



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044722
(43) 공개일자 2011년04월29일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-0103951</p> <p>(22) 출원일자 2010년10월25일
심사청구일자 2010년10월25일</p> <p>(30) 우선권주장
1020090101117 2009년10월23일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
주식회사 알앤엘바이오
서울 관악구 봉천동 1596-7</p> <p>(72) 발명자
라정찬
경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을 SK한화아파트 626동 701호</p> <p>강성근
서울특별시 관악구 성현동 관악드림타운아파트 116동 504호</p> <p>백선진
서울특별시 동작구 상도4동 210-90</p> <p>(74) 대리인
이처영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 14 항

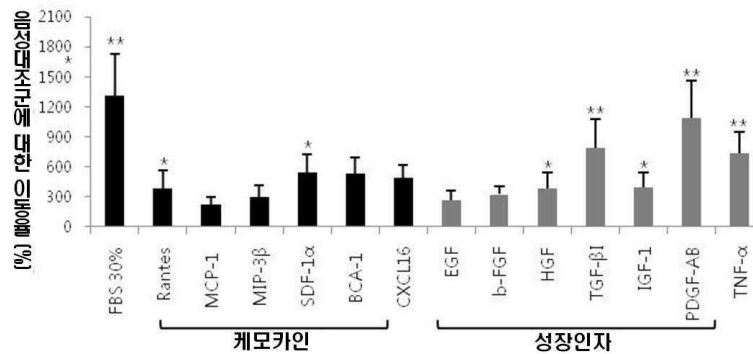
(54) 지방조직 유래 성체 줄기세포 이동을 유도하는 방법

(57) 요약

본 발명은 지방조직 유래 성체줄기세포의 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.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

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

청구항 2

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

청구항 3

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

청구항 4

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

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 케모카인 또는 성장인자는 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 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

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

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 칵테일은 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.

청구항 8

제7항에 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 조성물.

청구항 9

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.

청구항 10

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

청구항 11

- (a) 지방조직 유래 성체 줄기 세포에 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 각테일(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 내의 다른 부위에 투여하는 단계를 포함하는, 지방조직 유래 성체 줄기 세포 이동 유도방법.

청구항 12

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

청구항 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.

청구항 14

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

명세서

기술분야

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.

[0001]

배경 기술

- [0002] 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.
- [0003] 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 유래하며, 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.
- [0004] 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.
- [0005] 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.
- [0006] 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.
- [0007] 이에 본 발명자들은, 지방 중간엽 줄기세포 자체의 세포 이동(cell migration) 능력을 발견하고, 나아가 다양한 케모카인 및 성장인자를 전처리(Priming)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.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 이의 분비물을 유효성분으로 함유하는 지방 줄기세포 이동 유도용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 지방조직 유래 성체 줄기 세포의 질환 부위로의 이동방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 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.
- [0011] 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 데브리스(debris)를 제거하고 남은 브로스(broth)인 "인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포 배양물"의 형태로 사용할 수 있다.
- [0012] 또한, 상기 조성물은 FBS를 추가로 더 함유할 수 있는데, 특히 약 30% FBS를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0013] 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 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 선택되는 1종 이상인 케모카인 또는 성장인자 수용체를 발현함으로써, 이러한 케모카인 또는 성장인자에 반응하여 이동하게 된다.
- [0014] 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.
- [0015] 특히, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 칵테일(cocktail)로 전처리(priming)된 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0016] 상기 칵테일은 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 함유할 수 있는데, 특히, 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.
- [0017] 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.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0019] (a) 지방조직 유래 성체 줄기 세포에 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 칵테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 단계;
- [0020] (b) 상기 전처리된 지방조직 유래 성체 줄기 세포 및 이의 분비물을 함유하는 조성물을 질환 부위와 직접 접촉하지 않는 생체 내의 다른 부위에 투여하는 단계를 포함하는, 지방조직 유래 성체 줄기세포 이동 유도방법을 제공한다. 이 때, 특히, 정맥으로 투여하는 것이 가장 바람직하다.

발명의 효과

[0021] 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.

도면의 간단한 설명

[0022] 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: TGFB2 (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.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 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.

[0024] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다.

[0025] 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.

[0026] 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

- [0027] 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.
- [0028] 상기 "지방조직 유래 성체 줄기 세포" 또는 "지방조직 유래 중간엽 줄기세포"는 지방 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에서는 축약하여 "지방 유래 성체 줄기세포" 또는 "지방 줄기세포"라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통해 획득할 수 있다.
- [0029] 상기 지방 줄기세포물의 획득에 사용되는 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들어 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 등을 사용할 수 있다.
- [0030] 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 중탄산염) 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 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 베타-메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.
- [0031] 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.
- [0032] 그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:
- [0033]
 - 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-Kit를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제
- [0034]
 - 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
- [0035]
 - 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포스폴리인
- [0036]
 - gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M
- [0037]
 - 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)
- [0038]
 - 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF-beta
- [0039]
 - 다른 성장 인자, 예컨대 표피 성장 인자(EGF)
- [0040]
 - 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF
- [0041]
 - N-acetyl-L-cysteine (NAC)
- [0042]
 - Hydrocortisone
- [0043]
 - Ascorbic Acid
- [0044] 특히, 본 발명의 일 구체예에서 사용되는 지방 줄기세포를 획득하기 위한 배지는 NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는, FBS, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유할 수 있다.
- [0045] 본 발명은 상기 지방 유래 성체 줄기세포 분비물을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0046] 이러한 분비물은, 여러가지, 사이토카인, 아미노산, 성장인자 등을 포함하는데, 예를 들어, TGF, bFGF, IGF-1, KGF, HGF, fibronectin, VEGF, 아디포넥틴, 랩틴 또는 Procollagen 등의 물질일 수 있고, 이들의 수용체도 함

게 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.

- [0047] 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 "지방조직 유래 성체 줄기세포 배양물"의 형태로도 사용할 수 있고, 각각의 성분을 추출하여 단독으로 또는 함께 사용할 수도 있다.
- [0048] 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.
- [0049] 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.
- [0050] 본 발명에서 '케모카인 또는 성장인자 수용체 기능을 발휘한다'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.
- [0051] 상기 성장인자(growth factor)는 각종 세포분열이나 성장 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 세포내 영역에서 티로신키나아제의 활성을 가지는 경우가 많으며, 리간드 수용체와 결합하면 수용체자신이나 세포내 단백질의 티로신잔기가 인산화되며 세포증식이나 분화가 일어나게 된다.
- [0052] 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(Ca^{2+}) 농도의 일시적 증가, 과립 세포외배출, 인테그린 상승조절, 생활성 지질(예를 들어, 류코트리엔)의 형성 및 호흡기 방출도 선택적으로 유도될 수 있다. 그러므로, 케모카인은 조기에 염증 반응을 유발시켜, 감염 또는 염증 부위에서 염증 매개체 방출을 일으키고, 주화성 및 일혈을 유발시킨다.
- [0053] 일반적으로, 케모카인 및 케모카인 수용체의 상호작용은, 하나의 케모카인이 다수의 케모카인 수용체와 결합할 수 있고 역으로 하나의 케모카인 수용체가 몇 개의 케모카인과 상호작용 할 수 있다는 점에서 유연성을 띤다. 이러한 케모카인 수용체 신호전달 및 리간드에 대한 선택성에 관한 다수의 측면들은 아직 파악되지 않고 있다.
- [0054] 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('타겟팅(targetting) 이동'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.
- [0055] 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.
- [0056] 한편, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물의 수용체 발현율을 높이거나 또는 반응성을 높이

기 위하여, 상기 지방조직 유래 성체 줄기세포는 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 칵테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 것이 바람직하다.

[0057] 특히, 상기 칵테일은 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.

[0058] 본 명세서의 실시예 5에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 특정 케모카인 또는 성장인자를 전처리한 지방조직 유래 성체 줄기세포 및/또는 이의 분비물의 경우, 해당 케모카인 또는 성장인자에 대한 세포 이동성의 효과가 현저히 증가한다.

[0059] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서,

[0060] (a) 지방조직 유래 성체 줄기 세포에 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 칵테일(cocktail)로 전처리(priming)하는 단계;

[0061] (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.

[0062] 이 때, 상기 (a)단계에서 케모카인 또는 성장인자를 함유하는 칵테일(cocktail)로의 전처리(priming)는 지방 줄기세포의 배양 배지에 상기 케모카인 또는 성장인자들을 함유시켜 배양하는 방법으로 이루어질 수 있고, 20~60 시간, 바람직하게는 약 20~50시간 동안 수행한다. 본 발명의 일 구체예에서는 약 24시간 동안 전처리를 수행하였다. 또한, 상기 칵테일은 지방 줄기세포 배양 전, 배양 중, 또는 배양 후에 전처리할 수 있고, 바람직하게는 배양 후에 전처리한다.

[0063] 상기 칵테일은 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.

[0064] 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.

[0065] 그리고, 상기 '질환 부위와 직접 접촉하지 않는 생체 내의 다른 부위에 투여'라 함은 병변 부위에 직접 이식하는 방법을 제외하고, 병변 이외의 부위에서 줄기 세포의 적어도 부분적인 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 "투여"는 "도입", "전달", "배치" 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.

[0066] 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.

- [0067] 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.
- [0068] '치료하는'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, '치료'란 용어는 '치료하는'이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서, 포유 동물에 있어서 질환의 "치료" 또는 "치료요법" 은 하기의 하나 이상을 포함한다:
 - [0069] (1) 해당 질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴,
 - [0070] (2) 질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함,
 - [0071] (3) 질환을 경감시킴, 즉, 암의 퇴행을 야기시킴,
 - [0072] (4) 질환의 재발을 예방함, 및
 - [0073] (5) 질환의 증상을 완화함(palliating)
- [0074] 줄기세포를 질환부위로 이동시켜 해당 부위를 치료하기 위해, 본 발명의 조성물을 약리학적 유효량으로 투여한다.
- [0075] '약리학적 유효량(therapeutically effective amount)'은 투여되는 화합물의 양이 치료하는 장애의 하나 또는 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 양을 의미한다.
- [0076] 본 발명의 조성물(세포치료제)은 임상투여시에 근육 또는 정맥 주사제와 같은 형태의 비경구 투여 등이 가능하나, 가장 바람직하게는 정맥 주사에 의한 투여이다.
- [0077] 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 당업계에 일반적으로 공지되어 있다.
- [0078] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0079] 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.
- [0080] 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.
- [0081] 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 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0082] 이하 실시한 실시예에서 사용한 각종 배지 및 시약의 입수처는 하기 표에 기재된 바와 같다.

표 1

[0083]

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

실시예 1

[0084]

인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

[0085]

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.

[0086]

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.

실시예 2

[0087]

지방 줄기세포의 세포이동 유도

[0088]

2-1: 표 2의 케모카인 또는 성장인자로 세포이동 유도

[0089]

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 각 웰마다 2 x 10⁴ cells/200 μ l로 씨딩(seeding)하여 이하 케모카인 또는 성장인자로 세포이동을 유도하였다. 양성 대조군으로 FBS 30%를 사용하였다.

표 2

[0090]

FBS 30%	BCA-1	TGF- β 1
Rantes	CXCL16	IGF-1
MCP-1	EGF	PDGF-AB
MIP-3 β	b-FGF	TNF- α
SDF-1 α	HGF	

[0091]

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 이

동이 활발히 유도되었다.

[0092] **2-2: 그 외의 케모카인 또는 성장인자로 세포이동 유도한 사진 촬영**

[0093] 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.

[0094] 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 l seeding하여 37° 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° 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.

[0095] 세척 후 0.5% crystal violet 용액으로 염색을 1시간하였다. 그 후 세척을 하여 현미경에서 X100로 관찰 후 사진을 찍었다.

[0096] 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.

실시예 3

[0097] **케모카인 또는 성장인자를 전처리한 지방 줄기세포의 세포이동**

[0098] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 이하 케모카인 또는 성장인자로 24시간 전처리(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).

표 3

[0099]	Rantes	TNF- α
	SDF-1 α	PDGF-AB
	HGF	TGF- β 1

[0100] 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.

실시예 4

[0101] **TNF- α 전처리된 지방 줄기세포의 세포이동**

[0102] 실시예 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.

표 4

[0103]

FBS 없음	BCA-1	TGF-β 1
Rantes	CXCL16	IGF-1
MCP-1	EGF	PDGF-AB
MIP-3 β	bFGF	TNF- α
SDF-1 α	HGF	

[0104]

그 결과를 도 4에 도시하였다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, TNF-α로 전처리한 지방조직 유래 중간엽 줄기 세포(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-α로 전처리한 경우 세포 이동성이 확연히 활발해 짐을 확인할 수 있었다.

실시예 5

[0105]

지방 줄기세포에 대한 다양한 케모카인 또는 성장인자의 전처리 및 세포이동 유도능

[0106]

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

표 5

[0107]

FBS 30%	BCA-1	TGF-β 1
Rantes	CXCL16	IGF-1
MCP-1	EGF	PDGF-AB
MIP-3 β	b-FGF	TNF- α
SDF-1 α	HGF	

[0108]

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-3β, SDF-1 α, BCA-1, CXCL16, EGF, PDGF-AB 등 상기 인자로 전처리한 지방 줄기세포가 전처리하지 않은 경우에 비해 세포 이동성이 개선됨을 확인할 수 있었다. 특히, Rantes, SDF-1 α, BCA-1, CXCL16 및 PDGF-AB의 경우는 세포 이동능이 현저히 증가하였다.

실시예 6

[0109]

지방 줄기세포의 케모카인 또는 성장인자 수용체 발현

[0110]

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

[0111]

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

표 6

[0112]

수용체	케모카인 또는 성장인자	리간드
CCR1	RANTES	CCL5
CCR2	MCP-1	CCL2
CCR7	MIP-3 β	CCL19

CXCR4	SDF-1 α	CXCL12
CXCR5	BCA-1	CXCL13
CXCR6	CXCL16	CXCL16
EGF	EGFR	
b-FGF	FGFR1	
HGF	c-MET	
TGF-β 1	TGFBR2	
IGF-1	IGF1R	
PDGF-AB	PDGFRA, PDGFRB	
TNF-α	TNFRSF1A	

[0113] 지방 줄기세포를 T75 플라스크에서 배양한 후 90% 컨플루언스로 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 고정을 한 뒤 세척을 하였다. 그 이후, 표 7의 항체를 4도 냉장고에서 1시간 이상 배양하여 FACS를 측정하였다.

표 7

항체	구입처	번호
anti-human CCR1	R&D Systems	MAB145
anti-human CCR2	R&D Systems	MAB150
anti-human CCR7	R&D Systems	MAB197
anti-human CXCR4	R&D Systems	MAB170
anti-human CXCR5	R&D Systems	MAB190
anti-human CXCR6	R&D Systems	MAB699
anti-human EGF Receptor	BD Pharmingen	555997
TGFβ RII (D-2)	Santa Cruz Biotechnology	sc-1779949
CD140a-PDGFRα	BD Pharmingen	556002
CD140b-PDGFRβ	BD Pharmingen	558821
CD221-IGF1R	BD Pharmingen	555999
anti-human HGF R/c-MET	R&D Systems	FAB3582F
CD120a-TNFRSF1A	BD Pharmingen	550514
FGFR1 antibody [M19B2]	Abcam	ab823

[0115] 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.

[0116] 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 전처리한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포는 란테스(Rantes;CCR1), MIP-3β(CCR7), SDF-1α(CXCR1), BCA-1(CXCR5), CXCL16, EGF, TGF, PDGF-AB, IGF-1, TNF-알파, FGF에 대한 수용체를 발현하고 있음을 FACS 결과를 통해 확인할 수 있었다.

[0117] 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 질환부위의 타겟팅 이동을 유도할 수 있고, 이를 통해 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.

실시예 7

[0118] 지방 줄기세포의 케모카인 또는 성장인자 수용체mRNA 확인

[0119] 실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포가 각각의 케모카인 또는 성장인자 수용체의 mRNA

를 발현하는지 여부를, RT-PCR을 통해 확인하였다.

[0120] 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.

[0121] RNA 2 µg을 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/µl h-Taq DNA polymerase (Solgent)로 cDNA 1µl를 95°C에서 20 초 동안 DNA를 변성시킨 후, 아래 표 8의 각 온도(어닐링 온도)에서 40초간 primer를 가열시키고, 72°C에서 1분 간 PCR 산물을 신장시키는 반응을 40 cycle 조건으로 유전자 증폭을 실행하였다. 실험에 사용된 수용체primer와 가열 온도는 다음 표 8과 같다.

표 8

[0122]

수용체	서열번호 1~34 (F: 포워드, B: 백워드)	생산물	어닐링 온도
CCR1	F : 5'-CATCTGGCTTCCATGCCAGGCT-3' R : 5'-CCTCCGTCACCTGACAGCCAGGT-3'	380bp	62 ° C
CCR2	F : 5'-CCTCCTGACAATCGATAGATACCT-3' R : 5'-GTCACCTGCGTGGCTTGGTCCAGT-3'	474bp	56 ° C
CCR7	F : 5'-ATCTCCAAGACCAGAGATAGTG-3' R : 5'-AAATGTTGCTCTCTTAACGAAT-3'	461bp	62 ° C
CXCR4	F : 5'-GAGGAGTTAGCCAAGATGTG-3' R : 5'-TTCTTCTGGTAACCCATGAC-3'	489bp	62 ° C
CXCR5	F : 5'-CATCCTAATCATCCAATGCT-3' R : 5'-AGCTCTTTTCTTCCCTCTGT-3'	494bp	62 ° C
CXCR6	F : 5'-CCTAACCCCTGTGCTCTATG-3' R : 5'-CTCACCTTCAACCTTCAG-3'	517bp	62 ° C
EGFR	F : 5'-GCATCTGCCTCACCTCCACCGTGA-3' R : 5'-GATTCGGTCATATGGCTTGGATCCA-3'	419bp	64 ° C
FGFR1	F : 5'-CCTGACCACAGAATTGGAGGCTACA-3' R : 5'-AGTTCATGTGAAGGTGTACAGTG-3'	250bp	58 ° C
TGFBR2	F : 5'-CCACGTGTGCCAACCAATCAACCA-3' R : 5'-TGAAGAACGACCTAACCTGCTGCC-3'	498bp	58 ° C
CD120a -TNFRSF1A	F : 5'-GAGAGGCATAGCTGTCTGG-3' R : 5'-GTTCTTTGTGGCACTTGGT-3'	218bp	58 ° C
CD140a -DGFRB	F : 5'-GAAGCTGTCAACCTGCATGA-3' R : 5'-CTTCTTAGCACGGATCAGC-3'	187bp	58 ° C
CD140b -DGFRB	F : 5'-GCGGCTGGTGGAGCCGGTACTGA-3' R : 5'-CTCACTTAGCTCCAGCACTCGGACA-3'	508bp	68 ° C
CD221 -IGF1R	F : 5'-GTGAACGAGGCCGCAAGCATGCGT-3' R : 5'-CTGTGGACGAACTTATTGGCGTTGA-3'	299bp	58 ° C
c-MET	F : 5'-CAGGCAGTGCAGCATGTAGT-3' R : 5'-GATGATCCCTCGGTCAGAA-3'	201bp	58 ° C
ADIPOR1	F : 5'-GCTGACACGGTGGAACTGGCTGAACT-3' R : 5'-CTGTATGAATGCGGAAGATGCTCTTGA-3'	337bp	60 ° C
ADIPOR2	F : 5'-GGCAACATTTGGACACATCTTTAGGT-3' R : 5'-CAGCTCCTGTGATGTAGAGGCTGGCCA-3'	538bp	60 ° C
GAPDH	F : 5'-AATCCCATCACCATCTCCAG-3' R : 5'-AGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'	362bp	55 ° C

[0123] 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 GAPDH 를 사용하였다. 모든 PCR 산물을 Solgent사에 염기서열분석을 의뢰하여 99% 이상 염기서열이 일치하는 것을 확

인하였다.

[0124] 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.

[0125] 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 치료가능함을 시사한다.

[0126] **실시예 8: 지방 줄기세포에 대한 아디포넥틴의 전처리 및 농도별 유도능**

[0127] **8-1: 아디포넥틴의 농도별 유도능 확인**

[0128] 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.

[0129] 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.

[0130] **8-2: 지방 줄기세포의 아디포넥틴 수용체 발현**

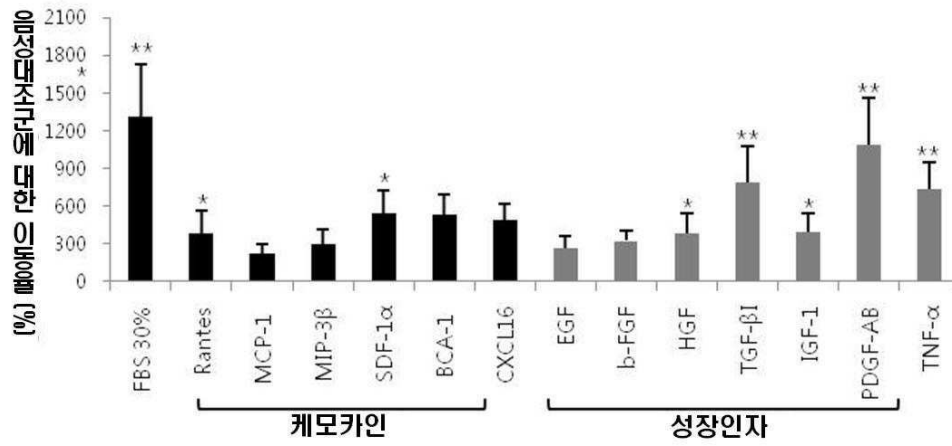
[0131] 실시예 7의 방법과 같은 방법으로 표 8에 기재된 프라이머와 어닐링 온도를 사용하여 RT-PCR를 수행하여 지방 줄기세포에서 아디포넥틴 수용체가 발현되는지 여부를 확인하였다.

[0132] 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.

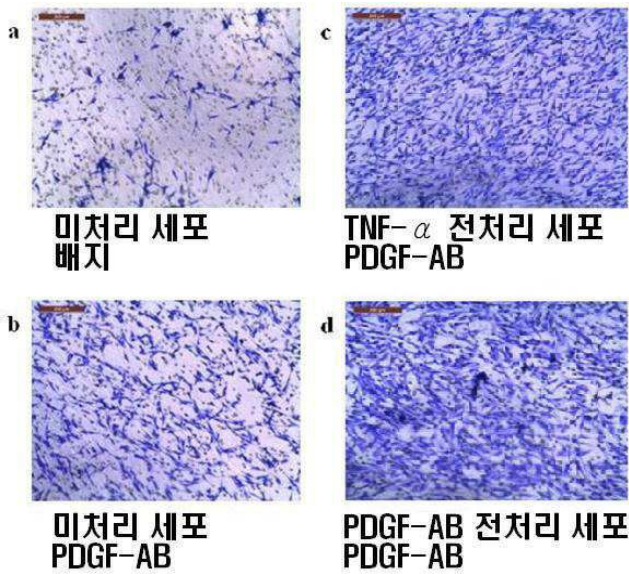
[0133] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

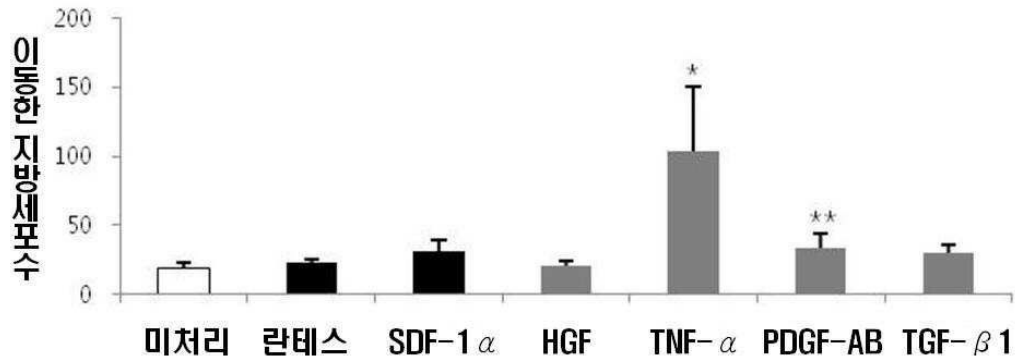
도면1



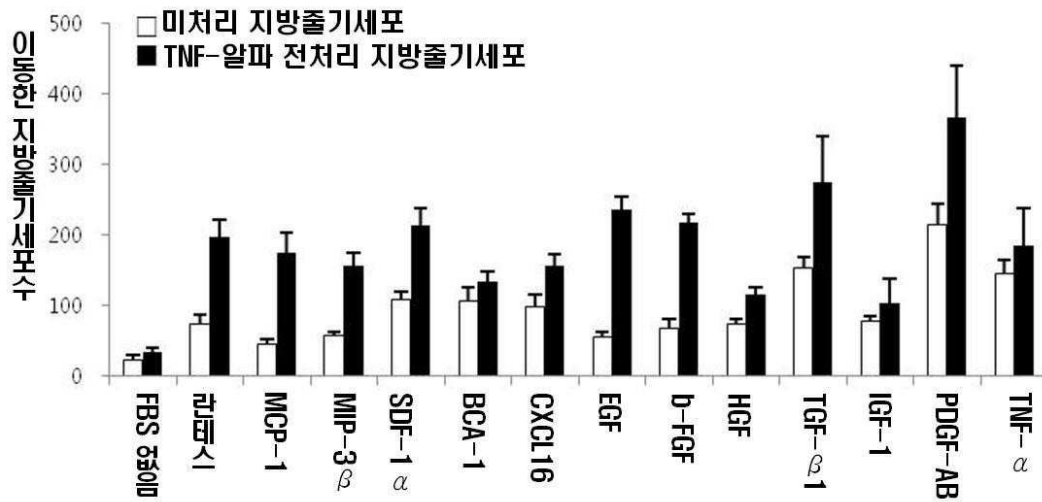
도면2



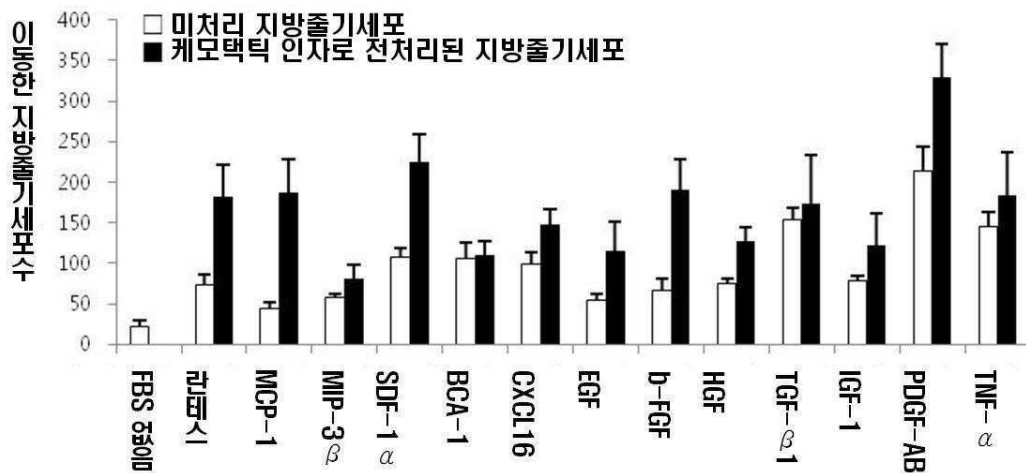
도면3



도면4

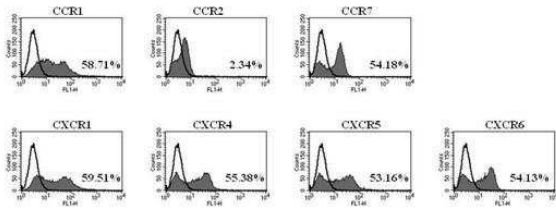


도면5

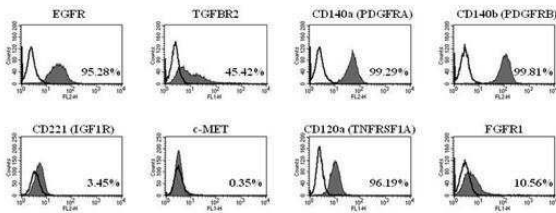


도면6

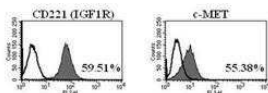
줄기세포에서 발현된 케모카인 수용체(FACS)



줄기세포에서 발현된 성장인자 수용체(FACS)



A549세포에서 발현된 성장인자 수용체(FACS)

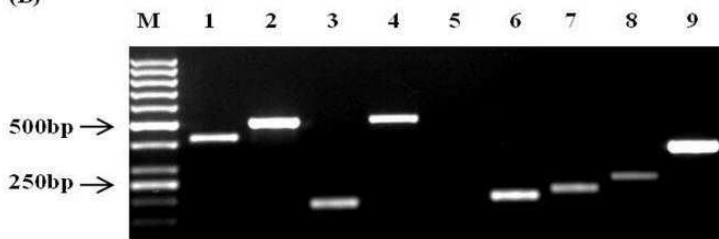


도면7

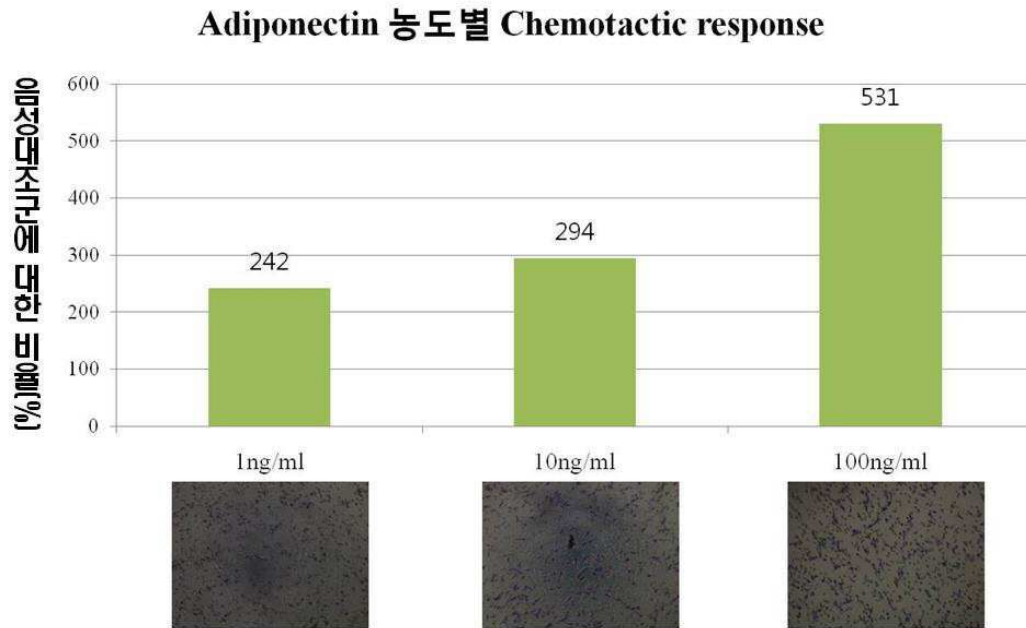
(A)



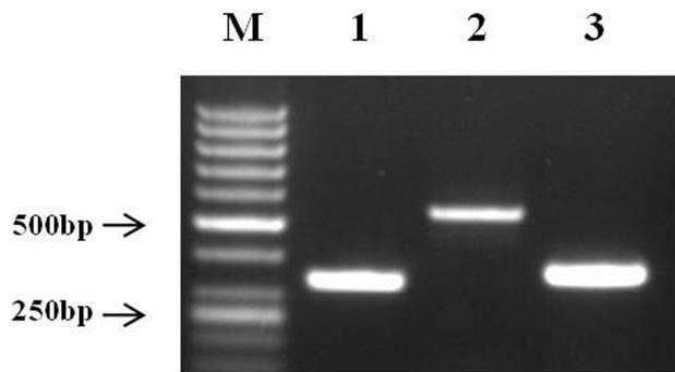
(B)



도면8



도면9



서열 목록

- <110> RNL Bio Co Ltd.
- <120> A Method for inducing a Migration of Adipose-derived Adult Stem Cells
- <130> PP-B0951
- <150> KR1020090101117
- <151> 2009-10-23
- <160> 34
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 1
 catcttggt tccatgccag gct 23
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 cctccgtcac ttgcacagcc aggt 24
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 cctcctgaca atcgatagat acct 24
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gtcacctgcg tggettgtc cagt 24
 <210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 atctcaaga ccagagatag tg 22
 <210> 6

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 aaatgttgct ctcttaacga at 22
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gaggagttag ccaagatgtg 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ttctttctggt aacctatgac 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 catcctaate atccaatgct 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10

agctcttttc ttcctctgt 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 ccttaaccct gtgctctatg 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 ctcaccttt caaccttcag 20

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 gcatctgcct cacctccacc gtgca 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 gattccgtca tatggcttgg atcca 25

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 15
 cctgaccaca gaattggagg ctaca 25
 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 agttcatgtg taagggtac agtg 24

 <210> 17
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 ccacgtgtgc caacaacatc aacca 25
 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 tgaagaacga ctaacctgc tgcc 24
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 gagaggccat agctgtctgg 20

 <210> 20
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 gttcctttgt ggcacttggt 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 gaagctgtca acctgcatga 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 cttctttagc acggatcagc 20

 <210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 gcggctggtg gagccggtga ctga 24
 <210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 ctcaattagc tccagcactc ggaca 25
 <210> 25

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 gtgaacgagg ccgcaagcat gcgt 24

<210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 ctgtggacga acttattggc gttga 25

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 caggcagtgc agcatgtagt 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 gatgattccc tcggtcagaa 20

<210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29

gctgacacgg tggaactggc tgaact 26

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

ctgtatgaat gcggaagatg ctcttga 27

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

ggcaacattt ggacacatct cttaggt 27

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

cagctcctgt gatgtagagg ctggcca 27

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

aatcccatca ccatcttcca g 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 34

aggggccatc cacagtcttc t

21