



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0056925
(43) 공개일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.

A61K 35/50 (2006.01) A61P 13/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0120535

(22) 출원일자 2008년12월01일

심사청구일자 2008년12월01일

(30) 우선권주장

1020070124010 2007년11월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 알앤엘바이오

서울 관악구 봉천동 1596-7

(72) 발명자

라정찬

경기 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을 SK한화아파트 626동 701호

이항영

경기 수원시 장안구 정자동 백설마을 진로아파트 526동 1803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

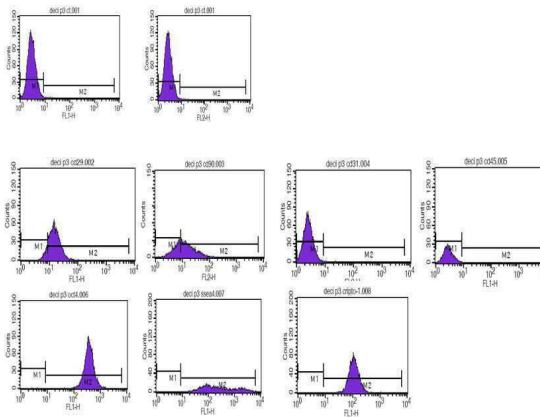
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 탈락막 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금의 세포치료제

(57) 요약

본 발명은 탈락막 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금의 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 태반이나 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금의 세포치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 탈락막 또는 지방 유래 줄기세포는 요누출압 증가 및 요도괄약근 수축력을 향상시키는 효과를 나타내므로 요실금 치료제로서 유용하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

조정윤

서울 송파구 오금동 131-17번지

김윤정

서울 서초구 양재동 247-5번지 양재캐슬 401호

특허청구의 범위

청구항 1

태반 또는 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 요실금 세포치료제.

청구항 2

제1항에 있어서, 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 다음과 같은 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 요실금 세포치료제:

- (a) CD29 및 CD90에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31 및 CD45에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타냄;
- (b) Oct4, SSEA4 및 Cripto-1에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄;
- (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및
- (d) 근세포로 분화하는 능력을 가짐.

청구항 3

제1항에 있어서, 지방 유래 줄기세포는 다음과 같은 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 요실금 세포치료제:

- (a) CD73, CD90, CD29, CD44 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; 및
- (b) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 탈락막 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금의 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 태반이나 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금의 세포치료제에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 줄기세포(stem cells)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cells), 전능성(전분화능) 줄기세포(pluripotent stem cells), 다능성(다분화능) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.
- <3> 만능 줄기세포(totipotent stem cells)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 cells)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. 다능성(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관을 형성하는 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포이다.
- <4> 다능성 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang *et al.*, *Nature*, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 소스이지만, 다능성 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi *et al.*, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang *et*

al., *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직내의 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들을 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

- <5> 이에 대해, 지방 조직이 다능성 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다(B.Cousin *et al.*, *BBRC.*, 301:1016, 2003; A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 189:54, 2001; M.J.Seo *et al.*, *BBRC.*, 328:258, 2005). 즉, 지방흡입(liposuction)에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것은 in vitro상에서 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는 세포라는 사실이 보고되었다(P.A.Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M Rodriguez *et al.*, *BBRC.*, 315:255, 2004). 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점이 있어, 기존의 단점을 보완하는 새로운 줄기세포의 소스로 주목받고 있는 것이다. 또한, 최근 연구에서는 지방 조직 유래 세포가 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있음이 동물 모델 실험을 통하여 알려짐으로써, 줄기세포의 새로운 소스로서 두각을 나타내고 있다.
- <6> 본 출원인은 세절한 태반 조직을 콜라게나아제 및 bFGF 함유 배지에서 배양하여, 태반 줄기세포를 분리한 다음, 근세포, 골형성 세포, 신경세포, 지방세포, 연골세포 또는 췌장 베타세포로 분화시킨바 있다 (KR 2007-0101756 A).
- <7> 한편, 여성 요실금은 다산과 노령으로 인한 음부신경의 손상으로 인한 골반근육의 지지 약화에서 오는 요도 및 방광의 처짐이 원인이 된다. 현재 국내 여성 요실금 환자 수는 400~500만 명으로 추정되며, 노년층 여성의 급격한 증가로 인하여 매년 환자수가 증가 추세에 있다. 이에 현재 여성 요실금은 전세계적으로 발생하는 심각한 사회적 문제의 하나로 대두되고 있다. 요실금 환자를 치료하기 위해 주사요법이나 요도 및 방광을 지지하기 위한 수술요법과 주사요법이 사용되고 있다. 현재 수술요법은 침습적인 방법으로 합병증이 발생할 수 있다는 문제점이 있고, 주사요법은 고가 물질이어서 환자에게 용이하게 쓰일 수 없을 뿐만 아니라, 성공률이 50~60% 밖에 되지 않아 재주사 및 재수술이 요구되는 문제점이 있다.
- <8> 줄기세포 주사치료는 마취가 필요하지 않고 손쉽게 요도괄약근에 주사할 수 있어, 줄기세포 주사요법이 요도괄약근의 수축력을 향상시키고 요누출압을 증가시킬 수 있다면 요실금은 줄기세포치료의 좋은 적응증이 될 수 있을 것이다. 그러나 줄기세포를 이용한 요실금 치료에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다.
- <9> 이에, 본 발명자들은 줄기세포를 이용한 요실금 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 탈락막 또는 지방 유래 줄기세포가 요실금의 치료에 효과적이라는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 본 발명의 목적은 태반이나 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금 세포치료제를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <11> 상기 목적을 달성하고자, 본 발명은 태반 또는 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 요실금 세포치료제를 제공한다.

효 과

- <12> 본 발명에 따른 태반이나 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포는 근세포로 분화하는 능력이 우수하여, 요누출압 증가 및 요도괄약근 수축력을 향상시키는 효과를 나타내므로 요실금 치료제로서 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <13> 본 발명은 일 관점에서, 태반 또는 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 요실금의 세포치료제에 관한 것이다.

- <14> 1. 용어의 정의

- <15> 본 발명에서 사용된 용어 '줄기세포'는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있

는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래('전이(transit)') 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.

<16> 본 발명에서 사용된 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다. 예를 들면, 개체발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리카나 몸통 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포 또는 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질적이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어져 있는 상태를 분화라고 한다.

<17> 본 발명에서 사용된 용어 '세포치료제'는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은 특히 탈락막 또는 지방 유래 줄기세포 치료제에 관한 것이다.

<18> 2. 탈락막 유래 줄기세포의 분리 및 정제

<19> 태반(placenta)은 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 것으로 일반적으로 무게 500g, 지름 15-20cm, 두께 2-3cm 정도의 원반 형태로 되어있다. 태반의 한쪽은 모체와 닿아 있고 다른 한쪽은 태아와 맞닿아 있으며 그 사이 공간에 모체의 혈액이 담겨 있어 태아에게 영양분을 공급하게 된다. 태반은 양막, 장막 및 탈락막의 3층으로 구성되어 있다. 양막은 태아를 둘러싸고 있는 얇고 투명한 막으로, 양수가 들어 있으며, 양막에는 태아의 줄기세포가 존재한다. 탈락막은 수정란이 자궁에 착상되기 위해 자궁의 상피세포가 변형되어 형성된 막으로써 모체의 줄기세포가 존재한다. 본 발명에서는 상기 탈락막으로부터 줄기세포를 분리하였다.

<20> 본 발명에 따른 인간 태반조직(human term placenta)에서 분리된 탈락막(decidua) 유래 줄기세포는 성인의 자가성 성체줄기세포로 분류되고, 태반조직을 사용하므로 윤리적으로 문제가 되지 않는다.

<21> 통상 다음과 같은 방법을 통하여, 태반의 탈락막으로부터 줄기세포를 분리 및 정제한다. 포유류의 태반(바람직하게는 인간의 태반)을 자궁으로부터의 만출 후, 이로부터 탈락막을 분리한 다음, 처리 및 배양하여 다능성 줄기세포, 태반 탈락막 유래 줄기세포 및 다른 생체 물질을 생성한다. 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 자궁으로부터 만출된 태반으로부터 수득된다. 바람직한 실시양태에서, 태반의 탈락막은 성장 인자[예: bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor)]의 존재하에서 배양된다.

<22> 본 발명에서는 다음과 같은 방법을 통하여, 인간 태반 조직의 탈락막으로부터 줄기세포를 분리 및 정제하였다. 인간 태반 조직샘플로부터 탈락막을 분리하여 각각 PBS로 세척한 다음, 탈락막 조직을 잘게 자른다. 잘게 자른 탈락막 조직을 100 mm 디쉬로 옮긴 후 콜라게나아제 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) 배지를 이용해 37°C에서 1시간 동안 화학적으로 분해한다.

<23> 화학적 분해된 조직들을 100µm 메쉬(mesh)에 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거후 1200rpm에서 1~10분간 원심분리하였다. 상층액은 석션(suction)하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1200rpm으로 1~10분간 원심분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 단일세포로 잘 부유시킨 후 bFGF가 함유되어 있는 DMEM배지에서 배양한다. 이때, 중간엽 줄기세포의 경우는 바닥에 부착이 되고 이외의 세포들은 부유하여 있다.

<24> 이러한 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타낸다. 이틀이 지난 후 디쉬 바닥에 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 배지를 2~3일마다 교체하면서 배양하여 인간 태반에서 분리한 탈락막 유래 줄기세포액을 수득하였다.

<25> 상기 분리된 탈락막 유래 줄기세포의 증식율을 조사하면, 계대수(passage number)가 12에 이르기까지, CPDL이 점진적으로 증가하여 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있다 (도 2).

<26> 수득한 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능하다 (도 3). 본 발명에서 사용 가능한 SFM 배지의 하나로 2% B27, 500mM 2-mercaptoethanol, 1µg/ml Hydrocortisone, 5µg/ml insulin, 20ng/ml EGF, 20ng/ml bFGF을 함유하는 MEBM (Mammary Epithelial Basal

Medium) 배지를 들 수 있다.

- <27> 증식된 세포의 갯수 및 유형은 유동 세포측정, 세포 분류, 면역세포화학(예를 들어, 조직 특이성 또는 세포-표지 특이적 항체로 염색시킴), 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS), 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting, MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하는 형태 및 세포의 표면 표지에서의 변화를 측정하거나, 광학 현미경 또는 공초점(confocal) 현미경을 사용하여 세포의 형태를 검사하거나, 또는 PCR 및 유전자 발현 프로파일링(profiling)과 같이 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정함으로써 쉽게 모니터링될 수 있다.
- <28> 바람직한 실시양태에서, 태반이나 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포는 당해 분야에 공지된 기법, 예를 들어 밀도 구배 원심분리, 자석 세포분리, 유세포분석기, 또는 다른 세포 분리법을 사용하여, 또는 당해 분야에 공지된 분류 방법을 사용하여 분류된다.
- <29> 일례로, 수득한 태반이나 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포액으로부터 목적의 표면항원을 발현하고 있는 다능성 줄기세포를 수득하는 방법으로서는 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 다능성 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 페닝법(*J. Immunol.*, 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 대량의 배양액 등으로부터 다능성 줄기세포를 수득하는 방법으로서, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.
- <30> 플로우 사이토미터 소팅 방식으로서, 수적하전 방식, 셀캡처 방식 등을 들 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 표면 표지-특이적 항체 또는 리간드는 분명한 형광 라벨로 표지된다. 세포는 세포 분류기를 통해 처리되어 그들의 사용된 항체에 대한 결합능력에 기초하여 세포가 분리된다. FACS-분류된 입자는 96웰 또는 384웰 플레이트의 개별 웰(well)내에 직접 침착되어 분리 및 클로닝을 촉진시킬 수 있다.
- <31> 어떠한 방법으로도 세포의 표면항원을 특이적으로 인식하는 항체를 형광으로 표지하고, 표지된 항체와 항원의 결합체에 대한 형광을 측정하여 형광 강도를 전기 신호로 변환함으로써 세포의 항원 발현량을 정량할 수 있다. 또한, 사용하는 형광물질의 종류를 조합함으로써, 복수의 표면 항원을 발현하고 있는 세포를 분리하는 것도 가능하다. 여기에 사용가능한 형광물질로는, FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin), APC(allophycocyanin), TR(TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.
- <32> 본 발명에서 사용 가능한 하나의 방법인 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서, 상기에서 수득한 줄기세포용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과 한번 적당한 배지 중에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다. 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 세포 샘플을 혼합하고, 4℃에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않는 경우에는 세정 후 일차 항체에 대해서 결합 활성을 갖는 형광 표지된 이차 항체와 일차 항체가 반응한 세포를 혼합하고, 다시 4℃에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 세정 후, 일차 항체와 이차 항체에서 염색된 세포를 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다.
- <33> 3. 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 특성
- <34> 태반의 탈락막으로부터 분리된 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 균질하고 멸균성이다. 또한, 줄기세포는 인간에게 투여되기 적합한 형태(즉, 약학적 등급)로 용이하게 수득된다.
- <35> 장기간 배양 후 세포들을 표면 CD 시리즈 항원 마커들, 예를 들어 CD29 (mononuclear cell marker), CD31(endothelial cell and stem cell marker), CD45(hematopoietic cell marker) 및 CD90(mononuclear stem cell marker)들로 캐릭터라이제이션하여 FACS 분석에 적용할 수 있다.
- <36> 본 발명의 방법에 의해 수득된 바람직한 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 하기 세포 표면 표지의 존재에 의해 규명될 수 있다: CD29 및 CD90에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31 및 CD45에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타낸다. 이러한 세포 표면 표지는 당해 분야에 익히 공지된 방법에 따라, 예를 들어 유세포분석기에 의해 일괄적으로 측정된 후 세척하고, 항-세포 표면 표지 항체로 착색된다.
- <37> 또한, 본 발명의 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 미분화상태의 줄기세포 마커라고 할 수 있는 Oct4, SSEA4, 및 Cripto-1의 마커를 이용하여 확인할 수 있다(도 4, 5 및 6). Oct4는 줄기세포에서 미분화상태 표지인자로서 잘 알려져 있고, 기술분야에서는 대한민국특허출원 제10-2004-0105716호 "인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론

항체", 대한민국특허출원 제10-2004-0096780호 "포유류 배아 및 줄기세포의 미분화 상태 유지 Oct4 유전자 발현 억제용 이중나선 RNA", 대한민국특허출원 제10-2006-0092128호 "과골세포 기반 적소 유사 구조에 의해 증식능이 증가된 인간 제대혈 유래 다분화능 줄기 세포 및 그 제조방법" 등에서 나타난 바와 같이, 미분화상태의 줄기세포임을 입증하기 위한 실험으로 Oct4 발현능 실험을 하는 것이 통상이다. 또한, SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4)과 Cripto-1이 인간 배아줄기세포의 표면에 존재한다는 것도 당업자에게 이미 알려져 있는 사실이다.

<38> Oct4 발현을 FACS 법과 더불어 RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 확증한다. RT-PCR의 방법은 당분야에 공지되어 있는 기술이다. RT-PCR은 특정 부위의 RNA를 주형(template)로 하여 이에 상응하는 cDNA를 합성한 다음, 이를 이용하여 PCR 증폭을 시행하는 기술이며, 실험과정은 (1) 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 RNA로부터 cDNA를 제조하는 과정과 (2) cDNA를 이용하여 특정부위를 증폭시키는 과정으로 이루어지며 (2)과정은 게놈(genomic) DNA로부터 특정 유전자 부위를 증폭시키는 방법과 같다. 이 방법은 노던 블롯 하이브리다이제이션과 같은 방법을 통해 가능하던 RNA 분석보다 실험방법이 더욱 간단할 뿐만 아니라, 유전자의 염기서열 결정이 가능하기 때문에 주로 mRNA의 염기서열 및 전사량을 연구할 때 크게 도움이 되는 기술이다.

<39> 본 발명의 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 Oct4, SSEA4 및 Cripto-1의 발현에 대해 양성 반응을 나타낸다 (도 4, 5 및 6).

<40> 4. 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 분화

<41> 본 발명의 방법에 의해 수득된 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 근세포로의 분화를 비롯한, 특정 세포 계통을 따라 분화하도록 유도될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 수득된 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 이식 및 생체 외 처리 프로토콜에서의 사용을 위해 분화하도록 유도된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 수득된 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 특정 세포 유형으로 분화하도록 유도되고 치유 유전자 생성물을 제공하도록 유전자적으로 설계된다.

<42> 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 특정 근세포로의 분화 측정은 당해 분야에 익히 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들어, 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 하루 동안 아자사이티딘(azacytidine)을 전처리 한 후 SKBM 배지(cambrex, co.)에서 근세포로의 분화를 유도할 수 있다.

<43> 또한, 상기 분화세포들은 유세포 분석 또는 면역세포화학과 같은 기법을 사용하여 세포 표면 표지(예를 들어 조직-특이적 또는 세포-표지 특이적 항체로 세포를 염색함) 및 형태의 변화를 측정하면서, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하여 세포의 형태를 조사함으로써, 또는 PCR 및 유전자-발현 프로파일과 같은 당해 분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.

<44> 5. 태반의 탈락막 유래 줄기세포 및 분화세포의 이용

<45> 본 발명의 태반의 탈락막 유래 줄기세포는, 신체의 조직 또는 기관이 목적하는 세포 군집, 예를 들어 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 유래세포군집의 생착, 이식 또는 주입에 의해 강화, 치료 또는 대체되는 다양한 종류의 치료 프로토콜에 사용될 수 있다. 상기 본 발명의 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 존재하는 조직을 대체 또는 강화시켜, 새롭거나 변화된 조직이 되게 하거나 생물학적 조직 또는 구조와 결합시킬 수 있다.

<46> 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 적합 및 부적합 HLA형 조절 이식을 포함하는, 자가 및 동종 조절 이식에 사용될 수 있다.

<47> 태반의 탈락막 유래 줄기세포는, 전형적으로 유래세포가 사용되는 치료 또는 연구 프로토콜에서 특정한 부류의 전구세포 (예를 들어, 연골세포, 줄기세포, 조혈세포, 뼈장 실질세포, 신경줄기세포 및 근육 유래 세포 등) 대신 사용될 수 있다.

<48> 또한 본 발명에 따른 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 주사가능물질(예를 들어, 본원의 참조문헌으로 인용되는 국제특허 공개공보 제 WO 96/39101 호)로서 제형화될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포 및 조직은 미국특허 제 5,709,854 호; 제 5,516,532 호; 제 5,654,381 호(모두 본원의 참조문헌으로 인용됨)에 기술된 바와 같은 중합성 또는 가교성 하이드로겔을 사용하여 제형화 될 수 있다.

<49> 6. 지방 유래 줄기세포 및 이용

<50> 본 발명의 지방 유래 줄기세포는 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에서 부수적으로 얻어지는 지방조직

에서 순수하게 분리하여 플라스크 배양용기에 부착하여 자라는 지방유래 중간엽 줄기세포로부터 얻어진다.

- <51> 본 발명의 지방유래 줄기세포는 구체적으로, 출원인의 선특허출원인 대한민국특허출원 제10-2007-0050624호, 대한민국특허출원 제10-2007-0042645호, 대한민국등록특허 제10-0679642호 또는 대한민국등록특허 10-0788632호에 기재된 내용에 따라 분리 및 배양된 지방 유래 줄기세포이다.
- <52> 상기 지방 유래 줄기 세포는 다음과 같은 특성을 가질 수 있다:
- <53> (a) CD73, CD90, CD29, CD44 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; 및
- <54> (b) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, CORM-2 함유 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함.
- <55> 본 발명의 줄기세포의 스피어 컬처를 위하여, 분리된 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 함유 MEBM 배지로 배양하면, seeding 후 3일째부터 구(sphere)의 모양을 형성하기 시작하여, 이로부터, 미분화 상태를 유지하며 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있다.
- <56> 또한, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 지방 유래 줄기세포의 면역학적 특성을 알아보기 위해, 상기 공개특허들에 기재된 면역학적 특성 분석방법에 따라서, 지방 유래 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신으로 처리한 다음, 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 원심분리한다. 상층액을 버린 후 2% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 각 샘플에 대해 1×10^5 개의 세포를 분주한다. 각 세포에 대해서는 항체(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 첨가하여 얼음에서 40분 동안 방치하여 결합을 유도하고, 반응이 종결되면 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, PBS로 2회 세척한다. 세척 후에는 최종적으로 1% 파라포름알데하이드를 첨가하여 고정하고, FACS방법을 통하여 얻어진 다분화능 줄기세포의 표면항원을 분석한 결과, 본 발명의 지방 유래 줄기세포는 CD73에 대해서는 91%, CD90에 대해서는 97%, CD29에 대해서는 96%, CD44에 대해서는 83%, CD105에 대해서는 80%의 양성반응을 보이고, 다른 항원에 대한 면역표현형을 확인한 결과, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타낸다.
- <57> 상기 지방 유래 다분화능 줄기세포를 Saline, Saline+슈크로오스, Saline+슈크로오스+5% 알부민 및 PBS+ 슈크로오스 조건에서 보관 후의 스피어 형성능을 확인하는 경우, 10 μ M CORM-2, 5ml antibiotic antimycotic solution(100X), 1 μ g/ml 하이드로코티손, 5 μ g/ml 인슐린, 20ng/ml EGF, 40 ng/ml FGF, B27 및 β -멸캅토에탄올을 함유한 무혈청 MEBM 배지를 함유하는 6웰 세포배양기의 각 웰에 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 개/ml의 세포를 분주하여 배양한 결과, 3 ~ 7일째부터 스피어(sphere)를 형성하기 시작하고, 7 ~ 10일째에도 줄기세포가 증식해서 스피어를 형성한다.
- <58> 또한, 본 발명의 지방 유래 줄기세포는, 일 양태로, 지방흡입술 또는 카테터를 연결한 1회용 주사기로부터 얻어지는 튜메스트 용액과 지방이 함유된 원료로부터, 마이코플라스마 시험과 무균시험을 통해 원료 품질관리 기준을 통과한 시료를 원심분리하여 지방층과 수층을 분리하여 수층의 시료를 콜라게네이즈 용액으로 전처리 한 후 얻어진 세포를 상기 공개 특허들에 기재된 조성의 배지로 배양하여 지방 줄기세포를 이용할 수 있다.
- <59> 본 발명의 지방 유래 줄기세포는, 신체의 조직 또는 기관이 목적하는 세포 군집, 예를 들어 지방 유래 줄기세포 또는 유래세포군집의 생착, 이식 또는 주입에 의해 강화, 치료 또는 대체되는 다양한 종류의 치료 프로토콜에 사용될 수 있다. 상기 본 발명의 지방 유래 줄기세포는 존재하는 조직을 대체 또는 강화시켜, 새롭거나 변화된 조직이 되게 하거나 생물학적 조직 또는 구조와 결합시킬 수 있다.
- <60> 본 발명의 방법에 의해 획득된 지방 유래 줄기세포는 근세포로의 분화를 비롯한, 특정 세포 계통을 따라 분화하도록 유도될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 획득된 지방 유래 줄기세포는 이식 및 생체 외 처리 프로토콜에서의 사용을 위해 분화하도록 유도된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 획득된 지방 유래 줄기세포는 특정 세포 유형으로 분화하도록 유도되고 치유 유전자 생성물을 제공하도록 유전자적으로 설계된다. 지방 유래 줄기세포의 특정 근세포로의 분화 측정은 당해 분야에 익히 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다.
- <61> 또한, 상기 분화 세포들은 유세포 분석 또는 면역세포화학과 같은 기법을 사용하여 세포 표면 표지(예를 들어 조직-특이적 또는 세포-표지 특이적 항체로 세포를 염색함) 및 형태의 변화를 측정하면서, 광학 현미경 또는 공

초점 현미경을 사용하여 세포의 형태를 조사함으로써, 또는 PCR 및 유전자-발현 프로파일과 같은 당해 분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.

<62> 7. 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 이용한 요실금 치료제 개발

<63> 본 발명에 따른 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금 세포치료제는 상기 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포가 내요도괄약근의 기능향상을 나타내는 요누출압 상승 및 외요도괄약근의 기능향상을 나타내는 요도괄약근의 수축력을 증가시키는 원리를 기반으로 한다.

<64> 요누출압이란 요누출시의 방광내압 또는 요누출시의 복압을 의미하는 것으로, 요누출압의 감소는 요실금의 주요한 원인이다.

<65> 본 발명에서는 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포가 요실금 치료에 미치는 영향, 특히 요누출압에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 암컷 누드마우스를 각각 정상군, 대조군 및 실험군으로 분류한 후, 생리식염수를 이용하여 상기 정상군, 대조군(prudental nerve 절단군) 및 실험군(prudental nerve 절단 후 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 사용한 군)의 방광내압을 증가시켜 요누출압을 측정함으로써, 본 발명에 따른 태반의 탈락막 유래 줄기세포가 요누출압을 증가시키며, 따라서, 요실금 세포치료제로서의 가능성을 확인한다.

<66> 요도괄약근은 수축력으로 인하여 배뇨를 조절할 수 있는 기능을 하는 것으로, 요도괄약근의 수축력 약화 역시 요실금의 주요한 원인이다.

<67> 본 발명에서는 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포가 요실금 치료에 미치는 영향, 특히 요도괄약근의 수축력에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 수컷 쥐를 각각 정상군, 대조군 및 실험군으로 분류한 후, 요도의 조직절편에 전기장 자극(EFS) 또는 아세틸콜린 (acetylcholine) 약물을 적용하여 요도괄약근의 수축력을 측정함으로써, 본 발명에 따른 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포가 요도괄약근의 수축력을 증가시키며, 따라서, 요실금 세포치료제로서의 가능성을 확인한다.

<68> 8. 태반의 탈락막 유래 줄기세포 또는 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금 세포치료제

<69> 태반의 탈락막은 수정란이 자궁에 착상되기 위해 자궁의 상피세포가 변형되어 형성된 막을 가리킨다.

<70> 생리혈은 자궁경관 점액, 질 분비물, 자궁 내 세포, 자궁의 상피세포와 모세혈관의 피가 섞여 있으며, 세포 등을 형성하는 단백질이 주를 이루고 있으며, 이때, 생리혈 내에 포함되어 있는 자궁으로부터 탈락된 자궁의 상피세포 생리혈의 탈락막이라 한다.

<71> 지방 유래 줄기세포는 인간 지방조직의 지방 흡입술에서 부수적으로 얻어지는 지방세포와 플라스크 배양용기에 부착하여 자라는 지방 유래 중간엽 줄기세포로부터 얻어진다.

<72> 상술한 바와 같이, 태반의 탈락막과 생리혈의 탈락막은 주요 구성성분이 공통적으로 자궁의 상피세포로서, 본 발명의 실시예에서는 구체적으로 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 요실금 치료효과만을 규명하였지만, 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포도 요실금 치료효과가 있다는 것을 용이하게 유추해낼 수 있다. 또한, 지방 유래 줄기세포 또한 다분화능을 가지고 있어 지방조직 유래 줄기세포 또한 적용가능하다는 것을 용이하게 유추해낼 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 함유하는 요실금 세포치료제 뿐만 아니라 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포를 함유하는, 또는 지방 유래 줄기세포를 함유하는 요실금 세포치료제를 구현하는 것은 당업자에게 있어 자명할 사항이라 할 것이다.

실시예

<73> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<74> **실시예 1: 본 발명에 따른 줄기세포의 분리 및 배양**

<75> (1) 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 분리 및 배양

<76> 본 출원인의 선행특허출원 (대한민국공개특허 10-2007-0101756A)에 기재된 아래와 같은 방법에 따라 태반으로부터

터 탈락막을 분리하였다.

- <77> 구체적으로, 태반은 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산분만에서 수집되어 연구용으로 사용하였다. 태반 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수에 넣어서 연구실까지 옮겼고, 연구실로 옮긴 태반 조직은 PBS를 이용하여 세척하여 혈구세포들과 여러 조직의 잔해들을 제거하거나 조직을 용혈버퍼(hemolysis buffer)를 이용하여 혈구세포들을 제거 하거나 태반을 구성하고 있는 양막(amnion), 장막(chorion), 기저탈락막(decidua) 및 태반(placenta) 조직을 각각 포셋을 이용하여 조심스럽게 분리하였다.
- <78> 상기 분리된 탈락막 조직을 100mm 디쉬에 놓고 멸균된 메쉬를 이용해 1~2mm 크기로 잘게 세절하였다. 그 후, 콜라게나제가 포함된 배지에 놓고, 37℃의 배양기에서 최소 1 시간에서 최대 4시간 동안 반응시킨 다음 100 μm 와이어 직물체를 이용해 콜라게나제가 처리된 조직을 걸렀다. 이렇게 분리한 세포들은 75-flask에 37℃, 5% CO₂ 조건하 bFGF 함유 DMEM배지에서 배양하였다 (도 1).

<79> (2) 지방 유래 줄기세포의 분리 및 배양

- <80> 본 실시예에서 이용된 지방 유래 줄기세포는 본 출원인의 선특허출원 (대한민국등록특허 제10-0679642호)에 기재된 방법에 따라 분리된 지방 유래 줄기세포로, 구체적으로는, 지방흡입을 통해 복부에서 채취된 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐분해효소 타입1 (1 mg/ml)을 첨가한 DMEM배지를 사용하여 37℃에서 2시간 동안 분해하였다. 다음으로, PBS로 세척한 후, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μm 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 세포들은 PBS로 세척하고, 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 다분화능 줄기세포를 분리하였다.

<81> **실시예 2: 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 증식율 조사**

- <82> 상기 분리된 인간 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포의 증식방법에 따라 수득된 줄기세포의 증식율을 조사하였다. 각각 다른 인간 개체의 태반의 탈락막 샘플로부터 가져온 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 실시예 1과 같은 분리방법을 거쳐 얻은 후, 75-flask에 2x10⁵씩 씨딩(seeding)하였다.

<83> CPDL(cumulative population doubling level)은 세포의 증식율을 나타내는 지수로서,

<84> $CPDL = \ln(N_f/N_i) / \ln 2$

<85> (Ni=초기 seeding한 세포수, Nf=최종 세포수)

<86> 의 식으로 나타낼 수 있다.

- <87> 기저탈락막 유래 줄기세포의 CPDL을 계대수(passage number)에 따라 관찰한 결과, 계대수가 12일 때 약 30에 달하는 CPDL 값을 나타낸다. 이러한 CPDL 값은 인간 지방 조직 유래 줄기세포(Lin *et al.*, *stem cells and development*, 14:92, 2005; Zuk *et al.*, *Tissue eng.*, 7:211, 2001)의 그 값과 유사하며 이 결과로부터 본 발명에 따른 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 증식율이 매우 우수하다는 것을 알 수 있었다 (도 2).

<88> **실시예 3: 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포의 면역학적 특성**

- <89> 실시예 1에서 수득한 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 5% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 샘플수 만큼 1x10⁵ cell을 분주하였다. 각 웰(well)에 항체(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 4℃에 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션후에 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거 후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 1% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)을 넣어서 싱글(single)화 하고, 플로우 사이토미터를 이용해 분석하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 태반의 탈락막 유래 줄기세포는 CD29, CD90, Oct-4, SSEA-4 및 Cripto-1에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31 및 CD45에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄을 알 수 있었다 (도 4).

표 1

<90> 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 표면항원분석(FACS analysis)

Antigen	Decidua-MSCs
CD29	+
CD31	-
CD45	-
CD90	+
Oct-4	+
SSEA-4	+
Cripto-1	+

<91> **실시예 4: 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포의 Oct4 및 SSEA-4 발현 분석**

<92> 상기 실시예 1에서 수득된 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 PBS로 세 번 세척하고, 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)를 함유한 PBS로 30분간 고정하였다. PBS로 3회 세척한 후, 0.1% Triton-X100을 함유한 PBS로 10분간 침투(permeabilization)시킨다. PBS로 3회 세척한 후, 블로킹 버퍼 (5% goat serum)를 처리하여 4℃에서 한 시간 동안 반응시키고, 일차항체를 함유한 블로킹 버퍼 (blocking buffer)에 하룻밤동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 이차항체로 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후, 마운팅(mounting)하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 분화능 줄기세포는 인간 배아 줄기세포의 마커인 Oct4와 SSEA-4에 대하여 양성반응을 나타내었다.

<93> 또한, RT-PCR을 이용하여 Oct4의 발현을 확인하였다, RT 반응은 37℃에서 50분간, 70℃에서 10분간 행하였으며, PCR 반응은 95℃에서 5분간, 그리고 95℃에서 30초/ 58℃에서 40초/72℃에서 1분으로 40회의 사이클(cycles)을 행한 후, 72℃에서 10분간 수행하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 기저탈락막 유래 줄기세포의 경우 800bp에서 발현되어 있음을 확인할 수 있었다.

<94> **실시예 5: 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포의 근세포로의 분화**

<95> 실시예 1에서 수득한 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포를 10 ng/ml 피브로넥틴(fibronectin)이 코팅되어 있는 플라스크에 분주한 후 10 μM 5'-아자사이티딘(azacytidine)을 이용하여 24시간 동안 전처리를 한다. 전처리 후 SKBM 배지(Cambrex, Co.)를 이용하여 10일 동안 배양한 후 면역 염색을 실시하였다.

<96> 그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포는 근육세포의 특이항원인 미오신에 대하여 양성 반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포가 근육세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

<97> **실시예 6: 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 주입한 암컷 누드마우스에서 요누출압의 측정**

<98> 1) 실험군 동물 모델의 준비

<99> 태반의 탈락막 유래 줄기세포가 요누출압에 미치는 영향을 측정하기 위한 동물실험을 실시하기 위하여, 암컷 누드마우스 56마리를 사용하였다. 상기 56마리의 암컷 누드마우스를 각각 정상군 14마리(n=14), 대조군(음부 신경(prudendal nerve) 절단군) 14마리(n=14), 및 실험군 1(음부신경 절단 2주 후에 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 10⁵ 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)와 실험군 2(음부신경 절단 2주 후에 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 10⁷ 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)로 나누어 실험을 실시하였다. 이때, 각각의 군은 다시 4주군 7마리(n=7) 및 8주군 7마리(n=7)으로 나누어, 4주 및 8주에 요누출압을 측정하였다.

<100> 대조군 준비: 암컷 누드마우스 14마리를 할로세인(halothane)으로 마취시켰고, 좌골직장 환상홈(ischiorectal fossa)에 양쪽으로 절개를 가하여 음부 신경을 박리한 후, 상기 음부 신경에 2cm 정도 전기소작(electrocauterization)을 시행한 다음, 피부를 봉합하였다.

<101> 실험군 1 및 2 준비: 암컷 누드마우스 28마리를 할로세인(halothane)으로 마취시키고, 하복부에 종 절개 (low midline incision)을 시행 후 이를 통하여 방광과 요도를 박리한 다음 (도 8), 음부신경 절단 2주 후에 요실금이 발생한 후, 현미경을 이용하여 10ml 해밀톤 시린지(Hamilton syringe)로, 실시예 2에서 수득한 태반의 탈락

막 유래 다능성 줄기세포를 14마리는 10^5 세포들 (실험군 1)을 주입하고, 다른 14마리에는 10^7 세포들(실험군 2)을 주입하였다.

<102> 2) 요누출압의 측정

<103> 상기 암컷 누드마우스들을 우레탄(urethane)(1.2 g/kg)으로 마취시키고, T9-T10 레벨에서 척수(spinal cord) 절단(transection)을 시행한 다음, 하복부에 종 절개 (low midline incision)을 통하여, 방광을 박리한 PE-90 카테터를 이용하여 치골상부 방광루 형성술을 시행하였다.

<104> 요누출압의 측정을 위하여 상기 정상군, 대조군 및 실험군의 암컷 누드마우스를 vertical tilt/intraversical pressure clamp model에 위치시켰다 (도 9). PE-90 tube에 생리식염수 150ml를 연결하고, 이 생리식염수의 높이를 약간씩 높임으로써 실험쥐의 방광내의 압력을 증가시켰다. 요누출이 시작될 때의 압력을 LPP(leak point pressure)로 정의하였다.

<105> 도 10에 나타난 바와 같이, 정상군 (N), 대조군 (D), 실험군 1 (P1), 실험군 2 (P2)의 요누출압은 4주에서 각각 22.8 ± 0.9 , 11.6 ± 0.6 , 20.4 ± 0.8 및 21.5 ± 0.9 cmH₂O이었으며 (도 10의 A), 8주에서는 각각 22.6 ± 0.8 , 11.5 ± 0.7 , 20.6 ± 0.6 및 22.5 ± 0.8 cmH₂O를 나타내어 (도 10의 B), 4주 및 8주 모두에서 정상군, 실험군 1 및 실험군 2는 대조군에서보다 통계학적으로 높게 나타났으며, 대조군의 요누출압은 정상군의 요누출압에 비해 감소하였고, 실시예 1의 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 투여한 결과, 실험군 1 및 2의 요누출압은 정상군의 요누출압에 거의 가까운 수준으로 비해 증가한 것으로 나타나, 태반의 탈락막 유래 줄기세포가 요누출압을 증가시키는 기능을 하는 것을 확인할 수 있었다.

<106> **실시예 7: 지방 유래 줄기세포를 주입한 암컷 누드마우스에서 요누출압의 측정**

<107> 1) 실험군 동물 모델의 준비

<108> 지방 유래 줄기세포가 요누출압에 미치는 영향을 측정하기 위한 동물실험을 실시하기 위하여, 암컷 누드마우스 56마리를 사용하였다. 상기 56마리의 암컷 누드마우스를 각각 정상군 14마리(n=14), 대조군(음부 신경 (prudental nerve) 절단군) 14마리(n=14), 및 실험군 1(음부신경 절단 2주 후에 지방 유래 줄기세포를 10^5 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)와 실험군 2(음부신경 절단 2주 후에 지방 유래 줄기세포를 10^7 세포를 주입한 군) 14마리(n=14) 로 나누어 실험을 실시하였다. 이때, 각각의 군은 다시 4주군 7마리(n=7) 및 8주군 7마리(n=7)으로 나누어, 4주 및 8주에 요누출압을 측정하였다.

<109> 대조군 준비: 암컷 누드마우스 14마리를 할로세인(halothane)으로 마취시켰고, 좌골직장 환상홈(ischiorectal fossa)에 양쪽으로 절개를 가하여 음부 신경을 박리한 후, 상기 음부 신경에 2cm 정도 전기소작 (electrocauterization)을 시행한 다음, 피부를 봉합하였다.

<110> 실험군 1 및 2 준비: 암컷 누드마우스 28마리를 할로세인(halothane)으로 마취시키고, 하복부에 종 절개 (low midline incision)을 시행 후 이를 통하여 방광과 요도를 박리한 다음 (도 8), 음부신경 절단 2주 후에 요실금이 발생한 후, 현미경을 이용하여 10ml 해밀톤 시린지(Hamilton syringe)로, 실시예 1에서 수득한 지방 유래 다능성 줄기세포를 14마리는 10^5 세포들 (실험군 1)을 주입하고, 다른 14마리에는 10^7 세포들(실험군 2)을 주입하였다.

<111> 2) 요누출압의 측정

<112> 상기 암컷 누드마우스들을 우레탄(urethane)(1.2 g/kg)으로 마취시키고, T9-T10 레벨에서 척수(spinal cord) 절단(transection)을 시행한 다음, 하복부에 종 절개 (low midline incision)을 통하여, 방광을 박리한 PE-90 카테터를 이용하여 치골상부 방광루 형성술을 시행하였다.

<113> 요누출압의 측정을 위하여 상기 정상군, 대조군 및 실험군의 암컷 누드마우스를 vertical tilt/intraversical pressure clamp model에 위치시켰다 (도 9). PE-90 tube에 생리식염수 150ml를 연결하고, 이 생리식염수의 높이를 약간씩 높임으로써 실험쥐의 방광내의 압력을 증가시켰다. 요누출이 시작될 때의 압력을 LPP(leak point pressure)로 정의하였다.

<114> 도 11에 나타난 바와 같이, 정상군 (N), 대조군 (D), 실험군 1 (A1), 실험군 2 (A2)의 요누출압은 4주에서 22.8 ± 0.9 , 11.6 ± 0.7 , 18.7 ± 0.9 및 19.2 ± 0.7 cmH₂O이었으며 (도 11의 A), 8주에서는 22.6 ± 0.9 , 11.5 ± 0.7 ,

20.4±0.7 및 21.5±0.8 cmH₂O를 나타내어 (도 11의 B), 본 발명의 지방 유래 줄기세포 투여결과, 4주 및 8주 모두에서 요누출압을 증가시키는 것을 확인할 수 있었으며 A2이 A1군에 비하여 높게 나타났으나 통계학적인 차이는 없었다 (도 11).

<115> 실시예 8: 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 주입한 수컷쥐에서 요도괄약근의 수축력의 측정

<116> 1) 실험군 동물 모델의 준비

<117> 태반의 탈락막 유래 줄기세포가 요도괄약근의 수축력에 미치는 영향을 측정하기 위한 동물실험을 실시하기 위하여, 수컷쥐 56마리를 사용하였다. 상기 56마리의 수컷쥐를 각각 정상군 14마리(n=14), 대조군(음부 신경(prudental nerve) 절단군) 14마리(n=14), 및 실험군 1(음부신경 절단 2주 후에 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 10⁵ 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)와 실험군 2(음부신경 절단 2주 후에 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 10⁷ 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)로 나누어 실험을 실시하였다. 이때, 각각의 군은 다시 4주군 7마리(n=7) 및 8주군 7마리(n=7)으로 나누어, 4주 및 8주에 요도괄약근의 수축력을 측정하였다.

<118> 대조군 준비: 수컷쥐 14마리를 할로세인(halothane)으로 마취시켰고, 좌골직장 환상홈(ischiorectal fossa)에 양쪽으로 절개를 가하여 음부 신경을 박리한 후, 상기 음부 신경에 2cm 정도 전기소작(electrocauterization)을 시행한 다음, 피부를 봉합하였다.

<119> 실험군 1 및 2 준비: 수컷쥐 28마리를 할로세인(halothane)으로 마취시키고, 하복부에 종 절개(low midline incision)을 시행 후 이를 통하여 방광과 요도를 박리한 다음 (도 8), 음부신경 절단 2주 후에 요실금이 발생한 후, 현미경을 이용하여 10ml 해밀톤 시린지(Hamilton syringe)로, 실시예 2에서 수득한 태반의 탈락막 유래 다능성 줄기세포를 14마리는 10⁵ 세포들(실험군 1)을 주입하고, 다른 14마리에는 10⁷ 세포들(실험군 2)을 주입하였다.

<120> 2) 요도괄약근 수축력의 측정

<121> 상기 수컷쥐들의 요도를 각각 얻은 후 나선형으로 요도를 절제하여 요도조직절편(102 mm)을 준비하였다. Organ Bath실험에서 vertical chambers (vol. 20 ml)에 CO₂/ bicarbonate buffered Tyrode solution을 채운 후 요도 조직 절편을 고정시킨 후 Acetylcholine 약물을 사용하여 요도괄약근 수축력을 알아보았다 (도 12).

<122> 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 수컷 쥐 실험에서 종래 기술분야에서 통상 이용되는 전기장 자극(Electrical Field stimulation(EFS), 60V)시 정상군(N), 대조군(D), 실험군 1(P1) 및 실험군 2(P2)에서 요도괄약근 수축력은 4주에서 각각 0.45±0.06, 0.34±0.02, 0.39±0.02 및 0.45±0.05 g/tension이었으며, 8주에서는 각각 0.44±0.06, 0.35±0.02, 0.41±0.04 및 0.46±0.03 g/tension을 나타내었다. 따라서, 전기자극시에는 4주 및 8주 모두에서 대조군에서보다 높은 요도괄약근 수축력을 나타냈으며, 정상군과 유사하거나, 그 이상의 요도괄약근 수축력을 나타내었다. 또한, 실험군 2가 실험군 1보다 높은 수치를 나타내었다.

<123> 또한, 도 14에 나타난 바와 같이, 아세틸콜린(Ach) 투여시에는 정상군(N), 대조군(D), 실험군 1(P1) 및 실험군 2(P2)에서 요도괄약근 수축력은 4주에서 각각 0.54±0.04, 0.28±0.03, 0.52±0.02 및 0.54±0.03 g/tension이었으며 (도 14의 A), 8주에서는 각각 0.56±0.03, 0.3±0.02, 0.56±0.04 및 0.59±0.04 g/tension을 나타내었다 (도 14의 B). 따라서, 아세틸콜린 투여시에는 정상군, 실험군 1 및 실험군 2는 모두 D군보다 높았으며 실험군 2가 실험군 1보다 요도괄약근 수축력이 높게 나타났으나, 통계학적으로 의의가 있다고 볼 수는 없다. 즉, 실제로 실험군 2가 실험군 1보다 높은 요도 괄약근 수치를 나타낸다고 결론지을 수는 없다.

<124> 실시예 9: 지방 유래 줄기세포를 주입한 수컷쥐에서 요도괄약근의 수축력의 측정

<125> 1) 실험군 동물 모델의 준비

<126> 지방 유래 줄기세포가 요도괄약근의 수축력에 미치는 영향을 측정하기 위한 동물실험을 실시하기 위하여, 수컷 쥐 56마리를 사용하였다. 상기 56마리의 수컷쥐를 각각 정상군 14마리(n=14), 대조군(음부 신경(prudental nerve) 절단군) 14마리(n=14), 및 실험군 1(음부신경 절단 2주 후에 지방 유래 줄기세포를 10⁵ 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)와 실험군 2(음부신경 절단 2주 후에 지방 유래 줄기세포를 10⁷ 세포를 주입한 군) 14마리(n=14)로 나누어 실험을 실시하였다. 이때, 각각의 군은 다시 4주군 7마리(n=7) 및 8주군 7마리(n=7)으로 나누어, 4주 및 8주에 요도괄약근의 수축력을 측정하였다.

- <127> 대조군 준비: 수컷쥐 14마리를 할로세인(halothane)으로 마취시켰고, 좌골직장 환상홈(ischiorectal fossa)에 양쪽으로 절개를 가하여 음부 신경을 박리한 후, 상기 음부 신경에 2cm 정도 전기소작(electrocauterization)을 시행한 다음, 피부를 봉합하였다.
- <128> 실험군 1 및 2 준비: 수컷쥐 28마리를 할로세인(halothane)으로 마취시키고, 하복부에 중 절개 (low midline incision)을 시행 후 이를 통하여 방광과 요도를 박리한 다음 (도 8), 음부신경 절단 2주 후에 요실금이 발생한 후, 현미경을 이용하여 10ml 해밀톤 시린지(Hamilton syringe)로, 실시예 1에서 수득한 지방 유래 다능성 줄기 세포를 14마리는 10^5 세포들 (실험군 1)을 주입하고, 다른 14마리에는 10^7 세포들(실험군 2)을 주입하였다.
- <129> 2) 요도괄약근 수축력의 측정
- <130> 상기 수컷쥐들의 요도를 각각 얻은 후 나선형으로 요도를 절제하여 요도조직절편 (102 mm)을 준비하였다. Organ Bath실험에서 vertical chambers (vol. 20 ml) 에 CO₂/ bicarbonate buffered Tyrode solution을 채운 후 요도 조직 절편을 고정시킨 후 Acetylcholine 약물을 사용하여 요도괄약근 수축력을 알아보았다 (도 12).
- <131> 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 수컷 쥐 실험에서 종래 기술분야에서 통상 이용되는 전기장 자극 (Electrical Field stimulation(EFS), 60V)시 정상군 (N), 대조군 (D), 실험군 1 (A1) 및 실험군 2 (A2)군에서 요도괄약근 수축력은 각각 4주에서 0.46 ± 0.08 , 0.32 ± 0.03 , 0.35 ± 0.03 및 0.38 ± 0.03 g/tension 이었으며, 8 주에서는 0.44 ± 0.06 , 0.31 ± 0.02 , 0.39 ± 0.02 및 0.44 ± 0.05 g/tension을 나타내었다. 전기자극시에는 4주 및 8주 모두에서 N 및 A군은 D군에서보다 통계학적으로 높게 나타났으며 A2과 A1군 사이에는 차이가 없었다.
- <132> 또한, 도 16에 나타난 바와 같이, 아세틸콜린 (Ach) 투여시에는 정상군 (N), 대조군 (D), 실험군 1 (A1) 및 실험군 2 (A2)에서 요도괄약근 수축력은 4주에서 0.54 ± 0.05 , 0.29 ± 0.04 , 0.48 ± 0.03 및 0.51 ± 0.05 g/tension 이었으며, 8주에서는 0.55 ± 0.05 , 0.29 ± 0.03 , 0.55 ± 0.02 및 0.54 ± 0.05 g/tension을 나타내었다. 아세틸콜린 투여시에는 N, A1 및 A2군은 모두 D군보다 높았으며 A2과 A1군 사이에는 차이가 없었다.
- <133> **실시예 10: 태반의 탈락막 유래 줄기세포를 주입한 쥐의 조직에서의 면역염색**
- <134> 상기 실시예 6 및 8에 따라, 4주 및 8주에 요누출압 및 요도괄약근 수축력을 측정된 후, 각각의 요도 조직을 채취하여 액화질소에서 이미 냉각된 2-methylbutane을 이용하여 조직의 손상 없이 냉동시켰다. 요도조직들을 냉각 절편한 후에 H/E 염색을 시행하였고, 줄기세포의 평활근 및 골격근으로의 분화를 관찰하기 위하여 DAPI, muscle actin (α -SMA) 및 Myosin heavy chain (MyHC) 면역염색을 시행하여 형광현미경으로 관찰하였다.
- <135> 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 실시예 6에 따른 암컷 누드마우스에서 정상 요도괄약근에서는 평활근이 풍부하고, 골격근은 약하게 염색되어 있다 (도 17의 A, B, C). 음부신경 절단후에는 평활근의 감소가 관찰되었고 (도 17의 D, E, F), 태반 줄기세포 주입시에는 4주 (도 17의 G, H, I) 및 8주 (도 17의 J, K, L)에서 평활근이 녹색으로 밝게 염색되어 평활근 양이 증가되었음을 알 수 있었으며, 평활근 사이에서 붉은색과 녹색이 co-staining된 노란색 세포가 관찰되었다. MyHC 염색시는 골격근이 녹색으로 아주 약하게 염색되었고, 평활근 사이에 주입된 세포가 붉은색으로 나타났다.
- <136> 또한, 도 18에서 나타난 바와 같이, 실시예 8에서의 수컷쥐 요도는 나선형으로 절개하였으므로 원래의 요도모양을 관찰할 수는 없었으나, 요도괄약근 수축 실험후 조직에서 PKH가 발현되는 것을 관찰되어 (도 18의 A 및 B) 주입한 태반유래 줄기세포가 요도괄약근 수축력에 기여했음을 알 수 있었다. 참고로, PKH는 살아있는 세포를 형광염색하는 형광염색 물질로, 태반의 탈락막 줄기세포를 PKH(붉은색)로 표지하여 주입하였다.
- <137> 종합해 보면, 요실금환자와 유사한 복잡성 요실금 동물모델을 구축한 상기 실시예 6 내지 8에서, 태반의 탈락막 유래 줄기세포 주입결과, 요실금 모델 누드 마우스의 요도의 요누출압을 증가시켰고, 요실금 모델 쥐의 요도괄약근의 수축력을 증가시켰음을 알 수 있었다. 요누출압에 있어서는, 주입한 세포수에 따른 차이가 크게 나타난 것은 아니나, 괄약근 수축력의 경우에 주입한 줄기세포의 수가 많을 수록 우수한 요도괄약근 수축력을 나타내었다. 이 점은, 요실금 환자에게 있어서도 본 발명에 따른 태반의 탈락막 유래 줄기세포가 우수한 세포치료제로서 사용가능할 것이다.
- <138> 앞서 언급한 바와 같이, 태반의 탈락막과 생리혈의 탈락막은 주요 구성성분이 공통적으로 자궁의 상피세포로서, 본 발명의 실시예에서는 구체적으로 태반의 탈락막 유래 줄기세포의 요실금 치료효과만을 규명하였지만, 생리혈의 탈락막 유래 줄기세포도 요실금 치료효과가 있다는 것을 용이하게 유추해낼 수 있다.
- <139> **실시예 11: 지방 유래 줄기세포를 주입한 쥐의 조직에서의 면역염색**

<140> 상기 실시예 7 및 9에 따라, 4주 및 8주에 요누출압 및 요도괄약근 수축력을 측정된 후, 각각의 요도 조직을 채취하여 액화질소에서 이미 냉각된 2-methylbutane을 이용하여 조직의 손상 없이 냉동시켰다. 요도조직들을 냉각 절편한 후에 H/E 염색을 시행하였고, 줄기세포의 평활근 및 골격근으로의 분화를 관찰하기 위하여 DAPI, muscle actin (α -SMA) 및 Myosin heavy chain (MyHC) 면역염색을 시행하여 형광현미경으로 관찰하였다.

<141> 그 결과, 도 19에 나타난 바와 같이, 실시예 7에 따른 누드마우스에서 정상 요도괄약근에서는 평활근이 풍부하고, 골격근은 약하게 염색되어 있다 (도 19 A, B, C). 음부신경 절단후에는 평활근의 감소가 관찰되었고 (도 19 D, E, F), 줄기세포 주입시(8주)에는 평활근이 녹색 (green color)으로 밝게 염색되어 평활근의 증가되었음을 알 수 있었으며 평활근 사이사이에 red-color와 green-color가 co-staining된 노란색세포가 관찰되었다. MyHC 염색시는 골격근은 아주 약하게 염색되고 평활근 사이에 주입된 세포가 붉은색 (red color)로 나타났다.

<142> 또한, 도 20에서 나타난 바와 같이, 실시예 9에서의 수컷쥐 요도는 나선형으로 절개하였으므로 원래의 요도모양을 관찰할 수는 없었으나, 요도괄약근 수축 실험후 조직(8주)에서 PKH가 발현되는 것을 관찰되어 (도 20의 A 및 B) 주입한 지방 유래 줄기세포가 요도괄약근 수축력에 기여했음을 알 수 있었다. 참고로, PKH는 살아있는 세포를 형광염색하는 형광염색 물질로, 지방 유래 줄기세포를 PKH(붉은색)로 표지하여 주입하였다.

<143>

<144> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<145> 도 1은 태반의 탈락막 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 형태(morphology)에 대한 현미경 사진이다.

<146> 도 2는 기저탈락막 유래 줄기세포에 대한 계대수에 따른 축적집단 배가정도(cumulative population doubling level, CPDL)를 나타낸 그래프이다.

<147> 도 3은 SFM배지에서 7일간 배양한 1계대째 기저탈락막의 스피어 형성사진이다.

<148> 도 4는 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 기저탈락막 유래 MSC의 표면항원들을 분석한 결과이다.

<149> 도 5는 각각에 표기된 특정 항체를 이용한 면역조직화학검사 결과사진이다[A:OCT4; B:SSEA4; C:CD44, CD54 및 대조군].

<150> 도 6은 OCT4에 대한 RT-PCR결과이다[레인 1:마커; 레인 2: RT-reaction control; 레인 3: 양막 줄기세포; 레인 4:기저탈락막 줄기세포; 레인 5:PCR-reaction control].

<151> 도 7은 근세포로의 분화(Myogenesis)에 있어서, MM-3160배지(근육세포 분화용 SKBM 배지)에서 10일간 유도한 기저탈락막 유래 줄기세포에 대한 면역조직화학검사(α Myosin-FITC)의 현미경 사진이다.

<152> 도 8은 누드마우스에서 음부신경을 박리하는 장면을 나타내는 사진이다.

<153> 도 9는 틸트 테이블(tilt table)을 이용하여 요누출압을 측정하는 과정을 나타낸 사진이다 (A 및 B).

<154> 도 10은 실시예 6의 실험결과에 따른 요누출압 결과를 나타낸 그래프이다 (A: 4주째의 요누출압, B: 8주째의 요누출압, N: 정상군, D: 대조군, P1: 실험군 1, P2: 실험군 2).

<155> 도 11은 실시예 7의 실험결과에 따른 요누출압 결과를 나타낸 그래프이다 (A: 4주째의 요누출압, B: 8주째의 요누출압, N: 정상군, D: 대조군, A1: 실험군 1, A2: 실험군 2).

<156> 도 12는 organ, bath를 이용하여 요도괄약근 수축력을 측정하는 과정을 나타낸 사진이다 (A 및 B).

<157> 도 13은 실시예 8의 실험결과에 따라, 전기자극에 의한 요도괄약근 수축력을 나타낸 그래프이다 (A: 4주째의 요도괄약근 수축력, B: 8주째의 요도괄약근 수축력, N: 정상군, D: 대조군, P1: 실험군 1, P2: 실험군 2).

<158> 도 14는 실시예 8의 실험결과에 따라, 아세틸콜린 투여에 의한 요도괄약근 수축력을 나타낸 그래프이다 (A: 4주째의 요도괄약근 수축력, B: 8주째의 요도괄약근 수축력, N: 정상군, D: 대조군, P1: 실험군 1, P2: 실험군 2).

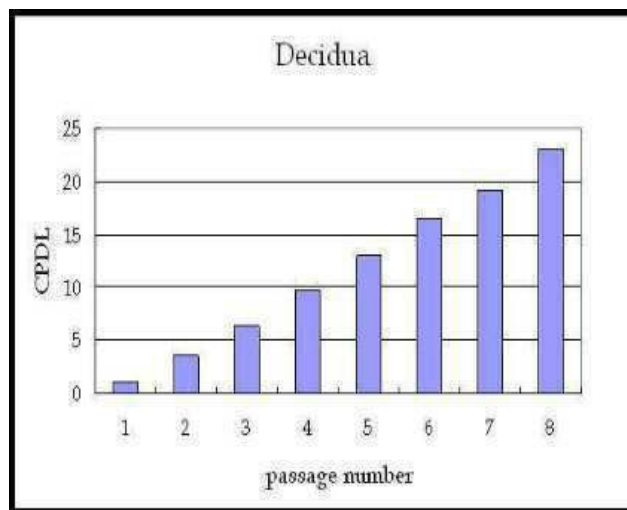
- <159> 도 15는 실시예 9의 실험결과에 따라, 전기자극에 의한 요도괄약근 수축력을 나타낸 그래프이다 (A: 4주째의 요도괄약근 수축력, B: 8주째의 요도괄약근 수축력, N: 정상군, D: 대조군, A1: 실험군 1, A2: 실험군 2).
- <160> 도 16은 실시예 9의 실험결과에 따라, 아세틸콜린 투여에 의한 요도괄약근 수축력을 나타낸 그래프이다 (A: 4주째의 요도괄약근 수축력, B: 8주째의 요도괄약근 수축력, N: 정상군, D: 대조군, A1: 실험군 1, A2: 실험군 2).
- <161> 도 17은 실시예 10에 따라 암컷 누드마우스에서의 요도 조직의 조직학적 H/E 면역염색, SMA, MyHC 결과를 나타낸 것이다.
- <162> 도 18은 실시예 10에 따라 수컷쥐에서의 요도조직의 조직학적 H/E 면역염색 결과를 나타낸 것이다.
- <163> 도 19는 실시예 11에 따라 암컷 누드마우스에서의 요도 조직의 조직학적 H/E 면역염색, SMA, MyHC 결과를 나타낸 것이다.
- <164> 도 20은 실시예 11에 따라 수컷쥐에서의 요도조직의 조직학적 H/E 면역염색 결과를 나타낸 것이다.

도면

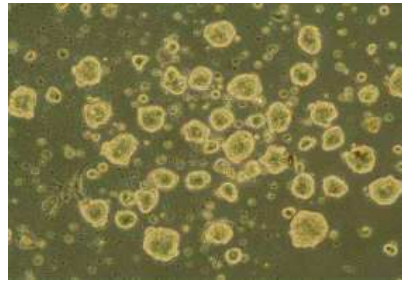
도면1



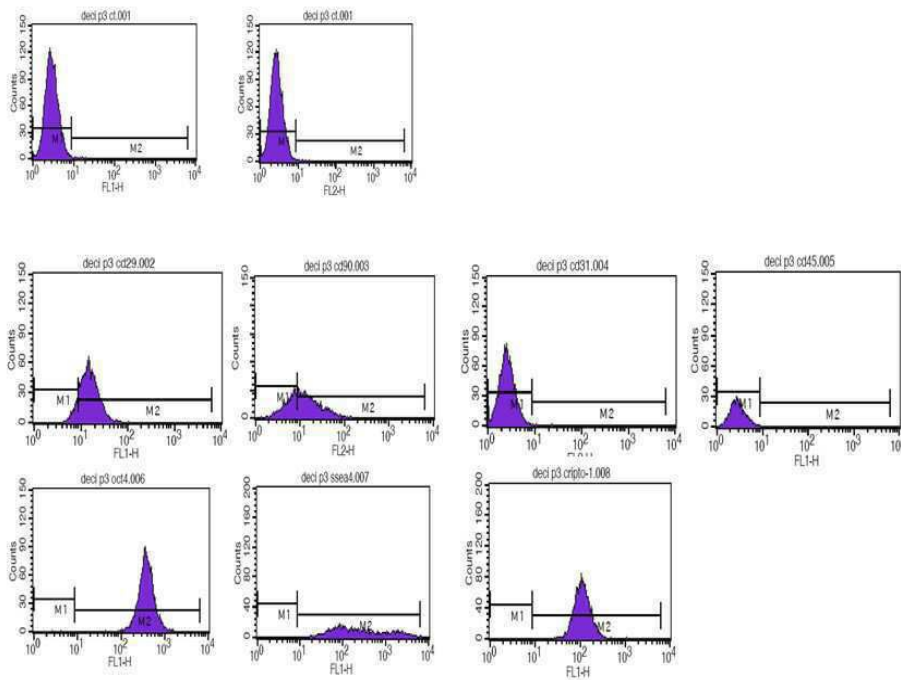
도면2



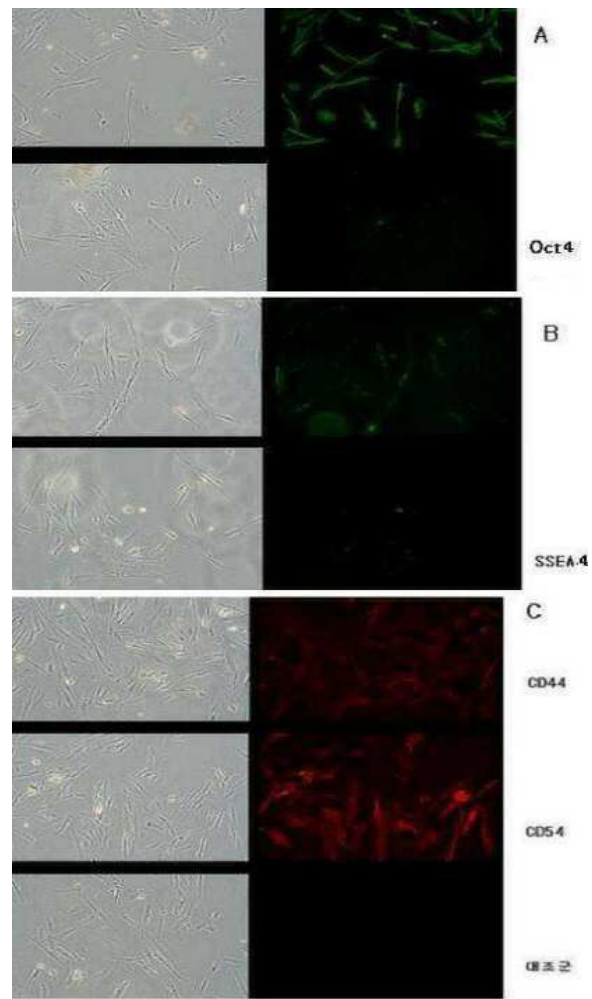
도면3



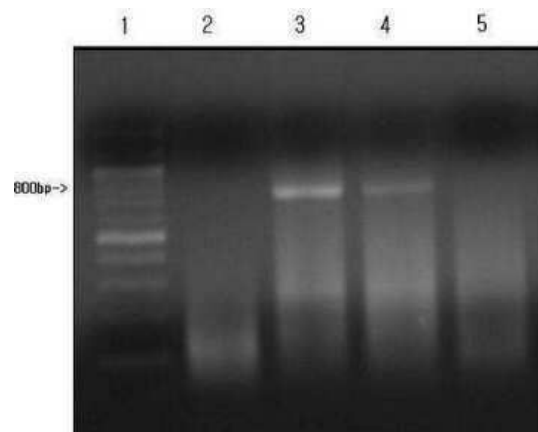
도면4



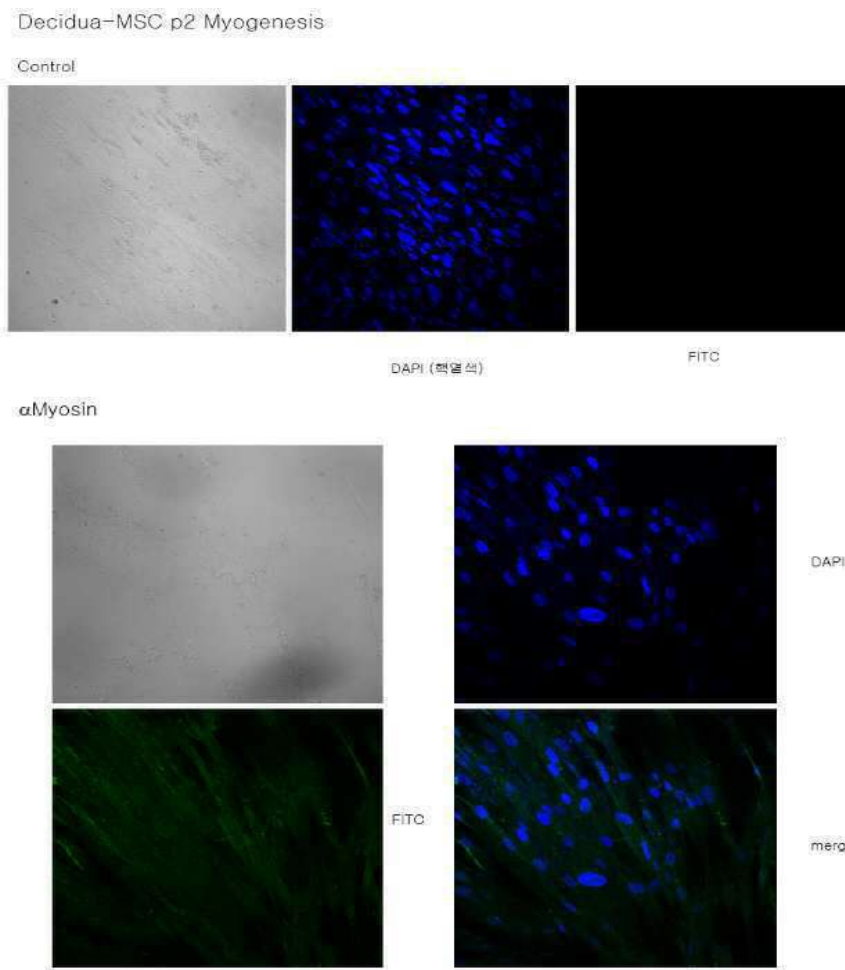
도면5



도면6



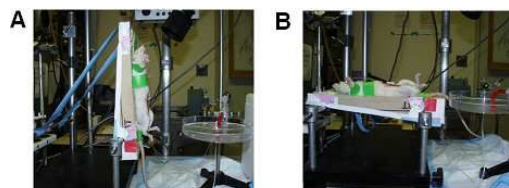
도면7



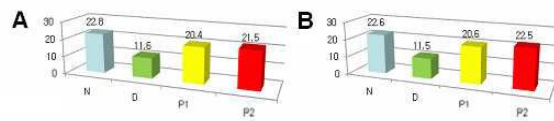
도면8



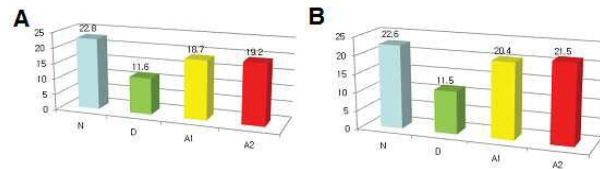
도면9



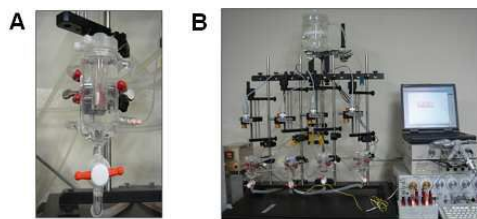
도면10



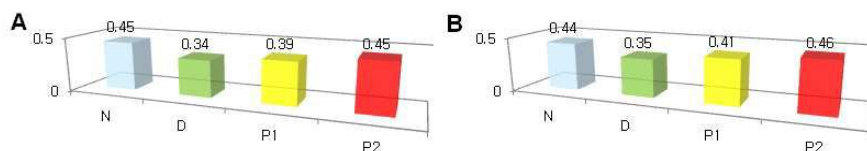
도면11



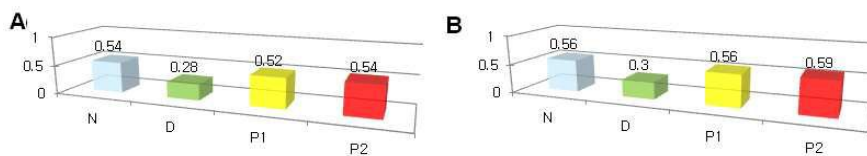
도면12



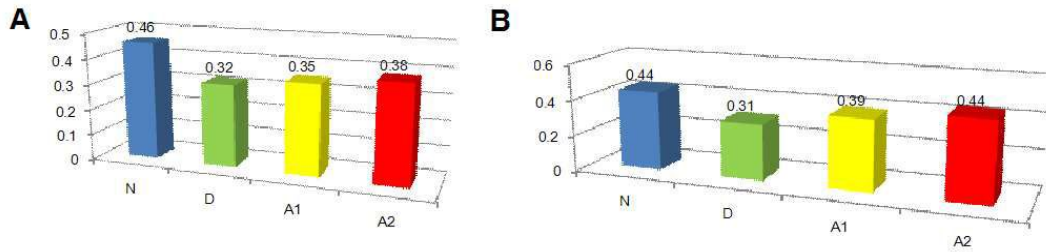
도면13



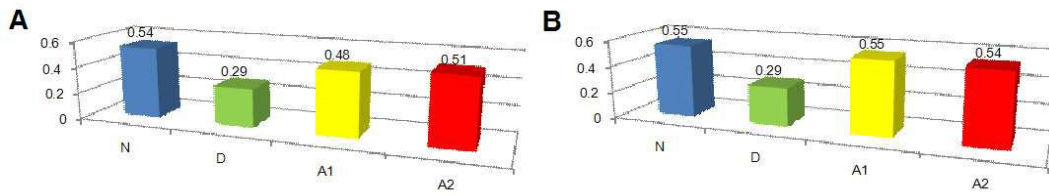
도면14



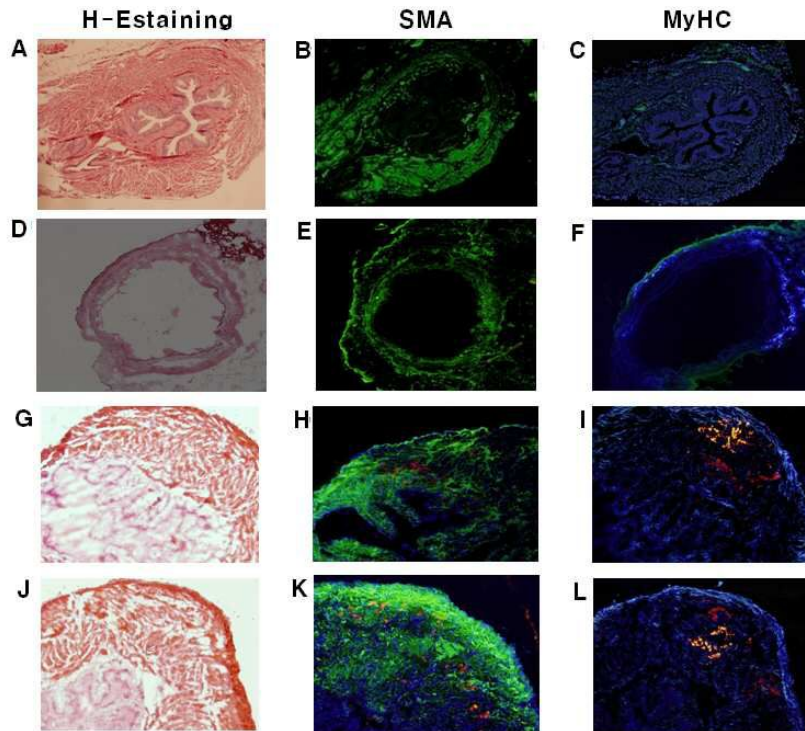
도면15



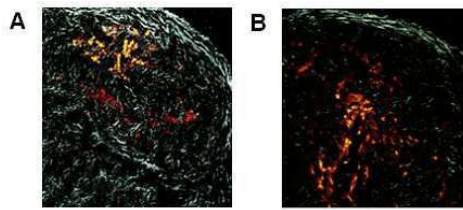
도면16



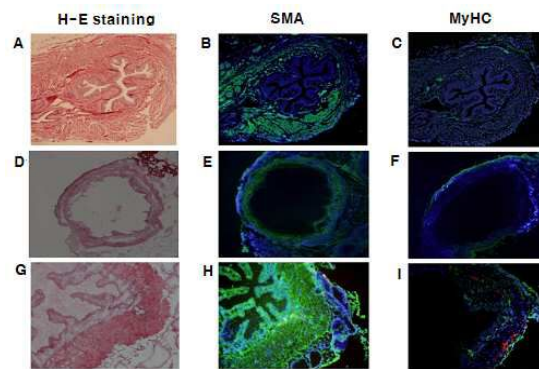
도면17



도면18



도면19



도면20

