명세서

발명의 명칭: 줄기세포의 세포 활성과 연관된 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF 및 이들의 용도

기술분야

[1] 하나이상의 구체예는 줄기세포, 예를 들면, MSC의 세포 활성과 연관된 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF 및 이들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 연골은 밀도 높은 결합조직의 일 타입이다. 연골은 단단하나 유연한 (stiff yet flexible) 젤-유사 마트릭스에 분산된 연골세포 (chondrocyte)로 구성된다. 연골은 혈관을 포함하고 있지 않으며 영양분은 상기 마트릭스를 통하여 확산된다. 연골은 3가지의 주요 타입이 있다: 히알린 (hyaline) (예, 코, 기관, 세기관지의 연골 및 관절연골), 탄성 (elastic) (예, 외귀, 유스타키오관의 일부, 후두 연골의 일부), 및 섬유연골(fibrocartilage) (예, 반월판(meniscus), 추가판 연골). 연골의 주 목적 중 하나는 뼈 침적이 시작될 수 있도록 하는 것이다. 다른 하나는 뼈의 관절 운동을 위한 부드러운 표면을 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 강하지만 유연한 지지를 제공하기 위한 것이다.

[3] 연골 손상 또는 부전(failure)를 치료하기 위한 여러 가지 방안이 있다. 퇴행성 관절염(osteoarthritis)은 일반적으로 상대적으로 약하게 (relatively mild) 시작하여 시간 및 마모 (wear)에 따라 악화되는 퇴행성질환이다. 약물치료에는 항염증제(예, 디클로페낙, 이부프로펜, 및 나프록센), COX-2 선택적 저해제, 히드로코르티손, 글루코스아민, 및 콘드리이틴 술페이트와 같은 약물이 연골 결손으로 인한 통증을 약화시키는 알려져 있다.

[4] 트롬보스폰딘-2 (thrombospondin-2: TSP-2)는 강력한 항-혈관신생 활성 (anti-angiogenic activity)을 가진 분비된, 세포외 마트릭스 당단백질이다 (Bornstein et al., 2000, Matrix Biology 19: 557-568).

[5] 트롬보스폰딘-1 (thrombospondin-1: TSP-1)은 동일한 모노머로 구성된 멀티머 당단백질이다. 상기 모노머는 환원조건의 SDS-PAGE에서 약 185KDa의 분자량을 갖는다. 주 멀티머는 비환원 겔에서 약 450KDa의 분자량을 갖는 트리머이며, 침강 평형에 의하여 분자량은 모노머에 대하여 135KDa, 트리머에 대하여 420KDa이다. 모노머의 아미노산 잔기로부터 예측된 분자량은 127,524Da이며, 당화 및 β-히드록실화를 반영하지 않은 것이다. TSP-1은 세포 흡착, 증식 및 주화성에 관여하는 것으로 알려져 있다. TSP-1은 또한 악성 종양의 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[6] IL-17BR (interleukin-17B receptor)는 인간의 경우 IL17RB 유전자에 의하여 코딩되는 단백질이다. IL-17BR은 IL17B와 IL17E에 특이적으로 결합하고, IL17 및 IL17C에는 결합하지 않는 사이토카인 수용체이다.

[7] HB-EGF는 EGF 수용체(EGFR)의 erb 클라스에 결합함으로써 생물학적 활성을 발휘한다. HB-EGF는 헤파린과 높은 친화성으로 결합한다. HB-EGF는 EGFR에 결합하여 표적세포에서 세포이동 및 증식을 포함한 성장인자의 생물학적 효과를 조절하는 것으로 보인다. HB-EGF는 섬유아세포, 평활근 세포 및 상피세포에 대하여 세포분열촉진(mitogenic) 활성을 갖는다. HB-EGF는 열에 약한 양이온성 단백질이며, 분자량 약 22,000Da을 갖는다. HB-EGF는 내장 허혈과 연관된 증상, 예를 들면, 내장세포 괴사(intestinal cell necrosis) 및 소장결장염(enterocolitis)을 치료하는 것으로 알려져 있다. HB-EGF는 또한 포유동물에서 간 질환 및 간세포 사멸 (liver cell death)을 억제하고 간 재생을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[8] 이러한 선행기술에도 불구하고, TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF와 줄기세포의 연골세포로의 분화와의 연관성에 대하여는 여전히 밝혀지지 않은 바가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 일 구체예는, 줄기세포 활성과 연관된 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF 또는 그를 발현하는 줄기세포를 제공하는 것이다.

[10] 다른 구체예는, 줄기세포 세포 활성과 연관된 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF 또는 그를 발현하는 줄기세포를 이용하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[11] 일 구체예는, TSP-2 및 TSP-2를 발현하는 세포로 구성되는 군으로부터 선택된 하나이상을 포함하는, 세포의 연골세포로의 분화를 촉진하는 조성물을 제공한다.

[12] 트롬보스폰딘-2 (thrombospondin-2: TSP-2)는 강력한 항-혈관신생 활성 (anti-angiogenic activity)을 가진 분비된, 세포외 마트릭스 당단백질이다 (Bornstein et al., 2000, Matrix Biology 19: 557-568). TSP-2는 디술피드 연결된 호모트리머 당단백질이며, 인간에서는 THBS2 유전자에 의하여 코딩된다. TSP-2는 RefSeq NP_003238 (인간)(서열번호 1) 또는 NP_035711 (생쥐) (서열번호 2)에 개시된 아미노산 서열 또는 그로부터 유도되는 서열을 갖는 것일 수 있다.

[13] 상기 조성물은 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 약제학적으로 허용가능한 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 담체는 배지, 버퍼, 및 생체 적합성 중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 2차원적 또는 3차원적 구조 내에서 세포를 지지 및/또는 세포활성을 유지할 수 있는 통상적으로 알려진 중합체 중에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체의 예는, 히알루론산, 히드록시아파타이트, 키토산, 콜라겐 및 피브린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상이 포함된다.

[14] 상기 조성물은 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함을 치료 또는 예방하기 위한

것일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함은 관절염 또는 관절변형을 포함할 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함은 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형; 중 하나 이상으로부터 유래하는 것일 수 있다. 또한, 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직, 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다.

[15] 상기 조성물은 30 pg 내지 300mg의 TSP-2를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 10 ng 내지 300mg, 100ng 내지 300mg, 1㎍ 내지 300mg, 10㎍ 내지 300mg, 또는 10㎍ 내지 300mg의 TSP-2를 포함하는 것일 수 있다.

[16] 또한, 상기 조성물은 $1x10^4$ cells/ml 내지 $1x10^6$ cells/ml, $5x10^4$ cells/ml 내지 $1x10^6$ cells/ml, $2.5x10^5$ cells/ml 내지 $1x10^6$ cells/ml, 또는 $5x10^5$ cells/ml 내지 $1x10^6$ cells/ml의 TSP-2를 생산하는 세포를 포함할 수 있다.

[17] 상기 조성물은 인 비트로 또는 인 비보에서 상기 분화를 촉진하는 것일 수 있다. 인 비보 분화 촉진의 경우, 분화가 일어나는 개체는 포유동물일 수 있다.

[18]

[19] 상기 세포는 줄기세포일 수 있다. 상기 줄기세포는, 유도된 다능력 줄기세포 (induced pluripotent stem cell : iPS cells), 배아유래 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다.

[20]

[21] 상기 세포는, 상기 TSP-2를 생산하고 세포 외부로 분비하는 세포인 것일 수

있다. 즉, 상기 세포는 자신이 TSP-2를 분비하고, 자신이 상기 TSP-2와 상호작용하여 연골세포로 분화되는 것일 수 있다. 또한, 상기 세포는 다른 세포에 의하여 생산되어 분비되거나 외부에서 투여된 TSP-2에 접촉되는 세포일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포"란 상기 조직 자체 뿐만 아니라 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함의 정도에 따라 상기 노출되는 조직은 달라질 수 있다. 상기 조직은 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 조직은 관절염 또는 관절변형이 있는 조직일 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 조직 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다.

[22] 상기 "TSP-2를 생산하는 세포"는 천연적으로 TSP-2를 생산하거나, TSP-2를 생산하도록 유도된 세포일 수 있다. 상기 조성물은, 세포가 TSP-2를 생산하도록 유도하는 유도물질을 더 포함하는 것일 수 있다.

[23] 상기 "TSP-2를 생산하는 세포"는 줄기세포일 수 있다. 상기 줄기세포는, 유도된 다능력 줄기세포 (induced pluripotent stem cell : iPS cells), 배아유래 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다.

[24]

[25] 상기 "TSP-2를 생산하는 세포"와 상기 "분화되는 세포"는 동일하거나 다를 수 있다. 즉, TSP-2를 생산하는 세포는 파라크린 (paracrine) 또는 오토크린 (autocrine)에 의하여 작용하는 것일 수 있다. 상기 "분화되는 세포"는, 상기 TSP-2를 생산하고 세포 외부로 분비하는 세포인 것일 수 있다. 즉, 상기 세포는 자신이 TSP-2를 분비하고, 자신이 상기 TSP-2와 상호작용하여 연골세포로 분화되는 것일 수 있다. 또한, 상기 세포는 다른 세포에 의하여 생산되어 분비되거나 외부에서 투여된 TSP-2에 접촉되는 세포일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포"란 상기 조직 자체 뿐만 아니라 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함의 정도에 따라 상기 노출되는 조직은 달라질 수 있다. 상기 조직은 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 조직은 관절염 또는 관절변형이 있는 조직일 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 조직 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다.

[26]

[27] 상기 "TSP-2를 생산하는 세포"는 TSP-2를 설정된 값보다 높은 양으로 발현하는 세포일 수 있다. 상기 "설정된 값"은 표준세포(reference cell)가 발현하는 양일 수 있다. 상기 표준세포는 연골세포로 분화하는 능력이 알려진 것일 수 있다. 이러한 분화능력은 인 비트로 분화배지에서 배양하여 분화를 유도하는 것에 의하여 알려진 것일 수 있다. 또한, 상기 표준세포를 개체에 투여하여 인 비보에서 분화하는 능력이 확인된 것일 수 있다. 상기 표준세포는 BM-MSC, 섬유아세포 및 UCB-MSC로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 UCB-MSC는 C5, C6 및 C7으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[28] 상기 설정된 값은 유지 배지 또는 유도 배지에서 연골세포로 분화하는 활성이 낮은 줄기세포로부터 발현되는 값 이상인 것일 수 있다. 상기 연골세포로 분화하는 활성이 낮은 MSC는 C5, C6 또는 C7 UCB-MSC일 수 있다.

[29] 상기 설정된 값은, TSP-2를 생산하는 세포가 1일 동안 유지 배지에서 배양되는 경우 72 pg/10^5 cell/ml 이상인 것일 수 있다. 상기 설정된 값은, TSP-2를 생산하는 세포가 7일 동안 유도 배지에서 펠렛 배양되는 경우 550 pg/10^5cells/ml 이상인 것일 수 있다.

[30] 상기 설정된 값은 MEM-α, MSC 유지 배지 (예, 10% FBS, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 MEM-α 배지) 및 MSC의 연골세포로의 분화 배지 (예, 높은

글루코스 농도의 DMEM (4500mg/L 글루코스 함유), 50μg/ml 아스코베이트, 0.1μM 덱사메타손, 40μg/ml L-프롤린, 100μg/ml 피루베이트, 10ng/ml TGF-β3, 500ng/ml BMP-6, 50mg/ml ITS+, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 배지)로 이루어진 군으로부터 선택된 배지에서 발현된 TSP-2의 값일 수 있다.

[31] 상기 TSP-2는 세포 파쇄물 및/또는 배양 상층 (supernatant)에서 발현된 것일 수 있다. 상기 TSP-2는 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정된 농도인 것일 수 있다.

[32]

[33] 상기 조성물은 세포를 연골세포로 분화시키는 활성을 촉진하는 것일 수 있다. 상기 세포는, 상기 "TSP-2를 발현하는 세포"와 동일하거나 다를 수 있다.

[34] 상기 "세포"는, 상기 TSP-2를 생산하고 세포 외부로 분비하는 세포인 것일 수 있다. 즉, 상기 세포는 자신이 TSP-2를 분비하고, 자신이 상기 TSP-2와 상호작용하여 연골세포로 분화되는 것일 수 있다. 또한, 상기 세포는 다른 세포에 의하여 생산되어 분비되거나 외부에서 투여된 TSP-2에 접촉되는 세포일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포"란 상기 조직 자체 뿐만 아니라 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함의 정도에 따라 상기 노출되는 조직은 달라질 수 있다. 상기 조직은 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 조직은 관절염 또는 관절변형이 있는 조직일 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 조직 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 TSP-2를 발현하는 세포의 주변의 위치하는 세포일 수 있다.

[35]

[36] 다른 양상은, 세포를 연골세포로 분화시키기에 유효한 양의 TSP-2를 발현하는 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 세포를 연골세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[37] 상기 "세포를 연골세포로 분화시키기에 유효한 양"은 일정한 비율의 세포를 연골세포로 분화시키기에 충분한 양일 수 있다. 상기 양은 선택되는 세포 및 TSP-2를 발현하는 세포에 따라 당업자가 용이하게 선택할 수 있다. 예를 들면, 상기 양은 1일 내지 7일 내에 총 줄기세포의 50%이상, 60%이상, 70%이상,

80%이상, 또는 90%이상을 연골세포로 분화시키는 것일 수 있다. 상기 "TSP-2를 발현하는 세포"는 상기한 바와 같다. 상기 "분화되는 세포"에 대하여는 상기한 바와 같다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 생쥐 및 토끼로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[38]

[39] 다른 양상은, 줄기세포를 배지 중에서 배양하는 단계; 상기 배양물로부터 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 농도에 근거하여 배양된 세포가 연골세포로 분화하는 능력을 확인하는 단계;를 포함하는, 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력을 확인하는 방법을 제공한다.

[40] 상기 방법은 줄기세포를 배지 중에서 배양하는 단계를 포함한다. 줄기세포를 배지 중에서 배양하는 것은 알려져 있다. 당업자라면 선택되는 줄기세포에 따라 적절한 배지 및 조선을 선택할 수 있다.

[41] 상기 줄기세포는, 유도된 다능력 줄기세포 (induced pluripotent stem cell : iPS cells), 배아유래 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다.

[42] 예를 들면, 상기 줄기세포는 MSC일 수 있으며, 상기 배지는 MSC의 유지 또는 연골세포로 분화시키는 분화배지인 것일 수 있다. 상기 배지는 MEM-α, MSC 유지 배지 (예, 10% FBS, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 MEM-α 배지) 및 MSC의 연골세포로의 분화 배지 (예, 높은 글루코스 농도의 DMEM, 50μg/ml 아스코베이트, 0.1μM 덱사메타손, 40μg/ml L-프롤린, 100μg/ml 피루베이트, 10ng/ml TGF-β3, 500ng/ml BMP-6, 50mg/ml ITS+, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 배지)로 구성되는 군으로부터 선택되는 배지인 것일 수 있다. 그외 상기 배양은 MSC 배양에서 통상적으로 알려진 방법으로 배양되는 것일 수 있다.

[43]

[44] 상기 "줄기세포를 배지 중에서 배양하는 단계"는 다른 세포를 포함하지 않고 줄기세포만을 배양하는 것이거나, 줄기세포 외에 다른 세포를 포함하는 것일 수 있다. 상기 "다른 세포"는 TSP-2를 생산하고 세포 외부로 분비하는 세포인 것일 수 있다. 즉, 상기 세포는 자신이 TSP-2를 분비하고, 자신이 상기 TSP-2와 상호작용하여 연골세포로 분화되는 것일 수 있다. 또한, 상기 세포는 다른 세포에 의하여 생산되어 분비되거나 외부에서 투여된 TSP-2에 접촉되는 세포일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포"란 상기 조직 자체 뿐만 아니라 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함의 정도에 따라 상기 노출되는 조직은 달라질 수 있다. 상기 조직은 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 조직은 관절염 또는 관절변형이 있는 조직일 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 조직 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 TSP-2를 발현하는 세포의 주변의 위치하는 세포일 수 있다.

[45]

[46] 상기 방법은 상기 배양물로부터 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도를 측정하는 단계;를 포함한다. 상기 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도는 세포 파쇄물 또는 배양 상층액으로부터 측정되는 것일 수 있다. 상기 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도는 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정되는 것일 수 있다. mRNA 또는 단백질의 수준을 측정하는 방법은 알려져 있다. 예를 들면, 정량적 PCR 또는 ELISA가 사용될 수 있다.

[47] 트롬보스폰딘-1 (thrombospondin-1: TSP-1)은 동일한 모노머로 구성된 멀티머 당단백질이다. 상기 모노머는 환원조건의 SDS-PAGE에서 약 185KDa의 분자량을 갖는다. 주 멀티머는 비환원 겔에서 약 450KDa의 분자량을 갖는 트리머이더, 침강 평형에 의하여 분자량은 모노머에 대하여 135KDa, 트리머에 대하여 420KDa이다. 모노머의 아미노산 잔기로부터 예측된 분자량은 127,524Da이며, 당화 및 β-히드록실화를 반영하지 않은 것이다. TSP-1은 세포 흡착, 증식 및 주화성에 관여하는 것으로 알려져 있다. TSP-1은 또한 악성 종양의 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다. TSP-1는 RefSeq NP_003237 (인간)

(서열번호 3) 및 NP_035710 (생쥐) (서열번호 4)의 아미노산 서열 및 그로부터 유래된 것일 수 있다.

[48] IL-17BR (interleukin-17B receptor)는 인간의 경우 IL17RB 유전자에 의하여 코딩되는 단백질이다. IL-17BR은 IL17B와 IL17E에 특이적으로 결합하고, IL17 및 IL17C에는 결합하지 않는 사이토카인 수용체이다. IL-17BR은 RefSeq NP_758434 (인간) (서열번호 5) 및 NP_062529 (생쥐) (서열번호 6)의 아미노산 서열 및 그로부터 유래된 것일 수 있다.

[49] HB-EGF는 EGF 수용체(EGFR)의 erb 클라스에 결합함으로써 생물학적 활성을 발휘한다. HB-EGF는 헤파린과 높은 친화성으로 결합한다. HB-EGF는 EGFR에 결합하여 표적세포에서 세포이동 및 증식을 포함한 성장인자의 생물학적 효과를 조절하는 것으로 보인다. HB-EGF는 RefSeq NP_001936 (인간) (서열번호 7) 및 NP_034545 (생쥐) (서열번호 8)의 아미노산 서열 및 그로부터 유래된 것일 수 있다.

[50] 상기 방법은, 상기 측정된 농도에 근거하여 배양된 세포가 연골세포로 분화하는 능력을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[51] 상기 확인하는 단계는, 상기 측정된 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도를 연골세포로 분화하는 능력이 확인된 표준 세포 (reference cell)를 대조군으로 하여 얻어진 농도와 비교하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[52] 상기 확인하는 단계는, 상기 측정된 농도가 상기 표준세포로부터 얻어진 농도보다 높은 경우는, 상기 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정하고, 상기 측정된 농도가 상기 표준 세포로부터 얻어진 농도보다 작거나 같은 경우는, 상기 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력이 낮은 것으로 판정하는 것을 포함할 수 있다.

[53] 상기 확인하는 단계는 상기 줄기세포가 1일 동안 유지 배지에서, 단층 배양한 경우 TSP-2 발현량이 72 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높거나, 펠렛 배양한 경우 550 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높은 TSP-2를 발현하는 경우, 상기 줄기세포를 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 줄기세포의 유지배지는 MEM-α, 10% FBS, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 배지이고, 상기 줄기세포의 연골 세포 유도 배지는 높은 글루코스 농도의 DMEM, 50μg/ml 아스코베이트, 0.1μM 덱사메타손, 40μg/ml L-프롤린, 100μg/ml 피루베이트, 10ng/ml TGF-β3, 500ng/ml BMP-6, 50mg/ml ITS+, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 배지인 것일 수 있다.

[54]

[55] 상기 방법은, 상기 측정된 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 양을 연골세포로 분화하는 능력이 낮은 것으로 확인된 표준 세포 (reference cell)를 대조군으로 하여 얻어진 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 양과 비교하는

단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[56] 또한, 상기 방법은, 상기 표준 세포로부터 얻어진 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도보다 10% 이상, 20% 이상 또는 30% 이상 높은 경우는, 상기 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정하는 것일 수 있다. 상기 표준 세포는 BM-MSC, 섬유아세포 및 UCB-MSC로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 UCB-MSC는 C5, C6 또는 C7일 수 있다.

[57]

[58] 다른 양상은, 상기한 방법에 따라서 얻어진 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정된 세포를 연골세포로 분화시키는 단계;를 포함하는, 세포를 연골세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[59] 상기 분화는 인 비트로 또는 인 비보에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 방법은, 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정된 세포, 예를 들면, MSC를 연골세포 분화 배지 중에서 배양하여, 인 비트로에서 상기 세포, 예를 들면, MSC를 연골세포로 분화시키는 단계;를 포함할 수 있다. 상기 배양은 생체 적합성 중합체와 함께 배양되는 것일 수 있다.

[60] 상기 생체 적합성 중합체는 2차원적 또는 3차원적 구조 내에서 세포를 지지 및/또는 세포활성을 유지할 수 있는 통상적으로 알려진 중합체 중에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 히알루론산, 히드록시아파타이트, 키토산, 피브린, 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상의 중합체인 것일 수 있다.

[61] 상기 방법은, 상기 세포, 예를 들면, MSC를 연골세포 분화를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 개체는 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함을 가진 개체일 수 있다. 예를 들면, 상기 개체는 관절염 또는 관절변형을 가진 개체일 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 상기 개체는 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 조직 중 하나이상을 갖는 것일 수 있다. 상기 외상은 골절을 포함한다. 상기 투여는 정맥, 근육 내 또는 병변 부위에 국소적으로 투여되는 것일 수 있다. 상기 세포, 예를 들면, MSC는 담체와 함께 투여되는 것일 수 있다. 상기 담체는 배지, 버퍼, 또는 생체 적합성 중합체인 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 2차원적 또는 3차원적 구조 내에서 세포를 지지 및/또는 세포활성을 유지할 수 있는 통상적으로 알려진 중합체 중에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 히알루론산, 히드록시아파타이트, 키토산, 피브린, 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상의 중합체인 것일 수 있다.

상기 세포는, 줄기세포일 수 있다. 상기 줄기세포는 iPS 세포, 배아줄기세포 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다.

[62]

[63] 다른 양상은, 세포를 포함하는 시료를 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 TSP-1, TSP-2, IL-17BR 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 농도를 측정하는 단계;를 포함하는, 연골세포로 분화하는 능력을 가진 세포를 포함하는 시료를 확인하는 방법을 제공한다.

[64] 상기 배양하는 단계에 있어서, 상기 세포는 줄기세포일 수 있다. 상기 줄기세포는 예를 들면, UCB-MSC일 수 있다. 상기 "연골세포로 분화하는 능력을 가진 세포"는 줄기세포, 예를 들면, UCB-MSC일 수 있다. 또한, 상기 "연골세포로 분화하는 능력을 가진 세포"는 줄기세포, 예를 들면, UCB-MSC와, 그와 함께 배양된 다른 세포일 수 있다. 상기 다른 세포는 다른 타입의 줄기세포일 수 있다. 상기 "다른 세포"는 TSP-2를 생산하고 세포 외부로 분비하는 세포인 것일 수 있다. 즉, 상기 세포는 자신이 TSP-2를 분비하고, 자신인 상기 TSP-2와 상호작용하여 연골세포로 분화되는 것일 수 있다. 또한, 상기 세포는 다른 세포에 의하여 생산되어 분비되거나 외부에서 투여된 TSP-2에 접촉되는 세포일 수 있다. 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함이 있는 조직에 존재하는 세포"란 상기 조직 자체 뿐만 아니라 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함의 정도에 따라 상기 노출되는 조직은 달라질 수 있다. 상기 조직은 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 조직은 관절염 또는 관절변형이 있는 조직일 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다.

상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 조직 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 TSP-2를 발현하는 세포의 주변의 위치하는 세포일 수 있다. 상기 배지는 세포의 유지 또는 연골세포로의 유도 배지일 수 있다.

[65]

[66] 다른 양상은, 헤파린 결합 EGF 유사 성장 인자 (heparin binding EGF-like growth factor: HB-EGF) 및 HB-EGF를 발현하는 줄기세포를 포함하는, 연골세포의 사멸을 감소시키기 위한 조성물을 제공한다.

[67] 상기 HB-EGF는 EGF 수용체(EGFR)의 erb 클라스에 결합함으로써 생물학적 활성을 발휘할 수 있다. HB-EGF는 헤파린과 높은 친화성으로 결합할 수 있다. HB-EGF는 EGFR에 결합하여 표적세포에서 세포이동 및 증식을 포함한 성장인자의 생물학적 효과를 조절하는 것으로 보인다. HB-EGF는 RefSeq NP_001936 (인간) (서열번호 7) 및 NP_034545 (생쥐) (서열번호 8)의 아미노산 서열 및 그로부터 유래된 것일 수 있다.

[68] 상기 조성물은 HB-EGF를 발현하는 줄기세포를 포함할 수 있다. 상기 줄기세포는 UCB-MSC인 것일 수 있다. 상기 조성물은 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 상기한 바와 같다.

[69] 다른 양상은 다른 구체예는, 연골세포의 사멸을 감소시키기에 충분한 양의 HB-EGF 및 HB-EGF를 발현하는 줄기세포를 포함하는, 연골세포의 사멸을 감소시키기 위한 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 연골세포의 사멸을 감소시키는 방법을 제공한다.

[70] "연골세포의 사멸을 감소시키기에 충분한 양"은 연골세포의 사멸을 대조군에 비하여 감소시키기에 충분한 양을 말한다. 예를 들면, 연골세포의 사멸을 대조군에 비하여 50%이상, 60%이상, 70%이상, 80%이상, 또는 90%이상 감소시키기에 충분한 양을 말한다. 상기 조성물에 대하여는 상기한 바와 같다. 상기 개체는 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함을 포함하는 개체일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함은 관절염, 골다공증, 골절 또는 관절변형을 포함할 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함은 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형; 중 하나 이상으로부터 유래하는 것일 수 있다. 또한, 상기 접촉되는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실,

또는 결함에 의하여 노출되는 조직, 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수 중 하나이상으로부터 유래하는 세포인 것일 수 있다. 상기 투여는 정맥, 근육 내 또는 병변 부위에 국소적으로 투여되는 것일 수 있다. 상기 개체는 포유동물일수 있다. 상기 포유동물은 사람, 소, 돼지, 개 및 생쥐를 포함할 수 있다.

[71] 상기 조성물은 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 배지, 버퍼, 또는 생체 적합성 중합체인 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 2차원적 또는 3차원적 구조 내에서 세포를 지지 및/또는 세포활성을 유지할 수 있는 통상적으로 알려진 중합체 중에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 히알루론산, 히드록시아파타이트, 키토산, 피브린, 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상의 중합체인 것일 수 있다. 상기 방법은 인 비트로 또는 인 비보에서 이루어질 수 있다.

[72]

[73] 다른 양상은, 연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 상태를 갖는 환자의 관절액의 존재하에서 줄기세포를 배양하는 단계:를 포함하는, 줄기세포로부터 TSP-1, TSP-2, IL-17BR, 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 단백질의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[74] 상기 줄기세포는 BM-MSC 또는 UCB-MSC인 것일 수 있다. 상기 발현은 단백질 또는 mRNA 수준에서 측정된 것일 수 있다. 상기 줄기세포는 상기 관절액에 대하여 동종타가(allogeneic) 또는 자가 (autologous) 유래인 것일 수 있다.

[75] 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 상태"는 관절염 또는 관절변형을 포함할 수 있다. 상기 관절염은 류마티스 관절염 및 퇴행성 관절염일 수 있다. 상기 상태는, 예를 들면, 노화현상으로 인한 퇴행성관절염; 비만을 포함한 관절의 과부하로 인한 조기 퇴행성관절염; 스포츠나 낙상, 사고 등으로 인한 외상; 외상으로 인한 연골 손상을 방치하여 추가적으로 발생된 퇴행성 관절염; 및 인대의 손상, 관절주위의 근육약화, 관절이 어긋나는 탈구, 관절내 유리체 발생, 뼈의 성장 장애로 인한 관절변형 중 하나이상의 상태인 것일 수 있다. 상기 방법은 인 비트로 또는 인 비보에서 이루어질 수 있다. 상기 관절액은 상기 상태가 존재하는 조직 자체 뿐만 아니라, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결함의 정도에 따라 상기 노출되는 조직은 달라질 수 있다. 상기 조직은 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한, 상기 관절액은 상기 상태가 존재하는 개체 내의 임의의 위치의 관절액일 수 있다.

[76] 다른 양상은, 병변 조직의 존재하에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 병변 조직 세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[77] 상기 병변 조직은 관절염 환자의 관절액, 관절염 환자의 관절강 (joint cavity) 유래의 활액 (synovial fluid), 및 급성 호흡곤란 증후군 (acute respiratorydistress

syndrome: ARDS), 기관지천식, 폐암, 간질성폐질환 (interstitial ling disease), 또는 만성폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease : COPD) 환자의 기관지 폐포 세척액 (bronchoalveolarlavage fluid: BALF), 환자에게서 채취된 뇌척수액 (spinal fluid), 늑막액 (pleural fluid), 복수 (ascite fluid), 또는 위액 (gastric fluid)인 것일 수 있다. 상기 배양은 줄기세포의 배양과 관련된 당업계에 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다.

[78]

[79] 상기 방법은, 배양에 의하여 얻어진 병변 조직 세포로 분화된 줄기세포, 예를 들면 MSC를 병변 조직을 가진 개체에 투여하여, 병변 조직을 치료하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 병변 조직과 상기 줄기세포, 예를 들면 MSC는 서로 대하여 동종타가 또는 자가 유래인 것일 수 있다.

[80] 상기 방법에 있어서, 상기 줄기세포는 iPS 세포, 배아줄기세포 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다. 상기 방법은 인 비트로 또는 인 비보에서 이루어질 수 있다.

[81]

[82] 다른 양상은, 병변 조직의 존재하에서 줄기세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 발현되는 산물을 측정하는 단계;를 포함하는, 줄기세포의 활성을 조절하는 물질을 탐색하는 방법을 제공한다.

[83]

[84] 상기 방법은, 병변 조직의 존재하에서 줄기세포, 예를 들면, MSC를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 병변 조직은 관절염 환자의 관절액, 관절염 환자의 관절강 (joint cavity) 유래의 활액 (synovial fluid), 및 급성 호흡곤란 증후군 (acute respiratorydistress syndrome: ARDS), 기관지천식, 폐암, 간질성폐질환 (interstitial ling disease), 또는 만성폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease :

COPD) 환자의 기관지 폐포 세척액 (bronchoalveolarlavage fluid: BALF), 환자에게서 채취된 뇌척수액 (spinal fluid), 늑막액 (pleural fluid), 복수 (ascite fluid), 또는 위액 (gastric fluid)인 것일 수 있다. 상기 배양은 상기 줄기세포, 예를 들면 MSC의 유지 배지 (maintenance medium) 또는 병변 조직에 해당하는 조직으로 분화시키는 분화 배지의 존재하에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 병변 조직은, 세포 부유액 부피 또는 세포 농도 또는 세포 수 기준으로 5 내지 30%, 예를 들면, 10% 내지 20%의 양으로 배양물 중에 포함되는 것일 수 있다. 상기 배양은 줄기세포의 배양과 관련된 분야의 당업자에게 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다.

[85] 상기 방법에 있어서, 상기 줄기세포는 iPS 세포, 배아줄기세포 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다.

[86]

[87] 상기 방법은, 상기 배양물로부터 발현되는 산물을 측정하는 단계;를 포함한다. 상기 측정은 알려진 방법에 의하여 측정될 수 있다. 예를 들면, RNA인 경우 정량적 PCR, 단백질인 경우, ELISA에 의하여 측정될 수 있다. 상기 산물은 RNA 또는 단백질일 수 있다.

[88]

[89] 상기 방법은, 상기 측정된 산물로부터 줄기세포, 예를 들면 MSC의 활성을 조절하는 물질을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 줄기세포, 예를 들면 MSC의 활성은 분화 활성일 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은,상기 측정된 산물의 양을 대조군 실험으로부터 얻어진 산물의 양과 비교하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 대조군 실험은 음성 또는 양성 대조군 실험인 것일 수 있다. 상기 대조군 실험은 병변 조직을 제외하거나 병변 조직 대신에 정상 조직의 존재하에서 줄기세포, 예를 들면 MSC를 배양하는 단계에 의하여 얻어지는

배양물로부터 발현 산물을 측정하는 것일 수 있다.

[90] 상기 방법은, 상기 산물의 양이 대조군 비하여 높은 경우, 줄기세포, 예를 들면 MSC의 활성을 양성적으로 조절하는 것으로 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은, 상기 산물의 양이 대조군 비하여 낮은 경우, 줄기세포, 예를 들면 MSC의 활성을 음성적으로 조절하는 것으로 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 분화는 병변 조직에 해당하는 조직으로의 분화인 것일 수 있다. 예를 들면, 병변 조직이 관절액 (joint fluid)인 경우, 연골세포 (chondrocyte)로 분화되는 것일 수 있다.

[91] 다른 양상은 줄기세포를 펠렛 배양 방식으로 배양하는 단계;를 포함하는, 줄기세포로부터 TSP-2 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[92] 줄기세포를 펠렛 배양 방식으로 배양하는 단계는, 줄기세포를 3차원적으로 응집된 상태에서 배양하는 것일 수 있다. 펠렛 배양은 예를 들면, 세포를 포함하는 현탁액을 원심분리하여 침전된 세포 펠렛을 형성시키고, 이 펠렛을 그대로 배양하는 것일 수 있다. 이때 배양에 사용되는 초기 세포 농도는 $5x10^5$ cells/ml 내지 $5x10^7$ cells 일 수 있다. 상기 원심분리는 350g 내지 1500g에서 5분 내지 30분 동안 이루어지는 것일 수 있다. 상기 상기 줄기세포는, 유도된 다능력 줄기세포 (induced pluripotent stem cell : iPS cells), 배아유래 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 성체 줄기세포는 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간 유래의 것일 수 있다. 상기 간엽줄기세포는, 예를 들면, 골수유래 간엽줄기세포, 제대혈 유래 간엽줄기세포, 지방유래 줄기세포, 배낭(embryonic yolk sac) 유래 간엽줄기세포, 태반유래 간엽줄기세포, 피부유래 간엽줄기세포, 말초혈액유래 간엽줄기세포, 근육유래 간엽줄기세포, 간유래 간엽줄기세포, 신경조직유래 간엽줄기세포, 골막(periosteum)유래 간엽줄기세포, 제대(umbilical cord)유래 간엽줄기세포, 태아막(fetal membrane)유래 간엽줄기세포, 활액막(synovium)유래 간엽줄기세포, 양막(amniotic membrane)유래 간엽줄기세포, 반월상연골(meniscus)유래 간엽줄기세포, 전십자인대(anterior cruciate ligament)유래 간엽줄기세포, 관절연골세포(articular chondrocytes)유래 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포가 존재하는 기타 조직으로부터 분리 및/또는 배양된 간엽줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 간엽줄기세포일 수 있다.

발명의 효과

[93] 일 구체예에 따른, TSP-2를 포함하는 조성물은, 세포, 예를 들면, MSC가 연골세포로 분화되는 것을 촉진할 수 있다.

[94] 하나이상의 구체예에 따른, TSP-1, TSP-2 또는 IL-17BR을 이용하는, 세포, 예를

들면, MSC가 연골세포로 분화하는 능력을 확인하는 방법에 의하면, 효율적으로 MSC가 연골세포로 분화하는 능력을 확인할 수 있다.

[95] 하나이상의 구체예에 따른, TSP-1, TSP-2, 또는 IL-17BR를 이용하는, 세포, 예를 들면, MSC를 연골세포로 분화시키는 방법에 의하면, 효율적으로 세포, 예를 들면, MSC를 연골세포로 분화시킬 수 있다.

[96] 일 구체예에 따른, 세포, 예를 들면, MSC를 병변 조직 세포로 분화시키는 방법에 의하면, 효율적으로 세포, 예를 들면, MSC를 병변 조직 세포로 분화시킬 수 있다.

[97] 일 구체예에 따른, 세포, 예를 들면, MSC의 활성을 조절하는 물질을 탐색하는 방법에 의하면, 세포, 예를 들면, MSC의 활성을 조절하는 물질을 효율적으로 탐색할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[98] 도 1은 7개 UCB-MSC 세포 타입, C1, C2, C3, C4, C5, C6 및 C7을 각각 분화배지에서 4주 동안 분화시킨 결과를 나타내는 도면이다.

[99] 도 2는 연골분화 배지에서 배양된 UCB-MSC의 TSP-2 mRNA 발현량을 나타내는 도면이다.

[100] 도 3 및 4는 ELISA 분석을 통한 배양 상등액 중의 TSP-2의 양을 나타내는 도면이다.

[101] 도 5는 TSP-2 존재 또는 부존재 하에서 배양된 UCB-MSC의 펠렛 크기를 나타내는 도면이다.

[102] 도 6은 연골분화 배지에서 배양된 6개 UCB-MSC 타입의 배양 상등액 중에 발현된 TSP-2를 나타내는 도면이다.

[103] 도 7은 인 비트로에서 UCB-MSC와 BM-MSC의 연골분화를 나타내는 도면이다.

[104] 도 8은 UCB-MSC 및 BM-MSC의 연골생성 세포계 (chondrogenic lineage)로의 분화 능력을 나타내는 도면이다.

[105] 도 9는 6주에서 본 실시예에서 분석된 각각 10개의 BM-MSC 및 UCB-MSC 세포 타입의 연골분화를 나타내는 것이다.

[106] 도 10은 6주에서 UCB-MSC와 BM-MSC 사이의 연골생성 능력의 차이를 나타내는 도면이다

[107] 도 11은 성장인자 조합의 존재하에 단층 배양과 펠렛 배양한 경우 TSP-2의 발현을 나타내는 도면이다.

[108] 도 12는 UCB-MSC 세포 타입에 따른 TSP-2 발현 정도를 나타내는 도면이다.

[109] 도 13은 C3 및 C5 UCB-MSC를 3일 동안 펠렛 배양하여 TSP-2 발현량을 측정한 결과이다.

[110] 도 14는 분화 및 탈분화 조건에서 UCB-MSC에 의한 TSP-2 발현량을 나타낸다.

[111] 도 15. 16 및 17은 TSP-2의 존재하에서 배양된 UCB-MSC의 마커 단백질 발현량를 나타내는 도면이다.

[112] 도 18은 TSP-2 발현 억제 조건에서 연골생성 배지에서 배양된 UCB-MSC의 연골분화 정도를 나타낸다.

[113] 도 19는 정상인과 골관절염 환자의 혈장에서의 TSP-2 수준을 나타내는 도면이다.

[114] 도 20 및 21은 관절염 환자의 관절액 존재하에서 UCB-MSC의 TSP-1 발현량을 나타낸다.

[115] 도 22는 연골로 분화된 UCB-MSC를 용해시키고, IL-17BR mRNA의 양을 RT-PCR을 통하여 분석할 결과를 나타내는 도면이다.

[116] 도 23은 관절염 환자의 관절액의 존재하에서 배양된 UCB-MSC에서 HB-EGF mRNA를 측정한 결과를 나타내는 도면이다.

[117] 도 24는 연골세포 사멸 조건에서 배양된 UCB-MSC에서 HB-EGF 발현량을 나타낸다.

[118] 도 25는 HB-EGF 존재하에서 배양된 토끼 유래 연골세포를 관찰한 결과를 나타내는 도면이다.

[119] 도 26은 UCB-MSC와 BM-MSC의 펠렛 배양 결과를 나타내는 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[120] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[121]

[122] **실시예1. 관절염 환자의 관절액에 의해 UCB-MSC에서 특이적으로 유도되는 분비 단백질의 동정**

[123] UCB-MSC의 연골 재생 및 염증 조절 물질의 동정을 위하여, 관절염 환자의 관절액을 UCB-MSC가 배양되고 있는 배지에 20(v/v)% 농도가 되게 첨가한 후 3 시간 동안 추가 배양하였다. 얻어진 배양 상등액을 분석 시료로 사용하였다. 또한, 상기 관절액을 첨가하지 않은 상태에서 배양된 UCB-MSC 배양액과 배양되지 않은 배지에 상기 관절액을 20 (v/v)% 농도가 되게 첨가한 배지를 대조군으로 분석하였다. 상기 관절액은 퇴행성 관절염 환자로부터 얻었다.

[124] 각각 얻어진 배양액 또는 대조군 시료 중에 포함된 것으로 예상되는 단백질에 검출가능한 표지를 붙였다. 상기 표지는 비오틴이며, 상기 비오틴은 형광 표지된 스트렙타비딘과의 특이적인 결합으로 형성된 복합체를 형광 검출을 통하여 검출하였다. 다음으로, 각 시료를 507개 분비 단백질에 각각 결합하는 항체가 고정되어 있는 단백질 칩 (RayBiotech, Inc., RayBio™ Biotin Label-based Human Antibody Array I; Cat# AAH-BLG-1-2)에 첨가하여 생산자의 지침서에 따라 반응시켰다. 반응 후 레이저 스캐너 (Axon Genepix Scanner 4000B)를 사용하여 상기 단백직 칩에 532nm의 여기광을 조사하고 635nm에서 방사광을 검출하였다. 이렇게 얻어진 검출 신호를 대조군으로부터 얻어진 표준 검출 신호와 비교하여

시료 중의 각 단백질의 농도를 결정하였다.

[125] 분석 결과, 관절염 환자의 관절액의 존재하에서 UCB-MSC를 배양하는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여, TSP-1, TSP-2, IL-17BR, 및 HB-EGF가 현저하게 증가하였다.

[126]

[127] **실시예2. TSP-2와 UCB-MSC의 연골분화의 연관성**

[128] 본 실시예에서는 TSP-2가 UCB-MSC의 연골분화와 연관이 있는지를 조사하였다. 또한, TSP-2가 UCB-MSC의 연골분화를 유도하는지를 조사하였다.

[129]

[130] **(1) UCB-MSC 세포 타입의 연골분화능**

[131] 먼저, 여러 UCB-MSC 세포 타입의 연골분화능을 확인하였다. 각 세포 타입는 연골분화 배지 (chondrogenic culture medium) 중에서 펠렛 배양 방법으로 배양하였다. 상기 연골분화 배지는, 50μg/ml 아스코베이트, 0.1μM 덱사메타손, 40μg/ml L-프롤린, 100μg/ml 피루베이트, 10ng/ml TGF-β3, 500ng/ml BMP-6, 50mg/ml ITS+, 및 50μg/ml 겐타마이신 함유 높은 글루코스 농도의 DMEM이었으며, 초기 세포 농도는 $5x10^5$ cells/ml로 하고, 배양은 15ml 폴리프로필렌 튜브에서 4주 동안 배양하였다. 배지는 일주에서 두번 교환하였으며, 28일째에 펠렛을 파라핀 중에 내포된 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 5㎛ 절편을 만들었다. 상기 절편을 사프라닌-O로 염색하여 음이온성 프로테오글리칸을 검출하였다.

[132] 도 1은 7개 UCB-MSC 세포 타입, C1, C2, C3, C4, C5, C6 및 C7을 각각 분화배지에서 4주 동안 분화시킨 결과를 나타내는 도면이다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 연골분화능이 좋은 것으로 분류된 C1와 C2의 경우, 연골 표지인 라쿠나(lacunae)가 분명한 경계선을 가진 둥근 모양으로 절단면 전체적으로 잘 형성되었다. 연골분화능이 중간정도인 것으로 분류된 C3와 C4는 크기는 작지만 분명한 경계선을 가진 라쿠나가 전체면 또는 일부 절단면에서 형성되었다. 연골분화능이 낮은 것으로 분류된 C5, C6 및 C7는 라쿠나 구조가 거의 생성되지 않았다. 이는 UCB-MSC가 개인간의 유전적 및 제대혈 채취과정에서의 차이로 인하여 다른 분화능을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

[133] **(2) TSP-2의 연골분화능과의 연관성**

[134] 연골분화능이 다른 UCB-MSC 세포 타입을 연골분화 배지에서 1주일 동안 배양한 다음 세포로부터 전체 RNA를 주형으로 하고, TSP-2 특이적 프라이머를 사용한 RT-PCR (Real time-PCR)에 의하여 TSP-2 mRNA 양을 측정하였다.

[135] 도 2는 연골분화 배지에서 배양된 UCB-MSC의 TSP-2 mRNA 발현량을 나타내는 도면이다. 도 2에 나타낸 바와 같이, TSP-2는 연골분화능이 큰 C1 (또는 C2) UCB-MSC 세포 타입에서 가장 많이 발현되는 반면, 연골분화능이 약한 C5 (C6 또는 C7)에서는 발현이 약하였다.

[136] 또한, 연골분화능이 다른 UCB-MSC 세포 타입을 연골분화 배지에서 배양하고,

배양 상등액 중의 TSP-2의 농도를 시간에 따라 ELISA를 통하여 분석하였다.

[137] 도 3 및 4는 ELISA 분석을 통한 배양 상등액 중의 TSP-2의 양을 나타내는 도면이다. 도 3 및 4에 나타낸 바와 같이, 연골분화능이 큰 세포 타입인 C1 또는 C2에서 TSP-2가 높은 수준으로 발현되나(도 3), C5, C6 또는 C7에서는 매우 낮은 수준으로 발현되었다(도 4).

[138] **(3) TSP-2의 연골분화 유도활성**

[139] 분리 정제된 인간 TSP-2 단백질(R&D System, Minneapolis, MN, USA) 10 ng/ml를 포함하는 연골분화 배지에서 UCB-MSC를 마이크로매스 배양 방법으로 배양하고, 펠렛 크기를 측정하였다. UCB-MSC가 연골세포로 분화됨에 따라 세포외매질 (ECM) 합성이 증가하므로, 펠렛 크기는 연골분화정도를 나타내는 척도이다.

[140] 도 5는 TSP-2 존재 또는 부존재 하에서 배양된 UCB-MSC의 펠렛 크기를 나타내는 도면이다. 도 5에서, 대조군은 258526.070 ㎛²이었으며, TSP-2 (10ng)의 경우, 901919.431 ㎛²(대조군의 3.49배)이었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, TSP-2에 의하여 UCB-MSC의 펠렛 크기가 증가하였으며, 이는 TSP-2가 연골분화를 유도한다는 것을 나타낸다.

[141]

[142] **실시예3. 연골분화능에 따른 TSP-2 발현 수준**

[143] 본 실시예에서는 연골분화능에 따른 UCB-MSC의 TSP-2 발현 수준을 측정하였다. 먼저, UCB-MSC C3, C4 및 C5를 연골분화 배지에서 동일한 조건에서 7일 동안 배양하여 연골 분화를 유도하였다. UCB-MSC C3, C4 및 C5의 상대적인 연골분화능은 미리 실험을 통하여 확인하였으며, C3 > C4 > C5의 순서이었다. 다음으로, 배양 상등액 중의 TSP-2를 ELISA를 이용하여 측정하였다.

[144] 도 6은 연골분화 배지에서 배양된 3개 UCB-MSC 타입의 배양 상등액 중에 발현된 TSP-2를 나타내는 도면이다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 연골분화능이 가장 약한 것으로 분류된, C5 UCB-MSC는 연골분화 유도 전(naive)에는 72 pg/ml/1x10^5 cells, 연골분화유도 3일째 1.2 ng/ml/1x10^5 cells, 7일째 0.550 ng/ml/1x10^5 cells을 분비하였다. 연골분화를 위하여 사용하기에 적합한 UCB-MSC는 C5에 비하여 TSP-2을 많이 발현하는 세포로 정할 수 있다.

[145]

[146] **실시예 4: UCB-MSC와 BM-MSC의 연골생성 능력**

[147] 본 실시예에서는, 약 10개의 다른 인간 공여자로부터 유래된 UCB-MSC와 BM-MSC의 인 비트로 연골생성 능력 (chondrogenesis)을 측정하였다.

[148]

[149] **(1) UCB-MSC 및 BM-MSC의 준비**

[150] 제대혈 (umbilical cord blood : UCB) 표본은 통지된 모친 동의(informed maternal consent)를 얻어 분만된 방출물 (deliveries)의 제대 정맥으로부터 얻었다. 골수

흡인물(bone marrow aspirate)은 각 공여자의 동의하에 공여자의 엉덩뼈능선 (iliac crest)으로부터 얻었다. 부착성 및 방추-모양의 간엽줄기세포-유사 단핵세포 (adherent and spindle-shaped mesenchymal stem cell (MSC)-like mononuclear cells)는 동일한 과정을 거쳐 인간 BM 및 UCB로부터 분리하였다. 2개 기원으로부터 얻어진 상기 MSC-유사 단핵세포에 대하여 다음 특성을 확인하였다: (1) 줄기성 (stemness) (증식성), (2) 부착성, (3) 방추 모양, (4) 유세포 분석(flow cytometry)을 사용한 세포 표면 항원, 및 골 및 연골과 같은 중간엽 조직으로의 분화 능력.

[151] 상기 (1) 내지 (3)의 기준을 충족시키는 것으로 확인된, 2개 기원으로부터 얻어진 MSC-유사 세포로 확인된 세포의 표면 항원 표현형은, CD14, CD34, CD45 (조혈 마커: hemapoietic marker), 및 HLA-DR (클라스 II 마커)에 대하여 음성이었나; CD29, CD44, CD73, CD105, CD90 (중간엽 줄기세포 마커), 및 HLA-ABC (클라스 I 마커)에 대하여 양성이었다. 섬유아세포도 상기한 바와 동일한 세트의 표면 항원을 발현하고 부착성 방추 모양의 잘 증식하는 세포이기 때문에, 골 및 연골과 같은 중간엽 조직으로의 MSC의 적절한 분화 잠재력 (differentiation potential)를 확인하기 위하여, MSC-유사 단핵세포에 대하여 더 특성을 확인하였다.

[152]

[153] **(2) 각 타입의 MSC의 연골분화 능력 및 특성 확인**

[154] BM-MSC 또는 UCB-MSC를 6주 동안 연골분화 배지에 펠렛 배양법에 의하여 배양하여 연골생성을 유도하였다. 연골분화 배지는 500ng/ml BMP-6(R&D System, Minneapolis, MN, USA), 10ng/ml TGF-β3(Sigma), ITS+ Premix (6.25㎍/ml 인슐린, 6.25 ㎍/ml 트란스페린, 6.25 ng/ml 셀렌산(selenious acid), 1.25mg/ml BSA 및 5.35 mg/ml 리놀레산(linoleic acid), 1:100 dilution, Becton Dickinson), 100 nM 덱사메타손(Sigma), 50㎍/ml 아스코르베이트-2-포스페이트, 40㎍/ml L-프롤린(Sigma) 및 100 ㎍/ml 피루베이트(Sigma)로 보충된 고 글루코스 DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)을 사용하였다. 상기 연골분화 배지는 연골생성 분야의 당업자에게 통상적으로 사용되고 있는 것이다 (see "Pellet Culture" in Materials and Methods of PNAS, Vol.99, No. 7, pp.4397-4402(2002); "Chondrogenesis" in MATERIALS AND METHODS of Stem cells, 20(2002): 530-41). 상기 연골분화 배지에서, UCB-MSC 및 BM-MSC는 연골세포 (chondrocyte)로 용이하게 분화하는 것으로 알려져 있다.

[155] 배양은 4 내지 6 계대에 있는 MSC를 트립신으로 떼어낸 후, 상기 연골분화 배지에 현탁하여 $5x10^5$/ml가 되게 하였다. 다음으로, 이 현탁액을 15-ml 폴리프로피렌 튜브에 첨가하여 500g에서 5분 동안 원심분리하고, 얻어진 펠렛을 배양하였다. 배지는 일주에서 두번 교환하였으며, 시간에 따라 펠렛을 파라핀 중에 내포된 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 5㎛ 절편을 만들었다. 상기 절편을 사프라닌-O로 염색하여 음이온성 프로테오글리칸을 검출하였다. 또한,

상기 절편을 타입 II 콜라겐에 대하여 면역염색하였다. 연골분화는 펠렛 배양물 중에 구가 형성되는지 여부, Safranin-O 또는 Hematoxylin에 의한 카운터 염색에서 연골 특이적 프로테오글리칸에 존재하는지 여부, 및 타입 II 콜라겐에 대한 면역 염색에서 타입 II 콜라겐이 존재하는지 여부에 따라 결정하였다.

[156]

[157] 도 7은 인 비트로에서 UCB-MSC와 BM-MSC의 연골분화를 나타내는 도면이다. 도 7에 있어서, a,c 및 e; b,d 및 f는 UCB-MSC와 BM-MSC에 대한 1주, 3주, 및 6주에서 사프라닌-O 염색 결과를 나타낸다. g 및 h는 UCB-MSC와 BM-MSC에 대한 6주에서 타입 II 콜라겐 면역 염색 결과를 나타낸다.

[158]

[159] 6주에서 Safranin-O 특이적 오렌지-레드 염색은 BM-MSC에 비하여, UCB-MSC에서 더 명확하였다 (e 및 f 참조). 또한, 6주에서 콜라겐 II 면역 염색 (화살표로 표시된 부분)은 BM-MSC에 비하여, UCB-MSC에서 더 명확하였다 (g 및 h 참조).

[160] 1주에서 Safranin-O 특이적 오렌지-레드 염색은 양 세포에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, 3주에서 BM-MSC는 연골형태를 전혀 보이지 않는 반면, UCB-MSC는 연골세포의 형태를 보이기 시작하였다. UCB-MSC에 대하여, 3주에서 펠렛(pellet) 외부는 연골막-유사 세포 (perichondrium-like cells)가 관찰되고, 내부는 safranin-O에 약하게 염색되기 시작하여 세포외 마트릭스 (extra-cellular matrix)가 분비되고 있다는 것을 나타낸다. 6주에서, BM-MSC는 마치 3주째 UCB-MSC의 연골형성 수준 정도를 보이는 반면, UCB-MSC는 전형적인 연골 조직의 모습을 보였다.

[161] 기능을 하는 정상적인 연골세포의 형성 유무를 확인하기 위해, 콜라겐 II 면역 염색을 실시하였을 때, 화살표가 가리키는 대로 갈색을 띄는 양성소견을 관찰할 수 있었다. 이는 UCB-MSC가 BM-MSC와 비교하여 우수한 양성을 보였기에 연골형성의 능력이 뛰어나다고 할 수 있다.

[162] 결론적으로, 도 6에 나타낸 바와 같이, UCB-MSC는 BM-MSC 보다 연골생성능력이 현저하게 우수하다.

[163] 도 8은 UCB-MSC 및 BM-MSC의 연골생성 세포계 (chondrogenic lineage)로의 분화 능력을 나타내는 도면이다. UCB-MSC 및 BM-MSC의 연골생성 세포계로의 분화 능력을 결정하기 위한 실험은, 4 내지 6 계대에 있는 MSC를 트립신 처리하여 떼어낸 후, 상기 연골분화 배지에서 현탁하여 5x 10^5 cells/ml가 되게 하였다. 다음으로, 이 현탁액을 15 ml 폴리프로필렌 튜브에 첨가하여 500g에서 5분 동안 원심분리하고, 얻어진 펠렛을 배양하였다. 배지는 일주에 두번 교환하면서 배양하였다.

[164] 도 8에 나타낸 바와 같이, 총 10개의 UCB-MSC 시료 중 7개 (즉, 70%)가 분화능을 보인 반면, 총 10개의 BM-MSC 시료 중 5개 (즉, 50%)가 분화능을 보였다. 6주에서 펠렛 영역의 크기는, BM-MSC의 펠렛 영역 (n=5,

346531.3±87396.6 ㎛²)에 비하여 UCB-MSC의 펠렛 영역 (n=7, 1450123.7±24256.9 ㎛²)(p<0.02)이 훨씬 컸다. 펠렛 및 Safranin-O 양성 영역은 i-solution software (IM Technology, Doosan, Daejeon)로 측정하였다.

[165]

[166] 도 9는 6주에서 본 실시예에서 분석된 각각 10개의 BM-MSC 및 UCB-MSC 세포 타입의 연골분화를 나타내는 것이다. 도 9에 나타낸 바와 같이, Safranin-O에 의한 연골 프로테오글리칸 특이적 오렌지-레드 염색은 UCB-MSC의 경우 7개 세포 타입 (A의 상단에서 7개 및 하단에서 2개)에서 명확하였으나, BM-MSC의 경우 5개 세포 타입 (B의 상단 5개)에서 명확하였다. 즉, UCB-MSC는 총 세포 타입 중 70%가 연골생성 세포계로 분화하였으나, BM-MSC는 50%만이 연골생성 세포계로 분화하였다.

[167]

[168] 도 10은 6주에서 UCB-MSC와 BM-MSC 사이의 연골생성 능력의 차이를 나타내는 도면이다. 도 10은 동일한 수의 MSC를 사용하여 동일한 연골생성 조건 (chondrogenic conditions) 하에서 6주 동안 배양된 후, UCB-MSC로부터 생성된 연골 펠렛과 BM-MSC로부터 생성된 연골 펠렛의 차이를 더 명확하게 보여준다. 도 9에 나타낸 바와 같이, BM-MSC에 비하여, UCB-MSC 유래의 연골 펠렛이 명확하게 더 크다. 또한, BM-MSC에 비하여, 라쿠나 (lacuna)를 둘러싸는 연골세포-유사 세포를 가진 UCB-MSC 유래의 연골 펠렛에서 연골특이적 프로테오글리칸 마트릭스는 더 풍부하고 명확하였다. 이는 동일한 인 비보 연골생성 조건에서, BM-MSC에 비하여 UCB-MSC가 현저하게 우수한 연골분화능을 갖는다는 것을 나타낸다.

[169]

[170] 상기한 바와 같이, BM-MSC에 비하여 UCB-MSC는 통계적으로 유의하게 높은 연골분화능을 갖는다. 이는 동일하게 MSC라고 명명되었더라도, 서로 현저하게 다른 분화적 세포 특성 (differential cellular feature)을 가질 수 있다는 것을 나타낸다. 즉, 동일한 MSC라도 서로 다른 세포 타입으로 분류될 수 있다는 것을 나타낸다. 본 실시예는 (1) 분화가 말단 분화된 섬유아세포 (fibroblast)와는 다른 MSC의 정체성 (identity)뿐만 아니라 (2) 특히, 각 타입의 MSC가 분리된 원천 조직 (source tissue)의 기원 (origin)과 나이에 의존하는, 세포 타입의 차이를 검사하기 위하여 사용된다는 것을 보였다.

[171]

[172] 상기 연골생성 배지는 UCB-MSC 및 BM-MSC에 대하여 동일한 것을 사용하였다. 또한, 상기 배지에 포함된 성장 인자 조합은 BM-MSC의 연골생성을 위하여 도입된 것으로 당업계에 잘 알려져 있는 것이다 (Biochemical and Biophysical Research Communications 320 (2004): 914-919의 요약서, Materials and Methods의 "Cell culture" and "Pellet culture" 참조). 따라서, 본 실시예에 사용된 특정한 배지 조건은 UCB-MSC의 연골생성 능력에 유리하게 영향을 미치는 것이

아니다.

[173] 결론적으로, UCB-MSC는 BM-MSC에 비하여 현저하게 우수한 인 비트로 연골생성 활성을 가지고 있다.

[174]

[175] **실시예 5: UCB-MSC에서 TSP2 발현 유도인자의 확인**

[176] 본 실시예에서는 배양 조건을 달리하여 UCB-MSC에서 TSP2 발현 유도인자를 확인하였다.

[177] 먼저, 단층 배양 중이던 세포를 트립신을 처리하여 떼어내고, UCB-MSC를 무혈청 DMEM 중에서 $5x10^5$ cells/ml의 농도로 현탁시키고 24 시간 동안 배양하였다. 사용된 배지는 DMEM (100nM 덱사메타손, 50μg/ml 아스코르베이트-2-포스페이트, 40μg/ml L-프롤린 및 100μg/ml 피루베이트 함유) 및 DMEM에 10ng/ml TGF-β3 (Sigma), 500ng/ml BMP-6 (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 및 ITS+ (6.25μg/ml 인슐린, 6.25μg/ml 트란스페린, 6.25μg/ml 셀렌산, 1.25mg/ml BSA 및 5.35mg/ml 리놀레산, 1:100 dilution, Becton Dickinson)로부터 선택되는 성장인자를 첨가한 것을 사용하였다. 배양은 단층 배양 또는 펠렛 배양을 하였으며, 펠렛 배양의 경우 상기 현탁액을 500g에서 5분 동안 원심분리하고 세포를 펠렛화하여 배양하였다.

[178] 배양 상등액을 회수한 후, 세포 파쇄물을 얻고 이 세포 파쇄물로부터 추출된 총 RNA를 주형으로 하여 RT (실시간)-PCR을 수행하여 TSP2의 mRNA 수준을 측정하였다.

[179] 도 11은 성장인자 조합의 존재하에 단층 배양과 펠렛 배양한 경우 TSP-2의 발현을 나타내는 도면이다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 펠렛 배양에서 TSP-2 발현이 현저하게 증가하였다. 또한, 도 11에 의하면, 성장인자는 TSP2 발현에 영향을 미치지 않았다.

[180] **실시예 6: 연골생성에 적합한 세포 타입의 선택**

[181] 본 실시예에서는 UCB-MSC를 연골생성을 유도하지 않는 배지에서 배양한 후, TSP-2 발현량이 UCB-MSC의 연골분화능과 연관성이 있는지 확인하였다. 구체적으로, C3 및 C5 UCB-MSC 세포 타입을 무혈청 DMEM (100nM 덱사메타손, 50μg/ml 아스코르베이트-2-포스페이트, 40μg/ml L-프롤린 및 100μg/ml 피루베이트 함유) 배지에서 $5x10^5$ cells/ml의 농도로 단층배양 및 펠렛 배양하였다. 배양 조건은 실시예 5에 나타낸 바와 동일하였다. 상등액 중의 TSP-2 발현량은 ELISA를 통하여 측정하였다. 또한, BM-MSC도 동일한 조건에서 배양하였다.

[182]

[183] 도 12는 UCB-MSC 세포 타입에 따른 TSP-2 발현 정도를 나타내는 도면이다. 도 12에서, C3 및 C5는 UCB-MSC 세포 타입이며, naive 및 pellet는 각각 단층 배양 및 펠렛 배양으로 24시간 동안 배양한 것이다. 배양 과정 및 배양 후의 광학현미경 관찰 결과는 도 1의 C3 및 C5와 동일하다. 도 12에 나타낸 바와 같이, C5에

대하여, naive 배양한 경우, TSP-2 발현량은 33 내지 72 pg/ml/1.0x10^5 cells이었으며, pellet 배양한 경우, 163 내지 550 pg/ml/1.0x10^5 cells이었다. C3 및 C5 UCB-MSC 세포의 연골생성능력은 C3가 C5에 비하여 우수한 것으로 미리 확인되었다. 따라서, 미지의 세포가 연골생성 능력이 우수한 것인지 여부는 기준 세포,예를 들면, C5 UCB-MSC 세포의 TSP-2 발현량과 비교함으로써 결정될 수 있다. 예를 들면, 표적 세포가 1일 동안 naive 배양한 경우, TSP-2 발현량이 33 내지 72 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높거나, pellet 배양한 경우 163 내지 550 pg/ml/1.0x10^5 cells 높으면, 연골생성 능력이 C5 보다 우수한 것으로 결정할 수 있다. 이러한 방법으로 연골생성에 적합한 세포를 선발할 수 있다.

[184] 연골생성에 적합한 세포를 선발하는 기준에 따라, 표준 세포는 당업자에 의하여 적절하게 선택될 수 있다.

[185] 도 12에 나타낸 바와 같이, 줄기세포를 펠렛 배양함으로써 TSP-2의 발현이 현저하게 증가하였다.

[186]

[187] 도 13은 C3 및 C5 UCB-MSC를 3일 동안 펠렛 배양하여 TSP-2 발현량을 측정한 결과이다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 연골분화능이 좋은 C3에 비하여 연골분화능이 좋지 않은 C5에서는 배양 시간이 경과하여도 TSP-2의 발현량이 C3에 비하여 크지 않았다.

[188] 따라서, TSP-2 발현량은 UCB-MSC의 연골분화능과 연관성을 가지고 있으며, TSP-2 발현량을 측정함으로써 MSC의 연골분화능을 예측할 수 있다.

[189] 도 26은 UCB-MSC와 BM-MSC의 펠렛 배양 후 TSP-2 발현 수준을 측정한 결과를 나타내는 도면이다. 도 26에 나타낸 바와 같이, BM-MSC에 비하여 UCB-MSC가 TSP-2를 현저하게 높은 비율로 발현하였다. 이는 실제 UCB-MSC와 BM-MSC와의 연골분화도가 UCB-MSC가 우수한 것과 연관성이 있음을 제시한다.

[190] 도 26의 결과는 단층 배양 중이던 세포를 트립신을 처리하여 떼어내고, UCB-MSC 및 BM-MSC를 무혈청 DMEM 중에서 5x10^5 cells/ml의 농도로 현탁시키고 24 시간 동안 배양하였다. 사용된 배지는 DMEM(100nM 덱사메타손, 50μg/ml 아스코르베이트-2-포스페이트, 40μg/ml L-프롤린 및 100μg/ml 피루베이트 함유)을 사용하였다. 배양은 펠렛 배양을 하였으며, 500g에서 5분 동안 원심분리하고 세포를 펠렛화하여 24시간 배양하였다. 배양 상등액을 회수한 후 TSP-2 ELISA를 실시하였다.

[191]

[192] **실시예 7: 연골분화 및 연골탈분화 조건에서 UCB-MSC에 의한 TSP-2 발현**

[193] 본 실시예에서는 연골분화 및 연골탈분화 조건에서 UCB-MSC에 의한 TSP-2 발현량을 측정하여, TSP-2 발현량과 연골분화의 연관성을 확인하였다.

[194]

[195] **(1) 연골분화 조건에서 연골 전구세포에 의한 TSP-2 발현**

[196] 태아 생쥐의 지아 (limb bud)로부터 연골세포의 전구세포를 분리하였다. 분리된 전구 세포를 4x10^7 cells/ml를 배지 (DMEM/F-12 (2:3), 10%(v/v) FBS, 50㎍/ml 스트렙토마이신, 50 유니트/ml 페니실린 함유)에 재부유 (resuspension)시켜 15㎕ 방울씩 배양접시에 떨어뜨려 독립적인 점(spot) 형태로 부착한 후 6일 동안 배양하여 점(spot) 별로 각각 연골분화를 유도하였다. TSP-2의 발현량을 세포로부터 분리된 총 RNA를 주형으로 한 RT-PCR을 통하여 측정하였다.

[197] 도 14는 분화 및 탈분화 조건에서 연골 전구세포 또는 연골세포에 의한 TSP-2 발현량을 나타낸다. 도 14의 A에 나타낸 바와 같이, 분화 조건에서 TSP-2 발현량은 배양 시간이 경과함에 따라 증가하였다.

[198] **(2) 연골탈분화 조건에서 연골세포에 의한 TSP-2 발현**

[199] 2주령 토끼의 무릎 관절로부터 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포를 5ng/ml IL-1β의 존재하에서 배지 (DMEM, 10%(v/v) FBS, 50㎍/ml 겐타마이신 함유) 중에 배양하여 탈분화를 유도하였다. IL-1β는 염증성 사이토카인으로서 연골세포를 탈분화시켜 연골세포의 성질을 잃어버리도록 하는 성질을 가지고 있다. TSP-2의 발현량을 세포로부터 분리된 총 RNA를 주형으로 한 RT-PCR을 통하여 측정하였다.

[200] 도 14의 B에 나타낸 바와 같이, 탈분화 조건에서 TSP-2 발현량은 배양 시간이 경과함에 따라 감소하였다.

[201]

[202] 이상의 결과로부터, TSP-2의 발현은 연골세포의 분화 및 탈분화와 연관된다는 것을 알 수 있다.

[203] **실시예 8: TSP-2에 의한 UCB-MSC의 연골분화 유도**

[204] 본 실시예에서는 TSP-2의 존재하에서 UCB-MSC를 배양하여 연골분화를 유도하였다. 배지는 상기한 연골생성 배지를 사용하였다. 재조합 TSP-2 (R&D System, Minneapolis, MN, USA)는 10ng/ml 내지 500ng/ml의 양으로 배지에 중에 첨가하고 펠렛 배양하였다. 초기 농도는 5x10^5 cells/ml이었다. 배양한 후 세포로부터 분리된 총 RNA를 주형으로 하고, 연골세포 마커인 콜라겐 타입 II (Col IIA1), 아그레칸 (Acan), Sox-9 및 TSP-2; 및 비대 연골세포 (hypertrophic chondrocyte)와 뼈의 마커인 Col 1A1 및 Col XA1에 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하여, 이들 마커의 mRNA 발현량을 측정하였다.

[205] 도 15,16 및 17은 TSP-2의 존재하에서 배양된 UCB-MSC의 마커 단백질 발현량를 나타내는 도면이다. 도 15,16 및 17에 나타낸 바와 같이, 연골세포 마커인 콜라겐 타입 II (Col IIA1), 아그레칸 (Acan) 및 Sox-9의 발현은 1주에서 농도 의존적으로 증가하였다. 반면, 비대 연골세포 (hypertrophic chondrocyte)와 뼈의 마커인 Col 1A1 및 Col XA1는 시간이 경과함에 따라 감소하거나 발현되지 않았다.

[206] 따라서, 외래에서 첨가된 TSP-2는 UCB-MSC에 대하여 연골세포로의 분화를 촉진한다는 것을 알 수 있다.

[207]

[208] **실시예 9: TSP-2 발현 억제 조건에서 UCB-MSC의 연골분화 유도**

[209] 본 실시예에서는 TSP-2 발현 억제 조건에서 UCB-MSC를 연골생성 배지에서 배양하여 연골세포 분화를 유도하였다.

[210] TSP-2의 mRNA에 대하여 상보적인 서열을 갖는 siRNA (Bioneer, Daejeon, Korea, 센스 서열: 서열번호 9, 안티센스 서열: 서열번호 10)를 배지 중에 33nM의 농도로 첨가하여 TSP-2 발현을 억제하였다. 배지는 상기한 연골생성 배지를 사용하였고 펠렛 배양하였다. 초기 농도는 $5x10^5$ cells/ml이었으며, 7일 동안 배양하였다. TSP-2의 발현량은 UCB-MSC로부터 추출된 총 RNA를 주형으로 하고, TSP-2에 특이적인 프라이머를 프라이머로 사용한 RT-PCR에 의하여 측정하거나, 배양 상등액에 대한 ELISA를 통하여 측정하였다. 연골세포 마커인 Col IIA1과 아그레칸은 RT(실시간)-PCR을 통하여 측정하였다.

[211]

[212] 도 18은 TSP-2 발현 억제 조건에서 연골생성 배지에서 배양된 UCB-MSC의 연골분화 정도를 나타낸다. 도 18에 나타낸 바와 같이, TSP-2 발현 억제 조건, 즉 TSP-2 siRNA의 존재하에서 UCB-MSC는 연골세포 마커인 Col IIA1 및 아크레칸의 발현이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였다. 이는 TSP-2가 UCB-MSC의 연골분화를 유도하거나 촉진한다는 것을 나타낸다. 도 18에서, A 및 B는 TSP-2의 농도를 각각 RT-PCR 및 ELISA를 통하여 측정한 것이며, C 및 D는 Col IIA1 및 아크레칸을 RT-PCT을 통하여 측정한 것이다.

[213]

[214] **실시예 10: 골관절염 환자의 혈장에서의 TSP-2 수준**

[215] 본 실시예에서는 정상인 (15명)과 골관절염 환자 (28명)의 혈액을 채취한 후, 혈장 중의 TSP-2의 수준을 ELISA를 이용하여 측정하였다.

[216] 도 19는 정상인과 관절염 환자의 혈장에서의 TSP-2 수준을 나타내는 도면이다. 도 19에 나타낸 바와 같이, 정상인의 혈장에 비하여, 관절염 환자에서 TSP-2 수준이 높았다. 이는 혈액 중의 TSP-2 수준이 관절염을 진단할 수 있는 마커로서 작용할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, 관절염 뿐만 아니라, 연골분화와 연관된 질환의 진단을 위한 마커로서 작용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[217] **실시예 11: 관절염 환자의 관절액에 의한 UCB-MSC에서 TSP-1 발현**

[218] 본 실시예에서는 관절염 환자의 관절액이 UCB-MSC에서 TSP-1 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[219] 관절염 환자의 관절액의 존재하에서 UCB-MSC를 배양하였다. UCB-MSC는 MEM-α, 10%(v/v) FBS 및 50㎍/ml 겐타마이신 함유 배지에서 5-6 일 동안 배양하였다. 관절액(joint cavity)을 첨가할 시 UCB-MSC는 배양 용기 면적의 70-80% 수준으로 배양중이었다. 관절염 환자의 관절액은 UCB-MSC가 배양되고 있는 배지를 MEM-α 및 50㎍/ml 겐타마이신 함유 배지로 교환한 후에 20(v/v)% 농도로 첨가한 후 3 시간 동안 추가 배양하였다. 그 후 얻어진 배양액을 분석

시료로 사용하였다. 또한, 상기 관절액을 첨가하지 않은 상태에서 배양된 UCB-MSC 배양액과 배양되지 않은 배지에 상기 관절액을 20 (v/v)% 농도가 되게 첨가한 배지를 대조군으로 분석하였다. 상기 관절액은 퇴행성 관절염 환자로부터 얻었다.

[220] 도 20 및 21은 관절염 환자의 관절액 존재하에서 UCB-MSC의 TSP-1 발현량을 나타낸다. 도 20에서 MSC only는 UCB-MSC를 관절액 없이 배양한 것이며, JF#1, JF#2 및 JF#3은 각각 다른 환자의 관절액이이며 triplicate로 실험한 결과이다. 도 21에서 TSP-1 발현량은 UCB-MSC로부터 추출된 총 RNA를 주형으로 하고, TSP-1에 특이적인 프라이머를 프라이머로 한 RT-PCR에 의하여 측정하였다.

[221] 도 21에서 JF은 환자의 관절액을 나타낸다. 도 21에서 TSP-1 발현량은 UCB-MSC의 배양 상등액에 대하여 ELISA를 통하여 측정하였다. 도 21에 나타낸 바와 같이, 관절염 환자의 관절액 존재하에서 배양되는 UCB-MSC는, 관절염 환자의 관절액 존재하지 않은 배지에서 배양된 UCB-MSC 또는 20% 관절염 환자의 관절액만 첨가된 배지에서 배양된 배양물 중의 TSP-1 발현량에 비하여, 상승적으로 증가된 TSP-1를 발현하였다.

[222]

[223] **실시예 12: IL-17BR의 연골분화능과의 연관성**

[224] 연골분화능의 차이를 보이는 UCB-MSC 세포 타입을 연골분화 배지에서 1주일 동안 펠렛 배양하여 연골분화를 유도하다. 세포를 용해시켜 얻은 전체 RNA를 주형으로 하여 RT-PCR (Real time-PCR)을 수행하여, IL-17BR mRNA 양을 측정하였다.

[225] 도 22는 연골로 분화된 UCB-MSC를 용해시키고, IL-17BR mRNA의 양을 RT-PCR을 통하여 분석할 결과를 나타내는 도면이다.

[226] 도 22에 나타낸 바와 같이, 세포의 연골분화능에 따라 IL-17BR mRNA 발현 수준이 변하였다. 즉, C2와 C3 세포는 IL-17BR mRNA를 발현하였으며, 그 정도는 분화능이 높은 C2가 C3에 비해 8.9배 높았다. 반면, 연골분화능이 약한 C5은 IL-17BR mRNA를 발현하지 않았다.

[227]

[228] **실시예 13. 관절염 환자의 관절액이 세포의 HB-EGF 발현에 미치는 영향**

[229] 실시예1에 기재된 방법과 유사한 방법으로 관절염 환자의 관절액을 10 (v/v)% 농도가 되게 첨가된 배지에서 UCB-MSC를 6 시간 동안 배양한 후, 세포로부터 전체 RNA를 얻은 후 RT-PCR에 의하여 HB-EGF mRNA 양을 측정하였다. 대조군으로서, 관절액을 첨가하지 않은 배지를 사용한 것을 제외하고는 동일한 조건에서 것을 UCB-MSC를 배양하였다.

[230] 도 23은 관절염 환자의 관절액의 존재하에서 배양된 UCB-MSC에서 HB-EGF mRNA를 측정한 결과를 나타내는 도면이다. 도 23에서, C3 및 C5는 UCB-MSC이며, BM-MSC는 골수 유래 중간엽줄기세포이고, BEAS-2B는 폐 유래 기관지 상피세포이고, JF는 관절액 (joint fluid)이다. 도 23에 나타낸 바와 같이,

UCB-MSC에서 HB-EGF 발현은 관절염 환자의 관절액에 의하여 현저하게 증가한 반면, BM-MSC 및 BEAS-2B에서는 크게 증가하지 않았다. 관절염 환자의 관절액에 의하여, UCB-MSC는 BM-MSC에 비하여 2배 (C5 UCB-MSC) 내지 8.4배 (C3 UCB-MSC) 많이 HB-EGF를 발현하였다.

[231] 이는 관절염 환자의 관절액에 의하여 특이적으로 UCB-MSC에서 HB-EGF 발현이 유도된다는 것을 나타낸다. 이는 또한 관절염 병변 부위에서 BM-MSC에 비하여 UCB-MSC가 HB-EGF를 현저하게 많이 발현시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[232]

[233] 또한, UCB-MSC 및 환자에 따른 UCB-MSC에서 관절액에 의한 HB-EGF 발현의 정도를 측정하였다. UCB-MSC는 C3 및 C5를 사용하였으며, 3명의 환자로부터 채취된 관절액 (각각 JF1, JF5 및 JF11로 표기함)을 사용하였다. 배양 조건 및 HB-EGF 측정 조건은 도 20에 나타낸 바와 같다. 표 1은 UCB-MSC 및 환자에 따른 UCB-MSC에서 관절액에 의한 HB-EGF 발현량을 RT(real time)-PCR에 의하여 분석한 결과를 나타낸다.

[234] 표 1

HB-EGF	MSC	MSC+JF1	MSC+JF5	MSC+JF11
C5 UCB-MSC	1.00	9.80	26.60	9.20
C3 UCB-MSC	1.00	15.00	46.90	17.50

[235] 표 1에 나타낸 바와 같이, UCB-MSC는 관절염 환자의 관절액과 배양하는 경우, UCB-MSC는 HB-EGF를 대조군에 비하여 9.2 내지 46.9배 많이 발현하였다.

[236]

[237] **실시예 14: 연골세포 사멸 조건에서 UCB-MSC에 의한 HB-EGF의 발현**

[238] 본 실시예에서는 연골세포 사멸 조건에서 UCB-MSC에 의한 HB-EGF 발현 정도를 분석하였다. 먼저, 2주령 토끼의 관절로부터 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포를 DMEM 및 10%(v/v) FBS 함유 배지 중에서 5일 동안 6-웰 플레이트에서 배양하고, 이 배양 중인 연골세포를 실험에 사용하였다. UCB-MSC 배양은 SNP (sodium nitroprusside) 또는 상기 토끼 유래 연골세포 존재하에서 이루어졌다. 배양은 상기 조건에서 24시간 동안 이루어졌다. SNP는 500μM로 첨가하였다. SNP는 니트릭옥시드를 생성하는 화합물로서, 연골세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. SNP 첨가는 관절염 환자에서 일어나는 환경을 인 비트로에서 모방한 것이다. 또한, 상기 토끼 유래 연골세포는 트란스웰 챔버 (transwell chamber) (BD Falcon, San Jose, California, USA, Cell Culture inserts for 6-well plates, 0.4㎛, translucent PET membrane)의 하단에서 배양하고 상기 UCB-MSC는 챔버의 상단에서 공동 배양하였다.

[239] HB-EGF의 발현 여부는 배양물로부터 세포를 분리하고 파쇄한 후 동일한

농도의 파쇄물에 대하여 항-HB-EGF 항체 및 항-HB-EGF 항체에 특이적으로 결합하는 항체에 형광표지를 부착하여 사용한 면역블로팅에 의하여 측정하였다.

[240] 도 24은 연골세포 사멸 조건에서 배양된 UCB-MSC에서 HB-EGF 발현량을 나타낸다. 도 24에 나타낸 바와 같이, 연골세포 사멸 조건에서 UCB-MSC는 HB-EGF를 발현하지 않았으나, 토끼 유래 연골세포와 공동배양하는 경우 HB-EGF를 발현하였다.

[241] 또한, HB-EGF 존재하에서 상기 토끼 유래 연골세포를 배양하여 연골세포가 보호되는지를 확인하였다. 도 25는 HB-EGF 존재하에서 배양된 토끼 유래 연골세포를 광학현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 도면이다. 도 25에 나타낸 바와 같이, 대조군 (상단)에서는 SNP 농도 의존적으로 연골세포가 죽었으나 50ng/ml HB-EGF의 포함하는 배지에서는 연골세포의 사멸이 농도 의존적으로 억제되었다. 이는 HB-EGF에 의하여 연골세포의 SNP에 의한 사멸이 억제된다는 것을 나타낸다.

서열목록 Free Text

[242] 본 명세서에 첨부된 서열목록은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다.

청구범위

[청구항 1] 줄기세포를 배지 중에서 배양하는 단계; 및
상기 배양물로부터 TSP-1, TSP-2 및 IL-17BR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 농도를 측정하는 단계; 및
상기 측정된 농도에 근거하여 배양된 세포가 연골세포로 분화하는 능력을 확인하는 단계;를 포함하는, 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력을 확인하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 UCB-MSC인 것인 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 확인하는 단계는, 상기 측정된 TSP-1, TSP-2 및 IL-17BR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 양을 연골세포로 분화하는 능력이 확인된 표준 세포 (reference cell)를 대조군으로 하여 얻어진 양과 비교하는 단계;를 포함하는 것인 방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 확인하는 단계는, 상기 측정된 농도가 상기 표준 세포로부터 얻어진 농도보다 높은 경우는, 상기 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정하고,
상기 측정된 농도가 상기 표준 세포로부터 얻어진 농도보다 작거나 같은 경우는, 상기 줄기세포가 연골세포로 분화하는 능력이 낮은 것으로 판정하는 것인 방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 확인하는 단계는 상기 줄기세포가 1일 동안 유지 배지에서, 단층 배양한 경우 TSP-2 발현량이 72 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높거나, 펠렛 배양한 경우 550 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높은 TSP-2를 발현하는 경우,상기 줄기세포를 연골세포로 분화하는 능력이 높은 것으로 판정하는 것인 조성물.

[청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 표준 세포는 UCB-MSC, BM-MSC 및 섬유아세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 7] 트롬보스폰딘-2 (thrombospondin-2: TSP-2) 또는 TSP-2를 발현하는 세포; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 세포의 연골세포로의 분화를 촉진하기 위한 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 분화되는 세포는 UCB-MSC인 것인 조성물.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상을 치료 또는 예방하기 위한 것인 조성물.

[청구항 10] 제7항에 있어서, 관절염을 치료 또는 예방하기 위한 것인 조성물.

[청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 TSP-2를 발현하는 세포는 UCB-MSC인 것인 조성물.

[청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 TSP-2를 발현하는 세포는 1일 동안 유지

배지에서, 단층 배양한 경우 TSP-2 발현량이 72 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높거나, 펠렛 배양한 경우 550 pg/ml/1.0x10^5 cells 보다 높은 밀도를 갖는 UCB-MSC인 것인 조성물.

[청구항 13] 세포를 연골세포로 분화시키기에 유효한 양의 트롬보스폰딘-2 (thrombospondin-2: TSP-2) 또는 TSP-2를 발현하는 세포; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진하기 위한 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 세포를 연골세포로 분화시키는 방법.

[청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 개체는 연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 가진 것인 방법.

[청구항 15] 제13항에 있어서, 개체의 연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 예방 또는 치료하는 것인 방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 개체는 관절염을 가진 환자인 방법.

[청구항 17] 헤파린 결합 EGF 유사 성장 인자 (heparin binding EGF-like growth factor: HB-EGF); 또는 HB-EGF를 발현하는 줄기 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 연골세포의 사멸을 감소시키기 위한 조성물.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 HB-EGF를 발현하는 줄기 세포는 UCB-MSC인 것인 조성물.

[청구항 19] 연골세포의 사멸을 감소시키기에 충분한 양의 제17항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 연골세포의 사멸을 감소시키는 방법.

[청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 개체는 연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 가진 것인 방법.

[청구항 21] 연골 손상, 변성, 상실, 결함 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 상태를 갖는 환자의 관절액의 존재하에서 줄기세포를 배양하는 단계;를 포함하는,
줄기세포로부터 TSP-2 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 단백질의 발현을 증가시키는 방법.

[청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 줄기세포는 UCB-MSC인 것인 방법.

[청구항 23] 병변 조직의 존재하에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 병변 조직 세포로 분화시키는 방법.

[청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 병변 조직은 관절염 환자의 관절액, 관절염 환자의 관절강 (joint cavity) 유래의 활액 (synovial fluid), 급성 호흡곤란 증후군 (acute respiratorydistress syndrome: ARDS), 기관지

천식, 폐암, 간질성 폐질환 (interstitial ling disease), 만성폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) 환자의 기관지폐포 세척액 (bronchoalveolarlavage fluid: BALF), 환자에게서 채취된 뇌척수액 (spinal fluid), 늑막액 (pleural fluid), 복수 (ascite fluid) 또는 위액 (gastric fluid)인 것인 방법.

[청구항 25] 병변 조직의 존재하에서 줄기세포를 배양하는 단계: 및 상기 배양물로부터 발현되는 산물을 측정하는 단계;를 포함하는, 줄기세포 활성을 조절하는 물질을 탐색하는 방법.

[청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 병변 조직은 관절염 환자의 관절액, 관절염 환자의 관절강 (joint cavity) 유래의 활액 (synovial fluid), 급성 호흡곤란 증후군 (acute respiratorydistress syndrome: ARDS), 기관지 천식, 폐암, 간질성 폐질환 (interstitial ling disease), 만성폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) 환자의 기관지폐포 세척액 (bronchoalveolarlavage fluid: BALF), 환자에게서 채취된 뇌척수액 (spinal fluid), 늑막액 (pleural fluid), 복수 (ascite fluid) 또는 위액 (gastric fluid)인 것인 방법.

[청구항 27] 제25항에 있어서, 상기 배양은 상기 줄기세포 유지 배지 (maintenance medium) 또는 병변 조직에 해당하는 조직으로 분화시키는 분화 배지의 존재하에서 이루어지는 것인 방법.

[청구항 28] 제25항에 있어서, 상기 줄기세포는 UCB-MSC인 것인 방법.

[청구항 29] 제25항에 있어서, 상기 측정된 산물의 양을 대조군 실험으로부터 얻어진 산물의 양과 비교하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

[청구항 30] 줄기세포를 펠렛 배양 방식으로 배양하는 단계;를 포함하는, 줄기세포로부터 TSP-2 및 HB-EGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 발현을 증가시키는 방법.

[청구항 31] 제30항에 있어서, 상기 줄기세포는 UCB-MSC인 것인 방법.