	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0104649 (43) 공개일자 2012년09월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/12 (2006.01) A61F 2/02 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0006440 (22) 출원일자 2011년01월21일 심사청구일자 2011년01월21일		(71) 출원인 (주)치아줄기세포뱅크 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학 원 (신촌동) 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신 촌동) (72) 발명자 김창성 서울특별시 서초구 신반포로 171, 신반포한신6차 아파트 214-408호 (잠원동) 국일 서울특별시 서대문구 연희로11마길 65, 301호 (연 희동) (74) 대리인 특허법인다나

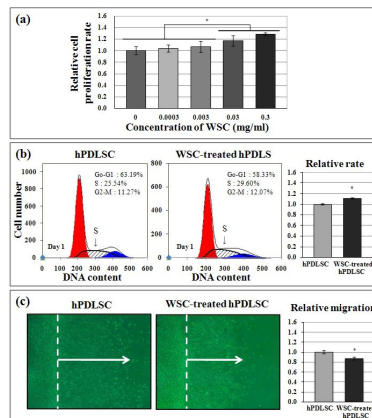
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 포함하는 이식용 조성물**

### (57) 요약

본 발명은 인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 포함하는 이식용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따르면 수용성 키틴은 인간 치주인대 줄기 세포에 의한 인 비트로 및 인 비보에서의 콜라겐 타입 I 및 III의 형성을 효과적으로 자극하며, 인간 치주인대 줄기세포의 증식을 촉진하고, 인간 치주인대 줄기 세포의 이동은 저해한다. 또한, 수용성 키틴은 인간 치주인대 줄기 세포로 하여금 미성숙 타입 보다는 성숙 콜라겐을 생산하도록 유도할 수 있다. 따라서 인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 함께 포함하는 이식용 조성물은 연부 조직의 결함과 같이 콜라겐 조직 재생이 필요한 환자에게 유용하게 사용될 수 있다.

### 대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 포함하는 이식용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간 치주인대 줄기 세포는 자가 또는 타가 유래인 이식용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

인간 치주인대 줄기 세포는 조성물 1ml 당  $1 \times 10^4$  내지  $5 \times 10^{10}$  cells로 포함되는 것인 이식용 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

수용성 키틴의 수평균 분자량은 35,000 내지 55,000인 이식용 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

수용성 키틴의 중량평균분자량은 85,000 내지 150,000인 이식용 조성물.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

수용성 키틴의 탈아세틸화 정도는 40 내지 60%인 이식용 조성물.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

수용성 키틴의 고유 점성도는 1.5 dl/g 내지 2.5dl/g인 이식용 조성물.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

수용성 키틴의 농도는 0.02 내지 0.5mg/ml인 이식용 조성물.

### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 이식용 조성물은 연부조직 결함 보정, 남성의 성기능 개선을 위한 충전, 여성의 유방확대술, 요실금 치료를 위한 것인 이식용 조성물.

### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 이식용 조성물은 진피 내, 피하, 또는 근육 내로 투여되는 것인 이식용 조성물.

## 명세서

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 포함하는 이식용 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 미용 분야에 있어서, 다양한 천연 및 합성 물질을 주입하여 변형된 부피의 재건, 피부 섬유아세포 증식의 향상, 콜라겐 조직의 복구에 의해 피하 함몰과 안면 주름을 치료하고 있다. 그러나, 이런 통상적인 미용 치료는 중요한 결점을 갖고 있다. 즉, 생분해성 삽입물들의 경우에는 부피를 유지하는데 있어서 일시적이고 비예측적이라는 결점을 갖고 있으며, 반면 비생분해성 제품들은 원치않는 이동의 문제가 생기고 재흡수가 잘 되지 않아 알려지 및 이물 반응을 야기한다.

[0003] 이러한 문제점들을 해결하기 위해 중간엽 줄기 세포가 대안적인 필링 물질로 도입되었다. 그들은 콜라겐 또는 지방질 매트릭스를 실질적인 양으로 생산할 수 있고, 더 장기간 지속되며, 면역학적 문제를 발생시키지 않을 수 있기 때문이다. 최근, 중간엽 줄기 세포의 원천으로는 골수 및 지방 조직을 비롯한 여러 종류가 이용되고 있다. 그러나, 이들 세포를 획득하기 위해서는 일반적으로 2차적인 수술이 필요하다.

[0004] 한편, 치아 유래의 중간엽 줄기세포가 그들의 비교할만한 줄기세포 특성 및 치과 치료 동안의 채취 용이성으로 인하여 최근 집중적으로 연구되고 있다. 인간 치주인대 줄기세포(Human periodontal ligament (PDL) stem cells)는 치과교정술 목적으로 발치되는 소구치 또는 매복된 제3대구치의 발치 동안에 얻을 수 있는 중간엽 줄기 세포의 한 유형이다. 인간 치주인대 줄기 세포는 특이적 환경 하에서 골형성, 백악질 형성, 지방생성, 연골 형성, 신경형성, 및 콜라겐-형성 세포로 분화될 수 있는 고증식성 세포이다. 흥미롭게도 인간 치주인대 줄기 세포의 조직공학적 잠재력은 스캐폴드 타입에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 인간 치주인대 줄기 세포는 하이 드록시아파타이트/트리칼슘포스페이트 입자와 함께 이식될 때에는 백악질 및 PDL 유사 조직을 형성하는 반면, 콜라겐-기반 입자와 함께 이식될 때에는 실질적인 콜라겐 섬유가 재생된다. 그러나, 인간 치주인대 줄기세포만으로는 다른 중간엽 줄기세포나 섬유아세포에 비해 생체 내에 이식될 때 콜라겐 섬유에 대한 한 재생능 및 지속 능이 제한적으로 유효하다고 보고되고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 인간 치주인대 줄기 세포의 콜라겐 합성을 유의하게 향상시킴으로써 우수한 콜라겐 조직 수복 효과를 나타내는 이식용 조성물을 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 인간 치주인대 줄기 세포의 잠재력을 이용한 콜라겐 합성을 촉진하기 위해, 이와 함께 사용할 담체에 대해 연구하였다.

[0007] 키틴은 안정적인 콜라겐의 형성을 촉진함으로써 우수한 상처 치유 특성을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한, 수용성 키틴은 통상적인 키틴 및 키토산에 비해 상처 치유에 있어서 보다 효과적이며, 수용성 키틴 용액의 존재 하에서 치유된 조직은 높은 인장강도를 보이며, 콜라겐 섬유의 배열이 정상적인 피부의 것과 유사한 것으로 보고된 바 있다[Cho YW, Cho YN, Chung SH, Yoo G, Ko SW. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. Biomaterials 1999;20:2139-45.].

[0008] 이에 따라 본 발명자들은 인간 치주인대 줄기 세포와 수용성 키틴의 동시 사용이 인간 치주인대 줄기 세포의 콜라겐 형성을 상승시킬 수 있을 것이라고 가정하고 인간 치주인대 줄기 세포의 기본적 생체 활성도를 포함하여 콜라겐 합성능에 대한 수용성 키틴의 영향을 조사하였다.

[0009] 그 결과, 하기 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 수용성 키틴은 인간 치주인대 줄기 세포의 증식을 증진시키며, 그들의 이주 활성을 감소시키고, 인간 치주인대 줄기 세포가 보다 많은 콜라겐 조직을 안정적인 형태로 생산하도록 도와준다는 것을 확인할 수 있었다.

[0010] 따라서, 본 발명은 인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 포함하는 이식용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에 사용되는 인간 치주인대 줄기 세포는 치과교정술 목적으로 발치되는 소구치 또는 매복된 제3대구치의 발치 동안에 공지의 방법을 통해 용이하게 채취될 수 있다. 치아 조직으로부터 수득된 인간 치주인대 줄기 세포

는 그 자체로 또는 배양을 통해 증식시켜 사용할 수 있다. 인간 치주인대 줄기 세포로서의 특성을 유지하는 한 증식의 방법이나 배양의 횟수 등에는 제한이 없다.

[0012] 한 구체예에서, 상기 인간 치주인대 줄기 세포는 자가 또는 타가 유래인 것일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 이식용 조성물에 있어서, 인간 치주인대 줄기 세포의 함량은 이에 제한되는 것은 아니나 조성물 1ml 당  $1 \times 10^4$  내지  $5 \times 10^{10}$  cells일 수 있다. 시술시 이식되는 인간 치주인대 줄기 세포의 총 함량은 환자의 상태를 고려하여 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명에서 사용되는 수용성 키틴은 본래 불용성인 키틴을 수용성으로 개질한 것이다. 본 발명에서 있어서 사용되는 수용성 키틴의 수평균 분자량은 이에 제한되는 것은 아니나, 35,000 내지 55,000이고, 바람직하게는 40,000 내지 50,000이다. 또한 수용성 키틴의 중량평균분자량은 이에 제한되는 것은 아니나 85,000 내지 150,000이고, 바람직하게는 90,000 내지 100,000이다. 또한, 수용성 키틴의 탈아세틸화 정도는 40 내지 60%일 수 있으며, 바람직하게는 45 내지 55%일 수 있다. 또한, 수용성 키틴의 고유점성도는 1.5 dl/g 내지 2.5dl/g이고, 바람직하게는 1.8 dl/g 내지 2.2dl/g일 수 있다.

[0015] 한 구체예에서, 상기 수용성 키틴의 농도는 이에 제한되는 것은 아니나 0.02 내지 0.5mg/ml일 수 있다. 상기 범위 내의 수용성 키틴의 농도가 인간 치주인대 줄기 세포의 증식, DNA 합성 증가, 콜라겐 합성 등에 유의한 효과를 미칠 수 있으며, 이식에 적당한 점도를 제공할 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 이식용 조성물은 주름과 같은 연부조직 결함 보정, 남성의 성기능 개선을 위한 충전용, 그리고 여성의 유방확대술, 요실금 치료 등을 위해 세포 이식이 필요할 때 매우 유용하게 사용할 수 있다. 연부조직 결함보정은 미간, 비순 주름을 포함하는 안면, 구강 주위의 라인, 망석중 라인, 진피 디보트, 둔부, 장딴지 등의 부위에 본 발명의 이식용 조성물을 직접 이식하여 상태 개선효과를 유도할 수 있으며, 이식부위는 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 이식용 조성물은 진피 내, 피하, 또는 근육 내로 투여될 수 있다.

[0018] 본 발명의 이식용 조성물은 당업자에게 공지된 임의의 수단으로 피시술자에게 투여할 수 있으며, 예를 들면, 주사기와 같은 전달 장치에 적재하여 진피 내, 피하, 또는 근육 내 투여하거나 또는 요도 주위의 영역, 주름살 아래의 피하공간 또는 유방 내의 피하공간의 특정 표적부위로 전달 가능케 하는 다른 기술로 투여할 수 있다. 바람직하게는 바늘 또는 카테터로, 또는 직접 수술 이식으로 투여될 수 있으며, 수술 이식의 실시 양태에서 본 발명의 세포 이식용 조성물은 미리 형성된 매트릭스와 같은 첨가제를 함께 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 이식용 조성물은 기타 다른 세포, 조직, 조직의 단편, 세포 생장에 필요한 성장인자 또는 세포 분화제, 생활성 또는 불활성 화합물, 재흡수가 가능한 스캐폴드 및 조성물의 전달, 효능, 관용성 또는 기능 향상을 위한 기타 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다.

### 발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면 수용성 키틴은 인간 치주인대 줄기 세포에 의한 인 비트로 및 인 비보에서의 콜라겐 타입 I 및 III의 형성을 효과적으로 자극하며, 인간 치주인대 줄기세포의 증식을 촉진하고, 인간 치주인대 줄기 세포의 이동은 감소한다. 또한, 수용성 키틴은 인간 치주인대 줄기 세포로 하여금 수용성 타입 보다는 불용성 콜라겐을 생산하도록 유도할 수 있다. 따라서 인간 치주인대 줄기 세포 및 수용성 키틴을 함께 포함하는 이식용 조성물은 연부 조직의 결함과 같이 콜라겐 조직 재생이 필요한 환자에게 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 인간 치주인대 줄기 세포의 증식 및 이동에 미치는 수용성 키틴의 영향을 살펴보기 위한 BrdU 분석, 세포-주기 분포 분석 및 인 비트로 세포 이동능의 분석 결과를 보여준다.

도 2는 인간 치주인대 줄기 세포의 콜라겐 합성 향상에 대해 미치는 수용성 키틴의 영향을 살펴보기 위한 ECM 분석, Sircol 콜라겐 탐지 분석, real time PCR 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 보여준다.

도 3은 인간 치주인대 줄기 세포의 이동에 의한 콜라겐 섬유의 재생을 보여주는 조직학적 및 조직계측학적 분석의 결과를 보여준다.

도 4는 콜라겐 타입 I 및 III에 대한 면역조직화학적 분석의 결과를 보여준다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

### [실시예]

#### [0024] 1.1. 수용성 키틴의 제조

[0025] 수용성 키틴을 Kurita et al. [Kurita K, Koyama Y, Nishimura S, Kamiya M. Facile preparation of water-soluble chitin from chitosan. Tokyo: Chemical Society of Japan; 1989.]에 기술된 방법을 이용하여 제조하였다. 한국산 계 *Chionoecetes opilio* 의 껍질로부터 얻어 우리 실험실에서 제조된 저분자량 키토산을 시작 물질로 이용하였다. 30 g의 키토산을 5% 아세트산을 함유한 수용액 800 ml에 녹이고, 키토산 용액을 800 ml의 에탄올을 가하여 회석시켰다. 1000 ml의 피리딘과 110 g의 아세트산 무수물의 제조된 혼합물을 키토산 용액에 가하였다. 실온에서 10시간 동안 교반 후, 반응 용액을 서서히 3000 ml의 아세톤에 붓고, 모여진 침전물을 여과하였다. 여과된 침전물을 건조시킨 후, 2% 아세트산을 함유한 수용액 중에 용해시키고, 불용성 물질을 여과에 의해 제거하였다. 남은 용액의 pH를 12로 조절한 후, 용액을 5000ml의 아세톤 및 물의 혼합 용액(아세톤:물=7:1)에 부은 후 건조시켰다. 사용 시점에서, 0.3 g의 건조된 수용성 키틴을 100 ml의 증정수에 용해시키고, 용액의 pH를 0.5%의 시트르산을 이용하여 7로 조절하였다. 불용성 물질은 여과에 의해 제거하고, 상기 용액을 10,000의 컷-오프 수치를 갖는 멤브레인을 이용하여 투석하였다.

#### [0026] 1.2. 인간 치주인대 줄기 세포의 분리 및 배양

[0027] 인간 치주인대 줄기 세포의 배양 프로토콜은 Seo et al. [9]에 의해 보고된 방법에 약간의 변형을 가하여 이용하였다. 실험적인 프로토콜은 연세대학교 치과대학 윤리위원회에 의해 승인되었으며, 모든 환자로부터 동의를 얻었다. 인간 치주인대 줄기세포는 치과적 교정술을 목적으로 3명의 젊은 성인(11-19세)로부터 발치된 건강한 치아로부터 분리되었다. 100 U/ml 페니실린 및 00 µg/ml 스트렙토마이신(GIBCO®)을 함유한 α-MEM (GIBCO®, Grand Island, NY, USA)로 세척 후, PDL 조직을 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(GIBCO®)을 함유한 중간 1/3으로부터 끝까지의 뿌리 표면을 긁어 모아 얻었으며, 이를 얇게 저몄다. 조직의 작은 조각들을 효소 용액으로 37 °C에서 20분 간격으로 4회 내지 5회 분해시켰다. 상기 효소 용액은 α-MEM, 2 mg/ml 콜라게나아제 type I (Waco Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan), 및 1 mg/ml 디스파아제(GIBCO®)를 함유하였다. 단일-세포 현탁액을 70-µm strainer (BD Falcon™, BD Biosciences, Bedford, MA, USA)를 이용하여 얻었다. 세포들을( $5 \times 10^5$ ) T75 세포 배양 플라스크에 배양 배지와 함께 씨딩하고, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다. 배양 배지는 α-MEM, 15% 우태아혈청 (GIBCO®), 10 µmol/ml 아스코르브산 2-포스페이트 (GIBCO®), 200 µmol/ml L-글루타민(GIBCO®), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(GIBCO®)을 함유하였다. 배지는 매 3-4일마다 교환하였고, 약 4일 후 인간 치주인대 줄기 세포 콜로니의 형성이 관찰되었다. 배양 접시가 거의 다 차갈 때(subconfluent), 0.25% 트립신-EDTA 용액(GIBCO®)을 37 °C에서 3분간 처리하여 인간 치주인대 줄기 세포를 수확하였다. 3 또는 4계대의 인간 치주인대 줄기세포가 본 실험에서 사용되었다.

#### [0028] 1.3. 세포 증식 분석(brdU 삽입 분석 및 세포-주기 분석)

##### [0029] 1.3.1. BrdU-삽입 분석

[0030] 인간 치주인대 줄기 세포의 증식을 세포-증식 효소 면역측정법(ELISA) 키트 (BrdU, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 제조자의 지시 및 Zheng et al.[21]의 방법에 따라 분석하였다.  $0.05 \times 10^6$ 개의



세포를 다양한 농도의 수용성 키틴(0.0003, 0.003, 0.03, 0.3, and 0 mg/ml)으로 6시간 후에 처리된 96웰의 플레이트에 플레이팅 한 후, 24시간 동안 배양하였다. 인큐베이션 기간 후, BrdU-표지 용액을 각 웰에 10  $\mu$ M의 최종 농도로 가하였다. BrdU는 실온에서의 2시간 동안의 재인큐베이션에 의해 증식하는 세포의 새로이 합성되는 DNA 내로 삽입되었다. 남은 표지 용액을 버린 후, 세포들을 FixDenat 용액으로 30분 동안 고정하고, 실온에서 90분 동안 항-BrdU-PDO working solution과 함께 다시 인큐베이션하였다. 세포들을 PBS로 3회 행구고, 기질 용액을 가하였다. 충분한 색상이 발현된 후, 삽입된 BrdU의 흡광도를 ELISA 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 의해 370 nm에서 측정하였다.

### [0031] 1.3.2. 세포-주기 분석

[0032] 세포-주기 분석은 BrdU 분석에서 얻은 세포-증식 결과를 확인하고, 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기세포의 군에 대해 수용성 키틴의 가장 좋은 농도를 선택하기 위해 수행되었다. 수용성 키틴으로의 처리 1일 후, 인간 치주인대 줄기 세포를 수확하고, 70- $\mu$ m의 세포 스트레이너 (BD Falcon™)를 통과시켰다. 90 g 에서 5분 동안 원심분리후, 세포침전물을 PBS로 2회 세척하고, 1 ml의 PBS 중에서 반복된 진동으로 세포들을 재현탁시키고, 단일-세포 현탁액의 제조를 확실히 하기 위해 혼합하였다. 그런 다음 차가운 탈수 알코올 (2 ml)을 재빨리 세포 현탁액과 혼합하여 세포들을 -4 °C에서 24시간 동안 고정시켰다. 마지막으로 세포들을 PBS로 2회 세척하고, 프로피디움 아이오다이드(50  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich Biotechnology, Saint Louis, MO, USA) 및 RNase A solution (5  $\mu$ g/ml; Worthington Biochemicals, Freehold, NJ, USA)과 함께 4 °C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 유세포 분석기(FACS Calibur™, BD Biosciences)로 처리하였다. 샘플 당 백만개의 세포들이 카운팅되었고, 세포 주기 중 G1, S, 및 G2기의 세포들의 분획이 Cell Quest™ software (version 3.3, BD Immunocytometry Systems, BD Biosciences)로 분석되었다.

### [0033] 1.4. 세포-이동 분석

[0034] 상처-치유 분석은 세포 스크래치 분석의 프로토콜에 약간의 변형을 가하여[22] 수행되었다. 인간 치주인대 줄기 세포(0.1 $\times$ 10<sup>6</sup>)를 6웰 플레이트(Nunc™ Delta Surface, NUNC, Roskilde, Denmark)에 씨딩하고, 80%의 컨플루언스까지 배양하였다. 세포 스크래퍼(SPL Lifesciences, Pocheon, Korea)를 이용하여 세포층을 조심스럽게 스크래치하여 cell-free strip을 만든 후, PBS로 세척하여 부유 세포를 제거하였다. 3일 동안 수용성 키틴으로 처리한 후, 세포들을 2% 파라포름알데히이드(PFA; Sigma-Aldrich Biotechnology)로 고정하고, 0.4% 트립판 블루 용액 (GIBCO®)으로 염색하였다. 각 웰의 대표적인 10개 지역의 사진을 현미경하에서 찍고, 수용성 키틴 처리군과 대조군에서의 인간 치주인대 줄기 세포가 이동한 평균 거리를 계산하였다.

### [0035] 1.5. 인 비트로 콜라겐 합성 분석 (ECM 및Sircol™콜라겐 분석)

#### [0036] 1.5.1. ECM-형성 분석

[0037] 인간 치주인대 줄기세포 간의 세포외 기질(ECM) 콜라겐을 picro-sirius red (Direct Red 80®, Sigma-Aldrich Biotechnology)로의 염색에 의해 탐지하였다. 인간 치주인대 줄기 세포(0.8 $\times$ 10<sup>5</sup>)를 0.3 mg/ml 수용성 키틴을 함유하거나 함유하지 않은 배양 배지 중에서 7일 동안 배양하였다. PBS로 세척 후, 2 m의 matrix solution으로의 37 °C에서 5분간 인큐베이션하여 세포 용해를 수행하였다. 여기에서, matrix solution은 0.5% Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Biotechnology) 및 20 mM NH<sub>4</sub>OH를 함유한 PBS였다. 남아있는 매트릭스를 PBS로 1회 세척하였다. Picro-sirius red를 각 웰에 가하고, 샘플들을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 염색 용액을 버린 후, 웰들을 조심스럽게 PBS로 1회 행군 후, 각 웰의 대표적인 10개의 지역의 사진을 현미경하에서 찍고, 수용성 키틴 처리군과 대조군에서 붉게 염색된 평균 영역을 계산하였다.

#### [0038] 1.5.2. Sircol™ 콜라겐 분석

[0039] 세포 상층액 중 총 가용성 콜라겐을 Sircol™ collagen assay kit (Biocolor Ltd., Newtownabbey, UK)를 이용하여 분석하였다. 5일 후, 260g에서 5 분 동안 원심분리하여 세포 상층액을 수득하였다. 상층액 중 200- $\mu$ l 분취액을 키트에 제공된 1 ml의 염색 시약에 가하고, 상기 용액을 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 9300 g에서 10분 동안 원심분리 후, 분리된 현탁액을 버리고, 남은 펠렛을 키트에 제공된 1 ml의 알칼리 시약에 가하였다. 확실한 용해를 확인 한 후, 샘플 분취액을 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 상대적인 흡광도를 540 nm에서

측정하였다.

#### 1.6. Quantitative real-time PCR

증가된 ECM 합성의 발견은 본 발명자들로 하여금 mRNA 및 단백질 수준에서의 콜라겐 합성의 변화를 고려하도록 고취시켰다. 콜라겐 types I 및 III는 모든 PDL 섬유의 약 80%를 구성하는 인간 PDL 조직의 주요 타입이므로, real-time PCR 및 웨스턴 블롯을 콜라겐의 이들 타입에 대하여 수행하였다.

인간 치주인대 줄기 세포( $0.1 \times 10^6$ )를 6웰 플레이트 상에 씨딩하고, 그들이 80%의 컨플루언스에 도달할 때 수용성 키틴(0.3 mg/ml)을 처리 또는 비처리하였다. 7일 후, 각 산물에 대해 제조자의 지시에 따라 real-time PCR에 의해 콜라겐 타입 I 및 III의 발현을 확인하였다. 세포들을 Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>, Ca, USA)을 이용하여 수확하고, 전체 세포 RNA를 제조하였다. 분리된 전체 RNA는 Oligo dT 프라이머(Maxime RT Premix<sup>®</sup>, iNtRon Biotechnology, Seongnam, Korea)로의 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용되었다. 후속적인 PCR 증폭 반응은 SYBR<sup>®</sup> real-time PCR kit (Premix Ex Taq<sup>™</sup>, Takara Bio, Otsu, Japan), ABI 7300 real-time PCR system 및 소프트웨어(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 표 1의 특정 프라이머들을 하기 조건 하에서 활용하였다:

[표 1]

Name (GenBank no.)	Forward and Reverse primer (5' to 3')	Size
$\beta$ -actin (NM_007393)	GGC GGA CTA TGA CTT AGT TG (forward)	238
	AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA (reverse)	
Collagen type I (NM_000088)	CCT GTC TGC TTC CTG TTAAC (forward)	177
	AGA GAT GAA TGC AAA GGA AA (reverse)	
Collagen type III (NM_000090)	CTG CCA TCC TGA ACT CAA GAG TGG (forward)	447
	CCA TCC TCC AGA ACT GTG TAG G (reverse)	

개시단계는 50 °C에서 2분, 95 °C에서 10분, 변성 단계는 95 °C에서 15초, 어닐링 단계는 60 °C에서 30초, 연장 단계는 72 °C에서 30초간 40 사이클, 그런 다음 72 °C 에서 최종 10분 연장.

mRNA 발현의 상대적인 수준은 내부 표준( $\beta$ -actin)과의 비교를 통해 정량하였다. realtime PCR에서의 유전자 발현의 양은 표준곡선법에 의해 타겟  $C_t$ (threshold cycle) 값 및  $\beta$ -액틴  $C_t$ 값으로부터 계산된다:  $\Delta C_t$  = 콜라겐 타입 I 또는 III의  $C_t$  -  $\beta$ -actin의  $C_t$ ;  $\Delta \Delta C_t$  = 타겟 유전자의  $\Delta C_t$  - 대조군의  $\Delta C_t$ ; 비율 =  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ . 각각의 PCR은 동일한 전체 RNA로 3회 수행되었다.

#### 1.7. 웨스턴 블롯팅

인간 치주인대 줄기 세포( $0.5 \times 10^6$ )를 100-mm 디쉬 상에 씨딩하고, 그들이 80%의 컨플루언스에 도달하였을 때 수용성 키틴 (0.3 mg/ml)으로 처리하였으며, 대조군의 세포들에는 처리하지 않았다. 7일 후, 콜라겐 타입 I 및 III의 발현을 각 산물에 대한 제조자의 지시 및 보고된 프로토콜 [23]에 따라 웨스턴 블롯에 의해 확인하였다. 100-mm 디쉬 상의 컨플루언트 단층 세포들을 단백질 저해제 각테일 테이블릿 (Complete<sup>™</sup> EDTA-free, Roche Diagnostics)과 함께 단백질 추출 시약(M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent, PIERCE, Rockford, IL, USA) 중에서 행구고, 세포 스크레퍼로 수집하였다. 용해 후, 세포들을 60분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하고, 4 °C에서 9300 g로 15분간 원심분리하여, 상층액을 모아 사용할 때까지 -20 °C까지 보관하였다. 각 샘플을 BCA<sup>®</sup> protein assay kit (Thermo<sup>™</sup> Scientific)로 정량한 후, 세포 용해물을 NuPAGE<sup>®</sup> LDS 샘플 버퍼 (Invitrogen)로 70 °C에서 10분 동안 용해시켜, 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(10%)에

의해 분리시키고, Mini-PROTEIN® Tetra cell system (Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Immobilon-P®, Millipore, Bedford, MA, USA)으로 옮겼다. 블롯을 5% (w/v) 탈지분유 (Difco™, Sparks, MD, USA) 및 TBST [20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, and 0.1% (v/v) Tween 20]로 4 °C에서 밤새 블로킹시킨 후, 래빗 폴리클로날 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다: 콜라겐 타입 I (ab292, Abcam, Cambridge, UK) (1:5000), 콜라겐 타입 III (ab7778, Abcam) (1:1000), 및 β-액틴 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). 블롯을 항-래빗 IgG HRP 연결 항체 (Cell Signaling Technology)(1:2000)로 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 그들을 제조자의 지시에 따라 Amersham ECLTM 웨스턴 블롯팅 탐지 시약(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 처리하였다. 탐지된 블롯을 x-선 필름에 노출시켰다. 단백질의 Mr값은 표준(SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen)의 위치와의 비료에 의해 추정되었다.

[0049] 1.8. 인 비보 콜라겐 합성 분석(인간 치주인대 줄기 세포 transplantation into immunocompromised mice and histology observations)

[0050] 콜라겐 합성능의 평가를 위해 인비보 이식이 수행되었다. 적당한 담체의 사용이 인간 치주인대 줄기세포의 잠재력에 중요하기 때문에[5], 우리는 생체의약 수술에서 사용되고 있는 가장 공통적인 성분 중 하나인 히알루론산 (HA) 성분 [24]을 선택하였다. HA-기반의 스케폴드는 이미 랫트 MSCs의 배양 및 이식을 위해 [25], 그리고 복원 수술에서의 인간 ADSCs의 연조직 증대[7]를 위해 사용된 바 있다. 단일 이식을 위해,  $6 \times 10^6$  개의 세포들을 0.3 ml의 HA 필러(ReDexis®, Prolenium Medical Technologies, Ontario, Canada)와 혼합 한 후, 5주령의 면역타협된 마우스의 배면 상의 피하 공간으로 주입하였다. 4개의 군의 구성을 표 2에 정리하였다.

[0051] [표 2]

Group 1	Control: HA only
Group 2	WSC (+) / hPDLSCs (-) / HA filler
Group 3	WSC (-) / hPDLSCs (+) / HA filler
Group 4	WSC (+) / hPDLSCs (+) / HA filler

[0052] (+): treated or containing; (-): untreated or not containing.

[0053] 모든 동물 실험은 연세대학교 의과대학 동물보호 위원회의 동물의 사용과 보호에 대한 가이드라인과 규율에 따라 수행되었다. 마우스는 4주 후 희생되었으며, 삽입물을 수확하였다. 무게를 재고, 3일 동안 4% PFA로 고정한 후, 파라핀에 포매시키기 전에 그들을 PBS로 세척하였다. 면역학적 분석을 위해, 절편(4 μm 로 연속적으로 절단)을 hematoxylin-eosin 및 picro-sirius red로 염색하고, 면역조직화학 분석을 수행하였다.

[0054] 1.9. 면역조직화학적분석

[0055] 요약하면, 통상적인 탈파라핀화 및 재수화 후, 마이크로웨이브-기반 기법을 이용하여 시트레이트 버퍼(pH 9.1) 중에서 30 분 동안 항원을 복구시켰다. 내생적 퍼옥시다아제를 3% 과산화수소로 5분 동안 블로킹시켰다. 절편을 1차 항체와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다: 인간-특이적 미토콘드리아 리보조말 단백질 (ab74285, Abcam) (1:50로 희석), 콜라겐 타입 I (ab7778, Abcam)(1:200로 희석), 및 콜라겐 타입 (ab292, Abcam) (1:1000로 희석). 3회 세척 후, 면역탐지를 상업적으로 입수가 가능한 키트(EnVision™ Detection System, Dako REAL™, Kyoto, Japan)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 그런 다음 슬라이드를 헤마토실린으로 대조염색하였다.

[0056] 2.10. 통계학적 분석

[0057] 각각의 인 비트로 실험은 적어도 3회 수행하였다. 평균 및 표준 편차를 계산하였으며, 각 그룹 간의 통계적인 유의도는 분산분석법(one-way analysis of variance) 및 t-test에 의해 조사되었다. 시험 결과는  $p < 0.05$ 의



확률치에 대해 통계학적 유의성을 고려하였다.

## 2. 결과

### 2.1. 수용성 키틴의 특성

겔 여과 크로마토그리피는, 게 껍질로부터 유래한 키틴산이 Mark-Houwink equation에서  $a$  및  $\log K$ 의 수치가 각각 0.711 및 -3.167임을 보여주었다. 탈아세틸화 정도는 51.6%였다. 개질된 수용성 키틴의 다양한 특성은 표 3에 나열되어 있다.

[표 4]

Mn	Mw	pd	DA (%)	$a$	$\log K$	RG(nm)	HR	IV(dl/g)
43,600	94,800	2.17	51.6	0.711	-3.167	18.15	13.94	2.187

WSC: water-soluble chitin; Mn: number average molecular weight; Mw: weight average molecular weight; pd: polydispersity; DA: degree of deacetylation;  $a$ : Mark-Houwink exponent (conformation);  $\log K$ : Mark-Houwink exponent (volume); RG: radius of gyration; HR: hydrodynamic radius; IV: intrinsic viscosity.

### 2.2. 인간 치주인대 줄기 세포의 증식 및 이동에 대한 수용성 키틴의 효과

24시간의 인큐베이션 후, 0.3 및 0.03 mg/ml의 농도의 수용성 키틴은 다른 군과 비교하여 인간 치주인대 줄기 세포의 BrdU 침착을 증진시켰다(도 1a;  $p < 0.05$ ). 이러한 증진 효과는 투여량 의존적이었으며, 0.3 mg/ml의 수용성 키틴의 농도에서 최대값을 나타냈다. 추가적으로, 유세포 분석기에 의해 분석된 바에 따르면 세포-주기 분배는 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기세포군에서 유의하게 높은 증식 인덱스(PI, S+G2+M phases)를 나타내었으며, 이는 수용성 키틴으로의 처리가 G1기로부터 S기로의 이동 과정을 촉진시키며, 추가로 인간 치주인대 줄기세포의 DNA 재생산을 가속화시킴을 증명해 준다(도 1b;  $p < 0.05$ ). 다른 한편, 인 비트로 세포 이동 분석은 처리 3일 후 세포 이동능이 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기세포 처리군에서 비처리된 인간 치주인대 줄기세포군에 비해 유의하게 낮음을 보여준다(도 1c;  $p < 0.05$ ).

### 2.3. 콜라겐 합성의 인 비트로 분석 (ECM 염색, Sircol™ 분석, 정량적 real-time PCR 및 웨스턴 블롯팅)

수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기 세포군이 ECM에서의 침전이 보다 많아, 세포 용해 후 디쉬가 picrosirius red로 염색되었다. ECM 염색 후, 우리는 모든 군의 웰 상의 적색 침전물을 정량하였다. 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기세포군의 적색 침전물이 대조군(비처리된 인간 치주인대 줄기세포군)에 비해 높았으며, 이는 유의하게 높은, 고밀도의 콜라겐 매트릭스가 생성되었음을 제시한다(도 2a;  $p < 0.05$ ). 대조적으로, 용해성 콜라겐에 대한 Sircol™ 분석은, 대조군에 비해 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기 세포군에서 수용성 콜라겐의 양이 유의하게 낮음을 증명해 준다(도 2b;  $p < 0.05$ ).

PCR 결과는 콜라겐 타입 I 및 III의 발현이 대조군에 비해 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기세포군에서 더 높음을 보여준다(도 2c) 상대적인 mRNA 발현( $\beta$ -액틴 대 콜라겐 타입 I 또는 III)은 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기 세포에 대응하는 밴드의 강도가 대조군의 것에 비해 유의하게 높음을 보여주며, 이는 콜라겐 타입 I 또는 III mRNA의 양이 대조군에 비해 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 줄기 세포군에서 유의하게 더 높음을 나타낸다 (도 2c;  $p < 0.05$ ). 이들 결과는 웨스턴 블롯 분석의 결과로부터 지지된다(도 2d).

### 2.4. 콜라겐 합성의 인 비보 연구

우리는 전임상 치유 모델에서 콜라겐 합성에 대한 인간 치주인대 줄기 세포의 재생능을 조사하였다. 조직학적 분석이 이식 4주 후 수행되었다. 치유의 단계에서 특이사항은 없었으며, 수술 부위에서 관찰된 이식물의 노출이나 또는 합병증은 없었다. 조직학적 분석은 이식된 HA 물질을 꺼낸 후 수행되었으며, 다른 군에 비해 4번 군의

이식물이 더 견고하고 무거움을 확인할 수 있었다(테이터 미도시).

[0070] 헤마토실린 및 에오신 염색에 있어서, 세포질 및 ECM의 양은 1번 및 2번 군에 비해 3번 및 4번(세포가 로딩된 군)에서 더 높았다(도 3a). 항-인간 미토콘드리아 항체에 대한 면역조직화학 분석에서 재생된 콜라겐 섬유를 둘러싼 양성 세포의 양이 1번 및 2번 군에 비해 3번 및 4번 군에서 더 높았으며, 이는 새로운 콜라겐이 이식된 인간 치주인대 줄기세포로부터 유래함을 나타낸다. 항-인간 미토콘드리아 세포의 양성 발현은 4번 군에서 가장 높았다(도 4a). 다른 한편, picro-sirius red 염색 결과는 인간 치주인대 줄기 세포의 상태와는 무관하게 콜라겐 섬유 및 ECM의 양과 밀도가 1번 군에 비해 2번 군에서, 그리고 3번 군에 비해 4번 군에서 유의하게 높음을 보여 준다. 이는 인간 치주인대 줄기세포가 수용성 키틴의 적용 여부에 불구하고 보다 많은 콜라겐 합성을 유도하며, 수용성 키틴은 콜라겐 섬유의 추가적 생산을 증진시킨다는 것을 나타낸다. 콜라겐-섬유 합성은 4번 군에서 가장 높았다(도 3b;  $p < 0.05$ ). 이들 결과는 4번째 군에서 탐지된 콜라겐 타입 I 및 III의 양이 더 높음을 보여주는 항-타입 I 콜라겐 항체 염색(도 4b) 및 항-타입 III 콜라겐 항체 염색(도 4c)에 의해 확인되었다.

[0071] 본 연구는 인간 치주인대 줄기 세포의 생활성에 대한 수용성 키틴의 영향을 조사한 것으로, 정확한 기전은 추후 연구되어야 하나 인 비트로 결과는 수용성 키틴이 인간 치주인대 줄기 세포의 이주를 감소시키고 동시에 증식 및 ECM의 생산을 촉진함을 보여주었다. 이전 연구들은 골막 유래의 중간엽 줄기세포의 증식의 증가가 무처리 웰이나 미코팅 글라스 커버슬립에 비해 키틴-코팅된 글라스 커버슬립 상에서 유의하게 높음을 보였다[Li L, Hui JH, Goh JC, Chen F, Lee EH. Chitin as a scaffold for mesenchymal stem cells transfers in the treatment of partial growth arrest. *J Pediatr Orthop* 2004;24:205-10.]. 또한, 한 연구에서는 키틴, 키토산 및 그들의 올리고머 및 모노머로 처리된 섬유아세포의 이동이 미처리된 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였음을 보고한 바 있다[Okamoto Y, Watanabe M, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium. *Biomaterials* 2002;23:1975-9.]. 그러나, 중간엽 줄기세포의 이동에 대한 키틴, 키토산 및 수용성 키틴의 영향에 대한 보고는 없다. 본 연구에 기초한 우리의 견해에 따르면, 우리는 수용성 키틴이 인간 치주인대 줄기 세포의 증식을 증진시키며, 그들의 이주 활성을 저해시키고, 결과적으로 인간 치주인대 줄기세포가 보다 많은 콜라겐 조직을 고정적이고 안정적인 형태로 생산하도록 도와준다는 것을 추론할 수 있다. 또한, 키틴은 인 비트로 및 인 비보에서 중성구에 대한 주화성 효과(chemotactic effects)를 가지며, 면역 세포에 대한 자극 효과가 주변의 세포 증식에 영향을 미친다는 것이 보고된 바 있다 [Shigemasa Y, Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996;13:383-420.; Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul* 1997;14:689-711.]. 그러므로, 이 새로운 시도는 미용 치료를 위한 더 쉽고 더 안전한 요법을 제공할 뿐만 아니라, 치료 후 얻어지는 양을 최대화할 수 있다. 그러나, 이 현상에 대한 정확한 메커니즘은 추가적인 연구를 통해 접근되어야 할 것이다.

[0072] 세포 이동 분석 동안, 우리는 대조군과 비교하여 수용성 키틴-처리된 인간 치주인대 줄기 세포군의 디쉬 바닥에 상당한 양의 ECM이 침전됨을 관찰하였다. picro-sirius red에 의해 양성으로 염색된 콜라겐성 매트릭스의 양은 대조군에 비해 수용성 키틴 처리된 인간 치주인대 세포군에서 유의하게 높았다. 다른 한편, 수용성 콜라겐의 탐지를 위한 Sircol™ 콜라겐 분석에서, 수용성 키틴-처리된 인간 치주인대 줄기 세포는 대조군에 비하여 용해성 콜라겐은 덜 생산하였다. 이러한 결과는 수용성 키틴으로의 처리가 인간 치주인대 줄기세포로 하여금 불용성 세포의 콜라겐 섬유를 더 많이 생산하도록 한다는 것으로 해석될 수 있으며, 인간 치주인대 줄기세포에 의해 용해성 콜라겐의 생산이 저해되거나 용해성 콜라겐이 불용성 콜라겐으로 전환된다는 것을 나타낸다. 인체에서 미성숙 콜라겐의 성숙 콜라겐으로의 전환 동안 분자간 및 섬유간 크로스링킹이 발생하여 콜라겐을 불용성으로 만든다는 것이 보고되어 있으므로, 이는 수용성 키틴이 인간 치주인대 줄기 세포로 하여금 미성숙 타입 보다는 성숙 콜라겐을 생산하도록 유도할 수 있음을 나타낸다.

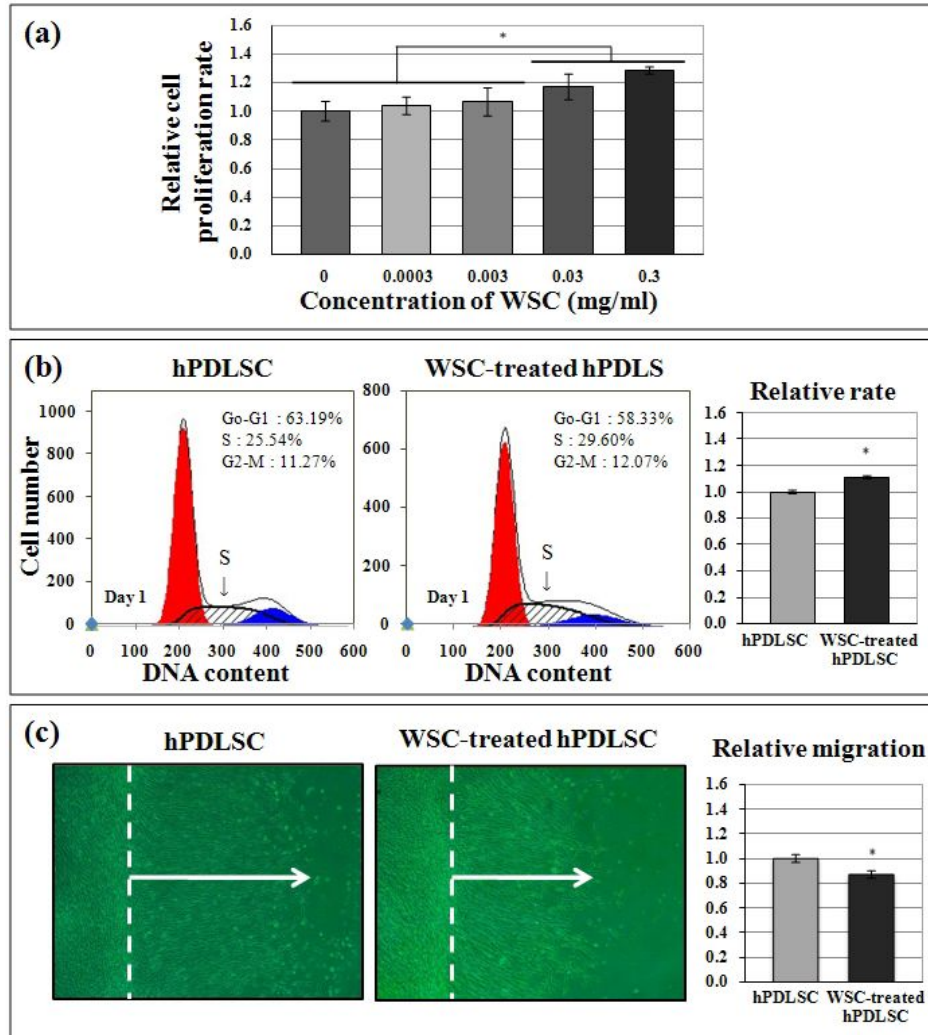
[0073] 보다 중요하게는, 수용성 및 불용성 콜라겐 모두 유사한 크로스링킹 선분을 공유하긴 하지만, 불용성 콜라겐은 수용성 물질보다는 더 높은 압축 강도와 더 낮은 분해율을 보인다는 것이다. 그러므로, 수용성 키틴 및 인간 치주인대 줄기 세포의 새로운 적용은 덜 지속적인 통상적인 필러의 결정을 극복할 수 있는 설득력있고 성공적인 대안으로 제시될 수 있다. 우리는 수용성 키틴이 인간 치주인대 줄기 세포에 의한 인 비트로 및 인 비보에서의 콜라겐 타입 I 및 III의 형성을 효과적으로 자극함을 성공적으로 증명하였다.

[0074] 상기 결과에 따르면, 인간 치주인대 줄기 세포의 적용은 유의한 양의 콜라겐 합성을 담보하며, 콜라겐 합성의 이러한 향상은 수용성 키틴이 인간 치주인대 줄기 세포와 함께 적용될 때 보다 높이 증진될 수 있다. 인간 치주

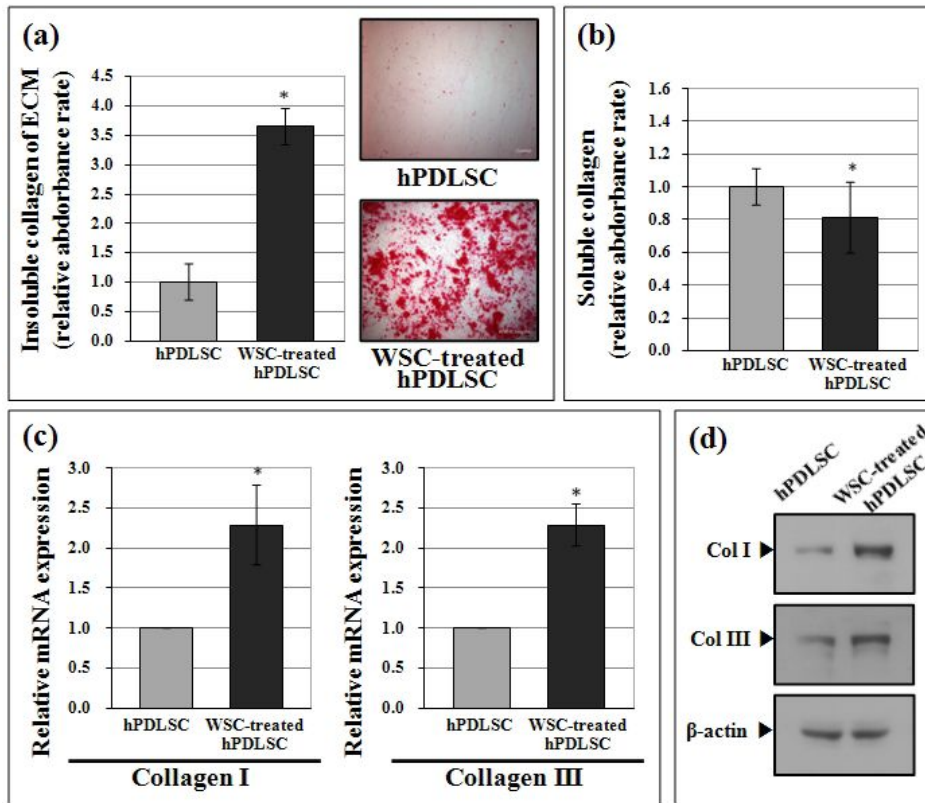
인대 줄기 세포의 콜라겐 재생에 대한 탁월성 및 접근 용이성, 노화 피부의 개선을 위한 수용성 키틴의 타당성이 확인되었는 바, 인간 치주인대 줄기세포와 수용성 키틴의 조합은 콜라겐 조직 재생에 있어서 전통적인 심미적 필러에 대한 대안적인 치료안이 될 수 있을 것이다.

## 도면

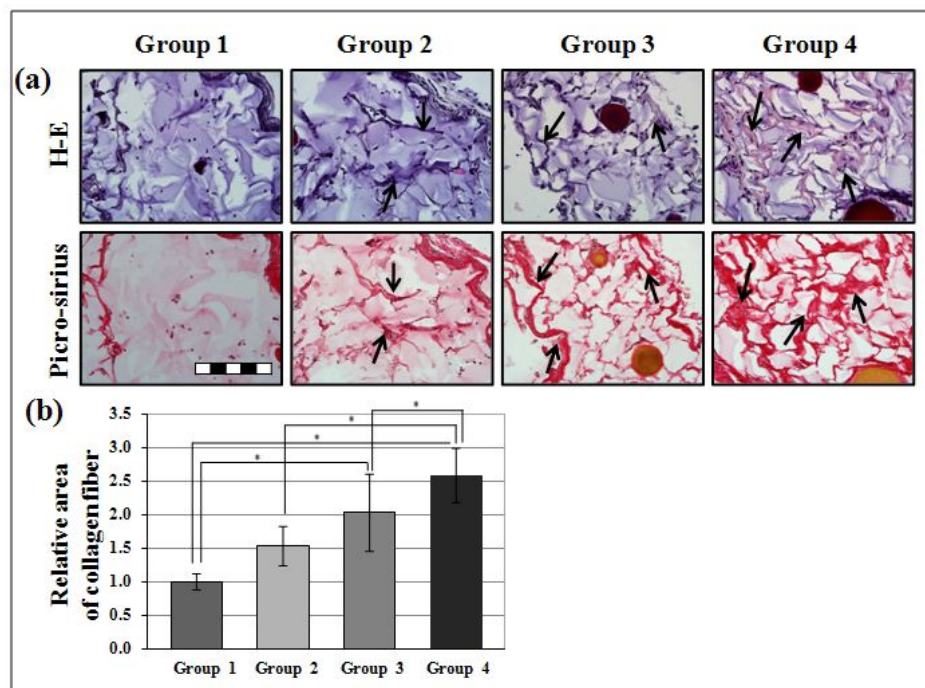
### 도면1



도면2



도면3





도면4

