



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0100502
(43) 공개일자 2010년09월15일

(51) Int. Cl.

A61K 35/12 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0019425

(22) 출원일자 2009년03월06일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

손영숙

서울특별시 송파구 송파2동 한양아파트 25동 807호

이은아

서울특별시 강동구 암사1동 491-26

홍현숙

서울특별시 광진구 자양동 690-64 102호

(74) 대리인

최규팔

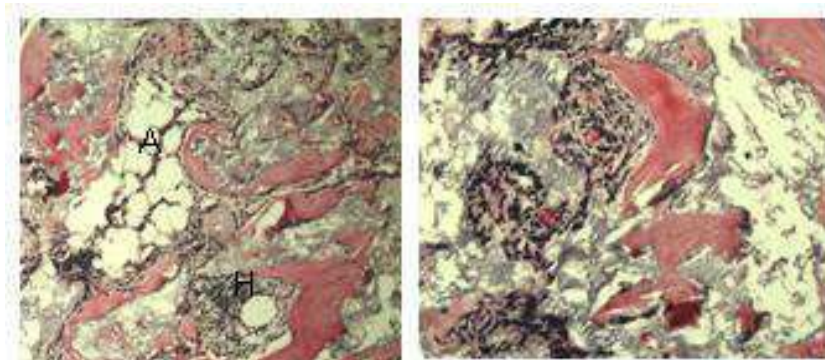
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) P 물질을 이용한 뼈 형성제 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 P 물질(Substance P)의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포(MSC: mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

P 물질(Substance P)의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포(MSC: mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제.

청구항 2

제1항에 있어서, 투여가 정맥주사에 의한 것인 뼈 형성제.

청구항 3

제1항에 있어서, 중배엽 줄기세포가 P 물질 투여 후 3일째 되는 날 채취한 혈액으로부터 분리한 것인 뼈 형성제.

청구항 4

P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는 뼈 형성제의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 투여가 정맥주사에 의한 것인 뼈 형성제의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 중배엽 줄기세포가 P 물질 투여 후 3일째 되는 날 채취한 혈액으로 분리한 것인 뼈 형성제의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 P 물질(Substance P)의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포(MSC: mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] P 물질은 감각 뉴런, 대식세포, 호산구, 내피세포와, 상피세포 및 케라토사이트와 같은 각막 세포, 및 육아조직(granulation tissue)에서 발현되는 11개의 아미노산으로 이루어진 뉴로펩티드이다. P 물질이 조혈 조절에 대한 신경-면역 커뮤니케이션에 관여하고 있음이 몇몇 보고서에서 제안된 바 있다. P 물질 신경 섬유가 골수 기질에 분포하고 있으며, P 물질은 골수 기질세포의 표면 수용체 NK-1을 통해 신호를 전달하여 골수 기질세포를 자극함으로써, 골수 기질세포가 공급자로서 조혈 촉진에 유리한 줄기세포 인자 및 인터류킨-1을 생산하도록 한다.

[0003] 골수의 중배엽 줄기세포는 뼈, 연골로의 분화가 가능한 세포로, 뼈 형성을 필요로 하는 질병 연구에 이용되고 있다. 기존에 중배엽 줄기세포를 분리하는 방법은 환자의 골수에서 직접 분리하는 것인데, 과정이 복잡할 뿐 아니라 자주 시행할 수 없고 환자에게도 힘든 과정이다. 상처가 없는 정상적 생리 상태에서 중배엽 줄기세포는 지방 조직과 익상편(ptyerygium)과 같은 골수 이외의 조직에서는 검출되지만, 말초혈액에서는 거의 검출되지 않는다.

[0004] 한편 본 발명자들의 선행 출원인 한국특허공개번호 제10-2006-0037176호는 P 물질이 골수로부터 중배엽 줄기세포를 유리 또는 증식시키는 것을 밝혀내고, P 물질 및/또는 P 물질 처리에 의해 골수로부터 유리된 중배엽 줄기

세포를 유효성분으로 함유하는 상처 치유제를 개시하고 있다.

[0005] 그러나 지금까지 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포만을 분리하여 이를 뼈 형성제로 사용하는 용도에 대해서는 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존의 환자의 골수에서 중배엽 줄기세포를 직접 분리하는 방법을 대신하여, 환자에게 고통을 주지 않고 쉽고 간편하게 골수의 중배엽 줄기세포를 분리하는 방법에 대하여 지속적인 연구를 수행하였으며, 그 결과 P 물질을 투여할 경우 골수의 중배엽 줄기세포가 혈중으로 유리되고 유리된 중배엽 줄기세포를 혈액으로부터 용이하게 분리하여 뼈 형성제의 유효성분으로 사용할 경우 뼈 형성 또는 골재생에 탁월한 효과를 나타냄을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

[0007] 따라서 본 발명의 제1목적은 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 제2목적은 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는 뼈 형성제의 제조방법을 제공하는 것이다.

효 과

[0009] 본 발명에 따른 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제 및 그 제조방법은 기존의 환자의 골수에서 중배엽 줄기세포를 직접 분리하는 방법과 달리 환자에게 고통을 주지 않고 쉽고 간편하게 골수의 중배엽 줄기세포를 분리할 수 있고, 기존의 골수로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포와 동등한 정도의 뼈 형성능을 나타내어 혈액으로부터 분리한 세포에 의해서도 뼈 형성 또는 골재생이 가능함을 최초로 입증한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 제1측면은 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 제2측면은 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는 뼈 형성제의 제조방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명자들은 이전의 연구(한국특허공개번호 제10-2006-0037176호)에서 실험 동물에 상처(예를 들어, 각막 화상)를 입히지 않고 P 물질을 정맥주사한 경우에도 훨씬 많은 CD29+ 중배엽 줄기세포가 말초혈액으로 이동하고, 시험관 내 3-D 콜라겐 젤에서 P 물질이 기질 분해효소를 유도하고 이들의 저해제를 저해함으로써 골수로부터 중배엽 줄기세포의 이동을 촉진함을 밝혔다.

[0013] 구체적으로, 본 발명자들은 상처 미세환경에서 발견되는 다른 인자들과는 별도로 P 물질만의 전신적 영향을 알아보기 위하여, P 물질을 상처가 없는 마우스에 정맥주사하고 CD29+ 중배엽 줄기세포의 말초혈액으로의 이동을 조사하였다. 그 결과, P 물질을 정맥주사한 경우 주사하지 않은 마우스에 비해 약 15배 많은 CD29+ 중배엽 줄기세포가 말초혈액으로 이동함을 확인하였다. 이로부터 P 물질이 상처 치유과정의 초기에 발현되어 중배엽 줄기세포를 골수로부터 혈중으로 이동시키고 궁극적으로 각막 상처 부위로 공급하여 각막 수복을 용이하게 하는 역할을 담당한다고 결론지었다.

[0014] 이후 계속된 연구를 통하여, 본 발명자들은 P 물질 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 혈액으로부터 분리하여 누드 마우스의 등쪽 피하에 이식한 결과 실제로 뼈 기질인 콜라겐이 생성됨을 확인하였다. 즉, 본 발명은 혈액으로부터 분리한 중배엽 줄기세포에 의해서도 실제로 뼈 형성 또는 골재생이 가능함을 최초로 입증하는 것이다.

[0015] 본 발명에 있어서, 골수로부터 중배엽 줄기세포를 혈중으로 유리시키기 위한 P 물질의 투여는 정맥주사, 피하주사, 내피주사, 근육주사 등의 주사가 바람직하며, 특히 정맥주사에 의해 투여되는 것이 가장 바람직하다.

- [0016] 본 발명에 있어서, 골수로부터 중배엽 줄기세포를 혈중으로 유리시키는데 유효한 P 물질의 투여량은 0.1 내지 1000 μ g/kg, 바람직하게는 0.1 내지 100 μ g/kg이나, 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또한 본 발명에 있어서, P 물질의 투여 후 골수의 중배엽 줄기세포가 혈중으로 유리되는 시기는 투여 후 2일 내지 4일째 되는 날이고, 바람직하게는 투여 후 3일째 되는 날이므로, 이때 혈액을 채취하여 중배엽 줄기세포를 분리하는 것이 바람직하다.
- [0018] 본 발명의 뼈 형성제는 유효성분으로 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 함유하고, 추가로 뼈 대체재(지지체)를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 중배엽 줄기세포는 뼈 대체재에 접촉 또는 로딩된 상태로 이용된다. 본 발명에 사용될 수 있는 뼈 대체재로는 상용화된 것이면 모두 가능하고, 특히 세라믹 재질을 기본으로 하는 물질이 바람직하다. 세라믹 재질을 기본으로 하는 물질의 예로, 하이드록시 아파타이트 트리칼슘 포스페이트(HA-TCP: Hydroxy apatite tricalcium phosphate)가 있다.
- [0019] 구체적으로, 본 발명자들은 P 물질을 토끼의 정맥에 5nmole/kg로 2회 주사(1회/일)하고 3일째 되는 날에 혈액을 채취한 후, 퍼콜 구배 원심분리를 이용하여 혈액 내 적혈구를 제거하고 분리된 단핵구 세포들을 약 2주 동안 배양하였다. 배양시간이 길어짐에 따라 중배엽 줄기세포의 수는 늘어나지만 초반에 섞여 있던 백혈구들은 모두 제거되어 2주 후에는 중배엽 줄기세포만 남았다. 이 세포를 트립신/EDTA로 처리하여 떼어낸 후, 세포의 수를 각각 세었다.
- [0020] 2×10^6 개의 중배엽 줄기세포를 HA-TCP 40mg이 들어 있는 튜브에 넣고 둘을 혼합한 후 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 1시간 배양 동안 골고루 혼합되도록 10분에 한번씩 튜브를 두드리거나 흔들어주어, 세포들을 HA-TCP 표면에 붙게 하였다.
- [0021] 동물은 누드 마우스를 이용하고 마우스의 등쪽 피하에 중배엽 줄기세포가 붙은 HA-TCP를 이식하였다. 이식물 분리 시기(즉, 뼈 형성 여부 관찰 시기)는 이식 후 8주 이상으로 하고, 바람직하게는 10주 후에 분리한다. 마우스의 등에서 이식물을 분리하여 4% 파라 포름알데하이드에 넣고 3일 동안 고정하였다. 고정 후 칼슘 제거를 위해 0.25M EDTA에 3주 동안 넣어주고 EDTA는 1주일에 3번씩 교체해주었다. 칼슘 제거 후 조직을 파라핀 ब्ल록으로 만들고 4 μ m 두께로 단면을 잘라 주었다. 충분히 건조시킨 뒤, 헤마톡실린/에오신(H/E) 염색을 통해 모양을 확인하였다.
- [0022] 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다. 구체적으로, 도 1은 분리한 이식물의 뼈 형성 여부를 관찰한 사진이고(분홍색: 콜라겐(뼈 기질), A: 지방조직, H: 골수조직, 진보라색: 섬유조직), 도 2는 도 1의 고배율 사진으로서, 분홍색의 콜라겐이 많이 형성된 점에 비추어 뼈 형성이 제대로 일어났음을 알 수 있다.
- [0023] 이어서, 생성된 뼈가 실제로 토끼 기원의 세포에 의한 것인지 확인해보았다. 뼈의 기질이 이식된 세포에 의해 형성된 것이라면 뼈의 기질은 토끼 항체와 반응해야 한다. 그 외에 지방조직, 골수조직, 섬유조직들은 반응해서는 안된다. 이를 확인하기 위해, 분리한 이식물에 토끼의 콜라겐과 반응하는 항체를 처리하여 염색하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 뼈 기질만 이 항체에 의해 염색되었고 주변 조직은 그렇지 않은 것을 확인할 수 있다.
- [0024] 한편, 동일한 항체를 마우스의 정상 피부 조직에 처리하여 염색하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 마우스의 정상 피부 조직에는 콜라겐이 존재함에도 불구하고(우측 사진), 토끼의 콜라겐과 반응하는 항체를 처리하여도 마우스의 콜라겐과는 반응하지 않는다는 것을 증명하였다(좌측 사진)(파란색: 콜라겐 붉은색: 세포질).
- [0025] 이러한 결과로부터, 도 3의 염색에 이용한 항체는 토끼에만 특이적으로 반응하는 항체임을 알 수 있으며, 결국 분리된 이식물의 뼈의 기질은 이식한 세포의 의해 생성된 것임을 다시 한번 확인할 수 있었다.
- [0026] 한편, 본 발명자들은 본 발명에 따른 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포가 기존의 골수로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포와 동등한 정도의 뼈 형성능을 나타내는지 여부를 확인하기 위해, 토끼의 골수로부터 직접 중배엽 줄기세포를 분리하여 동일한 실험을 수행하였다.
- [0027] 구체적으로, 골수 세척 및 흡인에 의해 토끼의 경골로부터 중배엽 줄기세포를 분리하여 중배엽줄기세포배양배지(MSCGM)에서 배양한 후, 상기와 동일한 방식으로 HA-TCP와 혼합하여 누드 마우스의 등쪽 피하에 이식하고 이식 후 10주 후에 분리하여 H/E 염색을 통해 모양을 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0028] 도 1과 도 5의 비교에 의해, P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포가 기존의 골수

로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포와 동등한 정도의 뼈 형성능을 나타냄을 알 수 있었다.

[0029] 상기한 바에 기초하여, P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포는 뼈 형성제의 유효 성분으로 사용될 수 있다. 본 발명의 뼈 형성제에 있어서, 중배엽 줄기세포의 유효용량은 뼈 대체재 40mg당 2×10^5 내지 2×10^7 세포이며, 바람직하게는 1×10^6 내지 3×10^6 , 가장 바람직하게는 2×10^6 이다. 그러나 이들의 용량은 환자의 골질환의 크기 및 정도에 따라 적의 증감될 수 있으며, 체중, 연령, 성별 등에 따라서도 증감될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 뼈 형성제는 각종 골절, 골괴사 질환 또는 골재생에 이용될 수 있다. 한 구체예로, 본 발명의 뼈 형성제를 복원하고자 하는 골질환의 크기만큼 환자의 피하에 이식하고, 이식 후 8주, 바람직하게는 10주 후에 이식물을 분리하여 환자의 복원하고자 하는 골질환 부위에 삽입함으로써 골질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

[0031] 이와 같이, 본 발명에 따른 P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 뼈 형성제 및 그 제조방법은 기존의 환자의 골수에서 중배엽 줄기세포를 직접 분리하는 방법과 달리 환자에게 고통을 주지 않고 쉽고 간편하게 골수의 중배엽 줄기세포를 분리할 수 있고, 기존의 골수로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포와 동등한 정도의 뼈 형성능을 나타내어 혈액으로부터 분리한 세포에 의해서도 뼈 형성 또는 골재생이 가능함을 최초로 입증한다.

[0032] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0033] 실시예

[0034] 실시예 1: P 물질 투여 후 혈액으로부터 중배엽 줄기세포의 분리 및 배양

[0035] P 물질(Calbiochem)을 1월령 토끼의 정맥에 5nmole/kg로 2회 주사(1회/일)하고 3일째 되는 날에 혈액을 채취하였다. 퍼콜 구배 원심분리를 이용하여 혈액 내 적혈구를 제거하고 분리된 단핵구 세포들을 2주 동안 배양하였다. 배양시간이 길어짐에 따라 중배엽 줄기세포의 수는 늘어나지만 초반에 섞여 있던 백혈구들은 모두 제거되어 2주 후에는 중배엽 줄기세포만 남았다. 이 세포를 트립신/EDTA로 처리하여 떼어낸 후, 세포의 수를 각각 세었다.

[0036] 2×10^6 개의 중배엽 줄기세포를 하이드록시 애파타이트 트리칼슘 포스페이트(HA-TCP: Hydroxy apatite tricalcium phosphate) 40mg이 들어 있는 튜브에 넣고 물을 혼합한 후 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 1시간 배양 동안 골고루 혼합되도록 10분에 한번씩 튜브를 두드리거나 흔들어서, 세포들을 HA-TCP 표면에 붙게 하였다.

[0037] 실시예 2: 뼈 형성능 확인

[0038] 생후 6주된 암컷 누드 마우스를 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 40~60%의 사육조건에서 동일한 표준사료와 수분을 공급하고 1주일간 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 마우스의 등쪽 피하에 실시예 1에서 제조된 중배엽 줄기세포가 붙은 HA-TCP를 이식하였다. 이식 후 10주가 되었을 때, 뼈 형성 여부를 관찰하기 위해 마우스의 등에 이식한 이식물을 분리하였다. 분리한 이식물을 4% 파라 포름알데히드에 넣고 3일 동안 고정하였다. 고정 후 칼슘 제거를 위해 0.25M EDTA에 3주 동안 넣어주고 EDTA는 1주일에 3번씩 교체해주었다. 칼슘 제거 후 조직을 파라핀 블록으로 만들고 4μm두께로 단면을 잘라 주었다. 충분히 건조시킨 뒤, 헤마톡실린/에오신(H/E) 염색을 통해 모양을 확인하였다.

[0039] 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다. 구체적으로, 도 1은 분리한 이식물의 뼈 형성 여부를 관찰한 사진이고 (분홍색: 콜라겐(뼈 기질), A: 지방조직, H: 골수조직, 진보라색: 섬유조직), 도 2는 도 1의 고배율 사진으로서, 분홍색의 콜라겐이 많이 형성된 점에 비추어 뼈 형성이 제대로 일어났음을 알 수 있었다.

[0040] 이어서, 생성된 뼈가 실제로 토끼 기원의 세포에 의한 것인지 확인해보았다. 뼈의 기질이 이식된 세포에 의해 형성된 것이라면 뼈의 기질은 토끼 항체와 반응해야 한다. 그 외에 지방조직, 골수조직, 섬유조직들은 반응해서는 안된다. 이를 확인하기 위해, 분리한 이식물에 토끼의 콜라겐과 반응하는 항체를 처리하여 염색하고, 그

결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 뼈 기질만 이 항체에 의해 염색되었고 주변 조직은 그렇지 않은 것을 확인할 수 있었다.

[0041] 한편, 동일한 항체를 마우스의 정상 피부 조직에 처리하여 염색하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 마우스의 정상 피부 조직에는 콜라겐이 존재함에도 불구하고(우측 사진), 토끼의 콜라겐과 반응하는 항체를 처리하여도 마우스의 콜라겐과는 반응하지 않는다는 것을 증명하였다(좌측 사진)(파란색: 콜라겐 붉은색: 세포질).

[0042] 이러한 결과로부터, 도 3의 염색에 이용한 항체는 토끼에만 특이적으로 반응하는 항체임을 알 수 있으며, 결국 분리된 이식물의 뼈의 기질은 이식한 세포의 의해 생성된 것임을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0043] 실시예 3: 골수로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포의 뼈 형성능 확인

[0044] 1월령 토끼의 경골로부터 골수 세척 및 흡인에 의해 중배엽 줄기세포를 분리하여 중배엽줄기세포배양배지(MSCGM)에서 배양한 후, 실시예 1 및 2와 동일한 방식으로 HA-TCP와 혼합하여 누드 마우스의 등쪽 피하에 이식하고 이식 후 10주 후에 분리하여 H/E 염색을 통해 모양을 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0045] 도 1과 도 5의 비교에 의해, P 물질의 투여에 의해 골수로부터 혈중으로 유리된 중배엽 줄기세포가 기존의 골수로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포와 동등한 정도의 뼈 형성능을 나타냄을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 토끼 정맥에 P 물질을 주사하여 혈액으로부터 분리한 중배엽 줄기세포를 누드 마우스에 이식 후 15주 후에 분리한 이식물의 뼈 형성 여부를 관찰한 사진이다(분홍색: 콜라겐(뼈 기질), A: 지방조직, H: 골수조직, 진보라색: 섬유조직).

[0047] 도 2는 도 1의 고배율 사진이다.

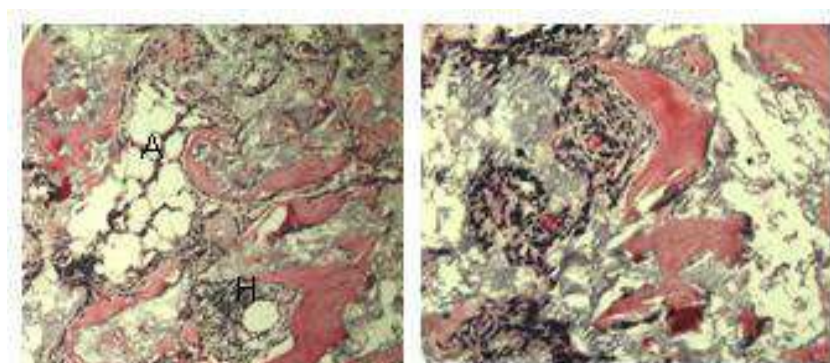
[0048] 도 3은 토끼 정맥에 P 물질을 주사하여 혈액으로부터 분리한 중배엽 줄기세포를 누드 마우스에 이식 후 15주 후에 분리한 이식물에 토끼의 콜라겐과 반응하는 항체를 처리하여 염색한 결과를 나타낸 사진이다.

[0049] 도 4는 토끼의 콜라겐과 반응하는 항체를 마우스의 정상 피부 조직에 처리하여 염색한 결과를 나타낸 사진이다(파란색: 콜라겐, 붉은색: 세포질).

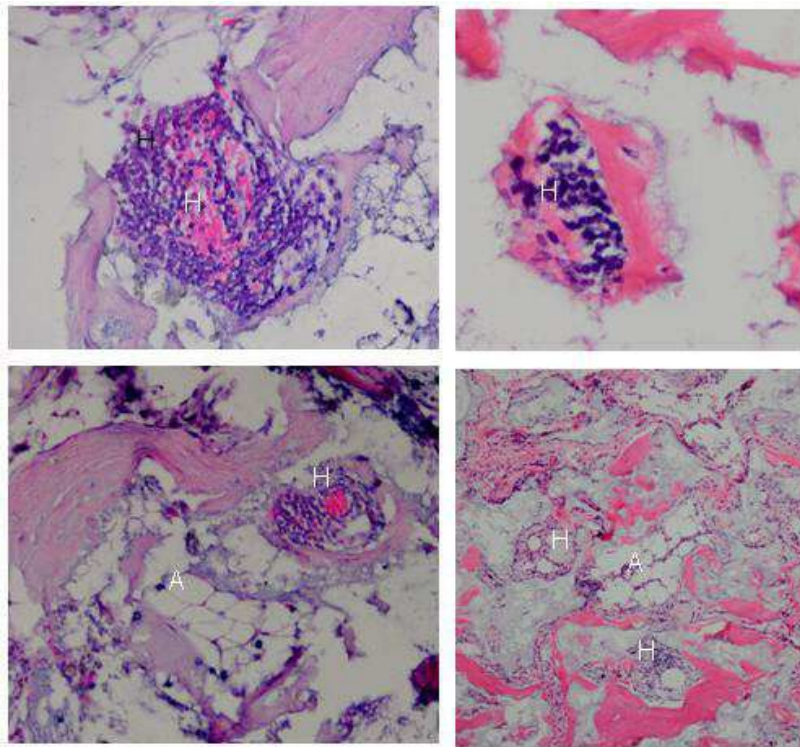
[0050] 도 5은 토끼 골수로부터 직접 분리한 중배엽 줄기세포를 누드 마우스에 이식 후 15주 후에 분리한 이식물의 뼈 형성 여부를 관찰한 사진이다(분홍색: 콜라겐(뼈 기질), 연보라색: 잔류하는 HA-TCP).

도면

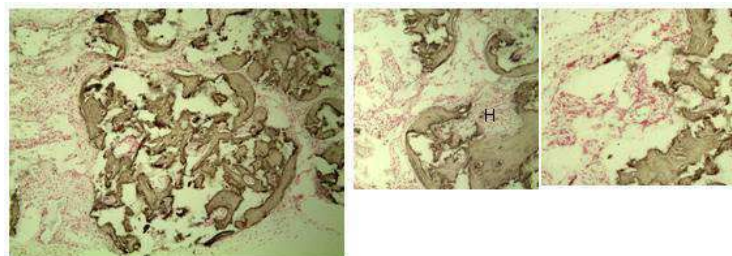
도면1



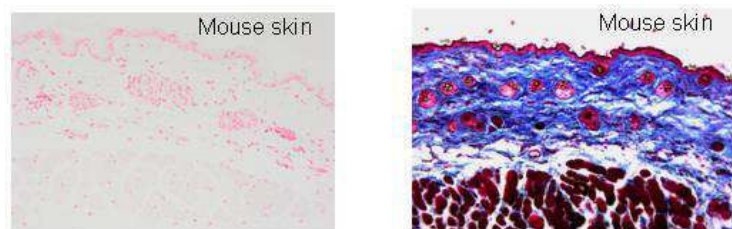
도면2



도면3



도면4



도면5

