



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월10일

(11) 등록번호 10-2407387

(24) 등록일자 2022년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/33 (2014.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 35/33 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2019-7003364
 (22) 출원일자(국제) 2018년02월23일
 심사청구일자 2020년12월29일
 (85) 번역문제출일자 2019년01월31일
 (65) 공개번호 10-2019-0117468
 (43) 공개일자 2019년10월16일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2018/006795
 (87) 국제공개번호 WO 2018/155651
 국제공개일자 2018년08월30일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2017-033624 2017년02월24일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020150009655 A
 비특허문헌

(73) 특허권자
 가부시키가이샤 메토세라
 일본국 야마가타켄 츠루오카시 하리마 아자 와카
 마즈 51만치 1
 (72) 발명자
 이와미야 타카히로
 일본국 9970015 야마가타켄 츠루오카시 스에히로
 마치 5반 22고 가부시키가이샤 메토세라 내
 (74) 대리인
 특허법인(유한) 대아

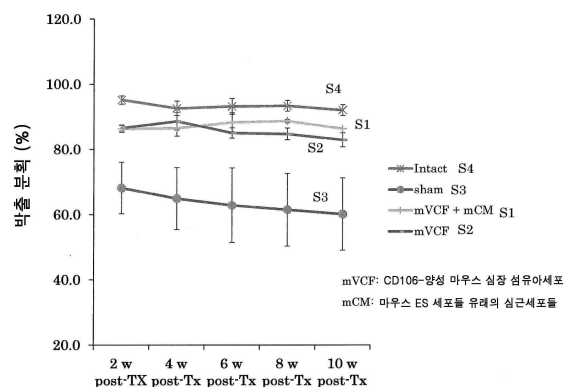
전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 **섬유아세포를 포함하고, 심장 질환들의 치료를 위하여 사용될 수 있는 주사용 조성물, 및 치료 용도를 위하여 섬유아세포를 생산하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 괴사성 심장 조직 영역의 장기적이고 근본적인 치유를 달성하는데 유용하며, 아직 확립되지 않은 방법을 제공하여 심장의 기능성의 회복을 가능하게 하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 심장 질환의 치료를 위한 주사가 가능한 조성물을 제공하며, 그 조성물은 섬유아세포들을 포함하고, 이때 섬유아세포들은 CD106-양성 섬유아세포들을 포함하고, 바람직하게는 CD90-양성 섬유아세포들을 포함한다.

대표도 - 도2a

(52) CPC특허분류

A61P 9/04 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

심부전(heart failure), 허혈성 심장 질환 또는 심근경색증(myocardial infarction)을 치료하는데 사용을 위한 섬유아세포들을 포함하는 주사가능한 조성물로, 이때 섬유아세포들은 CD106-양성 섬유아세포들을 포함하고 그리고 이때 주사가능한 조성물은 괴사성(necrotic) 심장 조직의 영역 또는 그것의 인근에 주사되어야 하고, 그리고 /또는 관상 동맥 내로 주입되어야 하는, 주사가능한 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

섬유아세포들은 CD90-양성 섬유아세포들을 포함하는, 사용을 위한 주사가능한 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

섬유아세포들은 코넥신(connexin) 43-양성 섬유아세포들을 포함하는, 사용을 위한 주사가능한 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

주사가능한 조성물에 포함되는 섬유아세포들의 총량에 대한 CD106-양성 섬유아세포들의 (세포 수의 면에서) 비율은 0.03% 이상인, 사용을 위한 주사가능한 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 심장 질환의 치료를 위한 주사가능한 조성물, 섬유아세포들을 포함하는 조성물에 대한 것이고, 더욱 특이적으로 심장 질환의 치료를 위한 주사가능한 조성물, 특정 단백질을 발현시키는 섬유아세포들을 포함하는 조성물에 대한 것이다. 본 발명은 또한 섬유아세포들이 주사가능한 조성물을 위하여 사용될 수 있는, 치료를 위한 섬유아세포들을 생산하는 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 심근경색 또는 심근증으로 인한 심장기능상실 후 생존 예후는 매우 좋지 않고, 그것의 근본적인 방법은, 현재로서는 심장 이식으로 제한된다. 그러나, 현재, 일본 뿐 아니라 전세계적으로 환자들은 공여자(donors) 수의 부족으로 고통받고 있으며, 충분한 치료를 받지 못하는데 이는 문제가 있다. 그러므로 최근에는 재생 의학에 의한 심장 질환들의 치료가 주목을 받고 있으며 그 기술이 발달되고 있다.

[0003] 예를 들어, 특허 문헌 1 등은 세포 시트들을 개시하고 있으며, 자가조직의 뼈대 근육모세포들로의 이러한 시트들의 발달이 연구된다. 특허 문헌 2 등은 유도(induced) 만능(pluripotent) 줄기 세포들을 사용하는 심근(myocardial) 시트로 심장 질환의 치료를 연구한다. 그러나, 이들 연구들에도 불구하고, 상실된 심장 기능의 장기간의 그리고 중요한 회복을 하게 하는 방법에 대한 보고는 없으며, 심장 기능의 회복을 가능하게 하는 괴사성(necrotic) 심장(cardiac) 조직 영역의 장기간의 그리고 근본적인 치유를 하게 하는 방법의 확립에 대한 요구가 있다.

[0004] 이러한 상황에서, 본 발명자들은 기능적 심장 세포 시트가 혈관(vascular) 세포(cell) 부착(adhesion) 분자(molecule)-1 (VCAM-1, CD106)에 양성인 섬유아세포들을 이용하여 수득될 수 있다는 것을 발견하였다 (특허 문헌 3 참조).

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) [특허 문헌 1] JP 2010-081829 A
(특허문헌 0002) [특허 문헌 2] WO 2013/137491
(특허문헌 0003) [특허 문헌 3] WO 2016/006262

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 아직 확립되지 않았고, 심장 기능의 회복을 가능하게 하기 위하여 괴사성 심장 조직 영역의 장기간 및 근본적 치유를 달성하는데 유용한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 문제를 해결하기 위하여 연구를 수행하였으며, 그 결과, 심장 질환이 특정 종류의 섬유아세포들을 괴사성 심장 조직 영역에 투여함으로써 치료될 수 있다는 것을 발견하고, 이로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 본 발명은 하기 첫 번째 측면을 포함한다 (발명 A).

[0009] (A1) 심장 질환의 치료를 위한 주사가능한 조성물, 그 조성물은 섬유아세포들을 포함하고, 이때 섬유아세포들은 혈관 세포 부착 분자-1 (VCAM-1, CD106)에 양성인 섬유아세포들을 포함한다.

[0010] (A2) (A1)에 따른 주사가능한 조성물로, 이때 섬유아세포들은 흉선(Thymus) 세포(cell) 항원(antigen)-1 (Thy-1, CD90)에 양성인 섬유아세포들을 포함한다.

[0011] (A3) (A1) 또는 (A2)에 따른 주사가능한 조성물로, 이때 섬유아세포들은 코넥신(connexin) 43 (Cx43)에 양성인 섬유아세포들을 포함한다.

[0012] (A4) (A1) 내지 (A3) 중 어느 하나에 따른 주사가능한 조성물로, 이때 (세포 수의 면에서) CD106-양성 섬유아세포들의 주사가능한 조성물 내 포함되는 섬유아세포들의 총 양에 대한 비율은 0.03% 이상이다.

- [0013] 본 발명은 또한 하기 두 번째 측면을 포함한다 (발명 B).
- [0014] (B1) 치료를 위한 섬유아세포들을 생산하는 방법으로, 그 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0015] 섬유아세포들을 제공하는 단계; 및
- [0016] 섬유아세포들로부터 CD106-양성 섬유아세포들을 스크리닝하는 단계.
- [0017] (B2) (B1)에 따른 방법으로, 이때 치료를 위한 섬유아세포들은 심장 질환의 치료를 위하여 사용된다.
- [0018] (B3) (B1) 또는 (B2)에 따른 생산 방법으로, 섬유아세포들로부터 CD90-양성 세포들을 스크리닝하는 단계를 더 포함한다.
- [0019] (B4) (B1) 내지 (B3) 중 어느 하나에 따른 생산 방법으로, 이때 치료를 위한 섬유아세포들은 코넥신 코넥신 43-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0020] (B5) (B1) 내지 (B4) 중 어느 하나에 따른 생산 방법으로, 이때 CD106-양성 섬유아세포들의 치료를 위한 섬유아세포들의 총 세포 수에 대한 (세포 수 면에서의) 비율은 0.03% 이상이다.
- [0021] 본 발명은 또한 하기 세 번째 측면을 포함한다 (발명 C).
- [0022] (C1) 심장 질환의 치료를 위한 방법으로, 섬유아세포들을 포함하는 주사가 가능한 조성물의 피사성 심장 조직 영역 또는 그 인근으로의 주사, 및/또는 조성물의 관상 동맥(coronary artery)로의 조성물의 투입을 수행하는 단계를 포함하고, 이때 섬유아세포들은 CD106-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0023] (C2) (C1)에 따른 심장 질환의 치료를 위한 방법으로, 이때 섬유아세포들은 CD90-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0024] (C3) (C1)에 따른 심장 질환의 치료를 위한 방법으로, 이때 섬유아세포들은 코넥신 43-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0025] (C4) (C1)에 따른 심장 질환의 치료를 위한 방법으로, 이때 CD106-양성 섬유아세포들의 주사가 가능한 조성물 내 포함된 섬유아세포들의 총 양에 대한 (세포 수 면에서의) 비율은 0.03% 이상이다.
- [0026] 본 발명은 또한 하기 네 번째 측면을 포함한다 (발명 D).
- [0027] (D1) 주사가 가능한 조성물로서 섬유아세포들의 용도로, 이때 섬유아세포들은 CD106-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0028] (D2) (D1)에 따른 용도로, 이때 섬유아세포들은 CD90-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0029] (D3) (D1) 또는 (D2)에 따른 용도로, 이때 섬유아세포들은 코넥신 43-양성 섬유아세포들을 포함한다.
- [0030] (D4) (D1) 내지 (D3) 중 어느 하나에 따른 용도로, 이때 CD106-양성 섬유아세포들의 주사가 가능한 조성물 내 포함된 섬유아세포들의 총 양에 대한 (세포 수 면에서의) 비율은 0.03% 이상이다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 의하여, 심장 기능의 회복을 위한 피사성 심장 조직 영역을 치유하는데 효과적인 수단들이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1A는 CD106-양성 마우스 심장 섬유아세포들에서 VCAM-1 단백질의 국소화를 보여주는 그래프들을 보여준다.
- 도 1B는 CD106-양성 마우스 심장 섬유아세포들의 VCAM-1-양성 면역형광 이미지들을 보여준다 (도면 대체 사진들).
- 도 1C는 섬유아세포들의 각 타입들의 코넥신 43-양성 면역형광 이미지들을 보여준다 (도면 대체 사진들).
- 도 2A는 CD106-양성 마우스 심장 섬유아세포들의 주사 후 심장 기능 (박출 분율, 좌심실 박출 분율)을 보여주는 그래프를 보여준다.
- 도 2B는 CD106-양성 마우스 심장 섬유아세포들의 주사 후 심장 기능 (분획 단축, 좌심실 분획 단축)을 보여주는 그래프를 보여준다.

도 2C는 래트 심장들의 심초음파검사 이미지들을 보여준다. (도면 대체 사진들).

도 3A는 래트 심장들에서 콜라겐 섬유증 경색부들들의 이미지들을 보여준다 (도면 대체 사진들).

도 3B는 래트 심장들에서 콜라겐성 섬유증 경색의 영역들을 보여주는 그래프를 보여준다.

도 4는 심장 기능 (좌심실 분획 단축 (FS) 및 좌심실 박출 분율 (EF))을 보여주는 그래프를 보여준다.

도 5는 추적이 심초음파검사에 의하여 수행되는 래트 만성 심부전 모델에 대한 심장 기능 추적 스케줄을 보여준다. 만성 심부전에 대한 CD106-양성 래트 섬유아세포들의 치료적 효과의 확인을 위하여, 심장 기능들의 추적이 2주 간격으로 세포들의 투여일로부터 18주까지 심초음파검사에 의하여 수행되었다.

도 6은 추적이 심초음파검사에 의하여 수행되는 래트 만성 심부전 모델에 대한 심장 기능 추적 스케줄을 보여준다. 만성 심부전에서 CD106-양성 인간 섬유아세포들의 치료적 효과의 확인을 위하여, 심장 기능들의 추적이 두 주 간격으로 세포들의 투여일부터 18주까지 심초음파검사에 의하여 수행되었다. CD106-양성 인간 섬유아세포들의 최적의 투여량을 연구하기 위하여, 심장 기능들의 추적이 두 주 간격으로 세포들의 투여일부터 8주까지 심초음파검사에 의하여 수행되었다. 대조군을 제공하기 위하여, 심초음파검사에 의한 심장 기능들의 추적이 배지의 투여 2주, 4주, 8주, 12주, 16주 및 18주 후에 수행되었다.

도 7은 래트 만성 심부전 모델에서 심장 기능들의 회복에 CD106-양성 래트 섬유아세포들 (2.0×10^6 세포들/ 50μ L)의 투여의 효과를 보여준다. (A)는 좌심실 박출 분율 ($LVEF = (LVIDd3 - LVIDs3) / LVIDd3$)을 나타낸다; (B)는 좌심실 분획 단축 ($LVFS = (LVIDd - LVIDs) \times 100 / LVIDd$)을 나타낸다; (C)는 좌심실 확장말기 용적 ($LVEDV$)을 나타낸다; 그리고 (D)는 좌심실 수축기말 용적 ($LVESV$)을 나타낸다. $N = 4$.

도 8은 여러가지 심장 섬유아세포들에서 CD106- 및 CD90-양성 세포 비율들 (%)을 보여준다. 백인 태아 (21 주) 심장-유래 섬유아세포들 (c21wFCF), 백인 성인 (50대) 심장-유래 섬유아세포들 (c50yACF), 및 흑인 성인 (60대) 심장-유래 섬유아세포들 (b60yACF)이 비교 분석되었다.

도 9는 autoMACS에 의한 분류에 의하여 수집된 CD106-양성 인간 섬유아세포들에서 CD106-CD90-양성 세포 비율 (%)을 보여준다.

도 10은 하기를 보여준다: (A) CD106-양성 인간 섬유아세포들에서 Oct3/4-양성 세포 비율 (%)을 보여준다; (B) CD106-양성 인간 섬유아세포들에서 나노그-양성 세포 비율 (%); (C) CD106-양성 인간 섬유아세포들에서 Sox2-양성 세포 비율 (%). $N = 3$. N.S. = 중요하지 않음(not significant).

도 11은 CD106-양성 인간 섬유아세포들의 세포 물성들을 보여준다. 기질 세포/중간엽 줄기 세포 마커 (비멘틴), 상피 세포 마커 (사이토케라틴), 및 심근세포 겹 결합 마커 (코넥신 43)의 국소화가 평가되었다.

도 12는 CD106-양성 인간 섬유아세포들에서 TRO-1-양성 세포 비율 (%)을 보여준다. FSC-A 및 SSC-A로 세포 영역의 인식 후 CD106 (VioBlue-A) 및 CD90 (PE-A)에 대하여 이중-양성인 세포 군집에서 STRO-1 (FITC-A)-양성 세포들의 비율 (%)이 평가되었다. 음성 대조군으로서, 상기 항체들에 대한 이소타입 대조군들이 사용되었다.

도 13은 래트 만성 심부전 모델에서 심장 기능들에 대한 CD106-양성 인간 섬유아세포들 (2.0×10^6 세포들/ 50μ L)의 투여의 효과를 보여준다. (A)는 좌심실 박출 분율 ($LVEF = (LVIDd3 - LVIDs3) / LVIDd3$)을 나타낸다; (B)는 좌심실 분획 단축 ($LVFS = (LVIDd - LVIDs) \times 100 / LVIDd$)을 나타낸다; (C)는 좌심실 확장말기 용적 ($LVEDV$)을 나타낸다; 그리고 (D)는 좌심실 수축기말 용적 ($LVESV$)을 나타낸다. $N = 4$.

도 14는 래트 만성 심부전 모델에서 심장 기능들의 회복에 다른 투여량들로 하는 CD106-양성 인간 섬유아세포들의 투여의 효과를 보여준다. (A)는 좌심실 박출 분율 ($LVEF = (LVIDd3 - LVIDs3) / LVIDd3$)을 나타낸다; (B)는 좌심실 분획 단축 ($LVFS = (LVIDd - LVIDs) \times 100 / LVIDd$)을 나타낸다; (C)는 좌심실 확장말기 용적 ($LVEDV$)을 나타낸다; 그리고 (D)는 좌심실 수축기말 용적 ($LVESV$)을 나타낸다. $N = 4$. N.S. = 중요하지 않음(not significant).

도 15는 돼지 만성 심부전 모델에서 심장 기능들의 평가의 결과들을 보여주며, 그 평가는 CD106-양성 인간 섬유아세포들의 투여 전 날 수행되었다 (도면 대체 사진들).

도 16은 돼지 만성 심부전 모델에서 심장 기능들의 평가의 결과들을 보여주며, 그 평가는 CD106-양성 인간 섬유아세포들의 투여 4주 후에 수행되었다 (도면 대체 사진들).

도 17은 돼지 만성 심부전 모델에서 심장 기능들의 평가의 결과들을 보여주며, 그 평가는 CD106-양성 인간 섬유아세포들의 투여 8주 후에 수행되었다 (도면 대체 사진들).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명은 특정 예들의 방식으로 하기에서 상세히 기재된다. 그러나 본 발명은 기재된 특정 예들에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 한 예는 심장 질환의 치료를 위한 주사가 가능한 조성물로, 그 조성물은 섬유아세포들을 포함하고 이때 섬유아세포들은 CD106-양성 (이하 CD106+으로도 부른다) 섬유아세포들을 포함한다.
- [0035] 섬유아세포들은 결국 섬유아세포들 또는 근섬유모세포들(myofibroblasts)이 되는 임의의 세포들을 포함한다. 즉, 본 발명의 섬유아세포들의 범위는 분화 또는 성숙의 과정에 있는 그리고 세포들이 현 시점에서는 섬유아세포들 또는 근섬유모세포들로 확인될 수 없는 경우에도 결국은 섬유아세포들 또는 근섬유모세포들이 되는 세포들을 포함한다. 본 발명의 섬유아세포들의 범위는 그것들이 섬유아세포들의 그것들과 유사한 기능을 갖는 CD106+ 세포들인 한, 간질(stromal) 세포들, 전구(precursor) 세포들, 줄기 세포들 및 근모세포들(myoblasts)과 같은, 섬유아세포들로 불리지 않는 세포들 또한 포함한다.
- [0036] CD106+ 섬유아세포들은 섬유아세포들 및 중간엽 줄기 세포들의 세포골격 마커인 비멘틴(vimentin)에 양성이고, 중간엽(mesenchymal) 줄기(stem) 세포들(cells)(MSCs)의 가장 잘 알려진 분자 마커들 중 하나인, STRO-1에 음성이라는 특징이 있다.
- [0037] 섬유아세포들의 기원은 제한되지 않으며, 이들 세포들은 배아(embryonic) 줄기 세포들 (ES 세포들), 유도(induced) 만능(pluripotent) 줄기 세포들 (iPS 세포들), 또는 뮤즈(Muse) 세포들과 같은 다분화(multipotent) 줄기 세포들 또는 만능 줄기 세포들의, 또는 중간엽 줄기 세포들과 같은 성체 줄기 세포들의, 분화에 의하여 수득될 수 있다. (인간을 포함하는) 동물로부터 수집되는 일차(primary) 세포들이 사용될 수 있고, 또는 확립(established) 세포주들이 사용될 수 있다. 심장-유래 섬유아세포들이 바람직하게는 사용되고, 심장의막(epicardium)-유래 섬유아세포들이 더 바람직하게 사용된다.
- [0038] 특히, 인간으로부터 유래된 섬유아세포들이 사용될 때, 심장 질환에 높은 치료적 효과가 주사에 의하여 수득될 수 있다. 인간으로부터 유래된 섬유아세포들은 마우스 등에 비하여 CD106+ 섬유아세포들의 훨씬 더 낮은 비율을 보인다. 본 발명자들에 의한 연구에 따라, 그 비율은 (세포 수의 면에서) 많아 봐야 약 9.1%이다. 그러므로, 본 발명은 또한 인간-유래 CD106+ 섬유아세포들의 비율이 뒤에 언급된 스크리닝 단계 및/또는 등에 의하여 증가되는 인간-유래 섬유아세포 군집(population)을 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 또다른 측면은 총 인간-유래 섬유아세포들에서 인간-유래 CD106+ 섬유아세포들의 (세포 수의 면에서의) 비율이 10% 이상인 인간-유래 섬유아세포 군집일 수 있다. 총 섬유아세포들에서 CD106+ 섬유아세포들의 (세포 수의 면에서) 그 비율은 15% 이상일 수 있고, 20% 이상일 수 있고, 25% 이상일 수 있고, 30% 이상일 수 있고, 40% 이상일 수 있고, 50% 이상일 수 있고, 60% 이상일 수 있고, 70% 이상일 수 있고, 80% 이상일 수 있고, 90% 이상일 수 있고, 또는 100%일 수 있다. 여기에서 인간-유래 섬유아세포 군집은 인간 심장-유래 섬유아세포 군집일 수 있고, 인간 성체 심장-유래 섬유아세포들일 수 있고, 또는 인간 태아 심장-유래 섬유아세포 군집일 수 있다.
- [0039] CD106+으로 알려진 세포들을 선택함으로써 세포 분류의 과정이 생략될 수 있다.
- [0040] VCAM-1으로도 알려진 CD106은 혈관 내피 세포들 등에서 발현되는 세포 부착 분자로 알려진 단백질이다. 본 예에서, CD106+, 즉, VCAM-1-양성 (VCAM-1+) 섬유아세포들이 심장 질환의 치료를 위한 주사가 가능한 조성물로서 사용된다.
- [0041] 주사가 가능한 조성물로서 사용되는 CD106+ 섬유아세포들은 괴사성 심근 조직 영역으로 직접적인 주사를 통하여 심장 질환의 치료를 가능하게 한다. 나아가, 세포들은 괴사성 심근 조직 영역의 인근으로 주사될 수 있고, 관상 동맥 내로 주입될 수 있고, 또는 정맥, 동맥, 림프절 또는 림프관 내에 주입될 수 있다. 관상 동맥 내로의 주입, 또는 정맥, 동맥 또는 림프관 내로의 주입은 관(vessel) 내로의 주사에 의하여 또는 카테터를 통한 주입에 의하여 수행될 수 있고, 또는 또다른 공지의 방법이 그것을 위하여 사용될 수 있다.
- [0042] 주사의 방법은 제한되지 않으며, 바늘 주사와 같은 알려진 주사 방법 또는 바늘을 사용하지 않는 주사가 여기에 적용될 수 있다. 카테터를 이용한 주입 방법 또한 제한되지 않으며, 알려진 방법이 여기에 적용될 수 있다.
- [0043] 주사가 가능한 조성물은 또한 조성물이 효과적인 요소로 CD106+ 섬유아세포들의 치료적으로 효과적 양을 포함하는

한 또다른 요소 또는 또다른 종류의 섬유아세포들을 포함할 수 있다. 또다른 종류의 섬유아세포들이 포함되는 경우들에서, CD106+ 섬유아세포들의 세포 수의 면에서 주사가능한 조성물 내 포함되는 섬유아세포들의 총 양에 대한 비율은 0.03% 이상일 수 있고, 0.1% 이상일 수 있고, 1% 이상일 수 있고, 2% 이상일 수 있고, 4% 이상일 수 있고, 5% 이상일 수 있고, 10% 이상일 수 있고, 20% 이상일 수 있고, 30% 이상일 수 있고, 40% 이상일 수 있고, 50% 이상일 수 있고, 60% 이상일 수 있고, 70% 이상일 수 있고, 80% 이상일 수 있고, 90% 이상일 수 있고, 95% 이상일 수 있고, 98% 이상일 수 있고, 또는 99% 이상일 수 있다.

[0044] 주사가능한 조성물 내 포함된 CD106+ 섬유아세포들은 다른 세포들, 예컨대, 심근세포들(cardiomyocytes)과의 공-배양에 의하여 제주되는 세포들일 수 있다.

[0045] 본 예에서 심장 질환의 예들은 심부전(heart failure), 허혈성 심장 질환들, 심근경색증(myocardial infarction), 심근병증(cardiomyopathy), 심근염(myocarditis), 비대심근병증(hypertrophic cardiomyopathy), 및 확장심근병증(dilated cardiomyopathy)과 같은, 심근 조직의 장애, 결함, 기능장애 등에 의하여 야기되는 질환들을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0046] 주사가능한 조성물 내 포함되는 CD106+ 섬유아세포들은 CD90-양성 (CD90+)일 수 있다. 즉, 주사가능한 조성물은 CD90-양성 섬유아세포들을 포함할 수 있다. Thy-1로도 불리는 CD90은 당 사슬이 풍부한 글라이코실(glycosyl)-포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol) (GPI)-연결된 분자이다. CD90은 신경 조직들, 결합 조직들 등의 여러가지 간질 세포주들에서 발현되나 심근세포들에서는 발현되지 않는다. 이와 같이, 용어 "CD90+ 섬유아세포들"에 의하여 심근세포들이 없는 것이 의미된다. 여기에서 사용된 대로 용어 "심근세포들이 없는 CD90+ 섬유아세포들"에 대하여, 일정양의 심근세포들의 존재가 허용가능하다. 심근세포들의 양은 주사가능한 조성물 내 포함되는 총 세포들에 대하여 세포 수의 면에서 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.1% 이하, 또는 0.01% 이하일 수 있다.

[0047] CD106+ 섬유아세포들 내 CD90+ 섬유아세포들의 (세포 수의 면에서의) 비율은 30% 이상일 수 있고, 40% 이상일 수 있고, 50% 이상일 수 있고, 60% 이상일 수 있고, 70% 이상일 수 있고, 80% 이상일 수 있고, 90% 이상일 수 있고, 95% 이상일 수 있고, 98% 이상일 수 있고, 또는 100%일 수 있다.

[0048] 본 발명의 특정 예에서, CD106+ CD90+ 섬유아세포들을 포함하는 섬유아세포 군집이 제공될 수 있다. 섬유아세포 군집에서, 세포 수의 면에서 CD106+ CD90+ 섬유아세포들의 비율은 8.2% 초과일 수 있고, 8.5% 이상일 수 있고, 9% 이상일 수 있고, 10% 이상일 수 있고, 15% 이상일 수 있고, 20% 이상일 수 있고, 30% 이상일 수 있고, 40% 이상일 수 있고, 50% 이상일 수 있고, 60% 이상일 수 있고, 70% 이상일 수 있고, 80% 이상일 수 있고, 90% 이상일 수 있고, 95% 이상일 수 있고, 97% 이상일 수 있고, 98% 이상일 수 있고, 99% 이상일 수 있고, 또는 100%일 수 있다. 이들 방식들에서, CD106+ CD90+ 섬유아세포들은 예컨대, 인간으로부터 유래될 수 있다. 이들 예들에서, CD106+ CD90+ 섬유아세포들은 예컨대, 심장-유래 섬유아세포들일 수 있다. 이들 예들에서, CD106+ CD90+ 섬유아세포들은 예컨대, 인간 심장-유래 섬유아세포들일 수 있다. CD106+ CD90+ 섬유아세포들은 예컨대, 세포 분별장치 등을 이용하여 조직으로부터 CD106+ CD90+ 세포들을 모아 수득될 수 있다. 이들 방식들에서, 섬유아세포들은 인간 태아로부터 수집된 섬유아세포들일 수 있다.

[0049] CD106+ CD90+ 섬유아세포들은 기관들의 항상성 유지를 위하여 사이토카인 등의 분비에 의하여 염증 반응을 통제하는 것이 가능하다. 분비된 사이토카인들, 케모카인들 등은 심장 근육 조직들의 재생에 적합하게 미세환경들을 형성하고, 그리고 심근세포들의 성장, 심근세포들의 박동의 통제, 및/또는 혈관신생을 촉진하여, 이로써 심장 기능들의 개선을 가능하게 한다. 나아가, CD106+ CD90+ 섬유아세포들은 섬유화의 진행을 억제하는 것이 가능하다.

[0050] 따라서, 본 기재는 CD106+ CD90+ 섬유아세포들 또는 세포들의 정제된 산물을 포함하는 심장 염증 반응 통제제 (또는 심장 염증 억제제)의 발명을 포함할 수 있다. 본 기재는 또한 심장 세포들을 위한 사이토카인 분비 촉진제의 발명을 포함할 수 있고, 이 제제는 CD106+ CD90+ 섬유아세포들 또는 이들 세포들의 배양 상청액을 포함하거나; 또는 세포 용해물 또는 CD106+ CD90+ 섬유아세포들의 배양 상청액을 포함하는, 또는 이들 세포들의 정제된 산물을 포함하는, 사이토카인들 분비 통제제이다. 본 기재는 또한 심장 조직들을 위한 미세환경의 발명을 포함하며, 이 제제는 CD106+ CD90+ 섬유아세포들을 포함한다. 본 기재는 또한 CD106+ CD90+ 섬유아세포들을 포함하는, 심근세포 성장 제제, 심근세포들에 대한 박동 통제 제제, 또는 심근세포들의 혈관 신생 또는 성숙 촉진을 위한 제제의 발명을 포함할 수 있다.

[0051] 다시 말해서, 심장 염증 반응을 통제하는 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 괴사성 심장 조직 영역 또는 그 인

근 내로 CD106+ CD90+ 섬유아세포들을 주사하는 단계, 및/또는 관상 동맥 내로 이들 세포들을 주입하는 단계를 포함한다. 나아가, 사이토카인들의 분비를 통제하는 방법 또는 사이토카인들의 분비를 촉진하는 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 피사성 심장 조직 영역 또는 그 인근 내로 CD106+ CD90+ 섬유아세포들을 주사하는 단계 및/또는 관상 동맥 내로 이들 세포들을 주입하는 단계를 포함한다. 나아가, 심장 조직에서 미세환경을 형성하는 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 피사성 심장 조직 영역 또는 그 인근 내로 CD106+ CD90+ 섬유아세포들을 주사하는 단계 및/또는 관상 동맥 내로 이들 세포들을 주입하는 단계를 포함한다.

- [0052] 사이토카인들은 면역력 또는 염증에 관여되는 신호 전달(transduction)을 담당하는 단백질들로, 알려진 사이토카인들을 포함한다.
- [0053] 주사가능한 조성물 내 포함되는 CD106+ 섬유아세포들은 코넥신 43-양성 (connexin 43+) 섬유아세포들일 수 있다. 즉, 주사가능한 조성물은 코넥신 43-양성 섬유아세포들을 포함할 수 있다.
- [0054] 코넥신 43은 동맥경화 플라크(plaques)들과 함께 혈관벽 상에 발견되는 것으로, 그리고 심근세포의 갭(gap) 결합(junction)으로서, 인접 세포에 결합하여 심장의 전기 자극의 전파에 관여하는 것으로 알려진 막관통 단백질이다. 본 발명자들은 코넥신 43 양성(positivity)이 심근 조직에서 전기적 신호들의 전달을 가능하게 하여, 주사가능한 조성물의 치료적 효과의 개선을 이끈다고 생각한다.
- [0055] CD106+ 섬유아세포들에서 코넥신 43+ 섬유아세포들의 (세포 수 면에서의) 비율은 30% 이상일 수 있고, 40% 이상일 수 있고, 50% 이상일 수 있고, 60% 이상일 수 있고, 70% 이상일 수 있고, 80% 이상일 수 있고, 90% 이상일 수 있고, 95% 이상일 수 있고, 98% 이상일 수 있고, 또는 100%일 수 있다.
- [0056] 주사가능한 조성물은 주사가능한 조성물로서 생리학적으로 허용가능한 다른 성분들을 포함할 수 있다. 이러한 다른 성분들의 예들은 생리식염수, 세포 보존 액들, 세포 배양 배지, 하이드로겔들, 세포외 매트릭스들 및 냉동 보존액을 포함한다.
- [0057]
- [0058] 주사가능한 조성물에 포함되는 CD106+ 섬유아세포들의 비율은, 예컨대 주사 또는 주입의 방식에 따라 적절히 정해질 수 있어, 치료적으로 효과적인 양의 CD106+ 섬유아세포들이 효과적인 성분으로서 포함된다. 보통, 세포 수의 면에서, CD106+ 섬유아세포들의 주사가능한 조성물 내 세포들의 총 양에 대한 비율은 0.03% 이상일 수 있고, 1% 이상일 수 있고, 5% 이상일 수 있고, 10% 이상일 수 있고, 25% 이상일 수 있고, 50% 이상일 수 있고, 90% 이상일 수 있고, 95% 이상일 수 있고, 98% 이상일 수 있고, 또는 100%일 수 있다.
- [0059] 주사가능한 조성물 내 포함되는 CD106+ 섬유아세포들의 수는, 예컨대, 1.0×10^2 세포들/mL 이상일 수 있고, 1.0×10^3 세포들/mL 이상일 수 있고, 1.0×10^4 세포들/mL 이상일 수 있고, 1.0×10^5 세포들/mL 이상일 수 있고, 5.0×10^6 세포들/mL 이상일 수 있고, 또는 1.0×10^7 세포들/mL 이상일 수 있다. 주사가능한 조성물에 포함되는 CD106+ CD90+ 섬유아세포들의 수는, 예컨대, 1.0×10^2 세포들/mL 이상일 수 있고, 1.0×10^3 세포들/mL 이상일 수 있고, 1.0×10^4 세포들/mL 이상일 수 있고, 1.0×10^5 세포들/mL 이상일 수 있고, 5.0×10^6 세포들/mL 이상일 수 있고, 또는 1.0×10^7 세포들/mL 이상일 수 있다. 주사가능한 조성물에 포함되는 CD106+ 섬유아세포들의 수는 심장 질환의 상태들에 따라 더 증가 또는 감소될 수 있다.
- [0060]
- [0061] 주사가능한 조성물에 포함되는 섬유아세포들을 생산하는 방법은 하기에 기재된다. 섬유아세포들을 생산하는 방법을 위하여, 본 발명자들에 의한 전의 보고서를 참조할 수 있으며 (WO 2016/006262), 그 방법은 이 보고서에 따라 수행될 수 있다.
- [0062] (섬유아세포들을 제공하는 단계)
- [0063] 섬유아세포들을 제공하는 단계에서, 섬유아세포들의 기원은 하기 언급된 것에 제한되지 않는다. 자가 (autologous) 이식(transplantation)에 기초한 예가 사용될 수 있고, 이러한 경우들에서, 심장 질환을 가진 환자의 심장 조직으로부터 분리된 심장 섬유아세포들, 또는 환자의 성체(체세포성(somatic)) 줄기 세포들의 분화 후 분리된 심장 섬유아세포들이 제공된다. 섬유아세포들은 iPS 세포들의 분화 후 모아진 섬유아세포들일 수 있다. 나아가, 동종이계(allogeneic) 이식에 기초한 예가 사용될 수 있으며, 이러한 경우들에서, 심장 세포들을 제공하는 공여자(donor)로부터 유래된 심장 조직으로부터 분리된, 또는 동물 등을 이용하여 제조된 심장 조직으

로부터 분리된 심장 섬유아세포들; 또는 공여자의 성체 (체세포성) 줄기 세포들의 분화 후 분리된 심장 섬유아 세포들;이 제공된다. 섬유아세포들은 공여자로부터 유래된 iPS 세포들의 분화 후 모아진 섬유아세포들일 수 있다.

[0064] (섬유아세포들의 분리 단계)

[0065] 제공된 섬유아세포들은 보통 배양을 위한 분리를 달성하기 위하여 디스파아제(dispace) 또는 콜라게나아제(collagenase)와 같은 효소를 이용하여 치료에 가해질 수 있다. 분리는 디스파아제 또는 콜라게나아제와 같은 효소로, 또는 일차 배양 전 요구되는 분리를 가능하게 하는 한 기계적 처리와 같은 또다른 처리에 의하여 수행될 수 있다.

[0066] (CD90-양성 섬유아세포들의 스크리닝 단계)

[0067] 섬유아세포들은 CD90+ 섬유아세포들의 비율을 증가시키기 위하여 스크리닝될 수 있다. 이 스크리닝에 의하여, 심근세포들이 섬유아세포들로부터 제거될 수 있다. 스크리닝의 예들은 항-CD90 항체를 이용한, 패닝법(panning method), 유동세포 분석법, 자성 비드 방법 및 친화 칼럼 방법과 같은 세포 분류 방법들을 포함한다. 더 특이적으로, 예컨대, 자성(magnetic) 세포(cell) 분류(sorting) (MACS) 또는 형광(fluorescence)-활성(activated) 세포(cell) 분류(sorting) (FACS)가 사용될 수 있다. 항-CD90 항체는 상업적으로 이용가능한 제품일 수 있고, 또는 알려진 방법에 의하여 제조될 수 있다. 단일클론 항체 또는 다클론(polyclonal) 항체가 사용될 수 있으나, 특이성의 관점에서, 단일클론 항체가 바람직하게 사용된다. 대체하여, 스크리닝은 CD90-음성 섬유아세포들의 제거를 위하여 약물 저항성 유전자의 도입에 의하여 수행될 수 있다. 대체하여, 형광 단백질-코딩하는 유전자가 도입될 수 있고, 그 다음에 형광 단백질-양성 세포들이 형광-활성 세포 분류 (FACS) 등에 의하여 분리될 수 있다.

[0068] (부착성을 갖는 세포들의 스크리닝 단계)

[0069] 섬유아세포들의 스크리닝은 부착성의 차이의 이용에 의하여 수행될 수 있다. CD90-양성 섬유아세포들이 (젤라틴 등으로 코팅에 가해지지 않아) 코팅되지 않은 배양 접시에 그것들의 부착을 가능하게 하는 물질들을 갖기 때문에, 섬유아세포들의 순도는 이 단계에 의해서 증가될 수 있다. 더 특이적으로, 섬유아세포들은 코팅되지 않은 배양 접시 상에 위치되고, 배양은, 예컨대, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 8 시간, 12 시간, 또는 24 시간 동안 수행된다. 배양 접시에 부착된 섬유아세포들을 수집함으로써, 스크리닝이 수행될 수 있다.

[0070] (CD106+ 섬유아세포들의 스크리닝 단계)

[0071] 주사가능한 조성물에 CD106+ 섬유아세포들의 포함을 위하여, 섬유아세포들이 보통 CD106+ 섬유아세포들의 스크리닝 단계에 가해진다. CD106+ 섬유아세포들이 이러한 단계를 수행하지 않고 수득될 수 있는 경우들에서, 이 단계는 생략될 수 있다. CD106+ 섬유아세포들의 스크리닝의 예들은 항-CD106 항체 (항-VCAM-1 항체)를 이용한, 패닝법, 유동세포 분석법, 자성 비드 방법 및 친화 칼럼 방법과 같은 세포 분류 방법들을 포함한다. 더 특이적으로, 예컨대, 자성 세포 분류 (MACS) 또는 형광-활성 세포 분류 (FACS)가 사용될 수 있다. 항-CD106 항체는 상업적으로 이용가능한 제품일 수 있고, 또는 알려진 방법에 의하여 제조될 수 있다. 대체하여, 스크리닝은 CD106-음성 섬유아세포들의 제거를 위한 약물 저항성 유전자의 도입에 의하여 수행될 수 있다. 대체하여, 형광 단백질-코딩하는 유전자가 도입될 수 있고, 그 다음에 형광 단백질-양성 세포들이 형광-활성 세포 분류 (FACS) 등에 의하여 분리될 수 있다. 단일클론 항체 또는 다클론 항체가 사용될 수 있으나, 특이성의 관점에서 보면, 단일클론 항체가 바람직하게 사용된다. 대체하여, 실시간 PCR, 차세대(next-generation) 시퀀싱(sequencing), 또는 인 시츄 혼성화와 같은 방법이 세포들에서 CD106 유전자의 발현을 확정하기 위하여 사용될 수 있고, 그 다음에 CD106 유전자-발현 그룹이 분리될 수 있다.

[0072] (배양 단계)

[0073] 섬유아세포들이 예컨대, 원하는 세포 수의 달성 및/또는 세포들이 원하는 기능을 갖는 것을 가능하게 하는 목적을 위하여 배양 단계에 가해질 수 있다. 배양 조건들은 제한되지 않으며, 배양은 알려진 세포 배양 방법에 의하여 수행될 수 있다.

[0074] 배양에 사용되는 배양 배지는 예컨대, 배양되는 세포들의 종류에 따라 적절히 정해질 수 있다. 사용될 수 있는 배양 배지의 예들은 DMEM, α -MEM, HFDM-1(+), 및 RPMI-1640을 포함한다. FCS 및 FBS와 같은 영양학적 성분들; 사이토카인들, 항생물질; 등이 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0075] 배양 기간의 일(day) 수는 예컨대, 원하는 세포 수를 달성하는, 및/또는 세포들이 원하는 기능을 갖도록 하는

목적에 의하여 적절히 정해질 수 있다. 배양 기간의 예들은 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일, 10 일, 2 주, 1 달, 2 달, 3 달, 및 6 달과 같은 기간들을 포함한다.

[0076] 배양 온도는 배양되는 세포들의 종류에 따라 적절히 정해질 수 있다. 배양 온도는 예컨대, 10℃ 이상, 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 또는 30℃ 이상일 수 있고, 그리고 예컨대, 60℃ 이하, 55℃ 이하, 50℃ 이하, 45℃ 이하, 또는 40℃ 이하일 수 있다. 배양 단계는 복수 회 수행될 수 있다. 예컨대, 배양은 원하는 섬유아세포들의 순도가 스크리닝에 의하여 증가될 때마다 수행될 수 있다.

[0077] (수집 단계)

[0078] 배양된 섬유아세포들은 수집 단계에 의하여 수집된다. 수집 단계에서, 세포들은 트립신과 같은 프로테아제들을 이용하여 떼어지고, 그 다음에 수집될 수 있다. 대체하여, 온도-반응성 배양 접시가 사용될 수 있고, 세포들은 온도를 변화시킴으로써 떼어지고, 뒤이어 세포들의 수집이 이어질 수 있다.

[0079] 본 발명의 또다른 예에서, 치료를 위하여 섬유아세포들을 생산하는 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 상기 전술된 단계들 중, CD106+ 섬유아세포들의 스크리닝 단계를 포함한다.

[0080] 나아가, 치료를 위한 섬유아세포들의 생산 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 상기 전술된 단계들 중, CD106+ 섬유아세포들의 스크리닝 단계 및 CD90+ 섬유아세포들의 스크리닝 단계를 포함한다.

[0081] 나아가, 섬유아세포들의 생산 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 상기 전술된 단계들 하나, 또는 중 둘 이상의 임의적 조합을 포함한다.

[0082] 본 발명의 또다른 예에서, 심장 질환의 치료 방법이 제공될 수 있고, 이 방법은 괴사성 심장 조직 영역 또는 그 인근 내로, 및/또는 관상 동맥, 또는 정맥, 동맥, 림프관, 또는 림프관 내로 섬유아세포들을 포함하는 주사가 가능한 조성물의 주입의 수행을 포함하고, 이때 섬유아세포들은 CD106+ 섬유아세포들을 포함한다.

[0083] 나아가, 주사가 가능한 조성물로서 섬유아세포들의 용도가 제공될 수 있고, 이때 섬유아세포들은 CD106+ 섬유아세포들을 포함한다.

[0084] 또다른 예에서, CD106+ 섬유아세포들을 포함하는, 평면의 또는 삼차원 세포 조직이 제공될 수 있다. CD106+ 섬유아세포들이 심근세포들과 같은 또다른 종류의 세포들과의 공-배양 후 평면의 또는 삼차원 세포 조직으로 형성될 수 있고, CD106+ 섬유아세포들은 공-배양 없이도 평면의 또는 삼차원 세포 조직으로서 효과적으로 기능할 수 있다. 평면의 또는 삼차원 세포 조직의 예들은 3D 프린터에 의하여 형성된 세포 시트들; 세포 섬유들; 및 세포 조직들을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0085] 실시예들

[0086] 본 발명은 실시예들의 방식으로 더 자세히 하기에 기재된다. 그러나, 본 발명의 범위는 이로써 제한되지 않는다.

[0087] [CD106+ 마우스 섬유아세포들의 투여에 의한 심장 기능들의 개선]

[0088] <동물들 및 시약들>

[0089] 야생형 C57BL/6 마우스들 및 야생형 Slc: SD 래트들(rats)이 일본 SLC Inc. (Shizuoka, Japan)으로부터 구입되었다.

[0090] 하기 항체들이 면역형광 염색 및 형광-활성 세포 분류(FACS)를 위하여 사용되었다: 마우스 단일클론 항-CD106 (VCAM-1)-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 토끼 다클론 항-코넥신 43 (Cell signaling technology, MA), 마우스 단일클론 항-비멘틴 (Abcam, Cambridge, UK), 및 Hoechst 33258 용액 (St. Louis, MI).

[0091] 이차 항체가 Jackson Immuno Reserch Laboratories (West Grove, PA)로부터 구입되었다.

[0092] <섬유아세포들 및 심근세포들>

[0093] 마우스 심장 섬유아세포들이 이전의 보고서(Matsuura K, et al., Biomaterials. 2011; 32:7355-7362)에 따라 야생형 C57BL/6 마우스 (neonate, 1일 연령)으로부터 획득되었다. 획득된 세포들은 10-cm 배양 접시에서 고-글루코스 DMEM + 10% FBS에서 배양되었다. 배양 시작 3일 내지 5일 후, 세포들은 0.05% 트립신/EDTA으로 떼어지고, 그 다음에 또다른 10-cm 배양 접시에서 계대배양되었다.

- [0094] 마우스 배아 줄기 세포들 (ES 세포들)로부터 유래된 심근세포들 (Cor.AT)이 Axiogenesis AG (Cologne, Germany)로부터 구입되었다. 심근세포들로의 분화, 및 세포들의 정제는 지시들에 따라 수행되었다.
- [0095] <CD106+ 마우스 섬유아세포들의 형광-활성 세포 분류 (FACS)>
- [0096] 마우스 심장 섬유아세포들 (2×10^7 세포들/실험)이 마우스 항-CD106 (VCAM-1)-PE 항체로 염색되었다. 염색은 지시를 따라 수행되었다. CD106+ 섬유아세포들은 S3e 세포 분류기 (Bio-Rad, PA)에 의하여 분리되었다.
- [0097] <면역형광 염색>
- [0098] 세포들은 4% 파라포름알데하이드로 고정되었고, 그 다음에 그 전의 보고서 (Matsuura K, et al., Biomaterials. 2011; 32:7355-7362)에 따라 면역형광 염색에 가해졌다. 염색된 샘플은 IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 및 IN Cell Developer Toolbox 1.9.2 (GE Healthcare)을 이용하여 분석되었다.
- [0099] <외과적 치료 절차>
- [0100] 래트 심부전이 30분 동안 흡입 마취 하 좌전하행(left anterior descending) 관상 동맥(coronary artery) (LAD) 를 막고, 그 다음에 혈류의 재관류를 가능하게 함으로써 유도되었다. 더 특이적으로, 먼저, 11일 내지 12 주령의 수컷 Slc: SD 래트들이 제공되었다 (369.0-506.5 g, Japan SLC Inc., Shizuoka). 0.15 mg/kg 메데토미딘(medetomidine) 염산염(hydrochloride), 2 mg/kg 미다졸람(midazolam), 및 2.5 mg/kg 부토르판놀(butorphanol) 타르타르산염(tartrate)을 포함하는 혼합물이 제공되었고, 그 다음에 생리식염수로 희석되었다. 그 결과인 10 mL/kg 부피의 희석물이 마취를 위하여 각 래트에게 복강내로 투여되었고, 그 다음에 가슴 주변의 털을 깎아 제거하였다. 털 제거 후, 기관내 튜브가 경구로 삽관되었고, 작은 동물들을 위한 인공호흡기 (모델 SN-480-7×2T, Shinano Manufacturing Co., Ltd.)를 이용하여 인공 호흡이 수행되었다 (일회 호흡량: 2.0 내지 2.5 mL/박동, 호흡율: 75 박동/분.). 마취는 흡입 마취 장치 (model KN-1071, Natsume Seisakusho Co., Ltd.)를 이용하여 2% 이소플루란(isoflurane)으로 유지되었고 래트는 양와위 또는 측와위로 고정되었다.
- [0101] 절개 부위는 이소다인(Isodine) 용액으로 살균되었고, 그 다음에 리도카인이 통증 완화를 위하여 분무되었다. 심장은 가슴의 측면에서 개흉에 의하여 노출되었고 아트로핀(atropine) 황산염(sulfate)(0.02 mg/kg)이 부정맥 방지를 위하여 필요 시 근육 내로 투여되었다. 비외상성 바늘 (6-0 VICRYL) (Johnson & Johnson, NJ)을 이용하여, 좌전하행 관상 동맥 (LAD)이 30분 동안 막혔다. 심전도의 모니터링에 의하여, 폐색(심근허혈의 발생)이 존재 또는 부존재가 심장 근육의 백화 (시각적 관찰) 및 ST 전위(potential)의 상승에 기초하여 조사되었다. 심실 세동(ventricular fibrillation) (VF)이 나타나는 경우들에서, 소생 (링 겹자를 사용하여 심장의 직접적인 자극)이 심실세동을 종료하기 위하여 수행되었다. 폐색 30분 후 혈류의 재관류를 가능하게 함으로써, 국소빈혈-재관류 모델이 준비되었다.
- [0102] 재관류 후, 심근 내 주입이 수행되었다. 가슴이 그 다음에 닫히고, 비외상성 바늘 (3-0 VICRYL) (Johnson & Johnson, NJ)로 봉합되고, 뒤이어 이소다인 용액으로 봉합 부위의 살균이 이어졌다.
- [0103] 래트들은 하기 4 개의 치료 군들로 나뉘었다.
- [0104] (S1) CD106+ 마우스 섬유아세포들 및 마우스 심근세포들 (4×10^5 섬유아세포들 및 1.6×10^6 심근세포들을 포함하는 10% 신생아 송아지 혈청(New Born Calf Serum) (NBCS) + 고-글루코스 DMEM 50 μ L)의 주입
- [0105] (S2) CD106+ 마우스 섬유아세포들 (2×10^6 섬유아세포들을 포함하는 10% NBCS + 고-글루코스 DMEM 50 μ L)의 주입
- [0106] (S3) 외과적 치료 단독에 가해진 그룹
- [0107] (S4) 외과적 치료가 없는 그룹
- [0108] 세포들의 주입은 손상된 영역의 주변에서 두 위치들에서 수행되었다 (25 μ L/주입).
- [0109] <심장 기능들의 평가>
- [0110] 준비된 보텔 래트의 좌심실 기능들의 비교 평가를 위하여, 심장 기능들이 세포들 주입 0 주부터 10주까지 2주 간격으로 심장 초음파 검사 (심초음파검사)를 수행함으로써 모니터링되었다.

- [0111] 심장 초음파검사 (심초음파검사)는 초음파 진단 장치 (Nolus, Hitachi, Ltd.)을 이용하여 수행되었다. 더 특이적으로, 표면적인 선형 프로브가 래트의 가슴 상에 위치되었고, 측정이 좌심실(left ventricular) 확장말기(end-diastolic) 직경(diameter)(LVIDd), 좌심실 수축기말(end-systolic) 직경(diameter) (LVIDs), 좌심실 앞벽(anterior wall) 확장말기(end-diastolic) 두께(thickness) (LVAWd), 좌심실 자유(free) 벽(wall) 확장말기(end-diastolic) 두께(thickness) (LVPWd), 및 좌심실 자유(free) 벽(wall) 수축기말(end-systolic) 두께(thickness) (LVPWs)를 위한 M-모드에 의하여 수행되었다. 좌심실 확장말기 용적 (LVEDV) 및 좌심실 수축기말(end-systolic) 용적(volume) (LVESV)으로서, 에코(echo) 장치에 의하여 자동적으로 계산된 값들이 이용되었다. 나아가, 그려진 M-모드 이미지들에 기초하여, 좌심실 심외막 표면 (D2)의 이동이 측정되었다. 좌심실 확장가능성(extensibility)에 대한 지수 $EMI = (LVPWs - LVPWd)/(LVPWs \times D2)$ 이고 간략화된 지수 $DWS = (LVPWs - LVPWd)/LVPWs$ 이 계산되었다. 나아가, 하기 방정식들 및 도 4에 따라, 좌심실 분획(fractional) 단축(shortening) (FS) 및 좌심실 박출(ejection) 분율(fraction)(EF)이 계산되었다.
- [0112] 좌심실 분획 단축 (FS) = $(LVIDd - LVIDs)/LVIDd \times 100$
- [0113] 좌심실 박출 분율 (EF) = $(LVEDV - LVESV)/LVEDV \times 100$
- [0114] <조직학적 실험>
- [0115] 제거된 심장의 좌심실이 10% 버퍼된 포르말린 용액에서 함침에 의하여 고정되었다. 좌심실은 짧은 축 방향으로 나뉘어져 세 부분이 되어, 결찰 바로 아래 위치 및 심첨(cardiac apex) 사이의 긴 축 방향에서의 길이가 세 부분들로 동일하게 나뉘었다. 심장 근육의 각 부분이 하나의 파라핀 블록에 끼워져, 근원인(origin) 면(side)이 끼워진 면에 위치된다. 얇은 슬라이스들의 제조 후, Masson 트리크롬(trichrome) 염색이 수행되었다. Masson 트리크롬 염색 후 샘플들의 이미지들이 이미지 분석기 (general-purpose image processor "Win ROOF Version 5.5", Mitani Corporation)로 캡처되었고, 심근경색증 영역 (%)이 이미지 분석기에 의하여 세 부분들의 각각에 대하여 측정되었다.
- [0116] <통계 분석>
- [0117] 심장 기능들에 대한 평가 결과들은 평균 \pm 표준오차로 나타낸다. 모든 다른 데이터들은 평균 \pm 표준편차로 나타낸다. 셋 이상 그룹들 사이의 변화(variation) 차이(difference)는 분산(variance)의 일방 분석에 의하여 계산되었다. 그 뒤에, 세 그룹들 사이의 중요한 차이가 Tukey-Kramer Multiple Comparison Test에 의하여 계산되었다. 차이의 중요성은 p-값이 0.05보다 작을 때로 상정되었다. 모든 통계적 계산들은 Statcel 소프트웨어를 이용하여 수행되었다.
- [0118] <마우스 심장 섬유아세포들 사이의 VCAM-1 단백질의 국소화>
- [0119] 심근세포들의 성장 및 이동을 개선하는, CD106+ 섬유아세포들의 분리를 위하여, 마우스 심장 섬유아세포들에서 VCAM-1 단백질의 발현이 조사되었다 (도 1A). CD106+ 섬유아세포들의 영역이 음성 세포들의 제거를 위하여 엄격하게 선택되었다. 약 39.2%의 심장 섬유아세포들이 CD106+ 섬유아세포들이었다. 그 뒤에, CD106+ 섬유아세포들이 균일하게 장기간 동안 VCAM-1을 발현하는지 여부를 평가하기 위하여, CD106+ 섬유아세포들이 18 주까지 인 비트로에서 배양되어 VCAM-1 단백질의 발현을 평가하였다 (도 1B). 모든 CD106+ 섬유아세포들에서, VCAM-1 단백질의 높은 발현 수준들이 18 주 내내 유지되었다. 나아가, CD106+ 섬유아세포들은 코넥신 43, 즉, 심근의 전기적 네트워크 전달을 위한 갭 결합 단백질을 높게 발현시켰다 (도 1C). 이들 발견들에 기초하여, CD106+ 섬유아세포들이 VCAM-1 단백질의 발현을 유지하고, 심장의 전기적 흥분을 전파하는 능력을 가진다는 것이 이해될 수 있다.
- [0120] <심근경색 후 CD106+ 마우스 섬유아세포들에 의한 심장 기능들의 개선>
- [0121] 심초음파검사(echocardiography)에 따라, 주입 2주 내지 10주 후, S1 및 S2 그룹들은 S3 및 S4 그룹들에 비하여 좌심실 박출 분율 (EF) 및 좌심실 분획 단축 (FS)에서 개선을 보였다. 반면, S1 및 S2 그룹들 간에 EF 또는 FS에서의 중요한 차이는 없었다 (도 1A, 도 2B). 이와 같이, CD106+ 섬유아세포들의 투여가 심근경색증에 의하여 손상된 심장의 펌프 능력의 개선을 야기하였다는 것을 이해할 수 있었다. 심근세포들의 존재는 주사가 가능한 조성물의 구성에 중요하지 않았다.
- [0122] <CD106+ 마우스 섬유아세포들에 의한 콜라겐 섬유증 경색부의 개선>
- [0123] 주사 10주 후, 심장의 병적인 조직 표본이 준비되었고 Masson 트리크롬 염색이 되었다. 그 결과, S1 및 S2 그룹들의 콜라겐 섬유증 경색부들이 상당히 작은 것이 확인될 수 있었다 (도 3A). 나아가, 이미지 분석 소프트웨어

를 이용한 콜라겐 섬유증 경색의 영역(%)의 측정의 결과로서, 섬유증 영역이 S2에서 상당히 작게 발견되었다 (도 3B). 이와 같이, CD106+ 섬유아세포들의 투여가 심근경색증 등에 의하여 손상된 심장의 수축(systolic) 기능의 개선 뿐 아니라 콜라겐 섬유증의 상당한 억제도 야기하였다는 것이 이해될 수 있다. 심근세포들의 존재는 주사가 가능한 조성물의 조성에 중요하지 않았다.

[0124] 상기 실험들에 의하여, 허혈성 심장 질환의 효과적 치료를 위한 VCAM-1-양성 섬유아세포들의 중요성이 처음 입증되었고, CD106+ 섬유아세포들의 투여가 심장 질환의 치료에 있어 바람직한 결과를 만들 수 있다는 것을 이해할 수 있다. VCAM-1-양성 섬유아세포들의 투여는 허혈성 심장 질환의 효과적인 개선을 위한 치료에서 사용될 수 있다. 나아가, 심장 기능들의 주목할 만한 개선 및 콜라겐 섬유증의 주목할 만한 억제가 VCAM-1을 발현하는 심장 섬유아세포들의 투여의 결과로서 발견되었기 때문에, 투여가 다른 심장 질환들의 치료에도 또한 효과적이라는 것이 이해될 수 있었다.

[0125] [CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 심장 기능들의 개선]

[0126] 그 뒤에, 래트들에 CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 심장 기능들의 개선이 조사되었다.

[0127] <섬유아세포들 및 심근세포들>

[0128] Slc로부터: SD 태아 래트 (배아 20 일(day)), 심장이 수집되었고, 그것의 조직이 gentleMACS (Miltenyi Biotec)을 이용하여 균질화되었으며, 뒤이어 베이스 배양-물질 표면의 부착성 차이에 기초하여 래트 심장 섬유아세포들의 수집이 이어졌다. 수득된 세포들은 10-cm 배양 접시에서 10% NBCS으로 보충된 고-글루코스 DMEM에서 배양되었다. 배양 시작 삼 내지 오일 후, 세포들이 0.05% 트립신/EDTA로 떼어지고, 그 다음에 또다른 10-cm 배양 접시에서 계대배양되었다.

[0129] <세포 분류>

[0130] 세포들은 CD106 (VCAM-1)-비오틴 항체들, 래트 (Miltenyi Biotec)로 일차 면역염색에 가해졌고, 그 다음에 항-비오틴 마이크로비드들 (Miltenyi Biotec)로 면역염색에 가해졌다. 염색된 세포들로부터, CD106-양성 세포들 단독이 autoMACS (Miltenyi Biotec)에 의하여 수집되어 CD106+ 래트 섬유아세포들을 제공하였다.

[0131] <만성 심부전 래트 모델의 초음파심박동기 측정 및 제조>

[0132] 8주령의 수컷 누드 래트들 (F344/N Jcl-rnu/rnu)이 CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan)로부터 구입되었다. 환경 순응 1 주 후, 각 동물이 실험 동물들을 위한 흡입 마취 장치 (Soft Lander (Shin-ei Industries, Inc., Saitama, Japan))를 이용하여 2% 이소플루란으로 흡입 마취에 가해졌고(마취 아주버트: 웃음 가스:산소 = 7:3), 그 다음에 털이 깎였다. 그 직후, 기관 삽관이 수행되었고 0.5 내지 2% 이소플루란 (마취 아주버트; 웃음 가스: 산소 = 7:3) 흡입 마취 가스가 마취를 유지하기 위하여 인공호흡기 내로 직접 도입되었다. 인공적인 호흡 관리 하, 동물이 양와위로 고정되었고, 왼쪽 세 번째 갈비뼈 및 다섯 번째 갈비뼈 사이에서 둘 또는 세 개 갈비뼈들이 갈비 연골에서, 세로 절단에 의하여 개흉이 수행되었다. 견인기를 이용하여, 수술 부위가 확장되었고, 심장 막(pericardial membrane)이 심장을 노출하기 위하여 떼어졌다. 좌심방이 올려졌고, 실이 혈관들을 위한 비외상성인 약하게 굽은 등근 바늘 (6-0: Nescosuture)을 이용하여 좌심실에서 4 내지 5 mm의 길이를 통해 약 2 mm의 깊이로 통과되었다. 실의 양쪽 끝들이 서로 결합되었고, 폴리에틸렌 튜브(PESO, Becton Dickinson)로 제조된 올가미(snare)가 거기를 통과했다. 실이 동맥 클램프를 이용하여 조여져(올가미 방법) 30 분 동안 관상 동맥 국소 빈혈을 야기하였다. 그 후, 재관류가 수행되었다. 상태들이 안정된 후, 출혈의 부재가 확인되었고, 흉부 배액(chest drainage)이 수행되었고, 뒤이어 피부 및 근육층의 봉합이 이어졌다. 피부를 위하여, 표피 하 봉합이 수행되었다. 정상적인 봉합이 수행되었을 때, 봉합 제거는 모니터링된 수술 후 상태에 따라 수행되었다. 모델 제조 1주 후, 즉, 세포들의 투여 1일 전, 초음파심박동 기록기 측정이 초음파 이미지 진단 장치(Xario SSA-660A, Toshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japan)를 이용하여 수행되었다. 55% 이하의 좌심실 박출 분율(LVEF = (LVIDd3 - LVIDs3) / LVIDd3)을 가진 개체들이 만성 심부전 모델로 간주되었고, CD106+ 인간 섬유아세포 투여 실험에 가해졌다.

[0133] <만성 심부전 래트 모델에 CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여>

[0134] 투여 테스트 날, CD106+ 인간 섬유아세포들이 고-글루코스 DMEM + 10% NBCS으로 희석되었고, 살아 있는 세포 수의 면에서, 2.0×10^6 세포들/50 μ L의 세포 현탁액이 각 개체들에 투여되었다. 대조군으로, 50 μ L의 DMEM + 10% NBCS 단독이 투여되었다. 각 그룹은 N = 4로 제공되었다.

- [0135] 마취가 모델 제조에서와 동일한 방법으로 유지되는 동안, 총 양 50 μ L의 세포 현탁액이 인공적인 호흡 관리 하 경색 영역에서 두 군대에서 나뉘어 30-G 바늘로 카테터를 이용하여 동물에 투여되었다. 상태들이 안정된 후, 투여된 액체의 누수 또는 출혈이 없는 것이 확인되었고, 흉부 배액이 수행되었고, 뒤이어 근육층 및 피부의 봉합이 이어졌다. 피부를 위하여, 표피하 봉합이 수행되었다. 정상적인 봉합이 수행되었을 때, 봉합 제거는 모니터링된 수술 후 상태들에 따라 수행되었다.
- [0136] <심초음파검사에 의한 만성 심부전 모델 래트에서 심장 기능들의 평가>
- [0137] CD106+ 래트 섬유아세포들이 투여되는 만성 심부전 모델이 도 5에 나타난 스케줄에 따라 초음파 이미지 진단 장치 (Xario SSA-660A, Toshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japan)을 이용하여 심초음파검사 측정이 수행되는 동안 추적되었다. 더 특이적으로, 동물의 가슴털을 이발기로 깎고, 프로브를 M-모드에 의하여 하기 항목들을 측정하기 위하여 가슴 상에 위치시켰다. 주된 항목으로, 좌심실 박출 분율 ($LVEF = (LVIdD3 - LVIdS3) / LVIdD3$), 좌심실 분획 단축 ($LVFS = (LVIdD - LVIdS) \times 100 / LVIdD$), 좌심실 확장말기 용적 ($LVEDV$), 및 좌심실 수축기말 용적 ($LVESV$)이 측정되었다. 항위항목들로서, 좌심실 확장말기 직경 ($LVIdD$), 좌심실 수축기말 직경 ($LVIdS$), 좌심실 앞벽 확장말기 두께 ($LVAWd = IVSTd$), 좌심실 뒷벽 (posterior wall) 확장말기 두께 ($LVPWTd$), 및 심박수 (heart rate) (HR)가 측정되었다. HR 를 제외한 심장 기능 값들이 (소수점 첫째 자리로 반올림되어) 소수점 첫째 자리로 표현되었고, 하위항목인 HR 은 (소수점 둘째 자리로 반올림되어) 소수점 둘째 자리로 표현되었다.
- [0138] [CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 심장 기능들의 개선]
- [0139] 그 뒤에, 래트들 또는 돼지들에게 CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 심장 기능들의 개선이 조사되었다.
- [0140] <세포들 및 항체들>
- [0141] 심장 섬유아세포들이 하기 제조업체들로부터 구입되었다.
- [0142] 백인 태아 (21 주) 심장-유래 섬유아세포들 (c21wFCF, Cell Applications, San Diego, CA)
- [0143] 백인 성인 (50대) 심장-유래 섬유아세포들 (c50yACF, Cell Applications, San Diego, CA)
- [0144] 흑인 성인 (60대) 심장-유래 섬유아세포들 (b60yACF, Lonza, Basel, Switzerland)
- [0145] <세포 분류>
- [0146] 세포들은 CD106 (VCAM-1)-비오틴 항체들, 인간 (Miltenyi Biotec)으로 일차 면역염색에 가해졌고, 그 다음에 항-비오틴 마이크로비드들 (Miltenyi Biotec)로 이차 면역염색에 가해졌다. 염색된 세포들로부터, CD106-양성 세포들 단독이 autoMACS (Miltenyi Biotec)에 의하여 수집되어 CD106+ 인간 섬유아세포들을 제공하였다.
- [0147] 항체들이 하기 제조업체들로부터 구입되었다.
- [0148] BV421 래트 IgG2a, 이소타입(Isotype) 대조군 RUO (BD Biosciences)
- [0149] PE-REA 대조군 (S) 이소타입 대조군 (Miltenyi Biotec)
- [0150] Oct3/4-PE (Miltenyi Biotec)
- [0151] 나노그(Nanog)-PE (Miltenyi Biotec)
- [0152] Sox2-PE (Miltenyi Biotec)
- [0153] 토끼 다클론 항-코넥신 43 (Cell signaling technology)
- [0154] 인간 STRO-1 Alexa Fluor 488-콘주게이트된 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN)
- [0155] 모든 다른 항체들은 Abcam으로부터 구입했다.
- [0156] 이차 항체는 Jackson Immuno Reserch Laboratories으로부터 구입하였다.
- [0157] 세포 막 표면 단백질을 인식하는 항체들을 위하여, 세포들이 4% 파라포름알데하이드로 고정되었고, 그 다음에 면역형광 염색이 수행되었다. Oct3/4-PE, 나노그-PE, and Sox2-PE를 위하여, CD106+ 인간 섬유아세포들이 30 분 (실온) 동안 0.1% 트리톤(Triton)-X (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)으로 세포 막 투과화 처리에 가해졌다.
- [0158] <유동세포 분석법>

- [0159] 면역형광 염색 후 세포들이 1.0×10^6 세포들/시험 당의 밀도로 제조되었고, 그 다음에 유동세포분석기(MACSQuant, Miltenyi Biotec)를 이용하여 분석되었다. FSC-A and SSC-A으로 세포 영역의 인식 후, 각 마커 단백질에 대하여 양성 세포 비율(%, 세포 수의 면에서)이 평가되었다.
- [0160] <만성 심부전 래트 모델의 심초음파검사 측정>
- [0161] 하기 기재된 것과 동일한 방법으로, 만성 심부전 모델이 준비되었고, 심초음파검사 측정이 수행되었다.
- [0162] <만성 심부전 래트 모델에 CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여>
- [0163] 투여 테스트 날, CD106+ 인간 섬유아세포들이 고-글루코스 DMEM + 10% NBCS으로 희석되었고, 살아 있는 세포 수의 면에서, 2.0×10^6 세포들/50 μ L 또는 5.0×10^5 세포들/50 μ L의 세포 현탁액이 각 개체들에게 투여되었다. 각 그룹은 N = 4로 제공되었다. 각 동물에서 마취의 유지를 위하여, 세포 투여 방법, 봉합 및 봉합 제거가 상술한 것과 동일한 방법들에 의하여 수행되었다.
- [0164] <심초음파검사에 의한 만성 심부전 모델 래트의 심장 기능들의 평가>
- [0165] 도 6에 나타난 스케줄에 따라 심초음파검사 측정이 2 주 간격으로 초음파 이미지 진단 장치(Xario SSA-660A, Toshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japan)를 이용하여 수행되는 동안 CD106+ 인간 섬유아세포들이 투여되는 만성 심부전 모델이 추적되었다. 구체적인 방법은 상술한 바와 같았다.
- [0166] <만성 심부전 돼지 모델의 심초음파검사 측정 및 제조>
- [0167] 35 내지 40 kg의 LWD 종류의 SPF 사육된 돼지들이 구입되었다(Okayama JA Livestock Co., Ltd., Okayama, Japan). 돼지 심부전 모델은 풍선 카테터를 이용하여 60 분 동안 좌전하행지(left anterior descending branch) 주변부를 부풀리고, 그 다음에 30 분 간격 후, 60 분 동안 다시 좌전하행지의 중간 부분을 부풀림으로써 제조되었다.
- [0168] 모델 제조 1 주 후, 즉, 세포들의 투여 하루 전, 심초음파검사 측정이 MRI를 이용하여 수행되었다. 45% 미만의 좌심실 박출 분율(EF)을 가진 개체들이 만성 심부전 모델로 간주되었고, CD106+ 인간 섬유아세포 투여 실험에 가해졌다.
- [0169] <만성 심부전 돼지 모델에 CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여>
- [0170] 마취 유도 후, 제조된 돼지 심부전 모델은 양아위로 수술대 위에 고정되었다. 상기 만성 심부전 돼지 모델의 제조에서와 동일한 방식으로, 6 Fr 초(sheath)가 서혜부(groin)로부터 삽입되었고, 0.035-인치 유도(guide) 철사(wire)에 의하여 선행된 6 Fr 유도(guiding) 카테터가 상행대동맥 부위 내로 삽입되었다. 0.035-인치 유도 철사가 제거되었고, 그 다음에 유도 카테터 내 공기가 제거되었고, 뒤이어 좌주간부(left main trunk)에서 관여하는 것을 가능하게 하는 것이 이어졌다. 관여 후, 보강 이미징이 관상 동맥의 상태를 확인하기 위하여 중앙 및 LAO 30 ° 각도들에서 수행되었다. 0.014-인치 유도 철사를 따라 마이크로카테터가 좌전하행지의 개구(ostial) 부분 바로 뒤의 위치 내로 삽입되었다. CD106+ 인간 섬유아세포들(2.0×10^7 세포들/40 mL)로 사전에 채워진 50-mL 주사기가 주사기 펌프에 세팅되었고, 그 다음에 삽입된 마이크로카테터로 연결되었으며, 뒤이어 40 분 동안 1 mL/분의 유속으로 투여의 실시가 이어졌다. 세포들의 투여 후, 5 mL 생리 식염수가 동일한 유속으로 투여되어, 마이크로카테터가 플러싱(flushing)되었다. 모든 투여들의 완료 후, 카테터 및 초(sheath)가 제거되었다. 초(sheath) 삽입 부위에서 압박 지혈 후, 돼지가 마취로부터 회복되는 것이 가능해지고, 우리로 돌아갔다. CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여는 N = 1로 수행되었다.
- [0171] <MRI에 의한 만성 심부전 모델 돼지의 심장 기능들의 평가>
- [0172] 돼지는 세포들의 투여일 전, 투여 4주 후, 그리고 투여 8주 후 MRI 스캔되었다. 깊은 마취 하 돼지는 MRI실에서 실험대 위에 위치되었다. 양아위로, 돼지는 기관내 튜브 및 마취 장치의 관에 연결되었다. 심전도 전극이 가슴에 부착되었다. 코일이 맞춰져, 코일이 가슴을 덮었으며, 돼지는 MRI 본체의 실린더에 위치되었고(Signa EXCITE XI TwinSpeed 1.5T Ver.11.1, GE Healthcare), 뒤이어 이미징이 수행되었다. 더 특이적으로, 먼저, 영화(cine) MRI가 체측 횡단면(축의 횡단면)을 따라 심장을 덮는 영역의 2D 피에스타 이미징을 위하여 사용되었다. 그 뒤에, 얻어진 데이터로부터, 심박 당 20 슬라이스들의 2D 피에스타 이미징이 심실의 장축 및 심첨을 통과하는 횡단면에서 수행되었다. 이미징 데이터로부터 확장기의 슬라이스들이 선택되었고, 2D 피에스타 이미징이 승모판막 부근 및 심첨을 통과하는 장축 횡단면에서 수행되었다. 나아가, 확장기의 슬라이스들이 선택

되었고, 2D 피에스타 이미징이 심첨 (단축(short-axis) 횡단면들)으로부터 10 내지 12 슬라이스들에 대하여 6-내지 8-mm 너비의 간격들로 좌심실의 장축(long axis)에 수직인 횡단면에서 수행되었다. 이미징에 의하여 얻어진 데이터는 소프트웨어 어플리케이션 Cardiac VX를 이용하여 분석되었다. 심장 기능들의 평가 항목들로서, LVEF (좌심실 박출 분율, %), SV (일회박출량(stroke volume), mL), EDV (확장말기(end-diastolic) 용적(volume), mL), 및 ESV (수축기말(end-systolic) 용적(volume), mL)이 계산되었다. 속도와 관련된 지표들로서, HR (심박수, bpm), PFR (최대충전율(peak filling rate), mL/s), 및 PER (최대방출율(peak ejection rate), mL/s)이 계산되었다. 게다가, 질량(Mass) ED (g), 심박출량(Cardiac Output) (L/min), 질량(Mass) (g), 질량(Mass) ES (g), 확장말기(End-Diastolic) 심외막(Epicardial) 용적(Volume) (mL), 및 수축기말(End-Systolic) 심외막(Epicardial) 용적(Volume) (mL)이 계산되었다.

[0173] 나아가, 심근의(Myocardial) 일시적(temporal) 변화 분석 관류(Perfusion) 및 LGE 분석이 심장 근육의 비정상적인 부위에 존재하는 경색/섬유증 영역의 양적인 계산을 위하여 수행되었다. 심근의 일시적 변화 분석 관류에서, 먼저 조영제 (Omniscan intravenous injection 32% for intravenous injection)가 일시 주사에 의하여 정맥 루트 (정맥내)로부터 정맥으로 투여되었고, 심장 근육을 조영제가 처음 통과하는 과정이 이미지로 되었다 (단축 횡단면). 이미징으로 얻어진 데이터는 소프트웨어 어플리케이션 Cardiac VX를 이용하여 분석되었다. LGE 분석에서, 먼저, 조영제 (정맥 주사를 위하여 Omniscan 정맥 주사 32%, 0.25 mL/kg)가 정맥으로 투여되었다. 빠른 GRE 이미징이 그 다음에 10 내지 20 분 후 수행되었다 (단축 횡단면). 이미징에 의하여 얻어진 데이터는 소프트웨어 어플리케이션 Cardiac VX를 이용하여 분석되었다. 경색 영역들 및 섬유증 영역들이 높은 신호들로 나타났기 때문에 정상 영역들과 그것들의 차이들이 관심영역(Region Of Interest) (ROI) 분석에 의하여 양적으로 계산되었다. 좌심실 기능 분석과 유사하게, 측정들은 몇몇 특정 포인트들에 대하여 자동적으로 수행되었다. 그러나, 측정이 명백히 잘못된 영역에 대해서 수행된 경우, 변형이 적용되었다. 심장 근육 조직 내 경색 부위들의 비율은 또한 퍼센트로 나타내어졌다.

[0174] <통계 분석>

[0175] 인 비트로 테스트들의 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 인 비보 테스트들의 데이터들은 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 두 그룹들 간의 중요한 차이는 스튜던트 t-테스트에 의하여 계산되었다. 셋 이상의 그룹들 사이의 변화 차이는 분산의 일방 분석에 의하여 계산되었다. 그 뒤에, 세 그룹들 사이의 중요한 차이가 Tukey-Kramer Multiple Comparison Test에 의하여 계산되었다. 차이의 중요성은 p-값이 0.05보다 작을 때로 상정되었다.

[0176] 실험 결과들은 하기와 같다.

[0177] <래트 만성 심부전 모델에 대한 CD106+ 래트 섬유아세포들의 치료적 효과>

[0178] 세포 분류 후 수집된 CD106+ 래트 섬유아세포들이 래트 만성 심부전 모델로 심근내로 투여되었고, 만성 심부전으로부터 회복 효과가 세포들의 투여 18 주 후에 평가되었다. 그 결과들이 도 7에 나타나 있다. CD106+ 래트 섬유아세포들이 투여된 그룹은 투여 18주 후 대조군에 비하여 EF의 32.9% 개선 및 FS의 12.4% 개선을 보이는 것으로 발견되었다. LVEDV에서 극단적인 증가/감소 또는 LVESV에서 증가는 투여 18주 동안 발견되지 않았다. 주된 항목들 (LVEF, LVFS, LVEDV, 및 LVESV)의 결과들 및 하위 항목들 (LVIdD, LVIdS, IVSTd, LVPWTd, 및 HR)의 결과들이 표 1 내지 9에 나타나 있다.

[0179] 표 1: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 박출 분율 (LVEF)의 영향

표 1

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVEF (%)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	53.20	43.60	54.50	65.60	67.10	67.10	68.20
	107	42.60	46.70	49.60	49.70	34.00	31.60	27.10
	108	46.90	46.10	50.20	50.50	50.80	57.50	63.20
	109	44.20	45.80	49.60	61.00	64.30	50.80	62.60
	평균	46.70	45.60	51.00	56.70	54.10	51.80	64.70
	표준오차	2.30	0.70	1.20	3.90	7.60	7.50	1.80
대조군	101	50.90	42.50	41.60	39.10	42.00	42.60	43.00
	102	49.40	43.90	36.10	33.20	31.80	30.60	28.20
	103	42.10	37.50	32.70	27.70	29.30	29.90	29.30
	104	53.20	43.40	36.60	28.70	28.60	27.10	26.50
	평균	48.90	41.80	36.80	32.20	32.90	32.60	31.80
	표준오차	2.40	1.50	1.80	2.60	3.10	3.40	3.80

[0180]

[0181] 표 2: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 분획 단축 (LVFS)의 경향

표 2

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVFS (%)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	22.30	17.40	23.10	30.00	31.00	31.00	31.70
	107	16.90	18.90	20.50	20.50	12.90	11.90	10.00
	108	19.00	18.60	20.70	20.90	21.10	24.80	28.40
	109	17.60	18.40	20.40	27.00	29.10	21.00	27.90
	평균	19.00	18.30	21.20	24.60	23.50	22.20	24.50
	표준오차	1.20	0.30	0.60	2.30	4.10	4.00	4.90
대조군	101	21.10	16.90	16.40	15.20	16.60	16.90	17.10
	102	20.30	17.50	13.90	12.60	12.00	11.50	10.50
	103	16.60	14.50	12.40	10.30	10.90	11.20	10.90
	104	22.50	17.30	14.10	10.70	10.60	10.00	9.70
	평균	20.10	16.60	14.20	12.20	12.50	12.40	12.10
	표준오차	1.30	0.70	0.80	1.10	1.40	1.50	1.70

[0182]

[0183] 표 3: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 확장말기 용적 (LVEDV)의 경향

표 3

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVEDV (μL)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	316.00	580.00	516.00	375.00	471.00	471.00	531.00
	107	235.00	614.00	564.00	825.00	804.00	825.00	890.00
	108	305.00	471.00	402.00	457.00	516.00	668.00	614.00
	109	471.00	668.00	649.00	580.00	516.00	597.00	580.00
	평균	331.80	583.30	532.80	559.30	576.80	640.30	653.80
	표준오차	49.80	41.60	51.50	98.10	76.50	73.80	80.60
대조군	101	442.00	442.00	580.00	501.00	564.00	531.00	516.00
	102	668.00	668.00	649.00	868.00	1006.00	935.00	982.00
	103	686.00	686.00	597.00	632.00	868.00	804.00	1080.00
	104	415.00	415.00	614.00	724.00	935.00	890.00	959.00
	평균	552.80	552.80	610.00	681.30	843.30	790.00	884.30
	표준오차	72.00	72.00	14.70	77.30	97.30	90.50	125.50

[0184]

[0185] 표 4: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 수축기말 용적 (LVESV)의 경향

표 4

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVESV (μL)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	148.00	327.00	235.00	129.00	155.00	155.00	169.00
	107	135.00	327.00	284.00	415.00	531.00	564.00	649.00
	108	162.00	254.00	200.00	226.00	254.00	284.00	226.00
	109	263.00	362.00	327.00	226.00	184.00	294.00	217.00
	평균	177.00	317.50	261.50	249.00	281.00	324.30	315.30
	표준오차	29.20	22.70	27.80	59.90	85.90	86.00	112.00
대조군	101	155.00	254.00	339.00	305.00	327.00	305.00	294.00
	102	217.00	375.00	415.00	580.00	686.00	649.00	705.00
	103	217.00	429.00	402.00	457.00	614.00	564.00	764.00
	104	123.00	235.00	389.00	516.00	668.00	649.00	705.00
	평균	178.00	323.30	386.30	464.50	573.80	541.80	617.00
	표준오차	23.40	46.90	16.60	58.80	83.70	81.40	108.60

[0186]

[0187]

표 5: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 확장말기 직경의 경향

표 5

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVIDd (mm)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	6.81	8.34	8.02	7.21	7.78	7.78	8.10
	107	6.17	8.50	8.26	9.38	9.30	9.38	9.62
	108	6.73	7.78	7.38	7.70	8.02	8.74	8.50
	109	7.78	8.74	8.66	8.34	8.02	8.42	8.34
	평균	6.87	8.34	8.08	8.16	8.28	8.58	8.64
	표준오차	0.33	0.20	0.27	0.47	0.34	0.33	0.34
대조군	101	6.81	7.62	8.34	7.94	8.26	8.10	8.02
	102	7.54	8.74	8.66	9.54	10.02	9.78	9.94
	103	7.21	8.82	8.42	8.58	9.54	9.30	10.26
	104	6.41	7.46	8.50	8.98	9.78	9.62	9.86
	평균	6.99	8.16	8.48	8.76	9.40	9.20	9.52
	표준오차	0.24	0.36	0.07	0.34	0.39	0.38	0.51

[0188]

[0189]

표 6: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 수축기말 직경 (LVIDs)의 경향

표 6

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVIDs (mm)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	5.29	6.89	6.17	5.05	5.37	5.37	5.53
	107	5.13	6.89	6.57	7.46	8.10	8.26	8.66
	108	5.45	6.33	5.85	6.09	6.33	6.57	6.09
	109	6.41	7.13	6.89	6.09	5.69	6.65	6.01
	평균	5.57	6.81	6.37	6.17	6.37	6.71	6.57
	표준오차	0.29	0.17	0.23	0.49	0.61	0.59	0.71
대조군	101	5.37	6.33	6.97	6.73	6.89	6.73	6.65
	102	6.01	7.21	7.46	8.34	8.82	8.66	8.90
	103	6.01	7.54	7.38	7.70	8.50	8.26	9.14
	104	4.97	6.17	7.30	8.02	8.74	8.66	8.90
	평균	5.59	6.81	7.28	7.70	8.24	8.08	8.40
	표준오차	0.26	0.33	0.11	0.35	0.45	0.46	0.59

[0190]

[0191]

표 7: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 앞벽 확장 말기 두께 (LVAWd = IVSTd)의 경향

표 7

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 IVSTd (mm)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	2.65	0.96	0.88	0.96	0.88	0.96	1.36
	107	1.36	1.28	1.28	0.72	0.96	0.96	0.96
	108	1.92	0.96	1.04	1.20	1.52	1.44	1.52
	109	2.40	1.52	1.36	0.88	0.88	0.96	0.96
	평균	2.08	1.18	1.14	0.94	1.06	1.08	1.20
	표준오차	0.28	0.14	0.11	0.10	0.15	0.12	0.14
대조군	101	2.65	1.20	1.44	1.20	1.04	1.36	1.44
	102	2.40	1.20	1.04	0.72	0.80	0.80	0.88
	103	1.84	0.72	0.96	0.80	0.96	0.88	0.72
	104	2.16	1.12	1.36	0.96	1.04	1.20	1.12
	평균	2.26	1.06	1.20	0.92	0.96	1.06	1.04
	표준오차	0.17	0.11	0.12	0.11	0.06	0.13	0.16

[0192]

[0193]

표 8: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 뒷벽 확장 말기 두께 (LVPWTd)의 경향

표 8

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVPWTd (mm)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	1.92	1.76	1.60	1.12	1.20	1.20	1.20
	107	1.84	1.44	1.60	1.36	1.36	1.20	1.52
	108	2.16	1.60	1.36	1.52	1.52	1.36	1.76
	109	1.92	1.52	1.60	1.52	2.57	1.76	1.04
	평균	1.96	1.58	1.54	1.38	1.66	1.38	1.38
	표준오차	0.07	0.07	0.06	0.09	0.31	0.13	0.16
대조군	101	1.84	1.44	1.44	1.36	1.28	1.36	1.52
	102	1.84	1.36	1.28	1.28	1.28	1.52	1.36
	103	1.36	1.68	1.36	0.80	1.04	1.28	0.96
	104	2.00	1.28	1.36	0.96	0.96	1.28	1.28
	평균	1.76	1.44	1.36	1.10	1.14	1.36	1.28
	표준오차	0.14	0.09	0.03	0.13	0.08	0.06	0.12

[0194]

[0195]

표 9: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 래트 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 심박수 (HR)의 경향

표 9

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 HR (bpm)						
		0 주	2 주	4 주	8 주	12 주	16 주	18 주
+ VCF	106	390.00	359.00	368.00	368.00	368.00	351.00	359.00
	107	343.00	351.00	411.00	368.00	335.00	343.00	319.00
	108	351.00	300.00	335.00	335.00	351.00	319.00	351.00
	109	380.00	359.00	335.00	351.00	306.00	343.00	313.00
	평균	366.00	342.30	362.30	355.50	340.00	339.00	335.50
	표준오차	11.30	14.20	18.00	7.90	13.20	6.90	11.40
대조군	101	380.00	368.00	343.00	319.00	335.00	300.00	328.00
	102	435.00	368.00	359.00	359.00	390.00	335.00	335.00
	103	306.00	343.00	328.00	328.00	300.00	300.00	335.00
	104	400.00	335.00	380.00	343.00	351.00	328.00	343.00
	평균	380.30	353.50	352.50	337.30	344.00	315.80	335.30
	표준오차	27.20	8.50	11.10	8.80	18.70	9.20	3.10

[0196]

[0197]

상기 실험들에 의하여, 만성 심부전의 효과적인 치료를 위한 VCAM-1-양성 섬유아세포들의 중요성이 입증되어 왔고, CD106+ 섬유아세포들의 투여가 만성 심부전의 치료에 바람직한 결과를 만들 수 있다는 것이 이해될 수 있다. VCAM-1-양성 섬유아세포들의 주사가 만성 심부전 뿐 아니라, 전술한 바와 같이 심근경색증의 치료도 가능하게 하였기 때문에, 다른 심장 질환들의 치료에도 또한 효과적일 것으로 생각된다.

- [0198] <인간 심장 섬유아세포들 중 CD106+ 인간 섬유아세포들의 국소화>
- [0199] 인간(human) 태아(fetal) 심장(heart) (FCF)으로부터 수집된 심장 섬유아세포들 및 인간 성인(adult) 심장들(hearts) (ACF)로부터 수집된 두 종류의 심장 섬유아세포들이 제공되었고, 각각 마우스 CD106 및 마우스 CD90에 상동성을 갖는 인간 CD106 및 인간 CD90의 발현 레벨들에 대하여 유동세포분석법에 의하여 평가되었다. 그 결과는 도 8에 나타난다. 두 종류의 ACF가 후성 유전학의 영향을 고려하여 제공되었다. 그 결과, 하기 국소화가 c21wFCF: CD106-양성 세포 비율, 9.13%; CD90-양성 세포 비율, 24.5%; 이중-양성 세포 (CD106+ 인간 섬유아세포) 비율, 8.20%에 대하여 발견되었다. 하기 국소화가 c50yACF: CD106-양성 세포 비율, 12.53%; CD90-양성 세포 비율, 5.79%; 이중-양성 세포 (CD106+ 인간 섬유아세포) 비율, 1.79%에 대하여 발견되었다. 하기 국소화가 b60yACF: CD106-양성 세포 비율, 5.55%; CD90-양성 세포 비율, 96.39%; 이중-양성 세포 (CD106+ 인간 섬유아세포) 비율, 5.43%에 대하여 발견되었다. 전술된 모든 양성 세포 비율들은 세포 수의 면에서의 값들이다.
- [0200] 이들 결과들로부터, 모든 심장 섬유아세포들이 거기에 국소화된 CD106+ 인간 섬유아세포들을 포함한다는 것이 명확해졌다.
- [0201] <CD106+ 인간 섬유아세포들의 세포 분류>
- [0202] 인간 심장에서부터 수집된 심장 섬유아세포들로부터 높은 순도에서 CD106+ 인간 섬유아세포들을 수집하기 위하여, CD106+ 인간 섬유아세포들의 세포 분류가 autoMACS에 의하여 수행되었다. autoMACS에 의한 분류에 의하여 얻어진 CD106+ 인간 섬유아세포들의 세포 물성들이 평가되었다. 그 결과들은 도 9에 보여진다. 수집된 CD106+ 인간 섬유아세포들은 95.98% CD106-양성 세포들, 92.28% CD90-양성 세포들, 및 89.15% 이중-양성 세포들을 포함하는 것으로 발견되었다. 이와 같이 거의 모든 세포들이 CD106+ 인간 섬유아세포들의 군집을 가리키는 마커 단백질들인 CD106 및/또는 CD90에 양성인 것이 명확하여졌다. 전술된 양성 세포 비율들 모두가 세포 수의 면에서의 값들이다.
- [0203] CD106+ 인간 섬유아세포들이 만능 줄기 세포들 및 종양형성(tumorigenicity)의 마커들에 양성인지 여부를 평가하기 위하여, CD106+ 인간 섬유아세포들이 Oct3/4, Nanog, 및 Sox2으로 면역형광 염색에 가해졌고, 양성 세포 비율들 (% , 세포 수의 면에서)이 평가되었다. 그 결과들은 도 10에 보여진다. CD106+ 인간 섬유아세포들은 상기 마커들에 음성이었으며, 만능 줄기 세포들 또는 종양형성의 물성들을 갖지 않았다.
- [0204] <CD106+ 인간 섬유아세포들의 세포 물성들>
- [0205] 섬유아세포들 및 중간엽 줄기 세포들의 세포골격의 마커인 비멘틴에 대한, 상피 세포들의 마커인 사이토케라틴에 대한, 그리고 심근세포들의 겹 결합들의 마커인 코넥신 43에 대한 CD106+ 인간 섬유아세포들의 면역형광 염색의 결과로서, 모든 CD106+ 인간 섬유아세포들이 비멘틴 및 코넥신 43의 발현을 보이는 것을 알게 되었다. 그 결과들은 도 11에 나타나 있다.
- [0206] 나아가, 유동세포분석법에 의한 CD106+ 인간 섬유아세포들의 STRO-1 발현 속도의 평가 결과로서, CD106+ 인간 섬유아세포들이 STRO-1에 대하여 0.29% 양성이고, 그러므로 CD106+ 인간 섬유아세포들 중에는 STRO-1의 발현을 보이는 것이 거의 없다는 것이 발견되었다. 그 결과는 도 12에 보여진다. "중간엽 줄기 세포들 (MSCs)의 가장 잘 알려진 분자 마커들 중 하나인 STRO-1은 세포내 칼슘의 상실에 대한 반응으로 소포체로부터 세포막으로 그 국소화가 변화하는 단일(single)-통과(pass) 막관통 단백질이다 (Barkhordarian A, Sison J, Cayabyab R, et al. Epigenetic regulation of osteogenesis: human embryonic palatal mesenchymal cells. Bioinformation 2011; 5:278-281.). 높은 콜로니 형성능 및 전분화능을 가진 세포 군집이 골수 간질 세포들로부터 STRO-1-양성, 글리코포린(glycophorin) A-음성 세포 분획의 분리에 의하여 얻어질 수 있다는 것이 알려져 있다 (Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood 1991; 78: 55-62., Tomohiko Kazama. Basic Research and Clinical Application in Mesenchymal Stem Cells. Journal of Nihon University Medical Association. 2016; 75(2): 61-66.)"
- [0207] <랫트 만성 심부전 모델에 대한 CD106+ 인간 섬유아세포들의 치료적 효과>
- [0208] 분류 후 수집된 CD106+ 인간 섬유아세포들이 랫트 만성 심부전 모델에 심근대로 투여되었고, 심부전으로부터의 회복 효과가 세포들의 투여 18주 후 평가되었다. 그 결과들이 도 12에 보여진다. CD106+ 인간 섬유아세포들이 투여된 그룹은 투여 18주 후 대조군에 비하여 의 32.60% 개선 및 FS의 17.85% 개선을 보이는 것이 발견되었다. LVEDV에서의 극단적인 증가/감소 및 LVESV에서의 증가 중 어느 것도 투여 후 18주 내내 발견되지 않았다. 주된 항목들 (LVEF, LVFS, LVEDV, 및 LVESV) 및 서브 항목들 (LVIdD, LVIdS, IVSTd, LVPWTd, 및 HR)에 대한 결과들

이 표 10 내지 18에 보여진다. 대조군에 대한 결과의 면에서, 래트 만성 심부전 모델에서 CD106+ 래트 섬유아세포들의 치료적 효과에 대한 실험에 의하여 얻어진 결과들이 사용되었다.

[0209] 표 10: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델에서의 좌심실 박출 분율 (LVEF)의 경향

표 10

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVEF (%)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	50.50	53.10	57.50	59.80	66.60	72.90	79.20	81.30	81.00	79.80
	111	48.80	43.30	56.20	63.70	64.50	65.70	58.30	59.10	64.90	67.40
	112	42.50	44.20	46.80	59.70	61.10	57.20	66.70	60.70	64.30	59.30
	113	49.00	53.90	56.80	58.90	57.20	59.00	57.30	53.40	54.80	50.90
	평균	47.70	48.63	54.33	60.53	62.35	63.70	65.38	63.63	66.25	64.35
	표준오차	1.77	2.83	2.52	1.08	2.06	3.57	5.07	6.10	5.43	6.15
대조군	101	50.90	42.50	41.60	N.D.	39.10	N.D.	42.00	N.D.	42.60	43.00
	102	49.40	43.90	36.10	N.D.	33.20	N.D.	31.80	N.D.	30.60	28.20
	103	42.10	37.50	32.70	N.D.	27.70	N.D.	29.30	N.D.	29.90	29.30
	104	53.20	43.40	36.60	N.D.	28.70	N.D.	28.60	N.D.	27.10	26.50
	평균	48.90	41.83	36.75	N.D.	32.18	N.D.	32.93	N.D.	32.55	31.75
	표준오차	2.40	1.47	1.83	N.D.	2.60	N.D.	3.10	N.D.	3.43	3.79

[0210]

[0211] 표 11: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 분획 단축 (LVFS)의 경향

표 11

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVFS (%)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	20.90	22.30	24.80	26.20	30.60	35.30	40.80	42.90	42.60	41.40
	111	20.00	17.20	24.10	28.60	29.20	30.00	25.30	25.70	29.50	31.20
	112	16.90	17.70	19.00	26.20	27.00	24.60	30.70	26.80	29.00	25.90
	113	20.10	22.80	24.40	25.70	24.60	25.70	24.60	22.50	23.30	21.10
	평균	19.48	20.00	23.08	26.68	27.85	28.90	30.35	29.48	31.10	29.90
	표준오차	0.88	1.48	1.37	0.65	1.31	2.43	3.74	4.57	4.08	4.35
대조군	101	21.10	16.90	16.40	N.D.	15.20	N.D.	16.60	N.D.	16.90	17.10
	102	20.30	17.50	13.90	N.D.	12.60	N.D.	12.00	N.D.	11.50	10.50
	103	16.60	14.50	12.40	N.D.	10.30	N.D.	10.90	N.D.	11.20	10.90
	104	22.50	17.30	14.10	N.D.	10.70	N.D.	10.60	N.D.	10.00	9.70
	평균	20.13	16.55	14.20	N.D.	12.20	N.D.	12.53	N.D.	12.40	12.05
	표준오차	1.26	0.69	0.83	N.D.	1.12	N.D.	1.39	N.D.	1.53	1.70

[0212]

[0213] 표 12: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 확장말기 용적 (LVEDV)의 경향

표 12

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVEDV (μL)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	457.00	501.00	597.00	632.00	649.00	547.00	486.00	486.00	531.00	580.00
	111	375.00	686.00	516.00	597.00	564.00	516.00	564.00	668.00	547.00	614.00
	112	442.00	649.00	705.00	705.00	784.00	764.00	705.00	804.00	764.00	804.00
	113	516.00	686.00	784.00	825.00	764.00	744.00	847.00	890.00	890.00	959.00
	평균	447.50	630.50	650.50	689.75	690.25	642.75	650.50	712.00	683.00	739.25
	표준오차	28.97	44.04	58.98	50.38	51.53	64.67	79.65	88.11	87.09	88.28
대조군	101	442.00	442.00	580.00	N.D.	501.00	N.D.	564.00	N.D.	531.00	516.00
	102	668.00	668.00	649.00	N.D.	868.00	N.D.	1006.00	N.D.	935.00	982.00
	103	686.00	686.00	597.00	N.D.	632.00	N.D.	868.00	N.D.	804.00	1080.00
	104	415.00	415.00	614.00	N.D.	724.00	N.D.	935.00	N.D.	890.00	959.00
	평균	552.75	552.75	610.00	N.D.	681.25	N.D.	843.25	N.D.	790.00	884.25
	표준오차	72.04	72.04	14.74	N.D.	77.25	N.D.	97.25	N.D.	90.51	125.52

[0214]

[0215] 표 13: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 수축기말 용적 (LVESV)의 경향

표 13

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVESV (μL)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	226.00	235.00	254.00	254.00	217.00	148.00	101.00	91.00	101.00	117.00
	111	192.00	389.00	226.00	217.00	200.00	177.00	235.00	273.00	192.00	200.00
	112	254.00	362.00	375.00	284.00	305.00	327.00	235.00	316.00	273.00	327.00
	113	263.00	316.00	339.00	339.00	327.00	305.00	362.00	415.00	402.00	471.00
	평균	233.75	325.50	298.50	273.50	262.25	239.25	233.25	273.75	242.00	278.75
	표준오차	15.99	33.72	35.03	25.78	31.55	44.93	53.29	67.78	63.86	77.27
대조군	101	155.00	254.00	339.00	N.D.	305.00	N.D.	327.00	N.D.	305.00	294.00
	102	217.00	375.00	415.00	N.D.	580.00	N.D.	686.00	N.D.	649.00	705.00
	103	217.00	429.00	402.00	N.D.	457.00	N.D.	614.00	N.D.	564.00	764.00
	104	123.00	235.00	389.00	N.D.	516.00	N.D.	668.00	N.D.	649.00	705.00
	평균	178.00	323.25	386.25	N.D.	464.50	N.D.	573.75	N.D.	541.75	617.00
	표준오차	23.44	46.94	16.62	N.D.	58.80	N.D.	83.66	N.D.	81.42	108.56

[0216]

[0217]

표 14: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 확장말기 직경 (LVIDd)의 경향

표 14

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVIDd (mm)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	7.70	7.94	8.42	8.58	8.66	8.18	7.86	7.86	8.10	8.34
	111	7.21	8.82	8.02	8.42	8.26	8.02	8.26	8.74	8.18	7.62
	112	7.62	8.66	8.90	8.90	9.22	9.14	8.90	9.30	9.14	8.98
	113	8.02	8.82	9.22	9.38	9.14	9.06	9.46	9.62	9.62	9.62
	평균	7.64	8.56	8.64	8.82	8.82	8.60	8.62	8.88	8.76	8.64
	표준오차	0.17	0.21	0.26	0.21	0.22	0.29	0.35	0.39	0.37	0.43
대조군	101	6.81	7.62	8.34	N.D.	7.94	N.D.	8.26	N.D.	8.10	8.02
	102	7.54	8.74	8.66	N.D.	9.54	N.D.	10.02	N.D.	9.78	9.94
	103	7.21	8.82	8.42	N.D.	8.58	N.D.	9.54	N.D.	9.30	10.26
	104	6.41	7.46	8.50	N.D.	8.98	N.D.	9.78	N.D.	9.62	9.86
	평균	6.99	8.16	8.48	N.D.	8.76	N.D.	9.40	N.D.	9.20	9.52
	표준오차	0.24	0.36	0.07	N.D.	0.34	N.D.	0.39	N.D.	0.38	0.51

[0218]

[0219]

표 15: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 수축기말 직경 (LVIDs)의 경향

표 15

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVIDs (mm)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	6.09	6.17	6.33	6.33	6.01	5.29	4.65	4.49	4.65	4.89
	111	5.77	7.30	6.09	6.01	5.85	5.61	6.17	6.49	5.77	5.85
	112	6.33	7.13	7.21	6.57	6.73	6.89	6.17	6.81	6.49	6.89
	113	6.41	6.81	6.97	6.97	6.89	6.73	7.13	7.46	7.38	7.78
	평균	6.15	6.85	6.65	6.47	6.37	6.13	6.03	6.31	6.07	6.35
	표준오차	0.14	0.25	0.26	0.20	0.26	0.40	0.51	0.64	0.58	0.63
대조군	101	5.37	6.33	6.97	N.D.	6.73	N.D.	6.89	N.D.	6.73	6.65
	102	6.01	7.21	7.46	N.D.	8.34	N.D.	8.82	N.D.	8.66	8.90
	103	6.01	7.54	7.38	N.D.	7.70	N.D.	8.50	N.D.	8.26	9.14
	104	4.97	6.17	7.30	N.D.	8.02	N.D.	8.74	N.D.	8.66	8.90
	평균	5.59	6.81	7.28	N.D.	7.70	N.D.	8.24	N.D.	8.08	8.40
	표준오차	0.26	0.33	0.11	N.D.	0.35	N.D.	0.45	N.D.	0.46	0.59

[0220]

[0221]

표 16: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 앞벽 확장말기 두께 (LVAwD = IVSTd)의 경향

표 16

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 IVSTd (mm)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	1.36	1.52	1.92	1.44	1.76	2.24	2.40	2.65	2.49	2.65
	111	1.76	1.20	1.92	1.44	1.52	1.52	2.16	1.76	2.24	2.16
	112	1.36	1.04	0.80	1.04	1.20	1.36	1.76	1.60	1.04	1.28
	113	1.20	1.52	1.28	1.20	1.36	1.44	1.04	1.04	1.12	0.96
	평균	1.42	1.32	1.48	1.28	1.46	1.64	1.84	1.76	1.72	1.76
	표준오차	0.12	0.12	0.27	0.10	0.12	0.20	0.30	0.33	0.37	0.39
대조군	101	2.65	1.20	1.44	N.D.	1.20	N.D.	1.04	N.D.	1.36	1.44
	102	2.40	1.20	1.04	N.D.	0.72	N.D.	0.80	N.D.	0.80	0.88
	103	1.84	0.72	0.96	N.D.	0.80	N.D.	0.96	N.D.	0.88	0.72
	104	2.16	1.12	1.36	N.D.	0.96	N.D.	1.04	N.D.	1.20	1.12
	평균	2.26	1.06	1.20	N.D.	0.92	N.D.	0.96	N.D.	1.06	1.04
	표준오차	0.17	0.11	0.12	N.D.	0.11	N.D.	0.06	N.D.	0.13	0.16

[0222]

[0223]

표 17: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 좌심실 뒷벽 확장말기 두께 (LVPWTd)의 경향

표 17

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVPWTd (mm)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	1.36	1.20	2.08	2.08	1.68	2.32	2.08	2.65	1.68	1.76
	111	1.20	1.68	1.76	1.84	1.84	1.52	1.76	1.76	1.44	1.60
	112	1.36	1.44	1.68	1.68	1.68	1.84	1.68	1.60	1.84	1.68
	113	2.00	1.84	1.76	1.76	2.08	1.68	1.68	1.04	1.68	1.60
	평균	1.48	1.54	1.82	1.84	1.82	1.84	1.80	1.76	1.66	1.66
	표준오차	0.18	0.14	0.09	0.09	0.09	0.17	0.10	0.33	0.08	0.04
대조군	101	1.28	1.36	1.20	2.08	2.08	N.D.	2.32	N.D.	1.36	1.52
	102	1.52	1.20	1.68	1.76	1.84	N.D.	1.52	N.D.	1.52	1.36
	103	1.28	1.36	1.44	1.68	1.68	N.D.	1.84	N.D.	1.28	0.96
	104	2.32	2.00	1.84	1.76	1.76	N.D.	1.68	N.D.	1.28	1.28
	평균	1.60	1.48	1.54	1.82	1.84	N.D.	1.84	N.D.	1.36	1.28
	표준오차	0.25	0.18	0.14	0.09	0.09	N.D.	0.17	N.D.	0.06	0.12

[0224]

[0225]

표 18: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여에 의한 래트 심부전 모델의 심박수 (HR)의 경향

표 18

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 HR (bpm)									
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주	10 주	12 주	14 주	16 주	18 주
+ VCF	110	335.00	359.00	368.00	313.00	306.00	328.00	319.00	335.00	313.00	343.00
	111	359.00	343.00	319.00	313.00	319.00	319.00	328.00	306.00	294.00	319.00
	112	359.00	300.00	359.00	359.00	343.00	328.00	343.00	335.00	351.00	359.00
	113	343.00	335.00	368.00	319.00	380.00	328.00	328.00	335.00	319.00	343.00
	평균	349.00	334.25	353.50	326.00	337.00	325.75	329.50	327.75	319.25	341.00
	표준오차	6.00	12.46	11.69	11.09	16.25	2.25	4.97	7.25	11.85	8.25
대조군	101	380.00	368.00	343.00	2.08	319.00	N.D.	335.00	N.D.	300.00	328.00
	102	435.00	368.00	359.00	1.76	359.00	N.D.	390.00	N.D.	335.00	335.00
	103	306.00	343.00	328.00	1.68	328.00	N.D.	300.00	N.D.	300.00	335.00
	104	400.00	335.00	380.00	1.76	343.00	N.D.	351.00	N.D.	328.00	343.00
	평균	380.25	353.50	352.50	1.82	337.25	N.D.	344.00	N.D.	315.75	335.25
	표준오차	27.23	8.53	11.14	0.09	8.78	N.D.	18.67	N.D.	9.20	3.07

[0226]

[0227]

<CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량 연구>

[0228]

분류 후 수집된 CD106+ 인간 섬유아세포들이 래트 만성 심부전 모델로 (2.0×10^6 세포들/50 μ L 및 5.0×10^5 세포들/50 μ L)의 두 종류의 농도로 심근내로 투여되었고, 심부전으로부터의 회복 효과가 세포들의 투여 후 8주 동안 평가되었다. 그 결과들이 도 14에 보여진다. CD106+ 인간 섬유아세포들 (2.0×10^6 세포들/50 μ L)이 투여된 그룹은 투여 8주 후, 대조군에 비하여 EF의 30.18% 개선 및 FS의 15.65% 개선을 보이는 것으로 발견되었다. LVEDV의 극단적인 증가/감소 및 LVESV의 증가 중 어느 것도 투여 후 8주 내내 발견되지 않았다. CD106+ 인간 섬유아세포들 (5.0×10^5 세포들/50 μ L)이 투여된 그룹은 투여 8주 후 대조군에 비하여 EF의 26.90% 개선 및 FS의 13.63% 개선을 보이는 것을 알게 되었다.. CD106+ 인간 섬유아세포들 (2.0×10^6 세포들/50 μ L)이 투여된 그룹 및 CD106+ 인간 섬유아세포들 (5.0×10^5 세포들/50 μ L)이 투여된 그룹 사이에서 투여 8주 후, EF 또는 FS에서

중요한 차이는 는 발견되지 않았다. 그러나, 투여량이 증가함에 따라 심부전에 대한 치료적 효과가 더 일찍 발견될 수 있다는 것이 명확해졌다. 대조군에 대한 결과들의 면에서, 래트 만성 심부전 모델에서 CD106+ 래트 섬유아세포들의 치료적 효과에 대한 실험으로 얻어진 결과들이 사용되었다. CD106+ 인간 섬유아세포들 (2.0×10^6 세포들/50 μ L)이 투여된 그룹에 대한 결과들의 면에서, 표 2에 얻어진 결과들이 사용되었다.

[0229] 주된 항목들 (LVEF, LVFS, LVEDV, and LVESV)에 대한 결과들 및 하위 항목들 (LVIDd, LVIDs, IVSTd, LVPWTd, 및 HR)에 대한 결과들이 표 19 내지 27에 나타나 있다.

[0230] 표 19: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌심실 박출 분율 (LVEF)의 경향

표 19

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVEF (%)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μ L)	110	50.50	53.10	57.50	59.80	66.60
	111	48.80	43.30	56.20	63.70	64.50
	112	42.50	44.20	46.80	59.70	61.10
	113	49.00	53.90	56.80	58.90	57.20
	평균	47.70	48.63	54.33	60.53	62.35
	표준오차	1.77	2.83	2.52	1.08	2.06
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μ L)	201	50.90	47.70	49.30	52.20	55.40
	202	51.30	47.90	50.40	52.20	62.70
	203	47.50	44.80	50.90	51.70	57.00
	204	53.70	48.90	55.70	54.30	61.20
	평균	50.85	47.33	51.58	52.60	59.08
	표준오차	1.28	0.88	1.42	0.58	1.72
대조군	101	50.90	42.50	41.60	N.D.	39.10
	102	49.40	43.90	36.10	N.D.	33.20
	103	42.10	37.50	32.70	N.D.	27.70
	104	53.20	43.40	36.60	N.D.	28.70
	평균	48.90	41.83	36.75	N.D.	32.18
	표준오차	2.40	1.47	1.83	N.D.	2.60

[0231]

[0232] 표 20: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌심실 분획 단축 (LVFS)의 경향

표 20

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVFS (%)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μL)	110	20.90	22.30	24.80	26.20	30.60
	111	20.00	17.20	24.10	28.60	29.20
	112	16.90	17.70	19.00	26.20	27.00
	113	20.10	22.80	24.40	25.70	24.60
	평균	19.48	20.00	23.08	26.68	27.85
	표준오차	0.88	1.48	1.37	0.65	1.31
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μL)	201	21.10	19.50	20.30	21.90	23.60
	202	21.40	19.50	20.80	21.90	28.00
	203	19.30	18.00	21.10	21.60	24.60
	204	22.70	20.10	23.80	23.00	27.10
	평균	21.13	19.28	21.50	22.10	25.83
	표준오차	0.70	0.45	0.78	0.31	1.03
대조군	101	21.10	16.90	16.40	N D.	15.20
	102	20.30	17.50	13.90	N D.	12.60
	103	16.60	14.50	12.40	N D.	10.30
	104	22.50	17.30	14.10	N D.	10.70
	평균	20.13	16.55	14.20	N D.	12.20
	표준오차	1.26	0.69	0.83	N D.	1.12

[0233]

[0234] 표 21: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌 심실 확장말기 용적 (LVEDV)의 경향

표 21

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVEDV (μL)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μL)	110	457.00	501.00	597.00	632.00	649.00
	111	375.00	686.00	516.00	597.00	564.00
	112	442.00	649.00	705.00	705.00	784.00
	113	516.00	686.00	784.00	825.00	764.00
	평균	447.50	630.50	650.50	689.75	690.25
	표준오차	28.97	44.04	58.98	50.38	51.53
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μL)	201	375.00	486.00	580.00	531.00	547.00
	202	649.00	564.00	705.00	531.00	415.00
	203	501.00	705.00	764.00	632.00	547.00
	204	614.00	442.00	531.00	457.00	516.00
	평균	534.75	549.25	645.00	537.75	506.25
	표준오차	61.91	57.72	53.99	35.93	31.28
대조군	101	442.00	442.00	580.00	N D.	501.00
	102	668.00	668.00	649.00	N D.	868.00
	103	686.00	686.00	597.00	N D.	632.00
	104	415.00	415.00	614.00	N D.	724.00
	평균	552.75	552.75	610.00	N D.	681.25
	표준오차	72.04	72.04	14.74	N D.	77.25

[0235]

[0236] 표 22: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌

심실 수축기말 용적 (LVESV)의 경향

표 22

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVESV (μL)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μL)	110	226.00	235.00	254.00	254.00	217.00
	111	192.00	389.00	226.00	217.00	200.00
	112	254.00	362.00	375.00	284.00	305.00
	113	263.00	316.00	339.00	339.00	327.00
	평균	233.75	325.50	298.50	273.50	262.25
	표준오차	15.99	33.72	35.03	25.78	31.55
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μL)	201	184.00	254.00	294.00	254.00	244.00
	202	316.00	294.00	350.00	254.00	155.00
	203	263.00	389.00	375.00	305.00	235.00
	204	284.00	226.00	235.00	209.00	200.00
	평균	261.75	290.75	313.50	255.50	208.50
	표준오차	28.11	35.60	31.17	19.62	20.20
대조군	101	155.00	254.00	339.00	N D.	305.00
	102	217.00	375.00	415.00	N D.	580.00
	103	217.00	429.00	402.00	N D.	457.00
	104	123.00	235.00	389.00	N D.	516.00
	평균	178.00	323.25	386.25	N D.	464.50
	표준오차	23.44	46.94	16.62	N D.	58.80

[0237]

[0238]

표 23: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌 심실 확장말기 직경 (LVIDd)의 경향

표 23

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVIDd (mm)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μL)	110	7.70	7.94	8.42	8.58	8.66
	111	7.21	8.82	8.02	8.42	8.26
	112	7.62	8.66	8.90	8.90	9.22
	113	8.02	8.82	9.22	9.38	9.14
	평균	7.64	8.56	8.64	8.82	8.82
	표준오차	0.17	0.21	0.26	0.21	0.22
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μL)	201	7.21	7.86	8.34	8.10	8.18
	202	8.66	8.26	8.90	8.10	7.46
	203	7.94	8.90	9.14	8.58	8.18
	204	8.50	7.62	8.10	7.70	8.02
	평균	8.08	8.16	8.62	8.12	7.96
	표준오차	0.33	0.28	0.24	0.18	0.17
대조군	101	6.81	7.62	8.34	N D.	7.94
	102	7.54	8.74	8.66	N D.	9.54
	103	7.21	8.82	8.42	N D.	8.58
	104	6.41	7.46	8.50	N D.	8.98
	평균	6.99	8.16	8.48	N D.	8.76
	표준오차	0.24	0.36	0.07	N D.	0.34

[0239]

[0240] 표 24: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌 심실 수축기말 직경 (LVIDs)의 경향

표 24

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVIDs (mm)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μL)	110	6.09	6.17	6.33	6.33	6.01
	111	5.77	7.30	6.09	6.01	5.85
	112	6.33	7.13	7.21	6.57	6.73
	113	6.41	6.81	6.97	6.97	6.89
	평균	6.15	6.85	6.65	6.47	6.37
	표준오차	0.14	0.25	0.26	0.20	0.26
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μL)	201	5.69	6.33	6.65	6.33	6.25
	202	6.81	6.65	7.05	6.33	5.37
	203	6.41	7.30	7.21	6.73	6.17
	204	6.57	6.09	6.17	5.93	5.85
	평균	6.37	6.59	6.77	6.33	5.91
	표준오차	0.24	0.26	0.23	0.16	0.20
대조군	101	5.37	6.33	6.97	N D.	6.73
	102	6.01	7.21	7.46	N D.	8.34
	103	6.01	7.54	7.38	N D.	7.70
	104	4.97	6.17	7.30	N D.	8.02
	평균	5.59	6.81	7.28	N D.	7.70
	표준오차	0.26	0.33	0.11	N D.	0.35

[0241]

[0242] 표 25: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌 심실 앞벽 확장말기 두께 (LVAWd = IVSTd)의 경향

표 25

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 IVSTd (mm)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μ L)	110	1.36	1.52	1.92	1.44	1.76
	111	1.76	1.20	1.92	1.44	1.52
	112	1.36	1.04	0.80	1.04	1.20
	113	1.20	1.52	1.28	1.20	1.36
	평균	1.42	1.32	1.48	1.28	1.46
	표준오차	0.12	0.12	0.27	0.10	0.12
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μ L)	201	1.44	1.36	1.12	1.20	1.20
	202	1.04	1.20	1.12	1.12	2.08
	203	1.28	1.12	1.28	0.88	1.36
	204	1.20	2.00	1.36	2.24	1.60
	평균	1.24	1.42	1.22	1.36	1.56
	표준오차	0.08	0.20	0.06	0.30	0.19
대조군	101	2.65	1.20	1.44	N D.	1.20
	102	2.40	1.20	1.04	N D.	0.72
	103	1.84	0.72	0.96	N D.	0.80
	104	2.16	1.12	1.36	N D.	0.96
	평균	2.26	1.06	1.20	N D.	0.92
	표준오차	0.17	0.11	0.12	N D.	0.11

[0243]

[0244]

표 26: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 좌심실 뒷벽 확장말기 두께 (LVPWTd)의 경향

표 26

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 LVPWTd (mm)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μ L)	110	1.36	1.20	2.08	2.08	1.68
	111	1.20	1.68	1.76	1.84	1.84
	112	1.36	1.44	1.68	1.68	1.68
	113	2.00	1.84	1.76	1.76	2.08
	평균	1.48	1.54	1.82	1.84	1.82
	표준오차	0.18	0.14	0.09	0.09	0.09
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μ L)	201	1.60	1.60	1.20	1.84	1.76
	202	1.76	1.12	1.68	1.44	1.20
	203	1.20	1.28	1.76	1.28	1.68
	204	1.28	1.20	1.28	1.84	1.60
	평균	1.46	1.30	1.48	1.60	1.56
	표준오차	0.13	0.11	0.14	0.14	0.12
대조군	101	1.28	1.36	1.20	N D.	2.08
	102	1.52	1.20	1.68	N D.	1.84
	103	1.28	1.36	1.44	N D.	1.68
	104	2.32	2.00	1.84	N D.	1.76
	평균	1.60	1.48	1.54	N D.	1.84
	표준오차	0.25	0.18	0.14	N D.	0.09

[0245]

[0246] 표 27: (표에서 "VCF"로 나타낸) CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여량에서의 차이로 인한 래트 심부전 모델의 심박수 (HR)의 경향

표 27

그룹들	동물 수	세포 주사 각 주 후의 HR (bpm)				
		0 주	2 주	4 주	6 주	8 주
+ VCF (2.0e6 cells/ 50 μ L)	110	335.00	359.00	368.00	313.00	306.00
	111	359.00	343.00	319.00	313.00	319.00
	112	359.00	300.00	359.00	359.00	343.00
	113	343.00	335.00	368.00	319.00	380.00
	평균	349.00	334.25	353.50	326.00	337.00
	표준오차	6.00	12.46	11.69	11.09	16.25
+ VCF (5.0e5 cells/ 50 μ L)	201	380.00	351.00	351.00	359.00	351.00
	202	390.00	411.00	328.00	359.00	390.00
	203	359.00	343.00	343.00	343.00	343.00
	204	351.00	313.00	335.00	351.00	313.00
	평균	370.00	354.50	339.25	353.00	349.25
	표준오차	9.05	20.53	4.97	3.83	15.86
대조군	101	380.00	368.00	343.00	N D.	319.00
	102	435.00	368.00	359.00	N D.	359.00
	103	306.00	343.00	328.00	N D.	328.00
	104	400.00	335.00	380.00	N D.	343.00
	평균	380.25	353.50	352.50	N D.	337.25
	표준오차	27.23	8.53	11.14	N D.	8.78

[0247]

[0248] <돼지 만성 심부전 모델에서 CD106+ 인간 섬유아세포들의 치료적 효과>

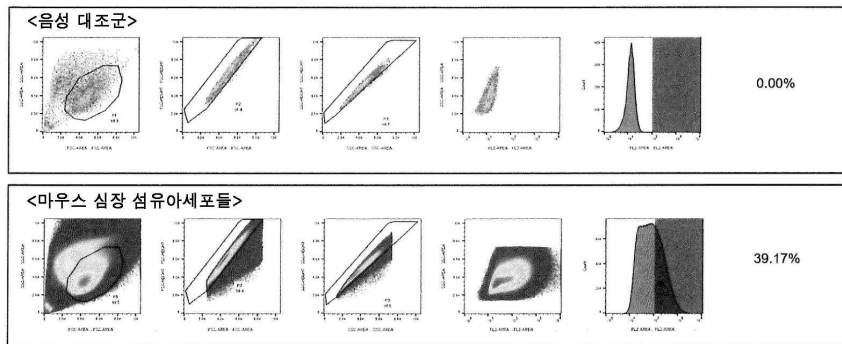
[0249] 그 뒤에, 만성 심부전 모델이 그 심장이 인간 심장과 해부학적 및 생리학적으로 가까운 것으로 보고된 돼지를 이용하여 제조되었고, 심부전에 대한 CD106+ 인간 섬유아세포들의 치료적 효과가 평가되었다. 그 결과들은 도 15, 16, 및 17에 보여진다. CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여 전 날, LVEF는 43%였고; SV는 30.4 mL였고; EDV는 70.5 mL였고; ESV는 40.0 mL였고; HR은 100 bpm였고; PFR는 231 mL/s였고; 그리고 PER은 161 mL/s였다. ROI 분석에 의하여 계산된 경색부 중량 (섬유증 영역 중량) 10.2 g이었고, 좌심실 심장 근육 중량이 78.1 g였고, 경색 영역 (섬유증 영역) (%)은 13.1%로 발견되었다.

[0250] 반면, CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여 4 주 후, LVEF는 58%였고; SV는 38.6 mL였고; EDV는 66.9 mL였고; ESV는 28.2 mL였고; HR은 98 bpm였고; PFR은 232 mL/s였고; PER은 215 mL/s였다. 15%의 LVEF 개선 및 8.2 mL의 SV 개선이 CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여 4 주 후에 달성될 수 있다는 것이 명확하여졌다. 나아가, ESV가 11.8 mL까지 감소되었고, PER이 54 mL/s까지 증가되었기 때문에, 심장 기능들의 개선이 명확하여졌다. 나아가, ROI 분석에 의한 경색부 중량 (섬유증 영역 중량)이 8.23 g, 그리고 좌심실 심장 근육 중량이 89.2 g였기 때문에, 경색 영역 (섬유증 영역) (%)은 9.23%로 발견되었다. 이 결과로부터, CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여가 1.97 g까지 경색부 중량 (섬유증 영역 중량)의 감소를 야기한다는 것이 명확하여졌다.

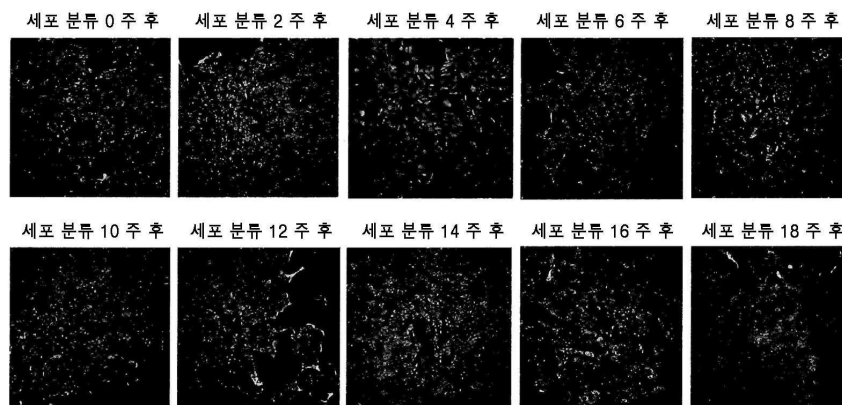
[0251] CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여 8주 후, LVEF는 52%였고; SV는 35.9 mL였고; EDV는 69.2 mL였고; ESV는 33.3 mL였고; HR은 92 bpm이었고; PFR는 263 mL/s였고; PER은 156 mL/s이었다. 8%의 LVEF의 개선이 CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여 8주 후 달성될 수 있다는 것이 명확하여졌다. 나아가 ROI 분석에 의하여 계산된 경색부 중량 (섬유증 영역 중량)이 8.51 g이었고, 좌심실 심장 근육 중량이 91.6 g이었기 때문에, 경색 영역 (섬유증 영역) (%)은 9.29%인 것을 알게 되었다. 이 결과로부터, CD106+ 인간 섬유아세포들의 투여가 투여 8주 후에 1.69g의 경색부 중량 (섬유증 영역 중량)의 감소를 야기한다는 것이 명확하여졌다. 경색/섬유증 영역 (%)는 이식 4주 후의 그것에서 거의 변하지 않았다. 이 결과로부터, CD106+ 인간 섬유아세포들이 인간과 해부학적 및 생리학적으로 유사하다고 보고된 돼지의 심부전에서도 심장 기능들의 회복에 매우 효과적이라는 것이 명확하여졌다.

도면

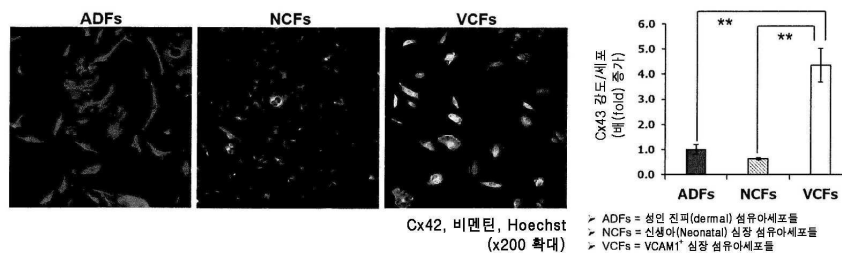
도면1a



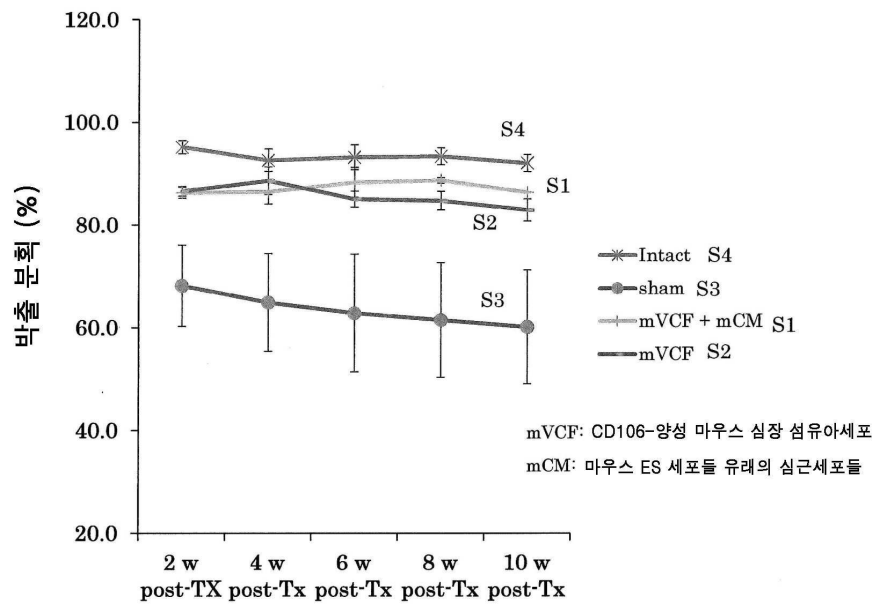
도면1b



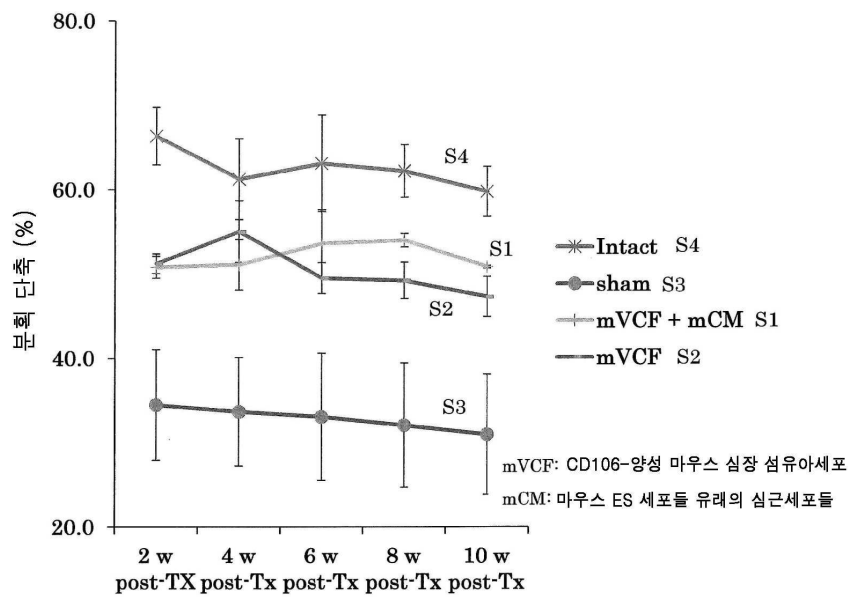
도면1c



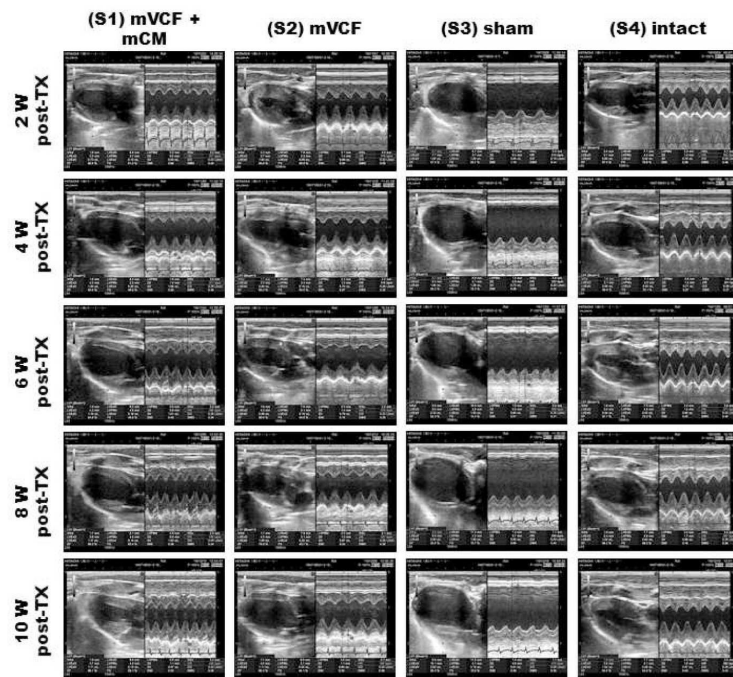
도면2a



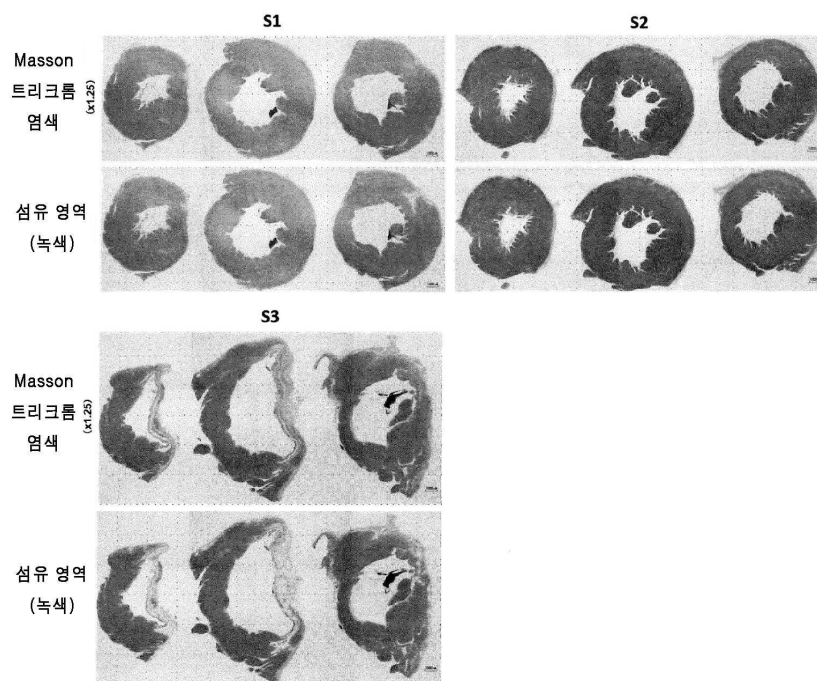
도면2b



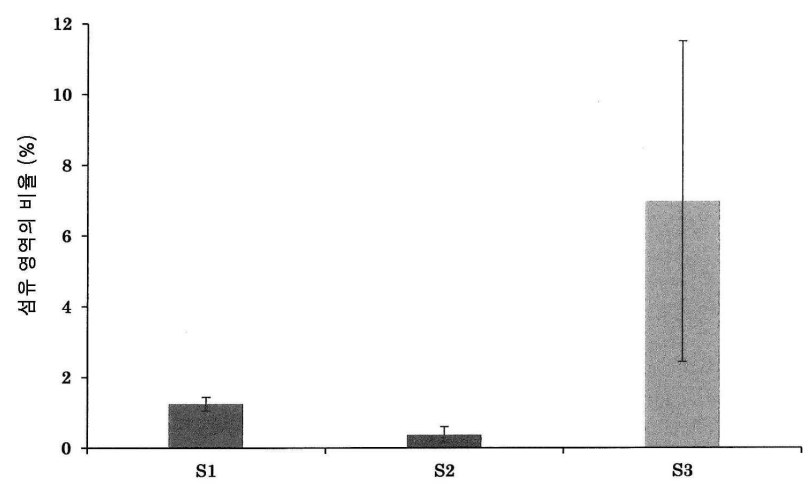
도면2c



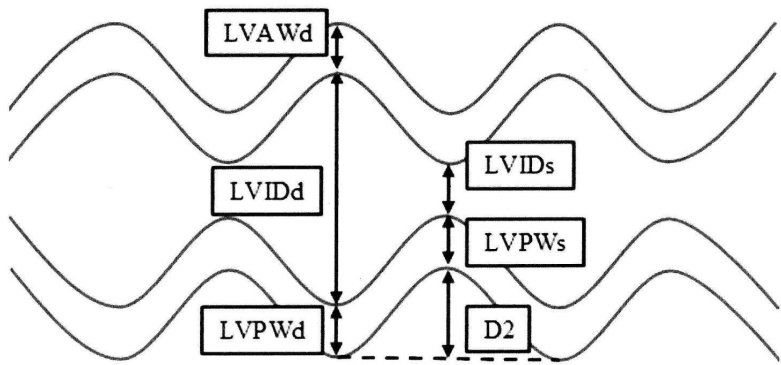
도면3a



도면3b

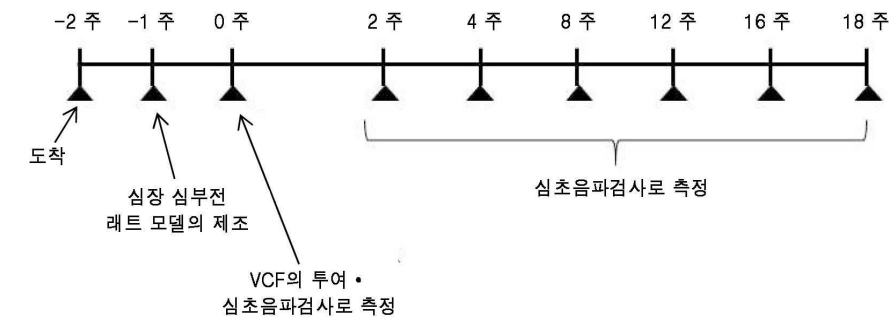


도면4



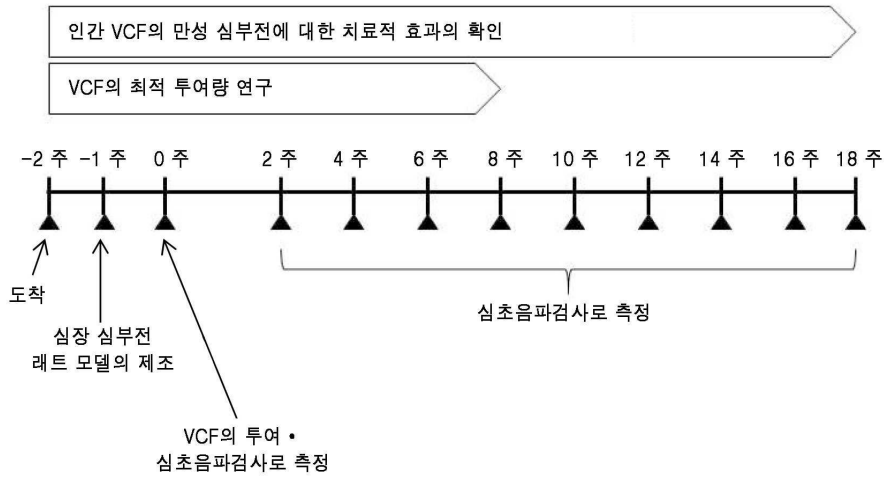
도면5

VCF : CD106-양성 래트 심장 섬유아세포



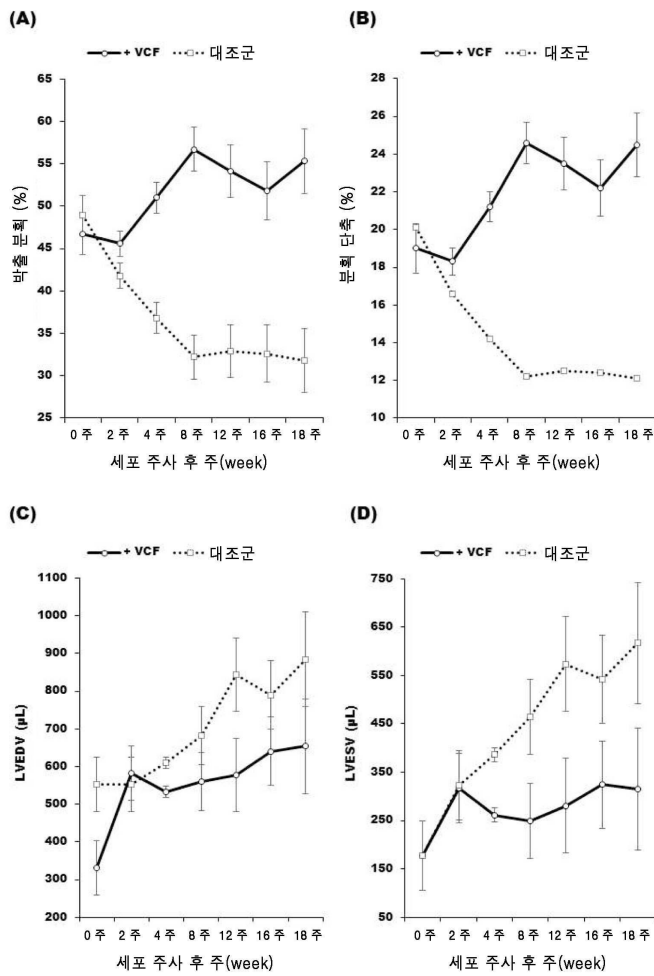
도면6

VCF : CD106-양성 인간 심장 섬유아세포

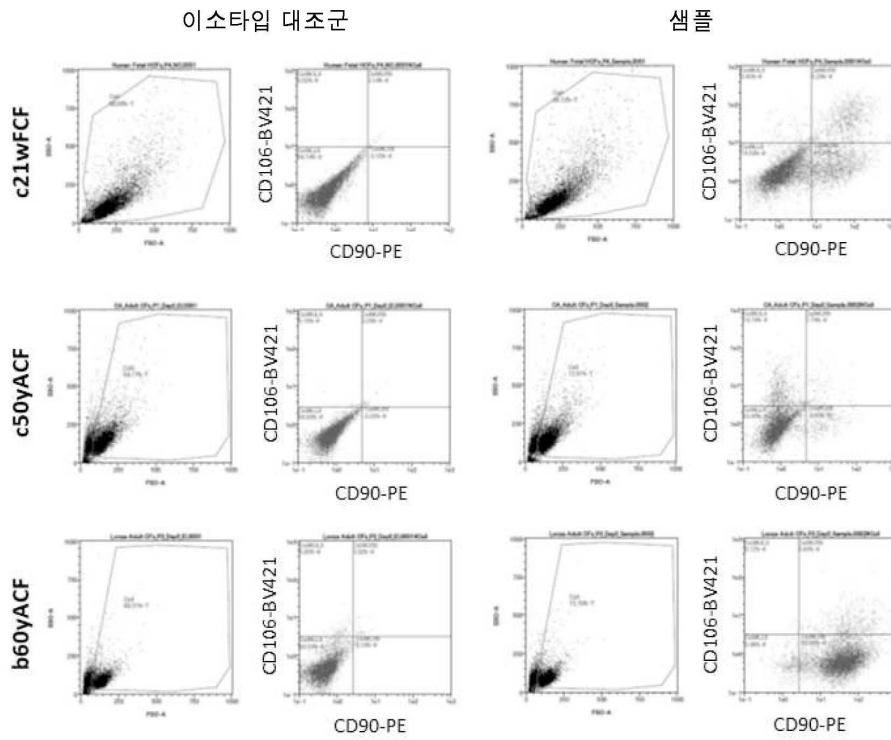


도면7

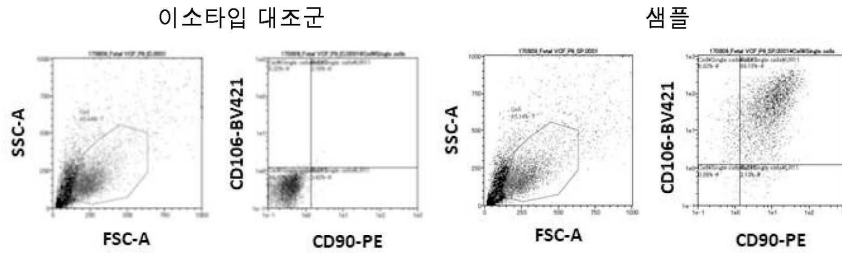
VCF : CD106-양성 래트 심장 섬유아세포



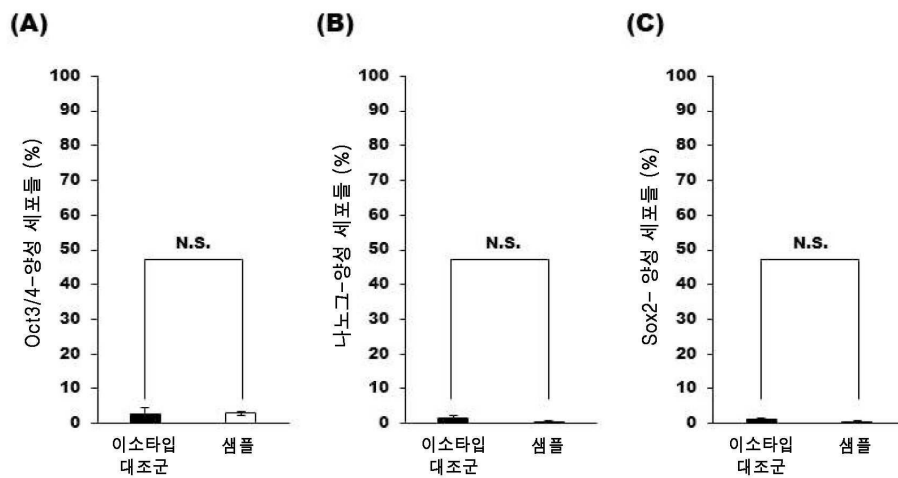
도면8



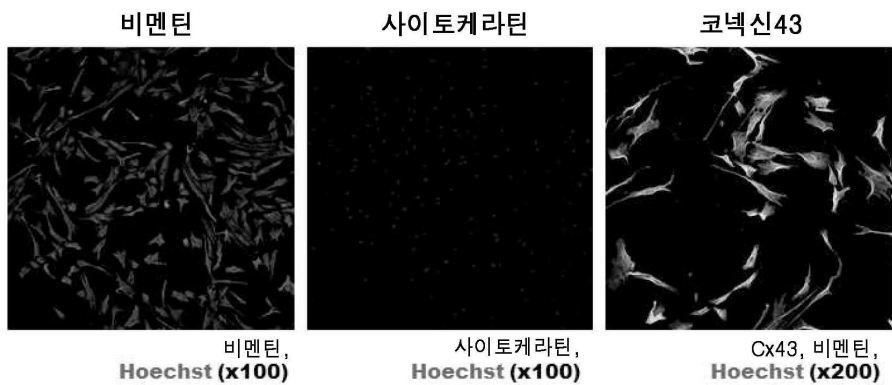
도면9



도면10



도면11



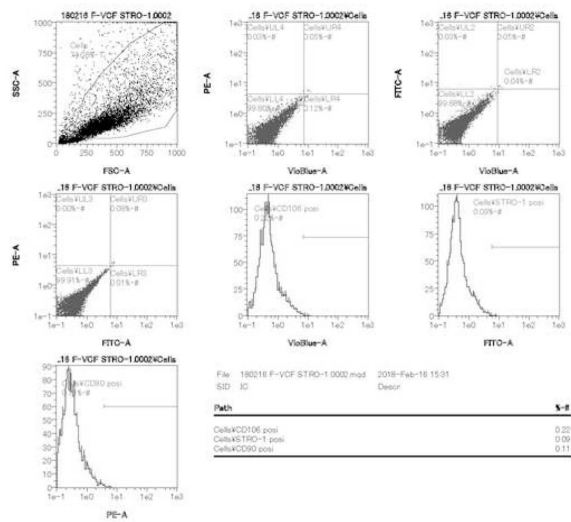
비멘틴,
Hoechst (x100)

사이토케라틴,
Hoechst (x100)

Cx43, 비멘틴,
Hoechst (x200)

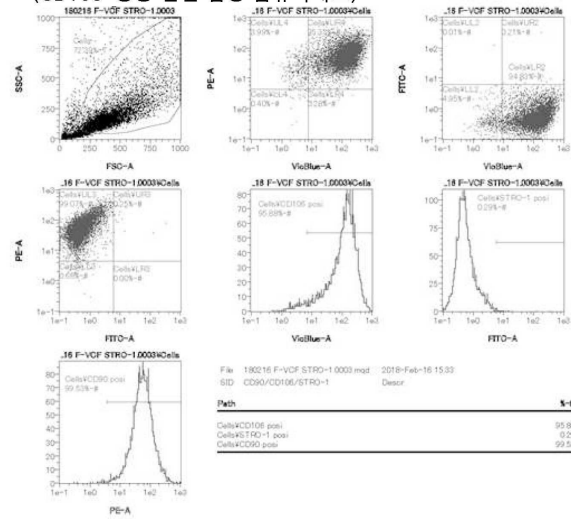
도면12

<음성 대조군>



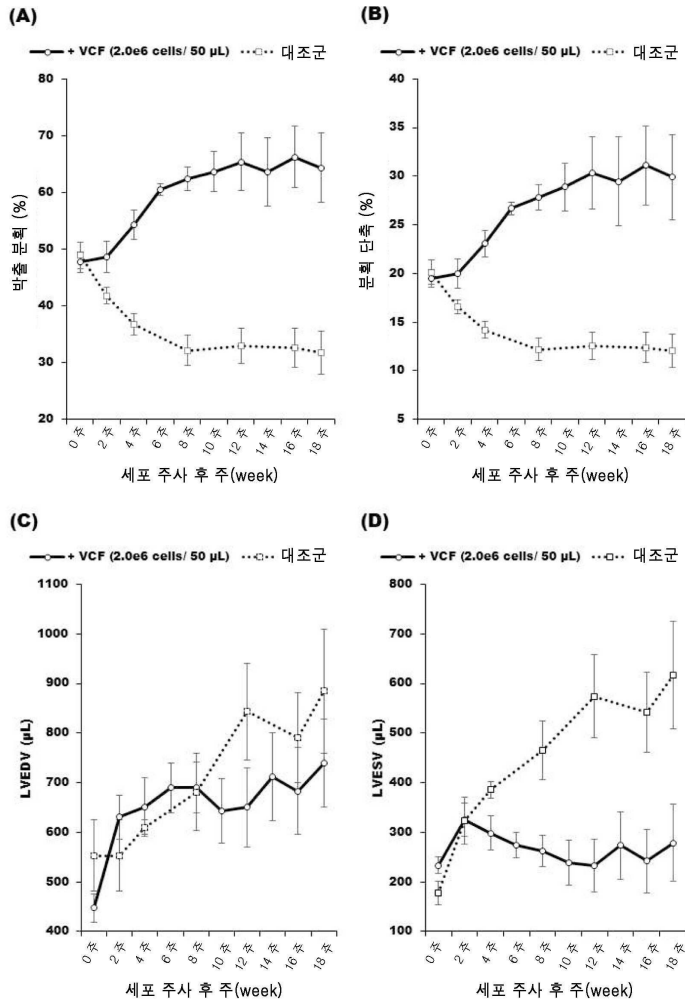
<VCF>

(CD106-양성 인간 심장 섬유아세포)



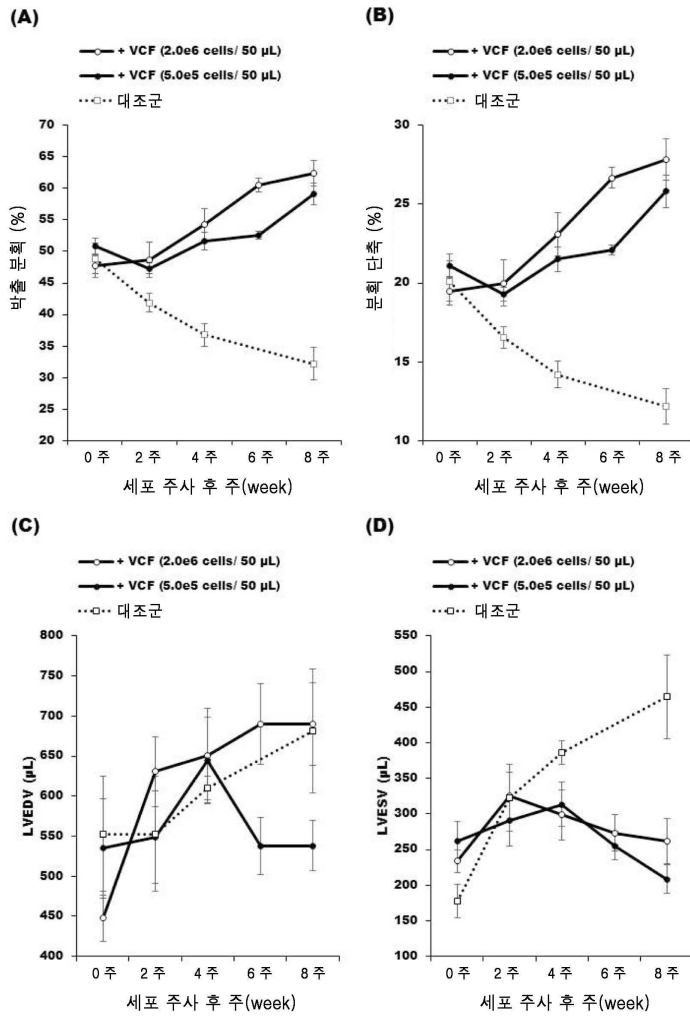
도면13

VCF : CD106-양성 인간 심장 섬유아세포

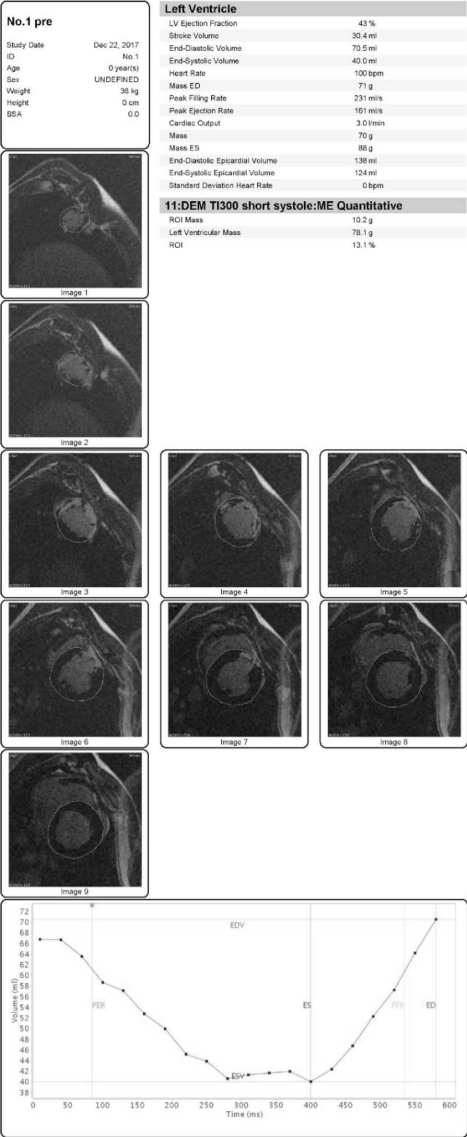


도면14

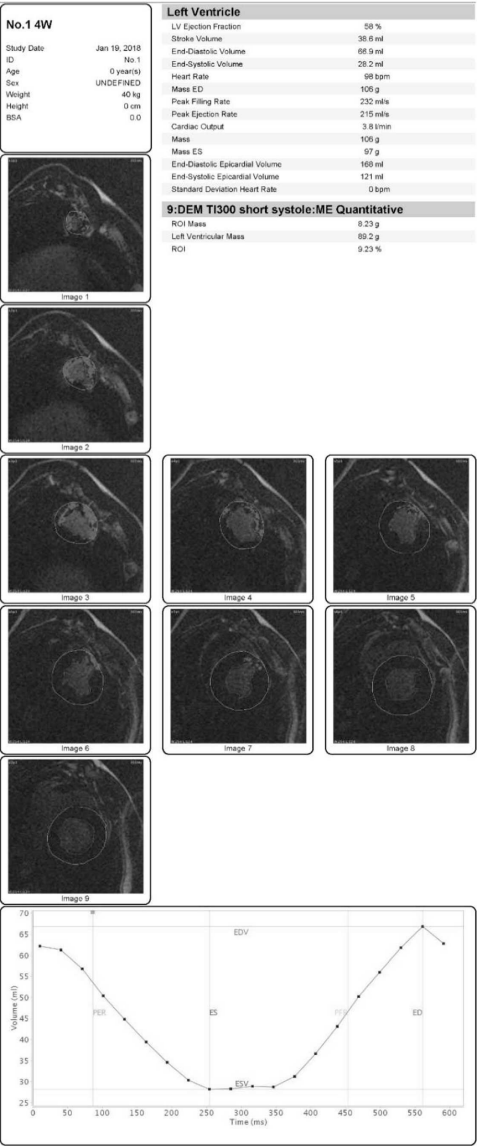
VCF : CD106-양성 인간 심장 섬유아세포



도면15



도면16



도면17

