【명세서】

【발명의 명칭】

외래 미토콘드리아를 세포로 전달하는 방법

【기술분야】

본 발명은 외래 미토콘드리아를 세포 내로 전달하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아를 대상세포의 세포질 내로 효율적으로 전달하는 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

미토콘드리아는 에너지 공급원으로서 아데노신 트라이포스페이트(adenosine triphosphate: ATP) 합성 및 조절에 관여하는 진핵세포의 생존에 필수적인 세포 소기관이다. 미토콘드리아는 생체 내 다양한 대사 경로, 예를 들어, 세포 신호처리, 세포 분화, 세포 사멸뿐만 아니라 세포 주기 및 세포 성장의 제어와 연관이 있다.

따라서, 미토콘드리아가 손상되면 다양한 질병이 유발될 수 있는데, 대부분의 공지된 미토콘드리아 장애는 미토콘드리아 DNA에서 발생하는 유전성 또는 후천성 돌연변이에 기인한다. 예를 들어, 미토콘드리아 막전위 이상으로 인한 팽윤, 활성산소종, 또는 자유라디칼 등에 의한 산화적 스트레스, 그리고 미토콘드리아의 에너지 생성을 위한 산화적 인산화 기능의 결함 등에 의해 미토콘드리아의 기능이 손상될 수 있다.

구체적으로, 미토콘드리아의 기능 이상은 다발성경화증, 뇌척수염, 뇌신경근염, 말초신경변증, 라이증후군, 알퍼증후군, MELAS, 편두통, 정신병, 우울증, 발작과 치매, 중풍성 에피소드, 시신경위축, 시신경병증, 망막색소변성,

백내장, 고알도스테론혈증, 부갑상선기능저하증, 근육병증, 근육위축, 미오글로빈뇨, 근육긴장저해, 근육통, 운동내성저하, 세뇨관증, 신부전, 간부전, 간기능부전, 간비대, 철적혈구빈혈, 호중성백혈구 감소증, 저혈소판증, 설사, 융모위축, 다발성구토, 연하곤란, 변비, 감각신경난청, 간질, 정신지체, 간질, 알츠하이머, 파킨슨, 헌팅턴 질환 등의 다양한 질병에 직접 또는 간접적인 원인이 되는 것으로 알려져 있다.

이러한 미토콘드리아 관련 질환을 치료하기 위하여, 미토콘드리아를 보호하거나 미토콘드리아의 기능장애를 회복하는데 사용될 수 있는 물질 또는 이러한 물질을 효율적으로 표적 전달할 수 있는 방법 등에 대한 연구가 지속되고 있다. 그러나, 치료범위가 다소 제한적이거나 부작용이 발생하는 문제가 있는 등 아직은 미토콘드리아 관련 질환에 대한 획기적인 치료법이 개발되지 않은 실정이다.

또한, 미토콘드리아 관련 질환을 원천 차단하는 방법으로, 미토콘드리아 돌연변이를 보유한 난자에서 핵의 유전물질을 추출하여 정상 미토콘드리아를 보유한 난자에 이식하는 기술이 대두되고 있으나, 생물학적 논란과 윤리적 논란이 있어 관련 법이 통과되지 못하고 있다.

따라서, 본 발명자들은 세포 내 미토콘드리아 활성을 효과적으로 증진시키면서도 생명윤리와 상충되지 않는 방법을 찾기 위해 노력하는 과정에서, 세포 손상을 수반하지 않고 건강한 미토콘드리아를 주입할 수 있는 기술을 고안함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명은 세포에서 분리된 미토콘드리아를 특정 세포 내로 주입하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 투여 대상세포를 손상시키지 않으면서도 높은 전달율로 정상 미토콘드리아를 전달함으로써, 미토콘드리아 기능이 향상된 세포를 제공하는 것을 목적으로 한다.

【기술적 해결방법】

상기 과제를 해결하기 위하여,

본 발명의 일 측면에 따르면, a) 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아와 대상세포를 혼합하는 단계 및 b) 수득된 혼합물을 원심분리 하는 단계를 포함하는 외래 미토콘드리아를 대상세포 내로 전달하는 방법을 제공한다.

또한, 상기 단계 b)전에, 계면활성제를 첨가하는 단계 또는 인큐베이션을 하는 단계를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 방법에 따라 외래 미토콘드리아가 도입된 세포를 제공할 수 있다.

【발명의 효과】

본 발명의 방법을 통하여, 정상세포로부터 분리된 미토콘드리아를 대상세포에 효과적으로 주입할 수 있다. 특히, 본 발명의 방법은 세포에 전달되는 미토콘드리아의 양을 조절할 수 있기 때문에, 주입 수율이 매우 높고 세포에 손상이 발생하지 않는 장점이 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 세포 내 미토콘드리아를 형광촬영 방법으로 관찰한 것이다.

도 2는 분리된 미토콘드리아를 형광촬영 방법으로 관찰한 것이다.

도 3은 미토콘드리아 분리 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 4는 공여세포 종류에 따른 미토콘드리아의 활성을 비교한 그래프이다.

도 5는 분리된 미토콘드리아 내의 ATP 양을 측정하여 미토콘드리아의 기능을 확인한 것이다.

도 6은 미토콘드리아 마커와 핵 마커의 발현을 분석하여 분리된 미토콘드리아의 높은 순도를 확인한 것이다.

도 7a 내지 도 7c는 미토콘드리아 염색 패턴을 이용하여 UC-MSCs 내로의 미토콘드리아 전달을 확인한 것이다.

도 7d 내지 도 7f는 미토콘드리아 전달을 3D Z-stack으로 확인한 것이다.

도 7g 내지 도 7i는 미토콘드리아 특이적 MitoTracker 프로브를 이용하여 분리한 미토콘드리아의 생존률을 확인한 것이다.

도 8은 UC-MSCs 내 전달된 미토콘드리아 전달율을 FACS 분석을 통해 확인한 것이다.

도 9는 대상세포(L6 세포) 내로의 UC-MSCs 유래 미토콘드리아 전달을 qPCR을 이용하여 확인한 것이다.

도 10은 원심분리를 통한 미토콘드리아 전달이 효과적으로 이루어진다는 점을 real-time PCR을 이용하여 확인한 것이다.

도 11은 FACS 분석을 통해 다양한 세포로의 미토콘드리아 전달을 확인한 것이다.

도 12는 공여세포 유래 미토콘드리아를 대상세포로 전달한 후, 이를

이용하는 과정을 나타낸 것이다.

도 13은 혼합되는 외래 미토콘드리아의 함량에 따른 전달율을 FACS를 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 혼합되는 외래 미토콘드리아의 함량에 따른 전달율을 FACS를 통해 분석한 것이다.

도 15는 혼합한 미토콘드리아의 농도에 따라, 대상세포로 전달된 외래 미토콘드리아 양을 나타낸 것이다.

도 16은 대상세포로 전달된 외래 미토콘드리아를 공초점 주사 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 17은 FACS 분석을 통해 최적의 미토콘드리아 전달 조건을 확인한 것이다.

도 18a 및 도 18b는 최적의 미토콘드리아 전달 조건으로 미토콘드리아를 전달한 후 공초점 현미경을 통해 전달된 미토콘드리아를 확인한 것이다.

도 19는 계면활성제 첨가 후 인큐베이션 시간에 따른 미토콘드리아 전달율을 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 계면활성제 첨가 후 인큐베이션 시간에 따른 미토콘드리아 전달율을 FACS로 분석한 결과를 막대 그래프로 도식화한 것이다.

도 21은 원심분리 과정 없이 대상세포에 계면활성제를 첨가하고 인큐베이션 과정을 통해 미토콘드리아 전달율을 측정한 것이다.

도 22는 대상세포에 계면활성제를 다양한 농도 및 처리 시간에 따라 처리한 후, 원심분리를 통해 미토콘드리아를 대상세포로 전달 시, 미토콘드리아 전달율을 측정한 것이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하도록 한다.

본 발명의 일 측면은 a) 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아와 대상세포를 혼합하는 단계 및 b) 수득된 혼합물을 원심분리하는 단계를 포함하는 외래 미토콘드리아를 대상세포 내로 전달하는 방법을 제공한다.

먼저, 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아와 대상세포를 혼합하는 단계를 제공한다.

여기서, "공여세포"란 미토콘드리아를 제공하는 세포를 말한다. 또한, 상기 공여세포는 정상세포로서 정상적인 미토콘드리아를 포함하는 세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 공여세포는 동물 또는 인간을 포함하는 포유 동물로부터 분리된 세포일 수 있다. 또한, 상기 공여세포는 동물세포로서, 각각 독립적으로, 체세포, 줄기세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있다.

또한, 상기 체세포는 근육세포, 간세포, 섬유아세포, 상피세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 백혈구, 림프구, 점막세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있고, 또는 근육세포, 간세포, 섬유아세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있고, 또는 근육세포나 간세포일 수 있다. 바람직하게는, 공여세포는 미토콘드리아 활성이 뛰어난 근육세포일 수 있다.

또한, 줄기세포란 여러 종류의 조직 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포를 말하며, 상기 줄기세포는 성체줄기세포, 중간엽줄기세포, 역분화줄기세포 및 조직 유래 줄기세포와 같이 모든 종류의 줄기세포일 수 있다.

또한, 암세포는 편평세포 암, 소형 세포 폐암, 비-소형 세포 폐암, 폐암, 선암, 복막암, 결장암, 담도 종양, 비인두암, 후두암, 기관지암, 구강암, 골육종, 담낭암, 신장암, 백혈병, 방광암, 흑색종, 뇌암, 신경 교종, 뇌종양, 피부암, 췌장암, 유방암, 간암, 골수암, 식도암, 대장암, 위암, 자궁경부암, 전립선암, 난소암, 두경부암 및 직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 세포일 수 있다.

한편, "대상세포"란 미토콘드리아가 도입되는 세포를 말한다. 또한, 상기 대상세포는 정상세포일 수 있으며, 면역관련 세포인, 백혈구, 림프구 중 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 대상세포는 선천적 또는 후천적 요인에 기인하여 비정상 미토콘드리아를 포함하는 이상세포일 수 있다.

또한, 상기 공여세포와 대상세포는 동종 세포 또는 이종 세포일 수 있다. 상기 공여세포와 상기 대상세포는 동일한 개체 또는 다른 개체로부터 수득된 것일 수 있다.

상기 단계 a)에서, 공여세포로부터 미토콘드리아를 분리하는 방법은, 예를 들어, 특정 버퍼 용액을 사용하여 분리되거나 전위차 및 자기장을 이용하여 미토콘드리아를 추출하는 등 공지된 다양한 방법에서 선택될 수 있다.

미토콘드리아를 분리하는 방법의 일 구체예로 미토콘드리아 활성을 유지시키기 위해서, 세포를 파쇄하고 원심분리를 하여 수득할 수 있다. 일 구체예로, 공여세포를 배양하고, 이러한 세포를 포함하는 조성물을 제1차 원심분리하여 펠렛을 생성하는 단계, 상기 펠렛을 버퍼 용액에 재현탁시키고, 균질화하는 단계, 상기 균질화된 용액을 제2차 원심분리하여 상청액을 제조하는 단계 및 상기 상청액을 제3차 원심분리하여 미토콘드리아를 정제하는 단계로

수행될 수 있다. 이때, 제2차 원심분리가 수행되는 시간은 제1차 및 제3차 원심분리가 수행되는 시간보다 짧도록 조절되는 것이 세포 활성 유지 면에서 바람직하며, 제1차 원심분리에서 제3차 원심분리로 갈수록 속도를 높일 수 있다.

구체적으로, 상기 제1차 내지 제3차 원심분리는 0 내지 40℃의 온도, 바람직하게는 3 내지 5℃의 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 원심분리가 수행되는 시간은 0.5분 내지 50분, 1분 내지 20분, 2분 내지 30분, 바람직하게는 5분 동안 수행될 수 있다. 또한, 원심분리 횟수 및 샘플의 함량 등에 따라 적절히 조정될 수 있다. 상기 원심분리 속도는 1×g 내지 2,400×g, 350×g 내지 2,000×g, 600×g 내지 1,600×g, 바람직하게는 1,500×g의 속도로 수행될 수 있다.

아울러, 상기 제1차 원심분리는 100 내지 1,000×g, 또는 200 내지 700×g, 또는 300 내지 450×g의 속도로 수행될 수 있다. 또한, 상기 제2차 원심분리는 1 내지 2,000×g, 또는 25 내지 1,800×g, 또는 500 내지 1,600×g의 속도로 수행될 수 있다. 또한, 상기 제3차 원심분리는 100 내지 20,000×g, 또는 500 내지 18,000×g, 또는 800 내지 15,000×g의 속도로 수행될 수 있다.

다음으로, 수득한 혼합물을 원심분리 하는 단계를 포함하는 외래 미토콘드리아를 대상세포 내로 전달하는 단계를 제공한다.

이때, 원심분리는 100×g, 300×g, 500×g, 800×g, 1,000×g, 1,200×g, 1,500×g, 1,800×g, 2,000×g, 2,400×g, 3,000×g, 5,000×g 또는 10,000×g에서 수행될 수 있다. 또한, 원심분리 시간은 0.1분 내지 60분일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 1분, 2분, 3분, 5분, 10분, 20분 또는 30분일 수 있다.

상기 원심분리는 0 내지 40℃, 20 내지 38℃ 또는 30 내지 37℃의 온도에서 수행될 수 있다.

이와 같이 대상세포와 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아에 함께 원심력을 가해줌으로써, 대상세포에 손상이 적게 발생하면서도 높은 효율로 미토콘드리아를 대상세포로 전달시킬 수 있다. 또한, 대상세포의 미토콘드리아에 결함이 있는 경우, 정상 미토콘드리아를 포함하고 있는 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아를 대상세포로 주입하여, 미토콘드리아 결함에 기인한 대상세포의 기능을 복구할 수 있다.

또한, 상기 단계 b)에서, 상기 혼합물은 하단으로 갈수록 점진적으로 직경이 좁아지는 시험관에서 원심분리 하는 것이 대상세포와 미토콘드리아에 가해지는 원심력 및 접촉 효율 측면에서 보다 효율적일 수 있다. 상기 원심분리는 동일한 조건으로 1회 내지 3회 추가로 수행될 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서는, 1,500×g의 속도로 5분 동안 원심분리를 수행하였을 때, 미토콘드리아가 대상세포로 가장 잘 전달됨을 알 수 있었다.

또한, 상기 단계 a)에서, 미토콘드리아는 다양한 양으로 대상세포와 혼합될 수 있다. 구체적으로, 대상세포 1 x 10^5 개당 미토콘드리아 0.005 내지 25 ㎍, 0.01 내지 23 ㎍ 또는 0.1 내지 20 ㎍으로 포함될 수 있다. 구체적으로, 대상세포 1 x 10^5 개당 미토콘드리아가 0.1 ㎍, 1 ㎍, 3 ㎍, 5 ㎍, 10 ㎍, 15 ㎍ 또는 18 ㎍ 포함될 수 있다. 대상세포 1 x 10^5 개당 미토콘드리아 0.005 ㎍의 함량 보다 적은 수의 미토콘드리아가 포함되는 경우 전달 수율이 다소 저하될 수 있다.

아울러, 상기 단계 b)를 수행하기 전에, a) 단계에서 수득한 혼합물에

계면활성제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 계면활성제는 대상세포의 세포막 투과성을 증진시키기 위해 사용된다. 계면활성제의 첨가 시점은 대상세포와 미토콘드리아를 혼합하기 전, 혼합 시 또는 혼합 후에 첨가될 수 있다. 또한, 계면활성제를 대상세포에 첨가한 후 대상세포의 세포막 투과성을 높이기 위해 일정 시간 대상세포를 인큐베이션할 수 있다. 방치시간은 0.1 내지 60분일 수 있다. 구체적으로 1분, 5분, 10분, 20분 또는 30분일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

구체적으로, 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제인 것이 바람직하며, 폴록사머(poloxamers)일 수 있다. 이때 폴록사머는 폴리옥시에틸렌의 두 개의 친수성 사슬에 의해 옆으로 배치된 폴리옥시프로필렌의 중심 소수성 사슬로 구성된 삼블록 공중합체이다. 또한, 상기 혼합물에서 계면활성제의 농도는 1 내지 100 mg/ml, 3 내지 80 mg/ml 또는 5 내지 40 mg/ml 일 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 30 mg/ml일 수 있다.

또한, 상기 단계 b)를 수행하기 전에, a) 단계에서 수득한 혼합물을 소정의 시간 및 온도 조건으로 인큐베이션을 하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 인큐베이션은 0 내지 40℃ 또는 20 내지 38℃ 또는 30 내지 37℃의 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 0.1 내지 4시간, 0.5 내지 3.8시간 또는 0.8 내지 3.5시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 인큐베이션은 단계 b)를 수행하여 대상세포에 미토콘드리아가 전달된 후에 소정의 시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 인큐베이션 시간은 세포의 종류 및 미토콘드리아의 양에 따라 적절히 선택될 수 있다.

또한, 상기 단계 b)를 수행하기 전에, a) 단계에서 수득한 혼합물에

계면활성제를 첨가하고 인큐베이션을 하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 계면활성제 및 인큐베이션 조건은 각각에서 설명한 바와 동일하다.

본 발명의 또 다른 측면은 전술한 방법에 따라 외래 미토콘드리아가 전달된 세포를 제공한다.

상기 세포는 미토콘드리아 이상 질환 치료용 조성물에 포함될 수 있다. 구체적으로, 전술한 방법에 따라 외래 미토콘드리아가 전달된 세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여하여 질병을 치료할 수 있으며, 이때 목적 질병과 직접적으로 관련되거나 관련되지 않은 건강 상태를 가진 포유류에게 본 발명의 세포의 유효량을 투여할 수 있다.

이와 같이, 본 발명에 따른 전달 방법은 외래 미토콘드리아가 도입되는 세포의 미토콘드리아 기능을 향상시킬 수 있고, 본 발명에 따라 수득된 세포는 미토콘드리아 기능 향상, 미토콘드리아 이상 질환 치료 또는 예방에 이용될 수 있다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

【발명의 실시를 위한 형태】

준비예 1. 세포 준비

인간 지방 유래 중간엽줄기세포(AD-MSCs; PCS-500-011, passage #7), 인간 유방암 세포주(MCF-7; HTB-22, passage #20), 인간 선암 폐포 상피세포(A549; CCL-185, passage #20), 인간 백혈병 세포주(K562; CCL-243, passage #20), 인간 간

세포주(WRL-68; CL-48, passage #9), 인간 진피 섬유아세포(HDFs; PCS-201-012, passage #9) 및 인간 자연살해 세포주(NK-92; CRL-2407, passage #10)는 Animal Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 구입하였다. 인간 골수 유래 중간엽줄기세포(BM-MSCs; MSC-001F, passage #7)는 Stem Cell 사(Vancouver, Canada)에서 구입하였다. 세포 유형에 따른 전달 효율(%)을 비교하기 위해, 모든 세포주가 완전히 해동될 때까지 37℃ 배스(bath)에서 보관하였다. 이후, 미토콘드리아 전달에 즉각적으로 사용하였다.

UC-MSCs를 10% 소태아 혈청(foetal bovine serum, FBS; Hyclone), 100 ㎍/㎖의 스트렙토마이신 및 100 IU/㎖의 페니실린(P/S; Hyclone), 및 10 ng/㎖ 염기성 섬유모세포생장인자(CHA 메디텍 사, 대전, 한국)를 포함하는 α-MEM 배지(Hyclone LaboratoRIES Inc., Logan, UT)에서 배양하였다. 세포 증식이 80% 내지 90%에 도달할 때, 상기 passage #5 내지 #7 단계에 있는 UC-MSCs를 사용하였다. 참고로, CHA 대학교(성남, 한국; IRB No. 201412-BR-003-02) 기관감사위원회의 승인 하에 본 실험을 실시하였다.

래트 골격근 유래 세포주인 L6(CRL-1458)는 동물류 Animal Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 구입하였다. 상기 세포들은 10% FBS 및 1% P/S를 포함하는 DMEM 배지(DMEM; Hyclone)에서 배양하였고, passage #6 내지 #10 단계에 있는 상기 L6 세포를 사용하였다.

준비예 2. 형광 이미지 분석

하기 실시예에서 미토콘드리아 전달을 추적하기 위해 10× 및 20× 개구수를 지니고 있는 TCS SP5 II 공초점 현미경(Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하였다.

2.6 버전의 Leica LAS AF 소프트웨어(Leica Microsystems, Mannheim, Germany)를 사용하여 디지털 이미지를 확인하였다.

실시예 1. 미토콘드리아 분리

1.1. L6 세포 내 미토콘드리아 분리

상기 준비예 2에서 배양된 L6를 녹색을 띄는 미토콘드리아 특이적 표지자(Mitotracker green)로 염색시켰다. 세포 내 미토콘드리아에 녹색 형광이 잘 표지 되었는지 확인하기 위해 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

미토콘드리아를 추출하기 위하여, 혈구계산기를 이용하여 세포수를 측정하여 2×10^7 cells/ml 정도의 세포를 회수하였다. 이후, 상기 세포주를 약 4℃의 온도에서 10분 동안 350×g의 속도로 제1차 원심분리를 수행하였다. 이때 얻어진 펠렛을 회수하여 프로테아제 억제제(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 포함하는 SHE 버퍼 용액(0.25 M 수크로오스, 20 mM HEPES(pH 7.4), 2 mM EGTA, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ 및 0.1% BSA(defatted bovine serum albumin))에 일회용의 1 ml 실린지(syringe)를 이용하여 재현탁시켜 균질화하였다. 상기 펠렛을 포함하는 조성물을 약 4℃의 온도에서 3분 동안 1,100×g의 속도로 제2차 원심분리시켜 상청액을 수득하였다. 이후, 상기 상청액을 약 4℃의 온도에서 15분 동안 12,000×g의 속도로 제3차 원심분리시켜 세포주로부터 미토콘드리아를 분리하였다.

분리된 미토콘드리아를 확인하기 위하여, 분리 수행 전 녹색 형광으로 표지된 세포 내 미토콘드리아를 일반현미경 및 형광현미경으로 촬영하여 도 1에 나타내었고, 분리된 미토콘드리아를 일반현미경 및 형광현미경으로 촬영하여 도 2에 나타내었다. 미토콘드리아 분리 실험의 흐름도는 도 3에 나타내었다.

도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 분리 전 L6세포 내에 존재하는 미토콘드리아가 분리된 것을 확인하였다.

1.2. 인간 탯줄 유래 중간엽줄기세포 내 미토콘드리아 분리

분별 원심분리를 이용하여 인간 탯줄 유래 중간엽줄기세포(UC-MSCs, 분당차병원 제공, IRB No. 201412-BR-003-02)로부터 미토콘드리아를 분리하였다. 미토콘드리아를 추출하기 위하여, 혈구계산기를 이용하여 세포수를 측정하였고 2×10^7 세포를 회수하였다.

상기 세포주를 약 4℃의 온도에서 10분 동안 350×g의 속도로 제1차 원심분리를 수행하였다. 이때 얻어진 펠렛을 회수하여 프로테아제 억제제(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 포함하는 SHE 버퍼 용액(0.25 M 수크로오스, 20 mM HEPES(pH 7.4), 2 mM EGTA, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ 및 0.1% BSA(defatted bovine serum albumin))에 일회용의 1 ml 실린지(syringe)를 이용하여 재현탁시켜 균질화하였다.

분해되지 않은 세포와 세포 잔해를 제거하기 위해, 상기 펠렛을 포함하는 조성물을 약 4℃의 온도에서 3분 동안 1,100×g의 속도로 제2차 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 이후, 미토콘드리아를 펠렛화하기 위해, 상기 상층액을 약 4℃의 온도에서 15분 동안 12,000×g의 속도로 제3차 원심분리하였다. 미토콘드리아 펠렛은 500 ㎕의 SHE 버퍼에서 재현탁하였고 약 4℃에서 5분 동안 20,000×g의 속도로 원심분리하였다. 상층액 제거 후 펠렛을 50 ㎕의 PBS에서 재현탁하였고, 측정을 수행할 때까지 아이스에서 보관하였다. 모든 분석은 갓

분리한 미토콘드리아로 수행하였다.

실시예 2: 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아의 활성 및 기능 확인

2.1. 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아의 활성 측정

실시예 1의 방법에 따라 인간 간 세포주 WRL-68, 인간 진피 섬유아세포 HDFs 및 인간 탯줄 유래 중간엽줄기세포 UC-MSCs에서 미토콘드리아를 추가로 분리하였다. 이렇게 분리된 미토콘드리아의 활성을 측정하기 위하여, 사이토크롬 c 산화 활성 분석 키트(Biovision)를 사용하였다. 각 세포의 미토콘드리아로부터 키트에 포함된 환원된 형태의 사이토크롬 c 와 반응시키고 550 nm에서 30분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 시간별로 측정된 흡광도의 변화로부터 환원된 형태에서 미토콘드리아의 산화 능력을 산출하였다. 각각의 세포주로부터 얻어진 미토콘드리아의 사이토크롬 c 산화 활성을 측정하여 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타난 바와 같이, 분리된 미토콘드리아의 ATP 활성 능력은 근육세포, 간세포, 탯줄 유래 줄기세포, 그리고 섬유아세포 순으로 나타났으며, 이를 통해 조직에 따라 미토콘드리아의 활성이 다른 것을 알 수 있다.

2.2. 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아의 기능 확인

상기 UC-MSCs로부터 분리된 미토콘드리아의 기능을 확인하기 위해, 분리된 미토콘드리아를 BCA 분석기법(bicinchoninic acid assay)을 통해 미토콘드리아 단백질 농도를 정량화하여 다양한 농도(0.05 μg, 0.5 μg 및 5 μg)에서 ATP를 측정하였다. ATP 양에 비례하여 발광 신호를 발생시키는 CellTiter-Glo 발광 키트(Promega, Madison, WI)를 이용하여 미토콘드리아 내 ATP의 양을 측정하였다.

상기 농도별 미토콘드리아는 50 ㎕의 PBS에 섞어준 뒤 96-웰 플레이트에

준비하였고, 키트에 포함되어있는 테스트 용액을 동일하게 50 ㎕ 추가하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, 발광 마이크로플레이트 리더(luminescence microplate reader)를 이용하여 발광 신호를 측정함으로써 ATP 양을 측정하였다. 이를 도 5에 나타내었다.

도 5에 나타난 바와 같이, ATP 양은 미토콘드리아 농도에 의존적으로 비례하여 증가하였고, 이를 통해 미토콘드리아의 기능을 확인할 수 있었다.

실시예 3. 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아의 순도 측정

상기 UC-MSCs로부터 분리된 미토콘드리아의 순도를 측정하기 위해, 미토콘드리아 분리 과정에서 얻어지는 세포질 분획(cytosolic fraction)과 미토콘드리아 분획(mitochondrial fraction)에서 미토콘드리아 마커[COX IV(cytochrome C oxidase)와 cytochrome c] 및 핵 마커[PCNA(proliferating cell nuclear antigen)와 β-actin]의 발현을 웨스턴 블롯 분석기법을 통해 확인하였다. 이를 도 6에 나타내었다.

도 6에 나타난 바와 같이, 분리된 미토콘드리아 분획에서 COX IV 및 cytochrome c가 발현함을 확인한 반면, PCNA 및 β-actin은 발현하지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 분리된 미토콘드리아의 순도가 높음을 확인할 수 있었다.

실시예 4. 공여세포로부터 분리된 미토콘드리아의 전달 확인

4.1. WRL-68로부터 분리된 미토콘드리아의 전달 및 활성 확인

상기 WRL-68로부터 분리된 미토콘드리아의 전달 및 전달된 미토콘드리아의 활성을 확인하기 위해, 미토콘드리아 특이적 MitoTracker 프로브를 사용하였다. 붉은색 형광의 MitoTracker Red CMXRos(CMXRos) 프로브는 미토콘드리아

막전위(mitochondrial membrane potential, MMP)에 의존적으로 축적된다는 특징을 이용하여 미토콘드리아의 생존성 및 호흡 능력을 확인하였다. 또한, MitoTracker Green(MTG) 프로브를 이용하여 대상세포인 UC-MSCs 내 미토콘드리아를 염색하였다. MitoTracker Red CMXRos 프로브로 염색된 WRL-68로부터 분리된 외래 미토콘드리아를 MitoTracker Green 프로브로 염색된 UC-MSCs와 혼합하였다. 이후 원심분리를 진행하였다. MitoTracker Red CMXRos(CMXRos) 프로브 및 MitoTracker Green(MTG) 프로브 각각의 관찰 이미지를 도 7a 및 도 7b에 나타내었으며, 상기 두 이미지가 합병(merge)된 이미지를 도 7c에 나타내었다.

도 7a 내지 도 7c에 나타난 바와 같이, 전달된 외래 미토콘드리아(붉은색 형광)은 UC-MSCs에 내재되어 있는 미토콘드리아(녹색 형광)와 합병된 이미지(노란색 형광)로 나타났다. 이를 통해, 본 발명의 미토콘드리아 분리 방식으로 온전한 미토콘드리아를 수득할 수 있음을 알 수 있었다.

또한, MitoTracker Red CMXRos(CMXRos) 프로브로 염색된 외래 미토콘드리아를 갖는 UC-MSCs의 3차원 z-stack 이미지를 관찰하였다. 이를 도 7d 내지 도 7f에 나타내었다. 도 7e를 기준으로 도 7d는 2 ㎛ 아래, 도 7f는 2 ㎛ 위의 이미지이다.

도 7e 내지 도 7f에 나타난 바와 같이, 합병(merge)되어 나타나는 노란색 형광을 통해 대상세포인 UC-MSCs 내에 전달된 미토콘드리아가 확인되었다. 이를 통해, 미토콘드리아가 원심분리를 통해 대상세포에 효과적으로 전달됨을 알 수 있었다. 또한, 전달된 미토콘드리아의 활성이 유지됨을 알 수 있었다.

4.2. UC-MSCs로부터 분리된 미토콘드리아의 전달 및 활성 확인

상기 UC-MSCs로부터 분리된 미토콘드리아의 전달 및 전달된 미토콘드리아의

활성을 확인하기 위해, 미토콘드리아 특이적 MitoTracker Red CMXRos(CMXRos) 프로브를 사용하였다. 또한, MitoTracker Green(MTG) 프로브를 이용하여 세포 내 미토콘드리아를 염색하였다. 또한, 미토콘드리아 분리하기 전 UC-MSCs를 MitoTracker 프로브로 염색하고 37° C에서 30분 동안 배양하였다. 미토콘드리아 분리 과정을 거친 뒤, 미토콘드리아 펠렛을 10 μl의 PBS와 혼합하였고 이를 슬라이드 위에 얹고 커버슬라이드로 덮어 형광 현미경으로 관찰하였다. MitoTracker Red CMXRos(CMXRos) 프로브 및 MitoTracker Green(MTG) 프로브 각각의 관찰 이미지를 도 7g 및 도 7h에 나타내었으며, 상기 두 이미지가 합병(merge)된 이미지를 도 7i에 나타내었다.

도 7g 내지 도 7i를 통해, 본 발명의 미토콘드리아 분리 방식으로 온전한 미토콘드리아를 수득할 수 있음을 할 수 있었다.

4.3. FACS 분석을 이용한 미토콘드리아 전달 확인

미토콘드리아 전달율을 확인하기 위해, MitoTracker Green을 이용하여 상기 실시예 5.1과 동일한 방법으로 FACS를 수행하였다. 이를 도 8에 나타내었다.

도 8에 나타난 바와 같이, UC-MSCs로 전달된 미토콘드리아의 양(0.05, 0.5 및 5 μg)에 비례하여 녹색 형광으로 나타나는 전달율이 각각 33.1±0.8%, 77.1±1.1% 및 92.7±5.9%로 증가하였다. 이를 통해, 대상세포로 전달된 미토콘드리아의 양(미토콘드리아 단백질 농도(μg))에 비례하여 전달율이 증가함을 알 수 있었다.

4.4. qPCR 분석을 통한 미토콘드리아 전달 확인

미토콘드리아 전달을 증명하기 위해, 미토콘드리아 전달 후 공여세포 또는 대상세포에 특정 프라이머를 이용하여 전통적인 PCR을 수행함으로써 대상세포 내

mtDNA 발현을 증명하였다.

공여세포인 인간 탯줄 유래 중간엽줄기세포 UC-MSCs로부터 추출한 미토콘드리아를 래트 L6 세포에 전달한 후, qPCR(quantitative polymerase chain reaction) 분석을 이용하여 인간-mtDNA, 래트-mtDNA 및 래트-GAPDH의 발현을 확인하였다. 이때, 인간 UC-MSCs 및 래트 L6 세포의 특정 프라이머를 사용하였다. 이를 도 9에 나타내었다.

도 9에 나타난 바와 같이, L6 세포로 전달된 미토콘드리아의 양에 의존적으로 래트 세포 내 인간-mtDNA의 발현이 증가하였다. 반면, 래트-mtDNA의 발현에는 변함이 없었다. 이를 통해, 미토콘드리아를 전달한 대상세포 내에 외래 미토콘드리아가 전달되었다는 것을 알 수 있었다.

4.5. real-time PCR 분석을 통한 미토콘드리아 전달 확인

상기 실시예 4.4에서 확인한 정성적인 결과와 함께 정량적인 결과를 얻기 위해, 외래 미토콘드리아가 전달된 L6 세포 내에서 전달된 미토콘드리아의 특이적인 인간-mtDNA copy 수와 미토콘드리아 전달 전의 인간-mtDNA copy 수를 비교하였다. 이를 도 10에 나타내었다. 도 21에서 검은색 바(상단에서 1번째)는 미토콘드리아를 추출한 뒤 전달하고자 하는 미토콘드리아 농도에 대한 mtDNA copy 수를 확인한 결과이다. 옅은 회색바(상단에서 2번째)는 원심분리를 통해 대상세포로의 미토콘드리아 전달 후, 대상세포 내의 mtDNA copy 수를 확인한 결과이다. 짙은 회색바(상단에서 3번째)는 원심분리 방법을 통한 전달율에 대한 비교 수치를 보여주고자, 원심분리가 아닌 공배양(co-incubation, 24h)을 통해 미토콘드리아를 전달한 후 mtDNA copy 수를 확인한 결과이다.

도 10에 나타난 바와 같이, 원심분리를 통한 미토콘드리아의 전달율은 약 80% 내지 85%로 나타났다. 또한, 공배양을 통한 미토콘드리아 전달율은 10% 미만의 현저히 떨어지는 수치를 보였다. 이를 통해, 원심분리를 통한 미토콘드리아 전달법이 효과적임을 알 수 있었다.

4.6. 다양한 세포로의 미토콘드리아 전달 확인

대상세포의 특성에 따라 미토콘드리아 전달의 차이를 비교하기 위해, FACS 분석을 통하여 다양한 세포로의 미토콘드리아 전달율을 측정하였다. 3개의 세포주(줄기세포, 암세포 및 체세포)를 선별하였다. 상기 세포를 부착세포 및 부유세포의 유형으로 분류하였고, 원심분리를 통해 UC-MSCs 유래 미토콘드리아를 각 유형의 세포로 전달하였다. 이후, FACS 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

도 11을 통해, 세포마다 전달율의 차이는 보이나 넓은 범위의 다양한 세포로 미토콘드리아 전달이 가능함을 알 수 있었다.

실시예 5: 대상세포로 미토콘드리아의 전달

상기 실시예 1에 따라 분리된 외래 미토콘드리아를 대상세포로 효과적으로 전달하기 위해, 도 12에 나타나는 빠르고 단순한 원심분리 방법을 사용하였다. 도 12에 나타나는 바와 같이, 미토콘드리아 활성 능력이 좋은 공여세포(donor cell)로부터 빠른 시간 내에 미토콘드리아를 분리하는 과정(step 1), 분리된 미토콘드리아를 대상세포(recipient cell)로 전달하는 과정(step 2) 및 다양한 응용분야(in vitro, in vivo(clinical & pre-clinical))에 접목시킬 수 있는 과정(step3)으로 크게 분류할 수 있다.

5.1. 미토콘드리아 전달 확인 (1)

1 x 10^5 개의 세포에, 실시예 1에 따라 WRL68로부터 추출된 미토콘드리아를 혼합한 조성물을 실시예 2에 따른 방법으로 처리하여, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ㎍의 미토콘드리아를 대상세포인 UC-MSCs와 혼합하였다. 이때, 미토콘드리아의 농도에 따른 전달율을 측정하기 위하여, FACS 분석을 수행하여 도 13 및 도 14에 나타내었다.

도 13 및 도 14를 통해, 대상세포 UC-MSCs에 WRL68 유래 미토콘드리아가 전달됨을 확인하였다.

5.2. 미토콘드리아 전달 확인 (2)

실시예 1의 방법으로 인간 간 세포주 WRL-68로부터 추출된 미토콘드리아와 미토콘드리아와 인간 탯줄 유래 중간엽줄기세포 UC-MSCs를 혼합하여, 약 4℃의 온도에서, 15분 동안 1,500×g의 속도로 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 PBS로 세척하고 약 4℃의 온도에서, 5분 동안 원심분리 하였다. 같은 조건으로 세척은 2회 수행하였다. 대상세포 1 x 10^5 개당 미토콘드리아 6.25, 12.5, 25 ㎍의 중량으로 전달된 공여세포의 미토콘드리아를 확인하기 위해, 대상세포 내의 DNA 추출하여 PCR로 확인하였다.

추출한 DNA에 공여세포인 간세포 WRL-68에 특이적인 미토콘드리아 유전자의 프라이머 세트(정방향 프라이머: 서열번호 1, 역방향 프라이머: 서열번호 2)를 각각 혼합한 후 원하는 DNA 부분을 증폭하였다. DNA 산물을 확인하기 위하여 1.5% 아가로오스 겔에서 전기영동 한 후, loading star(DYNE Bio, Seongnam, Korea)로 염색하여 UV-spectrometer(Chemi-Doc XRS, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여

증폭된 DNA band를 도 15에 나타내었다.

대상세포로 전달된 미토콘드리아를 공초점 주사 현미경으로 확인하기 위해, 공여세포의 미토콘드리아는 Mitotracker green으로 표지하고, 대상세포의 미토콘드리아는 Mitotracker red로 각각 표지하였다. 24시간 뒤 핵을 파란색으로 염색시켜 줄 수 있는 DAPI 가 포함된 고정액을 이용하여 세포를 슬라이드에 고정하고, 공초점 주사 현미경(Zeiss LSM 880 Confocal microscope)을 이용하여 세포 내 미토콘드리아를 관찰하였다. 이 결과는 도 16에 나타내었다.

도 16에 나타난 바와 같이, 공여세포의 미토콘드리아가 대상세포로 전달된 것을 육안으로 확인할 수 있다.

5.3. 최적의 미토콘드리아 전달 조건 확인: 원심분리

다양한 원심분리 속도(500×g, 1,000×g, 1,500×g, 및 2,000×g)와 다양한 원심분리 시간(5분, 10분 및 15분)에 따른 농도별(0.05 μg, 0.5 μg 및 5 μg) 미토콘드리아 전달을 평가하였다. 각 조건에 따라 대상세포 내로 전달되는 미토콘드리아는 FACS 분석을 통해 녹색 형광의 비율로 확인하였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.

도 17을 통해, 최적의 대상세포로의 미토콘드리아 전달 조건은 원심분리 속도 1,500×g 그리고 원심분리 시간 5분임을 알 수 있었다.

5.4. 최적의 미토콘드리아 전달 조건에 따른 미토콘드리아 전달 확인

공여세포인 UC-MSCs로부터 분리된 미토콘드리아를 대상세포인 L6 세포와 혼합하고, 상기 실시예 5.3에서 확인한 최적의 미토콘드리아 전달 조건을 이용하여 약 4℃의 온도에서 5분 동안 1,500×g의 속도로 원심 분리하였다. 상등액을

제거하고 PBS로 두 번 세척하고 약 4℃의 온도에서, 5분 동안 원심분리 하였다. 대상세포 1 x 10^5 개당 전달된 공여세포의 미토콘드리아를 확인하기 위해, 대상세포 내의 DNA 추출하여 PCR로 확인하였다.

NucleoSpin Tissue 키트(Marcherey-Nagel, Dueren, Germany)를 이용하여 대상세포로부터 gDNA(genomic DNA)를 분리하였고, 하기 조건으로 PCR을 수행하였다: 95℃에서 5분 동안 pre-변성, 95℃에서 30초 동안 25회의 변성(denaturation), 58℃에서 30초 동안 풀림(annealing) 및 72℃에서 30초 동안 확장(extension); 및 72℃에서 5분 동안 최종 확장. DNA 산물을 확인하기 위하여, EtBr이 염색된 1.5%(w/v) 아가로오스 겔에서 전기영동한 후 loading star(DYNE Bio, Seongnam, Korea)로 염색하여 UV-spectrometer(Chemi-Doc XRS, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

대상세포로 전달된 미토콘드리아를 공초점 주사 현미경으로 확인하였다. 이때, 공여세포의 미토콘드리아는 Mitotracker green으로, 대상세포의 미토콘드리아는 Mitotracker red로 미리 염색한 뒤, 미토콘드리아 전달 과정을 거쳐 대상세포를 기준으로 관찰하였다. 그 결과를 도 18a 및 도 18b에 나타내었다.

도 18a 및 도 18b에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아가 전달된 대상세포에서 녹색 형광과 붉은색 형광이 합병되어 노란색의 미토콘드리아 패턴이 나타났다. 이를 통해, 공여세포의 미토콘드리아가 대상세포로 전달된 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

실시예 6: 계면활성제 처리에 따른 미토콘드리아 전달율 측정

6.1. 계면활성제 처리 및 인큐베이션에 따른 WRL68 유래 미토콘드리아

전달율 측정

CHO 세포(Chinese Hamster Ovary cell)를 면적이 작은 튜브에 모아둔 후, Mitotracker Green 으로 염색된 간 세포주 WRL68 유래 미토콘드리아를 세포의 상층에 작은 부피로 부가해주었다. 해당 튜브에 계면활성제(PF-68, BASF사)를 조성물 내 각각 0, 10 및 30 mg/ml가 되도록 첨가하고, 이를 37℃의 온도에서 0, 1, 2 및 4시간 동안 인큐베이션 과정을 수행하여 총 12개의 실험군을 제작하였다. 이후, 실시예 5에 따른 방법으로 WRL68 유래 미토콘드리아를 CHO 세포로 전달하기 위한 원심분리 과정을 수행하였다. 이를 FACS 분석하여 각각 도 19 및 도 20에 나타내었다.

도 19 및 도 20에 나타난 바와 같이, 인큐베이션을 통한 외래 미토콘드리아 도입 시, 인큐베이션을 수행하지 않은 방법(도 12의 두 번째 히스토그램 9.1%, 도 14의 좌상 히스토그램 8.9%)과 대비하여 최대 99%까지 외래 미토콘드리아 전달율이 향상되었음을 확인하였다.

6.2. 계면활성제 처리 및 인큐베이션에 따른 UC-MSCs 유래의 미토콘드리아 전달율 측정

CHO 세포(Chinese Hamster Ovary cell)를 면적이 작은 튜브에 모아둔 후, Mitotracker Green으로 염색된 공여세포 UC-MSCs의 미토콘드리아를 세포의 상층에 작은 부피로 부가해주었다. 해당 튜브에 계면활성제(PF-68, BASF사)를 조성물 내 각각 0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 및 30 mg/ml가 되도록 첨가하고, 이를 37℃의 온도에서 0 시간, 1시간 및 2시간 동안 인큐베이션 과정을 수행하여 총 12개의 실험군을 제작하였다. 원심분리 과정 없이 상기 실험군의 미토콘드리아 전달율을

FACS 분석을 통해 측정한 결과를 도 21에 나타내었다.

반면, 실시예 5에 따른 방법으로 UC-MSCs의 미토콘드리아를 CHO 세포로 전달하기 위한 원심분리 과정을 수행한 실험군의 미토콘드리아 전달율을 FACS 분석을 통해 측정 결과를 도 22에 나타내었다.

도 21에 나타난 바와 같이, 각 조건의 실험군에서 10% 미만의 미토콘드리아 전달율을 보였다. 반면, 도 22는 20 mg/ml의 PF-68을 2시간 동안 처리한 조건에서 최대 90% 이상의 미토콘드리아 전달율을 보였다. 이는 원심분리를 통한 미토콘드리아 전달이 세포의 막을 통과하여 대상세포 내로 전달될 수 있음을 의미한다. 또한, 상기 결과를 통해, PF-68과 같은 계면활성제 처리가 세포막의 투과성(permeability)을 조절함으로써 외부에서 도입하는 미토콘드리아가 세포 내로 들어갈 수 있는 비율을 높여줄 수 있음을 알 수 있었다.