(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0129266
(43) 공개일자 2020년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/32 (2015.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 15/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/32 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0053424
(22) 출원일자 2019년05월08일
심사청구일자 2019년05월08일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
주식회사 스템센트릭
경기도 안양시 동안구 시민대로 230, 지니센터 디동 2449호 (관양동, 평촌아크로타워)
(72) 발명자
노규진
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 102동 2903호 (가좌동, 센트럴웰가)
김경민
서울특별시 서초구 동광로1길 112, 101동 1103호 (방배롯데캐슬헤론)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

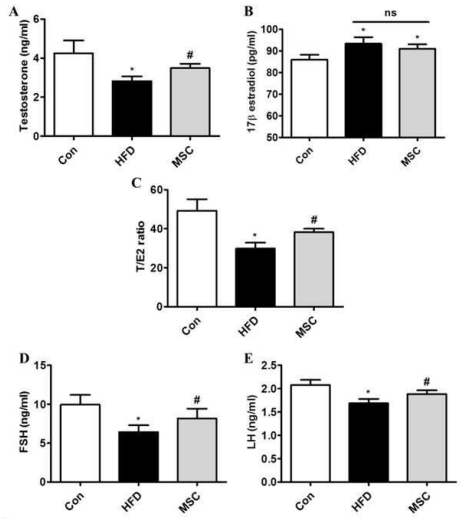
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **치아 주변조직 유래 다분화능 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 초자화 동결보존된 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 간 내 지질대사효소의 개선을 통해 위축된 고환 내 세정관 및 혈중 성호르몬 농도를 정상 수준으로 회복시켜 남성 불임에 대한 현저한 예방 및 치료 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 유효성분인 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 가장 비침습적인 방법으로 세포를 얻을 수 있어, 남성 불임에 대한 세포 치료제로서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61P 15/08 (2018.01)
(72) 발명자
장시정
경상남도 진주시 동부로43번길 10-13, 102동 305호 (호탄동, 삼성아파트)
이성림
경상남도 진주시 새평거로 25, 102동 1602호 (평거동, 더 퀸즈웰가)
박봉욱
경상남도 진주시 새평거로 112, 102동 1204호 (평거동, 진주평거 엘크루)

명 세 서

청구범위

청구항 1

치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 치낭조직, 치배줄기조직 및 치근 유두조직으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 사랑니 (wisdom teeth) 주변조직인 것을 특징으로 하는, 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 초자화 동결보존된 것을 특징으로 하는, 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 남성 불임은 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)에 의해 유발된 것을 특징으로 하는, 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 고환 내 세정관 위축을 개선시키는 것을 특징으로 하는, 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 간 손상에 따른 성호르몬 불균형을 개선시키는 것을 특징으로 하는, 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 치료용 줄기세포 치료제.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 치아 주변조직은 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 치낭조직, 치배줄기조직

및 치근 유두조직으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 남성 불임 치료용 줄기세포 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초자화 동결보존된 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 남성 불임 (Male infertility) 환자는 최근 4년간 빠른 속도로 증가하여 지난 2013년 4만 3094명에서 2017년 6만 2468명으로 약 1.5배 증가하였다. 2012년 기준 불임치료를 받은 경험이 있는 35~39세 남성은 인구 10만명 당 695명, 40~44세 남성은 10만명 당 266명으로 5년간 성별 비교에서 여성 불임환자가 연평균 2.5%씩 증가한 데 반해 남성은 11.8%씩 대폭 늘어나는 추세이다.

[0004] 남성 불임은 다양한 요인에 의해 발생하며 그 요인에는 남성 호르몬을 포함한 호르몬 문제, 독성물질 노출이나 감염 및 외상으로 고환에 문제가 생긴 경우, 정자의 문제, 정자가 배출되는 길이 비정상적인 경우 등이 있다. 최근에는 비만, 당뇨, 흡연 및 스트레스 등의 현대 생활양식과 관련하여 남성 불임이 평균보다 높은 증가율을 보인다고 보고되며, 그 중 비만은 2010년 초반까지도 간과되어 오다가 불임과의 병리학적 연관성이 보고되면서 최근 수많은 불임 요소 중 불임과 직접적으로 관련이 있는 요인으로 주목 받고 있다. 비만남성에서는 과다한 지방조직이 성호르몬의 대사작용에 문제를 일으켜 남성호르몬 (테스토스테론)을 여성호르몬 (에스트로겐)으로 변화시켜 정자 생성을 방해하며, 비만남성의 과다한 지방이 체온을 높여 정자가 잘 생성될 수 없다는 일련의 연구들이 보고된 바 있다. 또한, 비알코올성 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 만성 간질환 중에서 가장 흔한 질환으로, 주원인이 비만으로 알려져 있으며, NAFLD는 간세포 손상으로 인해 성호르몬 불균형을 일으켜 남성 성선기능저하증 (Male hypogonadism) 등의 만성적인 남성 불임을 유발한다. 특히, 대부분의 에스트로겐은 간조직에서 대사되므로 간세포 손상은 에스트로겐 제거 시스템에 문제를 야기하며, 이는 간 이식 후 간경변에 따른 성호르몬 불균형이 개선된다는 연구로 입증된 바 있다.

[0005] 비만, 간질환 등과 관련이 있는 남성 불임은 호르몬 요법, 칼리크레인(kallikrein), 카르니틴 (carnitine), 펜톡시필린 (pentoxifylline), 비스테로이드성 소염제, 알파차단제 등 정자형성 기능에 영향을 줄 수 있는 다양한 약물들이 쓰이나 테스토스테론 대체 요법 (testosterone replacement therapy, TRT)과 같은 호르몬 요법의 경우 임상적 성공률이 일관되지 않거나 치명적인 부작용이 보고되고, 비호르몬 요법의 경우 약물의 정확한 작용기준을 잘 모르는 경우가 많다. 또한, 성선기능저하증의 경우 아직 효과적 치료방법이 없는 것으로 알려져 있다. 따라서, 비만 및 NAFLD와 같은 간세포 손상으로 인한 만성적인 남성 불임을 근본적으로 치료할 수 있는 새로운 치료법이 필요하다.

[0006] 한편, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 (dental tissue-derived mesenchymal stem cells)는 중간엽 줄기세포의 한 종류로, 최근의 연구에 의하면 중간엽 줄기세포는 중배엽뿐 아니라 외배엽 (주로 신경세포) 혹은 내배엽 (간세포, 췌장세포 등)으로도 분화할 수 있음이 밝혀져 다분화능 (Multipotency)을 가지는 것으로 인정되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 10-1551900

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자들은 부작용이 많이 보고되고 있는 남성 불임 치료를 대체할 수 있는 새로운 치료제를 개발하고자 노력한 결과, 초자화 동결보존된 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 고지방식이를 통한 불임 동물모델에 투여 시 고환 내 세정관 및 혈중 성호르몬 농도가 정상모델과 유사한 수준으로 회복되어 남성 불임 개선에 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 치료용 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 치료용 줄기세포 치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 간 내 지질대사효소의 개선을 통해 위축된 고환 내 세정관 및 혈중 성호르몬 농도를 정상 수준으로 회복시켜 남성 불임에 대한 현저한 예방 및 치료 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 유효성분인 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 가장 비침습적인 방법으로 세포를 얻을 수 있어, 남성 불임에 대한 세포 치료제로서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 대조군과 고지방식이로 NAFLD 및 남성 불임이 유도된 각 실험군 마우스의 체중 (A), 간 (B), 고환 (C) 조직의 무게를 측정한 결과를 나타낸 것이다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 2는 대조군과 각 실험군 마우스 고환조직의 조직학적 분석 결과를 나타낸 것으로, 각 행에 해당하는 H&E 염색 결과는 각각 서로 다른 마우스의 조직학적 소견을 나타낸다 (scale bar = 100 μm, Magnification = x 200) (A). 또한, 대조군과 각 실험군 마우스 고환조직에서 세정관의 지름 (B), 레이디히 세포 수 (C)를 측정한 결과를 나타내었다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 3은 대조군과 실험군의 간 및 고환 조직에 대한 TUNEL 분석 결과를 나타낸 것으로, 각각 TUNEL 염색 결과 (A; scale bar = 50 μm, Magnification = x 400), 간 조직에서의 TUNEL 양성 세포 (세포 사멸) 계수 결과 (B), 고환 조직에서의 TUNEL 양성 세포 계수 결과 (C)에 해당한다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 4는 간 특이적 에스트로겐 대사와 관련된 효소의 활성을 확인하기 위한 면역조직화학 분석 결과를 나타낸 것으로, 각각 각 그룹의 아로마타제 (aromatase) 발현 정도 (A; scale bar = 50 μm), CYP1A2의 발현 정도 (B; scale bar = 100 μm), 상기 발현량을 정량화한 결과로서 전체 영역 중 아로마타제 양성 신호 영역의 비율 (C) 및 전체 영역 중 CYP1A2 양성 신호 영역의 비율 (D)에 해당한다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 5는 세정관에서 세르톨리 세포의 기능을 평가한 결과를 나타낸 것으로, 각각 안드로겐 결합 단백질 (ABP)의 발현을 확인한 면역조직화학염색 결과 (A; scale bar = 50 μm, Magnification = x 400), 상기 발현량을 정량화한 결과로서 전체 영역 중 ABP 양성 신호 영역의 비율 (B)에 해당한다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 6은 생식능력과 관계된 시상하부-뇌하수체-생식소 축 (HPG axis)과 관련된 혈청 내 호르몬 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다 (*p<0.05, 대조군과 비교; #p<0.05, HFD 그룹과 비교).

도 7은 NALFD에 의해 유도된 남성 성선기능저하증 (Male hypogonadism)에 대한 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 치료의 작용 메커니즘 (Mode of Action, MoA)을 나타낸 도이다. 본 발명에 따른 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 간의 에스트로겐 대사 및 지질 항상성을 개선시킴으로써 NALFD에 의해 유도된 남성 성선기능저하증을 비롯한 남성 불임증을 완화시킬 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0022] 본 발명에서 용어, "줄기세포 (stem cells)"란 조직을 구성하는 각 세포로 분화 (differentiation) 되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하는 것으로, 특정 분화 자극 (환경)에 의해 특정 세포로 분화가 진행되는 세포를 의미한다.

[0023] 본 발명에서 용어, "중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)"는 중간엽 줄기세포 혹은 성체 줄기세포라고도 하며 배아 이외의 조직에서 분리 및 배양된 줄기세포를 통칭하는 것이다. 간엽줄기세포는 이미 분화가 완료된 대부분의 조직에 소량으로 존재하는 것으로 현재까지 제대혈, 탯줄, 치아, 눈, 태반, 모낭, 허파, 간 등 연구된 거의 모든 조직에서 이의 존재가 확인된 바 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 (dental-tissue derived mesenchymal stem cells)"는 치아 및 치아 주변조직에서 유래한 성체 줄기세포, 중간엽 줄기세포와 형태가 유사한 세포 (mesenchymal stem cell-like cells)를 모두 포함하는 개념이며, 골수나 탯줄 등에 존재하는 다른 성체줄기세포에 비하여 조직의 손상을 최소화하고 (비침습적) 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어 본 발명의 유효성분으로 사용하였다. 상기 치아 주변조직은 이에 제한되지는 않으나 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 맹출 중인 치아의 치낭조직, 치배줄기조직, 미성숙 영구치의 치근 유두조직일 수 있으며, 바람직하게는 사랑니 (wisdom teeth) 주변조직일 수 있다.

[0025] 또한, 상기 조직은 중간엽 줄기세포를 포함하고 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 중간엽 줄기세포는 치아 치수 줄기세포 (dental pulp stem cells, DPSCs), 탈락 유치 줄기세포 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs), 치주인대 줄기세포 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs), 치배줄기 세포 (dental follicle stem cells, DFSCs) 및 치근단유두 줄기세포 (stem cells from apical papilla, SCAP)로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 한편, 이와 같은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 임플란트 주위염, 신경손상, 잇몸뼈 소실 등을 치료 또는 개선하기 위해 재생의학적으로 임상에 적용된 바는 있으나, 현재까지 남성 불임에 대한 의학적 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 치아 주변조직은 인체로부터 분리되어 초자화 동결보존된 것을 특징으로 하며, 상기 초자화 동결보존 방법은 본 발명자들의 선행특허인 한국 등록특허 10-1551900 (특허문헌 1)에 기술된 방법을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 중간엽 줄기세포의 분리방법은 당업계에 공지되어 있는방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대 치아 주변조직으로부터 분리되고 정제될 수 있고, 분리된 중간엽 줄기세포는 필요에 따라 배양할 수도 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 남성 불임은 이에 제한되지는 않으나, 비만, 당뇨, 흡연, 스트레스 및 비알코올성 지방간 질환에 의해 유발되는 것일 수 있고, 바람직하게는 비만 또는 비알코올성 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)에 의해 유발된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, "치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 예방 또는 치료용 약학적 조성

물”은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 자체일 수도 있으며, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 이외에 배양액, 줄기세포 배양 시 당업계에서 일반적으로 사용되는 물질을 포함하는 조성물을 포함하는 것이다. 또한, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포가 분비하는 물질 또는 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포로부터 추출한 물질을 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 대체하여 사용하는 것도 포함하는 의미이다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 이외에 약학적으로 허용 가능한 통상의 담체를 포함할 수 있고, 주사제의 경우 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있고, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소 적용이 가능하며, 본 발명에 따른 조성물의 비경구 투여용 조성물 (예, 주사제)은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어, 멸균 정제수, 약 pH 7의 완충액, 또는 생리식염수 중에 분산 및/또는 용해시켜 생체 내에 주입될 수 있으며, 필요할 경우, 보존제, 안정화제 등과 같은 통상의 첨가제를 포함할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에서 중간엽 줄기세포의 양은 10^4 내지 10^{10} cells/회로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 10^5 내지 10^9 cells/회로 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 10^6 내지 10^8 cells/회, 가장 바람직하게는 5×10^7 내지 10^8 cells/회로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 용량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 고환 내 세정관 위축을 개선시킬수 있고, 간 손상에 따른 성호르몬 불균형을 개선시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서는, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 투여하는 경우 남성 불임 동물모델의 고환 구조가 회복되고, 내강에서 정자가 형성되는 등 세정관의 개선을 보임을 확인하였으며, 세정관 지름 길이가 증가하여 세정관의 조직학적 특징이 현저히 회복되고, 테스토스테론을 생성하는 레이디히 (Leydig) 세포 수가 현저히 증가함을 확인하였다.

[0038] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 투여함에 따라 혈청 내 테스토스테론 수치 및 성호르몬 균형의 임상적 지표에 해당하는 테스토스테론/17β-estradiol 값이 증가하여 고지방식이(비만)에 따른 성호르몬 불균형이 현저히 개선됨을 확인하였다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물은 남성 불임의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 당업계에 공지된 남성 불임의 예방 또는 치료 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 포함하는 남성 불임 치료용 줄기세포 치료제를 제공한다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 치아 주변조직은 이에 제한되지는 않으나 유치 또는 영구치의 치수조직, 치주인대조직, 맹출 중인 치아의 치낭조직, 치배줄기조직, 미성숙 영구치의 치근 유두조직일 수 있으며, 바람직하게는 사랑니(wisdom teeth) 주변 조직일 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어, "세포 치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품 (미국 FDA규정)이며, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아 있는 자가, 동종 또는 이종 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성

을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물 또는줄기세포 치료제의 투여로 남성 불임을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 약학적 조성물 또는줄기세포 치료제의 투여로 남성 불임이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다. 통계 분석은 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 one-way ANOVA followed by Tukey's test에 따라 이루어졌다. 결과는 평균 ± 표준 오차로 나타내었다. $P<0.05$인 경우 유의적인 것으로 판단하였다.

[0048] **실시예 1. 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 준비**

[0049] 모든 화학물질은 SigmaAldrich®(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 배지는 Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하여 사용하였다. 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 수득하기 위하여 본 발명자들은 새로운 동결 프로토콜을 확립하였으며, 이를 초자화 동결보존방법으로 명명하였다. 상기 방법은 에틸렌 글라이콜 (Ethylene glycol), 수크로오스 (Sucrose) 및 글루코오스를 함유하는 조직의 초자화 동결보존용 조성물을 이용하여 조직 내의 세포를 효과적으로 보존하기 위한 것으로서, 본 발명자들의 선행특허인 한국 등록특허 10-1551900 (특허문헌 1)에 기술되어 있고 이는 그 전체로 본원에 참고로 인용된다.

[0050] 보다 구체적으로, 20세 전후의 매복지치 환자에게서 발치된 후 폐기되는 치아 주변 조직을 경상대학교병원 구강악안면외과에서 제공받아 이용하였고, 멸균된 메스를 사용하여 추출된 사랑니에서 치아 조직을 분리하고 초자화 동결시켜 최소 3개월간 보관한 후 해동하였다. 조직 해동시 액체질소에 보관된 동결용 튜브를 37℃의 물에서 1~2분간 해동한 후, 동결 보존제를 완전히 제거하기 위하여 100 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신, 0.25 ㎍/㎖ 암포테리신 B (amphotericin B, Invitrogen)가 함유된 DPBS를 이용하여 1500rpm에 5분간 원심분리하여 수차례 세척하였다. 상기 치아 주변조직에서 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cell)을 분리하기 위하여 collagenase type IV (Sigma, USA)를 30분간 효소처리 하였다. 처리된 조직을 100 ㎛ cell strainer (BD FalconTM, USA), 40 ㎛ cell strainer (BD FalconTM, USA)에 각각 한차례 거른 후, 15ml 코니컬 튜브 (15ml polypropylene conical tube; BD FalconTM, USA)에 옮긴 다음 페니실린/스트렙토마이신, 암포테리신B (amphotericin B, Gibco, USA)가 함유된 DPBS를 이용하여 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 두 차례 세척하였다.

[0051] 10% FBS (fetal bovine serum), 1% L-글루타민 (Glutamax™및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 4mL DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)을 사용하여 25 T-플라스크 (NuncTM, Roskilde, Denmark) 내에서 5% CO_2, 37℃와 습한 (humidity) 조건으로 상기 초자화 동결보존된 치아 주변조직에서 유래된 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 배지는 3일에 한번씩 교체하였다. 동물에 투여하기 바로 직전에, 계대배양 4~5회의 세포를 0.25% 트립신/EDTA로 배양용기 바닥에서 떼어낸 후 DPBS로 세척하였다. 혈구계수기 (hemocytometer)를 사용하여 분리한 세포들을 계수하고, 세포 1×10^6 개를 차가운 DPBS 200 ㎕에 희석하여 이후 실험에 사용하였다 (이하, MSCs라 한다).

[0053] **실시예 2. 고지방식 섭취를 통한 남성 불임 동물모델 제조**

[0054] 20-22g의 8주령 수컷 C57BL/6J 마우스 40마리를 Central Lab Animal Inc. (Seoul, Korea)로부터 구매하여 사용하였다. 모든 마우스는 12시간의 명암주기를 유지하여 방 온도는 25±2℃, 습도 30-40%로 사육하였고 물과 음식에 대해 자유롭게 접근 가능하게 하였다. 마우스들은 무작위로 하기 4 그룹으로 나누었다:

[0055] 1. 대조군 (Con) (n=10): 10주간 정상식이

[0056] 2. HFD 그룹 (n=10): 10주간 60 kcal%의 지방을 포함하는 고지방식이 + 10주 후 200 ㎕ PBS 복강내 투여

[0057] 3. MSCi 그룹 (n=10): 10주간 60 kcal%의 지방을 포함하는 고지방식이 + 고지방식이 5주, 7주 및 9주 후 1×

10^6/200 μl MSCs를 각각 복강내 투여

[0058] 4. MSCs 그룹 (n=10): 10주간 60 kcal%의 지방을 포함하는 고지방식이 + 고지방식이 8주 후 1×10^6/200 μl MSCs를 5일 연속 복강내 투여.

[0059] 매주 모든 마우스들의 체중을 측정하고, 10주 후 0.5 μL/g tiletamine-zolazepam (Zoletil®) 및 0.5 μL/g xylazine (Rompun, Bayer Korea Ltd., Seoul, Korea)를 주입하여 희생시켰다. 심장 천자 (cardiac puncture)하여 마우스의 혈액을 수집하고, 헤파린이 포함된 PBS로 관류하여 잔류 혈액을 제거하였다. 간, 고환 조직을 수득하고 조직 무게/체중 계산을 위해 무게를 측정하였다. 모든 동물 실험은 경상대학교의 실험동물 처치와 사용에 관한 가이드라인을 따라 수행하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0060] 도 1의 A에 나타낸 바와 같이, HDF 그룹의 체중은 고지방식이 3주부터 대조군보다 유의하게 더 높았다 ($p<0.05$). MSCi 그룹의 체중은 MSC의 첫번째 투여시 HFD 그룹과 비교하여 체중이 현저히 낮았다 ($p<0.05$). 간 중량의 경우, 도 1의 B에 나타낸 바와 같이, HFD 그룹의 간 중량은 대조군에 비해 현저히 증가하였고 ($p<0.05$), MSCi 그룹은 HFD 그룹에 비해 현저히 감소한 간 중량을 나타냈으며 ($p<0.05$), 반면 MSCs 그룹은 HFD 그룹과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한, 고환 중량의 경우, 도 1의 C에 나타낸 바와 같이, HFD 그룹의 고환 중량은 대조군에 비해 유의하게 감소되었으며 ($p<0.05$), MSCi 및 MSCs 그룹 모두 HFD 그룹에 비하여 고환 중량이 현저히 증가하였음을 확인하였다 ($p<0.05$).

[0062] **실시예 3. MSC 투여 전후의 조직학적 분석**

[0063] 간 및 고환에 대한 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 치료적 효과를 확인하기 위하여, 조직학적 분석을 수행하였다. 간, 고환 조직을 4% 포름알데하이드에 고정시키고 탈수시킨 다음 파라핀에 끼워 5 μm 두께의 절편으로 절단하였다. 자일렌 (xylene)을 사용하여 조직 절편에서 파라핀 성분을 제거한 후, 에탄올로 재수화 (rehydration)한 뒤 H&E (hematoxylin and eosin)으로 염색하였다. 염색된 모든 조직은 탈수, 세척과정을 거쳐 permount (Fisher scientific, NH, USA)로 마운팅한 뒤 광학현미경 (Nikon Eclipse 80i) 및 Photo Imaging System (Canon 600D)으로 염색 정도를 확인하였다. 세정관 (seminiferous tubule) 지름 및 레이디히 (Leydig) 세포 수는 NIS Elements BR3.2를 사용하여 측정하였다. 각 그룹 당 10마리 마우스에서 세정관 총 150개를 측정하였고 (마우스 당 3 field, 각 field 당 무작위로 세정관 5개), 레이디히 세포는 30개의 캡쳐된 이미지에서 계수되었다 (마우스 당 3 field, 10마리). 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0064] 도 2에 나타낸 바와 같이, 대조군은 세정관에서 정자 형성의 관찰과 함께 정상적인 고환의 조직학적 특징을 나타낸 반면, HFD 그룹은 세정관의 크기가 대조군보다 작고, 30% 정도의 세정관에서 정세포 (spermatid)의 수가 적거나, 내강 (lumen)이 없거나, 내강에서 정자형성이 일어나지 않는 등의 비정상적 특징이 관찰됨을 확인하였다. 한편, MSCs 및 MSCi 그룹은 고환 구조가 회복되고, 내강에서 정자가 형성되는 등 세정관의 개선을 보임을 확인하였다 (A). 또한, 세정관 지름의 경우 HFD 그룹이 대조군보다 현저히 감소하였고 ($p<0.05$), MSCs 및 MSCi 그룹에서는 지름 길이가 증가하여 세정관의 조직학적 특징이 현저히 회복됨을 확인하였다 ($p<0.05$) (B). 나아가, 테스토스테론을 생성하는 레이디히 (Leydig) 세포의 경우 HFD 그룹은 대조군보다 세포 수가 현저히 감소하였고 ($p<0.05$), 반면 MSCi 및 MSCs 그룹에서는 세포 수가 현저히 증가함을 확인하였다 ($p<0.05$) (C).

[0065] 상기 실험 결과를 통해, 고지방식이로 고환 위축이 유도된 NAFLD 및 남성 불임동물모델이 성공적으로 제조되었으며 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포 투여 시 남성 불임에 효과가 있음을 확인하였다. 한편, 투여 방식에 따라 치료 효능에 약간의 차이가 있었는데, 고지방식이 5주, 7주 및 9주 후의 각 시점에서 중간엽 줄기세포를 투여한 MSCi 그룹이 8주 후 연속 5일간 중간엽 줄기세포를 투여한 MSCs 그룹보다 체중 및 세정관 회복에 더 우수한 치료 효과를 보임을 확인하여 이후 실험에서는 MSCi 그룹만을 MSC 그룹으로 선택하여 실험을 수행하였다 (이하, MSC 그룹이라 한다).

[0067] **실시예 4. MSC 투여에 따른 세포사멸 분석**

[0068] 고지방식이에 의해 유도된 세포사멸을 평가하기 위하여, TUNEL 분석을 수행하였다. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) kit (TUNEL, Roche, IN, USA)를 이용하여 간, 고환 조직의 세포사멸 (apoptosis) 수준을 평가하였다. 각 슬라이드에서 10개 영역을 무작위로 선택하여

400배율 하에서 갈색으로 염색된 핵의 수를 TUNEL 양성 세포의 수로 계수하고, 측정된 숫자의 평균을 계산하였다. 모든 분석은 NIS Elements BR3.2.를 사용하여 맹검방식으로 수행되었다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0069] 도 3에 나타낸 바와 같이, HFD 그룹의 간 조직과 고환 조직에서 갈색으로 염색된 핵이 현저히 증가하였고, 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포를 투여한 MSC 그룹에서는 현저히 감소하였음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 간 및 고환 조직 모두에서 고지방식이에 의해 세포 사멸이 현저히 증가하나 ($p<0.05$), 중간엽 줄기세포를 투여함에 따라 세포 사멸이 현저히 감소함을 확인하였다 ($p<0.05$).

[0071] **실시예 5. MSC 투여에 따른 간 기능의 변화**

[0072] 남성 불임 동물모델에서 에스트로겐 대사와 관련된 간 기능의 변화를 평가하기 위해, 아로마타제 (aromatase)와 CYP1A2의 발현 수준을 면역조직화학법으로 분석하였다. 면역조직화학염색 (immunohistochemistry, IHC)을 위하여 재수화된 절편을 0.1 M 시트르산 버퍼 (pH 6.0)에 10분간 끓여 항원을 복원하고, 3% H_2O_2로 30분 동안 실온에서 반응시킴으로써 내인성 퍼옥시다아제 (peroxidase) 활성을 차단시켰다. 조직 절편을 1:100으로 희석된 ABP (LS-B12124, LSBio), 모노클로날 마우스 항-싸이토크롬 (anti-cytochrome) P450 1A2, CYP1A2 (sc-53241, Santacruz), 폴리클로날 래빗 항-아로마타제 (ab18995, Abcam)로 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 그 후, 1:200으로 희석되고 바이오틴과 결합된 2차 항체 IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 적용시킨 뒤, ABC 시약 (avidin-biotin-peroxidase complex; ABC Elite Kit, Vector Laboratories)으로 반응시켰다. 모든 슬라이드는 0.05% DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma-Aldrich)으로 발색한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다. 각 그룹 당 30개 field (10개 슬라이드로부터 선택된 3개의 무작위 field)에서 양성 신호를 분석하고, 양성 신호 영역/모든 영역의 비율을 계산하였다. 그 결과를 도 4 및 5에 나타내었다.

[0073] 도 4에 나타낸 바와 같이, 간 실질 (liver parenchyma)에 지방이 축적됨에 따라 HFD 그룹의 아로마타제 발현 정도가 현저히 증가한 반면 ($p<0.05$), MSC 그룹에서는 간 지방증이 개선됨에 따라 아로마타제 발현 정도가 현저히 감소하였음을 확인하였다 ($p<0.05$) (A 및 C). 또한, 간의 주요 에스트로겐 수산화효소 (hydroxylase)인 CYP1A2는 대조군의 간에서 전체적으로 광범위하게 발현된 반면, HFD 그룹에서 발현이 극적으로 감소하였고, MSC 그룹에서는 간 지방증이 개선됨에 따라 CYP1A2의 발현도 현저히 회복됨을 확인하였다 (B 및 D). 상기 결과를 통해, 남성 불임 동물모델에 중간엽 줄기세포를 투여함에 따라 간 특이적인 에스트로겐 대사가 회복되고, 이를 통해 고지방식이가 유도된 마우스에서 간 지방증도 함께 개선됨을 확인하였다. 상기 결과는 또한, HFD 동물 모델의 경우 호르몬 불균형이 유도되어 에스트로겐 대사가 비정상적일 것을 시사한다.

[0074] 나아가, 도 5에 나타낸 바와 같이, 세정관 내 세르톨리 (Sertoli) 세포에서 분비되는 안드로겐 결합 단백질 (Androgen binding protein, ABP)의 경우 대조군의 세정관 기저막에서 고발현되는 반면, HFD 그룹에서는 세르톨리 세포의 구조적 변화 또는 소실 없이 발현이 현저히 감소됨을 확인하였다 ($p<0.05$). 한편, 중간엽 줄기세포를 투여한 경우 ABP의 발현은 유의하게 증가함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, ABP의 낮은 수치는 세르톨리 세포의 소실로 인한 것이 아니라 고지방식이로 인해 유도된 간조직 손상에 따른 호르몬 이상으로 인한 것임을 확인하였다.

[0076] **실시예 6. MSC 투여에 따른 성호르몬 불균형 개선 효과**

[0077] 실시예 2에 기재한 방법으로 심장 천자 (cardiac puncture)하여 마우스의 혈액을 수집하고, 400 xg에서 10분간 원심분리하여 혈청을 수집하고 사용 전까지 -80℃에 보존하였다. 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포가 고지방식이와 NALFD에 의해 유도된 성호르몬 불균형을 개선할 수 있는지 확인하기 위하여 ELISA를 통해 마우스 혈청에 있는 테스토스테론 (T; ADI-900-065, ENZO), 17β-estradiol(E2; ADI-900-174, ENZO), FSH (LS-F39325, LSBio), LH (LSF22503, LSBio), TNF-α (ADI-900-047, ENZO), IL-1β을 분석하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0078] 도 6에 나타낸 바와 같이, HFD 그룹에서 테스토스테론 수치가 유의하게 감소했으나 ($p<0.05$), MSC 투여 이후 현저히 증가함을 확인하였다 ($p<0.05$) (A). 아로마타제에 의해 테스테스테론으로부터 전환된 17β-estradiol의 경우, HFD 그룹에서 그 수치가 현저히 증가하였으며 (B), 성호르몬 균형의 임상적 지표에 해당하는 테스토스테론/17β-estradiol값은 MSC 투여 이후 현저히 증가하였다 ($p<0.05$) (C). 상기 결과를 통해, 고지방식이 동물 모델에서 성호르몬 불균형이 유도될 수 있으며, 이를 중간엽 줄기세포 투여를 통해 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0079] 나아가, 남성 성선기능저하증 (male hypogonadism)을 확인하기 위하여 고환을 자극하여 ABP 및 테스토스테론을 생산하는 FSH 및 LH 수치를 측정한 결과, 두 생식선 자극 호르몬 모두 HFD 그룹에서 유의하게 감소하였으나, MSC 투여 이후 유의하게 증가하였음을 확인하였다 (D 및 E). 상기 결과를 통해, ABP 생산량의 감소는 성호르몬 불균형에 의해 유발된 FSH의 감소에 영향을 받은 것임을 확인하였다.

[0080] 상기 실시예들에서 확인한 본 발명의 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 남성 불임 치료에 대한 작용 메커니즘 (Mode of Action, MoA)을 도 7에 나타내었다.

[0082] NAFLD를 유도시키는 다양한 동물 모델 중에서, 고지방식이 동물 모델은 인간 NAFLD와 가장 유사한 병리학적 특징을 가지며, 체중 증가, 혈당 증가 및 대사성 질병 증가와 같은 유사한 생리적 변화를 나타내는 것으로 보고되어 있다.

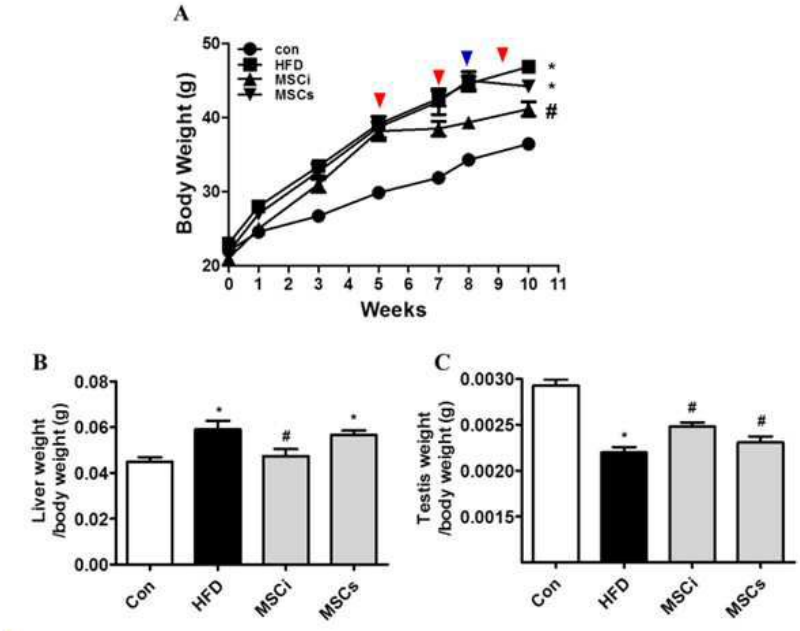
[0083] 본 발명자들은 비만, NAFLD를 가진 남성에서 나타날 수 있는 남성 불임의 새로운 치료제를 개발하기 위하여 고지방식이로 유도한 동물 모델을 제조하고, 상기 동물 모델에 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포의 투여 시 지방 대사와 간세포 회복을 통해 세정관의 조직학적 특성 회복, 성호르몬 불균형의 완화, 다양한 호르몬 대사효소의 발현 및 조직학적 소견이 정상화됨을 확인하였다.

[0084] 뿐만 아니라, 본 발명의 유효성분인 치아 주변조직 유래 중간엽 줄기세포는 가장 비침습적인 방법으로 세포를 얻을 수 있어, 본 발명은 남성 불임에 대한 세포 치료제로서 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

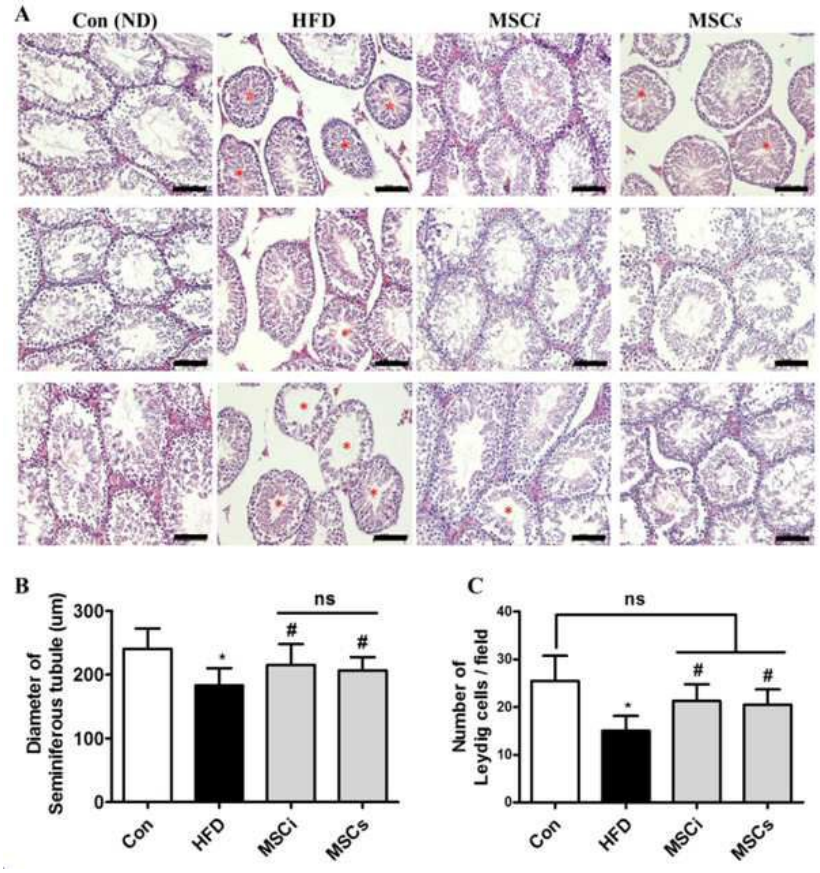
[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

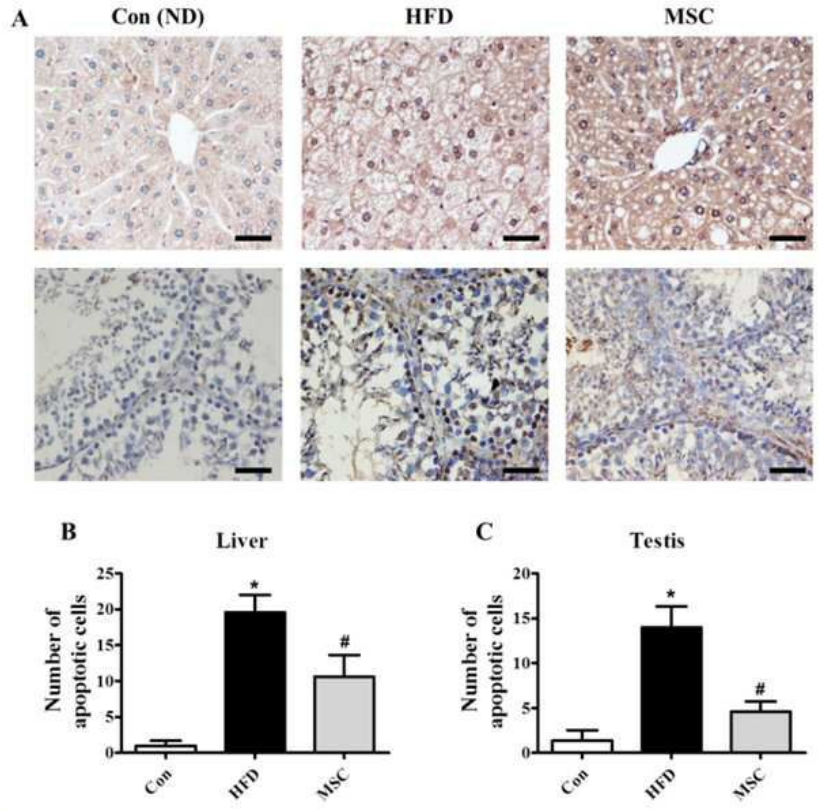
도면1



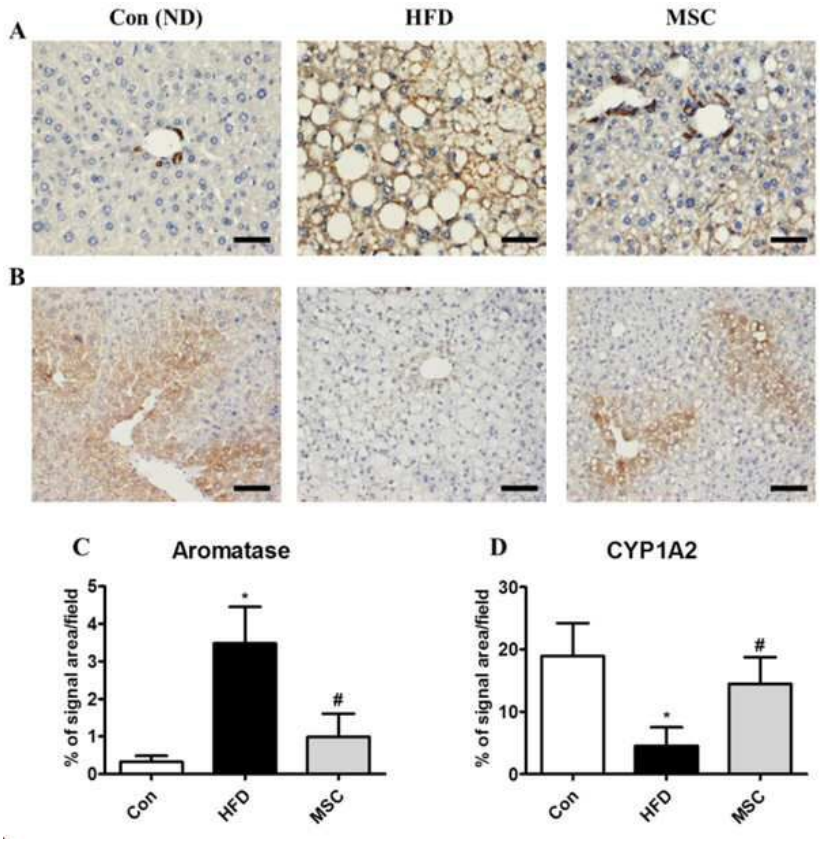
도면2


A
Con (ND)
HFD
MSCi
MSCs
B
Diameter of Seminiferous tubule (um)
300
200
100
0
ns
#
#
*
Con
HFD
MSCi
MSCs
C
Number of Leydig cells / field
40
30
20
10
0
ns
#
#
*
Con
HFD
MSCi
MSCs

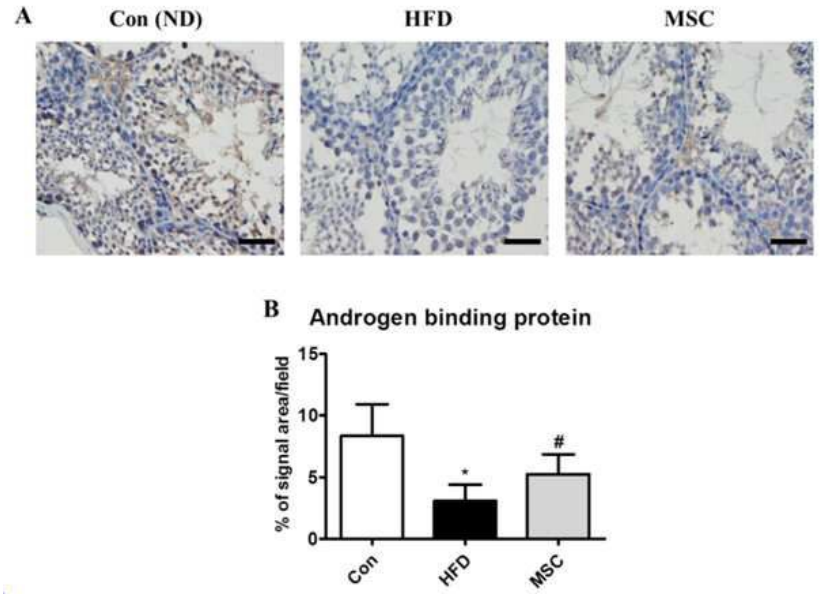
도면3


A
Con (ND)
HFD
MSC
B
Liver
Number of apoptotic cells
25
20
15
10
5
0
*
#
Con
HFD
MSC
C
Testis
Number of apoptotic cells
20
15
10
5
0
*
#
Con
HFD
MSC

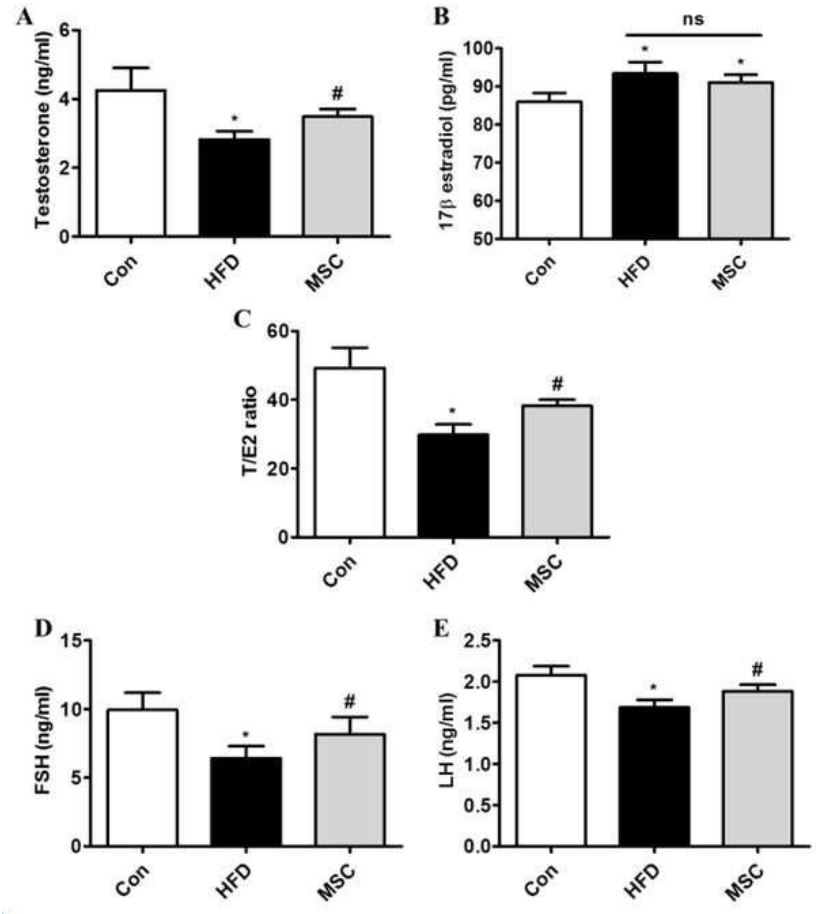
도면4


A
Con (ND)
HFD
MSC
B
C
Aromatase
% of signal area/field
Con
HFD
MSC
D
CYP1A2
% of signal area/field
Con
HFD
MSC

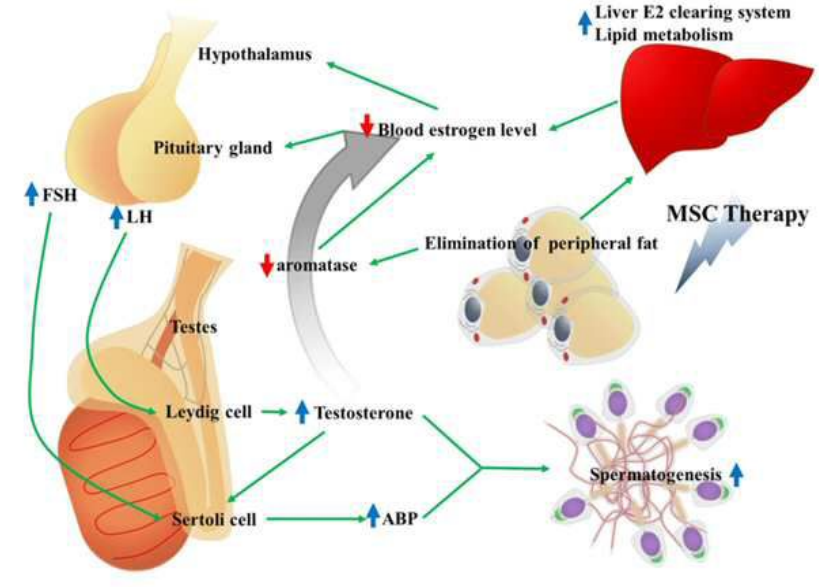
도면5


A
Con (ND)
HFD
MSC
B
Androgen binding protein
% of signal area/field
Con
HFD
MSC

도면6


A
Testosterone (ng/ml)
Con
HFD
MSC
B
17β estradiol (pg/ml)
ns
C
T/E2 ratio
D
FSH (ng/ml)
E
LH (ng/ml)

도면7


Liver E2 clearing system
Lipid metabolism
Hypothalamus
Blood estrogen level
Pituitary gland
FSH
LH
MSC Therapy
Elimination of peripheral fat
aromatase
Testes
Leydig cell
Testosterone
Spermatogenesis
Sertoli cell
ABP