(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0012883
(43) 공개일자 2021년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0668 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0031210(분할)
(22) 출원일자 2020년03월13일
심사청구일자 2020년03월13일
(62) 원출원 특허 10-2019-0091193
원출원일자 2019년07월26일
심사청구일자 2019년07월26일

(71) 출원인
주식회사 엠케이바이오텍
대전광역시 유성구 대학로 99, 207호(궁동, 충남대학교 농업생명공학관)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김민규
대전광역시 유성구 죽동로 321, 금성백조 예미지 102동 2401호
김은영
대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트 136동 703호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
길준연

전체 청구항 수 : 총 4 항

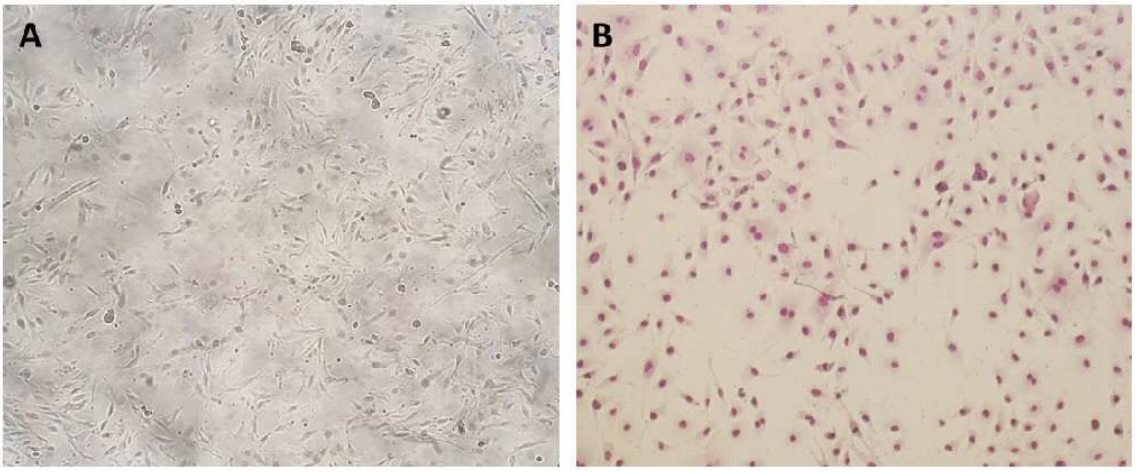
(54) 발명의 명칭 **말과 동물 양수 유래 줄기세포 및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제**

(57) 요 약

본 발명은 말과 동물의 태아 조직 유래 줄기세포(Equine fetal tissue derived stem cells)및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 말과 동물의 양수 유래 줄기세포(Equine amniotic fluid stem cells)의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 양수 줄기세포의 특성 분석, 상기 줄기세포를 유효 성분으

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



로 함유하는 말 양수 유래 줄기세포 및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제에 관한 것이다.

본 발명은 말과 동물 양수 유래의 줄기세포를 제공한다.

또한 본 발명은 임신한 말의 양수를 채취하는 과정(1과정),

상기의 채취한 양수에서 단핵 세포를 분리하는 과정(2과정),

상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정(3과정)을 포함하는 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법를 제공한다.

또한 본 발명은 임신한 말의 양수를 채취하는 과정(1과정),

상기의 채취한 양수에서 단핵 세포를 분리하는 과정(2과정),

상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정(3과정),

상기에서 초기 배양된 3~5계대 사이의 말 양수 유래 세포를 10~20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5~1.5 % Glutamax 및 0.5~1.5 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배양 배지를 사용하여 배양하는 과정(4과정),

상기의 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.01~0.1% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시키는 과정(5과정)을 포함한 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 근골격계 치료 기능이 있는 것을 특징으로 하는 말과 동물 양수 유래의 줄기세포를 제공한다.

또한 본 발명은 상기한 말과 동물 양수 유래의 줄기세포를 포함하는 근골격계 재생용 세포 치료제를 제공한다.

(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 2533/54 (2013.01)

(72) 발명자
이은지
대전광역시 유성구 대학로76번안길 36 최앤리 206호
김동언
대전광역시 유성구 대학로163번길 61 죽림빌라 301호
남윤석
충청남도 논산시 가야곡면 가야로201번길 81-12
길태영
대전광역시 동구 새울로 68번길 27

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	S2296281
과제번호	S2296281
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소벤처기업부
연구사업명	창업성장-기술개발사업
연구과제명	피부치료용 줄기세포 바이오 패치 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)엠케이바이오텍
연구기간	2019.11.25 ~ 2021.11.24

명 세 서

청구범위

청구항 1

임신한 말의 양수를 채취하는 과정(1과정),

상기의 채취한 양수에서 단핵 세포를 분리하는 과정(2과정),

상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정(3과정),

상기에서 초기 배양된 말 양수 유래 세포를 10~20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5~1.5 % Glutamax 및 0.5~1.5 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배양 배지로 교체하여 배양하는 과정(4과정),

상기의 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.01~0.1% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시키는 과정(5과정),

을 포함하는 근골격계 치료 기능이 있는 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기한 말과 동물은 말, 당나귀, 얼룩말 또는 이들의 교잡으로 태어난 잡종으로 구성된 군에서 선택되는 것이 특징인 근골격계 치료 기능이 있는 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

다음과 같은 특성을 가진 근골격계 치료 기능이 있는 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법.

(a)줄기세포의 특성을 유지 한 채 50계대 이상 배양되는 자가 증식능력을 가짐.

(b)지방, 연골, 골세포 등의 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

(c)배아줄기세포 특이 유전자 Oct4, c-Myc, Klf4와 중간엽 줄기세포 관련 유전자 PAX6, ALCAM, Integrin α1, Endoglin, HCAM 에 대하여 동시에 양성의 유전적 발현 특성을 나타냄.

(d)세포 표면 마커인 CD44, CD90, CD105에는 양성의 면역학적 표현형을 나타내고 동시에 CD14, CD45, CD79α, ELA-DR에는 음성의 면역학적 표현형을 나타냄.

청구항 4

제1항 내지 제3항에 의하여 제조된 근골격계 치료 기능이 있는 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 포함하는 근골격계골절, 미세 골절, 골막염, 건과 인대 손상, 근육 손상, 근 위축, 근섬유 단락 치료용 또는 회복용 세포 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 말과 동물의 태아 조직 유래 줄기세포(Equine fetal tissue derived stem cells)및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 말과 동물의 양수 유래 줄기세포(Equine amniotic fluid stem cells)의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 양수 줄기세포의 특성 분석, 상기 줄기세포를 유효 성분으로 함유하는 말 양수 유래 줄기세포 및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 생명공학 기술의 발달은 세포치료 및 재생의학 분야의 가능성을 열어 주었으며 현재 인간 질병 치료를 위한 줄기세포 치료제 분야는 놀라운 속도로 임상 시험 및 연구가 진행되고 있다. 줄기세포(Stem cell)는 스스로 자기복제가 가능하고 여러 다양한 조직의 세포로 분화 가능한 능력을 가진 세포로서, 손상 받은 신체 조직 및 세포 재생 능력을 가지고 있어 현재 확실한 치료법이 없는 퇴행성 질병이나 심한 외상과 같은 치료가 어려운 손상에 있어 의학적 활용도가 매우 높은 차세대 기술로 인식되어 알려졌다.

[0004] 줄기세포의 종류에는 초기 발달 단계의 배아를 이용한 배아유래 줄기세포(Embryonic stem cells)와 발달 이후 조직을 구성하는 세포를 이용한 성체 줄기세포(Adult stem cells), 그리고 유전자 편집기술을 이용한 만능유도 줄기세포(induced Pluripotent stem cells)가 있으며, 성체 줄기세포는 신체 각 조직에 존재하며 신체의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 제공하는 세포로, 조직의 유래에 따라 내배엽, 중배엽, 외배엽 유래 조직 줄기세포로 분류된다.

[0005] 성체 줄기세포의 한 종류인 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells)는 안정적인 분화 능력을 가지고 있고 윤리적 문제 및 종양세포 발생 가능성이 적어 세포 치료제 연구에 있어 가장 많이 임상 시험이 진행되어 이미 적용이 가능한 단계로 진입했다. 또한 중간엽 줄기세포는 신체 손상이 발생된 부위로 직접 이동하여 손상된 조직 및 세포를 재생하는 능력을 가지고 있고 체외에서 쉽게 증식할 수 있으며, 여러 가지 세포형태로 분화가 가능한 다분화능 세포로 유전자 치료와 세포 치료에 있어서 유용한 표적으로 이용되고 있다.

[0006] 현재 세포 치료분야에 있어 중간엽 줄기세포는 주로 골수(Bone marrow), 지방조직(Adipose tissue) 및 제대혈(Umbilical cord blood) 등이 많은 연구가 진행되었으며, 이들에서 유래한 중간엽 줄기세포들은 여러 세포들로 분화할 수 있는 다분화능은 가지고 있으나, 배아 줄기 세포의 분화 능력에 비하면 제한 된 면이 있기 때문에 중간엽 줄기세포 유래 조직 중 배아 줄기세포와 비슷한 분화능력을 가진 출처를 찾는 연구들이 진행되고 있다.

[0007] 태아 유래 조직 중 양수에서 유래된 줄기세포는 가장 최근에 발견되어 연구되고 있는 중간엽 줄기세포 기원조직으로, 증식능력이 우수하고 배아줄기세포에서 특징적으로 나타나는 세포 특이 마커 다수를 보유하고 있다는 연구 결과가 발표되었다. 양수 유래 줄기세포는 임신기간 양수 천자를 통한 태아 검사 혹은 제왕절개를 통한 출산 시 얻을 수 있어, 산모와 태아에게 전혀 해가 없는 비 침습적인 방법으로 채취가 가능하고 다른 중간엽 줄기세포와 마찬가지로 자가 증식을 하며 여러 형태의 다양한 세포들로 분화할 수 있는 분화능이 확인되었다. 위와 같은 결과들은 성체 줄기세포 기원 조직 중 태아와 함께 생성되어 가장 빨리 채취 가능한 조직으로 양수 유래 중간엽 줄기세포의 세포 치료제로서의 가능성을 보여준다.

[0008] 인간의 질병 치료에 있어서의 줄기세포 치료제에 대한 연구는 동물 줄기세포 치료제의 발달로 이어졌으며, 현재 주로 개와 고양이 같은 반려 동물과 경주마 산업 발달로 인해 말과 동물에서 놀라운 속도로 임상 시험 및 치료가 진행되고 있다. 경주마 및 승용마의 주요 부상 요인인 골막염 치료를 위한 줄기세포 치료제의 개발은 6개월 이상 되는 회복 기간의 단축 및 건강 증진에 매우 효율적인 역할을 할 것으로 기대하며, 이를 통해 말 산업의 주요 비중을 차지하는 경주마 산업의 발전에 있어 매우 중요한 연구로 예상된다.

[0009] 태아 유래 줄기세포를 포함한 여러 줄기세포 치료제에 대한 연구 결과들이 임상 시험을 통해 치료제로 시판되고 있지만 줄기세포 치료제에 대한 연구는 다양한 융합 기술을 통해 세포 단일 치료제 개발에 집중되어 왔던 연구 방향에서 한 발 나아가 보다 확실한 안정성과 효용성이 추구되는 연구로 진행되고 있다. 따라서 균질한 말과 동물의 태아 유래 줄기세포와 근골격계 재생 능력 시험을 통한 줄기세포 치료제의 확립은 앞으로 많은 질병치료에 도움이 될 것이다.

[0011] 이와 관련된 기술로 공개특허 10-2019-0037504호(말과 동물의 골질환 치료 및 예방용 세포 치료제 및 3차원 환경을 이용한 이것의 제조방법)는 "말과 동물의 간엽줄기세포를 골세포로 초기 분화 유도시킴으로써 연골 및 골 재생 능력을 갖는 세포를 제조하는 것으로서, 특히, 하이드로겔을 이용한 3차원 세포 배양 및 분화 환경을 조성

함으로써, 대량으로 신속하게 연골 및 골재생 능력을 보유한 세포의 제조에 관한 발명"을 제시한 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 말과 동물의 태아 조직 유래 줄기세포로부터 분리된 양수 유래 중간엽 줄기세포를 기본으로 하고 Oct4, c-Myc, Klf4 등의 배아줄기세포 특이 유전자와 PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, HCAM 등의 중간엽 줄기세포에 특이 유전자를 동시에 발현하며, 50 계대 이상 배양되는 우수한 증식률을 가지고, 중배엽 유래 세포로의 분화능력과 다분화능 줄기세포 특성을 나타내며 말과동물 면역반응 관련 마커 ELAⅡ(equine leukocyte antigen)에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타내는 근골격계 치료 유효성이 확인된 말 양수 유래 줄기세포, 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포치료제 및 제조방법을 제공하고자 한다.

[0015] 특히 본 발명은 기존 골수, 지방, 제대혈 유래 치료용 줄기세포 보다 채취가 쉽고 증식 및 분화능이 우수하여 근골격계 손상 및 질병에 있어 새로운 세포치료제로의 활용성을 지닌 말 양수 유래 줄기세포 및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제를 제공하고자 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 종래의 기존 중간엽 줄기세포에 비해 빠르고 우수한 성장률 (재생 능력)과 말의 근골격계 치료를 통한 재생 능력이 있는 말 양수 유래 줄기세포 및 이를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명은 상기한 문제점 및 요구를 해결하기 위하여,

[0020] 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 상기한 말과 동물은 말, 당나귀, 얼룩말 또는 이들의 교잡으로 태어난 잡종으로 구성된 군에서 선택되는 것이 특징인 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 임신한 말의 양수를 채취하는 과정(1과정),

[0025] 상기의 채취한 양수에서 단핵 세포를 분리하는 과정(2과정),

[0026] 상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정(3과정)을 포함하는 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0028] 또한 본 발명은 임신한 말의 양수를 채취하는 과정(1과정),

[0029] 상기의 채취한 양수에서 단핵 세포를 분리하는 과정(2과정),

[0030] 상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정(3과정),

[0031] 상기에서 초기 배양된 말 양수 유래 세포를 10~20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5~1.5 % Glutamax 및 0.5~1.5 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배양 배지로 교체하여 배양하는 과정(4과정),

[0032] 상기의 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.01~0.1% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시키는 과정(5과정)을 포함한 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제

조하는 방법을 제공한다.

[0034] 또한 임신한 말의 양수를 채취하는 과정(1과정)은,

[0035] 18-22 G를 장착한 30~70 cc 주사기로 획득하여 30~70 ㎖ 시험관으로 옮긴 후, 약 3~5 ℃를 유지한 채로 평균 약 3~4시간 내에 실험실로 운반하는 것을 특징으로 하는 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0037] 또한 본 발명은 상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정(3과정)은,

[0038] 10~20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5~1.5 % Glutamax 및 0.5~1.5 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium 배양 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0040] 또한 본 발명은 모든 배양 과정에서의 배양 접시는 0.05~0.15 % 젤라틴으로 코팅된 배양 접시를 사용하여 세포 부착성을 높인 것을 특징으로 하는 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0042] 또한 본 발명은 모든 배양 과정에 있어서 세포의 미분화상태를 유지하기 위해 배양 배지 바닥의 80% 이상 세포가 부착되면 계대 또는 동결하여 보관하여 사용하는 것이 특징인 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0044] 또한 본 발명은 다음과 같은 특성을 나타내는 말과 동물 양수 유래 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[0045] (a)줄기세포의 특성을 유지 한 채 50계대 이상 배양되는 자가 증식능력을 가짐.

[0046] (b)지방, 연골, 골세포 등의 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

[0047] (c)배아줄기세포 특이 유전자 Oct4, c-Myc, Klf4와 중간엽 줄기세포 관련 유전자 PAX6, ALCAM, Integrin α1, Endoglin, HCAM 에 대하여 동시에 양성의 유전적 발현 특성을 나타냄.

[0048] (d)세포 표면 마커인 CD44, CD90, CD105에는 양성의 면역학적 표현형을 나타내고 동시에 CD14, CD45, CD79α, ELA-DR에는 음성의 면역학적 표현형을 나타냄.

[0050] 또한 본 발명은 근골격계 치료 기능이 있는 것을 특징으로 하는 말과 동물 양수 유래의 중강엽 줄기세포를 제공한다.

[0052] 또한 본 발명은 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 포함하는 근골격계골절, 미세 골절, 골막염, 건과 인대 손상, 근육 손상 근 위축, 근섬유 단락 치료용 및 회복용 세포 치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0054] 본 발명은 말과 동물의 양수에서 중간엽 줄기세포를 제조할 수 있는 작용과 효과가 나타난다.

[0056] 또한 본 발명의 말과 동물의 양수에서 유래된 줄기세포가 줄기세포의 특성을 유지 한 채 50계대 이상 배양되는 자가 증식 능력을 확인 하는 작용과 효과가 나타나게 된다.

[0058] 또한 본 발명의 말과 동물의 양수에서 유래된 줄기세포가 지방세포분화, 골아세포분화, 연골세포분화 등의 분화

능력이 확인된 중간엽 줄기세포가 됨을 확인하는 작용과 효과가 나타나게 된다.

[0060] 또한 본 발명의 말과 동물의 양수에서 유래된 줄기세포가 배아줄기세포의 특성을 포함하여 중간엽 줄기세포로서의 다능성이 있는 작용과 효과가 나타남이 확인된다.

[0062] 또한 본 발명의 말과 동물의 양수에서 유래된 중간엽 줄기세포는 근골격계 치료 효과가 있음이 확인된다.

[0064] 또한 본 발명의 말과 동물의 양수에서 유래된 중간엽 줄기세포는 근골격계 골절, 미세 골절, 골막염 치료 효과가 있음이 확인된다.

[0066] 또한 본 발명에 따른 말과 동물의 양수에서 유래된 중간엽 줄기세포는 (a)줄기세포의 특성을 유지 한 채 50계대 이상 배양되는 자가 증식능력을 가지고, (b)지방, 연골, 골세포 등의 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지며, (c)배아줄기세포 특이 유전자 Oct4, c-Myc, Klf4와 중간엽 줄기세포 관련 유전자 PAX6, ALCAM, Integrin α1, Endoglin, HCAM 에 대하여 동시에 양성의 유전적 발현 특성을 나타내고, (d)세포 표면 마커인 CD44, CD90, CD105에는 양성의 면역학적 표현형을 나타내고 동시에 CD14, CD45, CD79α, ELA-DR에는 음성의 면역학적 표현형을 나타내는 특성을 가지게 된다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 말의 양수 유래 세포의 초기 배양을 보여준다. (A)는 양수 유래 줄기세포가 배양 접시 표면에 부착되어 섬유아세포 형태로 자라는 모양을 나타낸다(X100). (B)는 Diff-quick으로 염색 한 결과이다(X100).

도 2는 초기계대부터 50계대 이상의 말 양수 유래 줄기세포의 계대수 증가 시 Doubling time 을 보여준다.

도 3은 말의 양수 유래 줄기세포의 지방 세포 분화 실험을 보여준다. (A)는 분화 유도 전 말 양수 줄기세포의 오일 레드 오(Oil Red O) 염색 음성 반응을 나타내며(X100), (B)는 분화 유도 배지에서 배양 후 오일 레드 오(Oil Red O)로 염색 시, 양성으로 염색된 것을 보여준다(X100). (C)는 (X200).

도 4는 말의 양수 유래 줄기세포의 골아 세포 분화 실험을 보여준다. (A)는 분화 유도 전 말 양수 줄기세포의 알리자린 레드 에스(Alizarin red S) 염색 음성 반응을 나타내며(X100), (B)는 분화 유도 배지에서 배양 후 알리자린 레드 에스(Alizarin red S)로 염색 시, 양성으로 염색된 것을 보여준다(X100). (C)는 (X200).

도 5는 말의 양수 유래 줄기세포의 연골 세포 분화 실험을 보여준다. (A)는 분화 유도 전에 말 양수 줄기세포의 알시안 블루(Alcian blue) 염색 음성 반응을 나타내며(X100), (B)는 분화 유도 배지에서 배양 후 알시안 블루(Alcian blue) 로 염색 시, 양성으로 염색된 것을 보여준다(X100). (C)는 (X200).

도 6은 줄기세포 특이 유전자들이 발현되는지를 확인하기 위하여, 말의 양수 유래 줄기세포들의 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행한 결과를 보여준다. 컨트롤 마커인 beta-actin 포함 배아줄기세포 유전자 (Oct4, c-MYC, klf4)와 중간엽 줄기세포 관련 유전자 (PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, HCAM) 모두 발현됨을 알 수 있다.

도 7은 도 6에서 실험한 유전자 발현을 실시간 정량 분석을 통해 유전자의 발현양을 비교한 결과이다.

도 8은 양수 유래 세포에서 줄기세포의 특성을 확인하기 위한 유세포분석(Flow Analysis Cytometry System)을 수행한 결과를 보여준다. 유세포 분석을 통해 말 양수 유래 세포가 중간엽 줄기세포의 양성발현 마커인 CD44, CD90, C105에서는 양성의 면역학적 특징을, 음성발현 마커인 CD14, CD45, CD79α 및 면역 관련 특이 마커 ELAⅡ에서는 음성의 면역학적 양상을 나타냈다.

도 9는 말 양수 유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 근골격계 손상 질환 말의 손상 부위에 본 발명의 줄기세포 이식 후, 손상된 조직의 회복을 보여주는 X-Ray결과이다. (A, D)는 좌측 연골 손상 부위, (B, E)는 제 3완골 골절 및 연골 손상 부위, (C, F)는 요골 골절 부위의 줄기세포 치료 전후의 상태를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 본 발명을 도면을 참고하여 상세히 설명하고자 한다.

[0071] 본 발명은 말과 동물 양수 유래의 줄기세포를 제조하는 방법 및 이에 따른 말과 동물 양수 유래의 줄기세포를 제공한다.

[0073] 본 발명의 말과 동물은 말, 당나귀, 얼룩말 또는 이들의 교잡으로 태어난 잡종으로 구성된 동물을 포함하는 것을 의미한다.

[0075] 또한 본 발명은 상기한 말과 동물 양수 유래의 줄기세포를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제를 제공한다.

[0077] 본 발명은 임신한 말의 출산 과정에서 채취한 양수로부터 줄기세포 주(Line)를 분리 배양하는 것을 기술적 특징으로 한다.

[0079] 본 발명은 임신한 말의 양수를 채취하는 과정을 수행한다.(1과정)

[0081] 바람직하게는 본 발명은 임신한 말의 출산 과정에서 비 침습적인 방법으로 양수를 채취하는 과정을 수행한다.

[0083] 본 발명은 임신한 말의 출산 과정에서 양수를 채취하되, 이와 같은 양수는 임신이 확인된 암말의 분만 시 양막낭 파열 전, 18-22 G를 장착한 30~70 cc 주사기로 획득하여 30~70 ㎖ 시험관으로 옮긴 후, 약 3~5 ℃를 유지한 채로 평균 약 3~4시간 내에 실험실로 운반하여 준비하는 과정을 수행한다.

[0084] 상기한 18-22 G에서 G는 호수(Guage)를 의미하며 18은 직경이 1.270mm, 22는 0.711mm의 사이즈를 의미한다.

[0086] 바람직하게는 본 발명은 임신한 말의 출산 과정에서 양수를 채취하되, 이와 같은 양수는 임신이 확인된 암말의 분만 시 양막낭 파열 전, 18 G를 장착한 50 cc 주사기로 획득하여 50 ㎖ 시험관으로 옮긴 후, 약 4 ℃를 유지한 채로 평균 약 3시간 내에 실험실로 운반하여 준비하는 과정을 수행한다.

[0088] 본 발명은 상기의 채취한 양수에서 단핵 세포를 분리하는 과정을 수행한다.(2과정)

[0090] 본 발명은 상기에서 채취한 양수를 셀 스트레이너(cell strainer)를 사용하여 거른 후에 3~7% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS (Phosphate Buffered Saline)과 1:0.5~1.5 비율로 섞은 뒤 2,000~4,000 rpm, 8~12분간 원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하는 과정을 수행한다.

[0092] 바람직하게는 상기에서 채취한 양수를 90~110 μM, 바람직하게는 100 μM cell strainer를 사용하여 거른 후에 5% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS (Phosphate Buffered Saline)과 1:1로 섞은 뒤 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하는 과정을 수행한다.

[0094] 또한 상기 회수한 펠렛은 다시 3~7 % 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS를 이용 세척 및 원심분리하는 과정을 1~3회 진행하여 단핵세포를 분리하는 과정을 수행한다.

[0095] 바람직하게는 상기 회수한 펠렛은 5 % 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS를 이용 세척 및 원심분리하는 과정을 2회 진행하여 단핵세포를 분리한다.

[0097] 본 발명은 상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하는 과정을 수행한다.(3과정)

[0099] 본 발명은 상기의 분리된 양수 유래 단핵세포를 초기 배양하기 위하여, 10~20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5~1.5 % Glutamax 및 0.5~1.5 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium 배양 배지를 사용한다.

[0101] 바람직하게는 15 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % Glutamax 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium 배양 배지를 사용하는 것이 좋다.

[0103] 본 발명은 세포 부착성을 높이기 위해 0.05~0.15 % 젤라틴으로 코팅된 6well 배양 접시에 분주 되었으며, 말과 동물의 체온과 같은 38.5 ℃에서 4.5~5.5 % CO^2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하였다.

[0105] 바람직하게는 세포 부착성을 높이기 위해 0.1 % 젤라틴으로 코팅된 6well 배양 접시에 분주 되었으며, 말과 동물의 체온과 같은 38.5 ℃에서 5 % CO^2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하는 것이 좋다.

[0107] 본 발명은 초기 배양 과정에서 죽은 조직 및 세포를 제거해 주는 과정을 수행한다.

[0108] 즉, 죽은 조직 및 세포를 제거해주기 위해 초기 배양 시작 48h 안에 배양 배지를 교체 해주었고 세포가 배양 접시 바닥에 부착된 것이 관찰되었을 경우에도 배양 배지를 교체해 주는 과정을 수행한다.

[0110] 본 발명은 배양 배지 바닥의 80% 이상 세포가 부착되면 계대 또는 동결하여 양수 유래의 줄기세포를 수득하여 보관하는 과정을 수행한다.

[0112] 도 1에서 보는 것처럼 상기한 과정으로 배양된 양수 유래의 줄기세포에서 세포의 자라는 형상은 섬유아세포와 유사한 spindle 모양으로 관찰되었다. 이는 다른 중간엽 줄기세포에서 나타나는 형상과 유사하며, 세포 형태의 자세한 관찰을 위해 Diff-quick 염색 시약을 통해 양수 유래의 중간엽 줄기세포인 것이 확인된다.

[0114] 본 발명은 상기한 과정으로 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하게 되며, 이와 같이 제조된 양수 유래의 중간엽 줄기세포는 뛰어난 자가 증식능력이 있으며, 지방 세포, 연골 세포, 골 세포로 분화 등을 포함한 높은 분화 능력이 있고, 줄기세포의 다능성을 보유하는 특성을 갖게 된다.

[0116] 또한 본 발명은 상기한 바와 같이 제조된 양수 유래의 중간엽 줄기세포는 근골격계 치료의 기능이 나타난다.

[0118] 본 발명의 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포의 제조는 다음과 같은 방법으로 제조할 수 있다.

[0120] 본 발명은 상기에서 초기 배양된(제조한) 3~5계대 사이의 말 양수 유래 세포를 10~20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5~1.5 % Glutamax 및 0.5~1.5 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco Modified Eagle

Medium(DMEM) 배양 배지를 사용하여 배양하는 과정을 수행한다.(4과정)

[0122] 바람직하게는 상기에서 제조한 3~5계대 사이의 말 양수 유래 세포를 15 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % Glutamax 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배양 배지를 사용하여 배양한다.

[0124] 본 발명은 상기의 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.01~0.1% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시키는 과정(5과정)을 수행하여,

[0125] 말과 동물 중간엽 줄기세포를 수득하는 과정을 수행한다.

[0127] 바람직하게는 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.05% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시킨 뒤 주사 부위에 따라 5×10^6~ 1×10^7 수의 세포를 수득한다.

[0129] 본 발명은 상기의 0.1~1.0 % FBS가 포함된 PBS로 준비한 세포를 희석하여 주사기에 주입하는 과정으로 주사용 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포를제조하는 과정을 수행한다.(6과정)

[0131] 본 발명은 0.1~1.0 % FBS가 포함된 PBS로 준비한 세포를 희석한 뒤 주사기에 햇빛을 차단한 상태로 2~8℃ 온도를 유지하여 주사기에 포함된 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조하는 과정을 수행한다.

[0133] 바람직하게는 본 발명은 0.5 % FBS가 포함된 PBS로 준비한 세포를 희석한 뒤 3ml 주사기에 햇빛을 차단한 상태로 4℃ 온도로 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포를 제조한다.

[0135] 본 발명은 상기한 바와 같이 제조된 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 함유하는 근골격계 재생용 세포 치료제를 제공한다

[0137] 본 발명은 다음과 같은 실시예로 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포를 제조하며, 이와 같이 제조된 양수 유래의 중간엽 줄기세포는 뛰어난 자가 증식능력이 있으며, 지방 세포, 연골 세포, 골 세포로 분화 등와 같은 높은 분화 능력이 있고, 줄기세포의 다능성을 보유하는 특성을 갖게 되고, 근골격계 치료의 기능이 나타남을 시험으로 확인하게 된다.

[0139] **<실시예>**

[0141] 1. 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포 제조방법 및 그에 따른 말과 동물 양수 유래의 중간엽 줄기세포

[0143] **(1) 말과 동물 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양**

[0145] 양수 샘플은 임신이 확인된 암말의 분만 시 양막낭 파열 전, 18 G를 장착한 50 cc 주사기로 획득하여 50 ㎖ 시험관으로 옮긴 후, 약 4 ℃를 유지한 채로 평균 약 3시간 내에 실험실로 운반하였다.

[0146] 채집한 양수는 100 μM cell strainer를 사용하여 거른 후에 5% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS (Phosphate Buffered Saline)과 1:1로 섞은 뒤 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하였으며, 회수한 펠렛은 다시 5 % 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 PBS를 이용 세척 및 원심분리하는 과정을 2회 진행하여 단핵세포를 분리하였다.

[0147] 상기 분리 과정을 거친 양수 유래 단핵세포들의 초기 배양을 위해, 15 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % Glutamax 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium 배양 배지를 사용하였다. 세포 부착성을 높이기 위해 0.1 % 젤라틴으로 코팅된 6well 배양 접시에 분주 되었으며, 말과동물의 체온과 같은 38.5 ℃에서 5 % CO^2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하였다.

[0149] 죽은 조직 및 세포를 제거해주기 위해 초기 배양 시작 48h 안에 배양 배지를 교체 해주었고 세포가 배양 접시 바닥에 부착된 것이 관찰되었을 경우에도 배양 배지를 교체해 주었으며, 줄기세포의 미분화 특성을 유지하기 위하여 배양 배지 바닥의 80% 이상 세포가 부착되면 계대 또는 동결하여 보관하였다. 양수 유래 세포들은 평균 약 5 일 후 부착된 형태로 관찰 할 수 있었으며,

[0150] 도 1에 나타난 바와 같이 세포의 자라는 형상은 섬유아세포와 유사한 spindle 모양으로 관찰되었다. 이는 다른 중간엽 줄기세포에서 나타나는 형상과 유사하며, 세포 형태의 자세한 관찰을 위해 Diff-quick 염색 시약을 통해 확인하였다.

[0152] **(2) 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포의 제조**

[0154] 3~5계대 사이의 말 양수 유래 세포를 15 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % Glutamax 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) 배양 배지로 교체하여 배양하였다.

[0155] 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.05% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시킨 뒤 주사 부위에 따라 5×10^6~ 1×10^7 수의 세포를 제조하여 준비하였다.

[0156] 0.5 % FBS가 포함된 PBS로 준비한 세포를 희석한 뒤 3ml 주사기에 햇빛을 차단한 상태로 4℃ 온도로 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포 제조하였다.

[0158] **2. 실험**

[0160] (1) 상기의 실시예에서 제조된 말과 동물 중간엽 줄기세포를 아래와 같은 실험을 실시하였다.

[0162] **(2) 중간엽 줄기세포의 자가 증식능력 검증 실험**

[0163] 중간엽 줄기세포의 뛰어난 자가복제 및 증식능력을 분석하기 위하여, 위에 실시된 방법에 의해 수득된 양수 줄기세포의 성장 및 증식 효율을 계대수 관측 (Doubling time analysis) 을 통해 확인하였다.

[0164] Doubling time 분석은 세포가 처음의 수에서 두 배가 되는 시간 분석을 통해 세포의 증식율을 나타내는 지수로 표현되며, 다음과 같은 식으로 표현된다.

[0166] Doubling time(hr)={(T-T0)log2}/(logN-logN0)

[0168] T-T0 : 세포 배양 시간 (hr)

[0169] N0 : 초기 분주한 세포 수, N : 최종 배양 된 세포 수

[0171] 본 실험을 하기 위해 말 양수 중간엽 줄기세포를 six-well dish에 200,000 세포/well의 밀도로 분주한 후 새로운 배지를 전혀 첨가하지 않는 방법으로 38.5 ℃에서 5 % CO^2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하여 배양시간과 전체 활성세포수를 관측하였다.

[0172] 세포는 trypan blue staining을 이용하여 활성세포(viable cell)만 계측하였다.

[0173] 즉 six-well 배양접시 내의 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, PH 7.2)으로 세척 후 0.05% Typsin-EDTA를 이용하여 세포를 기저면에서 분리시켰다. 이후 새로운 5 % FBS가 포함된 배양액으로Trypsin의 작용을 중지시키고, 세포 배양 접시에서 분리된 세포를 세포수 계측에 사용하였다.

[0174] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, Doubling time 곡선은 양수 줄기세포가 50계대 이상까지 자라고 있음을 보여준다. 이는 기존 말 양수 유래 중간엽 줄기세포의 14계대와 비교하였을 때, 본 발명에서 수득한 말 양수 유래 중간엽 줄기세포의 우수한 자가 재생능력을 시사한다.

[0176] **(3) 분화 능력 확인 실험**

[0177] 본 발명의 말 양수에서 분리한 중간엽 줄기세포의 분화 능력을 확인하기 위해 Gibco사의 StemPro Differentiation Kit를 사용하여 각각 계통에 맞는 배지에서 지방 세포, 연골 세포, 골 세포로 분화를 유도하였다.

[0179] 1) 지방세포 분화 (Adipogenic differentiation)

[0180] 지방세포로의 분화가능여부를 검증하기 위해, Gibco사의 StemPro Adipogenesis Differentiation Kit를 이용하여 six-well dish에 200,000 세포/well의 밀도로 38.5 ℃에서 5 % CO^2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하였다.

[0181] 2일에 한 번씩 배지를 교환하였으며, 약 1주일 후 양수 유래 중간엽 줄기세포 모두 분화 유도 과정 중 섬유아세포(fibroblast) 형태에서 점차 둥근 모양으로 세포의 형태가 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

[0182] 약 7일 후에 오일 레드 오(Oil Red O)로 염색한 결과 지질 방울 형성으로 인한 염색을 관찰할 수 있었다 (도 3).

[0184] 2) 골아세포 분화 (Osteogenic differentiation)

[0185] 골아세포로의 분화가능여부를 검증하기 위해, Gibco사의 StemPro Osteogenesis Differentiation Kit를 이용하여 six-well dish에 200,000 세포/well의 밀도로 38.5 ℃에서 5 % CO2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하였다.

[0186] 2일에 한 번씩 배지를 교환하였으며, 약 1주일 후 양수 유래 중간엽 줄기세포 모두 분화 유도 과정 중 섬유아세포(fibroblast) 형태에서 점차 입방형으로 형태의 세포로 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

[0187] 약 21일의 분화 유도 후에 세포 외 기질(extracellular matrix)에 칼슘(calcium) 침전이 일어났는지를 알리자린 레드 에스(Alizarin red S)염색으로 확인한 결과 양성으로 염색됨을 알 수 있었다 (도 4).

[0189] 3) 연골세포 분화 (Chondrogenic differentiation)

[0190] 연골세포로의 분화가능여부를 검증하기 위해, Gibco사의 StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit를 이용하여 1,000cells/마이크로리터의 농도로 3D 배양 방법 중 하나인 행잉드롭 (Hanging drop) 방법으로 세포가 구 형태로 자라도록 38.5 ℃에서 5 % CO2 환경의 인큐베이터에 넣고 배양하였다.

[0191] 3일에 한 번씩 배지를 추가 혹은 교환하여 주었으며, 약 14 일 후에 알시안 블루(Alcian blue)로 염색한 결과 연골세포 분화로 인한 염색을 관찰할 수 있었다 (도 5).

[0193] (4) 줄기세포 다능성 확인

[0194] 일반적으로 중간엽 줄기세포는 특정 세포 표면 표식 인자에 의해 구별되는 특이 발현 패턴을 가지고 있으며, 국제 줄기세포 위원회(international society for cellular therapy, ISCT)에서 제시한 말과 동물의 중간엽 줄기세포에서 양성 발현을 보이는 CD44, CD90, CD105와 음성 발현을 보이는 CD14, CD45, CD79α 및 면역 관련 마커 ELA-Ⅱ에 대한 분석을 유세포 분석(Flow cytometry analysis)과 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 시행하였다.

[0195] 또한, 양수 유래 줄기세포의 특성으로 알려진 배아줄기세포 특이 유전자 Oct4, c-Myc, Klf4 및 중간엽 줄기세포 관련 유전자 PAX6, ALCAM, Integrin â1, Endoglin, HCAM 에 대하여 mRNA 레벨에서의 발현 양상을 실시간 정량(Real time PCR)을 통해 분석하였다.

[0197] 1) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

[0198] Total RNA는 제조사의 지침에 따라 RNA 추출 키트를 사용하여 준비하였다 (Qiagen, Cat. No. 74104). RNA 시료(Total RNA 1㎕)는 iScript 역전사효소 (BIO-RAD)를 사용하여 올리고 dT 프라이머 및 랜덤(random) 프라이머로 cDNA를 합성하였다. 프라이머는 하기 [표 1]에 제시되어 있다.

표 1

[0200]

유전자명	프라이머 서열		크기	Accession No.
beta-Actin	F	GGATGCAGAAGGAGATCACAG	125	NM_001081838.1
	R	CTGGAAGGTGGACAATGAGG		
OCT4	F	TCTCCCATGCACTCAAACTG	197	XM_001490108
	R	AACTTCACCTTCCCTCCAAC		
c-Myc	F	GCCCATAAAATTGCCAAGAGG	132	XM_023655154
	R	AGCCCTGACCTTTGAATGAC		
Klf4	F	ACCTCGCCTTACACATGAAG	218	XM_023629843.1
	R	TGGTTTCCTCATTGTCTCCTG		
PAX6	F	TGTTTGCCCGAGAAAGACTAG	224	XM_023646553.1
	R	AGAGGTGAAGGATGAAACAGG		
ALCAM	F	AGAAGGCAGGAAGTTTGTCG	147	XM_001503380.6
	R	GGAAAGTTGAGGATTGTGCG		
Integrin-β1	F	CTTATTGGCCTTGCATTGCT	169	XM_005606848.3
	R	TTCCCTCGTACTTCGGATTG		
HCAM	F	ATCCTCACGTCCAACACCTC	165	XM_005598012
	R	CTCGCCTTTCTTGGTGTAGC		
Endoglin	F	AAGAGCTCATCTCGAGTCTG	162	XM_003364144
	R	TGACGACCACCTCATTACTG		

[0201] [PCR에 사용된 프라이머]

[0203] 합성한 cDNA는 95℃에서 4분, 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 및 72℃에서 30초 사이클로 총 34회 반응시킨후 마지막으로 73℃ 에서 5분의 조건으로 PCR을 수행하였다.

[0204] 각각의 프라이머의 염기서열에 따라 그에 맞는 어닐링(annealing) 온도로 PCR을 수행하였으며, PCR 산물은 그 증폭 크기를 비교할 수 있는 아가로스겔 전기영동을 통해 유전자의 발현을 확인하였다.(도 2).

[0206] RT-PCR 결과, 줄기 세포의 다능성을 나타내는 배아줄기세포 특이 Oct4, c-Myc, Klf4 유전자의 발현을 확인한 결과 각각의 유전자가 발현됨을 알 수 있었으며 중간엽 줄기세포에 특이적으로 나타나는 PAX6, ALCAM, Integrin

β1, Endoglin, HCAM 유전자가 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도6).

[0208] 2) 실시간 정량 (Real time PCR)

[0209] 실시간 정량에 사용한 cDNA는 RT-PCR에 사용했던 cDNA 합성 방법과 동일한 방법으로 합성하였다. Realtime PCR은 95℃에서 10분, 94℃에서 15초, 58℃에서 30초, 및 72℃에서 30초의 조건으로 총 39회 반응시켰다.

[0210] 대조군으로는 말의 피부 유래 섬유아세포의 유전자를 이용하였으며, 베타 액틴 (ß-actin) 유전자와의 상대적 발현양 비교를 통해 줄기세포 특이 마커 발현 양을 말 양수 유래 중간엽 줄기세포에서 비교하였다.

[0212] 그 결과 다능성을 나타내는 유전자 Oct4, c-Myc, Klf4와 줄기세포에 특이적으로 나타나는 유전자인 PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, HCAM 모두 말의 양수 유래 세포에서 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였다 (도7).

[0214] 3) 유세포 분석(Flow cytometry analysis)

[0215] 말 양수 유래 세포는 각각의 세포 표면 특이 항체와 FITC(fluorescein isothiocyanate)또는 PE(phycoerythrin)와 같은 형광 IgG가 결합된 다양한 조합의 항체를 붙인 뒤 레이저를 기초로 유동적으로 흐르는 세포들의 지표를 탐지하는 유세포 분석을 통해 세포 표지 인자 발현 및 발현량을 분석하였다.

[0216] 사용된 항체는 다음과 같다: CD14, CD44-FITC, CD45, CD79α-FITC, CD90-PE, CD105-FITC, ELA-DR-FITC 및 IgG-FITC. 시료 당 약 5~8x10^5개의 세포가 하나의 항체를 분석하는 데 사용되었으며 Cellquest 소프트웨어를 사용하여 유세포 분석(FACScan, BD Biosciences, USA)을 실시하였다.

[0217] 줄기세포 특이적 마커인 CD14, CD44, CD45, CD90, CD105, ELA-DR를 확인해본 결과, CD44, CD90, CD105에는 양성의 면역학적 표현형을 나타내었으며, CD14, CD45, CD79α, ELA-DR에는 음성의 면역학적 표현형을 나타내었다. 따라서 양수 유래 세포들은 중간엽 줄기세포의 특성을 가지고 있음이 확인되었다 (도 8).

[0219] **5. 말과 동물 중간엽 줄기세포의 근골격계 치료 효과 검증**

[0221] (1) 본 발명은 상기의 (2) 근골격계 치료용 말과 동물 중간엽 줄기세포의 제조 실시예에서 제조한 말과 동물 중간엽 줄기세포의 근골격계 치료 효과에 대하여 아래와 같이 실험하였다.

[0223] (2) 세포 주사 및 확인

[0224] 근골격계 치료를 위한 줄기세포 치료제는 세포를 준비하고 3시간 이내로 준비하여 치료를 수행하였다. 초음파를 이용하여 치료가 필요한 정확한 손상을 찾은 뒤 PBS로 희석한 세포를 18222 게이지 바늘이 달린 주사기를 이용하여 소독을 마친 후, 상처 부위에 주사한 뒤 2달 간격으로 초음파를 이용해서 경과를 지켜보았을 때 상처의 회복 속도가 현저하게 빠른 것을 확인할 수 있었다 (도9).

[0226] 도 9는 말 양수 유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 근골격계 손상 질환 말의 치료부위에 이식 후, 손상된 조직의 회복을 보여주는 X-Ray결과이다. (A, D)는 좌측 연골 손상 부위, (B, E)는 제 3완골 골절 및 연골 손상 부위, (C, F)는 요골 골절 부위의 줄기세포 치료 전후의 상태를 나타낸다.

[0228] 이와 같이 본 발명에 따라 제조된 말과 동물의 양수 유래 중간엽 줄기세포는 근골격계 손상 질환에 매우 효과적임을 알 수가 있다.

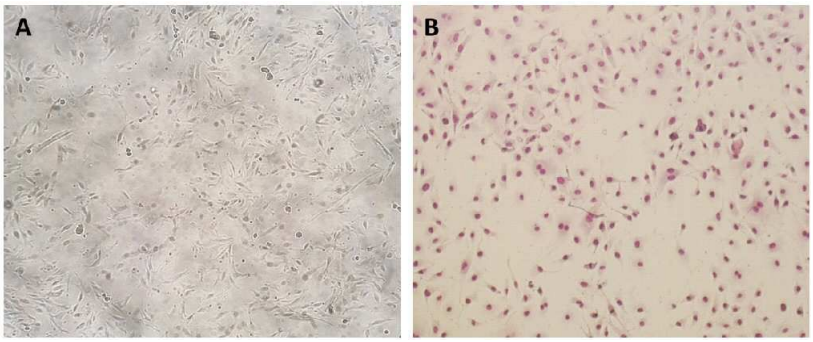
산업상 이용가능성

[0230] 본 발명은 말과 동물의 줄기세포의 제조 및 이를 이용하는 근골격계 재생용 세포 치료제에 관한 생산, 제조, 판매, 유통, 연구하는 산업에 유용하다.

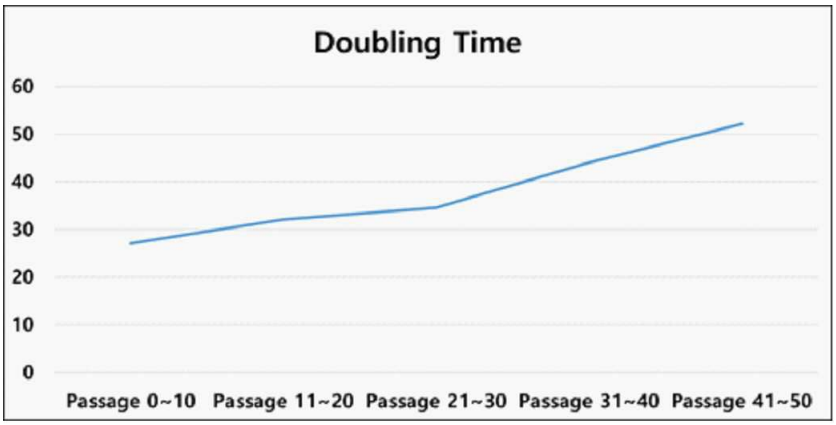
[0232] 특히 본 발명은 말과 동물의 양수에서 추출한 중간엽 줄기세포의 제조 및 이를 이용하는 근골격계 재생용 세포 치료제에 관한 생산, 제조, 판매, 유통, 연구하는 산업에 유용하다.

도면

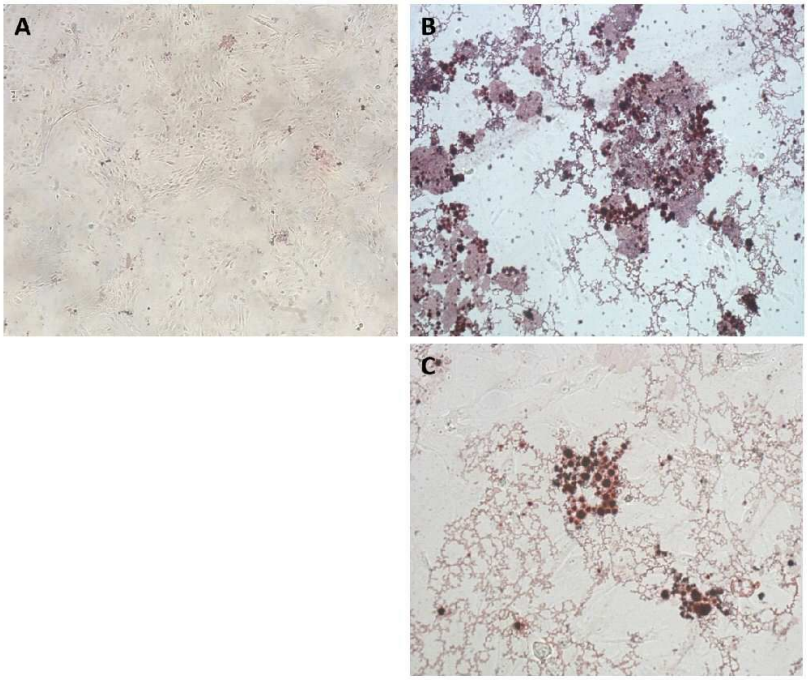
도면1



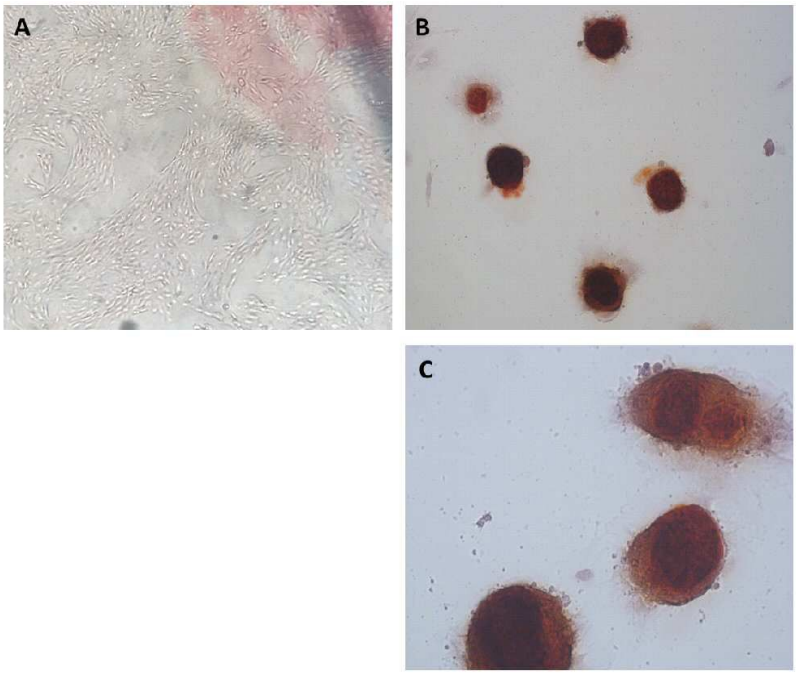
도면2



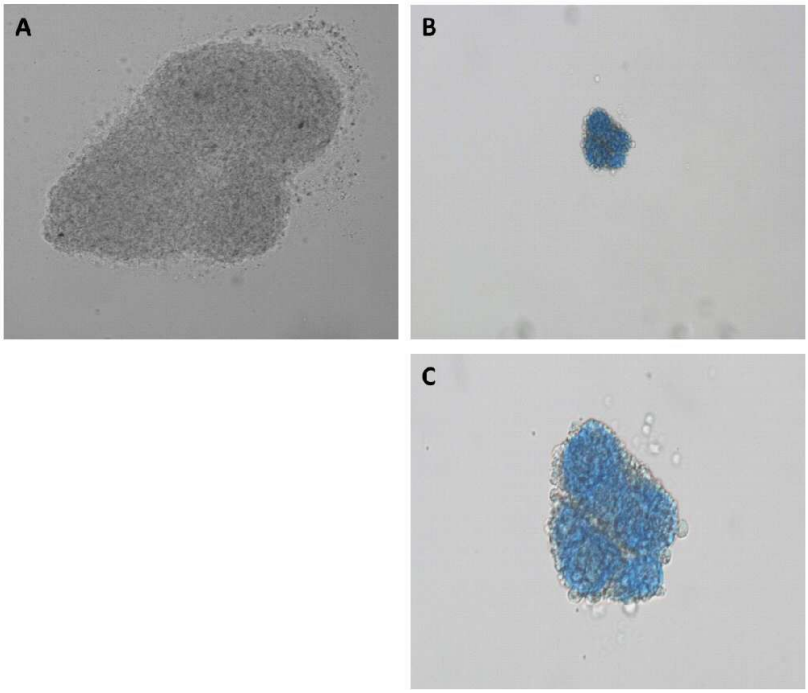
도면3



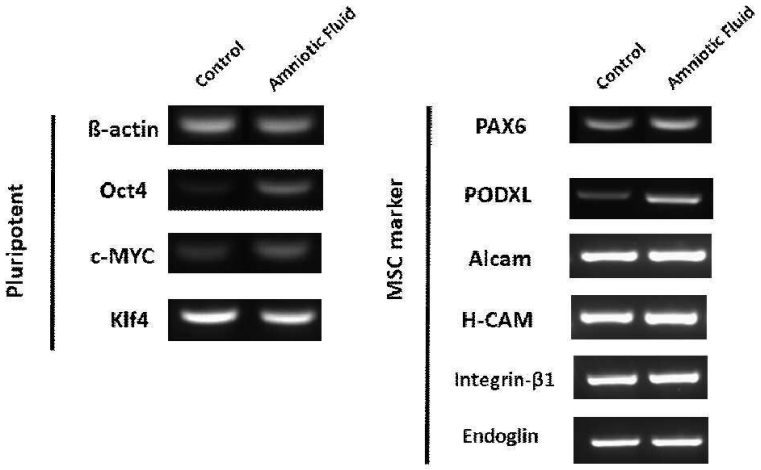
도면4



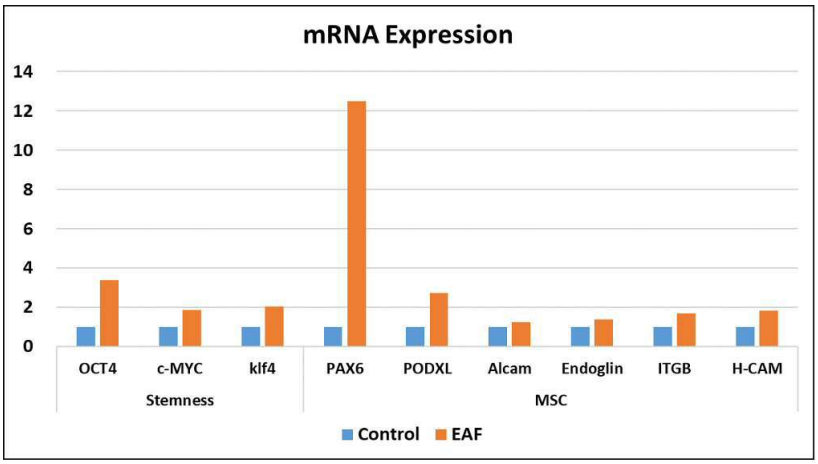
도면5


A
B
C

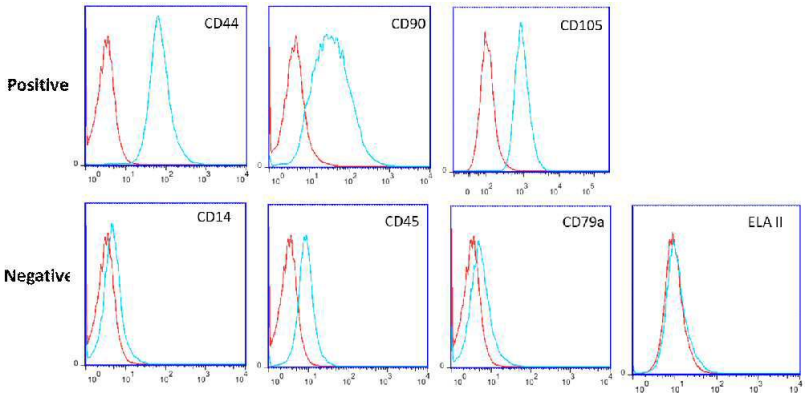
도면6


Control
Amniotic Fluid
Pluripotent
ß-actin
Oct4
c-MYC
Klf4
Control
Amniotic Fluid
MSC marker
PAX6
PODXL
Alcam
H-CAM
Integrin-β1
Endoglin

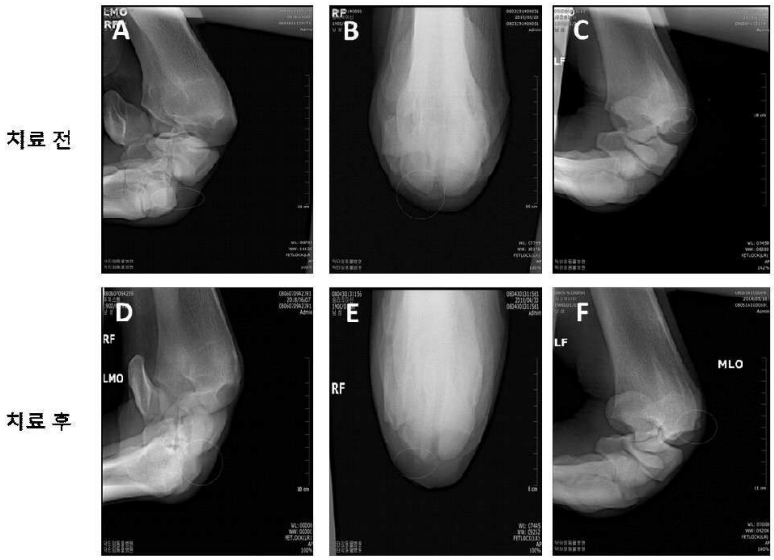
도면7


mRNA Expression
14
12
10
8
6
4
2
0
OCT4
c-MYC
klf4
PAX6
PODXL
Alcam
Endoglin
ITGB
H-CAM
Stemness
MSC
Control
EAF

도면8


Positive
CD44
CD90
CD105
Negative
CD14
CD45
CD79a
ELA II

도면9


치료 전
치료 후
A
B
C
D
E
F
RF
LMO
LF
MLO