(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0154465
(43) 공개일자 2021년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 19/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0668 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0071501
(22) 출원일자 2020년06월12일
심사청구일자 2020년06월12일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박주원
서울특별시 양천구 목동동로 350, 512동 106호(목동, 목동신시가지아파트5단지)
유경하
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호(삼성동, 삼성 대우 멤버스카운티1차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김경교, 양용, 백서일

전체 청구항 수 : 총 14 항

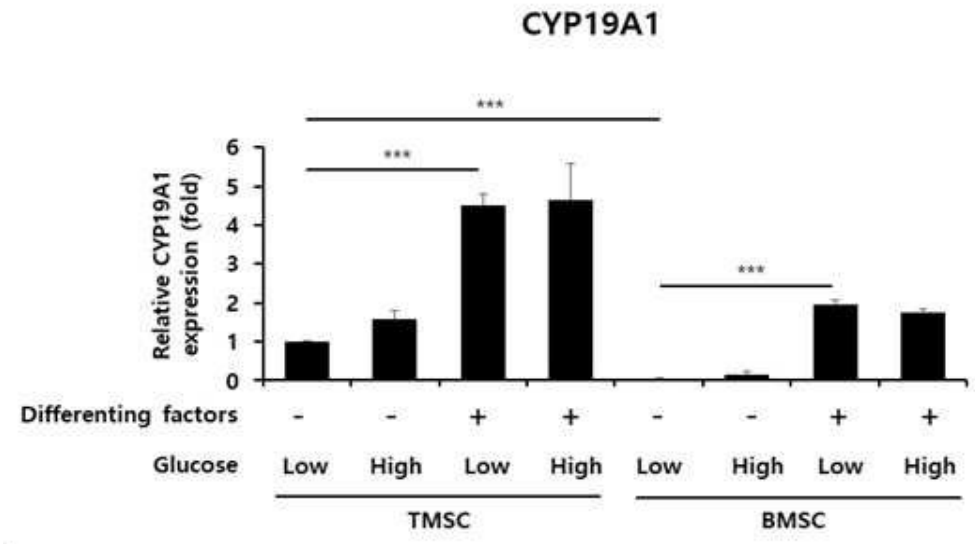
(54) 발명의 명칭 **줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법**

(57) 요 약

본 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법을 제공한다.

본 발명의 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화 방법은 에스트로겐 분비 세포로의 높은 분화능을 보이기 때문에 짧은 시간 내 대량의 에스트로겐 분비 세포의 확보가 가능하며, 폐경기 관련 증후군 또는 질환의 치료제로써 우수한 이용가능성을 가진다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 19/10 (2018.01)
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2501/113 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자
김유희
경기도 파주시 동패로 117, 202동 503호 (동패동, 교하 벽산아파트)
김희연
부산광역시 기장군 기장읍 차성동로 25
우소연
서울특별시 동대문구 한빛로 73, 103동 1901호 (용두동, 용두롯데캐슬리치)
조경아
서울특별시 강남구 개포로110길 43, 104동 605호(일원동, 개포한신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114929
과제번호	2017R1E1A1A01073021
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	에스트로겐 결핍 골다공증 치료를 위한 편도줄기세포의 응용
기 여 율	8/10
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030786
과제번호	HI18C2392030020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발(R&D)
연구과제명	편도유래중간엽줄기세포 공여자 다양성 극복을 위한 선별법 개발
기 여 율	2/10
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함하는 배양 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계;를 포함하는 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양배지는 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양은 3일 내지 30일 동안 수행되는 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배양 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 기반 배지인 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 DMEM 기반 배지가 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) 또는 이들 모두를 포함하는 저농도 글루코스 DMEM 배지인 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 배양배지는 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine) 및 포스콜린(Forskolin)을 포함하는 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

배양 배지는 5 내지 50 μM의 레티놀산(Retinoic acid), 10 내지 100 ng/ml의 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 50 내지 500 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 50 내지 500 nM의 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함하는 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

배양 배지는 5 내지 50 μM의 레티놀산(Retinoic acid), 10 내지 100 ng/ml의 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 50 내지 500 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor), 50 내지 500 nM의 덱사메타손(Dexamethasone), 0.1 내지 5 μM의 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine) 및 5 내지 50 μM의 포스콜린(Forskolin)을 포함하는 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 인간의 편도, 지방조직, 골수, 말초혈액, 또는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포인 것인 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법.

청구항 10

레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함하는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화 유도용 배양 배지 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 배양 배지 조성물은 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화 유도용 배양 배지 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 제조된 에스트로겐 분비 세포.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 에스트로겐 분비 세포는 3β-HSD (3β-Hydroxysteroid dehydrogenase), CYP17A1(steroid 17α-monooxygenase) 및 CYP19A1(Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현이 증가된 것인, 에스트로겐 분비 세포.

청구항 14

제12항에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐경(menopause)은 월경의 멈춤, 즉 '월경이 중지되는 것'을 의미하며, 의학적으로 폐경은 마지막 월경이 있은 후, 1년 동안 월경이 없는 경우로 정의한다. 난소 기능의 소실로 월경이 영구히 없어지는 것이며, 대부분의 여성들은 45~55세 사이에 자연 폐경을 맞게 되지만, 난소수술 등으로 수술적 폐경이 되는 경우도 있고, 40세 전에 자연 폐경이 되면 '조기 폐경'이라고 한다.

[0003] 폐경은 여성의 많은 질환과 관련이 있는데, 골밀도 감소(골다공증), 근육양 감소, 심혈관 질환 증가가 대표적인 예이다. 에스트로겐은 골밀도를 유지하는 중요한 호르몬이다. 이 호르몬이 감소하면 골밀도도 떨어진다. 폐경

후 5년이 지나면 폐경 전에 비해 골밀도가 절반으로 감소한다. 이를 방치하면 척추가 변형돼 뒤로 볼록 튀어나오면서 허리가 짧아지고 앞 가슴뼈가 늘어나는 노인 체형으로 바뀌게 된다. 키도 줄어든다. 혈관도 에스트로겐의 보호 작용을 받지 못해 동맥경화증 등의 심혈관계 질환 위험이 높아진다. 또한, 폐경은 열성 홍조, 우울증, 기억력 감퇴 증의 증상을 동반한다.

[0004] 폐경 후 여성은 삶의 질 향상, 폐경과 관련된 질환 예방 및 치료, 노화 지연을 목적으로 호르몬을 복용하는 치료를 현재 임상에서 시행하고 있지만, 약을 복용하는 불편함, 유방암과 자궁암의 위험성 증가 등의 부작용이 있다.

[0005] 에스트로겐 분비 세포가 개발되어 이를 이식한다면, 한 번의 세포 주입으로 오랜 기간 에스트로겐을 공급할 수 있을 것으로 예측되므로, 매번 약을 복용하는 불편함을 줄일 수 있다. 에스트로겐 공급 방법에 대한 또 다른 대안으로 줄기세포로부터 에스트로겐을 생산하는 세포를 분화/증식시켜 폐경 여성 및 에스트로겐 결핍 환자에 이식함으로써 에스트로겐 치료를 시도하는 연구가 몇 건 진행되었으나, 줄기세포로부터 효과적으로 에스트로겐을 분비하는 분화법 개발이 현재 되어있지 않고, 상이한 유전적 기원, 유래 및/또는 배경을 가지는 중간엽 줄기세포들의 경우 중간엽 줄기세포를 규정하는 일부 기준들에 대해서는 서로 유의적 차이를 나타내지 않지만, 통상적으로 각각의 생체 내 활성에 있어서는 매우 큰 차이를 나타내는바, 특정 유래의 줄기세포로부터 분화 방법 및 분화된 세포 특성에 대한 확인이 필요하다.

[0006] 이에 따라, 에스트로겐 분비 세포로의 높은 분화능을 보일 수 있는 특정 줄기세포로부터 최적의 분화 방법을 확인하여 인체 적용에 적합한 에스트로겐 세포 및 에스트로겐 생산방법을 확보하는 방안에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Reproductive Sciences Vol. 25(5) 712-726 (2017. 8.)

(비특허문헌 0002) J Clin Endocrinol Metab, 98(9):3713-3723(2013. 9.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor), 덱사메타손(Dexamethasone), 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 배양 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 줄기세포로부터 에스트로겐 분비세포로 분화용 배양 배지 조성물에 관한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 에스트로겐 분비 세포에 관한 것이다.

[0011] 또한, 본 발명은 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 폐경기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0012] 또한, 본 발명은 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 폐경기 증후군의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 인체 적용에 적합한 에스트로겐 분비 세포의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 중간엽 줄기세포, 특히 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포를 단기간에 대량 생산하는 방법을 발명하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명의 일 측면에 있어서, 본 발명은 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor), 덱사메타손(Dexamethasone), 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′ -deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 배양 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법을 제공한다.

[0015] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되고, 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있는 특성이 있으며, 분화 자극에 따라 상이한 세포로도 분화될 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0016] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포이며, 일부 줄기세포는 다분화능 또는 단분화능의 잠재력을 지닌다.

[0017] 본 발명에서 용어, "중간엽 줄기세포"는 미분화 상태에서 무한 증식능력(self-renewal capacity)과 더불어 특정한 분화 유도 자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 능력(multi-differentiation potency)을 가진 세포를 말한다. 본 발명의 중간엽 줄기세포는 분화능 및 증식능을 갖는 모든 세포일 수 있으며, 인간(human), 원숭이(monkeys), 돼지(pigs), 말(horses), 소(cows), 양(sheeps), 개(dogs), 고양이(cats), 생쥐(mice), 토끼(rabbits) 등의 모든 동물로부터 유래할 수 있으며, 바람직하게는 인간 유래이며, 더욱 바람직하게는 인간의 편도, 지방조직, 골수, 말초혈액, 또는 제대혈 등에서 분리된 것일 수 있으며, 가장 바람직하게 인간의 편도로부터 분리되거나 유래된 것일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 용어 "편도"란, 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여, 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직을 의미한다. 상기 편도는 인두편도, 귀인두관편도, 구개편도, 혀편도 등을 포함한다. 본 발명에 있어서 상기 편도는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 제공하는 원천조직으로 사용된다. 본 발명의 용어 "편도 유래 중간엽 줄기세포"는 편도에서 유래한 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)를 의미한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 에스트로겐 분비 세포란 예를 들어, 난소 과립막 유사 세포(Ovarian Granulosa-like Cell), 난소 여포 유사 세포(ovarian follicle-like cell)와 같이 에스트로겐 분비능을 가지는 세포일 수 있다. 보다 구체적으로 분화 인자로 3β-HSD (3β-Hydroxysteroid dehydrogenase), CYP17A1(steroid 17α-monooxygenase) 및 CYP19A1(Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현이 증가된 세포일 수 있다. 이들은 안드로스테네디온(Androstenedione) 또는 테스토스테론(testosterone)을 에스트론(esterone) 및 에스트라디올(estradiol)로 변환시키는 효소 유전자로 에스트로겐 분비에서 핵심 역할을 한다(도 1 참조).

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 배양 배지는 줄기세포 배양 및/또는 분화를 위한 배지의 경우 어떠한 것이라도 사용 가능하다.

[0021] 바람직하게, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 기반 배지일 수 있으며, 바람직하게는 저농도 글루코스 DMEM(Low glucose DMEM) 기반 배지를 사용할 수 있다.

[0022] 또한, 상기 DMEM 기반 배지는 DMEM, 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)을 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 5 내지 20% FBS, 0.5 내지 2% 페니실린/스트렙토마이신을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 무혈청 배지를 이용하는 것일 수도 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포를 분화하기 위한 방법은 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 덱사메타손(Dexamethasone)로 조성된 배양 배지를 사용하는 것이 바람직하다.

[0024] 즉, 본 발명은 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함하는 배양 배지에서 중간

엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법을 제공한다.

[0025] 바람직하게는 상기 배양 배지는 5 내지 50 μM의 레티놀산(Retinoic acid), 10 내지 100 ng/ml의 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 50 내지 500 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 50 내지 500 nM의 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM의 레티놀산(Retinoic acid), 10 내지 30 ng/ml의 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 100 내지 300 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 150 내지 350 nM의 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 배양 배지는 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 성분들은 줄기세포의 종류, 줄기세포의 계대 등을 고려하여 하나 이상이 추가로 배양배지에 포함될 수 있다.

[0029] 바람직하게, 상기 배양 배지는 0.1 내지 5 μM의 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 5 내지 50 μM의 포스콜린(Forskolin), 200 ng/ml 내지 1,000 ng/ml의 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 1 내지 20 nM의 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 성분들은 줄기세포의 종류, 줄기세포의 계대 등을 고려하여 하나 이상이 추가로 배양배지에 포함될 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor), 덱사메타손(Dexamethasone), 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine) 및 포스콜린(Forskolin)을 포함하는 배양 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하여 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화할 수 있다.

[0031] 본 발명의 구체적인 일실시양태에 따르면, 배양 배지는 5 내지 50 μM의 레티놀산(Retinoic acid), 10 내지 100 ng/ml의 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 50 내지 500 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 50 내지 500 nM의 덱사메타손(Dexamethasone), 0.1 내지 5 μM의 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine) 및 5 내지 50 μM의 포스콜린(Forskolin)을 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 일시양태에 따르면, 5 내지 20 μM의 레티놀산(Retinoic acid), 10 내지 30 ng/ml의 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 100 내지 300 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor), 150 내지 350 nM의 덱사메타손(Dexamethasone), 0.5 내지 3 μM의 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine) 및 10 내지 30 μM의 포스콜린(Forskolin)을 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 배양 배지에서 중간엽 줄기세포의 배양은 3일 내지 30일 동안 수행될 수 있으며, 바람직하게는 4일 내지 21일 동안 수행될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4일 내지 15일 동안 수행될 수 있다.

[0034] 본 발명의 에스트로겐 분비 세포를 유도하는데 사용되는 분화 배양 배지는 구체적인 성분으로 저농도 글루코스 DMEM 하의 FBS, 페니실린/스트렙토마이신, 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 덱사메타손(Dexamethasone)를 모두 포함하는 구성을 가지는데, 상기 모든 성분들을 포함하는 분화배양 배지를 이용하면 에스트로겐 분비 세포로의 분화에 우수한 효과를 가진다.

[0035] 또한, 상기 배양 배지는 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate) 중 하나 이상을 더 포함하는 배양 배지를 이용하여, 배양을 추가로 적절히 조절 가능하다.

[0036] 본 발명의 다른 일 측면에 있어서, 본 발명은 상기 분화 방법에 따라 제조된 에스트로겐 분비 세포를 제공한다.

[0037] 본 발명에 따라 제조된 에스트로겐 분비 세포는 예를 들어, 난소 과립막 유사 세포(Ovarian Granulosa-like Cell), 난소 여포 유사 세포(ovarian follicle-like cell)와 같이 에스트로겐 분비능을 가지는 세포일 수 있다. 이러한 에스트로겐 분비능을 가지는 세포는 β-HSD (3β-Hydroxysteroid dehydrogenase), CYP17A1(steroid 17α-monooxygenase) 및 CYP19A1(Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1)로 이루

어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 증가시켜 에스트로겐의 분비를 촉진시킬 수 있다.

[0038] 이들은 에스트로겐 생성 작용에 중요한 인자들로서, 이 중 상기 CYP19A1은 에스트로겐 생성에 가장 핵심적인 인자로 에스트로겐 분비 세포의 대표적인 마커이다.

[0039] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 에스트로겐 분비 세포에 대해 PCR, ELISA 및 웨스턴 블롯팅 등을 통해 β-HSD, CYP17A1 및 CYP19A1 발현을 분석한 결과, 4일 이상 분화된 에스트로겐 분비 세포는 이의 마커인 β-HSD, CYP17A1 및 CYP19A1 의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0040] 본 발명에 따라 제조된 에스트로겐 분비 세포는 계대배양이 가능하고, 동결 후 해동하여 사용이 가능하다. 즉, 본 발명의 에스트로겐 분비 세포는 계대배양하여도 재현성이 우수한 특성을 나타내고, 장시간 보관 후에도 정상적인 에스트로겐 분비 세포로서 사용이 가능한 특성을 나타낸다. 또한, 본 발명의 에스트로겐 분비세포는 플레이트에 부착한 상태 또는 구(sphere)형태의 세포 응집(aggregation) 상태에서 배양이 가능하며 두 배양 형태 모두에서 에스트로겐 분비 세포로서 사용이 가능한 특성을 나타낸다.

[0041] 본 발명은 또한, 레티놀산(Retinoic acid), 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1), 섬유 아세포 성장 인자(Basic fibroblast growth factor) 및 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함하는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화 유도용 배양 배지 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 배양 배지 조성물은 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-aza-2′-deoxycytidine), 포스콜린(Forskolin), 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate) 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0043] 상기 배양 배지 조성물과 관련하여 앞서는 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법의 내용이 적절히 변형되어 적용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 일 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 폐경기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명의 또 다른 일 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 폐경기 증후군 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0046] 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 폐경기 질환에 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 폐경기 질환은 폐경에 의해 유발되는 골 질환일 수 있으며, 상기 골 질환은 폐경에 따른 I형 골다공증, 난소적출술에 따른 I형 골다공증, 척추관협착증, 척추압박골절 및 골관절염 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 폐경기 증후군은 동맥경화성 심혈관병, 정맥혈전증, 빈맥, 안면홍조, 혈관 운동 난조로 인한 신열, 가슴 두근거림, 발한, 피부 건조, 피로, 골다공증, 요실금, 배뇨곤란, 오줌 소태, 재발성 비뇨기계 염증, 질염, 위축성 질염, 소화불량, 탈모증, 성욕감퇴, 성교통증, 질건조증(vaginal dryness), 방광염, 배뇨통, 급뇨, 단기 기억장애, 수면 장애(sleep disorder), 집중력 이상(mental awareness problem), 관절통, 근골격 질환, 심계항진(palpitations), 우울증, 불안증(anxiety) 및 과민성(irritability) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 명세서에서 상기 "예방"이란 상기 약학 조성물의 투여로 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 "치료"란 상기 약학 조성물의 투여로 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0050] 본 발명의 약학 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이를 한정하지 않는다. 추가로, 상기 약학 조성물은

단독 사용하거나 기존에 사용된 에스트로겐 분비 활성을 가지는 물질을 포함할 수 있다.

[0051] 상기 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 치료용 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제, 분무제 등이 바람직하다. 또한, 상기 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군 치료용 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 1.0×10^{5} 내지 1.0×10^{8} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^{6} 내지 1.0×10^{7} 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물을 제형화하는 경우 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명의 상기 약학 조성물은 개체에 투여하여 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "개체" 또는 “대상체”는 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군을 가지고 있으며, 본 발명의 상기 약학 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 말, 양, 돼지, 염소, 개 등의 포유동물을 의미하나, 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0055] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 약학 조성물은 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포 외에 동일 또는 유사한 약효를 나타내는 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명은 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 약학 조성물의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명에 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 예방 또는 치료에 유효한 에스트로겐 분비 세포 양을 나타낸다.

[0060] 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 중간엽 줄기세포로부터 분화된 본 발명의 에스트로겐 분비 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계;를 포함하는 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 치료 방법을 제공한다.

[0061] 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함으로써 징후의 발현 전에 질병 그 자체를 다룰 뿐만 아니라, 이의 징후를 저해하거나 피하는 것을 또한 포함한다. 질환의 관리에 있어서, 특정 활성 성분의 예방적 또는 치료학적 용량은 질병 또는 상태의 본성(nature)과 심각도, 그리고 활성 성분이 투여되는 경로에 따라 다양할 것이다. 용량 및 용량의 빈도는 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이다. 적합한 용량 용법은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 쉽게 선택될 수 있다.

[0062] 상기 대상체는 인간을 포함하여, 포유류 등일 수 있다.

[0063] 상기 치료 방법은 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 조성물과 함께 질환 치료에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 더 포함할 수 있으며, 추가적인 활성 제제는 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 약학 조성물과 함께 시너지 효과 또는 보조적 효과를 나타낼 수 있다.

[0064] 본 발명은 또한 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포를 포함하는 조성물의 용도를 제공하고자 한다. 약제의 제조를 위한 상기 에스트로겐 분비 세포는 허용되는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다.

[0065] 본 발명은 폐경기로 인해 유발되는 폐경기 질환 또는 폐경기 증후군의 치료를 위한 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포로부터 분화된 에스트로겐 분비 세포를 제공한다.

[0066] 본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

[0067] 본 발명의 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화 방법은 에스트로겐 분비 세포로의 높은 분화능을 보이기 때문에 짧은 시간 내 대량의 에스트로겐 분비 세포의 확보가 가능하며, 폐경기 관련 증후군 또는 질환의 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 에스트로겐(에스트롤 및 에스트라디올)이 체내에서 합성되는 과정을 모식화한 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 분화 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화시켜 RT-PCR을 통해 CYP19A1 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 분화 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포를 분화시켜 RT-PCR을 통해 CYP11A1, CYP17A1 및 CYP19A1 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 분화 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화시켜 RT-PCR을 통해 배양 기간에 따른 CYP19A1의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 분화 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화하기 전 및 후의 3β-HSD, CYP17A1 및 CYP19A1 유전자 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 분화 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로 분화시켜 웨스턴 블랏팅을 통해 CYP19A1 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 편도 유래 줄기세포로 분화된 에스트로겐 분비 세포에서 분비된 에스트로겐을 배양액을 이용한 ELISA 검사를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공

되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0071] **제조예 1: 에스트로겐 분비 세포 분화를 위한 중간엽 줄기세포 배양**

[0072] **제조예 1-1: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양**

[0073] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC) 는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻었다. 편도 조직을 3 mm 이하로 잘게 잘라서 210 U/ml 콜라게나제(collagenase) type I이 포함된 RPMI 1640 배지(Invitrogen)에 넣어 37℃에서 30분 반응시킨 후 철망에 걸러 세포를 분리하였다. 세포를 RPMI 1640/10% FBS 배지로 2번 씻어준 후 Ficoll-Paque(Sigma aldrich) 밀도 원심분리를 하여 단핵 세포를 분리하여 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium), 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신(Penicillin/Streptomycin) 배지에서 배양하였다. 48시간 후 바닥에 붙어 자라는 유착 세포를 얻어 5 passage가 되도록 계대배양하였다. 실험을 위해 편도 유래 중간엽 줄기세포는 passage 5 내지 8 사이를 실험에 사용하였다.

[0074] 지방 유래 중간엽 줄기세포(AT-MSC)는 RNL Bio에서 제공되는 동일 계대의 세포를 사용하였으며, 골수 중간엽 줄기세포의 경우 서울 연세대학교 세브란스 병원 세포치료센터로부터 제공되는 동일 계대의 세포를 사용하였다.

[0076] **실시예 1: 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화**

[0077] **실시예 1-1: 배양 배지 1을 이용한 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포 분화**

[0078] 편도 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포 각각으로부터 에스트로겐 분비 세포로부터 분화를 유도하기 위하여 하기 [표 1]에 개시된 배지 조성을 갖는 배양 배지 1로 중간엽 줄기세포를 배양하였다.

[0079] 구체적으로, DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), 10% 태아 소 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신를 포함하는 배지 하에 10 μM 레티놀산(Retinoic acid) (Sigma-aldrich), 20 ng/ml 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor 1) (Peprotech), 200 ng/ml 섬유 아세포 성장 인자(fibroblast growth factor-basic) (Peprotech), 250 nM 덱사메타손(Dexamethasone) (Sigma-aldrich)을 첨가하여 제조된 배양 배지로 편도 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포 각각을 4 내지 21일간 배양하여 분화된 에스트로겐 분비 세포를 획득하였다.

표 1

[0080]

분화 인자(Differentiating factors)	농도
레티놀산	10 μM
인슐린 유사 성장 인자-1	20 ng/ml
섬유 아세포 성장 인자	200 ng/ml
덱사메타손	250 nM
Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% 태아 소 혈청 + 1% 페니실린/스트렙토마이신	

[0082] **실시예 1-2: 배양 배지 2를 이용한 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포 분화**

[0083] 편도 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포 각각으로부터 에스트로겐 분비 세포로부터 분화를 유도하기 위하여 하기 [표 2]에 개시된 배지 조성을 갖는 배양 배지 2로 중간엽 줄기세포를 배양하였다.

[0084] 구체적으로, DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), 10% 태아 소 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신를 포함하는 배지 하에 10 μM 레티놀산(Retinoic acid) (Sigma-aldrich), 20 ng/ml 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor 1) (Peprotech), 200 ng/ml 섬유 아세포 성장 인자(fibroblast growth factor-basic) (Peprotech), 250 nM 덱사메타손(Dexamethasone) (Sigma-aldrich), 25 μM 포스콜린(Forskolin)

(Sigma-aldrich), 1 μM 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-Aza-2'-deoxycytidine) (Sigma-aldrich), 20 nM 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Sigma-aldrich)을 첨가하여 제조된 배양 배지로 편도 유래 중간엽 줄기세포를 4 내지 21일간 배양하여 분화된 에스트로겐 분비 세포를 획득하였다.

표 2

[0085]

분화 인자(Differentiating factors)	농도
레티놀산	10 μM
인슐린 유사 성장 인자-1	20 ng/ml
섬유 아세포 성장 인자	200 ng/ml
덱사메타손	250 nM
포스콜린	25 μM
5-아자-2'-데옥시시티딘	1 μM
Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% 태아 소 혈청 + 1% 페니실린/스트렙토마이신	

[0087] **실시예 1-3: 배양 배지 3을 이용한 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포 분화**

[0088] 편도 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 유래 중간엽 줄기세포 각각으로부터 에스트로겐 분비 세포로부터 분화를 유도하기 위하여 하기 [표 3]에 개시된 배지 조성을 갖는 배양 배지 3으로 중간엽 줄기세포를 배양하였다.

[0089] 구체적으로, DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin를 포함하는 배지 하에 10 μM 레티놀산(Retinoic acid) (Sigma-aldrich), 20 ng/ml 인슐린 유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor 1) (Peprotech), 200 ng/ml 섬유 아세포 성장 인자(fibroblast growth factor-basic) (Peprotech), 250 nM 덱사메타손(Dexamethasone) (Sigma-aldrich), 25 μM 포스콜린(Forskolin) (Sigma-aldrich), 1 μM 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-Aza-2'-deoxycytidine) (Sigma-aldrich), 20 nM 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Sigma-aldrich), 500 ng/ml 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 및 20 nM 12-O-테트라데카노일포르볼- 13-아세트산(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate)을 첨가하여 제조된 배양 배지로 편도 유래 중간엽 줄기세포를 4 내지 21일간 배양하여 분화된 에스트로겐 분비세포를 획득하였다.

표 3

[0090]

분화 인자(Differentiating factors)	농도
레티놀산	10 μM
인슐린 유사 성장 인자-1	20 ng/ml
섬유 아세포 성장 인자	200 ng/ml
덱사메타손	250 nM
포스콜린	25 μM
5-아자-2'-데옥시시티딘	1 μM
프로스타글란딘 E2	500 ng/ml
12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세트산	20 nM
Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% 태아 소 혈청 + 1% 페니실린/스트렙토마이신	

[0092] **실시예 2: 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화능 및 특성 확인**

[0093] **실시예 2-1: CYP19A1 발현 확인을 통한 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화능 및 특성 확인**

[0094] Real-time PCR을 통해 배양 배지 1을 이용하여 중간엽 줄기세포로부터의 에스트로겐 분비 세포의 분화능을 확인하기 위해 CYP19A1 발현 정도를 확인하였다.

[0095] CYP19A1은 안드로스테네디온(Androstenedione) 또는 테스토스테론(testosterone)을 에스트론(esterone) 및 에스트라디올(estradiol)로 변환시키는 효소로 에스트로겐 분비에서 가장 핵심 역할을 하는 효소인 바(도 1 참

조), CYP19A1 유전자 발현 정도를 실시간 중합효소 연쇄 반응(real-time PCR) 분석을 통하여 확인하였다.

[0096] 구체적으로, RNeasy mini kit (Qiagen Inc.)를 이용하여, 제조자의 지시서에 따라 총 RNA를 추출하였다. Superscript Ⅱ (Invitrogen)와 oligo-d(T)20 프라이머를 이용하여 42℃에서 1시간, 72℃에서 15분 반응하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA에 대한 Quantitative real-time PCR은 SYBR® Premix Ex Taq™ kits (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여, ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific,Waltham, MA, USA)에서 수행하였다. CYP19A1 유전자의 상대적 발현량은 comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 방법으로 계산하였으며, 모든 측정값은 삼중(triplicate)으로 수행하였다.

[0097] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)와 골수 유래 중간엽 줄기세포(BMSC)에서 배양 배지 1에서 에스트로겐 분비 세포로 분화시켰을 때 TMSC의 CYP19A1의 발현이 높다.

[0098] 또한, 이 결과를 통해 본 당(glucose)의 농도는 이 효소 발현에 큰 영향을 미치지 않은 것을 알 수 있는 바, 에스트로겐 분비 세포의 분화를 위해 저농도 글루코스 DMEM 기반 배지를 사용하였다.

[0100] **실시예 2-2: CYP11A1, CYP17A1 및 CYP19A1 발현 확인을 통한 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화능 및 특성 확인**

[0101] Real-time PCR을 통해 CYP11A1, CYP17A1 및 CYP19A1 발현을 확인하여 배양 배지 1을 이용하여 중간엽 줄기 세포로부터의 에스트로겐 분비 세포의 분화능 측면에 있어서 편도 유래 줄기세포를 사용하는 것이 에스트로겐 분비 세포로의 분화에 높은 효과를 가짐을 확인하였다.

[0102] 구체적으로, CYP19A1 외에 에스트로겐 생성 과정에서 중요한 역할을 하는 Cholesterol을 Pregnenolone으로 바꾸는 효소인 CYP11A1 및 Pregnenolone을 17α-hydroxypregnenolone로 7α-hydroxyprogesterone을 다시 5-androstenediol로 변환하는 효소인 CYP17A1 발현 정도를 실시간 중합효소 연쇄 반응(real-time PCR) 분석을 통하여 추가로 확인하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0103] 도 3을 참조하면, 본 발명에 따른 에스트로겐 분비 세포의 분화 방법으로 분화할 때 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)에서 에스트로겐 분비 정도를 나타내는 유전자들의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 한편, 20 nM TPA를 분화를 위한 기본 배양 배지에 첨가하면 CYP11A1은 감소하고 CYP19A1은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과에 따라 분화를 위한 배양 배지로는 TPA를 제외한 기본 배양 배지를 사용하였다.

[0106] **실시예 2-3: 배양 기간에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포의 분화 특성 확인**

[0107] 본 발명의 배양 배지 1과 대조군에 대해 배양 기간에 따른 에스트로겐 분비 세포로의 분화능을 확인하기 위해 Real-time PCR을 통해 CYP19A1 발현 여부를 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0108] 도 4를 참조하면, 배양 4일째에 대조군과 대비하여 본 발명에 따른 배양 배지 1을 이용하여 편도 유래 중간엽 줄기세포가 배양된 경우(Differentiated cells) CYP19A1의 mRNA 발현이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, 배양 14일 후에도 대조군에 대비하여서도 본 발명의 배양 배지 1에서 배양된 경우 CYP19A1의 발현이 현저히 높은 것으로 나타났다.

[0110] **실시예 2-4: 3β-HSD, CYP17A1 및 CYP19A1 발현 확인을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화능 및 특성 확인**

[0111] Real-time PCR을 통해 에스트로겐 합성에 있어서 중요한 효소 유전자인 3β-HSD, CYP17A1 및 CYP19A1 발현을 분화 전(Undifferentiated TMSC) 및 배양 배지 2를 이용한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터의 에스트로겐 분비 세포의 분화 후(Differentiated TMSC)에서 확인하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0112] 도 5를 참조하면, 본 발명의 배양 배지 2에서 편도 유래 줄기세포를 배양한 결과 에스트로겐 분비 세포(Differentiated TMSC) 분화능이 높은 것으로 나타났다.

[0114] **실시예 2-5: 웨스턴 블롯팅을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포로의 분화능 확인**

[0115] 웨스턴 블롯팅을 통해 에스트로겐 합성에 있어서 가장 중요한 효소 유전자인 CYP19A1 발현을 분화 전 및 배양 배지 2를 이용한 편도 유래 중간엽 줄기세포에서의 분화 후(Differentiated cells)에서 확인하였다.

[0116] 웨스턴 블롯팅 분석 결과는 도 6과 같다.

[0117] 도 6을 참조하면, 배양 21일째까지 CYP19A1 발현이 나타나는 것을 확인하였다.

[0119] **실시예 2-6: ELISA 검사를 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 에스트로겐 분비 세포에 의한 에스트로겐 분비량 변화 확인**

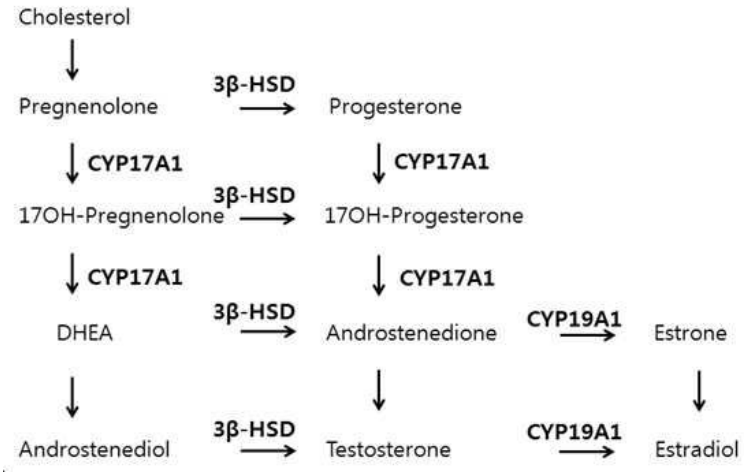
[0120] 대조군과 본 발명의 배양 배지 2를 이용하여 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 에스트로겐 분비 세포(Differentiated cells)에 의해 분비된 에스트로겐을 ELSA로 측정하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0121] 도 7을 참조하면, 에스트로겐 생성 과정 중 중간 생성물인 DHEA가 존재하는 경우 본 발명의 배양 배지 2를 이용하여 편도 유래 줄기세포에서 분화된 에스트로겐 분비 세포(Differentiated cells)로 인해 에스트로겐이 분비되는 것을 알 수 있다.

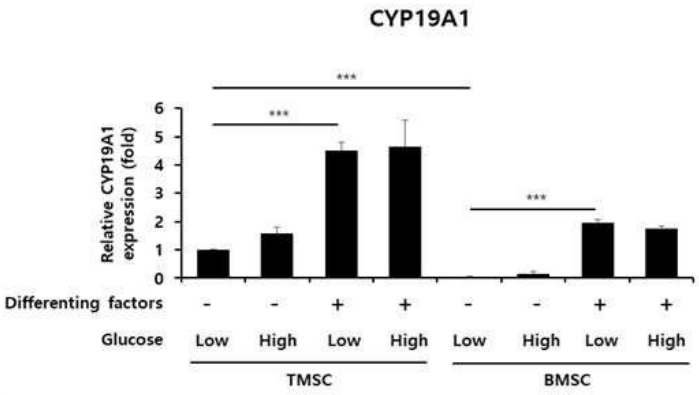
[0122] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

도면

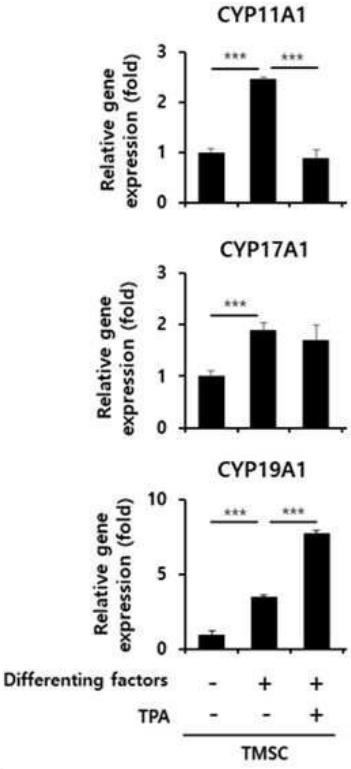
도면1



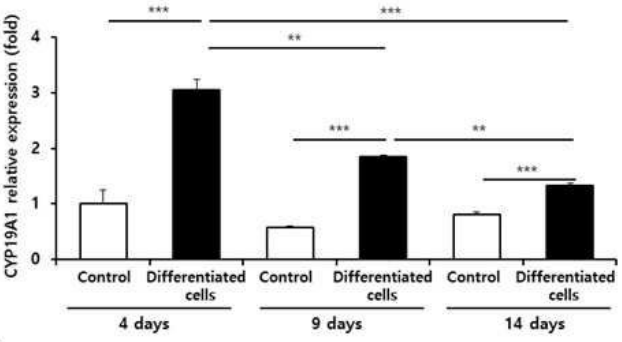
도면2


CYP19A1
Relative CYP19A1 expression (fold)
Differenting factors
Glucose
Low
High
TMSC
BMSC

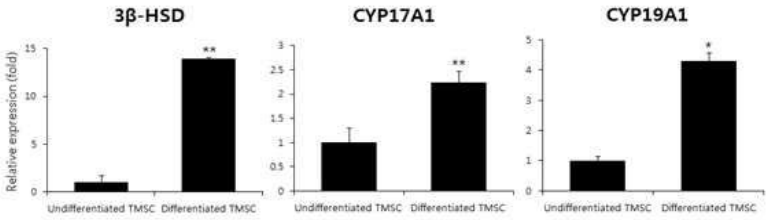
도면3


CYP11A1
CYP17A1
CYP19A1
Relative gene expression (fold)
Differenting factors
TPA
TMSC

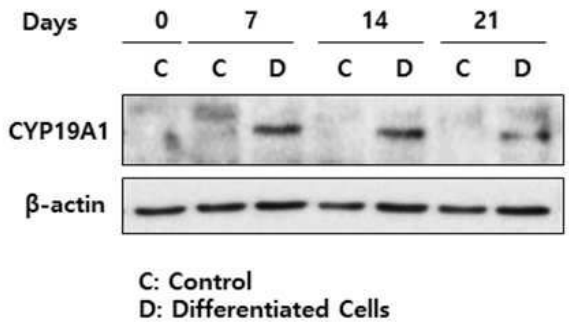
도면4


CYP19A1 relative expression (fold)
Control
Differentiated cells
4 days
9 days
14 days

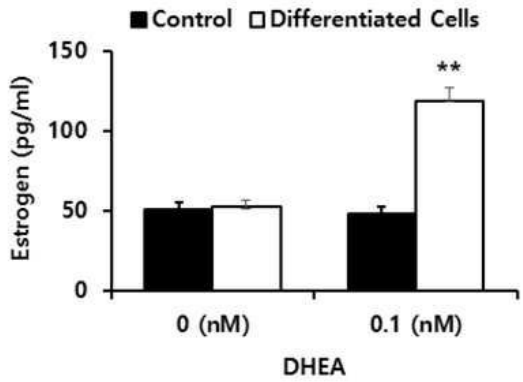
도면5


3β-HSD
CYP17A1
CYP19A1
Relative expression (fold)
Undifferentiated TMSC
Differentiated TMSC

도면6


Days
0
7
14
21
C C D C D C D
CYP19A1
β-actin
C: Control
D: Differentiated Cells

도면7


Control
Differentiated Cells
Estrogen (pg/ml)
150
100
50
0
0 (nM)
0.1 (nM)
DHEA