



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0139816
(43) 공개일자 2022년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61P 13/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0665 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0043146
(22) 출원일자 2022년04월07일
심사청구일자 2022년04월07일
(30) 우선권주장
1020210045743 2021년04월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
신동명
서울특별시 강동구 고덕로 131, 105동 2904호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
김승후
서울특별시 송파구 오금로31길 28, 103동 1312호(방이동, 코오롱아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

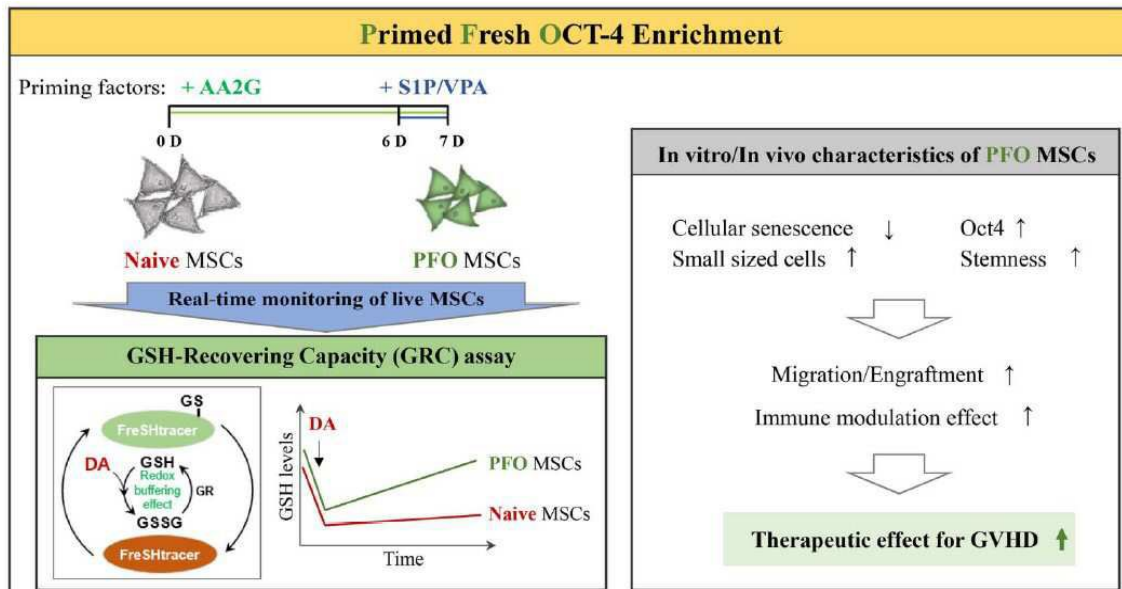
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포 항산화능, 생착률, 줄기세포성을 동시에 증진시키는 단일 공정 배양 방법을 이용한 난치성 면역질환 치료 용도

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 항산화능, 생착률, 줄기세포성을 동시에 증진시키는 단일 공정 배양 방법을 이용한 난치성 면역질환 치료 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 PFO 공정(Primed Fresh OCT-4 enrichment)을 통해 줄기세포 항산화능, 생착률, 줄기세포성을 동시에 증진시키는 단일 공정 배양 기술에 대한 것이다. 본 발명의 PFO 공정에 의해 배양된 줄기세포능을 글루타치온(glutathione; GSH) 회복능(GSH-recovering capacity; GRC) 분석을 통해 평가한 결과, PFO MSCs의 줄기세포능이 향상되었으며, 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD), 천식 및 방광 질환 치료 효과도 향상시키는 것을 확인하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 11/06 (2018.01)

A61P 13/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

C12N 5/0667 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111009
과제번호	2018R1A5A2020732
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	줄기세포 면역제어 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 분리된 중간엽줄기세포에 아스코르브산 2-글루코사이드(ascorbic acid 2-glucoside; AA2G)를 처리하여 계대 배양하는 단계; 및
- 2) 상기 계대배양에 스펅고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 및 발프로익산(valproic acid; VPA)을 첨가하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래 중간엽줄기세포(umbilical cord derived MSCs; UC-MSCs) 또는 지방 유래 중간엽줄기세포(adipose derived MSCs; AD-MSCs)인 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 1) 단계는 0.1 내지 0.75 mM의 AA2G를 처리하여 4일 내지 11일 동안 계대배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 2) 단계는 10 내지 50 nM의 S1P 및 0.1 내지 1.0 mM의 VPA를 첨가하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법에 의해 활성화 촉진된 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상되고, 줄기세포성, 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성화, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성, 자가재생, 세포이동, 생착능, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진된 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법.

청구항 6

0.1 내지 0.75 mM의 AA2G, 10 내지 50 nM의 S1P 및 0.1 내지 1.0 mM의 VPA를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래 중간엽줄기세포(umbilical cord derived MSCs; UC-MSCs) 또는 지방 유래 중간엽줄기세포(adipose derived MSCs; AD-MSCs)인 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상되고, 줄기세포성, 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성화, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성, 자가재생, 세포이동, 생착능, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진된 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진용 조성물.

청구항 9

AA2G, S1P 및 VPA를 처리하여 활성화 촉진된 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성

면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 AA2G는 0.1 내지 0.75 mM 농도로, 상기 S1P는 10 내지 50 nM 농도로, 상기 VPA는 0.1 내지 1.0 mM 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래 중간엽줄기세포(umbilical cord derived MSCs; UC-MSCs) 또는 지방 유래 중간엽줄기세포(adipose derived MSCs; AD-MSCs)인 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상되고, 줄기세포성, 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성, 자가 재생, 세포이동, 생착능, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진된 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 난치성 면역질환은 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD), 천식, 저활동성 방광 또는 과민성 방광인 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 SV2A, CD2AP 및 ALDH6A1로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포 항산화능, 생착률, 줄기세포성을 동시에 증진시키는 단일 공정 배양 방법을 이용한 난치성 면역질환 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSCs)는 생체 내 투여 이후 조직 특이적 세포를 생착시키고 직접 재생하는 능력을 통해 조직 손상을 복구할 수 있다. 또한, 이들 전구세포는 성장 인자 또는 기질 단백질을 공급하고, 세포-세포 상호 작용을 매개함으로써, 면역 조절, 항염증 또는 혈관신생 촉진 활성을 포함하는 유리한 미세환경을 제공한다. 이들 다능성 세포는 골수(bone-marrow; BM), 체대혈 및 양수와 같은 여러 성인 또는 태아 조직으로부터 분리된다. 최근, 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs) 및 유도 만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)와 같은 만능줄기세포(pluripotent stem cells; PSCs)로부터 MSCs를 직접 유도하는 것이 효과적인 대안으로 나타나고 있는데, 이는 생체 외 확장에 따른 예측할 수 없는 기능 손실 및 이질성과 같은 성인 조직 대비 한계를 극복하면서 충분한 세포수를 얻기 위함이다.

[0003] 여러 원인 및 이들 여러 측면의 효과로 인한 실질적인 이점 때문에, MSC-기반 치료는 다양한 난치성 심혈관, 근골격, 신경학적, 면역학적 및 비뇨기과적 장애를 치료하기 위해 제안되고 있으나, 이들의 성과에 대한 논란은 임상적 적용을 방해하고 있다. 보다 중요한 것은, 이식 후 이들 세포의 생체 내 행동을 유도하는 기본적인 특징에 대한 정보가 부족하여, MSC 치료의 유망한 전임상 연구를 임상 시험으로 진전시키는데 어려움이 있다. 이에, 병리학적 환경에서 생착된 MSCs의 생물학적 및 분자적 특성을 동적으로 모니터링하면, 전달과 같은 과정을 촉진할 뿐만 아니라 치료 효과의 조기 예측도 가능하다는 점이 강조되고 있다. 하지만, MSC 생착 과정, 특히 계층-와이드 수준에서 미세 환경 및 분자 프로파일 간의 상호작용에 대한 심층적인 정보는 여전히 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2097191호 (2020.03.30 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 분리된 중간엽줄기세포에 아스코르브산 2-글루코사이드(ascorbic acid 2-glucoside; AA2G), 스프링고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 및 발프로익산(valproic acid; VPA)를 처리하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법을 제공하는 데에 있다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 AA2G, S1P 및 VPA를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 AA2G, S1P 및 VPA를 처리하여 활성이 촉진된 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 분리된 중간엽줄기세포에 아스코르브산 2-글루코사이드(ascorbic acid 2-glucoside; AA2G)를 처리하여 계대배양하는 단계; 및 2) 상기 계대배양에 스프링고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 및 발프로익산(valproic acid; VPA)을 첨가하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 0.1 내지 0.75 mM의 AA2G, 10 내지 50 nM의 S1P 및 0.1 내지 1.0 mM의 VPA를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 AA2G, S1P 및 VPA를 처리하여 활성이 촉진된 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 줄기세포 항산화능, 생착률, 줄기세포성을 동시에 증진시키는 단일 공정 배양 방법을 이용한 난치성 면역질환 치료 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 PFO 공정(Primed Fresh OCT-4 enrichment)을 통해 줄기세포 항산화능, 생착률, 줄기세포성을 동시에 증진시키는 단일 공정 배양 기술에 대한 것이다. 본 발명의 PFO 공정에 의해 배양된 줄기세포능을 글루타치온(glutathione; GSH) 회복능(GSH-recovering capacity; GRC) 분석을 통해 평가한 결과, PFO MSCs의 줄기세포능이 향상되었으며, 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD), 천식 및 방광 질환 치료 효과도 향상시키는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 아스코르브산 2-글루코사이드(ascorbic acid 2-glucoside; AA2G)와, 저농도의 스프링고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P, 50 nM) 및 발프로익산(valproic acid; VPA, 0.5 mM)를 첨가하여, 작은 크기 및 높은 글루타치온(glutathione; GSH) 동역학으로 특징되는 원시성 MSCs를 보존하기 위해 최적의 환경을 제공하는 PFO(Primed Fresh OCT-4 enrichment) 공정의 모식도를 나타낸다.

도 2는 PFO 공정이 NRF2 경로를 활성화시킨다는 결과를 나타낸다.

도 3은 PFO 공정이 원시성 작은 크기의 UC-MSCs를 유지시킨다는 결과를 나타낸다.

도 4는 높은 GSH 동역학을 가진 작은 크기의 UC-MSCs가 향상된 면역조절 기능을 나타낸다는 결과이다.

도 5는 MSCs의 특성에 대한 PFO 공정의 효과를 나타낸다.

도 6은 인간 AD-MSCs에서 PFO 공정의 효과를 나타낸다.

도 7은 PFO 공정이 인간 UC-MSCs의 복제 유도 노화를 보호한다는 결과를 나타낸다.

도 8은 PFO UC-MSCs에서 *OCT4-A* 및 *SOX2*의 발현 결과를 나타낸다.

도 9는 인간 UC-MSCs의 핵심 기능에 대한 PFO 공정의 효과를 나타낸다.

도 10은 인간 AD-MSCs에서 PFO 공정의 유익한 효과를 나타낸다.

도 11은 PFO UC-MSCs의 유전자 발현 프로파일 결과를 나타낸다.

도 12는 높은 GRC MSCs가 GVHD의 치료 효과를 향상시킨다는 결과를 나타낸다.

도 13은 GVHD 치료에 있어 PFO UC-MSCs의 생체 내(*in vivo*) 치료 효과 및 생착 효과 개선에 대한 결과를 나타낸다.

도 14는 GVHD 마우스의 혈청에서의 사이토카인 프로파일 결과를 나타낸다.

도 15는 PFO MSCs의 전사체(Transcriptome) 분석 결과를 나타낸다.

도 16 내지 도 20은 PFO MSCs의 전사체(Transcriptome) Gene Ontology, Gene network 분석 결과를 나타낸다.

도 21 내지 도 23은 PFO MSCs의 메틸롬(Methylome) 분석 결과를 나타낸다.

도 24 내지 도 26은 PFO MSCs의 단백질체(Proteome) 및 단백질 분비체(Secretome) 분석 결과를 나타낸다.

도 27 내지 도 29는 PFO MSCs의 단일세포 전사체 분석 결과를 나타낸다.

도 30 내지 도 32는 Th2 면역 반응 유도 천식 질환 모델에서 PFO-MSCs 치료 효능 평가 결과를 나타낸다.

도 33 내지 도 39는 PFO-MSC에 의한 당뇨병 저활동성 방광(streptozotocin induced detrusor underactivity, STZ-DUA)의 생체내(*in vivo*) 치료 효과 결과를 나타낸다.

도 40은 만성 방광 허혈(Chronic bladder ischemia; CBI) 손상 유도 저활동성 방광 (CBI induced DUA) 질환 모델에서 PFO-MSCs 치료 효능 평가 결과를 나타낸다.

도 41은 만성 방광 허혈 유도 과민성 방광(CBI induced OAB) 질환 모델에서 PFO-MSCs 치료 효능 평가 결과를 나타낸다.

도 42 내지 도 44는 PFO-MSC 특징적 역가 단백질에 대한 시험관 내(*in vitro*) 유효성 평가 결과를 나타낸다.

도 45는 PFO-MSC 특징적 역가 단백질에 대한 생체 내(*in vivo*) 유효성 평가 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 1) 분리된 중간엽줄기세포에 아스코르브산 2-글루코사이드(ascorbic acid 2-glucoside; AA2G)를 처리하여 계대배양하는 단계; 및 2) 상기 계대배양에 스핑고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P) 및 발프로익산(valproic acid; VPA)을 첨가하는 단계를 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진 방법을 제공한다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래 중간엽줄기세포(umbilical cord derived MSCs; UC-MSCs) 또는 지방 유래 중간엽줄기세포(adipose derived MSCs; AD-MSCs)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 1) 단계는 0.1 내지 0.75 mM의 AA2G를 처리하여 4일 내지 11일 동안 계대배양할 수 있고, 상기 2) 단계는 10 내지 50 nM의 S1P 및 0.1 내지 1.0 mM의 VPA를 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 방법에 의해 활성이 촉진된 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상되고, 줄기세포성, 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성화, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성, 자가재생, 세포이동, 생착능, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또한, 본 발명은 0.1 내지 0.75 mM의 AA2G, 10 내지 50 nM의 S1P 및 0.1 내지 1.0 mM의 VPA를 유효성분으로 포함하는 중간엽줄기세포 활성화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래 중간엽줄기세포(umbilical cord derived MSCs; UC-MSCs) 또는

지방 유래 중간엽줄기세포(adipose derived MSCs; AD-MSCs)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0019] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상되고, 줄기세포성, 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성, 자가재생, 세포이동, 생착능, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이밍(Priming)"은 줄기세포의 치료 효능을 증진시키기 위하여 반응성(활성)이 향상되는 현상을 의미한다.
- [0021] 또한, 상기 활성 촉진용 조성물은 치료를 위한 세포치료제와 혼합하여 생체 내 주입함으로써 세포치료제의 생체 내 효과를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 줄기세포 자체에 본 조성물을 처리한 후 기능이 증가된 세포치료제를 생체 내 이식하는 방법으로도 사용될 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 AA2G, S1P 및 VPA를 처리하여 활성이 촉진된 중간엽줄기세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 난치성 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 AA2G는 0.1 내지 0.75 mM 농도로, 상기 S1P는 10 내지 50 nM 농도로, 상기 VPA는 0.1 내지 1.0 mM 농도로 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래 중간엽줄기세포(umbilical cord derived MSCs; UC-MSCs) 또는 지방 유래 중간엽줄기세포(adipose derived MSCs; AD-MSCs)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 세포 내 글루타치온 수준 및 글루타치온 회복능(glutathione-recovering capacity; GRC)이 향상되고, 줄기세포성, 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성, 자가재생, 세포이동, 생착능, 항염증 및 T-세포 억제능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 줄기세포 활성이 촉진될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 난치성 면역질환은 이식편대숙주질환(Graft-versus-host disease; GVHD), 천식, 저활동성 방광 또는 과민성 방광일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 중간엽줄기세포는 SV2A, CD2AP 및 ALDH6A1로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 특이적으로 발현할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, "배양액"은 생체 외에서 줄기세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지, 상기 배지에 포함된 배양된 줄기세포의 분비물 등을 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium: CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α MEM (α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0029] 또한, 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명은 상기 줄기세포, 이의 분비물, 배지 성분을 모두 포함하는 형태, 분비물 및 배지성분만을 포함하는 형태, 분비물만을 분리하여 단독으로 또는 줄기세포와 함께 사용하는 형태, 또는 줄기세포만을 투여하여 체내에서 분비물을 생성하는 형태로 사용하는 것도 모두 가능하다.
- [0031] 상기 줄기세포는 통상적으로 당업계에 공지된 어떠한 방법을 이용하여 획득할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 AA2G, S1P 및 VPA를 처리하여 활성이 촉진된 중간엽줄기세포는 특정 질환의 치료를 위한 세포치료제로 이용될 수 있으며, 상기 처리는 상기 분자들의 직접적인 처리 또는 전-처리일 수 있다.
- [0033] 상기 "세포치료제"란, 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 여타 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련

의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0034] 상기 세포 치료제는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038] <실험예>

[0039] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0040] 1. 연구 승인

[0041] 모든 동물 실험들은 울산대학교 의과대학의 동물실험윤리위원회로부터 승인받았다(IACUC-2020-12-141). 서울아산병원의 인체실험윤리위원회에서 승인한 가이드라인(IRB#: 2015-0303)에 따라 부모의 서면 동의를 얻은 후, 건강하고, 정상적이며, 만삭인 출생아로부터 인간 태줄(umbilical cord; UC) 및 지방 샘플을 얻었다. UC 수집 전, 모든 임산부로부터 사전 동의를 얻었다.

[0042] 2. 세포 배양 및 MSCs의 시험관 내(in vitro) 특성 분석

[0043] 10% 열 불활화된 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 5 ng/ml 인간 상피 성장인자(Sigma-Aldrich), 10 ng/ml basic FGF 및 50 ng/ml long-R3 인슐린 유사 성장인자-1(ProSpec, Rehovot, Israel)을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM에서, 인간 UC MSCs (UC-MSCs)을 배양하였다. 인간 지방 조직 유래 MSCs(adipose tissue derived MSCs; AD-MSCs)는 이전에 보고된 대로 확립하였고, UC-MSCs와 동일한 과정으로 유지시켰다. 본 발명에 사용된 모든 MSCs는 기능성을 확보하기 위해서 7 세대 이하로 확장시켰고, 37℃에서 5% CO₂의 습윤 대기에서 유지시켰다. 세포 증식, 자가-재생을 위한 콜로니 형성 유닛(CFU)-섬유아세포, 혈소판-유래 성장 인자에 반응하는 트랜스-웰 이동(10 ng/mL PDGF-AA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 매트릭셀 관-형성 분석을 통한 혈관형성능, 시험관 내(In vitro) 항-염증, 면역 조절 및 동종 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR) 분석을 통한 동종 자극에 반응하는 억제 특성을 포함하는 시험관 내(In vitro) MSCs 세포 활성 분석은 이전에 보고된 대로 수행하였다. MSCs의 핵심 기능은 Image Pro 5.0 software (Media-Cybernetics, Rockville, MD, USA)를 이용하여 디지털 이미지 분석을 통해 정량화하였다. FACS 데이터 분석은 FlowJo software 7.6.5 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0044] 3. 인간화된 GVHD 동물 모델

[0045] GVHD 동물모델 제작을 위해, 9주령 수컷 NOD/ShiLtJ-*Prkdc*^{em1AMC}*I12rg*^{em1AMC} (NSG) 마우스(26-29 g)는 JOONGAH BIO (JA BIO, Suwon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea)로부터 구입하였고, X-RAD 320 X-ray irradiator (Precision X-ray, North Branford, CT, USA)를 사용하여 2.0 Gy로 조사하였다. 조사 후 24시간 내에, GVHD를

유도하기 위해, 1.0×10^6 인간 PBMCs (#70025; STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) 또는 동일 부피의 포스페이트-완충된 식염수(phosphate-buffered saline; PBS; Sham group)을 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 치료 옵션에 있어서, 정상 배양(naive) 또는 PFO 공정하에서 확장된 인간 UC-MSCs는 인간 PBMCs의 주입 18일 후, 100 μ L PBS 내 1×10^5 세포 밀도로 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. Sham 및 GVHD 그룹에 대해, 대조군으로 PBS를 단독 주입하였다. 마우스는 치료 그룹에 임의로 배정하였고, 조사, 세포 이식, 또는 비히클 주입 및 일일 검사의 순서는 임의로 진행하였다. 치료 그룹은 GVHD 유도 절차에 관련된 연구자에게는 숨졌다.

[0046] 4. GVHD 동물 평가

[0047] GVHD의 임상 증상은 체중 감소, 생존율, 허리 구부러짐 및 털 질감을 측정하여 매일 평가하였고, GVHD 유도 후 60일 동안, 그룹 당 5마리 마우스를 이틀마다 기록하였다. 인간 PBMCs의 주입 6주 후에, 그룹 당 5마리 마우스의 독립적 실험 세트를 사용하여, GVHD 표적 기관(폐, 간, 신장 및 소장)의 조직학적 평가, 공여 T 세포군에 대한 면역학적 분석 및 다중 인간 사이토카인 분석을 수행하였다. 모든 GVHD 증상, 조직학적 분석, 사이토카인 및 비장 림프구 평가는 블라인드된 연구자에 의해 수행되었다.

[0048] 공여 T 세포 증식에 있어서, GVHD 마우스 비장으로부터 분리된 세포는 500 μ L PBS에 재현탁되었고, FITC- 또는 PE-접합된 1차 항체들로 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 인간 항원 CD3 (#300412), CD4 (#300512) 및 CD45 (#555483)과, 마우스 항원 CD45 (#553079)에 대한 1차 항체들은 BD Biosciences로부터 구입하였다. 세포의 형광 세기는 BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 데이터는 FlowJo software 7.6.5 (FlowJo)를 사용하여 분석하였다.

[0049] 다중 사이토카인 분석을 위해, Magnetic Luminex Screening Assay Human Premixed Multi-Analyte Kit (#LXSAHM-28, R&D Systems)를 사용하여, 인간화된 GVHD 마우스 유래 혈청을 분석하였다. 28-plex 인간 사이토카인들의 측정 및 정량화는 KOMA BIOTECH INC. (Seoul, Korea)에 의뢰하였고, Varioskan Flash Reader (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0050] 5. 살아있는 MSCs에서 GRC의 실시간 관측

[0051] 다양한 배양 조건하에서 살아있는 모든 단일 세포의 GSH 변화를 실시간 추적하기 위해서, 본 발명자들은 $\times 200$ 또는 $\times 400$ 배율을 가진 Operetta High-Content Imaging System (HH12000000; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여, GRC 분석을 수행하였다. 상기 GRC 분석은 살아있는 MSCs에서 GSH 동역학의 정성 및 정량 분석을 위해 비-과괴, 통합 및 이미지 기반 고처리 분석으로 수행되었다. GRC 분석은 GSH에 대한 가역적 화학 프로브인, FreSHtracrer (Fluorescent real-time thiol tracer; Cell2in, Inc., Seoul, Korea)의 독특한 특성을 기반으로 하여 수행되었다. GSH와의 반응에서, FreSHtracrer는 520 nm부터 430 nm까지 자외선-가시광선 흡광도의 $\lambda_{\max}$ 스펙트럼 이동을 나타냈는데, 이는 580 nm (F_{580} , λ_{ex} 520 nm)에서의 형광 방출 세기는 감소하는 것으로 나타났다, 510 nm (F_{510} , λ_{ex} 430 nm)에서의 형광 세기는 증가하는 것으로 나타났다. FreSHtracrer의 형광 비율 (fluorescence ratio; FR) 수치를 얻기 위해서, 430 및 520 nm에서 여기되는 형광 방출을 510 및 580 nm에서 각각 검출하였다. 상기 FreSHtracrer의 형광 신호는 공초점 모드를 가진 Harmony High-Content Imaging and Analysis Software 3.1 (PerkinElmer)를 사용하여 분석하였다.

[0052] 6. 유전자 발현 및 웨스턴 블랏팅 분석

[0053] 표시된 유전자들의 전사체에 대한 정량적 측정은 이전에 보고된 대로 50 ng의 총 RNA를 사용하여 수행하였다. 상기 유전자들의 상대 발현 수준은 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 방법을 사용하여 측정하였고, *GAPDH*는 내재성 대조군 유전자로서 사용되었다.

[0054] 웨스턴 블랏 분석을 위해, RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로, 세포 추출물(30 μ g)을 제조하였고, SDS-PAGE 젤 상에서 분리하였다. 표시된 단백질들의 발현 수준은 특정 항체들을 프로브로 하여 측정하였다. 표시된 단백질들에 대한 신호 밀도는 NIH Image J software를 사용하여 측정하고 정량화하였다.

[0055] 7. 크로마틴-면역침전(Chromatin-immunoprecipitation; ChIP) 분석

[0056] ChIP 분석은 Magna ChIP G Kit (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여, 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 자세한 과정은 acetylated histone-3 (H3Ac), tri-methylation at lysine-4 of histone-3 (H3K4me3) 및 tri-methylation at lysine-27 of histone-3 (H3K27me3)에 대한 3 μ g의 ChIP 등급 항체를 사용하여, 이전에 보

고된 대로 수행하였다.

8. 면역염색

OCT4-A 단백질을 검출하기 위해서, 인간 MSCs는 4% 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich)로 30분 동안 고정시켰고, OCT4-A에 특이적인 항체(#Ab62352; Abcam)로 염색하였으며, 이후 Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibody (#A11008, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 표지하였다. 핵은 DAPI (Sigma-Aldrich)로 대비염색하였다. 이미지들은 ZEISS LSM800 confocal microscope system (Carl Zeiss, Munich, Germany)를 사용하여 획득하였다.

9. 통계적 분석

데이터는 Bonferroni post-hoc test와 함께, non-parametric Mann-Whitney test 또는 ANOVA (one- or two-way)를 사용하여 통계적으로 분석하였다. 모든 분석은 GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

10. 전사체 분석

전사체 분석을 위하여 상기 작성한 실험 방법대로 Naive 와 PFO MSC로부터 RNA를 분리하였다. Affymetrix GeneChip Human (for hESC-derived M-MSCs) 20 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)을 사용하는 분석을 위해, 1 마이크로그램의 총 RNA를 적용하였다. 마이크로어레이 이미지 데이터는 GeneChip GCS3000 Scanner and Command Console software (Affymetrix)로 가공하였다. 6개의 샘플(각 그룹에서 3개의 독립적인 샘플)의 CEL 파일을 가져온 후, Affymetrix Expression Console Software에서 구현된 강력한 multi-average (RMA) 방법을 사용하여 데이터를 요약하고 표준화하였다.

유전자 네트워크, 생체 기능 및 표준 경로에 대한 전사체 데이터베이스의 기능적 분석을 위해, 기본 설정으로 MetaCore microarray software (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA) 또는 geneset enrichment analysis (GSEA; Broad Institute, Cambridge, MA, USA)을 사용하였다. MetaCore 분석에 있어서, $p < 0.05$ 인, 15배 이상 상향- 또는 하향-조절된 유전자들은 유의적으로 변화가 있는 것으로 정의하였다. GSEA에 있어서, 유전자 세트들은 공개된 문헌으로부터 얻거나, 선별된 기능적 유전자 세트(C2) 데이터베이스에서 필터링하였다. 유의적 차이는 오류 발견 비율(false discovery rate; FDR) < 0.25 을 기반으로 결정하였다.

11. 단일세포 전사체 분석

단일세포 전사체 분석을 위한 단일세포로 분리한 PFO MSC에서 RNA를 추출한 후, 단일세포 cDNA 라이브러리 합성은 이전에 보고된 대로 T7-primed 단일세포 cDNA 라이브러리로 증폭되었다. 본 실험은 이바이오젠 사에 의뢰하여 진행하였으며 실험방법은 PFO MSC의 cDNA 라이브러리의 초기 스크리닝에서, 20배 희석된 T7-primed PCR 증폭 산물을 이용하여, human GAPDH 발현량을 조사하여, transcriptome 분석이 가능한 수준의 단일세포 cDNA 라이브러리만을 게놈-와이드 분석을 위해 선택되었는데, 젤-용출된 T7-primed 라이브러리는 GeneChip 3' *in vitro* transcription kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 비오틴-표지되었다.

단일세포 라이브러리 유래 비오틴-표지된 aRNA를 절편화하였고, Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array로 혼성화시켰다. 마이크로어레이 이미지 데이터는 GeneChip GCS3000 Scanner 및 Command Console software (Affymetrix)로 가공하였다. Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC)에서 제공되는 소프트웨어를 사용하여, Affymetrix 데이터 추출 프로토콜에서 미가공 데이터는 자동적으로 추출되었다.

전사체의 기능 분석 및 유전자 네트워크, 생물기능성 및 규정 경로의 코어 분석은 MetaCore (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA) 또는 GSEA (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) 마이크로어레이 소프트웨어 기본 설정을 이용하여 수행하였다. MetaCore 분석에서, $p < 0.05$ 의 1.5 배 상향- 또는 하향-조절은 유의성 있는 변화에 대한 컷오프 수치로 정의하였다. GSEA에서, 유전자 세트는 출판된 문헌에 얻었거나, 선별된 기능성 유전자 세트 (C2) 데이터베이스로부터 필터링되었다.

12. T helper (Th) type 2 반응 유도 천식 동물 모델 및 PFO-MSC의 투여

모든 동물실험은 울산대학교 의과대학의 동물실험 윤리위원회(IACUC-2015-12-061)에 의해 승인을 받았으며, 천식 마우스 모델을 제작하기 위해, 6 주령의 BALB/c 마우스(오리엔트바이오, 가평, 경기도, 한국)를 사용하였다. 0, 7 일 쯤에 2 mg Alum(Thermo, #77161, USA)로 복강 내 투여로 감작했고, 14, 15, 16, 21, 22, 23 일째에 50

μg OVA(Sigma, #A5503, USA)로 마취 후, 비강 내 투여로 challenge 하여 장애를 일으켰다. 상기 마우스는 17 일째에 정맥 주사를 통하여 1.0×10^5 개의 Navie MSC와 PFO MSC를 주입하였다. 마지막 면역화 후 24 시간 경과 한 마우스로부터 BALF, 림프절, 및 폐조직을 수득하였다. 모노사이트, 호염기성구, 호중성구, 및 림프구의 수와 BALF와 폐조직에서 사이토카인 발현 변화는 종래에 기술한 바대로 측정하였다. 조직병리평가를 위해서, 폐에 대하여 오른쪽 심실을 통해서 5 ml PBS를 관류시키고 기관지를 통하여 1 ml PBS를 투입팽창시켰다. 상기 투입 팽창시킨 폐는 10% 중성 완충 포르말린 용액에서 24 시간 동안 담금으로써 고정하였다. 상기 고정된 폐조직을 파라핀에 포매시키고 4 μm 두께로 절편화하여 기관지 및 혈관 주위 영역에서 염증의 크기를 헤마토실린 및 에오신 염색으로 시험하였다. 주입한 MSC의 생착은 인간 $\beta 2$ -마이크로글로불린(ab15976; Abcam, USA)의 면역형광분석으로 결정하였고, FITC-표지된 이차 항체를 사용하여 시각화하였다. 핵은 4'-6-다이아미노-2-페닐인돌(DAPI; Sigma, USA)를 사용하여 상대적으로 염색하였다.

[0070] **13. 당뇨병 저활동성 방광(streptozotocin induced detrusor underactivity, STZ-induced DUA) 동물 모델 및 PFO-MSC의 투여**

[0071] 모든 동물실험은 울산대학교 의과대학의 실험동물 운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 진행되었다(IACUC-2019-12-129). STZ-induced DUA (streptozotocin induced detrusor underactivity) 랫트 모델에 STZ 주입은 기존에 기재된 바대로 수행되었다. STZ-DUA 동물 모델을 만들기 위하여, 8주의 암컷 Sprague-Dawley rats (OrientBio, Gapyong, Gyeonggi-do, Korea)에 Streptozotocin (STZ, Sigma)의 복강주사로 당뇨병을 유발하였다. 0.1M의 citrate buffer를 pH 4.5로 적정한 다음, 50mg/kg의 분량으로 1회 복강 주사 하였고, 정상군은 동일한 양의 0.1M의 citrate buffer를 복강 주사하였다. 72시간 이후, 혈당을 측정하여 200mg/dL가 넘는 쥐를 당뇨병이 유발되었다고 생각하고 실험에 사용하였다. STZ 주사가 이루어지고 3주 후에 복부 절개가 이루어졌고, PBS 비하를 또는 PFO-MSC는 기존에 보고된대로 500 μm 주사기와 26-게이지 바늘을 이용하여 방광의 전방벽과 원개(dome)의 점막하층으로 직접 주입되었다. PFO-MSC 투여 1주일 후, 비마취 및 미세한 방광내압측정법(각성 방광내압측정) 및 조직학적 염색을 통하여, 각각 방광 배뇨 기능 및 조직 손상을 측정하였다.

[0072] **14. CBI (Chronic bladder ischemia) 유도된 과민성 방광(Overactive bladder; OAB)과 저활동성 방광(Detrusor underactivity; DUA) 모델 확립**

[0073] 16 주령의 Sprague Dawley rat (Orient) 실험동물을 30 mg/kg 졸레틸 및 5mg/kg 자일라진을 복강 투여하여 마취 하였다. 마취 후 방광에 혈류를 공급하는 장골동맥 내강에 손상을 유도하기 위하여, 양아위에서 양측 하복부를 종절개하여 장골동맥을 박리하고, 박리된 장골동맥 내강에 2 French Fogarty catheter (Edwards Lifesciences LLC, Irvine, CA)를 사용하여, 장골동맥 내강에 손상(10회; 과민성방광, overactivity bladder, OAB), 30회; 저활동성 방광, Dtrusor underactivity, DUA)을 가하고 이 후 8주간 1.25% 고지방식이 (D12336, Research Diets, Brunswick, NJ, USA)를 적용 하였다. 대조군은 실험군과 동일한 부위에 가짜(sham) 수술을 시행하고 고지방식이를 8주간 적용 하였다. 장골동맥 내강 손상 8주 후 방광내압을 측정하여 OAB, DUA 모델이 만들어 졌음을 확인 하였다.

[0074] **15. 어웨이크 방광내압측정법(awake cystometry)에 의한 방광내압측정도(cystometrogram)**

[0075] 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. 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 2cmH₂O 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.

[0076] 16. 방광 평활근 장력 측정을 통한 방광 기능 평가

[0077] 방광평활근 장력을 측정하기 위하여, 방광의 전 층을 2×1 cm 크기로 절제하여 절제된 조직을 섭씨 25도에서 5% O₂와 95% CO₂로 혼합한 가스로 미리 포화(aeration)시킨 중탄산염 완충액(bicarbonate buffered solution)에 담아 재빨리 실험실로 운반한다. 7.5배 입체현미경(stereo-microscopy) 시야 하에 미세수술도구를 이용하여 방광점막층을 조심스럽게 제거하고, 현미경 시야에서 일정한 크기로 방광근 종절편을 제작하여(0.7×1.1×5.7mm) 미리 디자인된 조직고정틀(tissue holder)에 절편의 양단을 5-0 silk로 결찰, 고정하였다. 이를 5ml 수직형 용기(bath)에 넣고 등장성수축력(isometric tension)을 기록하였다. 실험을 시작하기 전 약 50분간 평형시킨 후 최적길이(optimal length)를 구하고, 수축반응의 극대화를 위해 최적길이에 근거하여 실험을 진행하고(예비실험에서 휴지기 길이의 200%에서 최대수축을 보임) 이 길이를 실험 내내 유지하였다. 모든 약물에 대한 조직반응은 단 1회의 실험으로 종결하고 다른 조직 절편으로 교체하였다. 장력의 기록은 4개의 bath로 연결된 4개의 장력변환기(force transducer)로 방광근 절편에서 나오는 등장성 수축신호를 개인용 컴퓨터와 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 전산화하고 기록하여 방광기능을 평가하였다.

[0078] <실시예 1> PFO(Primed Fresh OCT-4 enrichment) 단일 공정 배양을 통한 MSCs의 줄기세포 항산화능, 생착률 및 줄기세포성 증진 효과

[0079] 본 발명자들은 CREB1 의존적 기작을 통해 MSCs의 원시 상태 및 후성유전학적 완전성을 보존하는데 유익한 효과를 나타내는 비타민-C 유도체(vitamin-C; VitC)인, 아스코르브산 2-글루코사이드(ascorbic acid 2-glucoside; AA2G)를 적용하였다. 0.74 mM AA2G 조건하에서 배양된 인간 태줄 유래 MSC(umbilical cord derived MSC; UC-MSCs)는 핵 내로의 NRF2 단백질 전좌를 촉진하였고, MSCs에서 레독스 항상성을 유지시키는 주요 CREB1-NRF2 표적 유전자들을 상향조절하였는데(e.g., *GCLM*, *GCLC*, *PRDX1*, and *GSR*), 이는 NRF2 경로의 활성화를 나타낸다(도 2). AA2G 프라이밍 외에, MSCs의 생체 내(*in vivo*) 생착률을 향상시키기 위해, 저농도의 스팅고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate; S1P, 50 nM) 및 발프로익산(valproic acid; VPA, 0.5 mM)를 첨가하는 프라이밍 조합을 확립하였는데, 이는 GVHD 치료에 핵심적인 부분일 수 있다. 상기 신규한 생체 외(*ex vivo*) 확장 공정을 PFO(Primed Fresh OCT-4 enrichment)라고 명명하였다(도 1).

[0080] 우선, 본 발명자들은 다양한 AA2G 처리 시간이 작은 크기의 원시성 MSCs 유지에 영향을 미치는지 시험하였다(도 3a). 형광-활성화된 세포 분류 및 현미경 분석을 통해서, 확대된 세포 크기를 가진 UC-MSCs 세포군이 정상 배양 조건(naive) 하에서 점차적으로 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, PFO 공정(PFO UC-MSCs)에서는 복제 유도되는 UC-MSCs 세포 크기 확대가 보호되는 것을 확인하였다(도 4a 및 도 4b). 2개의 독립적인 공여체 유래 UC-MSCs에서, 상기 보호 효과는 AA2G 처리 4일째부터 시작되었고, 8 세대(11일) 확장 이상까지 유지되었고(도 3b-d), 이들의 다능성 및 세포 표면 표현형의 변화는 전혀 없었다(도 5). 또한, PFO 공정은 지방 유래 MSCs(adipose derived MSCs; AD-MSCs)에서도 작은 크기 세포들을 보호하는데 효과적이었다(도 6).

[0081] PFO 공정에 의해 농축된 작은 크기의 UC-MSCs는 복제 노화에 저항성이 있고, 향상된 증식 활성을 나타냈으며(도 4c 및 도 7a), 노화-연관 β-갈락토시다제(β-galactosidase; SA-β-gal) 염색은 전혀 발현되지 않았다(도 4d 및 도 7b). naive 배양된 세포와 비교하면, PFO UC-MSCs는 p21^{CIP1} 및 p53과 같은 사이클린-의존성 키나제 억제제를 낮게 발현하는 것으로 나타났으나, 줄기세포성 마커인 BMI-1은 높게 발현하는 것으로 나타났다(도 4e 및 도 7c). 일관성 있게, PFO UC-MSCs는 만능성 특이 전사체인 OCT-4A 및 SOX2를 발현했는데(도 4f), 이는 OCT-4 및 SOX2 단백질의 핵 내 염색을 통해 추가적으로 검증되었고(도 4g 및 도 8a), DNA 메틸화가 적은 OCT4 프로모터 내 열린 크로마틴 구조 및 전사체적으로 선호하는 히스톤 변형의 농축도 확인되었다(도 8b 및 도 8c).

[0082] 본 발명자들은 PFO 공정이 MSCs의 GSH 동역학에 영향을 미치는지 시험하였다. 이를 위해, 본 발명자들은 GSH에 대한 가역적 화학 프로브로, 비-파괴, 통합 및 이미지 기반 고처리 분석이 가능한 FreSHtracer를 이용하여, GSH 회복능(GSH-recovering capacity; GRC)의 정성 및 정량적 측면을 실시간 관측하였다(도 1). naive 세포와 비교하면, PFO UC-MSCs는 티올-특이적 산화제인 100 μM 디아미드(diamide)에 짧게 노출한 후의 기본 GSH 수준 및 GRC 활성이 더 높게 나타났다(도 4h). PFO UC-MSCs는 콜로니 형성 유닛-섬유아세포(colony forming unit-fibroblast; CFU-F) 활성, 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)에 대한 주화성 및 항-염증 능력에 관한 활성이 높게 나타났다(도 9). 또한, 상기 PFO 공정의 유익한 효과는 2개의 독립적 공여체 유래 AD-MSCs에서도 관측되었다(도 10). 그리고, PFO UC-MSCs에서는 줄기세포성, 세포 이동, 성장인자들, 케모카인, 염증 및 면역 조절과 관련된 유전자들이 상향-조절되었다(도 11).

- [0083] 면역-조절 능력에 있어서, PFO UC-MSCs는 세포 내(*in vitro*)에서 파이토헤마글루티닌(phytohaemagglutinin; PHA) 자극을 통해 인간 말초혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells; PBMC) 내 CD3⁺ T-세포 증식을 억제하였다(도 4i). 동종 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR) 분석 결과, PFO UC-MSCs에서 동종(allogeneic) 자극에 따른 PBMCs의 증식은 강하게 억제되었는데(도 4j), 이는 면역 조절 활성이 향상되었음을 뒷받침한다. 종합하면, 상기 결과는 PFO 공정이 높은 GSH 동역학과 함께 작은 크기의 원시성 MSCs를 농축시킬 수 있고, 이는 노화에 저항성을 가지며, 자가재생, 항-염증 및 면역조절 능력을 향상시킬 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0084] <실시예 2> PFO 단일 공정 배양을 통한 MSCs의 GVHD 치료 개선 효과
- [0085] 상기 결과들의 생체 내(*in vivo*) 관련성을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 인간 PBMCs의 이식에 의해 인간화된 GVHD 마우스 모델에서, PFO 공정에 의해 농축된 원시성 UC-MSCs의 치료 효과를 조사하였다. 인간 PBMCs 단독으로 이식된 모든 마우스(GVHD)는 60일 이내에 사망한 반면, naive 배양(60%) 및 PFO 공정(90%)의 UC-MSCs 주입 시 GVHD 마우스의 생존율은 증가하였다(도 12a). 일관되게, GVHD 마우스의 체중 감소는 PFO UC-MSCs 이식에 의해 보호되었고, naive 배양 세포보다 유의한 효과가 높게 나타났다(도 12b 및 도 13a). GVHD 표적 기관인 소장, 폐, 간 및 신장 내에서, PFO UC-MSCs의 주입은 GVHD 마우스의 임상 점수 및 조직학적 손상을 상당히 개선시켰다(도 12c 및 도 12d). 상기 GVHD 증상에 대한 결과와 일치하게, PFO UC-MSCs는 생체 내(*in vivo*) 호밍(homing) 및 GVHD 표적 기관 내로의 정착 능력이 우수한 것으로 나타났다(도 13b).
- [0086] 또한, 인간 PBMCs 이식 40일 후에, GVHD 마우스에서 혈청 및 비장 림프구를 각각 사용하여, 다중 사이토카인 프로파일링 및 유세포 분석을 수행하였다. 시험관 내(*in vitro*) 결과와 일치하게, PFO UC-MSCs는 Th17 (e.g., IL17, IL6 및 GM-CSF), Th1 (e.g., INF- γ 및 IL18) helper T cell 및 전-염증 (e.g., CXCL13, TNF- α , IL8 및 IL23) 반응과 관련된 인간 사이토카인과 케모카인들의 수준을 효과적으로 감소시켰다(도 12e 및 도 14). 또한, GVHD 마우스 내 인간 CD45⁺, CD3⁺ 및 CD3⁺CD4⁺ 세포의 세포군은 PFO UC-MSCs 주입한 GVHD 마우스의 비장에서 더 감소하였는데(도 12h), 이는 생체 내(*in vivo*) 항-염증 및 면역조절 활성이 향상되었다는 것을 뒷받침한다.
- [0087] <실시예 3> PFO MSCs의 전사체(Transcriptome) 분석
- [0088] Naive MSC(아무것도 처리하지 않은 세포; 비교군)와 PFO MSC 세포군들 특성 차이를 genome-wide 수준에서 입증하기 위하여, 두 세포에서 추출한 RNA를 활용하여 전사체 분석을 실시하였다. 이때 PFO-MSC 제조에 사용되는 2가지 프라이밍 기술인 AA2G와 S1P+VPA 혼합 프라이밍을 진행한 MSC의 전사체 dataset들을 추가 분석하여, PFO-MSC와 AA2G 단독 혹은 S1P+VPA 혼합 프라이밍 MSC의 전사체들과의 특성 비교를 실시하였다.
- [0089] 이들 줄기세포 전사체의 PCA 분석 결과 Naive MSC는 PCA에서 다양한 분포를 보이고 있어, 이질성이 높은 세포임을 확인하였으며, AA2G 단독 혹은 S1P+VPA 혼합 프라이밍 MSC와 genome-wide 유전자 발현 특성에서 뚜렷한 차이가 있는 세포임을 확인하였다(도 15A).
- [0090] PFO-MSC 전사체가 naive MSC와 AA2G 단독 혹은 S1P+VPA 혼합 프라이밍 MSC 전사체와 뚜렷한 차이를 보이는 결과는 heatmap clustering 분석을 통하여 검증하였다(도 15B).
- [0091] PFO-MSC 전사체를 naive MSC와 AA2G 단독 혹은 S1P+VPA 혼합 프라이밍 MSC 전사체와 개별적으로 scatter plotting 분석을 실시한 결과, PFO-MSC는 이들 세포와 뚜렷한 유전자 발현 차이를 보이는 줄기세포군임을 확인하였다(도 15C).
- [0092] 따라서 이러한 줄기세포군들의 전사체 분석을 통하여, PFO-MSC는 naive MSC 뿐만 아니라 AA2G 단독 혹은 S1P+VPA 혼합 프라이밍 MSC와 분자학적 특성이 상이한 줄기세포군임을 입증하였다.
- [0093] <실시예 4> PFO MSCs의 전사체(Transcriptome) Gene Ontology, Gene network 분석
- [0094] Naive MSC 와 PFO MSC로부터 전사체 특성을 gene ontology, pathway map, gene network 등의 특이성을 연구하는 심층 분석을 진행한 결과, Naive MSC와 비교하여 PFO MSC에서 염증성 반응, 혈관 생성, 분화 등에 관여하는 유전자 군들의 유의적인 발현 차이를 확인하였다(도 16).
- [0095] 다음으로 그룹간의 차이를 비교하고 이미 기 보고되어있는 정보들을 기반으로 상호작용 및 예상 타겟을 예측할 수 있는 프로그램인 'MetaCore(Clarivate Analytics사)'를 사용하여 결과를 분석하였다. 신호전달체계(Pathway) 중심으로 분석을 하면 기관지천식에서 발생하는 인터류킨(Interleukins; IL)에 의해 유도되는 염증성 반응, 흑색종에서 IL-1의 신호전달, 면역반응시 IL-17 신호전달 체계에 관여하는 것으로 알려진 유전자들이 주

로 변화를 보였다. 유전자 온톨로지(GO) 분류기준을 바탕으로 분석하였을 때는 세포신호전달에 관여하는 사이토카인들과 이 때문에 발생하는 세포의 반응 신호체계가 가장 큰 차이를 보인 것으로 분석되었다. 또한 질병의 측면에서는 관절 질환과 질환의 발병과정에 관여하는 유전자들에서 차이를 보인 것으로 분석되었다(도 17).

[0096] 또한, NFkB, p38 MAPK, IL-6, 등의 염증성 반응에 핵심적인 역할을 하는 단백질들의 발현이 증가되어 있고, 이들을 중심으로 세포의 염증반응에 크게 관여할 것으로 예측되었다. 상기 결과에서 밝혀진 단백질들은 상기 pathway 분석에서도 상호작용 할 것으로 예측한 결과와 중복되므로 해당 결과가 염증성 반응에 관여할 것이라는 신뢰도 높은 결과를 확보하였다(도 18).

[0097] 전사체 분석 후 유효한 타겟을 예측할 수 있는 또 다른 분석법 중에 기 발표된 특정 유전자그룹을 확보하여 분석한 결과와 비교하는 분석법인 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis) 새로운 타겟을 예측하는 데에 널리 사용된다. PFO MSC의 전사체 분석 결과를 대입하여 분석하여 여러 geneset에서 중복하여 높게 발현하고 있는 89개의 예상 타겟 유전자들의 List를 확보하였고(도 19), 실시간 유전자발현 분석 기법(qRT-PCR)을 통해 검증한 결과 PFO MSC에서 FAM113A, NFkB2, NFkBID, IL-6, ICAM, QN1, YIPF5, ZC2H12A, LOH11CR2A, MPV, ZNF175, ZFP90 등의 유전자 발현량에 큰 차이(증가)가 있음을 확인하였다(도 20).

[0098] <실시예 5> PFO MSCs의 메틸롬(Methylome) 분석

[0099] 유전자의 발현 혹은 미발현(억제)이 결정되는데 매우 중요한 단계인 메틸화(Methylation)를 개별 유전자 수준이 아닌 유전체의 메틸화 정도를 분석하여 Naive MSC 와 PFO MSC의 특성을 비교 분석하였고, 각 시료는 결과의 정확도를 높이기 위하여 3번의 반복실험 군을 준비하였다(도 21). 도 21에서 각각의 지표가 의미하는 바는 다음과 같다. Correlation Matrix는 각 그룹간의 유사성을 의미하고 AVG_Beta는 메틸화의 정도를 의미한다. 또한 BMIQ는 샘플 그룹 내에 동질성을 비교하는 지표이고, M value와 log2 value는 메틸화가 일어난 정도를 나타내는데, 유전체 전체에 걸친 ‘메틸화’가 근소한 차이로 Naive에서 더 많이 발생하였다는 것을 알 수 있었다.

[0100] 보다 구체적으로 살펴보기 위해, Naive MSC에 비해 PFO MSC 유전자의 프로모터 내 CpG site에서 메틸화가 적게 일어난 세포가 99.27% 였고, 유의적으로 감소되어 있는 유전자군을 발굴하였다(도 22).

[0101] Naive와 PFO MSC를 각각 3번 반복하여 준비한 총 6개의 시료로 비슷한 패턴을 보이는 그룹별로 나누었더니 Naive와 PFO MSC의 메틸화가 완벽하게 서로 다른 특성을 보인다는 것을 확인하였고, 170개 유전자의 메틸화 증가 혹은 감소하는 패턴이 상반되는 결과를 확인함으로써, PFO MSC 가 Naive MSC에 비해 뚜렷한 변화가 있었음을 확인하였다(도 23).

[0102] Transcriptome과 DNA methylome 다중 오믹스 분석 결과를 바탕으로 PFO-MSC가 일반 배양한 naive MSC와 분자학적으로 특성이 뚜렷하게 차이가 나는 줄기세포라는 실험적 근거를 제시하였다.

[0103] <실시예 6> PFO MSCs의 단백질체(Proteome) 및 단백질 분비체(Secretome) 분석

[0104] 일반 배양한 naive MSC와 PFO-MSC 간의 세포 특성 차이를 보다 명확하기 증명하기 위하여, 세포 활성을 직접적으로 나타내는 단백질체(proteome) 혹은 단백질 분비체(secretome) 분석을 고효율의 질량분석 기법을 통하여 진행하였다(도 24).

[0105] Naive와 PFO MSC에서 추출된 단백질 중에서 공통적으로 발현된 단백질이 3556개, Naive에서만 발현된 것이 165개, PFO MSC에서만 발현된 것이 71개임을 확인하였다. 또한 6개의 시료의 (Naive, PFO 각각 3 반복 샘플이므로) 특성을 분석하여 그룹화하였을 때, Naive 와 PFO MSC가 각기 다른 특성을 가진 것으로 나타났다 (도 25).

[0106] 또한, 질량 분석법으로 분석한 결과 WASHC3, COMMD6, NUDT4, INTS4, FYTDD1, DHRS3, GOLIM4, SNAPIN, PARVB 등의 단백질들이 Naive에서는 높게 발현 되는데에 반해 PFO MSC에서는 검출되지 않았다. 반대로 SAAL1, POLR2D, TGOLN2, ALDH6A1, FIBP, CC2B1B, PIH1D1, AASS, CD2AP, SV2A 등의 단백질들은 PFO에서만 높게 발현이 되고 Naive에서는 거의 검출되지 않았다(도 26).

[0107] Transcriptome, DNA methylome, Proteome, Secretome 다중 오믹스 분석을 통하여, PFO-MSC는 일반 배양한 naive MSC와 분자학적으로 상이한 줄기세포군이며, 특히 두 세포간의 발현이 확연히 차이가 나는 단백질군들의 존재를 입증하여 이를 검증하였다.

[0108] <실시예 7> PFO MSCs의 단일세포 전사체 분석

[0109] PFO-MSC 세포의 단일세포 전사체 dataset을 분석한 결과, PFO MSC는 크게 6 가지의 서로 다른 특성을 가진 세포 군집으로 나누어진다는 사실을 확인했고, 각 군집마다 유전자군의 발현 양상이 다르다는 것을 확인하였다(도

27).

- [0110] 각 군집의 마커로 쓰일 수 있는 유전자들을 찾아내기 위해 각 군집마다 서로 다른 양상을 보이는 유전자들을 추려내어 확인한 결과, 군집의 차이가 뚜렷하게 나타남을 확인하였다(도 28).
- [0111] 각 군집의 마커로 사용할 수 있는 유전자들 (Cluster 1 : SLBP 외, Cluster 2 : CDCA8 외, Cluster 3 : HIST1H4C 외, Cluster 4 : MXD1 외, Cluster 5 : CCNB1, Cluster 6 : FAM111B 외)을 발굴하였다(도 29).
- [0112] <실시예 8> Th2 면역 반응 유도 천식 질환 모델에서 PFO-MSCs 치료 효능 평가
- [0113] PFO-MSC의 난치성 면역 질환에 대한 우수한 치료 효능의 적응증 확대 연구를 위하여, Type 2 T helper 면역 반응으로 유도되는 난치성 면역 장애 질환인 천식 질환 모델에서 PFO-MSC 치료 효능을 평가하였다. OVA 유도 천식 마우스 모델을 확용하여 1×10^5 Naive MSC와 PFO-MSCs를 정맥 주사한 후 항천식 효능을 평가한 결과, Navie MSC를 투여한 마우스 그룹보다 PFO MSC를 투여한 마우스 그룹의 BALF에서 면역 세포들의 침윤 (infiltration of immune cells)이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 30).
- [0114] 폐조직의 조직학적 평가를 실시한 결과, Navie MSC를 투여한 마우스 그룹보다 PFO MSC를 투여한 마우스 그룹에서 기관지의 염증이 줄어든 것을 확인하여, PFO-MSC의 증진된 치료효능을 확인하였다(도 31).
- [0115] PFO-MSC 줄기세포의 폐조직 내 생착률을 평가하기 위하여, 인간 $\beta 2$ -마이크로글로불린(human $\beta 2$ microglobulin; B2MG) 단백질의 면역형광분석을 실시한 결과, Navie MSC를 투여한 마우스 그룹보다 PFO MSC를 투여한 마우스 그룹의 폐조직에서 human B2MG를 발현하는 인간 유래 세포들이 유의적으로 증가되어 있는 것을 확인하여, PFO-MSC의 향상된 이식 후 생체 내 생착능을 확인하였다(도 32).
- [0116] <실시예 9> PFO-MSC에 의한 당뇨병 저활동성 방광(streptozotocin induced detrusor underactivity, STZ-DUA)의 생체내(*in vivo*) 치료 효과
- [0117] PFO-MSC의 우수한 치료 효능의 적응증 확대 연구를 위하여, 당뇨병으로 유도되는 대표적인 합병증인 저활동성에 대한 치료 효능을 평가하였으며, 이를 위하여 STZ-DUA 동물 모델을 사용하였다. 어웨이크 방광내압측정법(awake cystometry)을 사용한 방광 기능의 분석은 DUA 랫트에 유도된 STZ 복강주사(STZ-DUA 그룹)가 대조군과 비교할 때, 배뇨간격 (micturition interval, MI), 잔뇨량 (residual volume, RV), 방광용적 (bladder capacity, B C)의 현저한 증가와 배뇨압 (micturition press, MP)이 감소되는 배뇨 패턴을 보였다. 5×10^5 PFO-MSC의 이식은 결함된 배뇨 파라미터를 유의적으로 완화시켰다(도 33 및 도 34).
- [0118] 어웨이크 방광내압측정 데이터와 함께, 5×10^5 의 PFO-MSC의 주입은 DUA 환자의 방광에 나타나는 특징인 심각한 근육 조직의 변화, 비만세포 침투, 섬유증과 같은 조직적 변화를 회복시켰다. 따라서, PFO-MSC는 STZ 복강주사로 유도된 저활동성 방광의 예방 또는 치료에 있어 현저한 효과가 있음을 확인하였다(도 35).
- [0119] 장기 치료 효능을 관찰한 결과, PFO-MSC 줄기세포 단회 투여는 그 치료 효과가 줄기세포 이식 후 2주 혹은 4주 까지 지속되는 것을 확인하였다(도 36).
- [0120] 이식한 세포의 분화 특성을 분석하기 위하여, 방광 조직에서 베타 2 마이크로글로불린과 근육 마커인 알파-평활근 항체를 공동-염색하여 확인한 결과 PFO-MSC 그룹에서 근육층에 뚜렷하게 통합되어 있는 것을 확인하였다(도 37).
- [0121] 따라서, 기존의 줄기세포 치료제의 한계점이었던 측분비 효과가 현재는 직접 분화를 통해 치료 효능을 보이는 것을 확인하였다.
- [0122] 이러한 이식한 PFO-MSC의 근육 세포로의 분화는 이식한 후 2주와 4주 뒤 방광 조직에서도 관찰되어, PFO-MSC 줄기세포의 높은 생착률에 의한 직접적인 근육 조직 손상의 장기 치료 효과를 입증하였다(도 38 및 도 39).
- [0123] 이에, 본 발명자들은 임상형을 대변하는 저활동성 방광 질환 모델을 최적화 하고, PFO-MSC 줄기세포 효능을 입증하였으며, 줄기세포 투여 세포 수, 투여 빈도와 투여 경로 등에 대한 전임상 프로토콜을 최적화하였다.
- [0124] <실시예 10> 만성 방광 허혈(Chronic bladder ischemia; CBI) 손상 유도 저활동성 방광 (CBI induced DUA) 질환 모델에서 PFO-MSCs 치료 효능 평가
- [0125] 다양한 병리학적 요인으로 발생하는 저활동성 방광에 대한 PFO-MSC 줄기세포의 우수한 치료 효능을 평가하기 위하여, 노화로 유도되는 저활동성 방광을 대표하는 질환 모델인 CBI induced DUA 랫트 모델을 사용하였다. PFO-

MSCs의 치료 효능 평가하기 위해서, 장골동맥 내강 손상 7주 후, 1×10^6 PFO-MSCs를 DUA 랫트의 방광으로 직접 주입하였다. 주입 후 1주일 뒤에 방광 기능 결과를 정확하게 확인하기 위해서, 본 발명자들은 비수면 방광내 압측정을 수행하였다. DUA 랫트에 비해, DUA + PFO-MSCs 그룹에서 방광최대 내압 (Maximum pressure; 56.24 ± 7.57 vs. 88.65 ± 17.76 cmH₂O) 및 배뇨 압력 (MP; 17.37 ± 1.36 vs. 50.64 ± 8.67 cmH₂O; $p < 0.05$)은 증가하였고, 배뇨량 (MV; 2.77 ± 0.11 vs. 2.16 ± 0.15 mL; $p < 0.01$), 배뇨 간격 (MI; 273.7 ± 14.3 vs. 244 ± 11.46 sec), 잔여 부피 (RV; 0.25 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.01 mL; $p < 0.005$) 및 방광 능력 (BC; 3.03 ± 0.11 vs. 2.32 ± 0.16 mL; $p < 0.001$)는 감소하였다(도 40).

[0126] <실시예 11> 만성 방광 허혈 유도 과민성 방광(CBI induced OAB) 질환 모델에서 PFO-MSCs 치료 효능 평가

[0127] 만성 방광 허혈의 경우 그 손상 정도에 따라서 저활동성 방광과 과민성 방광이 유도된다. CBI 유도 과민성 방광 랫트 모델을 사용하여 PFO-MSCs의 치료 효능 평가하기 위해서, 장골동맥 내강 손상 7주 후, 1×10^6 PFO-MSCs를 OAB 랫트의 방광으로 직접 주입하였다. 주입 후 1주일 뒤에 방광 기능 결과를 정확하게 확인하기 위해서, 본 발명자들은 비수면 방광내압측정을 수행하였다. OAB 랫트에 비해, OAB + PFO-MSCs 그룹에서 배뇨 간격 (MI; 75.44 ± 3.79 vs. 204.2 ± 4.3 sec; $p < 0.001$), 배뇨량 (MV; 0.57 ± 0.03 vs. 1.23 ± 0.09 mL; $p < 0.001$), 방광최대 내압 (Maximum pressure; 25.09 ± 1.25 vs. 58.72 ± 5.28 cmH₂O; $p < 0.001$), 배뇨 압력 (MP; 17.29 ± 1.56 vs. 51.04 ± 4.78 cmH₂O; $p < 0.001$), 잔여 부피 (RV; 0.06 ± 0.01 vs. 0.08 ± 0.01 mL) 및 방광 능력 (BC; 0.50 ± 0.02 vs. 1.36 ± 0.02 mL; $p < 0.001$)이 특징적으로 증가하였다(도 41).

[0128] <실시예 12> PFO-MSC 특징적 역가 단백질에 대한 시험관 내(in vitro) 유효성 평가

[0129] 단백질체 분석을 통하여, PFO-MSC에 특이적으로 발현되는 SAAL1, POLR2D, TGOLN2, ALDH6A1, FIBP, CC2B1B, PIH1D1, AASS, CD2AP, SV2A 등의 단백질 중, SV2A, CD2AP, ALDH6A1 유전자에 대한 shRNA (shSV2A, shCD2AP, shADLH6A1)를 발현시키는 렌티바이러스를 안정적으로 발현하는 UC-MSC를 확보하였다. 대조군으로 empty shRNA control (shControl) 렌티바이러스를 사용하였다.

[0130] 해당 shRNA를 안정적으로 발현하는 UC-MSC에서 각 유전자들을 발현이 감소됨을 확인하였으며(도 42A), 이들 세포들을 활용하여, PFO-MSC를 유도한 후, 상기 PFO-MSC 특이적 역가 단백질의 발현에 따른 자가재생능을 CFU-F assay를 통하여 측정한 결과, shSV2A, shCD2AP, shADLH6A1를 발현하는 PFO-MSC는 shControl 대조군 세포와 비교하여, CFU-F 활성이 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 42B 및 도 42 C).

[0131] 세포 이동능에 대한 차이를 확인하기 위하여, Transwell을 활용하여 PDGF-AA에 대한 chemotaxis assay를 실시한 결과, SV2A, CD2AP, ALDH6A1를 knock-down (KD) 시킨 MSC에서 PFO-MSC를 유도한 경우, shControl MSC 세포와 비교하여, PDGF responsive chemotaxis 활성이 크게 감소함을 확인하였다(도 43A 및 도 43B).

[0132] LPS-stimulated MH-S 세포에서 분비되는 TNF- α pro-inflammation 단백질 분비능을 측정한 결과, shSV2A, shCD2AP, shADLH6A1를 발현하는 PFO-MSC에서 획득한 conditioned media (CM)은 대조군 세포와 비교하여, anti-inflammation 활성에 의한 TNF- α 단백질 분비 억제능이 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 44).

[0133] 따라서, 상기에서 실시한 자가재생능 (CFU-F), 세포이동능 (Transwell chemotatic response to PDGF), 항-염증 반응 등의 MSC의 주요 기능이 SV2A, CD2AP, ALDH6A1 KD MSC에서 유도한 PFO-MSC에서 억제되는 것을 확인하여, 본 PFO-MSC 특이적 역가 단백질들의 시험관 내(in vitro) 유의성을 검증하였다.

[0134] <실시예 13> PFO-MSC 특징적 역가 단백질에 대한 생체 내(in vivo) 유효성 평가

[0135] 상기에서 확인한 PFO-MSC 역가 단백질의 중요성에 대한 생체 내(in vivo) 유효성 평가를 위하여, Type 2 T helper 면역 반응으로 유도되는 난치성 면역 장애 질환인 천식 질환 모델에 1×10^5 PFO-MSC (shControl, shSV2A, shCD2AP, shADLH6A1)를 정맥 주사한 후 항천식 효능을 평가하였다. Control MSC에서 유도한 PFO-MSC를 투여한 마우스에서는 천식으로 유도된 폐조직 내 기관지 염증 반응을 효과적으로 억제하는 반면, SV2A, CD2AP, ALDH6A1 KD MSC에서 유도한 PFO-MSC는 기관지 염증 반응 억제 효과가 저하됨을 확인하였다(도 45A).

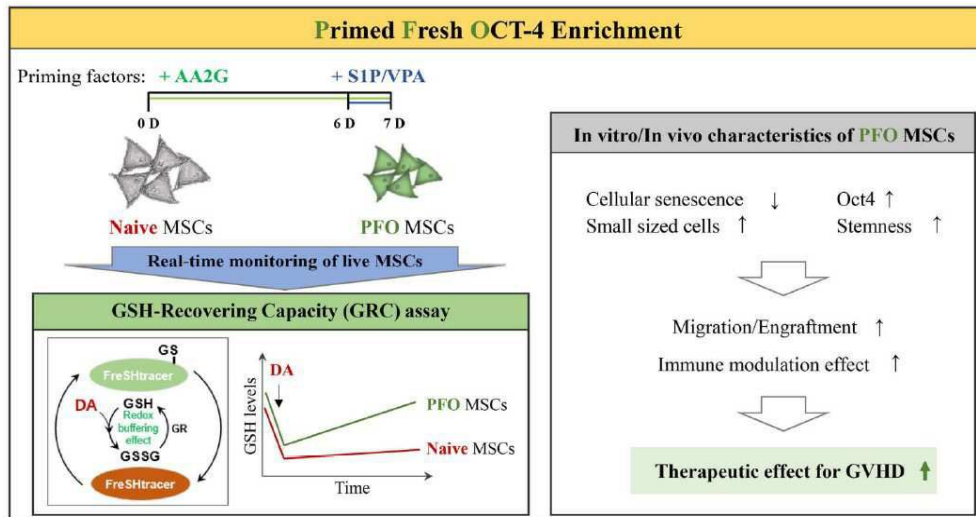
[0136] 상기 조직학적 검사 결과와 동일하게, 폐기관지세척액 (BALF)에서 면역 세포들의 침윤 (infiltration of immune cells) 정도를 평가한 경우 역시, SV2A, CD2AP, ALDH6A1 KD MSC에서 유도한 PFO-MSC는 대조군 세포와 비교하여, 폐 조직으로의 면역세포 침윤을 억제하는 항천식 능력이 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 45B 및 도 45C).

[0137] 따라서, 시험관 내(in vitro) 유효성 평가 실험과 동일하게 PFO-MSC에 의한 항천식 효능에서 SV2A, CD2AP, ALDH6A1 역가 단백질들의 생체 내(in vivo) 유의성을 검증하였다.

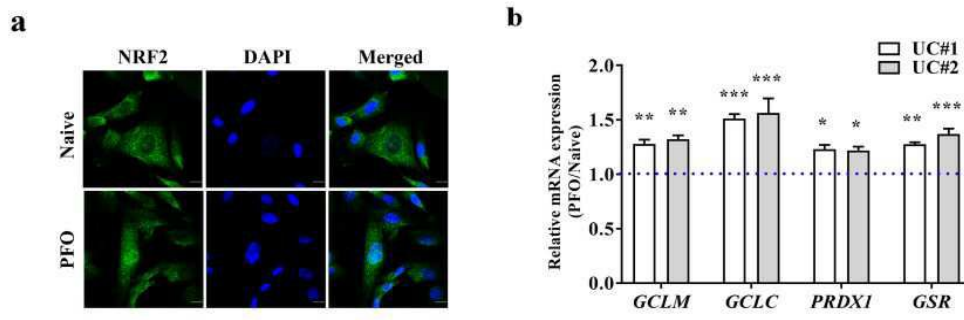
[0138] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

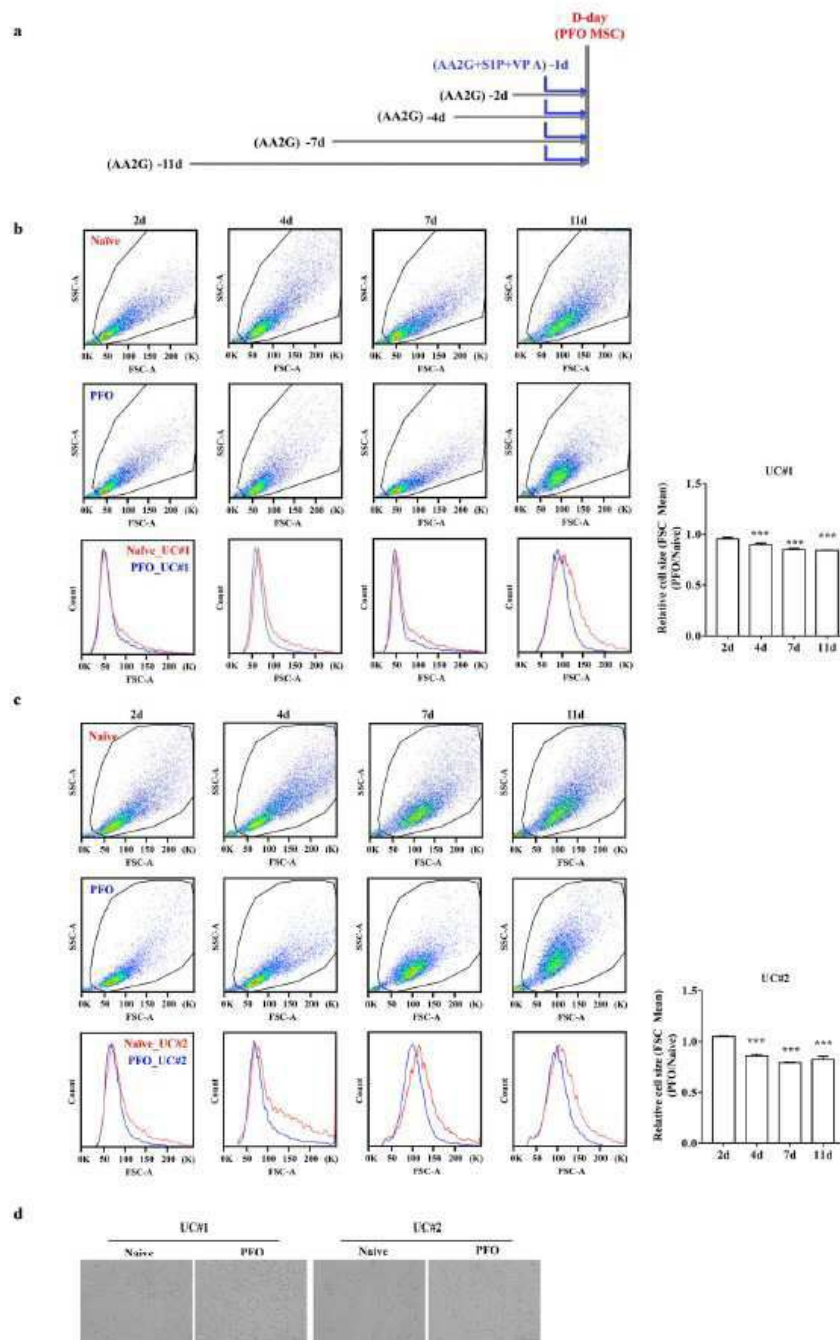
도면1



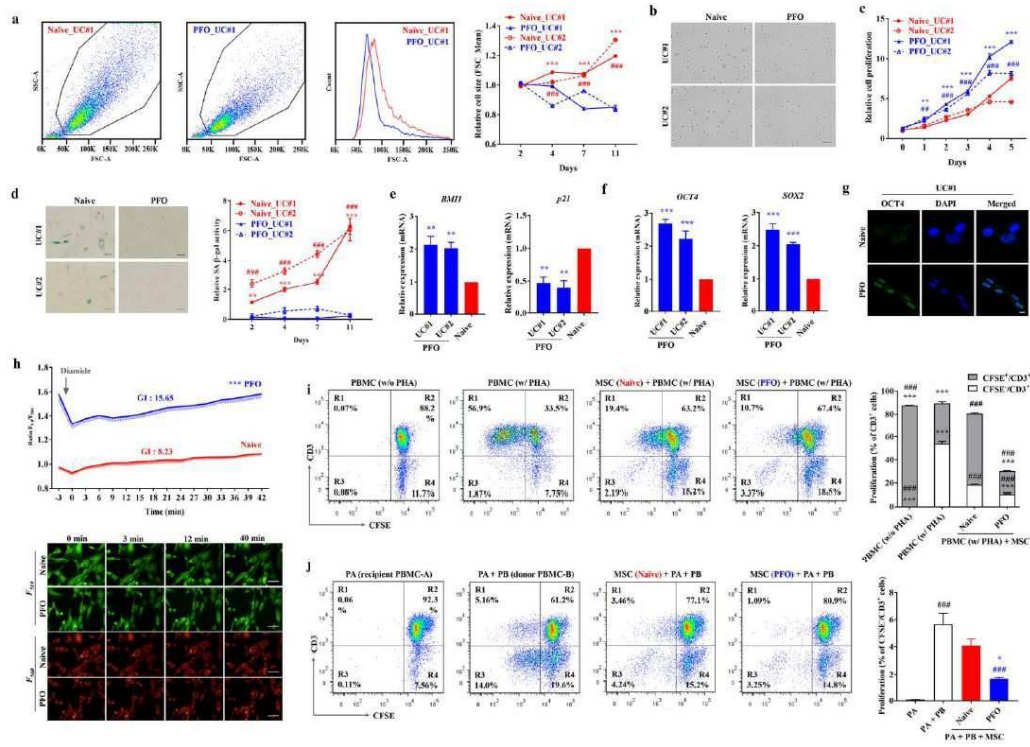
도면2



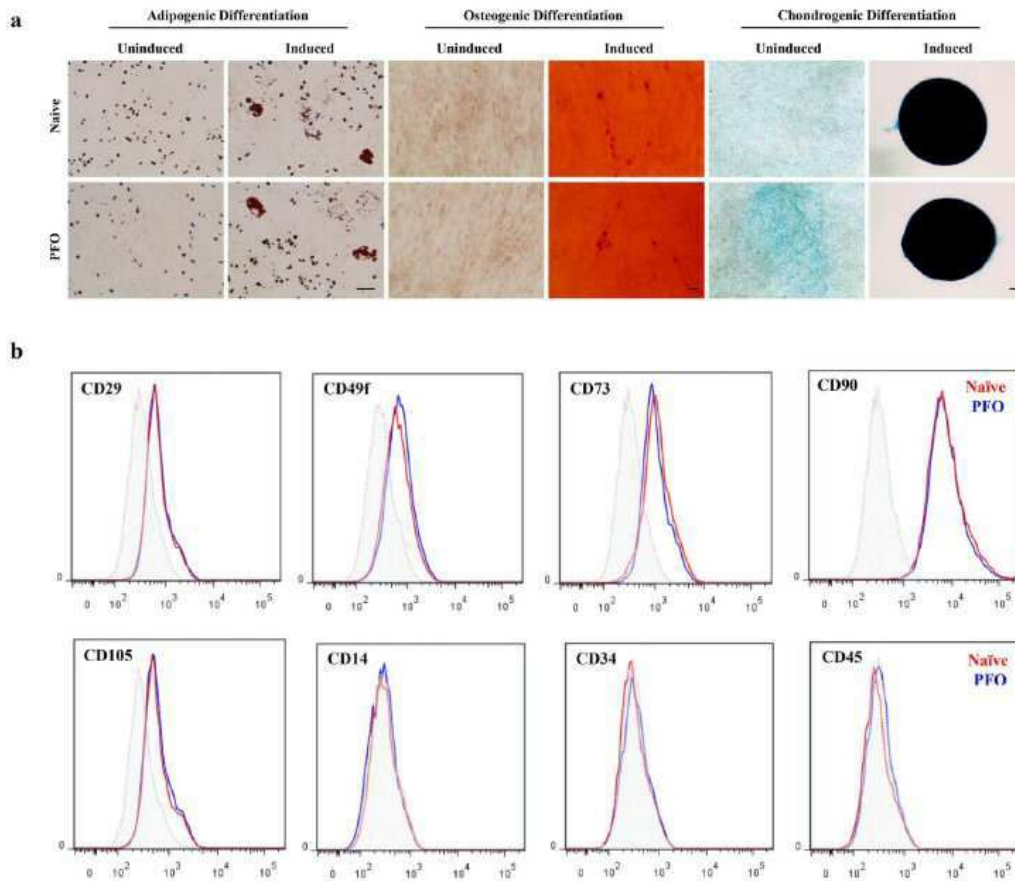
도면3



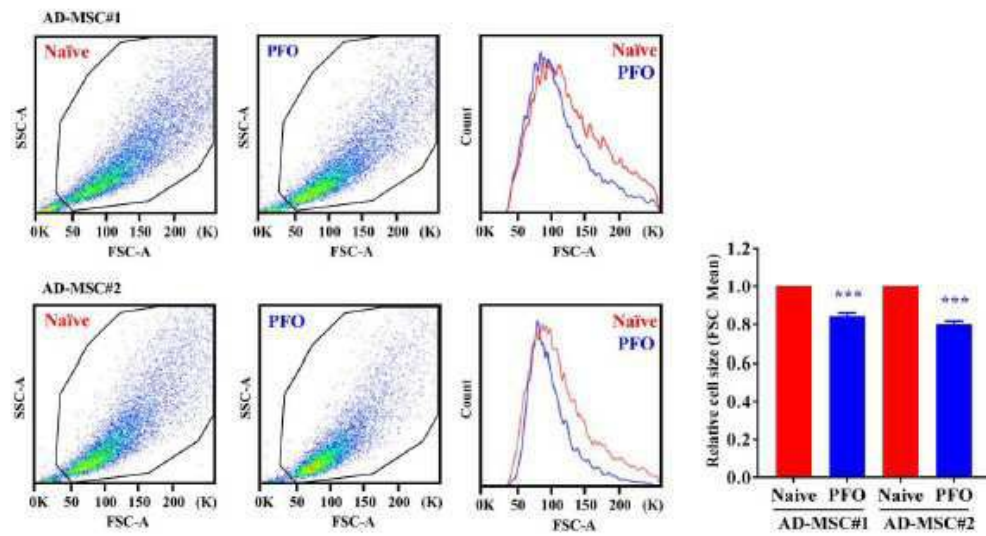
도면4



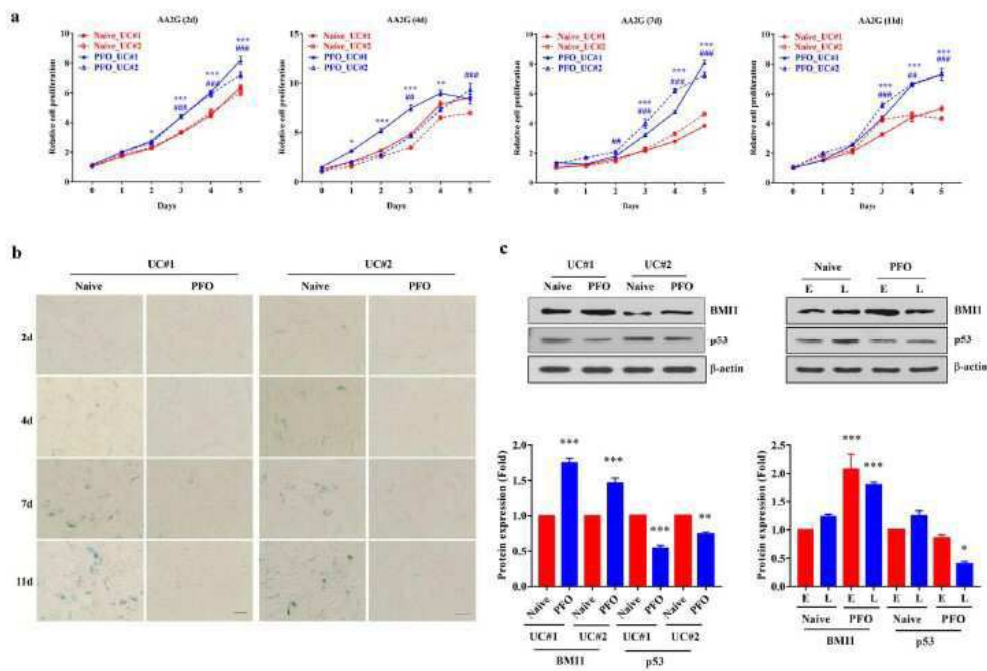
도면5



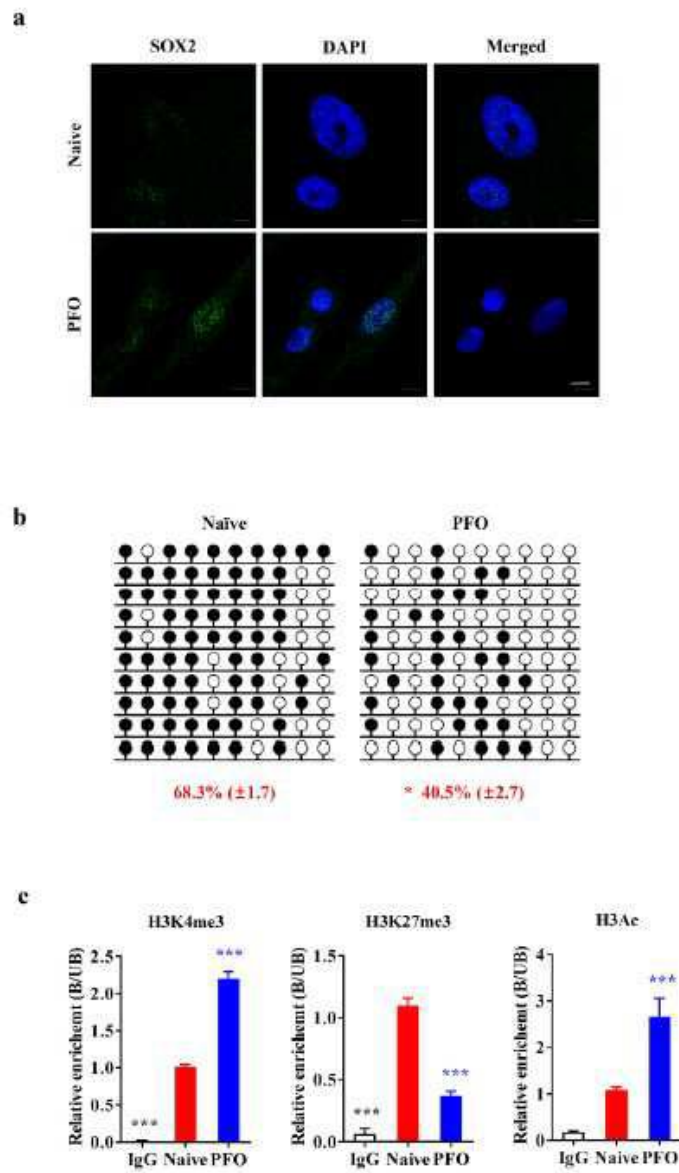
도면6



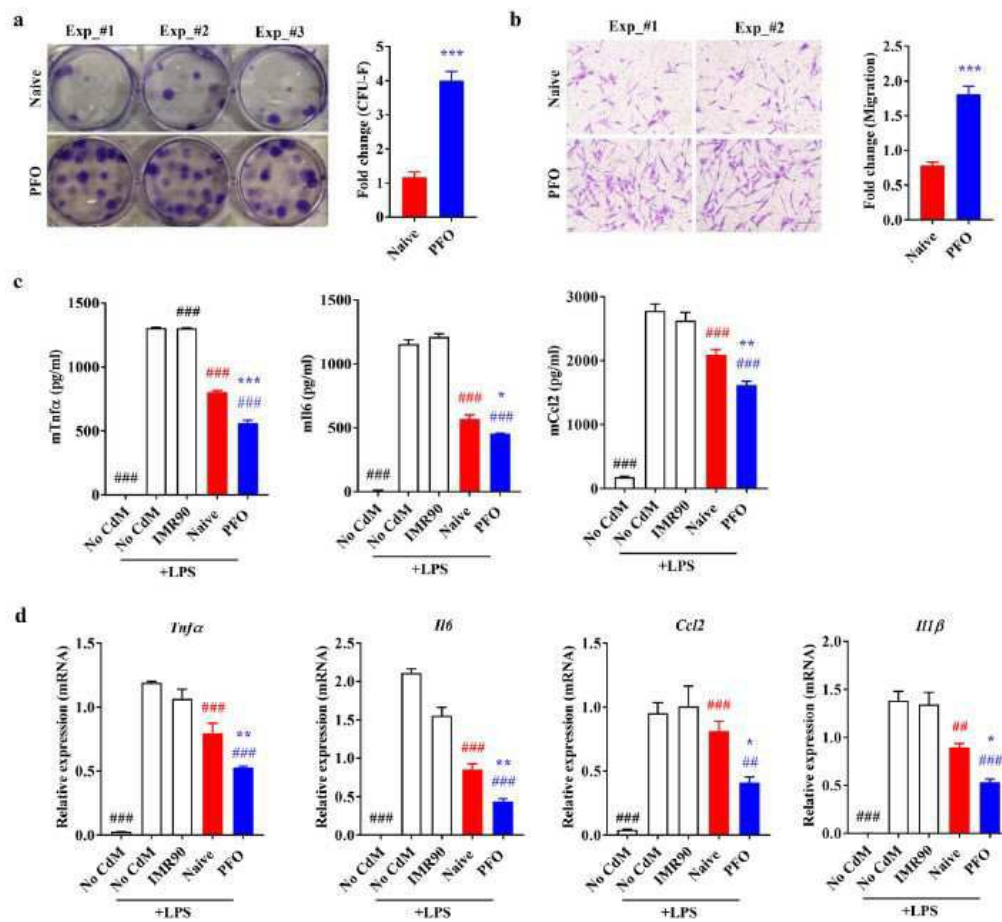
도면7



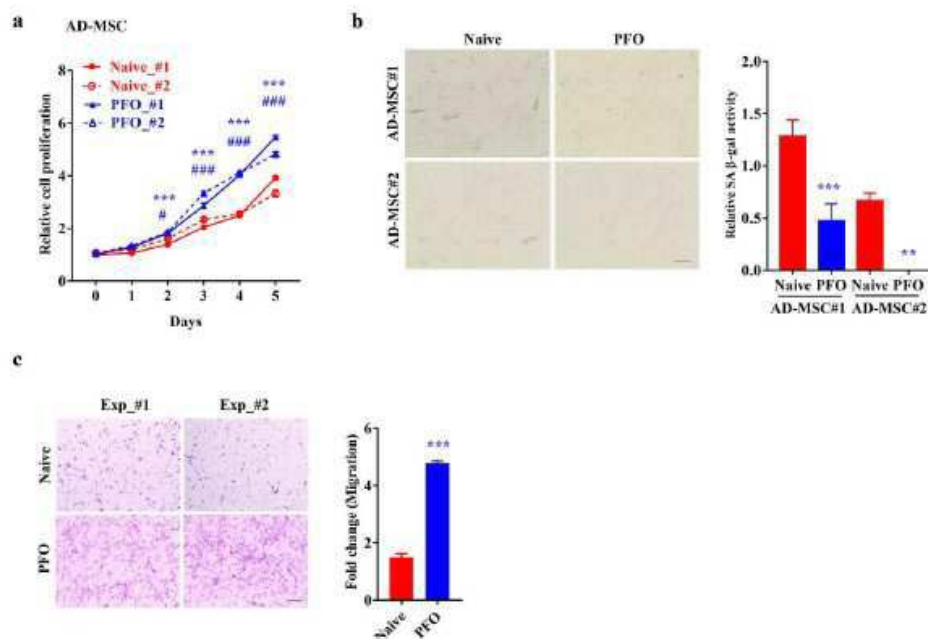
도면8



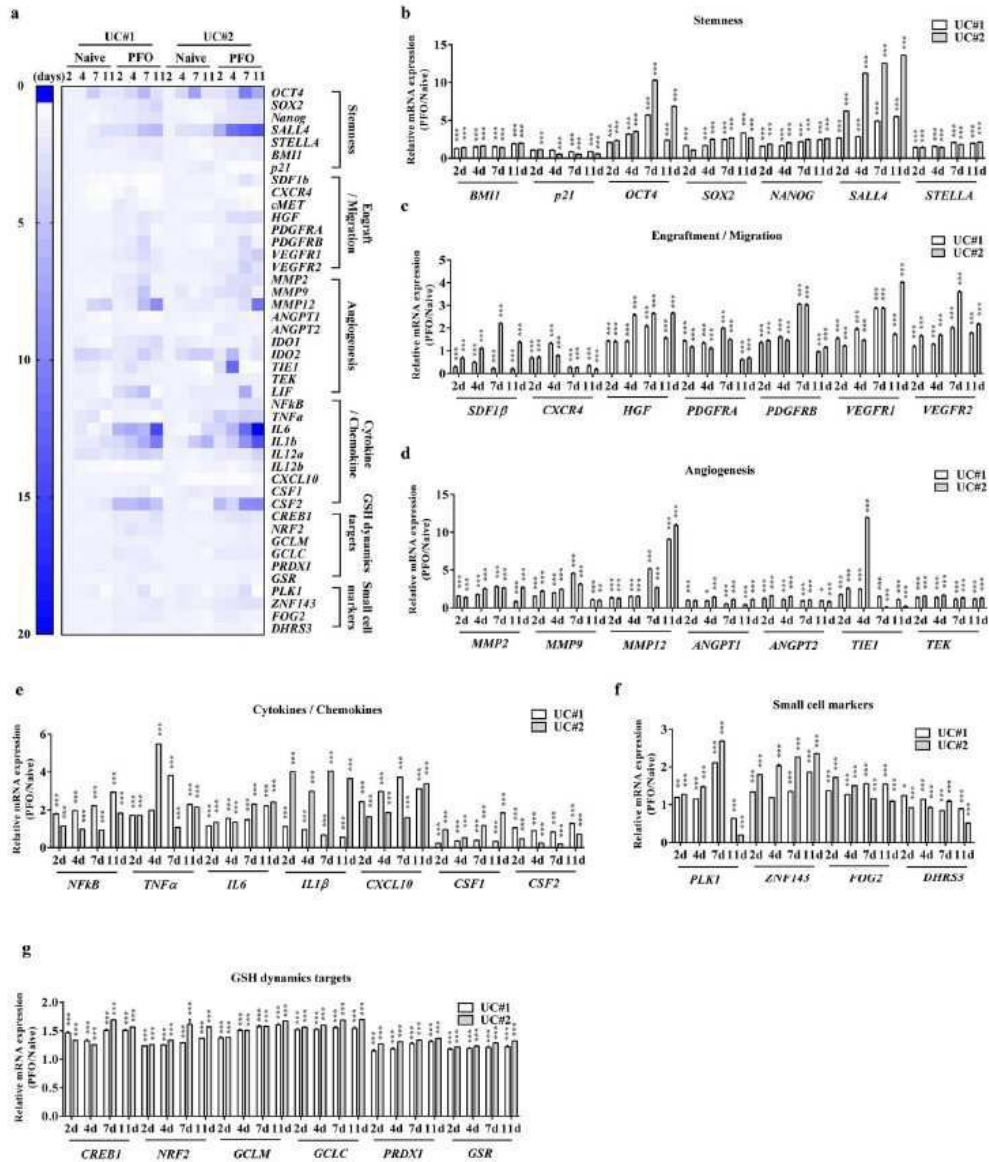
도면9



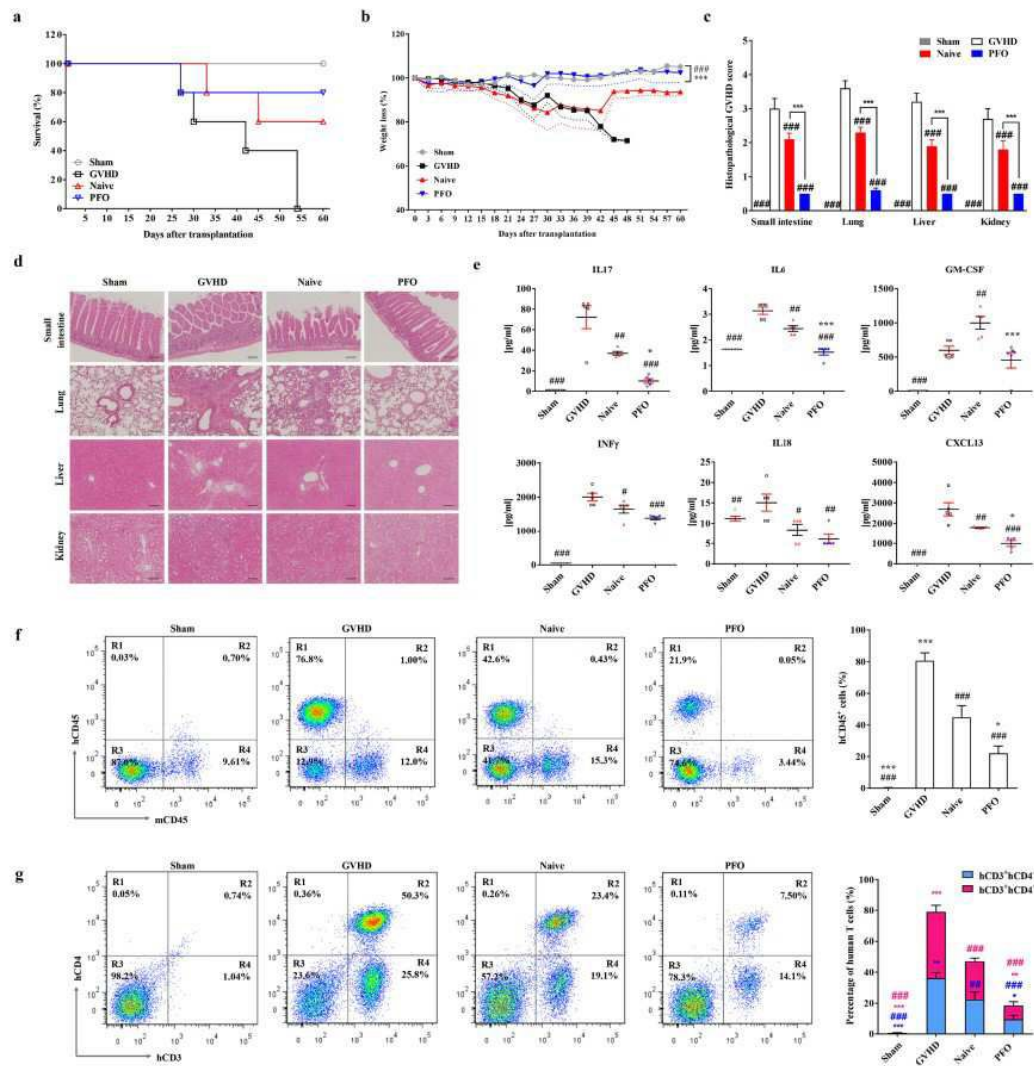
도면10



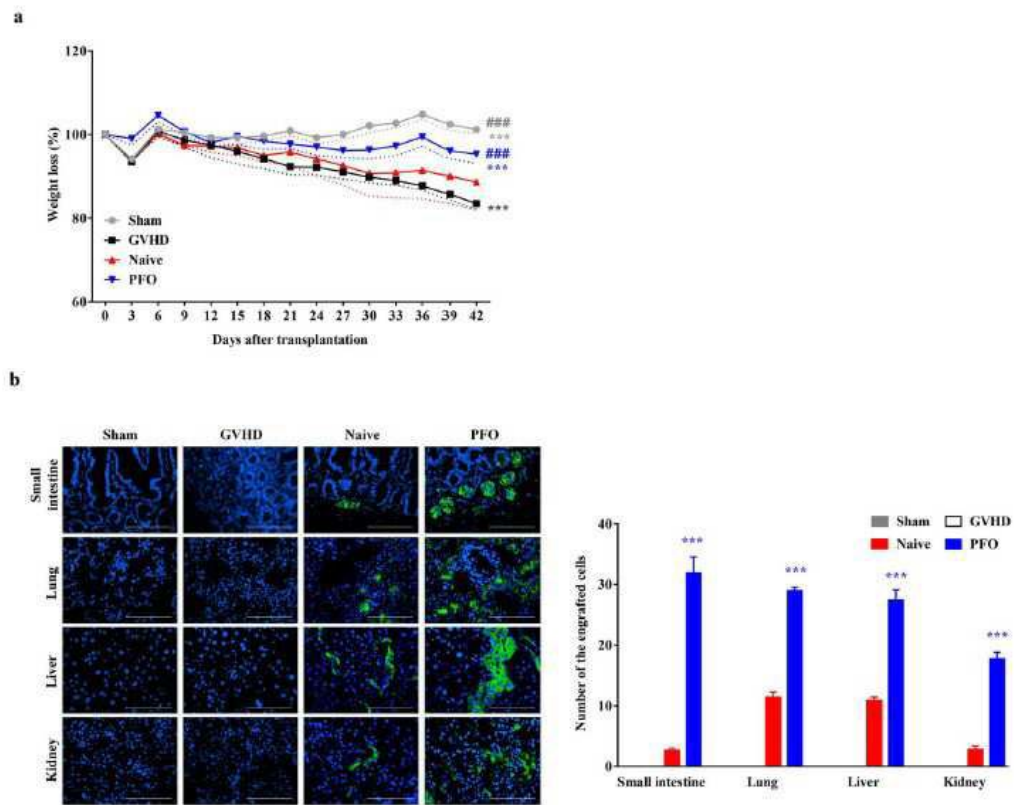
도면11



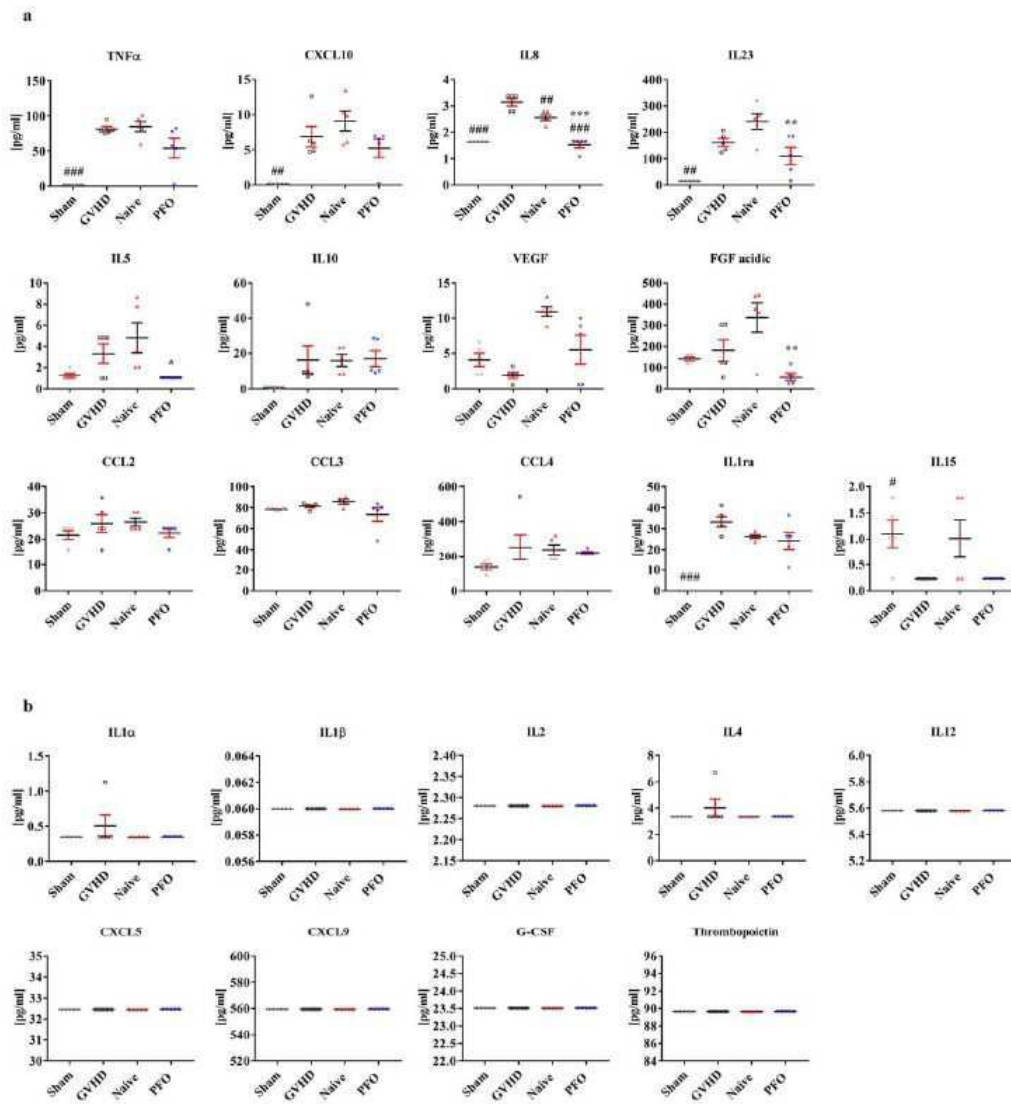
도면12



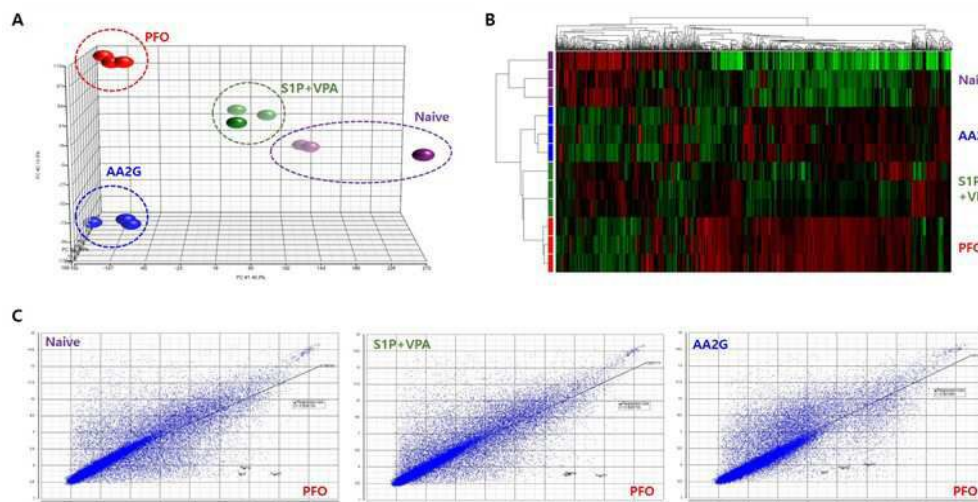
도면13



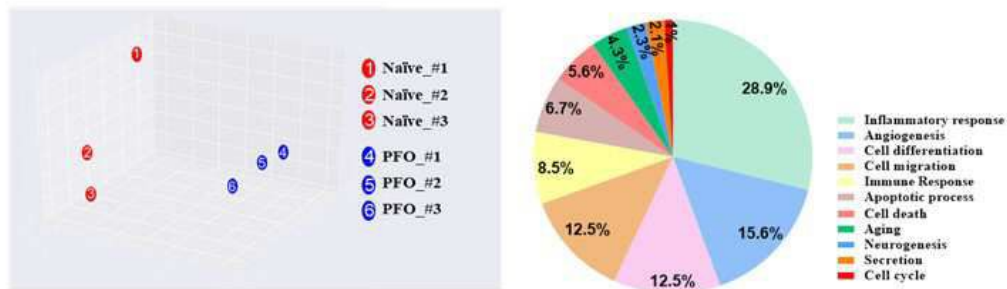
도면14



도면15



도면 16



도면17

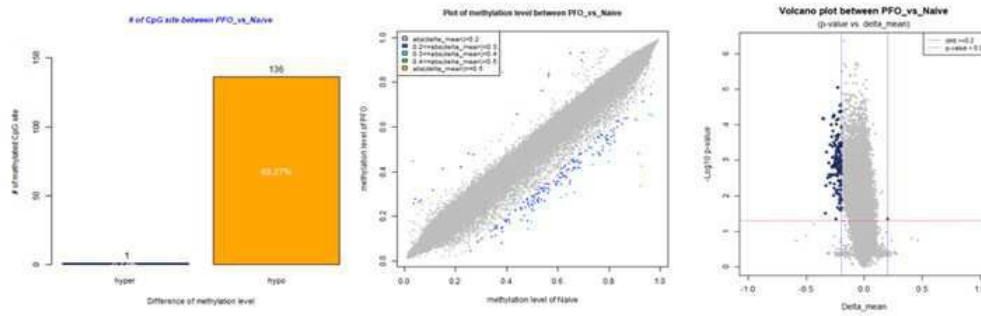


도면 18

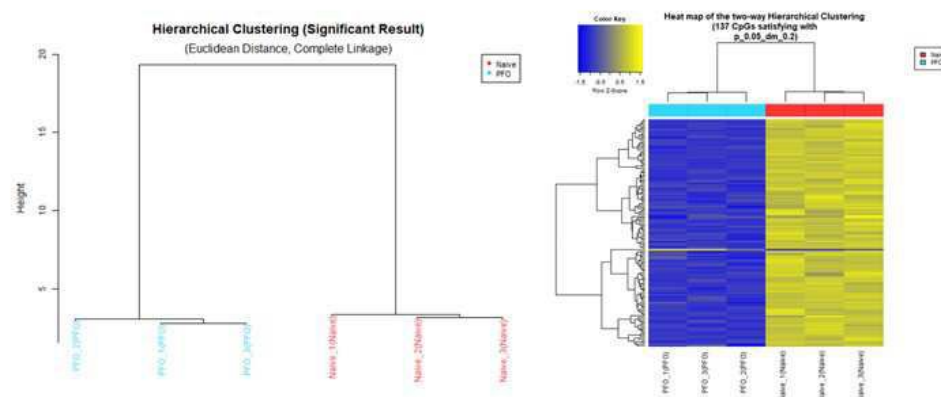


Network name	Processes
NF-kB, I-kB, IL-6, NF-kB2 (p100), p38 MAPK	positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity (59.2%), response to lipopolysaccharide (75.5%), cellular response to interleukin-1 (63.3%), response to molecule of bacterial origin (75.5%), cellular response to biotic stimulus (67.3%)
IL-6, MPV17, KIF3C, TM254, C9orf64	positive regulation of axo-dendritic protein transport (7.0%), regulation of axo-dendritic protein transport (7.0%), epidermal stem cell homeostasis (7.0%), positive regulation of establishment or maintenance of cell polarity regulating cell shape (7.0%), regulation of establishment or maintenance of cell polarity regulating cell shape (7.0%)

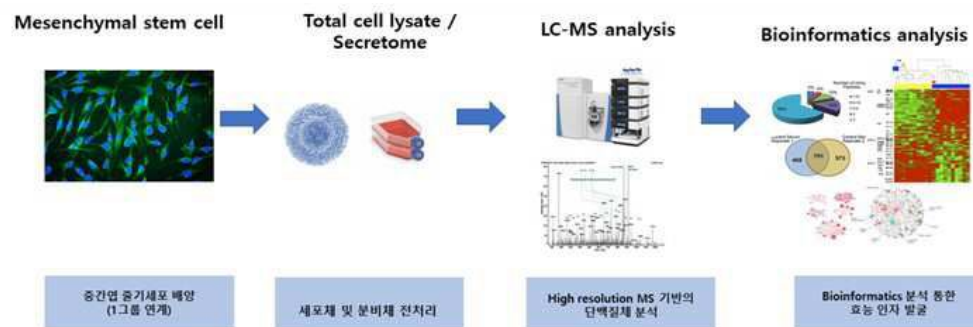
도면22



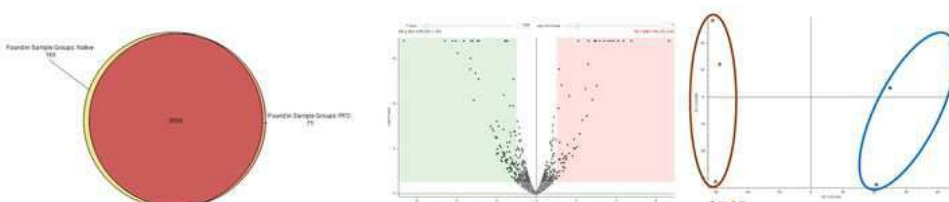
도면23



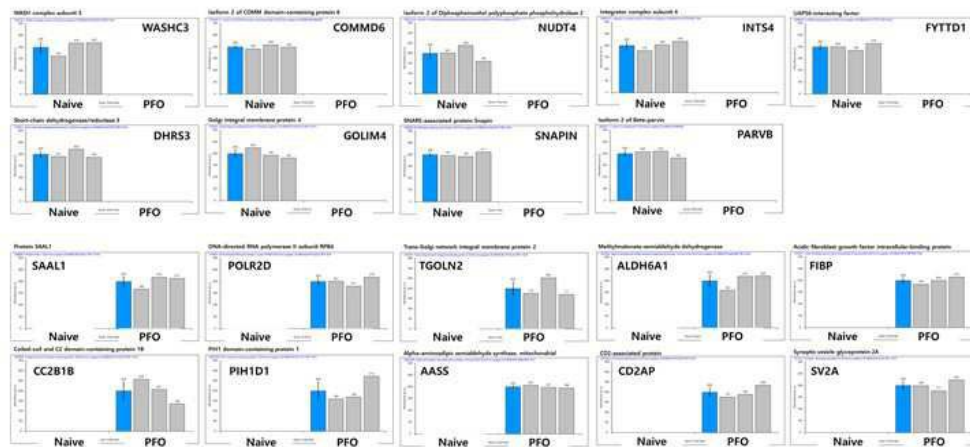
도면24



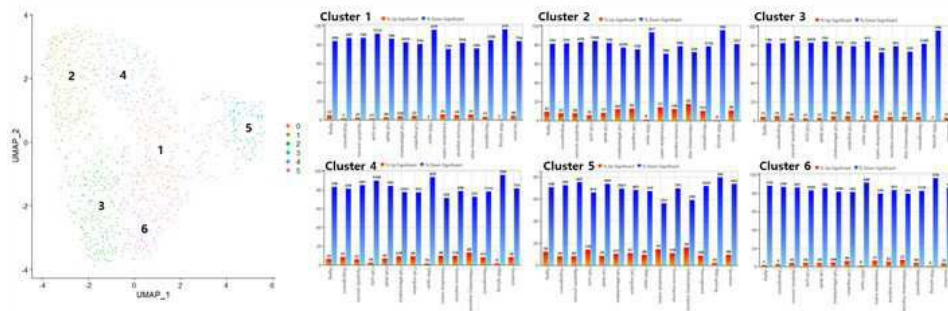
도면25



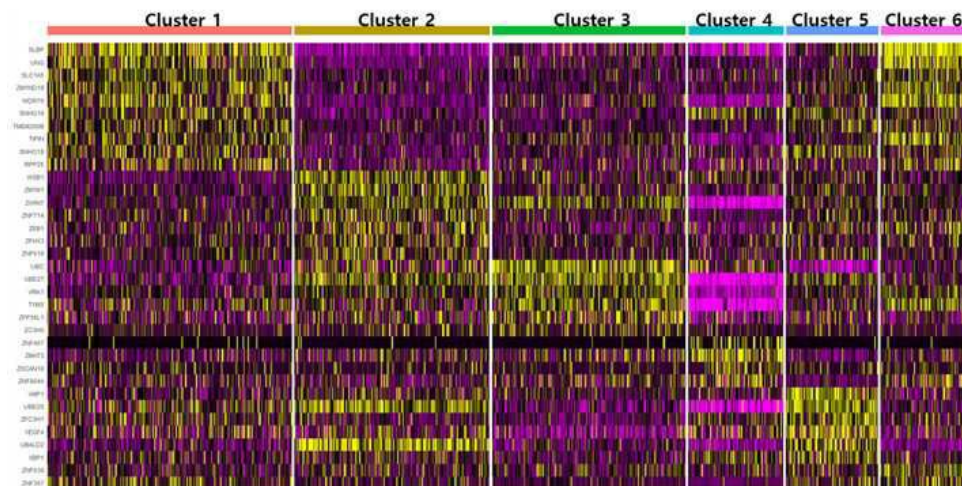
도면26



도면27



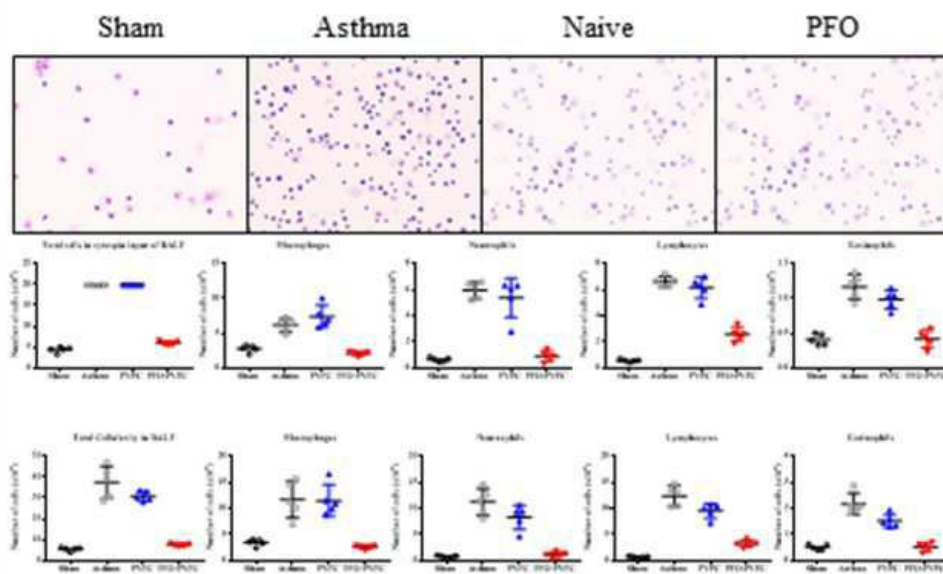
도면28



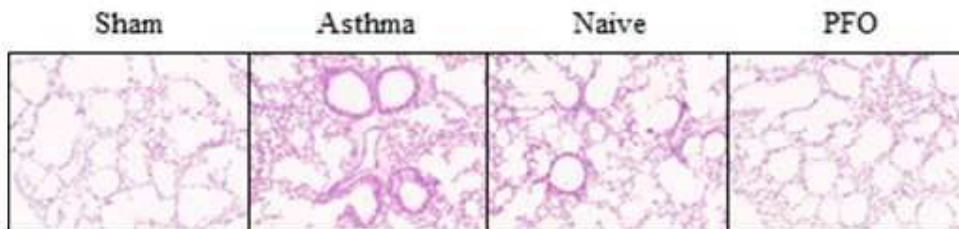
도면29

Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6
SLBP	CDCA8	HIST1H4C	MXD4	CCNB1	FAM111B
CDCA7	CENPA	HIST1H1B	MYL9	CDC20	CCNE2
MSH6	KPNA2	HIST1H1E	S100A11	CCNB2	MCM3
UNG	HJURP	HIST1H2AL	TSPO	VMP1	HIST1H1D
HNRNPF	ARL6IP1	HIST1H1A	IFI27L2	HILPDA	MCM10
SLC1A5	FAM83D	TNFRSF12A	MAP1A	HMMR	CDC6
ZMYND19	PLK1	HIST2H2AC	GUK1	PHLDA1	HNRNPF
C19orf48	AURKA	HIST1H1D	SELENOM	KNSTRN	HIST1H2AH
WDR76	PSRC1	HIST1H3B	ATP6V0E1	DEPDC1	CHAF1A
PAQR4	TOP2A	HIST1H2AH	SPARC	RAD21	SLBP

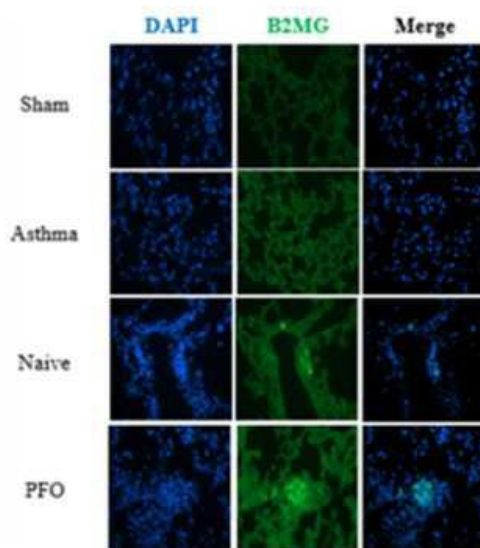
도면30



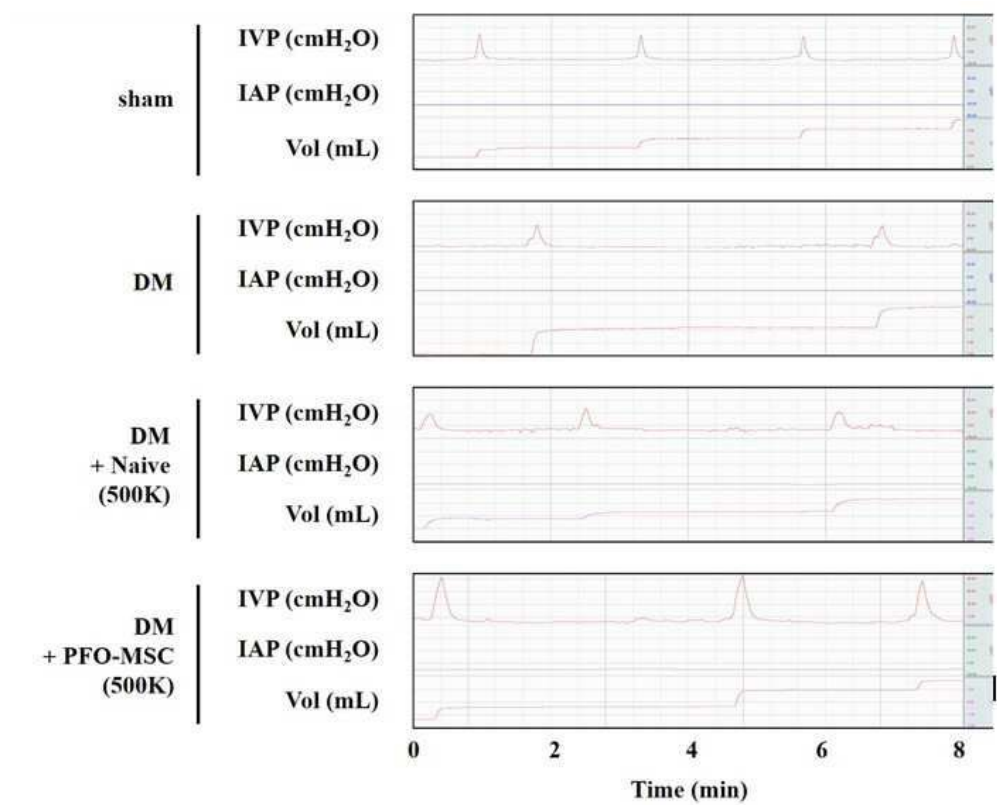
도면31



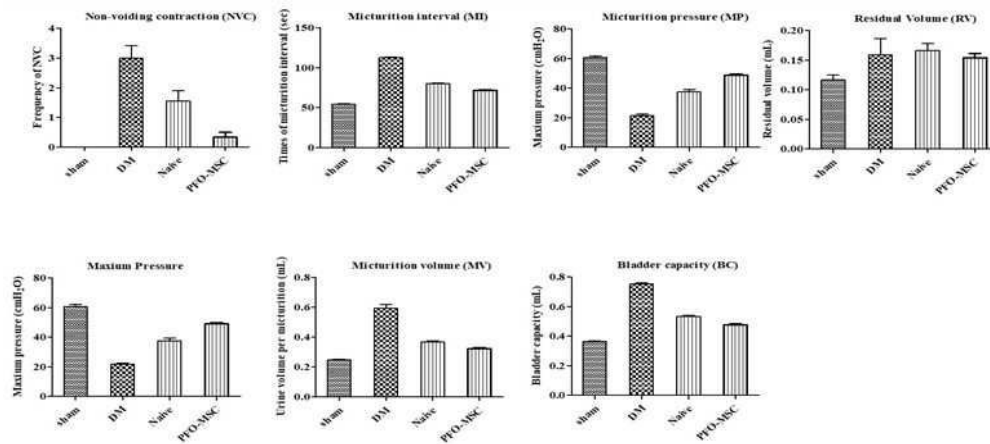
도면32



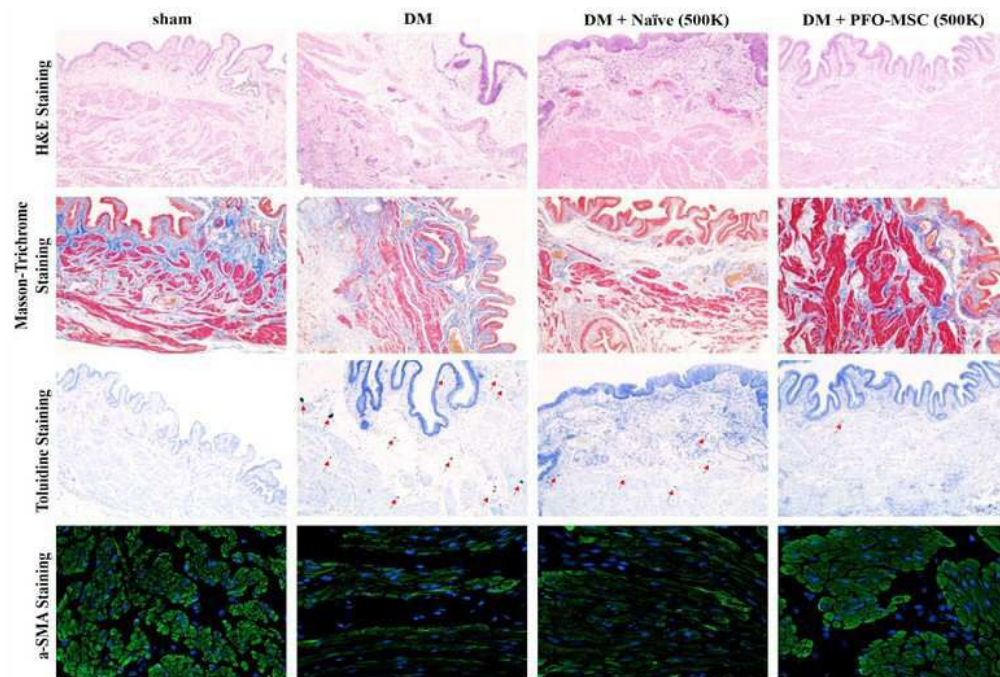
도면33



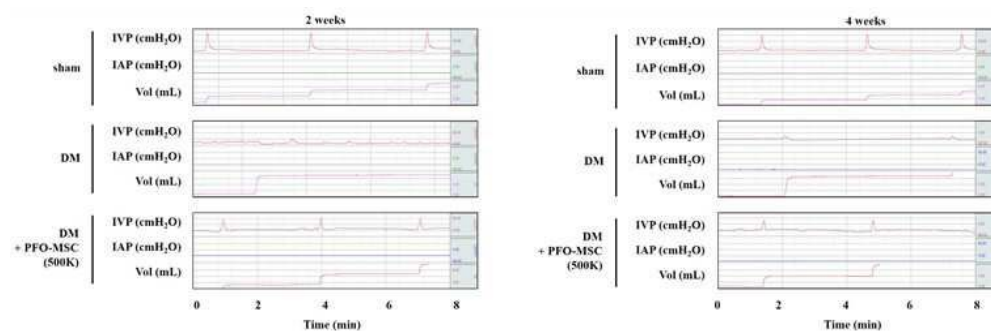
도면34



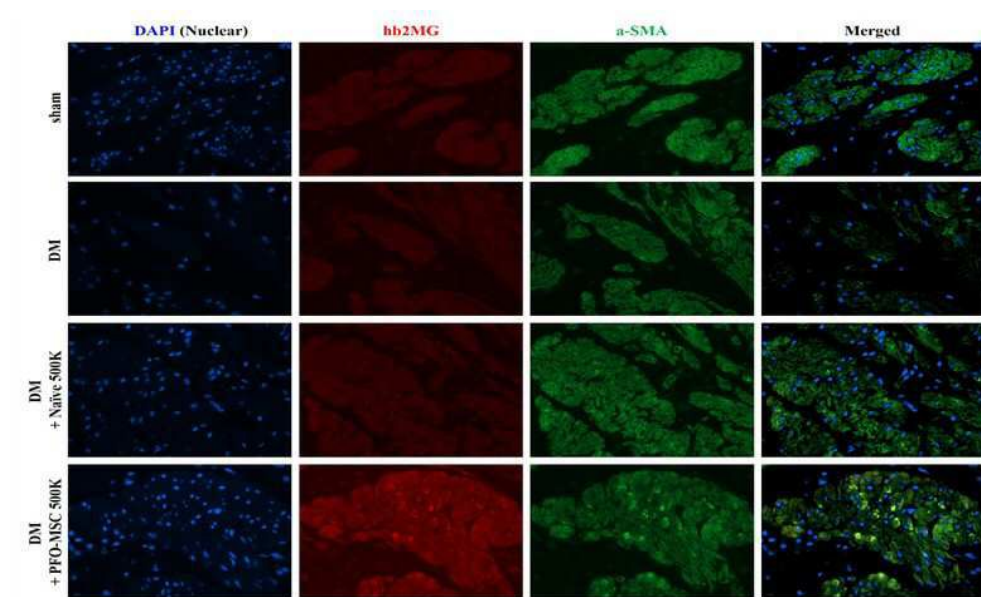
도면35



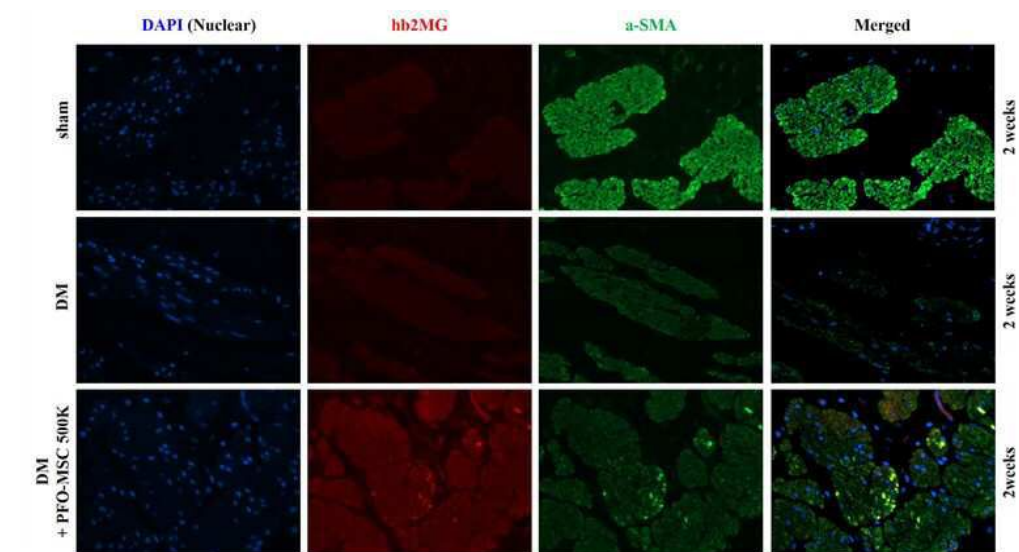
도면36



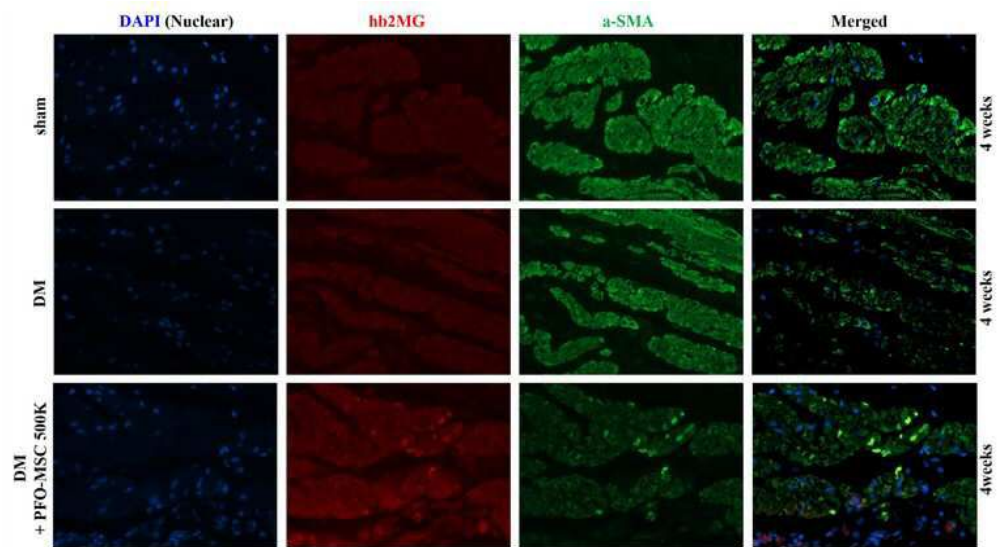
도면37



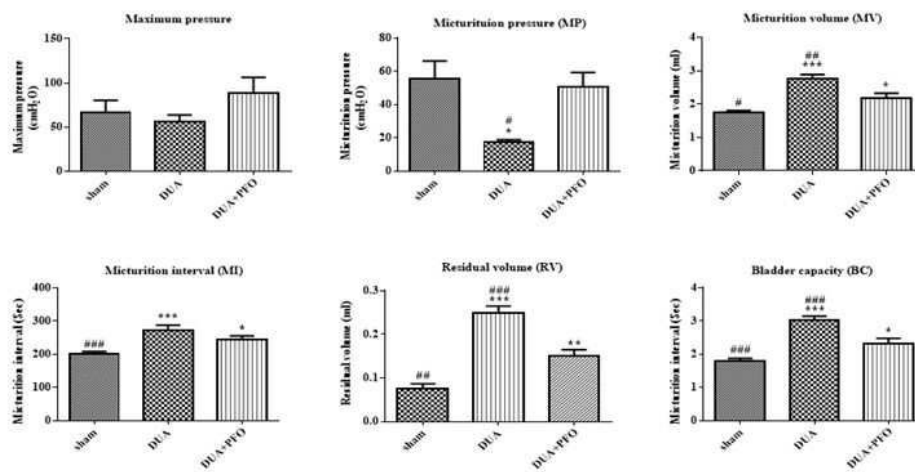
도면38



도면39

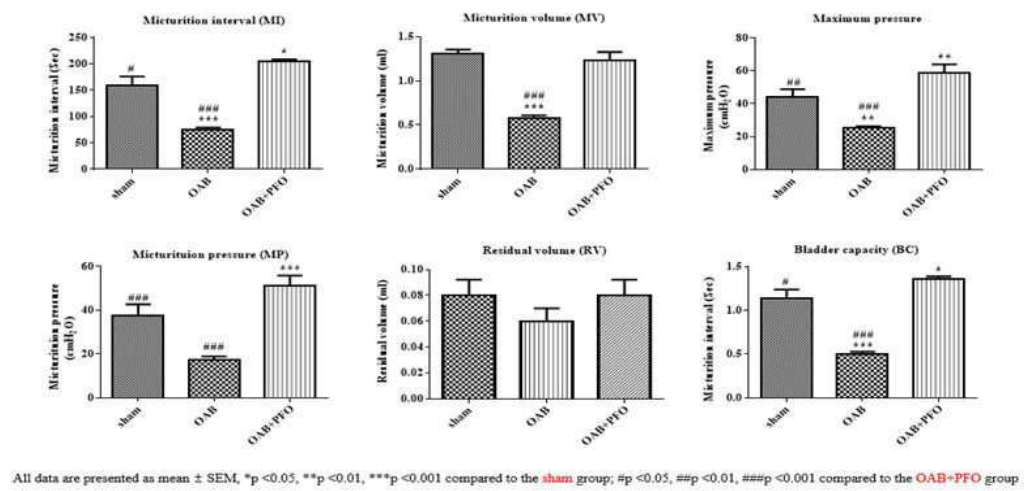


도면40

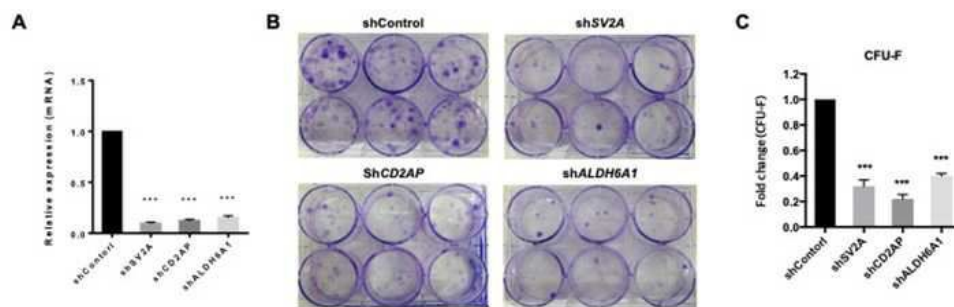


All data are presented as mean $\pm$ SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the sham group; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 compared to the DUA+PFO group

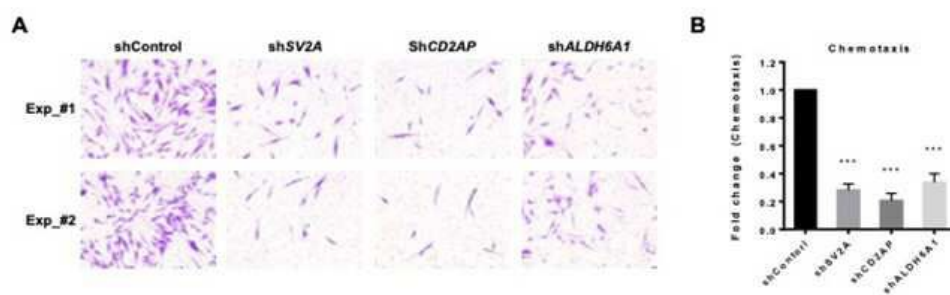
도면41



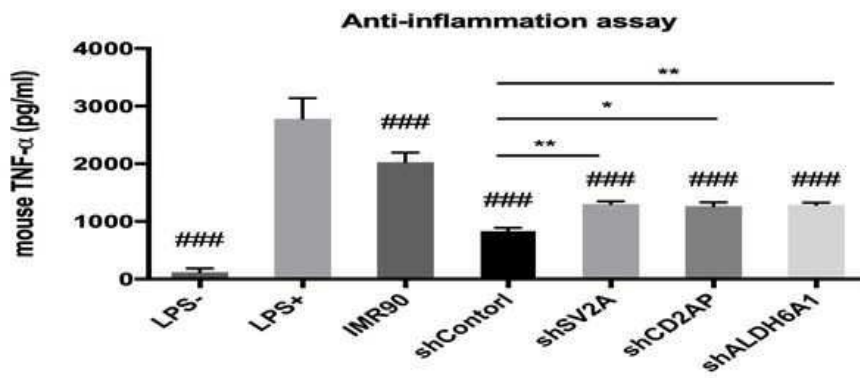
도면42



도면43



도면44



도면45

