대한 평가이다.
- 도 2는 FBS 존재하에 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 증식단계에 처리한 결과이다.
- 도 3은 FBS 부재하에 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 증식단계에 처리한 결과이다.

- 도 4는 FBS 부재하에 인간영양막세포 배양액 처리군과 중간엽줄기세포 배양액 처리군의 세포분포도 및 모양을 확인한 것이다.
- 도 5는 인간영양막세포의 줄기세포 유지 관련 유전자의 발현을 나타낸 것이다.
- 도 6은 인간영양막세포와 중간엽줄기세포의 체외배양한 모습과 나노입자 분석결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 FBS 부재하에 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액의 중간엽줄기세포 증식효능을 비교한 것이다.
- 도 8은 중간엽줄기세포 배양액, 인간영양막세포 배양액 및 인간영양막세포 유래물의 항노화 효능을 SA- β -GAL염색법을 적용하여 나타낸 것이다.
- 도 9는 FBS 부재하에 도 8과 동일한 조건에서의 항노화 효능을 SA- α -GAL염색법을 적용하여 나타낸 것이다.
- 도 10은 마우스 창상부위에 인간영양막세포 배양액을 처리하여 일자에 따라 창상회복 정도를 나타낸 것이다.
- 도 11은 마우스 창상치유 실험에서 조직염색법을 통해 상피세포층과 진피층의 두께가 증가함을 확인한 것이다.
- 도 12는 인간영양막세포 배양액의 골분화 촉진 효과를 ALP활성도 및 칼슘침착도로 나타낸 것이다.
- 도 13은 인간영양막세포 배양액을 처리한 경우의 미네랄 침착도 평가를 알리자린 레드 에스 염색 결과로 나타낸 것이다.
- 도 14는 인간영양막세포 배양액을 처리함에 따라 골재생 관련 유전자의 발현 변화를 확인한 것이다.
- 도 15는 인간영양막세포 배양액을 처리하여 중간엽줄기세포를 골분화 유도배양하고 RNA 시퀀싱 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 16은 인간영양막세포 배양액 처리에 따른 세포신호전달계(KEGG pathway) 분석결과를 나타낸 것이다.
- 도 17은 증가된 MAPK 신호전달계를 웨스턴블롯으로 확인한 것이다.
- 도 18은 신호전달계 중 BMP2의 발현은 증가하고 GREM1의 발현이 감소됨을 확인한 것이다.
- 도 19는 인간영양막세포 배양액 처리에 따라 사이토카인 연계 신호전달계의 활성 변화를 비교한 것이다.
- 도 20은 인간영양막세포 배양액의 지방분화 억제효과를 확인한 사진 및 지방분화 인자 발현정도를 표시한 것이다.
- 도 21은 인간영양막세포 유래물의 골분화 촉진 효과를 ALP활성도 및 칼슘침착도로 확인한 것이다.
- 도 22는 인간영양막세포 유래물과 배양액을 함께 사용하는 경우의 골분화 촉진효과가 상승됨을 ALP 활성도를 통해 확인한 것이다.
- 도 23은 인간영양막세포 유래물의 미네랄 침착도 평가를 알리자린 레드 에스 염색을 통해 나타낸 것이다.
- 도 24는 인간영양막세포 유래물로 골분화 촉진시 골재생 관련 전사인자 유전자의 발현을 측정하는 것이다.
- 도 25는 인간영양막세포 유래물의 골재생 효능을 동물실험으로 검증하는 microCT 결과이다.
- 도 26은 상기 동물실험에서 H&E 및 MT 염색방법을 이용한 조직학적 분석결과이다.
- 도 27은 상기 동물실험에서 골재생 마커 인자 발현을 형광분석법으로 평가한 결과이다.
- 도 28은 인간영양막세포 유래물(엑소좀)의 miRNA를 분석한 결과이다.
- 도 29는 인간영양막세포 유래물(엑소좀)에서 더 높게 발현되는 miRNA의 표적유전자들을 나타낸 것이다.
- 도 30은 ClueGO bioinformatic tool로 분석한 신호전달계를 나타낸 것이다.
- 도 31은 DAVID bioinformatic tool로 인간영양막세포 유래물(엑소좀)에서 발현되는 상위 1%의 miRNA를 분석한 결과이다.
- 도 32는 상기 도 31과 같은 분석을 string과 ClueGO bioinformatic tool로 수행한 결과이다.
- 도 33은 인간영양막세포 유래물(엑소좀)과 중간엽줄기세포의 엑소좀 내의 miRNA의 역할을 도식화한 것이다.

도 34는 인간 산모 태반으로부터 영양막세포를 분리하는 과정이다.

도 35는 분리된 세포를 체외배양한 결과를 나타낸다.

도 36은 배양 72시간 후의 다핵세포화와 인간영양막세포 특이적 마커 단백질인 시토허라틴7의 발현을 보여준다.

도 37은 일차 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 배양시 처리한 결과를 나타낸다.

도 38은 일차 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 배양액 및 인간영양막세포 배양액과 줄기세포 증식효능을 비교실험한 것이다.

도 39는 FBS 부재하에 일차 인간영양막세포 배양액의 중간엽줄기세포의 증식 촉진 효능을 확인한 것이다.

도 40은 일차 인간영양막세포 배양액의 골재생 효능을 ALP활성화, 칼슘침착도 및 RUNX2 유전자 발현 변화로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0037] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0038] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0039] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0040] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 중간엽 줄기세포 증식 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간영양막세포"는 인간 태반의 일 구성부분으로서, 보다 구체적으로는 배포 외부에 위치한 배자의 외배엽층으로, 난자를 자궁벽에 부착시키며 배자에 영양분을 공급하는 조직을 의미한다. 이것에서 용모막 및 양막이 유래하며, 영양막의 내세포층은 용모를 덮으며, 이를 세포영양막이라 부른다. 상기 인간영양막세포는 시판되는 세포를 이용할 수 있고 또는 인간 산모의 출산 후 분리된 태반으로부터 추출되어 제공될 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간영양막세포 배양액"은 상기 인간영양막세포를 체외배양한 배양액을 의미한다. 바람직하게는 항생제 및 FBS의 존재 하에 세포성장배지에서 체외배양될 수 있으며 구체적인 제조방법은 후술하는 바와 같다. 상기 인간영양막세포 배양액은 하기 인간영양막세포 유래물을 포함할 수 있다.
- [0045] 일 측에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포 증식 촉진용 조성물은, 동물혈청을 포함하지 않을 수 있다. 상기 동물혈청을 포함하지 않는 것이란 바람직하게는 FBS를 포함하지 않는 것을 의미하며, FBS의 부재 하에서도 인간중간엽 줄기세포의 증식을 촉진할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "FBS"는 소태아 혈청을 말하며, FBS는 세포생장에 필수적인 성장인자, 시토킨, 단백질 등이 다양하게 포함되어 줄기세포용 배지 첨가제로 널리 활용되고 있다. 하기 실시예 2, 실시예 3-2 및 실시예 6-2에서 검증하는 바와 같이, FBS가 부존재하는 조건에서도 상기 조

성물은 중간엽 줄기세포의 증식을 촉진하는 효과를 가진다.

- [0046] 일 측에 따르면, 상기 유래물은 엑소좀을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 영양막 세포 유래물"은 인간 영양막 세포가 포함하거나 외부로 분비하는 막성 소포체로서 내부에 지질, 핵산, 단백질, 대사물질 등 생물학적 활성을 보이는 다양한 물질을 포함하는 것을 의미한다. 상기 유래물은 엑소좀, 미세소포체, 세포의 소포체, 마이크로베지클 또는 마이크로파티클 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 본 명세서에서는 "유래물"과 "엑소좀"을 서로 같은 의미로써 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 유래물은 바람직하게는 중간엽줄기세포의 증식을 촉진하는 성분 및 골분화 유도된 중간엽 줄기세포가 골세포로 분화하는 것을 촉진하는 성분 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 has-miR-1246, has-miR-1290, has-miR-423-5p 및 has-let-7b-5p로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 포함할 수 있다.
- [0047] 일 측에 따르면, 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 탯줄 및 지방으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래한 것일 수 있으며, 전분화능 줄기세포로부터 분화된 것일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 중간엽줄기세포"는 인간의 다분화능을 가진 기질세포로, 제한적이지만 다양한 분화능을 가지는 줄기세포를 말하며, 유래 조직에 의해 한정되지 않으나, 바람직하게는 골수, 탯줄 및 지방으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래한 인간중간엽줄기세포일 수 있다. 또한, 본 발명의 중간엽 줄기세포가 전분화능 줄기세포로부터 분화된 것인 경우 상기 전분화능 줄기세포는 배아줄기세포(ESC)일 수 있으며, 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)일 수 있다. 하기 실시예 3-2에서 검증하는 바와 같이, 본 발명의 상기 중간엽 줄기세포의 증식 촉진용 조성물은 골수, 탯줄 및 지방 유래의 중간엽 줄기세포 모두에 대하여 증식을 촉진하는 효과가 존재하였다.
- [0048] 일 측에 따르면, 상기 인간 영양막 세포 배양액은 전체 조성물의 20 내지 60 부피 %로 포함될 수 있다. 실시예 3-2에서 검증하듯 상기 조성에서 본 발명의 인간영양막세포 배양액은 중간엽줄기세포 배양액보다 중간엽줄기세포의 증식을 촉진하는 효과가 우수하였다.
- [0049] 본 발명의 다른 실시예에 따르면,
- [0050] (a) 세포배양배지에 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계;
- [0051] (b) 중간엽 줄기세포에 인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 조성물을 처리하는 단계; 및
- [0052] (c) 적어도 24시간 이상 연속하여 배양하는 단계;를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 증식을 촉진하는 방법이 제공된다.
- [0053] 일 측에 따르면, 상기 (a)단계 및 (c) 단계에서의 배양은 동물혈청을 포함하지 않는 배지에서 이루어질 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 인간영양막세포 배양액 또는 이의 유래물을 함유하는 조성물이 동물혈청이 부존재하는 환경에서도 중간엽줄기세포의 증식을 촉진할 수 있음은 상술한 바와 같다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면,
- [0056] (a)인간영양막세포를 체외배양하는 단계;
- [0057] (b)상기 배양된 인간영양막세포를 포함하는 용액을 원심분리하여 상층액을 수거하는 단계; 및
- [0058] (c)상기 수거된 상층액을 다공성 필터를 이용하여 멸균 정제하여 배양액을 수득하는 단계;를 포함하는, 중간엽 줄기세포 증식 촉진용 조성물의 제조방법이 제공된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "체외배양"은 인체 및 여하의 동물의 체외에서 배양되는 것을 의미하며, 특정한 배양 조건으로 한정되지 않으나 바람직하게는 항생제와 배지 첨가제 하에 진행될 수 있다. 더욱 바람직하게는 1% 항생제의 존재 하에 배양될 수 있다.
- [0059] 일 측에 따르면, 상기 (a)단계의 체외배양은 바람직하게는 50 내지 100%의 세포밀도(confluency)로 48 내지 72 시간 배양 후 배양액을 교체하는 것일 수 있다. 바람직하게는 50%의 세포밀도로 72시간 배양 후 배양액을 교체하고 48시간 후에 배양액을 수거하여 이루어질 수 있다.
- [0060] 일 측에 따르면, 상기 (c)단계의 다공성 필터의 공극지름은 0.2 μm 이하일 수 있다.
- [0061] 일 측에 따르면, 상기 단계 이후에,
- [0062] (d) 300G에서 10분, 2,000G에서 10분, 10,000G에서 30분, 100,000G에서 70분동안 원심분리하는 단계; 및

- [0063] (e) 상기 원심분리를 동일하게 1회 더 반복하는 단계;
- [0064] 를 더 포함할 수 있다.
- [0065] 바람직하게는, 상기의 원심분리를 통해 하부에 침전된 침전물(pellet)을 수득할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제조방법 중 어느 하나의 제조방법으로 제조된, 중간엽 줄기세포 증식 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0067] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 중간엽 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물이 제공된다. 본 발명에서 개시하는 인간영양막 세포 배양액과 그 유래물은 단독으로 사용되는 경우에도 중간엽 줄기세포의 골분화를 촉진하는 효과를 가지며, 하기 실시예 5-1에서 검증하는 바와 같이 배양액과 유래물을 함께 처리하는 경우 상승효과를 가질 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 사용된 용어 “골분화 촉진”이란 골분화가 유도된 중간엽 줄기세포가 골세포로 분화하는 것을 촉진하는 것을 말한다. 상기 골분화의 유도는 바람직하게는 중간엽줄기세포를 골분화 유도 배지(OIM)에 처리하여 이루어질 수 있다. 인간영양막세포 배양액 또는 유래물을 포함하는 조성물은 중간엽줄기세포의 골분화를 촉진하여 높은 ALP활성도 및 미네랄 침착도를 보여줄 수 있으며, 우수한 조골세포 분화 촉진 및 골형성 촉진 효능을 가질 수 있다.
- [0069] 상기 ALP활성도는 조골세포의 초기 분화 및 골형성 지표로서, ALP(Alkaline Phosphatase)효소가 활성화된 정도를 나타낸다. 바람직하게는 아나스펙, Inc, Ferment, Canada의 ALP 키트를 사용하여 405 nm에서 측정될 수 있다.
- [0070] 상기 미네랄 침착도는 조골세포의 중후반 분화의 마커로 널리 이용되는 알리자린 레드 에스(Alizarin Red S) 염색으로 평가될 수 있다. 바람직하게는 Millipore 사의 염색액을 제조사의 지침에 따라 사용하여 측정할 수 있다.
- [0071] 일 측에 따르면, 상기 인간 영양막 세포 배양액은 전체 조성물의 10 내지 40부피 %로 포함될 수 있다. 하기 실시예 4에서 검증하듯이, 인간영양막세포 배양액의 상기 조성에서 골분화 유도된 중간엽줄기세포의 골세포로의 분화를 촉진하는 효과를 가졌다.
- [0072] 일 측에 따르면, 상기 유래물은 엑소솜을 포함할 수 있고, 상기 유래물은 1×10^8 내지 1×10^9 입자/mL로 포함될 수 있다. 상기 “인간영양막세포 유래물” 및 “엑소솜”에 관한 설명은 앞서 설명한 바와 같으므로 생략한다. 실시예 5에서 검증하듯이, 인간영양막세포 유래물이 1×10^8 내지 1×10^9 입자/mL로 포함되는 경우 골분화 촉진 효과가 우수하였다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면,
- [0074] (a)인간영양막세포를 채취배양하는 단계;
- [0075] (b)상기 배양된 인간영양막세포를 포함하는 용액을 원심분리하여 상층액을 수거하는 단계; 및
- [0076] (c)상기 수거된 상층액을 다공성 필터를 이용하여 멸균 정제하여 배양액을 수득하는 단계;를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물의 제조방법이 제공된다.
- [0077] 일 측에 따르면, 상기 단계 이후에,
- [0078] (d) 상기 배양액에 엑소솜 단리 용액을 처리하는 단계; 및
- [0079] (e) 상기 처리된 용액을 원심분리하여 엑소솜을 수득하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 엑소솜 단리 용액은 당 업계에 공지된 모든 종류의 단리방법에 사용되는 것일 수 있으나 바람직하게는 엑소솜을 석출하기 위한 용액일 수 있으며, 시판되는 엑소솜 단리 용액을 이용할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 상기 방법 중 어느 하나의 방법으로 제조된, 중간엽 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0082] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

- [0083] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 골질환 또는 피부질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0084] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 골질환, 피부질환 또는 피부상처부위의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0085] 본 발명에서 사용되는 용어 “개체”란 골 질환의 발생 위험도가 높거나 골 질환 또는 피부질환이 발생한 포유 동물로서 야생동물과 가축을 가리지 않으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0086] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 1×10^8 내지 1×10^9 입자/mL로 상기 유래물을 포함할 수 있다.
- [0087] 일 측에 따르면, 상기 골질환은 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0088] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 골분화 유도된 중간엽줄기세포의 골세포로의 분화를 촉진시키는 것일 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 골분화가 유도된 중간엽줄기세포가 이용되는 줄기세포치료방법에 있어서, 중간엽줄기세포의 골분화를 촉진하여 치료효과를 개선하기 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [0089] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 예멸전, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화될 수 있다.
- [0090] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 이러한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 약학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 종양내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다.
- [0092] 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0093] 상기 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 영양막 세포 배양액 및/또는 이의 유래물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환 치료방법으로서, 상기 개체는 골 질환이 발생한 인간을 제외한 포유동물인 골질환의 치료방법이 제공된다.
- [0095] 일 측에 따르면, 상기 치료방법은 중간엽줄기세포를 개체에 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 중간엽줄기세포는 골분화가 유도된 중간엽줄기세포이거나 상기 치료방법은 중간엽줄기세포와 함께 중간엽줄기세포의 골분화 유도 물질을 개체에 투여하는 것일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 상기 조성물이 골분화 유도된 중간엽줄기세포가 골세포로 분화되는 것을 촉진하는 효과를 가지고 있음은 상술한 바와 같다. 바람직하게는 줄기세포치료에 있어서, 골분화 유도된 중간엽 줄기세포를 투여하거나 또는 중간엽 줄기세포와 골분화 유도물질을 함께 투여하는 경우 이와 동시에 또는 순차로 본 발명의 상기 조성물을 투여하여 치료효과를 개선할 수 있다.
- [0097] 일 측에 따르면, 상기 치료방법은 골분화 유도된 중간엽줄기세포를 개체에 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 중간엽줄기세포의 투여는 상기 배양액 및/또는 유래물의 투여와 동시에 또는 순차로 이루어지는 것이고, 순차로 투여되는 경우 그 선/후는 무방하나 바람직하게는 중간엽줄기세포의 투여 후 인간 영양막 세포 배양액

및/또는 이의 유래물을 투여하는 것일 수 있다.

- [0098] 일 측에 따르면, 상기 치료방법에서 개체는 CT 촬영으로 골질환 발생이 확인된 개체일 수 있으며, 상기 치료방법은 상기 투여 단계 이후에 상기 골질환이 발생한 환부의 CT 촬영을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 상기 조성물에 의한 치료효과는 조골세포의 골형성과 관련되어 확인될 수 있다. 하기 실시예 5-4의 동물실험에서는 인위적으로 골결손을 유발한 후 본 발명의 조성물에 의해 결손부위가 회복되는 것으로 검증하였다. 본 발명의 조성물 처리에 따른 치료효과는 처리 전후 CT촬영을 통한 육안비교, 조직염색법을 통한 육안비교 및 골재생 마커인 OCN(osteocalcin) 발현량 비교를 통해 확인될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0100] 본 발명의 일 측에 따르면, 인간 영양막 세포 배양액 및 이의 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 피부재생 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0101] 상기 “피부재생”이란 상처부위의 회복, 노화된 진피/표피 세포의 대체, 피부질환의 치료 및 탈락된 부위의 재생 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 창상과 같이 외부의 물리적 자극으로 인해 소실된 피부층의 수복을 의미한다. 하기 실시예 3-4에서 검증하는 바와 같이, 본 발명의 조성물은 창상부위의 피부를 재생하는 효과가 존재하였다.
- [0102] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 인간중간엽줄기세포를 더 포함할 수 있다. 인간중간엽줄기세포를 피부 상처 부위에 처리하는 경우에도 피부재생 촉진 효과를 보이거나, 본 발명의 인간영양막세포 배양액 및 유래물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 함께 사용되는 경우 더 우수한 피부재생 촉진 효과가 있음을 실시예 3-4에서 검증하였다.
- [0103] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0105] 실시예 1: 인간영양막세포 배양액(Conditioned Medium, CM) 및 유래물(Extracellular Vesicles, EV)제조 프로토콜 확립
- [0106] 인간영양막세포는 ATCC로부터 구매하여 RPMI1640 배양액에 1% 항생제, 5% 엑소솜 디플리티드 FBS(exosome depleted FBS)를 넣어 체외 배양하였다. 인간영양막세포는 태반 속 용모막으로부터 분리하여 사용할 수 있으며, 이에 대한 방법은 이미 알려져 있다 (Lucas Sagrillo-Fagundes et al., Journal of Visualized Experiments 2016).
- [0107] 실시예 1-1: 골재생 효과 확인용 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 제조조건
- [0108] 골재생 효과 확인용 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 제조 조건은 다음과 같다. 1.5×10^6 세포로 75cm^2 배양 컨테이너에서 72시간 배양 후 (50%세포밀도) 엑소솜 제거된 FBS(exosome depleted FBS)를 포함하는 배양액으로 교체한다. 이후 48시간 경과 후 상기 배양액을 수거하여 이를 인간영양막세포 배양액으로 사용하였다. 인간영양막세포 유래물은 상기 배양액으로부터 제조하였으며, 엑소솜 분리 용액을 사용하거나 초원심분리 방법으로 제조하였다. 엑소솜 분리 용액을 사용하는 경우, 인간영양막세포 배양액 10mL에 2mL의 엑소퀵(Exoquick) 용액 (SBI 제조)을 섞어서 (5:1) 하룻밤 동안 4°C 에서 엑소솜이 분리되도록 한 후 원심분리기를 이용하여 엑소솜을 수집하였다. 초원심분리 방법으로 제조하는 경우, 1) 300G에서 10분, 2) 2,000G에서 10분, 3) 10,000G에서 30분, 4) 100,000G에서 70분의 과정을 두 번 반복하여 제조하였다. 분리된 엑소솜은 1/10 또는 1/20으로 희석하여 NTA 장비를 이용하여 사이즈와 농도를 분석하였다.
- [0110] 실시예 1-2: 줄기세포증식 및 피부재생 효과 확인용 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 제조 방법
- [0111] 중간엽 줄기세포 증식 및 피부재생 효과 확인용 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 제조 조건은 다음과 같다. 75cm^2 배양 컨테이너에서 1.5×10^6 세포를 배양하여 90% 세포밀도(confluency)가 되도록 한 후, PBS로 2회 세척하였다. FBS가 존재하지 않는 DMEM F12 또는 MEM에 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 배양액에서 24시간 배양 후 수거하여 이를 인간영양막세포 배양액으로 사용하였다. 인간영양막세포 유래물은 초원심분리방법으로 엑소솜을 수집하였으며, 1) 300G에서 10분, 2) 2,000G에서 10분, 3) 10,000G에서 30분, 4) 100,000G에서 70분의 과정을 두 번 반복하여 제조하였다. 분리된 엑소솜은 1/10 또는 1/20으로 희석하여 NTA 장비를 이용하여 사

이즈와 농도를 분석하였다.

[0113] 실시예 1-3: 최적프로토콜 확립

[0114] 세포 유래물 수집에 있어 최적의 세포밀도 및 배양시간을 파악하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 50% 이상, 100% 이하의 세포밀도(confluency)에서 48시간 배양하여 수급된 세포유래물(엑소좀 포함)을 프로토콜 1로, 100% 초과인 세포밀도에서 72시간 배양하여 수급된 세포유래물을 프로토콜 2로 나누었다. NTA 분석 후 중간엽줄기세포의 골분화 유도 시 처리하여 초기 골분화 마커인 ALP활성도를 평가하였다. 프로토콜 1과 2에서 비슷한 세포 유래물 입자(particle)의 분포도가 나타났으나 차이도 확인되었다. 프로토콜 1의 세포유래물 입자 분포도가 넓게 나타나며, 프로토콜 2는 대부분 50~350nm의 입자가 분석되었다. ALP 활성도 평가에서는 프로토콜 1에서 유의적 결과를 얻을 수 있었다. 프로토콜에 따른 NTA 분석 결과와 골재생 효능에 대한 평가 결과는 도 1에 나타내었다.

[0116] 실시예 2: 인간영양막세포 배양액의 중간엽줄기세포의 증식 촉진 효능 확인

[0117] 본 발명에서 사용한 인간 중간엽줄기세포는 골수유래 중간엽줄기세포로 promocell로부터 구입하였으며, 5%(v/v) FBS(Fetal bovine serum) 및 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 MEM-alpha에서 37 °C, 5% CO₂ 습한 환경의 배양조건에서 세포를 배양하였다.

[0118] 중간엽줄기세포를 동일 세포수로 부착시킬 때 인간영양막세포 배양액 (Trophoblast CM 또는 TB CM)을 5%(100uL), 10%(200uL) 및 30%(v/v, 600uL) 로 처리하고 24, 48, 72시간 후 세포의 증식을 이미지 또는 정량화하여 평가하였다. 인간영양막세포 배양액 처리량이 많을수록 중간엽줄기세포의 증식이 촉진되는 것으로 확인할 수 있었으며, 배양 시간이 증가할수록 또한 증식이 촉진되었다. 평가 결과는 도 2에 나타내었다.

[0119] 중간엽줄기세포 배양 시 동물혈청인 FBS를 제외하고 인간영양막세포 배양액을 처리하여도 중간엽줄기세포의 증식이 유지 또는 촉진되는 지를 확인하였다. 중간엽줄기세포를 동일 세포수로 처리 후 부착시킬 때 FBS를 제외하고 인간영양막세포 배양액 (Trophoblast CM) 또는 중간엽줄기세포 배양액(MSC CM)을 각각 5%(100 uL), 10%(200 uL), 20%(400 uL) 및 30%(v/v, 600 uL)로 처리하고 24시간이 경과한 후의 현미경 사진을 도 3에 나타내었다. FBS가 처리되지 않은 그룹과 비교하여 인간영양막세포배양액이 처리된 군은 배양액 처리량이 증가할수록 중간엽줄기세포의 증식을 촉진함을 확인할 수 있었으며 FBS만 처리된 군과 비교하여도 인간영양막세포 배양액 처리군에서 중간엽줄기세포의 증식이 촉진됨을 확인할 수 있었다.

[0120] FBS 처리 없이 중간엽줄기세포 배양액과 인간영양막세포 배양액 처리 시 중간엽줄기세포 배양과정에서 세포 분포도 및 모양을 확인하였다. FBS가 처리되지 않은 중간엽줄기세포는 24시간 후 잘 부착되지 않은 모습이었으나 FBS와 인간영양막세포배양액이 처리된 군에서 안정적으로 배양이 유지되는 모습을 확인할 수 있었다. 중간엽줄기세포 배양액 5% 처리군은 같은 양의 인간영양막세포 배양액 처리군과 비교하여 중간엽줄기세포의 부착 및 배양이 잘 이루어지지 않았다. 30% 배양액 처리군에서는 모두 중간엽줄기세포의 배양이 안정적으로 관찰되었으나 세포 하나 하나의 모습이 선명하게 관찰되는 인간영양막세포 배양액 처리군과 비교하여 중간엽줄기세포 배양액 처리군은 배양된 세포의 수도 적고 세포의 모습이 불분명하게 관찰되었다. 평가 결과는 도 4에 나타내었다.

[0122] 실시예 3: 인간영양막세포와 중간엽 줄기세포와의 비교실험

[0123] 실시예 3-1: 인간영양막세포 및 중간엽 줄기세포의 특성 확인

[0124] 먼저, 인간영양막세포의 줄기세포 유지능력(stemness potential)을 중간엽줄기세포와 비교하기 위해 줄기세포 유지 관련 유전자인 OCT4, NANOG, SOX2 및 KLF4의 발현을 PCR로 확인하여 도 5에 나타내었다. 인간영양막세포는 ATCC로부터 구입하여 RPMI 1640 배양액에 5%(v/v) FBS, 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하여 배양하였다. 인간영양막세포(TSC)가 중간엽줄기세포(MSC)보다 상기 OCT4, NANOG 및 SOX2의 유전자 발현률이 높게 나타났다. 세포 유래물은 세포가 지닌 특이적 능력을 포함하므로, 본 실험을 통해 인간영양막세포의 유래물이 중간엽줄기세포보다 우수한 재생 능력을 나타낼 수 있음을 확인할 수 있다.

[0125] 두 번째로, 인간영양막세포와 중간엽줄기세포 채취 배양 시 모습과 세포 유래물 속 나노입자 분석 결과를 도 6

에 나타내었다. 두 줄기세포 모두 2.0×10^{10} 내지 2.5×10^{10} 입자/mL 농도와 직경 150nm 이하의 입자 크기를 갖는 것으로 확인되었으며, 서로 비슷한 분포도 양상을 보여 유래물 회수율의 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[0127] 실시예 3-2: FBS-free 조건에서 중간엽줄기세포 증식 평가

[0128] 골수유래(BM), 탯줄유래(UC) 및 지방유래(AD) 중간엽줄기세포의 배양 시 동물혈청인 FBS를 제외하고 인간영양막세포 배양액을 처리하여 중간엽줄기세포의 증식이 유지 또는 촉진되는지를 확인하였다. 중간엽줄기세포를 동일 세포수로 처리 후 부착시킬 때 FBS를 제외하고 인간영양막세포 배양액(TSC-CM) 또는 중간엽줄기세포 배양액(MSC-CM)을 각각 20%, 40% 및 60%(v/v)로 처리하고 24시간, 48시간 후에 CCK8으로 정량분석 평가하여 도 7에 나타내었다. FBS가 처리되지 않은 그룹(serum free medium, SFM)과 비교하여 인간영양막세포 배양액이 처리된 군은 배양액 처리량이 증가할수록 중간엽줄기세포의 증식 유지 및 촉진능력이 향상되었다(TSC-CM은 적색 *로 통계적 유의성을 표시함). 중간엽줄기세포 배양액 처리군도 FBS 없이 중간엽줄기세포 자신의 증식 유지 및 촉진 효능이 나타났다(MSC-CM은 흑색 *로 통계적 유의성을 표시함). 하지만, 인간영양막세포 배양액 처리 군에서는 40% 이하의 적은 양의 배양액 처리 시에도 증식 촉진 효능이 나타나는 것으로 확인되었다.

[0130] 실시예 3-3: 노화세포에서의 항노화 효능 확인

[0131] 계대수 9 이상의 노화된 골수유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 중간엽줄기세포 배양액(MSC-CM), 인간영양막세포 배양액(TSC-CM) 및 인간영양막세포 유래물(엑소좀)(TSC-Exos)의 항노화 효능을 확인하였다. 모두 30%로 처리되었으며, 세포노화의 지표인 SA- β -GAL(Senescence-associated beta-galactosidase) 염색법을 적용하여 항노화 효능을 검증하였고 그 결과를 도 8에 나타내었다. 인간영양막세포 배양액과 유래물 처리 군에서 유의적으로 염색 세포의 수가 감소함을 확인하였다. 또한, 동일한 조건에서 FBS 처리된 군(GM), FBS 처리되지 않은 SFM(serum free media)군 및 MSC-CM 처리군과 인간영양막세포 배양액 처리군을 비교실험하여 결과를 도 9에 나타내었다. 인간영양막세포 배양액(TB-CM) 처리군에서 FBS 처리군과 비슷한 세포수가 유지됨 및 항노화 효능이 나타남을 확인할 수 있었고, 특히 중간엽 줄기세포 배양액(MSC-CM) 처리군과 비교하면 2배 이상의 항노화 효능이 확인되었다.

[0133] 실시예 3-4: 피부상처 치유 촉진 효능

[0134] 중간엽줄기세포 배양액(MSC-CM)과 인간영양막세포 배양액(TSC-CM)의 상처치유 촉진 효능을 비교 분석하기 위해 면역결핍마우스 피부에 지름 10mm의 동일한 원형의 상처를 유도한 후 5×10^5 cell의 중간엽줄기세포를 100 μ L PBS에 섞어서 도입하였다. 그리고, 상처부위에 3일마다 100 μ L의 중간엽줄기세포 및 인간영양막세포 배양액을 처리하여 15일 동안 관찰하여 이를 도 10에 나타내었다. 5일 이후부터 중간엽줄기세포 배양액보다 우수한 상처치유능력을 확인할 수 있었으며, 15일에 인간영양막세포 배양액 처리군에서 상처가 모두 치유된 것을 확인하였다. 중간엽줄기세포 배양액 처리군도 상처치유 효능을 보였으나 인간영양막세포 배양액 처리군보다 우수하지는 않았다. 상처치유 효능을 H&E 염색법과 MT 염색법을 통해 조직학적 분석으로 확인하여 도 11에 나타내었으며, 인간영양막세포 배양액 처리군에서 피부 상피세포층과 진피층의 두께가 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 원발명의 인간영양막세포 배양액은 상처치유 촉진효능 및 피부재생 촉진효능을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0136] 실시예 4: 인간영양막세포 배양액의 골재생 촉진효능 평가

[0137] 실시예 4-1: ALP 활성화도 평가

[0138] 인간중간엽줄기세포의 골분화 초기단계에서 ALP활성화도를 측정하였다. ALP 활성화도는 중간엽줄기세포의 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에 인간영양막세포 배양액(TB-CM) 10%, 20%, 30% 및 40%(v/v)를 각각 처리한 후 3일차 및 7일차에 ALP활성도를 평가하였다. 차가운 PBS버퍼로 2회 세척한 다음, 0.1% 트리톤(Triton) X-10이 첨가된 세포막 분해 용액(cell lysis buffer)로 용해(lysis) 시켰다. 용해된 세포를 섭씨 4도, 13000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 브래드포트법으로 정량하고, 동량의 단백질을 ALP kit(아나스펙, Inc, Ferment, Canada)로 제조사의 지침에 따라 405 nm에서 ALP 활성도를 측정하였으며, 그 결과를 도 12의 좌측에 나타내었다. 인간영양막세포 배양액 처리군에서는 처리하지 않은 경우에 비하여 최대 1.5배

까지 ALP 활성도가 증가된 것으로 확인되었다. 인간영양막세포 유래물 (TB EV, protocol 1 EV)의 골재생 촉진 효능 평가는 ALP 활성도로 분석되었으며 이에 대한 결과는 도 1에 나타낸 바와 같다.

[0140] 실시예 4-2: 칼슘 침착도 평가

[0141] 골 형성 후기 단계에 나타나는 칼슘 침착은 후기 골 형성 지표로 사용되어 이에 대한 실험을 실시하였다. 동일 실험에서 골분화 14일째 세포에 침착된 칼슘을 정량적으로 분석하였으며(DICA-500, Bioassay System) 이를 도 12의 우측에 나타내었다. 칼슘침착도는 인간영양막세포 배양액 처리군이 처리되지 않은 군과 비교하여 3배가량 증가한 것으로 분석되었다.

[0143] 실시예 4-3: 알리자린 레드 에스 염색 평가

[0144] 알리자린 레드 에스(Alizarin Red S) 염색 평가는 조골세포의 분화 중 중후반 지표로 널리 사용되어 이에 관한 실험을 진행하였다. 인간영양막세포 배양액의 미네랄 침착 촉진 효능을 평가하기 위해서 골형성 유도 배지 (osteogenesis induction medium, OIM)에서 중간엽줄기세포를 분화시킬 때 인간영양막세포 배양액 10%, 20% 및 30%(v/v)를 각각 처리하고, 처리하지 않은 대조군과 함께 미네랄의 함량을 분화 14일 후에 측정하였다. 미네랄의 함량은 Alizarin Red S 염색액 (Millipore)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다. 이를 통해서 인간영양막세포 배양액을 처리한 군이 처리하지 않은 군과 비교하여 미네랄 침착 유도 효과가 높음을 확인할 수 있었다(* $P < 0.05$).

[0146] 실시예 4-4: 골재생 관련 전사인자 유전자 발현정도 평가

[0147] 골재생 관련 중요 전사인자 유전자인 초기의 IBSP 및 ALP, 중기의 RUNX2 및 Osterix 그리고 후기의 OCN 및 OPN 유전자의 발현을 측정하였다. 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 골분화 유도 시 0%, 10%, 20%, 30% 및 40%로 각각 처리 후 PCR을 통하여 확인하였으며 그 결과를 도 14에 나타내었다. TB-CM 처리량이 증가할수록 해당 유전자 발현이 모두 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 인간영양막세포 배양액이 중간엽줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있음을 확인하였다.

[0149] 실시예 4-5: RNA 시퀀싱 분석

[0150] 인간영양막세포 배양액이 중간엽줄기세포의 골분화 촉진 효능을 가짐은 상기 실시예 4-1 내지 4-3에서 확인한 바와 같다. 이의 기전을 확인하기 위해 RNA 시퀀싱 분석을 실시하였다. 중간엽줄기세포를 골형성유도배지(OIM)에서 배양하여 골분화 유도 시, 인간영양막세포 배양액을 20% 처리하여 7일간 골분화 유도배양하고 RNA 시퀀싱 분석하여 그 결과를 도 15에 나타내었다. 분석 결과 인간영양막세포 배양액 처리에 따라 세포 내 골재생 촉진과 관련된 사이토카인 및 케모카인 반응, 염증, 성장인자 활성화 관련 세포 반응이 분석되었으며 골재생에 직접적 영향을 주는 BMP 바인딩(BMP binding)도 확인되었다.

[0152] 실시예 4-6: 신호전달계 분석

[0153] 인간영양막세포 배양액 처리에 따른 세포신호전달계 분석결과를 도 16에 나타내었으며, 사이토카인 연계 신호전달계와 MAPK 신호전달계가 유의적으로 증가되는 것으로 확인되었다. 인간영양막세포 배양액에 의한 중간엽줄기세포 골분화 촉진 시 MAPK 신호전달계가 증가됨을 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인하여 이를 도 17에 나타내었다. 또한, BMP2의 발현은 증가하고 BMP2 신호전달계 저해인자(antagonist)인 GREM1의 발현은 감소됨을 PCR로 확인하여 도 18에 나타내었다. 따라서, 인간영양막세포 배양액 처리에 따라 BMP2 바인딩이 증가하여 골재생을 촉진하는 기능이 있음을 확인하였다.

[0154] 또한, 골분화 유도배지(OIM)에서 인간영양막세포 배양액 처리 여부에 따라 CXCL1, CXCL3, CXCL6, CXCL8, CCL7, CCL11, CCL13, IL-6, MMP-1, MMP-3, MMP-8 및 MMP-13 유전자의 발현율의 변화를 PCR로 확인하여 도 19에 나타내었다. 대조군과 비교하여 사이토카인 연계 신호전달계 활성이 증가하여 중간엽 줄기세포의 골분화를 촉진함을 확인할 수 있었다.

- [0156] 실시예 4-7: 지방분화 억제 효능
- [0157] 중간엽줄기세포는 지방세포와 골세포로 모두 분화가 가능하며, 지방분화가 증가하는 경우 골세포량이 줄어 골다공증 등 골재생 관련 질환에 노출된다. 따라서, 지방분화 억제 효능은 골분화 촉진 효능과 밀접한 관련이 있으며, 이를 검증하고자 하기와 같이 실험하였다.
- [0158] 5×10^4 입자/mL의 중간엽줄기세포를 24 웰 플레이트(well plate)에 도입 후 90%이상 세포밀도(confluency)일 때 지방유도 배양액 (adipogenesis induced medium, AIM)을 처리하여 14일동안 배양하였다. 이 때 인간영양막세포 배양액(TB-CM)을 10%, 20% 및 50%(v/v)로 처리하여 2~3일에 한 번씩 배양액을 교체하여 주었다. 14일 후 Oil red O 염색법으로 중간엽줄기세포의 지방분화도를 측정하였으며 지방재생 관련 유전자인 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin) 및 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(PPAR- γ)의 상대적 발현정도를 측정하여도 20에 나타내었다. 붉은색 염색이 많이 나타날수록 지방 분화가 증가된 것으로 평가되며, 인간영양막세포 배양액 처리군에서 유의적으로 지방분화 감소가 관찰되었다. 또한 지방재생 관련 유전자인 아디포넥틴, 렙틴 및 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마의 상대적 발현량이 인간영양막세포 배양액 처리 농도 증가에 따라 현저히 감소함을 확인할 수 있었다.
- [0159] 따라서, 본원발명의 인간영양막세포 배양액이 지방분화 유도된 중간엽줄기세포의 분화 및 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.
- [0161] 실시예 5: 인간영양막세포 유래물(엑소솜)의 골재생 촉진효능 평가
- [0162] 실시예 5-1: ALP활성도 및 칼슘침착도 측정
- [0163] 본 실시예에서의 인간영양막세포 유래물(엑소솜, TSC-EV)은 상기 실시예 1-1에 따라 제조되었다. 골분화 유도배지에서 골분화를 유도할 때, 인간영양막세포 유래물(엑소솜)을 1×10^8 및 1×10^9 입자/mL로 처리한 후 평가하였다. ALP활성도는 3일 및 7일에서 측정되었고, 칼슘침착도는 14일에서 측정되었으며 그 결과를 도 21에 나타내었다. 인간영양막세포 유래물(엑소솜)을 처리한 군에서 ALP 활성도는 농도에 따라 1.3배 내지 2배가 증가하였으며, 칼슘침착도는 3배 증가한 것으로 분석되어 골재생효능이 있음을 확인하였다.
- [0164] 인간영양막세포 유래물(TSC-EV)과 인간영양막세포 배양액(TSC-CM)을 함께 처리하는 경우의 ALP 활성도를 단독 처리하는 경우와 비교하여 도 22에 나타내었다. 상기 유래물과 상기 배양액을 함께 처리하는 경우, 단독으로 처리하는 경우보다 ALP 활성도가 3일차 및 7일차에서 모두 유의적으로 증가하였다.
- [0166] 실시예 5-2: 알리자린 레드 에스 염색 평가
- [0167] 알리자린 레드 에스(Alizarin Red S) 염색 평가로 인간영양막세포 유래물(엑소솜, TSC-EV)의 미네랄 침착 촉진 효능을 평가하였다. 골형성 유도배지에서 인간영양막세포 유래물을 각각 1×10^8 및 1×10^9 입자/mL로 처리 후 결과를 도 23에 나타내었다. 분화 14일차에서 인간영양막세포 유래물을 처리한 군이 대조군에 비해 미네랄 침착도가 높음을 확인할 수 있었다.
- [0169] 실시예 5-3: 골재생 관련 전사인자 유전자 발현정도 평가
- [0170] 골재생 관련 중요 전사인자 유전자인 초기의 IBSP 및 ALP, 중기의 RUNX2 및 Osterix 그리고 후기의 OCN 및 OPN 유전자의 발현을 측정하였다. 인간영양막세포 유래물을 중간엽줄기세포 골분화 유도 시 1×10^8 및 1×10^9 입자/mL로 각각 처리 후 PCR을 통하여 확인하였으며 그 결과를 도 24에 나타내었다. 인간영양막세포 유래물의 처리량이 증가할수록 해당 유전자 발현이 모두 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 인간영양막세포 유래물(엑소솜)이 중간엽줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0172] 실시예 5-4: 동물실험

[0173] 인간영양막세포 유래물의 골재생 효능을 검증하기 위해 전임상 실험(동물실험)을 진행하였다. 랫트의 두개골에 직경 6mm의 원형으로 골결손을 유도하였다. 결손부위를 그대로 둔 경우, 지지체만 처리한 경우, 지지체 처리에 더하여 체외에서 5일간 골분화 유도된 중간엽줄기세포(5×10^5 세포)를 처리한 경우, 상기 중간엽 줄기세포에 인간 영양막세포 유래물을 1×10^9 입자/mL 농도로 처리한 경우 및 상기 중간엽 줄기세포에 BMP2를 500ng/mL로 처리한 경우에 대하여 평가하였다. 8주 후 조직을 적출하여 골재생 정도를 microCT로 확인하여 그 결과를 도 25에 나타내었다. microCT 결과 인간영양막세포 유래물 (TSC-EV) 처리군에서 유의적으로 골결손 부위가 채워져 골형성을 촉진함을 확인하였으며, 결손부위의 직경 및 면적 모두 MSC만 처리한 군 및 MSC+BMP2 처리군 보다 유의하게 감소함을 확인하였다.

[0174] 같은 실험에서, H&E(hematoxylin & eosin)와 MT(Masson's trichrome)염색방법을 이용하여 조직학적 분석을 하였다. 대조군과 실험군은 상기 microCT 실시예에서와 같으며 결과를 도 26에 나타내었다. 중간엽줄기세포에 인간영양막세포 유래물을 처리한 군(MSC+TSC-EV)에서 다른 대조군에 비해 유의하게 골결손 부위(defect region) 내 새로운 골형성을 촉진함을 확인할 수 있었다.

[0175] 또한 같은 실험에서, 새로이 골형성이 이루어지는 부위에서의 골재생 마커 인자인 OCN(osteocalcin) 발현을 해당 항체를 이용하여 형광분석법으로 평가하였다. 대조군과 실험군은 상기 microCT에서와 같으며 결과를 도 27에 나타내었다. 인간영양막세포 유래물 처리군 (MSC+TSC-EV)에서 유의적으로 높게 OCN이 발현됨을 형광 현미경 사진 및 형광 세기를 통해 확인할 수 있었고, 이는 인간영양막세포 유래물이 골결손 부위에서 새로운 골형성을 촉진하는 효과를 가짐을 뒷받침한다.

[0177] 실시예 5-5: miRNA 분석

[0178] 상기 실시예 5-1 내지 5-4에서 확인한 바와 같이, 인간영양막세포 유래물(엑소솜)은 우수한 골재생효과를 보여주었다. 인간영양막세포 엑소솜의 재생 효능 기전을 분석하기 위해 엑소솜 내의 miRNA를 분석하고, 현재 엑소솜 바이오시장에서 사용 중인 중간엽줄기세포 엑소솜과 비교분석하여 그 결과를 도 28 및 표 1에 나타내었다.

표 1

[0179]

	TSC-Exos			MSC-Exos		
	Gene name	Read counts	Total read counts	Gene name	Read counts	Total read counts
1	has-miR-1246	358225	71.61	has-let-7b-5p	7320	30.05
2	has-miR-1290	89371	17.87	has-miR-126-5p	3720	15.27
3	has-let-7b-5p	32281	6.45	has-miR-23a-3p	3134	12.87
4	has-miR-423-5p	8068	1.61	has-miR-23b-3p	1215	4.99
5	has-miR-335-5p	2823	0.56	has-miR-25-3p	767	3.15
6	has-let-7e-5p	1931	0.39	has-miR-4301	671	2.75
7	has-miR-574-5p	1206	0.24	has-miR-21-5p	612	2.75
8	has-miR-122-5p	781	0.16	has-let-7e-5p	543	2.23
9	has-let-7g-5p	780	0.16	has-miR-1246	521	2.14
10	has-let-7d-5p	721	0.14	has-let-7d-3p	416	1.71
11	has-miR-877-5p	620	0.12	has-miR-574-5p	414	1.70
12	has-miR-23a-3p	615	0.12	has-miR-150-5p	385	1.58
13	has-let-7i-5p	413	0.08	has-miR-92a-3p	347	1.42
14	has-miR-193b-5p	337	0.07	has-miR-423-5p	245	1.01
15	has-miR-98-5p	303	0.06	has-miR-486-5p	230	0.94
합계		500,223			24,359	

[0180] 분석 결과 인간영양막세포 엑소솜 (TSC-Exos)에서는 전체 RNA 조성 중 세포 내 전사 유전자 조절을 할 수 있는 snRNA(small nuclear RNA, miRNA를 포함함)가 70% 이상을 차지하였고, 반면 중간엽줄기세포 엑소솜(MSC-Exos) 속에는 단백질 번역 기능의 rRNA(ribosomal RNA)가 77% 분포되어 있었다. 또한, total reads counts의 비는 500,223/24,359로 약 20.54를 나타내었으며, 인간영양막세포 엑소솜의 총 miRNA 수가 중간엽줄기세포 엑소솜 보다 약 20배 많이 분포된 것으로 확인되었다. 또한 miRNA 분포 양상도 두 세포에서 다르게 나타났다. 상기 표 1

의 인간영양막세포 엑소솜에서는 has-miR-1246, has-miR-1290, has-miR-423-5p 및 has-let-7b-5p가 98%를 차지하고 있었으며, 중간엽줄기세포 엑소솜에서의 miRNA 구성과 차이를 보였다.

[0181] 중간엽줄기세포 엑소솜 속 miRNA와 비교하여 인간영양막세포 엑소솜에서 100 fold 이상 높게 발현되는 miRNA는 23개로 나타났으며 이들의 표적 유전자들을 도 29에 나타내었고, 이를 기반으로 세포 내 영향을 주는 신호전달계를 ClueGO bioinformatic tool을 이용하여 분석하여 이를 도 30에 나타내었다. 골재생과 관련된 병소 유착(Focal adhesion), AMPK 및 MAPK 신호전달계가 유의적으로 분석되었고, 인간영양막세포 엑소솜 속의 miRNA가 골재생 효능에 영향을 미칠 수 있음을 보여준다.

[0182] 다음으로, 인간영양막세포 엑소솜의 98% 이상을 점유하고 있는 상위 1%의 4개 miRNA(has-miR-1246, has-miR-1290, has-miR-423-5p 및 has-let-7b-5p)의 표적 유전자들을 기반으로 DAVID bioinformatic tool을 이용하여 세포 내에서 변화 가능한 생물학적 과정(biological processes)과 신호전달계를 분석하여 도 31에 나타내었다. 그 중 재생에 관련된 세포 증식(cell proliferation), 신경계 발달(nerve system development), 상처치유(wound healing), 그리고 줄기세포 조절(regulation of stem cell)등이 분석되었다. 이 결과는 string과 ClueGO bioinformatic tool에 의해서도 동일하게 분석되었으며 이를 도 32에 나타내었다. 통합적으로 인간영양막세포와 중간엽줄기세포 엑소솜 속 miRNA에 의해 조절 가능한 세포 기능들 및 두 세포 유래 엑소솜의 miRNA에 의해 동일하게 조절 가능한 세포기능을 모식화 하여 도 33에 표시하였다.

[0184] 실시예 6: 산모 태반으로부터 분리된 인간영양막세포 배양액의 효능 검증

[0185] 상시 실시예 1 내지 5에서는 ATCC사에서 구입한 인간영양막세포를 이용하였다. 인간 산모 태반으로부터 얻은 영양막세포에 대해서도 동일한 재생효능이 나타나는지를 검증하기 위해 다음과 같이 실험하였다. 이하에서 ATCC사에서 구입한 인간영양막세포와 구분하기 위하여 산모 태반으로부터 분리된 인간영양막세포를 일차(primary) 인간영양막세포로 지칭한다.

[0187] 실시예 6-1: 일차 인간영양막세포의 분리

[0188] 분만한 산모의 태반으로부터 일차(primary) 인간영양막세포를 분리하여 15일간 체외 배양하였으며, 매일 배양액을 수거하여 중간엽줄기세포의 증식과 골재생 효능을 확인하고자 하였다. 세포 분리과정은 선행연구(B. Simon, M. Bucher, A. Maloyan, A Primary Human Trophoblast Model to Study the Effect of Inflammation Associated with Maternal Obesity on Regulation of Autophagy in the Placenta. J Vis Exp,(2017))의 방법을 따랐으며, 이는 다음과 같다. 분만 후 30분안에 가로 및 세로 2 내지 3 cm로 태반 조직을 자른 후 유리판으로 밀어 융모조직(villous tissue) 주변 혈관을 제거한 후 PBS로 세척하였다. 가위로 조직을 보다 세밀히 자른 후 DNase와 트립신(trypsin)을 이용한 다이제스션(digestion)과정을 3번 진행하여 부유층을 수거하였다. 수거한 부유층은 FBS와 함께 원심분리를 실시하고 적혈구층과 FBS층 사이 흰색의 영양막(trophoblast)세포 층을 확인하고 수집하였다. 수집된 영양막 세포들은 밀도 차등(density gradient) 원심분리법으로 다시 한번 분리과정을 거쳐 최종 영양막 세포를 태반조직으로부터 분리해냈다. 상기 분리과정은 도 34에 나타내었다. 본 분리과정에서 융모 조직 100g당 3.5×10^7 세포의 일차 영양막세포를 얻을 수 있었다. 분리된 세포는 IMDM 배양액에 10%(v/v)FBS, 1%(v/v)페니실린/스트렙토마이신 항생제를 포함하는 배양액에서 체외배양을 진행하였으며, 현미경 사진 및 나노입자 분석결과를 도 35에 나타내었다. 배양 4일을 전후로 나노입자의 농도가 감소하고 입자의 크기가 커지는 것으로 확인되었다. 일차 인간영양막세포는 증식과 계대를 하지 않는 특징을 가졌으며, 도 36 좌측의 현미경사진에서 확인할 수 있듯이 체외배양 72시간 후에는 다핵세포(multinucleated cells)의 모습을 보였다. 또한, 도 36의 우측에서 특이적 마커 단백질인 시토크라틴 7(cytokeratin 7)을 발현함을 확인하여, 본 세포가 일차 인간영양막세포임을 확인하였다.

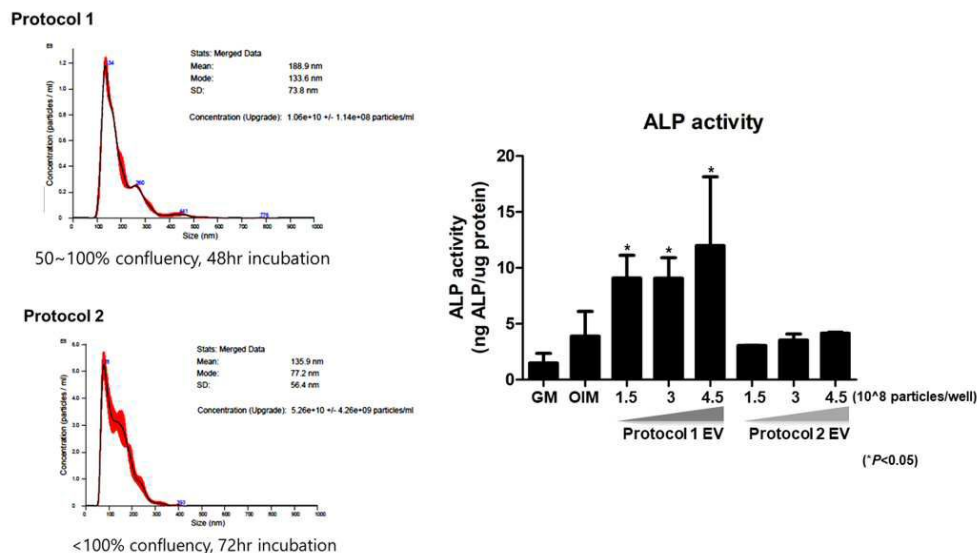
[0190] 실시예 6-2: 일차 인간영양막세포 배양액의 중간엽줄기세포 증식 촉진 효능 확인

[0191] 일차 인간영양막세포 배양액(PTB-CM)을 중간엽줄기세포 배양 시 각각 0%, 15%, 30% 및 60%(v/v)로 처리하고 24일간 배양하여 현미경 사진 및 세포 수를 도 37에 나타내었다. 일차 인간영양막세포 배양액의 처리 농도가 증가함에 따라 세포 증식이 촉진됨을 확인하여 일차 인간영양막세포 배양액의 중간엽줄기세포 증식 효능을 확인하였다.

- [0192] 또한, 산모태반으로부터 얻은 일차 인간영양막세포 배양액(PTB-CM)을 중간엽줄기세포 배양액(MSC-CM) 및 실시예 1 내지 4의 인간영양막세포 배양액(TSC-CM)과 중간엽줄기세포 증식효능을 비교실험하여 그 결과를 도 38에 나타내었다. 산모태반에서 얻어진 일차 인간영양막세포 배양액(PTB-CM)은 인간영양막세포 배양액(TSC-CM)보다는 낮으나, 중간엽줄기세포 배양액(MSC-CM)보다 우수한 세포 증식 효능을 보였다.
- [0193] FBS 없이 일차 인간영양막세포 배양액(PTB-CM)만을 처리하는 경우에도 중간엽줄기세포의 증식 촉진 효능이 나타나는지 확인하였다. FBS를 처리하지 않은 군과 5% FBS를 처리한 군, FBS 없이 1 내지 7일에 수거된 일차 인간영양막세포 배양액을 처리한 군(Early PTB-CM) 및 FBS 없이 8 내지 14일에 수거된 일차 인간영양막세포 배양액을 처리한 군(Late PTB-CM)을 비교실험하였으며 그 결과를 도 39에 나타내었다. PTB-CM이 처리된 군들은 각각 20%, 40% 및 60%(v/v)로 처리되었다. 일차 인간영양막세포 배양액이 FBS 부존재 하에서도 중간엽줄기세포 증식을 촉진할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 특히 초기에 수거된 PTB-CM(Early PTB-CM)의 60% 처리군에서는 FBS 미처리 군에 비해 2배 이상의 증식 촉진 효능이 확인되었다. 전체적으로 1 내지 7일에 수거된 초기 배양액(Early PTB-CM) 처리군에서 8 내지 14일에 수거된 후기 배양액(Late PTB-CM) 처리군보다 증식 효능이 높게 나타났다.
- [0195] 실시예 6-3: 일차 인간영양막세포 배양액의 골재생 효능 확인
- [0196] 일차 인간영양막세포 배양액의 골재생 효능을 ALP활성화, 칼슘침착도 및 RUNX2 유전자 발현 변화로 확인하였다.
- [0197] 조골세포에 골형성유도배지(OIM) 처리 시 일차 인간영양막세포 배양액(PTB-CM)을 10% 및 30%로 처리한 후 ALP 활성도, 칼슘침착도 및 RUNX2 발현량을 확인하여 도 40에 나타내었다. ALP 활성도 및 RUNX2 발현량은 7일차에 측정되었으며, 칼슘침착도는 14일차에 측정되었다. 일차 인간영양막세포 배양액 처리군에서 미처리군 및 대조군과 비교하여 ALP 활성도, 칼슘침착도 및 RUNX2 발현량이 유의하게 증가된 것으로 확인되어 일차 인간영양막세포 배양액도 골재생 촉진 효능을 가짐을 확인하였다.
- [0199] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0200] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

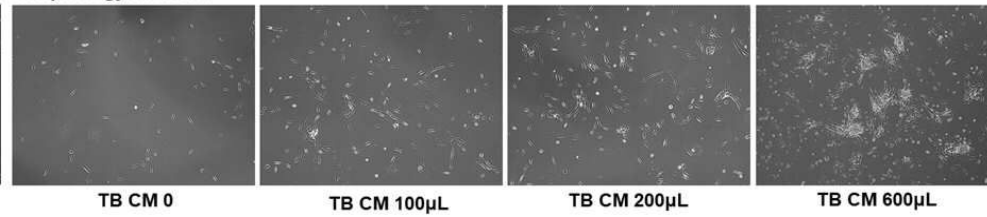
도면1



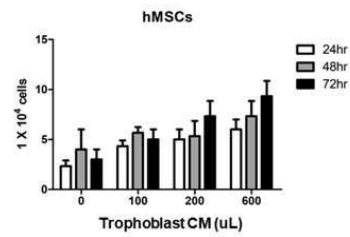
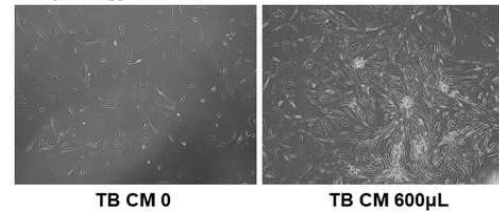
도면2

hMSC (2.5x10⁴ cells/6well)

Morphology after 24hr

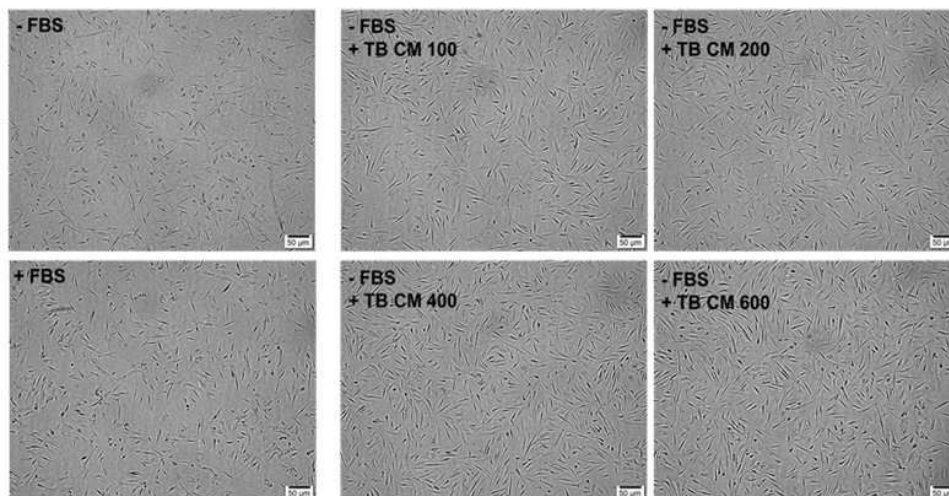


Morphology after 72hr



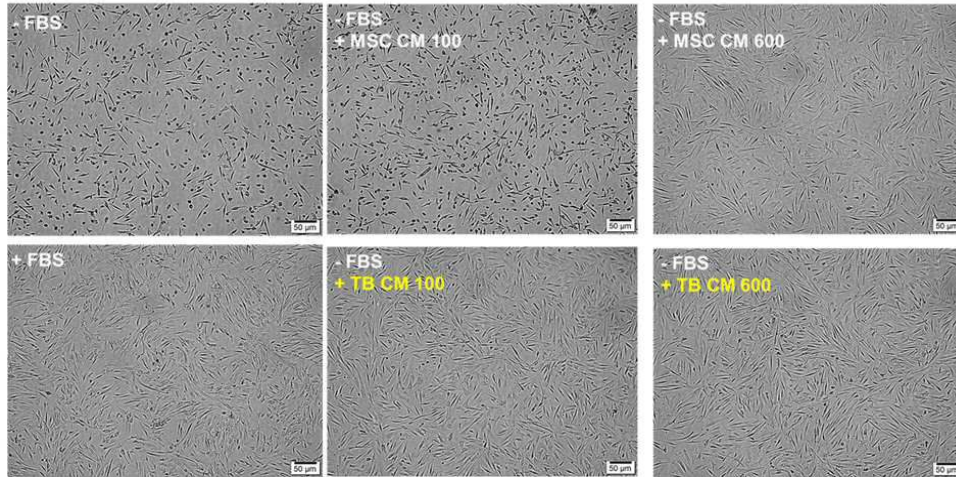
도면3

hMSC (2x10⁴ cells/12well) Morphology after 24hr

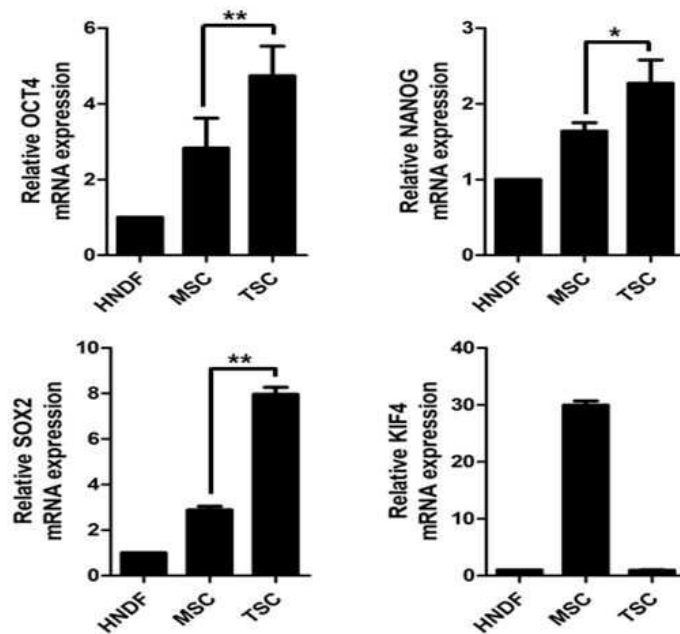


도면4

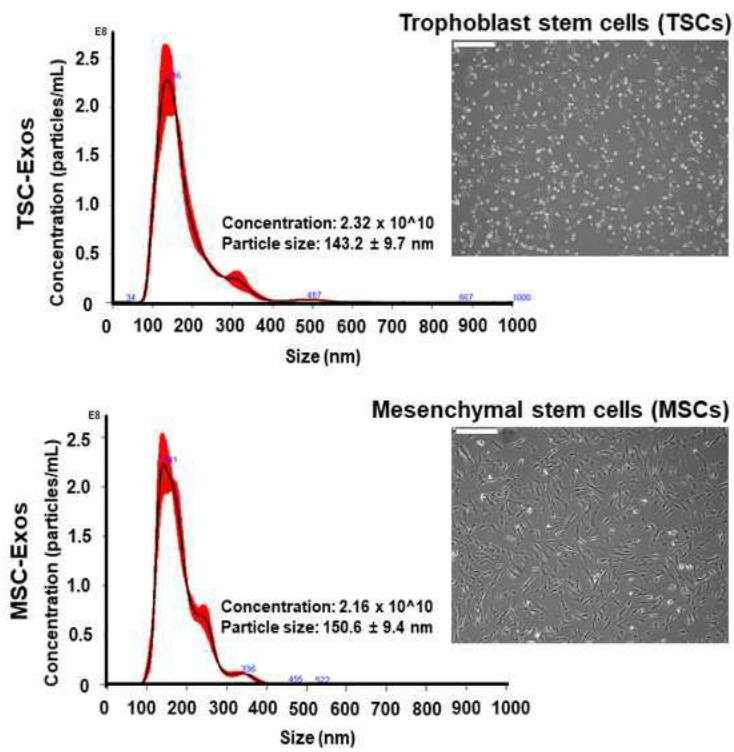
hMSC (4x10⁴ cells/12 well)



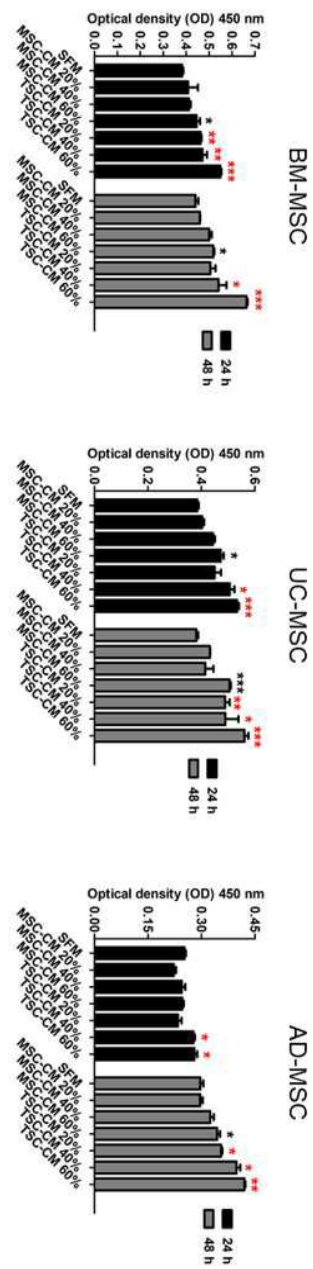
도면5



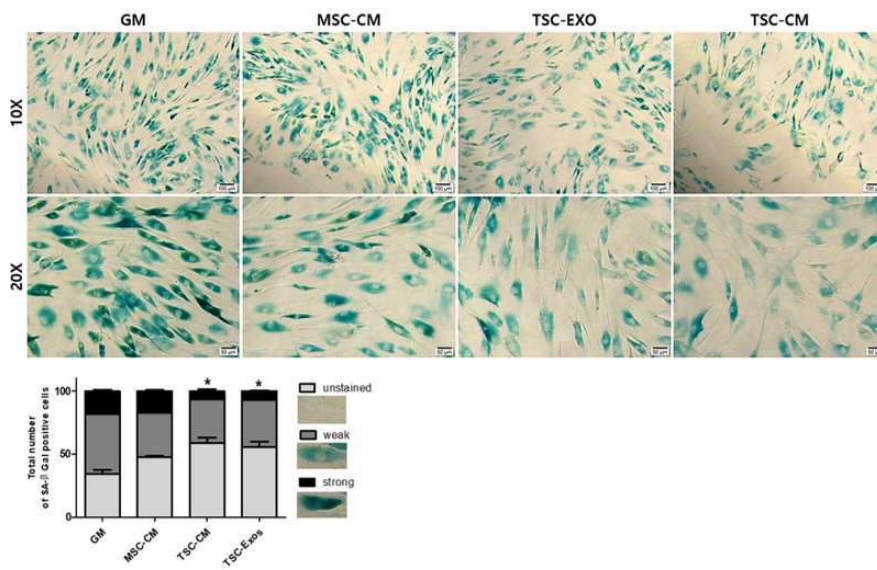
도면6



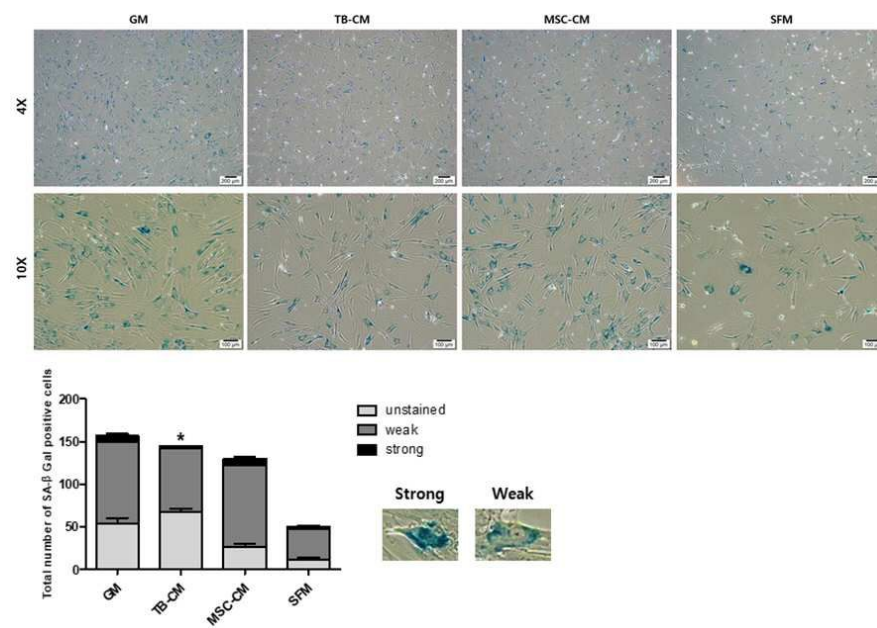
도면7



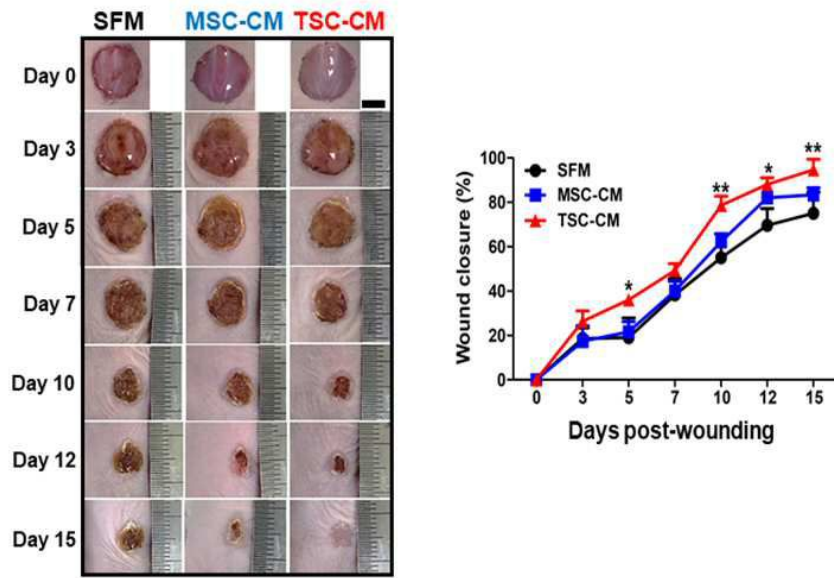
도면8



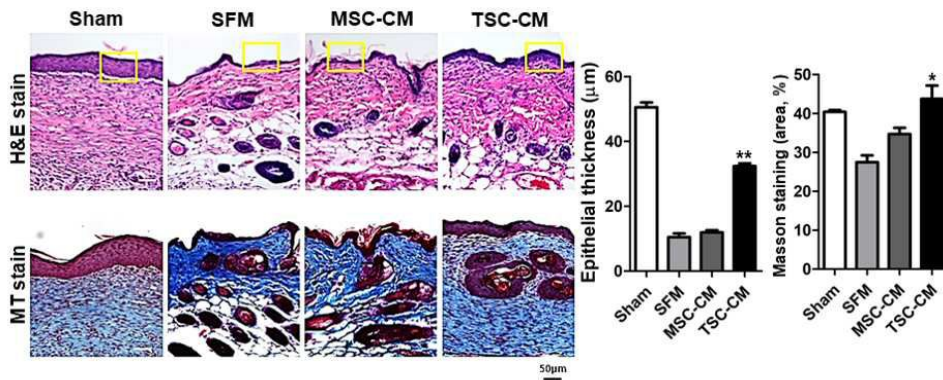
도면9



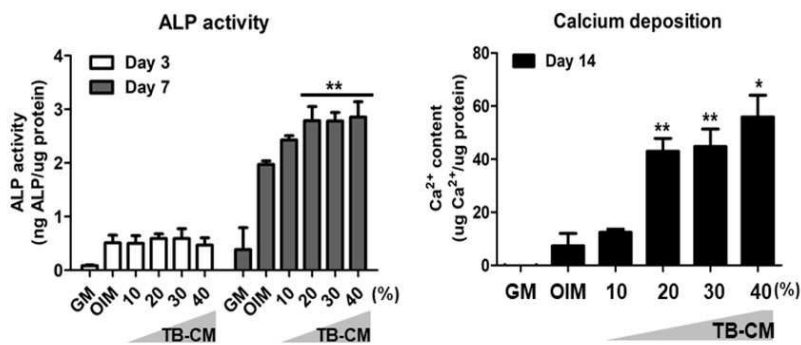
도면10



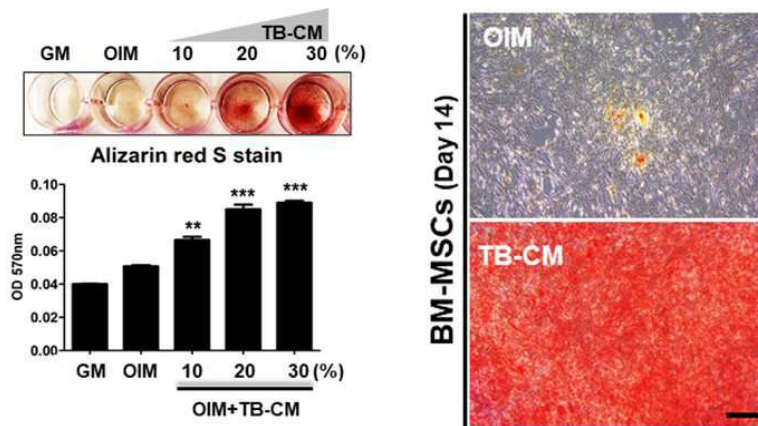
도면11



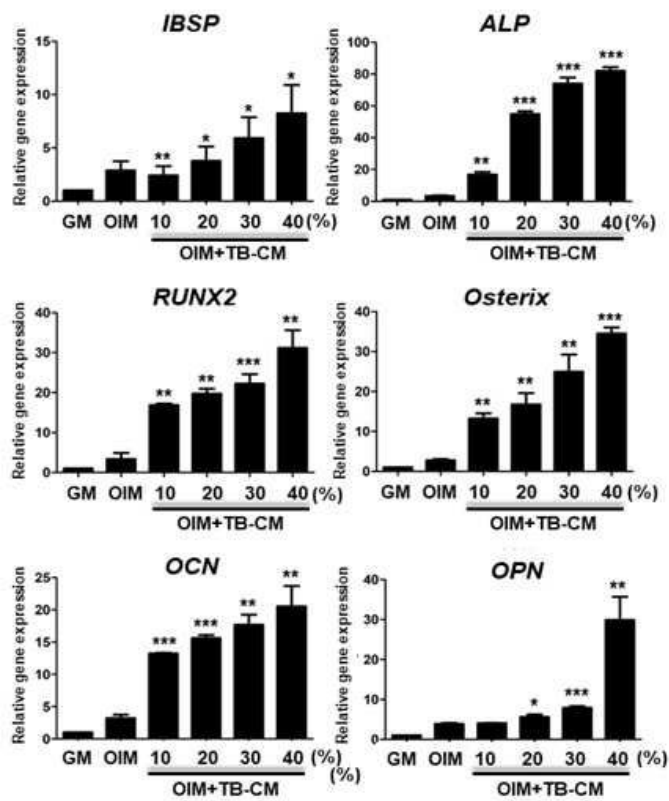
도면12



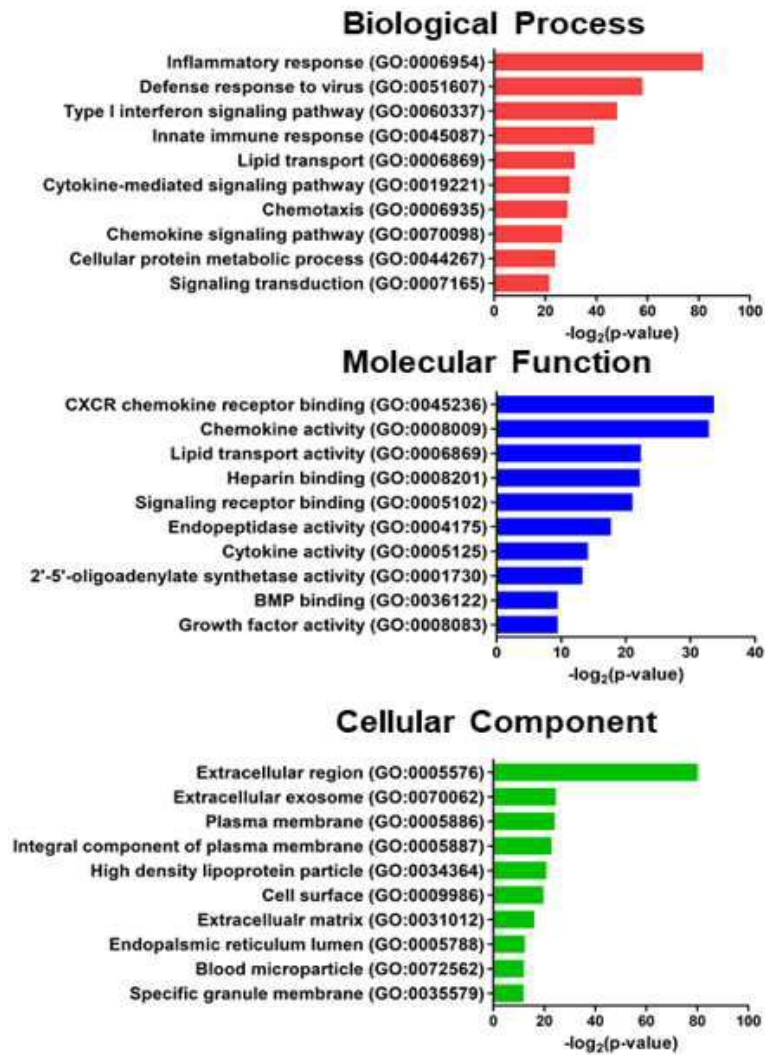
도면13



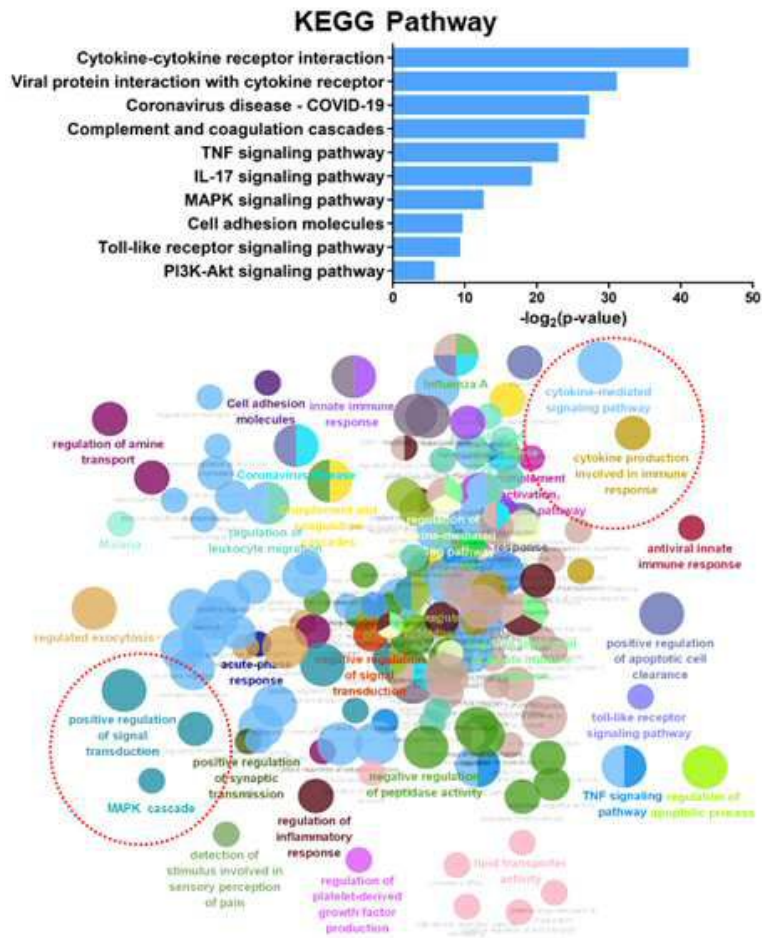
도면14



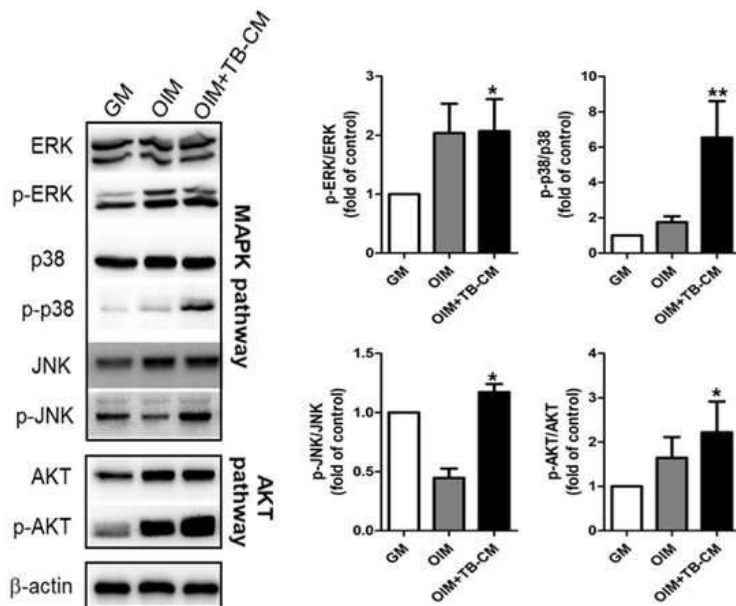
도면15



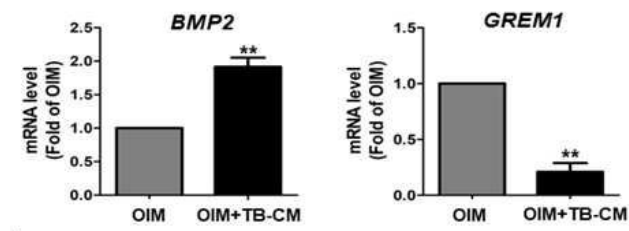
도면16



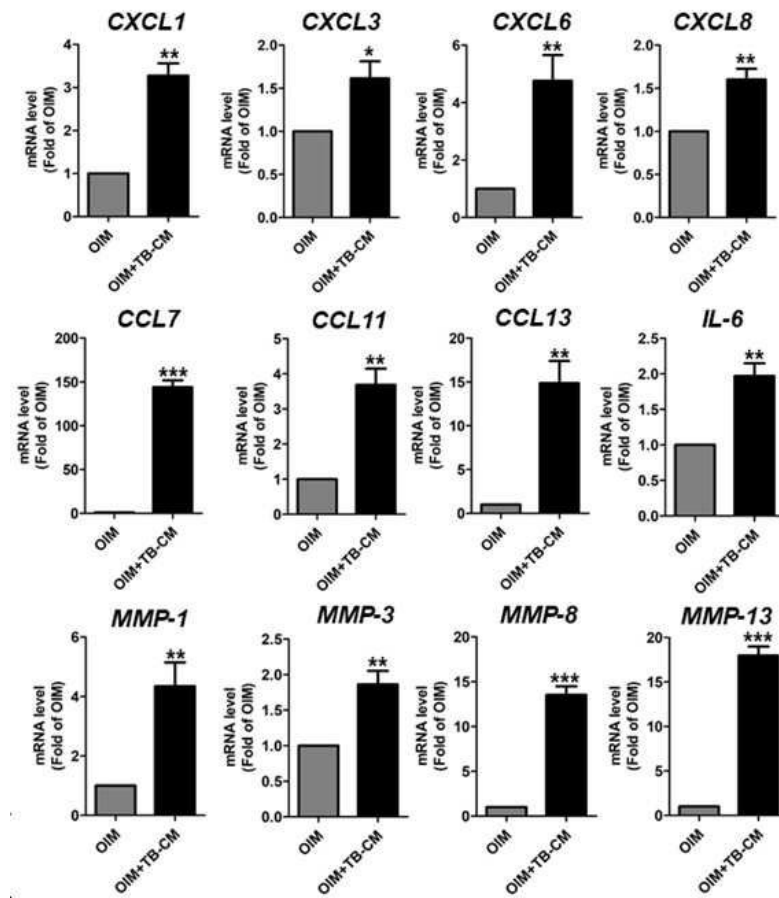
도면17



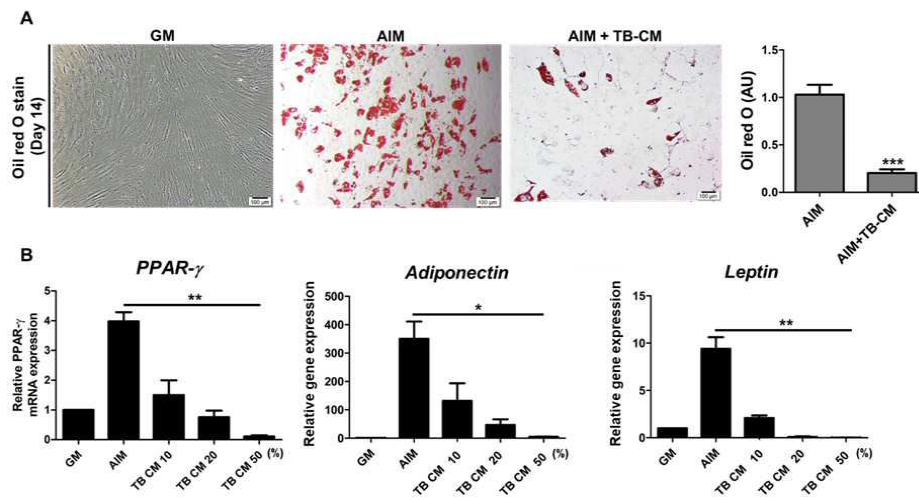
도면18



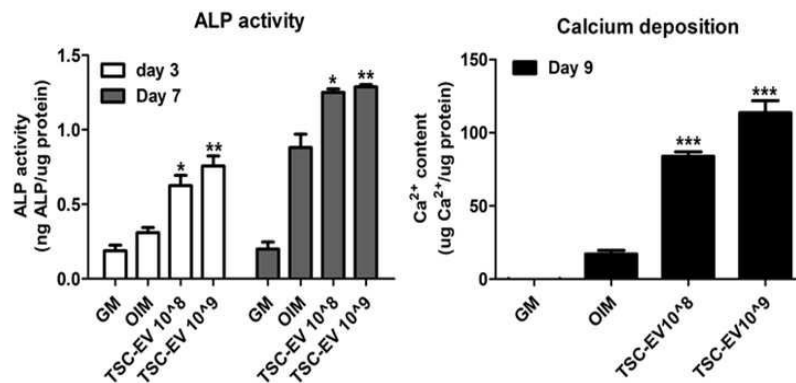
도면19



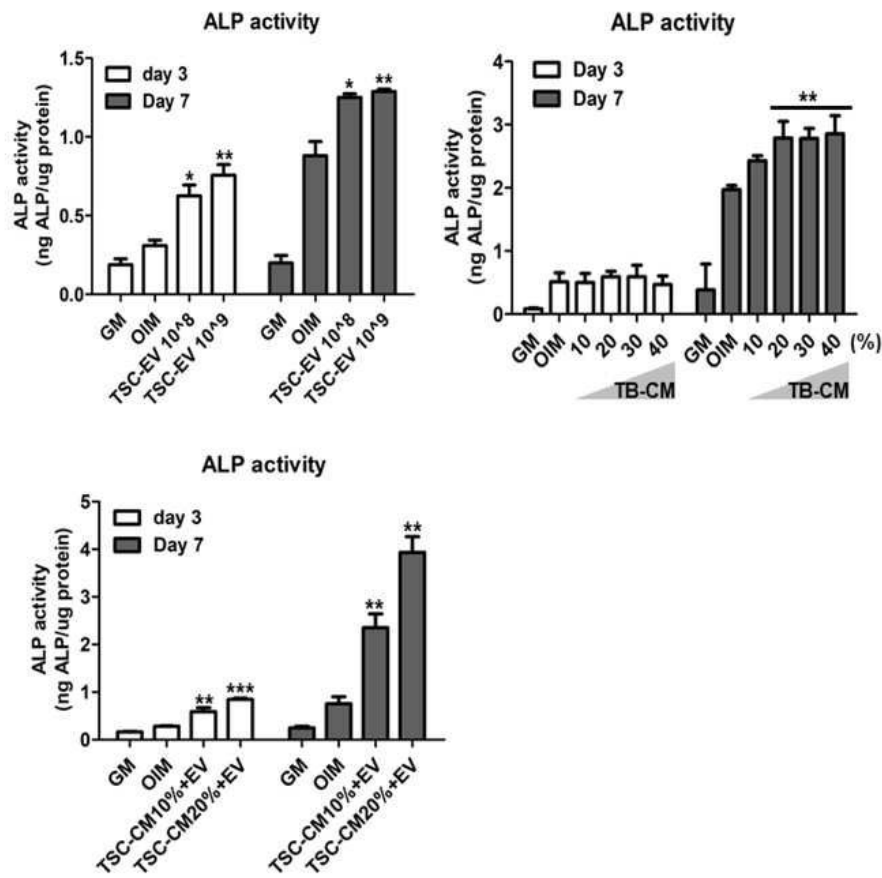
도면20



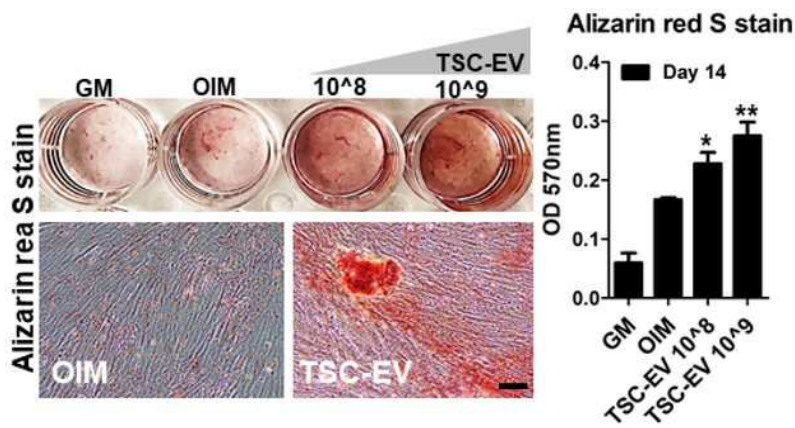
도면21



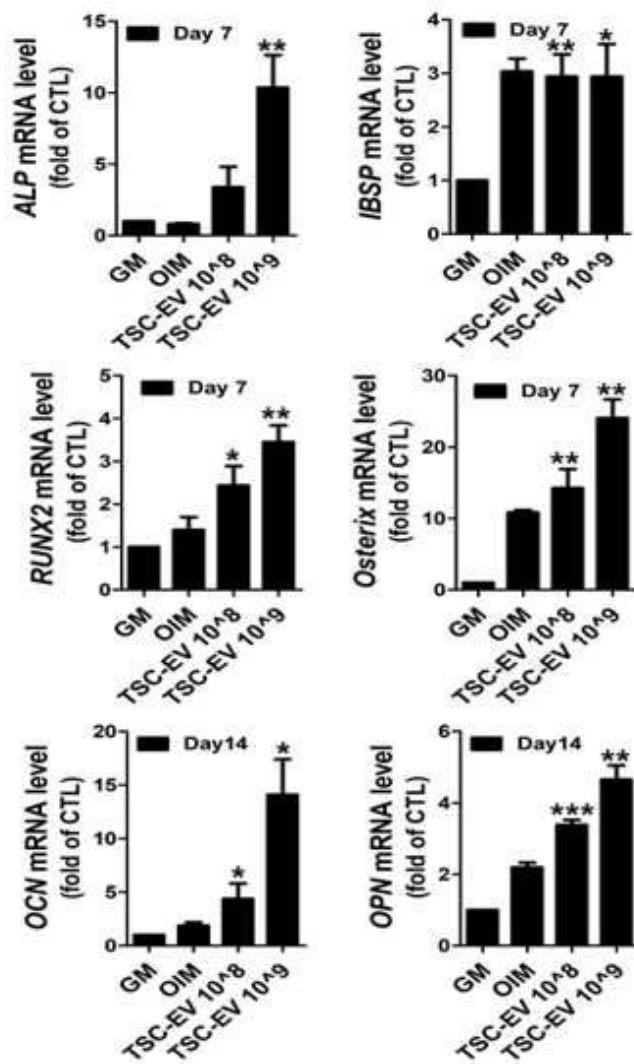
도면22



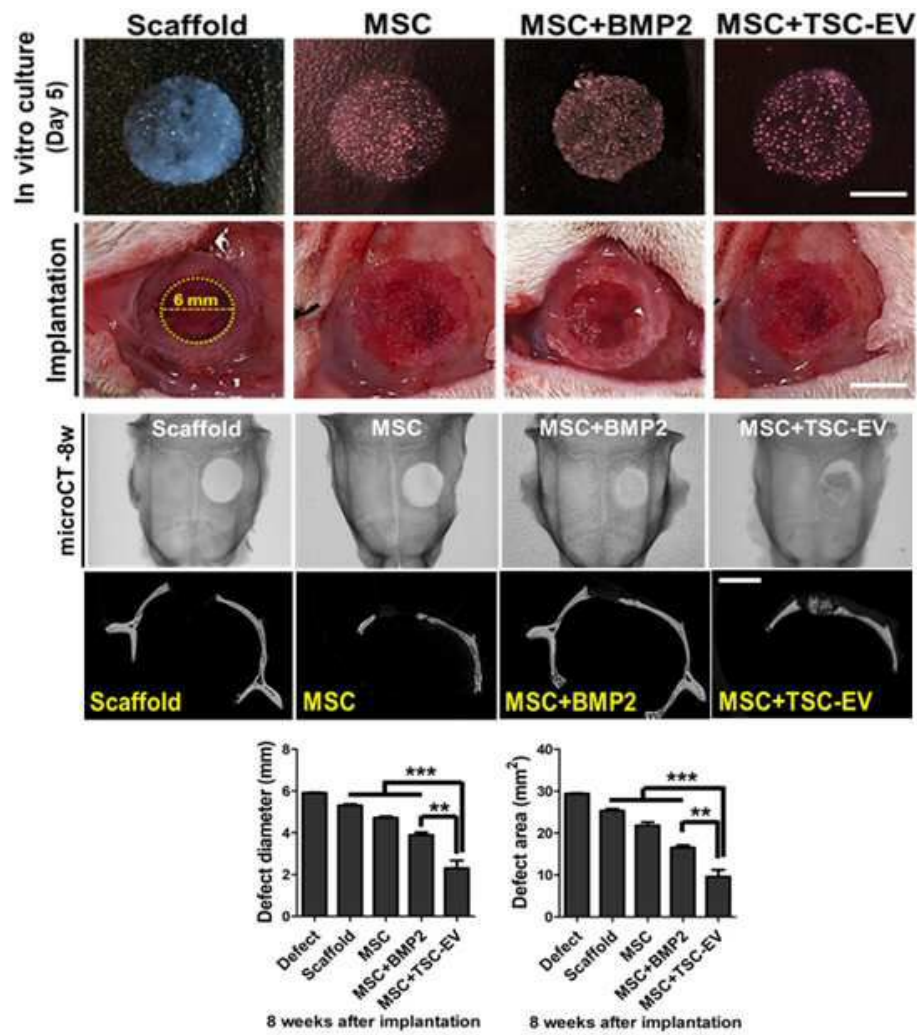
도면23



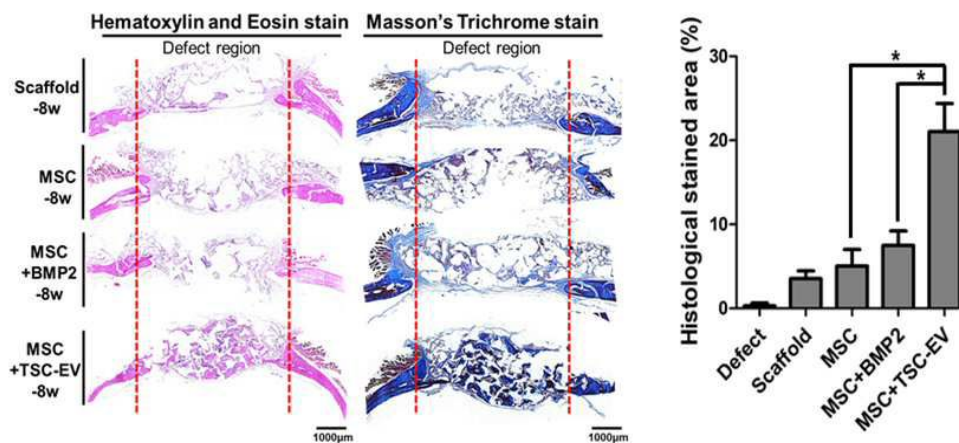
도면24



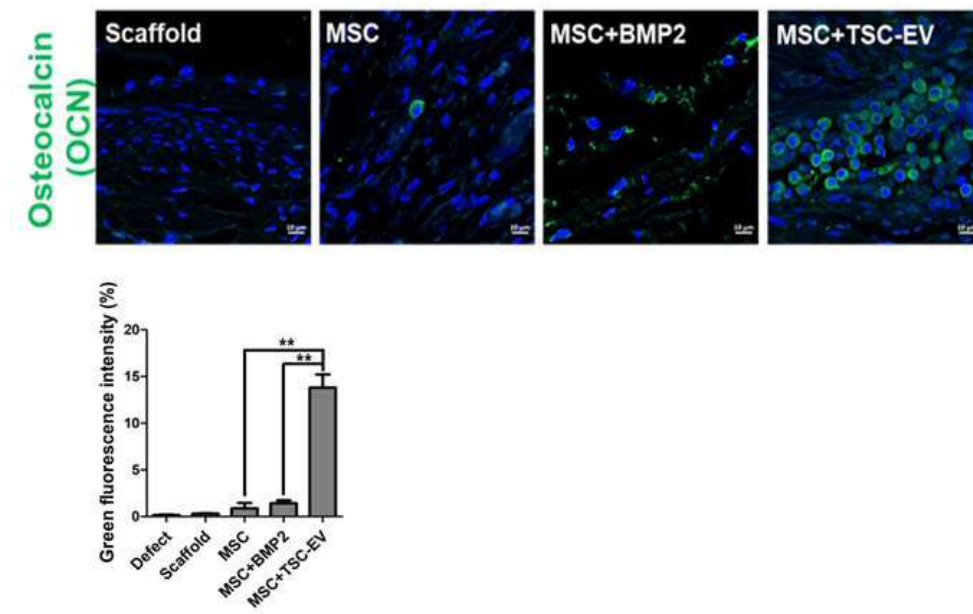
도면25



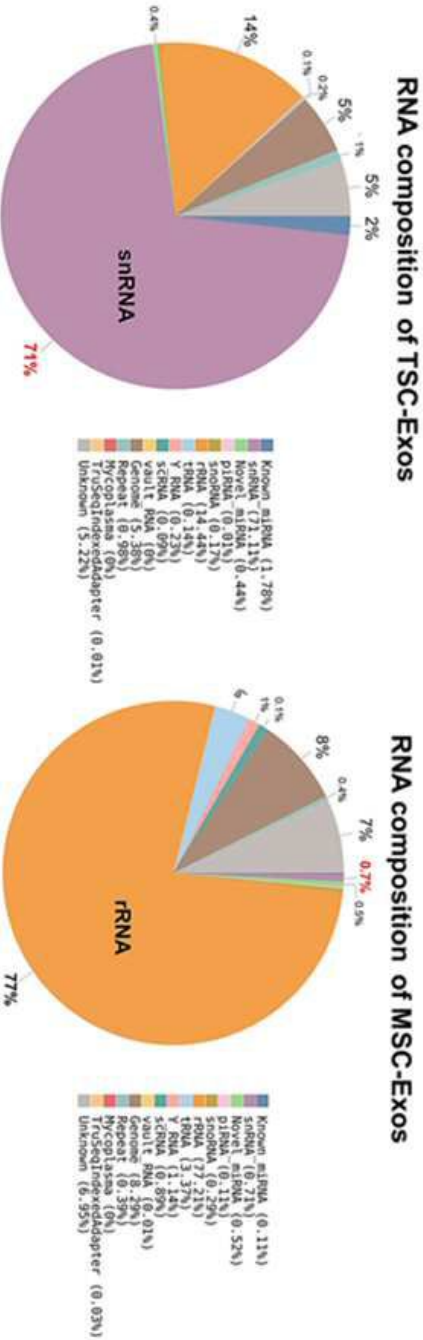
도면26



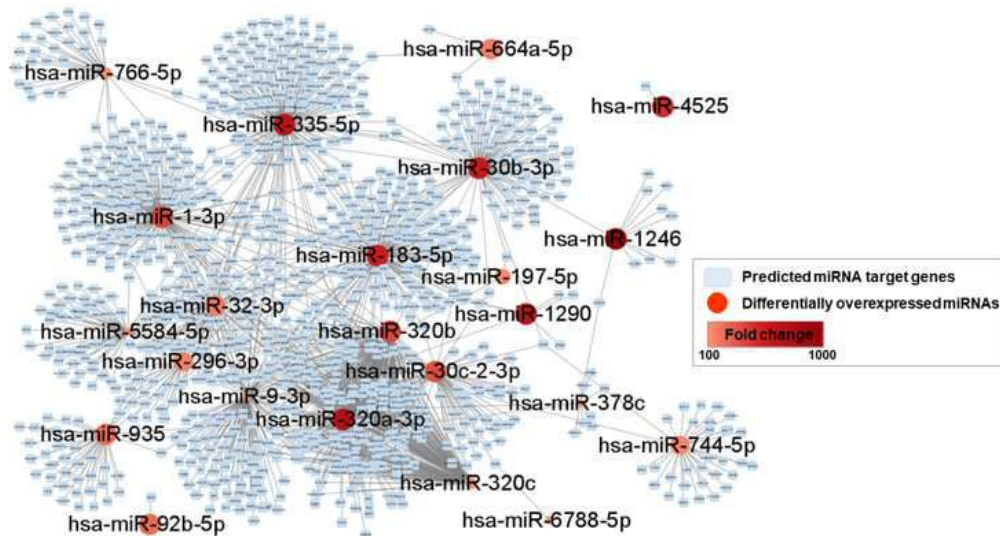
도면27



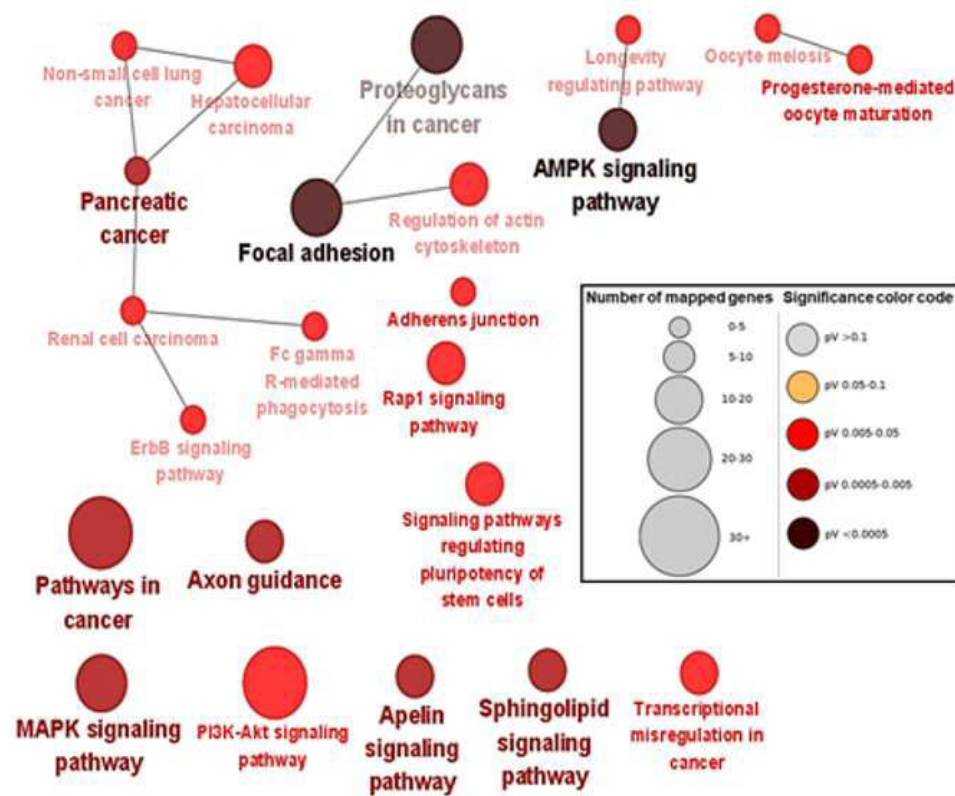
도면28



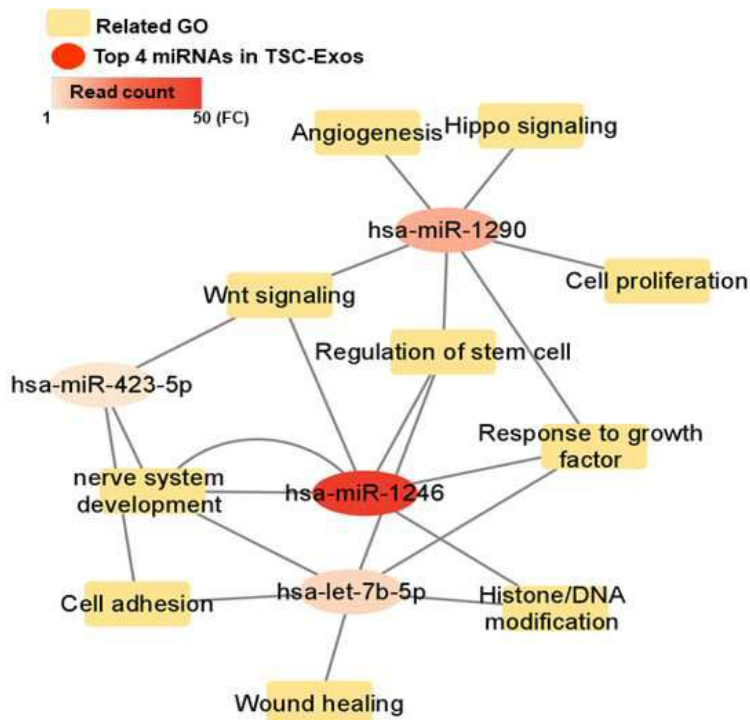
도면29



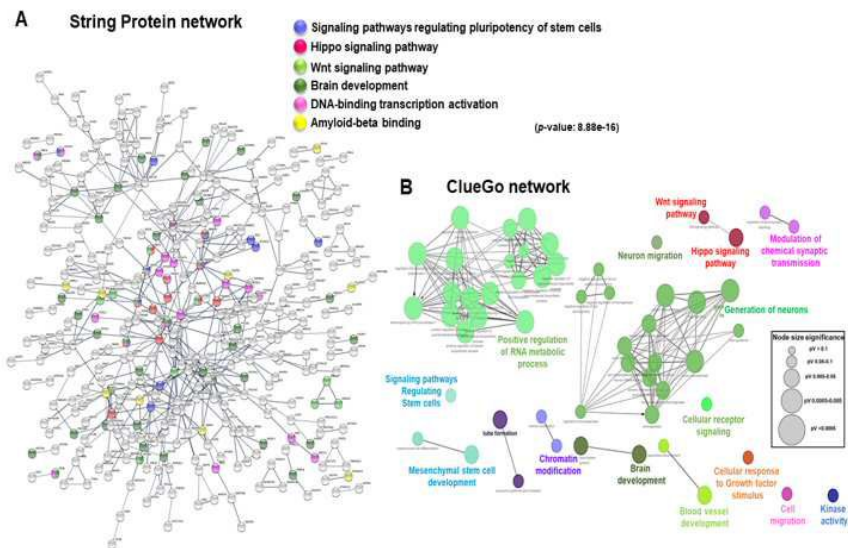
도면30



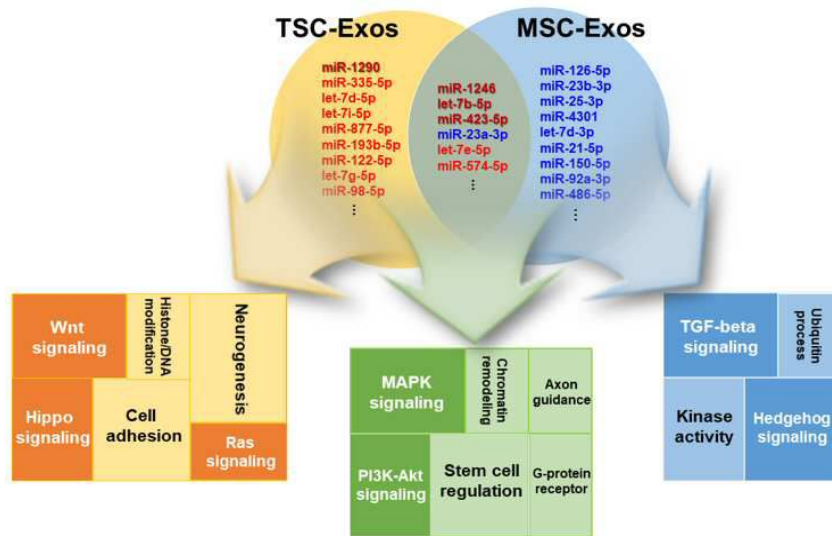
도면31



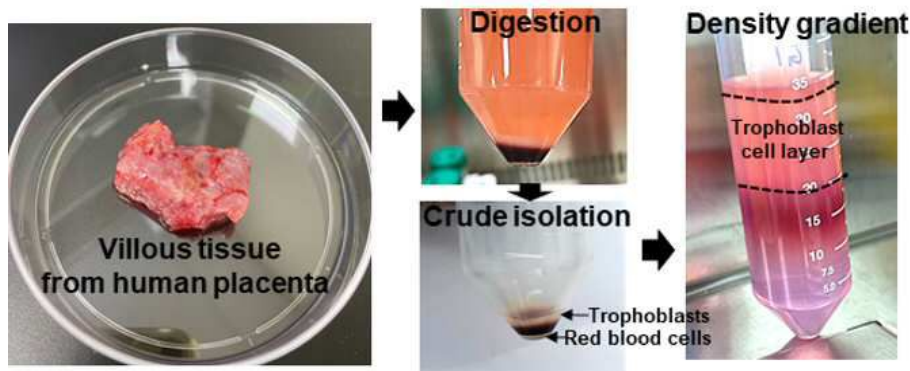
도면32



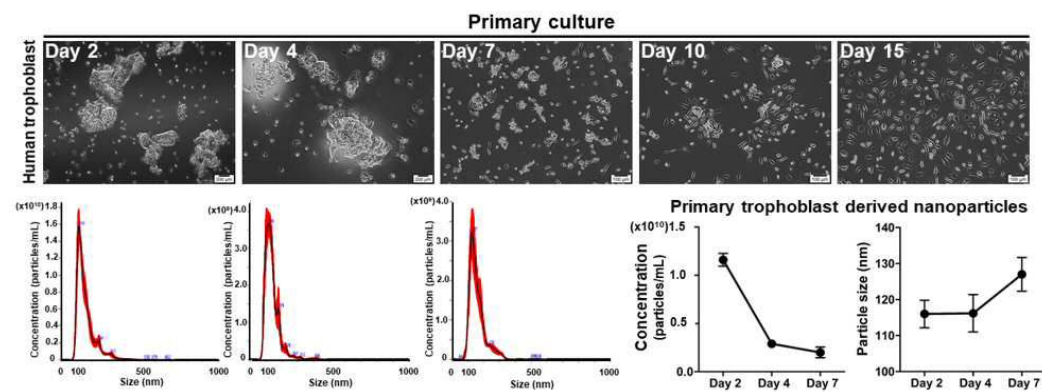
도면33



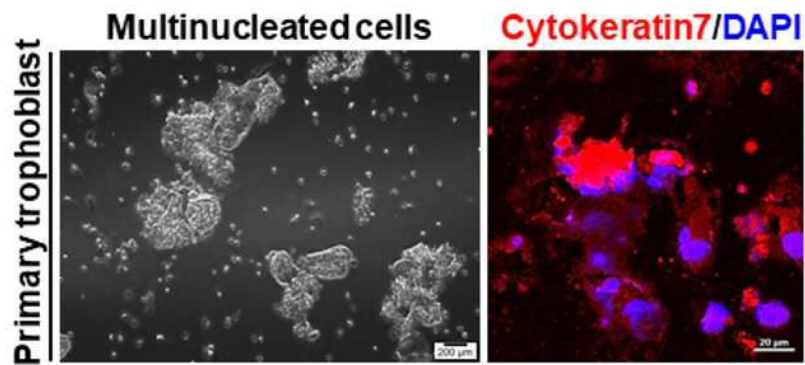
도면34



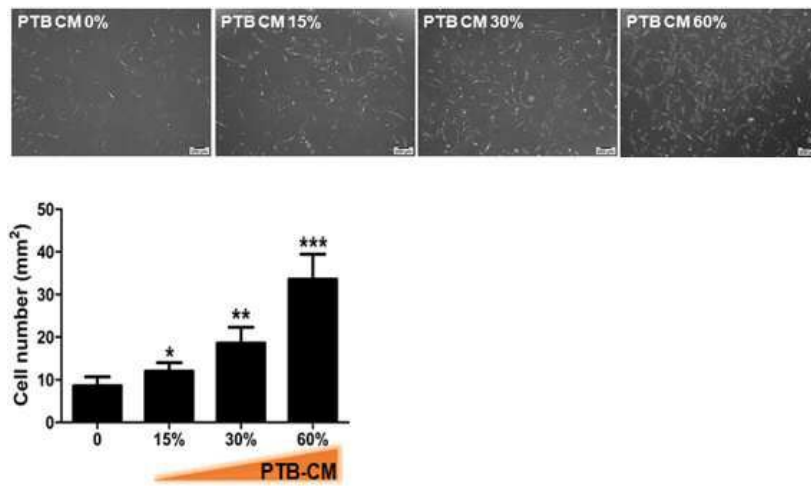
도면35



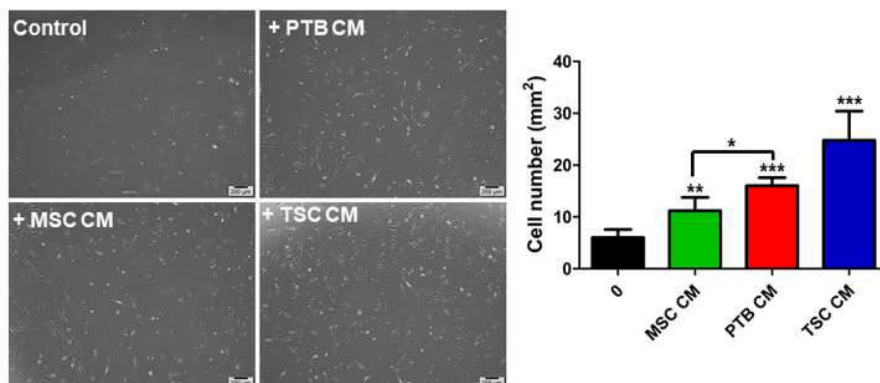
도면36



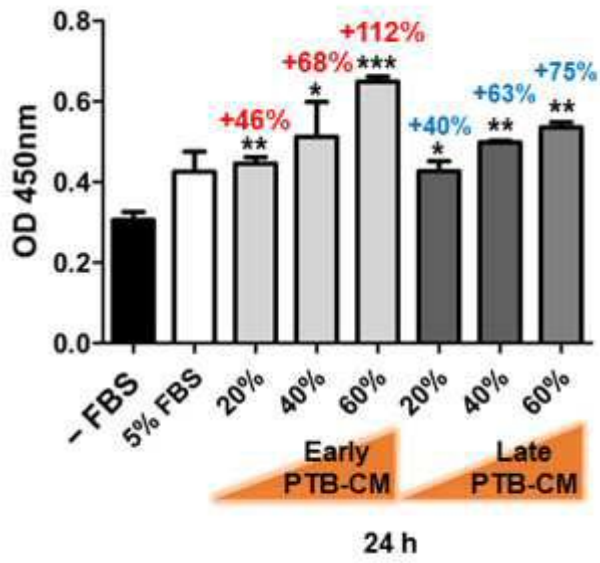
도면37



도면38



도면39



도면40

