

명세서

발명의 명칭

간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학

5 조성물

기술분야

본 발명은 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

10

배경기술

염증은 일반적으로 외부 물질 또는 해로운 자극에 대해 나타나는 국소화된 보호 반응이다. 염증의 직접적인 원인으로는 박테리아, 바이러스 및 기생충과 같은 감염성 원인; 화상 또는 방사선 조사와 같은 물리적 원인; 독소 및 약물과 같은 화학약품성 원인; 알레르기 및 자가면역 반응과 같은 면역반응성 원인 등이 있다.

일반적으로, 세균의 감염으로 인해 발생한 염증의 경우는 항생제를 사용하며, 통증은 없고 진물과 고름 등이 생기는 염증의 경우는 소염효소제를 사용한다. 또한, 염증으로 인해 통증이 심한 경우는 비스테로이드성 소염진통제를 사용하며, 면역체계의 이상으로 발생하는 염증의 경우 면역억제제 또는 스테로이드제를 사용한다. 하지만, 면역억제제는 면역체계에 직접적으로 관여하기 때문에 부작용 발생률이 높으며, 스테로이드제 또한 장기간 사용할 경우 부작용이 나타나며, 복용을 중단하면 병증이 다시 나타난다는 문제점이 있다.

최근, 이러한 부작용을 극복하기 위해 바이오 의약품 시장에서 줄기세포 치료제가 각광받고 있다. 그 중 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)는 지방세포, 뼈세포 및 연골세포와 같은 여러 세포계통으로 분화할 수 있다. 또한, 간엽줄기세포는 골수 외에도 치밀골, 말초혈액, 지방조직, 제대혈 및 양막 등의 조직에서 모두 분리가 가능하다는 장점이 있다.

30 발명의 상세한 설명

기술적 과제

본 발명자들은 *in vitro*에서 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포가 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽줄기세포보다 항염증 효과가 우수한 것을 확인하였다. 또한, 기관지폐이형성증 유발 마우스 모델 및 알츠하이머병 유발 마우스 모델에서 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포가 우수한 항염증 효과를 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

본 발명의 일 측면은, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 염증 질환 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는, 염증 억제 능력이 우수한 간엽줄기세포를 선별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명에 따른 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포는 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 분비를 억제하고, 항염증성 마커인 CD163과 Arg-1의 발현을 증가시키므로, 상기 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 염증을 억제하거나, 염증 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 Raw264.7 세포에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포(lot: G171, G28, G257) 또는 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽줄기세포(lot: G571, G43, G240)를 처리한 후, mTNF- α 분비량을 측정한 도면이다.

도 2는 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 Raw264.7 세포에 HLA-A2를 발

현하는 간엽줄기세포(lot: G171, G28, G257) 또는 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽 줄기세포(lot: G571, G43, G240)를 처리한 후, mTNF- α 분비 감소율을 계산하여 나타낸 도면이다.

도 3은 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포에 control siRNA(HLA-A2(+)-MSC+siCON) 또는 HLA-A2에 대한 siRNA(HLA-A2(+)-MSC+siHLA-A2)를 처리한 후, 염
5 증 반응을 유도한 Raw264.7 세포와 공배양하였을 때, mTNF- α 분비량을 측정한 도면이다.

도 4는 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포에 control siRNA(HLA-A2(+)-MSC+siCON) 또는 HLA-A2에 대한 siRNA(HLA-A2(+)-MSC+siHLA-A2)를 처리한 후, 염
10 증 반응을 유도한 Raw264.7 세포와 공배양하였을 때, TNF- α 분비 감소율을 계산하여 나타낸 도면이다.

도 5는 2회 계대배양이 진행된 간엽줄기세포(P2)와, 6회 계대배양이 진행된 간엽줄기세포(P6)의 HLA-A2 발현 패턴을 분석한 도면이다.

도 6은 기관지폐이형성증 마우스 모델에 PBS, HLA-A2를 발현하는 간엽줄
15 기세포(HLA-A2(+)-MSC), control siRNA(HLA-A2(+)-MSC-siCON) 또는 HLA-A2에 대한 siRNA(HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2)를 처리한 간엽줄기세포를 투여한 후, 14일째에 마우스의 폐 조직을 적출하여 염색한 사진이다.

도 7은 기관지폐이형성증 마우스 모델에 PBS, HLA-A2를 발현하는 간엽줄
기세포(HLA-A2(+)), control siRNA(HLA-A2(+)-MSC-siCON) 또는 HLA-A2에 대한
20 siRNA(HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2)를 처리한 간엽줄기세포를 투여한 후, 14일째에 마우스의 폐 조직을 적출하여 폐포의 크기를 측정한 도면이다.

도 8은 알츠하이머병 마우스 모델에 생리식염수(Control), HLA-A2를 발현
하는 간엽줄기세포를 단회(Single) 또는 반복(Repeat) 투여한 후, 12주차에 마우스의 뇌 조직을 적출하여 조직 내 TNF- α 및 IFN- γ 의 발현량을 확인한 도면이
25 다.

도 9는 알츠하이머병 마우스 모델에 생리식염수(Control), HLA-A2를 발현
하는 간엽줄기세포를 단회(Single) 또는 반복(Repeat) 투여한 후, 20주차에 마우스의 뇌 조직을 적출하여 조직 내 TNF- α 및 IFN- γ 의 발현량을 확인한 도면이
다.

30 도 10은 알츠하이머병 마우스 모델에 생리식염수(Control), HLA-A2를 발

현하는 간엽줄기세포를 단회(Single) 또는 반복(Repeat) 투여한 후, 12주차에 마우스의 뇌 조직을 적출하여 조직 내 CD163 및 Arg-1의 발현량을 확인한 도면이다.

도 11은 알츠하이머병 마우스 모델에 생리식염수(Control), HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 단회(Single) 또는 반복(Repeat) 투여한 후, 20주차에 마우스의 뇌 조직을 적출하여 조직 내 CD163 및 Arg-1의 발현량을 확인한 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

10 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 일 측면은, 세포 표면에 HLA-A2(human leukocyte antigen A2)를 발현하는 간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

상기 HLA-A2는 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA)의 HLA-A
15 혈청 그룹에 속하는 혈청형 중 하나로서, 상기 HLA는 인간의 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex: MHC) 유전자에 의해 암호화되는 당단백 분자이다. 상기 HLA-A는 모든 유핵세포 및 혈소판의 세포 표면에 발현되며, 세포독성 T세포가 바이러스에 감염된 세포나 종양세포를 인지하여 제거하기 위한 항원 인식 기능을 한다. 아직까지 HLA-A2를 발현하는 인간 유래 간엽줄기세포의 염증
20 억제 효과에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

본 발명은 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포가 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽줄기세포에 비해 염증 억제 능력이 우수하다는 결과에 기초한다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포는 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽줄기세포에 비해 70%, 75%, 80%,
25 85%, 90% 또는 95% 이상 HLA-A2를 더 발현하는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명의 간엽줄기세포는 세포 표면에 CD73(cluster of differentiation 73), CD90, CD105, CD166 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 발현하고, CD14, CD34, CD45 HLA-DR(human leukocyte antigen DR) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 발
30 현하지 않을 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 간엽줄기세포는 세포 표면에 CD73, CD90, CD105 및 CD166을 각각 70% 이상 발현하고, CD14, CD34, CD45 및 HLA-DR을 각각 1% 이하로 발현하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 간엽줄기세포는 세포 표면에 HLA-A2를 75% 이상 발현하고, CD73, CD90, CD105 및 CD166을 각각 70% 이상 발현하고, CD14, CD34, CD45 및 HLA-DR을 각각 1% 이하로 발현하는 것일 수 있다.

상기 CD73은 5'-뉴클레오티드 가수분해효소(5'-nucleotidase, 5'-NT)로도 불리며, *NT5E* 유전자에 의해 암호화되는 효소이다. CD73은 아데노신 일인산(adenosine monophosphate, AMP)을 아데노신으로 전환하는 기능을 한다.

상기 CD90은 N-글리코실화 GPI(Glycophosphatidylinositol) 및 단일 V-유사 면역 글로블린 도메인으로 구성된 세포 표면 단백질이다.

상기 CD105는 ENG(Endoglin)로도 불리며, 세포 표면에 위치한 I형 막 당단백질로 TGF 베타 수용체 복합체의 일부이다.

상기 CD166은 세포 표면에 위치하고 있는 면역 글로블린 슈퍼 패밀리(immunoglobulin superfamily)의 I형 막투과성 당단백질이다. CD166은 *ALCAM* 유전자에 의해 암호화된다.

상기 CD14는 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR)로서, 선천 면역계(innate immune system)의 구성요소 중 하나이다. 상기 CD14는 박테리아 LPS(lipopolysaccharide)의 검출을 위해 보조 수용체인 TLR 4(Toll-like receptor 4) 및 MD-2와 함께 작용하여 LBP(lipopolysaccharide-binding protein)의 존재 하에 LPS에 결합한다.

상기 CD34는 인간에서 *CD34* 유전자에 의해 암호화되는 막 관통형 포스포글리코프로테인(phosphoglycoprotein)이다.

상기 CD45는 인간에서 *PTPRC* 유전자에 의해 암호화되는 PTP(Protein tyrosine phosphatase) 효소이다.

상기 HLA-DR은 HLA의 Class II에 속하는 세포 표면 수용체로서, 자가 면역, 질병의 감수성 및 질병에 대한 저항성 등에 관여한다.

상기 간엽줄기세포는 유래에 관계없이 모두 사용할 수 있으며, 바람직하게는 제대혈로부터 유래된 것일 수 있다.

또한, 상기 약학 조성물 내 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포의 함량은

1.0×10⁵ 세포(cells)/ml 내지 1.0×10⁸ 세포/ml일 수 있으며, 구체적으로 1.0×10⁵ 세포/ml 내지 1.0×10⁸ 세포/ml 또는 2.0×10⁵ 세포/ml 내지 5.0×10⁷ 세포/ml일 수 있다. 바람직하게는, 상기 약학 조성물 내 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포의 함량은 5.0×10⁶ 세포/ml 내지 3×10⁷ 세포/ml 일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 1×10⁷ 세포/ml 함량의 용액 50 μl를 마우스에 투여하였다.

상기 약학 조성물은 일종의 세포치료제로서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 담체는 약품 제조시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있다.

또한, 본 발명의 약학 조성물은 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 약학적으로 허용가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

상기 담체는 본 발명의 약학 조성물 총 중량을 기준으로 약 1 중량% 내지 약 99.99 중량%, 바람직하게는 약 90 중량% 내지 약 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 약 0.1 중량% 내지 약 20 중량%로 포함될 수 있다.

상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나, 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다.

상기 염증 질환은 염증이 동반되는 질환을 의미한다. 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 아토피, 천식, 알레르기비염, 알츠하이머병, 이식편대숙주병(GVHD), 당뇨병성 신증, 크론병, 염증성 장질환, 이식후 거부반응, 기관지폐이형성증(BPD) 또는 만성폐쇄성폐질환(COPD)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 측면은, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 포함하는 염증 질환 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

5 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포는 약학 조성물에서 상술한 바와 동일하다.

상기 개체는 포유동물, 구체적으로 인간일 수 있다. 상기 약학 조성물의 투여경로 및 투여량은 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법 및 투여량은 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물을 치료하고자 하는 염증 질환에 대하여 치료 효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

상기 약학 조성물을 비경구적으로 투여하는 경우, 그 예로는 피하, 눈, 복강 내, 근육 내, 구강, 직장, 안와 내, 뇌 내, 두개 내(intracranial), 척추 내, 뇌실 내, 수강막 내, 비강 내, 정맥 내 투여가 있다.

15 상기 투여는 1회 이상, 1회 내지 3회 투여될 수 있고, 구체적으로 3회 투여될 수 있다. 반복 투여하는 경우에는 1일 내지 56일, 7일 내지 49일, 14일 내지 42일 또는 21일 내지 35일 간격으로 투여할 수 있다. 바람직하게는, 28일 간격으로 투여할 수 있다. 투여량이 많은 경우에는 하루에 수회에 걸쳐 투여될 수 있다.

20 상기 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포의 투여량은 1×10^6 세포/개체 내지 1×10^8 세포/개체일 수 있다. 구체적으로, 상기 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포의 투여량은 5×10^4 세포/kg 내지 1×10^7 세포/kg, 1×10^5 세포/kg 내지 7×10^6 세포/kg, 2×10^5 세포/kg 내지 5×10^5 세포/kg일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 염증 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는 염증 억제 능력이 우수한 간엽줄기세포를 선별하는 방법을 제공한다.

상기 선별방법에 있어서, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 분리하는 방법은 예를 들면, 유세포 분석기를 이용하여 분리할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서는, 항-CD14 항체, 항-CD34 항체, 항-CD45 항체, 항-HLA-DR 항체, 항-CD73 항체, 항-CD90 항체, 항-CD105 항체, 항-CD166 항체 및 마우스 항-HLA-A2 항체를 간엽줄기세포에 처리하여 세포 표면항원을 분석한 후, HLA-A2, CD73, CD90, CD105 및 CD166를 발현하는 간엽줄기세포에만 전하(電荷)를 부여하고 전장(電場)을 통과시켜 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 분리하였다.

발명의 실시를 위한 형태

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포 확인

제대혈 유래 간엽줄기세포는 제대혈로부터 최초로 간엽줄기세포를 분리한 후 5회의 계대 배양이 진행된 간엽줄기세포(5 passage)를 액체질소에 냉동 보존하였으며, 여러 로트(lot)의 간엽줄기세포를 사용하였다. 냉동 보존되었던 간엽줄기세포를 37℃ 온도의 항온수조에서 약 3분 동안 해동하였다. 그 후, 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum)가 포함된 α -MEM 배지에 간엽줄기세포를 재현탁 시키고, 원심분리기를 이용하여 1,200 rpm 조건에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후, 상층액을 제거하고 남은 간엽줄기세포를 PBS(phosphate buffer saline)에 재현탁시켰다.

그 후, 제대혈 유래 간엽줄기세포의 세포 표면 항원을 분석하기 위하여, 항-CD14 항체(BD pharmigen, Cat#555397), 항-CD34 항체(BD pharmigen, Cat#555822), 항-CD45 항체(BD pharmigen, Cat#555482), 항-HLA-DR 항체(BD pharmigen, Cat#555811), 항-CD73 항체(BD pharmigen, Cat#550257), 항-CD90 항체(Invitrogen, Cat#12-0909-42), 항-CD105 항체(Invitrogen, Cat#12-1057-42), 항-CD166 항체(BD pharmigen, Cat#555263) 및 마우스 항-HLA-A2 항체(BD pharmigen, Cat#558570)를 25℃ 온도의 어두운 곳에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, PBS로 1회 세척하고 1,200 rpm 조건에서 5분 동안 원심분리하여

간엽줄기세포만 분리하고, 1% 농도의 포르말데히드를 각 튜브당 200 μ l씩 처리하여 고정하였다. 이때, 세포 표면 항원 분석은 MACSQuant Analyzer 10 유세포분석기(Miltenyi biotec, Germany, Bergisch Gladbach)와 MACS Quantify 소프트웨어를 이용하였다. 분석결과는 하기 표 1에 나타내었다.

5 [표 1]

	lot No	HLA-A2 (+)			HLA-A2 (-)		
		10G171	09G028	11G257	12G571	08G043	11G240
negative markers	CD14	0.54%	0.47%	0.19%	0.60%	0.59%	0.53%
	CD34	0.47%	0.33%	0.46%	0.81%	1.44%	0.51%
	CD45	0.46%	0.44%	0.20%	0.68%	0.62%	0.42%
	HLA-DR	0.80%	0.42%	0.39%	0.55%	1.26%	0.34%
positive markers	CD73	84.60%	93.39%	99.56%	77.59%	96.91%	93.91%
	CD90	71.54%	75.65%	99.71%	67.42%	90.87%	86.44%
	CD105	80.40%	94.36%	99.34%	58.54%	97.05%	99.59%
	CD166	78.86%	91.10%	99.51%	51.90%	98.19%	99.26%
	HLA-A2	77.59%	85.23%	99.20%	0.63%	0.87%	0.49%

표 1에 나타난 바와 같이, G171, G028 및 G257 로트의 제대혈 유래 간엽 줄기세포는 세포 표면에 HLA-A2를 70% 이상 발현하는 것을 확인하였다. 반면, G571, G043 및 G240 로트의 제대혈 유래 간엽줄기세포는 세포 표면에 HLA-A2를 1% 미만으로 발현하는 것을 확인하였다. 상기 분석을 통해 세포 표면에 HLA-A2를 발

10 현하는 간엽줄기세포 그룹(HLA-A2(+))과 세포 표면에 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽줄기세포 그룹(HLA-A2(-))을 확실하게 구분하였다.

실시에 2: HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포의 염증 억제 효과 확인 I

15 HLA-A2 발현유무에 따른 간엽줄기세포의 염증 억제 효능을 비교하기 위해, 각 로트의 간엽줄기세포의 염증 억제 효과를 확인하였다.

구체적으로, 마우스 유래 대식세포인 Raw 264.7 세포에 염증성 자극 물질인 LPS(Lipopolyssacharide)를 처리하여 염증반응을 유도하였다. 냉동보존 되었던 각 로트의 간엽줄기세포를 37℃ 온도의 항온수조에서 약 3분 동안

20 해동하였다. 그 후, 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum)가 포함된 α -MEM 배지에 간엽줄기세포를 재현탁시키고, 원심분리기를 이용하여 1,200 rpm 조건에서 5분

동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후, 상층액을 제거하고 남은 간엽줄기세포를 RPMI 배지에 재현탁시켰다.

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 LPS가 포함된 RPMI 배지를 사용하여, 각 웰에 2×10^4 개의 Raw264.7 세포와 2×10^4 개의 G171, G028, G257, G571, G043 또는 G240 로트의 간엽줄기세포를 공동 배양하였다. 24시간 후 배양배지를 회수하여 Quantikine® mouse TNF- α Immunoassay kit(R&D Systems)를 이용하여 mTNF- α 의 분비량을 분석하였다.

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, Raw264.7 세포를 G171, G028 또는 G257 로트의 간엽줄기세포 공동배양한 경우가 G571, G043 또는 G240 로트의 간엽줄기세포와 공동배양한 경우보다 Raw264.7 세포의 mTNF- α 분비량이 더 감소된 것을 확인하였다.

또한, 상기 측정한 mTNF- α 분비량을 토대로 감소율을 계산한 결과, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포 그룹(HLA-A2(+): G171, G028, G257)은 mTNF- α 의 분비 감소율이 약 35%이었으나, 세포 표면에 HLA-A2를 발현하지 않는 간엽줄기세포 그룹(HLA-A2(-): G571, G043, G240)은 mTNF- α 의 분비 감소율이 15% 이하인 것을 확인하였다(도 2).

실시예 3: 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포의 염증 억제 효과 확인 II

간엽줄기세포의 HLA-A2 발현을 억제할 경우 항염증 효과도 억제되는지 확인하기 위해, siRNA를 이용하여 간엽줄기세포의 HLA-A2 발현을 억제시켜 염증 억제 효능을 비교하였다.

마우스 유래 대식세포인 Raw 264.7 세포에 염증성 자극 물질인 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하였다, 그 후, HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포(HLA-A2(+)-MSC)에 control siRNA(서열번호 3 및 4)를 처리(HLA-A2(+)-MSC+siCON) 또는 HLA-A2에 대한 siRNA(서열번호 1 및 2)를 처리(HLA-A2(+)-MSC+siHLA-A2)한 후, 상기 염증반응을 유도한 Raw 264.7 세포와 공배양하여, mTNF- α 의 분비량을 확인하였다.

구체적으로, G027, G074, G171, G610, G028, 또는 G257 로트의 간엽줄기세포에 control siRNA를 처리(HLA-A2(+)-MSC+siCON) 또는 HLA-A2

siRNA(HLA-A2(+)-MSC+siHLA)를 처리하여 준비한 후, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 LPS가 포함된 RPMI 배지를 사용하여, 각 웰에 2×10^4 개의 Raw264.7 세포와 2×10^4 개의 준비된 간엽줄기세포를 공동 배양하였다. 24시간 후, 배양배지를 회수하여 Quantikine® mouse TNF- α Immunoassay kit(R&D Systems)를 이용하여 mTNF- α 의 분비량을 분석하였다.

그 결과, HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포에 siRNA control(HLA-A2(+)-MSC-siCON)을 처리한 경우 TNF- α 의 분비량이 감소하였다. 반면, HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포에 HLA-A2에 대한 siRNA(HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2)를 처리한 경우, TNF- α 의 분비량이 유의미하게 감소하지 않았다(도 3).

또한, HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포에 siRNA control(HLA-A2(+)-MSC-siCON)을 처리한 경우와 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포에 HLA-A2에 대한 siRNA(HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2)를 처리한 경우의 TNF- α 의 분비 감소율을 비교해 보았을 때, HLA-A2에 대한 siRNA를 처리한 경우 TNF- α 의 분비 감소율이 낮아졌으므로, 간엽줄기세포의 HLA-A2 발현을 억제하는 경우 염증 억제 효과도 같이 감소되는 것을 확인하였다(도 4).

실시예 4: 간엽줄기세포의 계대배양 횟수에 따른 HLA-A2의 발현량 변화 확인

제대혈 유래 간엽줄기세포의 계대배양 횟수에 따라 HLA-A2의 발현이 변화하는지 확인하기 위해, 최초 제대혈로부터 간엽줄기세포를 분리한 후, 2회 계대배양이 진행된 간엽줄기세포(passage 2, P2, G028)와 6회 계대배양이 진행된 간엽줄기세포(passage 6, P6, G171)를 이용하여 HLA-A2 발현 패턴을 분석하였다.

실시예 1과 동일한 방법으로 항-HLA-A2 항체를 이용하여 FACS 분석한 결과, 2회 및 6회 계대배양한 각각의 간엽줄기세포에서 모두 90% 이상 HLA-A2를 발현하였고, 간엽줄기세포의 계대배양 횟수와 상관없이 HLA-A2를 발현하는 것을 확인하였다(도 5).

실시예 5: 기관지폐이형성증 마우스 모델을 이용한 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포의 치료 효과 확인

기관지폐이형성증은 폐구조 이상과 폐 발달 정지에 의해 나타나는

질환으로, 이는 신생아 호흡곤란 시 산소호흡기를 통한 고농도의 산소 치료과정에서 폐염증이 과도하게 유도되어 폐의 손상이 발생하는 염증 질환 중 하나다. 현재까지 전세계적으로 근본적인 치료제 및 치료방법이 없는 상태이다.

이에 기관지폐이형성증 마우스 모델에 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는
5 제대혈 유래 간엽줄기세포를 투여하였을 때, 미성숙한 폐조직 재생과 염증 억제 등의 치료효과를 확인하였다.

구체적으로, 출생 후 산소호흡기 치료로 인한 고농도 산소의 조건을 반영하기 위해, 임신한 어미 마우스를 수령하여 출산시킨 후, 태어난 지 10시간
10 이내의 신생아 마우스를 정상 농도 또는 고농도 산소 농도의 케이지로 이동하여 사육하였다. 출산한 어미 마우스도 신생아 마우스의 사육을 위해 같은 케이지로 이동하여 사육하였다. 이때, 임신한 어미 마우스로부터 출산될 신생아 마우스 수의 변동이 발생할 수 있고, 신생아 마우스를 고농도 산소로 사육할 경우 평균 사망률이 50% 정도임을 감안하여 최종 마우스가 각 군당 9마리가 되도록 각 군당
15 총 18마리의 마우스를 사육하였다. 9마리 중 3마리는 폐 조직의 형태학적 분석, 3마리는 염증물질 특정을 위한 폐포용액 추출, 나머지 3마리는 RNA 또는 단백질 분석에 이용하였다. 각 군의 구성을 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

군 구성	개체수(n)
정상 농도 산소 유도군 (Normal)	18
고농도 산소 유도 및 PBS 투여군 (Hyperoxia-PBS)	18
고농도 산소 유도 및 HLA-A2(+) 간엽줄기세포 투여군 (Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC)	18
고농도 산소 유도, control siRNA가 처리된 HLA-A2(+) 간엽줄기세포 투여군 (Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC-siCON)	18
고농도 산소 유도, HLA-A2 siRNA가 처리된 HLA-A2(+) 간엽줄기세포 투여군 (Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2)	18

태어난 지 3일째 되는 날, 신생아 마우스에 마취제로서 50 mg/ml 농도의 졸레틸 50(Zoletil 50)과 23.32 mg/ml 농도의 럼폰(Rompun)을 복강 내
20 주입하였다. 그 후, 신생아 마우스의 기도 내로 PBS, HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포(HLA-A2(+)), control siRNA (siCON) 또는 HLA-A2에 대한 siRNA(siHLA-A2)가 처리된 간엽줄기세포를 투여하였다. 이때, 간엽줄기세포 투여군에 신생아 마우스 한 마리당 5×10^5 개의 간엽줄기세포를 50 μ l의 PBS에

부유하여 1회 투여하였다. 그 후, 출생 14일째에 다시 마취제를 복강 내 주입하고, 폐 조직을 적출하여 분석하였다. 4% 포름알데하이드에 24시간 고정시킨 폐조직의 절편을 파라핀에 포매시킨 후, 4 μ m의 두께로 잘라 헤마톡실린/에오신 조직염색하여 광학현미경으로 조직관찰함으로써, 고농도 산소로 손상 유도된 폐조직에 대하여 HLA-A2 발현 간엽줄기세포의 치료적 효과를 비교평가하였다.

그 결과, 정상 농도 산소군의 폐조직에 비하여 고농도 산소 유도한 후 PBS만 투여한 군(Hyperoxia-PBS)의 폐조직은 폐포손상이 심하였다. 이러한 폐포손상에 대하여 본 발명의 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포 투여군 또는 Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC-siCON 투여군은 정상 농도 산소 유도군과 유사하게 폐포 보호/치료 효과를 보였다. 반면, Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2 투여군에서는 치료효과가 거의 나타나지 않았다. 이를 통해, HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포가 고농도의 산소로 인한 폐염증 및 폐의 손상을 치료할 수 있음을 확인하였다(도 6).

또한, 폐포손상 정도를 평균 선형 지수(mean linear index)로 정량화한 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이, 정상군에 비하여 기관지폐이형성증 모델군(Hyperoxia-PBS)에서 폐포의 발달이 손상되어 평균 선형지수가 유의하게 높게 나타났다. HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포 투여군 또는 Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC-siCON 투여군은 폐손상이 호전되어 평균 선형 지수가 현저히 낮아졌음을 알 수 있다. 반면, Hyperoxia-HLA-A2(+)-MSC-siHLA-A2 투여군에서는 치료적 효과가 평균 선형 지수가 유의하게 낮아지지 않았다(도 7).

실시예 6: 알츠하이머병 마우스 모델을 이용한 세포 표면에 HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포의 치료 효과 확인

알츠하이머병 마우스 모델로서 6개월령의 5XFAD 마우스(Jackson Laboratory, USA)를 사용하였으며, 5XFAD 마우스는 생후 2개월부터 뇌 조직 내에 아밀로이드 베타(amyloid-beta)가 생성되기 시작하여, 4개월에는 아밀로이드 베타가 뇌 조직에 축적되고, 6개월쯤에는 인지기능 장애(Cognitive impairment)가 나타난다. 6개월령의 5XFAD 마우스에 졸레틸, 럼폰, 생리식염수를 4:1:5의 비율로 혼합하여 마취제로 사용하였으며, 마우스의 몸무게(g) 당 5 μ l의

마취제를 복강 투여하였다.

실시에 1에서 분리한 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 뇌실 내에 투여하기 위해, 가이드 캐놀라(guide cannula)를 목표 위치(브래그마(bregma)로부터 Anterior/Posterior: -0.22 mm, Medial/Lateral: 1.0 mm, Dorsal/Ventral: 2.5 mm)에 삽입한 후, 주변에 스크류를 박아 고정하였다. 그 후, 회복을 위해 6일 내지 8일 동안의 회복기를 두었다. 이후, HLA-A2를 발현하는 제대혈 유래 간엽줄기세포를 해밀턴 주사기로 옮긴 후, 내부 캐놀라(internal cannula)를 가이드 캐놀라 안에 넣어 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 투여속도(infusion rate)로 뇌실 내 주입하였다. 이때, 각 군의 구성을 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

그룹		최초 투여 후 희생 시점		동물 수
		12주 (시험 A)	20주 (시험 B)	
대조군(Control)* (5% MEM-alpha and 95% saline 15 μl)		8 (M)	8 (M)	16 (M)
HLA-A2(+) MSC (1 x 10 ⁵ cells/15 μl)	단회 투여(Single)	8 (M)	-	8 (M)
	반복 투여(Repeat) (3회)	8 (M)	8 (M)	16 (M)
총 마리수(M= male 5XFAD)				40 (M)

희생 시점에 체중에 따라 적당한 양의 마취제를 복강 투여한 후, 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 심장관류(cardiac perfusion)를 실시하였다. 먼저 심장이 노출되게 하기 위해, 마우스의 피부, 횡경막, 갈비뼈를 절개하고 펌프배관(pump tubing)을 좌심실 쪽에 연결한 후, PBS를 체내에 순환시킴으로써 체내 혈액을 배출시켰다.

그 후, 뇌 조직을 채취하고, -80℃ 온도에서 냉동 보관하였다. 용해 버퍼(lysis buffer)와 초음파분산기(sonicator)를 이용하여 뇌 조직을 용해시킨 후, 브래드포드 분석법(bradford assay)을 이용해 뇌 조직 용해물을 희석하여 사용하여 뇌 조직과 같은 용해물 측정에 적합한 사이토카인 ELISA KIT를 이용하였으며, TNF- α ELISA KIT(PeproTech, 900K54EK), IFN- γ ELISA KIT

(RayBio, ELM-IFNg-CL)를 이용하여 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 분석하였고, CD163 ELISA KIT(LSBio, Cat No. LS-F9079), Arg-1 ELISA KIT(LSBio, Cat No. LS-F6864)을 이용하여 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)을 분석하였다.

5 그 결과, 시험 A(12주) 조건 및 시험 B(20주) 조건에서 모두 대조군에 비해 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 단회 투여한 실험군과 반복 투여한 실험군에서 TNF- α 와 INF- γ 가 감소하였다. 특히, 대조군과 비교하여 TNF- α 는 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 반복 투여한 실험군에서 통계적으로 유의하게 감소하였으며, INF- γ 는 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 단회 투여한 군에서
10 통계적으로 유의하게 감소하였다(도 8 및 도 9). 이를 통해 반복 투여한 후 시간이 경과하여도 항염증 효능이 유지되고 있음을 확인하였다.

 또한, 뇌 조직 내에서 항염증성 사이토카인으로 대표적으로 알려진 CD163와 Arg-1(Argnase-1)를 ELISA로 분석한 결과, 시험 A(12주) 조건 및 시험 B(20주) 조건에서 모두 대조군에 비해 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 단회
15 투여한 실험군과 반복 투여한 실험군에서 CD163와 Arg-1가 증가하였다. 특히, 대조군과 비교하여 CD163은 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 반복 투여군에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며, Arg-1은 HLA-A2를 발현하는 간엽줄기세포를 단회 투여한 실험군 및 반복 투여한 실험군 모두에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(도 10 및 도 11). 이를 통해 반복 투여한 후 시간이 경과하여도
20 항염증 효능이 유지되고 있음을 확인하였다.