



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0109358
(43) 공개일자 2016년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0033607
(22) 출원일자 2015년03월11일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
유경하
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우웹버스카운티1차)
류정화
서울특별시 구로구 새말로 31, 109동 801호 (구로동, 롯데구로아파트)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 8 항

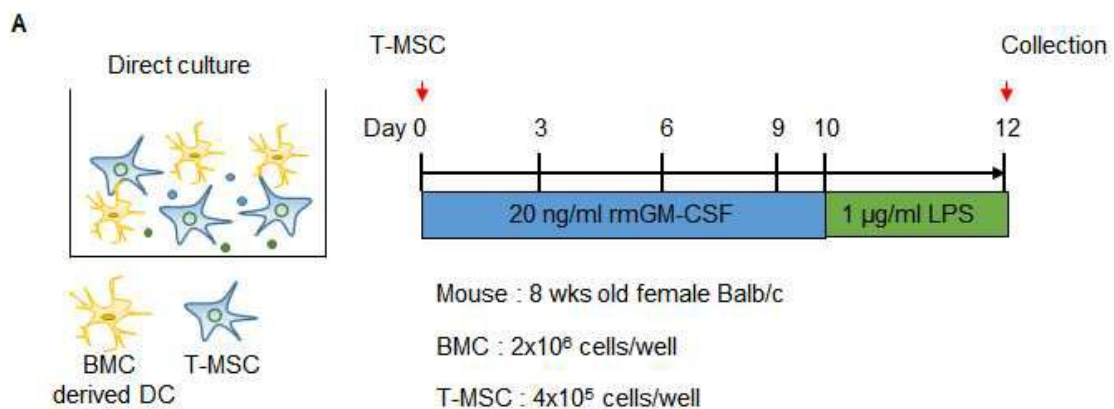
(54) 발명의 명칭 면역 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 수지상 세포의 분화 및 성숙을 억제하고, 수지상 세포가 분비하는 면역 반응 유발 사이토카인 분비를 억제하며, 수지상 세포 매개 T-림프구의 기능을 약화시켜 면역 반응을 조절함으로써 면역 질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 보인다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0021 (2013.01)

(72) 발명자

우소연

서울특별시 동대문구 정릉천동로 36, 102동 601호
(용두동, 래미안허브리츠아파트)

김유희

경기도 과천시 동패로 117, 104동 1201호 (동패동,
벽산아파트)

박민화

대구광역시 달서구 구마로12길 89, 502동 107호 (본동, 월성주공5단지아파트)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센트럴)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2057468

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구

연구과제명 골수재건을 위한 새로운 조혈모세포 공급원의 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9C6049823

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 새로운 세포치료제로서 편도줄기세포의 발굴 및 기능검색 연구

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역 질환은 수지상 세포 활성화 증진에 따라 유발되는 면역 질환인 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 질환은 제1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 크론병 또는 건선으로부터 선택된 어느 하나인 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 면역 질환 예방 또는 치료는 수지상 세포 분화 억제에 의한 것인 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 분화 억제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 수지상 세포 분화 억제는 조혈 골수세포로부터 수지상 세포 분화의 억제인 수지상 세포 분화 억제용 조성물.

청구항 7

편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 분화 억제용 조성물을 조혈 골수 세포에 처리하는 단계를 포함하는 수지상 세포 분화 억제 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조혈 골수세포에 대한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 처리는 수지상 세포에 대하여 편도 유래 중간엽 줄기세포를 1:1 내지 1:100 비로 처리하는 수지상 세포 분화 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다.

[0003] 치료 방법으로서 최근 줄기세포 및 조직공학을 이용한 이식치료법이 개발되고 있다. 하지만, 이러한 이식 치료 기법으로는 치료효과가 뛰어나고 인체의 면역반응을 일으키지 않는 안전한 세포 치료제를 개발하기 어렵다는 문제가 있다. 그 동안 여러 가지 줄기세포를 이용하여 세포 치료제로써 활용하기 위한 시도들이 진행되고 있지만, 면역 조절 능력에 대한 확인은 아직 부분적으로만 진행되고 있다. 특히, 줄기세포 중 일부가 면역 억제 능력이

있다는 보고가 나오고 있지만, 아직까지 면역 조절 능력을 가진 줄기세포에 대한 연구 보고는 없는 상황이다.

[0004] 특히, 수지상 세포(Dendritic Cells, DCs) 매개 면역 반응 조절은 면역 질환의 예방 및 치료에 중요한 요소이다. 수지상 세포(Dendritic Cells, DCs)는 면역계에 존재하는 세포 중에서 항원을 전달하는 능력이 가장 강력한 항원 제시 세포이다. 수지상 세포는 원시 T 세포(naive T cell)를 자극하는 일차면역반응(primary immune response)을 유도할 수 있으며, 면역의 기억을 유도할 수 있는 특성을 갖는 면역세포이다. 수지상 세포가 강력한 면역반응 활성화 기능을 할 수 있는 것은 항원제시세포(Antigen Presenting Cell)로서 세포 표면에 MHC 분자(I/II) 뿐만 아니라, 보조자극분자(co-stimulatory molecules)를 고농도로 발현하고 있으며, IFN- α , IL-12, IL-18 등의 여러 가지의 사이토카인(cytokine)을 분비하기 때문이다. 이러한 수지상 세포는 IFN- α , IL-12 등 여러 가지 사이토카인을 분비하기 때문에 항원 특이 세포 살해 T 세포의 생성, Th1 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있다. 따라서, 이러한 수지상 세포의 조절은 면역 반응 조절에 중요한 역할을 하며, 이에 대한 연구 개발이 필요하다.

[0005] 한편, 상기와 같은 줄기세포 연구를 진행하기 위해서는 줄기세포의 원활한 공급이 필요하다. 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 세포능이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 특정 줄기세포를 이용하여 면역 반응을 조절함으로써 면역 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 방법에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0135263호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0033471호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 분화 억제용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 분화 억제용 조성물을 수지상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 수지상 세포 분화 억제 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 면역 반응을 조절함으로써 면역 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 적합한 종류의 줄기세포를 확인하여 이의 특성을 확인하던 중, 편도 유래 중간엽 줄기세포가 수지상 세포의 분화 및 성숙을 억제하고, 수지상 세포가 분비하는 면역 반응 유발 사이토카인 분비를 억제하며, 수지상 세포 매개 T-림프구의 기능을 약화시킴

을 확인하고 면역 반응 억제를 통한 치료제로써 이용 가능성을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

- [0012] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 면역 질환이란 특정 면역 반응이 일어날 경우 문제가 되는 질환으로, 특히 수지상 세포 분화 및 활성화, 세포 매개 T-림프구의 기능 활성화에 의해 발생 가능한 면역 질환이다. 상기 면역 질환은 제1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 건선으로부터 선택되는 어느 하나 일 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 수지상 세포란 면역계에 존재하는 세포 중에서 항원을 전달하는 능력이 가장 강력한 항원 제시 세포이다. 수지상 세포는 원시 T 세포(naive T cell)를 자극하는 일차면역반응(primary immune response)을 유도할 수 있으며, 면역의 기억을 유도할 수 있는 특성을 갖는 면역세포이다. $CD4^+$ T 세포의 T_H1 , T_H2 및 T_H17 세포와 같은 Helper T 세포로의 분화를 자극함으로써 다양한 면역 반응을 이끌 수 있다. 또한, 세포 표면에 MHC 분자(I/II)를 고농도로 발현할 수 있으며, IFN- α , IL-12, IL-18 등의 여러 가지의 사이토카인(cytokine)을 분비할 수 있다.
- [0015] 따라서, 이러한 수지상 세포의 조절은 면역 반응 조절에 중요한 역할을 한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, $CD4^+$ T 세포란 면역 반응에 관여하는 세포 중 하나로 우리 몸의 제1형(T_H1)과 제2형(T_H2)으로 크게 구분되고 서로 다른 작용 기작을 하며 면역반응에 관여하는 세포를 말한다. 예컨대, 제1형 세포는 감염 원인을 제거하는 방법으로 염증을 일으키고 식균작용을 강화하고 세포독성 T 세포를 활성화시키며, 반면 제2형 세포는 주로 항체 반응을 일으켜서 감염균이 항체에 의해 결합되면 신속히 식균 작용으로 제거할 수 있도록 해준다.
- [0017] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 면역 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 본 발명에 있어서 면역 질환은 상기 언급된 바와 같다. 편도 유래 중간엽 줄기세포는 타 유래 중간엽 줄기세포와 대비하여 수지상 세포의 분화 및 성숙을 억제하고, 수지상 세포가 분비하는 면역 반응 유발 사이토카인 분비를 억제하며, 수지상 세포 매개 T-림프구의 기능을 약화시킴으로써 면역 반응을 조절하고, 이를 통하여 면역 질환에 대한 치료제로써 현저한 효과를 보인다. 예컨대, 공동 발현 인자 (Co-stimulatory molecules) 및 Class II MHC의 발현을 억제하여 $CD11^+$ 수지상 세포를 감소시키며, $CD4^+$ T 세포의 분화를 억제하고 면역 매개 사이토카인들의 분비를 억제한다.
- [0018] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 타 유래 줄기세포와 대비하여 기원 조직인 편도의 획득이 용이하며 수술 후 버려지는 편도 조직의 재활용이 가능하고 초기 수득율이 매우 높다는 점에서 주입해야 하는 세포의 양을 자유롭게 조절할 수 있으며, 또한 체외에서 수지상세포와의 감작을 유도하는 등의 경우에 다량의 세포가 필요한 경우에도 증식이 쉬워 다량의 세포를 사용할 수 있다는 점에서 면역 질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에서 알려진 방법에 따라 편도로부터 추출 가능하다.
- [0020] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 면역질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 면역질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 1 ml 당 1.0×10^5 개 내지 1.0×10^9 개, 바람직하게는 1.0×10^6 개 내지 1.0×10^8 개의 세포를 포함 할 수 있다.
- [0022] 상기 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제, 분무제 등이 바람직하다. 또한, 상기 면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 줄기세포 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제로는 이에 한정되지 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매

및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다. 이 외에도, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제등을, 국소투여용 제제의 경우에는 기재(base), 부형제, 유회제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife[®]) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.

[0023] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 예컨대, 본 발명에 의한 조성물은 직장, 피하, 근육, 복강, 정맥, 동맥, 뇌척수강내, 골수 내 등으로 투여가능하다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 10^7 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^8 내지 10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 분화 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 수지상 세포 분화 억제용 조성물은 조혈 골수 세포, 바람직하게 단핵구로부터 유도되는 수지상 세포로의 분화를 억제한다. 예컨대, interleukin 4 (IL-4) 또는 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)와 같은 인자들로 처리에 따라 조혈 골수 세포로부터 생성되는 미성숙 수지상 세포로의 분화를 억제하고 lipopolysaccharide(LPS)로부터 유도되는 성숙 수지상 세포의 분화를 억제한다. 상기 분화 억제는 세포간 접촉 조건 비접촉 조건 모두에서 억제 가능하다. 중간엽줄기세포에 대한 수지상 세포 처리 비는 1:1부터 1:100까지, 바람직하게는 1: 5 내지 1:100의 비로 처리가능하다.

[0025] 본 발명은 또한 편도 유래 중간엽 줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 분화 억제용 조성물을 조혈 골수 세포에 처리하는 단계를 포함하는 수지상 세포 분화 억제 방법을 제공한다. 본원 발명의 경우, 상기 조성물을 이용하여 조혈 골수 세포, 바람직하게 단핵구로부터 수지상 세포의 분화를 억제하며, 분화 억제 방법이 시험관 내에서 진행될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 면역 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 수지상 세포의 분화 및 성숙을 억제하고, 수지상 세포가 분비하는 면역 반응 유발 사이토카인 분비를 억제하며, 수지상 세포 매개 T-림프구의 기능을 약화시켜 면역 반응을 조절함으로써 면역 질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 공동 배양 조건 하에서 편도 유래 중간엽 줄기세포가 수지상 세포의 분화 및 성숙을 억제하는 것을 확인하기 위한 실험 모식도이다.

도 2는 공동 배양 조건 하에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리에 따른 CD11b+ 수지상 세포 감소 및 수지상 세포에서 CD80, CD86, Class II MHC 및 CD14 발현 변화를 보여주는 도이다.

도 3은 분리 배양 조건 하에서 편도 유래 중간엽 줄기세포가 수지상 세포의 분화 및 성숙을 억제하는 것을 확인하기 위한 실험 모식도이다.

도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 가용성 인자 분비에 의한 수지상 세포의 분화 및 성숙 억제 효과를 보여주는 도이다.

도 5는 편도 유래 중간엽 줄기세포가 수지상 세포 매개 T 세포 분화 및 증식을 억제하는 것을 확인하기 위한 실험 모식도이다.

도 6은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 첨가에 의한 수지상 세포 매개 T 세포 분화 및 증식의 억제 및, Th1, Th2 및 Th17 세포로 분화 감소를 보여주는 도이다.

도 7은 편도 유래 중간엽 줄기세포가 성숙한 수지상 세포로부터 사이토카인의 분비를 억제하는 것을 확인하기 위한 실험 모식도이다.

도 8은 사이토카인 분석법을 통한 사이토카인 발현 변화를 확인한 도이다.

도 9는 편도 유래 중간엽 줄기세포와 성숙한 수지상 세포 및 T 세포를 공동 배양할 때 GM-CSF, RANTES, interleukin 6 (IL-6) 및 monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)의 발현이 감소됨을 보여주는 도이다.

도 10은 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리 비율에 따른 CD11b+ 수지상 세포 감소 및 수지상 세포에서 CD80, CD86, Class II MHC 및 CD14 발현 변화를 보여주는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0029] <실시예 1> 골수 유래 수지상 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제조
- [0030] 골수 유래 수지상 세포의 제조를 위하여 8주령 암컷 Balb/c 마우스(OrientBio, Korea)가 사용되었으며, 모든 절차 및 프로토콜은 이화여자대학교 의학 동물 윤리위원회(ESM 11-0222)의 승인 하에 진행되었다. 마우스는 21 ~ 23 °C 및 51 ~ 54 % 습도 및 12시간 주/야 주기 하에 음식과 물을 자유식으로 하여 키워졌다.
- [0031] 마우스는 희생되었고, 골수가 대퇴골 및 경골로부터 수득되었다. 대퇴부 및 경골은 5 ml RPMI 1640으로 씻어졌고, 적혈구는 ACK 버퍼(10x, 1.5 M NH₄Cl, 100 mM KHCO₃, 10 mM disodium EDTA)를 사용하여 용해하였다. 세포 펠렛은 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI1640로 6 well 플레이트에서 2×10^6 cell로 배양되었다. 수지상 세포는 매 3일 동안 recombinant mouse GM-CSF (rmGM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (20 ng/ml) 및 10일간 lipopolysaccharide (LPS) (1 µl/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA)의 첨가에 의해 분화가 유도되었다. 또다른 48시간 후, 세포 및 배지는 다른 실험을 위해 수거되었다.
- [0032] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC) 는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 (4 passage)는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI1640 하에 24시간 동안 5×10^5 cell/well로 6 well에서 선 배양되었다.
- [0033] <실시예 2> 공동 배양 조건 하에 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골수 세포로부터 CD11⁺ 수지상 세포의 분화 억제 효과 확인
- [0034] 상기 실시예 1에서 마우스의 골수 세포(BMC)는 미성숙 수지상 세포(2×10^6 cell/well)로부터 분화를 유도하기 위하여 10일 동안 rmGM-CSF (20 ng/ml)로 배양되었고, 수지상 세포 성숙을 유도하기 위해 48시간 동안 LPS가 첨가되었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 (4×10^5 cell/well)는 골수 세포 배양의 0일 또는 10일에 세포-세포 접촉을 제공하기 위해 배양 배지에 첨가되었다. 실험 과정은 도 1에 기재하였다.
- [0035] 표현형을 확인하기 위하여 유세포 분석이 수행되었다.
- [0036] 세포는 2 µg/ml의 하기 Fluorochrome-conjugated 항체로 배양되었다: FITC-anti-mouse CD11b (M1/70, Rat IgG_{2b}, eBiosciences, San Diego, CA), PE-anti-mouse CD11c (HL3, Hamster IgG₁, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), APC-anti-mouse CD11c (N418, Hamster IgG, BioLegend, San Diego, CA), PerCP-anti-mouse CD80 (16-1 OA1, Hamster IgG₂, BD Biosciences), PE-anti-mouse CD86 (GL1, Rat IgG_{2a}, BD Biosciences), PE-anti-mouse CD14 (rmC5-3, Rat IgG₁, BD Biosciences), PE-anti-mouse class II major histocompatibility complex (MHC) (2G9, Rat IgG_{2a}, BD Biosciences), PE-anti-mouse CCR7 (4B12, Rat IgG_{2a}, R&D Systems). 대조군은 염색되지 않은 세포가 사용되었다. 세포는 상온 상태에서 5분간 300xg로 원심분리되고, 워싱되고 PBS하의 1 % 파라포름알데하이드로 고정되었다.
- [0037] intracellular 염색을 위하여, 얼음에서 20분간 세포는 PBS하의 4 % 파라포름알데하이드로 고정되었고, PBS하에 0.5 % FBS가 첨가된 20% permeabilization buffer(0.5% saponin, 1% bovine serum albumin [BSA] in PBS)로 워싱되었다. 세포는 얼음 하에 30분간 하기 Fluorochrome-conjugated 항체로 배양되었다: FITC-anti-mouse CD4 (RM4.5, Rat IgG_{2a}, BD Biosciences), APC-anti-mouse interferon gamma (IFN-γ) (XMGI.2, Rat IgG₁,

BioLegend), PE-anti-mouse interleukin 4 (IL-4) (11B11, Rat IgG₁, BD Biosciences) 및 PE-anti-mouse interleukin 17A (IL-17A) (TC11-18H10.1, Rat IgG₁, BioLegend). 염색 후에 세포는 PBS 하의 0.5 % FBS로 워싱되고 Cell Quest software(BD Biosciences)를 가지는 유동세포 분석기로 분석되었다.

[0038] 상기 결과를 도 2에 나타내었다.

[0039] 도 2의 A에서 확인되는 바와 같이, CD11b⁺ 골수 세포의 비율은 GM-CSF (20 ng/ml)가 첨가된 경우 $38.9 \pm 4.8\%$ 에서 $90.7 \pm 1.9\%$ 로 상당히 증가하였다.

[0040] 그러나, 0일차에 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)의 첨가는 CD11b⁺ 세포의 증식($55.1 \pm 8.3\%$)을 억제하였고, 이는 LPS의 첨가시에도 마찬가지로의 결과를 보였다 ($57.7 \pm 8.9\%$). 즉, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 세포-세포 접촉 조건 하에 GM-CSF에 의한 골수 유래 수지상 세포의 분화 및 LPS 자극에 따른 수지상 세포의 성숙을 억제하는 것을 확인하였다.

[0041] CD80, CD86, Class II MHC 및 CD14의 발현 변화를 확인한 결과를 도 2의 B에 나타내었다. LPS 자극은 수지상 세포에서 공동 자극 인자인 CD80 ($56.8 \pm 5.2\%$), CD86 ($69.7 \pm 3.4\%$) 및 class II MHC ($64.5 \pm 17.31\%$)의 발현을 증가시켰다. CD14⁺ 세포의 경우에는 그 비율이 변화되지 않았는데, 이는 LPS에 의해 수지상세포가 자극되지 않았음을 보여주는 결과이다.

[0042] 반면, 0 일차부터 편도 유래 중간엽 줄기세포를 첨가하면 LPS에 의하여 성숙이 유도된 CD80 및 CD86의 발현 상승을 억제하면서, class II MHC의 발현 역시 유의하게 감소하였다. 즉, 편도유래 중간엽 줄기세포가 수지상세포의 분화 억제에 중추적인 작용을 한다는 것을 보여준다.

[0043] 즉, 세포 접촉 조건 하에 공동 발현 인자 및 class II MHC의 발현 억제로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포가 골수 유래 수지상 세포의 성숙을 억제하는 것을 확인하였다.

[0044] <실시예 3> 분리 배양 조건 하에 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골수 세포로부터 CD11⁺ 수지상 세포의 분화 억제 효과 확인

[0045] 분리되어 배양되는 조건 하에서 가용성 인자 등에 의해서도 편도 유래 중간엽 줄기세포가 골수 세포로부터 수지상 세포의 분화를 억제할 수 있는지 확인하였다.

[0046] 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 유래 수지상 세포간의 접촉을 방지하기 위하여, 0.4 um pore 사이즈 폴리카보네이트 멤브레인을 가진 transwell 플레이트(Corning, Acton, MA)를 사용하였다. 골수 유래 수지상 세포와 편도 유래 중간엽 줄기세포는 각각 5:1의 비율로 챔버의 위쪽과 아래쪽에 위치하였으며, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI1640 하에 배양되었다. LPS(1 µl/ml)가 골수 유래 수지상 세포의 성숙을 유도하기 위하여 10일 동안 위쪽 챔버에 첨가되었다. 실험 조건은 도 3에 나타내었다.

[0047] 유세포 분석은 상기 실시예 2와 동일하게 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포가 GM-CSF에 의해 유도된 골수 유래 수지상세포에서 CD11b⁺ 세포의 증식을 억제하는 것을 확인하였으며, 세포 접촉 조건과 유사하게 GM-CSF 및 LPS 자극에 따른 수지상 세포 분화 및 성숙을 억제하는 것을 확인하였다.

[0048] <실시예 4> 편도 유래 중간엽 줄기세포에 의한 CD4⁺ T 세포 분화 및 수지상 세포 매개 T 세포 분화 억제 효과 확인

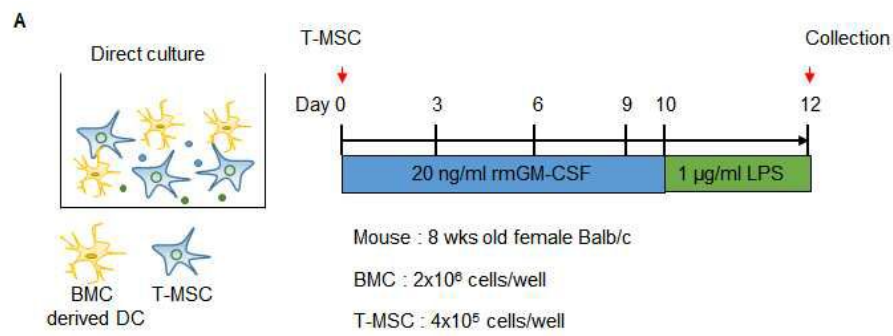
[0049] T 세포 증식에서 골수 유래 수지상 세포와 공동 배양된 편도 유래 중간엽 줄기세포의 효과를 확인하기 위하여, 마우스의 비장으로부터 T 세포를 분리하고 세포 분열 측정을 위하여 CFSE로 세포들을 라벨링하였다.

[0050] T 세포를 분리를 위하여 비장은 8주령 암컷 Balb/c 마우스로부터 수득되었으며, 5 ml RPMI1640 배지하에서 분쇄되었다. 세포 현탁액은 600 µl MACS sorting buffer(PBS 하 0.5% BSA, 2 mM EDTA, pH 7.2)세척 및 재현탁되었고, 이어서 항-CD4 또는 항 CD3 마이크로비드 용액(10^7 세포당 10 µl)이 첨가되었다. 세포는 15분 동안 얼음에서 처리되었고, 1 ml sorting buffer로 세척 및 재현탁되었다. 세포는 MACS 자성 컬럼(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분리되었다. 분리된 세포는 PE-결합 항-마우스 CD4 항체(GK 1.5, Rat IgG_{2b}, BioLegend)로 염색되었고 세포 집단의 순도를 결정하기 위해 유세포 분석기로 분석되었다.

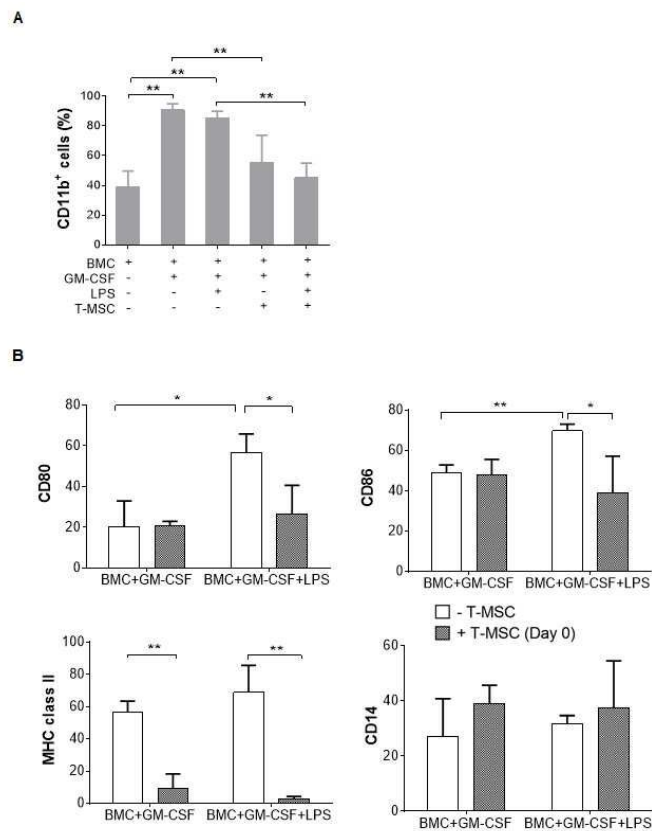
- [0051] 증식을 측정하기 위하여, 2×10^8 cell은 5 μ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 상온에서 5분간 염색되고, 1 ml FBS가 첨가되어 반응이 중단되었다. 세포는 10% FBS를 포함하는 RPMI1640으로 3회 세척되고 6 well 배양 플레이트(2×10^6 cell/well)로 옮겨졌다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 골수 유래 수지상 세포가 첨가되고 48시간 동안 배양되었다. T 세포 자극을 위해, 5 ug/ml의 LEAFTM purified anti-mouse CD3 (17A2, Rat IgG_{2b}, BioLegend) 및 LEAFTM purified anti-mouse CD28 (37.51, Syrian Hamster IgG, BioLegend) 각각은 10 % FBS 및 항생제를 포함하는 RPMI 1640하에 희석되고 세포에 첨가되었다. 세포 수는 편도 유래 중간엽 줄기세포에 대하여 4×10^5 cell/well, 골수 유래 수지상 세포에 대하여 2×10^6 cell/well 및 T 세포에 대하여 2×10^6 cell/well이었다. 48시간 후, 세포는 유동세포 계측을 위해 수거되었고 상층액은 Cytokine 검정을 위해 수거되었다. 상기 실험 방법은 도 5에 나타내었다.
- [0052] 상기 분석결과는 도 6에 나타내었다.
- [0053] 도 6의 A는 유세포 분석 결과를 보여준다. CFSE 강도의 감소로 나타내어지는 T 세포 증식은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양액에 첨가한 후 22.99 %에서 5.3 %로 감소되었다. 즉, 22.99 % CD4⁺ T 세포는 골수 유래 수지상 세포와 배양되고 항-CD3/항-CD28로 자극된 반면, 0일차에 편도 유래 중간엽 줄기세포와 공동 배양에서 세포 분열은 5.3%로 감소되었다.
- [0054] 또한, 골수 유래 수지상 세포와 CD4⁺ T 세포의 분화 능력을 평가하기 위하여, 마우스의 비장으로부터 CD4⁺ T 세포가 분리되었고 골수 유래 수지상 세포로 공동배양되었고 항-CD3/항-CD28로 편도 유래 중간엽 줄기세포의 존재 또는 부존재 하에 자극되어 실험된 결과를 도 6의 B에 나타내었다.
- [0055] 유동 세포 계측을 통해 분석한 결과, CD4⁺ INF- γ ⁺ (T_H1 cell), CD4⁺ IL-4⁺ (T_H2 cell), 및 CD4⁺ IL17A⁺ (T_H17) 세포의 퍼센트는 골수 유래 수지상 세포와 공동 배양 및 항-CD3/항-CD28 항체 자극 후 증가되었다. 그러나, 골수 유래 수지상 세포로 선처리된 편도 유래 중간엽 줄기세포로 공동 배양시, 분화된 T 세포의 비율은 감소하였다.
- [0056] 상기 결과로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포에 의한 CD4⁺ T 세포 분화 및 수지상 세포 매개 T 세포 분화 억제 효과가 확인되었다.
- [0057] <실시예 5> 편도 유래 중간엽 줄기세포에 의한 성숙된 수지상 세포로부터 사이토카인 분비 조절 효과 확인
- [0058] 상기 실험에서 수거된 배양 배지 및 인간 Cytokine array C1 kit(RayBiotech, Norcross, GA, USA)는 상온에서 유지되고, 검정은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행되었다. 현상된 멤브레인은 chemiluminescence imaging system (LAS-3000, Fujifilm, Japan)을 이용하여 분석되었다. 실험 방법은 도 7에 나타낸 바와 같다.
- [0059] T 세포 자극에 대한 골수 유래 수지상 세포 시크리토(secretome) 분석 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0060] GM-CSF, growth-regulated oncogene α (GRO- α , CXCL1), RANTES (CCL5), interleukin 8 (IL-8, CXCL8), IL-6, MCP-1 (CCL2), monocyte chemoattractant protein 2 (MCP-2, CCL8), 및 monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3, CCL7)가 T 세포 자극에 의해 증가되었다.
- [0061] 상기 사이토카인의 변화를 정량화한 결과를 도 9에 나타내었다. 사이토카인들 중 GM-CSF, IL-6, RANTES 및 MCP-1은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 첨가에 의해 상당히 감소하였다. 즉, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 T 세포 자극에 의해 유도되는 수지상세포에 의한 면역 매개 사이토카인의 분비억제 효과를 확인하였다.
- [0062] <실시예 6> 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리 비율에 따른 CD11b⁺ 수지상 세포 감소 확인
- [0063] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포에 대한 수지상 세포 처리 비율 1:1부터 1:100까지 변화시키며 CD11b⁺ 수지상 세포 및 CD80, CD86, Class II MHC 및 CD14의 발현 변화를 확인하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0064] 도 10에 나타낸 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 처리 결과 1:1부터 1:100까지 비율 모두에서 현저한 수지상 세포 감소를 보였으며, 특히 1: 5 내지 1: 100 사이의 비율에서 그 효과가 가장 뛰어났다.

도면

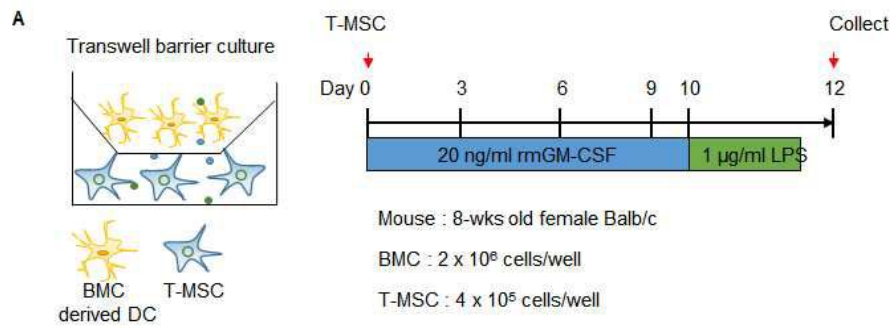
도면1



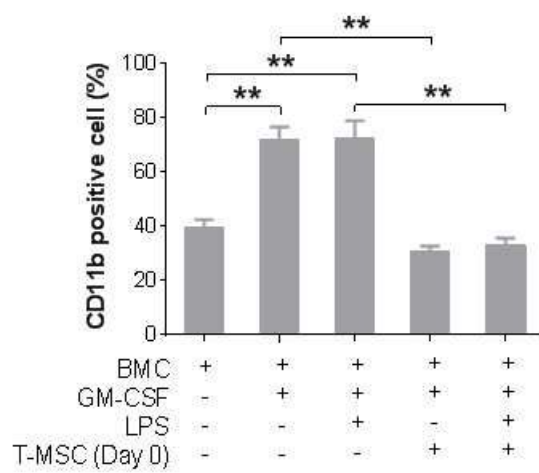
도면2



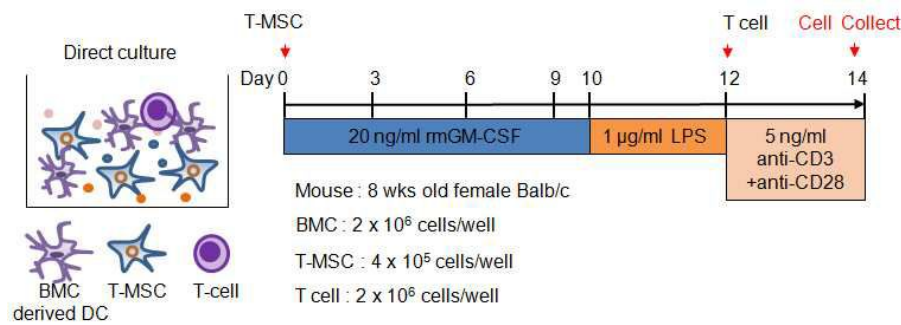
도면3



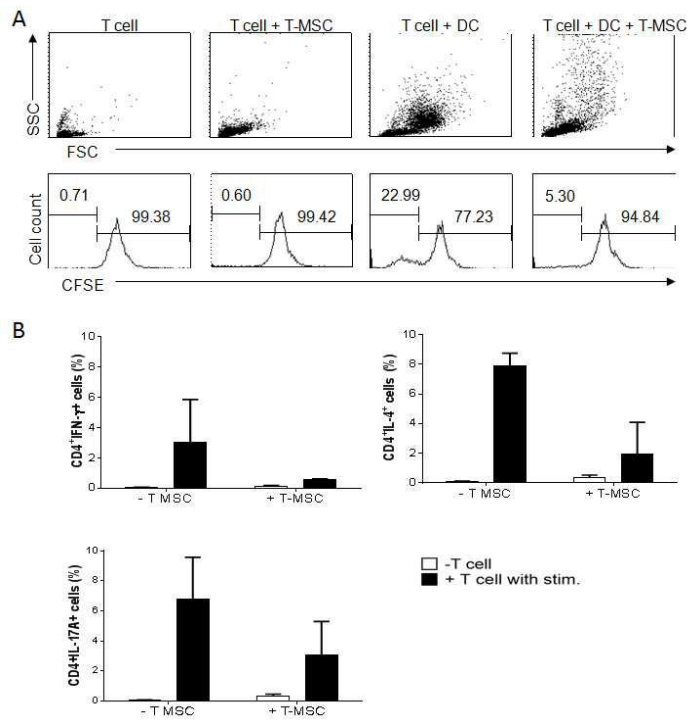
도면4



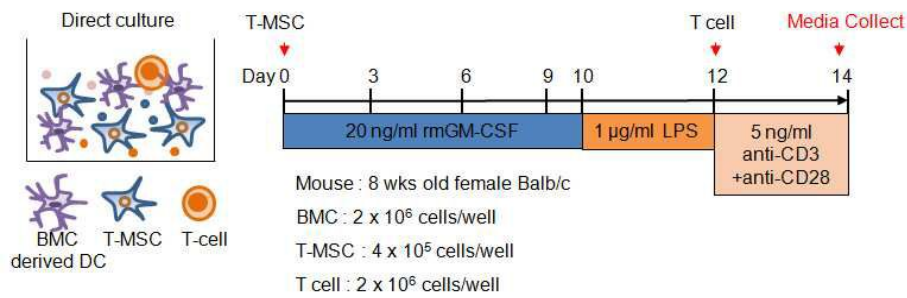
도면5



도면6

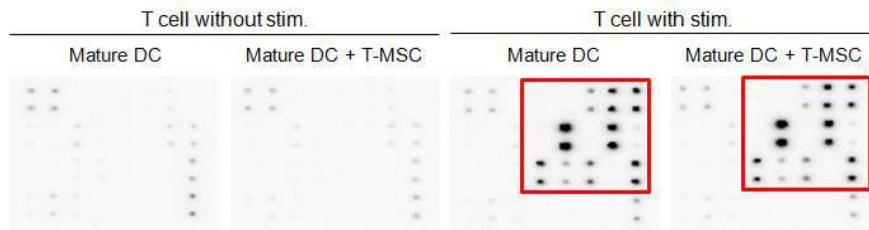


도면7

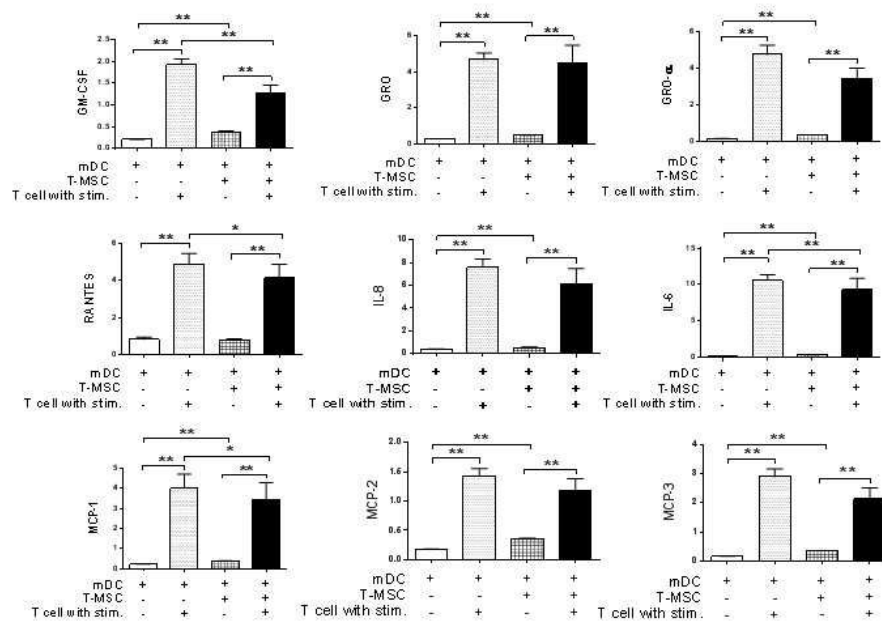


도면8

POS	POS	NEG	NEG	G-CSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
POS	POS	NEG	NEG	G-CSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
IL-1 α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-1 α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS



도면9



도면10

