



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0134137
(43) 공개일자 2011년12월14일

(51) Int. Cl.

A61K 35/32 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0053955

(22) 출원일자 2010년06월08일

심사청구일자 2010년06월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

손영숙

서울특별시 강남구 개포4동 현대2차아파트 205동 703호

이은아

서울특별시 강동구 암사1동 491-26

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

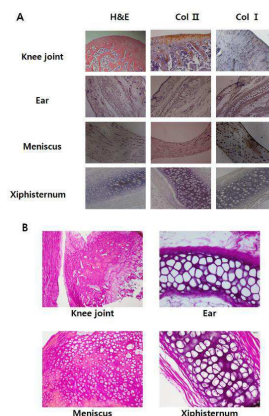
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 연골질환 치료용 조성물, 인공연골 및 이들의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 검상돌기로부터 분리한 연골세포를 함유하는 연골질환 치료용 조성물, 세포 치료제, 및 상기 세포를 이용하여 제조된 인공연골 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물, 세포 치료제, 및 인공연골은 연골질환 또는 연골손상 질환에 우수한 치료 효과를 나타낸다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

남승우

경기도 수원시 장안구 영화동 390-17

조희문

인천광역시 계양구 계산1동 954-30 서해아파트 3동
204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A040003

부처명 보건복지가족부

연구관리전문기관

연구사업명 미래보건기술개발사업

연구과제명 근골격계바이오장기센터

기여율

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2004년 05월 01일 ~ 2013년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

검상돌기 유래 연골세포를 포함하는 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 검상돌기 유래 연골세포는 검상돌기로부터 분리된 연골세포, 검상돌기로부터 분리 후 탈분화된 연골세포, 또는 검상돌기로부터 분리 후 탈분화되고, 재분화된 연골세포 중에서 선택되는 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 세포 치료제.

청구항 4

검상돌기 유래 연골세포를 포함하는 인공연골.

청구항 5

제4항에 있어서, 검상돌기 유래 연골세포는 검상돌기로부터 분리된 연골세포, 검상돌기로부터 분리 후 탈분화된 연골세포, 또는 검상돌기로부터 분리 후 탈분화되고, 재분화된 연골세포 중에서 선택되는 인공연골.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 검상돌기 유래 연골세포를 연골분화배지를 포함하는 배양접시에서 배양하여 시트형태로 분화된 연골을 형성하도록 제조된 인공연골.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서, 검상돌기 유래 연골세포를 배양 접시에서 배양배지를 교환하며 배양하여 시트 형태를 이루도록 유도하여 제조된 인공연골.

청구항 8

제4항 또는 제5항에 있어서, 검상돌기 유래 연골세포를 원심분리한 뒤 연골분화배지를 넣고 배양하여 펠렛 형태를 이루도록 유도하여 제조된 인공연골.

청구항 9

제4항 또는 제5항에 있어서, 검상돌기 유래 연골세포가 지지체 상에 로딩된 인공연골.

청구항 10

검상돌기 유래 연골세포를 계대배양하여 탈분화시키는 단계를 포함하는 인공연골의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 검상돌기로부터 분리된 연골세포를 혈청을 포함하는 α -MEM 기반 배지, 중간엽줄기세포 성장 배지, 또는 FGF(Fibroblast Growth Factor)를 포함하는 중간엽줄기세포 성장 배지에서 계대 배양하여 탈분화시키는 것인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 탈분화된 세포를 연골분화배지에서 배양하여 재분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 연골세포를 함유하는 연골질환 치료용 조성물, 인공연골, 및 이들의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 검상돌기(xiphoid process, xiphisternum)는 흉골의 가장 하단에 위치하는 작은 연골 구조물로, 흉골 끝 횡경막의 아래쪽에 위치하고 있다. 흉골은 흉골병(manubrium), 흉골(sternum), 검상돌기(xiphoid process)의 세 부분으로 구분되는데, 사람의 경우 15세에서 29세 사이에 검상돌기와 흉골병 사이가 움직이지 않는 섬유상 관절을 형성하면서 융합되며, 유아나 영아에서는 검상돌기의 끝 부분이 혹처럼 보이거나 만져지기도 한다. 검상돌기는 특별한 기능을 하는 구조는 아니며, 성인이 되어 노화가 됨에 따라 검상돌기는 내부에서부터 석회화되어 단단해진다.

[0003] 연골(cartilage)은 연골세포(chondrocytes)가 많은 양의 세포외 기질로 둘러싸인 형태로 이루어져 있는데, 콜라겐을 비롯한 여러 단백질과 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan; GAG)으로 이루어지는 당단백질이 치밀하게 조직을 구성하여 단단하고 탄성을 가지는 연골 조직을 형성하게 된다. 연골은 질기고 탄성이 있어서, 신체 내에서 뼈와 뼈가 마주 닿는 사이에서 관절면을 형성하거나, 저항력과 탄성이 필요한 곳, 물리적 힘을 수용할 수 있어야 하는 곳에 위치하여 기능을 하는데, 형성하는 기질의 형태와 기능에 따라 초자연골(hyaline cartilage), 탄성연골(elastic cartilage), 섬유연골(fibrous cartilage)로 나뉜다.

[0004] 초자연골은 움직임을 가지는 활액막(synovial membrane)으로 연결된 관절의 표면에 존재하여 관절간 뼈의 움직임을 돕는 역할을 하며, 섬유연골은 질긴 특성을 가지고 있어서 무릎 관절 내 반월상연골(semilunar cartilage), 또는 척추 디스크의 섬유륜(anulus fibrosus; AF)를 구성하는 연골처럼 하중을 견디는 부위에 존재한다. 탄성연골은 탄성 섬유(elastic fiber)를 많이 포함하고 있으며, 귓바퀴, 중이관(auditory tube), 외이도(external auditory meatus)등 탄력성이 크게 요구되는 곳에 위치하고 있다.

[0005] 연골은 한번 형성이 되면 오랜 수명을 가지고 유지가 되지만, 다른 조직과 달리 혈관이나 신경이 분포되어 있지 않으므로 손상이 생긴 경우 빠른 재생이 일어나기 어렵다. 특히 관절연골에 생기는 손상은 활동에 심각한 영향을 미치므로 이를 치료하기 위한 방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

[0006] 현재 많이 이용되는 방법 중 골수 내 중간엽성 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 세포치료제로 이용하는 방법은 기능성 있는 초자연골의 재생능력이 연골유래 세포에 비해 떨어진다는 단점이 있으며, 하중을 비교적 덜 받는 부위의 연골을 채취하여 손상이 일어난 부위에 이식하는 방법은 채취 부위에 병증을 동반하는 단점을 갖고 있다.

[0007] 한편, 탄성연골에 결손이 생긴 경우 조직공학적으로 이를 수복시켜주기 위해서는 탄성연골로부터 유래된 연골세포를 이용하는 것이 가장 바람직하나, 체내에 존재하는 탄성연골은 그 구조상/기능상 중요성 때문에 조직 채취가 어렵다는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 연골 재생에 우수한 효과를 나타내는 연골질환 치료용 조성물, 세포치료제 및 인공연골과, 이들의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 검상돌기 유래 연골세포를 유효성분으로 함유하는 연골재생 촉진 또는 연골 질환 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 검상돌기 유래 연골세포를 유효성분으로 함유하는 연골재생 촉진 또는 연골 질환 치료를 위한 세포 치료제를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 연골 재생의 촉진 또는 연골 질환의 치료를 위한, 검상돌기 유래 연골세포의 신규 용도를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 검상돌기 유래 연골세포를 체외 배양하여 연골을 형성하는 단계를 포함하는 인공연골의 제조방

법을 제공한다.

- [0013] 본 발명은 또한 검상돌기 유래 연골세포를 제외 배양하여 제조된 인공연골을 제공한다.
- [0014] 이하 본 발명에 대해 보다 상세히 설명한다.
- [0015] 본 발명은 검상돌기 유래 연골세포를 포함하는 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명의 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 조성물의 유효성분인 검상돌기 유래 연골세포는 검상돌기로부터 분리된 연골세포, 검상돌기로부터 분리 후 탈분화된 연골세포, 및 검상돌기로부터 분리 후 탈분화 및 재분화된 세포를 포함한다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 상기 검상돌기 유래 연골세포는 당업계에 알려진 통상의 방법을 통하여 대상체의 검상돌기로부터 채취될 수 있다. 본 발명에서는, 검상돌기로부터 얻어진 연골세포를 사용하기 때문에 종래 환자의 하중을 받지 않는 다른 연골 부위에서 연골을 채취하는 방법과 달리 채취 부위에 심각한 병증을 유발하지 않는다. 이렇게 분리된 세포는 당업계에서 통상 사용되는 조건하에서 배양 및 보존될 수 있다.
- [0018] 검상돌기로부터 분리된 연골세포는 탈분화 및 재분화 단계를 거치지 않고도 우수한 세포 확장 능력과 연골 형성 능력을 가진다. 즉, 검상돌기로부터 분리한 연골세포는 탈분화하지 않은 상태로 세포배양 후 재분화 유도 없이도 연골형성이 우수하고, 특히 뼈의 형성을 유도하는 환경에서도 뼈로 분화하지 않고 연골로 분화한다. 검상돌기 유래 연골로부터 얻은 세포가 우수한 연골재생 효과를 나타냄은 본 발명자들에 의해 처음으로 밝혀진 것으로, 특히, 검상돌기의 연골은 체내의 여러 탄성연골 중 외형이나 기능을 해치지 않고 조직을 채취하여 세포를 확장 배양할 수 있는 유일한 조직으로 여겨진다.
- [0019] 본 발명에서는 또한 검상돌기로부터 분리한 연골세포를 계대 배양하여 탈분화시킨 세포, 또는 이렇게 탈분화된 세포를 재분화시킨 세포를 사용할 수 있다.
- [0020] 탈분화는 검상돌기 유래 연골세포의 확장 배양을 위한 것으로, 당업계에 널리 알려진 방법, 예컨대 고농도 (바람직하게는 5~30%)의 혈청을 포함하는 alpha-MEM 기반 배지 (예컨대, 20%의 혈청을 포함하는 alpha-MEM 배지: alpha-MEM supplemented with penicillin-Streptomycin, L-Glutamate, Ascorbic acid, and Dexamethason), 중간엽줄기세포 성장 배지 (MSCGM; mesenchymal stem cell growth medium), 또는 FGF(Fibroblast Growth Factor) 함유 MSCGM 배지에 유지함으로써 달성될 수 있다. 바람직하게는, 검상돌기로부터 분리된 연골세포를 α -MEM(Minimum Essential Medium, Alpha Modification) 기반 배지에서 5세대까지 계대배양하여 탈분화시킨 세포를 사용할 수 있다. 임의적으로, 이렇게 탈분화된 세포를 융합(confluent) 상태에서 계대 없이 이들에 한번씩 배지를 교환하면서 밀집한 조직의 형태로 재분화시켜 사용할 수 있다.
- [0021] 재분화는 연골 결손부위에 이식 후 연골재생이 원활하게 일어나도록 돕기 위한 것으로, 당업계에 널리 알려진 방법을 사용할 수 있다. 탈분화 세포를 연골세포로 분화시키는 3차원 배양방법으로, 세포를 4~20℃에서 300~600g로 5~15분 동안 원심분리한 뒤 연골분화배지를 넣고 계대 배양하여 펠렛 형태의 연골 조직을 얻는 펠렛(pellet) 배양, 알지네이트 비드 또는 알지네이트 층 배양, 또는 배양접시 상에서 지속적으로 배지를 교환하면서 세포들이 시트(sheet)의 형태를 이루도록 하는 시트 배양이 이용가능하며, 충분한 연골화를 유도하기 위하여 TGF- β (transforming growth factor- β)와 같은 성장인자를 배양배지 내 첨가할 수 있다. 바람직하게는, 검상돌기로부터 분리한 연골세포가 융합(confluent) 상태에서 계대하지 않고 얇은 시트(sheet) 상태가 되도록 배양하는 방법을 사용할 수 있다. 이렇게 탈분화후 재분화된 검상돌기 유래 연골세포는 얇은 시트의 상태에서도 연골 기질인 GAG(glycosaminoglycan)를 형성하며, 생체 내 이식 후 연골로 우수하게 분화되는 성질을 나타낸다.
- [0022] 본 발명은 또한 검상돌기로부터 분리한 연골세포를 포함하는 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 세포 치료제에 관한 것이다. 세포치료제는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저장을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다.
- [0023] 본 명세서에서 “연골질환”은 연골, 연골 조직 및/또는 관절조직(활막, 관절포, 연골하골 등)이 기계적 자극이나 염증 반응에 의해 상해됨으로써 발생하는 질환을 말하며, 연골손상 질환을 포함한다. 이러한 연골질환에는 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 근육조직의 손상, 족저근막염, 상완골외과염, 석회화근염, 골절의 불유합 또는 외상에 의한 관절손상이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 조성물 내지 세포 치료제는 공지의 방법에 따라 환자의 관절내

로 직접 주입되거나, 3차원 배양 후 스캐폴드(scaffold)와 함께 이식될 수도 있으며(Kim, G. et al, J. Vet. Med. Sci., 66:263, 2004, Lee, J.W. et al., Yonsei Med. J., 30:41, 2004), 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련인자를 고려하여 투여하는 세포수를 조절 할 수 있으며, 일례로 개체의 투여 부위에 대해 10^4 내지 10^8 개의 세포를 적용할 수 있다.

[0025] 또한 본 발명의 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 조성물 또는 세포치료제는 연골형성을 위한 지지체 상에 접종되어 연골 손상부에 적용될 수 있다. 이러한 지지체는 생체적합성, 생체흡수성이거나 리모델링되어야 하고, 새로운 조직성장을 용이하게 하는 프레임워크를 제공하여야 한다. 또한 관절 연골 기능과 양립가능한 재료적, 기계적 성질을 나타내어야 한다. 3차원(3D) 배양 환경을 제공하는 지지체는 접종세포의 증식과 분화뿐만 아니라 조직공학적으로 제조된 연골조직의 궁극적인 품질에 영향을 준다. 현재는 합성이나 천연재료로부터 유래한 다양한 물질들이 적절한 지지체로써 사용되고 있다. 이러한 지지체들은 스폰지, 겔, 섬유 및 미세구슬(microbead) 등의 여러 가지 형태로 사용되고 있는데 (Honda, M.J., et al., J. Oral Maxillofac Surg., 62:1510, 2004, Griogolo, B., et al., Biomaterials, 22:2417, 2001, Chen, G., et al., J. Biomed. Mater. Res. A, 67:1170, 2003, Kang, S.W., et al., Tissue Eng., 11:438, 2005), 그중 가장 흔히 사용되는 것은 세포부착물을 향상시킬 수 있고, 부피에 대한 고율의 표면장력을 유지할 수 있는 다공성 구조이다.

[0026] 본 발명에 사용될 수 있는 연골형성을 위한 지지체는 상용화된 것이면 모두 가능하다. 예컨대, 콜라겐-기체 생체재료, 콜라겐 타입 I 및 II, 콜라겐/글리코사미노글리칸(GAG) 복합체와 같은 천연 생체재료와, 폴리글리콜산(PGA) 및 폴리락트산(PLLA), 또는 이들의 생분해성 및 비생분해성 컴포지트 혼합물, PLGA(폴리 D,L-락틱-co-글리콜산)와 같은 합성 생체재료와 같은 다양한 물질이 관절 수복을 위한 가능한 세포-지지체 재료로 사용될 수 있다. 또한, 키토산 스폰지, TGF- β (Transforming Growth Factor- β) 함유 키토산 스폰지, 히알루론산 코팅된 키토산 스폰지, 황산콘드로이틴 코팅된 키토산 스폰지, 또는 상기 키토산과 콜라겐의 혼합 스폰지와 같은 키토산-기체 지지체도 사용가능하다. 바람직하게는, 단백질을 기본 성분으로 하는 물질을 사용할 수 있다. 단백질을 기본성분으로 하는 물질의 예로, 양막, SIS(Small Intestinal Submucosa) 멤브레인, 콜라겐 스폰지 등이 있으며, 히알루론산 코팅, 황산 콘드로이틴 코팅, 또는 콜라겐 코팅된 것을 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 연골재생 촉진 또는 연골질환 치료용 조성물 내지 세포 치료제는 인간 또는 인간 이외의 생물, 예를 들면 소, 원숭이, 새, 고양이, 마우스, 래트, 물모트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양, 말 등의 비인간 포유 동물의 연골 손상부에 적용하여, 연골의 재생을 촉진시키기 위해서, 또는 관절 내에 주입 투여하여 연골질환의 치료를 위해서 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한 연골질환을 갖는 대상체에 검상돌기로부터 분리한 연골세포, 상기 연골세포를 함유하는 조성물 또는 세포치료제를 적용하는 것을 포함하는, 연골의 재생을 촉진시키거나, 연골 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한 검상돌기 유래 연골세포를 포함하는 인공연골에 관한 것이다. 본 발명의 인공연골은 검상돌기 유래 연골세포를 일정한 형태의 스캐폴드(scaffold)에서 계속 배양하는 통상의 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 예로서, 검상돌기 유래 연골세포를 융합(confluent) 상태에서 연골분화배지를 포함하는 배양접시에서 연골로 분화된 시트를 형성하도록 배양하여 제조하는 방법, 검상돌기 유래 연골세포를 배양 접시에서 배양 배지를 교환하며 배양하여 시트 형태를 이루도록 유도하여 제조하는 방법, 검상돌기 유래 연골세포를 원심분리한 뒤 연골분화배지를 넣고 배양하여 펠렛 형태를 이루도록 유도하여 제조하는 방법이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 인공연골은 검상돌기 유래 연골세포를 적절한 지지체 상에 로딩하여 제조될 수 있다. 이러한 지지체는 상기 기재된 것들을 사용할 수 있다. 이렇게 제조된 인공연골은 인공관절 또는 쿠나 코의 성형에 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 연골로부터 유래한 세포는 우수한 연골 재생능을 보이므로 연골 재생에 이용하기 위한 세포원을 얻기 위하여 하중을 받지 않는 다른 부위에서 연골을 채취하여 시술을 하나, 이는 채취부위에 병증을 야기하게 된다. 그러나, 본 발명에서는 검상돌기 유래 세포를 사용하기 때문에 환자의 채취부위에 병증을 유발하지 않는다. 또한 본 발명의 검상돌기에서 얻은 연골세포는 체외 배양에 의해 충분히 필요한 수만큼 확장이 가능하며 다양한 근골격계로의 분화가 가능하며, 특히, 뼈로 분화가 되는 환경에서도 연골을 형성해 낼 만큼 연골형성능이 매우 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도1은 검상돌기의 구조와 위치를 나타내는 사진이다(A번 정면의 xiphoid process로 표시된 부분). A: 정면 그림, B: 측면 그림
- 도2는 마우스와 랫트에서 분리한 검상돌기의 단면을 조직학적 염색을 하여 관찰한 사진이다.
- 도3은 랫트로부터 분리한 다양한 연골조직을 2형 콜라겐 또는 1형 콜라겐과 반응하는 항체를 처리하여 염색한 결과를 나타낸 사진이다. 염색 결과, 검상돌기를 구성하는 연골은 탄성연골임을 확인하였다. (위로부터 관절연골인 슬개골관절 조직, 탄성연골인 외이조직, 섬유상 연골인 반월상 연골, 검상돌기이다.)
- 도4는 골수에서 얻은 중배엽줄기세포와 검상돌기에서 얻은 연골세포의 형태를 비교한 사진이다.
- 도5는 관절연골 (Articular Cartilage), 검상돌기 연골 (Xiphisternum Cartilage), 늑연골 (Costal Cartilage)에서 얻은 연골세포의 형태를 계대수에 따라 비교한 사진이다.
- 도6은 관절연골 (AC), 검상돌기 연골 (XC), 늑연골 (CC)에서 얻은 연골세포의 콜로니 생성능력을 분석하여 그래프로 나타낸 그림이다.
- 도7는 관절연골세포(AC), 검상돌기연골세포(XC), 늑연골세포(CC)를 비교하여, 단위 중량의 조직 당 얻을 수 있는 세포의 수율(도7A)과 계대를 거치면서 얻을 수 있는 연골세포의 수(도7B)를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도8은 늑연골세포(CC)와 검상돌기세포(XC)를 각각 사춘기 이전과 고령의 랫트로부터 분리하여 단위중량의 조직 당 얻을 수 있는 세포의 수율(도8A)과 P0에서의 콜로니생성능력(도8B)을 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도9는 검상돌기에서 얻은 연골세포를 지방세포분화 조건 또는 연골세포분화 조건에서 배양 후 분화 여부를 확인한 사진이다. {A: 지방세포분화 (빨간색: 지방구 과립, 파란색: 세포핵), B: 연골세포분화 (빨간색: GAG, 파란색: 세포핵)}
- 도10은 검상돌기로부터 얻은 세포를 HA/TCP와 함께 누드마우스에 이식 후 6주 후에 분리한 뒤 조직학적으로 관찰한 사진이다. (연분홍색: 연골 조직, 회색: 잔류하는 HA/TCP)
- 도11은 골수로부터 얻은 중배엽 줄기세포를 HA/TCP와 함께 누드마우스에 이식 후 6주 후에 분리한 뒤 조직학적으로 관찰한 사진이다. (분홍색: 석회화가 일어난 콜라겐 (뼈 기질), 파란색: 세포핵, 회색: 잔류하는 HA/TCP, B: 뼈 조직, BM: 골수조직)
- 도12는 검상돌기로부터 얻은 연골세포를 배양접시에서 장기 배양 하여 막을 이루도록 한 뒤 그 단층을 관찰한 사진이다. (분홍색: 세포핵, 회색: 세포질)
- 도13은 막 형태의 연골세포 배양물을 GAG에 특이적으로 염색되는 alcian blue 로 염색한 결과를 관찰한 사진이다.
- 도14는 검상돌기로부터 얻은 연골세포가 막을 이루도록 배양한 뒤 토끼의 관절결손 모델에 이식 후 3주 뒤에 외형적으로 관찰한 사진이다.
- 도15는 도 14의 조직을 조직학적 염색을 통하여 관찰한 사진이다. (B: 뼈, C: 연골조직, F: 섬유상 조직)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명하나, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0033] [실시예]
- [0034] 1. 검상돌기 연골조직 채취 및 관찰
- [0035] 본 발명자들은 랫트와 마우스의 검상돌기를 채취하여 조직학적 관찰과 면역 조직염색을 수행하여 검상돌기를 이루는 연골의 형태를 관찰하였다.
- [0036] (1) 검상돌기 연골조직의 채취
- [0037] 마우스와 랫트를 마취한 후, 등을 아래로 하여 수술대에 놓고 흉부와 복부가 만나는 지점 부분의 털을 면도로 제거하였다. 면도한 부분을 포비돈과 알코올로 소독하고 수술용 칼을 이용하여 피부를 절개한 후 갈비뼈 아래쪽 복부의 근육막을 절개하여 횡경막 아래로 돌출되어 있는 검상돌기 부위를 확인하였다. 연골 조직이 상하지 않도록

록 검상돌기 하단을 포셉(forcep)으로 조심스럽게 잡고 흉골과 연결된 부위를 절단하여 채취하였다. 흉부 전면 흉골 아래에 위치하는 검상돌기 중 흉골과 연결되는 부분의 조직은 경화되어 있으므로, 조직 채취시 포함되지 않도록 검상돌기 하단 연골조직을 채취하였다. 채취한 검상돌기 연골조직을 오염되지 않도록 조심하여 고정액 (4% paraformaldehyde in PBS)에 넣어 하루 이상 두어 고정시켰다. 고정 후 검상돌기 연골 조직을 생리식염수 또는 PBS로 세척하고 조직학적 관찰을 위한 처리시까지 냉장보관하였다.

[0038] 검상돌기를 절제해낸 마우스 및 랫트는 복부의 절개한 조직과 피부를 수술실로 봉합한 뒤 다시 케이지(cage)로 옮겨 사육하면서 3개월 이상 행동이나 건강의 이상 유무를 관찰하였으나, 아무런 이상이 발견되지 않았다.

[0039] (2) 검상돌기 연골조직 조직 관찰

[0040] 위에서 얻은 고정된 검상돌기 조직을 파라핀으로 포매하여 5~7 μ m 두께로 절편 후 건조시킨 뒤, 헤마톡실린/에 오신 염색 (H&E, Hematoxylin & Eosin staining)을 수행하였다. 염색된 조직을 고배상도 광학현미경으로 관찰하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0041] 도2A는 마우스에서 분리한 검상돌기 연골조직의 단면이고 (그림 중 A: 지방조직, C: 탄성연골부분을 나타냄), 도2B는 랫트에서 분리한 검상돌기 조직의 단면이다. 검상돌기 연골의 주변이 지방조직으로 둘러싸여 있으며, 검상돌기 연골을 이루는 조직은 관절을 구성하는 초자연골에 비해 세포의 기질보다는 세포의 비율이 더 높음을 알 수 있다.

[0042] (3) 면역조직염색과 탄성섬유 염색 (Elastica van Geison staining)을 이용한 연골형 (cartilage type) 분석

[0043] 검상돌기 연골이 초자연골, 탄성연골, 섬유연골 중 어느 연골형에 해당하는지를 확인하기 위하여 다양한 조직에서 얻은 연골 조직과 함께 1형 콜라겐에 대한 항체 (Chemicon, 제품번호 AB755P)와 2형 콜라겐에 대한 항체 (AbCam, 제품번호 AB53047)를 이용하여 면역조직염색을 수행하였다. 랫트의 슬개골관절 연골조직을 초자연골의 대조군으로 삼았고, 외이부분을 구성하는 연골조직을 탄성연골의 대조군으로, 무릎 관절사이에 존재하는 반월상 연골 조직을 섬유연골의 대조군으로 삼아 함께 면역조직염색을 수행하고 관찰 결과를 도3A에 나타내었다. 면역조직염색 결과, 검상돌기 연골조직에서는, 탄성연골인 외이 연골조직과 유사하게, 초자연골에서 발현되는 2형 콜라겐이나 섬유상연골에서 발현되는 1형 콜라겐이 모두 발현되지 않음을 확인하였다. 또한, 검상돌기 연골조직을 구성하는 세포의 형태가 외이 연골(탄성연골)을 구성하는 세포의 형태와 유사함을 확인하였다.

[0044] 탄성연골에 존재하는 탄성섬유의 형태를 확인하기 위하여, 세가지 연골형에 대한 대조군인 슬개골관절 연골조직, 외이 연골조직, 반월상연골 조직과 함께 검상돌기 연골조직의 절편에 탄성섬유 염색 (Elastica van Geison staining)을 수행하고 관찰 결과를 도3B (분홍색: 세포외 기질, 어두운 보라색: 탄성섬유)에 나타내었다. 어두운 보라색으로 염색이 되는 탄성섬유는 외이연골과 검상돌기연골에서만 나타나므로, 이로부터 검상돌기 연골은 탄성연골에 해당한다고 결론지을 수 있었다.

[0045] 2. 검상돌기 유래 연골세포의 분리 및 배양

[0046] (1) 연골세포의 분리

[0047] 상기 실시예1에서 채취한 연골조직을 PBS로 세척한 뒤에 멸균된 수술용 칼을 이용하여 연골막을 떼어낸 후 다시 PBS로 세척하였다. 랫트 1마리에서 제거한 검상돌기 연골로부터 58mg 가량의 연골 조직을 얻었다. 이렇게 얻은 조직을 대략 1mm정도의 조각으로 만든 뒤 0.5%의 collagenase I(Worthington, USA, 제품번호: 46J8933)을 37°C 에서 16시간 이상 처리하였다. Collagenase I 처리에 의하여, 조각모양의 연골 조직이 분해되고, 중간엽 줄기 세포(Mesenchymal Stem cell)와 유사한 모양의 세포를 얻었다. 이렇게 얻은 세포(XC)와 랫트의 골수로부터 얻은 중간엽 줄기 세포(BMSC)의 형태를 비교한 사진을 도4 에 나타내었다.

[0048] 위에서 얻은 세포를 세포 여과체(cell strainer; Beckton Dickinson)로 여과하여 분해되지 않은 조각의 찌꺼기를 제거하고, P0 세포들을 얻었다.

[0049] 이렇게 얻은 조직 mg당 세포의 수를 계수하여 도7 및 도8에 나타내었다. 이에 관하여는 후술하는 실험예에 상세히 기재한다.

[0050] (2) 분리된 연골세포의 확장 배양

[0051] 상기 실시예 2.(1)에서 분리한 연골세포를 다음의 같이 배양하였다.

[0052] 상기 얻어진 P0의 세포들을 확장배양하기 위하여 100mm dish 하나당 5×10^5 개의 세포를 접종(seeding)하여 유지

배양하였다. 세포의 배양에는 alpha-MEM을 기반으로 하고, 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 10^{-8} Dexamethasone (Sigma), 10^{-4} M L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (Wako Chemical, Japan)를 포함하는 배지를 사용하였다. 배양접시에 접종 후 하루 뒤에 배지를 교환하여 상층액에 존재하는 죽은 세포를 제거하였다.

[0053] (3) 분리된 연골세포의 계대배양

[0054] 상기 alpha-MEM을 기반으로 하는 배지에서 배양한 검상돌기 연골세포가 융합(confluent) 상태에 이르면 PBS로 두 번 세척한 뒤 1x트립신/EDTA (Life Technologies)를 10~15분 동안 처리하여 배양접시 상에 붙어있는 세포들을 떼어내고 즉시 1,200 RPM에서 원심분리하고 100mm 배양접시 하나당 5×10^5 개의 세포를 접종하여 배양하였다. 이러한 과정을 매 계대시마다 반복하였다.

[0055] 후술하는 실험예에 나타난 바와 같이, 이렇게 혈청 농도가 높은 배지(20% FBS)에서 배양한 연골세포는 노화경향이 낮고, 세포확장력이 우수하였으며, 연골분화배지에 배양하여 재분화를 유도한 결과, 연골로의 분화가능성이 매우 높게 유지되고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 연골로의 재분화 유도 없이도 체내 이식(in vivo transplant) 결과 뼈의 분화를 촉진하는 환경에서도 연골을 형성하였다.

[0056] [실험예]

[0057] 상기 실시예에서 분리한 연골세포 및 분리 후 배양된 연골세포의 형태학적 특성, 증식속도, 표현형을 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0058] 1. 세포 증식능 확인

[0059] 상기 실시예에서 분리한 연골세포의 확장배양 가능성을 확인하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0060] (1) 계대 배양에 따른 세포 형태 확인

[0061] 검상돌기 연골조직으로부터 얻은 연골세포를 상기 실시예 2.(3)에 기술된 방법으로 계대 배양시 계대가 진행됨에 따라 세포 형태의 변화가 일어나는지를 확인하기 위하여 계대8까지 alpha-MEM 기반 배지에서 배양중인 세포의 형태를 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 관찰하고 그 결과를 도5에 나타내었다. 검상돌기 유래 연골세포(XC)와 늑연골세포(CC)는 섬유아세포(fibroblast)와 유사한 길쭉한 형태의 세포가 포함되어 있었고, 계대8까지 세포 형태에 있어서 큰 변화를 보이지 않았다. 관절연골에서 얻은 연골세포(AC)는 둥글둥글한 모양을 나타내었고, 이러한 형태가 계대8까지 변화 없이 유지되는 것을 확인하였다.

[0062] (2) 콜로니 생성능 확인

[0063] 검상돌기 유래 연골세포, 슬개골 관절 유래 연골세포, 늑연골조직 유래 세포의 콜로니 생성능력을 비교하기 위하여, 위 실시예에 기술한 검상돌기 연골세포 채취방법과 같은 방법으로 슬개골 관절 연골조직과 늑연골조직 및 검상돌기 연골조직으로부터 연골세포를 각각 얻어, 1×10^3 및 3×10^3 개의 세포를 25T 플라스크에 접종한 후 alpha-MEM을 기반으로 하는 배양 배지 (supplemented with 2 mM L-Glutamate, 10^{-8} M Dexamethason, 10^{-4} M Ascorbic acid)에서 12일 이하 배양하였다. 콜로니가 형성된 25T 플라스크는 4% 파라포름알데히드로 고정된 뒤 메틸바이올렛 농축액으로 염색 후 광학현미경으로 50개 이상의 세포로 구성된 콜로니만을 계수하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0064] 검상돌기 유래 연골세포는 슬개골 관절 조직 유래 연골세포에 비해 우수한 콜로니 생성능을 보였다.

[0065] (3) 세포 증식능 확인

[0066] 슬개골 관절 조직 유래 연골세포, 늑연골조직으로부터 얻은 연골세포와 검상돌기 유래 연골세포의 체외확장 능력을 비교하였다.

[0067] 각 연골세포를 접종 후 융합(confluency)에 도달하였을 때 각 계대 과정에서 세포수를 계수하여 도7에 나타내었다. 이들 세포의 채취 및 배양은 상기 실시예에 기재된 방법을 사용하였다.

[0068] 그 결과, 검상돌기 유래 연골세포가 관절연골이나 늑연골로부터 유래된 세포보다 단위 중량의 조직 당 얻을 수 있는 세포수, 및 확장배양 능력이 월등하게 높음을 확인하였다.

[0069] (4) 개체 연령에 따른 세포 증식능 비교

- [0070] 검상돌기 유래 연골세포와 늑연골 유래 연골세포의 개체 연령에 따른 세포 수율과 콜로니 형성능을 비교하였다.
- [0071] 어린 개체인 성장기의 랫트(3주령~6주령 이하)와 늑은 개체인 랫트(24주령 이상)에서 분리한 조직으로부터 얻은 연골세포의 수율과 콜로니 형성능을 확인하여 결과를 도8에 나타내었다.
- [0072] 그 결과, 검상돌기 유래 연골세포의 수율이 늑연골로부터 얻은 세포의 수율보다 월등하게 높음을 확인하였고(도 8A), 콜로니 형성능 역시 우수함을 확인하였다(도 8B). 다만, 어린 개체에서 분리한 검상돌기 유래 연골세포의 콜로니 생성능이 늑연골 유래 연골세포보다 낮았으나, 늑은 개체에서 분리한 검상돌기 유래 연골세포의 콜로니 생성능은 어린 개체에서 분리한 경우보다 월등하게 높아, 늑은 개체에서는 분리한 검상돌기 유래 연골세포가 늑연골 유래 연골세포의 경우보다 더 우수한 콜로니 생성능을 나타냄을 확인하였다.
- [0073] 2. 세포 분화능 확인
- [0074] (1) 지방세포로의 분화능 확인
- [0075] 상기 검상돌기에서 얻은 세포 1.5×10^5 을 6-웰 플레이트에 접종한 후 37℃, 5% CO₂에서 하룻밤 배양하였다. 2일 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 10% FBS, 10 μg/ml 인슐린(Sigma, Insulin), 100nM 덱사메타손(Sigma, Dexamethason), 0.2 mM 인도메타신(Sigma, Indomethacin), 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴이 포함된 고농도 글루코스 돌베코 변형 이글 배지 (high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium) 조성의 지방형성 유도 배지(adipogenic induction media)에서 3일 동안 배양한 후 10% FBS, 10 μg/ml 인슐린이 포함된 지방형성 유지 배지(adipogenic maintenance media)를 2일 동안 처리하였다. 6-웰 플레이트에서 15일간 분화한 세포를 4% 파라포름알데히드를 이용하여 고정하였다. 고정된 세포를 PBS를 사용하여 5분씩 3회 세척 후 0.18% 오일 레드-O 용액을 이용하여 15분간 염색하였다. 15분 경과 후 60% 이소프로필 알코올을 이용하여 5분간 세척하였다. 세척이 끝난 다음 해리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin) 용액을 이용하여 2 분간 염색하였다. 핵 염색 후에 수도물(tap water)과 증류수(Distilled Water)를 이용하여 세척하였다.
- [0076] 그 결과를 도9A에 나타내었다.
- [0077] 지방세포분화 조건에서 15일간 배양한 검상돌기 세포는 오일 레드-O로 염색이 되는 지방세포의 형성을 나타내었다. 즉, 검상돌기 세포가 지방세포로 분화되었음이 확인되었다.
- [0078] (2) 연골세포로 분화능 확인
- [0079] 상기 검상돌기로부터 얻은 연골세포 5×10^5 를 15ml 폴리프로필렌 튜브에 넣고 1ml의 alpha-MEM을 기반으로 하는 표준 배지에 현탁 시킨 후 600g로 5분간 원심분리하였다. 원심분리한 세포를 37℃, 5% CO₂에서 하룻밤 배양하였다. 배지를 제거하고 1% FBS, 50 μg/ml 아스코르베이트 2-인산 (ascorbate 2-phosphate), 40 μg/ml 프롤린, ITS+, 10ng/ml TGF-β3 (transforming growth factor β3), 200ng/ml BMP-1 (bone morphogenic protein-2)가 포함된 고농도 글루코스 돌베코 변형 이글 배지(high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium)가 포함된 연골형성 유도 배지(chondrogenic induction media; 연골분화배지) 1ml로 교환하였다. 배지는 일주일에 세번 교환하였다. 3주, 6주간 연골형성 유도 배지에서 분화된 세포를 4% 파라포름알데히드를 이용하여 고정하였다. 고정된 세포를 파라핀 절단(paraffin section)한 후 자일렌(xylene)을 이용하여 탈파라핀화(deparaffinization)하였다.
- [0080] 그 후에 바이게르트 헤마톡실린(Weigert's hematoxylin)을 이용하여 5분간 핵 염색하여 주고, 증류수를 이용하여 10분간 세척하였다. 10분 후 1% HCl 포함 70% 알코올 용액을 이용하여 rinse 후 0.02% 수성 패스트 그린(aqueous fast green)으로 5 분간 염색하였다. 패스트 그린 염색 후 1% 아세트산으로 세척하고, 0.1% 수성 사프라닌 O(aqueous safranin O)를 이용하여 5 분간 염색하였다. 사프라닌 O 염색 후 70%, 80%, 90%, 100% 알코올에 차례로 2-3회 담갔다 뺀 후 자일렌에 넣어 마운팅(mounting) 하였다. 그 결과를 도9B에 나타내었다.
- [0081] 도9B에 나타난 결과와 같이, 검상돌기 세포는 연골분화과정에 의해 풍부한 GAG를 포함하는 연골조직의 형성을 보였다.
- [0082] 3. 체내 이식에 의한 조직 형성 확인
- [0083] (1) 마우스 이식 실험
- [0084] 골수로부터 유래한 중배엽 줄기세포(BMSC)와 검상돌기로부터 분리한 연골세포를 이용하여 체내 조직형성 실험을

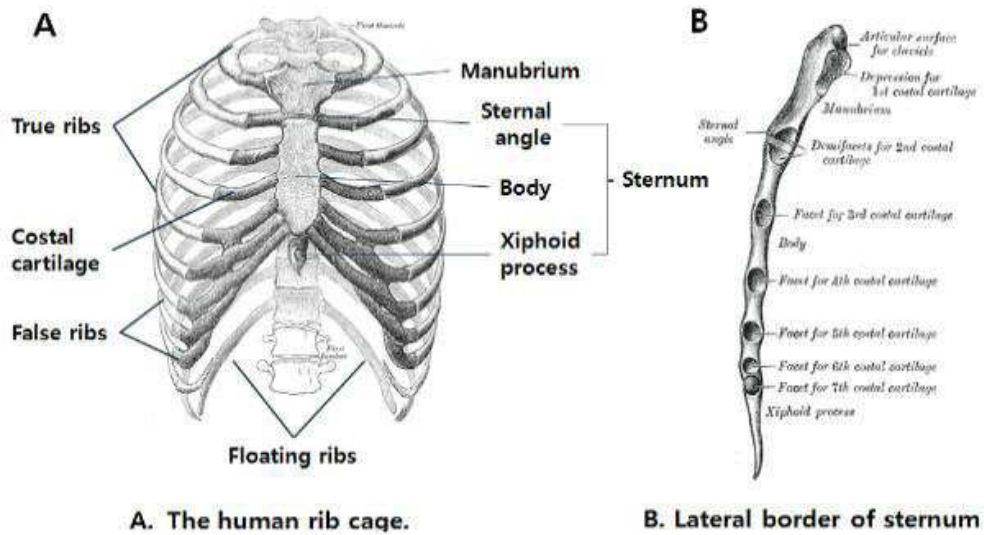
동일한 조건에서 다음과 같이 진행하였다.

- [0085] 0.5~1mm 크기를 가진 입자 형태의 수산화인회석/삼인산칼슘 (HA/TCP, hydroxyapatite/tricalciumphosphate)을 alpha-MEM으로 세척 후 HA/TCP 40 mg당 두 번째 계대를 거친 2×10^6 개의 세포와 섞어, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 두어 세포가 HA/TCP 표면에 결합하도록 하였다.
- [0086] 2시간 후에 세포와 HA/TCP 혼합물을 누드마우스의 등쪽 피하층에 이식한다. 구체적으로, 누드마우스를 마취 후 배가 아래로 오도록 놓은 뒤에 포비돈과 에틸알콜로 등쪽의 피부를 소독 후 절개하였다. 절개한 부위에 세포와 HA/TCP의 혼합물을 넣을 수 있도록 절개부위 바로 아래 피하를 가위 등으로 벌려 포켓을 만든 뒤에 세포와 HA/TCP 혼합물을 이식하였다. 절개한 등의 피부를 봉합한 후 마취가 깨는 것을 확인 후 케이지로 누드마우스를 옮겼다. 이식한 뒤 6주, 10주, 14주 후에 누드마우스로부터 이식물(transplant)을 채취한 후 4% 파라포름알데히드로 3일간 고정하였다. 고정된 이식물을 PBS를 사용하여 3회 세척 후 3주 동안 0.25M EDTA 용액을 이용하여 탈석회화(decalcification)하였다. 탈석회화 완료 후 파라핀 절단(paraffin section)한 뒤 H&E 염색하여 관찰하고 그 결과를 도10과 도11에 나타내었다.
- [0087] 일반적으로, HA/TCP에 중배엽 줄기세포와 같이 탈분화된 세포를 결합시켜 체내에 이식하면 이식된 조직에서 석회화가 진행되어 도11과 같이 뼈의 기질을 형성하는데, 검상돌기 유래 연골세포는 탈분화가 일어난 다음에도 HA/TCP와 섞어 체내에서 뼈로 분화되는 환경에 노출시에도 도10에 나타난 것과 같이 뼈보다는 연골로 분화가 일어나는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터, 검상돌기 유래 연골세포가 이식된 후에 석회화를 유도하지 않고 연골로 분화된 상태를 우수하게 유지할 수 있음을 알 수 있다.
- [0088] (2) 토끼 이식 실험
- [0089] 검상돌기로부터 분리한 연골세포를 2계대를 거친 후에 100 mm 배양접시에서 배양하여 융합(confluent) 상태를 이룬 후에도 지속적으로 배지를 교환하며 10일~20일 동안 배양하여, 배양된 세포 전체가 서로 결합이 되어 시트 형태를 이루도록 하였다. 포셉(forcep)으로 세포의 시트를 들어올려 집을 수 있게 되었을 때, 트립신/EDTA의 사용 없이 시트를 PBS로 세척하고 포셉으로 천천히 잡아당겨 배양접시로부터 분리하였다. 이러한 시트 형태의 검상돌기 유래 연골세포 배양물을 단면을 관찰하고 그 결과를 도12에 나타내었다.
- [0090] 이렇게 시트 형태의 검상돌기 유래 연골세포 배양물을 연골 기질 성분인 GAG에 특이적으로 염색되는 alcian blue 염색하여 연골기질 형성여부를 확인하였다(도 13). 이렇게 시트형태로 배양한 경우, 검상돌기 유래 연골세포는 슬개골관절 유래 연골세포나 늑연골 유래 연골세포와 달리, 연골형성 유도 배지에서 배양하지 않고도 연골 기질을 형성함을 확인하였다.
- [0091] 시트형태의 검상돌기 유래 연골세포 배양물의 연골재생효과를 확인하기 위하여 토끼의 관절 결손 모델에 이식하였다.
- [0092] 구체적으로, 토끼를 마취 후 등을 아래로 하여 눕히고 슬개골 관절 부분의 털을 면도후 포비돈과 에틸알콜로 절개할 부분을 소독하였다. 슬개골 주변의 피부를 중앙쪽에서 상하로 절개하여 슬개골 관절이 드러나도록 한 뒤, 정강이뼈 쪽의 관절연골에 지름 4 μ m 크기의 punch로 표식한 후 표식된 부분 만큼의 연골을 큐렛이나 치과용 드릴을 이용하여 제거하였다.
- [0093] 연골이 제거된 부분에 상기 제조된 시트형태의 검상돌기 유래연골세포 배양물을 이식하고 배양물이 이식부위로부터 빠져나오지 못하도록 피브린 등의 생체접착물질을 도포하였다. 슬개골 관절낭부터 피하조직과 피부를 각각 차례 차례 봉합하고 3주~6주동안 토끼를 사육한 뒤 이식한 부위의 샘플을 채취하였다.
- [0094] 채취한 이식물(transplant)을 4% 파라포름알데히드로 3일간 고정 후 PBS를 사용하여 3회 세척하였다. 그 후 3주 동안 0.25M EDTA 용액을 이용하여 탈석회화 한 후 파라핀 포매하여 절단하였다. 얻은 조직 절편을 H&E staining 하여 관찰하고 그 결과를 도15에 나타내었다.
- [0095] 시트 형태의 검상돌기 유래 배양물을 이식 후 토끼의 관절이 이식하지 않은 대조군에 비해 우수하게 연골이 재생되는 결과를 육안 관찰에 의해서도 알 수 있었으며(도14), 조직학적으로도 연골 결손부분에 새로이 생겨난 연골 조직과 이러한 연골조직이 기저부의 뼈 조직과 분리되지 않고 잘 연결이 이루어져 있는 결과를 확인하였다(도15).
- [0096] 이상, 실시예 및 실험예로서 살펴본 바와 같이, 검상돌기로부터 분리한 연골세포가 신체의 기능에 영향을 야기하지 않고 채취할 수 있는 유일한 탄성연골이며, 중간엽 줄기세포성 및 연골전구세포성 성질을 나타내며, 체외

에서의 확장 배양성이 우수한 동시에, 뼈를 형성하는 환경에서도 석회화가 일어나지 않고 연골형성 능력이 우수함을 알 수 있다.

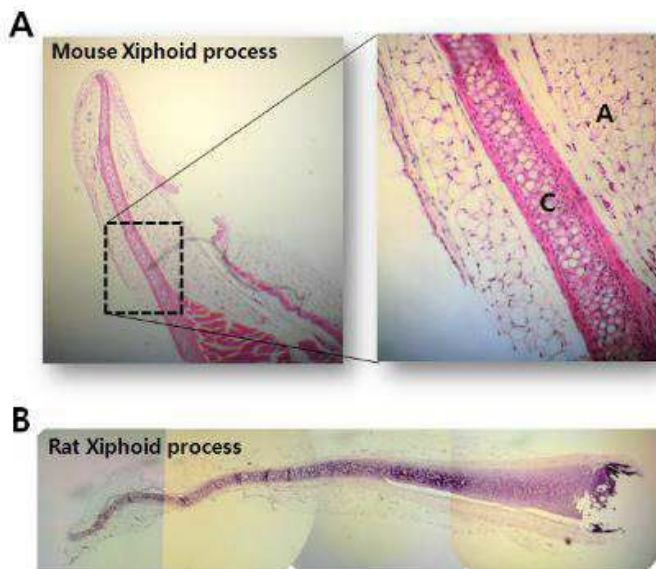
도면

도면1

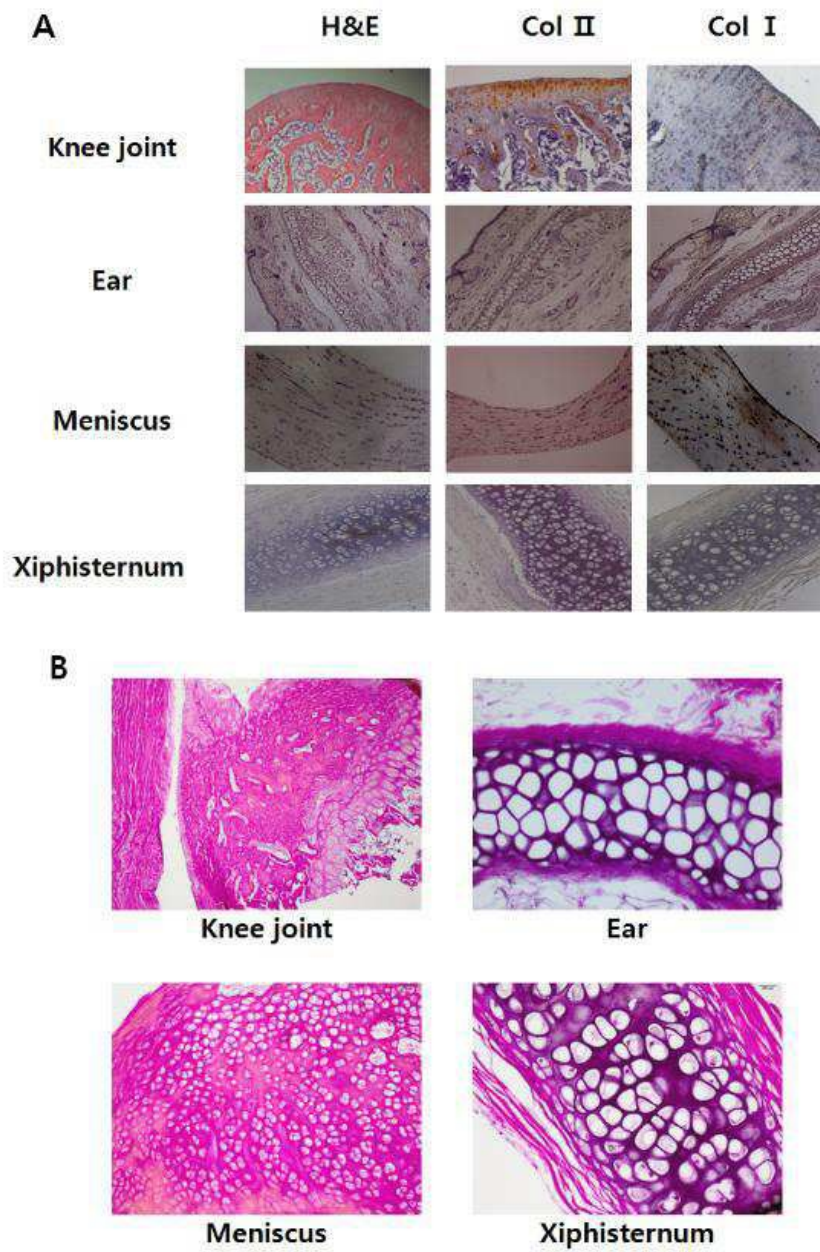


(Figures from Gray's Anatomy : The Anatomical Basis of Medicine and Surgery (British Edition, 38th Ed) (Hardcover))

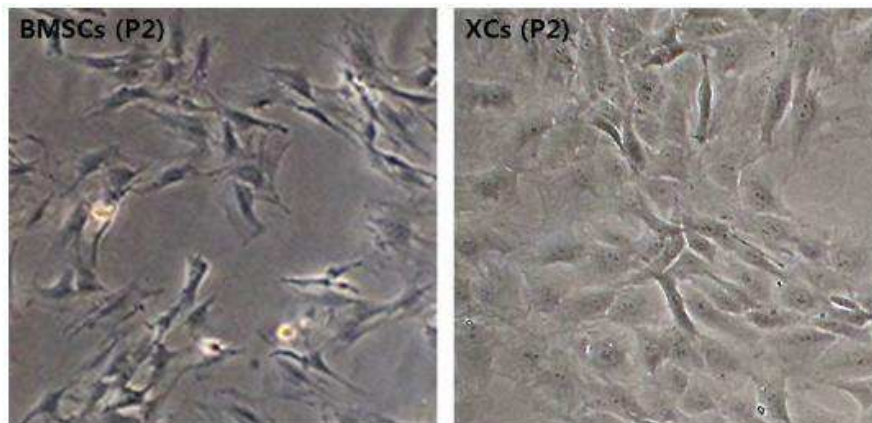
도면2



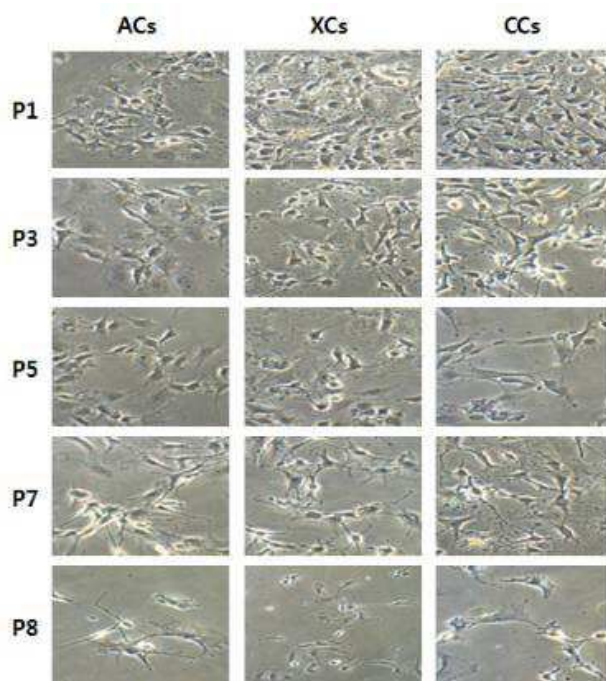
도면3



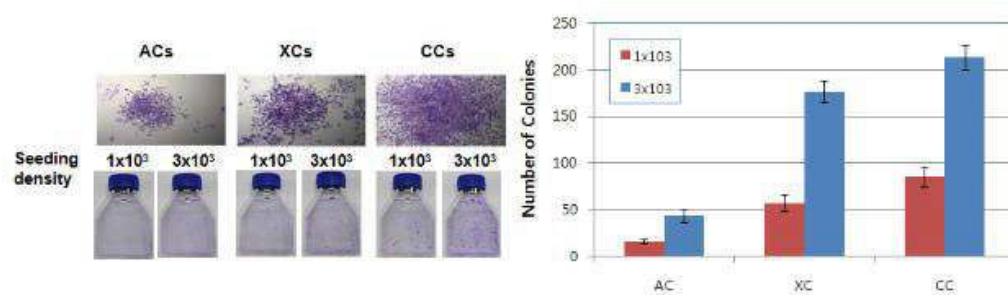
도면4



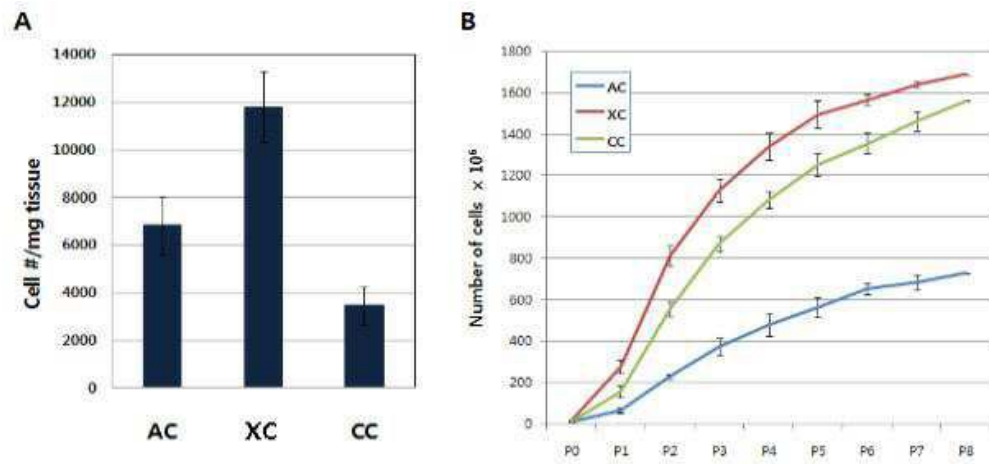
도면5



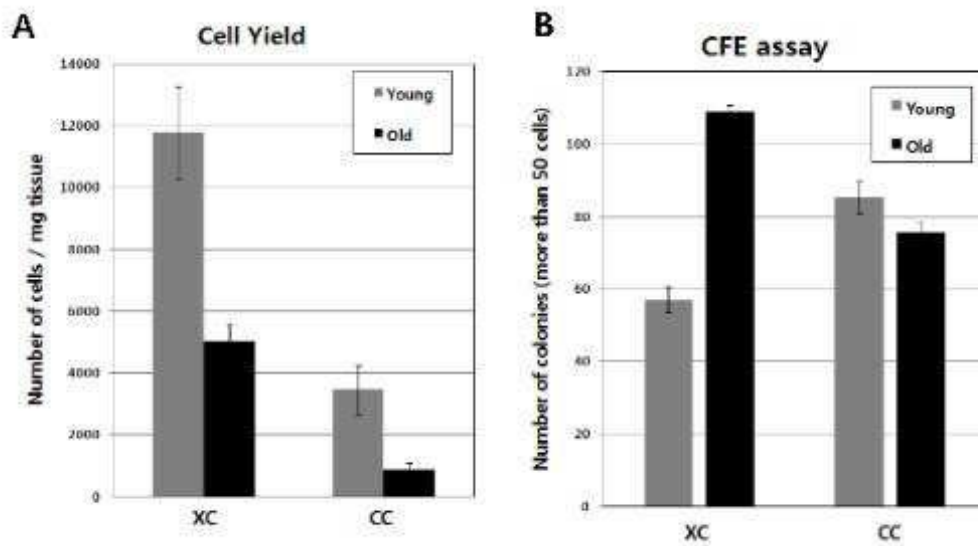
도면6



도면7

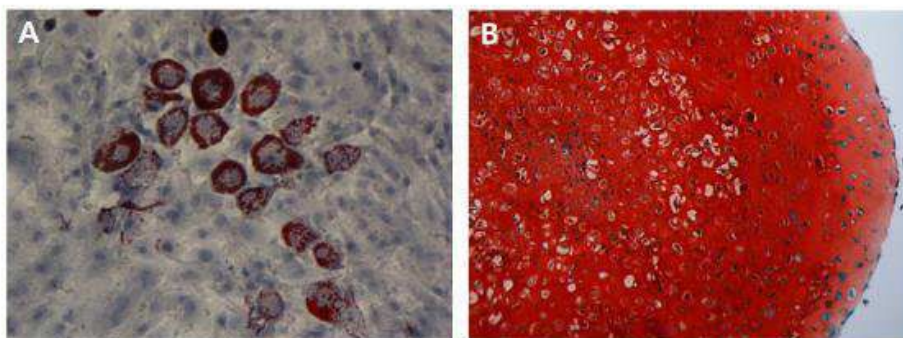


도면8

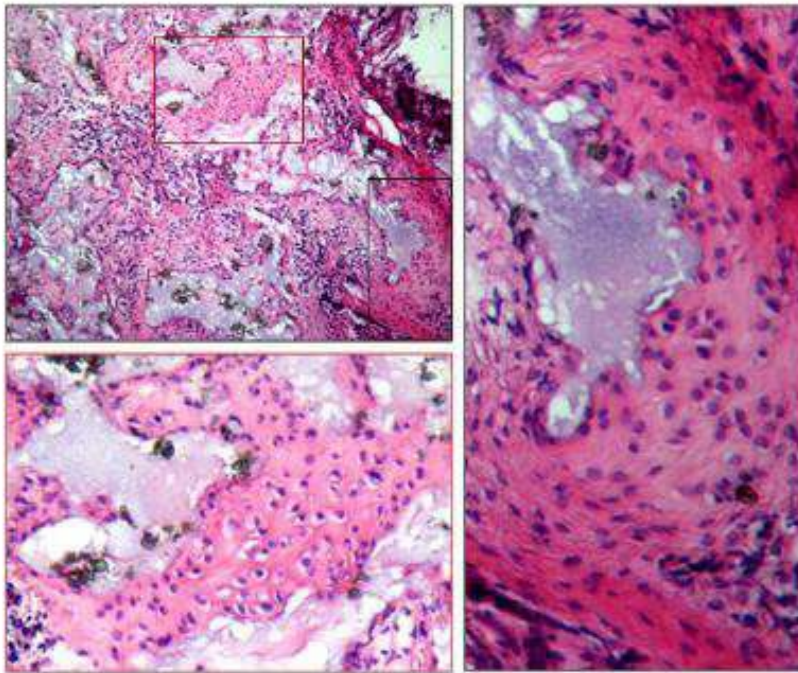


도면9

In vitro Differentiation Potential

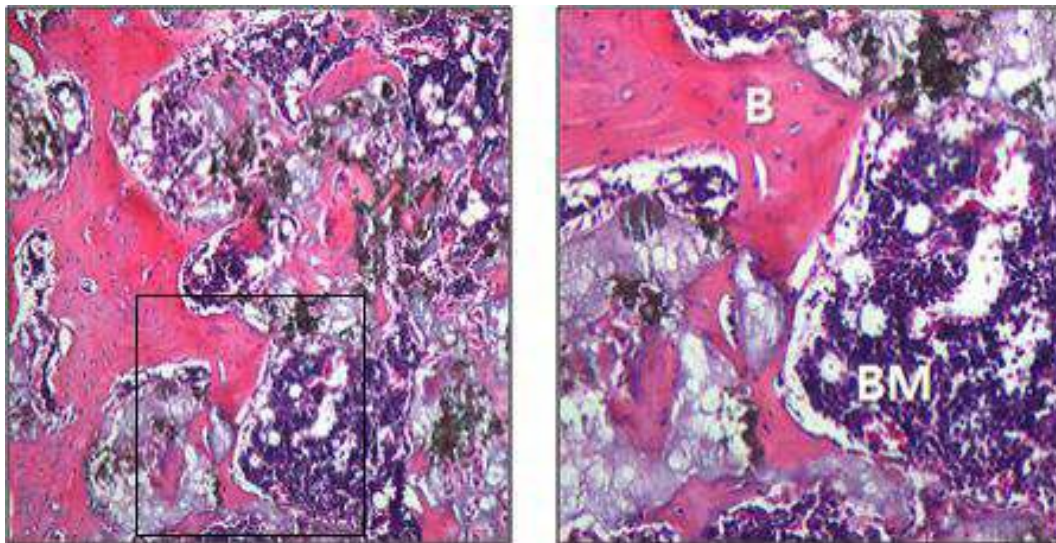


도면10



6 weeks after Subcutaneous transplantation with HA/TCP

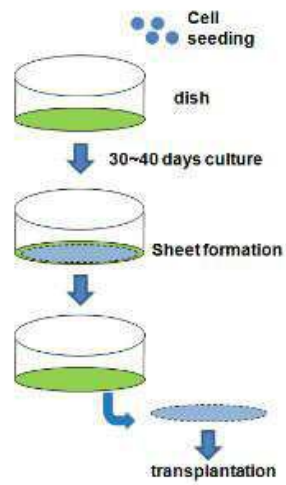
도면11



도면12

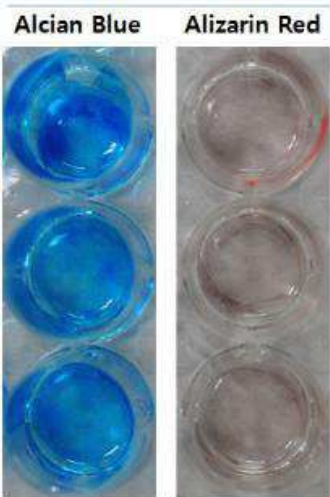
Sheet Culture

One layer of sheet culture



도면13

Sheet culture of XC



도면14

Autologous Chondrocyte Transplantation



도면15

