



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0109223
(43) 공개일자 2017년09월28일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/12 (2015.01)
C12N 5/0789 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
A61K 35/12 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0119603(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2017년09월18일
심사청구일자 2017년09월18일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2015-0138513
원출원일자 2015년10월01일
심사청구일자 2015년10월01일</p> <p>(30) 우선권주장
1020140140593 2014년10월17일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
손영숙
서울특별시 강남구 언주로 107, 205동 703호 (개포동, 현대2차아파트)</p> <p>홍현숙
서울특별시 송파구 송파대로47길 11 (석촌동, 석촌동다세대주택)</p> <p>진인지
서울특별시 동대문구 회기로23가길 52 (회기동)</p> <p>(74) 대리인
안소영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 9 항

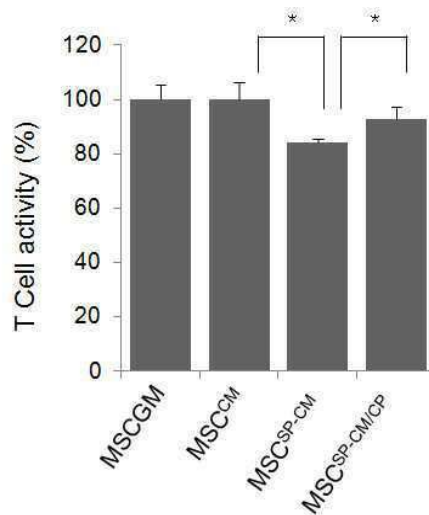
(54) 발명의 명칭 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 면역 억제 효과가 증진된 중배엽 줄기세포의 제조 방법 및 이로부터 제조된 면역 억제 효과가 증진된 중배엽 줄기세포에 관한 것이다.

본 발명에 따른 면역 억제 효과가 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법은 중배엽 줄기세포, 특히 후기 계대의 중배엽 줄기세포에서 조직 재생 및 면역 조절에 관여하는 인자들의 분비능을 증진시킴으로써 중배엽 줄기 세포의 면역 억제 활성을 증가시켜 인체 이식에 적합한 세포 치료제로써의 중배엽 줄기세포 제공할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 2501/10 (2013.01)
 C12N 2501/11 (2013.01)
 C12N 2501/113 (2013.01)
 C12N 2501/115 (2013.01)
 C12N 2501/117 (2013.01)
 C12N 2501/12 (2013.01)
 C12N 2501/165 (2013.01)
 C12N 2501/83 (2013.01)
 C12N 2506/1346 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2012-050485
부처명	원천기술개발사업
연구관리전문기관	미래창조과학부
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	골수 줄기세포 가동화 기술 및 심근세포 분화 기작을 이용한 당뇨 및 당뇨병 혈관질환 치
료의 POP 연구	
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

서브스텐스 P를 중간엽 줄기세포에 가하여 배양하는 것을 포함하는 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중배엽 줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 조직 또는 체액으로부터 분리된 것인 면역 억제가 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기세포의 제조 방법은 중간엽 줄기 세포 성장 배지에서 중간엽 줄기 세포를 배양하는 것인 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기세포의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 중간엽 줄기 세포의 배양은 FGF-2, SDF-1 α , HGF, VEGF, KGF, PDGF 또는 EGF 중 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 더 포함하는 배지에서 배양하는 것인 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기세포의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 후기 계대의 중간엽 줄기 세포인 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 서브스텐스 P를 0.01 nM 내지 500 nM로 가하는 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 중배엽 줄기 세포를 적어도 1회 이상 계대하는 것을 포함하는 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 제조 방법으로 제조된 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포는 후기 계대의 중간엽 줄기 세포인 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 억제능이 증진된 중간엽 줄기 세포 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)는 성체 골수에 있는 multipotential nonhematopoietic progenitor cell로서 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부, 신경 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한

다. 현재 다양한 조직 재생을 위한 임상 연구가 진행되고 있으며, 또한 면역 조절 기능뿐만 아니라 면역거부 반응에 관여하는 요소들이 적게 발현된다는 장점으로 장기이식 분야에도 충분한 적용가능성을 보이고 있다.

[0003] 그러나, 줄기세포 치료는 줄기세포를 대량으로 적용하여야 하고 이식을 위한 충분한 수의 줄기세포를 얻어야 하므로 GMP에서의 Long term ex vivo culture는 불가피하다. 이 과정에서 세포의 passage number가 증가하게 되며, 이에 따라 치료학적 활성이 감소하는 단점을 가진다. 알려진 바에 따르면, late passage의 중간엽 줄기 세포의 사용은 오히려 항원성을 늘어나고 세포 활성이 감소됨으로써 질환에 부정적인 영향을 끼칠 가능성이 높아지기 때문에 세포 치료제로써 활용 가치가 떨어진다고 알려져 있다. 특히, Late passage의 줄기세포의 경우에는 MHC Class I의 발현이 증가하며, 조직 재생 및 면역 조절에 관여하는 인자들의 분비능이 감소하는 것으로 알려져 있어, 인체에 적용을 위한 줄기 세포 치료제로써의 이용이 쉽지 않다.

[0004] 예컨대, 중배엽 줄기세포가 세포치료제로 이용되기 위해서는 재생의학 및/또는 세포치료분야에서 요구되는 최소 세포수(약 1×10^9 정도)를 만족시켜야 하는데, 적정조건을 잡고 기준을 정하는 실험까지 고려한다면 필요한 세포수는 더욱 늘어나게 된다. 따라서 기존의 다양한 기원의 중배엽 줄기세포로부터 이 정도의 양을 공급하려면 in vitro(시험관내) 실험에서 최소 10번 이상의 계대가 필요하게 되는데 이 경우 세포가 노화되고 변형되어 더 이상 세포치료제로서의 목적을 달성하기에는 적합하지 아니할 수 있다. 실령 이러한 세포로 조건과 기준을 잡았다 하더라도 정작 세포치료 목적으로 사용할 시점에는 이미 그 세포가 바닥이 나서 다른 사람의 중배엽 줄기세포를 써야 하고 그럴 경우 또 다른 세포이용에 따른 부가적인 실험을 다시 거쳐야 하는 문제가 발생할 수 있다.

[0005] 또한, 일반적으로 줄기세포 이식시에 줄기세포는 과한 염증 환경에 이식이 되는 경우가 많은데, 이 경우에 이식된 줄기세포는 치료 효과를 제대로 보이기도 전에 세포사할 가능성이 매우 높아서 치료학적 효율이 떨어질 가능성이 높다.

[0006] 즉, 중배엽 줄기 세포를 이용한 세포 치료를 위해서 많은 임상/연구자들은 빠른 시간 안에 활성이 높은 많은 수의 세포의 제조 및 이식을 원하지만, 장기간의 배양에 따른 제조비용 문제, 면역원성 등에 의한 장기 배양의 문제점 발생 때문에 인체 적용에 적합한 줄기 세포의 제조에 어려움을 겪고 있다. 이에 따라, 인체 적용에 적합한 중배엽 줄기 세포를 대량 생산할 수 있는 방법에 대한 연구 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1358777호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0140197호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 서브스틴스 P를 중간엽 줄기세포에 가하여 배양하는 것을 포함하는 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명은 또한 서브스틴스 P를 중간엽 줄기세포에 가하여 배양된 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포를 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명은 또한 서브스틴스 P를 포함하는 중간엽 줄기 세포의 면역 억제능 증진용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 인체 적용에 적합한 중배엽 줄기 세포의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 서브스틴스 P가 중배엽 줄기 세포에서 면역 억제능을 증진시킴으로써 인체 적용에 적합한 성질을 가지는 중배엽 줄기 세포로 기능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 서브스틴스 P를 중간엽 줄기세포에 가하여 배양하는 것을 포함하는 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법을 제공한다.

- [0013] 본 발명의 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법은 서브스텐스 P 처리에 따라 T 세포 활성 감소, 중간엽 줄기 세포의 TGF- β 의 분비량 증진, T 세포의 인터루킨-2(IL-2) 분비량 감소, SDF-1 α , PDGF-BB, VEGF 및 PGE2와 같은 줄기세포의 증식, 생존율 증진 및 면역 조절 기능 증진에 도움을 주는 사이토카인의 분비 증진 등의 면역 억제 효과를 통해서 중간엽 줄기세포의 면역 억제능을 증진시키고 In vivo에서 세포 활성을 증진시킴으로써 치료학적으로 활성이 높은 중배엽 줄기 세포를 제공할 수 있다. 특히, 중간엽 줄기 세포는 계대가 증가함에 따라 세포가 노화되고 변형되며 면역 억제능이 감소되는데, 본 발명에 따른 제조방법을 통해서 후기 계대의 중간엽 줄기 세포에서도 면역 억제능을 증진시킴으로써 인체, 특히 염증성 환경에 적용이 적합한 중간엽 줄기 세포를 대량으로 제공할 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 서브스텐스 P는 11개 아미노산(Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂)을 포함하는 펩티드 또는 이의 유사체를 말한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 중간엽 줄기세포란 골수, 제대혈, 혈액 또는 조직 등의 기관으로부터 유래된 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부, 신경 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 예컨대 중배엽 줄기세포의 대표적인 기원 조직은 골수이나, 제대혈 또한 중배엽 줄기세포의 기원 조직으로서 사용될 수 있으며, 또한 혈액으로부터 분리해 낼 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 면역 억제능 증진은 TGF-beta 분비 증가, 세포 대사 활동 증가, PGE2 등의 사이토카인 분비 증가, 중간엽 줄기 세포의 집단 배가 시간 (population doubling time) 감소 등의 면역 억제 증진에 따른 효과를 말한다.
- [0017] 상기 중간엽 줄기 세포의 배양은 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM)로 예컨대, a-MEM(Fetal bovin Serum 10%) 또는 DMEM (Fetal bovin Serum 10%)에서 배양할 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 중간엽 줄기 세포 성장 배지는 FGF-2 (Basic fibroblast growth factor), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), HGF(Hepatocyte growth factor), VEGF(Vascular endothelial growth factor), EGF(Epidermal growth factor), KGF (Keratinocyte growth factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor)로부터 선택된 1 이상의 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 성분들은 중간엽 줄기 세포의 증식, 면역 억제 증진 등에 도움을 준다.
- [0019] 상기 배양 배지 내 서브스텐스 P의 함유량은 0.01 nM 내지 500 nM이 바람직하며, 보다 바람직하게 0.1 nM 내지 200 nM으로 함유하는 것이 바람직하다. 상기 농도 범위 이하에서는 면역 억제능의 효과를 얻기 어려우며, 상기 농도 범위 이상에서 배양시 in vivo 상에서 알러지를 유발할 가능성이 있다.
- [0020] 서브스텐스 P의 처리는 중간엽 줄기세포의 배양 전 선행처리될 수 있으며, 중간엽 줄기세포 배양 중 배양 계대수 증가에 따라 수회 추가로 첨가될 수도 있다. 서브스텐스 P의 처리는 24 내지 72 시간에 2 내지 4회로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0021] 상기 중간엽 줄기 세포의 배양은 인간 등의 동물의 골수, 제대혈, 혈액 또는 조직 등의 기관으로부터 종래 공지된 방법에 의해 분리된 중간엽 줄기세포를 목적하는 계대수에 따라 배양하는데 사용할 수 있다. 배양 조건은 배지 1 ml당 1×10^5 내지 3×10^5 개의 세포를 seeding하는 것이 바람직하고 배양온도는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 배양 시간은 1일 내지 3일, 5 % 이하의 CO₂인 것이 바람직하다. 이와 같이 배양함으로써, 면역 억제능을 유지 또는 향상시킨 중간엽 줄기 세포를 효율적으로 대량으로 얻을 수 있다.
- [0022] 배양에 이용하는 배양 용기는, 중간엽 줄기 세포가 증식 할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 팔콘제 75 cm² 플라스크, 스미토모 베이크라이트제 75 cm² 플라스크 등을 매우 적합하게 이용할 수 있다. 단, 세포에 따라서는, 이용하는 배양 용기의 종류에 따라 세포의 증식이 영향을 받는 경우가 있다. 이 때문에, 중간엽 줄기 세포를 보다 효율적으로 증식시키기 위해서, 제조 방법에서 증식시키는 대상이 되는 중간엽 줄기 세포마다, 증식에 적합한 배양 용기를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0023] 또한, 본 발명의 제조 방법은 중간엽 줄기 세포를 계대하여 사용하는데 바람직하다. 배양 중 중간엽 줄기 세포를 계대함으로써 배양 조건을 개선하고, 중간엽 줄기세포를 대량으로 생산할 수 있다. 중간엽 줄기 세포의 계대 방법으로서 특별히 한정되지 않고, 종래 공지된 중간엽 줄기 세포의 계대 방법을 이용하여 계대할 수 있다. 특히, 중간엽 줄기 세포는 계대 수가 증가함에 따라 면역 억제능이 크게 감소하는데, 본 발명의 배양 방법은 계대수 증가에 따른 면역억제능 감소를 억제하여, 계대수 증가에 따른 중간엽 줄기세포의 성질 변화를 최

소화하고 인체 적용에 적합한 중간엽 줄기 세포를 제공할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 제조 방법은 전기 계대로 예컨대 제1계대, 제2계대 또는 제3계대에 사용이 바람직하며, 보다 바람직하게 후기 계대로 예컨대 제4계대, 제5계대, 제6계대, 제7계대, 제8계대, 제9계대, 제10계대, 제11계대, 제12계대 또는 그 이상으로 중간엽 줄기세포를 계대하여 사용하는데 바람직하다. 또는 전기 계대의 Population doubling time과 대비하여 증가된 Population doubling time을 가지는 계대에 대해서 면역 억제능이 감소하고 계대가 증가되었음을 알 수 있다.

[0024] 본 발명은 서브스텐스 P를 중간엽 줄기세포에 가하여 배양된 면역 억제능이 증진된 중배엽 줄기 세포를 제공한다.

[0025] 본 발명의 제조 방법에 따른 중간엽 줄기세포는 면역 억제능이 증진된 중간엽 줄기세포로서 예컨대, T 세포 활성 감소, TGF- β 1 등의 가용성 인자 분비 증진 등의 효과를 가져 인체 적용에 적합한 중배엽 줄기 세포로서의 성질을 가진다. 특히, 일반적인 중간엽 줄기 세포는 계대수가 증가함에 따라 면역 억제능이 감소하여 염증 환경 등에서 적용 시 치료 효과가 미비한 것과 달리, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 중배엽 줄기 세포, 특히 후기 계대의 중간엽 줄기 세포는 증진된 면역 억제능을 가짐으로써 인체 적용에 적합한 세포치료제로써 작용할 수 있다.

[0026] 본 발명은 서브스텐스 P를 포함하는 중간엽 줄기 세포의 면역 억제능 증진용 조성물을 제공하고자 한다.

[0027] 본 발명의 조성물은 서브스텐스 P를 종래 공지된 중간엽 줄기 세포 배양 배지에 첨가하여 면역 억제능이 유지 또는 향상된 중간엽 줄기 세포를 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 중간엽 줄기 세포 성장 배지(MSCGM, α -MEM(FBS10%), DMEM (FBS 10%))를 포함할 수 있으며, 추가적으로 FGF-2, SDF-1 α , HGF, VEGF, EGF, KGF 또는 PDGF로부터 선택된 1 이상의 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 서브스텐스 P는 조성물 내 0.5 nM 내지 500 nM로 포함되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게 1 nM 내지 100 nM로 포함될 수 있다. 본 발명의 조성물은 ex vivo의 중간엽 줄기세포 배양에 사용하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 면역 억제 효과가 증진된 중배엽 줄기 세포의 제조 방법은 중배엽 줄기세포, 특히 후기 계대의 중배엽 줄기세포에서 조직 재생 및 면역 조절에 관여하는 인자들의 분비능을 증진시킴으로써 중배엽 줄기 세포의 면역 억제 활성을 증가시켜 인체 이식에 적합한 세포 치료제로써의 중배엽 줄기세포 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 중배엽 줄기세포의 배양 계대 수 증가에 따른 중배엽 줄기세포의 면역 억제 효과 감소를 집단 배가 시간, T 세포 활성 및 TGF- β 1 분비량 변화 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 서브스텐스 P 선처리된 중배엽 줄기 세포 조정 배지에서 T 세포 활성 감소를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 중배엽 줄기 세포에서 서브스텐스 P 처리에 따른 면역 억제 효과를 TGF- β 1 분비량, T 세포 활성, IL-2 분비량 및 T 세포 집단 배가 시간 변화 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 염증 환경에서 중배엽 줄기 세포 유도 면역 억제에 대한 서브스텐스 P의 효과를 T 세포 활성 및 IL-2 분비량 변화 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 T 세포 및 중배엽 줄기 세포 공동-배양 하에 중배엽 줄기 세포 유도 면역 억제에 대한 서브스텐스 P의 효과를 TGF- β 1 분비량, T 세포 활성 및 IL-2 분비량 변화 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 중배엽 줄기 세포에서 서브스텐스 P 처리에 따른 SDF-1 α , PDGF-BB, VEGF 및 PGE2 사이토카인의 분비 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0031] <실시예 1> 배양 계대 수 증가에 따른 중배엽 줄기세포의 면역 억제 효과 감소

[0032] 중배엽 줄기 세포에서 배양 계대 수 증가에 따른 면역 억제 효과 감소를 확인하였다.

- [0033] 인간 중배엽 줄기 세포를 4명의 다른 건강한 기증자의 골수로부터 분리하였다(IRB #: KPH 2009-01 나이: 45-64). 인간 골수 시료를 동일 부피의 PBS에 희석하고, Ficoll-Paque 용액(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 상층액으로 옮긴 후 2200 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 경계면에서 단핵구 층을 수집하고, PBS로 워싱 후에, 중배엽 줄기 세포 성장 배지(MSCGM; Lonza, Basel, Switzerland)에서 현탁하고, MSCGM 내 100 mm 배양 디쉬에 옮겼다. 48시간 후, 배양액을 현탁액 내 적혈구 세포 및 다른 세포를 제거하기 위해 교환하였다. 중배엽 줄기 세포 여부를 CD45, CD34, CD29, CD73, CD105, CD44 및 CD90의 발현 측정을 통해 확인하였다.
- [0034] 상기 확인된 중배엽 줄기 세포의 증식을 집단 배가 시간 측정을 통해 확인하였다. 중배엽 줄기세포의 증식 속도를 3 계대 내지 8계대(2×10^5 cell)에 대하여 측정하였다. 중배엽 줄기세포를 3일 동안 배양하고, 이들의 집단 배가 시간 (population doubling time)를 각각의 계대의 최종 세포 수를 세어서 결정하였다.
- [0035] 그 결과를 도 1의 A에 나타내었다. 도 1의 A는 3 계대 내지 8 계대에서 중배엽 줄기 세포의 집단 배가 시간을 측정한 결과를 나타낸다. 도 1의 A에서 확인되는 바와 같이, 중배엽 줄기 세포는 계대 수가 증가함에 따라 집단 배가 시간이 증가되었고 증식 속도가 감소되는 경향을 보였다. (pn=계대 수, n=3~8)
- [0036] 또한, 상기 중배엽 줄기 세포가 T 세포 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0037] T세포는 다음 조건하에서 배양되었다. CD4⁺ Jurkat leukemic T 세포를 반응 세포로 사용하였고 10 % FBS 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 37 °C 및 5 % CO₂ 조건 하에 배양하였다. T 세포를 3 반복으로 2×10^4 cells/well 로 96-웰 플레이트에 접종하였다.
- [0038] 상기 T 세포에 계대수에 따른 중배엽 줄기세포 조정 배지(MSC-conditioned medium, MSC^{CM}) 또는 대조군으로 중배엽 줄기세포 성장 배지를 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 상기 중배엽 줄기세포 조정 배지는 24 well plate에 2×10^4 cells/well로 접종되고, 48시간 배양 후 이를 수거 하여 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포 debris를 제거함으로써 제조되었다.
- [0039] 상기 배양된 T 세포에 WST-1 용액(배지의 10% 부피)을 첨가하고 2시간 동안 더 배양하였다. OD는 450 nm에서 EMax Endpointing ELISA 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정하였으며, 중배엽 줄기세포 성장 배지 (Lonza, Basel, Switzerland)를 대조군으로 하여 T 세포 활성을 퍼센트로 나타내었다.
- [0040] 그 결과를 도 1의 B에 나타내었다. 도 1의 B에 나타낸 바와 같이, 초기 계대인 3 계대의 중배엽 줄기세포에서는 T 세포 활성이 억제되는 것을 확인하였으나, 이후 5계대 및 8계대에서는 T 세포 활성 억제 효과가 감소하는 것을 확인하였다.
- [0041] 또한, 중배엽 줄기 세포에서 계대 수에 따른 TGF-β의 분비량 변화를 확인하였다. 계대 수에 따른 중배엽 줄기 세포 조정 배지 내 TGF-β의 양을 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA 키트를 사용하여 정량화하였다. 시료 및 표준 시료를 항 TGF-β 항체가 코팅된 96-웰 플레이트에 추가하고 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 배양 후 상층액을 버리고, 항체에 결합된 Horseradish peroxidase를 처리하고 2시간 동안 더 배양하였다. 배양 후, 워싱 단계를 거치고 100 μL의 기질 용액을 첨가한 후 반응 정지 용액 100 μL를 이어서 첨가하였다. 흡광도는 EMax Endpointing ELISA 마이크로플레이트 리더 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.
- [0042] 그 결과를 도 1의 C에 나타내었다. 도 1의 C에 나타낸 바와 같이, 계대수 증가에 따라서 TGF-β의 분비량이 상당히 감소하는 것을 확인하였으며, 중배엽 줄기 세포의 계대수 증가에 따라 면역 조절 인자의 생산이 감소하는 것을 보여준다.
- [0043] 상기에서 확인되는 바와 같이, 중배엽 줄기 세포에서 계대수가 증가함에 따라 증식 속도가 감소되며, 집단 배가 시간이 증가하고, 면역 억제 효과가 감소하며, 면역 조절 인자 생산이 감소하는 것을 확인하였다.
- [0044] <실시예 2> 후기 계대의 중배엽 줄기 세포에서 서브스틴스 P 처리에 따른 면역 억제 활성 회복 효과
- [0045] 후기 계대의 중배엽 줄기 세포에서 서브스틴스 P 처리에 따른 면역 억제 활성 회복 효과를 확인하였다.
- [0046] 8 계대의 세포에서 상기와 동일한 방법으로 T 세포 활성을 확인하였다. 서브스틴스 P 처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지의 제조를 위해서, 서브스틴스 P를 상기 중배엽 줄기 세포(24-웰 플레이트, 2×10^4 cells/well) 접종 4 시간 후, 100 nM의 농도로 처리하고 배양 24시간 후에 다시 한번 동일 농도로 처리하여, 상기 실시예 1과 동

일한 방법으로 서브스텐스 P 처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지를 제조하였다. 또한, NK-1R에 의하여 매개되는 서브스텐스 P의 억제 효과인자에 대한 확인을 위하여 서브스텐스 P 처리 30분 전에 NK-1R 길항제(antagonist)를 200 nM 농도로 처리하여 이의 효과를 함께 확인하였다. T 세포 활성화는 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 확인하였다.

[0047] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 MSCGM은 중배엽 줄기 세포 성장 배지를 나타내며, MSC^{CM}은 중배엽 줄기 세포 조정 배지, MSC^{SP-CM}은 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지, MSC^{SP-CM/CP}는 NK-1R 길항제 및 서브스텐스 P 처리 중배엽 줄기세포 조정 배지를 나타낸다. 도 2에 나타난 바와 같이, 서브스텐스 P를 선처리한 실험군에서 T 세포의 활성이 감소되는 것을 확인하였으며, NK-1R 길항제 처리 시에 T 세포 활성 억제 효과가 감소하는 것을 확인하였다. 즉, 서브스텐스 P가 후기 계대에서도 NK-1R 신호 매개로 면역 억제 기능을 회복할 수 있음을 확인하였다.

[0048] 이러한 서브스텐스 P의 중배엽 줄기 세포 내 면역 억제 효과 증진의 추가적인 확인을 위하여 서브스텐스 P 처리에 따른 TGF-β1의 분비량, T 세포 활성화, 인터루킨-2 (IL-2) 분비량 및 T 세포의 집단 배가 기간을 측정하였다.

[0049] 중배엽 줄기 세포 조정 배지, 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지 및, NK-1R 길항제 및 서브스텐스 P 처리 중배엽 줄기세포 조정 배지에서 TGF-β1의 분비량 변화를 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 확인하였다. 그 결과를 도 3의 A에 나타내었다. 도 3의 A에 나타난 바와 같이, 서브스텐스 P가 선처리된 실험군에서 TGF-β1의 분비량이 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0050] 또한, 중배엽 줄기 세포 조정 배지, 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지, 및 TGF-β 카이네이즈 억제제(SB-505124)가 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지에 처리된 실험군 (MSC^{SP-CM}+SB)에서, T 세포 활성화 변화를 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 확인하였다. 그 결과를 도 3의 B에 나타내었다. 도 3의 B에서 확인되는 바와 같이, T 세포 활성화는 서브스텐스 P 선처리 중배엽 줄기세포 조정 배지(MSC^{SP-CM})에서 감소되었으며, TGF-β 카이네이즈 억제제가 처리된 실험군(MSC^{SP-CM}+SB)에서는 활성화 억제 효과가 줄어든 것을 확인하여, TGF-β1에 의하여 T 세포 억제가 이루어지는 것을 추가적으로 확인하였다.

[0051] 또한, IL-2의 분비량 변화를 중배엽 줄기 세포 조정 배지, 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지, 및 TGF-β 카이네이즈 억제제(SB-505124) 및 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지에서 확인하였다. T 세포에서 IL-2의 분비량 변화는 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA 키트 사용하여 측정하였으며, 항-IL-2 항체를 사용한 것만을 달리하여 TGF-β의 ELISA와 유사한 방법으로 IL-2의 분비량을 확인하였다. 그 결과를 도 3의 C에 나타내었다. 도 3의 C에서 확인되는 바와 같이, 서브스텐스 P 선처리 중배엽 줄기세포 조정 배지(MSC^{SP-CM})에서 T 세포의 IL-2 분비량이 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 서브스텐스 P 처리에 따른 증가된 TGF-β1이 T 세포에서 IL-2 분비 감소를 유발하는 것을 보여준다.

[0052] 또한, T 세포의 집단 배가 기간을 중배엽 줄기 세포 조정 배지, 서브스텐스 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지, NK-1R 길항제 및 서브스텐스 P 처리 중배엽 줄기세포 조정 배지, 및 TGF-β 카이네이즈 억제제(SB-505124) 및 서브스텐스 처리 중배엽 줄기세포 조정 배지에서 상기 실시예 1의 중배엽 줄기 세포 증식 확인과 유사하게 확인하였다. 그 결과를 도 3의 D에 나타내었다. 도 3의 D에 나타난 바와 같이, 상기 실험 결과들과 일관성있게 서브스텐스 P 선처리 중배엽 줄기 세포 조정 배지에서 T 세포의 집단 배가 기간이 증가하는 것을 확인하였다.

[0053] <실시예 3> 염증 환경에서 중배엽 줄기 세포 유도 면역 억제에 대한 서브스텐스 P의 효과

[0054] In vivo 상 이식된 중배엽 줄기 세포는 염증 환경을 접할 가능성이 높다. 따라서, 중배엽 줄기 세포는 염증성 사이토카인에 의해 자극되는 면역 세포의 활성을 억제하기 위한 강한 염증 억제 효과를 보여줄 필요가 있다. 활성화된 면역 세포에서 서브스텐스 P 선처리 중배엽 줄기세포의 억제 효과를 확인하기 위하여, T 세포는 4시간 동안 리포폴리사카라이드(LPS, 1 ug/ml)로 처리되고 T 세포 활성화 및 사이토카인 분비를 확인하기 위하여 24 시간 동안 중배엽 줄기 세포 조정 배지 또는 서브스텐스 P 선처리 중배엽 줄기세포 조정 배지로 처리되었다. T 세포 활성화 및 IL-2 분비량 변화는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정되었으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

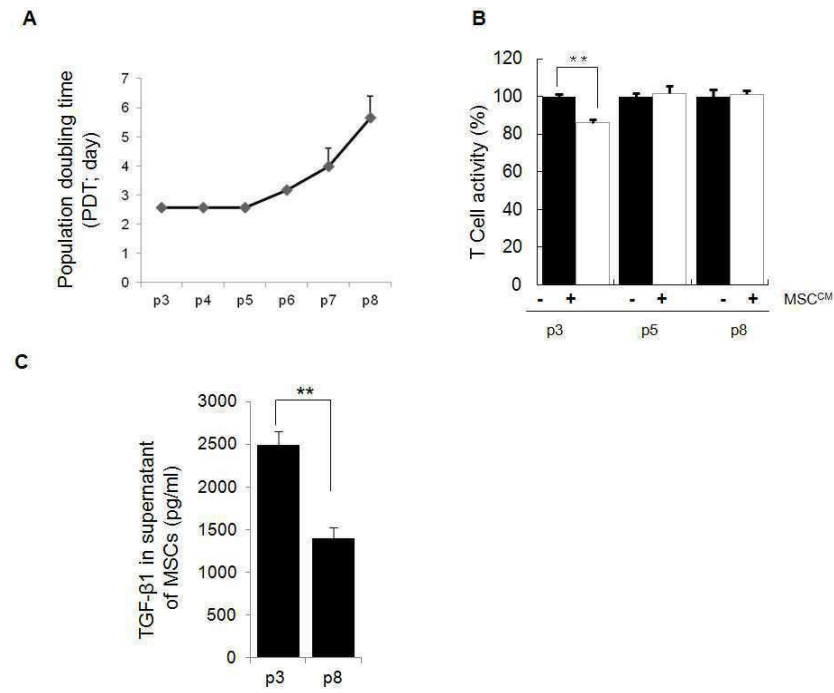
[0055] 도 4의 A는 T 세포 활성화 분석 결과를 나타낸다. 도 4의 A에 나타난 바와 같이, 리포폴리사카라이드(LPS)의 처리는 T 세포의 활성을 크게 증가시켰으나, 서브스텐스 P 처리된 중배엽 줄기 세포 조정 배지(LPS+MSC^{SP-CM})에서 T

세포 활성이 억제되는 것을 확인하였다.

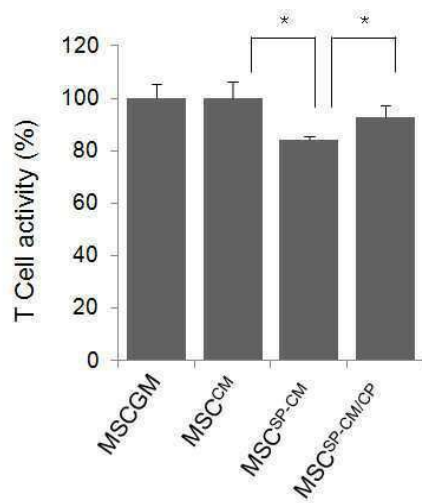
- [0056] 도 4의 B는 T 세포에서 IL-2 분비량 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 4의 B에 나타난 바와 같이, LPS의 처리는 T 세포에서 IL-2의 발현을 크게 증가시켰으나, 서브스틴스 P 처리된 중배엽 줄기 세포 조정 배지(LPS+MSC^{SP-}_{CM})에서 IL-2 분비량이 크게 감소하는 것을 확인하였다.
- [0057] 상기 결과들은 서브스틴스 P 선처리된 중배엽 줄기 세포가 염증 환경에서도 T 세포 활성을 감소시키며, IL-2 분비량을 감소시키는 것을 보여준다.
- [0058] <실시예 4> T 세포 및 중배엽 줄기 세포 공동-배양 하에 중배엽 줄기 세포 유도 면역 억제에 대한 서브스틴스 P의 효과
- [0059] 중배엽 줄기세포의 면역 조절 능력에 대한 세포-세포간 상호작용의 효과를 확인하기 위하여, T 세포 및 MSC는 서브스틴스 P(100 nM) 존재 또는 부존재 하에서 24시간 동안 공동-배양되었다. 구체적으로 중배엽 줄기 세포 및 T 세포는 1:1의 비율(2×10^4 cells/well)로 96-웰 플레이트에 서브스틴스 P(100 nM)와 함께 또는 없이 배양되었다. NK-1R 길항제(CP) 또는 TGF- β 카이네이즈 억제제(SB)의 처리는 서브스틴스 P 처리 30분 전에 이루어졌다.
- [0060] 상기 공동-배양 세포에 대하여 T 세포 활성, TGF- β 1의 분비량 및 IL-2 분비량 변화가 상기 실시예 1의 방법과 동일한 방법으로 측정되었으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0061] 도 5의 A는 T 세포 활성 변화를 확인한 결과이다. 도 5의 A에 나타난 바와 같이, 서브스틴스 P의 처리(MSC + T cell + SP)는 중배엽 줄기 세포 및 T 세포의 공동 배양에서 T 세포 활성을 감소시켰다.
- [0062] 도 5의 B는 TGF- β 1의 분비량 변화를 확인한 결과이다. 도 5의 B에 나타난 바와 같이, 서브스틴스 P의 처리는 TGF- β 1의 분비량을 증가시키는 것을 확인하였다. 도 5의 C는 IL-2의 분비량 변화를 확인한 결과이다. 도 5의 C에 나타난 바와 같이, 서브스틴스 P의 처리는 IL-2의 분비량을 감소시키는 것을 확인하였다.
- [0063] 상기 결과들을 모두 종합하면, 서브스틴스 P가 세포-세포간 상호작용 하에 T 세포 활성 억제 효과를 가져올 수 있으며, 이는 T 세포 내 IL-2 생산의 억제 및 중배엽 줄기 세포로부터 TGF- β 1의 유도에 의하여 이루어 질 수 있음을 보여준다.
- [0064] <실시예 5> 후기 계대의 중배엽 줄기 세포에서 서브스틴스 P 처리에 따른 사이토카인 분비 변화 확인
- [0065] 후기 계대의 중배엽 줄기 세포로부터 SDF-1 α , PDGF-BB and VEGF의 분비 변화를 ELISA kits (according to the manufacturer's instructions, R&D systems)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 8 계대의 중배엽 줄기세포를 24 well 플레이트에 2×10^4 /well 농도로 중배엽 줄기 세포 배양 배지에 suspending하여 seeding하였다. 그리고 나서, 24시간 후 서브스틴스 P를 최종 농도 100 nM로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 서브스틴스 P 처리 후 24시간째에 Conditioned medium을 얻고 cell debris를 제거하기 위해 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 수행하였다. 이를 통하여, 상등액을 얻고, 그 안에 사이토카인을 ELISA 방법으로 측정하였다.
- [0066] 사이토카인 측정을 위한 conditioned medium과 표준 시료를 96-well 플레이트 (SDF-1 α , PDGF-BB, VEGF 및 PGE2에 대한 항체로 코팅됨)에 50 μ l 씩 로딩한 뒤 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 키트 내 포함된 wash buffer로 4회 washing을 수행한 뒤, horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies를 각 well에 처리하고, 2시간 동안 실온 incubation을 수행하였다. 그리고 나서, 다시 4회 washing을 수행한 후, substrate solution을 30분간 처리하였다. 반응이 일어나 well의 색이 푸른색으로 변할 때, stop solution을 넣고 반응을 멈추었으며, 이의 흡광도는 450 nm에서 EMax Endpoint Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다.
- [0067] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0068] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 서브스틴스 P가 처리된 8계대 중배엽 줄기세포에서 SDF-1 α , PDGF-BB, VEGF 및 PGE2의 분비 수준이 처리되지 않은 실험군보다 현저히 높게 나타나는 것이 확인되었다. 즉, 서브스틴스 P 처리에 따라 중배엽 줄기 세포의 증식, 생존율 증진 및 면역 조절 기능 증진에 도움을 주는 인자들의 발현이 크게 증가되는 것이 확인되었다.

도면

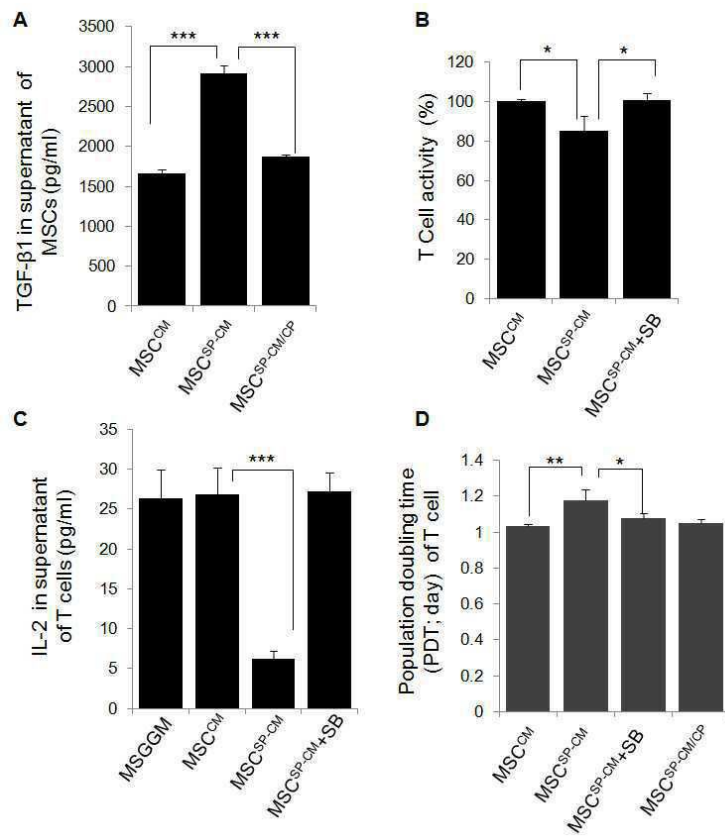
도면1



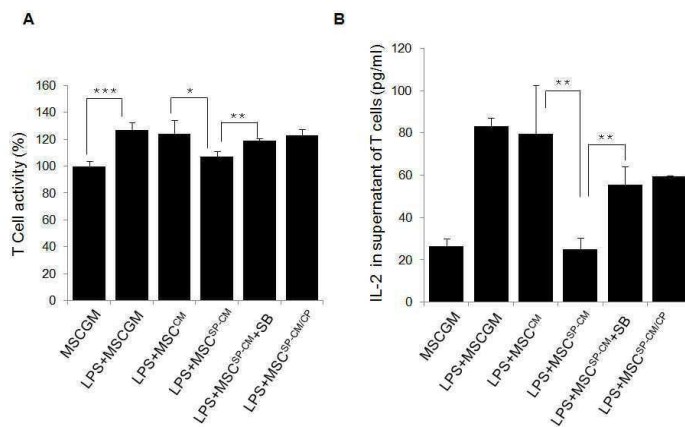
도면2



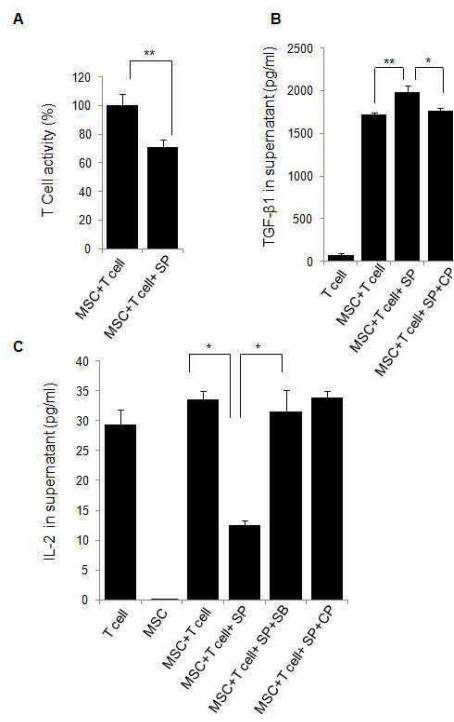
도면3



도면4



도면5



도면6

