(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0032459
(43) 공개일자 2015년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2014-0080732
(22) 출원일자 2014년06월30일
심사청구일자 2014년06월30일
(30) 우선권주장
1020130112196 2013년09월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박성규
서울 송파구 올림픽로 99, 134동 801호 (잠실동, 잠실엘스아파트)
장문석
서울 용산구 이촌로64길 15, 105동 102호 (이촌동, 엘지한강자이아파트)
김도림
인천 계양구 당미길 43, 102동 1304호 (동양동, 동양동휴먼빌아파트)
(74) 대리인
이원희

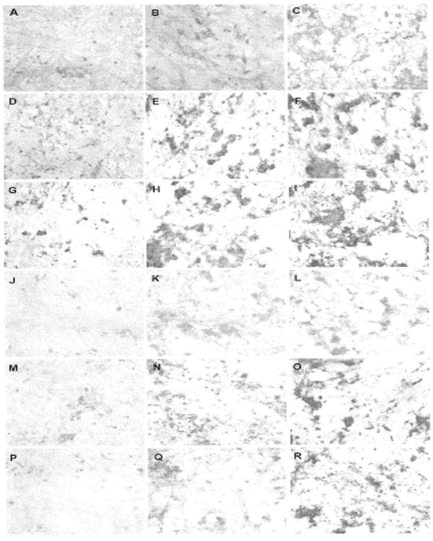
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **벤조일아코닌을 이용한 중배엽 줄기세포의 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법**

(57) 요 약

본 발명은 벤조일아코닌(benzoylaconine)을 유효성분으로 함유하는 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법에 관한 것으로서, 마우스 골수로부터 분리된 중배엽 줄기세포에 상기 벤조일아코닌을 처리하여 중배엽 줄기세포의 골세포 분화가 현저히 증가하므로, 상기 벤조일아코닌을 골세포 분화 유도용 조성물 및 골세포 분화 유도 방법에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子) 추출물을 유효성분으로 함유하는 중배엽 줄기 세포(MSC)로 부터 골세포(bone cell) 분화 유도용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서 상기 부자 추출물은 물, C_1 내지 C_2 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 중배엽 줄기세포(MSC)로 부터 골세포(bone cell) 분화 유도용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 중배엽 줄기세포(MSC)로 부터 골세포(bone cell) 분화 유도용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 중배엽줄기세포는 마우스 골수로 부터 유래된 것을 특징으로 하는 골세포(bone cell) 분화 유도용 조성물.

청구항 5

벤조일아코닌(benzoylaconine)을 유효성분으로 함유한 중배엽 줄기세포(MSC)로 부터 골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 벤조일아코닌을 부자로부터 분리한 것을 특징으로 하는 골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 중배엽 줄기세포는 마우스 골수(mouse bone marrow)로 부터 유래된 것을 특징으로 하는 골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 벤조일아코닌을 0.5 ng/ml 내지 3 ng/ml 포함하는 것을 특징으로 하는 골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 9

중배엽 줄기세포를 벤조일아코닌이 포함된 배지로 배양하는 단계를 포함하는 중배엽 줄기 세포로부터 골세포 분화 유도 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벤조일아코닌(benzoylaconine)을 이용한 중배엽 줄기세포의 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 성체줄기세포(adult stem cell)는 조직의 재생 및 비 대칭세포 분열(asymmetric cell division)에 의한 줄기세포 및 세포 집합체 분화 사이에서 균형 유지하는 것에 관련되어 있다(Van Damme A et, al., Curr Gene Ther, 2, 195-209, 2002). 또한, 성체줄기세포 집합체는 대부분의 성체 조직에서 발견이 되나, 골수(bone marrow)는 줄기세포에 쉽게 접근할 수 있고, 세포 및 유전자 치료가 가능하기 때문에 좋은 줄기세포 소스이다(Van Damme A et, al., Curr Gene Ther, 2, 195-209, 2002; Kolf CM et, al., Arthrits is Res Ther, 9, 204, 2007). 중배엽 줄기세포(MSC)는 골수로 부터 유래되고, 배양할 때 플라스틱에 부착되는 성질을 나타내는 구 형태(spindle shaped) 세포의 불균일계(heterogeneous) 세포 집합체로나타난다(Tschope C et, al., Curr Pharm Des, 17, 3295-307, 2007). 중배엽 줄기세포는 마우스(mouse), 랫트(rat), 고양이(cat), 강아지(dog), 토끼(rabbit), 돼지(pig) 및 개코원숭이(baboons)를 포함하는 여러 종(species)으로부터 분리 및 배양할 수 있다. 또한, 중배엽 줄기세포는 골원성(osteogenic), 연골생성(chondrogenic), 지방형성(adipogenic), 근육전구세포주(myogenic) 및 섬유아세포 계통(fibroblastic lineages)에 속하는 기질 세포(stromal cells)가 분화되는 것을 발견하였다(Chamberlain G, et, al., Stem Cell, 25, 2739-49, 2007).

[0003] 마이토젠 유도 단백질 카이네이즈(mitrogen-activated protein kinase, MAPK) 신호에 관련된 싸이토카인(cytokine) 및 성장인자(growth factor)는 중배엽 줄기세포 증식을 향상시킨다고 알려져 있다. 혈소판 유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF) 및 섬유아세포 성장인자 2(fibroblast growth factor 2, FGF 2)는 c-Jurr N-terminal kinase(JNK) 신호를 통해 세포 증식을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Ahn HJ, et, al., FEBS Lett, 583, 2922-6, 2009). 더불어, 염기성 섬유아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)는 세포외기질 신호 조절 카이네즈 1/2 경로(extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway, ERK1/2)를 통해 인간 골수 중배엽 줄기세포 증식을 자극(stimulated) 시킨다고 알려져 있다. 그러나, 혈소판 유래 성장인자이(PDGF-BB) 또는 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)로 유도된 증식은 골원성 분화 잠재력에 영향을 미치지 않는다(Levy O, et, al., Int J Biochem Cell Biol, 40, 2606-18, 2008).

[0004] 사이토카인 및 성장인자는 자가 재생(self renewal)으로부터 분화까지 단계적인(stage) 범위에서 중요한 역할을 가지고 있다; 그러나 분자 메케니즘을 포함하고 있는 이러한 방법들은 아직까지 명확하게 정립되어 있지 않고 실험에 있어서 제한되어 있다. 게다가, 골수 중배엽 줄기세포의 증식 및 분화에 있어서, 생약(medicinal herb)을 이용하여 골수 중배엽 줄기세포의 증식 및 분화에 대해서는 알져진바 없으며, 골수에서 생약에 의해 중배엽 줄기세포의 증식 및 분화를 조절 하는 신호 경로의 관련성 보고된바 없다.

[0005] 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子), 오두(Aconiti Radix, 烏頭) 및 초오(*Aconiti ciliare tuber*, 草烏)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)의 초오속(草烏屬, Aconitum)에 속하는 다년생초본으로, 각각 오두(Aconitum carmichaeli Debx.)의 자근과 괴근을 건조 가공한 것이며, 초오는 우리나라에서 재배가 흔한 놋젓가락나물(Aconitum cliliare)을 가리키나, 한방에서는 같은 속 식물의 뿌리를 통틀어서 초오라고 한다. 생약학에서는 초오를 오두류(烏頭類)라 하여 이를 다시 초오두(草烏頭), 천오두(川烏頭)로 대별하고, 초오두에는 놋젓가락나물(Aconitum cliliare), 투구꽃(Aconitum jaluense), 이삭바꽃(Aconitum Kusnezoftii) 등의 40 여종이 존재한다.

[0006] 부자는 6월 하순부터 8월 상순에 초오속(草烏屬, Aconitum) 식물의 모근과 수근을 제거하고 자근을 가공한 것으로 그 방법에 따라 염부자, 흑순편, 백부편을 나눈다. 부자는 강심 작용이 있어 쇼크, 심장쇠약에 구급약으로 양호한 반응을 나타낸다는 연구 결과가 있으며, 각종 만성 질환으로 허증에 응용되며, 전신 및 사지관절이 아프

고 마비감, 냉감을 느끼는 증상을 치료한다. 약리작용으로 심장 근육의 수축력을 증가시키며, 수용성 부분은 동물의 혈압을 높이고, 항염, 진통, 항한랭 작용, 면역 증강 작용, 뇌하수체 및 부신피질의 흥분 작용, 혈다 강하 작용을 나타낸다. 주의 사항으로는 독성이 강하므로 법제하여 사용해야 한다.

[0007] 초오속 약물에는 맹독성 알칼로이드가 함유되어 있기 때문에 주로 외용제의 형태로 사용하며, 예를 들어, 신경통, 편두통, 치통, 류마치스, 척수신경근염 등에 진통약으로 발라서 사용한다. 그러나, 초오는 독초이기도 하지만 몸을 따뜻하게 하고 힘이 나게 하는데 좋은 약초로서, 신경통, 관절염, 중풍, 당뇨병, 또는 냉증 등에 효험이 크다. 초오를 많이 먹으면 중독되어 목숨을 잃을 수도 있지만, 조금씩 먹으면 기운이 세어지고 뱃속이 더워지며 위와 장, 간, 신장이 튼튼해진다. 하루 2~4 그램(법제한 것)을 탕약, 환약, 산제, 형태로 먹는다. 외용약으로 쓸 때는 법제하지 않은 것을 가루내서 기초제에 개어 붙이거나 식초나 술에 불려 갈아서 바른다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 부자추출물을 이용하여 마우스 골수 중배엽줄기세포로 부터 골세포로 분화를 유도한 결과, 부자추출물의 벤조일아코닌(benzoylaconine)이 마우스의 골수로부터 분리한 중배엽 줄기세포를 골세포로 유의적으로 분화시킴으로써 상기 벤조일아코닌을 중배엽 줄기세포의 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 벤조일아코닌(benzoylaconine)을 이용한 중배엽 줄기세포의 골분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0012] 본 발명은 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子)추출물을 유효성분으로 함유하는 중배엽 줄기 세포(MSC)로부터 골세포(bone cell) 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 벤조일아코닌(benzoylaconine)을 유효성분으로 함유한 중배엽 줄기세포(MSC)로 부터 골세포 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 중배엽 줄기세포를 벤조일아코닌이 포함된 배지로 배양하는 단계를 포함하는 중배엽 줄기 세포로 부터 골세포 분화 유도 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 벤조일아코닌(benzoylaconine)을 유효성분으로 함유하는 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법에 관한 것으로서, 마우스 골수로부터 분리된 중배엽 줄기세포에 상기 벤조일아코닌을 처리한 결과, 상기 중배엽 줄기세포가 골세포로의 분화가 현저히 증가하므로, 상기 벤조일아코닌을 골세포 분화 유도용 조성물 및 골세포 분화 유도 방법에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 액체크로마토그래피와 질량분석기(LC-MS/MS)를 이용한 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子)추출물의 벤조일아코닌(benzolyaconine)을 확인한 도이다.

도 2는 FACS 분석을 통한 중배엽 줄기세포를 확인한 도이다:

A: 무처리군;

B: CD105 항체 처리 군;

C: Sca-1 항체 처리 군; 및

D: CD11b 처리군.

도 3은 마우스 유래 중배엽 줄기세포로 부터 골세포 분화 및 지방세포 분화를 확인한 도이다:

A: 무처리군 중배엽 줄기세포를 알리자린 레드(Alizarin red)로 조직염색;

B: 골세포로 분화된 중배엽 줄기세포를 알리자린 레드(Alizarin red)로 조직염색;

C: 무처리군 중배엽 줄기세포를 오일 레드 오(oil red o)로 조직염색; 및

D: 지방세포로 분화된 중배엽 줄기세포를 오일 레드 오(oil red o)로 조직염색.

도 4는 각기 다른 농도의 아코니틴, 메사코니틴, 벤조일아코니틴 및 아코닌을 mBMMSCs 세포에 24시간 동안 처리한 결과를 나타낸 도이다:

A: 아코니틴(aconitine);

B: 메사코니틴(mesaconitine);

C: 벤조일아코닌(benzoylaconin);

D: 아코닌(aconine);

각 컬럼(column) 평균± S.D. (n=3); 및

*: $P<0.05$; 및

**: $P<0.01$.

도 5는 중배엽 줄기세포로부터 골세포로의 분화 촉진 효과를 알리자린 레드(Alizarin red, ph 4.0) 염색법으로 확인한 도이다:

A: 무처리군 1 주;

B: 무처리군 2 주;

C: 무처리군 3 주;

D: 골세포 배지를 이용 골세포 분화 1 주;

E: 골세포 배지를 이용 골세포 분화 2 주;

F: 골세포 배지를 이용 골세포 분화 3 주;

G: 벤조일아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

H: 벤조일아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주;

I: 벤조일아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주;

J: 아코니틴 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

K: 아코니틴 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주;

L: 아코니틴 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주;

M: 메사코티닌 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

N: 메사코티닌 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주;

O: 메사코티닌 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주;

P: 아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

Q: 아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주; 및

R: 아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주.

도 6은 중배엽 줄기세포로부터 골세포로의 분화 촉진 효과를 본코사(Von kossa) 염색법으로 확인한 도이다:

A: 무처리군 1 주;

B: 무처리군 2 주;

C: 무처리군 3 주;

D: 골세포 배지를 이용 골세포 분화 1 주;

E: 골세포 배지를 이용 골세포 분화 2 주;

F: 골세포 배지를 이용 골세포 분화 3 주;

G: 벤조일아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

H: 벤조일아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주;

I: 벤조일아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주;

J: 아코니틴 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

K: 아코니틴 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주;

L: 아코니틴 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주;

M: 메사코티닌 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

N: 메사코티닌 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주;

O: 메사코티닌 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주;

P: 아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 1 주;

Q: 아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 2 주; 및

R: 아코닌 1 ng/ml의 농도로 처리 3 주.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子)추출물을 유효성분으로 함유하는 중배엽 줄기 세포(MSC)로 부터 골세포(bone cell) 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 부자 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0020] 1) 부자에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0021] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0022] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

[0023] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 부자는 재배한 것 또는 시판되는 것이 바람직 하나 이에 한정되지 않는다.

[0024] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 상기 추출용매는 물, C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출 방법으로는 냉침 추출, 가열 추출, 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0026] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나,

이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무 건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0027] 상기 중배엽 줄기세포(MSC)는 골수, 지방조직, 제대혈(cord blood), 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues), 태반 등의 다양한 성체 조직 및 골수 유래 세포에서 유래된 것이 바람직하고 마우스 골수로부터 유래된 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 상기 중배엽줄기세포는 마우스 골수로부터 유래된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 부자 추출물을 제조하고, 상기 추출물의 화합물을 확인하기 위해, 상기 추출물을 액체크로마토그래피와 질량분석기 LC/MS/MS 방법을 사용하여 상기 추출물이 아코니틴(aconitine), 메사코니틴(mesaconitine), 벤조일아코닌(benzolyaconine) 및 아코닌(aconine)을 포함하고 있음을 확인하였다(도 1 참조).

[0030] 또한, 마우스 골수로부터 중배엽 줄기세포(MSC)를 분리한 후, 분리된 BMMSC에서 중간엽 줄기세포의 마커인 Sca-1을 발현하고, CD45를 발현하지 않는 세포주를 선별하기 위하여 MACS(magnetic-activated cell sorting, MACS)를 수행하여 마우스 골수로부터 Sca-1 양성 및 CD45 음성 세포주를 선별하였고, 선별된 상기 BMMSC 세포주가 중배엽 줄기세포임을 확인하기 위하여 FACS 분석을 수행한 결과, 선별된 세포의 97.06% 및 90.10%가 각각 CD105 및 Sca-1을 발현함을 확인하였으며(도 2B 및 2C 참조), 배양된 세포에서 CD 발현 분석은 이의 발현이 0.22%로 조혈 세포 계통의 오염이 없음을 확인하였다(도 2 D 참조).

[0031] 또한, 선별된 BMMSC 세포주가 중배엽 줄기세포임을 재확인하기 위하여, 상기 선별된 BMMSC 세포주가 다양한 계통의 세포로 분화가 제대로 이루어졌는지 알리자린 레드(Alizarin red) 및 오일 레드 오(oil red o)를 사용하여 확인한 결과, 골세포 분화 조건에서 분화 유도 3주 후 알리자린 레드로 염색되는 결절성(nodule-like)구조를 확인하였고(도 3B 참조), 지방세포 분화 조건에서 분화 유도 2 내지 3주 후 오일 레드 오(oil red o)로 염색되는 지방세포를 확인하였다(도 3D 참조).

[0032] 또한, 아코니틴(aconitine), 메사코니틴(mesaconitine), 벤조일아코닌(benzolyaconine) 및 아코닌(aconine)의 세포 독성을 확인하기 위해, 상기 표준물질을 여러 농도로 mBMMSC에 처리하고 MTT 시약을 첨가하여 마이크로타이터 플레이트 리더(Microtiter plate reader)로 측정한 결과, 각기 다른 농도의 아코니틴, 메사코니틴, 벤조일아코니틴 및 아코닌을 처리한 세포에서 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 4 참조).

[0033] 또한, 부자 추출물에서 분리된 벤조일아코닌이 골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 선별된 mBMMSC 세포주에 아코니틴, 메사코티닌, 벤조일아코닌 및 아코닌을 처리하여 알리자린 레드(Alizarin red)로 확인한 결과, 벤조일아코닌을 처리한 mBMMSC 세포주에서 처리 1주일 후 골세포로 분화되는 것을 확인하였으며(도 5G 및 도 5H 참조), mBMMSC 세포주에 골형성 조건 배지를 처리하였을 때, 처리 2주 후부터 분화가 시작되는 것을 확인하였다(도 5D 및 도 5F 참조).

[0034] 또한, 부자 추출물에서 분리된 벤조일아코닌이 골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 선별된 mBMMSC 세포주에 아코니틴, 메사코티닌, 벤조일아코닌 및 아코닌을 처리하여 본코사(Von kossa)로 확인한 결과, 벤조일아코닌을 처리한 mBMMSC 세포주에서 유의적으로 골세포로 분화되는 것을 확인하였다(도 6G, 도 6H 및 도 6I 참조).

[0035] 따라서, 본 발명의 벤조일아코닌(benzolyaconine)은 마우스 유래 중배엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)를 골세포로 유의적으로 분화 유도 시킴을 확인함으로써, 부자 추출물로부터 유래된 벤조일아코닌(benzolyaconine)은 중배엽 줄기세포의 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 벤조일아코닌(benzoylaconine)을 유효성분으로 함유한 중배엽 줄기세포(MSC)로부터 골세포 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0037] 상기 벤조일아코닌을 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子)로부터 분리한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 상기 중배엽 줄기세포(MSC)는 골수, 지방조직, 제대혈(cord blood), 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues),

태반 등의 다양한 성체 조직 및 골수 유래 세포에서 유래된 것이 바람직하고 마우스 골수로부터 유래된 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 상기 조성물은 벤조일아코닌을 0.5 ng/ml 내지 3 ng/ml 포함하는 것이 바람직하고, 1 ng/ml을 포함하는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 중배엽 줄기세포(MSC)는 골수, 지방조직, 제대혈(cord blood), 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues), 태반 등의 다양한 성체 조직 및 골수 유래 세포에서 유래된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 따라서, 본 발명의 벤조일아코닌(benzolyaconine)은 마우스 유래 중배엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)를 골세포로 쉽게 분화시키는 것을 확인함으로써, 부자 추출물로부터 유래된 벤조일아코닌(benzolyaconine)은 중배엽 줄기세포의 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 중배엽 줄기세포를 벤조일아코닌이 포함된 배지로 배양하는 단계를 포함하는 중배엽 줄기 세포로부터 골세포 분화 유도 방법을 제공한다.

[0043] 상기 벤조일아코닌을 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子)로부터 분리한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0044] 상기 중배엽 줄기세포(MSC)는 골수, 지방조직, 제대혈(cord blood), 말초혈, 신생아 조직(neonatal tissues), 태반 등의 다양한 성체 조직 및 골수 유래 세포에서 유래된 것이 바람직하고 마우스 골수로부터 유래된 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0045] 상기 조성물은 벤조일아코닌 0.5 ng/ml 내지 3 ng/ml 포함하고, 1 ng/ml을 포함하는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 따라서, 본 발명의 벤조일아코닌(benzolyaconine)은 마우스 유래 중배엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)로부터 골세포 분화 및 지방세포를 쉽게 분화시키는 것을 확인함으로써, 부자 추출물로부터 유래된 벤조일아코닌(benzolyaconine)은 중배엽 줄기세포의 골세포 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 골세포 분화 유도 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0048] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] **<실시예 1> 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子)추출물 제조**

[0050] 건조한 부자(원광 한약 Co.Ltd.,서울, 한국) 250 g을 5 L물에 넣은 후 100℃에서 2시간 동안 열수 추출을하였다. 현탁액을 여과 및 감압하에 동결 건조하여 부자추출물 42.8 g(17.1%)을 수득하였다. 여과물을 감압하여 동결건조 하였고 4℃에서 유지하였다. 각기 다른 실험을 수행하기 전, 건조된 부자 추출물을 탈이온 증류수(distilled deionized water)(Millipore, Bedford, MA, USA)에 용해하고 2 분 동안 실온에서 볼텍스(voltex) 하였다.

[0051] **<실시예 2> 액체크로마토그래피와 질량분석기(LC-MS/MS)를 이용한 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子) 추출물의 benzolyaconine 검증**

[0052] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 부자(*Aconiti Lateralis Preparata Radix*, 附子) 추출물이 포함하는 화합물을 동정 및 확인하기 위하여 LC/MS/MS 방법을 사용하여 수행하였다.

[0053] 구체적으로, 상기 추출물의 화합물을 확인하기 위하여, 각기 다른 4가지의 표준시료(standard compound)(아코니틴(aconitine, Wako, 일본), 메사코니틴(mesaconitine, Wako, 일본), 벤조일아코닌(benzolyaconine, stanford chemical, 미국) 및 아코닌(aconine , stanford chemical, 미국))를 각각 100% 메탄올에 1 mg/ml의 농도로 준

비하고, 표준용액(working solution)은 100% 메탄올에 1000 ng/ml의 농도로 준비하여 질량 분석을 수행하였다. 각각의 표준 곡선을 위하여 10, 50, 100, 200, 500 및 1000 ng/ml의 6개 검량선을 분석하였다. 감압하여 동결 건조한 부자 추출물 100 ug/ml을 100% 메탄올에 용해하였다. 상기 용해된 용액은 2500 rpm에서 15분 동안 원심분리(centrifuge)를 사용하여 분리하였다. 깨끗하게 분리된 상등액(supernatant)을 LC-MS/MS를 사용하여 분석하기 전, 상기 분리된 상등액을 0.45 um 멤브레인 필터(membrane filter)를 통과시켜 여과하였다. 또한, 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피 시스템(Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 그런 다음, 희석된 부자 추출물의 500 ul 분취액(aliquot)을 100 mm × 2.1 mm, Atlntis DC18 컬럼에 주입하였다(물, 미국). 이동상 A 및 B는 각각 0.1% 수용 포름산 및 아세토니트릴로 구성되어 있다. 0.3 mL/분의 유속에서 20 분 동안 5-95%의 선형 그래디언트(linear gradient)에 따라 상기 추출물은 용출되었고, QTRAP 3200 질량분석 시스템(ABSCIEX, MA, USA)은 양이온화(positive ionization) 모드로 사용되었으며, MRM(multiple reaction monitoring scanning) 스캐닝이 수행되었다.

[0054] 구체적으로, 파라미터를 조절한 질량분석계는 표준용액(working solution)을 주입하여 각 분석물질을 최적화하였고, 0.1 내지 0.5 mL/분의 범위에서 여러 개의 유속으로 검증하였다. 이동상(mobile phase)은 0.1%(v/v) 포름산을 포함하는 아세토니트릴 수용액을 사용하였다. 양성모드를 위해 최적화된 상태하에서, 시료에 있어서 이온스프레이의 전압이 5000 V이고, 가스 온도가 400℃ 일 때, 질소는 건조가스 10 Lmin-1, 네블라이저(nebulizer) 가스 50 psi로 사용되었다.

[0055] 그 결과, 도 1에서 나타낸 바와 같이, MRM 스캐닝 과정에 있어서, 아코니틴(aconitine), 메사코니틴(mesaconitine) 및 벤조일아코닌(benzolyaconine)을 위해 모니터 된 전구체 이온(precursor ions)은 각각 m/z 646, 632 및 604였고, 이때, 7.11, 6.91 및 6.60 분의 지속시간이 탐지된 m/z 105.1의 상용화된 제품이온이 사용되었다. 아코닌을 위한 MRM 결과는 3.53분의 지속시간과 함께 450.1에서 탐지되었다(도 1).

[0056] **<실시예 3> 마우스 골수로 부터 중배엽 줄기세포의 분리**

[0057] **<3-1> BMMSC(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells)의 분리**

[0058] mBMMSCs(Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells)를 분리하기 위하여, 자성비드 분리(magnetic beed separation)를 수행하였다.

[0059] 구체적으로, 마우스 기질세포(stromal cells)는 Nadre et al에 기재된 방법에 따라 분리하였다. 골수세포는 8 내지 12 주령 수컷 마우스(C57BL/6)의 대퇴골 및 경골을 플러싱(flushing)하여 수득하였고, 이때 15% FBS(Gibco-BRL, Grand Island, NY), 100 U/ml 페니실린 및 100 ug/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Gibco-BRL, Grand Island, NY) 배지를 사용하였다.

[0060] 상기 분리된 골수세포에서 단일 세포 현탁액을 수득하기 위하여, 이들을 26-게이지 바늘이 장착된 주사기(gauge needle syringe)를 사용하여 세포를 재현탁하고, 70-um 세포 여과기(strainer)(Falcon, Becton Dickinson and Company, Heidelberg, Germany)를 통과시켜 골수세포의 덩어리(clump)로부터 제조하였고, 상기세포는 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 젤라틴 코팅된 10 cm 접시에 15% FBS, 100 U/ml 페니실린, 및 100 ug/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에서 배양되었다. 배양 3일 후, 부착되지 않은 세포는 제거되고, 부착된 세포주는 90% 밀집도(confluent)를 나타낼때까지 배양하였다(6 내지 7일). 동물을 사용한 모든 절차는 기관의 가이드라인(institutional guideline)에 따라 수행되었다.

[0061] **<3-2> MACS(magnetic-activated cell sorting)을 사용한 Sca-1 양성, 및 CD45 음성 세포주의 선별**

[0062] 상기 실시예 <3-1>의 방법으로 분리된 BMMSC에서 중간엽 줄기세포의 마커인 Sca-1을 발현하고, CD45를 발현하지 않는 세포주를 선별하기 위하여 MACS(magnetic-activated cell sorting, MACS)를 수행하였다.

[0063] 구체적으로, Sca-1 양성 BMMSC는 MACS 시스템(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, 독일)을 사용하여 수행되었고, 세번째 선별 후, 선별된 BMMSC는 PE-접합된 항-CD45 항체(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, 독일)과 4 ℃에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고나서, 0.5% BSA 및 2 mM EDTA가 첨가된 PBS인 MACS 완충액으로 세척하고, 항-PE 마이크로비드(microbead)를 넣고 4℃에서 10분간 반응시켰으며, MACCS 완충액으로 다시한번 세척한 후, 상기 세척된 세포는 밀테니 자석(Miltenyi magnet)에 있어서 MACS 칼럼을

통과시켰다. 또한 CD45 음성 BMMSC는 FITC 마이크로비드와 4℃에서 10분간 반응시킨 뒤, MACS 완충액으로 다시 한번 세척하였다. 상기 세척된 세포는 밀테니자석에 있어서 MACS 컬럼을 통과시켰다. 또한, CD45 음성 BMMSC는 FITC-결합된 항 -Sca-1 항체를 첨가하여 4℃에서 10분간 반응시키고, MACS 완충액으로 세척하였으며, 항-FITC-마이크로비드와 4℃에서 10분간 반응시킨뒤, 다시 MACS컬럼을 통과하였고, Sca-1 양성 BMMSC 세포주가 MACS 완충액으로 세척함으로써 용출되었다.

[0064] 그 결과, 마우스 골수로부터 Sca-1 양성 및 CD45 음성 세포주를 선별하였다.

[0065] **<실시예 4> 마우스 골수로 부터 중배엽 줄기세포의 확인**

[0066] **<4-1> FACS 분석을 통한 중배엽 줄기세포 확인**

[0067] 상기 실시예 <3-2>의 방법으로 선별된 세포주가 중배엽 줄기세포임을 확인하기 위하여 FACS 분석을 수행하였다.

[0068] 구체적으로, FACS 분석을 위하여 상기 선별된 세포주를 2ug/ml FITC-결합된 랫드(rat) 항-마우스 Sca-1, CD11b, 및 PE-결합된 랫드 항-마우스 CD105 와 4℃에서 30분간 반응시킨뒤, 침전된 상기 세포는 PBS로 두번 세척하고, 70% EtOH가 첨가된 PBS로 고정하였다. 그리고나서, 상기 고정된 세포를 FACS 칼리버 유세포 분석기(caliber flow cytometer)를 사용하여 분석하였다.

[0069] 그 결과, 도 2B 및 도 2C에 나타낸 바와 같이, 무 처리 대조군과 비교하여(도 2A) 선별된 세포의 97.06% 및 90.10%가 각각 CD105 및 Sca-1을 발현하였고(도 2B 및 도 2C), 배양된 세포에서 CD11b 발현 분석은 이의 발현이 0.22%로 조혈 세포 계통(hematopoietic cell lineage)의 오염이 없음을 확인하였다(도 2D).

[0070] **<4-2> 분화 실험을 통한 중배엽 줄기세포의 확인**

[0071] 상기 실시예 <3-2>의 방법으로 선별된 세포주가 중배엽 줄기세포임을 재확인하기 위하여, 상기 선별된 세포주가 다양한 계통의 세포로 분화할 수 있는지 확인하는 분화실험을 수행하였다.

[0072] 구체적으로, 골형성(osteogenesis)을 관찰하기 위하여 종래 기술(Eslaminejad MB, et, al., *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 45, 451-9, 2009)에 개시되어 있는 골형성 조건 배지에서 세포를 배양하였다. 상기 배양은 10 uM β- 글리세롤 인산(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, 미국), 50 ug/ml 아스코르베이트 2-인산(Sigma-Aldrich Co.)(ascorbate-2-phosphate), 및 10^{-7} 덱사메타손(dexamethasone)(Sigma-Aldrich Co.)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하였고, 배양 배지는 1주에 두 번씩 3주 동안 교체하였다. 그런 다음, 상기 세포는 10분 동안 실온에서 고정을 시키고, 5분 동안 알리자린 레드(Alizarin red, pH 4.0)를 사용하여 염색하였다. 또한, 지방세포 분화를 확인하기 위하여, 지방형성 조건 배지에서 세포를 배양하였다. 상기 배양은 50 ug/ml 인도메타신(indomethacin)(Sigma-Aldrich Co.) , 10^{-7} 덱사메타손(Sigma-Aldrich Co.), 및 50 ug/ml 아스코르베이트 2-인산이 첨가된 DMEM 배지를 사용하였고, 배양 배지는 1주에 두 번씩 3주 동안 교체하였다. 그런 다음, 상기 세포는 45분 동안 메탄올에서 고정을 시키고 오일 레드 오(oil red o)(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 염색하였다.

[0073] 그 결과, 도 3B 및 3D에 나타난 바와 같이, 골세포 분화 조건에서 분화 유도 3주 후 알자린레드(Alizarin red)로 염색되는 결절성(nodule-like)구조를 확인할 수 있었고(도 3B), 또한, 지방세포 분화 조건에서 분화유도 2내지 3주 후 오일 레드 오(oil red o)로 염색되는 지방세포를 확인할 수 있었으며, 지방 덩어리는 지방세포 분화 배지에서 확인할 수 있었다(도 3D).

[0074] **<실시예 5> 세포 독성 확인**

[0075] 상기 <실시예 2>에서 확인된 표준물질을 여러 농도로 mBMMSC에 24시간 동안 처리하여 세포 성장 및 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

[0076] 구체적으로, mBMMSC 세포를 24시간 동안 전처리한 후, 아코니틴, 메사코니틴, 벤조일아코닌 및 아코닌을 각각 0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/ml 농도로 mBMMSCs 세포에 처리하였다. 그런 다음, 24시간 후, 배지를 제거하고 대사활성을 측정하기 위해 mBMMSC 세포에 MTT를 처리하고 배양한뒤, 마이크로타이터 플레이트 리더(Microtiter

plate reader)(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 분광분석을 수행하였다.

[0077] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 각기 다른 농도의 아코니틴, 메사코니틴, 벤조일아코닌 및 아코닌을 mBMMSCs 세포에 24시간 동안 처리하였을 때, 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 4).

[0078] **<실시예 6> 벤조일아코닌을 이용하여 중배엽 줄기세포로부터 골세포로의 분화 촉진 효과 확인**

[0079] 상기 <실시예 2>에서 분리된 화합물이 골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 알리자린 레드(Alizarin red) 및 본코사(Von kossa) 분석을 수행하였다.

[0080] 구체적으로, 상기 실시예 <3-2>의 방법으로 선별된 중배엽 줄기세포에 상기 실시예 <4-2> 아코니틴, 메사코티닌, 벤조일아코닌 및 아코닌을 1 ng/ml의 농도로 처리하여 3주 동안 배양하였고, 1주에 한 번씩 관찰하였다. 배양 3주 후, 상기 세포를 상기 실시예<4-2>에 기재된 바와 같이 알리자린 레드 분석을 수행하였다. 또한, 본코사(von kossa) 분석은 24 웰 플레이트(well plate) 배양용기에 멸균처리 한 커버 슬라이드를 넣고 0.1% 젤라틴 용액(gelatin solution)을 이용하여 코팅하였다. 그런 다음, 코팅된 24 웰 플레이트에서 1×10^4 cell/plate 농도로 배양한 후, 골분화 배지로 배양액을 교환하여 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 골분화 배지 조성은 10^{-7}M 덱사메타손(dexamethasone, Sigma), 50μM L-아스크로빅산 2- 인산(ascrobic acid 2-phosphate, Sigma), 10mM β-글리세로 인산(glycerophosphate, Sigma), 15% 우태아 혈청이 첨가된 DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium, high glucose, Gibco BRL) 배지를 사용하였고 일주일에 2번씩 배지를 교환하면서 골분화 유도함과 동시에 벤조일아코닌 1 ng을 배지와 함께 희석하여 첨가한 후 7일, 14일, 21일 동안 배양하였다. 분화처리를 마친 세포는 각 웰의 배지를 제거하고 100% 알코올을 첨가하여 실온에서 20분 동안 고정시킨 후 증류수로 5분 동안 3번 세척하였다. 세척한 세포에 5% 질산(silver nitrate) 용액을 첨가하여 1 시간 동안 빛에 반응시킨 후 용액을 제거하고 증류수로 5분 동안 3번 세척하였다. 그런 다음, 2% 티오황산소다(sodium thiosulfate) 용액을 첨가하고 5분 동안 처리하여 반응하지 않고 남은 은(silver) 이온을 제거하고 증류수로 5분 동안 3번 세척한 후 글리세롤 젤라틴(glycerol gelatin) 용액으로 덮어 현미경으로 관찰하였다.

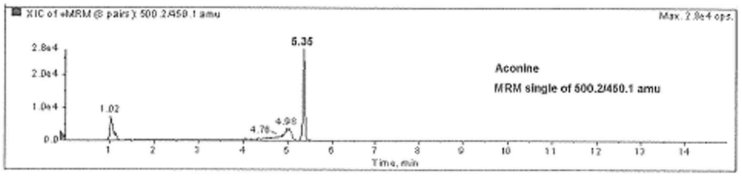
[0081] 그 결과, 도 5G 내지 5I에 나타낸 바와 같이, 벤조일아코닌을 처리한 세포주에서 처리 1주일 후 골세포로 분화한 반면(도 5G , 도 5H 및 도 5I) 도 5D 내지 도 5F에 나타난 바와 같이, 상기 실시예<4-2>의 골세포 배지를 처리한 경우 처리 2 주 후부터 분화가 시작된 것을 확인하였다(도 5D, 도 5E 및 도 5F). 또한, 도 6G 내지 6I에 나타낸 바와 같이, 벤조일아코닌을 처리한 mBMMSC 세포주에서 유의적으로 골세포로 분화되는 것을 확인하였다(도 6G, 도 6H 및 도 6I 참조).

[0082] 따라서, 벤조일아코닌을 처리하는 경우 중간엽 줄기세포의 골세포 분화가 현저히 증가함을 확인하였다.

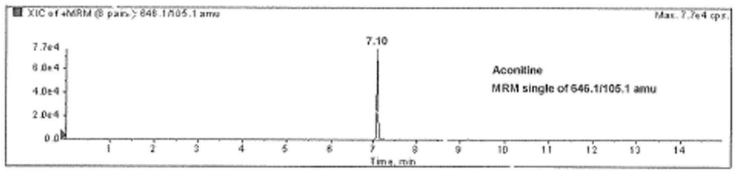
도면

도면1

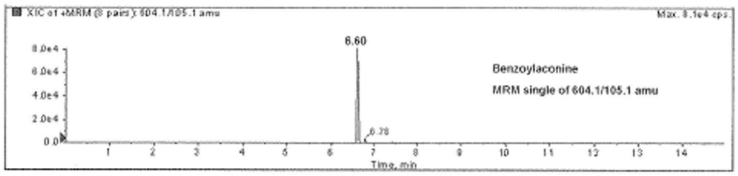
A


XIC of +MRM (8 pairs): 500.2/450.1 amu
Max. 2.8e4 cps.
5.35
1.02
4.76
4.96
Aconine
MRM single of 500.2/450.1 amu
Time, min

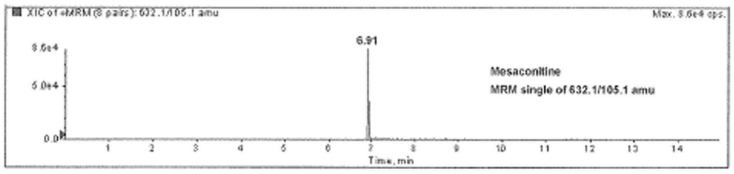
B


XIC of +MRM (8 pairs): 646.1/105.1 amu
Max. 7.7e4 cps.
7.10
Aconitine
MRM single of 646.1/105.1 amu
Time, min

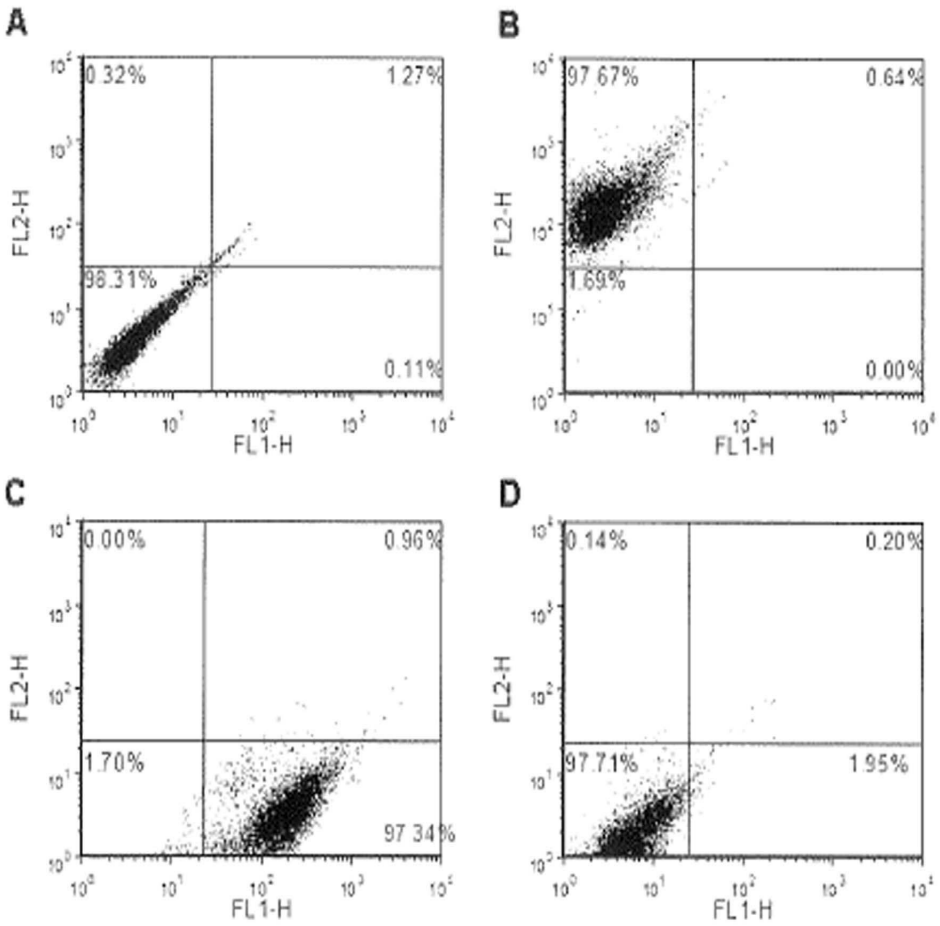
C


XIC of +MRM (8 pairs): 604.1/105.1 amu
Max. 8.1e4 cps.
6.60
6.78
Benzoylaconine
MRM single of 604.1/105.1 amu
Time, min

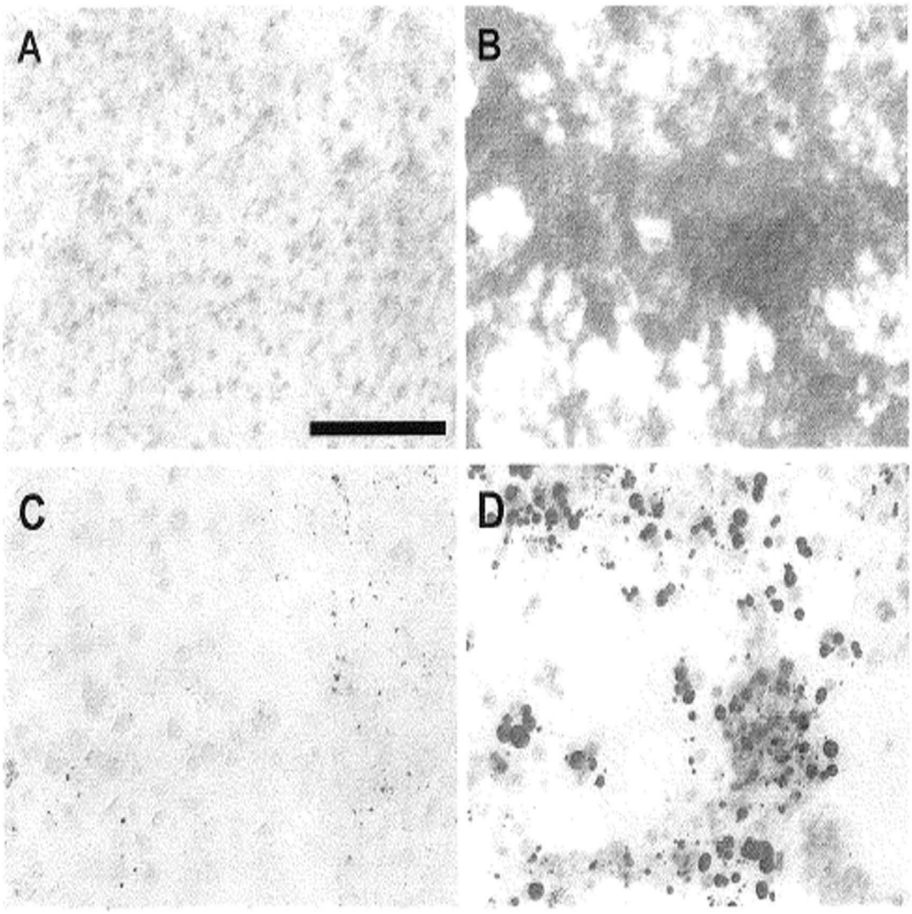
D


XIC of +MRM (8 pairs): 632.1/105.1 amu
Max. 8.6e4 cps.
6.91
Mesaconitine
MRM single of 632.1/105.1 amu
Time, min

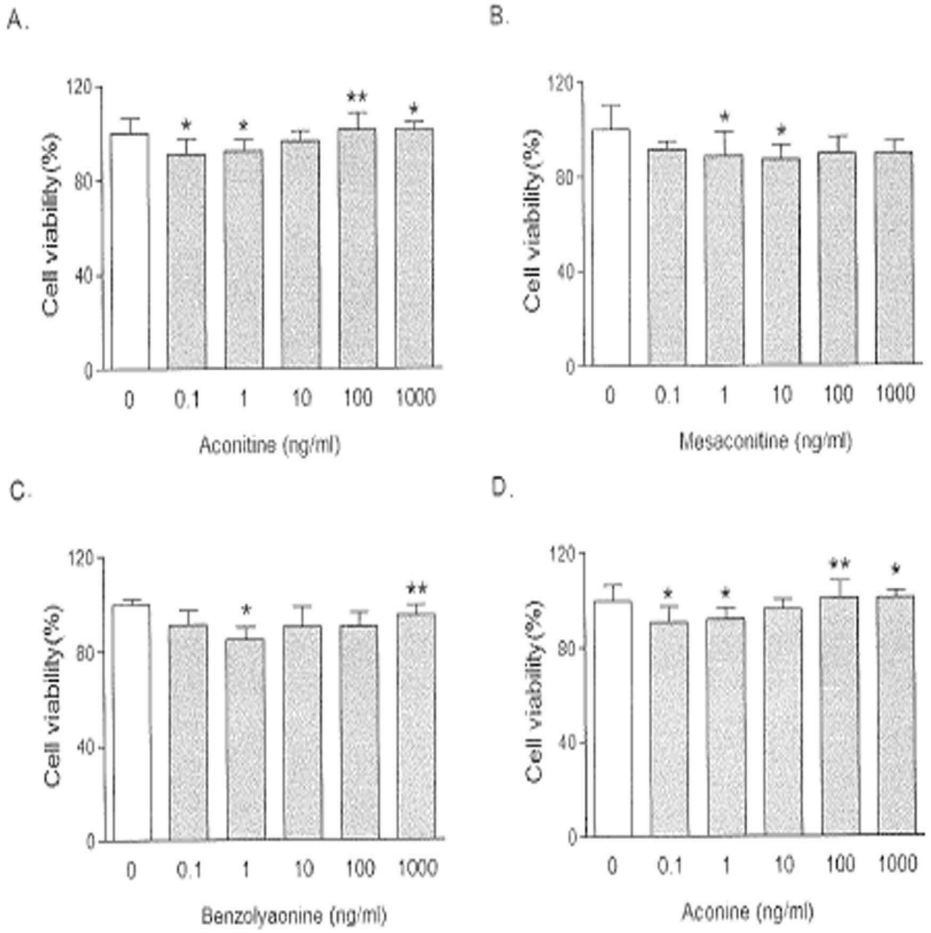
도면2


A
0.32%
1.27%
98.31%
0.11%
FL2-H
FL1-H
B
97.67%
0.64%
1.69%
0.00%
FL2-H
FL1-H
C
0.00%
0.96%
1.70%
97.34%
FL2-H
FL1-H
D
0.14%
0.20%
97.71%
1.95%
FL2-H
FL1-H

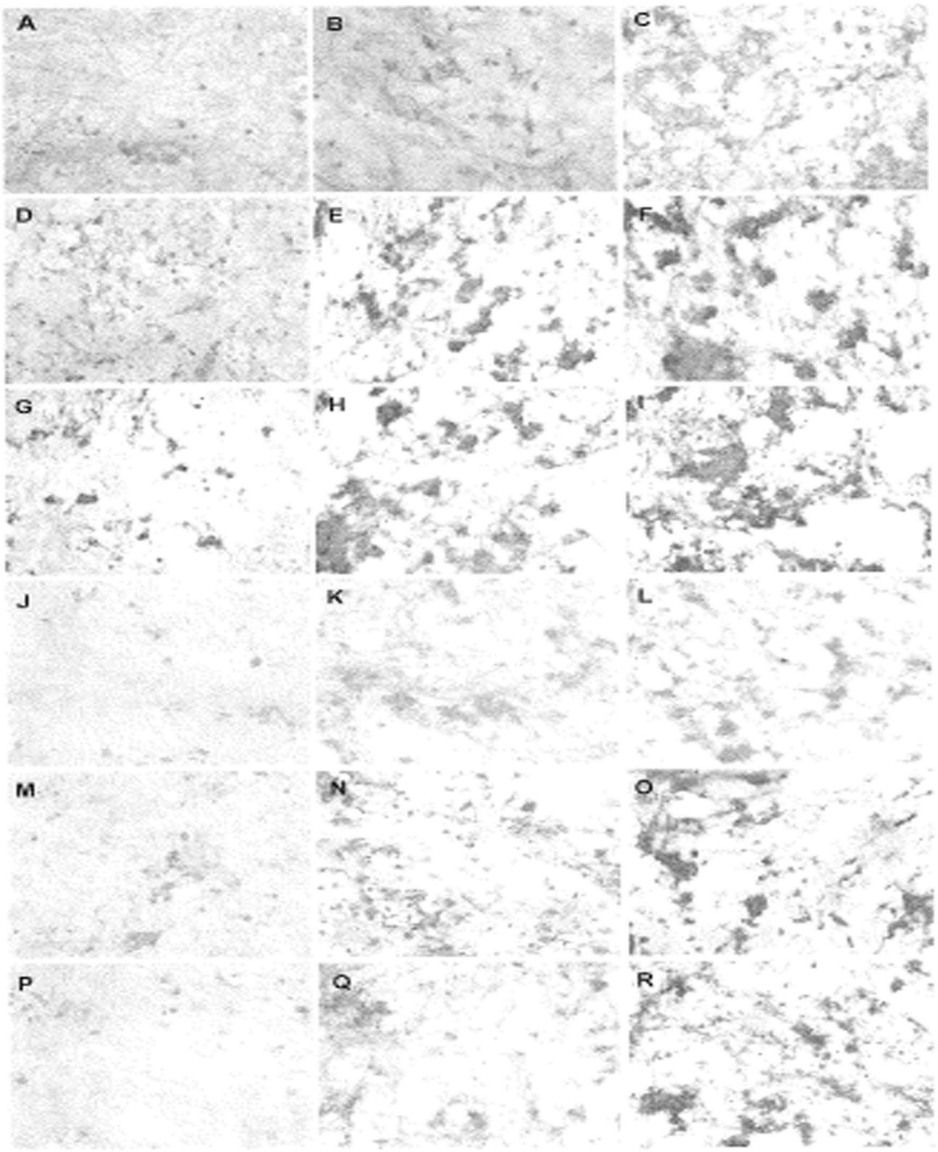
도면3



도면4


A.
Cell viability(%)
120
80
40
0
0 0.1 1 10 100 1000
Aconitine (ng/ml)
B.
Cell viability(%)
120
80
40
0
0 0.1 1 10 100 1000
Mesaconitine (ng/ml)
C.
Cell viability(%)
120
80
40
0
0 0.1 1 10 100 1000
Benzolyaonine (ng/ml)
D.
Cell viability(%)
120
80
40
0
0 0.1 1 10 100 1000
Aconine (ng/ml)

도면5



도면6

