(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0119497
(43) 공개일자 2007년12월20일

(51) Int. Cl.
C12N 5/08 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0053275
(22) 출원일자 2007년05월31일
심사청구일자 2007년05월31일
(30) 우선권주장
1020060054071 2006년06월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 알앤엘바이오
서울 관악구 봉천동 1596-7
(72) 발명자
라정찬
경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을SK.
한화아파트 626-701
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 6 항

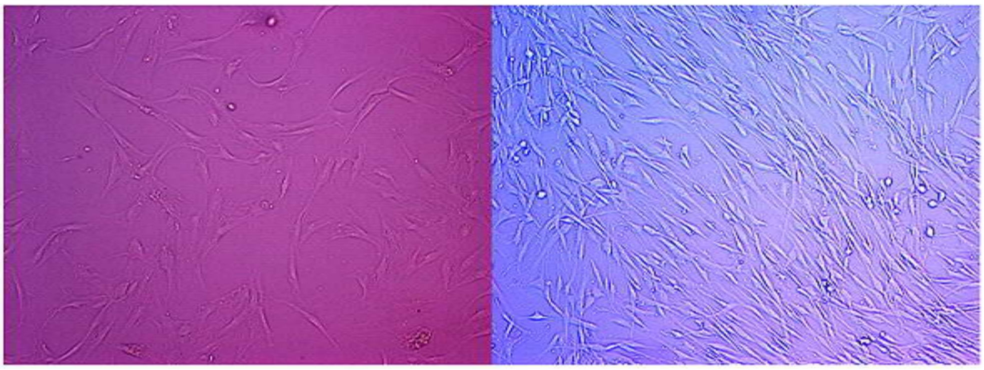
(54) 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포, 섬유아세포 및지방 또는 지방세포를 함유한 피부미용 또는 성형용 조성물의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 피부 미용 또는 성형용 조성물은 피부 탄력을 높이고, 주름 및 피부 처짐을 개선하며, 함몰부위를 성형을 통해 복구하도록 함으로써 미용에 효과적일 뿐만 아니라, 상기 성체 줄기세포가 지방세포로 분화할 수 있어 유방 조직 형성 등에도 유용하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 유방 조직 형성용 또는 주름제거용인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

다음의 단계를 포함하는, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법:

(a) 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에 의해 얻어진 지방 함유 suspension을 배양용기에서 배양한 다음, 상기 배양용기 표면에 부착된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수하는 단계; 및

(b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중배엽 유래 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 지방 유래 성체 줄기세포는 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한 α-MEM 배지에서 배양하여 지방세포로 분화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법:

(a) 인간 지방조직 유래 펠렛을 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양하여 지방 유래 성체 줄기세포를 제조한 다음, 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 회수하는 단계; 및

(b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<4> 본 발명은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물 그 제조방법에 관한 것이다.

<5> 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포로, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.

<6> 최근, 지방 조직이 다분화능 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다(B. Cousin *et al.*, *BBRC*, 301:1016, 2003; A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 189:54, 2001; M.J. Seo *et al.*, *BBRC*, 328:258, 2005). 즉, 지방추출(지방흡입술(liposuction))에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것이 in vitro상에서 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는다는 것이 보고되었다(P.A. Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M. Rodriguez *et al.*,

BBRC, 315:255, 2004). 아울러 지방 조직 유래 세포가 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있다는 것이 동물 모델 실험을 통하여 알려진 바 있다. 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점이 있어, 기존의 단점을 보완하는 새로운 줄기세포의 소스로 주목받고 있다.

<7> 지금까지 알려진 지방 유래 줄기세포로는 상피세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기 세포 (M. Brzoska *et al.*, *BBRC*, 330:142, 2005), 골 형성 및 지방 세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포 (Y. Cao *et al.*, *BBRC*, 332:370, 2005), 신경세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포 (K.M. Safford *et al.*, *BBRC*, 294:371, 2005), 지방세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (R. Ogawa *et al.*, *BBRC*, 319:511, 2004), 골 형성 및 연골 형성세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (R. Ogawa *et al.*, *BBRC*, 313:871, 2004), 연골세포로 분화가능한 인간 지방 유래 줄기세포 (H.A. Awad *et al.*, *Biomaterials*, 25:3211, 2004), 신경 세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (J. Fujimura *et al.*, *BBRC*, 333:116, 2005) 및 골세포, 연골세포, 신경세포 또는 근육세포로 분화가능한 지방 유래 줄기세포 (미국특허 6,777,231) 등이 있다.

<8> 현재까지 이러한 지방 유래 줄기세포는 주로 난치병 등의 치료를 포함한 의학 분야에서 이용하고자 하는 노력이 계속되었으나, 미용 또는 성형을 목적으로 줄기세포를 이용하고자 하는 시도는 미비하였다.

<9> 이에 본 발명자들은 주름 개선, 피부의 처짐 방지 등의 미용 및 성형 분야에 줄기세포를 이용하고자 예의 노력한 결과, 지방흡입술 (liposuction)으로부터 얻어진 지방 함유 suspension을 배양하여 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수한 다음, 지방과 혼합한 결과, 미용 및 성형에 효과적이라는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<10> 본 발명의 목적은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유 아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 미용 또는 성형용 조성물 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<11> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 인간 지방 조직의 지방흡입술 (liposuction)에 의해 얻어진 지방 함유 suspension을 배양용기에서 배양한 다음, 상기 배양용기에 부착된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계를 포함하는, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법을 제공한다.

<12> 본 발명은 또한, (a) 인간 지방조직 유래 펠렛을 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양하여 지방 유래 성체 줄기세포를 제조한 다음, 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계를 포함하는, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법을 제공한다.

<13> 본 발명은 또한, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제공한다.

<14> 본 발명은 일 관점에서, 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유 아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 미용 또는 성형용 조성물에 관한 것이다.

<15> 본 발명에 따른 조성물은 유방 조직 형성을 통한 가슴 확대용 또는 주름제거용인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대, 미세지방 이식술, 자가지방 이식술 등 얼굴의 얼굴의 팔자 주름 및 미간주름 제거 및 탄력 유지를 목적으로 사용할 수도 있다. 본 발명에 따른 조성물에 함유되는 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유 아세포 및 지방은 자가 유래 세포인 것이 바람직하다.

<16> 본 발명에 따른 미용 또는 성형용 조성물은 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에서 얻어지는 지방 함유 suspension을 배양하여 수득된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 기타 다른 세포 또는 조직과 혼합하여 제조할 수 있다.

<17> 일 구현예에서, 피부 미용 또는 성형용 조성물은 다음 단계를 거쳐 제조할 수 있다: (a) 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에 의해 얻어진 지방 함유 suspension을 배양용기에서 배양한 다음, 상기 배양용기에 부착된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체

줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

<18> 더욱 구체적으로는, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 및 섬유아세포를 회수 직전에 생리식염수로 1회 세척하여 상층액의 잔여 지방 및 혈구세포 등을 제거하고, 바닥에 부착된 줄기세포 및 섬유아세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접회수하거나, 또는 원심분리하여 원심분리된 세포층을 회수하여, 지방과 혼합하여 제조한다.

<19> 본 발명에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중배엽 유래 세포인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 중배엽 유래 세포는 지방세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

<20> 본 발명에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한 α-MEM 배지에 배양하여 지방세포로 분화되는 것을 특징으로 할 수 있다.

<21> 다른 구현예에서, 피부 미용 또는 성형용 조성물은 다음 단계를 거쳐 제조할 수 있다: (a) 인간 지방조직 유래 펠렛을 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양하여 지방 유래 성체 줄기세포를 제조한 다음, 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

<22> 상기 지방흡입술(liposuction)은 지방 제거의 미용 또는 성형 수술의 한 기법으로서, 지방질 부분을 절개하여 진공 펌프로 지방질을 뽑아내는 것 또는 주사기의 압력으로 뽑아내는 것을 의미한다.

<23> 본 발명에 있어서, 지방 또는 지방세포는 인간 지방 조직의 지방흡입술 (liposuction)에서 부수적으로 얻어지는 것을 사용할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에서 지방은 지방조직을 포함한다.

<24> 본 발명의 피부 미용 또는 성형용 조성물은 지방을 사용할 경우에는 지방조직은 1ml에 대하여 1×10^{4}~1×10^{7}개의 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 함유하는 것이 바람직하고, 지방세포를 사용할 경우에는 지방유래 줄기세포와 섬유아세포의 총세포수에 대하여 1~50배의 지방세포를 사용하는 것이 바람직하다.

<25> 아울러, 섬유아세포(fibroblast)는 섬유성 결합조직의 중요한 성분을 이루는 세포로서, 섬유세포라고도 한다. 조직절편으로 관찰하면 편평하고 길쭉한 외형을 가지며 흔히 불규칙한 돌기를 보인다. 세포질은 미토콘드리아, 골지체, 중심체, 소지방체 등을 포함하고 그 밖에 특수한 분화는 나타내지 않는다. 핵은 염색성이 약하고 타원형이며 인을 함유한다. 교원섬유에 밀접해 있는 경우가 많고, 그 형성에 관계가 있다고 생각되므로 상기와 같은 명칭이 붙었다. 본 발명에서 상기 섬유아세포는 지방조직으로부터 줄기세포를 분리하는 과정에서 함께 분리할 수 있다.

<26> 한편, 상기에서 수득한 인간 지방조직 유래 줄기세포액으로부터 목적의 표면항원을 발현하고 있는 다분화능 줄기세포를 수득하는 방법으로서는 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법 (*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 다분화능 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법 (*J. Immunol.*, 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 대량의 배양액 등으로부터 다분화능 줄기세포를 수득하는 방법으로서는, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.

<27> 플로우 사이토미터 소팅 방식으로서는, 수적하전 방식, 셀캡쳐 방식 등을 들 수 있다. 어떠한 방법도 세포의 표면항원을 특이적으로 인식하는 항체를 형광으로 표지하고, 표지된 항체와 항원의 결합체에 대한 형광을 측정하여 형광 강도를 전기 신호로 변환함으로서 세포의 항원 발현량을 정량할 수 있다. 또한, 사용하는 형광물질의 종류를 조합함으로서, 복수의 표면 항원을 발현하고 있는 세포를 분리하는 것도 가능하다. 여기에 사용가능한 형광물질로는, FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), APC (allo-phycocyanin), TR (TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.

<28> 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서는, 상기에서 수득한 줄기세포용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과 한번 적당한 배지 중에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다. 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 세포샘플을 혼합하고, 얼음 위에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않는 경우에는 세정 후 일차 항체에 대해서 결합 활성을 갖는 형광 표지된 이차 항체와 일차 항체가 반응한 세포를 혼합하고, 다시 얼음물에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 세정 후, 일차 항체와 이차 항체에서 염색된 세포를 플로우 사이토미터로 분리를

실시한다.

<29> 본 발명에 따른 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유 아세포 및 지방을 함유하는 조성물은 피부 탄력을 높이고, 주름 특히 얼굴의 팔자 주름 및 미간주름과 피부 처짐을 개선하며, 함몰부위를 성형을 통해 복구하도록 함으로써 미용에 효과적이다. 아울러, 상기 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포는 지방세포로 분화할 수 있으므로 본 발명에 따른 조성물은 유방 조직 형성 등에도 유용하다.

<30> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<31> <u>실시예 1 : 지방조직에서 다분화능 성체 줄기세포의 분리 및 성형용 조성물의 제조</u>

<32> <u>제조예 1</u>

<33> 인간 지방조직의 지방흡입술(liposuction)에서 부수적으로 얻어지는 생리식염수에 부유된 지방함유 suspension을 적정양의 생리식염수로 고르게 재부유하여 세포배양용 flask 또는 roller bottle에 적당량을 넣은 다음, 정치 배양 또는 회전배양을 하였다. 정치 배양의 경우, 최소 6시간 내지 12시간 동안 정치하였다. 그 다음으로, 플라스크 표면에 부착되는 세포층(지방유래 MSC, fibroblast)을 트립신으로 처리하여 회수하였다 (도 1). 이때, 소량의 생리식염수에 부유된 것을 직접 회수하여 바로 사용하거나, 세포층의 부피를 줄이고자 할 경우, 상기 생리식염수로 회수한 세포층을 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 가라앉는 펠렛층만을 사용하였다. 상기 분리된 세포층에는 성체줄기세포와 섬유아세포가 함유되어 있다. 상기 분리된 세포층을 지방과 혼합하여 본 발명에 따른 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제조하였다.

<34> <u>제조예 2</u>

<35> 인간 지방조직으로부터 다분화능 줄기세포를 분리 및 정제하였다. 즉, 분리된 인간 지방조직을 PBS로 3번 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후, collagenase type1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM-LG(low glucose) 배지를 이용해 지방과 DMEM을 1:3의 비율로 혼합하여 37℃에서 1시간동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 1:1로 혼합한 10%FBS와 DMEM-LG(low glucose)로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100㎛ mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 인큐베이션하였다. 하룻밤 지난 후 붙지않은 세포들은 PBS로 세척하고, K-NAC media(Keratinocyte-SFM media + 2mM NAC + 0.2mM ascorbic acid + 0.09mM calcium + 5ng/ml rEGF + 50㎍/ml BPE + 5㎍/ml insulin + 74ng/ml hydrocortisone)를 2일마다 교체하면서 배양하여 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포 및 섬유아세포액을 수득하였다. 상기 수득된 세포에 지방을 혼합하여 본 발명에 따른 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제조하였다.

<36> <u>실시예 2: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 면역학적 특성</u>

<37> 실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 성체 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분동안 1000rpm으로 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 2% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 sample수 만큼 1×10^5 cells을 분주한 후 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 150㎕의 블로킹용액 (5% FBS in PBS)을 넣은 후 잘 혼합하여 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거하고, 100㎕의 블로킹용액 (5% FBS in PBS)을 넣은 후 잘 혼합하여 4℃에서 30분동안 반응시켰다. 다시 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리한 후, 상층액을 제거하고, 150㎕의 블로킹용액(5% FBS in PBS)을 넣은 후 잘 혼합하고, 각 well에 antibody(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 4℃에서 30분동안 반응시켰다. 반응 후에 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분동안 4℃에서 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 200㎕의 PBS에 잘 섞은 후 1% paraformaldehyde을 넣어서 single화 하고, 플로우 사이토미터를 이용하여 분석하였다.

표 1

<38> 지방유래 줄기세포의 표면항원분석(FACS analysis)

Antigen	AD-MSCs
CD73	+
CD90	+
CD29	+
CD44	+
CD105	+
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

<39> 그 결과, 표 1에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 지방조직 유래 성체 줄기세포는 CD73에 대해서는 91%, CD90에 대해서는 97%, CD29에 대해서는 96%, CD44에 대해서는 83%, CD105에 대해서는 80%의 양성반응을 보였다. 또한, 다른 항원에 대한 면역표현형을 확인한 결과, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내었다.

<40> <u>실시예 3: 지방조직 유래 줄기세포의 면역염색분석</u>

<41> 상기 실시예 1에서 수득된 지방조직 유래 줄기세포를 PBS로 세 번 세척하고, 4% paraformaldehyde을 함유한 PBS로 30분간 고정하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 0.1% Triton-X100을 함유한 PBS로 10분간 침투(permeabilization)시킨다. PBS로 세 번 세척한 후, 10% NGS로 1시간동안 반응시키고, 1차항체를 함유한 PBS에 하룻밤동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 2차항체로 암실에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후, mounting하였다.

<42> 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 스피어는 미분화상태의 세포 마커라고 할 수 있는 Oct4 및 중간엽 줄기세포의 마커인 SH2(CD105), SH3/4(CD73)에 대하여 양성반응을 나타내었다.

<43> <u>실시예 4: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화</u>

<44> 실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포를 5% FBS, 1μM dexamethasone, 200μM indomethacin, 10㎍/ml insulin, 0.5mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)을 함유한 α-MEM 배지에서 2주동안 배양하여 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

<45> <u>실시예 5: 지방 유래 다분화능 줄기세포를 이용한 동물 실험</u>

<46> 마우스를 이용하여, 지방조직 유래 줄기세포의 지방 부피 보존능을 확인하였다. 마우스는 실험군 12 마리와 대조군 12마리를 사용하였으며, 실험군에는 지방1ml와 실시예 1에서 분리된 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포 및 섬유아세포(5×10^5/200μl saline)를 마우스에서 피하지방이 없는 부위인 두부피하에 주입하였으며, 대조군에는 지방1ml+vehicle(200ul saline)을 주입하였다.

<47> 15일이 경과한 후, 마우스의 두피를 절개하여 지방을 떼어낸 후, 부피를 측정하였다. 그 결과, 대조군에서는 주입한 지방부피가 31%로 축소된 반면, 실시예 1에서 제조한 조성물을 함께 주입한 실험군에서는 주입한 지방 부피의 45%가 유지되었다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 지방조직 유래 줄기세포와 섬유아 세포는 지방 이식술에서 발생되는 지방 부피 저하를 상당히 감소시키는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

<48> 이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따른 피부 미용 또는 성형용 조성물은 피부 탄력을 높이고, 주름 및 피부 처짐을 개선하며, 함몰부위를 성형을 통해 복구하도록 함으로써 미용에 효과적일 뿐만 아니라, 상기 성체 줄기세포가 지방세포로 분화할 수 있어 유방 조직 형성 등에도 유용하다.

<49> 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다

도면의 간단한 설명

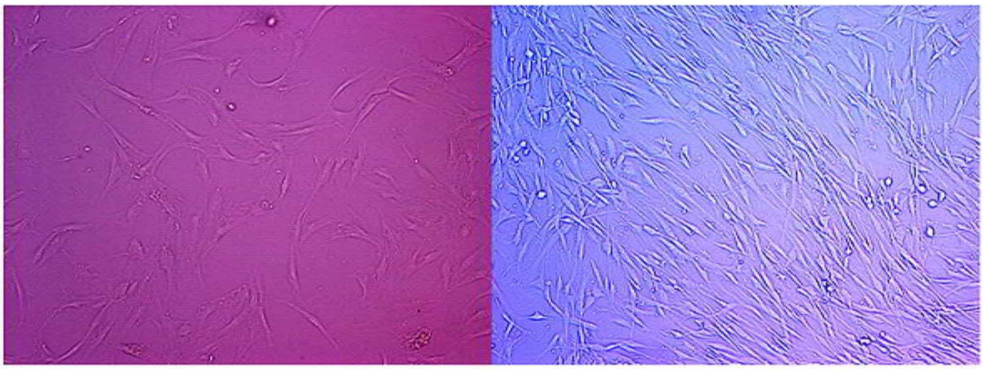
<1> 도 1은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포, 섬유아세포 등을 포함한 플라스크에 부착하는 세포를 100배 배율로 촬영한 사진이다.

<2> 도 2는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 함유 MEBM 배지에서 sphere culture한 후 면역염색을 이용하여 Nestin, Oct4, SH2, SH3/4가 발현한 결과를 100배 배율로 나타낸 사진이다.

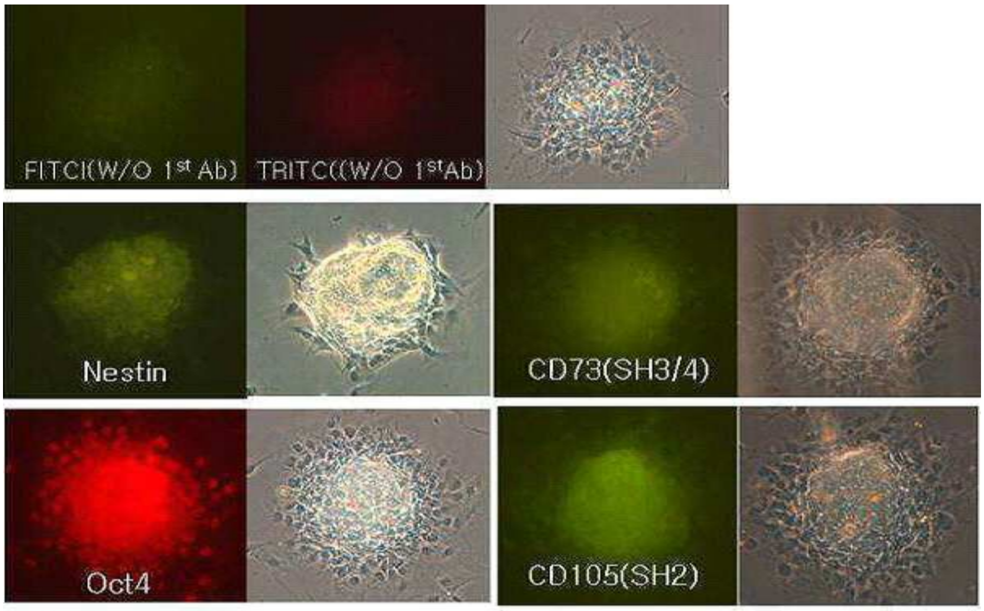
<3> 도 3은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 지방세포를 200배 배율로 나타낸 것이다 (A: 분화된 상태의 phase contrast, B: Oil Red O 염색법으로 염색한 것).

도면

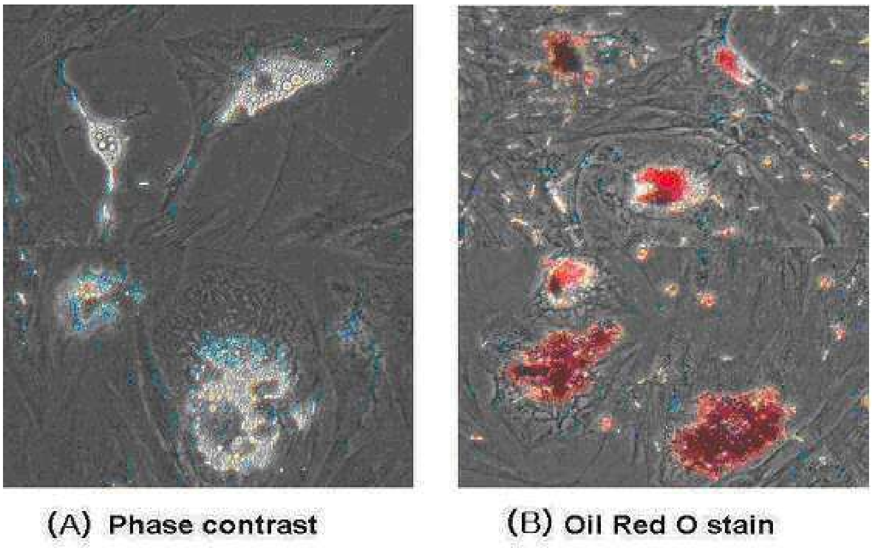
도면1



도면2


FITC(W/O 1st Ab)
TRITC((W/O 1stAb)
Nestin
CD73(SH3/4)
Oct4
CD105(SH2)

도면3


(A) Phase contrast
(B) Oil Red O stain