



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0036044
(43) 공개일자 2018년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/545 (2014.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A61K 35/545 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0126091

(22) 출원일자 2016년09월30일

심사청구일자 2016년09월30일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

건국대학교 글로벌산학협력단

충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로벌캠퍼스)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

정형민

서울특별시 강동구 고덕로20길 53, 201호

주명수

서울특별시 강남구 선릉로 120, 9동 701호(개포우성1차 아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

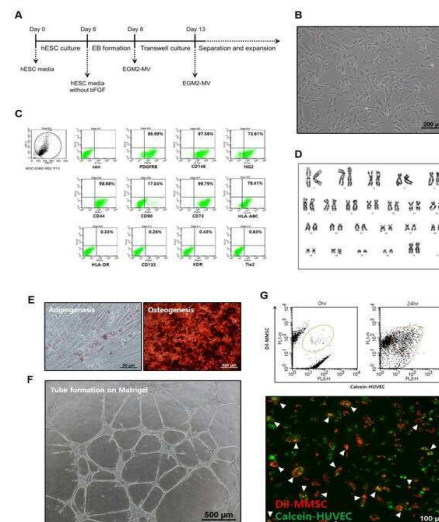
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 M-MSC를 유효성분으로 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 M-MSC(multipotent-mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 M-MSC는 hESC(human embryonic stem cell) 유래의 세포이고, 상기 M-MSC는 방광 내의 유로상피 및 기질조직 내로 직접 분화하여 방광통증 증후군을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신동명

서울특별시 강동구 고덕로 131, 139동 602호

김아람

서울특별시 성동구 마조로16길 31, 나동 302호(명성빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3365

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발사업

연구과제명 방광기능이상 질환 줄기세포 치료법의 전임상 효능 모니터링 기법개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2014.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

hESC(human embryonic stem cell) 유래의 M-MSc(multipotent-mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 M-MSc는 CD140B(beta-type platelet-derived growth factor receptor) 및 CD44(cluster of differentiation 44) 항원에 대한 양성 세포인 것을 특징으로 하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 M-MSc는 hESC 세포에서 EB(embryoid body) 형성에 의하여 분화되고, 다공성막(porous Transwell membrane)의 아래쪽으로 이동하여 분리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 M-MSc는 스핀들 및 섬유아세포-유사의 형태를 가지고, 매트릭젤(Matrigel)에서 튜브-형성 능력(tube-forming capacity)을 가지며, 전-맥관형성력(pro-angiogenic potency)을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 M-MSc는 하기 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물:

(a) CD73, CD105, CD90, CD146 및 NG2(neural/glia antigen 2) 항원을 발현함;

(b) HLA-A(human leukocyte antigen A), HLA-B(human leukocyte antigen B), HLA-C(human leukocyte antigen C), HLA-DR(human leukocyte antigen - antigen D Related), CD133, KDR(Kinase Insert Domain Receptor) 및 TIE-2(TEK tyrosine kinase, endothelial) 항원은 발현하지 않음;

(c) OCT4(octamer-binding transcription factor 4), NANOG(Nanog Homeobox) 및 SOX2(SRY (sex determining region Y)-box 2)의 발현이 하향조절됨; 및

(d) EMT(Epithelial-mesenchymal transition) 마커인 피브로넥틴이 상향조절됨.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 M-MSc는 치료학적 유효량인 1×10^5 내지 1×10^6 의 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 M-MSc는 방광 내의 유로상피 및 기질조직 내로 직접 분화하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 방광통증 증후군은 방광 내의 상피세포 손상으로 인하여 유발되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 방광통증 증후군은 간질성 방광염, 만성방광염, 케타민 유발 방광염 및 하부요로증상으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 통증은 하복부 통증, 골반 통증, 방광 통증, 치골위 통증, 질 통증, 음경 통증, 고환 통증, 음낭 통증, 회음부 통증, 요도 통증, 성교통 및 방광이 채워짐에 따라 증가할 수 있는 통증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 1 항의 조성물을 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 M-MSc를 유효성분으로 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간질성 방광염(IC)은 통증, 예를 들면 골반통의 증후, 및 하부 요로 증후군(LUTS), 예를 들면 증가된 빈뇨/절박뇨를 특징으로 하는, 원인이 밝혀지지 않은 만성 방광 질환이다. 보다 최근의 용어는 이 복합 증후를 집합적으로 개시하기 위해 IC와 함께 통증성 방광 증후군(PBS)([MacDiarmid SA et al. Rev Urol 2007; 9(1): 9-16]) 또는 방광 통증 증후군(BPS)([van der Merve et al. European Urology 53(2008) 60-67])를 포함하는 것으로, 즉 IC/PBS/BPS로 변화되고 있다.

[0003] IC/PBS/BPS의 유병률은 임상적으로 확인된 질병을 갖는 100,000명의 여성당 67 내지 230명으로 다양하며, 흔히 자궁내막염, 재발성 요로 감염, 과민성 방광 또는 외음부 통증으로 잘못 진단되거나 저진단되기 때문에 이 수치는 아마도 더 높을 것이다(Forrest J B et al. Clinical Courier 2006; 24(3):1-8). IC는 삶의 질에 상당한 영향을 미치고, 여행, 가족관계 및 활동에 영향을 미치고(Slade D et al. Urol 1997; 49 (5A Suppl):10-3), 또한 우울성 증후과 관련되어 있다(Rothrock N E et al. J Urol 2002; 167: 1763-1767).

[0004] 단일한 병인이 확인되지 않았고, 이는 아마도 악화되는 조직 손상, 흉터 및 섬유증을 이끌어내는 상피 세포 기능부전, C-신경 섬유 활성화, 및 비만 세포의 증식이라는 자가-영속성 과정을 야기하는 여러 곳의 요도 손상을 갖는 다원적인 과정이다. 염증으로부터 C 섬유의 반복적인 자극 및 방광의 감각 신경의 상향조절은 궁극적으로 영구적인 변화(집중화)를 일으켜, 통각과민, 만성 방광 통증 및 배뇨 장애를 일으킨다(Forrest J B et al. Clinical Courier 2006; 24(3):1-8).

[0005] 현재 이용가능한 치료법의 부작용이나 효능 제한이 없는, 신규하고 효과적인 간질성 방광염 및/또는 통증성 방광 증후군 및/또는 방광 통증 증후군의 통증 및/또는 하부 요로 증후군 치료법이 제공될 필요가 지속적으로 존재한다. 즉, 방광통증증후군은 아직까지 명확한 원인과 병태 생리가 밝혀져 있지 않고 치료제들(항우울제, 항히스타민제, 진통제, 항콜린제 등) 역시 효과가 그리 좋지 못하다. 방광통증증후군의 발생율은 Curhan 등이 발표한 미국 통계에 따르면 100,000명당 60명의 발병률을 보고하였고, 유럽에서는 100,000명당 18명, 일본에서는 100,000명당 5~7명 정도로 발생율이 높지는 않지만, 증상의 심각성은 깊어 삶의 질에 큰 영향을 주고 있어 효과적인 치료제 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 1. 미국공개특허 제2014/0079672호
(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 제2016-0023477호

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. Song, M., et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy Alleviates Interstitial Cystitis by Activating Wnt Signaling Pathway. Stem Cells and Development 24, 1648-1657 (2015).
(비특허문헌 0002) 2. Kim, A., et al. Mesenchymal stem cells protect against the tissue fibrosis of ketamine-induced cystitis in rat bladder. Scientific Reports 6, 30881 (2016).
(비특허문헌 0003) 3. Kim, J.M., et al. Perivascular Progenitor Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells Exhibit Functional Characteristics of Pericytes and Improve the Retinal Vasculature in a Rodent Model of Diabetic Retinopathy. Stem Cells Translational Medicine (2016).
(비특허문헌 0004) 4. Hong, K.-S., et al. A Porous Membrane-Mediated Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Embryonic Stem Cells. Tissue Engineering Part C: Methods 21, 322-329 (2014).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 hESC(human embryonic stem cell) 유래의 M-MSC(multipotent-mesenchymal stem cell)를 유효 성분으로 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 M-MSC는 CD140B(beta-type platelet-derived growth factor receptor) 및 CD44(cluster of differentiation 44) 항원에 대한 양성 세포인 것을 특징으로 하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 hESC(human embryonic stem cell) 유래의 M-MSC(multipotent-mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 M-MSC는 CD140B(beta-type platelet-derived growth factor receptor) 및 CD44(cluster of differentiation 44) 항원에 대한 양성 세포인 것을 특징으로 하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 M-MSC는 hESC 세포에서 EB(embryoid body) 형성에 의하여 분화되고, 다공성 막(porous Transwell membrane)의 아래쪽으로 이동하여 분리되는 것일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 M-MSC는 스핀들 및 섬유아세포-유사의 형태를 가지고, 매트릭젤(Matrigel)에서 튜브-형성 능력(tube-forming capacity)을 가지며, 전-맥관형성력(pro-angiogenic potency)을 가지는 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 M-MSC는 (a) CD73, CD105, CD90, CD146 및 NG2(neural/glial antigen 2) 항원을 발현함; (b) HLA-A(human leukocyte antigen A), HLA-B(human leukocyte antigen B), HLA-C(human leukocyte antigen C), HLA-DR(human leukocyte antigen - antigen D Related), CD133, KDR(Kinase Insert Domain Receptor) 및 TIE-2(TEK tyrosine kinase, endothelial) 항원은 발현하지 않음; (c) OCT4(octamer-binding transcription factor 4), NANOG(Nanog Homeobox) 및 SOX2(SRY (sex determining region Y)-box 2)의 발현이 하향조절됨; 및 (d) EMT(Epithelial-mesenchymal transition) 마커인 피브로넥틴이 상향조절됨;을 특징을 가지는 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 M-MSC는 치료학적 유효량인 1×10^5 내지 1×10^6 의 세포를 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 2.5×10^5 내지 1×10^6 의 세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 M-MSC는 방광 내의 유로상피 및 기질조직 내로 직접 분화하는 것일 수 있다.

- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방광통증 증후군은 방광 내의 상피세포 손상으로 인하여 유발되는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방광통증 증후군은 간질성 방광염, 만성방광염, 케타민 유발 방광염 또는 하부요로증상인 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 통증은 하복부 통증, 골반 통증, 방광 통증, 치골위 통증, 질 통증, 음경 통증, 고환 통증, 음낭 통증, 회음부 통증, 요도 통증, 성교통 또는 방광이 채워짐에 따라 증가할 수 있는 통증인 것일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 방광통증 증후군의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 M-ESC는 hESC에서 유래된 세포로서 기존의 간엽줄기세포를 사용하여 치료하는 것보다 더욱 적은 수의 세포로 방광통증 증후군의 예방 또는 치료에 대한 현저한 효과를 보이고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 hESC 유래의 M-ESC에 대한 특징을 나타내는 결과이다. (A)는 hESC에서 M-ESC로의 분화과정을 나타내는 것이며, (B)는 M-ESC의 morphology를 나타내는 것이고, (C)는 M-ESC의 표면 항원의 발현 여부를 확인한 것이며, (D)는 M-ESC의 핵형분석 결과를 나타낸 것이며, (E)는 지방세포분화(adipogenesis) 및 뼈세포분화(osteogenesis) 분화 능력이 있음을 확인하였고, (F) 매트릭젤에서 튜브-형성 능력을 확인한 것이고, (G)는 HUVEC 혈관내피세포와 공배양시 세포 간 상호작용 능력이 있음을 확인한 것이다.

도 2는 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에 M-ESC를 이식한 경우의 효과를 나타낸 것이다(Sham: 대조군; HCl-IC: HCl로 유도된 IC/BPS 그룹; 및 HCl-IC+M-ESC: IC/BPS 랫트에 M-ESC를 주입한 그룹). (A)는 각 그룹에서의 방광내압(intravesical pressure, IVP), 복강내압(intraabdominal pressure, IAP) 및 배뇨부피(micturition volume)를 측정된 결과이고, (B)는 각 그룹에서의 H&E staining, Toluidine blue staining, Masson's trichrome staining 및 TUNEL staining 에 대한 결과를 나타내며, (C)는 각 그룹에서의 NVC(non-voiding contraction), MI(micturition interval), MV(micturition volume) 및 BC(bladder capacity)를 측정된 결과를 나타낸 것이고, (D)는 각 그룹에서의 비만세포침투(mast cell infiltration), 섬유증(fibrosis) 및 세포사멸(apoptosis)에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에 M-ESC를 이식한 경우의 효과를 나타낸 것이다(Sham: 대조군; HCl-IC: HCl로 유도된 IC/BPS 그룹; HCl-IC+M-ESC(250K): IC/BPS 랫트에 2.5×10^5 M-ESC를 주입한 그룹; 및 HCl-IC+M-ESC(500K): IC/BPS 랫트에 5×10^5 M-ESC를 주입한 그룹). (A)는 각 그룹에서의 방광내압(intravesical pressure, IVP), 복강내압(intraabdominal pressure, IAP) 및 배뇨부피(micturition volume)를 측정된 결과이고, (B)는 BP(basal pressure), Maximum pressure, MP(micturition pressure) 및 RV(residual volume)를 측정된 결과이며, (C)는 1.0×10^6 M-ESC를 이식 2주 혹은 4주 후에 NVC(non-voiding contraction), MI(micturition interval), MV(micturition volume) 및 BC(bladder capacity)를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에 M-ESC를 이식한 경우의 조직학적 분석 결과를 나타낸 것이다(Sham: 대조군; HCl-IC: HCl로 유도된 IC/BPS 그룹; HCl-IC+M-ESC(250K): IC/BPS 랫트에 2.5×10^5 M-ESC를 주입한 그룹; HCl-IC+M-ESC(500K): IC/BPS 랫트에 5×10^5 M-ESC를 주입한 그룹; 및 HCl-IC+M-ESC(1000K): IC/BPS 랫트에 1×10^6 M-ESC를 주입한 그룹). 각 그룹에서의 시토크라틴, Toluidine blue staining, Masson's trichrome staining 및 TUNEL staining 에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에 M-ESC를 이식한 경우와 UCB-MSC를 이식한 경우의 효과를 비교한 결과이다(HCl-IC+UCB-MSC(100K): IC/BPS 랫트에 1×10^5 UCB-MSC를 주입한 그룹; HCl-IC+UCB-MSC(250K): IC/BPS 랫트에 2.5×10^5 UCB-MSC를 주입한 그룹; HCl-IC+M-ESC(100K): IC/BPS 랫트에 1×10^5 M-ESC를 주입한 그룹; 및 HCl-IC+M-ESC(250K): IC/BPS 랫트에 2.5×10^5 M-ESC를 주입한 그룹). (A)는 각 그룹에서의 방광내압(intravesical pressure, IVP), 복강내압(intraabdominal pressure, IAP) 및 배뇨부피(micturition volume)를 측정된 결과

고, (B)는 BP, MP, BC, MV, RV 및 MI에 대한 결과에 대한 것이다.

도 6은 LPS로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에 M-MSC를 이식한 경우의 효과를 나타낸 것이다(Sham: 대조군; LPS-IC: LPS로 유도된 IC/BPS 그룹; LPS-IC+M-MSC(250K): IC/BPS 랫트에 2.5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; LPS-IC+M-MSC(500K): IC/BPS 랫트에 5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; 및 LPS-IC+M-MSC(1000K): IC/BPS 랫트에 1×10^6 M-MSC를 주입한 그룹). (A)는 각 그룹에서의 BP, MP, BC, MV, RV 및 MI에 대한 결과에 대한 것이고, (B)는 각 그룹에서의 방광내압(intravesical pressure, IVP), 복강내압(intraabdominal pressure, IAP) 및 배뇨부피(micturition volume)을 측정된 결과이며, (C)는 각 그룹에서의 H&E staining, Toluidine blue staining 및 TUNEL staining에 대한 결과를 나타내며, (D)는 각 그룹에서의 비만세포침투(mast cell infiltration 및 세포사멸(apoptosis)에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 LPS로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에 M-MSC를 이식한 경우의 조직학적 분석 결과를 나타낸 것이다 (Sham: 대조군; LPS-IC: LPS로 유도된 IC/BPS 그룹; LPS-IC+M-MSC(250K): IC/BPS 랫트에 2.5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; LPS-IC+M-MSC(500K): IC/BPS 랫트에 5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; 및 LPS-IC+M-MSC(1000K): IC/BPS 랫트에 1×10^6 M-MSC를 주입한 그룹). 각 그룹에서의 시토크라틴, Toluidine blue staining, Masson's trichrome staining 및 TUNEL staining에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 케타민(ketamine)으로 유발된 KC 랫트 모델에 M-MSC를 이식한 경우의 효과를 나타낸 것이다(Sham: 대조군; KC: 케타민으로 유발된 KC 그룹; KC+M-MSC(250K): KC 랫트에 2.5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; KC+M-MSC(500K): KC 랫트에 5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; 및 KC+M-MSC(1000K): KC 랫트에 1×10^6 M-MSC를 주입한 그룹). (A)는 각 그룹에서의 BP, MP, BC, MV, RV 및 MI에 대한 결과에 대한 것이고, (B)는 각 그룹에서의 Toluidine blue staining, Masson's trichrome staining 및 TUNEL staining에 대한 결과를 나타낸 것이며, (C)는 각 그룹에서의 비만세포침투(mast cell infiltration), 섬유증(fibrosis) 및 세포사멸(apoptosis)에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 케타민(ketamine)으로 유발된 KC 랫트 모델에 M-MSC를 이식한 경우의 효과를 나타낸 것이다(Sham: 대조군; KC: 케타민으로 유발된 KC 그룹; KC+M-MSC(250K): KC 랫트에 2.5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; KC+M-MSC(500K): KC 랫트에 5×10^5 M-MSC를 주입한 그룹; 및 KC+M-MSC(1000K): KC 랫트에 1×10^6 M-MSC를 주입한 그룹). (A)는 각 그룹에서의 방광내압(intravesical pressure, IVP), 복강내압(intraabdominal pressure, IAP) 및 배뇨부피(micturition volume)을 측정된 결과이고, (B)는 각 그룹에서의 H&E staining에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 LPS로 유도된 IC/BPS 랫트 모델 또는 케타민(ketamine)으로 유발된 KC 랫트 모델에서 유전자 발현량을 측정된 결과이다. (A)는 LPS로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에서의 유전자 발현량을 측정된 것이고(Sham: 대조군; LPS-IC: LPS로 유도된 IC/BPS 그룹; 및 LPS-IC+M-MSC: IC/BPS 랫트에 M-MSC를 주입한 그룹), (B)는 케타민(ketamine)으로 유발된 KC 랫트 모델에서의 유전자 발현량을 측정된 것이다(Sham: 대조군; KC: 케타민으로 유발된 KC 그룹; 및 KC+M-MSC: KC 랫트에 M-MSC를 주입한 그룹).

도 11은 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에서의 유전자 발현량을 측정된 결과이다(Sham: 대조군; HCl-IC: HCl로 유도된 IC/BPS 그룹; 및 HCl-IC+M-MSC: IC/BPS 랫트에 M-MSC를 주입한 그룹). (A)는 SMAD 유전자의 발현량을 측정된 것이고, (B)는 Wnt 신호 유전자의 발현량을 측정된 것이며, (C)는 성장인자 유전자의 발현량을 측정된 것이다.

도 12는 LPS로 유도된 IC/BPS 랫트 모델 또는 케타민(ketamine)으로 유발된 KC 랫트 모델에서 유전자 발현량을 측정된 결과이다. (A)는 LPS로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에서의 Shh, Ptc-1, Wnt6, Wnt8b, Wnt11, Fgf16, Egf, Igf1 등의 유전자 발현량을 측정된 것이고(Sham: 대조군; LPS-IC: LPS로 유도된 IC/BPS 그룹; 및 LPS-IC+M-MSC: IC/BPS 랫트에 M-MSC를 주입한 그룹), (B)는 케타민(ketamine)으로 유발된 KC 랫트 모델에서의 TNF α , Cxcl10, Card10, Il-4, Snai1, Snai3 등의 유전자 발현량을 측정된 것이다(Sham: 대조군; KC: 케타민으로 유발된 KC 그룹; 및 KC+M-MSC: KC 랫트에 M-MSC를 주입한 그룹).

도 13은 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에서 이식된 M-MSC의 in vivo 분포 및 종양형성 여부를 optical imaging 및 nanoScanPET/MRI로 측정된 결과이다. (A)는 M-MSC 이식 후 12 개월 뒤, 종양이 발생하지 않음을

nanoScanPET/MRI로 측정된 결과이며, (B)는 이식된 M-MSc의 생체 내 분포를 optical imaging으로 측정된 결과이고, (C)는 이식한 M-MSc의 방광 조직 내 분포도를 GFP 조직 염색을 통하여 확인한 결과이며, (D)는 생착된 M-MSc 분화 계통을 cytokeratin (CK, 요로상피세포 특이적 항원), 비멘틴 (기질 세포 특이적 항원) 및 RECA-1 (내피세포 특이적 항원)으로의 공동 면역염색 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트 모델에서 M-MSc 이식 후 종양원성을 6, 9 및 12개월에서 nanoScanPET/MRI로 측정된 결과이다.

도 15는 검시(necropsy) 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 M-MSc 이식 후 0일(0 DAT)과 이식 후 1일(1 DAT)에서의 이식한 세포에서 발생하는 생물발광을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 M-MSc 이식 후 1일(1 DAT)부터 이식 후 9일(9 DAT)까지의 이식한 세포에서 발생하는 생물발광을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명에서의 용어, "줄기세포(stem cell)"는 어떤 조직으로든 발달할 수 있는 세포를 의미한다. 기본적인 특징으로는 두 가지가 있는데, 우선 반복 분열하여 자신을 만들어 내는 자기 재생산(self-renewal), 그리고 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는다.
- [0022] 본 발명에서의 용어, "(중)간엽줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포의 한 종류로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 성체 줄기세포 중 조혈모세포는 주로 부유상태(non-adherent)로 존재하지만 간엽줄기세포는 주로 부착성 세포들이다. 특히, 제대 유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 골수 유래 간엽줄기세포, 지방 유래 간엽줄기세포, 근육 유래 간엽줄기세포, 신경 유래 간엽줄기세포, 피부 유래 간엽줄기세포, 양막 유래 간엽줄기세포 및 태반 유래 간엽줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 제대혈 유래 간엽줄기세포이다. 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.
- [0023] 본 발명에서의 용어, "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다.
- [0024] 본 발명에서의 용어, "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서의 용어, "유전자 발현"은 일반적으로 생물학적 활성이 있는 폴리펩티드가 DNA 서열로부터 생성되고 세포에서 생물학적 활성을 나타내는 세포 과정을 의미한다. 그런 의미로, 유전자 발현은 전사 및 해독 과정을 포함할 뿐만 아니라, 유전자 또는 유전자 산물의 생물학적 활성에 영향을 끼칠 수 있는 전사 후 및 해독 후 과정을 포함한다. 상기 과정들은 RNA 합성, 가공 및 수송뿐만 아니라, 폴리펩티드 합성, 수송 및 폴리펩티드의 해독 후 변형을 포함하지만, 이들에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에서는 유전자 발현의 태양으로 유전자 프로모터의 메틸화, mRNA 발현 및 단백질 발현의 경우를 모두 포함한다.
- [0026] 본 발명에서의 용어, "상향조절(up-regulation)"은 정상조직세포에 비하여, 활성화된 세포에서 세포내 전사(gene transcription) 또는 번역(gene translation)에 의해서 특정 유전자의 mRNA로의 발현 또는 단백질로 발현량이 현저하게 증가된 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서의 용어, "하향조절(down-regulation)"은 정상조직세포에 비하여, 활성화된 세포에서 세포내 전사(gene transcription) 또는 번역(gene translation)에 의해서 특정 유전자의 mRNA로의 발현 또는 단백질로 발현량이 현저하게 감소된 것을 의미한다.
- [0028] 본 발명에서의 용어, "통증"은 급성 통증, 만성 통증, 및 염증 요소를 갖는 임의의 통증을 비롯한 임의의 병인의 통증을 의미한다. 통증은 통증의 수용 및 감지를 포함하고, 통증은 통증 점수 및 당 분야에 잘 공지된 다른 방법을 이용하여 주관적으로 및 객관적으로 평가될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서의 용어, "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안

정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 치료는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "완화(Palliating)"하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.

[0030] 본 발명에서의 용어, "유효량"은 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있으며, 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 조성물은 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다.

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0034] 재료 및 방법

[0035] 1.1. hESC(human Embryonic Stem Cell)-유래 M-MSc(multipotent-mesenchymal stem cell)의 분화 및 배양방법

[0036] 본 발명에서 실험된 세포는 미분화된 H9-hESC 세포에서 분화시킨 세포로서, "M-MSc"로 명명하여 사용하였다. H9-hESC의 유지 및 M-MSc로의 분화(도 1A)는 기존에 기재된 바대로 수행되었다 (Kim, J.M., *et al. Stem Cells Translational Medicine* (2016); 및 Hong, K.-S., *et al. Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 322-329 (2014)). 구체적으로, 인간 배아줄기세포를 정상산소 상태(37°C, 5% CO₂ 인큐베이터)에서 EB(embryoid body) 형성을 통해 초기 분화시킨 후, 8 µm 다공크기를 가진 세포배양 삽입체 위에 올렸다. 올릴 때는 적어도 5%의 FBS가 혼입되어 있으나, 사이토카인은 첨가되지 않은 배지인 EBM-2(Cat:CC-3156, Lonza, San Diego, CA)을 사용하였다. 상기 올려진 초기 배양체를 약 일주일간 세포배양 삽입체 위에서 배양하였고 이와 같은 배양으로 세포가 배양 삽입체 아래로 이동하였으며, 세포의 이행 패턴은 특정 마커의 발현 정도를 PCR 분석을 통해 확인하였다.

[0037] 상기에 의해 준비된 M-MSc는 랫트 꼬리의 콜라겐 타입 I(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 코팅된 플레이트에서 EGM2-MV 배양액(Lonza, San Diego, CA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양되었다. 모든 M-MSc는 분화능력(multipotency)을 유지하기 위하여 10 passage 이하의 세포를 사용하였다. 표면 단백질 발현(surface protein expression), 세포증식(cell proliferation), 분화능력(multipotency; osteogenic, chondrogenic, 또는 adipogenic lineages로의 *in vitro* differentiation), *in vitro* angiogenesis assays 및 핵형분석(karyotyping)은 기존에 기재된 바대로 수행되었다 (Kim, J.M., *et al. Stem Cells Translational Medicine* (2016); 및 Hong, K.-S., *et al. Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 322-329 (2014)).

[0039] 1.2. 동물 모델 및 M-MSc의 투여

[0040] 모든 동물실험은 울산대학교 의과대학의 실험동물 운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 진행되었다(IACUC-2014-14-167). IC/BPS(interstitial-cystitis/bladder pain syndrome) 랫트 모델에 HCl 주입은 기존에 기재된 바대로 수행되었다(Song, M., *et al. Stem Cells and Development* 24, 1648-1657 (2015)). IC/BPS 동물 모델에 LPS(lipopolysaccharide) 점적주사를 위하여, 10주의 암컷 Sprague-Dawley rats (OrientBio, Gapyong, Gyeonggi-do, Korea)에 26-게이지 카테터(angiocatheter)를 이용하여 요도를 통한 방광으로 프로타민 황산염(protamine sulfate)을 점적주사하였고, 이는 요로상피의 디누데이션(삭박, denudation)을 위한 것이다. 45분 후, 방광이 비워지면, PBS(phosphate-buffer saline) 용액으로 씻고, 염증반응을 유도하기 위해 30분 동안 LPS(525 mg/rat, Sigma-Aldrich)로 처리하였다. 5주 이상 매주 PS/LPS(protamine sulfate/lipopolysaccharide)의 점적주사에 의해 요로상피의 만성적 상처를 유도할 수 있었다. 케타민(ketamine) 유발의 방광염(cystitis, KC)은 기존의 보고와 유사하게 유도되었다. 다만, 12주 이상 일

주일에 두 번에 걸쳐 25 mg/kg의 케타민 염산염(ketamine hydrochloride, Huons, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea, EK1352-11)을 정맥 및 복강내로 주사하였다. HCl 점적주사, PS/LPS 점적주사 또는 케타민 주사가 이루어지고 1주일 후에 복부 절개가 이루어졌고, PBS 비히클 또는 M-MSc는 기존에 보고된대로 500 μ m 주사기와 26-게이지 바늘을 이용하여 방광의 전방벽과 원개(dome)의 점막하층으로 직접 주입되었다 (Song, M., *et al. Stem Cells and Development* 24, 1648-1657 (2015); Kim, A., *et al. Scientific Reports* 6, 30881 (2016); 및 Song, M., *et al. Stem Cells and Development* 23, 654-663 (2013)).

1.3. 어웨이크 방광내압측정법(awake cystometry)에 의한 방광내압측정도(cystometrogram)

방광내압측정도는 대사 케이지에 있는 마취되지 않고 억압되지 않은 랫트에서 수행되었다. 방광내압(intravesical pressure; IVP) 및 복강내압(intraabdominal pressure; IAP)의 기록을 위해서 기존의 보고대로 동시의 도뇨(catheterization)가 방광내압측정 전 3일 동안 수행되었다 (Lee, T. & Yoon, S.M. *Int Neurol J* 17, 44-47 (2013); 및 Jin, L.H., *et al. Int Neurol J* 14, 54-60 (2010)). 방광은 압력변환기(Research Grade Blood Pressure Transducer; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)와 미세주입펌프(microinjection pump, PHD22/2000 pump; Harvard Apparatus)에 연결된 부풀어지는 PE-50 카테터(Clay Adams, Parsippany, NJ)를 사용하여 접근되었다. 배뇨 부피(micturition volume; MV)는 물리적 변위변환기(Research Grade Isometric Transducer; Harvard Apparatus)에 연결된 체액집합관에 의해 계속적으로 기록되었고, 이때 멸균된 식염수는 0.4 ml/min 정도로 방광으로 주입되었다. IVP, IAP 및 MV는 50 Hz의 샘플링 레이트로 Acq Knowledge 3.8.1 software와 MP150 data acquisition system (Biopac Systems, Goleta, CA, USA)을 사용하여 계속적으로 기록되었다. 각 그룹에 5 마리의 동물을 사용하여 3번 반복된 배뇨로부터 평균값을 계산하였다 (n=5). NVC(Non-voiding contraction)는 IVP의 증가가 배뇨없이 기준치로부터 2 cmH₂O 를 초과할 때부터 계산되었다. BP(bladder basal pressure)는 방광이 채워지는 동안의 가장 낮은 방광압이며, MP(micturition pressure)는 배뇨 주기 동안 최대 방광압이고, MV(micturition volume)은 배뇨되는 뇨의 부피이며, RV(residual volume)은 배뇨 후 잔존하는 뇨의 부피이다. BC(bladder capacity)는 MV와 RV를 합한 값이며, MI(micturition interval)은 배뇨 수축 사이의 간격을 말한다.

1.4. 조직학적 분석 및 유전자 발현 분석

상피 노출, 비만세포 침투, 조직 섬유증 및 세포사멸에 대한 조직학적 분석은 기존에 기재된 바와 같이 각각 cytokeratin의 면역염색, Toluidine blue staining(Toluidine blue-O; Daejung Chemicals & Metals, Seoul, Korea), Masson's trichrome staining(Junsei Chemical, Tokyo, Japan) 및 TUNEL staining (Roche, Mannheim, Germany)으로 평가되었다 (Kim, A., *et al. Scientific Reports* 6, 30881 (2016)).

유전자 발현 분석에서는 기존에 기재한 바와 같이 총 RNA, 역전사 및 전사체의 정량은 RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) 및 iQTM SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Hercules, CA)에 의한 PikoRealTM Real-Time PCR System (Thermo Scientific)을 이용한 RQ-PCR(real-time quantitative PCR)을 이용하여 수행되었다 (Jin, J.H., *et al. Antioxid. Redox Signal.* (2015)).

각 그룹에 5 마리의 동물을 사용하여 각 슬라이드(n=15) 또는 중복된 RQ-PCR(n=15)로부터 3개의 랜덤으로 선택된 부분에 대해 디지털 이미지 또는 유전자 발현 데이터를 정량하기 위하여 사용하였다. 주입된 M-MSc의 추적은 방광에 있는 GFP(green fluorescent protein)의 형광 신호를 검사하여 수행되었다. GFP 발현과 면역형광 염색을 위한 렌티바이러스의 생산은 기존의 보고대로 수행되었다 (Kim, A., *et al. Scientific Reports* 6, 30881 (2016)).

1.5. M-MSc의 BRET(Bioluminescence resonance energy transfer) 이미징

M-MSc는 RLUC-Venus(venus fluorescent protein)으로 융합된 RLUC(renilla luciferase)를 포함하는 레트로바이러스와 함께 감염되었다(Okada, S. *et al. FASEB J.* 19, 18391841 (2005)). 100ml의 식염수에 1×10^5 , 2.5×10^5 및 1×10^6 세포수의 표지된 M-MSc가 마우스의 방광으로 주입되고, 상기 마우스는 일주일 동안 이틀마다 시클로포

스파미드(cyclophosphamide, CYP, 100 mg/kg, Sigma-Aldrich)를 복강내 주사하여 만성 방광염이 유도되었다 (Golubeva, A.V. *et al. Physiological reports* 2, e00260 (2014)). 생물형광 이미지는 IVIS Spectrum Pre-clinical In vivo Imaging System (PerkinElmer, Waltham, MA) 및 기존에 공개된 프로토콜에 따라 수행되었다 (Okada, S. *et al. FASEB J.* 19, 18391841 (2005)).

[0053] 1.6. 동물의 μ -PET/MRI(micro-positron emission tomography/magnetic resonance imaging)

[0054] 10 마리의 HCl로 유도된 IC/BPS 랫트는 두 그룹으로 나뉘어 각각 1×10^5 , 2.5×10^5 및 1×10^6 세포수의 M-MSc (n = 5) 또는 PBS 비히클이 주입되었다. 주입 후 6, 9, 12 개월에서, μ -PET/MRI가 nanoScan PET/MRI imaging system (1T, MEDISO, Budapest Hungary)에 의해 수행되었다. 랫트는 이미징 전 8시간 동안 굶겨졌다. 랫트는 보온이 유지된 상태로 0.2 ml의 FDG에 19.7 ± 1.1 MBq 를 꼬리로 정맥 주사하였고, 마취상태(100% 산소 가스에 2% isoflurane)로 유지시켰다. Gradient-echo(GRE) 3D sequence (TR= 25 ms, $TE_{eff}=3$, FOV=64mm, matrix=128x128)에 의하여 측정되는 T1은 FDG 주입 동안 획득하였다. 15분의 고정된 PET 이미지는 MRI 범위를 가진 한쪽 관측시야에서 1-5 일치에서 획득되었다. 체온은 동물침대(Multicell, Mediso, Hungary)에서 공기 가열방식으로 유지되었고, 압력 민감성 패드는 호흡 트리거로서 사용되었다. PET 이미지는 full detector 모드 (correction on, high regularization 및 8 iteration)에 있는 Tera-Tomo 3D로 재구성되었다.

[0056] 1.7. 통계적 분석

[0057] 데이터는 평균 $\pm$ SEM(standard error of the mean)으로 표시하였고, GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA)으로 분석되었다. 차이와 유의성은 one-way 또는 two-way ANOVA와 Bonferroni post hoc tests로 분석되었다. 0.05 이하의 p-value가 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

실시예 2

[0059] hESC 유래의 M-MSc의 특징

[0060] hESC 세포주인 H9은 2일 동안 EB(embryoid body) 형성에 의해 분화되고, 간엽세포는 5일 동안 다공성 Transwell membrane (8 μ m)의 아래 쪽으로 이동함으로써 분리되었다 (도 1A). 콜라겐으로 코팅된 디쉬로 이동된 세포의 플레이팅에 의해 CD140B(beta-type platelet-derived growth factor receptor)⁺ CD44(cluster of differentiation 44)⁺ M-MSc 세포가 자연적으로 선택되었다(도 1A, Kim, J.M., *et al. Stem Cells Translational Medicine* (2016); 및 Hong, K.-S., *et al. Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 322-329 (2014)). 조절된 hESC 분화는 7일 동안 1×10^5 세포수의 hESC에서 1×10^7 세포수의 M-MSc 의 효율로 99% 이상의 순수 M-MSc를 생산하였다 (Hong, K.-S., *et al. Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 322-329 (2014)). M-MSc는 스핀들(spindle) 및 섬유아세포-유사의 형태(도 1B), MSC 표면 항원(CD73, CD105 및 CD90)의 발현, 및 주피세포(pericyte)의 표면 항원(PDGFRB(beta-type platelet-derived growth factor receptor), CD146 및 NG2(neural/glial antigen 2))의 발현 등 몇 가지 전형적인 MSC의 특징을 나타내고 있으나, MHC class I (HLA-A(human leukocyte antigen A), HLA-B(human leukocyte antigen B), HLA-C(human leukocyte antigen C)), MHC class II (HLA-DR(human leukocyte antigen - antigen D Related)), hematopoietic progenitor(CD133) 및 endothelial (KDR(Kinase Insert Domain Receptor) 및 TIE-2(TEK tyrosine kinase, endothelial))의 표면 항원의 발현은 거의 없었으며(도 1C), mesodermal osteogenic 및 mesodermal adipogenic lineages의 분화능이 있음을 확인하였다(도 1E). 정량 PCR 결과에서는 전분화능의 마커(OCT4(octamer-binding transcription factor 4), NANOG(Nanog Homeobox) 및 SOX2(SRY (sex determining region Y)-box 2))가 상당히 하향조절된 반면, EMT(Epithelial-mesenchymal transition) 마커인 피브로넥틴이 상향조절되었고, 이는 MSC-유사 특징을 지지한다(Hong, K.-S., *et al. Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 322-329 (2014)). 확립된 M-MSc는 어떠한 특징적인 염색체 변화가 없이 30 passage 이상 증식될 수 있다 (도 1D). 특히, M-MSc는 매트릭셀(Matrigel)에서 튜브-형성 능력(tube-forming capacity)을 나타내었고(도 1F), dye-transfer assay에 의해 blood vessel component endothelial cells 및 smooth muscle cells 과 기능적 접합을 형성하였으며(도 1G), 이는 M-MSc의

강한 전-맥관형성력(pro-angiogenic potency)를 가리킨다.

실시예 3

M-MSC에 의한 IC/BPS 및 KC의 치료 효과(*in vivo*)

3.1. HC1 점적주사로 유도된 IC/BPS 랫트 모델

다수의 IC/BPS 모델과 KC 동물 모델을 사용하여 M-MSC의 효과를 *in vivo*에서 실험하였다(Song, M., *et al. Stem Cells and Development* 24, 1648-1657 (2015); 및 Kim, A., *et al. Scientific Reports* 6, 30881 (2016)). 어웨이크 방광내압측정법(awake cystometry)을 사용한 방광 기능의 분석은 IC/BPS 랫트에 유도된 HC1 점적주사(HC1-IC 그룹)가 불규칙적인 배뇨 패턴을 보이고, 대조군과 비교할 때, MI(micturition interval), BC(bladder capacity), MV(micturition volume) 및 RV(residual volume)가 줄어들었다 (표 1, 도 2A 및 도 2C). HC1로 유도된 IC 그룹의 동물은 대조군에 비해 증가된 BP를 보였고, MP(maximum pressure)도 대조군에 비해 증가하였다(도 3B).

표 1

	대조군(sham group)	HC1 점적주사에 유도된 IC/BPS 랫트
MI(micturition interval)	64.5±15.4 sec (p<0.05)	13.8±11.5 sec (p<0.05)
BC(bladder capacity)	0.6±0.2 mL (p<0.05)	0.1±0.1 mL (p<0.05)
MV(micturition volume)	0.3±0.0 mL (p<0.01)	0.03±0.1 mL (p<0.01)
RV(residual volume)	0.2±0.06 mL (p<0.05)	0.07±0.1 mL (p<0.05)

1x10⁶ M-MSC의 이식은 결합된 배뇨 파라미터를 유의적으로 완화시켰다(도 2C). 이러한 유익한 효과는 1x10⁵ 세포수 이상의 M-MSC를 주입하였을 때 관찰되었다(도 2C, 도 3 및 도 4). IC 랫트에서의 특징인 NVC(non-voiding contraction)은 적은 양(1x10⁵)의 M-MSC에 의해서도 상당히 예방되었다(도 2C). M-MSC의 치료적 가능성은 기존의 제대혈 유래의 MSC(UCB-MSC)보다 뛰어난 것으로 확인되었는데, 이는 UCB-MSC의 경우 IC/BPS 동물 모델에 적은 양을 처리하였을 때 거의 방광 배뇨 기능의 향상시키지 못했다는 것을 근거로 한다(도 5). 구체적으로, UCB-MSC의 경우 M-MSC와 동일한 세포수인 1x10⁵ 및 2.5x10⁵의 세포로 실험을 진행하였을 때, UCB-MSC에 의해서는 전혀 효과가 없음이 확인되었다. 그러나, M-MSC는 1x10⁵의 세포만으로도 IVP, IAP 등에 의한 결과에서 방광의 배뇨 기능이 향상되었음을 알 수 있었다.

어웨이크 방광내압측정 데이터와 함께, 2.5x10⁵ 이상의 M-MSC의 주입은 BPS 환자의 방광에 나타나는 특징인 요로상피의 심각한 노출, 비만세포 침투, 섬유증 및 세포사멸과 같은 조직적 변화를 회복시켰다(도 4)(Lilly, J.D. & Parsons, C.L. *Surgery, gynecology & obstetrics* 171, 493-496 (1990); Shie, J.H. & Kuo, H.C. *BJU international* 108, E136-141 (2011); Logadottir, Y., *et al. The Journal of urology* 192, 1564-1568 (2014); 및 Sant, G.R., *et al. Urology* 69, 34-40 (2007)).

따라서, 1x10⁵ 이상의 M-MSC는 HC1 점적주사로 유도된 간질성 방광염의 예방 또는 치료에 있어 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

3.2. LPS 점적주사로 유도된 IC/BPS 랫트 모델

[0074] HCl-IC 모델의 단점을 보완하기 위하여, 본 발명자들은 LPS의 점적주사에 의한 다른 IC/BPS 랫트 모델을 개발하였다 (Stein, P.C., *et al. The Journal of Urology* 155, 1133-1138). 평균 수축수(contraction number)를 측정하였을 때, LPS-IC 그룹(13.8 ± 11.5 sec, $p < 0.01$)은 대조군(64.5 ± 15.4 sec, $p < 0.01$)에 비해 짧은 MI(micturition interval)로 나타났다(도 6A 및 도 6B). 더욱이, LPS-IC 랫트 그룹은 대조군에 비해, BC (0.6 ± 0.2 ml(대조군) vs. 0.1 ± 0.1 mL, $p < 0.05$), MV (0.3 ± 0.0 ml(대조군) vs. 0.03 ± 0.1 mL, $p < 0.01$) 및 RV (0.2 ± 0.1 ml(대조군) vs. 0.07 ± 0.06 mL, $p < 0.05$)가 상당히 감소하였고, BP 및 MP는 증가하였다. 0.25 , 0.5 및 1×10^6 세포수의 M-MSc의 이식은 농도의존적으로 MI(각각 56.8 ± 29.8 , 51.7 ± 6.6 및 60.59 ± 17.0 sec, $p < 0.01$), BC(각각 0.4 ± 0.2 , 0.3 ± 0.1 mL 및 0.4 ± 0.1 , $p < 0.01$), MV(각각 0.23 ± 0.1 , 0.19 ± 0.2 및 0.26 ± 0.1 mL, $p < 0.01$) 및 RV(각각 0.1 ± 0.07 , 0.2 ± 0.1 및 0.16 ± 0.08 mL, $p < 0.01$)을 상당히 증가시켰다(도 6A 및 도 6B). 섬유증을 제외한 유사한 조직적 특징이 LPS-IC 모델의 방광에서 확인되었다(도 6C 및 도 7). 중요한 것은 2.5×10^5 세포수 이상의 M-MSc 이식은 조직적 결함을 상당히 회복시켰다(도 6D 및 도 7).

[0075] 따라서, 1×10^5 이상의 M-MSc는 LPS 점적주사로 유도된 간질성 방광염의 예방 또는 치료에 있어 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

[0077] 3.3. 케타민 정맥주사로 유발된 KC 랫트 모델

[0078] 케타민의 장기간 남용은 비뇨기 시스템에 심각한 영향을 줄 수 있고, 이는 IC/BPS와 유사한 하부요로증상(lower urinary tract symptoms)을 일으킨다. 기존의 보고(Kim, A., *et al. Scientific Reports* 6, 30881 (2016); 및 Song, M., *et al. Drug and Chemical Toxicology*, 1-7 (2015))와 유사하게, 3개월 동안 케타민으로 주사된 랫트(KC 그룹)는 대조군에 비해 증가되고 불규칙적인 배뇨 빈도 및 감소된 MI(각각 149.40 ± 26.51 vs. 52.26 ± 12.81 sec, $p < 0.01$)를 나타냈다(도 8A 및 도 9A). 0.25 , 0.5 , 및 1×10^6 세포수의 M-MSc 이식은 상당히 MI(각각 87.73 ± 6.23 , 109.40 ± 24.37 및 151.80 ± 35.11 sec, $p < 0.01$)를 향상시켰다. KC 그룹에 있는 랫트의 BC(각각 1.00 ± 0.18 vs. 0.27 ± 0.13 mL, $p < 0.05$), MV(각각 0.59 ± 0.12 vs. 0.26 ± 0.08 mL, $p < 0.01$) 및 RV(각각 0.23 ± 0.21 vs. 0.11 ± 0.08 mL, $p < 0.05$)은 대조군에 비해 상당히 감소되었다. 더욱이, BP 및 MP는 KC 그룹 랫트에서 대조군에 비해 상당히 증가되었다. 그러나, 모든 비정상적인 배뇨 파라미터는 M-MSc의 이식 후 회복되었다(도 8A 및 도 9A). KC 그룹에서 방광은 비만 세포 침투, 섬유증 및 세포사멸로 특징지어졌으나(도 8B), 요로상피의 노출에서는 거의 변화가 없었다(도 9A). 상기에서 언급된 IC 동물모델에서와 유사하게, M-MSc는 농도의존적으로 KC 모델에서 방광으로의 비만세포 침투, 세포사멸 및 섬유증을 예방한다는 것을 확인하였다(도 8B 및 8C).

[0079] 따라서, 따라서, 1×10^5 이상의 M-MSc는 케타민 유발 방광염의 예방 또는 치료에 있어 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

실시예 4

[0081] M-NSC 치료에 의한 Wnt 신호 및 항-섬유증 경로의 자극 효과

[0082] 본 발명자들은 MSc 치료가 HCl-IC 랫트 모델에서 내피의 재생이 일어나도록 Wnt 경로를 활성화하고(Song, M., *et al. Stem Cells and Development* 24, 1648-1657 (2015)), KC 랫트 모델에서 TGF-beta(transforming growth factor-beta) 경로를 억제한다는 것을 기존에 보고하였다(Kim, A., *et al. Scientific Reports* 6, 30881 (2016)). 유전자 발현 분석에서는 M-MSc 치료가 몇 가지 Shh(sonic hedgehog), Wnt 신호 및 HCl-IC(도 11) 및 LPS-IC(도 10A 및 도 12A) 그룹의 방광에서 모두 하향조절되는 특징이 있는 다운스트림 성장인자 유전자를 상당히 상향조절시켰음을 확인하였다. KC 모델에서는 TGF-beta 및 SMAD와 같은 조직 섬유증과 관련된 유전자 집합을 상향조절시키는데, M-MSc의 이식에 의하여 상당히 억제되는 효과가 있었다(도 10B 및 도 12B). IL-10(interleukin-10)과 항-염증 사이토카인의 발현은 M-MSc를 이식한 KC의 방광에서 현저하게 상향 조절되었다(도 10B).

[0083] 따라서, M-MSc 치료는 Wnt 신호에 의한 손상된 요로상피의 재생에 도움을 줄 뿐만 아니라, BPS의 방광에서 발견되는 섬유증의 손상을 회복시키는데 도움을 준다는 것을 확인하였다.

실시예 5

[0085] 주입된 M-MSc의 안전성 및 *in vivo* 분포

[0086] 이식된 M-MSc의 종양형성(tumorigenicity) 및 생물분포(biodistribution)는 각각 nanoScanPET/MRI 와 optical imaging을 사용하여 실험하였다. FDG(2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxyglucose)의 흡수에 대한 백그라운드 신호가 확인되었고, 1×10^6 세포수의 M-MSc 또는 PBS 비히클로 주입된 HCl-IC 동물에서 종양에 따른 FDG 흡수는 관찰되지 않았다(도 13 및 도 14). 본 발명자들은 이중은폐 검사(double-blind necropsy)에서의 장기(organ)의 철저한 현미경적 분석과 12개월의 nanoScanPET/MRI 분석에서 M-MSc에 의한 종양형성 가능성에 전혀 없음을 확인하였다(도 15).

[0087] *in vivo* 분포를 실험하기 위하여, RLuc-Venus BRET construct(Kim SY reference)을 발현하는 2×10^5 세포수의 M-MSc가 CYP(cyclophosphamide)에 의해 유도된 마우스 IC/BPS 모델로 주입되었다(Golubeva, A.V., et al. *Physiological reports* 2, e00260 (2014)). 본 발명자들은 이식 후 7일(DAT; day after transplantation)에서 대체로 감소하였고 이식 후 9일(DAT; day after transplantation)까지 이식된 M-MSc로부터 생물발광 강도를 관찰하였다(도 17). HCl-IC 랫트의 경우 2개의 강한 초점의 생물발광이 1×10^6 RLuc-Venus⁺ M-MSc의 주입 후 2시간 내의 방광에서 확인되었다. 1일 후에는 생물발광 강도가 감소되었고, 신호는 방광 전체로 넓게 분포되었고 몇 개는 간(liver) 근처에서 확인되었다(도 13B 및 도 16). 방광과 다른 장기에서의 신호는 이식 후 2일에서 대개 사라졌다.

실시예 6

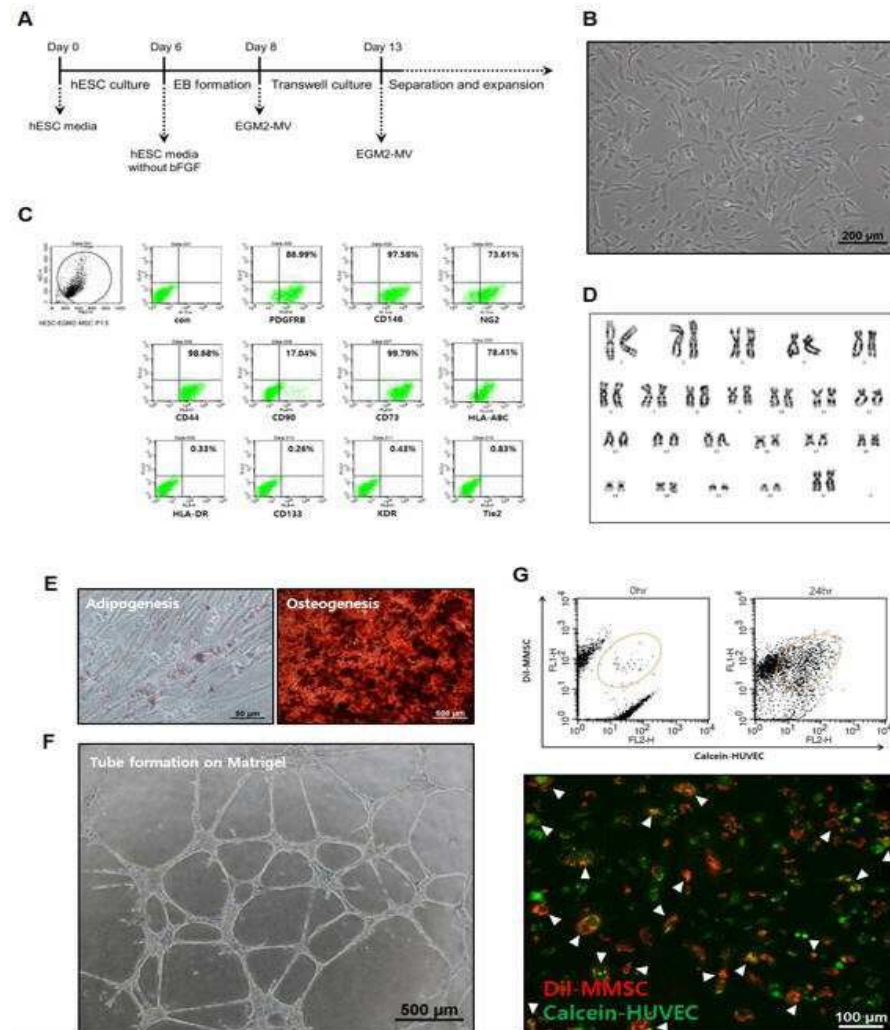
[0089] 주입된 M-MSc 줄기세포의 분화 계통 분석

[0090] 본 발명자들은 이식된 M-MSc가 방광 내 어떠한 세포로 분화하는 지를 조사하였다(도 13C). 이식된 세포의 분화 계통을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 GFP를 안정적으로 발현하는 주입된 M-MSc를 확인하기 위하여 면역-조직학적 분석을 수행하였다. HCl-IC 및 LPS-IC 동물에서, GFP⁺ 세포는 주로 프로프리아층(lamina propria)에 위치하였고, 부분적으로 유로상피에 위치하였으며, 적은 양으로는 근육층에 위치하였다(도 13C). 유로상피에 있는 GFP⁺ 세포는 시토케라틴(cytokeratin)과 공동-염색되었으며, 이는 내피세포로의 분화를 가리킨다. 프로프리아층에서 GFP⁺ 세포는 비멘틴 및 RECA-1으로의 공동-염색과 랫트 내피세포에 의해 발현되는 세포 표면 항원에 의하여 기질세포 및 내피세포의 특성을 나타냄을 확인하였다(도 13C).

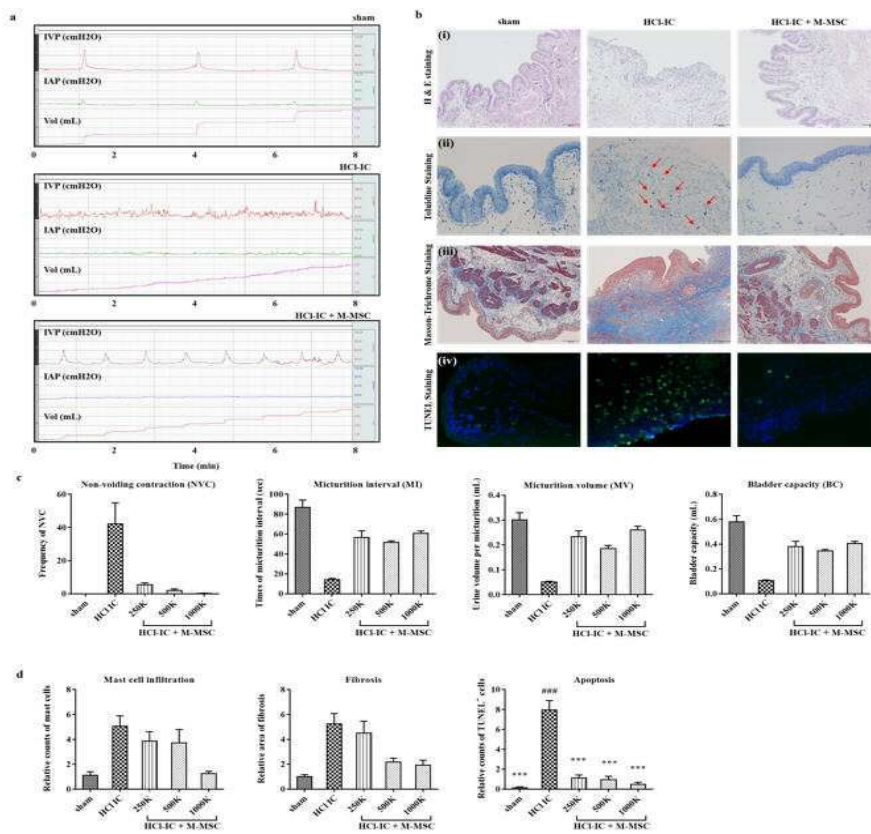
[0091] 따라서, 이식된 M-MSc는 어느 동물에서든 부작용이나 안전성의 문제 없이 방광에 있는 다양한 타입의 세포로 잘 생존되고 분화된다는 것을 알 수 있었다.

도면

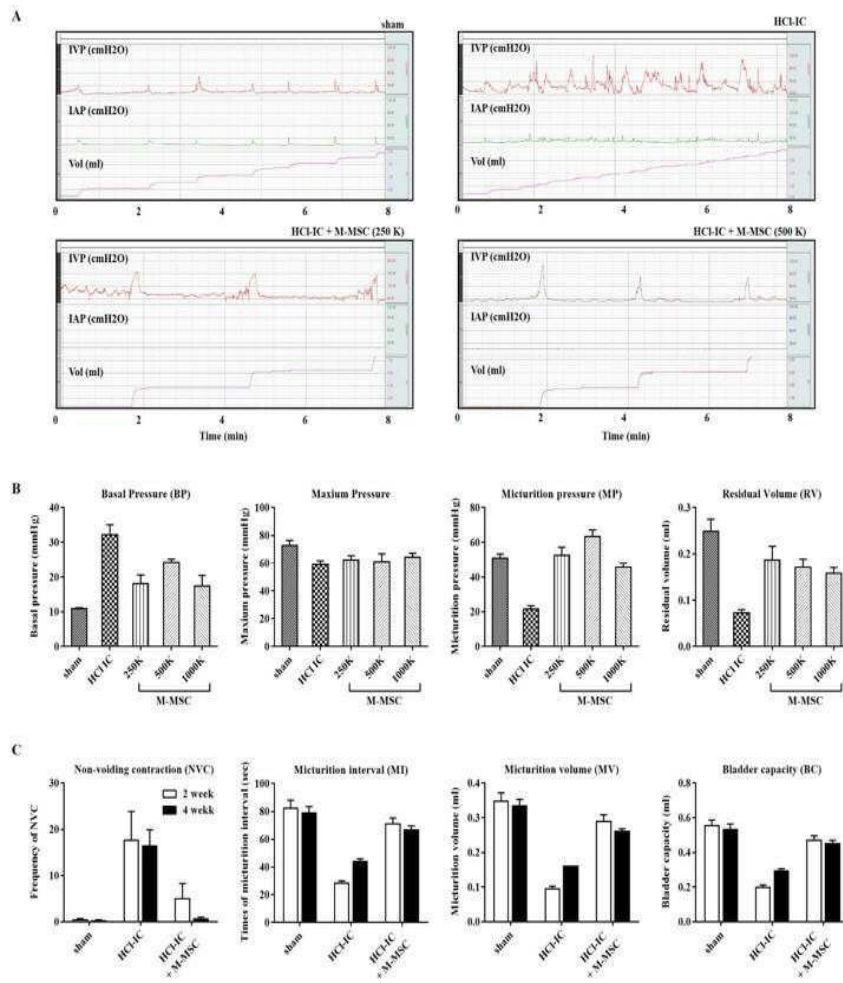
도면1



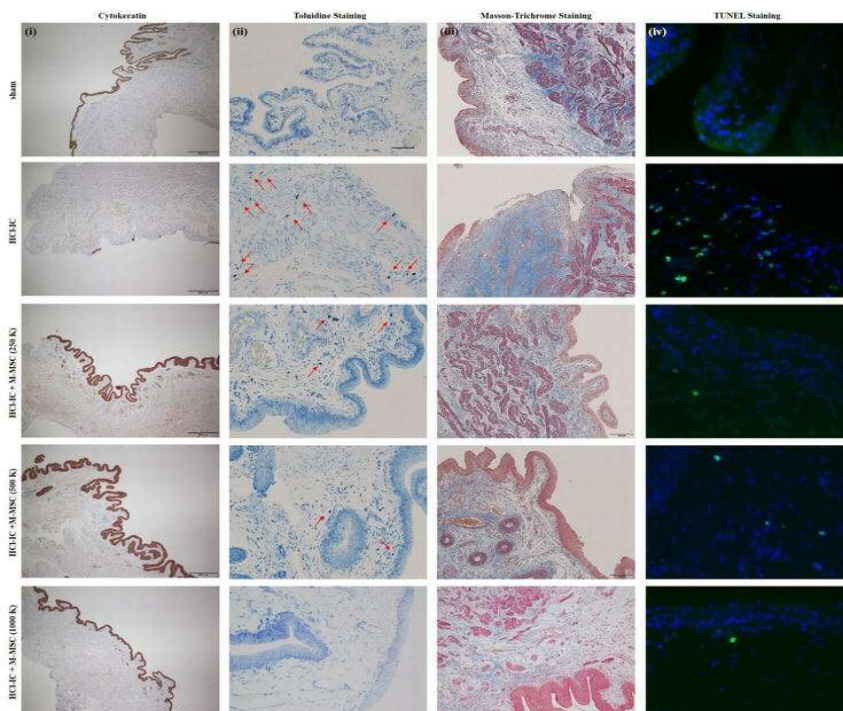
도면2



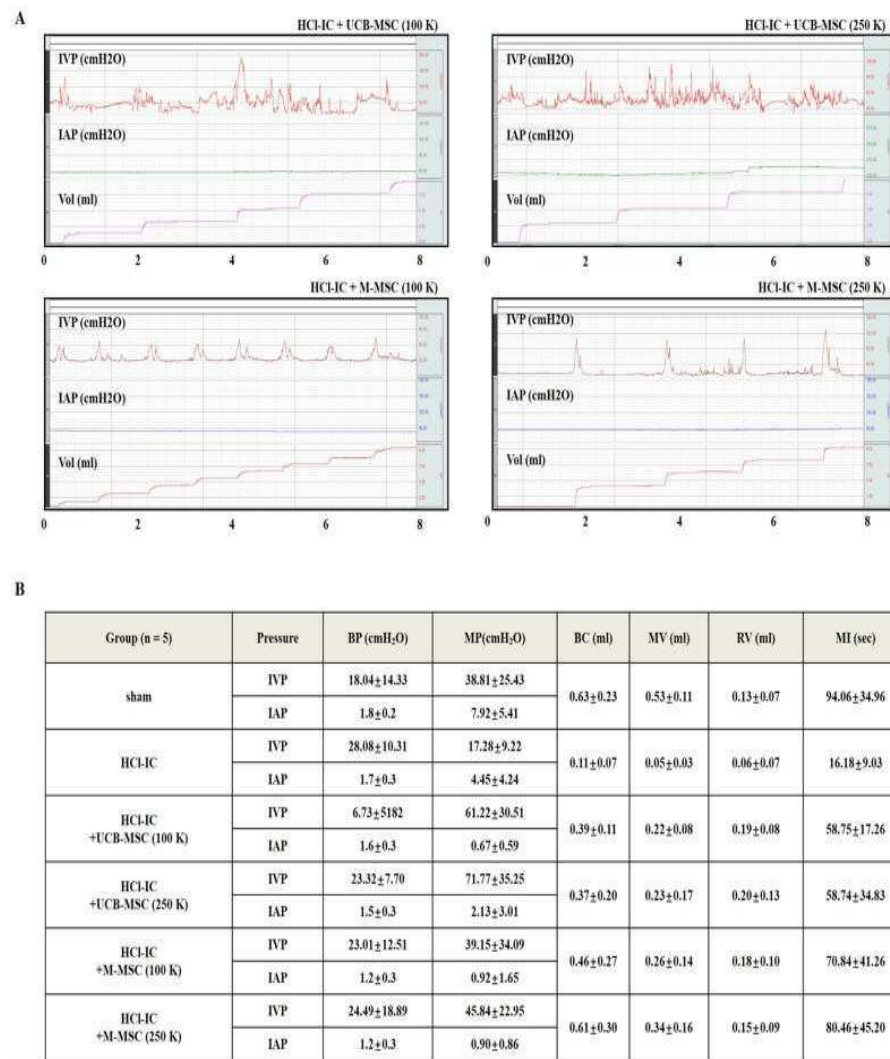
도면3



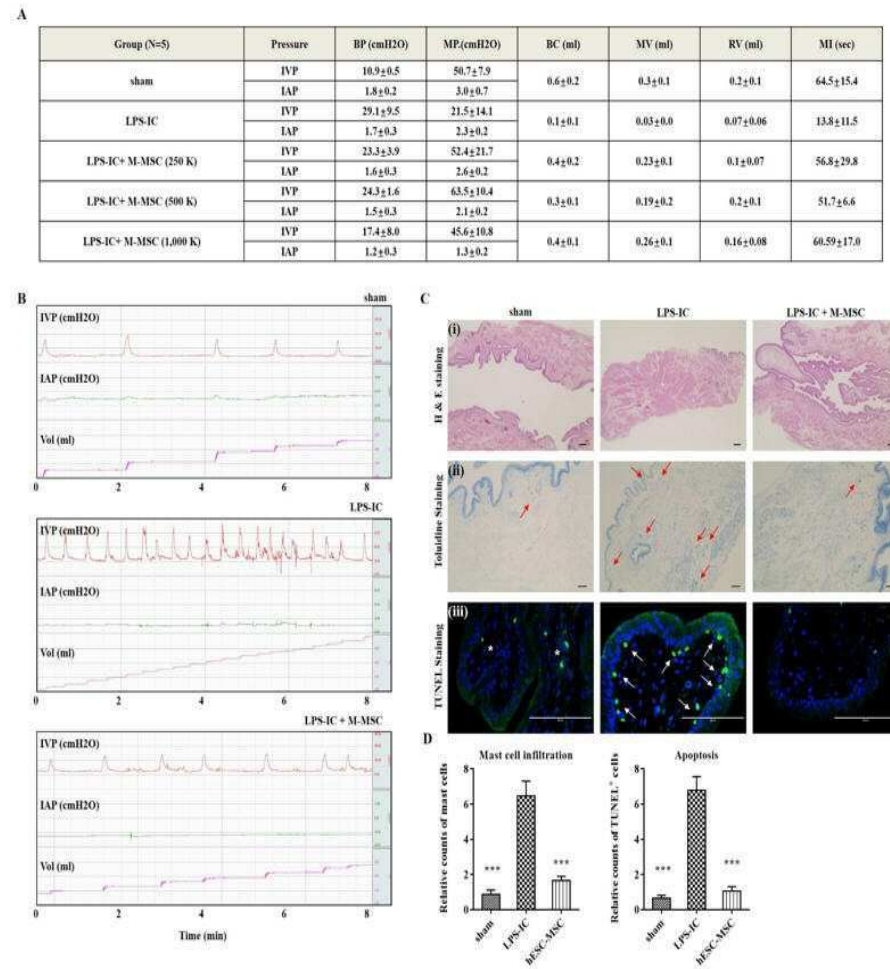
도면4



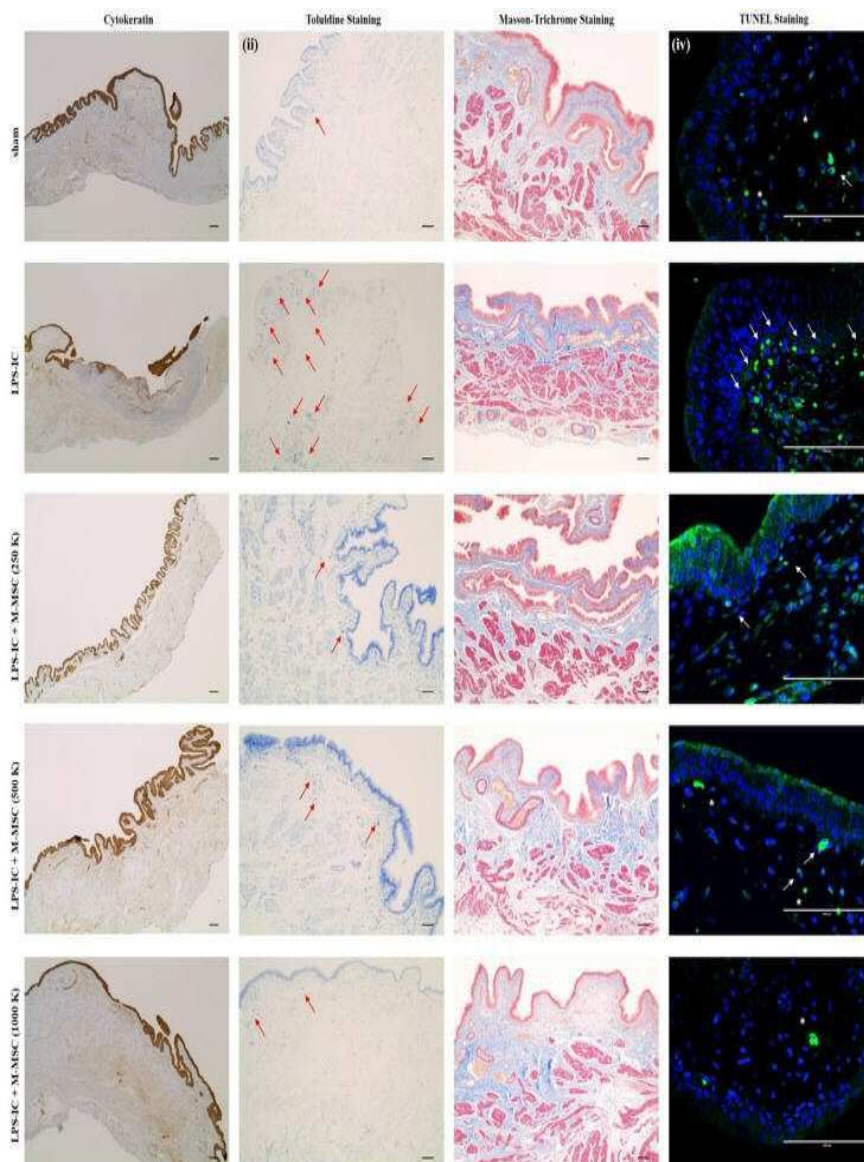
도면5



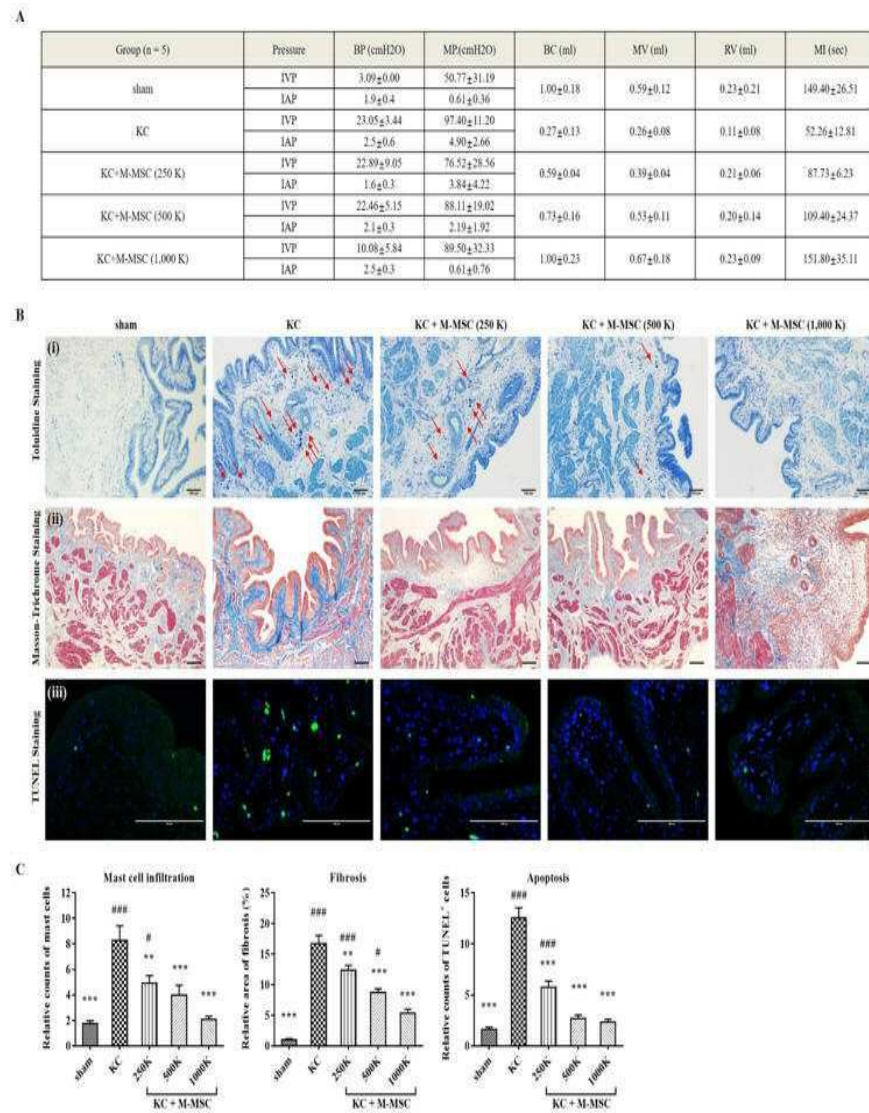
도면6



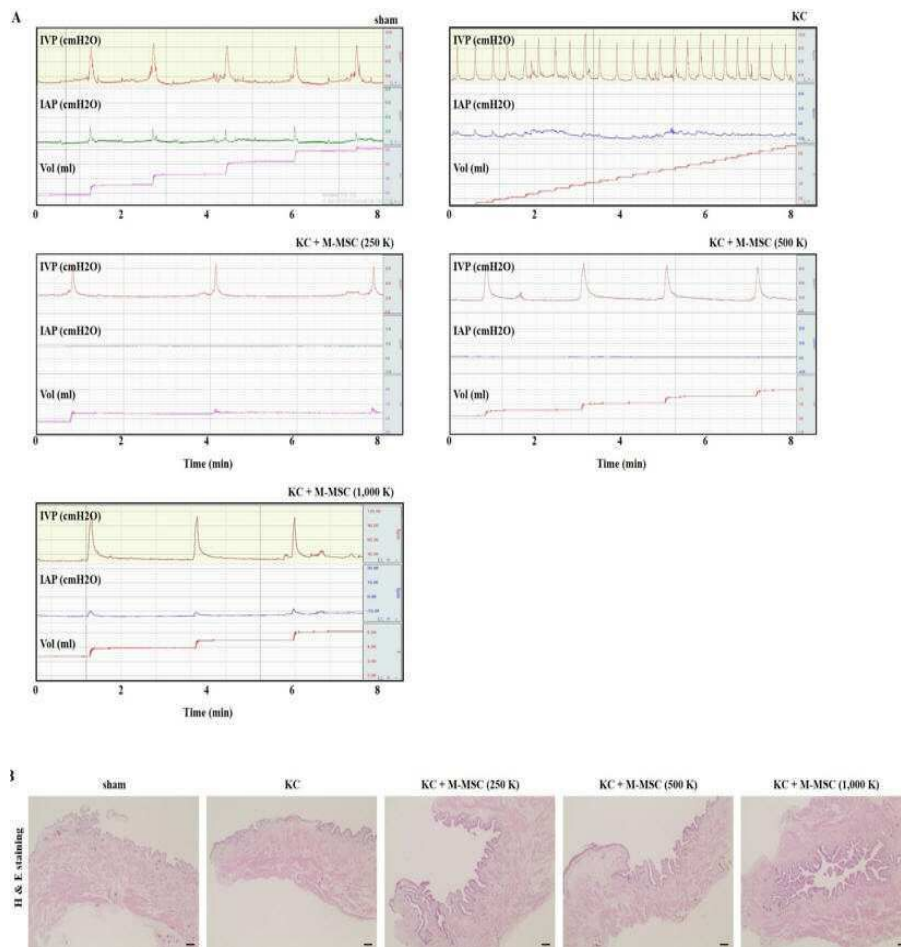
도면7



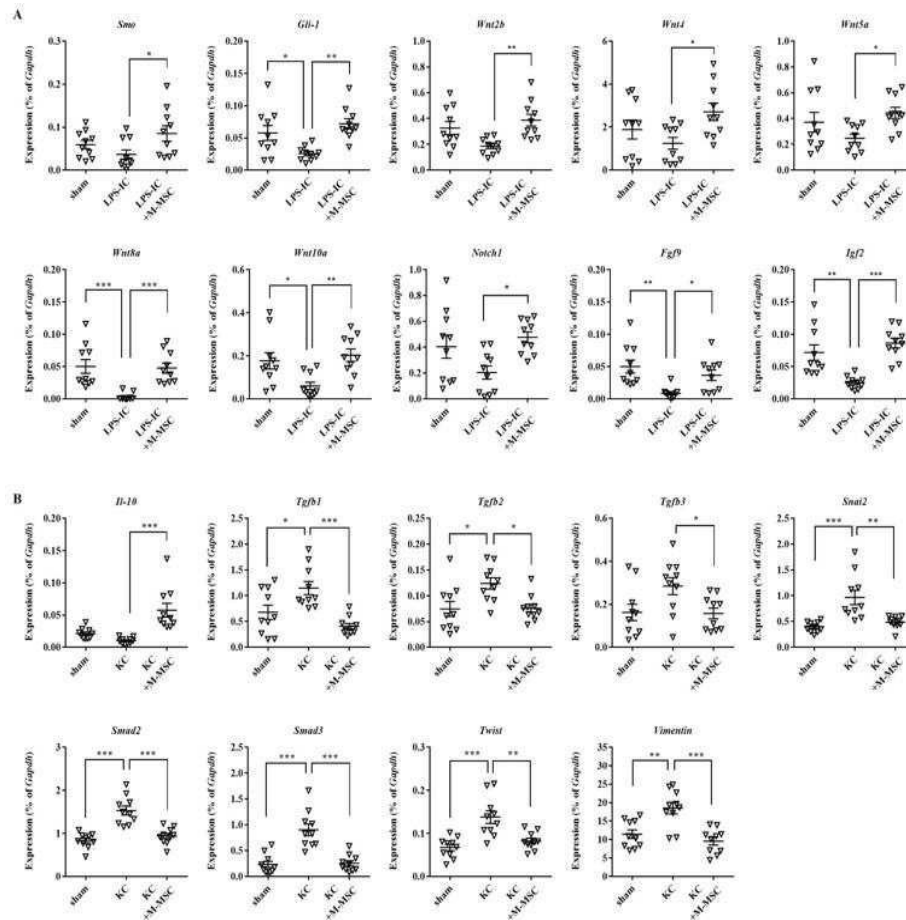
도면8



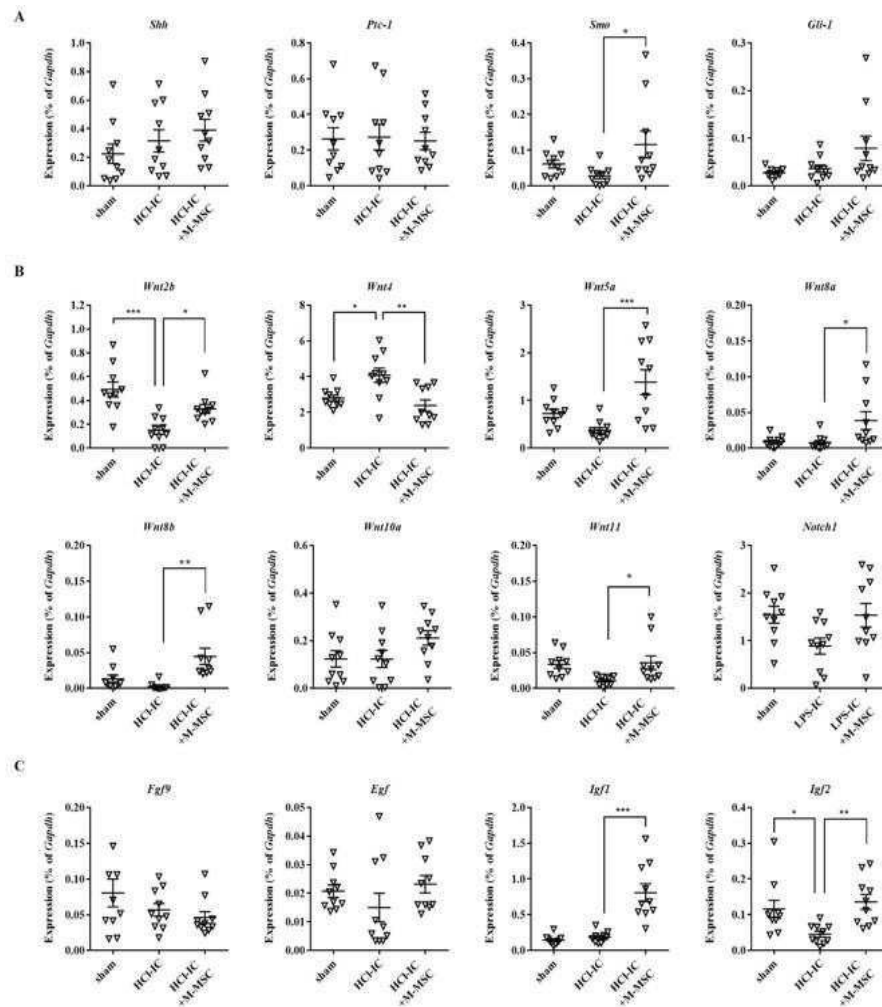
도면9



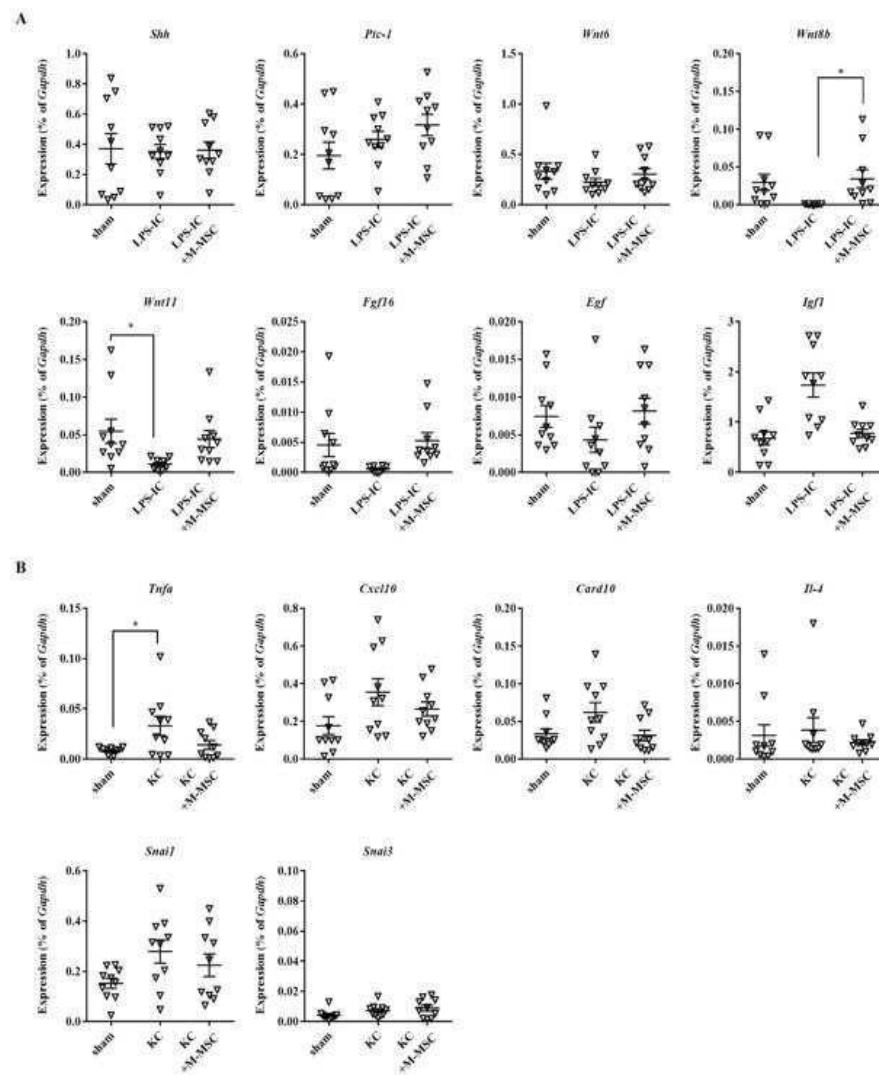
도면10



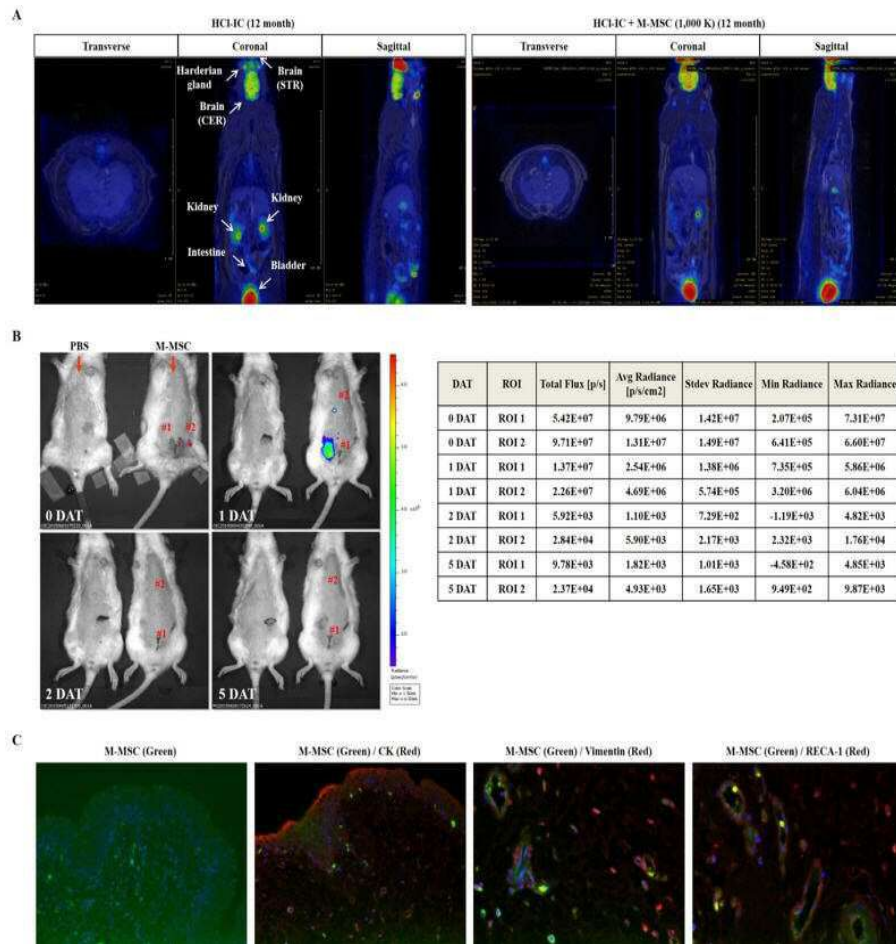
도면11



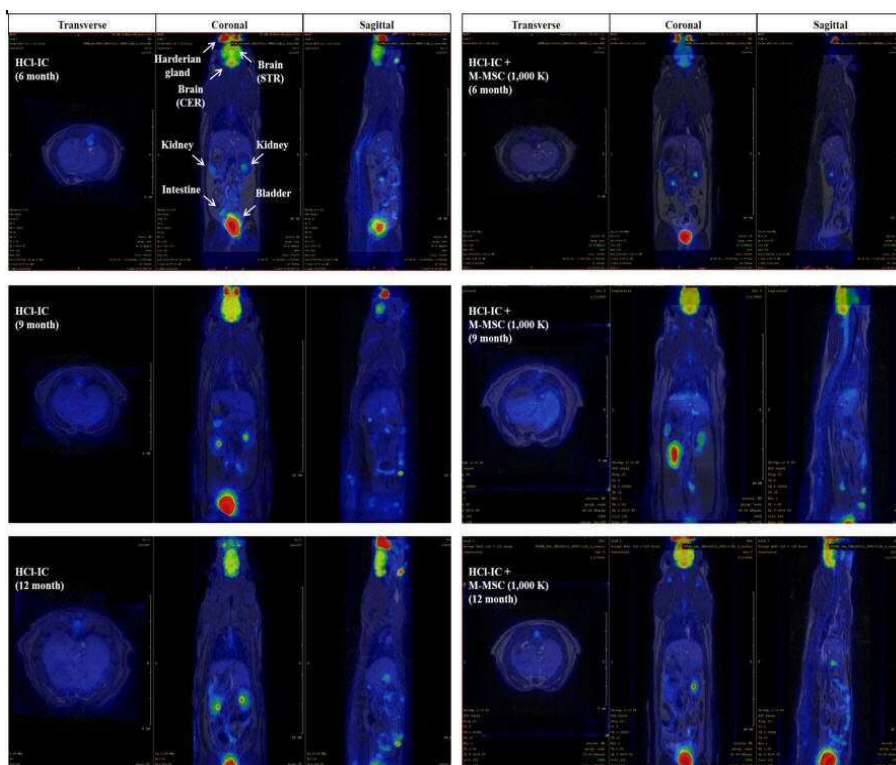
도면12



도면13



도면14



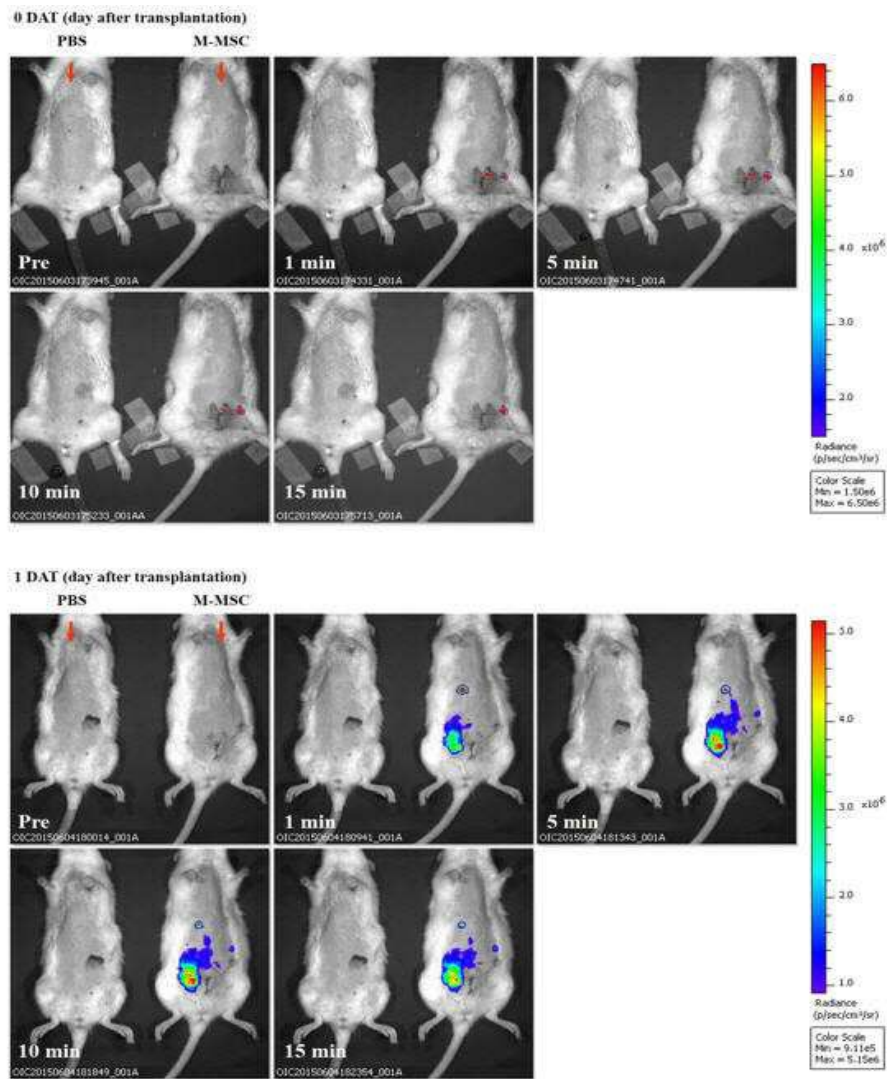
도면15

NECROPSY REPORT

Laboratory for Animal Research, Asan Institute for Lifescience

Prosector	Seung-Ho Heo, DVM, PhD,	Date of report	2016. 2. 5.		
P.I.	/ urology	Researcher			
Species	Rat	Strain	SD	Gender	F
No.	1	Birth Date		B.W.	-
Organs	Gross lesions			Note	
Eye	-				
Nostril & Nasal cavity	-				
Oral cavity	-				
Skin and Subcutaneous tissue	Lt. ventral neck resion, a subcutaneous soft nodule, white to beige colored, diameter <0.5cm			Fixation, Frozen	
Mammary gland	-				
Other external lesions	-				
Liver and Gall bladder	-			Fixation, Frozen	
Kidney	-			Fixation, Frozen	
Adrenal gland	-				
Esophagus and Stomach	-			Fixation	
Small intestine	-			Fixation	
Large intestine	-			Fixation	
Pancreas	-			Fixation	
Mesenteric L.N.	-				
Spleen	-			Fixation, Frozen	
Bladder	-			Fixation, Frozen	
Other abdominal lesions	-				
Trachea	-				
Thyroid	-				
Thymus	-			Fixation, Frozen	
Lung	-			Fixation, Frozen	
Heart	-			Fixation, Frozen	
Other thoracic lesions	-				
Testis/Epididymis	-				
Prostate gl. etc.	-				
Ovary	-			Fixation	
Uterus	-			Fixation	
Other genital lesions	-				
cerebrum	-			Fixation, Frozen	
cerebellum	-			Fixation, Frozen	
Pituitary gland	-				
Other CNS lesions	-				
Vertebrae	Not Examined (N.E.)				
Spinal cord	N.E.				
Sternum	N.E.				
Femur	N.E.				
Muscle	N.E.				
Sciatic nerve	N.E.				
Other musculoskeletal lesions	N.E.				
Overall Remark					
In necropsy, there were no significant gross lesion, except subcutaneous soft nodules (white to beige colored multiple nodules, diameter <0.5cm). It might be inflammatory lesions. For definite diagnosis, further histological analysis is needed.					

도면16



도면17

