



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0001525
(43) 공개일자 2018년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0149856(분할)
(22) 출원일자 2017년11월10일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-0079401
원출원일자 2016년06월24일
심사청구일자 2016년06월24일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박용범
서울특별시 서초구 명달로11길 29-3, 502호 (서초동, 서초4차상지리츠빌)
문진희
경기도 군포시 변영로 580, 101동 209호 (금정동, 신환아파트)
(74) 대리인
특허법인 정안

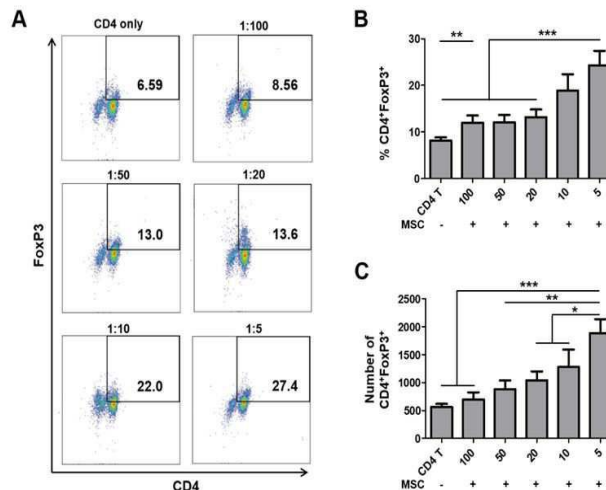
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 인간 중간엽 줄기세포를 이용한 FoxP3+ 조절 T 세포 생산 증대 기술

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양을 통해 조절 T 세포 생산을 증대시키는 기술에 관한 것이다. 많은 양의 조절 T 세포를 확보하는 것은 세포치료 관점에서 매우 중요한데, 조절 T 세포를 중간엽 줄기세포를 이용하여 생산을 증가시켜 그 양을 극대화하는 방법은 새롭고 획기적인 방법이 아닐 수 없다. 본 발명에 의하면, 중간엽 줄기세포는 CD4+ T 세포와의 다양한 공배양 비율에서 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현을 크게 증가시키며, 대표적 면역조절 사이토카인인 TGF- β 와 IL-10의 발현을 증가시킨다. 이 때, FoxP3+ PD-1+ 조절 T 세포가 크게 증가한다. PD-1 항체 처리 및 PD-1 유전자 결핍 마우스에서 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현이 저해됨을 관찰하였다. 중간엽 줄기세포에 의한 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현 증가는 PD-1 유전자 발현 증가가 관련되어 있는 것으로 생각된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C12N 2501/20 (2013.01)
C12N 2502/1352 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 보건산업진흥원
 연구사업명 첨단의료기술개발사업
 연구과제명 중간엽줄기세포 및 유래 분비단백체를 활용한 류마티스 관절염 치료기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2013.09.01 ~ 2015.08.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2058120
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 일반연구자지원사업
 연구과제명 수지상 세포와 T 세포에 대한 중간엽 줄기세포의 면역조절 기전 규명
 기 여 율 1/2
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.30

명세서

청구범위

청구항 1

중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양을 통해 분화된 조절 T 세포를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반 루푸스, 전신 경피증, 혈관염, 염증성 근육염, 쇼그렌 증후군, 염증성 대장염, 아토피 피부염, 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 중간엽 줄기세포를 이용하여 FoxP3+ 조절 T 세포 생산을 증대시키는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells)는 조직이나 기관의 분화된 세포들 사이에 존재하는 미분화된 성체줄기세포로써, 골수, 지방, 근육 등 인체 내 여러 조직으로부터 분리할 수 있으며, 스스로 증식하는 자가 재생능력 (self-renewal)을 가지고 있다. 또한, 체외에서 쉽게 증식이 가능하고 지방세포, 골세포, 연골세포, 근세포 등 여러 가지 다양한 조직 세포로 분화 가능하여 기존 줄기세포 연구들은 분화기능을 이용한 재생 연구에 집중되어 왔다.

[0003] 최근 대두되고 있는 중간엽 줄기세포의 면역조절기능은, 면역반응에 의한 손상으로부터 조혈모세포를 보호하고, 면역반응의 각 단계에 작용하여 면역조절 작용을 나타내어, 그 결과 면역반응 억제 및 항염증 반응으로 나타난다. 이러한 면역조절기능은 중간엽 줄기세포와 자연살해세포 (NK cell), 수지상세포 (dendritic cell), 대식세포 (macrophage), T 세포, B 세포 등과 같은 다양한 면역세포들과의 상호작용을 통해 일어난다.

[0004] 후천면역(adaptive immune) 반응에서 중간엽 줄기세포는 주로 T 세포 면역반응을 억제하며, 그 작용은 Th17 세포로의 분화억제 및 Foxp3+ 조절 T 세포 (Foxp3+ regulatory T cell)의 유도를 통해서 나타남이 알려져 있다.

[0005] 본 발명자들은 대표적 만성 염증성 질환인 류마티스 관절염 동물 모델에서 중간엽 줄기세포의 항염증 효과를 입증하였다. 중간엽 줄기세포가 가진 항염증 효과는 생체내에서 염증성 T 세포를 억제할 수 있는 조절 T 세포의 발현을 증가시킴으로써 나타나는 것을 발견하였다 (참조문헌 1).

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 참조문헌 1: Treatment of collagen-induced arthritis using immune modulatory properties of human mesenchymal stem cells. (Park KH et al. Cell Transplant 2016;25(6):1057-72)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 조절 T 세포 생산을 증대시키는 기술에 관한 것으로, 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 공배양 하여, FoxP3+ 조절 T 세포를 생산해내는 최적의 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [0008] 또한, 본 발명은 상기 조절 T 세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0011] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0012] 본 명세서에 사용되는 용어 "공배양"이란, 두 가지 이상의 세포를 동시에 키우는 기술로써, 이는 세포가 특정 세포 쪽으로 분화하는데 필요한 고가의 단백질이나 신호물질을 따로 넣어주지 않아도 함께 자라는 세포와 상호작용을 통해 얻을 수 있기 때문에 효율적이고 경제적인 방법으로 알려져있다. 본 발명에서는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 다양한 비율로 공배양을 실시한 결과, 발현이 증가된 조절 T 세포를 얻을 수 있었다. 상기 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양 비율은 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 및 1:100인 것이 바람직하며, 1:5인 것이 특히 바람직하다. 상기 공배양에 사용된 중간엽 줄기세포는 골수 유래 인간 중간엽 줄기세포를 사용하였으며, 상기 세포를 72 내지 86시간 동안 배양한 후, 5번째 계대를 사용하였다. 상기 공배양에 사용된 CD4+ T 세포는 비장세포를 분리하고 적혈구를 제거한 마우스의 비장으로부터 분리된 CD4+ T 세포를 사용하였다.
- [0013] 상기 상술한 바와 같이 공배양을 실시할 때, 조절 T 세포로의 분화에 영향을 미치는 인자로써 사이토카인을 추가적으로 첨가하여 실시할 수도 있다. 예를 들어, 마우스의 CD4+ T 세포에 조건에 맞는 사이토카인을 처리하여, 각각 Th1, Th17 세포로 분화시키는 실험에서, IL-12, 항-IL-4 항체를 사용하거나 IL-6, TGF- β 1, 항-IFN- γ 항체, 항-IL-4 항체 등을 사용하여 공배양한 예시가 있다. 사이토카인의 종류 또는 자극제의 종류에 따라서 분화의 정도 또는 분화되는 세포의 종류가 달라진다. 하지만, 본 발명의 일 구체예에서는, 중간엽줄기세포와 CD4+ T 세포에 다른 사이토카인을 처리하지 않고, T 세포를 활성화하기 위한 항-CD3 및 항-CD28 항체만을 처리하여 조절 T 세포의 분화에 현저한 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있다.
- [0014] 본 명세서에서 "조절 T 세포"란, T 세포 반응을 조절할 수 있는 세포를 말하며, 본 발명의 조절 T 세포는 CD4+ CD25+ FoxP3+ 조절 T 세포이다. 상기 조절 T 세포는 비정상적으로 활성화된 면역세포의 기능을 억제하여 염증 반응을 제어하는 특성이 있으며, 면역관용과 자가면역질환, 그리고 만성 염증 반응을 억제하여 이들 질환에 대한 치료효과를 나타낼 수 있다.
- [0015] 본 발명의 공배양을 통하여 분화되는 조절 T 세포의 세포분획은 유세포분석을 통하여 실시될 수 있다. 상기 세포 표면 항원을 항-마우스 항체로 염색한 후, 세포를 수집하여 유세포 분석기로 분석하는 방법을 통하여 공배양 비율에 따른 조절 T 세포 분화의 차이를 확인할 수 있다.
- [0016] 본 명세서에 사용되는 "중간엽 줄기세포"란, 조직이나 기관의 분화된 세포들 사이에 존재하는 미분화된 성체줄기세포로서 골, 연골, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등으로 분화될 수 있는 미분화된 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포의 종류는 그것이 어디로부터 유래한 것인지 관계없이 이용될 수 있으며, 예를 들어 골수, 조직, 배아, 제대혈, 혈액 또는 체액으로부터 얻을 수 있다. 골수, 조직 등의 채취 대상인 동물은 포유동물일 수 있다. 본 발명의 중간엽 줄기세포는 골수, 지방조직 및 제대혈로부터 수득하는 것이 바람직하며, 골수 유래 중간엽 줄기세포가 특히 바람직하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 공지의 중간엽 줄기세포 공급원으로부터 중간엽 줄기세포를 수득하는 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져있다.
- [0017] 본 명세서에 사용되는 용어 "사이토카인"이란, 면역 세포가 분비하는 단백질을 통틀어 일컫는 것으로, 사이토카

인은 세포로부터 분리된 후 다른 세포나 분리한 세포 자신에게 영향을 줄 수 있으며, 대식세포의 증식을 유도하거나 분리 세포 자신의 분화를 촉진할 수 있는 단백질을 의미한다. 본 발명의 공배양을 통하여 발현이 증가되는 사이토카인으로 염증성 사이토카인과 면역 조절 사이토카인인 TGF- β 및 IL-10이 있다. 상기 사이토카인은 24, 48, 72시간 동안 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 면역세포를 공배양한 배양액을 채취하여 그 농도를 ELISA로 측정할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서 "CD3" 및 "CD28"이란, T 세포표면에서 발현되는 분화 클러스터 (cluster of differentiation protein) 단백질로서, T 세포 활성화 및 생존에 필요한 공동 자극 신호를 제공한다. CD3은 T 세포항원수용체에 결합한 신호전달 분자로, γ , δ , ϵ , ζ , η 의 5종류 분자로 구성되고, 1분자의 TCR (T 세포수용체)에 연결된 γ , δ , ϵ 2, ζ 2 (또는 ζ , η)의 6분자가 결합하여 기능적인 항원수용체복합체를 형성하며, 이는 T 세포에만 발현한다. 본 발명에서의 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양 시, 항-CD3와 항-CD28 항체를 처리하여 72시간 동안 반응시켜 공배양을 실시한다.

[0019] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "자가면역질환"이란, 자기의 장기조직이나 그 성분에 대해 항체가 생산되는 염증성 질환으로 여러 장기와 조직에 만성적인 전신적 염증을 일으키는 특성을 갖는 질병을 총칭하는 의미로서, 본 명세서에서 자가면역질환에는 류마티스 관절염, 전신 홍반 루푸스, 전신 경피증, 혈관염, 염증성 근육염, 쇼그렌 증후군, 염증성 대장염, 아토피 피부염, 다발성 경화증 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에서 "예방"이란, 상기 조성물의 투여에 의해 자가면역질환을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0021] 본 발명의 일 구체예에서 "치료"란, 상기 조성물의 투여에 의해 자가면역질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에서 "약학 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학 조성물은 자가면역질환을 개선시키거나 치료를 위해 사용되는 것이며, 이를 위한 조성물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0023] 본 발명은 중간엽 줄기세포를 이용한 조절 T 세포 생산 방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 주요한 특징은 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양을 통하여 면역조절 T 세포의 생산이 증대되는 것이다. 조절 T 세포의 발현 시 세포 내 PD-1 유전자 및 단백질 발현이 증가한다는 것을 제공한다.

[0025] 본 발명의 조절 T 세포는 중간엽 줄기세포와 T 면역세포를 공배양함으로써, 공배양하지 않았을 때에 비하여 증대된 조절 T 세포의 생산을 얻을 수 있다. 상기 공배양은 배양한 중간엽 줄기세포가 부착된 플레이트에 마우스로부터 분리된 CD4+ T 세포를 공배양하고, 여기에 항-CD3와 항-CD28 항체를 처리하여 72시간 동안 반응시킴으로써 실시된다. 공배양 시, 중간엽 줄기세포 및 CD4+ T 세포의 비율을 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 및 1:100으로 실시하였으며, 상기 비율 중 가장 높은 조절 T 세포를 보이는 최적의 비율을 확립할 수 있었다.

[0026] 또한, 상기 공배양을 통하여, TGF- β , IL-10 등의 사이토카인의 발현이 증가되고, PD-1, Nrp-1, CTLA-4, LAG-3 등의 전사조절인자가 발현이 증가되며, FoxP3, PD-1, Nrp-1 등의 단백질이 증가되는 것을 ELISA, 웨스턴 블랏, 실시간 중합효소연쇄반응 등의 방법을 통하여 분석할 수 있다.

[0027] 또한, 중간엽 줄기세포에 의한 조절 T 세포의 발현이 PD-1에 의존적인지를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 중간엽 줄기세포와 CD4+ 세포를 1:5의 비율로 항-CD3와 항-CD28 항체를 처리하여 72시간 동안 반응을 시켜 공배

양할 때, 항 PD-1 항체를 처리하여 PD-1의 발현을 차단한다. 그 결과, 항 PD-1 항체를 처리했을 때 조절 T 세포의 세포 분획이 감소되는 것을 확인할 수 있다. 또한, PD-1 발현되지 않는 PD-1 녹아웃 마우스의 비장에서 분리한 CD4+ T 세포를 항 PD-1 항체로 처리하지 않는 것만을 제외하고 상기와 같은 방법으로 공배양 하였을 때, 야생형에 비해 PD-1 녹아웃 마우스에서 조절 T 세포의 세포 분획이 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 조절 T 세포의 생산 방법으로써, 분리된 CD4+ T 세포와 중간엽 줄기세포를 공배양하는 단계를 포함하며, 상기 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포가 1:2 내지 1:8의 세포 수 비율로 공배양되는 조절 T 세포의 생산 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 세포 수 비율은 1:4 내지 1:6인, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하고, 상기 공배양하는 단계에 항-CD3 및 항-CD28 항체 중 어느 1종 이상의 항체를 첨가하는 단계를 추가적으로 포함하며, 상기 공배양은 24 내지 72시간 동안 공배양되는, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 조절 T 세포가 FoxP3+, PD1+, CTLA-인, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 중간엽 줄기세포가 골수 (bone marrow)-, 지방 조직 (adipose tissue)- 및 제대혈 (cord blood)-유래 중간엽 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 공배양을 통하여 염증성 사이토카인 및 면역 조절 사이토카인의 발현이 증가하는, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 사이토카인이 TGF- β 및 IL-10인, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 공배양을 통하여 전사조절인자의 발현이 증가하는, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 전사조절인자가 PD-1, Nrp-1, CTLA-4 및 LAG-3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 공배양을 통하여 단백질의 발현이 증가하는, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공하며, 상기 단백질이 FoxP3, PD-1 및 Nrp-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 조절 T 세포의 생산 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명의 일 구체예에서, 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양을 통해 분화된 조절 T 세포를 유효성 분으로 포함하는, 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하며, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반 루푸스, 전신 경피증, 혈관염, 염증성 근육염, 쇼그렌 증후군, 염증성 대장염, 아토피 피부염, 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포의 공배양을 통하여 FoxP3+ 조절 T 세포를 생산하는 최적의 기술을 제공하며, 이를 통하여 향후 자가면역질환을 치료하는데 효과가 있는 조성물로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포와 마우스 CD4+ T 세포와의 다양한 공배양 비율에 따른 FoxP3+ 조절 T 세포의 세포 분획을 보여준다.

도 1a는 유세포분석(flow cytometry) 자료로서 공배양 비율에 따라 조절 T 세포의 발현이 증가함을 보여준다.

도 1b는 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현을 세포분획 퍼센트로 나타낸 것이다.

도 1c는 공배양에 의해 발현된 FoxP3+ 조절 T 세포의 숫자를 나타낸 것이다.

도 2는 조절 T 세포에서 발현하는 것으로 알려진 면역조절 사이토카인인 TGF- β 와 IL-10의 발현을 ELISA 검사를 통해 분석한 결과이다.

도 3은 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현을 조절하는 4가지 전사조절인자의 발현을 보여준다.

도 3a는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 예정세포사 (programmed cell death-1, PD-1) 유전자를 나타낸 것이다.

도 3b는 중간엽 줄기세포와 CD4 양성 T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4 T 세포에서 발현되는 Nrp-1 유전자를 나타낸 것이다.

도 3c는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 CTLA-4 유전자를 나타낸 것이다.

도 3d는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 LAG-3 유전자를 나타낸 것이다.

도 4는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포와의 다양한 공배양 비율에 따른 FoxP3+ PD-1+ 조절 T 세포의 세포 분획

을 보여준다.

도 4a는 유세포분석 자료로써 공배양 비율에 따라 FoxP3+ PD-1+ 조절 T 세포의 발현이 증가함을 보여준다.

도 4b는 FoxP3+ PD-1+ 조절 T 세포의 발현을 세포분획 퍼센트로 나타낸 것이다.

도 5는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 단백질을 확인한 것이다.

도 5a는 FoxP3, PD-1, Nrp-1 및 액틴 단백질 발현의 정성적 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 FoxP3 단백질과 액틴 단백질의 비율을 나타낸다.

도 5c는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 PD-1 단백질과 액틴 단백질의 비율을 나타낸 것이다.

도 5d는 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 CD4+ T 세포에서 발현되는 Nrp-1 단백질과 액틴 단백질의 비율을 나타낸 것이다.

도 6은 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 72시간 동안 공배양할 때, 항PD-1 항체를 처리하여 CD4+ T cell의 PD-1을 차단한 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 유세포분석 자료로써 항PD-1 항체를 처리하면 FoxP3+ 조절 T 세포의 세포 분획이 감소됨을 보여준다.

도 6b는 정량 분석으로, 항PD-1 항체를 처리하면 중간엽 줄기세포에 의한 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현이 감소됨을 보여준다.

도 7은 중간엽 줄기세포와 PD-1 발현이 되지 않는 PD-1 녹아웃 (knockout) 마우스의 비장에서 분리한 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 72시간 동안 공배양한 후, FoxP3+ 조절 T 세포의 발현을 조사한 것이다.

도 7a는 FoxP3+ 조절 T 세포의 세포 분획이 야생형 (wild type)에 비해 PD-1 녹아웃 마우스에서 감소됨을 보여준다.

도 7b는 정량 분석으로, FoxP3+ 조절 T 세포의 발현이 감소됨을 세포분획 퍼센트로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] 실시예

[0034] <인간 중간엽 줄기세포 배양 및 확보>

[0035] 한국 식약청의 기준[GMP(의약품 제조 품질 관리 기준)]을 준수하는 연세대학교 세포치료센터로부터 골수 유래의 인간 중간엽 줄기세포를 초기 계대에서 분양 받아서 배양하였다. 식약청 임상 승인 인간 중간엽 줄기세포 배양 조건인 배양접시에 중간엽 줄기세포 배양용 배지 (10% FBS, 0.1mM 머캅토에탄올, 1% 비필수아미노산이 첨가된 90% DMEM low glucose)를 넣고, 72-86시간 동안 배양하였다. 매 2-3일 간격으로 배지를 교환하였으며, 세포 배양물은 70-85%의 컨플루언스로 계대하고 5번째 계대를 연구에 사용하였다.

[0036] <마우스 CD4 양성 T 세포의 분리>

[0037] 6주령 된 DBA1 마우스의 비장에서 비장세포를 분리하고 RBC 라이시스 용액을 1분 처리하여 적혈구를 제거하였다. 이후, CD4+ T 세포 MACS 분리 키트 (Miltenyi Biotech, 독일)를 이용하여 CD4+ T 세포를 분리하였다.

[0038] <중간엽 줄기세포와 T 면역세포의 공배양>

[0039] 골수 유래 중간엽 줄기세포를 12 웰 플레이트에 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 개 부착시킨 후, CD4+ T 세포를 각각 1×10^6 , 5×10^5 개의 농도로 중간엽 줄기세포가 부착된 플레이트에 직접 공배양 하였다. 여기에 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-CD3와

22 μ g/ml의 항-CD28 항체를 처리하여 72시간 동안 반응하게 하였다. 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포와 마우스 CD4+ T 세포와의 다양한 공배양 비율에 따른 FoxP3+ 조절 T 세포의 세포 분획을 도 1에 나타내었으며, 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포와 마우스 CD4+ T 세포를 1:5의 비율로 공배양하였을 때, FoxP3+ 조절 T 세포가 최대로 발현된 것을 확인할 수 있었다. 도 4에서도 1:5의 비율로 공배양하였을 때, FoxP3+ PD-1+ 조절 T 세포의 발현이 최대로 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[0040] <유세포분석 (flow cytometry)>

[0041] FoxP3+ 조절 T 세포의 세포분획을 유세포분석 실시하였다. 분석을 위해 다음의 세포 표면 항원을 항-마우스 항체 (BD Pharmigen 및 eBioscience, 미국)로 염색하였다. CD4+, CD25+, CD279+, FoxP3+ 세포를 수집하고 유세포 분석기 (FacsVerse, BD Pharmigen, 미국)로 분석한 후, FlowJo를 사용하여 결과를 분석하였다.

[0042] <중간엽 줄기세포와 T 세포의 공배양을 통한 사이토카인의 측정>

[0043] 24, 48, 72시간 동안 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 면역세포를 공배양한 배양액을 채취하여 염증성 사이토카인과 면역 조절 사이토카인의 농도를 ELISA로 측정하여 도 2에 나타내었다. 도 2에서 Y 축의 값은 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 배양액 상층액에서 분석된 두 사이토카인의 발현양이다. 도 2에서, Y 축의 값은 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 24, 48, 72시간 동안 공배양한 배양액 상층액에서 분석된 두 사이토카인의 발현양을 나타낸다.

[0044] <실시간 중합효소연쇄반응 (real time PCR)>

[0045] 24, 48, 72시간 동안 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 면역세포를 공배양한 후, 세포를 모았다. 세포로부터 RNA를 분리하여 RNA 양을 정량한 후, Maxime RT PreMix (인트론, 대한민국)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 중합 효소연쇄반응은 SimpliAmpTM Thermal cycler (Applied Biosystems, 독일)를 이용하여 반응시켰다. 결과값에 대하여 GAPDH로 정규화 (normalization)하고, Ct 값으로 유전자 발현을 정량화하였다. 공배양 시간이 증가할수록 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현을 조절하는 4 가지 전사조절인자인 PD-1, Nrp-1, CTLA-4 및 LAG-3의 유전자 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있다 (도3).

[0046] <웨스턴 블롯>

[0047] 각 샘플에 대한 전(whole) 세포 용해물 (20 μ g)을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하였다. 전기영동을 통해 단백질을 분리시키고, PVDF 막으로 250mA로 90분 동안 전송하여 5% 탈지분유에 블로킹하였다. 블로킹 한 막을 항-PD-1, FoxP3, Nrp-1 및 항-액틴 (Santa Cruz, 미국)과 반응하고 TBS-T 버퍼로 10분 동안 3차례 세척하였다. 다음, 막을 HRT 결합된 항-고트 또는 항-래빗 IgG로 반응하였다. TBS-T 버퍼로 10분 동안 3차례 세척하고 화학발광 기질(Promega, 미국)을 처리하여 LAS4000에서 감광하였다. 공배양 조건에서 FoxP3, PD-1, Nrp-1 단백질이 증가하는 것을 알 수 있다 (도 5).

[0048] <FoxP3+ 조절 T 세포 발현에 PD-1 기능 확인>

[0049] PD-1 중화 항체 실험

[0050] 중간엽 줄기세포에 의한 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현 증가가 PD-1에 의존적인지 확인하기 위하여, 중간엽 줄기세포와 CD4+ T 세포를 1:5 비율로 72시간 동안 공배양할 때, 항PD-1 항체 (20 μ g/웰)를 처리하여 PD-1의 발현을 차단하였다. 6주령 된 DBA1 마우스의 비장에서 비장세포를 분리하고, CD4+ T 세포 MACS 분리 키트 (Miltenyi Biotech, 독일)를 이용하여 CD4+ T 세포를 분리하였다. 중간엽 줄기세포를 12 웰 플레이트에 1x10⁵개 부착시킨 후, CD4+T 세포를 5x10⁵개의 농도로 중간엽 줄기세포가 부착된 플레이트에 직접 공배양 하였다. 여기에 2 μ g/ml의 항-CD3와 2 μ g/ml의 항-CD28 항체를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 항PD-1 항체 처리 후, 중간엽 줄기세포에 의한 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현이 감소된 결과를 도 6에 나타내었다.

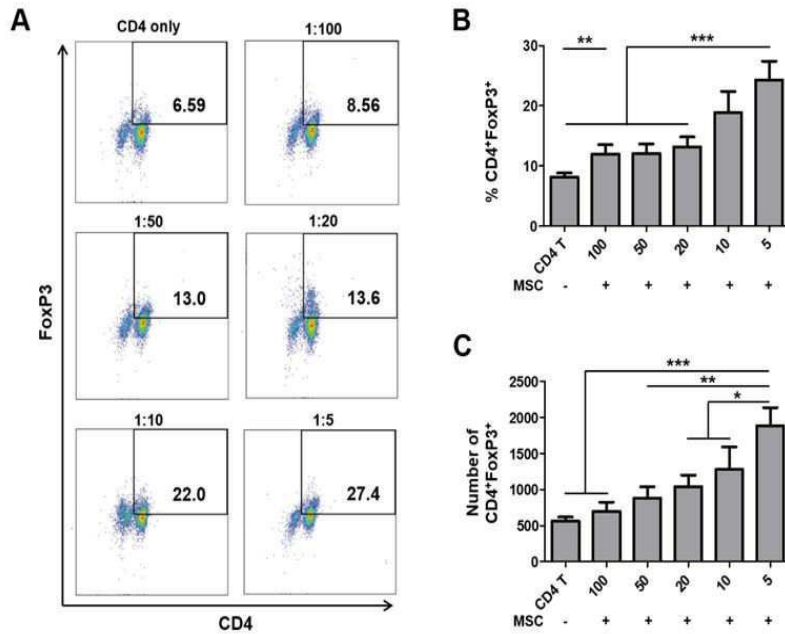
[0051] PD-1 knockout CD4+ T 세포 실험

[0052] 중간엽 줄기세포에 의한 FoxP3+ 조절 T 세포의 발현 증가가 PD-1에 의존적인지 확인하기 위하여, PD-1 발현이 되지 않는 PD-1 knockout 마우스의 비장에서 분리한 CD4+ T 세포를 중간엽 줄기세포와 1:5 비율로 공배양하였다. C57BL6 배경의 PD-1 knockout 마우스의 비장에서 비장세포를 분리한 후, CD4+ T 세포 MACS 분리 키트 (Miltenyi Biotech, 독일)를 이용하여 CD4+ T 세포를 분리하였다. 중간엽 줄기세포를 12 웰 플레이트에 1x10⁵개 부착시킨 후, CD4+T 세포를 5x10⁵개의 농도로 중간엽 줄기세포가 부착된 플레이트에 직접 공배양

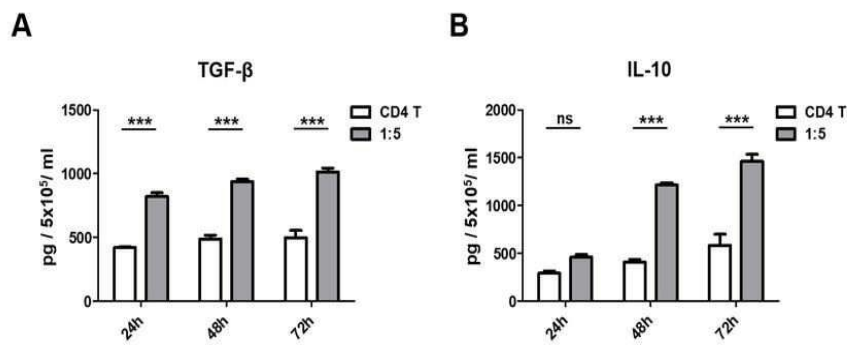
하였다. 여기에 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-CD3와 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-CD28 항체를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 상기와 같은 방법으로 공배양을 실시한 후, FoxP3+ 조절 T 세포의 발현을 도 7에 나타내었다.

도면

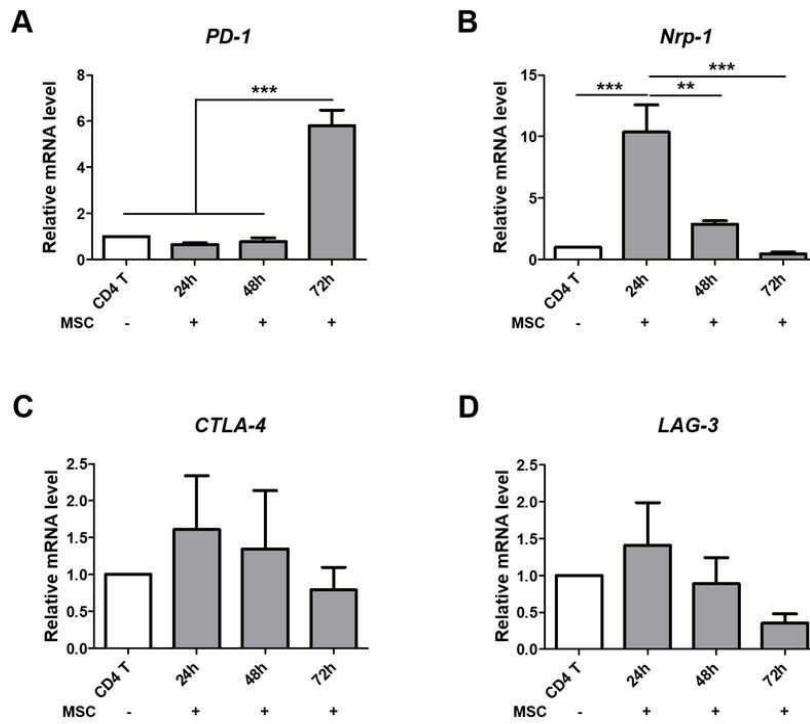
도면1



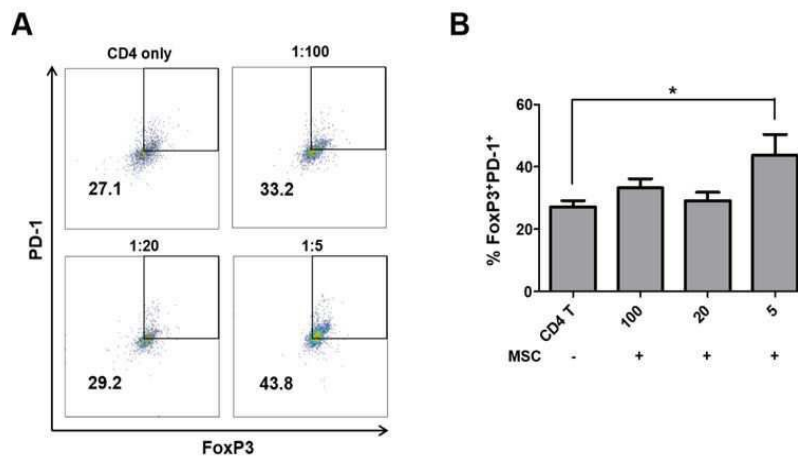
도면2



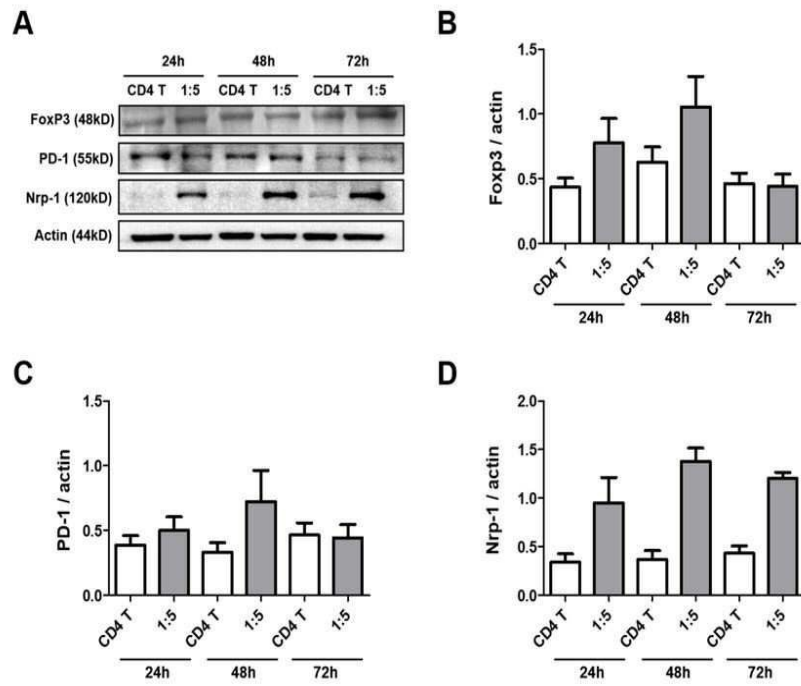
도면3



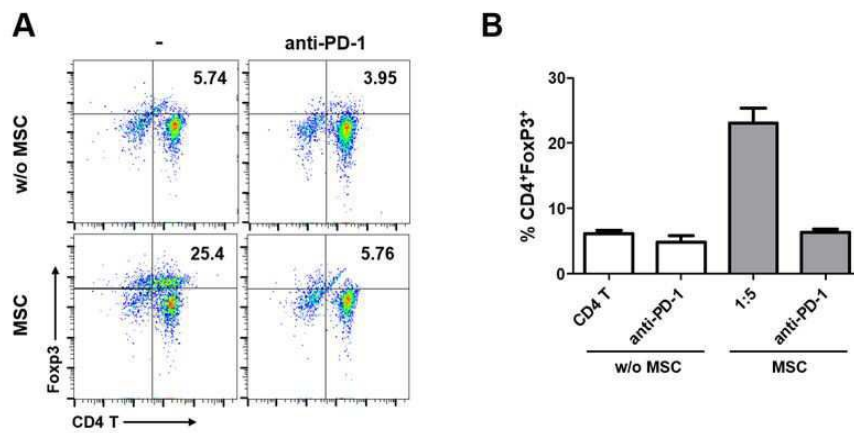
도면4



도면5



도면6



도면7

