(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0064292
(43) 공개일자 2024년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A23K 10/20* (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A23K 10/20 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2022-0146120
(22) 출원일자 2022년11월04일
심사청구일자 2022년11월04일

(71) 출원인
스템엑소원 주식회사
대전광역시 유성구 엑스포로446번길 38 ,3층302-8호(문지동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
조쌍구
서울특별시 서초구 서초중앙로 242, 501동 801호(반포동, 삼호가든맨션)
임재열
서울특별시 강남구 언주로63길 20(역삼동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 16 항

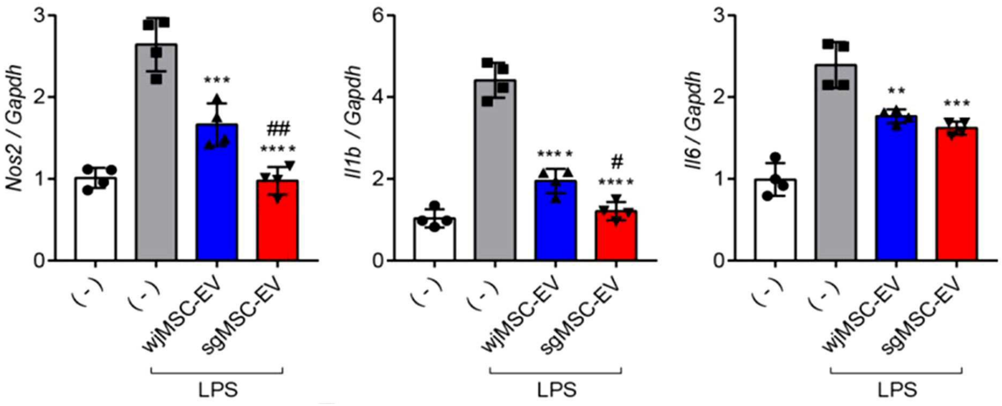
(54) 발명의 명칭 **탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체를 포함하는 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체를 포함하는 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체는 NO의 생성, 및 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 효능을 가지고 있으므로, 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2b



(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
A61K 8/981 (2013.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61Q 19/00 (2013.01)
C12N 5/0665 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/204 (2013.01)

(72) 발명자
임경민
서울특별시 광진구 군자로4길 5, 203호(화양동)
김동현
경기도 고양시 덕양구 충경로 149, 104동 401호(행신동, 소만마을1단지아파트)
조재민
서울특별시 서대문구 연희로10가길 51-8, 연세팰리스 206호(연희동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711154232
과제번호	2020M3A9I4039045
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	차세대바이오유망범용기술연구지원
연구과제명	도관 내 전달이 가능한 타액선줄기세포 유래 기능성 엑소좀 기반 타액선질환 치료기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465037278
과제번호	RS202200070411
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명	범부처재생의료기술개발사업
연구과제명	난치성 간질성방광염/방광통증증후군의 근본적 원인 극복을 위한 Advanced 3차원 줄기세포 엑소좀 치료제 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	스템엑소원(주)
연구기간	2022.04.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포체는 miR-93-5p, miR-484, miR-150-5p 및 miR-615-3p 중에서 선택되는 1종 이상의 miRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포 내 NO의 생성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 IL-1β 및 IL-6 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물은 Arg1(Arginase1), Mrc1(CD206) 및 Ym1(chitinase 3-like 3) 중에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포체는 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 수득되는 것을 특징으로 하는 조성물:

a) 탯줄 또는 타액선으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계;

b) 상기 분리된 탯줄 또는 타액선 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계;

c) 상기 단계 b)의 배양액을 수집하고 원심분리를 통해 상기 줄기세포를 제거하는 단계; 및

d) 상기 원심분리를 통해 수득한 상층액을 밀도 구배 초원심분리하는 단계.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포체는 50 - 300 nm의 평균직경을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 상기 세포외 소포체를 10^{6} 내지 10^{14} 개/mL 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 폐쇄성 타액선염(obstructive sialadenitis), 방광염, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 쇼그렌증후군(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베쳇병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative olitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 및 크론병(Crohn's disease) 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 염증성 질환은 폐쇄성 타액선염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 15

탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 항염증용 화장료 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 스킨, 스킨 소프트너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이 크림, 모이스쳐 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디로션, 바디클렌저, 비누 또는 파우더로 제형화되는 것을 특징으로 하는, 항염증용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체를 포함하는 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증은 물리적 또는 화학적 외상, 박테리아, 곰팡이 또는 바이러스에 의한 감염, 각종 알레르기 유발 물질 등에 의하여 야기되는 병리적 상태에 대응하여 나타나는 생체의 방어 반응이다. 염증반응은 선천성 면역 반응의 일환으로 나타난다. 염증반응에는 다양한 물질 및 생리·화학적 현상이 관여하는데, 최근의 연구에 따르면 다양한 염증성 사이토카인이 염증반응에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 염증반응에 관여하는 주요 사이토카인으로는 IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-β 등이 있으며, 이들의 발현량 및 분비량 증가와 활성화는 염증매개물질 분비, 면역세포 침윤, 세포 이동 및 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열 및 통증 등의 증상과 관련이 있다.

[0003] 일반적으로, 염증 반응은 감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하면 큰 문제가 되지 않고 질환 부위가 정상으로 회복되지만, 감염원이 제거되지 않거나 내부 물질이 원인이 되어 염증 반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 급·만성 염증성 질환을 유발하게 된다. 염증 반응이나 이로 인한 염증성 질환의 완화 내지는 치료를 위해 비스테로이드계 항염제, 스테로이드계 항염제, 신경 펩타이드 길항제, COX 억제제, 항히스타민제, 및 사이클로스포린 A와 같은 면역 억제제를 사용하지만, 피부 위축, 혈관 확장, 색소 탈실, 과민 반응, 내성, 및 호중구감소증(neutropenia) 등의 부작용을 일으키는 문제점이 있다. 또한, 이들 약제는 근본적인 치료보다는 증상을 적절한 수준으로 조절하는데 도움을 주는 한계도 있다.

[0004] 최근에는 천연물을 이용한 염증성 질환 치료제 개발에 대한 연구가 활발하다. 이러한 천연물을 원료로 하는 염증성 질환 치료제의 경우, 천연 추출물 내의 유효성분 함량이 적은 관계로 항염 효과를 얻기 위해서는 많은 양의 투여가 필요하고, 이들 중 대부분은 천연물 소재라는 점을 마케팅에 활용하고 있을 뿐 실질적인 항염 효능에 대해서는 과학적 연구가 좀 더 필요한 상황이다.

[0005] 또한, 최근 세포 분비물(secretome)에 세포의 행동(behavior)을 조절하는 다양한 생체활성인자가 포함되어 있다는 연구가 보고되고 있으며, 특히 세포 분비물 내에는 세포 간 신호전달 기능을 갖는 '엑소좀(exosome)' 또는 '세포외 소포체(extracellular vesicle)'가 포함되어 있어 그 성분과 기능에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

[0006] 세포외 소포체(Extracellular Vesicles)는 인간과 동물은 물론, 곤충, 식물, 미생물 등 다양한 진핵 세포에서 분비되는 다양한 크기의 지질 이중막 구조의 소포체로서, 이 중 나노수준의 입경을 가지는 미세 소포체를 엑소좀(exosome)이라 한다. 엑소좀은 세포가 함유하는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하면서, 지질 이중층으로 이들 분자들을 안정적으로 보호하고 분비 후 다른 세포로 이들을 전달하는 정보 전달 역할을 한다.

[0007] 또한, 세포외 소포체는 분비하는 기원 세포(공여 세포)의 상태를 반영하며, 어떤 세포에서 분비되었는가에 따라 다양한 생물학적 활성을 나타내고, 세포들 사이에 유전 물질과 단백질을 옮기면서 세포 간 상호작용에 중요한 역할을 한다.

[0008] 이러한 세포외 소포체를 종래에는 주로 바이오마커로 사용하여 왔을 뿐이고, 세포외 소포체 자체의 효능을 이용하여 세포외 소포체를 특정 용도로 사용하는 기술은 아직 개발이 미흡한 실정이다.

[0009] 따라서, 본 발명자는 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체가 염증 억제 효과를 갖는 의약품, 식품, 화장품 등의 제조에 응용할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-2360077 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 염증성 질환의 치료 또는 개선용 식품 조성물 및 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 항염증용 화장료 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 세포외 소포체는 50-300 nm의 직경을 가지는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 세포외 소포체는 miR-93-5p, miR-484, miR-150-5p 및 miR-615-3p 중에서 선택되는 1종 이상의 miRNA를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 세포 내 NO의 생성을 감소시키는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키는 것일 수 있다.

[0020] 상기 염증성 사이토카인은 IL-1β 및 IL-6 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 Arg1(Arginase1), Mrc1(CD206) 및 Ym1(chitinase 3-like 3) 중에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 세포외 소포체는 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 수득되는 것일 수 있다:

[0023] a) 탯줄 또는 타액선으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계;

[0024] b) 상기 분리된 탯줄 또는 타액선 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계;

[0025] c) 상기 단계 b)의 배양액을 수집하고 원심분리를 통해 상기 줄기세포를 제거하는 단계; 및

[0026] d) 상기 원심분리를 통해 수득한 상층액을 밀도 구배 초원심분리하는 단계.

[0027] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체가 10^6 내지 10^{14} 개/mL 농도로 포함된 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 염증성 질환은 폐쇄성 타액선염(obstructive sialadenitis), 방광염, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 쇼그렌증후군(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베쳇병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative olitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 및 크론병(Crohn's disease) 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 염증성 질환은 폐쇄성 타액선염일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 항염증용 화장료 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 화장료 조성물은 스킨, 스킨 소프트너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이 크림, 모이스쳐 크림, 핸드크림,

에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디로션, 바디클렌져, 비누 또는 파우더로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체는 NO의 생성, 및 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 효능을 가지고 있으므로, 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1a는 탯줄 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(wjMSC-EVs)와 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(sgMSC-EVs)의 사이즈 및 입자 농도를 측정한 결과이다.

도 1b는 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 세포 당 생산된 EV 수를 확인한 결과이다.

도 1c는 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 TEM 이미지이다.

도 1d는 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs에서 발현되는 EV 양성 마커 (CD9 및 CD63) 및 EV 음성 마커 (Calnexin 및 GM130)를 확인한 결과이다.

도 1e는 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs에서 발현되는 EV 양성 마커 (CD9 및 CD63)의 발현량을 확인한 결과이다.

도 1f는 hPG 세포를 표적 세포로 하여, DiR로 표지한 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 내재화 능력을 공초점 현미경을 사용하여 관찰한 결과이다.

도 1g는 hPG세포에 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs를 각각 처리한 후 다양한 환경에서 배양한 후 hPG 세포의 형광 강도를 측정하여 EV의 hPG 세포로의 내재화 효율을 확인한 결과이다.

도 2a는 Raw264.7 세포에 LPS를 처리하여 증가한 NO 생산량이 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 처리에 의해 감소하는 정도를 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 2b는 Raw264.7 세포에 LPS를 처리하여 증가한 Nos2, IL-1β 및 IL-6의 발현량이 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 처리에 의해 감소하는 정도를 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 2c는 마우스 골수유래 macrophage를 제작하여 M1 분화를 유도하는 과정에서, wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs의 처리에 의해 M1 관련 염증성 마커들 (Tnf, Il6, Il1b)의 발현이 억제되는 정도를 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 2d는 마우스 골수유래 macrophage를 제작하여 M2 분화를 유도하는 과정에서, wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs의 처리에 의해 M2 분화 관련 마커 (Arg1, Mrc1, Ym1)의 발현이 증가하는 정도를 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 3a는 wjMSC-EV와 sgMSC-EV 내에 존재하는 miRNA의 발현 패턴을 PCA (Principal Component Analysis) 분석법을 통해 확인한 결과이다.

도 3b는 sgMSC-EV 내의 다양한 miRNA들이 가지는 다양한 표적 유전자의 다차원적인 조절을 간단히 나타내고자, miRNA-표적 유전자간 네트워크 분석법을 통해 서로간의 상호 작용을 도식화한 것이다.

도 3c는 도 3b에서 도식화된 네트워크에서 상대적인 중요도를 나타내는 척도인 연결 중심성 (Degree Centrality)과 매개 중심성 (Betweenness Centrality)을 기준으로 중요도가 높은 miRNA를 선별한 결과이다.

도 3d는 sgMSC-EV에서 상대적으로 많이 발현하는 miRNA를 대상으로 표적 유전자의 특성을 KEGG 데이터베이스를 기준으로 신호전달 체계 (pathway) 별로 분석한 결과이다.

도 3e는 sgMSC-EV에서 상대적으로 많이 발현하는 miRNA를 대상으로 표적 유전자의 특성을 REACTOME 데이터베이스를 기준으로 신호전달 체계 (pathway) 별로 분석한 결과이다.

도 3f는 sgMSC-EV 내 miRNA에 의해 유의미하게 조절되는 신호전달 체계인 MAPK pathways (도 3e), NOTCH pathways (도 3e)에 해당되는 유전자의 기능을 GO: Molecular function 데이터베이스로 확인한 결과이다.

도 4a는 폐쇄성 타액선염 마우스 모델에 wjMSC-EV 및 sgMSC-EV를 처리한 결과를 H&E 염색, PAS 염색 및 MTC 염색으로 확인한 결과이다.

도 4b는 도 4a에 의해 나타난 결과를 통계처리 및 수치화하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 명세서에서 사용되는 용어에 대한 정의는 다음과 같다.

[0037] 본 명세서에서, “타액(saliva)”은 이하선, 악하선, 설하선 및 구강점막에 존재하는 점액선 등으로부터 분비되는 혼합액이다. 타액은 인체의 핵심 성분으로 타액선에서 생성되어 구강 내로 배출된다. 타액은 인체의 필수 성분으로서, 생체활성단백질, 소화효소, 점액, 면역글로불린, 각종 염류 등이 포함되어 있다.

[0038] 타액은 구강 내 건강뿐만 아니라 인체의 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 수행한다. 예를 들어 타액의 주요 성분인 뮤신(mucin), 면역글로불린 등은 외부의 감염으로부터 1차적인 방어 역할을 수행하며, 구강 및 치아의 윤활 및 수분 유지, pH 중화 기능을 통하여 구강점막 및 치아를 보호한다. 뿐만 아니라 타액에는 프티알린(ptyalin) 등의 아밀라아제(amylase)와 같은 소화 효소들이 있어 전분을 말토오스 단위까지 분해하는 등 소화를 촉진시키는 기능을 담당한다. 또한 타액의 분비에 의하여 인체의 수분대사 및 체온 조절이 이루어질 수 있으며, 유독물(I, Hg, Pb 등)을 배설하기도 한다.

[0039] 본 명세서에서, “타액선(침샘, salivary gland)”은 타액을 생성, 분비하는 기관으로 이하선(귀밑샘, parotid gland), 악하선(턱밑샘, submaxillary gland), 설하선(혀밑샘, sublingual gland)과 같은 3쌍의 주타액선(major salivary gland)과, 점액선(mucous gland)과 같이 구강점막의 여러 부위에 분포하는 수백 개의 소타액선(minor salivary gland)으로 분류된다. 하루에 1 ~ 1.5 L의 타액을 분비하며, 이 중 90% 정도가 3쌍의 주타액선에 의해 분비된다. 분비된 타액은 윤활 작용, 소화 작용, 감염 억제 작용, 구강 내 pH 유지, 치아 건강 유지 등 중요한 역할을 수행하고, 타액의 분비량이 줄어들어 구강건조증이 발생하게 되면 상기 작용들에 문제가 생겨서 환자의 삶의 질에 상당한 문제를 야기한다.

[0041] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0042] 본 발명의 일 측면은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0043] 본 발명에서의 용어, "줄기세포(stem cell)"는 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포로서, 특정 분화 자극(환경) 하에서 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지는 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 자극의 성격에 따라 다양한 세포로 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0044] 본 발명에서 이용되는 줄기세포는 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포인 것이 바람직하고, 타액선 유래 줄기세포인 것이 더욱 바람직하다. 하기 실시예에 의하면, 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체는 hsa-miR-93-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-150-5p, 및 hsa-miR-615-3p 중에서 선택되는 1종 이상의 miRNA를 포함하고 있어 항염증 효능이 대조군뿐만 아니라 탯줄 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체에 비해 현저히 높다. 또한, 타액선 유래 줄기세포는 같은 개수의 탯줄 유래 줄기세포에 비해 세포외 소포체의 생산량이 약 4배 높다는 장점이 있다.

[0045] 일 구현예에 있어서, 본 발명에서 이용되는 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있고, 바람직하게는 CD9, CD63, 및 CD81를 발현하는 중간엽 줄기세포일 수 있다 (도 1d 및 도 1e 참조).

[0046] 본 발명에서의 용어, “중간엽 줄기세포”는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 구체적으로, 본 발명의 탯줄 또는 타액선 유래 중간엽 줄기세포는 소용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD90(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-)의 발현 정도를 통하여 식별될 수 있으며, 다분화능과 함께 면역 반응을 조절하는 기능도 가진다.

[0047] 본 발명에서의 용어, “세포외 소포체(extracellular vesicle)"는 다양한 세포에서 다낭체와 원형질막의 융합을 통해 세포 밖 환경으로 분비되는 30-1,000 nm 범위 직경의 지질 이중막 구조의 소낭을 의미한다.

[0048] 일 구현예에서, 본 발명의 세포외 소포체는 고기능 면역조절 유전자인 miR-93-5p, miR-484, miR-150-5p 및 miR-615-3p 중에서 선택되는 1종 이상의 miRNA를 포함할 수 있다.

[0049] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 세포 내 NO의 생성을 감소시키는 것일 수 있다.

[0050] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 염증성 사이토카인, 특히 IL-1β 및 IL-6 중에서 선택되는 1종 이상의 발현량을 감소시키는 것일 수 있다.

[0051] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 염증 억제 활성과 관련된 M2 분화 관련 마커인 Arg1(Arginase1), Mrc1(CD206) 및 Ym1(chitinase 3-like 3) 중에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0052] 일 구현예에서, 본 발명의 세포외 소포체는 a) 탯줄 또는 타액선으로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계; b) 상기 분리된 탯줄 또는 타액선 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계; c) 상기 단계 b)의 배양액을 수집하고 원심분리를 통해 상기 줄기세포를 제거하는 단계; 및 d) 상기 원심분리를 통해 수득한 상층액을 밀도 구배 초원심분리하는 단계;를 포함하는 방법에 의해 수득되는 것일 수 있다.

[0053] 일 구현예에 있어서, 상기 b) 단계의 줄기세포의 배양 용기는 줄기세포의 배양을 위한 세포 배양액으로서 당, 아미노산, 각종 영양물질, 무기질 등과 같이 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는, 인 비트로에서 세포 성장 및 증식을 위한 혼합물을 더 포함할 수 있다.

[0054] 상기 배양액에 추가적으로 포함될 수 있는 성분은 예를 들어 글리세린, L-알라닌, L-아르기닌 하이드로클로라이드, L-시스테인 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-글루타민, L-히스티딘 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-리신 하이드로클로라이드, L-메티오닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-아스파라긴-모노하이드레이트, L-아스파르트산, L-시스틴 2HCl, L-글루탐산, L-이소류신, L-류신, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-티로신 디소듐염 디하이드레이트, i-이노시톨, 티아민 하이드로클로라이드, 나이아신아미드, 피리독신 하이드로클로라이드, 바이오틴, D-판토텐산칼슘, 엽산, 리보플라빈, 비타민 B12, 염화나트륨(NaCl), 탄산수소나트륨(NaHCO3), 염화칼륨(KCl), 염화칼슘(CaCl2), 인산수소나트륨 모노하이드레이트(NaH2PO4-H2O), 황산동 펜타하이드레이트(CuSO4-5H2O), 황산제이철 헵타하이드레이트(FeSO4-7H2O), 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(MgSO4), 인산수소이나트륨(Na2HPO4), 황산아연 헵타하이드레이트(ZnSO4-7H2O), D-글루코즈(덱스트로즈), 소듐 피루베이트, 히포크산틴 Na, 리놀렌산, 리포산, 푸트레신 2HCl 및 티미딘을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에 따른 배양액은 인위적으로 제조하여 사용하거나, 혹은 상업적으로 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다. 상업적으로 시판되고 있는 배양용 배지의 예는 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α-MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 상기 c) 단계에서는 상기 b) 단계에서 수집한 배양액으로부터 복수 회의 원심분리를 통해 상기 줄기세포를 제거한다.

[0057] 일 구현예에 있어서, 본 발명의 세포외 소포체는 50 - 300 nm의 평균직경을 가지며, 더욱 구체적으로는 100 - 250 nm, 더욱 구체적으로는 150 - 220 nm, 더욱 구체적으로는 180 - 200 nm, 더욱 구체적으로는 185 - 195 nm의 평균 직경을 가진다. 이러한 범위의 미세 직경을 가지는 세포외 소포체를 엑소좀(exosome)이라 한다.

[0058] 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 상기 세포외 소포체를 10^{6} 내지 10^{14} 개/mL 농도로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{14} 개/mL 농도, 더욱 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{12} 개/mL 농도, 더욱 바람직하게는 10^{10} 내지 10^{12} 개/mL 농도, 더욱 바람직하게는 10^{11} 내지 10^{12} 개/ml 농도로 포함될 수 있다.

[0059] 본 발명의 조성물은 Nos2의 발현 및 염증성 사이토카인의 발현을 현저히 억제하고, 염증 억제 활성과 관련된 M2 분화 관련 마커의 발현을 증가시키는 등 우수한 항염증 활성을 나타내므로 다양한 염증성 질환의 치료 또는 예방을 위해 이용될 수 있고, 특히 폐쇄성 타액선염의 치료 또는 예방에 효과적이다.

[0060] 일 구현예에 있어서, 상기 염증성 질환은 폐쇄성 타액선염(obstructive sialadenitis), 방광염, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 쇼그렌증후군(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베쳇병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative olitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 및 크론병(Crohn's disease) 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 폐쇄성 타액선염일 수 있다.

[0061] 상기 폐쇄성 타액선염은 침 분비의 저하로 인하여 침 분비의 통로가 되는 도관(duct)이 막혀서 생기는, 흔하게 발병하는 염증성 질환이다. 폐쇄성 타액선염의 치료는 일차적으로는 도관이 막혀있을 경우 외과수술적인 처치 및 초음파에 의한 타석 (Salivary stone) 제거가 있으나, 대증적인 치료에 불과하고 근본적인 원인 치료가 되지 못하면 쉽게 재발한다. 또한, 염증의 완화를 위해서는 덱사메타손(Dexamethasone) 등의 스테로이드 치료, 타액선 기능의 회복을 위해서는 타액분비 촉진제 (Sialogogue) 등이 쓰이고 있으나 약의 부작용으로 인하여 장기 복용이 불가하고 이 또한 대증적인 치료라는 한계점이 존재한다. 본 발명의 조성물을 이용하면, 이러한 한계를 극복할 수 있을 것으로 기대된다.

[0062] 본 발명의 용어 "예방"이란, 상기 염증성 질환의 증상을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 것을 의미한다.

[0063] 본 발명의 용어 "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 염증성 질환의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에서는, *in vivo* 염증, 특히 폐쇄성 타액선염을 유발한 동물모델에 본 발명의 줄기세포 유래 세포외 소포체를 투여하는 경우, 염증에 의해 손상된 조직이 유의하게 재생 또는 회복되는 것을 구체적으로 확인하였다.

[0065] 일 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체를 단독으로 포함하거나, 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0067] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 골수 내 투여, 경막내 투여, 맥락막위공간 주입(suprachoroidal injection), 경피 투여, 피하 투여, 복강내 투여, 비강내 투여, 장관 투여, 국소 투여, 설하 투여 또는 직장내 투여일 수 있고, 바람직하게는 정맥내 투여일 수 있다.

[0068] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

[0069] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0070] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 연고제, 크림제, 로션제, 오일제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당 업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0071] 바람직하게는, 본 발명의 상기 약학 조성물은 경구제, 주사제 및 연고제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의

형태로 제조되는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 주사제일 수 있다.

[0072] 본 발명의 약학 조성물은 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체를 유효량으로 포함할 때 바람직한 항염증 효과를 제공할 수 있다. 본 명세서에서, '유효량'이라 함은 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 염증성 질환을 치료하기에 충분한 양을 말한다. 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체는 약학 조성물 총 함량에 대하여 10^{6} 내지 10^{14} 개/mL 농도로 포함된 것일 수 있고, 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{14} 개/mL 농도, 더욱 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{12} 개/mL 농도, 더욱 바람직하게는 10^{10} 내지 10^{12} 개/mL 농도, 더욱 바람직하게는 10^{11} 내지 10^{12} 개/ml 농도로 포함될 수 있다. 이때, 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체의 함량이 상기 하한치 미만이면, 세포 생존율은 우수하나 염증성 질환에 대한 치료 효과가 원하는 정도로 나타나지 않을 수 있다. 반대로 상기 상한치를 초과하는 경우 농도가 증가하는 만큼 염증성 질환에 대한 치료 효과가 증가하지 않거나 독성이 있을 수 있다. 한편, 인 비트로 실험 결과, 본 발명의 줄기세포 유래 세포외 소포체의 농도가 상기 범위인 경우에는 염증성 질환의 치료에 대하여 유의적인 효과가 나타나면서도 세포독성 등의 부작용이 나타나지 않았다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 줄기세포 유래 세포외 소포체의 유효량은 조성물이 제제화되는 형태 등에 따라 달라질 것이다.

[0073] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다.

[0074] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.

[0076] 또한, 본 발명의 다른 측면은 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방용 의약 또는 식품의 제조를 위한 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체의 용도에 관한 것이다. 상기한 바와 같이 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체는 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방을 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 포유동물에게 유효량의 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체를 투여하는 것을 포함하는 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방 방법을 제공한다.

[0078] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0079] 여기에서 사용된 용어 "유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 해당 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 유효량 및 투여 횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 수 있다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료, 개선 또는 예방 방법에 있어서, 성인의 경우, 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체를 포함하는 조성물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.001 g/kg 내지 10 g/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0080] 본 발명의 치료 방법에서 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0082] 또한, 본 발명의 다른 측면은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0083] 본 발명의 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도

한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0084] 본 발명에 따른 식품 조성물은 식품학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 분말, 과립, 정제, 캡슐 등으로 제제화하여 기능성 식품으로 이용조할 수 있다. 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물은 예를 들어, 음료류, 알코올 음료류, 과자류, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류 등일 수 있다.

[0086] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 상기 줄기세포 유래 세포외 소포체 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 치료 또는 개선용 사료 조성물에 관한 것이다.

[0089] 본 발명의 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0091] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 포함하는, 항염증용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0092] 본 발명의 탯줄 또는 타액선 유래 줄기세포로부터 분리된 세포외 소포체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0093] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 상기 유효성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어서 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담제를 포함한다. 본 발명의 화장료 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클렌징, 오일, 분말파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는 세안용 클렌징, 로션, 크림, 마사지 크림, 아이크림, 에센스, 젤, 팩, 스프레이, 파우더, 선크림 등의 제형으로 제조될 수 있다.

[0094] 상기 화장료 조성물은 스킨, 스킨 소프트너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디로션, 바디클렌저, 비누 또는 파우더로 제형화될 수 있다.

[0096] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명하겠으나, 다음 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0098] **<실시예>**

[0099] **실험방법**

[0100] *중간엽 줄기세포 분리 및 배양*

[0101] 인간 타액선 유래 중간엽 줄기세포 (Human Salivary Gland Mesenchymal Stem Cell, sg-MSC) 및 인간 탯줄 유래 중간엽 줄기 세포 (Human Wharton' Jelly Mesenchymal Stem Cell, hWJ-MSC) (서울대병원, 건국대학교 생명윤리

위원회 승인번호: 001355-201705-BR-181)를 각각 150 mm 배양접시 (20151, SPL)에 seeding하고, 각각의 세포가 배양접시의 80~90%% 정도 밀집 되었을 때, exosome-depleted FBS가 10% 포함된 a-MEM (Minimum Essential Medium; 12561072, Gibco) 배지로 교체해 주고, 48시간 동안 배양한 후에 세포외 소포체 (EV; extracellular vesicle)를 분리하였다.

[0102]

[0103] *세포외 소포체 분리 및 정제*

[0104] 상기 줄기세포 배양액을 300g로 3분 동안 원심분리하여 줄기세포 찌꺼기를 제거하고, 2000g로 10분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 다음, 다시 10,000g로 30분 동안 원심분리하였고, 다시 상층액을 178,000g로 2시간 동안 원심분리하여 펠릿 (세포외 소포체, EV)을 수득하였다. 또한, 고도로 정제된 EV를 획득하기 위해 OptiPrep™ (iodixanol) 초고속원심분리기를 이용하여 밀도 구배 초원심분리를 진행하였다. 구체적으로, 초고속원심분리기 튜브에 요오딕사놀 (Iodixanol) 용액 (0.25M sucrose/10 mM Tris, pH 7.5)을 50%, 30% 및 10% (w/v) 용액의 농도로 3 mL마다 층을 쌓았다. 1×10^{11} 밀도의 EV 입자를 요오딕사놀 50% 층의 바닥에 적재하고, 4 ℃, SW 41 Ti 로터를 사용하여 120,000×g (K-인자: 277.5)에서 2시간 동안 원심분리하였다. 그리고, EV를 포함할 것으로 예상되는 요오딕사놀 10%-30% 층 1 mL를 수집하고, EV 샘플을 10 mL의 PBS에 재현탁한 후, 4 ℃, 178,000 xg에서 2시간 동안 원심분리하여 최종 펠릿 (EV)을 수득하였다. 상기 최종 펠릿을 200㎕ PBS에 재현탁하고, 이후 실험에 이용하였다.

[0106] *세포외 소포체의 생산량 비교 및 특성 분석*

[0107] EV의 크기와 수는 나노입자 추적 분석기 ZetaView (Particle Metrix, Germany)을 이용하여 측정하였다. 또한, EV의 형태 및 구조는 80kV에서 투과전자현미경 (TEM, JEM-1011, Nippon Denshi, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

[0108] 그리고, EV의 표면마커를 측정하기 위해, Exosome-Human CD9 Flow Detection Reagent (invitrogen, 10620D)을 이용하여 EV를 포획하고 CD63-PE (556020, BD), CD81-APC (130-119-787, miltenyi biotec)로 염색 후 유세포 분석기 (Beckman Coulter/CytoFLEX)로 측정하였다.

[0109] Protease inhibitor cocktail (87786, Invitrogen)이 포함된 RIPA buffer (CBR002, LPS solution)를 이용하여 중간엽 줄기세포를 용해하고, WCL (Whole cell lysate)를 분리하였다. WCL과 EV는 4-12% Bis-Tris Flus Gels (NW04125BOX, Invitrogen)로 전기영동 후, NC membrane (IB23001, Invitrogen)으로 전이시켰다. 1차 항체 (1:1000)를 4 ℃에서 overnight하고 1x TBST (TLP-118.1, TrnasLab)를 이용하여 3회 세척하였다. 2차 항체를 2시간 상온에서 반응시키고 1x TBST를 이용하여 세척하였다. 모든 항체들을 1x blocking buffer (TLP-115.1G, Translab)에 희석하여 사용하였으며, Invitrogen™ iBright™ Imagers (CL-1000)을 이용하여 확인하였다. 1차 항체 및 2차 항체는 다음과 같은 제품을 사용하였다 : CD9 (ab263023, Abcam), CD63 (ab109201, Abcam), GM130 (12480, CST), Calnexin (Santa Cruz, sc-46669), HRP linked anti-rabbit IgG (7074, CST), and HRP linked anti-mouse IgG (7076, CST).

[0110] EV의 uptake를 확인하기 위하여, EV를 DiR (D12731, Invitrogen) 2 ug/ml로 상온에서 1시간 동안 염색한 후, 120,000g에서 2시간 동안 OptiPrep™ (iodixanol) 밀도 구배 초원심분리를 이용하여 free dye를 제거하였다. EVs를 hPG 세포에 6시간 동안 처리한 후, DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI - (H-1200))와 CellMask™ (Green Plasma Membrane Stain, C37608, Invitrogen)를 이용하여 염색하였다. 이후, 상기 염색된 EVs를 confocal laser microscopy (Carl Zeiss LSM 800)를 이용하여 관찰하였다.

[0112] *세포외 소포체의 생체 외 면역조절 효과 확인*

[0113] Raw264.7 세포를 24well plate에 $1x10^5$ cells로 seeding 하고, 12시간 후 LPS 10 ng/ml (L4391-1MG, Sigma)와 함께 wjMSC-EVs, sgMSC-EVs ($1x10^9$ particles/mL)를 각각 500 ul씩 처리하였으며, 24시간 후에 각각의 배양액을 Griess reagent (0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamide dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5%

phosphoric acid)와 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 Nitric oxide를 측정하였다. 그리고 상기 Raw264.7 세포에서 Labozol 시약 (Cosmo Gentech, Seoul, Korea)을 사용하여 total RNA를 분리하고 NanoPhotometer (Implen, Munich, Germany)를 사용하여 정제된 RNA를 정량화하였다. 이후 상기 total RNA 2μg를 M-MuLV 역전사 키트 (Cosmo Gentech, Seoul, Korea)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. qRT-PCR은 EzAMP PCR 2x Master Mix (ELPIS Biotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하고, PCR 산물은 1-2% 아가로스 젤로 시각화하였다. 이때, 사용된 각각의 프라이머 서열은 다음과 같다. mouse Nos2:5′ -GAG ACA GGG AAG TCT GAA GCA C-3′ (forward), 5′ -CCA GCA GTA GTT GCT CCT CTT C-3′ (reverse); mouse Tnf:5′ -GGT GCC TAT GTC TCA GCC TCT T-3′ (forward), 5′ -GCC ATA GAA CTG ATG AGA GGG AG-3′ (reverse); mouse Il6:5′ -TAC CAC TTC ACA AGT CGG AGG C-3′ (forward), 5′ -CTG CAA GTG CAT CGT TGT TC-3′ (reverse); mouse Il1b:5′ -TGG ACC TTC CAG GAT GAG GAC A-3′ (forward), 5′ -GTT CAT CTC GGA GCC TGT AGT G-3′ (reverse); mouse Arg1:5′ -CAT TGG CTT GCG AGA CGT AGA C-3′ (forward), 5′ -GCT GAA GGT CTC TTC CAT CAC C-3′ (reverse); mouse Mrc1:5′ - GTT CAC CTG GAG TGA TGG TTC TC-3′ (forward), 5′ - AGG ACA TGC CAG GGT CAC CTT T-3′ (reverse); mouse Ym1:5′ - TAC TCA CTT CCA CAG GAG CAG G-3′ (forward), 5′ - CTC CAG TGT AGC CAT CCT TAG G-3′ (reverse); mouse Fizz1:5′ - CAA GGA ACT TCT TGC CAA TCC AG-3′ (forward), 5′ - CCA AGA TCC ACA GGC AAA GCC A-3′ (reverse)

[0114] 한편, 마우스 생쥐의 대퇴골 (femur)과 정강이뼈 (tibia)를 얻은 후 양쪽 말단을 가위로 자른 후에 1xPBS를 주사하여 골수 세포를 수득하였다. 이후 원심분리 (500g, 5분)를 통하여 골수 세포 펠릿을 만든 후에 상층액을 제거한 후 저장액 (hypotonic solution)에 풀어준 후 5분간 반응시켜 적혈구를 제거하였다. 적혈구를 제거한 골수 세포는 배양용 코팅처리가 되지 않은 부유배양용 배양 플레이트에서 7일 동안 배양하여 대식 세포로 분화시켰다. 대식 세포의 분화를 위한 배양액은 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicilin/Streptomycin, 20 ng/mL 마우스 M-CSF가 포함된 DMEM 배지이다. 분화시킨 지 7일 후에 M1 분화를 위해 LPS (10 ng/mL), Interferon-gamma (20 ng/mL)을 처리하고, M2 분화를 위해 IL-4와 IL-13 (각 20 ng/mL)을 각각 처리하였다. 24시간이 지난 후에 세포를 수득하여 분화 관련 마커의 발현을 qRT-PCR로 확인하였다. 또한 EV 처리에 의한 분화의 변화 양상을 확인하기 위해 분화를 유도할 때 동시에 $1x10^9$ particles/mL 의 EVs을 처리하였다. 이 때 EV의 효과를 자세히 보기 위해 분화 시에는 EV가 제거된 FBS를 배양액에 사용하였다. 또한, 상피 세포의 염증 조절 평가를 위해서 사람 이하선(parotid gland)에서 수득한 상피성 줄기세포 (hPG 세포)를 표적 세포로 활용하여 $1x10^9$ particles/mL 의 EVs를 처리한 후, 1시간 후에 LPS (10 μg/mL)를 처리한 후 3일 후에 세포를 수득하여 유전자 발현을 확인하였다. hPG 세포는 다음과 같은 방식으로 분리 및 배양되었다. 사람 이하선 조직을 잘게 분쇄한 후, 0.05%의 collagenase II가 포함된 HBSS 용액에 37℃에서 1시간 동안 shaker에 넣어 반응시켰다 (200 rpm). 그 후 300 g 에 5 분간 원심분리된 pellet을 100 μm 필터를 이용하여 분리한 후에, KFSM 배지 (Keratinocyte SFM, Thermo Fisher) 에 0.06 mM의 $CaCl_2$, 10 μM의 Y-27632, 1 μM의 A83-01을 추가한 것을 배양용 배지로 하여 이에 풀어서 100 mm coated culture dish에 분주한 후, 2시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 그 후, 배양액을 새 culture dish로 옮긴 후 1시간 더 배양하였다 (D1). 이 후, 같은 방법으로 배양액을 새 culture dish로 옮긴 후 1일씩 배양한 후 매번 배양액을 새 culture dish로 옮겨주었다 (D2, D3, D4). 총 4일에 걸쳐 배양하면서 나타나는 세포 콜로니 (D2-D4에서 주로 나타남)를 cloning cylinder를 이용하여 분리한 후 0.05% trypsin/EDTA 용액을 이용하여 dish에서 떼어 주었다. 분리된 콜로니들은 각각 독립적으로 키우면서 장기간 배양이 가능한 지 확인한 후 실험에 사용하였다.

[0116] *세포외 소포체의 miRNA sequencing 분석*

[0117] Optiprep 밀도 구배 초원심분리를 이용하여 고순도로 분리된 EVs 샘플을 활용하였다. Exosomal RNA는 제조업체의 지침에 따라 TRIzol LS 시약 (Ambion, Life Technology, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 분리하였다.

[0118] 이후, NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep kit (New England BioLabs, Inc., USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 라이브러리 구축을 수행하였다. 간단히, 라이브러리 구성을 위해 각 샘플의 총 RNA를 사용하여 어댑터를 연결한 다음 어댑터 특이적 프라이머와 함께 역전사효소를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 라이브러리 증폭을 위해 PCR을 수행하고 QIAquick PCR Purification Kit (Quaigen, Inc, German) 및 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 겔을 사용하여 라이브러리를 정리하였다. 소형 RNA 라이브러리의 수율 및 크기 분포는 고감도 DNA 분석용 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기 (Agilent Technologies, Inc., USA)로 평가하고, single-end 75

sequencing 방법으로 NextSeq500 system에 의해 High-throughput sequences가 생성되었다.

[0119] 이후, wjMSC와 sgMSC에서 얻은 EVs의 miRNA 분석은 다음과 같은 방식으로 수행되었다. miRNA 발현의 그룹 간 비교는 R언어의 Limma 패키지를 사용하였다. miRNA-타겟 유전자의 상호작용을 알아보기 위해 웹 오픈소스인 miRNet을 사용하였다 (https://www.mirnet.ca). miRNA-타켓 유전자 네트워크 분석 간의 유의미한 차이는 Log2 (fold change) 가 1 이상일 때, adjusted p value가 0.01 이하일 때로 정의되었다. 타겟 유전자의 분석을 위해 miRNA의 타겟 유전자 데이터베이스인 miRTarBase를 활용하였다. 분석된 네트워크의 명료한 도식화를 위해 network를 이루는 node의 degree가 5보다 적을 때에는 네트워크 도식화에서 제외되었다. miRNA-타겟 유전자의 pathway 분석을 위해서 KEGG, REACTOME, Gene ontology 데이터베이스를 활용하였다.

[0121] *폐쇄성 타액선염 생체 내 마우스 모델을 통한 세포외 소포체의 항염 효과 확인*

[0122] 8-12주령의 암컷 C57BL/6 마우스가 실험에 사용되었다. ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg)을 복강 내에 주입하여 마우스를 마취시킨 후에 목 부위의 가죽을 Povidone-iodine 용액으로 소독하였고, 목 가운데 부위를 1-2 cm 정도 절개하였다. 절개 후 마우스 왼쪽의 악하선 (submandibular gland, SMG)와 연결된 도관을 찾아서 악하선에서 3 mm 정도 떨어진 곳에 위치한 도관을 수술용 실로 묶은 후 절개한 부분을 봉합하였다. 이 때 신경이나 혈관 등 다른 부위가 묶이지 않게 유의하여 수술을 진행하였다. 한 쪽의 악하선 도관을 묶은 지 2주일이 지난 후에 마우스 마취 후 재절개를 수행하여 묶은 실을 다시 풀어서 (De-ligation) 도관의 통로를 복구시켜 준 후, 마우스의 혀 밑의 wharton’s duct의 구멍에 삽관한 후 $1x10^9$ particles/20 uL의 EV를 주입하거나 같은 부피의 PBS를 도관 내로 주입하였다. EV 주입 후 3일이 지난 후에 폐쇄성 타액선염에서 회복되는 지표를 보기 위해 실험을 종료하고 마우스의 타액선을 수득하여 실험에 사용하였다.

[0124] **실험결과**

[0125] *줄기세포 유래 세포외 소포체 생산량 비교 및 특성분석*

[0126] wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 사이즈 및 입자 농도는 ZetaView를 이용하여 측정한 결과, 각각의 평균 사이즈가 약 50 - 300 nm, 구체적으로는 50 - 250 nm, 더욱 구체적으로는 100 - 250 nm인 것을 확인하였다 (도 1a). 따라서, 상기 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs는 모두 세포외 소포체 중에서도 엑소좀인 것을 알 수 있었다.

[0127] 또한, 세포 당 생산된 EV 수를 확인한 결과, sgMSC가 wjMSC에 비해 약 4배 더 많은 EV를 생성함을 확인하였다 (도 1b).

[0128] 또한, 정제된 wjMSC-EVs와 sgMSC-EVs의 TEM 이미지를 확인하였고 (도 1c), EV 양성 마커의 발현을 확인하기 위해 웨스턴블롯을 사용하여 CD9 및 CD63 단백질의 발현을 확인하였다. 그리고, Calnexin 및 GM130과 같은 EV 음성 마커가 MSC-EVs에서 검출되지 않음을 확인하였다 (도 1d).

[0129] 또한, CD63 또는 CD81 발현에 대한 유세포 분석 데이터를 통해 CD9-bead를 사용하여 캡처된 MSC-EV가 CD63 및 CD81의 >95%를 발현하는 것을 확인하였다 (도 1e).

[0130] 다음으로, hPG 세포를 표적 세포로 사용하여 MSC-EV의 내재화 능력을 측정하고자, EV를 DiR로 표지한 후 6시간 동안 hPG 세포와 함께 배양하였다. 공초점 현미경을 사용하여 관찰한 결과, wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 모두 세포 내 적색 형광이 관찰되었으며, wjMSC-EVs를 사용하여 관찰된 것보다 sgMSC-EVs에서 더 나은 EV 흡수를 확인할 수 있었다 (도 1f).

[0131] 또한, hPG세포에 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs를 각각 처리하고 37 ℃에서 1시간, 37 ℃에서 6시간, 및 4℃에서 1시간 동안 각각 배양한 후 유세포 분석기를 사용하여 hPG세포의 형광 강도를 측정하였다. 그 결과, 37 ℃에서 배양한 경우 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 모두 우수한 내재화 효율을 나타내었고, 특히 sgMSC-EV가 wjMSC-EV에 비해 내재화 효율이 더욱 우수한 것을 감지할 수 있었으며, 대조적으로 4 ℃에서의 배양은 EV의 유의한 흡수를 나타내지 않았다 (도 1g). 즉, sgMSC-EV의 hPG 세포로의 상당한 흡수 능력을 확인할 수 있었다.

[0133] *세포외 소포체의 생체 외 면역조절 효과 확인*

[0134] 세포외 소포체 (EV)에 의한 염증 조절 효과를 *in vitro*에서 확인하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0135] 우선 mouse macrophage 세포주인 Raw264.7 cell에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하였다. 그와 동시에 wjMSC 또는 sgMSC 유래 EV를 처리하여 24시간이 지난 후에 염증 관련 지표의 조절 유무를 확인하였다. 그 결과, LPS에 의해 증가하는 Nitric oxide의 생산량이 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의해 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2a). 또한, wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의해, Nitric oxide의 생산에 관여하는 Nos2, 및 염증성 사이토카인의 일종인 IL-1β (Il1b), IL-6 (Il6)의 발현이 LPS만 처리했을 때보다 상대적으로 유의미하게 감소하는 양상이 확인되었다 (도 2b). 이러한 염증지표의 감소 경향은 wjMSC-EV보다 sgMSC-EV를 처리했을 때 더욱 유의미한 수준으로 관찰되었다. 구체적으로, sgMSC-EV는 Nos2 및 IL-1β의 경우 LPS를 처리하지 않은 대조군의 수준까지 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0136] 그 후, Raw264.7 cell에서 나타난 결과를 세포주가 아닌 *ex vivo* macrophage에서도 확인하기 위해 마우스 골수 유래 macrophage를 제작하여 M1 분화 (염증활성) 및 M2 분화 (염증억제)를 유도하였다. 분화 유도 1시간 전에 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs를 선처리하여 분화 조절 효과를 확인해 보았을 때, M1 분화에 있어서 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의해 M1 관련 염증성 마커들 (Tnf, Il6, Il1b)의 발현이 억제되는 양상을 확인하였고 (도 2c), M2 분화 관련 마커 (Arg1, Mrc1, Ym1)는 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의해 그 발현이 증가되는 것으로 확인되었다 (도 2d). 골수 유래 macrophage에서도 특정 마커 (Il6, Arg1, Mrc1, Ym1)의 경우, 발현의 조절 양상이 sgMSC-EV를 처리했을 때 wjMSC-EV 처리 시보다 더욱 유의미하게 변화하는 것으로 나타났다.

[0137] 상기 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs의 염증 조절 능력을 확인할 수 있었고, sgMSC-EV가 wjMSC-EV에 비해 더욱 유의미하게 염증을 억제하고, 항염증 관련 대식세포 분화를 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.

[0139] *세포외 소포체 miRNA sequencing 분석 결과*

[0140] 세포외 소포체 (EV)에 의한 염증 조절 효과의 기전 설명을 위해, wjMSC-EV와 sgMSC-EV 내 존재하는 miRNA의 발현 양상을 exosomal miRNA sequencing 분석을 통해 확인하고자 하였다.

[0141] 구체적으로, wjMSC-EV와 sgMSC-EV 내에 존재하는 miRNA의 발현 패턴이 큰 차이가 나는 것을 PCA (Principal Component Analysis) 분석법을 통하여 확인할 수 있었다 (도 3a).

[0142] 그 후, sgMSC-EV 내의 다양한 miRNA들이 가지는 다양한 표적 유전자의 다차원적인 조절을 간단히 도식화하고자, miRNA-표적 유전자간 네트워크 분석법을 통해 서로간의 상호 작용을 도식화하였고 (도 3b), 도식화된 네트워크에서 상대적인 중요도를 나타내는 척도인 연결 중심성 (Degree Centrality)과 매개 중심성 (Betweenness Centrality)을 기준으로 중요도가 높은 4개의 miRNA를 선별한 결과, miR-93-5p, miR-484, miR-150-5p, 및 miR-615-3p인 것이 확인되었다 (도 3c).

[0143] sgMSC-EV에서 상대적으로 많이 발현하는 miRNA를 대상으로 표적 유전자의 특성을 신호전달 체계 (pathway) 별로 분석하였을 때, KEGG 데이터베이스를 기준으로 cell cycle, growth factor, MAPK 등이 sgMSC-EV 내 miRNA에 의해 유의미하게 조절되는 것으로 확인되었고 (도 3d), REACTOME 데이터베이스를 기준으로는 NOTCH pathway가 검출되었다 (도 3e). 상기 MAPK, NOTCH pathways 모두 염증 조절과 관련되어 잘 알려져 있는 pathway이고, 특히 해당 유전자의 기능을 GO: Molecular function 데이터베이스로 확인한 결과, RNA binding, DNA binding, transcription factor binding 등의 전사조절과 관련되어 있음을 알 수 있었다 (도 3f).

[0144] 결론적으로, sgMSC-EV에 의한 항염증 효과는 MAPK, NOTCH 신호전달 체계에 관련되어 있는 전사인자들의 조절을 통해서 일어나는 것이고, 해당 기전은 sgMSC-EV에 존재하는 miRNA 들에 의해 종합적으로 나타나는 결과이며, 그 중에서 miR-93-5p, miR-484, miR-150-5p, miR-615-3p 등의 중요도가 높은 4개의 miRNA에 의해서 주로 일어남을 확인할 수 있었다.

[0146] *폐쇄성 타액선염 마우스 모델을 통한 세포외 소포체의 항염 효과 확인*

[0147] wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs의 항염증 효과에 대한 *in vivo* 효능 검증을 수행하기 위해 타액선염을 유발한 마우스 모델을 이용하였다. 구체적으로, 마우스 악하선 (submandibular gland)과 연결된 도관 (duct)을 수술용 실로 묶어서 폐쇄성 타액선염을 유발하였다. 2주간 도관을 묶은 후, 다시 풀어주어 회복을 유도한 상태로 wjMSC-EVs 및

sgMSC-EVs에 의한 회복 증대효과가 나타나는지를 sgMSC-EV와 wjMSC-EV 처리군에서 각각 확인하였다. 타액선 조직에서의 병리학적 소견을 보았을 때 H&E 염색상 마우스 도관 묶음을 통해 선세포 (acinar cell)의 현저한 감소와 더불어 조직 섬유화가 나타는 현상을 관찰하였고, 이 현상이 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의해 완화되고 있음이 관찰되었다 (도 4a). PAS 염색을 통한 타액선의 뮤신 분비 (보라색)를 확인하였을 때 도관 묶음에 의한 감소 효과 및 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의한 회복 효과가 관찰되었고, MTC 염색을 통해서 조직 섬유화 (파란색)를 판단하였을 때 도관 묶음에 의한 증가 및 wjMSC-EVs 및 sgMSC-EVs 처리에 의한 감소 효과를 확인하였다 (도 4a).

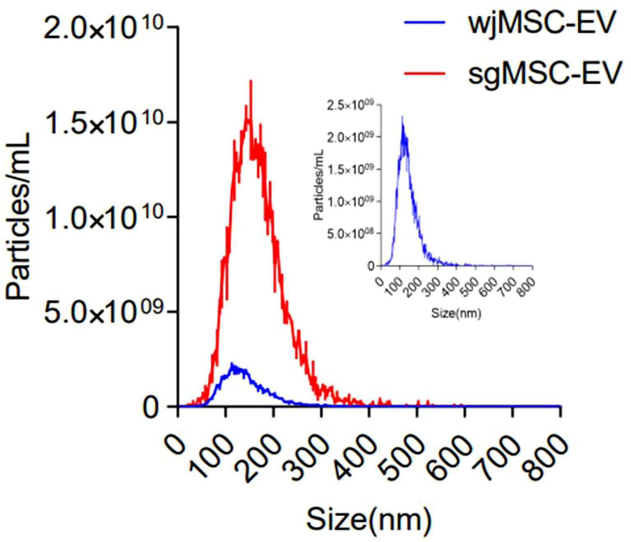
[0148] 본 실험의 결과를 통계 처리 하였을 때, EV를 처리한 군 (sgMSC-EV 및 wjMSC-EV 처리군)은 모두 EV를 처리하지 않은 군 (PBS)에 비해 유의미하게 염증에 의해 손상된 조직을 재생시키는 것이 확인되었고, sgMSC-EV 처리군이 wjMSC-EV 처리군에 비해 더욱 유의미한 효과를 나타내는 것을 확인하였다 (도 4b). 구체적으로, 도 4b를 살펴보면, 대조군인 PBS 처리군의 경우 염증에 의한 손상 점수 (Damage score)가 3.67±0.33인 반면, 본 발명의 sgMSC-EV 처리군은 2.40±0.24, wjMSC-EV 처리군은 3.25±0.25이므로, 염증에 의한 손상 부위가 대조군에 비해 sgMSC-EV 처리군은 약 35%, wjMSC-EV 처리군은 12% 감소함을 알 수 있다. 또한, 대조군인 PBS 처리군의 경우 뮤신 분비 부위의 비율이 15.63±3.27%인 반면, 본 발명의 sgMSC-EV 처리군은 39.67±1.67%, wjMSC-EV 처리군은 26.80±3.02%이므로, 뮤신 분비 부위가 대조군에 비해 sgMSC-EV 처리군은 약 2.5배, wjMSC-EV 처리군은 1.7배 회복되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 대조군인 PBS 처리군의 경우 조직 섬유화 부위가 55.99±3.34%인 반면, 본 발명의 sgMSC-EV 처리군은 30.30±3.63%, wjMSC-EV 처리군은 40.09±8.81%이므로, 염증에 의해 섬유화된 부위가 sgMSC-EV 처리군은 약 45%, wjMSC-EV 처리군은 28% 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0149] 따라서, 폐쇄성 타액선염을 유발한 마우스 모델에서 조직의 재생 지표를 확인하였을 때, wjMSC-EV 또는 sgMSC-EV 투여에 의해 조직 재생이 잘 일어나는 것이 확인되었고, 이는 wjMSC-EV 또는 sgMSC-EV의 항염증 효과에 의해 염증에 의해 손상된 조직의 재생을 더욱 촉진할 수 있음을 잘 설명해 주고 있다. 따라서 본 실험의 결과는 추후 EV 주입을 통하여 여러 가지 염증성 질환에 의한 조직 손상을 완화시킬 수 있는 치료제로서 wjMSC-EV 또는 sgMSC-EV의 가능성을 시사한다.

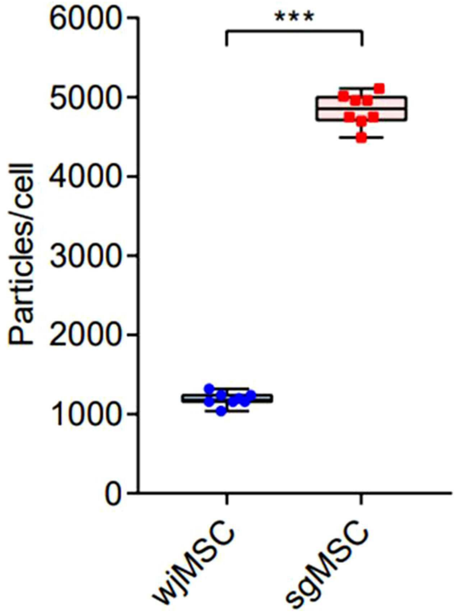
[0151] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한, 첨부된 특허청구범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

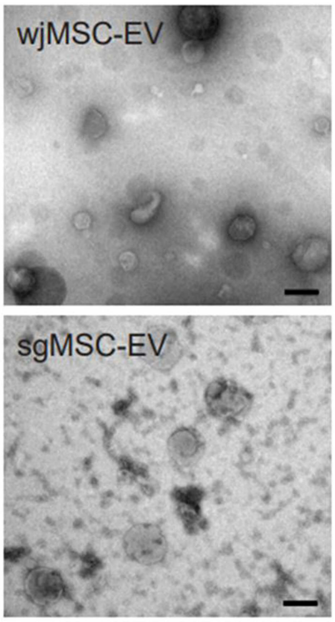
도면1a



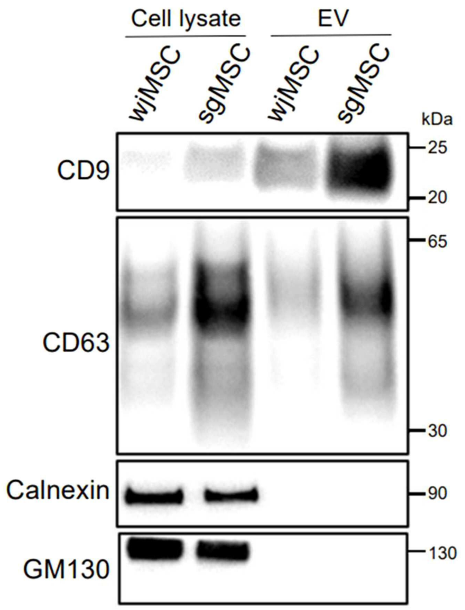
도면1b


***
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Particles/cell
wjMSC
sgMSC

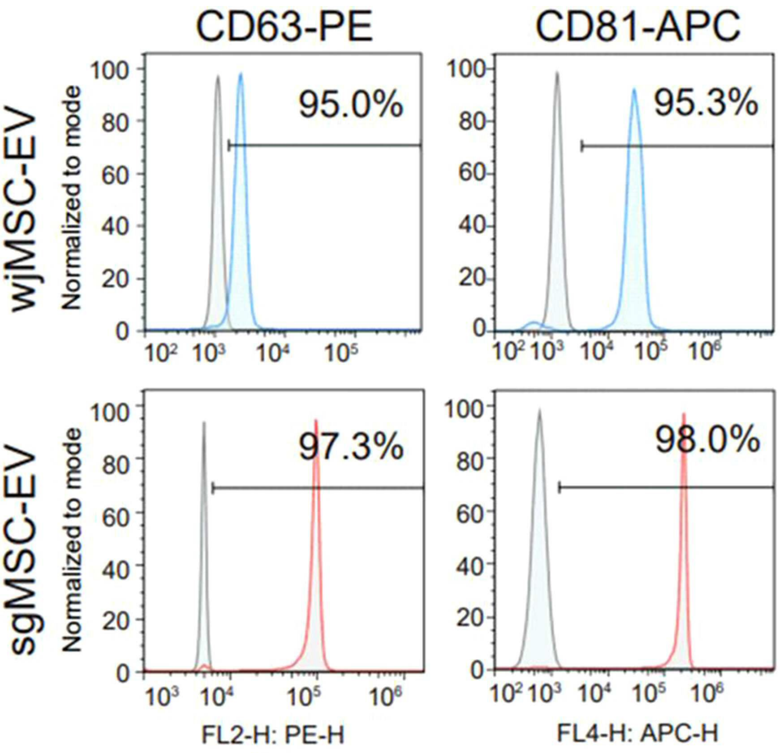
도면1c


wjMSC-EV
sgMSC-EV

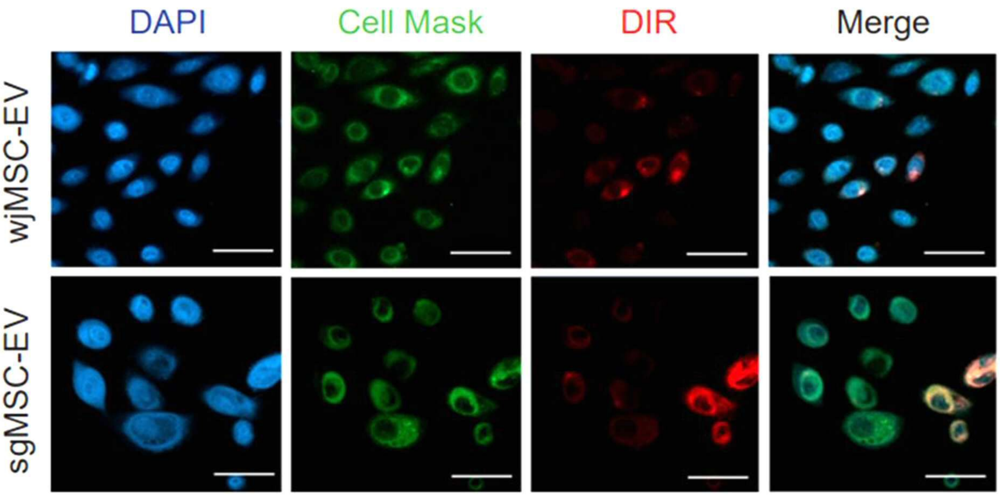
도면1d


Cell lysate
EV
wjMSC
sgMSC
wjMSC
sgMSC
kDa
CD9
25
20
CD63
65
30
Calnexin
90
GM130
130

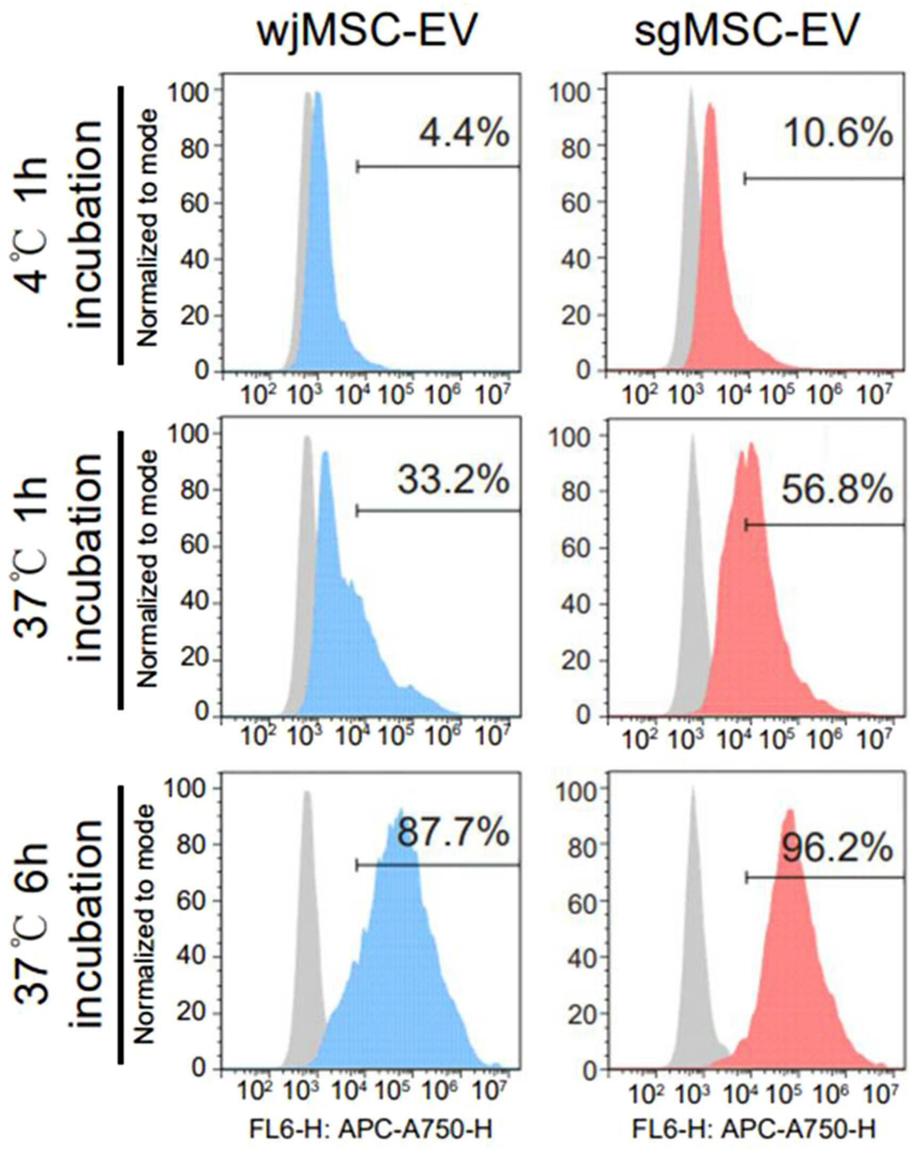
도면1e


CD63-PE
CD81-APC
wjMSC-EV
sgMSC-EV
Normalized to mode
95.0%
95.3%
97.3%
98.0%
FL2-H: PE-H
FL4-H: APC-H

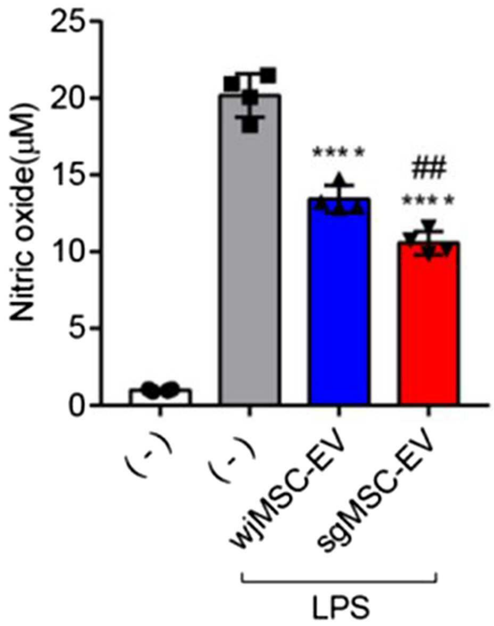
도면1f


DAPI
Cell Mask
DIR
Merge
wjMSC-EV
sgMSC-EV

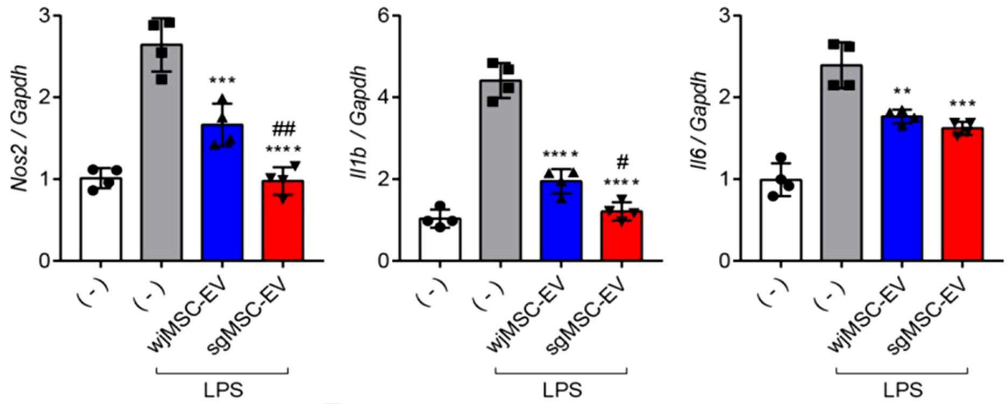
도면1g


wjMSC-EV
sgMSC-EV
4℃ 1h incubation
37℃ 1h incubation
37℃ 6h incubation
Normalized to mode
4.4%
10.6%
33.2%
56.8%
87.7%
96.2%
FL6-H: APC-A750-H
FL6-H: APC-A750-H

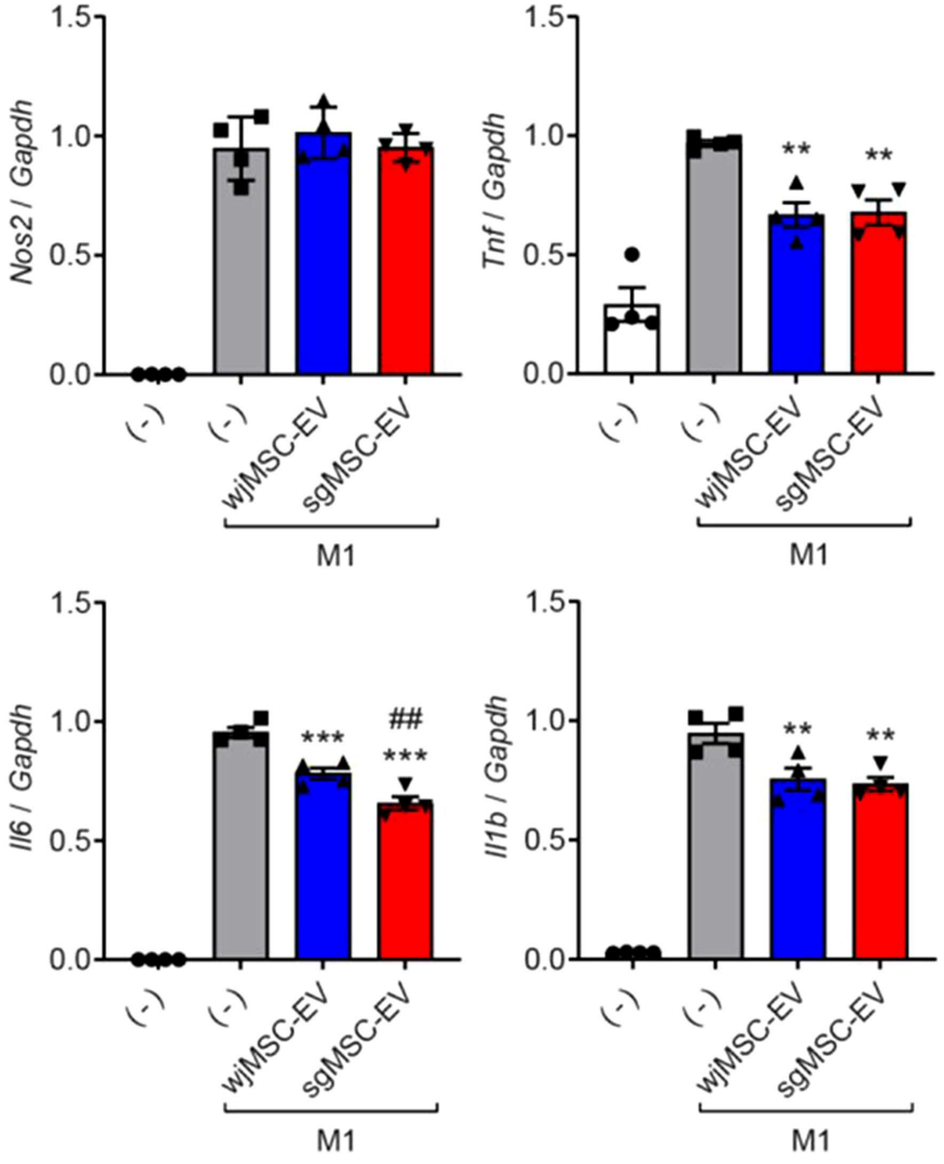
도면2a


Nitric oxide(μM)
25
20
15
10
5
0
****
##
****
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
LPS

도면2b

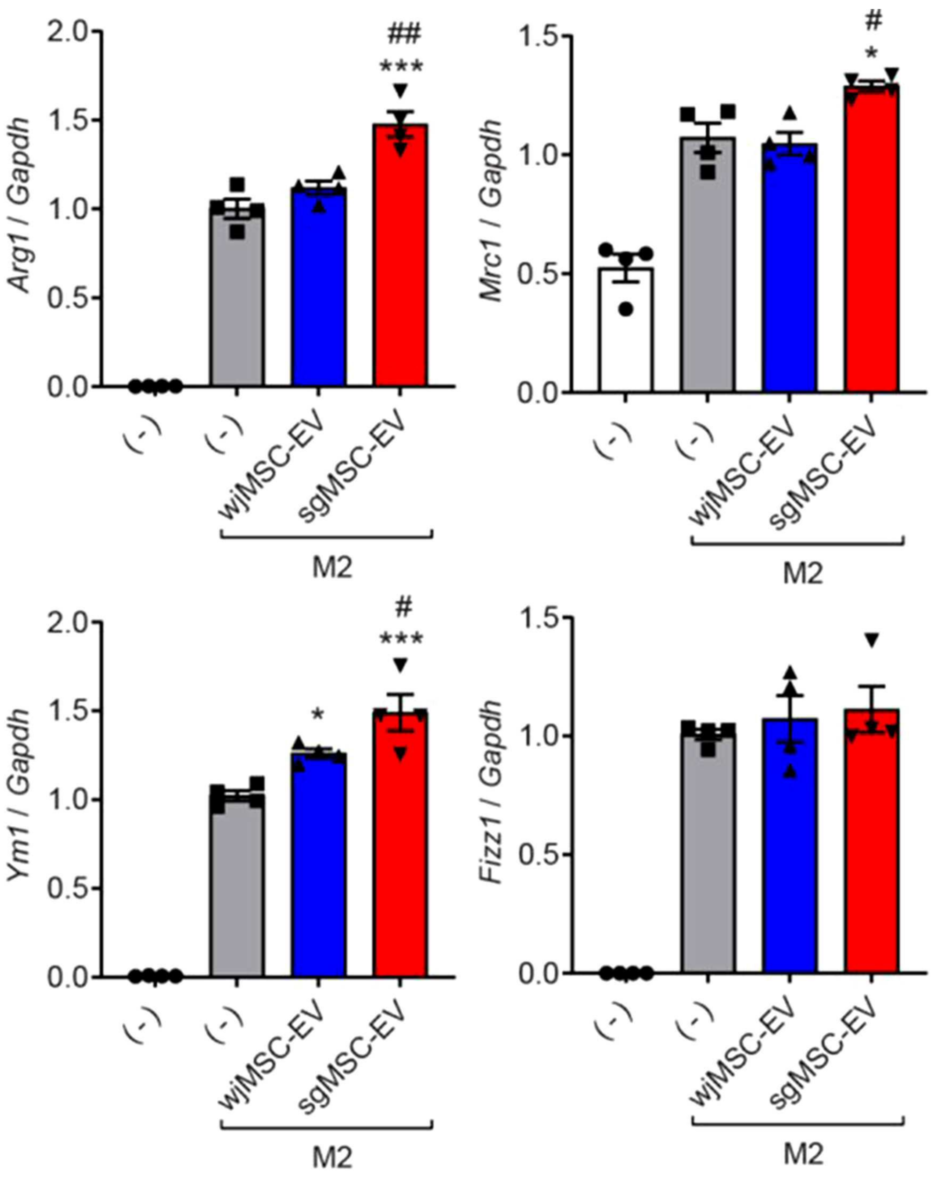

Nos2 / Gapdh
3
2
1
0
***
##
****
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
LPS
Il1b / Gapdh
6
4
2
0
****
#
****
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
LPS
Il6 / Gapdh
3
2
1
0
**
***
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
LPS

도면2c

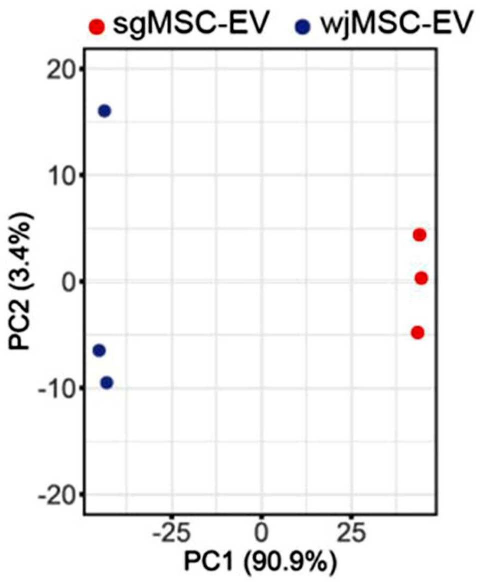


Nos2 / Gapdh
1.5
1.0
0.5
0.0
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M1
Tnf / Gapdh
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M1
Il6 / Gapdh
1.5
1.0
0.5
0.0
***
##
***
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M1
Il1b / Gapdh
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M1

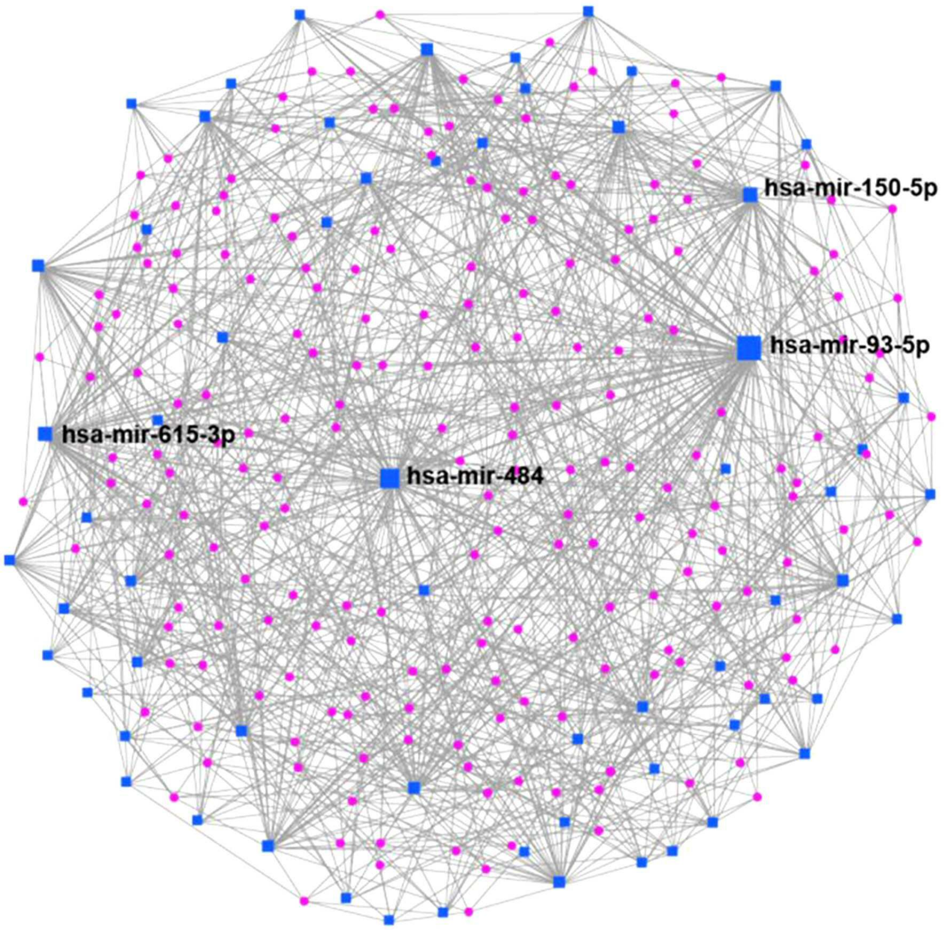
도면2d


Arg1 / Gapdh
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
##
***
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M2
Mrc1 / Gapdh
1.5
1.0
0.5
0.0
#
*
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M2
Ym1 / Gapdh
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
***
*
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M2
Fizz1 / Gapdh
1.5
1.0
0.5
0.0
(-)
(-)
wjMSC-EV
sgMSC-EV
M2

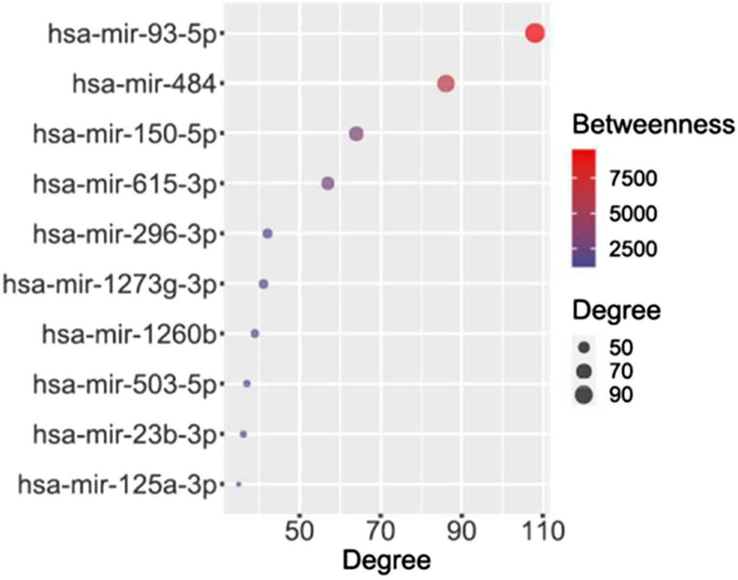
도면3a


sgMSC-EV
wjMSC-EV
20
10
0
-10
-20
PC2 (3.4%)
-25
0
25
PC1 (90.9%)

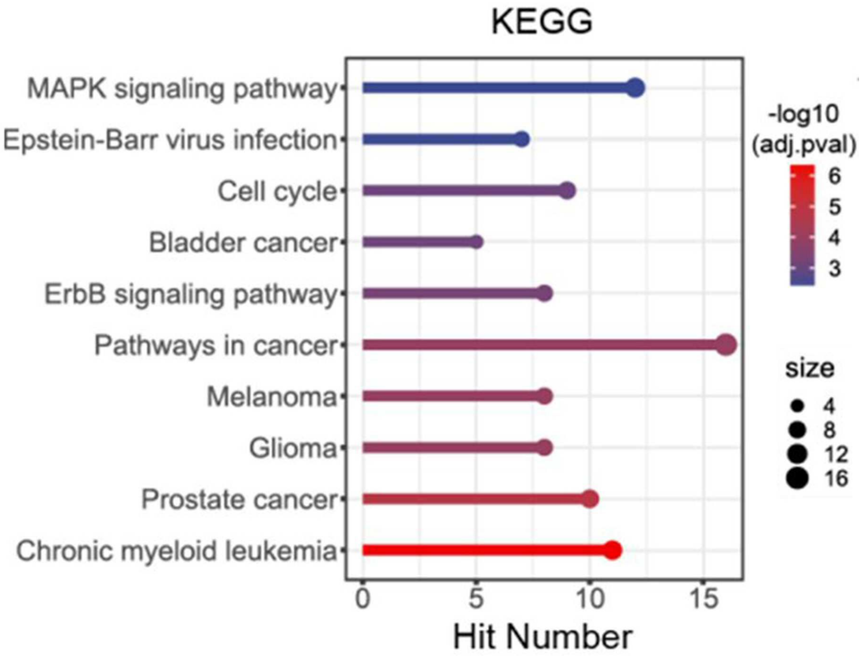
도면3b


hsa-mir-150-5p
hsa-mir-93-5p
hsa-mir-615-3p
hsa-mir-484

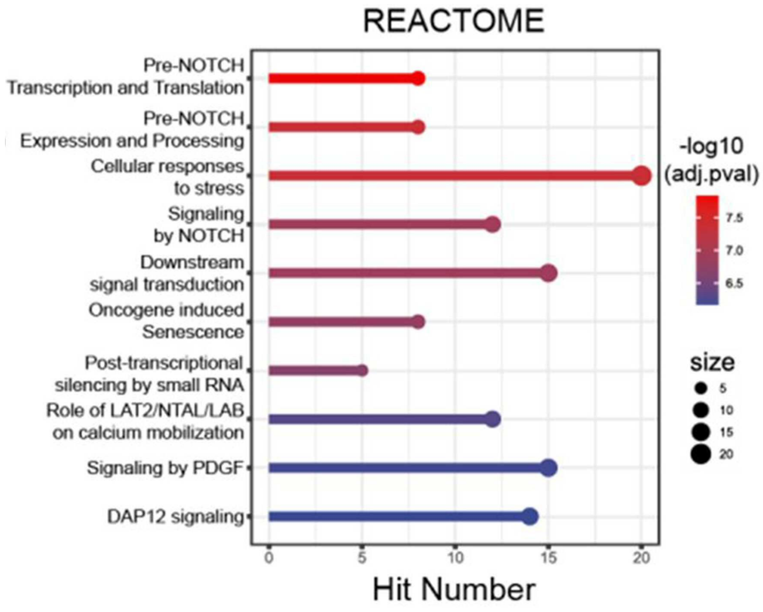
도면3c


hsa-mir-93-5p
hsa-mir-484
hsa-mir-150-5p
hsa-mir-615-3p
hsa-mir-296-3p
hsa-mir-1273g-3p
hsa-mir-1260b
hsa-mir-503-5p
hsa-mir-23b-3p
hsa-mir-125a-3p
50
70
90
110
Degree
Betweenness
7500
5000
2500
Degree
50
70
90

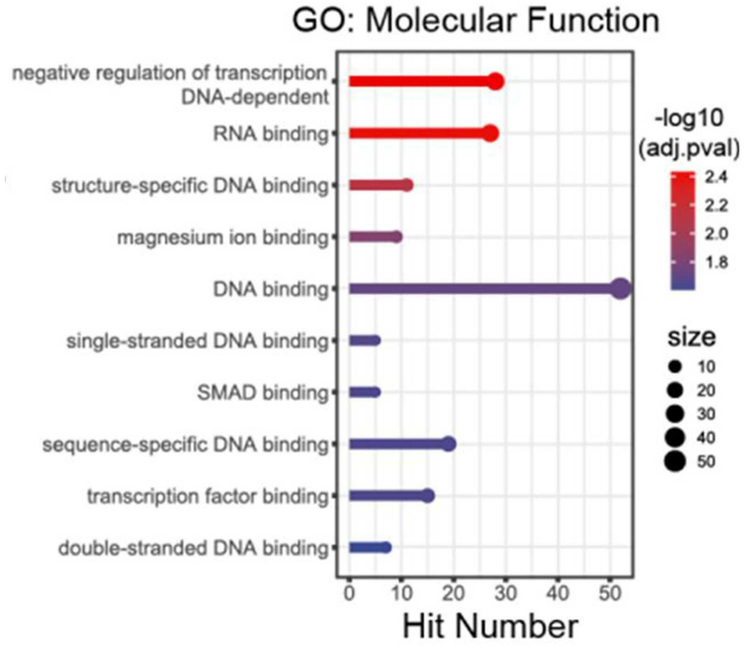
도면3d


KEGG
MAPK signaling pathway
Epstein-Barr virus infection
Cell cycle
Bladder cancer
ErbB signaling pathway
Pathways in cancer
Melanoma
Glioma
Prostate cancer
Chronic myeloid leukemia
0
5
10
15
Hit Number
-log10
(adj.pval)
6
5
4
3
size
4
8
12
16

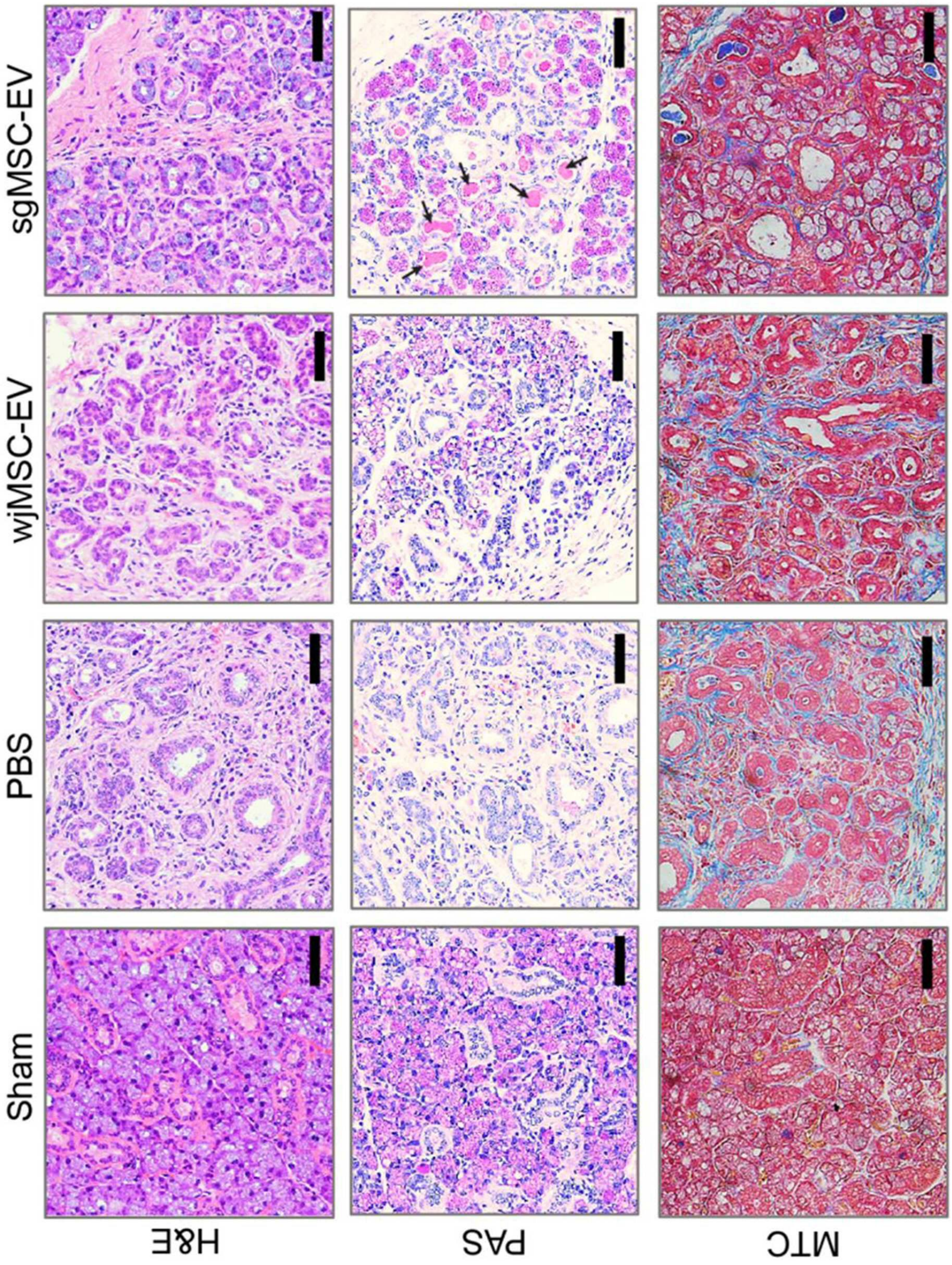
도면3e


REACTOME
Pre-NOTCH Transcription and Translation
Pre-NOTCH Expression and Processing
Cellular responses to stress
Signaling by NOTCH
Downstream signal transduction
Oncogene induced Senescence
Post-transcriptional silencing by small RNA
Role of LAT2/NTAL/LAB on calcium mobilization
Signaling by PDGF
DAP12 signaling
0
5
10
15
20
Hit Number
-log10 (adj.pval)
7.5
7.0
6.5
size
5
10
15
20

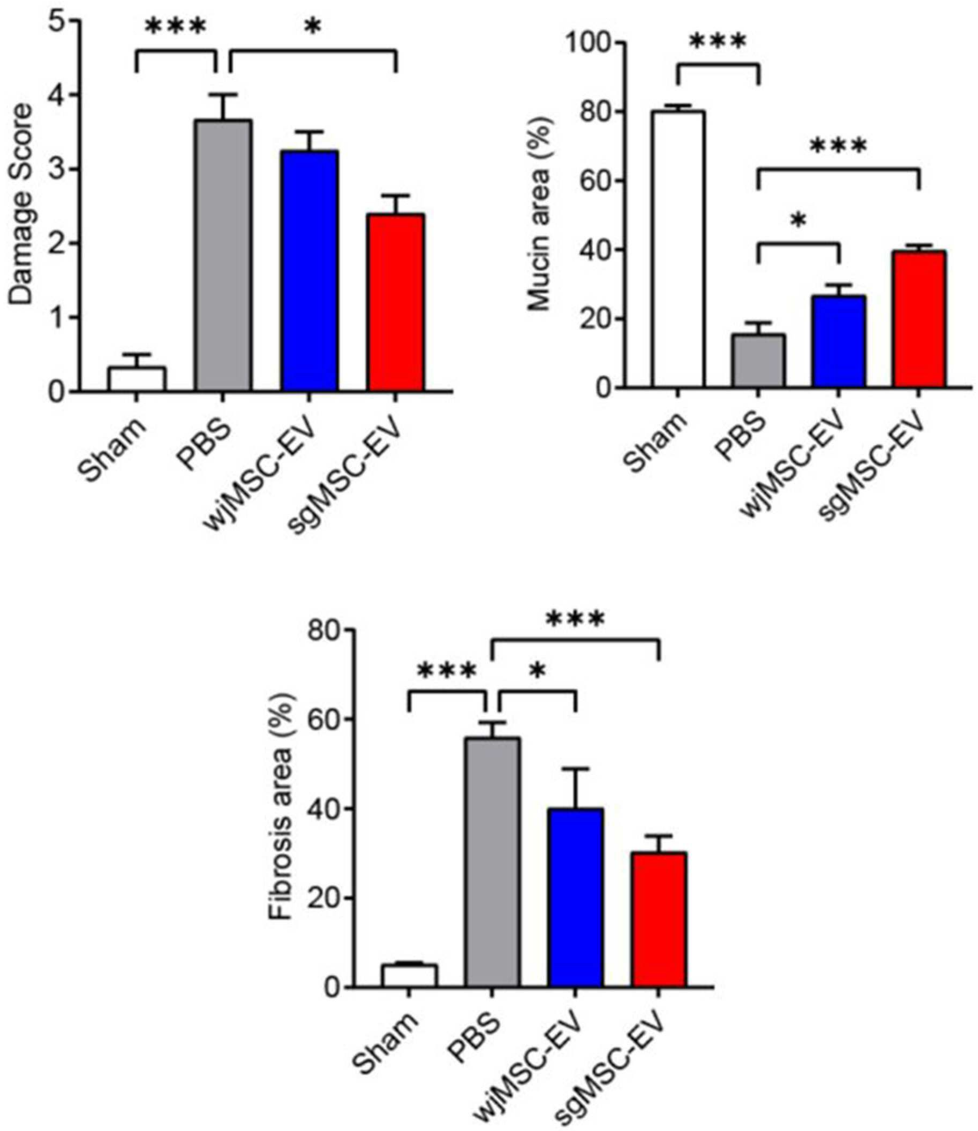
도면3f


GO: Molecular Function
negative regulation of transcription DNA-dependent
RNA binding
structure-specific DNA binding
magnesium ion binding
DNA binding
single-stranded DNA binding
SMAD binding
sequence-specific DNA binding
transcription factor binding
double-stranded DNA binding
0
10
20
30
40
50
Hit Number
-log10 (adj.pval)
2.4
2.2
2.0
1.8
size
10
20
30
40
50

도면4a



도면4b


Damage Score
***
*
Sham
PBS
wjMSC-EV
sgMSC-EV
Mucin area (%)
***
***
*
Sham
PBS
wjMSC-EV
sgMSC-EV
Fibrosis area (%)
***
***
*
Sham
PBS
wjMSC-EV
sgMSC-EV