

	<p>(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)</p>	<p>(11) 공개번호 10-2015-0102383</p>	<p>(43) 공개일자 2015년09월07일</p>
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 5/0784</i> (2010.01) <i>C12N 5/0775</i> (2010.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-0024178</p> <p>(22) 출원일자 2014년02월28일 심사청구일자 없음</p>	<p>(71) 출원인 (주)미래세포뱅크 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 555, 203호(상대원동, 선일테크노피아)</p> <p>(72) 발명자 스캇 최 경기 용인시 수지구 상현로 30-10, 227동 602호 우편번호 448-519 (상현동, 성원3차상떼빌아파트)</p> <p>(74) 대리인 이영규, 윤병국</p>		
<p>전체 청구항 수 : 총 5 항</p>			
<p>(54) 발명의 명칭 Ex vivo로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포 배양방법</p>			

(57) 요약

본 발명은 간엽줄기세포에 의해 면역억제능력이 향상된 수지상세포를 제조하는 방법을 포함하는 EX VIVO로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포의 배양방법에 관한 것으로 면역억제능력이 향상된 수지상세포, 및 이러한 수지상세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제시한다. 면역억제능력이 향상된 본 발명의 자가유래 면역세포는, 면역억제 기전을 통하여 치료될 수 있는 다양한 질환 또는 질병의 치료에 이용될 수 있으며, 면역관용 (immunotolerance) 능력이 개선된 본 발명의 면역세포는, 수지상세포의 면역억제제로서의 유효한(effective) 응용을 가능하게 한다.

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 수지상세포를 얻는 단계;
- (b) 간엽줄기세포를 얻는 단계;
- (c) 간엽줄기세포와 상기 수지상세포를 공동배양하는 단계; 및
- (d) 상기 공동배양물로부터 면역억제 반응 유도능력이 증가된 수지상세포를 분리하는 단계;를 포함하는 EX VIVO로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포 배양방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
 상기 수지상세포는 성숙 또는 미성숙 수지상세포인 것을 특징으로 하는, EX VIVO로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포 배양방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
 간엽줄기세포는 수지상세포에 대하여 동종동계(syngeneic), 동종이계(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic)의 세포인 것을 특징으로 하는, EX VIVO로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포 배양방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
 상기 공동배양의 배양시간은 0.1 내지 200 시간인 것을 특징으로 하는, EX VIVO로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포 배양방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
 상기 단계 (d)의 수지상세포는, 상기 단계 (a)의 수지상세포와 비교하여 CD86의 발현이 감소되는 것을 특징으로 하는, EX VIVO로 조작된 생 자가세포 제조를 위한 자가유래 면역세포 배양방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 간엽줄기세포에 의해 매개된 면역억제능이 향상된 수지상세포를 제조하는 방법, 면역억제능이 향상된 수지상세포 및 이를 포함하는 면역억제용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자가 면역 질환은 자가 면역 내성에 이상으로 인하여 자체 항원에 대하여 면역반응이 나타나는 현상을 말한다. 면역반응의 조절에 중요한 역할을 담당하는 T 세포는 흉선에서 성숙하는 과정을 거침으로써 자신의 조직 적합성 항원 (HLA)에 결합된 외부 항원만을 인식하도록 교육을 받는다. 그러나 간혹 자신의 조직적합성항원에 자신의 항원이 결합된 복합체를 인식하는 T 세포가 얻어지는 경우가 있다.

[0003] 자가 면역 질환은 환경의 변화, 바이러스 감염, 노화, 만성 스트레스, 호르몬 불균형, 임신 등의 다양한 원인에 의해 발생된다. 자가 면역 질환의 치료법으로는 주로 고농도의 세포 상해성 치료법을 주로 사용하고 있으나, 경미한 경우를 제외하고는 치료 효과가 낮고 부작용이 심하다는 단점이 있다.

- [0004] 그러므로 부작용이 적고 효과적인 치료법으로 대두되고 있는 것 중의 하나가 줄기세포의 면역 조절 활성을 이용한 치료법의 개발이다. 다분화 능력 및 여러 종류의 활성촉진 인자를 생산하는 특성을 지니고 있어서 생명과학 분야의 연구자들에게 좋은 연구소재로 사용되던 줄기세포는 이제 기초연구 영역을 넘어서 조절기계 이상, 선천적 면역 결핍증, 자가 면역 질환 등의 임상분야에 적용을 연구 하고 있으며, 실제로 이들 질환에 적용하여 좋은 결과를 얻은 바 있다.
- [0005] 일반적으로 조혈모세포의 이식은 치료법으로 적용하고 있으나 이식편대숙주질환과 감염의 위험성 때문에 적용을 꺼리는 경우도 있다. 이식에 의한 세균 및 바이러스의 감염은 이식의 효과를 감소시키는 가장 큰 장애이며 이를 해결하기 위한 화학요법, 방사선요법 등의 개발이 활발히 진행되고 있다.
- [0006] 또한 이식편대숙주질환의 원인으로 작용하는 공여자의 T 세포 면역반응을 감소시키기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있으며, 최근 몇 년간 줄기세포의 분리 및 배양기술의 발전됨에 따라 제대혈, 말초혈액 등으로부터 림프구가 포함되어있지 않은 순수한 조혈모세포 및 간엽줄기세포를 분리하여 줄기세포치료제를 개발하고자 하는 움직임이 활발해 지고 있다.
- [0007] 특히 제대혈 유래 성체줄기세포는 배아줄기세포와 비교하여 윤리적 문제를 피할 수 있으며, 현실적으로 전신마취를 해야 하고 다량으로 얻기 어려운 골수 유래 성체줄기세포와 비교하여 얻기가 수월하다는 장점을 지니고 있다. 그러나 지금까지의 연구는 제대혈 유래 간엽줄기세포보다는 먼저 성체줄기세포의 분리를 위한 원료로 사용된 골수 유래 간엽줄기세포에 대한 연구가 많이 발표되어 있다. 특히 자가 골수세포를 이용한 치료법은 면역반응에 의한 이식거부반응이 없고 이식효과를 극대화 시킬 수 있다. 그러나 자가골수를 이용하기 어려운 경우에는 동종골수이식을 해야 한다. 동종세포이식의 경우에는 면역학적 문제점을 예상할 수 있지만, 조직 적합성 항원을 맞추는 방법 등을 이용하여 면역학적 문제점을 극복한다면, 다분화능 및 여러 면에서 성능이 우수한 간엽줄기세포를 사용할 수 있다는 장점이 있다.
- [0008] 줄기세포를 세포치료에 응용하기 위해서는 반드시 수반 되어야 할 것이 충분한 세포수의 확보이다. 이를 위해서는 생체외부에서 성상의 변화없이 세포 수를 증가시키는 세포배양기술이 필요하다. 최근에 다양한 성장인자를 처리하거나 기질세포와 혼합배양방법을 이용하여 조혈모세포의 세포 수를 유의성 있게 증가시킨 연구 결과가 다수 발표된 바 있다
- [0009] 간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell; MSC)는 지방세포, 뼈세포 및 연골세포와 같은 여러 세포계통으로 분화할 수 있는 골수를 포함하는 전신에 존재하는 줄기세포이다. 간엽줄기세포는 인간, 마우스, 랫트, 개, 염소, 래빗 및 고양이를 포함하는 다수의 종으로부터 분리되었다. 인간 및 랫트의 간엽줄기세포와는 달리, 뮤린의 간엽줄기세포는 과성장(overgrow)하는 조혈모세포들에 의해 자주 오염되기 때문에 인간이나 랫트의 간엽줄기세포보다 골수로부터 분리 및 배양해서 증식시키기가 더욱 어렵다.
- [0010] 최근 간엽줄기세포가 인 비트로 및 인 비보에서 여러 T 림프구 활성을 억제하여 면역조절능력을 발휘한다는 보고가 있었으며, 간엽줄기세포는 개코원숭이에서 MHC-부적합 피부이식에서 이식후의 생존기간을 현저하게 연장시켰고, 인간에서 동종이형의 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell, HSC)의 이식 후의 숙주에 대한 이식조직의 질병(graft-versus-host disease, GVHD)을 감소시켰다. 그러나, T 림프구에 대한 간엽줄기세포의 면역조절 활성화에 관련된 작용기전은 완전하게 규명되어 있지는 않다.
- [0011] 또한, 줄기세포 자체를 주입할 경우에 인 비보에서 종양으로 발전할 가능성이 있어 위험이 남아 있다. 따라서, 간엽줄기세포를 면역조절의 목적으로 인 비보에 직접 이용하는 것은 임상에서 부담이 매우 크다.
- [0012] 수지상세포(Dendritic Cell; DC)는 T 세포 면역의 유도자로 알려져 있고, T 세포 관용(T-cell tolerance)의 매개자로서 점차 주목받고 있다. 성숙 수지상세포(Mature Dendritic Cell; mDC)와는 대조적으로, 미성숙 수지상세포(Immature Dendritic Cell; imDC)의 본래 기능은 T reg 세포들의 생성, 자기반응 작동세포의 아폽토시스의 유도, 또는 면역 불반응성의 유도를 통해 자기-관용에 대한 조건을 제공하는 것이다. 미성숙 수지상세포를 치료에 이용하려는 시도가 진행되어 왔다. 그러나, 불행하게도 미성숙 수지상세포를 생산하는 프로토콜이 매우 제한되어 있고, 숙주 내에서 성숙 단계가 진행되어 버리는 등의 몇 가지 장애가 여전히 존재한다. 따라서, 미성숙 수지상세포를 치료적 용도로 이용하는 것이 불가능하다고 여겨져 왔다. 그러나, 몇몇의 보고들에 의하면, 미성숙 수지상세포가 T reg 세포를 활성화시키거나 이펙터 T 세포(effector T cell)의 불반응성을 유도하는 관용적 특징을 갖고 있다는 것은 분명하다.
- [0013] 마우스에서, 일반적으로 성숙 수지상세포는 IL-6의 생성을 통해서 CD25⁺ CD4⁺ Treg 세포의 유도를 억제하나, 또

한편으로 미성숙 및 성숙 수지상세포 모두는 CD25⁺ CD4⁺ T reg 세포들의 증식을 유지하기도 한다. 수지상세포에서 CD40이 발현되는지 여부는 프라이밍(priming)이 면역에 도달하는지 또는 T reg 세포 매개 면역 억제에 도달하는지를 결정하는 중요한 인자이다. CD40이 없는 항원 노출된 수지상세포는 T 세포 증식 준비를 억제하고, 미리 증식 준비된 면역 반응을 억제하며, 증식 준비된 수용자(recipient)에게 항원 특이적 관용을 전달할 수 있는 IL-10을 분비하는 CD4⁺ T reg 세포들을 유도한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 공개특허공보 제2005-0037549호 (2005년 4월 22일 공개)
- (특허문헌 0002) 등록특허공보 제10-1039843호 (2011년 6월 9일 공고)
- (특허문헌 0003) 미국특허 제5,994,126호 (1999년 11월 30일 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명자들은 면역억제능력이 우수하고 종양발생의 부작용이 없는 안전한 면역반응 억제용 세포를 얻기 위해 노력한 결과, 수지상세포(DC)를 간엽줄기세포(MSC)와 공동배양하면 수지상세포의 면역억제효과가 현저하게 증가한다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0016] 따라서, 본 발명의 목적은 면역억제 능력이 우수한 자가유래 면역세포를 제조하는 방법을 제공하는 데 있으며, 본 발명의 다른 목적은 간엽줄기세포에 의해 매개된 수지상세포인 자가유래 면역세포를 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 간엽줄기세포에 의해 매개된 수지상세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 데 있으며, 본 발명의 또 다른 목적은 수용자의 면역반응을 억제하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 면역억제 반응 유도능력이 증가된 간엽줄기세포-매개 면역세포의 제조방법을 제공한다 : (a) 수지상세포를 얻는 단계; (b) 간엽줄기세포를 얻는 단계; (c) 간엽줄기세포와 상기 수지상세포를 공동배양하는 단계; 및 (d) 상기 공동배양물로부터 면역억제 반응 유도능력이 증가된 수지상세포를 분리하는 단계.
- [0019] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 간엽줄기세포와의 공동배양에 의해 처리되고, 면역활성 T 세포 억제 능력 또는 조절 T 세포(regulatory T cell) 유도 능력이 증가된 간엽줄기세포-매개 수지상세포를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 간엽줄기세포와의 공동배양에 의해 처리되고, 염증성 사이토카인의 분비를 억제하고, 면역억제 사이토카인의 분비를 유도하는 간엽줄기세포-매개 수지상세포를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 간엽줄기세포에 의해 매개된 수지상세포를 제조하는 방법 및 이 방법에 의해 얻어진 수지상세포 및 이를 포함하는 면역반응 억제용 약제학적 조성물을 제공한다. 면역억제능이 향상된 본 발명의 수지상세포는, 면역억제 기전을 통하여 치료될 수 있는 다양한 질환 또는 질병의 치료에 이용될 수 있다. 또한, 면역관용(immunotolerance) 능력이 개선된 본 발명의 수지상세포는, 미성숙 수지상세포의 면역억제제로서의 유효한(effective) 응용을 가능하게 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명자들은 면역반응 억제능력이 우수한 물질, 특히 세포를 얻기 위해 노력한 결과, 간엽줄기세포와 함께 수지상세포를 공동배양하면 수지상세포의 면역반응 억제효과가 현저하게 증가한다는 것을 발견하였다.

- [0023] 본 발명의 방법을 각각의 단계에 따라 상세히 설명하면 다음과 같다:
- [0024] **(a) 수지상세포를 얻는 단계**
- [0025] 본 발명에 따르면, 포유동물, 바람직하게는 인간으로부터 분리한 수지상세포를 간엽줄기세포로 처리하여 수지상세포의 면역억제능력을 크게 증가 시킨다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 “수지상세포”는 MHC(major histocompatibility complex)를 통하여 T 세포에 항원을 제시할 수 있는 세포를 의미한다. 수지상세포는 성숙도 정도에 따라, 미성숙 수지상세포(immature dendritic cells) 및 성숙 수지상세포(mature dendritic cells)로 나뉜다. 본 명세서에서 용어 “미성숙 수지상세포”는 다양한 전구세포로부터 분화 유도되어 형성된 수지상세포로서, 하기의 성숙 수지상세포의 표면 형질(surface phenotypes) 중 CD80 또는 CD86 등의 공동자극분자(costimulatory molecule)의 발현이 낮은 수지상세포를 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “성숙 수지상세포”는, 미성숙 수지상세포가 성숙화되어 형성된 세포를 의미하며, 다음과 같은 표면 형질들 중 적어도 하나 이상을 나타내는 세포를 의미한다: 감소된 CD115, CD14 또는 CD68의 발현; 및 증가된 CD11c, CD80, CD86, CD40, MHC 클래스 II, p55 및 CD83의 발현.
- [0028] 이러한 표면 마커의 발현 프로파일링은 당업계에 공지된 유세포 분석을 통하여 용이하게 할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 수지상세포는 바람직하게는 성숙 수지상세포 또는 미성숙 수지상세포이고, 더욱 바람직하게는 미성숙 수지상세포이다.
- [0030] 미성숙 수지상세포의 분리 및 배양 방법은 미국특허 제5,994,126호에 개시되어 있고, 관련 문헌의 전체 내용은 참조로서 본 명세서에서 참조한다.
- [0031] 미성숙 수지상세포의 소스는 미성숙 수지상세포 또는 증식 가능한 이들의 원조(progenitor)를 포함하는 조직 소스이며, 구체적으로 비장, 어페르นต์(afferent) 림프, 골수, 혈액, 및 G-CSF 또는 FLT-3 리간드와 같은 사이토카인을 투여하여 유도된 혈액 세포를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 다른 세포 타입에 대한 수지상세포 전구세포의 비율을 증가시키기 위해서, 조직 소스를 배양 전에 예를 들어 G-CSF, FLT-3, GM-CSF, M-CSF, TGF- β 및 트롬보포이에틴과 같은 자극 물질로 처리할 수 있다. 상기와 같이 처리하면 수지상세포의 원조세포들과 경쟁하여 증식을 방해하는 세포들을 제거할 수 있다. 상기 전처리에 의해 조직 소스가 인 비트로 배양에 더욱 적합하게 될 수 있다. 전처리 방법은 특정 조직 소스에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 비장 또는 골수를 본 명세서에서 참조하고 있는 미국특허 제5,851,756호 및 제5,994,126호에 개시된 방법과 같은 적합한 방법에 의해 단일 세포를 얻기 위해 처리한다. 혈액에서 독성이 있는 적혈구를 포함하는 다른 세포 타입들로부터 세포 분리 방법을 이용하여 백혈구를 분리한다. 상기 적혈구를 제거하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 상기 조직 소스는 혈액 또는 골수이다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 미성숙 수지상세포는 PCT 출원 WO 97/29182호에 개시된 바와 같이 혈액의 다능성 단핵세포 전구세포로부터 유도될 수 있다. 이들 다능성 세포들은 CD14, CD32, CD68 및 CD115 단핵세포 마커를 발현하고, CD83, p55, CD40 및 CD86는 거의 발현하지 않는다. 다능성 세포를 사이토카인 GM-CSF와 IL-4 또는 IL-13의 존재 하에 배양하여 미성숙 수지상 세포를 유도한다. 미성숙 수지상세포를 인 비트로 또는 인 비보에서 미성숙한 상태로 유지하기 위해서 변형시킬 수 있는데, 예를 들어 IL-10을 발현하는 벡터를 사용할 수 있다. 당업자는 미성숙 수지상세포를 분리하고 이들을 미성숙의 상태에서 유지하기 위한 공지된 방법에 변형을 가할 수 있다.
- [0034] 상기한 바와 같이, 적합한 조직 소스로부터 세포를 얻은 다음, 이 세포를 적합한 지지체(substrate)에서 배지(바람직하게는, GM-CSF로 보충된 배지)를 이용하여 일차 배양(primary culture)한다. 전능성 세포 또는 다능성 세포로부터 미성숙 수지상세포로의 분화를 촉진하는 물질, 특히 GM-CSF는 미국특허 제5,851,756호 및 제5,994,126호에 개시되어 있으며, 이들 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 상기 기관은 바람직하게는 세포가 부착할 수 있는 기관을 포함하며, 바람직하게는 조직 배양에 사용되는 플라스틱이다.
- [0035] 미성숙 수지상세포의 수율을 증가시키기 위해, GM-CSF 이외에, 비-수지상세포 타입의 증식을 막거나 억제하는 인자들을 배양배지에 첨가할 수 있다. 상기 인자들은, 예를 들어 대식세포를 억제하는 IL-4 및/또는 IL-13를 포함한다. 상기 인자들은 수지상세포 전구세포들의 증식을 촉진하는 반면 비-수지상세포 타입의 성장을 억제함으

로써 배지에서 미성숙 수지상세포의 수를 증가시킨다.

- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 단핵세포를 플라스틱 조직 배양 플레이트에 플레이팅하여 부착시킴으로써 혈액의 단핵세포 전구세포로부터 미성숙 수지상세포를 생성시킬 수 있다. 미성숙 수지상세포의 파플레이션을 증가시키기 위해서 플라스틱 부착 세포들을 GM-CSF 및 IL-4의 존재 하에서 배양한다. IL-4 대신에 IL-13과 같은 다른 사이토카인을 사용할 수 있다.
- [0037] 상기 미성숙 수지상세포를 얻기 위한 과정에서 이용되는 배지로는, 동물세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 바람직하게는, 혈청(예컨대, 우태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지이다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지로는 RPMI 시리즈, 예를 들면 RPMI 1640를 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지에는, 항산화제(β -머캅토에탄올 등)와 같은 다른 성분이 포함될 수 있다.
- [0038] 성숙 수지상세포들은 예컨대, CD83, DC-LAMP, p55, CCR-7 표면 마커의 발현, 그리고 MHC 클래스 II와 공동자극분자(costimulatory molecules), 예컨대 CD86의 고발현을 나타낸다. 한편, 미성숙 수지상세포들은 전형적인 형태(morphology), MHC 클래스 II 및 공동자극분자의 저발현 및 성숙 수지상세포 마커들(예를 들어 CD83, DC-LAMP)의 미발현에 의해 확인할 수 있다. 또한, 미성숙 수지상세포에 대한 양성 마커의 예는 DC-SIGN, Langerin 및 CD 1A가 있다.
- [0039] 상기한 마커 또는 마커에 대한 항체를 이용하여 당업계에 공지된 방법에 따라 미성숙 수지상세포를 확인할 수 있다. 또한, 항체를 이용하여 당업계에서 공지된 유세포 분석법 또는 다른 세포 분류(sorting) 방법에 따라 혼합된 세포 배양으로부터 미성숙 수지상세포를 분리 또는 정제할 수 있다.

[0040] **(b) 간엽줄기세포를 얻는 단계**

- [0041] 본 발명의 가장 큰 특징은 수지상세포의 면역반응 억제능을 향상시키기 위하여, 간엽줄기세포와 공동배양 한다는 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "간엽줄기세포"는 골수(bone marrow), 혈액, 진피 및 골막에서 분리되는 줄기세포로서, 다양한 세포 예컨대 지방세포, 연골세포 및 뼈세포 등으로 분화할 수 있는 전능성(pluripotent) 또는 다능성(multipotent) 세포를 의미한다. 상기 간엽줄기세포는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간의 간엽줄기세포일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 마우스의 간엽줄기세포이다.
- [0042] 간엽줄기세포는 골수 등에 매우 적은 양으로 존재하지만, 이를 분리 및 배양하는 과정은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상기 간엽줄기세포는 공지된 방법에 따라 골수의 조혈모세포로부터 부착특성에 의해 분리한 후 분화능력을 잃지 않은 상태에서 증식시켜 얻을 수 있다.
- [0043] 간엽줄기세포를 얻는 과정을 구체적인 실시예에 따라 설명하면 다음과 같다.
- [0044] 인간 또는 마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는, 인간의 간엽줄기세포 소스, 예컨대, 혈액 또는 골수로부터 간엽줄기세포를 분리한다. 상기 골수는 경골, 대퇴골, 척수 또는 장골로부터 추출할 수 있다. 이어, 골수로부터 세포를 얻고, 이들 세포를 적합한 배지에서 배양한다. 배양과정에서 부유 세포를 제거하고 배양 플레이트에 부착된 세포들을 계대 배양하여, 최종적으로 구축된(established) 간엽줄기세포를 수득한다.
- [0045] 상기 과정에서 이용되는 배지로는, 줄기세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 바람직하게는, 혈청(예컨대, 우태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지이다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 앞서 (a)의 수지상세포를 얻는 단계에서 사용되는 것과 동일한 종류가 사용될 수 있다.
- [0046] 간엽줄기세포의 확인은, 예컨대, 유세포 분석을 통하여 할 수 있다. 이러한 유세포 분석은, 간엽줄기세포의 특이한 표면 마커를 이용하여 실시된다. 예컨대, 간엽줄기세포는 CD44, CD29 및/또는 MHC 클래스 I에 대하여 양성 반응을 나타낸다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 간엽줄기세포는 표면 마커 CD44, CD29 및 MHC 클래스 I에 대하여 양성 반응을 나타내며, CD14, CD45, CD54, MHC 클래스 II 및 CD11b에 대해서는 음성 반응을 나타낸다. 줄기세포와 표면 마커를 언급하면서 사용되는 용어 "양성 반응"은 표면 마커에 대한 항체를 줄기세포에 처리하는 경우, 줄기세포의 표면 항원과 특이적으로 결합하는 양상을 의미한다.
- [0048] 상기 과정을 통하여 분리 및 구축된 간엽줄기세포는 분화 없이 증식되는 능력을 가지며, 분화유도된 경우 다양한 세포로 분화될 수 있다.

- [0049] (c) 간엽줄기세포와 상기 수지상세포를 공동배양하는 단계, 및 (d) 공동배양물로부터 상기 면역억제능력이 증가된 수지상세포를 분리하는 단계
- [0050] 상기 분리된 수지상세포와 간엽줄기세포를 공동배양 한다.
- [0051] 공동배양은 일반적인 동물세포의 배양 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이 과정에서 이용되는 배지로는, 동물세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 바람직하게는, 혈청(예컨대, 우태아 혈청, 말혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지이다.
- [0052] 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 앞서 (a)와 (b) 단계에서 사용될 수 있는 배지와 동일하다.
- [0053] 공동배양 단계에서 이용되는 수지상세포와 간엽줄기세포는 서로, 동종동계(syngeneic), 동종이계(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic)의 관계에 있는 것이다. 바람직하게는, 수지상세포와 간엽줄기세포는 서로 동종동계(syngeneic) 또는 동종이계(allogeneic)의 관계에 있는 것이다.
- [0054] 상기 간엽줄기세포와 수지상세포와의 공동배양 시간은 수지상세포가 면역억제활성을 획득하는데 충분한 시간으로서 특별하게 한정되지 않지만, 공동배양시간으로 0.1 내지 200 시간이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 공동배양시간은 1-100 시간, 보다 더 바람직하게는, 10-90 시간, 가장 바람직하게는 30-80 시간이다.
- [0055] 공동배양 시, 간엽줄기세포와 수지상세포의 개수 비율은 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게는, 간엽줄기세포의 개수 대 수지상세포의 개수의 비율은 1000:1-1:1000, 보다 바람직하게는 500:1-1:500, 보다 더 바람직하게는 100:1-1:100, 가장 바람직하게는 10:1-1:20이다.
- [0056] 간엽줄기세포는 부작성 세포이고, 수지상세포는 비부작성 세포이므로 공동배양배지로부터 부유하는 세포들을 분리함으로써, 면역억제능이 증가된 면역세포를 얻을 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 최종적으로 수득한 면역억제능이 증가된 수지상세포는, 상기 단계 (a)의 수지상세포와 비교하여 CD80의 발현이 증가되어 있다.
- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 최종적으로 수득한 면역억제능이 증가된 수지상세포는 상기 단계 (a)의 수지상세포와 비교하여 MHC 클래스 II의 발현이 증가되어 있다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 최종적으로 수득한 면역억제능이 증가된 수지상세포는 상기 단계 (a)의 수지상세포와 비교하여 CD86의 발현이 감소되어 있다.
- [0060] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 최종적으로 수득한 면역억제능이 증가된 수지상세포는 상기 단계 (a)의 수지상세포와 비교하여 CD11c의 발현이 감소되어 있다.
- [0061] 본 발명의 방법에 따르면, 면역억제능이 크게 향상된 수지상세포를 재현성 있게 효율적으로 얻을 수 있다.
- [0062] 면역억제능이 증가된 본 발명의 미성숙 수지상세포는, 본 명세서에서 “간엽줄기세포-매개 수지상세포” 라는 용어로도 표현된다. 본 명세서에서 사용된 용어 “매개된” 은 수지상세포를 간엽줄기세포에 접촉시킨다는 의미이고, 바람직하게는 간엽줄기세포와 수지상세포를 공동배양시켜 면역억제능이 증가된 수지상세포를 제조한다는 의미이다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 “간엽줄기세포-처리된 수지상세포” 는 “간엽줄기세포-매개된 수지상세포” 와 동일한 의미로 혼용된다.
- [0063] 본 발명의 간엽줄기세포와 공동배양하여 얻어진 수지상세포는 면역반응 억제능력이 매우 우수하다.
- [0064] 본 발명의 간엽줄기세포에 의해 매개된 수지상세포에 의한 면역 관용은 CD25⁺ Foxp3⁺ 특이적 Treg 세포에 의해 유도된 면역억제에 의한 결과이다. Treg 세포는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, B 세포, NK 세포 및 수지상세포를 포함하는 다양한 타입의 면역세포의 활성화, 증식, 분화 및 이펙터 기능(effector function)을 억제한다고 보고되어 있다. Treg 세포에 의해 매개되는 면역억제의 정확한 작용기전은 밝혀져 있지 않지만, TGF-β 및 IL-10과 같은 면역억제 사이토카인의 생성을 유도하거나, 또는 억제 수용체 CTLA-4에 의해 매개되는 세포-세포간 접촉에 의존하는 억제 작용기전에 의한 것으로 알려져 있다.
- [0065] 본 발명의 미성숙 수지상세포는 면역억제 작용을 하는 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 세포의 과플레이션을 현저하게 증가시키고, 면역억제 사이토카인 TGF-β의 분비를 크게 증가시킨다. 또한, IFN-γ(Th1 사이토카인)의 분비를 억제하

는 반면, IL-4 및 IL-10 (Th2 사이토카인)의 분비를 유도하며, 결국 Th1/Th2 비율을 감소시킨다. 결국, 본 발명의 수지상세포는 인 비모에서 면역억제 반응을 유도하게 된다.

[0066] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 간엽줄기세포-매개 수지상세포의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 면역반응 억제용 억제학적 조성물을 제공한다.

[0067] 줄기세포 자체는 인 비모에서 종양의 발생을 유도할 수 있는 부작용을 갖고 있다는 점을 감안한다면, 간엽줄기세포-매개된(처리된) 본 발명의 수지상세포를 투여하는 것은 줄기세포 자체를 투여하지 않고도 줄기세포가 갖고 있는 면역반응억제의 효과와 동등하거나 그 이상의 효과를 기대할 수 있다는 점에서 이점이 매우 크다.

[0068] 본 명세서에서 사용된 용어 “면역반응 억제용”은 수용자(recipient)에서 면역반응을 억제하는 용도를 의미한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 면역반응의 억제가 필요한 수용자에게 투여하여 면역반응을 효과적으로 억제하는 용도로 사용될 수 있으며, 이는 다양한 질환 또는 질병의 치료 효능을 나타낸다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 “수용자”란 면역 질환으로부터 고통받거나 또는 이식된 조직 또는 기관의 면역 거부 위험이 있는 동물을 의미하며, 바람직하게는 인간 및 쥐와 같은 포유류 동물을 의미하며, 가장 바람직하게는 인간이다.

[0070] 본 발명의 억제학적 조성물은 간엽줄기세포-처리된 면역억제능이 증가된 수지상세포를 유효성분으로 포함한다. 이 수지상세포는 상술한 본 발명의 수지상세포와 동일하기 때문에, 이 둘 사이에 공통되는 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0071] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 간엽줄기세포-매개 수지상세포는 수용자의 미성숙 수지상세포로부터 유래한 자가유래(autologous) 또는 수용자와 유전적으로 동일한 동종동계(syngeneic)이다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 수지상 세포는 자가유래의 것이다. 이 경우, 미성숙 수지상세포는 수용자의 세포-유래한 것이기 때문에 억제학적 조성물의 투여 시 면역 반응의 문제가 없고 안전하다는 이점이 있다.

[0072] 본 발명의 억제학적 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질병 또는 질환은, 면역반응을 억제하여 예방 또는 치료될 수 있는 모든 질환을 포함한다. 가장 대표적인 질환 또는 질병은, 자가면역질환, 염증성 질환 및 이식 거부(graft rejection)이다.

[0073] 본 발명의 억제학적 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 자가면역질환의 예는 알로페시아 그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 아디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유선포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 면역이상 증후군, 만성염증성 탈수초 다발성 신경병증, Churg-Strauss 증후군, 반흔성유선포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론씨병, 원판성 낭창, 북태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이트브스 질환, 켈레인 바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA 신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합성 연결 조직 질환, 다발성 경화증, 타입 I 또는 면역-매개 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군, 류마티스 다발성근통, 다발성 근염과 피부근염, 일차성 무감마글로불린혈증, 일차성 담증성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이더 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명의 억제학적 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 자가면역질환은 류마티스 관절염, 타입 I 당뇨병, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스 및 아토피를 포함한다.

[0074] 본 발명의 억제학적 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 염증성 질환의 예는, 천식, 엔세팔리티스(encephalitis), 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 알러지, 폐혈병성 쇼크증, 폐섬유증, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 억제학적 조성물은 이식된 조직, 기관 또는 세포에 대해 면역 거부 반응을 억제하는 데 유용하다. 본 발명의 면역억제용 조성물은 수용자의 상태를 악화 또는 심화시키는 것을 예방하는데 효과적이다. 예를 들어, 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM), 즉 타입 I 당뇨병은 인슐린을 분비하는 랭게르한스 섬의 β 세포에 대한 자가 면역 반응으로부터의 결과인 것으로 믿어지는 자가 면역 질환이다. 랭게르한스 섬의 β 세포의 완전한 파괴 전에 IDDM의 초기 단계로 고통받는 수용자의 치료는 잔존하는 인슐린 분비 β 세포의 추가의 파괴를 예방하거나 또는

억제하기 때문에, 질병이 더욱 진전하는 것을 예방하는데 유용하다.

[0076] 표준 임상 시험 및 실험실 시험 및 방법에 근거하여, 당업자로서 참석한 진단 전문 의사는 면역반응 억제의 치료 또는 예방이 필요한 수용자를 쉽게 판정할 수 있다.

[0077] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0078] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구로 투여된다. 비경구로 투여되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다. 예컨대 타입 I 당뇨병에 적용되는 경우, 복강투여가 가장 바람직하고, 이는 투여된 수지상세포가 회석되지 않고 효과적으로 채장으로 이동할 수 있기 때문이다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물이 관절염 환자에 적용되는 경우에는 정맥내 주사로 투여될 수 있지만, 가장 바람직하게는 국부적으로 관절내 주입으로 투여된다.

[0079] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 수용자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^{12}$ cells/kg (체중)이다.

[0080] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0081] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 자가유래 수지상세포를 간엽줄기세포와 공동배양한 후, 그 공동배양물로부터 간엽줄기세포를 제거하여 면역반응 억제능력이 증가된 자가유래 수지상세포만을 수용자에게 투여하는 방법을 제공한다.

[0082] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0083] **[실시예]**

[0084] **마우스 골수 유래 간엽줄기세포의 제조**

[0085] 6주 암컷 Balb/c 마우스들(오리엔트 바이오, 경기도, 대한민국)의 경골 및 대퇴골로부터 골수를 추출하였다.

[0086] 골수를 PBS (phosphate-buffered saline)를 사용하여 원심분리(1500rpm, 3분)에 의해 세정한 후, 세포들을 LG (low glucose)-DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 15% 우태아 혈청(FBS, RH Biosciences, Lenexa, KS, USA), 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 및 1% 항생제-항진균제 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)를 포함하는 배지에 현탁시키고, T75 플라스크에 플레이팅하였다.

[0087] 5 내지 7일 배양 후에 부유하는 세포들은 제거하고 부착된 세포들을 계속 배양하였다. 배양을 37°C에서 5% CO2를 포함하는 환경에서 진행하였고, 배양액은 3 내지 4일 마다 교체하였다. 세포들이 50 - 60%의 콘플루언스에 도달하였을 때 0.1% 트립신-EDTA를 이용해서 분리한 후 다른 배양 플라스크에서 2×10^3 세포/cm²의 농도로 다시 플레이팅 하였다. 관련된 특정 표면 마커의 유세포 분석(flow cytometric analysis)에 의해 동질의 부착세포를 분석하였다(다음의 “FACS 분석” 부분 참조). 4-7 세대 다양한 세포들을 추가의 세포 분석 및 분화 실험에 사용하였다.

[0088] **골수 유래 간엽줄기세포의 분화**

[0089] 지방세포로의 분화를 유도하기 위해, 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸크산틴(IBMx), 1 µM 히드로코르티손, 및 0.1 mM 인도메티신(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 LG-DMEM으로 이루어진 지방세포 분화용 배지에서 2

주간 배양하였다.

- [0090] 중성 지질 액포(vacuole)들의 형성을 확인하기 위해 위상차 현미경으로 세포의 형태를 검사하였으며, 중성 지질의 존재는 오일-레드 O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 염색하여 시각화하여 확인하였다.
- [0091] 뼈세포로의 분화를 위해서 부착 세포를, 10% 우태아혈청, 10 mM β -글리세로포스페이트, 100 nM 텍사메타손, 및 30 μ M 아스코르베이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 LG-DMEM 배지로 이루어진 뼈세포 분화용 배지에서 2 주간 배양하였다. 뼈세포로의 분화는 알카라인 포스파타아제(ALP) 염색으로 평가하였다. ALP 염색을 위해서, 단층의 세포들을 4% 포름알데히드로 미리고정하고 웨스턴 블루 안정화 기질(Promega, Madison, WI, USA)을 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다.
- [0092] 연골세포로의 분화를 위해서, 15 ml 폴리프로필렌 튜브 내에서 약 5×10^6 세포들을 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 튜브의 바닥에 펠LETED 마이크로 매스(micromass)를 형성시키고, 1 mM 피루베이트, 0.1 mM 아스코르베이트 2-포스페이트, 100 nM 텍사메타손, ITS + 프리믹스(6.25 μ g/ml 인슐린, 6.25 μ g/ml 트랜스페린, 6.25 μ g/ml 셀렌산, 5.35 μ g/ml 리놀렌산, 및 1.25 mg/ml 소 혈청 알부민), 35 nM L-프롤린 및 10 ng/ml 재조합 인간 TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 LG-DMEM 배지로 이루어진 연골세포 분화용 배지에서 5주간 배양하였다.
- [0093] 연골세포로의 분화는 사프란인 레드 O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 마이크로 매스를 조직화학적으로 염색하여 확인하였다.

[0094] **골수 유래 미성숙 수지상세포의 생성**

- [0095] 마우스 골수 유래 미성숙 수지상세포(imDC)를 6-7 주의 암컷 Balb/c 마우스로부터 얻었다. 거즈로 대퇴골 및 경골로부터 모든 근육 조직을 제거한 후, 뼈를 60 mm 배양접시에 70 % 알코올과 함께 수초동안 두고, PBS로 2회 세척하고, RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)와 함께 새로운 배양접시로 옮겼다.
- [0096] 배양접시에서 뼈의 양쪽 말단을 가위를 사용하여 자르고, 골수를 주사기 및 26-게이지 주사바늘로 1 ml의 RPMI 1640을 사용하여 추출해내었다. 조직을 현탁시키고, 나일론 메쉬를 통과시켜 작은 뼈 조각과 부스러기를 제거하고, 적혈구를 ACK 용해 버퍼(Cambrex Bio Science, Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA)를 사용하여 용해시켰다.
- [0097] 얻은 골수 세포들을 6-웰 플레이트에서 웰당 1×10^6 세포농도로, 10 % 우태아혈청(FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 1/1000-희석된 β -머캅토포에탄올(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 10 ng/ml의 마우스 재조합 GM-CSF 및 10 ng/ml의 마우스 재조합 IL-4가 첨가된 RPMI 1640 에서 배양하였다.
- [0098] 세포들을 5 % CO₂ 및 95 % 습도의 환경에서 37 °C의 온도에서 배양하였으며, 이틀째에 상등액을 제거하고 동일한 첨가물이 첨가된 새로운 배지로 교체하였고, 전형적인 실험을 6일째의 배양에서 비부착 세포군 및 약하게 부착된 세포군에 대해 수행하였다.
- [0099] 성숙 수지상세포(mDC)를 얻기 위해서, 미성숙 수지상세포를 1 μ g/ml 리포폴리사카라이드(LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양 최종단계에서, 유세포 분석(“FACS 분석” 참조)에 의해서 관련된 특정 표면 마커를 갖는 세포들의 특성을 분석하였다.
- [0100] 또한, 간엽줄기세포로 매개된 미성숙 수지상세포들의 특성을 분석하기 위해서, 1×10^5 MSC/ 1×10^6 imDC의 비율로 세포들을 플레이팅하고 10 % 우태아혈청이 첨가된 RPMI 1640에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 배양 후에 현탁된 세포들을 특정 표면 마커로 분석하였다.

[0101] **혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR)에 의한 T reg 세포 파플레이션 및 TGF- β 분비의 조사**

- [0102] Balb/c 마우스의 비장으로부터 비장림프구들을 분리하고 이를 RPMI 1640 배지에서 해체시켰다. 이들 중의 적혈구들을 ACK 용해 버퍼로 상온에서 5분 동안 용해시키고 PBS에서 세정하였다. 준비된 세포들(1×10^6 imDC 및 1×10^5 MSC)을 5×10^6 비장림프구들과 함께 6 웰 플레이트에서 72시간 동안 배양시켰다. 자세한 방법은, MSC를

계수하여 먼저 플레이팅해서 안정화시킨 후, 약 24시간이 경과되면 수지상세포와 비장림프구 또는 CD4⁺ T 세포를 (하기의 분리방법 참조) 함께 배양시켰다. 공동배양과정은 모두 상기의 방법에 준하였다.

[0103] 혼합림프구반응 배양에서 T reg 세포 과플레이션 및 TGF-β 분비의 변화를 조사하기 위해, 각 배양 기간의 종료 시점(6, 24, 48 및 72 시간)에서 공동배양 배지에 현탁된 세포들을 원심분리(1500 rpm, 3 분)에 의해 수집하였다. 상등액 및 펠렛을 TGF-β ELISA 및 Foxp3 (CD4⁺ CD25⁺ T reg 세포-특이적) FACS 또는 TGF-β RT-PCR 분석에 각각 사용하였다. 또한, MSC들을 RT-PCR 분석을 위해서 공동배양배지로부터 분리하였다.

[0104] **Th1/Th2 반응의 평가**

[0105] Th1 사이토카인 IFN-γ 및 Th2 사이토카인 IL-4 수준에 대한 정량 분석을 CD4⁺ T세포를 사용하여 24, 42, 및 72 시간 MLR 배양 배지로부터의 상등액에 대해 ELISA를 행함으로써 수행하였다.

[0106] CD4⁺ T세포들은 CD4 MicroBeads mouse kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)를 사용하여 비장림프구로부터 분리하였으며, CD4⁺ T세포들을 MACS 마그네틱 분리기 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) 내의 마그네틱-활성화 세포 선별기 MS 컬럼을 통해 세포 현탁액을 통과시켜 분리하였다.

[0107] 이어서, 컬럼에 부착된 CD4⁺ T세포들을 본 분석에 이용하였으며, IL-10 수준을 정량적으로 분석하기 위해 상기 샘플에 대해 ELISA를 행하였다.

[0108] **FACS 분석**

[0109] 유세포 분석을 위해, MSC을 0.1 % 트립신-EDTA로 처리하고, 탈착된 세포들을 PBS로 세정하고, 이들을 플루오레신이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 또는 파이코에리트린(phycoerythrin, PE)과 콘주게이트된, CD11b, CD14, CD29, CD44 (β1 인테그린), CD45, 조직적합성항원(MHC) 클래스 I, 및 MHC 클래스 II의 세포-특이적 항체와 함께 인큐베이션하였다.

[0110] 또한, 미성숙 수지상세포와 간엽줄기세포-매개된 미성숙 수지상세포를 수집한 후에 PBS로 세정하고, CD11c, CD40, CD80, CD86, 및 MHC 클래스 II 항체(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 표지하였다. T reg 세포 과플레이션(population)을 조사하기 위해, 비장림프구 또는 CD4⁺ T세포들을 미성숙 수지상세포 및/또는 간엽줄기세포와 함께 배양하고, CD25 및 Foxp3 항체들로 표지하였다.

[0111] 표지된 세포들을 PBS로 세정한 후, CellQuest 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 상에서 분석하였다.

[0112] **ELISA**

[0113] 혼합림프구반응 배양 배지 상등액에서 TGF-β, IFN-γ, IL-4 및 IL-10 농도를 상업적으로 구입 가능한 키트(R&D systems, Abington, OX, UK)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0114] **RT-PCR**

[0115] 미성숙 수지상세포 + 간엽줄기세포의 공동배양으로부터 현탁된 세포(미성숙 수지상세포) 또는 부착된 세포(간엽줄기세포)들을 수집하고 차가운 PBS로 세정하였다.

[0116] 총 RNA를 RNeasy Mini isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다. RT-PCR을 위해 제1의 cDNA 가닥을 SuperScript™ III First-strand Synthesis System (Invitrogen, California, CA, USA)을 사용하여 합성하였다. 초기 변성(denaturation)은 95℃에서 5분간 수행하였다. PCR 증폭은 DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 사용하여, 95 °C에서 30 초, 57 °C에서 30 초, 및 72 °C에서 30초의 총 35 사이클과, 72 °C에서 7분의 최종 연장으로 수행하였다.

- [0117] 각 분자에 대해 다음의 센스 및 안티센스 프라이머를 사용하였다:
- [0118] mTGF- β (187 bp), (sense) 5' -tgcgcttgacagatataaaa-3', (antisense) 5' -agccctgtattccgtctcc-3'; (Bionics, Guro, Korea).
- [0119] PCR 생성물을 1% 아가로스(Promega, Madison, WI, USA) 겔 전기영동에 의해 분획화하고 각 밴드들을 에티디움 브로마이드(EtBr) 염색에 의해 시각화하였으며, 폴라로이드 667 (Polaroid Corporation, Waltham, MA, USA)로 사진을 찍었다.
- [0120] **B16 멜라노마 세포를 이용한 종양의 동종이식 분석**
- [0121] B16F10 멜라노마 세포들, 간엽줄기세포, 미성숙 수지상세포, 미성숙 수지상세포 + 간엽줄기세포 및 간엽줄기세포-매개된 미성숙 수지상세포(72시간 공동배양 후의 미성숙 수지상세포)들을 단일-세포 타입의 현탁액(1×10^6 세포/100 μ l의 PBS) 또는 세포들의 혼합 타입(1×10^6 imDC 및 1×10^6 MSC/200 μ l PBS)으로 준비하였다. 7-내지 8-주의 Balb/c 마우스(B16 세포에 대한 동종이식 수용자)를 사용하여 왼쪽 복부 부위에 면역억제 세포들의 피하 투여를 행하였다.
- [0122] 면역억제 세포 주입 직후에, B16 멜라노마 세포들을 적어도 2 cm (오른쪽 측면)의 거리에서 피하 이식하였다. 마우스는 일주일에 3회 검사하였고 종양 덩이의 길이와 너비(부피 = 길이 \times 너비² / 2)를 측정하여 종양의 성장을 평가하였다. 종양은 30 mm³ 이상의 부피에 도달할 때까지 모니터하였다. 결과들은 종양의 발생(%), 양성 : 30 mm³ 이상의 종양 덩이를 갖는 마우스)으로 나타내었다. 인 비보 면역현상을 조사하기 위해, 실험 7일째에, 일부 동물들을 희생시키고 비장과 혈청을 사용하여 면역 상태를 분석하였다.
- [0123] **통계분석**
- [0124] 통계학적 유의성(P < 0.05)은 two-tailed Student's t-테스트 또는 Mann-Whitney U-테스트를 사용하여 결정하였다.
- [0125] **[실험결과]**
- [0126] (1) 유세포 측정법에 의한 간엽줄기세포의 특성분석 및 이의 분화 다능성 확인.
- [0127] 세포표면 항원의 발현을 LG-DMEM에서 4 세대 후에 얻어진 간엽줄기세포에 대해 유세포 분석에 의해 평가하였다. 이들 세포들은 조혈모세포 마커(CD14, CD45 및 CD54)에 대해서는 반응하지 않았지만, 어드히전(adhesion) 분자(CD29 및 CD44) 및 MHC 클래스 I에 대해서는 양성(positive)을 나타내었다. 세포들은 MHC 클래스 II뿐만 아니라 마이엘로이드 DC 마커 CD11b에 대해서도 음성(negative)을 나타내었으며, 이렇다.
- [0128] 배양한 간엽줄기세포를 다른 타입의 세포로 분화하는 능력에 대해 테스트하는 실험을 하였다. 지방세포 분화용, 뼈세포 분화용 및 연골세포 분화용 배지에 적용하였을 때, 간엽줄기세포들은 지방세포, 뼈세포 및 연골세포로 각각 명확하게 분화하였으며, 이는 분리된 마우스 간엽줄기세포들이 다른 타입의 세포로 분화되는 다능성을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0129] (2) 간엽줄기세포-매개 미성숙 수지상세포는 전형적인 수지상세포 마커들을 발현하지만 표면 마커가 성숙 수지상세포의 것과 비교하여 낮은 수준으로 발현됨.
- [0130] 미성숙 수지상세포(imDC)가 간엽줄기세포(MSC)에 의해 매개될 때의 표현형을 전형적인 수지상세포(DC) 마커를 사용하여 FACS 분석법으로 조사하였다.
- [0131] 간엽줄기세포-매개된 미성숙 수지상세포는 전형적인 수지상세포 마커들을 발현하였지만, 마커가 성숙 수지상세포의 것과 비교하여 매우 낮은 수준으로 발현되었고, 미성숙 수지상세포의 것과 비교하여 비슷한 수준으로 표면 마커들이 발현되었다.

- [0132] 그러나, 미성숙 수지상세포를 간엽줄기세포와 공동배양하였을 때, 표면상에서 CD80 (공동자극분자, B7-1)의 발현이 점차 증가하는 것이 확인되었다. 한편, 간엽줄기세포-매개된 미성숙 수지상세포는 미성숙 수지상세포 단독의 것과 비교하여 CD86 (B7-2)가 낮은 수준으로 발현되었다.
- [0133] **(3) 간엽줄기세포 및 미성숙 수지상세포와 함께 공동배양된 비장림프구로부터 Foxp3⁺ T reg 세포 파플레이션이 현저하게 유도됨.**
- [0134] Foxp3⁺ T reg 세포의 파플레이션이 간엽줄기세포(MSC) 및 미성숙 수지상세포(imDC)와 함께 배양된 비장림프구로부터 유도될 수 있는지를 조사하기 위해서, 간엽줄기세포, 미성숙 수지상세포 및 비장림프구를 공동배양하였다. 다른 분자들(예를 들어, CD45RB, CD38 및 CD62L)이 면역억제 활성을 갖는 T reg 세포를 검출하기에 충분히 특이적이지 못한 반면에, Foxp3 (forkhead box P3 전사인자)는 현재 가장 특이적인 T reg (CD4⁺ CD25⁺ T 세포) 마커이다(30, 31).
- [0135] CD25⁺ Foxp3⁺ T reg 세포의 파플레이션이, 다른 세포들의 조합과 공동배양된 비장림프구의 것과 비교하여, 간엽줄기세포(MSC) + 미성숙 수지상세포(imDC) 공동배양(40.11 %, 72 시간)에 의해 매개된 비장림프구로부터 현저하게 유도된다는 것을 확인할 수 있다.
- [0136] T reg 세포 파플레이션은 T 세포 증식준비(priming) 단계(24 시간) 동안 모든 테스트 그룹의 비장림프구로부터 현저하게 유도되었고, 그 이후에 파플레이션이 빠르게 감소하거나 유지되었지만, 배양 후 72 시간에서는 오직 간엽줄기세포(MSC) + 미성숙 수지상세포(imDC)로 공동배양된 비장림프구로부터만 급격하게 증가하였다. 또한, Treg 세포가 T 세포 증식준비 단계 동안 간엽줄기세포 단독으로만 공동배양된 비장림프구에서 가장 높은 수준까지 현저하게 증가되고 이후에는 신속하게 감소한다는 것을 확인하였다.
- [0137] 결과적으로 이들 데이터는 면역 억제 활성을 갖는 Foxp3⁺ T reg 세포의 파플레이션이 시간 경과에 따라 오직 간엽줄기세포 + 미성숙 수지상세포만에 의해 공동배양된 비장림프구로부터만 현저하게 유도된다는 것을 보여준다.
- [0138] 이러한 결과에 의하면 비장림프구를 미성숙 수지상세포 + 간엽줄기세포와 함께 배양하면, 간엽줄기세포 및 미성숙 수지상세포에 의해 초기 T 세포를 Treg 세포로 유도함으로써 T 세포 증식준비 단계 이후에 면역억제활성의 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 세포 파플레이션을 현저하게 증가시킨다는 것을 알 수 있다.
- [0139] **(4) 간엽줄기세포 + 미성숙 수지상세포 + 비장림프구 공동배양 상등액에서 면역억제 사이토카인인 TGF-β의 분비를 미성숙 수지상세포 또는 간엽줄기세포 + 비장림프구 공동배양에서 보다 현저하게 유도.**
- [0140] 비장림프구(splenocyte) 또는 CD4⁺ T세포 + imDC + MSC 공동배양에 의해 면역억제 작용제인 TGF-β의 분비가 유도되는지 조사하기 위해, 배양 상등액을 수집하고 ELISA에 의해 분석하였다.
- [0141] TGF-β 분비는 간엽줄기세포(MSC) 또는 미성숙 수지상세포(imDC) + 비장림프구의 공동배양(각각 177 ± 3.5 pg/ml 및 212 ± 0.5 pg/ml)과 비교해서, 72 시간 공동배양의 시점에서 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) + 비장림프구 배양 상등액에서 현저하게(282 ± 2.0 pg/ml) 유도되었다.
- [0142] 마찬가지로, 비장림프구로부터 분리된 CD4⁺ T세포를 사용한 공동배양 실험 역시 상기 결과와 매우 유사한 경향을 보여주었다.
- [0143] 또한, RT-PCR 분석에 의하면, TGF-β 전사가 72 시간 imDC 단독 배양과 비교해서 72 시간의 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) 공동배양의 미성숙 수지상세포(imDC)에서 높게 발현된다는 것을 알 수 있었으며, 24 시간 배양 후에 TGF-β 전사가 미성숙 수지상세포(imDC) 배양 및 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) 공동배양 모두에서 높게 발현되었지만, 배양 후 72시간에서는 미성숙 수지상세포(imDC) 단독 배양 시 현저하게 감소하였다.
- [0144] 반면 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) 공동배양의 미성숙 수지상세포(imDC)에서는 약간 감소하였으며, 이는 미성숙 수지상세포(imDC)가 간엽줄기세포로 매개된다면 세포내 수준에서 지속되는 면역억제 능력을 확실히 획득한다는 것을 나타낸다.

- [0145] 한편, TGF- β 전사는 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) 공동배양의 간엽줄기세포에서 매우 높게 발현되었고, IL-12의 전사는 검출되지 않은 반면에, IL-10 전사는 모든 사용된 세포내에서 비슷한 수준으로 검출되었다. 이들 결과들은 미성숙 수지상세포(imDC)가 간엽줄기세포에 의해 매개되었을 때 세포내 수준에서 더욱 현저하게 면역억제 환경을 유도할 수 있다는 것을 암시하는 것이다.
- [0146] (5) 간엽줄기세포 + 미성숙 수지상세포 + CD4⁺ T세포 공동배양은 미성숙 수지상세포 + CD4⁺ T세포 공동배양과 비교해서 상등액에서의 Th1 사이토카인 IFN- γ 의 분비를 현저하게 감소시킴.
- [0147] 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) + CD4⁺ T세포 공동배양이 Th1 사이토카인의 생성을 억제할 수 있는지와 Th2 사이토카인의 분비를 유도할 수 있는지를 조사하기 위해서, 배양 상등액을 수집하여 ELISA로 분석하였다.
- [0148] 간엽줄기세포(MSC) + 미성숙 수지상세포(imDC) + CD4⁺ T세포 공동배양은 시간 경과에 따라 미성숙 수지상세포(imDC) + CD4⁺ T세포 공동배양에 의해 높아진 Th1 사이토카인 IFN- γ 의 분비(77 \pm 1.9 pg/ml, 72시간)를 현저하게 억제(9.5 \pm 2.1 pg/ml, 72 시간)했는데, 이에 의해, Th1 반응이 감소된다는 것을 알 수 있다.
- [0149] 또한, Th2 사이토카인 IL-4의 분비는 간엽줄기세포(MSC) + CD4⁺ T세포 공동배양(18.5 \pm 0.2 pg/ml)과 비교하여, 미성숙 수지상세포(imDC) + 간엽줄기세포(MSC) + CD4⁺ T세포 72 시간 공동배양의 배양 상등액에서 높은 수준(26.5 \pm 0.5 pg/ml)으로 유도되었으나, 미성숙 수지상세포(imDC) + CD4⁺ T세포 공동배양(28.9 \pm 1.3 pg/ml, 72 시간)과 비교하여 IL-4 분비의 유도를 약간 감소시켰다(도 5의 패널 B). 또한, 간엽줄기세포(MSC) + 미성숙 수지상세포(imDC) + CD4⁺ T 세포 공동배양은 다른 Th2 사이토카인으로 알려진 IL-10의 분비를 전체적으로는 낮은 수준이지만, 다른 공동배양 시스템과 비교하여 현저하게 높은 수준까지 유도하였다.
- [0150] 상기 결과들은 아마도 Th1/Th2 비율을 감소시킴으로써, 간엽줄기세포(MSC) + 미성숙 수지상세포(imDC) + CD4⁺ T 세포 공동배양에 의해 유도되는 Th1/Th2 사이토카인 생성 패턴이 미성숙 수지상세포(imDC) 또는 간엽줄기세포(MSC) + CD4⁺ T세포 공동배양에 의해 유도되는 것과 명확히 다르다는 것을 보여주는 것이다.
- [0151] (6) B16 멜라노마 세포들은 간엽줄기세포-매개 미성숙 수지상세포와 함께 공동 주입되었을 때 Balb/c 동종이형(allogenic) 마우스에서 거부반응을 일으키지 않음.
- [0152] 간엽줄기세포-매개 미성숙 수지상세포를 사용함으로써 MHC-불일치 동종이형 수용자에게 종양 세포들이 이식될 수 있는지를 조사하였다.
- [0153] 면역억제 세포들의 면역조절 특성을 테스트하기 위해서, 미성숙 수지상세포, 간엽줄기세포, 간엽줄기세포+ 미성숙 수지상세포의 혼합물, 및 간엽줄기세포-매개 미성숙 수지상세포의 존재 또는 부존재의 경우 각각에서 동종이형 Balb/c 마우스에 B16 멜라노마 세포들을 이식하였다. 특히 전신적인 면역억제 효과를 검사하기 위해서 B16 멜라노마 세포들을 면역억제 세포 주입직후에 적어도 2cm 거리를 두고 피하에 이식하였다.
- [0154] 종양의 성장을 대조군으로서 동종동형(syngeneic)의 C57BL/6 마우스(100% 종양 발생)에 이식된 B16 세포들의 것과 비교하였다.
- [0155] 미성숙 수지상세포만으로 이식된 그룹을 제외한 모든 테스트 그룹 중에서, 최초 11일 동안 종양 발생은 100%였다 (이들 종양 발생은 세포이식 후, 약 80일까지 유지되었으나 그 후, 사라졌다.).
- [0156] 또한, B16 세포만을 이식받은 동종이형 Balb/c 마우스의 대조군 그룹에서는 종양형성이 발견되지 않았으며, 이는 간엽줄기세포에 의해 매개되지 않은 미성숙 수지상세포에 의해서는 면역억제효과가 충분하지 않다는 것을 보여주고 있다.
- [0157] 이들 결과들을 종합하면 간엽줄기세포-매개 미성숙 수지상세포가 간엽줄기세포와 유사한 면역억제 효능을 보였고, 적어도 Foxp3 특이적 T reg 세포 파플레이션의 증가에 의한 강한 면역억제 효과를 유도한다는 것을 암시한다.

[0158] 또한, 미성숙 수지상세포와 비교하여 간엽줄기세포-매개 미성숙 수지상세포가 면역억제효과가 현저하다는 것을 확인할 수 있다.

[0159] 이상으로 본 발명의 특징부를 상세히 기술하였으며, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물인 균등범위에 의하여 정하여진다.