

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/0775 C12N 5/02 C12Q 1/02 C07K 14/475
Published Date	20130131
Registration No.	1012235110000
Registration Date	20130111
Application No.	1020100103951
Application Date	20101025
Unexamined Publication No.	1020110044722
Unexamined Publication Date	20110429
Priority Claims	1020090101117 20091023 KR
Requested Date of Examination	20101025
Agent.	LEECHYOYOUNG
Inventor	Ra, Jeong Chan Kang, Sung Keun Baek, Sun Jin
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

발명의 명칭

지방조직 유래 성체 줄기세포 이동을 유도하는 방법

Title of Invention

The method of inducing adipose tissue originated adult stem cell movement.

요약

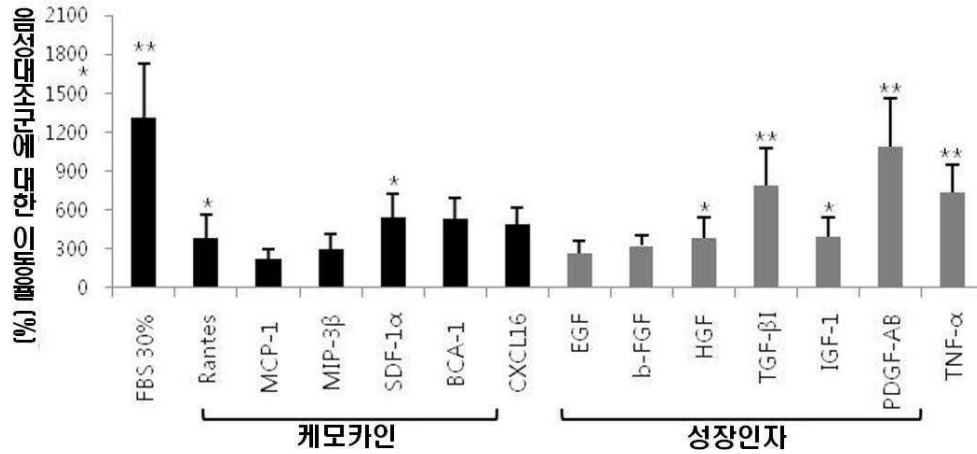
본 발명은 지방조직 유래 성체 줄기세포의 세포 이동(cell migration) 능력에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 이의 특정 분비물이, 특히, 특정 케모카인 또는 성장인자로 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기세포가 보다 효과적으로 체내 질환 부위로 이동해 가는, 지방 줄기 세포의 신규 용도에 관한 것이다

본 발명에 따른 지방유래 성체 줄기세포 또는 특정 케모카인 또는 성장인자로 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기세포 함유 조성물은 정맥 투여 등의 간단한 방법에 의해, 줄기세포의 질환부위로의 타겟팅(targetting)을 유도할 수 있으므로 세포치료제로서의 활용에 유용하다.

Abstract

The invention relates to the new use in which the adipose tissue originated adult stem cell in which the adipose tissue originated adult stem cell and more detailed its specific secretion are pre-processed to especially, the specific chemokine or the growth factor as the cell migration capability of the adipose tissue originated adult stem cell more effectively moves to the internal disease part of the adipose stem cell The adipose tissue originated adult stem cell containing composition pre-processed to the fat originated adult stem cell according to the present invention, the specific chemokine, or the growth factor is useful in the application as the cell therapy product the targeting (targetting) to the disease part of the stem cell can be induced with the simple method including the intravenous administration etc.

대표도면 (Representative drawing)



청구의 범위

청구 1항:

지방조직 유래 성체 줄기세포 및 이의 분비물 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 지방 줄기세포 이동 유도용 조성물.

청구 2항:

제1항에 있어서, 지방조직 유래 성체 줄기세포는 케모카인 또는 성장인자 수용체를 표면에 발현하거나, 이의 분비물은 케모카인 또는 성장인자 수용체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포의 분비물은 아디포넥틴 또는 렙틴인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 4항:

제1항에 있어서, 상기 조성물은 FBS(Fetal bovine serum)를 추가로 더 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 5항:

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 케모카인 또는 성장인자는 란테스(Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3β(Monocyte inflammatory protein-3β), SDF-1α(Stromal cell-derived factor-1α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF(basic Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte growth factor), TGF-β1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platel

Scope of Claims

Claim 1:

The composition for the adipose stem cell induction of movement containing the adipose tissue originated adult stem cell and one or greater among its secretion as a active ingredient.

Claim 2:

As for claim 1, the composition, wherein the adipose tissue originated adult stem cell comprises its secretion is the chemokine or the growth factor receptor the chemokine or the growth factor receptor is expressed in surface.

Claim 3:

As for claim 1, the composition called the secretion of the adipose tissue originated adult stem cell is the adiponectin or the leptin.

Claim 4:

As for claim 1, the composition in which the composition additionally more contains the FBS (Fetal bovine serum).

Claim 5:

As for claim 1 or 4, the composition called selected at least one kind in group comprised of the chemokine or the growth factor is the rantes, the MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3β (Monocyte inflammatory protein-3β), the SDF-1α (Stromal cell-derived factor-1α), the BCA-1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth

et Derived Growth Factor AB) 및 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 6항:

제1항에 있어서, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로 전처리(priming)된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 7항:

제6항에 있어서, 상기 콕테일은 란테스(Rantes), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte growth factor), TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 8항:

제7항에 있어서, 상기 콕테일은 란테스(Rantes), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), HGF(Hepatocyte growth factor), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 9항:

제1항에 있어서, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 인간 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포(Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 10항:

제1항에 있어서, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 1×10^7 cells 내지 1×10^{10} cells 수로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구 11항:

- (a) 지방조직 유래 성체 줄기 세포에 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 단계;
- (b) 상기 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기 세포 및 이의 분비물을 함유하는 조성물을 질환 부위와 직접 접촉하지 않는 생체

h factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF- 1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor- α).

Claim 6:

As for claim 1, the composition consisting of the cocktail in which the adipose tissue originated adult stem cell contains the chemokine or the growth factor with the preprocessing (priming).

Claim 7:

As for claim 6, the composition containing the factor selected in group comprised of the cocktail is the rantes, the MCP- 1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the BCA- 1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL 16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF- 1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor- α) more than one kind.

Claim 8:

As for claim 7, the composition containing the factor selected in group comprised of the cocktail is the rantes, the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TNF- α (Tumor necrosis factor- α), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) more than one kind.

Claim 9:

As for claim 1, the composition called the adipose tissue originated adult stem cell is the human fat origin of organization mesenchyme stem cell (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs).

Claim 10:

As for claim 1, the composition having with measure the adipose tissue originated adult stem cell does to 1×10^7 cells to 1×10^{10} cells number.

Claim 11:

- (a) The adipose tissue originated adult stem cell induction of movement method including the step administering the composition containing the adipose tissue originated adult stem cell pre-processed with the step :

내의 다른 부위에 투여하는 단계를 포함하는, 지방조직 유래 성체 줄기 세포 이동 유도방법.

(b) the above of being done by the cocktail containing the chemokine or the growth factor in the adipose tissue originated adult stem cell with the preprocessing (priming) and its secretion to the other site within the direct organism which does not contact with the disease part.

청구 12항:

Claim 12:

제11항에 있어서, 상기 (a)단계에서 FBS(Fetal bovine serum)를 처리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

As for claim 11, the method further comprising the step of processing the FBS (Fetal bovine serum) in (a) step.

청구 13항:

Claim 13:

제11항에 있어서, 상기 각테일은 란테스(Rantes), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), HGF(Hepatocyte growth factor), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

As for claim 11, the method of containing the selected factor more than one kind in group comprised of the cocktail is the rantes, the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TNF- α (Tumor necrosis factor- α), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1).

청구 14항:

Claim 14:

제11항에 있어서, 상기 투여는 정맥 투여인 것을 특징으로 하는 방법.

As for claim 11, the method in which administration is intravenous administration.

기술분야

Technical Field

본 발명은 지방조직 유래 성체줄기세포의 세포 이동(cell migration) 유도 능력에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 이의 특정 분비물의 질환 부위에서 발현되는 케모카인 또는 성장인자의 수용체 기능에 관한, 지방 줄기 세포의 신규 용도; 및 이러한 기능을 보다 효율적으로 높일 수 있는 방법에 관한 것이다.

The invention relates to method of more efficiently, enhancing the new use of the adipose stem cell about the function of receptor of adipose tissue originated adult stem cell more detailed as the cell migration induction capability of the adipose tissue originated adult stem cell and the chemokine revealed in the disease part of its specific secretion or the growth factor and such function.

배경기술

Background Art

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

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability. And it can classify into the pluripotent stem cell (totipotent stem cell), the pluripotent stem cell, and the Multipotent stem cell.

만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유

The pluripotent stem cell (totipotent stem cell) has the property thereafter that the cell to 8 cell group is like that with the correction of one complete entity the cell having the property of the pluripotent which can be generated the ovum and correct letter. And if this cell is separated and it transplants to the womb it can be generated as one complete entity. The pluripotent stem cell is that the new life it is derived from the positioned in

래하며, 이를 배아 줄기 세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.

성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다.

특히, 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복을 위해 세포를 적극적으로 활용하여 실시하는 치료법인 재생 의료에 있어서, 환자 본인으로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하는 단계, 시험관 배양으로 세포 증식 및/또는 분화를 유도하는 단계, 및 선택된 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포를 착상에 의해 환자 자신의 몸에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이처럼, 기존의 고전적인 약물치거나 수술적 방법을 통한 질병치료가 손상된 세포, 조직, 장기를 건강한 것으로 바꾸는 세포, 조직 대체치료법으로 대체될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

따라서, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 특히, 줄기세포의 효율적인 분리방법, 미분화 상태로의 유지 및 증식 방법 및 원하는 조직 세포로의 분화 방법 등에 따른 다양한 연구가 이루어지고 있다. 케모카인 처리에 의한 골수 유래 줄기세포의 세포 이동에 대한 보고는 다수 존재하고 있으나 (Adriana Lopez Ponte et al., Stem Cells, 25:1737-1745, 2007; Marek Honczarenko et al., Stem Cells, 24:1031-1041, 2006; Sordi V et al., Blood, 106:419-427, 2005; Fiedler J et al., J Cell Biochem, 87:305-312, 2002; Forte G et al., Stem Cells, 24:23-33, 2006; Wright DE et al., Blood, 87:4100-4108, 1996; Son BR et al., Stem Cells, 24:1254-1264, 2006), 지방 줄기세포의 세포 이동성에 대한 보고는 전무한 실정이다.

ner cell mass it is this specialized to various other histiocytes is formed in the inside of the blastocyst which is the cell which can be generated by the ectoderm, the mesoderm, and the various cells and organization of the endoderm layer originated and shows up after the correction 4~5. The fetal life, and the regeneration in the maintenance of homeostasis of the adult tissue as well as the growth of each organization of the new-born baby and adult phase and long-term and development and tissue injury it is the stem cell specializing in the cell specific for the organization containing the Multipotent stem cell is this cell and boiler may be referred to the adult stem cell while engaging in the function of inducing tissue specific pluripotent cells are called collectively.

There can be the specialized characteristic as the specific tissue the stem cell is developed the cell in which the adult stem cell already exists in all kinds of the long-terms of the human body is picked. But recently, the adult stem cell is used. The experiment let differentiate as all kinds of different organization including the interstitial cell etc. gets the success and the experiment is watched.

Particularly, as to regeneration medical called the therapy which actively utilizes the cell for the regeneration of the biological tissue falling into malfunction by bottle or accident or the incompatibility and long-term and function recovery and performed, the method for including the step of collecting the stem cell from the patient oneself, and the blood originated monocyte or the bone marrow originated monocyte, and the step of inducing the tube culture the cell proliferation and/or the differentiation and step of introducing to the condition of the patient oneself with the implantation the pulverization (the stem cell and/or the precursor cell) and/or the selected differentiated cell is very much used. Like this, it is predicted to be replaced with the cell which with being fine changes the classical drug treatment or the cell, in which the treatment of illness through the surgical method is damaged the organization, and the long-term, and the organization substitution value cure. In that way the availability of the stem cell is more enhanced.

Therefore, presently, the various functions of the stem cell is studied. And especially, the various researches including the efficient separation method of the stem cell, the differentiation method to maintenance to the undivided condition and propagating method and desired histiocyte etc. is made. The report about the cell migration of the marrow derived stem cell by the chemokine processing may be the actual condition in which it has with the multiple presence (Adriana Lopez Ponte et al., Stem Cells, 25:1737-1745, 2007; Marek Honczarenko et al., Stem Cells, 24:1031-1041, 2006; Sordi V et al., Blood, 106:419-427, 2005; Fiedler J et al., J Cell Biochem, 87:305-312, 2002; Forte G et al., Stem Cells, 24:23-33, 2006; Wright DE et al., Blood, 87:4100-4108, 1996; Son BR et al., Stem Cells, 24:1254-1264, 2006) and but the report toward the cell mobility of the adipose stem cell is unprecedented.

이에 본 발명자들은, 지방 중간엽 줄기세포 자체의 세포 이동 (cell migration) 능력을 발견하고, 나아가 다양한 케모카인 및 성장인자를 전처리(Primimg)한 경우, 특정 케모카인 및 성장인자에 의한 줄기 세포 이동이 현저히 유도되는 것을 발견하고, 지방 중간엽 줄기세포의 케모카인 또는 성장인자 수용체 발현 능력을 높일 수 있는 방법을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, the inventors discovered the cell migration capability of the fat mesenchyme stem cell itself. Furthermore it confirmed the various chemokines and method that increases the chemokine or the growth factor receptor expression capacity of the fat mesenchyme stem cell the growth factor is the preprocessing (Primimg) and it completed the invention.

발명의 내용

Summary of Invention

해결하고자 하는 과제

Problem to be solved

본 발명의 목적은 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 이의 분비물을 유효성분으로 함유하는 지방 줄기세포 이동 유도용 조성물을 제공하는데 있다.

The composition for the adipose stem cell induction of movement containing this Purpose of the invention is the adipose tissue originated adult stem cell and its secretion as an active ingredient are to be provided.

본 발명의 다른 목적은 지방조직 유래 성체 줄기 세포의 질환 부위로의 이동방법을 제공하는데 있다.

It is another object of the present invention to provide the transfer method to the disease part of the adipose tissue originated adult stem cell.

과제해결 수단

Means to solve the problem

본 발명은 상기 지방유래 성체 줄기세포 및 이의 분비물이 케모카인 또는 성장인자 수용체를 발현하는 기능 및 용도에 관한 것으로, 상기 목적을 달성하기 위하여, 지방 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물을 유효성분으로 함유하는 지방 줄기세포 이동 유도용 조성물을 제공한다.

The invention relates to the function and the use in which the fat originated adult stem cell and its secretion express the chemokine or the growth factor receptor, providing the composition for the adipose stem cell induction of movement containing to accomplish the above objects, the fat originated adult stem cell and/or its secretion as an active ingredient.

상기 지방 유래 성체 줄기세포 분비물은 예를 들어, 란테스 (Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF (Hepatocyte growth factor), TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB), TNF- α (Tumor necrosis factor- α) 아디포넥틴, 렙틴, 또는 Procollagen 등이 있고, 특히 바람직하게는 아디포넥틴 및/또는 렙틴을 함유시킬 수 있다. 상기 지방 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기 세포를 특정 성분을 함유하는 배지에 배양시킨 후, 배지를 수거한 다음 세포 데브리시(debris)를 제거하고 남은 브로스(broth)인 #34#인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포 배양물#34#의 형태로 사용할 수 있다.

For example, the rantes, the MCP- 1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the BCA- 1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL 16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF- 1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB), the TNF- α (Tumor necrosis factor- α) adiponectin, leptin or the Procollagen etc. have the fat originated adult stem cell secretion. The adiponectin and/or the leptin can be included rather than the preferably. It can use in the form of the " human fat origin of organization adult stem cell culture material " called the broth the fat originated adult stem cell and/or its secretion cultures the human fat origin of organization adult stem cell in the culture medium containing the specific component after taking away the culture medium.

또한, 상기 조성물은 FBS를 추가로 더 함유할 수 있는데, 특히 약 30% FBS를 사용하는 것이 바람직하다.

Moreover, the composition is FBS may be referred to especially, the be desirable to use about 30% FBS it additionally more can contain.

상기 지방유래 성체 줄기세포 및 이의 분비물은 란테스 (Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), BCA-1(B cell

In group comprised of the fat originated adult stem cell and its secretion is the rantes, the MCP- 1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), the SDF-1 α (Stromal cell-

attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF (Hepatocyte growth factor), TGF-β1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TNF-α(Tumor necrosis factor-α)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 케모카인 또는 성장인자 수용체를 발현함으로써, 이러한 케모카인 또는 성장인자에 반응하여 이동하게 된다.

이 때, 상기 지방 유래 성체 줄기세포는 바람직하게는, 포유류 유래, 더욱 바람직하게 인간 유래일 수 있고, 예를 들어 인간 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포(Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다.

특히, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로 전처리(priming)된 것을 사용하는 것이 바람직하다.

상기 콕테일은 란테스(Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3β(Monocyte inflammatory protein-3β), SDF-1α(Stromal cell-derived factor-1α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF (Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte growth factor), TGF-β1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TNF-α(Tumor necrosis factor-α)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유할 수 있는데, 특히, 란테스(Rantes), SDF-1α(Stromal cell-derived factor-1α), HGF(Hepatocyte growth factor), TNF-α(Tumor necrosis factor-α), PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TGF-β1 (Transforming growth factor beta 1)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것이 더욱 바람직하다.

상기 인간 유래 성체 줄기세포의 함유량은 1×10^7 cells 내지 1×10^{10} cells의 수로 함유되는 것이 바람직하고, 약 1×10^8 cells ~ 1×10^9 cells로 함유되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여,

(a) 지방조직 유래 성체 줄기 세포에 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 단계;

(b) 상기 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기 세포 및 이의 분비물을 함유하는 조성물을 질환 부위와 직접 접촉하지 않는 생체

derived factor-1α), the BCA- 1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL 16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF- 1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor-α), the chemokine called selected at least one kind or the growth factor receptor is expressed. In that way it reacts to this chemokine or the growth factor and it moves.

At this time, preferably the preferably the fat originated adult stem cell can be more the human origin with mammal origin. It may be for example, the human fat origin of organization mesenchyme stem cell (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs).

Particularly, the adipose tissue originated adult stem cell is the chemokine or the growth factor may be referred to the be desirable it uses to consist of the cocktail contained with the preprocessing (priming).

The factor selected in group comprised of the cocktail is the rantes, the MCP- 1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3β), the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1α), the BCA- 1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL 16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF- 1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor-α) than more than one kind may be referred to more, the be desirable the factor selected in group comprised of especially, the rantes, the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1α), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TNF- α (Tumor necrosis factor-α), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) it can contain than more than one kind is contained.

The content of the human origin adult stem cell may be the measure is more, the be desirable it is done by the White heat $\times 10^8$ cells ~ 1×10^9 cells it as to the measure, is the be desirable it is done by the number of 1×10^7 cells to 1×10^{10} cellses.

Moreover, the invention, to accomplish the above objects

(a) The step of the preprocessing (priming) being done by the cocktail which contains the chemokine in the adipose tissue originated adult stem cell or the growth factor.

(b) The adipose tissue originated adult stem cell induction of movement method including the step

내의 다른 부위에 투여하는 단계를 포함하는, 지방조직 유래 성체 줄기세포 이동 유도방법을 제공한다. 이 때, 특히, 정맥으로 투여하는 것이 가장 바람직하다.

administering the composition containing the pre-processed adipose tissue originated adult stem cell as described above and its secretion to the other site within the direct organism which does not contact with the disease part is provided. At this time, particularly, the vein should be most, the be desirable it administers.

발명의 효과

Effects of the Invention

본 발명은 지방유래 성체 줄기세포 및 이의 특정 분비물에 따른 세포 이동(cell migration) 유도 능력에 관한 것으로, 특히, 특정 케모카인 또는 성장인자로 전처리한 지방유래 성체 줄기세포 및 이의 특정 분비물을, 정맥 투여 등의 간단한 방법을 통해 줄기세포의 이식이 필요한 질환 부위에 스스로 타겟팅(targetting)하여 이동시킬 수 있다. 그러므로, 복잡한 시술없이 안전하게 질환부위에 성체 줄기세포가 이동하여 치료효과를 발휘하는 세포 치료제로서 매우 유용하다.

The invention relates to the cell migration induction capability according to the fat originated adult stem cell and its specific secretion. And particularly, it does the disease part requiring the transplant of the stem cell through the simple method including the intravenous administration etc. with for oneself targeting (targetting) and the fat originated adult stem cell and its specific secretion pre-processed to the specific chemokine or the growth factor can be moved. Therefore, it is very useful as the cell therapy product which is safe the adult stem cell moves in the disease part and exhibits the therapeutic effect without the complex procedure.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

Description of Embodiments

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

Differently, technical scientific terminologies which defined are used in this specification has the meaning it is understood in the technical field in which the invention belongs with the unskilled expert of being identical. Generally, in the experimental method in the glossology used in this specification and less than is this technical field, it is well known and generally it is used.

줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다.

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability.

성체 줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 분화능(multipotent)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 조직 특이적 분화능을 가진 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있다.

The adult stem cell has the blastogenesis (multipotent) specializing in the cell specific for the organization and boiler in the step that each long-term of the embryo build it is progressed it is formed or the stem cell showing up in the adult step. As the stem cell in which the stem cell (multipotent stem cell) having this tissue specific blastogenesis can specialize in the cell specific for the organization containing this cell and boiler, it engages in the function of inducing regeneration in the fetal life, and the maintenance of homeostasis of the adult tissue as well as the growth of each organization of the newborn baby and adult phase and long-term and development and tissue injury.

본 발명에서는 성체 줄기세포, 바람직하게는 지방조직, 또는 모낭·양막 등 상피조직에서 얻어지는 성체 줄기세포를 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는 지방조직 유래 성체 줄기세포를 사용한다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)를 사용할 수 있고, 특히, 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다

In the present invention, the adult stem cell, and the adult stem cell which preferably is obtained in the epithelial tissue including the adipose tissue or the hair follicle · amnion etc. can be used. More preferably, the adipose tissue originated adult stem cell is used. The mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cells, MSCs) can be used. It may be especially, the adipose tissue originated mesenchyme stem cell (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs).

상기 지방 또는 상피조직은 포유류 유래인 것이 바람직하고, 그 중에서도 인간 유래인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포(Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)를 사용하였다.

상기 #34#지방조직 유래 성체 줄기 세포#34# 또는 #34#지방조직 유래 중간엽 줄기세포#34#는 지방 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에서는 축약하여 #34#지방 유래 성체 줄기세포#34# 또는 #34#지방 줄기세포#34#라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통해 획득할 수 있다.

상기 지방 줄기세포물의 획득에 사용되는 배지로서는 당업계에 상기 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들어 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 등을 사용할 수 있다.

지방 줄기세포 배양용 배지는 지방 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 일반적으로, 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 영인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 베타-메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나, 너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제(anti-clumping agent), 예컨대 Invitrogen이 판매하는 것들(Cat # 0010057AE)을 포함하는 것이 유익할 수 있다.

그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:

- 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제

- 다른 티로신 키나아제 관련 수용체, 예컨대 혈소판-유도된 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF), 대식세포 콜로니-자극 인자, Flt-3 리간드 및 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를 위한 리간드

The fat or the epithelial tissue may be more, the be desirable it is among them the human origin what is the mammal origin is the be desirable. In a preferred embodiment of the present invention, the human adipose tissue originated mesenchyme stem cell (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs) was used.

As the " adipose tissue originated adult stem cell " or the divided adult stem cell which the " adipose tissue originated mesenchyme stem cell " separates from the adipose tissue, it reduces in this specification and it names as the " fat originated adult stem cell " or the " adipose stem cell ". It can obtain through the normal method in which this is known in the relevant industry.

In the relevant industry as the culture medium used in the acquisition of the adipose stem cell water, the known because of being suitable for the stem cell cultivation on conventional culture medium can be used. For example, the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) etc. can be used.

While the adipose stem cell culture badge promotes the proliferation of the divided expression type of the adipose stem cell it can be supplemented as the additive which the differentiation controls. Moreover, generally the culture medium can contain the neutral buffer agent (for example, the phosphate and/or the high concentration bicarbonate) among the iso-osmotic solution and protein nutrient (for example, the blood serum, for example, FBS, the serum replacement, and the albumin or the essential amino acid and non essential amino acid, for example, glutamine). Furthermore, etc component (member of a party called for example, insulin or the transferrin, the nucleoside or the nucleotide, the pyruvate, and the arbitrary ionic shape or salt, for example, the glucose, selenium, glucocorticoid, for example, the hydrocortisone and/or the reducing agent, for example, the beta-mercaptoethanol) discovered in the most of conservative solution culture media of this kind and lipid (the fatty acid, cholesterol, and HDL or the LDL extract of the blood serum) can be contained.

Moreover, the culture medium can be profitable to include the purpose, the cell being thick and loud or being thick and loud in the container wall or of preventing to so form the large bunch. The anti-caking agent (anti-clumping agent), and the Invitrogen sells for example the field (Cat # 0010057AE).

Among them, it can be advantageous to use the additional additive more than below 1 :

- The other activator of the other ligand dimerizing stem cell factor (SCF, and the Steel factor), and the c- kit or the signal transmission path such as antibody.

- The growth factor (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF), induced with the other tyrosine kinase related receptor, for example, platelet - the macrophage colony stimulating factor, and the ligand for the receptor of the Flt-3 ligand and blood vessel epidermal growth factor (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF).

· 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린

The factor that increases · circular AMP concentration, for example, the forskolin.

· gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

The factor, inducing · gp130 for example, LIF or the Oncostatin-M.

· 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

· hematopoiesis young rice plant growth factor, for example, the thrombopoietin (TPO)

· 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF-beta

· deformability growth factor, for example, the TGF-beta.

· 다른 성장 인자, 예컨대 표피 성장 인자(EGF)

· other growth factor, for example, the epidermal growth factor (EGF)

· 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

· neurotrophin, for example, CNTF.

· N-acetyl-L-cysteine (NAC)

· N-acetyl-L-cysteine (NAC)

· Hydrocortisone

· Hydrocortisone

· Ascorbic Acid

· Ascorbic Acid

특히, 본 발명의 일 구체예에서 사용되는 지방 줄기세포를 수득하기 위한 배지는 NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는, FBS, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유할 수 있다.

Particularly, it is the be desirable that the culture medium for obtaining the adipose stem cell used in one embodiment of the present invention contains the NAC, ascorbic acid, calcium, insulin and head computerized axial tomography. More preferably, the FBS, NAC, ascorbic acid, calcium, REGF, insulin and head computerized axial tomography can be contained.

본 발명은 상기 지방 유래 성체 줄기세포 분비물을 유효성분으로 포함할 수 있다.

The invention relates to the active ingredient the fat originated adult stem cell secretion. And it may include.

이러한 분비물은, 여러가지, 사이토카인, 아미노산, 성장인자 등을 포함하는데, 예를 들어, TGF, bFGF, IGF-1, KGF, HGF, fibronectin, VEGF, 아디포넥틴, 렙틴 또는 Procollagen 등의 물질일 수 있고, 이들의 수용체도 함께 함유할 수 있다. 특히, 이러한 지방 유래 성체 줄기세포 분비물들 중에서 아디포넥틴 또는 렙틴은 지방조직 유래 특이적 분비물로서, 본 발명의 세포이동 유도 기능에 큰 기여를 하게 된다.

This secretion includes the various, the cytokine, the amino acid, the growth factor etc, where it for example can be the material including the TGF, the bFGF, the IGF-1, KGF, HGF, the fibronectin, VEGF, the adiponectin, the leptin or the Procollagen etc. Their receptor can contain. Particularly, as the adiponectin among this fat or originated adult stem cell secretions or the leptin is the a dipose tissue originated specific secretion, the large contribution is in the cell migration induction function of the present invention.

상기 지방조직 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물은 지방조직 유래 성체 줄기 세포를 특정 성분을 함유하는 배지에 배양시킨 후, 배지를 수거한 다음 세포 데브리스(debris)를 제거하고 남은 브로스(broth)인 #34#지방조직 유래 성체 줄기세포 배양물#34#의 형태로도 사용할 수 있고, 각각의 성분을 추출하여 단독으로 또는 함께 사용할 수도 있다.

It can use in the form of the " adipose tissue originated adult stem cell culture material " called the broth the a dipose tissue originated adult stem cell and/or its secretion cultures the adipose tissue originated adult stem cell in the culture medium containing the specific component after taking away the culture medium. Each component is extracted and or it independently together can use.

즉, 지방 줄기세포와 분비물, 배지성분을 모두 포함하는 형태, 분비물 및 배지성분만을 포함하는 형태, 분비물만을 분리하여 단독으로 또는 지방 줄기세포와 함께 사용하는 형태, 또는 지방 줄기세포만을 투여하여 체내에서 분비물을 생성하는 형태로 사용하는 것도 모두 가능하다.

That is, it separates only the form, including the adipose stem cell and secretion, and the medium component the form including only the secretion and medium component, and the secretion and or the independently can do all to use as the form used with the adipose stem cell or the form which administers only the adipose

stem cell and creating the secretion in vivo.

일 관점에서, 본 발명은 지방조직 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물이 해당 줄기세포 자체의 이동을 유도하는 용도에 관한 것이다. 더욱 자세하게는 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 이의 특정 분비물이 질환 부위에서 발현되는 케모카인 또는 성장인자의 수용체의 기능을 발휘한다는 새로운 용도에 관한 것이다.

In consistency. And the invention relates to the use in which the adipose tissue originated adult stem cell and/or its secretion induces the movement of the corresponding stem cell itself. It is about the new use that it displays the function of the receptor of more detailed adipose tissue originated adult stem cell and the chemokine in which its specific secretion is revealed in the disease part or the growth factor.

본 발명에서 #39#케모카인 또는 성장인자 수용체 기능을 발휘한다#39#라고 하는 것은 지방조직 유래 성체 줄기세포가 특정 케모카인 또는 성장인자와 특이적으로 결합하는 수용체(receptor)를 세포 표면에 발현(expressing)하거나, 또는 그 분비물이 상기 수용체이거나 수용체를 포함하는 경우를 모두 일컫는 경우로서, 지방 줄기세포가 특정 케모카인 또는 성장인자와 반응할 수 있는 능력을 지닌 것을 총칭하여 의미한다.

In the present invention, thing with the capability it is the receptor in which the adipose tissue originated adult stem cell specifically binds with the specific chemokine or the growth factor at the cell surface with the expression (expressing) to display the ' chemokine or the growth factor receptor function do with 39 or which or can be the case of altogether calling the case of the secretion is the receptor or containing the receptor and in which the adipose stem cell can react to the specific chemokine or the growth factor are called collectively and it means.

상기 성장인자(growth factor)는 각종 세포분열이나 생장 및 분화를 촉진하는 폴리펩티드를 총칭하는 것으로, 세포의 신호 전달계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대부분은 그 구조적 유사성으로부터 패밀리로 분류하며, 자기분비, 측분비, 내분비 등의 방식으로 표적세포에 작용한다. 성장인자 수용체는 세포 내 영역에서 티로신키나아제의 활성을 가지는 경우가 많으며, 리간드 수용체와 결합하면 수용체자신이나 세포내 단백질의 티로신 잔기가 인산화되며 세포증식이나 분화가 일어나게 된다.

The polypeptide in which the growth factor promotes all kinds of the cell divisions or the outgrowth and differentiation is called collectively. The cell is known that it engages in the signal transduction pathway of the cell and the cell has. The majority classifies into family from the structural similarity. And it acts as the mode including the magnetism secretion, the lateral secretion, the endocrine etc. on the target cell. In that case having the growth factor receptor is the activity of the tyrosine kinase in the intercellular domain is many. And while the pTyr of the receptor oneself or the intercellular protein becomes phosphorylation if the ligand-receptor combines the cell proliferation or the differentiation occurs.

상기 케모카인은 염증 발생시 생성되어 백혈구의 보충을 조절하는 작은 시토킨 군을 구성하는데, 이러한 케모카인은 혈중 형성된 (적혈구를 제외한) 백혈구를 포함하는 성분 예컨대, 호중구, 단핵구, 대식 세포, 호산구, 호염기구, 비만 세포 및 림프구 예컨대, T 세포 및 B 세포의 주화성을 선택적으로 유발할 수 있다. 주화성을 자극함과 더불어, 백혈구 활성화와 관련된 반응 세포내 케모카인에 의하여 다른 변화 예를 들어, 세포 모양의 변화, 세포내 유리 칼슘 이온(Ca²⁺) 농도의 일시적 증가, 과립 세포외배출, 인테그린 상승조절, 생활성 지질(예를 들어, 류코트리엔)의 형성 및 호흡기 방출도 선택적으로 유도될 수 있다. 그러므로, 케모카인은 초기에 염증 반응을 유발시켜, 감염 또는 염증 부위에서 염증 매개체 방출을 일으키고, 주화성 및 일혈을 유발시킨다.

The small cytokine group which controls supplement of the leukocyte the chemokine is generated in the inflammatory generation is organized. This chemokine selectively can cause the component, including the leukocyte formed among blood (except for the red blood cell) for example, the neutrophil, monocyte, macrophage, eosinocyte, basophil, mast cell and lymphocyte, for example, the Thymusdependentlymphocyte and B immortalization of cell anger. The chemotaxis is stimulated. It temporarily of the glass calcium ion (Ca^{(sup)2+}(/sup)) concentration the formation and respiratory emission of the vitality lipid (for example, the leukotriene) can be selectively induced within the responding cell associated with the white blood cell activation with the chemokine within the other change, for example, the change of the shape of cell, and the cell. Therefore, the chemokine causes the inflammation at its early stage. The inflammatory mediator emission is raised in the infection or the inflammation. The chemotaxis and extravasation are caused.

일반적으로, 케모카인 및 케모카인 수용체의 상호작용은, 하나의 케모카인이 다수의 케모카인 수용체와 결합할 수 있고 역으로 하나의 케모카인 수용체가 몇 개의 케모카인과 상호작용할 수 있다는 점에서 우연성을 띤다. 이러한 케모카인 수용체 신호 전달 및 리간드에 대한 선택성에 관한 다수의 측면들은 아직 파

Generally, it has the contingency in that it multiple chemokine receptors can combine with one chemokine and one chemokine receptor reversely can interact with several chemokines. The multiple sides about the selectivity about this chemokine receptor signal transducti

약되지 않고 있다.

본 발명은 지방유래 성체 줄기세포 및 이의 특정 분비물이 이러한 케모카인 수용체 기능을 발휘한다는 새로운 발견사실에 근거하여, 감염 또는 염증 부위, 즉, 질환 부위에서 발현되는 특정 케모카인에 반응하여 스스로 상기 질환 부위로 이동해 가는 (#39#타겟팅(targetting) 이동#39#이라고도 한다) 기능을 이용하고자 한 것이다. 본 발명에서는 케모카인뿐만 아니라 특정 성장인자에 대한 반응성도 함께 고려하였다. 특히, 지방유래 성체 줄기세포는 란테스(Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte growth factor), TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TNF- α (Tumor necrosis factor- α) 등의 케모카인 또는 성장인자에 대한 반응성이 우수하다.

이 때, 상기 케모카인 또는 성장인자와 이들의 수용체의 반응에 따른 세포 이동성을 높이기 위해서, 상기 조성물은 FBS를 추가로 더 함유할 수 있는데, 특히 약 30% FBS를 사용하는 것이 바람직하다. 물론, 상기 조성물이 FBS를 함유하고 있지 않아도, 조성물을 체내에 투여하였을 때, 체내에 존재하는 FBS를 활용할 수 있다.

한편, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물의 수용체 발현율을 높이거나 또는 반응성을 높이기 위하여, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 것이 바람직하다.

특히, 상기 콕테일은 란테스(Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16(Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte growth factor), TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것이 바람직하고, 란테스(Rantes), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), HGF(Hepatocyte growth factor), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것이 더욱 바람직하다.

본 명세서의 실시예 5에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 특정 케모카인 또는 성장인자를 전처리한 지방조직 유래 성체 줄기세포

on and ligand are not yet grasped.

The invention relates to for oneself disease part it reacts to the specific chemokine revealed in the infection or the inflammation, in other words, the disease part based on the new fact of discovery that the fat originated adult stem cell and its specific secretion exhibit such chemokine receptor function. And the function of move (it is called the 'targetting (targetting) movement' this)ing tries to be used. In the present invention, the reactivity about not only the chemokine but also the specific growth factor together considered. Particularly, reactivity to the chemokine or the growth factor including the rantes, the MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the BCA-1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor- α) etc. of the fat originated adult stem cell is excellent.

At this time, the cell mobility according to the reaction of the chemokine or the growth factor and their receptor may be referred to especially, the be desirable to use about 30% FBS the composition additionally more can contain FBS it enhances. Of course, the composition did not contain FBS. Still when the composition was administered within the sieve FBS existing in the internal can be utilized.

In the meantime, the receptor expression rate of the adipose tissue originated adult stem cell and/or its secretion may be referred to the be desirable the preprocessing (priming) is done by the cocktail in which the adipose tissue originated adult stem cell contains the chemokine or the growth factor it enhances or reactivity is heightened.

Particularly, the factor selected in group comprised of the cocktail is the rantes, the MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the BCA-1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF-1 (Insulin-like growth factor), the PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor- α) than more than one kind may be referred to more, the be desirable the factor selected in group comprised of the rantes, the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TNF- α (Tumor necrosis factor- α), the PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) it contains than more than one kind is contained.

As shown in it can know at the embodiment 5 of this specification the effect of the cell mobility about the c

포 및/또는 이의 분비물의 경우, 해당 케모카인 또는 성장인자에 대한 세포 이동성의 효과가 현저히 증가한다.

orresponding chemokine or the growth factor remarkably increases in case of the adipose tissue originated adult stem cell and/or its secretion pre-processing the specific chemokine or the growth factor.

따라서, 본 발명은 다른 관점에서,

Therefore, in the invention is the other point of view

(a) 지방조직 유래 성체 줄기 세포에 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 단계;

(a) The step of the preprocessing (priming) being done by the cocktail which contains the chemokine in the adipose tissue originated adult stem cell or the growth factor.

(b) 상기 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기 세포 및/또는 이의 분비물을 함유하는 조성물을 질환 부위와 직접 접촉하지 않는 생체 내의 다른 부위에 투여하는 단계를 포함하는, 지방조직 유래 성체 줄기 세포 이동 유도방법을 제공한다.

(b) The adipose tissue originated adult stem cell induction of movement method including the step administering the composition containing the pre-processed adipose tissue originated adult stem cell as described above and/or its secretion to the other site within the direct organism which does not contact with the disease part is provided.

이 때, 상기 (a)단계에서 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 콕테일(cocktail)로의 전처리(priming)는 지방 줄기세포의 배양 배지에 상기 케모카인 또는 성장인자들을 함유시켜 배양하는 방법으로 이루어질 수 있고, 20~60시간, 바람직하게는 약 20~50시간 동안 수행한다. 본 발명의 일 구체예에서는 약 24시간 동안 전처리를 수행하였다. 또한, 상기 콕테일은 지방 줄기세포 배양 전, 배양 중, 또는 배양 후에 전처리할 수 있고, 바람직하게는 배양 후에 전처리한다.

At this time, in (a) step, it can be done in the method for the preprocessing (priming) to the cocktail containing the chemokine or the growth factor including the chemokine or the growth factors in the culture medium of the adipose stem cell and cultivating. Preferably it performs for about 20~50 hours. In one embodiment of the present invention, the preprocessing was performed for about 24 hours. Moreover, among the cocktail is the adipose stem cell cultivation former, and cultivation, it can pre-process to or after cultivation. It pre-processes to the preferably after cultivation.

상기 콕테일은 란테스(Rantes), MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1), MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), BCA-1(B cell attracting chemokine-1), CXCL16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), EGF(Endothelial growth factor), b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte growth factor), TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1), IGF-1(Insulin-like growth factor 1), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것이 바람직하고, 란테스(Rantes), SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), HGF(Hepatocyte growth factor), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), PDGF-AB(Platelet Derived Growth Factor AB) 및 TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 인자들을 함유하는 것이 더욱 바람직하다.

The factor selected in group comprised of the cocktail is the rantes, the MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), the MIP-3 β (Monocyte inflammatory protein-3 β), the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the BCA-1 (B cell attracting chemokine-1), the CXCL 16 (Chemokine C-X-C motif ligand 16), the EGF (Endothelial growth factor), the b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), the IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TNF- α (Tumor necrosis factor- α) than more than one kind may be referred to more, the be desirable the factor selected in group comprised of the rantes, the SDF-1 α (Stromal cell-derived factor-1 α), the HGF (Hepatocyte growth factor), the TNF- α (Tumor necrosis factor- α), the PDGF- AB (Platelet Derived Growth Factor AB) and TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) it contains than more than one kind is contained.

상기 (b) 단계에서 사용하는 전처리된 지방 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물은, 전처리한 상태의 지방 줄기세포와 분비물, 배지성분을 모두 포함하는 형태로 사용, 분비물 및 배지성분만을 포함하는 형태로 사용, 또는 전처리된 지방 줄기세포만을 사용 등 사용태양에 특별한 제한은 없다.

The special limit is not in the use sun including the use etc. to the form including to the form including the adipose stem cell and secretion of the state pre-processed, and the medium component only the use, and the secretion and medium component only the use or the pre-processed adipose stem cell.

그리고, 상기 #39#질환 부위와 직접 접촉하지 않는 생체 내의 다른 부위에 투여#39#라 함은 병변 부위에 직접 이식하는 방법을 제외하고, 병변 이외의 부위에서 줄기 세포의 적어도 부분

And the direct method for transplanting is excluded from the lesion region with the ' disease part to says to be the administration ' in the other site within the direc

적인 국소화를 유발하는 방법이나 경로에 의해 줄기 세포를 대상에 배치시키는 것을 지칭한다. 세포의 성분의 일부분이 여전히 생존가능한 대상의 원하는 위치로 전달되게 하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 상기 #34#투여#34#는 #34#도입#34#, #34#전달#34#, #34#배치#34# 등의 용어와 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 임상투여시에 근육 또는 정맥 주사제와 같은 형태의 비경구 투여 등의 방법이 가능하며, 본 발명에서, 정맥 주사에 의한 투여가 가장 바람직하다.

따라서, 본 발명은 케모카인 또는 성장인자로 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기 세포 및/또는 이의 분비물을 함유하는 조성물을 정맥 투여하는 단계를 포함하는, 지방조직 유래 성체 줄기 세포 이동 유도방법에 관한 것이다.

본 발명은 또 다른 관점에서, 지방유래 성체 줄기세포의 타겟팅 이동 유도를 이용하여 질환부위에 도달시켜 해당 부위를 치료하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 지방 유래 성체 줄기세포 및 이의 분비물을 유효성분으로 함유하는 세포 치료제 또는 이를 이용하는 치료방법에 관한 것이다.

#39#치료하는#39#이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, #39#치료#39#란 용어는 #39#치료하는#39#이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서, 포유 동물에 있어서 질환의 #34#치료#34# 또는 #34#치료요법#34# 은 하기의 하나 이상을 포함한다:

- (1) 해당 질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴,
- (2) 질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함,
- (3) 질환을 경감시킴, 즉, 암의 퇴행을 야기시킴,
- (4) 질환의 재발을 예방함, 및
- (5) 질환의 증상을 완화함 (palliating)

줄기세포를 질환부위로 이동시켜 해당 부위를 치료하기 위해, 본 발명의 조성물을 약리학적으로 유효량으로 투여한다.

#39#약리학적 유효량(therapeutically effective amount) #39#은 투여되는 화합물의 양이 치료하는 장애의 하나 또는

t organism which does not contact. The of causing at least partial localization of the stem cell in the site except the lesion route names to dispose the stem cell with the method or the route in the object. The proper route in which it makes delivered to the desired position of the object enabling still to survive can administer against. It is interchangeable the " administration " can be used with the term including the " introduction ", the " transmission ", the " arrangement " etc. The method including the parenteral administration of the form like the muscle in the clinical medication or the venous injection agent etc is made possible. And in the present invention, the administration by the intravenous injection is most, the be desirable.

Therefore, the invention relates to the adipose tissue originated adult stem cell induction of movement method comprising the step of vein-medicating the composition which contains the adipose tissue originated adult stem cell and/or its secretion pre-processed to the chemokine or the growth factor.

The invention relates to and, the method of curing the appropriate part it reaches to the disease part using the targeting induction of movement of the fat originated adult stem cell in the other point of view. Therefore, it is about the cell therapy product containing the fat originated adult stem cell and its secretion as an active ingredient or the treatment method using the same.

The term is not differently mentioned with 39. It cures with ' at least one symptom of the disease in which the term corresponds or the disease or the disease or the disease is reversed or it relieves or the progressing is controlled or or it means to prevent. As shown in it is used in the present application the term refers the action which it cures with ' cured when being defined with 39 to the ' treatment '. Therefore, the " treatment " of the disease as to the mammal or the " therapy " comprises below one or greater :

- (1) The growth of the corresponding disease is hindered. In other words, the development is blocked.
- (2) The diffusion of the disease is prevented. In other words, the transition is prevented.
- (3) The disease is reduced. In other words, the degeneration of the cancer is caused.
- (4) The recurrence of the disease is prevented.
- (5) The symptom of the disease is relieved

In order that the stem cell is moved to the disease part and the appropriate part is cured the composition of the present invention is administered to the therapeutically effective amount.

It means to to some extent reduce the symptom of one or more of the failure which the amount of the com

그 이상의 증상을 어느 정도 경감하는 것을 의미한다. 따라서, 약리학적 유효량은, (1) 질환의 진행 속도를 역전시키거나 (2) 질환의 그 이상의 진행을 어느 정도 금지시키게 하는 것을 의미하며, (3) 질환과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감(바람직하게는, 제거)하는 효과를 가지는 량을 의미한다.

본 발명의 조성물(세포치료제)은 임상투여시에 근육 또는 정맥 주사제와 같은 형태의 비경구 투여 등이 가능하나, 가장 바람직하게는 정맥 주사에 의한 투여이다.

주사를 위해서, 바람직하게는 Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리 식염수 버퍼와같은 약리학적으로 맞는 버퍼로 제형될 수 있다. 점막 투과 투여를 위해서, 통과할 배리어에 적합한 비침투성제가 제형에 사용된다. 그러한 비침투성제들은 당업계에서 일반적으로 공지되어 있다.

비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

사람의 경우, 세포치료제의 통상적인 투여량은 $10^4 \sim 10^{10}$ cells/body, 바람직하게는 $10^6 \sim 10^8$ cells/body, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 1×10^8 cells/body 내지 1×10^9 cells/body 인 것이 바람직하다.

그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

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

이하 실시한 실시예에서 사용한 각종 배지 및 시약의 입수처는 하기 표에 기재된 바와 같다.

'therapeutically effective amount' is injected cures. Therefore, it reverses the progress speed of (1) disease (2) or it means amount having the effect that means to to some extent forbid and to some extent plays the symptom of one or more associated with (3) disease the reduction (preferably, the removal) the progressing described in the above of the disease.

The composition (cell therapy product) of the present invention may be more preferably, the administration by the intravenous injection the parenteral administration of the form like the muscle or the venous injection agent etc. are possible in the clinical medication.

Can be preferably formed for injection to the buffer fitting due to the Hank-HEPES, and the pharmacological such as the Ringer solution and saline solution buffer. The impervious agent which is suitable for the barrier passing for the mucous membrane penetration administration may be used in the formulation. As the generally that impervious agents are known in the relevant industry.

The agent for the parenteral administration includes the sterilized aqueous solution, the non-aqueous solvent, the suspension agent, the emulsion etc. The propylene glycol, the polyethylene glycol, the vegetable oil like the olive oil, the ester like the ethyl oleate etc. can be used as the non-aqueous solvent, and the suspension solvent it can scan.

In case of human, preferably it divides into $10^6 \sim 10^8$ cells / body, 1 time or the several occasions and the conventional amount of administration of the cell therapy product can administer with $10^4 \sim 10^{10}$ cells / body. Particularly, the composition of the present invention may be the be desirable it is 1×10^8 cells / body to 1×10^9 cells / body.

But it has to be understood that the disease, the administration route, the age of the patient, and sex, weight and severe disease of the disease which the actual dose of the active ingredient cures light to the different related element of the etc. and the different related element has to be determined. And therefore the amount of administration does not limit the scope of the present invention through any method.

Hereinafter, the invention tries to be more particularly explained through the embodiment. These embodiments only exemplify the invention. Therefore it has to a person skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry not to be interpreted that the scope of the present invention is limited by these embodiments.

Hereinafter, the place of acquisition of all kinds of the culture mediums and the reagent used in the embodiment performed are same as those of as described in the diagram below.

항목	구입처	Item	The purchase wife
Ascorbic acid	Sigma USA	Ascorbic acid	Sigma USA
CaCl ₂	Sigma USA	CaCl ₂	Sigma USA
Collagenase type I	Gibco USA	Collagenase type I	Gibco USA
DMEM	Gibco USA	DMEM	Gibco USA
DPBS	Welgene Korea	DPBS	Welgene Korea
EGF	Gibco USA	EGF	Gibco USA
FBS	Gibco USA	FBS	Gibco USA
Hydrocortisone	Sigma USA	Hydrocortisone	Sigma USA
Insulin	Gibco USA	Insulin	Gibco USA
K-SFM	Gibco USA	K-SFM	Gibco USA
NAC	Sigma USA	NAC	Sigma USA

도면에 대한 간단한 설명

도 1은 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대하여 다양한 케모카인 또는 성장인자로 세포 이동을 유도한 결과 그래프이다.

도 2는 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대해 이동을 유도한 후 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 3은 다양한 케모카인 또는 성장인자로 전처리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대하여 10% FBS로 세포 이동을 유도한 결과 그래프이다.

도 4은 TNF-알파를 전처리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대하여 다양한 케모카인 또는 성장인자로 세포 이동을 유도한 결과 그래프이다.

도 5는 다양한 케모카인 또는 성장인자로 전처리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대하여 전처리했던 해당 인자로 세포 이동을 유도한 결과 그래프 및 현미경 사진이다.

도 6은 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포 및 A549세포에 대한 다양한 케모카인 또는 성장인자 수용체 발현여부를 확인한 FACS 결과 그래프이다.

도 7은 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대한 다양한 케모카인 또는 성장인자 수용체 mRNA 발현여부를 확인한 RT-PCR 결과 사진으로, 도 7A의 각 밴드는 각각 1: CCR1 (380bp), 2: CCR2 (474bp), 3: CCR7 (461bp), 4: CXCR4 (489bp), 5: CXCR5 (494bp), 6: CXCR6 (517bp), 7: GAPDH (362bp). 도 7B의 각 밴드는 각각 M: Marker, 1: EGFR (419bp), 2: TGFBR2 (498bp), 3: PDGFRA (187bp), 4: PDGFRB (508bp), 5: IGF1R (299bp), 6: c-MET (201bp), 7: TNFRSF1A (218bp), 8: FGFR1 (250bp), 9: GAPDH (362bp)를 나타낸다.

도 8은 아디포넥틴으로 전처리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대하여 1, 10, 100ng/ml 농도의 아디포넥틴으로 세포 이동을 유도한 결과 그래프 및 현미경 사진이다.

도 9는 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에 대한 아디포넥틴 수용체 1, 2의 mRNA 발현여부를 확인한 RT-PCR 결과 사진으로, 각 밴드 1: ADIPOR1(337bp), 2: ADIPOR2(538bp), 3: GAPDH (362bp)를 나타낸다.

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is graph the cell migration is induced to the chemokine or the growth factor being various about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell.

Figure 2 is a photograph taking a picture of the microscope after inducing the movement about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell.

Figure 3 is graph the cell migration is induced to 10% FBS about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell pre-processed to the chemokine or the growth factor being various.

Figure 4 is graph the cell migration is induced to the various chemokines or the growth factor about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell pre-processing the tumor necrosis factor alpha.

Figure 5 is graph and microphotography the cell migration is induced to the corresponding factor pre-processed about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell pre-processed to the chemokine or the growth factor being various.

Figure 6 is a FACS result graph confirming the chemokine or the growth factor receptor expression whether or not being various about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell and A549 cell.

Each band of the RT-PCR result photo, in which fig. 7 confirms the various chemokines about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell or the growth factor receptor mRNA expression whether or not the drawing 7A, respectively 1: CCR1 (380bp) 2: CCR2 (474bp) 3: CCR7 (461bp) 4: CXCR4 (489bp) 5: CXCR5 (494bp) 6: CXCR6 (517bp) 7: each band of the GAPDH (362bp). drawing 7B exhibits the respective M: Marker, 1: EGFR (419bp), 2: TGFBR2 (498bp), 3: PDGFRA (187bp), 4: PDGFRB (508bp), 5: IGF1R (299bp), 6: c-MET (201bp), 7: TNFRSF1A (218bp), 8: FGFR1 (250bp), and 9: GAPDH (362bp).

Figure 8 is graph and microphotography the cell migration is induced to the adiponectin of 1 about the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell, pre-processed to the adiponectin 10, 100ng / ml concentration.

Figure 9 is a RT-PCR result photo, confirming the mRNA expression whether or not each band of the adipose tissue

sue originated multipotent mesenchyme stem cell the a diponectin receptor 1, and 2 1: ADIPOR1(337bp) 2: ADIPOR2(538bp) 3: the GAPDH (362bp) is shown.

실시예

인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척하였다. 조직을 잘게 자른 후 collagenase type1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37도에서 2시간 동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μ m mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척한 후, DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 배양하였다.

하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng/ml rEGF, 5 μ g/ml 인슐린 및 74ng/ml Hydrocortisone를 함유한 Keratinocyte-SFM media을 2일마다 교체하면서 계대배양하여 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

지방 줄기세포의 세포이동 유도

2-1: 표 2의 케모카인 또는 성장인자로 세포이동 유도

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 각 웰마다 2×10^4 cells/200 μ l로 씨딩(seeding)하여 이하 케모카인 또는 성장인자로 세포이동을 유도하였다. 양성 대조군으로 FBS 30%를 사용하였다.

Example(s)

chemokine or the growth factor receptor mRNA confirmation of the adipose stem cell.

It confirmed through the RT-PCR whether the obtained adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell revealed the mRNA of each chemokine or the growth factor receptor in the embodiment 1 or not.

After 0.25% trypsin / 1mM EDTA being processed and separating the cell the adipose stem cell cultivated in the T75 Flask was washed to PBS and it centrifuged in 1,500 rpm for 5 minutes and the cell was collected. The cell collected extracted the total RNA using the Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology).

The RNA 2 μ g the cDNA was synthesized to the maximum RT Pre mix kit (iNtRON Biotechnology). In 95 $^{\circ}$ C 1X h-Taq buffer, 0.2mM dNTP, 0.4pM Primer F, 0.4pM Primer R, 0.25U / μ l h-Taq DNA polymerase (Solgent) the cDNA 1 μ l, after DNA was degenerated for 20 second 40 the first publication primer was heated in each temperature (annealing temperature) of the lower part table 8. The reaction extending for one minute PCR product in 72 $^{\circ}$ C the gene amplification was practiced to 40 cycle condition. The receptor primer used in the experiment and heating temperature are the same as that of the next table 8.

In 110V using 2.0 % agarose gel and 1X TAE reagent the SiZer DNA Markers -50 (iNtRON) and PCR product, the image measurement was for 30 1 hour the minute after doing the electrophoresis to the Fuji molecular imaging software. GAPDH was used as the control gene. All PCR products the base sequencing analysis were depended on to the Solgent corp. and it confirmed that the base sequence coincided with over 99%.

Consequently, as shown in figure 7, in the adipose stem cell, it could confirm that the mRNA of the receptor of each chemokine or the growth factor was revealed. Each band of the drawing 7A, respectively 1: CCR1 (380bp) 2: CCR2 (474bp) 3: CCR7 (461bp) 4: CXCR4 (489bp) 5: CXCR5 (494bp) 6: CXCR6 (517bp) 7: each band of the GAPDH (362bp). drawing 7B is the respective M: Marker, 1: EGFR (419bp), 2: TGFBR2 (498bp), 3: PDGFRA (187bp), 4: PDGFRB (508bp), 5: IGF1R (299bp: under-expression), 6: c-MET (201bp), 7: TNFRSF1A (218bp), 8: FGFR1 (250bp), and 9: GAPDH (362bp) are shown.

wn. And GAPDH used as the positive control group.

그 결과를 도 1에 도시하였다. Media로 유도한 세포를 음성대조군으로 FBS 30%로 유도한 세포를 양성대조군으로 하여 음성대조군 세포를 100이라 하였을 때 비율을 각 그래프로 나타내었다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 지방조직 유래 중간엽 줄기세포(AdMSCs)는 FBS 30%와 마찬가지로, 케모카인 또는 성장인자의 자극에 반응하여 이동이 활발하였으며, 특히 란테스, SDF-1 α , HGF, TGF- β 1, IGF-1, PDGF-AB 또는 TNF- α 에 반응하여 세포 이동이 활발히 유도되었다.

Therefore, in the adipose stem cell, the receptor was confirmed that the mRNA of the receptor of the specific chemokine or the growth factor was revealed. The targeting movement to the internal disease can be induced using the reactivity of this receptor. The targeting movement is suggestive through this, that the effective curing of the corresponding disease is possible.

2-2: 그 외의 케모카인 또는 성장인자로 세포이동 유도한 사진 촬영

embodiment 8: the preprocessing of adiponectin about the adipose stem cell and concentration inducibility .

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 24시간동안 FBS free Media(도 2A)와 TNF- α (도 2B, 2C), chemotactic factor(도 2D)로 전처리하여 배양한 후 0.25% trypsin /1mM EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음 PBS로 세척하고 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포를 회수하였다.

8- 1: the concentration inducibility confirmation of adiponectin .

그 후, Transwell Insert (Costar, 3422)를 0.1% gelatin (sigma-aldrich)로 2시간 동안 coating을 한 뒤 배지를 분주된 24well plate에 장착하였다. 각 insert에 대해 회수한 지방줄기세포를 2×10^4 cells /200 μ l씩 seeding하여 37#176#C, 5% CO₂ incubator 에서 2시간 동안 배양하였다. 배지(Media)와 케모카인(chemokine)과 성장인자(growth factor)를 100 ng/ml 농도로 분주시킨 24well에, seeding 된 Insert를 옮겨 장착하였다. 37#176#C, 5% CO₂ incubator 에서 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, Insert의 윗 부분에 있는 이동하지 않은 지방줄기세포는 면봉으로 제거하고 세척 후 70% 메탄올로 1시간 동안 고정하였다.

After the adipose tissue originated multipotent mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 was pre-processed to the adiponectin for 2 4 hours each chest processed the adiponectin as (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) and the cell migration was induced.

세척 후 0.5% crystal violet 용액으로 염색을 1시간 하였다. 그 후 세척을 하여 현미경에서 X100로 관찰 후 사진을 찍었다.

The result was shown in fig. 8. When being 10ng / ml it compared and it processed as 100ng / ml as the concentration was high the cell migration inducibility could confirm the highness according to the result showing 2 doubling dose high shift.

그 결과, 도 2A~2D에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 지방줄기세포(도 2A, 2B)에 비하여 전처리 시킨 지방줄기세포(도 2C, 2D)의 이동률이 높아 세포가 조밀하게 나타남을 확인할 수 있었다.

8- 2: adiponectin receptor expression of the adipose stem cell.

케모카인 또는 성장인자를 전처리한 지방 줄기세포의 세포이동

The RT-PCR was performed using the primer described in the method like the method of the embodiment 7 the table 8 and annealing temperature and annealing temperature confirmed whether the adiponectin receptor was revealed in the adipose stem cell or not.

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 이하 케모카인 또는 성장인자로 24시간 전

Consequently, as shown in figure 9, the receptor 2 kind of the adiponectin (1: ADIPOR1(337bp) 2: it co

처리(priming) 한 후, 각 웰마다 2×10^4 cells/200 μ l로 씨딩(seeding)하여 10% FBS로 세포 이동을 유도하였다. 30% FBS에 비해 변별력을 관찰하려는 의도였다. 한편, 아무런 전처리를 하지 않은 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 음성 대조군으로 두었다 (미처리).

nfirmated that the ADIPOR 2 (538bp) was revealed in the adipose stem cell. Therefore, it confirmed to the incidence of the adiponectin receptor be enhanced due to the preprocessing of the adiponectin and could use the reactivity between them.

The content of the present invention was particularly described to the or more. And the or more has to a person skilled in the art of the relevant industry. It is the embodiment which this concrete technology only does with desirable. And it will be clear the scope of the present invention is not limited by this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.

그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 여러 케모카인 또는 성장인자를 전처리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포(AdMSCs) 중에서 PDGF-AB 또는 TNF- α 로 전처리한 경우들이 10% FBS에 의한 세포 이동이 활발히 유도되었음을 이동한 세포수로 확인할 수 있었고, 특히 TNF- α 로 전처리한 경우가 현저하게 활발히 유도되었음을 확인하였다.

TNF- α 전처리된 지방 줄기세포의 세포이동

실시에 3에서 수득한 실험 결과를 참고하여, 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 TNF- α 로 24시간 전처리(priming) 한 후, 각 웰마다 2×10^4 cells/200 μ l로 씨딩(seeding)하여 이하 표 4에서 기재하고 있는 다양한 케모카인 또는 성장인자로 세포 이동을 유도하였다.

그 결과를 도 4에 도시하였다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, TNF- α 로 전처리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포(AdMSCs)는 Rantes, SDF-1 α , EGF, bFGF, TGF- β 1, PDGF-AB 등에 의해 세포 이동이 활발히 유도되었음을 이동한 세포수로 확인할 수 있었다. 특히, 실시예 1의 결과인 도 1과 비교해 보면, TNF- α 전처리 유무에 따른 효과를 확인할 수 있는데, TNF- α 로 전처리한 경우 세포 이동성이 확연히 활발해 짐을 확인할 수 있었다.

지방 줄기세포에 대한 다양한 케모카인 또는 성장인자의 전처리 및 세포이동 유도능

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 이하 표 5에 기재한 케모카인 또는 성장인자들로 약 24시간 전처리(priming)한 후, 각 웰마다 2×10^4 cells/200 μ l로 씨딩(seeding)하고, 전처리에 사용했던 각각의 동일한 인자를 이용하여 세포 이동을 유도하였다.

그 결과를 도 5에 도시하였다. 전처리를 하지 않은 경우를 하얀막대 그래프로 나타내었고, 해당 인자로 전처리를 한

경우, 이동한 세포수를 검은막대 그래프로 나타내었다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, Rantes, MIP-3 β , SDF-1 α , BCA-1, CXCL16, EGF, PDGF-AB 등 상기 인자로 전처리한 지방 줄기세포가 전처리하지 않은 경우에 비해 세포 이동성이 개선됨을 확인 할 수 있었다. 특히, Rantes, SDF-1 α , BCA-1, CXCL16 및 PDGF-AB의 경우는 세포 이동능이 현저히 증가하였다.

지방 줄기세포의 케모카인 또는 성장인자 수용체 발현

실시에 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포가 각각의 케모카인 또는 성장인자 수용체를 발현하는지 여부를, 상응하는 수용체의 항체 및 유세포분석기(FACS)를 통해 확인하였다.

한편, 각 케모카인 또는 성장인자에 대한 수용체와 리간드명은 아래 표 6과 같다.

지방 줄기세포를 T75 플라스크에서 배양한 후 90% 컨플루언시로 차게 되었을 때, 0.25% trypsin/1mM EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음 PBS로 세척하고 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 10% FBS 용액으로 4도 냉장고에서 1시간 이상 고정시킨 뒤 세척을 하였다. 그 이후, 표 7의 항체를 4도 냉장고에서 1시간 이상 배양하여 FACS를 측정하였다.

그 결과를 도 6에 도시하였다. 어두운 영역이 실험군이며, 검은 선은 대조군을 표지한 것이다. IGF-1과 HGF의 수용체가 확인되지 않아 항체의 기능을 확인하기 위해 폐암세포인 A549 cell line을 세포주은행에서 구입하여 배양 한 후 유세포분석기(FACS)를 통해 확인하였다.

도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 전처리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포는 란테스(Rantes:CCR1), MIP-3 β (CCR7), SDF-1 α (CXCR1), BCA-1(CXCR5), CXCL16, EGF, TGF, PDGF-AB, IGF-1, TNF-알파, FGF에 대한 수용체를 발현하고 있음을 FACS 결과를 통해 확인할 수 있었다.

상기 결과에 따라, 특정 케모카인 또는 성장인자의 수용체가 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포에서 발현됨이 확인되었고 이러한 수용체는 해당 인자에 대해 반응하며 이러한 해당인자의 전처리로 인해 수용체의 발현율이 높아져서 이들간의 반응성을 이용하여 체내 질환부위로의 타겟팅 이동을 유도할 수 있고, 이를 통해 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.

지방 줄기세포의 케모카인 또는 성장인자 수용체 mRNA 확인

실시에 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포가 각각의 케모카인 또는 성장인자 수용체의 mRNA를 발현하는지 여부를, RT-PCR을 통해 확인하였다.

T75 Flask에서 배양한 지방줄기세포를 0.25%

trypsin/1mM EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음 PBS로 세척하고 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포는 Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology)를 이용하여 total RNA를 추출하였다.

RNA 2#956#g을 maxime RT Pre mix kit (iNtRON Biotechnology)로 cDNA를 합성하였다. 1X h-Taq buffer, 0.2mM dNTP, 0.4pM Primer_F, 0.4pM Primer_R, 0.25U/ μ l h-Taq DNA polymerase (Solgent)로 cDNA 1 μ l를 95 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 DNA를 변성시킨 후, 아래 표 8의 각 온도(어닐링 온도)에서 40초간 primer를 가열시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 PCR 산물을 신장시키는 반응을 40 cycle 조건으로 유전자 증폭을 실행하였다. 실험에 사용된 수용체 primer와 가열 온도는 다음 표 8과 같다.

SiZer DNA Markers -50 (iNtRON) 과 PCR 산물을 2.0% 아가로스겔과 1X TAE 시약을 이용하여 110V에서 1시간 30분 동안 전기영동 한 후 Fuji molecular imaging software로 이미지 측정을 하였다. 컨트롤 유전자로 GAPDH를 사용하였다. 모든 PCR 산물을 Solgent사에 염기서열분석을 의뢰하여 99% 이상 염기서열이 일치하는 것을 확인하였다.

그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 지방 줄기세포에서 각각의 케모카인 또는 성장인자의 수용체의 mRNA가 발현됨을 확인할 수 있었다. 도 7A의 각 밴드는 각각 1: CCR1 (380bp), 2: CCR2 (474bp), 3: CCR7 (461bp), 4: CXCR4 (489bp), 5: CXCR5 (494bp), 6: CXCR6 (517bp), 7: GAPDH (362bp). 도 7B의 각 밴드는 각각 M: Marker, 1: EGFR (419bp), 2: TGFBR2 (498bp), 3: PDGFRA (187bp), 4: PDGFRB (508bp), 5: IGF1R (299bp; 미발현), 6: c-MET (201bp), 7: TNFRSF1A (218bp), 8: FGFR1 (250bp), 9: GAPDH (362bp)을 나타내며, GAPDH는 양성 대조군으로 사용하였다.

이로써, 지방줄기세포에서 특정 케모카인 또는 성장인자의 수용체의 mRNA가 발현됨이 확인되었고, 이러한 수용체의 반응성을 이용하여 체내 질환으로의 타겟팅 이동을 유도할 수 있고, 이를 통해 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.

실시예 8: 지방 줄기세포에 대한 아디포넥틴의 전처리 및 농도별 유도능

8-1: 아디포넥틴의 농도별 유도능 확인

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 아디포넥틴으로 24시간동안 전처리한 후, 아디포넥틴을 각 농도 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml)로 처리하여 세포 이동을 유도하였다.

그 결과를 도 8에 도시하였다. 10ng/ml일 때에 비하여 100ng/ml로 처리하였을 때, 2배가량 높은 이동량을 보인 결과에 따라, 농도가 높을수록 세포 이동 유도능이 높음을 확인할 수 있었다.

8-2: 지방 줄기세포의 아디포넥틴 수용체 발현

실시에 7의 방법과 같은 방법으로 표 8에 기재된 프라이머와 어닐링 온도를 사용하여 RT-PCR를 수행하여 지방 줄기세포에서 아디포넥틴 수용체가 발현되는지 여부를 확인하였다.

그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 아디포넥틴의 수용체 2종류 (1:ADIPOR1(337bp), 2:ADIPOR2(538bp)가 지방 줄기세포에서 발현됨을 확인하였다. 이로써, 아디포넥틴의 전처리로 인해 아디포넥틴 수용체의 발현율이 높아져서 이들간의 반응성을 이용할 수 있음을 확인하였다.

이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 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.

면책안내

본 문서는 특허 및 과학기술문헌 전용의 첨단 자동번역 시스템을 이용해 생성되었습니다. 따라서 부분적으로 오역의 가능성이 있으며, 본 문서를 자격을 갖춘 전문 번역가에 의한 번역물을 대신하는 것으로 이용되어서는 안 됩니다. 시스템 및 네트워크의 특성때문에 발생한 오역과 부분 누락, 데이터의 불일치등에 대하여 본원은 법적 책임을 지지 않습니다. 본 문서는 당사의 사전 동의 없이 권한이 없는 일반 대중을 위해 DB 및 시스템에 저장되어 재생, 복사, 배포될 수 없음을 알려드립니다.

(The document produced by using the high-tech machine translation system for the patent and science & technology literature. Therefore, the document can include the mistranslation, and it should not be used as a translation by a professional translator. We hold no legal liability for inconsistency of mistranslation, partial omission, and data generated by feature of system and network. We would like to inform you that the document cannot be regenerated, copied, and distributed by being stored in DB and system for unauthorized general public without our consent.)