



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월08일  
(11) 등록번호 10-2728330  
(24) 등록일자 2024년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/50 (2017.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 33/56966 (2013.01)  
G01N 33/5073 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2023-0082159  
(22) 출원일자 2023년06월26일  
심사청구일자 2023년06월26일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020230009566 A  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
이화여자대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)  
(72) 발명자  
김한수  
서울특별시 양천구 안양천로 1071  
김하영  
서울특별시 강서구 곰달레로31나길 36, 202호  
(74) 대리인  
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이수진

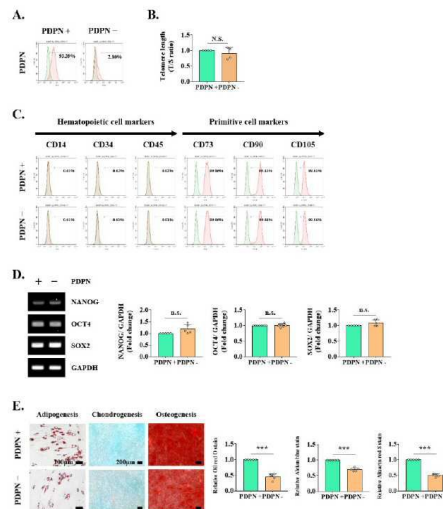
(54) 발명의 명칭 노화와 관련된 중간엽 줄기세포 검출용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 노화된 편도 유래 중간엽 줄기세포 검출용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 마커를 이용함으로써 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화를 정확하게 검출할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 조성물을 세포 혹은 배양액에 처리함에 따라 장기간의 배양기간에도 편도 유래 중간엽 줄기세포의 노화가 억제되고 다분화능을 유지할 수 있어, 이렇게 배양된 편도 유래 중간엽 줄기세포는 재생 의학 분야에서 치료 적용 자원 또는 치료자원으로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/5308 (2013.01)  
G01N 2800/7042 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Choi Da Hyeon et al, Biomaterials  
(2021.11.30.), vol 278; 121156, pp 1-14.  
Danielyan Lusine et al, EBioMedicine  
(2020.9.11.), vol 60.  
Ward Lewis SC et al, Journal of cell science  
(2019.2.25.), vol 132.5: jcs222067, pp 1-12.  
Yoon Hee-Soo et al, Biology (2022.2.7.), vol  
11.2: 255.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                          |
|-------------|--------------------------|
| 과제고유번호      | 1711196473               |
| 과제번호        | 23B0101L1                |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                |
| 과제관리(전문)기관명 | 재단법인 범부처재생의료기술개발사업단      |
| 연구사업명       | 재생의료 연계기술개발-재생의료 융합기술 개발 |
| 연구과제명       | 난치성 부갑상선 기능저하증 세포치료제의 개발 |
| 기 여 율       | 50/100                   |
| 과제수행기관명     | 이화여자대학교 산학협력단            |
| 연구기간        | 2023.04.01 ~ 2025.12.31  |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                              |
|-------------|----------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1345356332                                   |
| 과제번호        | 2021R1A6A3A01086945                          |
| 부처명         | 교육부                                          |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                       |
| 연구사업명       | 이공학학술연구기반구축                                  |
| 연구과제명       | 편도유래 줄기세포 기반 세포 시트의 개발 및 점막 결손 치료를 위한 유효성 분석 |
| 기 여 율       | 50/100                                       |
| 과제수행기관명     | 이화여자대학교 산학협력단                                |
| 연구기간        | 2021.09.01 ~ 2024.08.31                      |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

포도플라닌(podoplanin) 단백질에 특이적으로 결합하는 각각의 항체 또는 압타머를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포 노화(senescence) 검출용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 세포 노화는 세포 증식 능력의 저하, 세포 분열능 상실, 세포 이동의 저하, 세포 분화 능력의 저하, 텔로미어 길이 단축, 단일 세포의 크기 및 SA- $\beta$ -gal 증가로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 나타내는 것인, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화 검출용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 검출은 세포, 세포 배양액 또는 세포 용해액 내 포도플라닌(podoplanin) 단백질의 수준을 확인하는 것인, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화 검출용 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 선택되는 어느 한 항의 조성물을 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출용 키트.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 면역 분석(immune assay)용 키트인, 키트.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 면역분석은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제로 이루어진 군 중 선택되는 어느 하나인, 키트.

#### 청구항 7

- (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포 내 포도플라닌(podoplanin)의 단백질 발현을 검출하는 단계; 및
- (b) 상기 포도플라닌 단백질의 발현량을 측정하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, (c) 상기 포도플라닌 단백질의 발현이 초기(primary) 편도 유래 중간엽 줄기세포와 비교하여 저발현되는 경우, 세포노화로 판정하는 단계;를 더 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출 방법.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단백질 발현량 측정은 면역분석(immunoassay)에 의해 수행되는 것인, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 면역분석은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제로 이루어진 군 중 선택되는 어느 하나인, 편도 유래 중간

엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출 방법.

#### 청구항 11

- (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포 내 포도플라닌(podoplanin)의 단백질 발현이 감소된 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 포도플라닌 단백질의 발현량을 측정하는 단계;
- (c) 포도플라닌 단백질의 발현이 증가한 경우, 상기 시료를 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화 억제제로 판정하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 억제제 스크리닝 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단백질의 발현량을 측정하는 단계는 면역분석(immunoassay)에 의해 수행되는 것인, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 억제제 스크리닝 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 면역분석은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제로 이루어진 군 중 선택되는 어느 하나인, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 억제제 스크리닝 방법.

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 노화된 중간엽 줄기세포를 분별하기 위한 검출용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells, MSCs)는 재생 의학 분야에서 치료 적용을 위한 유망한 세포 공급원이다. MSCs는 골수, 지방 조직, 편도선 및 탯줄 등 다양한 성인 조직에서 얻을 수 있어, 배아 유래 줄기세포와 관련된 윤리적 문제를 회피할 수 있다. 현재까지 시험관 내(*in vitro*) 자가 재생, 다계통 분화, 생체 내(*in vivo*) 재생 과정을 촉진하는 면역 조절 작용이 가능한 MSCs의 특성을 이용한 치료 효과가 점점 더 많은 연구에서 보고되고 있다. 또한, MSCs에서 방출되는 영양 인자는 혈관신생 촉진 또는 항혈관신생 효과와 같은 또 다른 치료 역할을 나타낸다. 예를 들어, 마우스 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM-MSCs) 유래 엑소솜은 시험관 내 및 생체 내에서 4T1 유방암 세포의 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 억제함으로써 종양 진행 및 혈관 신생을 유의하게 억제한다. 이처럼 MSCs는 재생 의학의 치료 도구로서 많은 이점이 있지만 실험실 배양 조건에서 일관된 품질 관리에는 몇 가지 단점이 존재한다. MSCs는 충분한 양의 세포를 얻기 위해 시험관 내에서 증가된 계대 수로 확장될 수 있지만, 중간엽 줄기세포의 증식은 현저하게 감소하여 결과적으로 세포 노화로 이어진다.

[0003] 세포 노화는 세포의 복제능을 잃는 생리학적 과정이다. 세포 노화의 일반적인 특징은 세포 주기 진행의 중단, 리소좀 구획 또는 세포의 기질과 관련된 구조적 변화, 증가된 ROS 또는 기능 장애 미토콘드리아를 포함한 대사 적응으로 확인되었다. 또한, 세포 노화는 중간엽 줄기세포의 형태학적 및 기능적 특성의 변화를 초래할 수도 있다. 특히, 광범위한 실험실 내 확장을 통한 인간 BM-MSCs의 노화가 MSCs 표현형 및 분화능을 상당히 손상시킨다고 알려져 있다. 게다가, 장기간 배양된 인간 제대 유래 중간엽 줄기세포(UC-MSCs)는 많은 계대에 대해 확장될 수 있었지만, 대부분은 염색체 이상 또는 후생유전학적 특성의 변화와 같은 계능 변형을 초래하는 문제가 있다. 이러한 세포 노화에 관한 특성은 이전에 다양한 기원의 중간엽 줄기세포에서 보고되었지만, 중간엽 줄기세포의 노화 과정에 대한 자세한 기본 분자 메커니즘은 그 복잡성과 포괄적인 특성 때문에 이를 완전히 이해하기에 부

족함이 있었다.

[0004] ISCT(International Society for Cellular Therapy) 정의에도 불구하고 중간엽 줄기세포의 세포 집단은 기증자, 조직 공급원 및 세포 배양 환경을 포함한 다양한 요인으로 인해 매우 이질적으로 나타난다. 많은 연구자들이 MSCs의 이질성과 노화를 최소화하기 위해 표면 표현형 프로파일링을 사용하는 접근법을 확립했다. CD264+는 연속 계대 동안 세포 노화를 유도하고 CD264-와 비교하여 인간 BM-MSCs에서 증식 및 다계통 분화를 감소시켰다. 대조적으로, CD146의 하향 조절은 낮은 성장률, 다중 계통 분화, 만능성 관련 전사 인자(NANOG, OCT4 및 SOX2)의 발현 및 p16, p21, p53과 같은 노화 관련 마커의 높은 발현을 나타냈다. 이러한 모든 보고서는 MSC 노화 관련 바이오마커의 발견이 시험관 내 생물학적 특성 및 생체 내 치료 효능의 개선된 결과를 달성하는데 중요하다라는 것을 시사한다.

[0005] 이에, 본 발명자는 노화된 중간엽 줄기세포 검출용 조성물 및 이의 용도를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 편도 유래 중간엽 줄기세포(tonsil-derived MSCs, TMSCs)가 다양한 계통 세포로의 분화 잠재력이 크고 다른 유형의 조직 유래 중간엽 줄기세포보다 상대적으로 더 높은 증식률을 갖는 새로운 중간엽 줄기세포 공급원임을 확인하였다. 이러한 장점을 바탕으로 재생의학에서 TMSCs를 이용하여 중간엽 줄기세포의 세포 기전 또는 MSC 마커를 탐색한 결과, TMSCs를 포함한 일부 MSC 표면에서 발현되는 작은 막관통 당단백질(transmembrane glycoprotein)인 포도플라닌(podoplanin, PDPN)을 활용하여 노화된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 검출할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 포도플라닌(podoplanin) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출용 조성물 및/또는 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포 내 포도플라닌(podoplanin)의 단백질 발현을 검출하는 단계; 및 (b) 상기 포도플라닌 단백질의 발현량을 측정하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포 내 포도플라닌(podoplanin)의 단백질 발현이 감소된 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 포도플라닌 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및 (c) 포도플라닌 단백질의 발현이 증가한 경우, 상기 시료를 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화 억제제로 판정하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 포도플라닌(podoplanin)을 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화 억제제 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 포도플라닌(podoplanin)을 편도 유래 중간엽 줄기세포에 처리한 후 계대배양하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화(senescence) 억제 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 한다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니고, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.

[0012] 자가 재생 및 분화능을 갖는 중간엽 줄기세포는 재생 의학의 임상 적용 개발을 위한 유망한 세포 공급원으로 이용되고 있다. 중간엽 줄기세포 기반의 치료적 접근이 다양한 질병을 대상으로 급속히 증가하고 있지만, 중간엽 줄기세포의 노화에 따른 기능적 능력 저하에 대한 우려가 있어 고품질 효능 확보가 필수적이다.

[0013] 이에, 본 발명자는 예의 노력한 결과, 포도플라닌(podoplanin, PDPN)이 노화된 편도 유래 중간엽줄기 세포에서 상당히 감소함을 확인함으로써 포도플라닌이 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포 노화를 검출 또는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화 억제제를 스크리닝하기 위한 마커로 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한, siPDPN 등에 의해 PDPN의 발현을 억제한 세포에서 다계통 분화능, 세포주기 진행 등 편도 유래 중간엽 줄기세포가 가지는 특성이 손실되었음을 확인함에 따라, 포도플라닌이 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화를 억제할 수 있음을

확인하였다.

- [0014] 따라서, 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출용 조성물, 세포노화(senescence) 검출용 키트, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출 방법, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 억제제 스크리닝 방법, 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화 억제용 조성물 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화(senescence) 억제방법을 제공하고자 한다.
- [0015] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 포도플라닌(podoplanin) 단백질에 특이적으로 결합하는 각각의 항체 또는 압타머를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 검출용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 재생의학적 세포 치료에 유용한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화를 정확하게 검출할 수 있는 신규한 마커를 발굴하고자 예의 노력하였다. 그 결과, 일부 MSCs 표면에서 발현되는 작은 막관통 당단백질(transmembrane glycoprotein)인 포도플라닌(podoplanin, PDPN), 특히 포도플라닌의 단백질이 세포노화를 정확하게 검출할 수 있는 마커임을 규명하였다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 의하면, mRNA 발현이 아닌 단백질 수준에서 PDPN의 하향 조절이 계대 의존 방식으로 나타나, 15회 이상의 계대배양에서 PDPN 단백질의 발현이 노화된 편도 유래 중간엽 줄기세포의 용해물 및 세포 표면 모두에서 현저히 감소함을 확인하였다.
- [0018] 포도플라닌(podoplanin, PDPN)은 36~43 kDa의 질량을 갖는 점액형 막 단백질로, 해당 유전자는 인간 조직에 다양하게 분포되어 있는 type- I, 내재성 막 및 고도로 O-글리코실화된 당단백질을 암호화한다. PDPN은 암 분야에 광범위하게 연구되고 있을 뿐으로, 현재 세포노화와와의 연관성이 알려진 바 없다.
- [0019] 성체 유래 중간엽 줄기세포는 배아 유래 중간엽 줄기세포나 유도 만능 중간엽 줄기세포(iPSCs)와 관련된 윤리적 문제나 발암성에 대한 제한이 없기 때문에 많은 보고에서 광범위하게 조사되고 있다. 본 발명에서는 편도선 유래 중간엽 줄기세포를 이용할 수 있는데, 본 발명자의 이전 연구에서 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSCs)가 다양한 계통 세포로의 분화 잠재력이 크고 다른 유형의 조직 유래 중간엽 줄기세포보다 상대적으로 더 높은 증식률을 갖는 새로운 중간엽 줄기세포 공급원임을 확인한 바 있기 때문이다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 "세포 노화"는 세포가 일정 수의 분열 후에 비가역적으로(irreversible) 세포의 분열이 중지된 상태를 의미한다. 세포노화는 세포증식과 세포분열능력은 저하되어 있지만, 세포의 신진대사가 상당기간 유지된다는 점에서 세포사멸(cell death)과 차이가 있다. 이러한 세포 노화는 DNA 손상, 텔로미어 장애, 종양 유전자의 활성화, 그리고 세포소기관의 스트레스와 같은 매우 다양한 유발인자에 의해 발생한다.
- [0021] 다양한 세포들의 노화에서 나타나는 특징은 다음과 같다. 세포 노화의 우선적인 특징으로 p16, p21, p53 등과 같은 종양유발유전자의 증가 및 인산화 등으로 확인 가능한 유전자 수준의 불안전성, 텔로미어 길이의 단축과 같은 텔로미어 장애, DNA 메틸화, 히스톤의 번역 후 수정 등 후생유전학적 변경, 그리고 단백질 생산 기능 상실 등이 있다. 또한, 세포 혹은 조직에서 직접적으로 세포 노화를 확인하기 위한 방법으로는 증가된 단일 세포의 크기 및 SA-β-gal의 측정 그리고 미토콘드리아 기능 저하 등이 있다. 본 발명에 있어서 상기 용어 "노화된 편도 유래 중간엽 줄기세포"의 특징은 예를 들어 기본적으로 세포 증식 능력의 저하, 세포 분열능 상실, 세포 이동의 저하, 세포 분화 능력의 저하, 텔로미어 길이 단축, 단일 세포의 크기 및 SA-β-gal 증가, 또는 이들 모두의 특징을 나타내는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에서는, 15회 이상 계대배양한 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 배가 시간, 세포 크기 및 SA-β-gal에 대한 세포 염색의 증가와 텔로미어 길이의 단축, 분화능(지방형성, 연골형성 및 골형성)의 감소를 확인함으로써, 15이상 계대배양한 편도 유래 중간엽 줄기세포가 노화 세포임을 확인하고, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 특성이 시험관내 노화에 의해 영향을 받음을 입증하였다.
- [0023] 본 발명의 마커는 세포노화에 대한 지표가 될 수 있으며, 세포노화의 발생 및 발전의 검출에 이용될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "검출"은 생물학적 시료로서 예컨대, 세포, 세포 배양액 또는 세포 용해액 내 마커(즉, 포도플라닌(podoplanin) 단백질)의 수준을 확인하는 것이다.
- [0025] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기의 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화 검출용 조성물을 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포 노화(senescence) 검출용 키트를 제공한다.
- [0026] 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트일 수 있다. 즉 항원-항체 반응 방식으로 세포노화(senescence) 검출

을 실시할 수 있다. 이 경우, 본 발명의 세포노화 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 이용할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 이용되는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있다.

[0028] 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0029] 본 발명의 방법을 항체 또는 압타머를 이용하여 실시하는 경우, 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 세포노화를 검출하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있어, 참고할 수 있다.

[0030] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C14, I125, P32 및 S35)로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는데 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포배양액(또는 세포 용해물)을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 마커에 대한 항체와 상기 세포배양액(또는 세포 용해물)을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.

[0032] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.

[0033] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 마커에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 포도플라닌 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터

발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

- [0035] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0036] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 마커의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 변형예에 따르면, 항체 대신에 본 발명의 마커에 특이적으로 결합하는 압타머를 이용할 수 있다. 압타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 압타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0038] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 세포노화를 검출할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 마커에 대한 시그널이 정상 시료 보다 약하게 나오는 경우에는 세포노화로 판정한다.
- [0039] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 최적의 반응 수행 절차(조건)를 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트의 사용법, 예를 들면 시료와 키트 내용물의 적용 차례 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상의 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 제공되는 정보를 포함한다.
- [0040] 본 발명의 마커는 노화된 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 저발현 되는 생체 분자이다. 이러한 마커의 저발현은 단백질 수준에서 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "저발현"은 조사 대상의 시료에서의 대상이 되는 단백질의 발현 정도가 정상 시료와 비교하여 낮은 경우를 의미한다. 예컨대, PDPN의 단백질 발현이 초기계대(젊은) 줄기세포와 비교하여 90% 이하, 바람직하게는 85% 이하, 더욱 바람직하게는 80% 이하로 저발현되는 경우 세포노화로 판정한다.
- [0041] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포 내 포도플라닌(podoplanin)의 단백질 발현을 검출하는 단계; 및 (b) 상기 포도플라닌 단백질의 발현량을 측정하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포 노화(senescence) 검출 방법을 제공한다.
- [0042] 이때, 상기 방법은 (c) 상기 포도플라닌 단백질의 발현이 초기(primary) 편도 유래 중간엽 줄기세포와 비교하여 저발현되는 경우, 세포노화로 판정하는 단계;를 더 포함한다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 "초기 편도 유래 중간엽 줄기세포"는 인체로부터 분리한 계대 1 또는 계대 3~7 사이의 편도 유래 중간엽 줄기세포를 의미한다. 또는 세포 증식능력의 저하, 세포 분화 능력의 저하, 또는 텔로미어 길이 단축의 특징을 나타내지 않는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 의미한다.
- [0044] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포 내 포도플라닌(podoplanin)의 단백질 발현이 감소된 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 포도플라닌 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및 (c) 포도플라닌 단백질의 발현이 증가한 경우, 상기 시료를 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화 억제제로 판정하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화(senescence) 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 본 발명의 마커의 단백질 발현이 감소된 편도 유래 중간엽 줄기세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킨다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시료"는 본 발명의 마커의 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나,

이에 한정되는 것은 아니다.

- [0046] 이어, 시료가 처리된 세포에서 본 발명의 마커의 발현량을 측정한다. 발현량의 측정은 상기 기재한 바와 같이 실시할 수 있으며, 측정 결과, 본 발명의 마커의 단백질 수준이 고발현되는 경우에는 상기 시료는 세포노화 억제제로 판정될 수 있다.
- [0047] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 포도플라닌(podoplanin)을 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화 억제용 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 노화 억제용 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포가 일정 횟수의 분열 이후에 자가재생(selfrenewal) 및 다분화능(multipotency)으로 대표되는 편도 유래 중간엽 줄기세포 특성을 상실함으로써 개체수 및 재생능이 감소하는 현상인 노화를 억제한다.
- [0049] 본 발명에 따른 구현예에서, PDPN+ 세포는 PDPN- 세포보다 48시간에서 상당히 높은 증식능을 나타내었고, 스크래치 회복능이 현저히 높게 나타나 편도 유래 중간엽 줄기세포의 자가증식 및 세포 이동과 같은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 특성을 유지함을 확인하였다.
- [0050] 한편, 본 발명에서는 조직에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 분리한 후, 분리된 편도 유래 중간엽 줄기세포의 수를 충분히 확보할 수 있기 위한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공하고자 한다.
- [0051] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 분리된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계; 편도 유래 중간엽 줄기세포의 포도플라닌(podoplanin)의 발현 수준을 측정하는 단계; 포도플라닌(podoplanin)의 발현 수준이 높은 편도 유래 중간엽 줄기세포만을 취하는 단계;를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공한다.
- [0052] 상기의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 포도플라닌(podoplanin)을 편도 유래 중간엽 줄기세포에 처리한 후 계대배양하는 단계;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포 세포노화(senescence) 억제방법을 제공한다.
- [0053] 일 예로, 사람의 골수 유래 중간엽 줄기세포는 일반 체세포와 마찬가지로 체외 배양 시 계대 배양 횟수가 증가함에 따라 증식률이 감소하며 분화 능력이 감소되는 등의 특성 변화가 나타난다고 알려져 있다. 또한, 계대 배양 후반 시기에는 mTRF(mean telomere restriction fragment) 길이가 감소하며, SA  $\beta$ -gal(senescence-associated  $\beta$ -galactosidase)로 염색되는 세포 수가 증가하고, 세포의 성장과 증식 및 세포 주기와 관련된 유전자와 단백질 발현 변화가 보고되었다. 이러한 줄기세포 계대 배양에 대한 특성 변화를 최소화하고 활성이 우수한 편도 중간엽 줄기세포만을 취하기 위하여 본 발명에서는 포도플라닌을 줄기세포 분별을 위한 바이오마커로 사용 가능하며 또한 이를 직접 처리하거나 과발현하여 중간엽 줄기 세포의 노화를 억제한다.
- [0054] 본 발명은 포도플라닌(podoplanin)을 편도 유래 중간엽 줄기세포에 처리한 후 계대배양하는 단계;를 포함함으로써, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화를 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0055] 상기 계대 배양은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 동일성이 유지되면서 증식 배양되는 유지 배양으로, 이때 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 이용할 수 있다. 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 및 심근세포를 포함하는 세포로 분화할 수 있는 다능성(multipotency)을 보유한 세포이다.
- [0056] 바람직하게, 상기 계대 배양은 이에 한정되지 않으나, 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 10회 또는 그 이상으로 수행될 수 있다.
- [0057] 바람직하게 포도플라닌은 편도 유래 중간엽 줄기세포 배양배지에 첨가되어 이용될 수 있다. 상기 배지는 세포가 살아가기 위해 필요한 필수적인 당, 아미노산, 물 등이 포함되어 있는 혼합물로서, 혈청, 영양 물질 및 각종 편도 유래 중간엽 줄기세포 성장인자를 제외한 혼합물인 기본 배지를 이용할 수 있다. 이때 기본배지는 인위적으로 합성하여 사용하거나 상업적으로 구매 가능한 화학적으로 규명된 배지(chemically defined medium)를 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), a-MEM(a-Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), 및 IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium) 등이 가능하다.

[0058] 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양에 사용되는 배지는 체외 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양에 적절한 해당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 추가적으로, 박테리아, 곰팡이 등의 감염을 막기 위해 항생제, 항진균제 및 오염을 야기하는 마이코플라스마의 성장을 예방하는 해당 업계에서 일반적으로 사용하는 물질을 사용할 수 있다. 항생제로는 페니실린-스트렙토마이신 등 통상적으로 세포배양에 사용되는 항생제 모두 이용 가능하며, 항진균제로는 알포레리신 B, 마이코플라스마 억제제로는 젠타마이신, 시프로플록사신, 아지트로마이신 등의 일반적으로 사용하는 물질을 사용할 수 있다.

### 발명의 효과

[0059] 본 발명에 따른 포도플라닌 마커를 이용함으로써 편도 유래 중간엽 줄기세포의 세포노화를 정확하게 검출할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 조성물을 세포 혹은 배양액에 처리함에 따라 장기간의 배양기간에도 편도 유래 중간엽 줄기세포의 노화가 억제되고 다분화능을 유지할 수 있어, 이렇게 배양된 편도 유래 중간엽 줄기세포는 재생 의학 분야에서 치료 적용 자원 또는 치료자원으로서 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 편도선 유래 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSCs)에서 세포 노화 특성을 확인한 결과이다 (A: 연속 배양에 따른 세포성장시간 측정 결과, B: 계대 의존 방식에 의한 세포 길이와 너비의 측정 결과, C: 노화 관련  $\beta$ -갈락토시다제(SA- $\beta$ -gal) 검정 결과(파란색으로 염색된 세포는 노화 세포(검은색 화살표)임), D: 텔로미어 길이 측정 결과). Early(초기)는 3~7회 계대배양한 젊은 TMSCs이고, Late(후기)는 15회 이상 계대배양한 노화된 TMSCs임. 막대는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 통계적으로 중요한 차이는 \* $p$ <0.05 및 \*\*\* $p$ <0.001로 표시함. 알파벳은 실험 그룹 간의 유의미한 차이를 나타냄(\* $p$  < 0.05).

도 2는 ISCT 최소 기준에 의해 제안된 초기 및 후기 편도선 유래 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSCs)의 노화 특성을 확인한 결과이다 (A: 세포 크기와 입도를 평가 및 조혈 표면 마커(CD14, CD34 및 CD45) 및 원시 세포 마커(CD73, CD90 및 CD105)와 같은 MSC 특이적 표면 마커를 평가하기 위한 FSC(Forward Scatter) 및 SSC(Side Scatter) 값을 분석한 유세포 분석 결과, B: 전분화능(pluripotency) 관련 전사 인자(NANOG, OCT4 및 SOX2)의 유전자 발현 분석 결과, C) 지질생성(adipogenesis), 연골형성(condrogenesis) 및 골형성(osteogenesis)을 포함하는 다중 계통 분화 수준 평가 결과) 막대는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 통계적으로 중요한 차이는 \* $p$ <0.05 및 \*\*\* $p$ <0.001로 표시함. n.s.는 중요하지 않음.

도 3은 복제 노화를 통한 PDPN의 발현 변화를 확인한 결과이다 (A: 정량적 mRNA 발현 측정 결과, B: PDPN 및 GAPDH의 단백질 수준 측정 결과 C: 초기 및 후기 PDPN의 면역 표현형 분석 결과). 막대는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 알파벳은 실험 그룹 간의 유의미한 차이를 나타냄(\* $p$  < 0.05).

도 4는 FACS로 분류된 PDPN+ TMSCs 또는 PDPN- TMSCs에서 MSC 특성을 식별한 결과이다 (A: PDPN+ 세포 및 PDPN- 세포에 대한 PDPN의 면역표현형 분석 결과, B: T/S 비율 측정에 따른 텔로미어 길이 결정 결과, C: MSC 특이적 표면 마커 간의 차이 분석 결과, D: 전분화능 마커 분석 결과, E: PDPN+ 세포 및 PDPN- 세포의 다계통 분화능 분석 결과). 막대는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 통계적으로 중요한 차이는 \*\*\* $p$ <0.001로 표시함. n.s.는 중요하지 않음.

도 5는 PDPN가 세포증식, 세포 주기 및 세포이동능에 미치는 영향을 확인한 결과이다 (A: PDPN+ 세포 및 PDPN- 세포의 세포 증식 분석 결과, B: PDPN+ 세포 및 PDPN- 세포의 세포 주기 분석 결과, C: PDPN+ 세포 및 PDPN- 세포의 G0/G1 단계 관련 마커, CDK4 및 사이클린 D1의 단백질 수준 측정 결과, D: PDPN+ 세포 및 PDPN- 세포의 세포 이동능 분석 결과 (스크래치 회복률은 초기 스크래치 면적과 비교하여 남은 스크래치 면적의 백분율로 계산됨)). 막대는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 통계적으로 중요한 차이는 \* $p$ <0.01 및 \*\*\* $p$ <0.001로 표시함.

도 6은 PDPN siRNA로 형질감염 후 세포 주기 및 세포 이동능을 평가한 결과이다 (A: 정량적 mRNA 발현 수준 측정 결과, B: PDPN 및 GAPDH의 단백질 수준 측정 결과, C: 세포 주기 분석 결과, D: G0/G1 단계 관련 마커인 CDK4 및 사이클린 D1의 단백질 수준 측정 결과, E: 세포 이동능 분석 결과 (스크래치 회복률은 초기 스크래치 면적과 비교하여 남은 스크래치 면적의 백분율로 계산됨)). 막대는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 통계적으로 중요한 차이는 \* $p$ <0.01 및 \*\*\* $p$ <0.001로 표시함. n.s.는 중요하지 않음.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0062] **재료 및 방법**
- [0063] **1. 편도 유래 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSCs)의 분리 및 확장**
- [0064] TMSCs는 한국 이화여자대학교 목동병원 임상심사위원회(EUMC-2019-08-030)의 승인을 받은 프로토콜(Cytherapy. 2012;14(10):1193-202)에 따라 분리되었다. 또한, 편도선 절제술을 받는 10세 미만의 환자는 법적 보호자로부터 정보에 입각한 서면 동의를 얻었다. 구체적으로, 4명의 기증자로부터 수집한 편도선 조직을 가위를 사용하여 작은 조각으로 절단하였다. 절단된 조직은 210 U/ml 콜라게나제 I형(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 및 10 mg/ml DNase(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 37℃에서 30분 동안 효소 처리한 후, 조직을 여과하고 Ficoll-Paque(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)로 원심분리하여 단핵 세포를 얻었다. 단핵 세포를 배양 플레이트에 도말하고 48시간 동안 배양한 뒤, 부착되지 않은 세포는 버리고 부착 세포(TMSCs)를 하기 실험에 사용하였다.
- [0065] 하기 실험에서 TMSCs는 10% 태아 소 혈청(FBS; Young In Frontier, Seoul, Korea), 100 U/ml 페니실린, 100 U/ml 스트렙토마이신, 0.25 µg/ml 암포테리신 B로 보충된 저포도당(1,000 mg/L)을 포함하는 DMEM (DMEM-LG; Welgene Inc.)에서 37° C의 가습 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양 및 확장되었다. 분리 실험을 위해 TMSCs를 계대(passage) 범위가 다른 두 그룹으로 나누었다. 초기 계대 TMSC(초기; Early)는 3-7회 계대 사이에 있고, 후기 계대 TMSCs(후기; Late)는 15회 이상의 계대이다.
- [0066] **2. 배가 시간 및 세포 크기 측정**
- [0067] 편도유래 중간엽 줄기세포(TMSCs)를 72시간 또는 96시간 동안 배양한 다음 80-90%의 컨플루언스(confluence)에서 트립신-EDTA(trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid) 용액(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 수확하였다. 트립판 블루(trypan blue)와 혼합된 현탁 세포의 생존 세포를 혈구계산기를 사용하여 계수하였다. TMSCs의 각 계대에서 초기 세포 수와 최종 세포 수를 수집한 다음 하기 수학적 1의 공식을 사용하여 배가 시간(doubling time)을 계산하였다.
- [0068] [수학적 1]
- [0069] 
$$\text{배가 시간(h)} = \left[ \frac{\{T - T_0\}(\log_0)}{(\log N - \log N_0)} \right]$$
- [0070] 별도의 실험에서, TMSCs는 표시된 계대에서 배양 접시에 분주되었고 광학 현미경(Olympus, BX51, 일본) 하에서 24시간 후 무작위로 선택된 최소 5개의 필드에서 가시화되었다. 각각의 세포 길이와 확장 너비는 각각 Image J 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 측정하였다.
- [0071] **3. 노화 관련 β-갈락토시다제 분석**
- [0072] 노화 관련 β-갈락토시다제(SA-β-gal)의 활성은 SA-β-gal 염색 키트(Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 TMSCs의 계대 범위가 다른 두 그룹에서 검출하였다. 간략히 설명하면, TMSCs를 실온에서 15분 동안 1x 고정액으로 고정한 다음 Dulbecco의 인산염 완충 식염수(DPBS; Welgene Inc.)로 두 번 세척하였다. 고정된 세포를 CO<sub>2</sub>가 없는 37℃ 건식 인큐베이터에서 24시간 동안 β-gal 염색 용액(pH 6.0)과 함께 인큐베이션하였다. 노화 세포는 파란색으로 관찰되었으며 광학 현미경으로 시각화하였다.
- [0073] **4. 역전사 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)**
- [0074] TMSCs의 전체 RNA는 TRizol®시약(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 추출하였고, 2 µg의 총 RNA를 제조업체의 지침에 따라 Superscript 역전사 효소, dNTP 및 oligo-dT 프라이머로 cDNA를 합성하는데 사용하였다. PCR 증폭의 반응 조건은 94℃에서 2분간 1 사이클, 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분간, 72℃에서 5분간 36 사이클로 진행하였다.
- [0075] **5. 텔로미어 길이 측정**
- [0076] 제조업체의 지침에 따라 DNeasy Blood & Tissue 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 TMSCs로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 게놈 DNA는 텔로미어와 단일 카피 유전자의 비율(T/S 비율)에 대한 척도인 상대 텔로미어 길이를 결정하는데 사용하였다. 간단히 말해, Power SYBR™ Green PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific), 텔로미어 프라이머 쌍(telg 및 telc) 또는 단일 카피 유전자 증폭을 위한 36B4 프라이머 쌍을 사

용하여 게놈 DNA(200 ng/ $\mu$ l)를 합성하였다. 모든 PCR 반응은 QuantStudio 3 Real-time PCR 시스템(Thermo Fisher Scientific)에서 수행하였다.

## 6. 프라이머 서열

본 실험에 이용된 전분화능 관련 전사 인자, PDPN, 텔로미어 및 단일 카피 유전자의 증폭을 위한 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

| Primers  |      | 서열<br>번호 | Sequences (5'→3')                 |
|----------|------|----------|-----------------------------------|
| NANOG    | F    | 1        | ATG GTG TGA CGC AGG GAT G         |
|          | R    | 2        | TGG TTG CTC CAG GTT GAA TTG       |
| OCT4     | F    | 3        | CTT GAA TCC CGA ATG GAA AGG G     |
|          | R    | 4        | GTG TAT ATC CCA GGG TGA TCC TC    |
| SOX2     | F    | 5        | AAC CAA GAC GCT CAT GAA GAA G     |
|          | R    | 6        | CAT GTG CGC GTA ACT GTC C         |
| PDPN     | F    | 7        | AGG TGC CGA AGA TGA TGT GG        |
|          | R    | 8        | AGT TGG CAG ATC CTC GAT GC        |
| GAPDH    | F    | 9        | GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT       |
|          | R    | 10       | GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG    |
| Telomere | Telg | 11       | GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT       |
|          | Telc | 12       | GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT       |
| 36B4     | F    | 13       | CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC    |
|          | R    | 14       | CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A |

## 7. 유세포분석

TMSCs의 면역 표현형은 유동 세포 계측법을 사용하여 조사하였다. TMSCs를 단일 세포로 수집하고 CD14, CD34, CD73 및 PDPN에 대한 피코에리트린(PE) 접합 항인간 항체 또는 CD45, CD90 및 CD105에 대한 FITC(fluorescein isothiocyanate)-접합 항인간 항체로 4° C에서 30분간 염색하였다. 염색 후 ACEA NovoCyte 유세포 분석기(Agilant Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 세포를 분석하였다. 모든 항체는 BD Biosciences(San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

## 8. 형광 활성 세포 분류(FACS)

TMSCs를 단일 세포로 준비하고 PE-접합 항인간 PDPN으로 4° C에서 30분 동안 표지하였다. 세포를 FBS가 포함된 세포 선별 완충액으로 2회 세척한 후 70  $\mu$ m 세포 여과기(Corning Inc., Corning, NY, USA)를 사용하여 여과하였다. 여과된 단일 세포를 S3e™ 세포 분류기(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에서 PDPN+ 또는 PDPN - 세포로 분류하였다. 분류 후, 세포를 배양 플레이트에 분주하고 추가 실험을 위해 배양하였다.

## 9. TMSC의 다계통 분화

다계통 분화 수준을 조사하기 위해 TMSCs를 시중에서 판매되는 지방 분화, 연골 분화 및 골 분화 배지(Thermo Fisher Scientific)에서 2주 동안 배양하였다. 각 분화 배지는 3~4일마다 교체하였다. 분화된 TMSCs를 4% 파라포름알데하이드로 30분 동안 고정하고 DPBS로 세척하였다. Oil red O, Alcian blue 및 Alizarin red S 염색을 이용하여 각각 지방 형성, 연골 형성 및 골 형성 분화 세포의 능력을 검증하였다. 30분 동안 염색한 후 세포를 DPBS로 2회 세척하고 현미경으로 관찰하였다. 최소 3개의 무작위로 얻은 이미지를 RGB 스택으로 변환하여 Image J 소프트웨어를 사용하여 차별화된 수준을 정량화하였다.

## 10. 웨스턴 블롯 분석

20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA(ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid) 및 Protease Inhibitor Cocktail™를 포함하는 용해 버퍼를 이용하여 TMSCs를 추출하였다. 동일한 부피(20  $\mu$ g)의 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하고 Trans-Blot Turbo 시스템(Bio-Rad Laboratories Inc.)을 사용하여 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 트랜스퍼된 막을 5% 탈지유로 고정하고 PDPN, CDK4(cyclin-dependent kinase 4) 및 cyclin D1(1:1000 희석; Cell signaling Technology,

Boston, MA, USA), GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 1:5000 dilution; AbFrontier, Seoul, Korea)에 대한 1차 항체 각각과 함께 배양하였다. 그리고 그에 상응하는 2차 항체와 배양하였다. 단백질을 화학 발광 시약 (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 발광 이미지 분석기 (Cytiva, Marlborough, MA, USA)에서 인화되었다(developed).

## 11. 세포 생존력/증식 분석

PDPN+ 및 PDPN- 세포로 세포를 분류한 후, 약간의 수정을 가하여 세포 생존/증식 검정을 수행하였다. 간략하게, 분류된 세포를 24-웰 플레이트에  $1 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액(Sigma-Aldrich)을 지정된 시간에 (0, 24, 48 및 72시간) 각각 첨가하였다. 37° C, 가습 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 2시간 동안 배양한 후 염색된 자주색 포르마잔을 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich)를 사용하여 용해시키고 동량의 용해된 용액을 96-웰 플레이트로 옮겼다. 마이크로플레이트 판독기로 540nm에서 흡광도를 측정하고 시간 0에서의 값에 대해 상대적인 값으로 표현하였다.

## 12. 세포 주기 분석

TMSCs( $1 \times 10^5$  cells)는 트립신-EDTA 용액을 사용하여 단일 세포로 준비하였고, 4°C에서 1시간 동안 70% 에탄올 용액으로 고정하였다. 고정된 세포를 2% FBS가 포함된 차가운 DPBS를 사용하여 세척하고 어두운 곳에서 37° C, 가습 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 30분 동안 RNase A(Sigma-Aldrich) 및 요오드화 프로피듐(PI; BD Biosciences)으로 염색하였다. 세포 주기 분포의 분석은 ACEA NovoCyte 유세포 분석기를 사용하여 수행하였다.

## 13. 체외 세포 이동 분석

TMSCs를 6-웰 플레이트에  $3 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 후, 80~90%의 컨플루언스(confluence)에 있는 세포를 37° C, 가습 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 2시간 동안 10 µg/ml의 mitomycin C로 처리하였다. 세포를 DPBS로 부드럽게 세척하고 배양 배지를 공급하였다. 200µl 피펫 팁으로 긁어서 선형 스크레이퍼를 만들었다. 스크레이퍼 회복 정도는 각 시점(0 및 24시간)에서 현미경을 사용하여 이미지화하였다. 잔류 스크레이퍼 영역의 백분율은 초기 스크레이퍼 면적에 비례하여 측정하였다.

## 14. 형질감염 (transfection)

80% 컨플루언시(confluency)의 TMSCs를 각각 100 nM의 control siRNA(small interfering RNA)(siCON; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 PDPN siRNA(Bioneer Inc., Oakland, CA, USA)로, 제조업체의 지침에 따라 Lipofectamine 3000(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 24시간 동안 인큐베이션한 후 추가 실험에 사용하였다.

## 15. 통계 분석

모든 결과는 평균 ± 표준 편차(S.D.)로 표시된다. 통계적 유의성은 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 결정하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 실험적 시도는 결과의 재현성을 검증하기 위해 적어도 세 번 반복하였다.

## 실시예 1. 편도 유래 중간엽 줄기세포의 특성과 노화 관련 변화 평가

### 1. TMSCs의 복제 노화 검증

세포 배양 중 계대수에 따른 TMSCs의 세포 성장률과 형태학적 변화를 평가하고자 하였다. 이를 위하여, 4개의 다른 기증자로부터 얻은 TMSCs를 연속적으로 배양하고 계대 4에서 계대 16까지의 배가 시간을 계산하였다. 도 1A에 나타난 바와 같이, 계대 14에서 평균 배가 시간이  $37.42 \pm 5.30$  h이나, 계대 15 이상에서  $48.41 \pm 5.70$  h로 크게 증가하였음을 발견하였다.

한편, 세포의 길이와 폭을 측정하여 형태학적 변화를 관찰하였다. 도 1B에 나타난 바와 같이, 계대 5에서  $318.67 \pm 75.30$  µm, 계대 10에서  $338.46 \pm 57.13$  µm, 계대 15에서  $307.28 \pm 62.57$  µm로 나타나, TMSC의 세포 길이는 계대 15까지 다르게 나타나지 않았다. 그러나, 세포의 폭은 계대 5에서  $22.61 \pm 6.73$  µm, 계대 10에서  $25.52 \pm 9.50$  µm, 계대 15에서  $36.21 \pm 13.50$  µm으로, 계대 5보다 계대 15에서 현저히 넓게 나타나 계대에 따라 증가하였다.

- [0102] 한편, 상기 결과를 기반으로 TMSCs의 계대 의존적 노화를 확인하기 위하여, TMSCs를 두 그룹으로 나누었다: 초기 계대 세포(Early 또는 E; 젊은 세포)로서 계대 3 내지 7 내에서 배양된 TMSCs 및 후기 계대 세포(Late 또는 L; 노화된 세포)로서 계대 15 이상에서 배양된 TMSCs.
- [0103] 도 1C에 나타난 바와 같이, SA- $\beta$ -gal 염색은 노화된 세포 (Late)가 젊은 세포 (Early)보다 상당히 높은 세포 노화 정도를 나타냄을 보여주었고, 도 1D에 나타난 바와 같이, 복제 노화와 관련된 텔로미어 길이의 단축을 시사하는 T/S 비율이 노화된 세포에서 현저히 감소하였음을 확인하였다.
- [0104] 이러한 결과는, 계대 15 이상의 TMSCs는 노화된 세포임을 시사한다.
- [0105] **2. MSC 특성의 복제 노화 관련 변화 검증**
- [0106] 면역학적 표면 표현형, 전분화성 마커 및 다중 계통 분화 능력과 같은 MSC 특성이 복제 노화를 통해 변경되었는지 여부를 조사하였다.
- [0107] 도 2A에 나타난 바와 같이, 세포 크기 및 입도를 평가하기 위한 전방 산란(FSC) 및 측면 산란(SSC) 값은 젊은 세포에 비해 노화된 세포에서 증가하였다. 그러나 두 그룹 사이에 ISCT 최소 기준에 의해 제한된 면역 표현형 마커인, 조혈 표면 마커(CD14, CD34 및 CD45)에 대한 음성 발현 및 원시 세포 마커(CD73, CD90 및 CD105)에 대한 양성 발현에는 차이가 없었다.
- [0108] MSCs는 배아 편도 유래 중간엽 줄기세포(ESC)의 전분화성을 유지하는 전분화성 관련 전사 인자인 NANOG, OCT4 및 SOX2를 발현한다. 도 2B에 나타난 바와 같이, RT-PCR은 OCT4와 SOX2의 유전자 발현이 복제 노화를 겪음으로써 노화된 세포에서 유의하게 감소했지만 NANOG는 그렇지 않은 것으로 나타났다.
- [0109] 한편, 다계통 분화능(지방형성, 연골형성 및 골형성)에 대한 복제 노화의 영향을 조사하였다. 분화능을 평가하기 위해 젊은 세포와 노화된 세포가 지방 세포, 연골 세포 또는 골 세포와 같은 중배엽 세포로 분화되었는지 여부를 평가하였다.
- [0110] 도 2C에 나타난 바와 같이, 젊은 세포와 비교하여 노화된 세포에서 Oil red O, Alcian blue 및 Alizarin red S 염색 수준이 감소되었음을 확인하였다. 이러한 결과는, 노화된 세포에서 중배엽 분화능이 상당히 감소하였음을 나타낸다.
- [0111] **실시예 2. 편도 유래 중간엽 줄기세포의 노화와 포도플라닌(podoplanin, PDPN)과의 연관성 평가**
- [0112] **1. TMSCs에서 PDPN 표현의 변화 평가**
- [0113] TMSCs의 연속 배양 동안 PDPN의 유전자 및 단백질 발현을 확인하였다.
- [0114] 도 3A 및 3B에 나타난 바와 같이, PDPN의 mRNA 수준은 15계대까지는 차이가 없었지만 (도 3A), PDPN의 단백질 수준은 계대 의존적 방식으로 감소하였다 (도 3B). 특히, 계대 15에서 계대 5에 비해 현저한 PDPN 단백질 수준의 감소가 확인되었다.
- [0115] 또한, 도 3C에 나타난 바와 같이, 유세포 분석을 이용하여 노화된 세포에서 막형단 당단백질 중 하나인 PDPN+ 군이 86.11%(젊은 세포 PDPN+ 군 94.43%)로 감소한 것을 확인하였다.
- [0116] 이러한 결과는 TMSCs에서 복제 노화를 통해 PDPN의 세포내 및 막 단백질에서의 발현이 감소함을 나타낸다.
- [0117] **2. PDPN+ 분류 TMSCs의 특성 평가**
- [0118] PDPN+ TMSCs의 분류가 MSC 특성에 미치는 영향을 조사하였다. PDPN+ 또는 PDPN- TMSCs를 분리하기 위하여, 도 4A에 나타난 바와 같이, 형광 PDPN 염색 또는 염색되지 않은 단일 세포를 FACS 절차를 통해 분류하고 각각 93.39% 및 2.80%로 식별하였다.
- [0119] 도 4B에 나타난 바와 같이, 텔로미어 길이에서 PDPN+와 PDPN- 세포 사이에 유의미한 변화를 관찰하지 못하였다.
- [0120] 한편, 도 4C 및 도 4D에 나타난 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포 표면 표현형(도 4C)과 전분화능 관련 전사 인자인 NANOG, OCT4 및 SOX2(도 4D)가 서로 유사한 발현 수준에서 검출되었음을 발견하였다.
- [0121] 다만, 도 4E에 나타난 바와 같이, PDPN+ TMSCs의 Oil Red O 용액으로 염색된 지질 방울(지방 생성), Alcian Blue 용액으로 염색된 글리코사미노글리칸(연골 형성) 및 Alizarin Red S 용액으로 염색된 칼슘 침착(골 형성)의 증가된 축적을 통해, PDPN+ TMSCs의 삼중 계통 분화능이 PDPN- TMSCs에 비해 현저히 높게 나타났음을 확인하

였다.

[0122] **3. PDPN이 세포증식, 세포 주기 진행 및 세포 이동능에 미치는 영향 평가**

[0123] 세포 증식, 세포 주기 진행 또는 세포 이동능과 같은 노화 관련 예비 메커니즘과 PDPN의 연관성을 확인하였다.

[0124] 도 5A에 나타난 바와 같이, PDPN+ 세포는 PDPN- 세포보다 48시간에서 상당히 높은 증식능을 나타내었다.

[0125] 또한, 증식 능력의 또 다른 지표인 세포 주기 정지를 조사하기 위해 유동 세포 계측법과 세포 주기 관련 단백질의 발현을 통해 PDPN의 신호 전달 경로를 조사하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이, PDPN- TMSCs가 PDPN+ TMSCs와 비교하여 G0/G1 단계에서 세포 주기 정지를 유도함을 확인하였다.

[0126] 도 5 C에 나타난 바와 같이, 추가 검증을 통해 G0/G1 단계의 대표적인 조절 단백질인 사이클린 D1의 단백질 수준이 PDPN- TMSCs에서 유의하게 감소했지만, G0/G1 단계와 관련된 또 다른 마커인 CDK 4의 단백질 수준은 그렇지 않은 것으로 나타났다.

[0127] 한편, 도 5D에 나타난 바와 같이 세포 이동을 평가하기 위한 스크래치 회복 분석에서, 스크래치 회복정도가 PDPN- 세포 및 PDPN+ 세포에서 각각  $37.28 \pm 2.66\%$  및  $62.63 \pm 12.16\%$ 으로 나타나, PDPN+ 세포가 PDPN- 세포보다 스크래치 회복능이 현저히 높음을 입증하였다.

[0128] 한편, 세포증식과 세포이동에서 PDPN의 역할은 siRNA를 사용하여 PDPN의 발현을 억제함으로써 확인하였다.

[0129] 도 6A 및 6B에 나타난 바와 같이, PDPN siRNA를 이용한 이소성 형질감염은 성공적으로 PDPN의 mRNA(도 6A)와 단백질(도 6B) 모두의 발현을 감소시켰다.

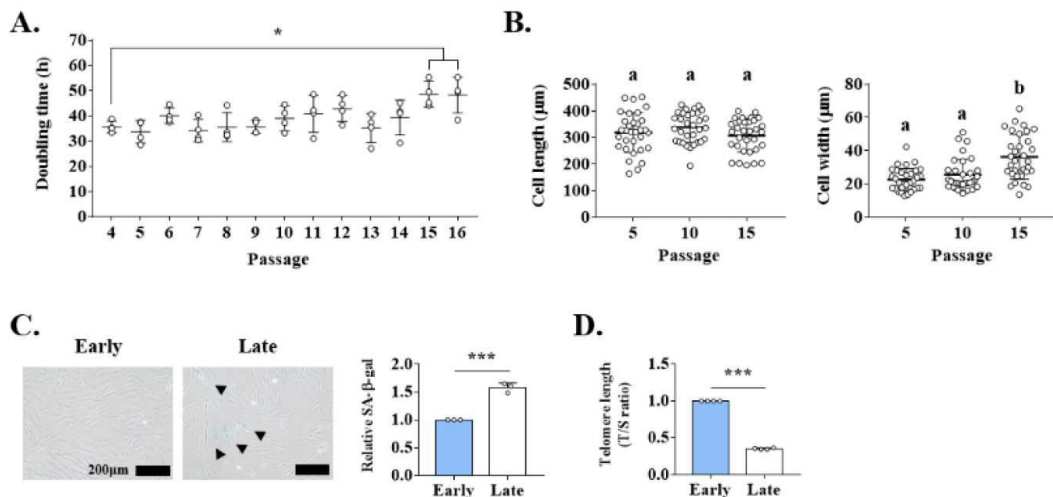
[0130] 도 6C 및 6D에 나타난 바와 같이, 예상대로 siPDPN은 Cyclin D1 단백질 수준의 억제(도 6D)를 포함하여 G0/G1 단계에서 세포 주기 진행을 완전히 억제하였다(도 6C).

[0131] 또한, 도 6E에 나타난 바와 같이, siPDPN에 비해 siCON에서 스크래치 회복 정도가 더 높게 나타났다.

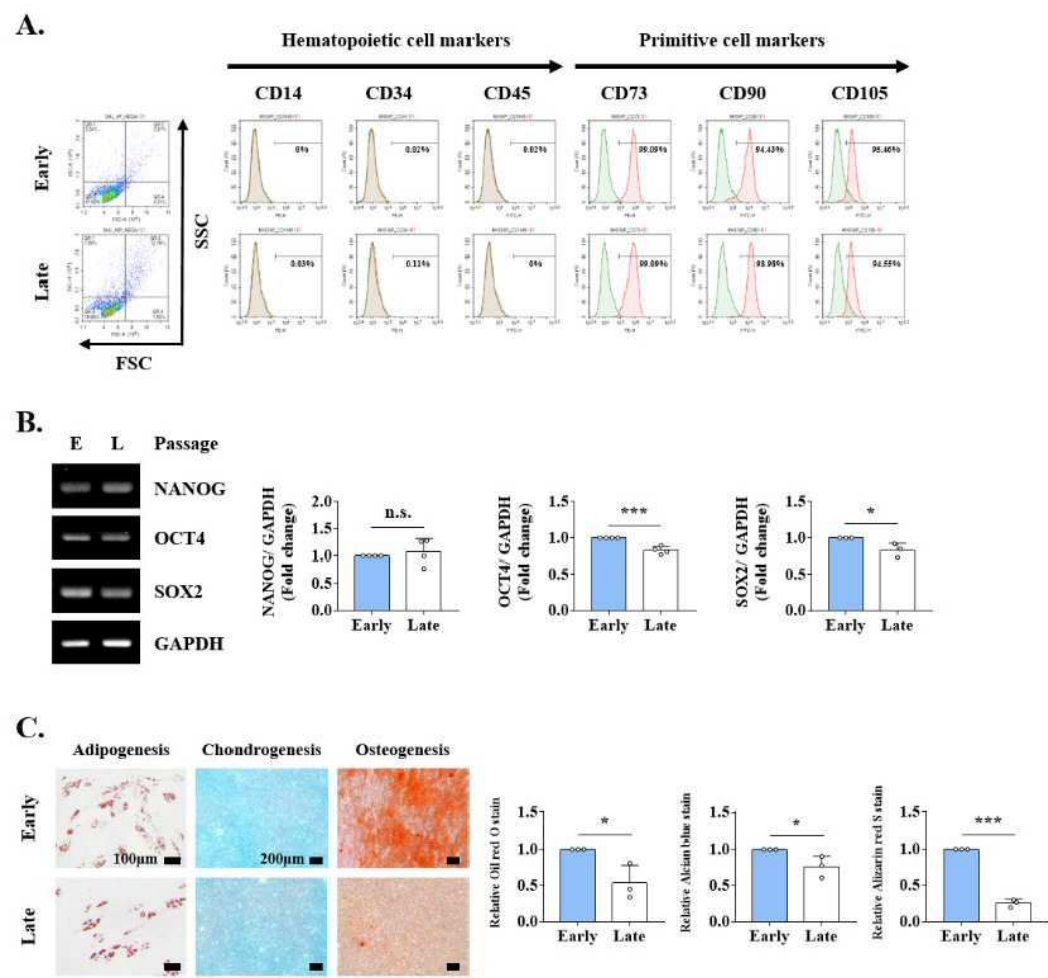
[0132] 종합하면, 상기한 연구 결과는 PDPN의 손실이 세포주기 진행뿐 아니라 TMSCs의 증식 및 이동능의 하향 조절로 이어짐을 시사한다.

**도면**

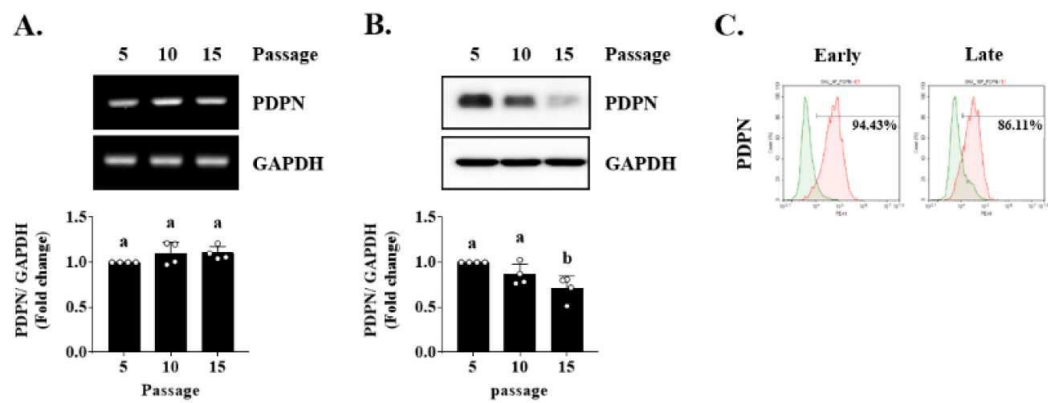
**도면1**



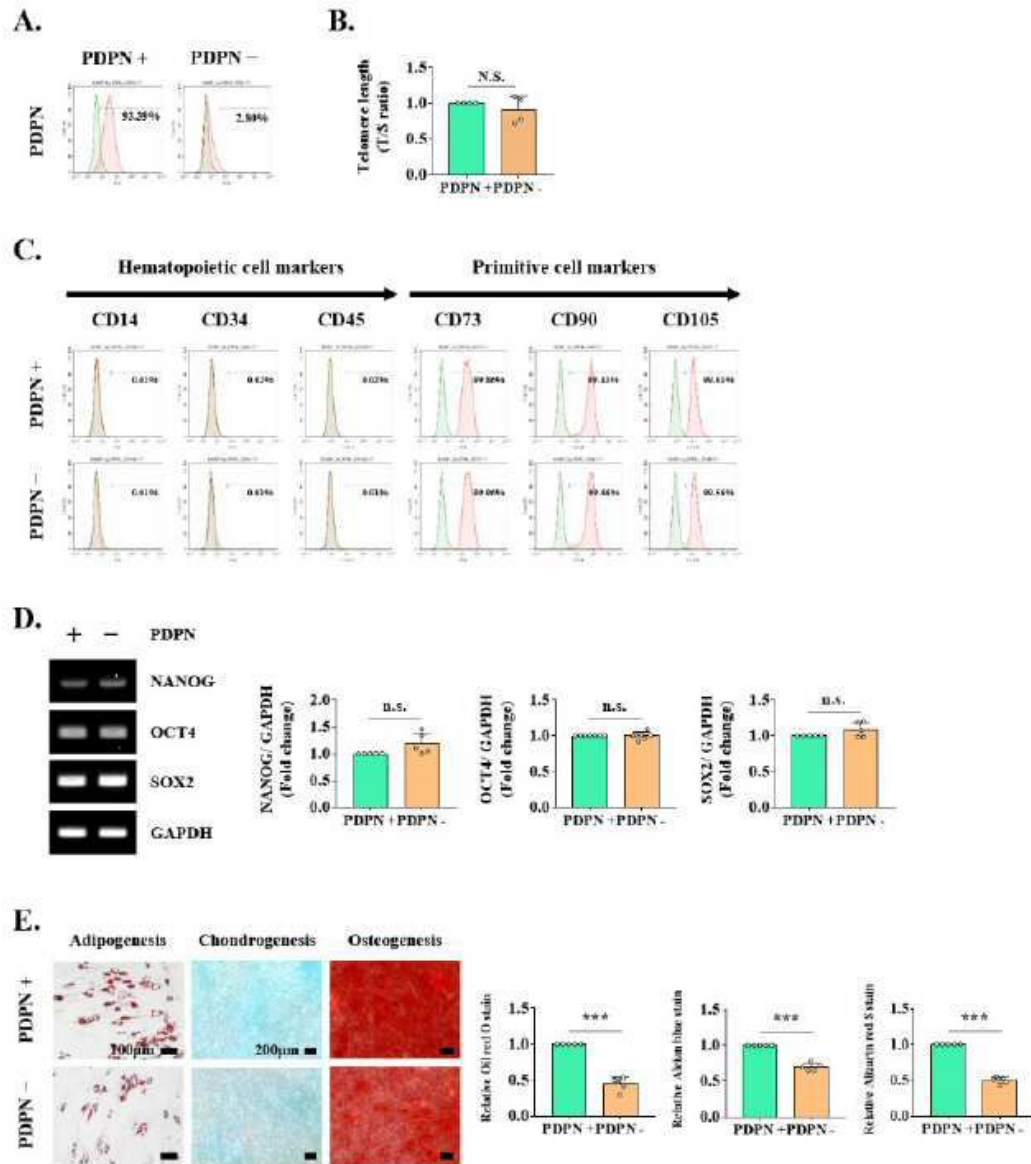
도면2



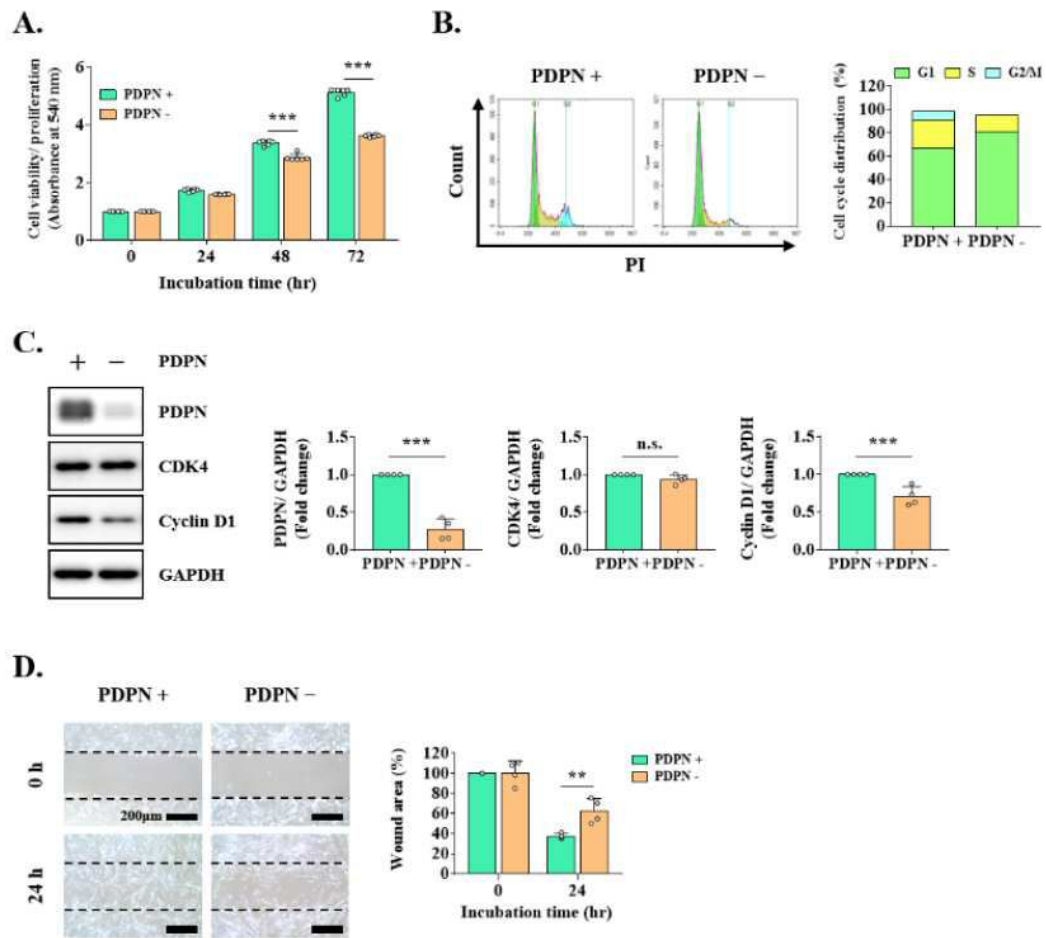
도면3



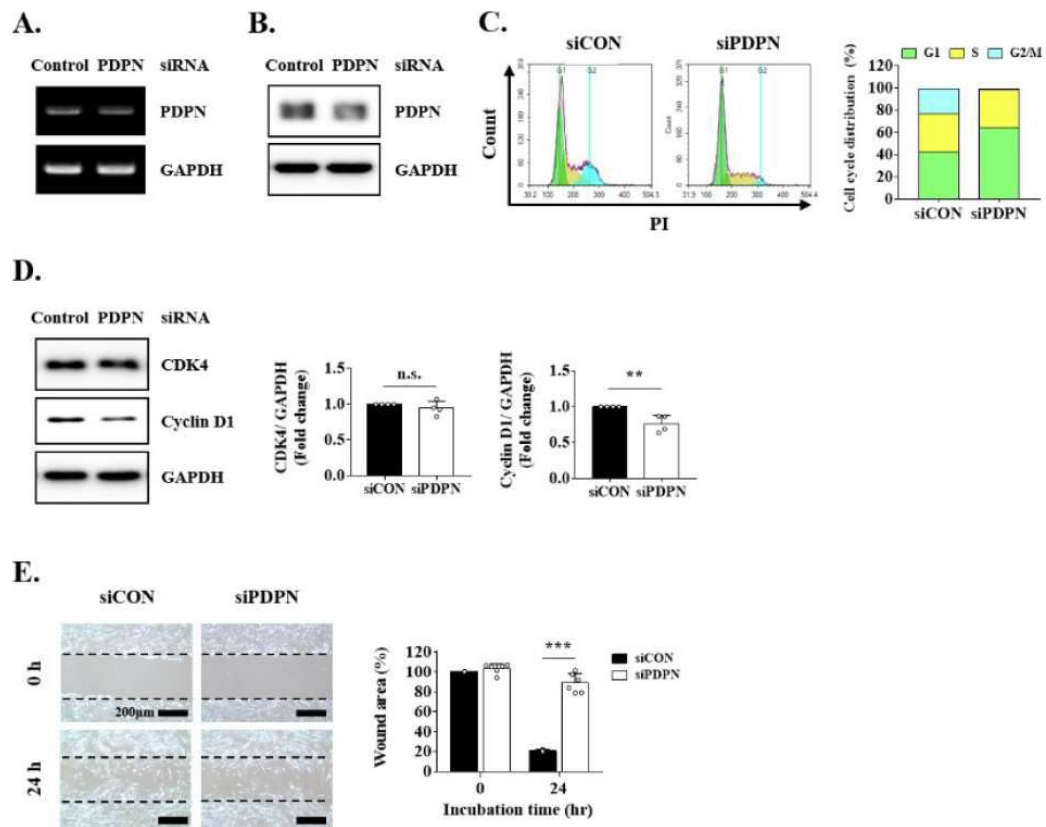
도면4



도면5



도면6



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.