



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0109362
(43) 공개일자 2016년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/15 (2014.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0033612
(22) 출원일자 2015년03월11일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
유경하
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)
우소연
서울특별시 동대문구 정릉천동로 36, 102동 601호 (용두동, 래미안허브리츠아파트)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

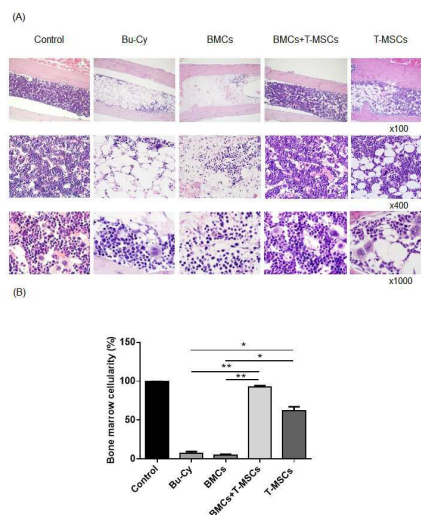
(54) 발명의 명칭 골수 부전 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 유효성분으로 포함하는 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 골수 부전 예방 및 치료용 약학 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포의 시너지 효과에 따라 말초 혈액 형상 회복에 현저한 효과를 보여 정상 수준의 백혈구, 혈소판 및 적혈구로 구성된 다양한 세포 집단을 형성할 수 있으며, 골수 공간에 다양한 골수 세포, 일부 지방 세포 및 거핵 세포들을 혼재하여 재건함으로써 정상 수준의 골수 형상을 나타낼 수 있으며, 비장 크기 및 세포 수를 정상 수준으로 유지시키며, CD41+ 세포의 수를 정상 수준까지 증가시키며, 이러한 효과를 기초로 생존율까지 크게 증가시킴으로써 골수 부전의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

(72) 발명자

류정화

서울특별시 구로구 새말로 31, 109동 801호 (구로동, 롯데구로아파트)

박민화

대구광역시 달서구 구마로12길 89, 502동 107호 (본동, 월성주공5단지아파트)

김한수

서울특별시 영등포구 의사당대로 110, E동 503호 (여의도동, 미성아파트)

김유희

경기도 과천시 동패로 117, 104동 1201호 (동패동, 벽산아파트)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센트럴)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2057468

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업-일반연구자지원사업-기본연구지원사업

연구과제명 골수재건을 위한 새로운 조혈모세포 공급원의 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9C6049823

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업-세포재생기술개발사업

연구과제명 새로운 세포치료제로서 편도줄기세포의 발굴 및 기능검사 연구

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 유효 성분으로 포함하는 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 골수 세포는 골수 유래 조혈 모세포인 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 골수 부전은 백혈병, 악성 림프종, 중증재생불량성 빈혈, 발작성야간혈색소뇨증, 면역부진증, 혈색소이상증, 판코니 빈혈, 진신성 홍반성 낭창 또는 항암제 치료 이후의 이차적 골수 부전으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수 부전 예방 및 치료는 비장 형상 회복에 의한 것인 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수 부전 예방 및 치료는 CD41+ 세포 증가에 의한 것인 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수 세포는 10^6 내지 10^9 세포/kg 체중으로 투여량으로 포함되고, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 10^7 내지 10^9 세포/kg 체중의 투여량으로 포함되는 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포는 주사제 또는 주입제로 투여되는 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 유효성분으로 포함하는 골수 부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다.

[0003] 이러한, 줄기세포는 혈액암, 림프종 및 골수 부전 등의 질병의 치료를 위한 궁극적 수단으로 인지되고 있다. 예컨대, 조혈 줄기 세포는 조혈 악성 질환, 골수기능 부전 병태 등의 질환을 치료하기 위한 효과적인 치료 전략들 중 한 가지를 구성한다. 그러나, 이를 위한 기술이 안전하고 성공적으로 이루어질 수 있을 정도로 세포를 충분히 생체 외에서 증식시키지 못하는 문제점이 있으며, 동일한 공여자를 찾을 수 없는 문제점이 존재하여 이식 기회 조차 갖지 못하는 경우가 다수이다. 또한, 골수 이식의 안전성과 효과는 생착에 이용 가능한 조혈 줄기세포의 개수에 의해 결정되기 때문에 충분한 조혈 줄기세포를 제공하는데 있어서 어려움이 있다.

[0004] 동종의 골수세포 또는 말초 혈액 줄기세포는 또 다른 이식 대안책으로 제시되고 있으나, 이식에 알맞은 적합한 공여자로부터 제공되는 세포를 찾기 어렵다. 또한, 이식을 받게 되는 환자들의 경우에는, 이식 편대 숙주 질환, 재발 또는 이식 거부로 인한 이식 관련 사망 빈도가 높으며, 장기간 면역결핍이 될 위험성이 높다. 또한, 제대혈은 일반적으로 성인 환자에게 신속하고 효과적으로 조혈을 재생하기에 충분한 세포를 제공하지 못한다.

[0005] 또한, 상기와 같은 연구 개발을 진행하기 위해서는 줄기세포의 원활한 공급이 필요하다. 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초 혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 세포능이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 적은 양의 조혈 세포, 골수 세포 등을 이용하여 이식의 안전성과 현저한 생착 효과를 얻을 수 있는 방법에 대한 연구개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0135263호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0033471호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 유효성분으로 포함하는 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 골수 부전을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 치료 방법에 관하여 연구하던 중 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수세포의 공동 투여가 골수 부전의 치료에 시너지 효과를 보여 현저한 치료 효과를 보임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 골수 세포란 골수를 이루는 세포들을 의미한다. 조혈 및 비조혈 줄기세포가 있으며, 조혈 줄기 세포는 모든 형태의 혈액 세포로 분화할 수 있고, 순환계의 혈액 리니지(linage)를 제공한다. 또한, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)라 불리는 비조혈 줄기세포는 지방세포, 연골세포, 조골세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 본 발명에서 골수 세포는 바람직하게 골수 유래 조혈 모세포이다.

[0012] 골수부전(bone marrow failure)은 정상적 골수의 기능이 어떤 이유로든 상실하게 된 상태를 의미한다. 예컨대, 백혈구, 혈소판, 적혈구 등의 수치가 정상 수치와 대비하여 감소된 상태가 골수 부전의 하나의 상태로 설명될 수 있다. 골수 부전은 백혈병, 골수이형성증, 재생불량성 빈혈과 같은 일차적인 골수부전과 항암 화학 요법이나

방사선 치료법 등에 의해서 유발되는 이차적 골수부전을 포함한다.

- [0013] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 유효 성분으로 포함하는 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 골수 부전 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 본 발명에 있어서 골수 부전은 상기 언급된 바와 같으며, 골수 부전에 따라 발생 가능한 질환은 예컨대 백혈병, 악성 림프종, 중증재생불량성 빈혈, 발작성 야간혈색소뇨증, 면역부전증, 혈색소이상증, 판코니 빈혈, 전신성 홍반성 낭창 등의 질환 또는 항암제 치료 이후의 이차적 골수 부전이 있으며, 바람직하게 고형암 또는 혈액암에 대한 항암제 치료 이후의 이차적 골수 부전일 수 있다. 본 발명에 있어서, 골수 세포는 골수로부터 분리된 세포로 조혈 및 비조혈 세포를 모두 포함하며, 바람직하게 골수 유래 조혈모세포를 사용할 수 있다. 편도 유래 중간엽줄기세포 및 골수 세포를 유효성분으로 포함하는 본원 발명의 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물은 두 세포의 시너지 효과에 따라 말초 혈액 형상 회복에 현저한 효과를 보여 정상 수준의 백혈구, 혈소판 및 적혈구로 구성된 다양한 세포 집단을 형성할 수 있으며, 골수 공간에 다양한 골수 세포, 일부 지방 세포 및 거핵 세포들을 혼재하여 재건함으로써 정상 수준의 골수 형상을 나타낼 수 있으며, 비장 크기 및 세포 수를 정상 수준으로 유지시키며, CD41+ 세포의 수를 정상 수준까지 증가시키며, 이러한 효과를 기초로 생존율까지 크게 증가시킨다. 즉, 본원 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포는 이들 각각을 사용하는 것과 대비하여, 이 둘을 조합하였을 때 현저한 시너지 효과를 가져 골수 부전에 현저한 치료 효능을 가진다.
- [0014] 또한, 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포는 타 유래 줄기세포와 대비하여 편도선염 등의 이유로 외과적 수술 후 버려지는 편도 조직을 재활용하여 별도의 줄기세포 추출을 위한 단계를 필요치 않으며, 초기 수득률이 월등히 높고, 타유래 줄기세포와 대비하여 조혈모세포의 분화를 현저히 촉진한다는 점에서 장점을 가지기 때문에 골수 부전의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포는 당업계에 알려진 방법에 따라 편도로부터 추출 가능하다.
- [0016] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 골수 부전의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 골수 부전의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 1 ml 당 편도 유래 중간엽 줄기세포를 1.0×10^5 개 내지 1.0×10^9 개, 바람직하게는 1.0×10^6 개 내지 1.0×10^8 개의 세포를 포함할 수 있으며, 골수 세포를 1.0×10^5 개 내지 1.0×10^9 개, 바람직하게는 1.0×10^6 개 내지 1.0×10^8 개의 세포를 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 골수 부전 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 줄기세포 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제로는 이에 한정되지 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다. 이 외에도, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소투여용 제제의 경우에는 기재(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife[®]) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [0019] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 예컨대, 본 발명에 의한 조성물은 직장, 피하, 근육, 복강, 정맥, 동맥, 뇌척수강내, 골수 내 등으로 투여가능하며, 바람직하게는 골수 내로 투여될 수 있다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 편도 유래 중간엽 줄기세포 10^7 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^8 내지 10^9 세포/kg 체중 및 골수 세포 10^6 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^8 내지 10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0020] 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 골수 부전 예방 및 치료용 약학 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포의 시너지 효과에 따라 말초 혈액 형상 회복에 현저한 효과를 보여 정상 수준의 백혈구, 혈소판 및 적혈구로 구성된 다양한 세포 집단을 형성할 수 있으며, 골수 공간에 다양한 골수 세포, 일부 지방 세포 및 거핵 세포들을 혼재하여 재건함으로써 정상 수준의 골수 형상을 나타낼 수 있으며, 비장 크기 및 세포 수를 정상 수준으로 유지시키며, CD41+ 세포의 수를 정상 수준까지 증가시키며, 이러한 효과를 기초로 생존율까지 크게 증가시킴으로써 골수 부전의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 마우스 골수 이식 및 화학 치료법 조건에 따른 실험 스케줄을 나타내는 도이다.

도 2는 카플란-마이어 누적 생존 분석에 따라 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여 마우스에서 생존률 증진 효과를 나타내는 도이다.

도 3은 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 말초 혈액과 골수 세포의 형상 회복 효과를 보여주는 Diff-quick 염색 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 적혈구 및 백혈구 수치 증가 효과를 나타내는 도이다.

도 5는 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 비장의 조직학적 형상 분석 결과 및 골수 세포의 면적 비율 증가 효과를 나타내는 도이다.

도 6은 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 비장 크기 확인 결과 및 조직학적 형상 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 비장 크기, 비장 세포수 및 CD41+ 세포수 증가를 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0024] <실시예 1> 골수 세포 및 편도 유래 중간엽 줄기세포의 제조

[0025] 골수 이식을 위하여 마우스로부터 골수세포를 추출하였다. 8 주령 C57BL/6 수컷 마우스(OrientBio, Korea)는 경추 탈골로 희생되었고 하지가 제거되었다. 골수는 뼈의 분해 및 세척을 통해 RPMI 1640로 대퇴골 및 경골로부터 수득되었다. 단일 세포 현탁액은 멸균 70 um cell strainer를 통해 골수 용액을 통과시켜 제조되었고, 이는 5분간 1200 rpm에서 원심분리되었다. 분리된 골수 세포는 RBC 용해 용액(물에서 0.15 M NH_4Cl , 10mM NaHCO_3 , 10mM EDTA-disodium)로 2분간 처리되었고 PBS로 2회 세척되었다. PBS로 재현탁 후, 2×10^6 cells/200 μL 는 마우스 정맥 투여를 위해 1 mL Tuberculin syringe (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 옮겨졌다.

[0026] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC)는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도절술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 (3~5 passage)는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 하에 배양되었다.

[0027] <실시예 2> 골수 이식을 위한 실험 디자인

[0028] 마우스 골수 이식 및 화학 치료법 조건의 스케줄은 도 1에 기재된 바와 같이 디자인되었다. 모든 절차 및 프로토콜은 이화여자대학교 의학 동물 윤리위원회(ESM 11-0185)의 승인 하에 진행되었다. 8주령 암컷 BALB/c (H-

2K^d) 마우스는 OrientBio(Korea)로부터 구매되었고, 마우스는 21 ~ 23 °C 및 51 ~ 54 % 습도 및 12시간 주/야 주기 하에 음식과 물을 자유식으로 하여 키워졌다. 모든 마우스 연구는 이화 여자대학교 내 동물 관리 및 사용 위원회의 승인 하에 진행되었고 해외 규정 절차에 따른 것이다.

[0029] 8 주령 암컷 BALB/c 마우스는 부설판(busulfan) 및 사이클로포스파미드(cyclophosphamide) (BU-CY)를 투여받았다. 복강 내로 부설판 (20 mg/kg)은 골수 이식 전 4, 5, 6, 7일째(이식일을 0일로 함)에 투여되었으며, 사이클로포스파미드 (100 mg/kg)는 2일 및 3일 전에 투여되었다. 회복기 하루 후 (이식 1일 전), 골수 이식 또는 편도 유래 중간엽 줄기세포 주입이 수행되었다. 골수 세포는 8 주령 수컷 C57BL/6 donor 마우스의 대퇴골 및 경골로부터 획득된 것으로 단일 세포 현탁액으로 준비되었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포 (T-MSCs) ± 골수 세포 (BMCs) 2×10^6 세포는 꼬리 정맥을 통해 마우스에게 투여되었다. 마우스는 대조군 그룹(Healthy group); Bu-Cy 화학 치료 그룹; 편도 유래 중간엽 줄기세포 이식 그룹; 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포 공동 이식 그룹; 골수 세포 이식 그룹으로 나뉘어졌다. 모든 마우스는 항생물질을 포함하는 물을 제공하면서 3주간 유지되었다.

[0030] <실시예 3> 편도 유래 중간엽 줄기세포 이식에 따른 생존율 증가 확인

[0031] 상기 실시예 2에서 수행된 실험에 따라 세포 이식 3주 후, 생존율을 비교하여 하기 표 1 및 도 2에 나타내었다.

[0032] [표 1] 생존율 확인

	생존율 (%)	마리수(생존/전체)
대조군 그룹	100	17/17
Bu-Cy 화학 치료 그룹	12.5	3/24
편도유래줄기세포(T-MSC) 이식 그룹	44.4	8/18
편도유래줄기세포(T-MSC) 및 골수 세포(BMC) 공동 이식 그룹	50	9/18
골수 세포(BMC) 이식 그룹	44	11/25

[0033] 상기 표 1 및 도 2에서 확인되는 바와 같이, 카플란-마이어 누적 생존 분석은 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 세포의 공동 이식 그룹에서 가장 높은 생존율을 나타내는 것을 보여주었으며, 이어서 편도 유래 중간엽 줄기세포 그룹에서 생존율이 높았으며, Bu-Cy 화학 치료 그룹이 가장 낮은 생존율을 나타내었다. 즉, 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 세포의 공동 이식 그룹에서의 이 두 세포 간의 시너지 효과에 따른 치료 효과를 확인하였다.

[0035] <실시예 4> 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 말초 혈액의 형상 회복 효과 확인

[0036] 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 말초 혈액의 형상 회복 효과를 확인하기 위하여 및 혈액학(Hematological) 및 조직학(histological) 분석을 수행하였다.

[0037] 세포 이식 3주 후, 마우스는 마취되었고 혈액은 헤파린-코팅 1 ml 실린지로 심장 천자를 통해 수거되었다. 헤마토크리트(hematocrit)로 일반 혈액 검사는 혈액학 분석기인 Sysmax XE-2100D (SYSMAX Corporation, Kobe, Japan)로 측정되었다. 대퇴골 및 비장은 경추 탈골 후 분리되었고 4 % 파라포름알데하이드로 고정되었다. 광학 현미경으로 관찰을 위한 시료는 Bouin 용액에 24시간 동안 고정되었고 파라핀으로 포매되었다. 골수는 파라핀 포매전 고정되고 Decalcify되었다. 골수 또는 비장을 포함하는 슬라이드는 염색이 수행되었다. 조직 절편의 이미지는 Olympus DP-71 디지털 카메라 및 이의 이미징 시스템(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하는 Olympus BX-50 현미경으로 확인하였다.

[0038] 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다. 도 3은 말초 혈액과 골수 세포의 형상을 보여주는 Diff-quick 염색 결과이며, 도 4는 적혈구 및 백혈구 세포 수를 비교한 결과를 보여준다.

[0039] 도 3에 나타낸 바와 같이, 말초 혈액과 골수 세포의 형상은 일반적으로 정상 백혈구, 혈소판 및 적혈구로 구성된 다양한 세포 집단을 보여주며 정상 대조군 마우스의 말초 혈액 도말 표본과 골수 세포 도말 표본은 정상 혈액의 형상을 보여주었다. 치료 그룹 중 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 세포의 공동 투여 그룹에서 가장 현저한 치료 효과를 보이는 것이 확인되었다. 반면, Bu-Cy 그룹은 적혈구, 백혈구 및 혈소판의 양이 매우 낮은 것으로 보였다.

[0040] 또한, 적혈구 및 백혈구의 수를 세어 그 분석 결과를 도 4에 나타내었다. 적혈구의 양을 확인하여 볼 때, 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 같이 처리한 그룹에서 적혈구의 양이 높은 것으로 확인되었고, 백혈구 역시 정상 수준 정도의 회복을 보였다.

[0041] 상기 결과로부터, 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 세포의 공동 이식 그룹에서의 이 두 세포 간의 시너지 효과에 따른 치료 효과를 확인하였다.

[0042] <실시예 5> 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 골수 재건 효과 확인

[0043] 각각의 그룹에 상응하는 골수의 조직학적 분석 결과를 5의 A에 나타내었다. 대조군 그룹은 적혈구 및 골수 세포가 작은 지방세포 및 일부 거핵 세포(megakaryocytes)와 함께 혼재되어 있는 것이 확인되었다. 반면, Bu-Cy 화학 치료를 받은 그룹은 지방 세포로 대체된 빈 골수 공간을 가지는 것이 확인되었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포를 이식받은 그룹은 Bu-Cy 그룹의 골수보다 골수 세포의 밀도가 증가한 것이 확인되었다. 특히, 골수 세포와 편도 유래 중간엽 줄기세포를 공동 이식 받은 그룹은 다양한 골수 세포들, 일부 지방 세포 및 거핵 세포들이 혼재되어 대조군과 유사한 수준으로 골수가 재건된 것이 확인되었다. 특히, 거핵 세포는 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 골수 세포만을 투여한 그룹과 대조하여 공동 이식 그룹에서 현저히 증가함이 확인되었다.

[0044] 또한, 지방세포에 대한 골수 세포의 면적 비율을 통해 확인하여 도 5의 B에 나타낸 바와 같이 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 골수 세포를 공동 이식한 그룹이 더 높은 골수 세포 밀도를 가지는 것을 확인하였다.

[0045] <실시예 6> 편도 유래 중간엽 줄기세포 투여에 따른 비장 회복 효과 확인

[0046] 비장의 사이즈를 비교하여 그 결과를 도 6의 A 및 표 2에 나타내었다. 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 세포가 공동 이식된 그룹의 비장은 대조군 그룹과 유사할 정도의 비장 크기를 보였으나, 나머지 그룹에서는 비장 크기가 감소되었으며, 이를 하기 표 2에 나타내었다.

[0047] [표 2] 비장 크기 확인

	비장 크기(cm)
대조군 그룹	2.15 ± 0.03
Bu-Cy 화학 치료 그룹	0.99 ± 0.05
편도유래줄기세포(T-MSC) 이식 그룹	1.27 ± 0.02
편도유래줄기세포(T-MSC) 및 골수 세포(BMC) 공동 이식 그룹	1.87 ± 0.09
골수 세포(BMC) 이식 그룹	1.06 ± 0.03

[0048]

[0049] 또한, 조직학적 분석 결과를 도 6의 B에 나타내었다. 분석 결과 편도 유래 중간엽 줄기세포와 골수 세포의 공동 이식 그룹에서 타 그룹과 대비하여 비장 세포수가 가장 많음이 확인되었다.

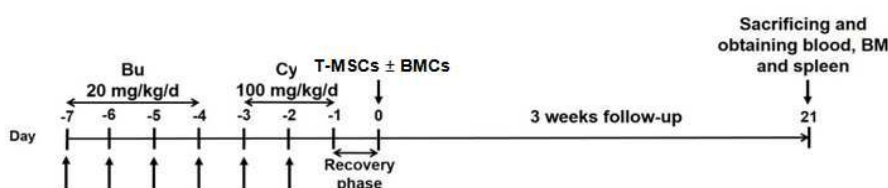
[0050] 상기 결과 비장 크기 및 비장 세포 수는 정상화하여 도 7의 A 및 B에 나타내었다.

[0051] 한편, 실시예 5와 동일하게 유세포 분석을 통하여 CD41+ 세포를 확인한 결과 골수 세포와 편도 유래 중간엽 줄기세포의 공동 투여 그룹에서 CD41+ 세포가 현저히 증가되는 것을 확인하였다.

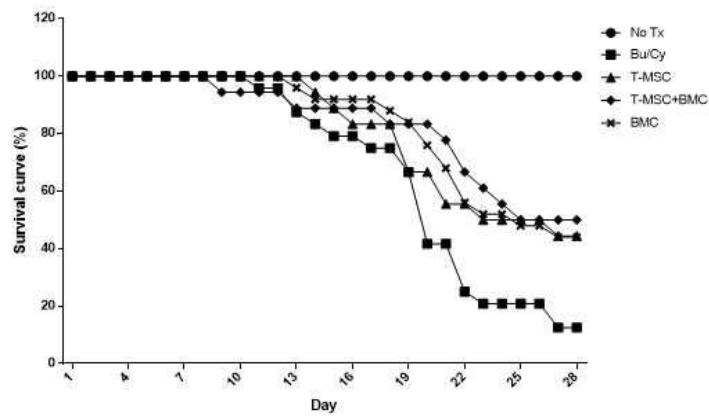
[0052] 상기 결과들로부터 편도 유래 중간엽 줄기세포가 골수 재건에 효과를 보일 수 있으며, 특히 골수 세포와 편도 유래 중간엽 줄기세포의 공동 투여에 따른 시너지 효과를 확인하였다.

도면

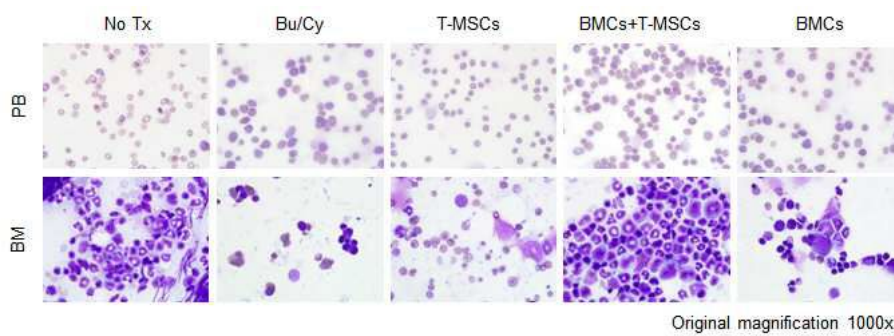
도면1



도면2

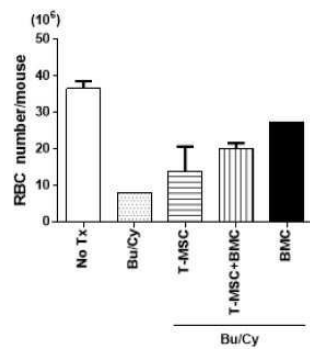


도면3

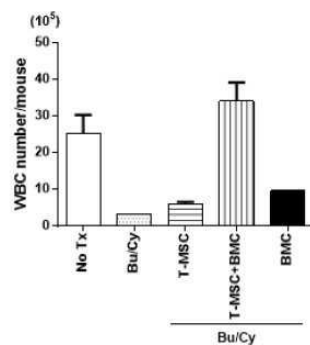


도면4

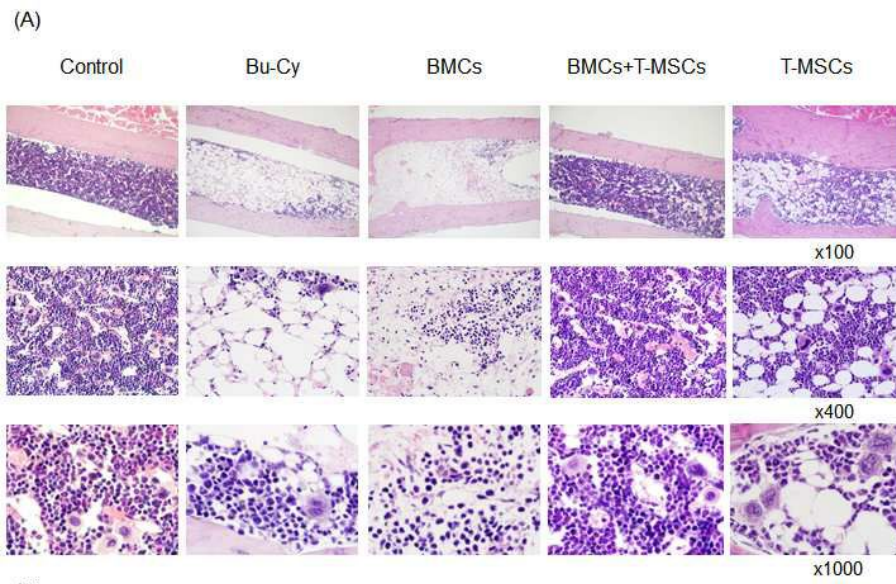
A



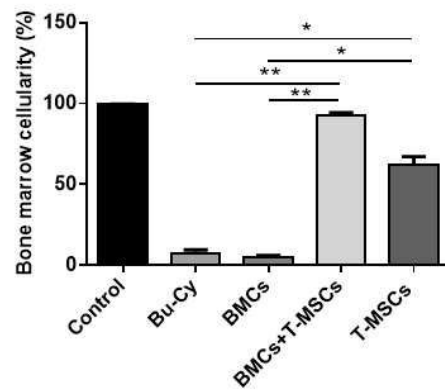
B



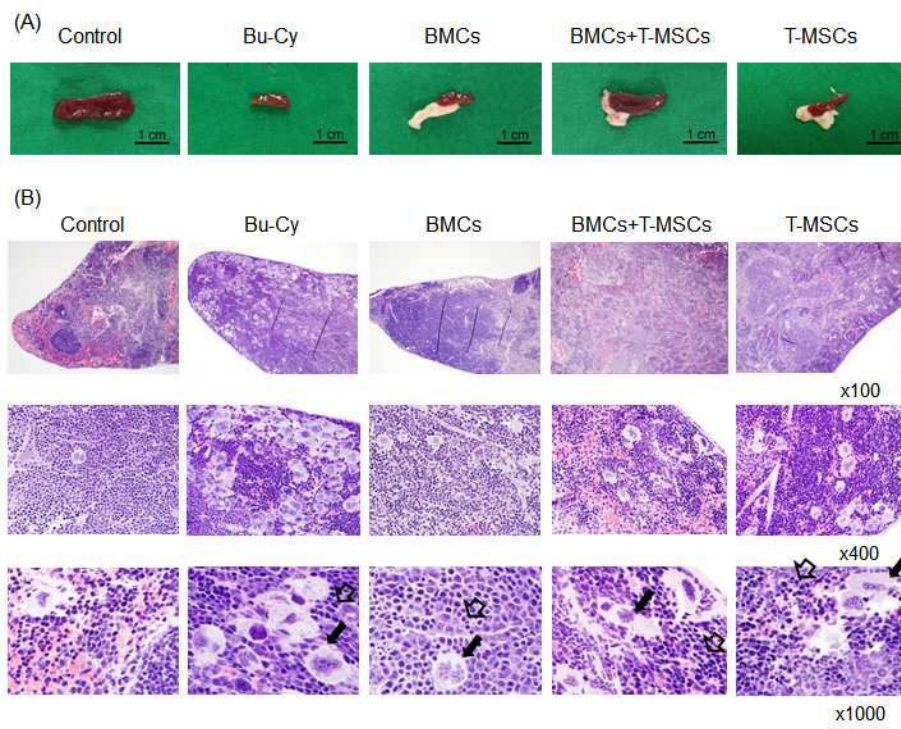
도면5



(B)



도면6



도면7

