

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2011년 10월 13일 (13.10.2011)

PCT

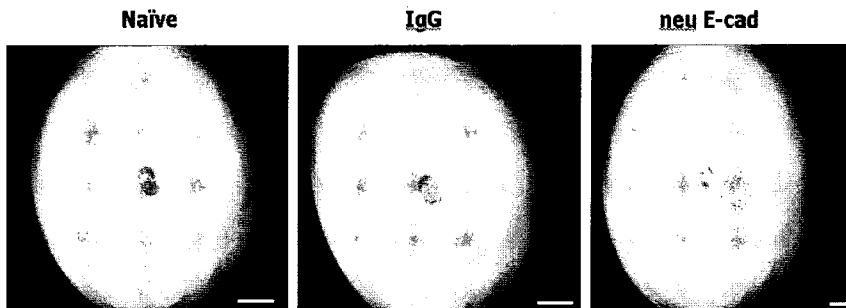
(10) 국제공개번호  
WO 2011/126264 A2

- (51) 국제특허분류:  
*C12N 5/0775* (2010.01) *A61P 9/00* (2006.01)  
*C12N 5/02* (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)  
*A61K 35/12* (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002358  
(22) 국제출원일: 2011년 4월 5일 (05.04.2011)  
(25) 출원언어: 한국어  
(26) 공개언어: 한국어  
(30) 우선권정보:  
10-2010-0031061 2010년 4월 5일 (05.04.2010) KR  
10-2010-0053183 2010년 6월 7일 (07.06.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL)** [KR/KR]; 서울시 종로구 연건동 28, 110-744 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸  
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김효수 (KIM, Hyo-Soo)** [KR/KR]; 서울시 서초구 반포동 반포자이 아파트 114 동 1901 호, 137-040 Seoul (KR). **강현재 (KANG, Hyun-Jae)** [KR/KR]; 서울시 종로구 사직동 풍림스페이스본 105 동 1010 호, 110-054 Seoul (KR). **이은주 (LEE, Eun-Ju)** [KR/KR]; 서울시 성북구 정릉 2 동 중앙하이츠 2 단지 202 동 1305 호, 136-779 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **제일광장특허법인 (FIRSTLAW LEE & KO)**; 서울시 서초구 양재동 275-7 트러스트타워, 137-739 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:  
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR INCREASING ACTIVITY IN HUMAN STEM CELL

(54) 발명의 명칭 : 인간 줄기세포의 활성을 증가시키는 방법

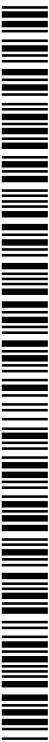
도 13



Scale bar = 400µm

(57) Abstract: Provided are a method for preparing a highly active human mesenchymal stem cell, which includes forming a spherical cell aggregate by cultivating human mesenchymal stem cells against gravity; a highly active stem cell aggregate prepared thereby; a cell therapeutic including the stem cell aggregate; and a method for forming a spherical cell aggregate by cultivating human mesenchymal stem cells, wherein the amount of E-cadherin in the mesenchymal stem cell is increased during the cultivation.

(57) 요약서: 인간 중간엽 줄기세포를 중력에 반하게 배양하여 구형세포괴를 형성하는 것을 포함하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포괴의 제조 방법; 상기 방법에 의해 제조된 고효성 줄기세포괴; 상기 줄기세포괴를 포함하는 세포치료제; 및 인간 중간엽 줄기세포를 배양하여 구형세포괴를 형성하는 것을 포함하며, 상기 배양시 중간엽 줄기세포 내의 E-cadherin 의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포괴의 제조 방법이 제공된다.



WO 2011/126264 A2

### 인간 줄기세포의 활성을 증가시키는 방법

#### 발명의 분야

5           본 발명은 고효성 인간 중간엽 줄기세포의 제조 방법, 상기 방법에 의해 유도된 고효성 줄기세포, 및 상기 줄기세포를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다.

#### 배경기술

10

          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. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 분화가 완료되어 세포분열이 정지된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

          줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포로서 배아줄기세포 (embryonic stem cells, ES cells) 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPS) 등이 이에 해당된다. 다분화능 및/또는 단분화능 줄기세포로는 성체줄기세포를 예로 들 수 있다.

          배아줄기세포는 배아발생초기인 포배기(blastocyte)의 세포내피(inner cell mass)로부터 형성되며, 모든 세포로 분화가능한 잠재력을 가지고 있어 어떠한 조직 세포로도 분화될 수 있으며, 또한 사멸하지 않고 미분화상태에서 배양가능하며, 성체줄기세포와 달리 배세포(germ cell)의 제조도 가능하므로 다음 세대로 유전될 수 있는 특징을 가지고

있다(Thomson et al., *Science*, 282: 1145-1147 (1998); Reubinoff et al., *Nat. Biotechnol.*, 18: 399-404 (2000)).

인간 배아줄기세포는 인간 배아 형성시 세포내피 만을 분리하여 배양함으로써 제조되는데, 현재 전 세계적으로 만들어진 인간 배아줄기세포는 불임시술 뒤 남은 냉동배아로부터 얻어진 것이다. 모든 세포로 분화될 수 있는 전분화능을 가진 인간 배아줄기세포를 세포치료제로 이용하기 위한 다양한 시도가 이루어져 왔지만 아직 암발생의 위험 및 면역거부반응과 같은 문제점들을 완전히 해결하지 못하고 있는 실정이다.

이에 대한 보완책으로 최근 보고되고 있는 것으로 유도만능줄기세포(iPS)가 있다. iPS는 분화가 끝난 성체세포를 여러 가지 방법으로 역분화시켜, 분화 초기 단계인 배아줄기세포 상태로 회귀시킨 세포이다. 현재까지 iPS는 유전자 발현과 분화능에서 만능줄기세포인 배아줄기세포와 거의 동일한 성격을 나타내는 것으로 보고 되어 있다. 이러한 iPS의 경우, 자가 세포를 이용하여 면역거부반응의 위험성은 배제할 수 있으나 암발생의 위험성은 여전히 해결해야 할 과제로 남아있다.

최근 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 면역조절기능과 함께 암발생의 위험성이 없는 중간엽 줄기세포가 제시되고 있다. 중간엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포, 간세포, 췌도베타세포, 혈관세포 등으로의 분화가 가능한 다능성을 가진 세포로 면역 반응을 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

중간엽 줄기세포는 골수, 체대혈, 지방조직 등 다양한 조직에서 분리, 배양이 가능하나 각 기원에 따른 세포 표면 표지자가 조금씩 다르기 때문에 중간엽 줄기세포를 명확히 정의하는 것은 용이하지 않다. 다만 골세포, 연골세포, 근육세포로 분화가 가능하며, 소용돌이 모양의 형태를 가지고, 기본적인 세포표면 표지자인 CD73(+), CD105(+), CD34(-) 및 CD45(-)를 발현하는 경우 일반적으로 중간엽 줄기세포로 규정하고 있다. 이와 관련하여, 상이한 유전적 기원 및/또는 배경을 가지는 중간엽 줄기세포들의 경우, 위에서 언급한 기존의 중간엽 줄기세포를 규정하는 기준들에 대하여는 서로 유의적 차이를 나타내지 아니하지만 통상적으로 각각의 생체내 활성화에 있어서는 유의적 차이를 나타내게 된다. 또한 중간엽 줄기세포를 타가 유래

세포치료제로 사용하는 경우, 사용가능한 후보군 (pool)이 한정적이므로 중간엽 줄기세포의 생체내 활성도가 낮아도 선택의 여지가 없어 대체가 불가능한 경우가 발생한다.

이에 더하여, 일반적으로 중간엽 줄기세포가 세포치료제로 이용되기  
 5 위해서는 재생의학 및/또는 세포치료 분야에서 요구되는 최소 세포수 (약  $1 \times 10^9$  정도)를 만족시켜야 하는데, 적정조건을 잡고 기준을 정하는 실험까지 고려한다면 필요한 세포수는 더욱 늘어나게 된다. 따라서 기존의 다양한 기원의 중간엽 줄기세포로부터 이 정도의 양을 공급하려면 생체의 (*in vitro*) 실험에서 최소 10 번 이상의 계대배양이 필요하게 되는데 이 경우 세포가  
 10 노화되고 변형되어 세포치료제로 더 이상 적합하지 않게 되는 문제가 발생한다.

따라서, 세포치료제의 가장 바람직한 재료로 기대되고 있는 중간엽 줄기세포가 세포치료의 목적으로 효율적으로 사용될 수 있도록, 중간엽 줄기세포의 고효성을 유도함으로써 적은 수의 줄기세포로도 치료효율을  
 15 극대화시킬 수 있는 방안을 개발하는 것이 필요하다.

### 발명의 요약

본 발명의 목적은 노화되거나 상대적으로 생체내 활성도가 낮은  
 20 중간엽 줄기세포로부터 고효성의 줄기세포괴를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 생성된 고효성 중간엽 줄기세포괴(stem cell aggregate) 및 이를 포함하는 세포치료제를 제공하는  
 25 것이다.

상기 목적에 따라, 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포를 중력에 반하게 배양하여 구형세포괴를 형성하는 것을 포함하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포괴의 제조 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 고효성 중간엽 줄기세포괴  
 30 및 상기 줄기세포괴를 포함하는 세포치료제를 제공한다.

또한 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포를 배양하여 구형세포괴를 형성하는 것을 포함하며, 상기 배양시 중간엽 줄기세포 내의 E-cadherin 의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포괴의 제조 방법을 제공한다.

5

도면의 간단한 설명

본 발명의 상기 및 다른 목적과 특징들은 첨부된 도면과 함께 하기 본 발명의 설명으로부터 명확해질 것이다:

10

도 1 은 인간 배아줄기세포 배양배지에서 bFGF 를 제거한 배지를 이용하여 인간 중간엽 줄기세포를 배양한 결과 부유상태가 유도된 것을 나타내는 것이다.

도 2 는 인간 중간엽 줄기세포를 저부착 디쉬(dish)에서 부유배양하여 15 구체형성을 유도한 결과를 나타낸 것이다.

도 3 은 배양 디쉬(dish) 뚜껑에서 중력에 반하게 중간엽 줄기세포를 부유배양하여 구체형성을 유도한 결과를 나타낸 것이다.

도 4 는 좌심실 확장기내경(Left ventricular end-diastolic dimension (LVE DD)) 및 좌심실 수축기내경(Left ventricular end-systolic 20 dimension(LVESD))을 수치화 하여 허혈성 심장 질환의 호전여부를 나타낸 것이다.

도 5 는 좌심실 구혈률(Left ventricular end-Ejection Fraction(LVEF)) 및 좌심실 분획단축(Left ventricular end-Fractional Shortening(LVFS))을 수치화 하여 허혈성 심장 질환의 호전여부를 25 나타낸 것이다.

도 6 은 심장벽의 두께(infarcted wall thickness) 및 섬유화 면적 (infarct area)을 각각 수치화하여 허혈성 심장 질환의 호전여부를 나타낸 것이다.

도 7 은 구형세포괴 형성을 유도하지 않은 중간엽 줄기세포를 주입한 그룹( naive)에 비하여 구형세포괴를 주입한 그룹( spheroid)의 경우, 허혈성 심장 부근에 남아 있는 세포가 현저히 많음을 보여주는 그림이다.

도 8 은 구형세포괴 주입군에서 sacomeric actinin(도 8a) 및  
5 connexin 43(도 8b)의 발현을 확인한 그림이다.

도 9 는 혈관형성에 대한 효과를 살펴보기 위하여 혈관특이적 표지자인 isolectin B4 의 발현여부를 확인하고 그 결과를 정량화하여 나타낸 것이다.

도 10 은 주입한 중간엽 줄기세포의 혈관세포로의 분화 여부를  
10 살펴보기 위하여 Isolectin B4 의 발현을 확인한 결과이다.

도 11 은 EDTA 첨가시 구체가 형성되지 않음을 나타내는 결과이다.

도 12 는  $Ca^{+2}$  의존성 세포부착인자인 N-cadherin 및 E-cadherin 의  
구체형성과정에서의 변화를 western blot 을 이용하여 살펴본 결과이다.

도 13 은 E-cadherin 의 기능을 억제시킨 경우 중간엽 줄기세포의  
15 구체형성에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 14 는 E-cadherin 을 과발현시키는 adenoviral vector (E-  
cadherin adenoviral vector)를 이용하여 구체형성에 미치는 효과를 살펴본  
결과이다.

도 15 는 구체형성에 따른 ERK(extracellular signal-regulated  
20 kinase) 및 AKT(V-akt murine thymoma viral oncogene homolog)의  
활성도 변화를 나타낸 것이다.

도 16 은 ERK 및 AKT 의 활성도에 미치는 E-cadherin 의 효과를  
나타낸 것이다.

도 17 은 E-cadherin 을 과발현시키는 adenoviral vector (E-  
25 cadherin adenoviral vector)를 이용하여 ERK 및 AKT 의 활성도 변화를  
살펴본 결과를 나타낸 것이다.

도 18 은 E-cadherin 이 중간엽 줄기세포의 세포생장에 미치는  
효과를 나타낸 것이다.

도 19 는 E-cadherin 이 중간엽 줄기세포의 세포 사멸에 미치는  
30 효과를 나타낸 것이다.

도 20 은 E-cadherin 이 중간엽 줄기세포의 VEGF (Vascular endothelial growth factor, 혈관내피세포 성장인자) 분비능에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 21 은 기원이 다른 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(UCB-MSC) 2 종을 사용하여 체외에서 면역유발정도를 평가하는 MLR(mixed lymphocyte reaction)을 실시한 결과를 나타낸 것이다.

도 22 는 도 21 의 각 MLR 배양액에서 PGE<sub>2</sub> 분비 수준을 ELISA 방법으로 분석한 결과이다.

도 23 은 면역세포의 표지자인 F4/80 를 사용하여 구체형성이 면역기능에 미치는 영향을 살펴본 결과이다.

도 24A 는 중간엽 줄기세포의 구체(spheroid) 형성으로 인한 연골 세포의 사멸 억제 효과를 확인하기 위한 생존/사멸 염색 결과이고, 도 24B 는 이로부터 생존률을 그래프로 나타낸 것이다.

도 25 는 중간엽 줄기세포의 구체(spheroid) 형성으로 인한 연골 재생 효과를 확인하기 위해 토끼 연골 결손 모델에서 10 주 후 연골 손상 부위의 육안 분석과 조직 염색 분석을 실시한 결과이다.

도 26 은 폐세포 분화 유도시 분화 활성 인자의 발현 변화를 hanging drop 방법과 bioreactor 방법으로 만든 구체(spheroid)에서 비교한 것이다.

## 20 발명의 상세한 설명

본 발명은 고효성 인간 중간엽 줄기세포의 제조 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포를 중력에 반하게 배양하여 구형세포괴를 형성시키는 것을 포함하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포의 제조 방법을 제공한다.

본원에서 “줄기세포괴”, “응집체” 또는 “구체” 는 줄기세포를 배양하여 형성된 줄기세포들의 구형 집합체를 의미하며, 상호교환적으로 사용된다.

본 발명에서 사용되는 인간 중간엽 줄기세포는 그 유전적 배경 및/또는 기원에 있어서 제한이 없다. 예를 들면, 인간 제대혈 유래 중간엽

줄기세포, 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 등 중간엽 줄기세포를 사용할 수 있으며, 체대혈 유래 중간엽 줄기세포가 바람직하다.

본 발명에서, 상기 구형세포피의 형성을 위한 배양은 중력에 반하게 놓인 배지 방울에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것일 수 있다. 이때, 배지  
5 방울당 300 내지 30,000 개의 세포, 바람직하게는 1,000 내지 30,000 개의 세포가 포함되게 하여 이로부터 구형세포피를 형성시키는 것이 치료 활성이 높은 구형 세포피를 얻는 데 유리하다.

상기와 같은 중력에 반하여 줄기세포를 배양하는 방법에 의하면  
10 균일한 크기의 줄기세포피를 다수 얻을 수 있으므로, 이들을 이용함으로써 치료적 유효성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

본 발명의 방법에서, 배양 배지로는 SR(serum replacement)을 포함하는 혈청배제배지를 사용할 수 있다. SR 로서는 상업적으로 입수가 가능한 어느 것도 사용가능하고, 배지 중 SR 의 농도는 필요에 따라 조절가능하며, 20%(v/v)가 바람직하다.

15 상기 혈청배제배지는 혈청 및 bFGF(basic fibroblast growth factor)를 포함하지 않은 인간 배아줄기세포 배양배지일 수 있다.

본 발명은 또한, 인간 중간엽 줄기세포를 배양하여 구형세포피를 형성시키는 것을 포함하며, 상기 배양시 중간엽 줄기세포 내의 E-  
20 cadherin 의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포피의 제조 방법을 제공한다.

상기 줄기세포내의 E-cadherin 의 양의 증가는 중간엽 줄기세포에 E-cadherin 을 발현하는 벡터를 도입함으로써 이루어질 수 있다. 상기 발현 벡터는, 예를 들어, E-cadherin 유전자가 포함된 아데노바이러스 벡터일 수  
25 있다.

또한, 이 방법에서 구형세포피를 형성시키기 위한 중간엽 줄기세포의 배양은 상기한 바와 같은 배지를 이용하여 중력에 반하게 배양하거나, 저부착 배양 디쉬(dish)에서 부유 배양함으로써 수행될 수 있다. 부유 배양한 경우, 생성된 구형세포피와 구형세포피에 포함되지 않은 세포를  
30 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 분리단계에서는 크기에 의해

세포피와 단일 세포를 분리할 수 있는 임의의 도구를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 스트레이너(strainer)를 이용한다.

또 다른 방법으로, 상기 구형세포피는 중간엽 줄기세포를 상기한 바와 같은 배지에서 3 차원 생물반응장치(bioreactor, 또는 spinner)를 이용하여 배양하거나, 일반 부착성 용기에서 교반하면서 배양함으로써 세포들이 바닥에 부착할 기회를 감소시키거나, 단일 세포들에 스트레스, 예를 들면 저산소상태(hypoxia) 또는 실온 이하의 저온 등과 같은 조건을 가하면서 배양함으로써 형성시킬 수 있으며; AggreWell™ 이라고 하는 제품과 같이 바닥에 미세한 웰 구조를 가지고 있는 플레이트에 일정 수의 줄기세포를 안치시키거나, 단일 세포들을 세포 부착이 어려운 비-부착성 용기 또는 줄기세포치료제 투여 기구에 담아둠으로써도 자연스럽게 구형세포피를 형성시킬 수도 있다.

또한 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 생성된 고효성의 인간 중간엽 줄기세포피를 제공한다.

본 발명의 줄기세포피는 생체 내 투여시 조직 재생 및 질환 치료 효과가 우수하며, 생체 내에서 높은 생존율을 나타내고, 조직세포로의 분화효율이 높은 장점을 가진다.

또한 본 발명은 상기 고효성 인간 중간엽 줄기세포피를 포함하는 세포치료제를 제공한다.

본 발명의 세포치료제는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포, 간세포, 췌도베타세포, 혈관세포 또는 폐세포의 형성에 이용될 수 있다.

또한, 본 발명의 세포치료제는 폐질환 치료; 폐질환에 의한 염증 억제 또는 치료; 폐조직 재생; 및 폐조직 섬유증 억제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 유용한 것을 특징으로 하며, 폐질환에 의한 염증반응 및 섬유증(fibrosis)을 억제하거나 호전시킬 수 있다.

본 발명의 세포치료제는 심혈관 질환의 치료 또는 연골 재생용으로 사용될 수 있다.

아울러, 본 발명의 세포치료제는 면역조절 기능을 증가시키거나, 면역유발성, 면역세포침투 또는 면역원성 중 하나를 저하시킬 수 있으며, 염증반응을 억제시킬 수 있다.

5 또한, 본 발명은 생물반응장치(Bioreactor)를 이용하여 고효성 인간 중간엽 줄기세포를 대량생산하는 방법을 제공한다.

생물반응장치는 생물학적으로 활성인 환경을 유지 및 지지하는 시스템 또는 장비이다. 상기 생물반응장치 내에서 인간 중간엽 줄기세포의 구형세포괴를 유도할 수 있으며, 나아가 형성된 구형세포괴를 생물반응장치  
10 내에서 계속 배양하면 접촉 저지(contact inhibition) 없이 성장이 가능한 고효성 인간 중간엽 줄기세포를 대량 생산할 수 있다. 즉, 상기한 바와 같은 배양배지를 사용하여 생물반응장치에서 교반(stirring) 등을 이용한 원심력으로 구체 형성을 유도할 수 있으며, 이후 동일 배지를 이용하여 계속적으로 배양하면 구형의 고효성 인간 중간엽 줄기세포의 대량 증폭이  
15 가능하다.

본 발명에 따르면, 노화되거나 상대적으로 생체내 활성도가 낮은 중간엽 줄기세포의 활성을 증가시켜 중간엽 줄기세포의 세포치료제로서의 실용성 및 치료효율을 극대화시킬 수 있다. 또한 본 발명의 고효성 유도  
20 방법은 상이한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 다양한 인간 중간엽 줄기세포에 모두 적용할 수 있는 규범화된 방법으로 타가 유래 세포치료제 개발 및 선발에 있어 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

이에 더하여, 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포의 효율을 극대화시킴으로써 세포치료 및 재생의학에서 필요로 하는 고효성의 적절한  
25 인간 중간엽 줄기세포 수를 도출할 수 있게 한다. 또한 본 발명은 고효성 인간 중간엽 줄기세포의 대량생산을 가능하게 한다.

궁극적으로, 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포의 세포치료제로서의 효율성을 증대시킴으로써 세포치료제의 실용화를 촉진하고, 나아가 심혈관계질환, 신경계질환 등을 위한 치료제 개발에도 크게 기여할 수 있을  
30 것으로 기대된다.

이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

5

[실시예]

본 발명에서는 MEDIPOST(주)(한국)에서 제공받은 인간 체대혈 유래 중간엽 줄기세포를 사용하였다. 상기 세포는 인간 중간엽 줄기세포 동정 실험을 실시하여 선별된 것으로, 중간엽 줄기세포의 양성 세포 표지자(CD29, CD44, CD73, CD105, CD166, HLA-ABC) 95% 이상 표현과 음성 세포 표지자(CD34, CD45, HLA-DR) 5% 미만의 확실적 표현 확인, 및 중간엽 줄기세포의 다중 분화능을 확인한 후 “인간 체대혈 유래 중간엽 줄기세포” 로 동정·분류된 것이다.

15

실시예 1: 인간 중간엽 줄기세포의 구체 형성 유도

(1) 구체 형성 유도배지

먼저 상기 중간엽 줄기세포를 기존의 중간엽 줄기세포 배양 배지인  $\alpha$ -MEM(Invitrogen 사 제조)에 SR(serum replacement)을 첨가한 배지를 이용하여 저부착디쉬에서 부유배양을 시도하였으나 부유상태가 만들어지지 않았다 (도 1A 참조).

다음으로, 상기 중간엽 줄기세포를 인간 배아 줄기세포 배양배지(ESM: embryonic stem cell media)로부터 bFGF (basic fibroblast growth factor)를 제거한 배지를 이용하여 저부착디쉬에서 배양한 결과 부유상태를 유도하는데 성공하였다(도 1B 참조). 상기 배지는 fetal bovine serum(소혈청)을 포함하지 않으며, DMEM/F-12(Invitrogen), 20% Knock out SR (Invitrogen), 0.1mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol(Sigma), 1% 비필수아미노산

(Invitrogen), 50 IU/ml 페니실린 및 50mg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen)을 포함한다.

(2) 구체 형성 방법

5

본 발명자들은 2 가지 방법을 이용하여 인간 중간엽 줄기세포의 구체 형성을 유도하였으며, 하기 2 가지 방법 모두에서 성공적으로 구체가 형성되었다.

먼저 인간 중간엽 줄기세포를 저부착 디쉬(dish)에서 상기 (1)의 bFGF 무함유 ESM 배지를 사용하여 배양함으로써 구체형성을 유도하였으며 그 결과를 도 2 에 나타내었다. 이 방법으로 유도된 중간엽 구형세포피는 스트레이너(strainer)를 이용하여 구체 형성에 포함되지 않은 세포와 분리하였다.

구체 형성을 유도하기 위한 또 다른 방법으로, 상기와 동일한 배지를 이용하여 배양 디쉬 뚜껑에 중간엽 줄기세포를 300~3000 cells/배지 20ul 로 접종한 후 뚜껑을 뒤집은 상태로 중력에 반하게 배양하여 구체 형성을 유도하였으며, 그 결과를 도 3 에 나타내었다. 이 방법은 세포수의 조절이 가능하며 형성되는 구체의 크기를 균일하게 할 수 있어 치료적 유효성이 높은 줄기세포피를 얻을 수 있는 장점이 있다. 따라서, 이후의 실험은 별도 기재가 있는 경우를 제외하고는 모두 이 방법으로 얻은 줄기세포피를 이용하여 실시하였다.

실시예 2: 구체 형성의 효과 - 생체내 활성화에 미치는 영향

허혈성 심혈관 질환 래트(rat) 모델을 이용하여 중간엽 줄기세포의 생체내 활성도를 평가하였다. 상기 허혈성 심혈관 래트 모델은 심장의 관상동맥을 결찰시켜 허혈상태를 유도하여 만들었다

허혈성 심혈관 질환 래트 모델들을 상기 실시예 1 의 (2)에서 얻은 구형세포피 자체를 주입한 그룹(spheroid), 구형세포피 형성 후 다시 단독세포(single cell)로 만들어 주입한 그룹(dissociate), 그리고 구형세포피

형성을 유도하지 않은 세포를 주입한 그룹(naive)으로 나누어 실험을 진행하였으며, 상기 그룹 각각에 대하여 최소 7 마리 이상의 래트(rat)를 사용하였다.

5 (1) 심전도 측정

상기 질환 모델화 후 4 일째 baseline 심전도를 측정하였으며, 상기 질환 모델화 후 7 일째에 상기 줄기세포를 상기 질환 모델에 주입하였다. 구체적으로, 마찰력이 없는 유리로 만들어진 헤밀턴 시린지를 이용하여  
 10 허혈성 심장질환이 유도된 심근 주위에 줄기 세포 또는 세포피를 주입하였으며, 래트 한 마리당 주입된 중간엽 줄기세포수가  $1 \times 10^5$  개가 되도록 조정하였다. 상기 세포 주입 후, 4 주째 및 8 주째에 심전도를 측정 한 후 좌심실 확장기내경(Left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD)), 좌심실 수축기내경(Left ventricular end-systolic dimension (LVESD)),  
 15 좌심실 분획단축(Left ventricular end-Fractional Shortening (LVFS)), 및 좌심실 구혈률(Left ventricular end-Ejection Fraction (LVEF)) 을 수치화하여 질환의 호전여부를 분석하였다. 좌심실 분획단축(LVFS)은  $LVEDD - LVESD / LVEDD$  으로 정의되며, 좌심실 구혈률 (LVEF)은  $LVEDD^2 - LVESD^2 / LVEDD^2$  로 정의된다. 좌심실 확장기내경(LVEDD) 및 좌심실 수축기내경(LVESD)이 작을수록, 좌심실 분획단축(LVFS) 및 좌심실 구혈률 (LVEF)이 클수록 높은 호전도를 나타낸다.  
 20

도 4 에서 알 수 있는 바와 같이, 구형세포피 자체를 주입한 그룹(spheroid) 및 구형세포피 형성 후 다시 단독세포로 만들어 주입한 그룹(dissociate)의 경우, 구형세포피 형성을 유도하지 않은 세포를 주입한  
 25 그룹(naive)에 비하여 좌심실 확장기내경(LVEDD) 및 좌심실 수축기내경(LVESD)이 작게 나타났다. 특히 구형세포피 자체를 주입한 그룹(spheroid)의 경우, 구형세포피 형성을 유도하지 않은 세포를 주입한 그룹(naive)에 비하여 현저하게 낮은 LVEDD 및 LVESD 값을 나타내었으며, 또한 구형세포피 형성 후 다시 단독세포(single cell)로 만들어 주입한  
 30 그룹(dissociate)과 비교시에도 낮은 LVEDD 및 LVESD 값을 나타내었다.

또한 도 5 에서 알 수 있는 바와 같이, 구형세포괴 자체를 주입한 그룹(spheroid) 및 구형세포괴 형성 후 다시 단독세포로 만들어 주입한 그룹(dissociate)의 경우, 구형세포괴 형성을 유도 하지 않은 세포를 주입한 그룹( naive)에 비하여 높은 좌심실 분획단축 (LVFS) 및 좌심실 구혈률 (LVEF) 값을 나타내었다. 특히 구형세포괴 자체를 주입한 그룹(spheroid)의 경우, 구형세포괴 형성을 유도하지 않은 세포를 주입한 그룹( naive)에 비하여 현저하게 높은 LVFS 및 LVEF 값을 나타내었으며, 또한 구형세포괴 형성 후 다시 단독세포로 만들어 주입한 그룹(dissociate)과 비교시에도 높은 LVFS 및 LVEF 값을 나타내었다.

10            상기 결과로부터, 구형세포괴 자체를 주입한 경우 높은 호전도를 나타냄을 알 수 있다.

**(2) 심장의 크기 및 섬유화 비교**

15            심전도 측정에 더하여 상기 구형세포괴 주입시 전체적인 심장벽의 두께 및 섬유화(fibrosis)에 미치는 효과를 살펴보았다. 도 6 은 심장벽의 두께 (infarcted wall thickness) 및 섬유화 면적 (infarct area)을 각각 수치화하여 나타낸 것이다.

              일반적으로 심장이 허혈에 노출되었을 경우, 심장벽의 섬유화로 인해  
 20            심벽이 얇아지고, 운동성 상실과 부피 확장이 일어난다. 도 6 에서 알 수 있는 바와 같이, 구형세포괴 자체를 주입한 경우, 구형세포괴를 형성하지 않은 세포를 주입한 그룹과 비교시 허혈에 노출되었음에도 통상적으로 허혈이 진행됨에 따라 나타나는 심벽이 얇아지고 섬유화가 진행되는 현상이 상대적으로 현저히 줄어든 것을 알 수 있다. 또한 구형세포괴 자체를 주입한  
 25            경우, 구형세포괴 형성 후 다시 single cell 로 분리 후 주입한 군과 비교시 심벽이 얇아지고 섬유화가 진행되는 현상이 상대적으로 줄어 든 것을 알 수 있다.

**(3) 심장의 조직학적 분석**

30

심장 허혈 모델에 대한 생체내 활성화(호전도)와 관련하여 그 원인을 밝히기 위하여 심장을 조직학적으로 분석하는 실험을 수행하였다. 주입 후 잔존하는 중간엽 줄기세포의 추적을 용이하게 하기 위하여, 세포에 DiI 염색을 한 후 허혈 모델에 주입하였다.

5 DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) 는 소수성 및 친지성 (hydrophobic and lipophilic)을 띠는 물질로 세포의 이중 지질막에 부착하여 붉은색으로 세포를 표지시킨다. 조직에서의 주입된 세포의 확인을 위해 심장조직을 샘플링하여, 전체 세포를 DAPI 로 핵염색 하고 형광 현미경으로 확인하였다. DAPI (4',6-diamidino-  
10 2-phenylindole) 는 모든 세포의 이중나선 DNA 의 AT cluster 의 minor groove 에 강하게 부착하여 푸른색 형광을 나타내는 물질이다.

도 7 에 나타난 바와 같이, 구형세포괴 형성을 유도하지 않은 중간엽 줄기세포를 주입한 그룹(naive)에 비하여 구형세포괴를 주입한 그룹(spheroid) 의 경우, 허혈성 심장 부근에 남아 있는 세포가 현저히  
15 많음을 확인할 수 있었다. 즉, DiI 으로 염색된 세포(red)가 현저히 많다는 것은 주입된 세포의 생존율(survival rate)면에서 구형세포괴가 탁월한 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

또한 허혈성 심장 부근에 잔존하는 중간엽 줄기세포가 허혈로 소실된  
20 심근세포로 분화가 진행되었는지를 확인하기 위하여 심근 특이적 표지자인 sacomeric actinin (S-actinin)의 발현을 확인하였으며, 이에 더하여 남아 있는 심근세포와의 연결에 중요한 역할을 하는 connexin 43(CX43) 의 발현을 확인하였다.

도 8 에서 알 수 있는 바와 같이, 구형세포괴 주입군에서 S-actinin  
25 (green 으로 염색된 부분)의 발현이 확인되었으며(도 8a 참조), 이는 허혈성 심장 부근에 남아 있는 중간엽 줄기세포가 소실된 심근세포로 분화 유도되었음을 의미한다. 또한 구형세포괴 주입군에서 심근세포 기능에 중요한 connexin 43(green 으로 염색된 부분)의 발현도 확인되었다(도 8b 참조).

30

이에 더하여 허혈심장의 호전에 가장 중요한 혈관형성에 대한 효과를 살펴보는 실험을 수행하였다. 구체적으로 혈관특이적 표지자인 isolectin B4의 발현여부를 확인하고 그 결과를 정량화 하여 도 9에 나타내었다.

5 도 9에 나타난 바와 같이, 구형세포괴를 유도하지 않은 중간엽 줄기세포를 주입한 군(naive)에 비하여 구형세포괴를 주입한 군(spheroid)에서 혈관특이적 표지자인 isolectin B4가 현저하게 발현됨을 알 수 있으며(green으로 염색된 부분), mm<sup>2</sup>당 그 수를 정량화한 그래프에서 알 수 있는 바와 같이 2배 이상의 탁월한 혈관형성 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

10

이러한 혈관형성에 있어서의 차이가 허혈 모델에 남아 있는 중간엽 줄기 세포의 혈관세포로의 분화에 기인한 것인지를 확인하는 실험을 수행하였다. 구체적으로 Dil와 함께 isolectin B4로 염색하여 그 결과를 분석하였다.

15

도 10에 나타난 바와 같이, 구형세포괴를 유도하지 않은 중간엽 줄기세포를 주입한 군(naive)에 비하여 구형세포괴를 주입한 군(spheroid)에서 isolectin B4가 현저하게 발현됨을 알 수 있으며(green으로 염색된 부분), 이는 구체형성으로 인하여 중간엽 줄기세포의 혈관세포로의 분화율이 현저히 증가되었다는 것을 의미한다.

20

25 상기 결과로부터 인간 중간엽 줄기세포를 부유배양하여 구체를 형성하고 또한 이를 다시 single cell로 분리하지 않고 그대로 유지시킨 상태의 구형세포괴를 허혈성 심장 질환 모델에 주입시, 구체를 형성하지 않은 세포 및 구체형성 후 다시 분리된 단독세포에 비하여 현저히 증가된 치료효과를 나타냄을 알 수 있다. 또한 구형세포괴 주입군에서 허혈성 심장 질환에 대한 향상된 치료효과를 나타내는 것은 구체형성으로 인하여 중간엽 줄기세포의 세포생존율, 심근세포로의 분화효율, 혈관형성능 등이 현저하게 증가된 것에 기인함을 확인하였다.

결론적으로, 중간엽 줄기세포의 구체형성유도는 중간엽 줄기세포의 활성의 증가를 유도하고 더 나아가 형성된 구체를 유지하는 것이 구체형성 후 다시 single cell 로 분리하는 것에 비하여 중간엽 줄기세포의 활성을 더욱 증가시킨다는 것이 명백해졌다.

5

**실시예 3: 구체 형성의 기전분석 - 생체내 활성 차이 검증**

상기 실시예 2 에서 살펴본 생체내 활성도 차이를 유발하는 구체형성의 기전을 분석하는 실험을 실시하였다.

10

먼저 저부착디쉬에서 bFGF 무함유 ESM 배지를 사용하여 구체형성 유도한 것에 EDTA 를 첨가하여 세포의 부착인자 중 주요한 기능을 하는 칼슘이온(Ca<sup>2+</sup>)을 킬레이트화시켜 보았다. 그 결과 도 11 에 나타난 바와 같이 EDTA 첨가시 구체가 형성되지 않았다. 즉, 중간엽 줄기세포의 구체형성이 Ca<sup>2+</sup> chelator 인 EDTA 첨가로 인해 방해되는 것으로

15 확인됨으로써 구체형성은 Ca<sup>2+</sup> 의존성 세포부착인자(cell adhesion molecule)에 의하여 일어남을 알 수 있다.

20

이에, Ca<sup>2+</sup> 의존성 세포부착인자인 N-cadherin 및 E-cadherin 의 구체형성과정에서의 변화를 western blot 을 이용하여 살펴보았다. 도 12 에서 알 수 있는 바와 같이, N-cadherin (abcam, ab18203)의 경우, 부유배양 (anchorage deprivation)에 의해 구체형성이 유도됨에 따라

없어지는 것으로 나타났으며, 이의 counterpart 로 알려져 있는 E-cadherin (abcam, ab1416)은 구체 형성이 유도됨에 따라 그 발현이 증가하는 것으로 나타났다. α-tubulin 을 대조군으로 사용하였다.

25

Western blot 에서는, 세포를 환원제[Lysis PreMix(4℃ stock) + NaF(10M, x100) + 오소바나데이트 (orthovanadate, 200 mM, x200) + 단백질 분해효소 억제제 각테일(1 tablet/10ml)]로 용해시킨 후 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하고 PVDF 이동막(transfer membrane, Millipore)에 옮긴 후 일차 항원-항체 반응과 항-래빗 IgG, 항마우스 IgG 를 이용한 이차 항원-항체 반응을 통하여 단백질 발현변화를 확인하였다.

상기 결과로부터 E-cadherin 이 인간 중간엽 줄기세포의 구체 형성의  
 주요인자로 작용할 수 있음이 확인되었으며, 이에 본 발명자들은 상기 E-  
 cadherin 이 중간엽 줄기세포의 구체형성 및 구형세포피의 고향성에 미치는  
 5 구체적인 효과를 검증하기 위하여 하기 실험을 실시하였다.

**실시에 4: E-cadherin 의 활성 확인 - 구체형성 및 구형세포피의 고향성에  
 미치는 효과**

10           **(1) 구체형성에 미치는 효과**

먼저 E-cadherin 의 기능을 억제시킨 경우 중간엽 줄기세포의  
 구체형성에 미치는 효과를 살펴보았다.

구체적으로, E-cadherin neutralization 기능이 있는 항체(Clone,  
 15 DECMA-1)를 이용하였으며, 이는 E-cadherin 의 세포막 부분을 인지하여  
 부착하는 항체를 이용하여 E-cadherin 의 세포간 부착 작용을 제거하는  
 방법이다.

이는 저부착 디쉬(dish)에서 bFGF 무함유 ESM 배지를 사용하여  
 구체형성을 유도시 E-cadherin neutralization 항체 2-10 µg/ml 또는 IgG 를  
 20 첨가하는 방법이다.

도 13 에서 알 수 있는 바와 같이, IgG 를 처리한 그룹 및 아무것도  
 처리하지 않은 세포 대조군( naive )에서는 구체가 형성되었지만 E-cadherin  
 기능 억제 그룹(neu E-cad)에서는 구체 형성이 이루어지지 않는 것을  
 확인하였다. Naive 군은 항체처리 그룹의 조건이 세포를 사멸하거나  
 25 활성화시키는 특수조건이 아님을 확인하기 위한 것으로, IgG 그룹과  
 비교하여 통상적으로 동일한 결과를 도출한다.

이에 더하여 E-cadherin 을 과발현시키는 adenoviral vector (E-  
 cadherin adenoviral vector) 를 이용하여 구체형성에 미치는 효과를

재검증하였다. 동일 vector 에서 E-cadherin 대신 LacZ 유전자가 들어간 vector 를 E-cadherin adenoviral vector 대조군으로 사용하였다.

CMV promoter 를 이용하였으며, adeno viral vector 를 293 세포에서 viral packaging 을 유도하여 정량 후 사용하였다. 통상의 viral vector transduction 과 마찬가지로 viral supernatant 를 고착 배양되어 70% 정도의 confluence 인 중배엽 줄기세포에 첨가하여 E-cadherin 의 발현을 유도 하였다. 24 시간 transduction 후 24 시간을 안정화 유도하고 세포를 단독세포로 분리하여 저부착 디쉬(dish)에서 bFGF 무함유 ESM 배지를 사용하여 구체형성을 유도하고 관찰 후 샘플링 하였다.

Adenoviral vector 를 처리하지 않은 세포군(naive)은 adenoviral vecor (E-cadherin 및 LacZ) 처리 그룹에 대한 세포 대조군으로 사용하였다. 세포에 vector 를 4 시간 동안 처리한 후, 구체형성을 유도하여 5 시간 및 24 시간 후 구체형성 유도 효과를 살펴보았다. Naive 군은 vector 처리군의 조건이 세포를 사멸하거나 활성화시키는 특수조건이 아님을 확인하기 위한 것으로, LacZ 그룹과 비교하여 통상적으로 동일한 결과를 도출한다.

도 14 에서 알 수 있는 바와 같이, 중간엽 줄기세포에 E-cadherin 을 과발현 시켰을 때(E-cad), E-cadherin 의 기능 억제 때와는 반대로 구체형성이 빠르게 진행되고 유도효율이 증대되는 것으로 나타났다.

상기 결과로부터 E-cadherin 이 중간엽 줄기세포의 구체형성을 조절하는 주요한 인자임이 명백해졌다.

**(2) ERK 및/또는 AKT 에 대한 영향**

세포의 생리기전 설명시 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 와 AKT(V-akt murine thymoma viral oncogene homolog)의 인산화를 통한 활성화는 세포의 활성을 나타내는 가장 핵심적 factor 이다. 따라서 먼저 구체형성에 따른 이들의 활성도를 확인하는 실험을 실시하였다. 상기 실시예 1 의 (2) 에 따라 구체 형성을 유도한 후 30 분, 1 시간, 3 시간 간격으로 세포를 샘플링하였다. ERK 와 AKT 의 인산화는 통상적으로 각종 처리 후

3 시간 이내에 확인되므로 위와 같은 시간대로 샘플링하여 인산화 정도를 평가하였다.

도 15 에 나타난 바와 같이, 부유배양(anchorage deprivation)으로 구형세포괴가 형성됨에 따라 전체 AKT(tAKT) 및 ERK(tERK) 중 활성화된 AKT(pAKT) 및 ERK(pERK) 가 증가됨을 알 수 있다. 상기 결과로부터, 중간엽 줄기세포의 부유배양으로 인한 구형세포괴 형성은 AKT 및 ERK 모두를 활성화 시키는 결과를 나타내며 이는 또한 AKT 및 ERK 통로가 인간 중간엽 줄기세포 구체 형성에 따른 활성 통로가 될 수 있음을 시사하는 결과이기도 하다.

10

다음으로, 이러한 활성인자를 E-cadherin 이 직접적으로 조절하는지를 확인하는 실험을 실시하였다. 구체적으로 E-cadherin neutralization 기능이 있는 항체(clone DECMA-1, sigma)를 이용하여 단일 세포에 처리하고, 구체 형성을 유도하여 western blot 으로 확인하였다. Western blot 에서는 세포를 환원제[Lysis PreMix(4°C stock) + NaF(10M, x100) + 오소바나데이트(orthovanadate, 200 mM, x200) + 단백질 분해효소 억제제 콕테일(1 tablet/10ml)]로 용해시킨 후 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하고 PVDF 이동막(transfer membrane, Millipore)에 옮긴 후 일차 항원-항체 반응과 항-래빗 IgG, 항마우스 IgG 를 이용한 이차 항원-항체 반응을 통하여 단백질 발현변화를 확인하였다.

20

구체적으로 E-cadherin 의 세포막 부분을 인지하여 부착하는 항체로 E-cadherin 의 세포간 부착 작용을 제거 후 샘플링하여 인산화 정도를 평가한 후 그 결과를 도 16 에 나타내었다. 항체 처리가 되지 않은 세포 대조군을 지칭하는 naive 그룹은 항체 처리그룹의 조건이 세포를 사멸하거나 활성화시키는 특수조건이 아님을 확인하기 위한 것으로, IgG 그룹과 비교하여 통상적으로 동일한 결과를 도출한다.

25

도 16 에서 알 수 있는 바와 같이, control 그룹인 IgG 를 처리한 그룹 및 naive 그룹 에서는 활성화된 pAKT 및 pERK 의 변화가 없는 반면, E-

cadherin 기능 억제 그룹(neuE-cad)에서는 AKT 및 ERK의 활성화도가 감소하는 것을 확인하였다(pAKT 및 pERK 감소).

이에 더하여 E-cadherin을 과발현시키는 adenoviral vector (E-cadherin adenoviral vector)를 이용하여 상기 결과를 재검증하였다. 통상의 viral vector transduction과 마찬가지로 viral supernatant를 고착 배양되어 70% 정도의 confluence인 중간엽 줄기세포에 첨가하여 E-cadherin의 발현을 유도하였다. 24시간 transduction 후 24시간을 안정화 유도하고 세포를 단독세포로 분리하여 저부착 디쉬(dish)에서 bFGF 무함유 ESM 배지를 사용하여 구체형성을 유도하고 샘플링하였다.

동일 vector에서 E-cadherin 대신 LacZ 유전자가 들어간 vector를 E-cadherin adenoviral vector 대조군으로 사용하였다. Adenoviral vector를 처리하지 않은 세포군(naive)은 adenoviral vector (E-cadherin 및 LacZ) 처리 그룹에 대한 세포 대조군으로 사용하였다. Naive 그룹은 vector 처리 그룹의 조건이 세포를 사멸하거나 활성화시키는 특수조건이 아님을 확인하기 위한 것으로, LacZ 그룹과 비교하여 통상적으로 동일한 결과를 도출한다.

도 17에서 알 수 있는 바와 같이, E-cadherin 과발현 그룹(E-cad)에서 naive 및 LacZ 그룹에 비하여 ERK와 AKT의 활성화가 증대(pAKT 및 pERK 증가)되는 것으로 나타났다.

### (3) 세포 성장 및 세포사멸에 미치는 효과

E-cadherin이 중간엽 줄기세포의 성장 및 사멸에 미치는 효과를 살펴보았다.

구체적으로, E-cadherin 과발현 그룹, naive 및 LacZ 그룹에 대한 세포 성장력을 유세포분석을 통해 살펴보았다. 실시예 1의 (1)에서와 같이 부유배양한 중간엽 줄기세포에 실시예 4의 (1)에서와 같이 E-cadherin을 과발현시키는 adenoviral vector를 처리한 후 24시간 동안 배양하여 형성된

구체를 다시 단일 세포로 분리하여 세포핵을 염색한 후 유세포 분석기로 cell cycle 을 분석하였다. Cell cycle 중 활발한 세포의 성장을 표지하는 합성기(S phase)의 %로 그 세포의 성장력을 평가한다.

도 18 에 나타난 바와 같이, naive 및 LacZ 그룹에 비해 E-cadherin 과발현 그룹(E-cad)에서 중간엽 줄기세포의 활성화에 주요한 성장기인 S phase 가 증가되는 것으로 확인되었다.

또한 도 19 에 나타난 바와 같이, E-cadherin 과발현시(E-cad) 세포사가 일어나는 M1 기의 비율이 감소하므로 세포사멸이 감소되는 것으로 확인되었다.

10

#### (4) VEGF 의 분비능에 미치는 효과

E-cadherin 이 중간엽 줄기세포의 VEGF (Vascular endothelial growth factor, 혈관내피세포 성장인자) 분비능에 미치는 효과를 살펴보았다. VEGF 는 허혈성 심장 질환의 호전에 주요한 인자이다.

구체적으로, E-cadherin 과발현 그룹, naive 및 LacZ 그룹에 대해 real time PCR 과 항원 항체 반응을 이용한 ELISA 를 실시하여 각각 mRNA 및 protein 수준을 비교하여 도 20 에 나타내었다.

세포에 adenoviral vector 를 처리하고 48 시간 후 세포로부터 RNA 를 추출하고, cDNA 를 합성한 후 VEGF 특이적 primer (바이오니아(한국) 주문 제작)를 이용하여 정량적으로 RNA 수준을 측정하였으며 (VEGF-real-time PCR), 세포에 adenoviral vector 를 처리하고 48 시간 후 그 배양액에 대하여 VEGF 항원-항체 반응을 유도하여 단백질 수준에서의 VEGF 양을 측정 하였다 (VEGF-ELISA).

도 20 에서 알 수 있는 바와 같이, E-cadherin 과발현시(E-cad) mRNA 및 protein 수준 모두에서 VEGF 가 상대적으로 증가되는 것으로 나타났다.

상기 결과로부터 E-cadherin 은 인간 중간엽 줄기세포의 구체형성 유도 인자일 뿐만 아니라 다양한 생체내 활성 조절 인자로 작용하는 것을 알

수 있으며, 결론적으로 E-cadherin 은 인간 중간엽 줄기세포의 부유배양시  
구체형성을 촉진하고 나아가 구형세포피의 고효성을 유도하는 것이 명백하다.

**실시예 5: 응집체 형성에 의한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 면역조절능력**

**5 향상 효과 검증 실험**

**(1) MLR (Mixed Lymphocyte Reaction)**

응집체 형성 후 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 면역조절능에 대한  
10 효과를 검증하기 위하여, 공여자가 다른 2 종의 제대혈 유래  
중간엽줄기세포의 면역조절능을 시험관 내에서 MLR (Mixed Lymphocyte  
Reaction) 방법을 통해 평가하였다.

구체적으로 서로 다른 2 명의 인간 유래의 동종의 인간 말초혈액  
세포를 공동배양하여 동종면역반응을 유발시킨 후 각각 세포배양을 억제  
15 시킨 후, 이를 평판 부착배양된 제대혈 유래 중간엽 줄기세포 (단층  
줄기세포) 또는 응집체를 형성한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(응집체  
줄기세포)와 함께 배양한 후 MLR 반응의 수치를 통해 줄기세포간  
면역조절능의 차이를 비교 평가하였다.

제대혈 유래 중간엽 줄기세포는  $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$  비율로 175T 배양접시에  
20 10% FBS 가 포함된 MEM- $\alpha$  배지에서 단층 배양하여 80~90% 자라게 한 후  
실험에 사용하였다. 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 부유상태에서 1 시간동안  
10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  의 마이토마이신(mitomycin) C 로 처리한 후 평판 부착배양법과  
응집체 형성법에 각각 사용하였다.

응집체를 형성하기 위해, 마이토마이신 C 로 처리된 제대혈 유래  
25 중간엽 줄기세포를 DMEM/F12 (20% Knock out SR, 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올,  
1% 비필수 아미노산, 50 IU/ml 페니실린, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신) 배지를  
이용하여  $2 \times 10^3$  세포/ 20 $\mu\text{L}$  배지 조건으로 배양 접시 뚜껑 위에서 hanging  
drop 방법으로 24 시간 배양하였다.

96-웰 플레이트 (well plate)의 웰에 단층 줄기세포  $2 \times 10^4$  개, 응집체  
30 줄기세포  $2 \times 10^3$  개를 각각 넣어 음성대조군으로 사용하였다. 양성대조군

웰에는 서로 다른 2 명의 인간말초혈액 세포를  $2 \times 10^5$  개씩 공동 배양하여 동종면역반응을 일으키게 하였다. 그리고 시험군 웰에는 단층 줄기세포  $2 \times 10^4$  개, 응집체 줄기세포  $2 \times 10^3$  개를 각각 넣은 웰에 서로 다른 2 명의 인간말초혈액 세포를  $2 \times 10^5$  개씩 넣고 공동 배양하여 동종면역반응을 억제시키는지 확인하였다. 5 일간 배양한 후, 현미경으로 세포의 증식 및 군집형성을 확인하였다. 다음으로, 배양 5 일에 BrdU 를 처리하여 최종 24 시간 동안 새로 합성된 세포의 DNA 를 측정하였다.

그 결과, 도 21 에 나타난 바와 같이 단층 줄기세포(M)에 비해 응집체 줄기세포(s)가 동종 면역반응을 37% 이상 더 억제하므로, 응집체 줄기세포의 면역반응 억제 능력이 현저히 우수함을 확인하였다.

### (2) PGE<sub>2</sub> (프로스타글란딘 E2) 분비 수준 확인

상기 (1)에서 얻어진 MLR 배양액에서 면역조절물질로 알려진 PGE<sub>2</sub> 분비 수준을 ELISA 방법(Cayman Chemical Company, prostaglandin E<sub>2</sub> ELISA Kit(catalog No. 514010))을 사용하여 측정하였다. 실험 배양액은 4°C에서 18 시간 동안 capture antibody 와 반응시켰고, 발색반응은 실온에서 90 분 동안 반응 시킨 후, 결과값을 측정하였다. ELISA 분석한 결과, 도 22 와 같이 동종면역반응이 일어난 환경에서 PGE<sub>2</sub> 분비가 응집체 형성 후 크게 증가함을 볼 수 있다(N: 단층 줄기세포; A: 응집체 줄기세포). 이 결과는 응집체 형성에 의해 체대혈 유래 중간엽 줄기세포의 면역조절능이 평판 배양된 줄기세포에 비해 향상됨을 의미한다.

### (3) 면역원성 확인

응집체 형성이 체대혈 유래 중간엽 줄기세포의 면역원성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 조직분석을 실시하였다. 구체적으로, 평판 부착배양된 체대혈 유래 중간엽 줄기세포와 응집체 형성 후의 체대혈 유래 중간엽 줄기세포를 허혈성 심혈관질환 래트 모델의 심근에 주입한 후, 심장의 허혈성 조직 주위로 면역세포의 침투반응을 분석하기 위하여 심장 조직 시료를 면역세포 표지자인 F4/80 으로 염색하였고, 2 차 항체로 녹색

표지자를 이용하였다. 주입된 세포는 주입 전에 DiI 로 염색함으로써 다른 세포와 구별되도록 하였다.

5 그 결과 도 23 에서 알 수 있는 바와 같이, 응집체 형성 후의 제대혈 유래 중간엽줄기세포괴를 주입한 조직(Spheroid)에서 평판 부착배양된 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(Naive)에 비해 상당히 적은 수의 면역세포가 관찰되었다. 이는 응집체 형성이 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 면역원성을 낮출 수 있음을 의미한다.

10 **실시예 7: 응집체 형성에 의한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 연골세포 사멸 및 연골재생 효과 강화 검증**

**(1)연골세포 사멸 억제 효과**

15 제대혈 유래 중간엽 줄기세포는 연골세포로의 분화능이 잘 알려져 있고 다양한 분비 인자들에 의한 세포 사멸억제, 항염증 기능이 확인되고 있어 연골 손상 질환에 대한 치료 적용이 시도되어 왔다. 따라서 연골 손상 및 관절염에 의한 연골 세포 사멸과 연골재생에 대한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 치료효능이 응집체 형성을 통해 향상 또는 개선될 수 있는지를 검증하였다.

20 토끼의 연골 세포를  $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  비율로  $10\text{cm}^2$  배양접시에 3ml 의 DMEM(10% FBS, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin) 배지로 단층 배양하고 공동 배양 1 일 전 평판 부착배양된 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(naive hUCB-MS)를  $5 \times 10^5 / 3\text{ml}$  로 trans-well 윗 부분에 배양하였다. 응집체의 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(spheroid hUCB-MS)는 공동 배양 1 일 전에,  $1 \times 10^4 /$   
 25  $20\mu\text{L}$  조건으로 DMEM/F12 (20% Knock out SR, 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올, 1% 비필수 아미노산, 50 IU/ml 페니실린, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신) 배지에서 배양 접시 뚜껑 위에 hanging drop 방법으로 배양하였다. 토끼의 연골 세포를 배양한지 6 일 뒤 trans-well 을 이용하여 분리 공동 배양을 실시하였다. naive hUCB-MS 는 배양 중인 trans-well 을 배양 중인 토끼의  
 30 연골 세포 배양 접시 위에 올려 공동 배양하고, spheroid hUCB-MS 는

형성된 spheroid 50 개를 3ml 의 DMEM(10% FBS, 50  $\mu$ g/ml Gentamicin) 배지로 옮긴 후 트랜스-웰(trans-well)에 올려 공동 배양하였다. 이때 연골 세포 사멸 조건으로 500  $\mu$ M 의 sodium nitroprusside 를 처리하였다.

그 결과 도 24 A 에서 나타난 바와 같이 생존/사멸 염색으로 연골 세포의 사멸이 크게 줄어들었음을 확인하였고, 도 24B 에서와 같이 구체(spheroid) 형성시 연골 세포 사멸 억제 정도가 hUCB-MS C (1)의 경우  $90.6 \pm 4.4\%$ , hUCB-MS C (2)의 경우  $95.7 \pm 1.2\%$ 로 대조군( $66.2 \pm 13.0\%$ )에 비해 크게 증가하였음을 확인하였다.

## 10 (2) 연골 재생 효과

뉴질랜드 흰토끼 10 주령에 무릎관절 외측면 피부, 피하 및 관절낭을 절개하고 관절을 노출시킨 후 직경 5 mm 의 조직생검용 펀치를 이용하여 활차구의 중심부에 전층 연골결손 모델을 완성한 후 20 초간 멸균거즈를 이용하여 손상부에 대한 지혈을 실시하였다. 이어, 공여자별로 체대혈 유래 중간엽 줄기세포의 연골 분화능과 재생 능력에 따라 분류된 2 종의 세포군(High cell 및 Low cell 군)과 대조군인 정상 인간 폐 섬유종(normal human lung fibroblast) 세포, 그리고 Low cell 을 응집체 형태로 만든 군으로 나누어 각  $5 \times 10^6$  세포를 4% 히아루론산과 섞어 손상부에 주입하였다. 그 후 관절낭, 피하조직 및 피부를 봉합한 후 10 주간 사육하였고 응집체 형성에 의한 체대혈 유래 중간엽 줄기세포의 연골재생능의 향상 여부를 평가하였다.

도 25 의 10 주 후 연골 손상 부위의 육안 분석과 조직 염색 분석을 통해 얻어진 연골 손상 점수 (낮을 수록 연골 재생으로 손상이 회복 된 것임)를 Pineda *et al.* (1992, *Acta Anat* (Basel)) 및 Wakitani *et al.* (1994, *J Bone Joint Surg Am*) 방법에 따라 평가한 결과, 연골 손상 회복 성적은 High cell ( $5.00 \pm 2.24$ )과 응집체 형성한 Low cell ( $6.00 \pm 1.22$ )이 높았고, Low cell ( $7.40 \pm 1.52$ )과 control cell ( $7.20 \pm 1.48$ )이 예상대로 낮았다. 따라서 이들 결과는 응집체 형성이 체대혈 유래 중간엽 줄기세포의 연골 세포 사멸 및 연골 재생에 대한 효능을 강화시킴을 의미한다.

**실시예 8: 응집체 형성에 의한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 폐손상 모델에서의 폐재생 효과 강화 검증**

5           **(1) 폐세포 재생 줄기세포 활성화 관련 VEGF 발현**

제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 세포 사멸 억제, 항염증 등이 다양한 분비인자들에 의해 일어남이 밝혀지고 있다. 특히 폐손상 질환에서 폐재생을 위한 폐모세혈관 재생 기능, 폐세포 증식 및 폐세포 사멸 억제 등과  
10           관련해서 VEGF 가 알려져 있다 [Varet J. 등, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298, L768-L774 (2010); Kuhn H 등, *Respirology* 15, 343-348 (2010)]. 응집체 형성 후 제대혈 유래 중간엽줄기세포의 VEGF 분비능의 증가로 인해 폐손상 모델에서의 폐재생 효과를 기대할 수 있는 바, 응집체 형성 전 후에 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 VEGF 분비 수준을 항-VEGF  
15           항체(R&D systems, ELISA kit cat#DY293B)를 이용한 ELISA 로 분석하였다.

그 결과 응집체 형성 후 VEGF 의 분비가 응집체 형성 전과 비교해 3 배 이상 증가함을 확인하였다. 이는 폐 손상에 있어 중요한 치료 인자가 될 수 있는 VEGF 의 분비 증가로 인한 폐손상 회복 개선에 중요한 사례가 될 수 있음을 의미한다.

20

**(2) 응집체 형성에 의한 제대혈 유래 중간엽줄기세포의 폐세포로의 분화능 강화**

제대혈 유래 중간엽줄기세포는 폐세포로의 분화능이 잘 알려져 있고  
25           폐조직 내로 정착이 되어 폐세포 생성 또는 재생, 폐섬유화 증상 억제와 항염증 기능이 확인되고 있어 폐질환에 대한 치료 적용이 시도되어 왔다. 특히 폐손상 질환에서 폐재생을 위한 폐세포가 분비하는 SP-C (surfactant protein C) 단백질이 중요하다. 따라서, 폐재생에 대한 제대혈

유래 중간엽줄기세포의 치료효능이 응집체를 통해 향상 또는 개선될 수 있는지를 검증하였다.

응집체 형성 후 제대혈 유래 중간엽줄기세포의 폐분화능에 대한 효과를 검증하기 위하여 공여자가 다른 2 종의 제대혈 유래 중간엽줄기세포의 폐분화능의 평가를 시험관 내에서 SP-C 유전자 발현을 통해 평가하였다. 제대혈 유래 중간엽줄기세포는  $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$  비율로 175T 배양접시에 10% FBS 가 포함된 MEM- $\alpha$  배지에서 단층 배양하여 50~60% 자라게 한 후 실험에 사용하였다. 단층으로 배양되는 제대혈 유래 중간엽줄기세포는 75T 배양접시에서 배양한다.

응집체 형성은 hanging drop 방법과 bioreactor 방법을 비교하여 진행하였다. Hanging drop 응집체로 배양되는 제대혈 유래 중간엽줄기세포는  $5 \times 10^4 / 20\mu\text{L}$  조건으로 DMEM/F12 (20% Knock out SR, 0.1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Non-essential amino acid, 50 IU/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin) 배지로 배양 접시 뚜껑에 24 시간 배양하였다. 현미경으로 반응세포의 증식 및 균집 형성 (spheroid)을 확인 후, 35 파이 배양접시로 옮긴 후 배양하였다. Bioreactor 응집체로 배양되는 제대혈 유래 중간엽줄기세포는  $5 \times 10^5 / \text{ml}$  조건으로 스파이너 플라스크에서 70 rpm 일정한 속도로 배양하였다.

단층으로 배양되는 세포군과 응집체로 배양되는 세포군들을 5 일간 배양한 후, RNA 를 추출하고 cDNA 를 합성하였다. 다음으로, SP-C 유전자 발현 수준을 Real time PCR 로 분석하였다.

그 결과 도 26 에 나타난 바와 같이, 일반 평판 부착배양 방법과 bioreactor 응집체 배양에 비해 hanging drop 응집체 형성 후의 제대혈 유래 중간엽줄기세포의 SP-C 발현이 크게 향상됨을 확인할 수 있으며 이는 hanging drop 응집체가 bioreactor 응집체에 비교하여 치료적 유효성이 더 바람직할 수 있음을 의미한다. Hanging drop 방법에 의한 응집체를 이용한

폐분화능 인자 SP-C 의 발현이 바이오리액터에 의한 응집체와 비교해 15 배 내지 80 배 정도, 단일 세포에 비해서는 2 배 내지 8 배 이상 증가함을 확인하였다. 이는 폐손상에 있어 중요한 치료 인자가 될 수 있는 SP-C 의 발현 증가로 인한 폐손상 회복 개선에 중요한 사례가 될 수 있음을 의미한다.

5

이상의 실시예의 결과로부터, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포는 응집체의 형성으로부터 다양한 기능성 분비 인자의 증가와 면역원성의 감소 등으로 인해 세포치료제로서 연골 및 폐 등의 손상 및 염증 질환에서 치료 효능의 향상을 기대할 수 있는 기술로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

10

**실시예 9: 로커(Rocker)를 이용한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 응집체 형성 방법**

MSC 의 응집체 형성 위해 로커를 이용하여 MSC 를 로킹(rocking)하여 응집체 형성을 유도하였다. 10,000~20,000 cells/cm<sup>2</sup> 의 MSC 세포를 이용하였고, 배지 조성은 10% FBS 함유 알파-DMEM 배지를 이용하였다. 배양 조건은 37℃ 및 CO<sub>2</sub> 배양기 내에 compact rocker CR95 (FinePCR 사)을 위치시키고, 로킹 스피드 8~12 rpm 으로 24 시간 배양시켰다. 디쉬 표면의 MSC 부착을 방지하기 위해 미처리 박테리아 배양디쉬 (non-treated bacterial culture dish)를 이용하였다.

20

그 결과, 로킹 스피드의 증가 시 MSC 응집의 감소가 유발되었다. 또한, 생성된 응집체의 사이즈는 로킹 스피드에 따라 분포가 다르게 생성되었고, 하나의 로킹 스피드 내에서도 사이즈가 다양함을 알 수 있었다.

25

본 발명을 상기의 구체적인 실시예와 관련하여 기술하였지만, 첨부된 특허청구범위에 의해 정의된 본 발명의 범위 내에서 당 분야의 숙련자는 본 발명을 다양하게 변형 및 변화시킬 수 있다.

### 특허청구범위

1. 인간 중간엽 줄기세포를 중력에 반하게 배양하여 구형세포피를 형성하는 것을 포함하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포피의 제조 방법.
2. 제 1 항에 있어서, 상기 배양이 중력에 반하게 놓인 배지 방울에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것임을 특징으로 하는 방법.
3. 제 1 항에 있어서, 상기 배양이 SR(serum replacement)을 포함하는 혈청배제배지를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
4. 제 3 항에 있어서, 상기 혈청배제배지가 bFGF(basic fibroblast growth factor)를 포함하지 않는 인간 배아줄기세포 배양배지인 것을 특징으로 하는 방법.
5. 제 1 항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포가 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.
6. 인간 중간엽 줄기세포를 배양하여 구형세포피를 형성하는 것을 포함하며, 상기 배양시 중간엽 줄기세포 내의 E-cadherin 의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 고효성 인간 중간엽 줄기세포피의 제조 방법.
7. 제 6 항에 있어서, 상기 E-cadherin 의 양의 증가가 중간엽 줄기세포에 E-cadherin 의 발현 벡터를 도입함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
8. 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 고효성 인간 중간엽 줄기세포피.

9. 제 8 항의 고효성 인간 중간엽 줄기세포괴를 포함하는 세포치료제.
10. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포, 간세포, 췌장베타세포, 혈관세포 또는 폐세포의 형성에 이용되는 것을 특징으로 하는 세포치료제.
11. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 폐질환 치료; 폐질환에 의한 염증의 억제 또는 치료; 폐조직 재생; 및 폐조직 섬유증(fibrosis) 억제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 세포치료제.
12. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 심혈관 질환의 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는 세포치료제.
13. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 혈관형성 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는 세포치료제.
14. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 면역조절기능을 증가시키는 것을 특징으로 하는 세포치료제.
15. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 면역유발성, 면역세포침투 또는 면역원성 중 어느 하나를 저하시키는 것을 특징으로 하는 세포치료제.
16. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 연골 재생용인 것을 특징으로 하는 세포치료제.
17. 제 9 항에 있어서, 상기 세포치료제가 염증 반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 세포치료제.

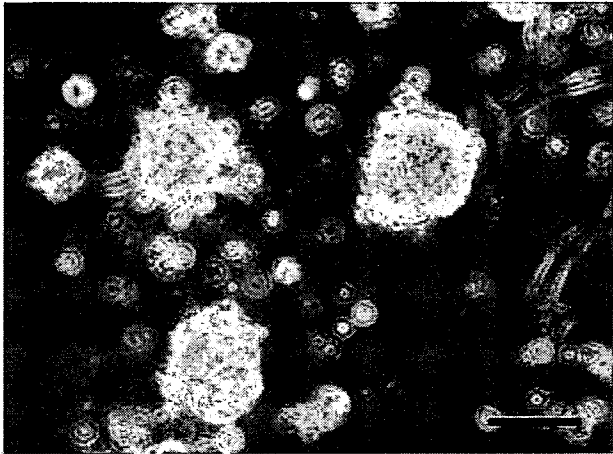
18. 제 8 항의 고효율성 인간 중간엽 줄기세포괴를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 세포치료 방법.

19. 제 17 항에 있어서, 상기 세포치료 방법이 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포, 간세포, 췌장베타세포, 혈관세포 또는 폐세포의 형성; 폐질환 치료; 폐질환에 의한 염증의 억제 또는 치료; 폐조직 재생; 폐조직 섬유증(fibrosis) 억제; 심혈관 질환의 치료; 면역조절기능의 증가; 면역유발성, 면역세포침투 또는 면역원성 중 어느 하나의 저하; 연골 재생; 또는 염증 반응 억제를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 세포치료 방법.

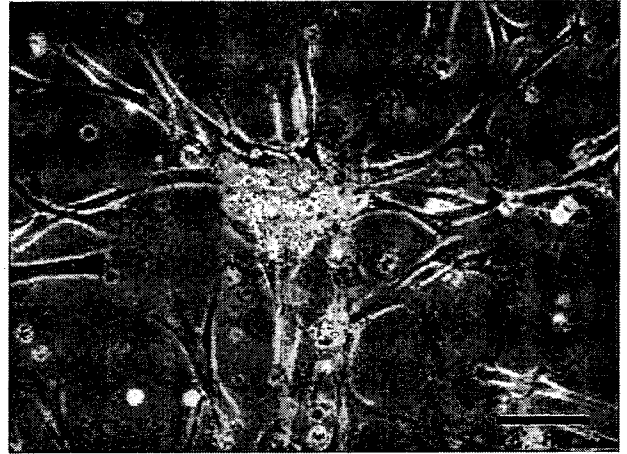
1/18

도 1

bFGF를 제거한 ESM 배지

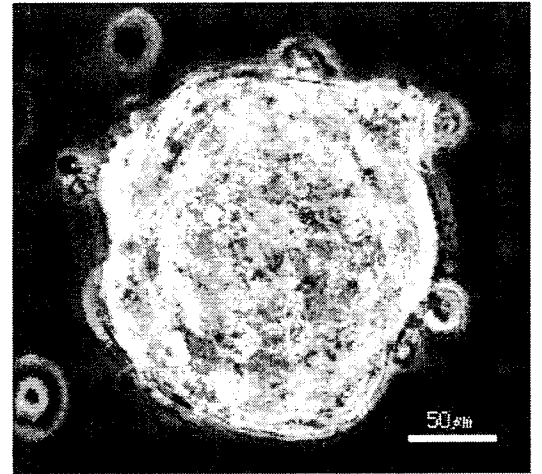
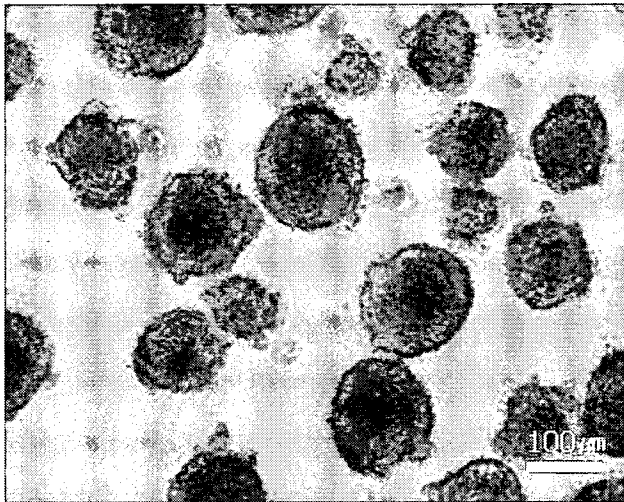


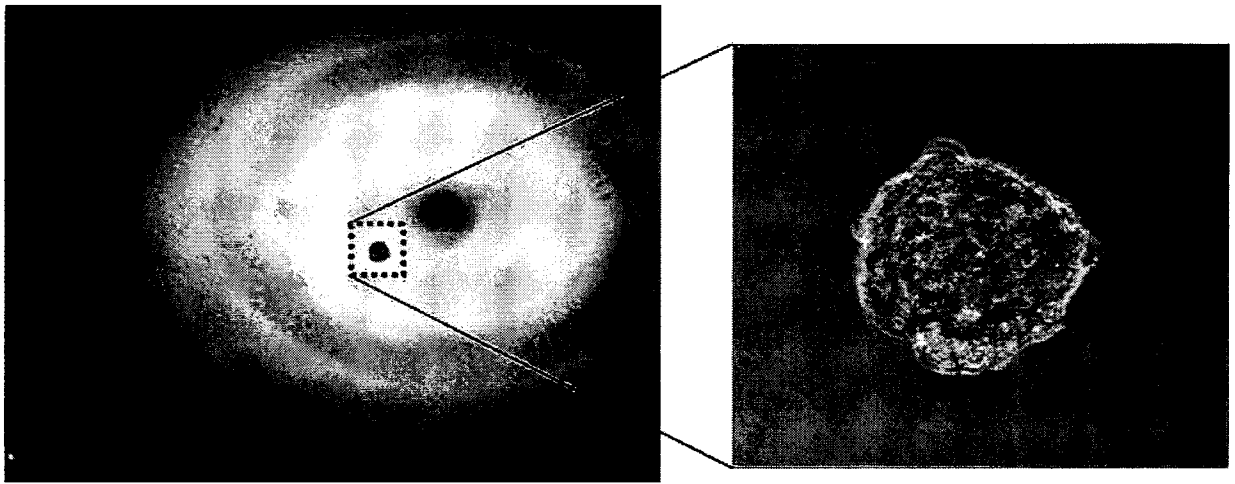
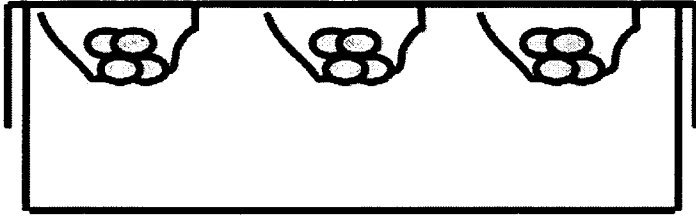
$\alpha$ MEM+SR 20%

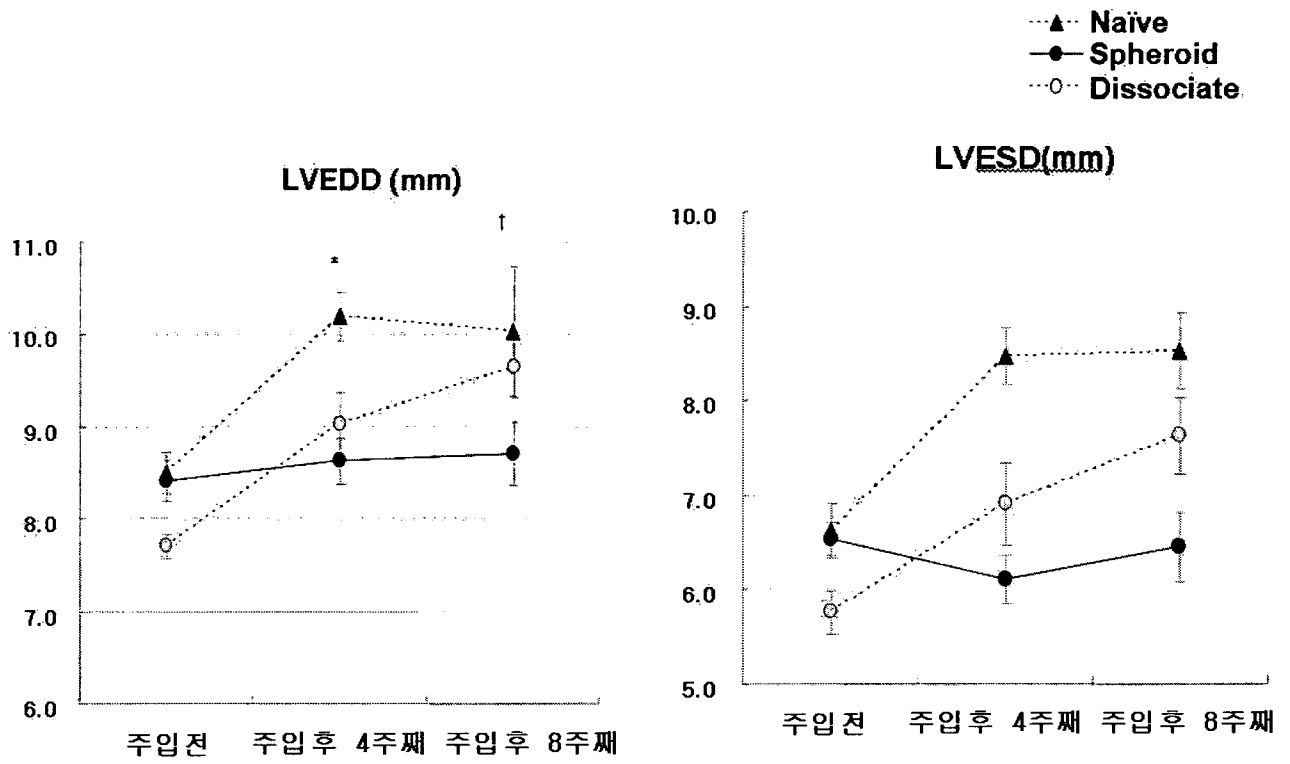


스케일 바 = 100 $\mu$ m

도 2

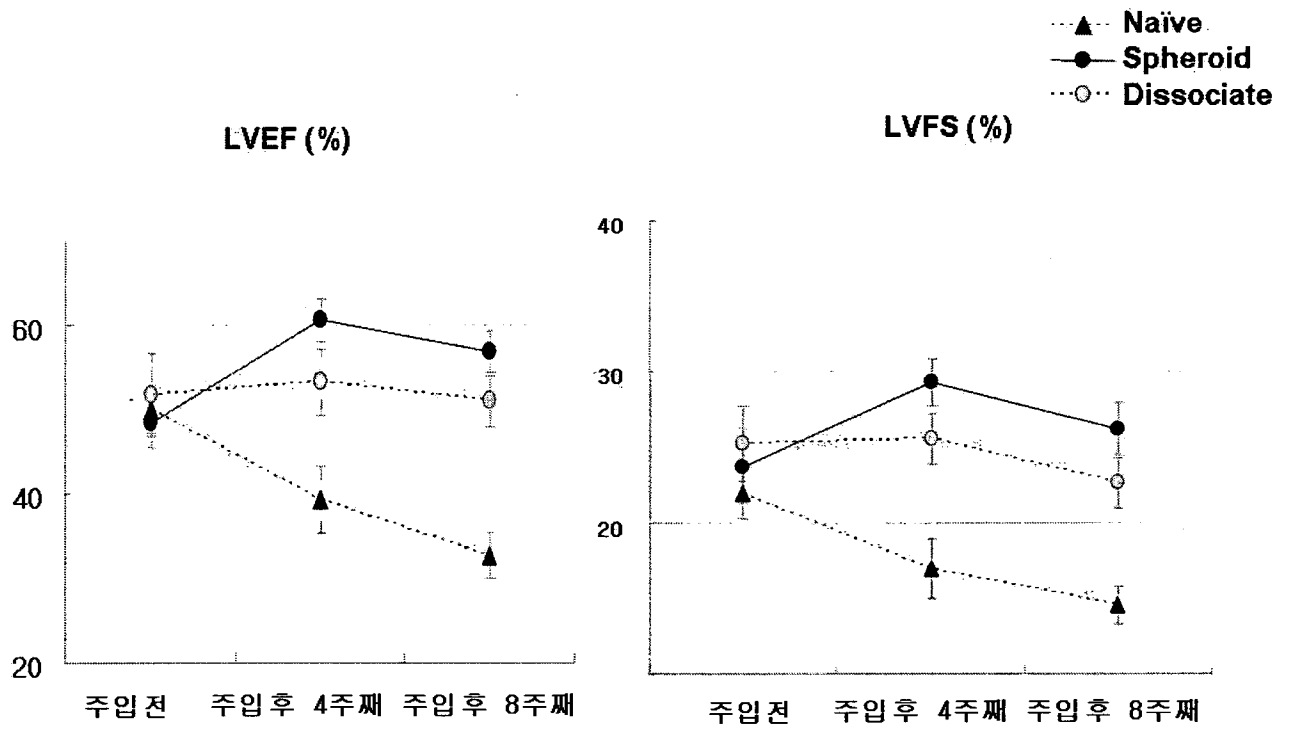




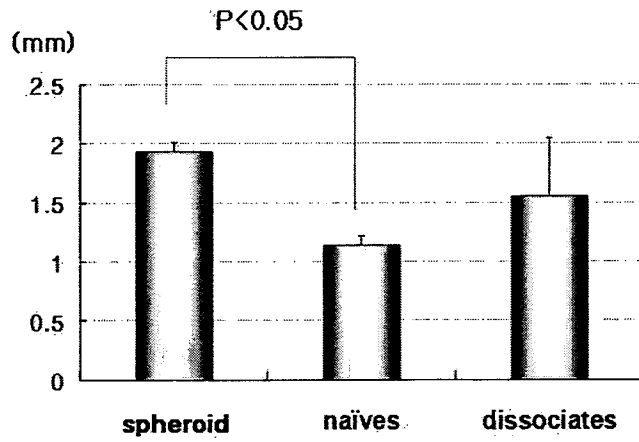


4/18

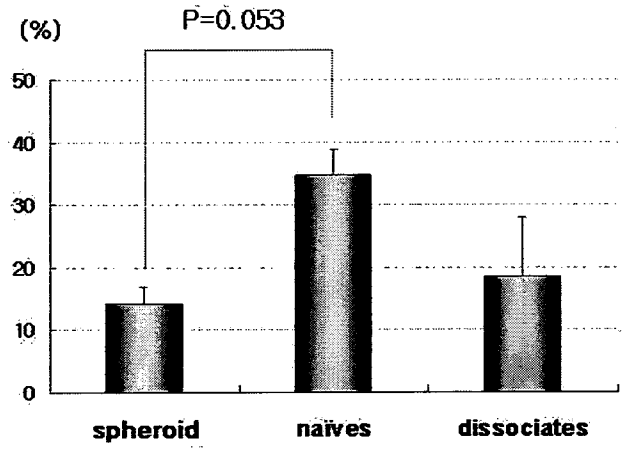
도 5



심장벽의 두께

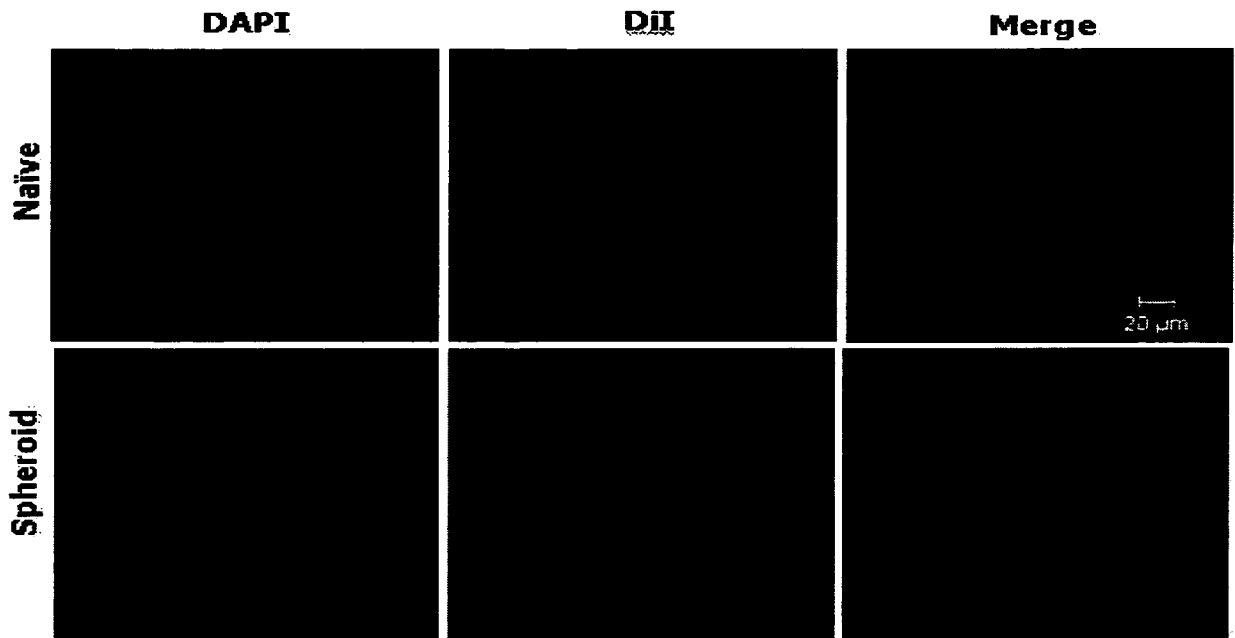


섬유화 면적

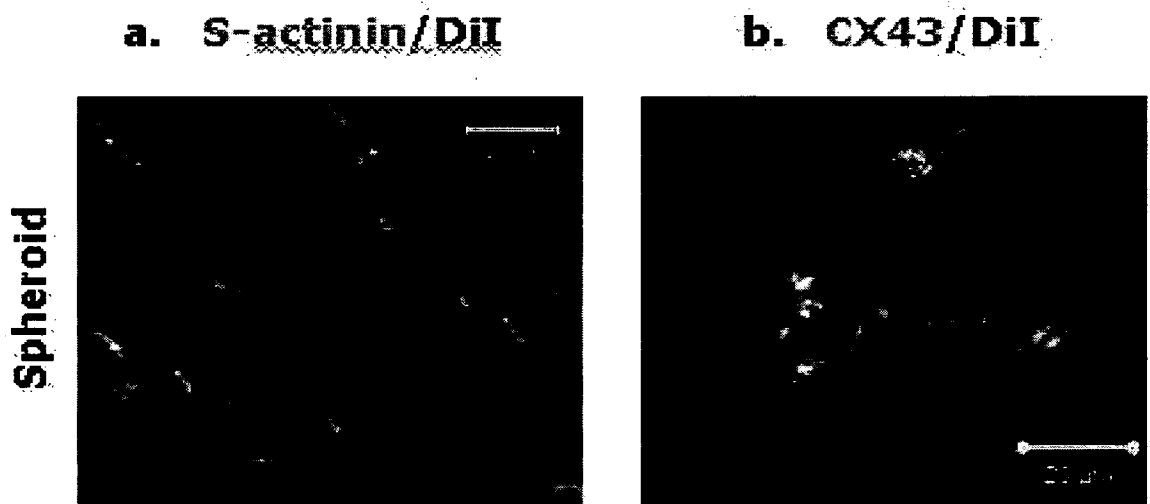


6/18

도 7

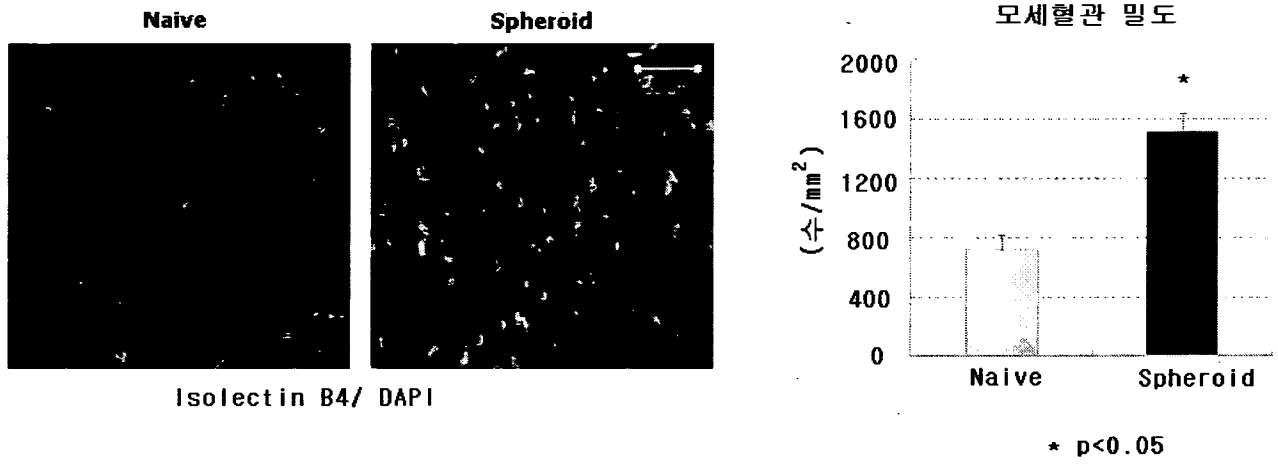


도 8



7/18

도 9



도 10

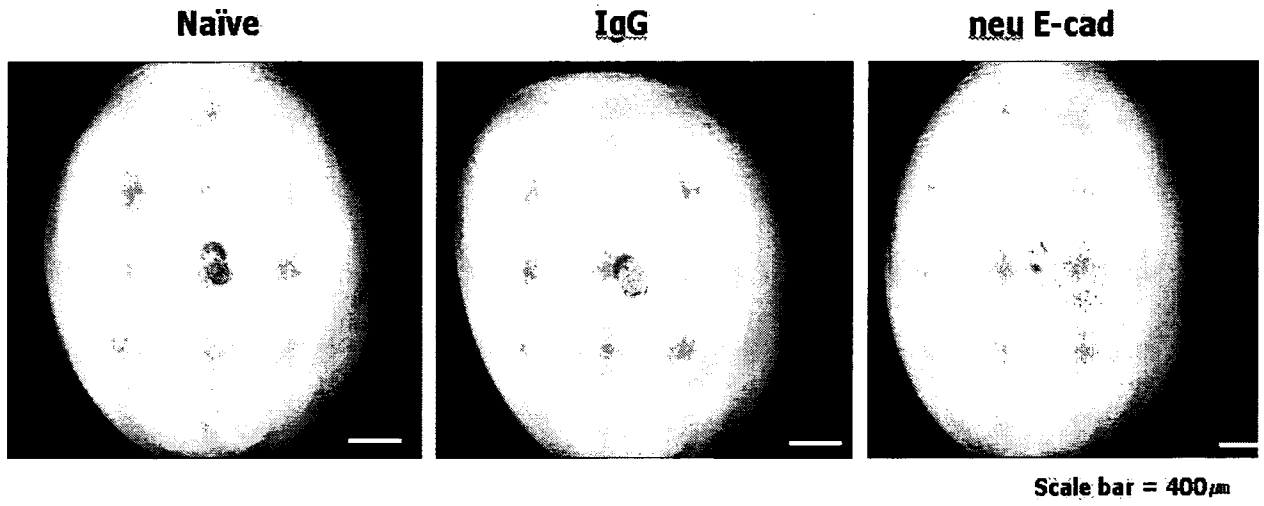


Green: Isolectin B4 staining

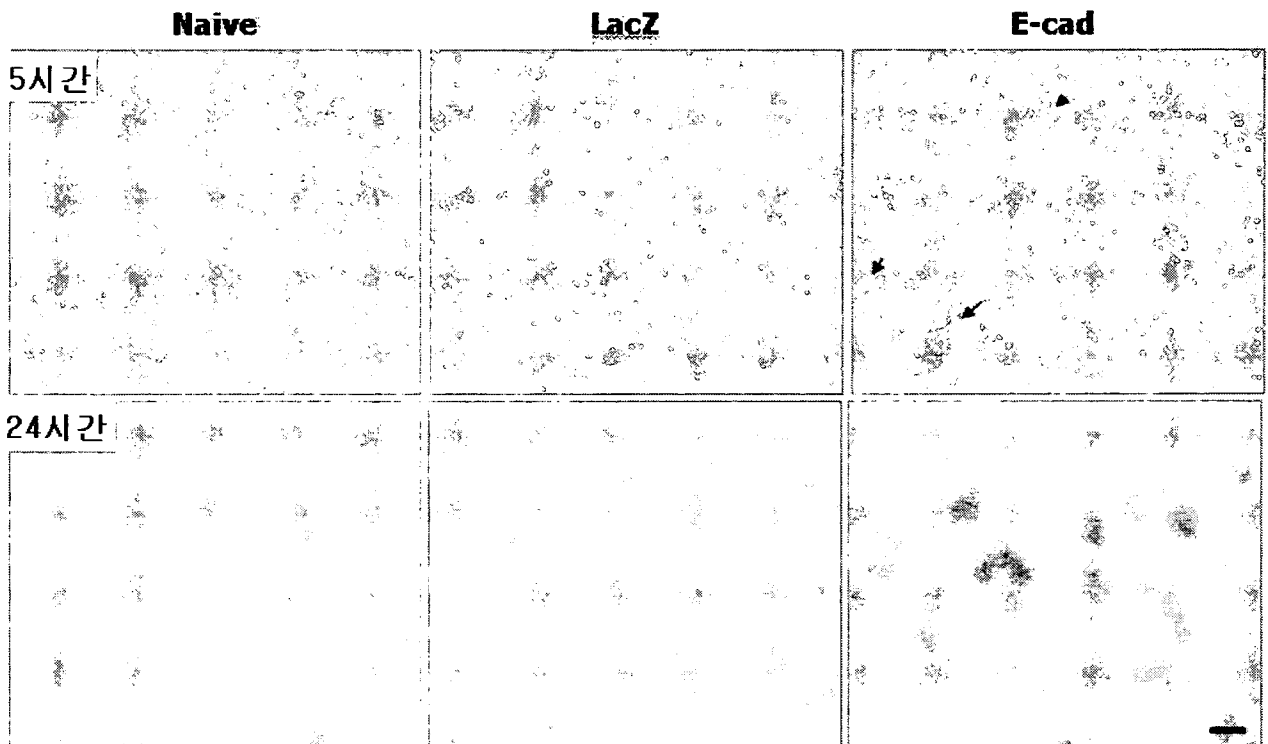


9/18

도 13



도 14

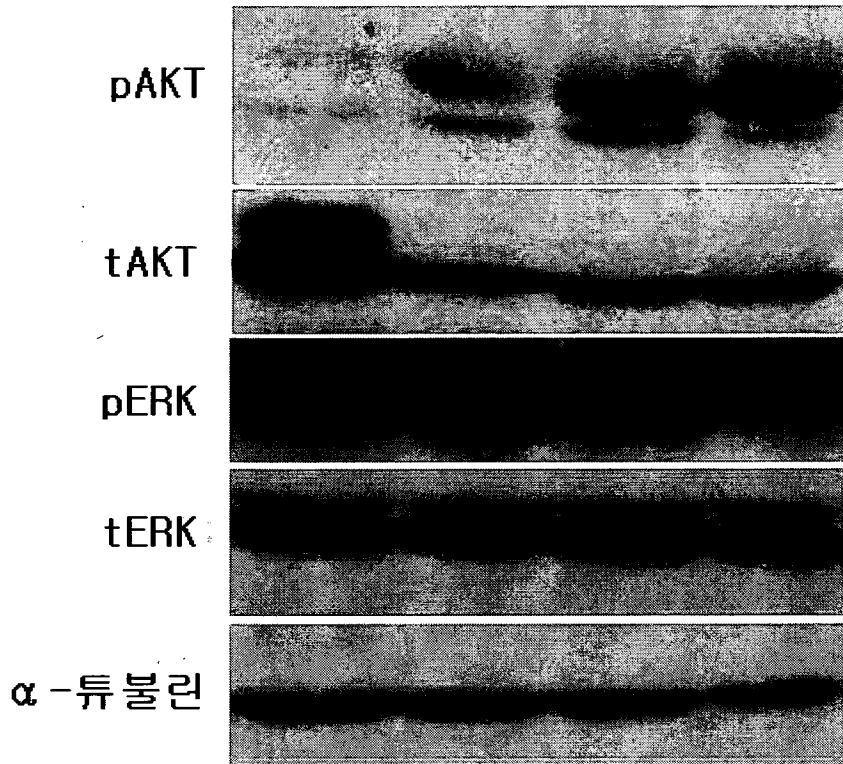


10/18

도 15

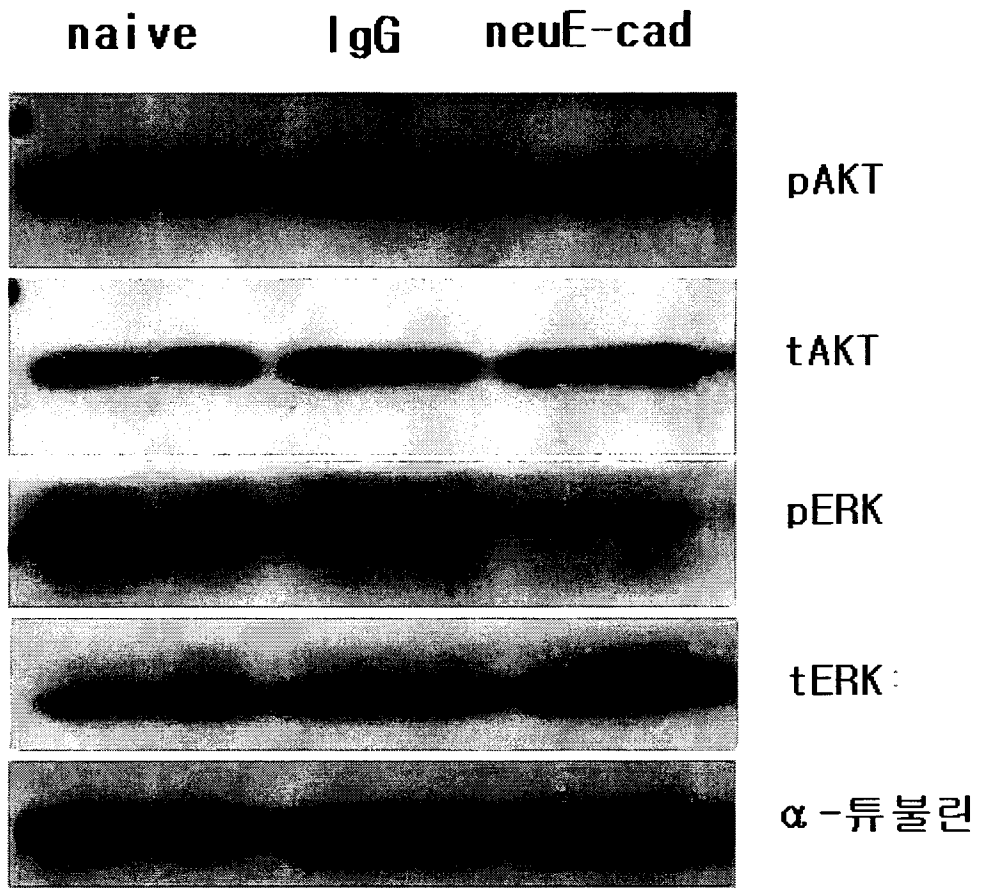
부유 배양  
(Anchorage deprivation)

단층      30분   1시간   3시간



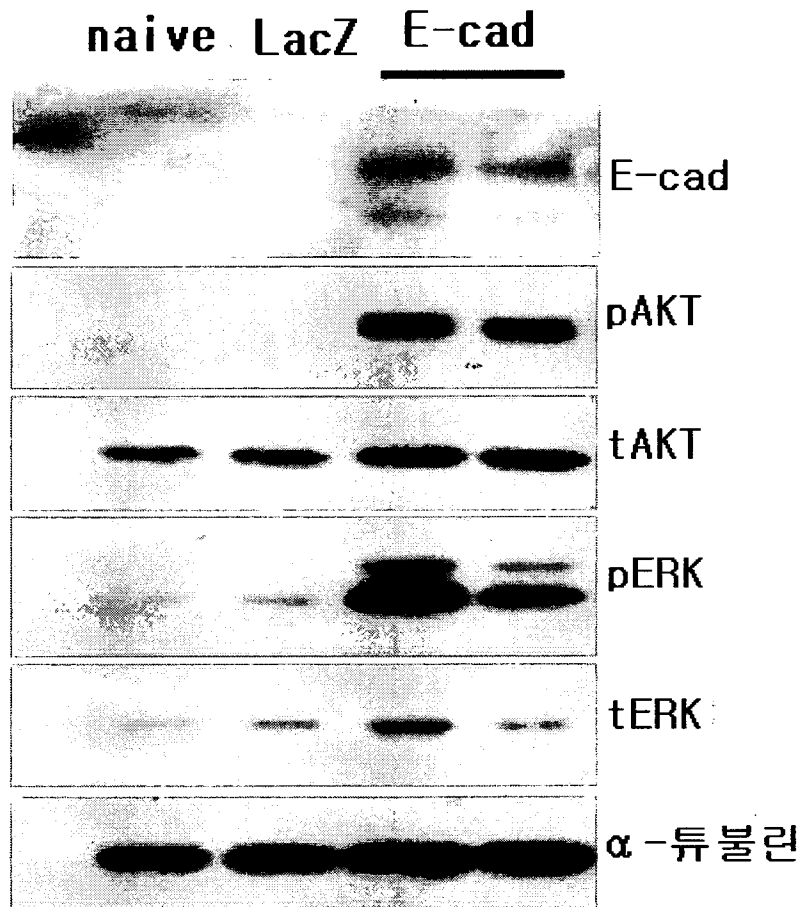
11/18

도 16



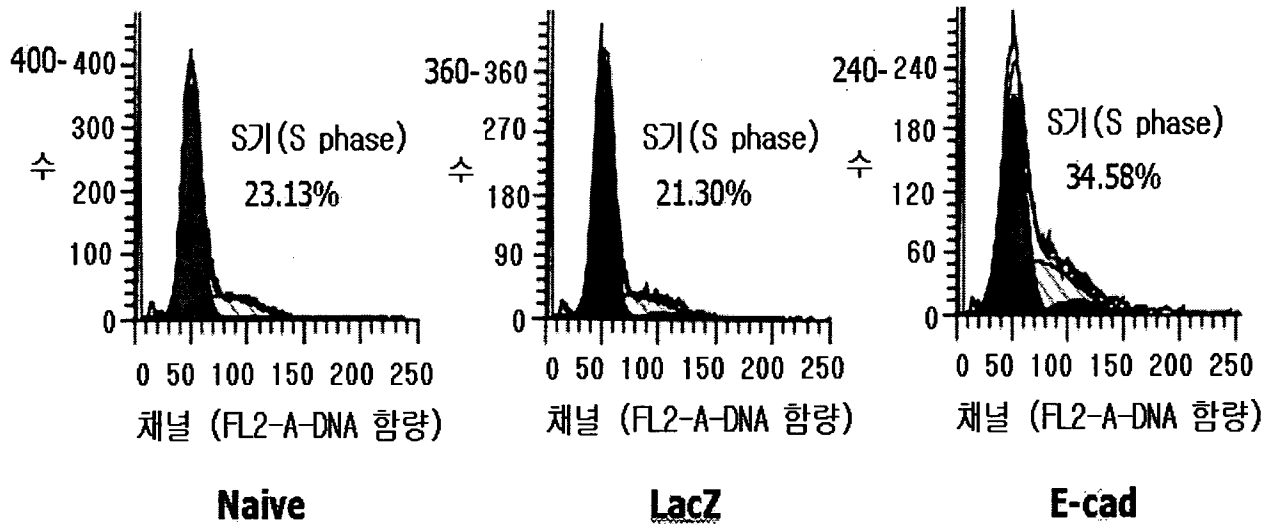
12/18

도 17

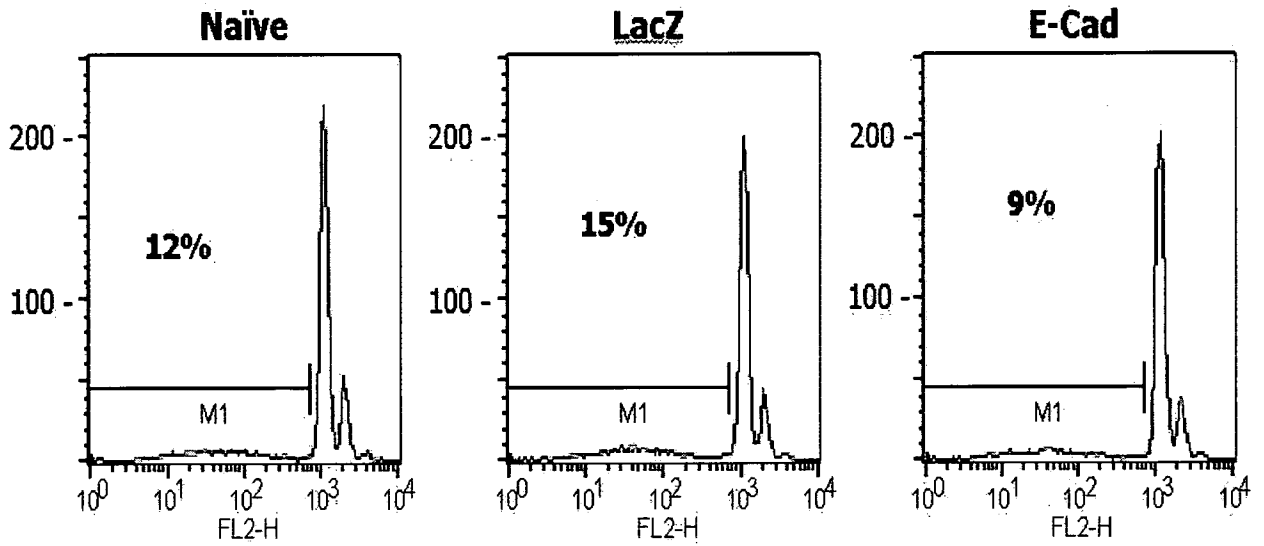


13/18

도 18

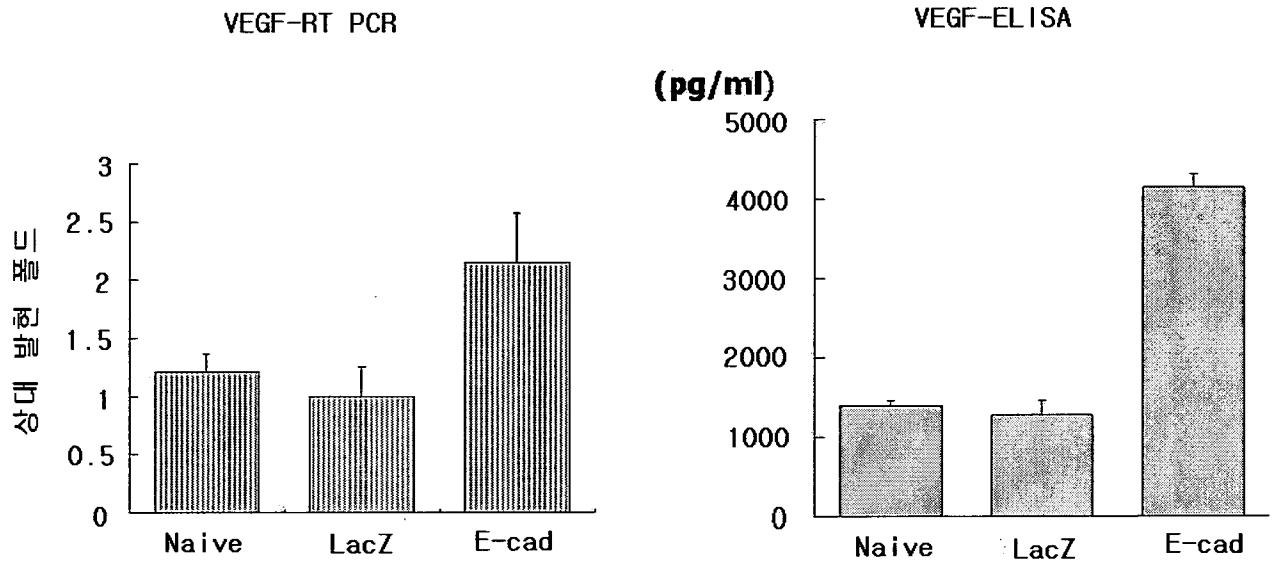


도 19

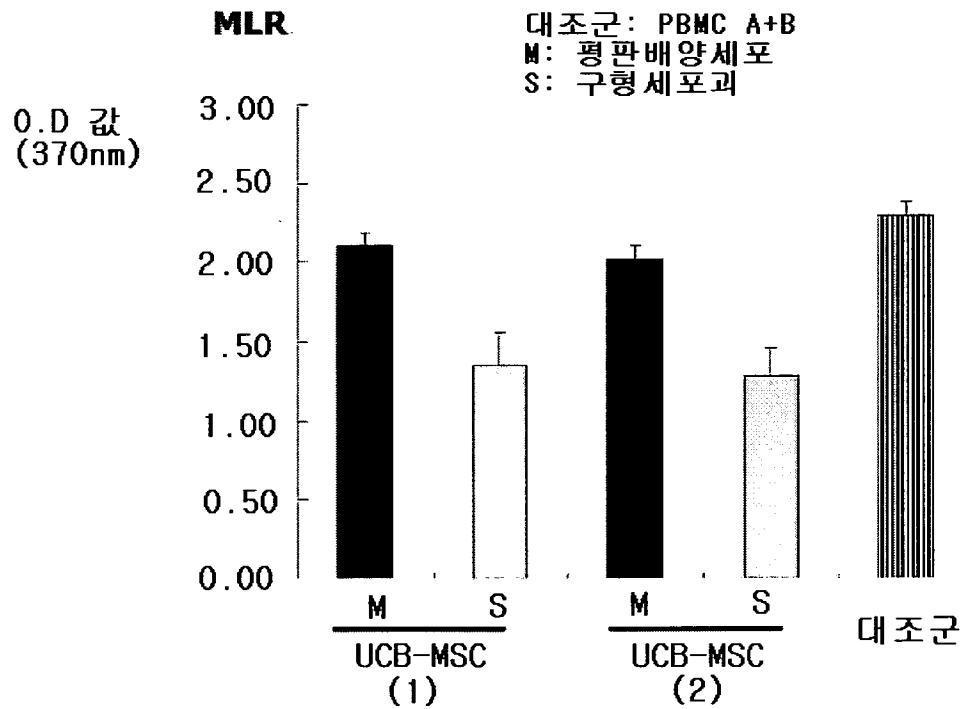


14/18

도 20



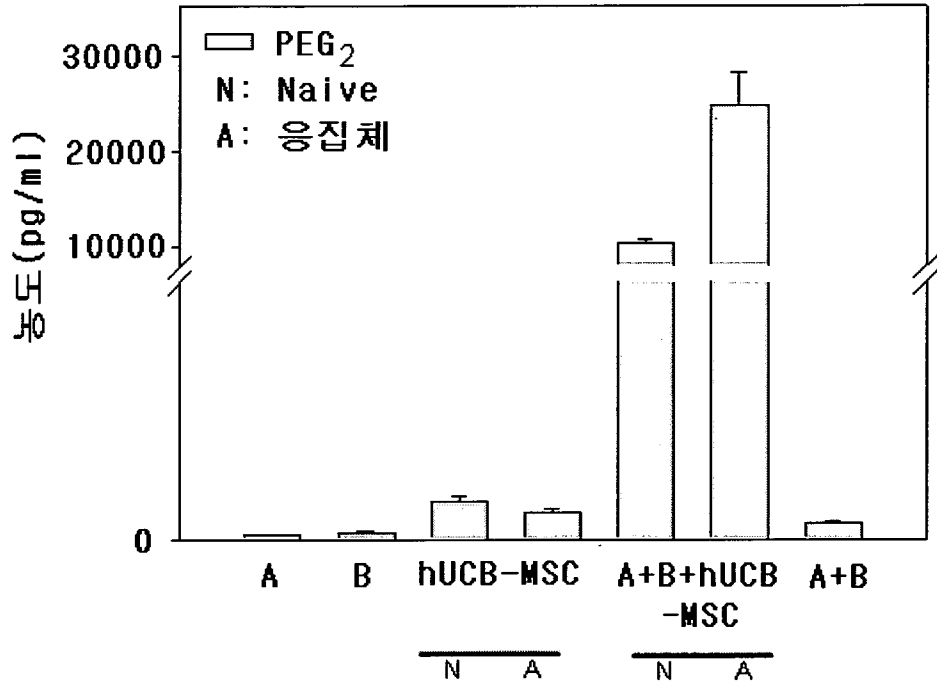
도 21



15/18

도 22

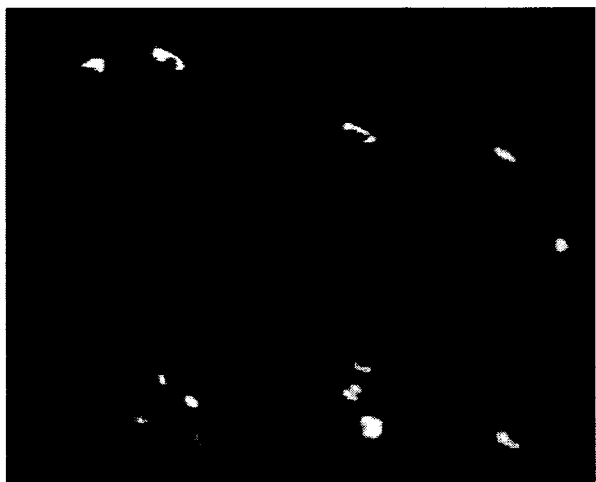
PEG<sub>2</sub> ELISA 분석



도 23

Naïve

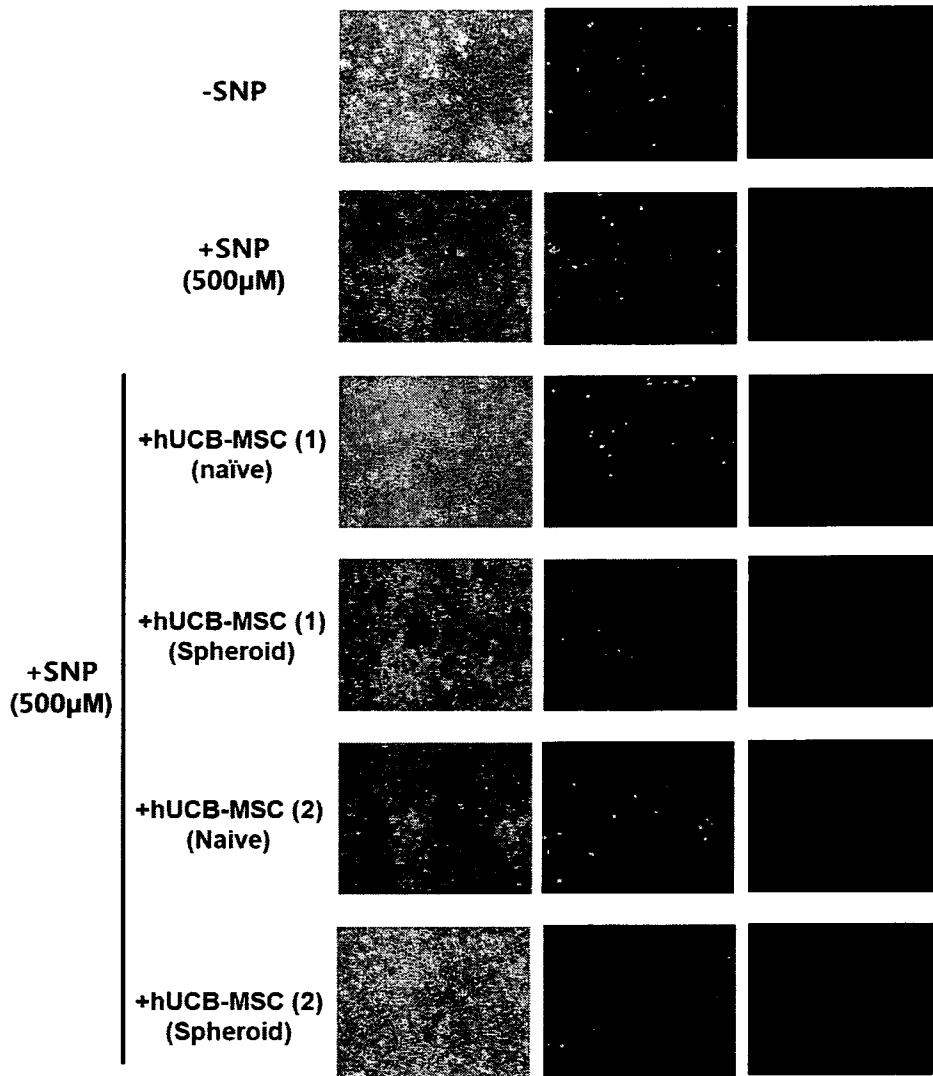
Spheroid



F4/80/DiI/DAPI

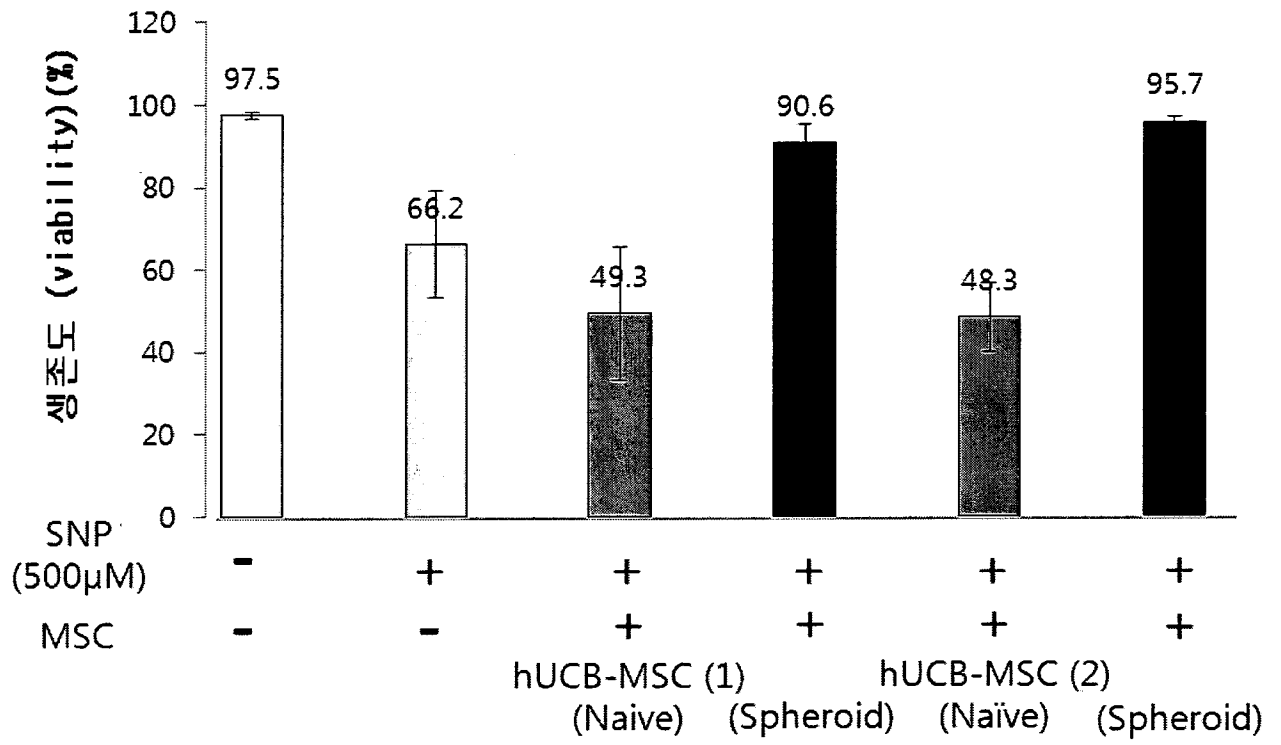
16/18

도 24A



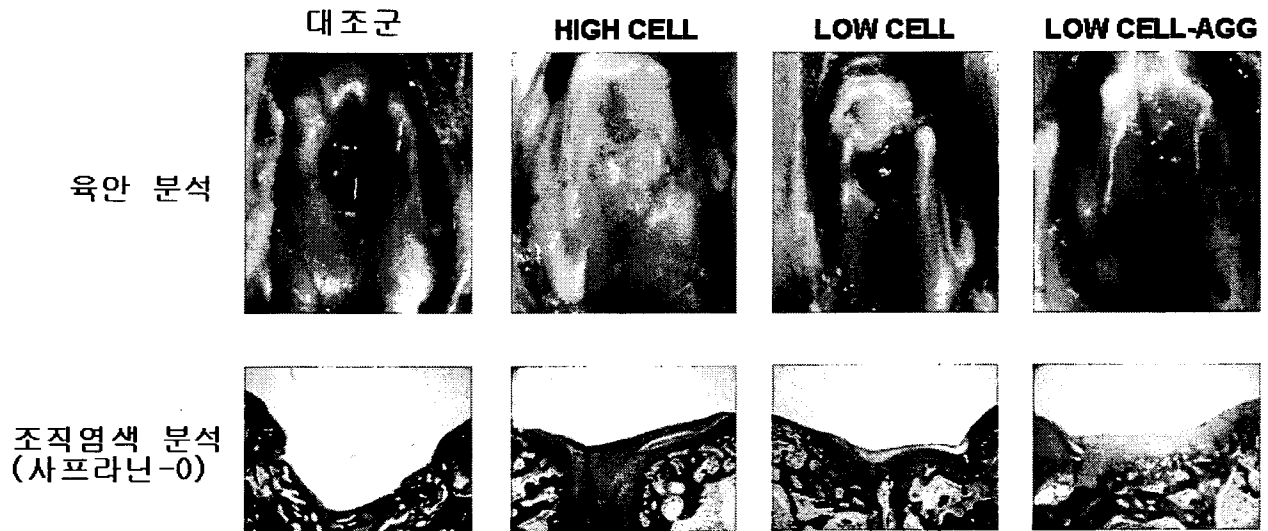
17/18

도 24B



18/18

도 25



도 26

