



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0117758
(43) 공개일자 2012년10월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7013498
- (22) 출원일자(국제) 2010년10월28일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년05월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/054450
- (87) 국제공개번호 WO 2011/053690
국제공개일자 2011년05월05일
- (30) 우선권주장
61/256,846 2009년10월30일 미국(US)

- (71) 출원인
사파엔자 유니버시티 디 로마
이탈리아 로마 00185 엔9 피아잘레 알도 모로
더 유니버시티 오브 노쓰 캐롤라이나 옛 채플 힐
미합중국 노쓰 캐롤라이나 27599 채플 힐 비뉴 홀
308
- (72) 발명자
레이드, 르라, 웬.
미국 노스 캐롤라이나 27514 채플 힐 스위튼 크리
크 로드 3621
왕, 윤팡
중국 27517 베이징, 하이뎬 츄 타이핑 로드 27 빌
딩 7 룸 506
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인무한

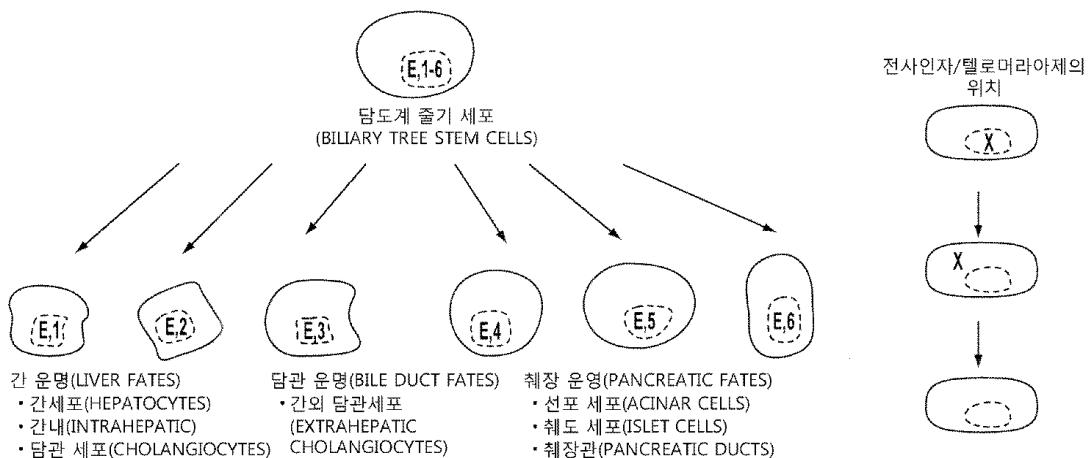
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 간외 담도계로부터의 다분화능 줄기 세포 및 이의 분리 방법

(57) 요 약

본 발명은 태아, 신생아, 소아, 및 성인 담도계 조직 및 사망 후 72시간까지의 사망자(바람직하게는 사망 후 10시간 내)에서 각각 발견되고, 간, 담도 및 췌장 조직을 포함하는 다중 내배엽 조직으로 성장할 수 있는, 다분화능 세포, 다분화능 세포 군, 및 농축된 다분화능 세포 군(enriched multipotent cell population)에 관한 것이다. 다분화능 줄기/전구 세포 및 세포 군은 담관주위선(peribiliary gland)에서 발견되고, 이들로부터 내려오는 전구체(descendent progenitor)는 담낭(gallbladder)에 포함되는 담도계 전체에 존재한다. 다수의 담관주위선은 담도계, 예컨대 문, 총간판, 담낭판, 총관, 총간-췌장관 및 담낭의 분기상 위치에서 발견된다. 관련 다분화능 세포, 다분화능 세포 군 및 내려오는 전구체는 담관주위선을 갖지 않는 담낭을 포함하는 담도계 전체에서 발견된다. 또한, 이들을 포함하는 조성물, 이들을 확인 및 분리하고, 배양물에서 이들을 유지하고, 배양물에서 이들을 확대하고 생체 내 또는 생체 외에서 이들을 간, 담도 또는 췌장 운명(예컨대, 간 세포, 담관 세포, 및/또는 췌장 췌도 세포)으로 분화 또는 혈통 제한하는 방법이 제공된다. 다분화능 세포 및/또는 다분화능 세포 군을 사용하는 방법 또한 제공된다.

대 표 도



(72) 발명자

카르디날레, 빈첸초

이탈리아 아벨리노 83059 발라타 스트리트 카를로
알베르토 달라 키에자 9

가우디오, 에우제니오

이탈리아 로마 00197 1 비아 지. 투치메이

카르피노, 귀도

이탈리아 로마 00199 16 비아 모리코네

알바로, 도메니코

이탈리아 로마 00137 스트리트 로베르토 로셀리니
51

추이- 카이-빈

미국 노스 캠브리아 27599 채플 힐 바이넘 홀
308 캠퍼스 박스 4105 더 유니버시티 오브 노스 캐
롤리나 앳 채플 힐

특허청구의 범위

청구항 1

다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포들을 포함하는 조성물로서:

상기 세포들은 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다분화능 줄기/전구 세포는 다분화능 줄기 세포인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 내배엽 혈통은 간 혈통(hepatic lineage), 담도 혈통(biliary lineage), 췌장 혈통(pancreatic lineage), 또는 이들의 조합인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 담도계 조직은 문(hilum), 총간관(common hepatic duct), 담낭관(cystic duct), 총관(common duct), 총간-췌장관(common hepato-pancreatic duct) 및 담낭(gall bladder)을 포함하는 담도계의 임의의 일부인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 포유류는 인간인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 인간 포유류는 태아(fetus), 신생아(neonate), 아동(소아), 성인, 또는 사후 72시간까지의 사망자인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 포유류는 사후 10시간 내의 사망자인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 담도계 조직은 담관주위선(peribiliary gland) 또는 담관주위선으로부터 유래된 전구 세포 또는 줄기 세포를 함유하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 담도계 조직은 담도계가 갈라지는 위치를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 다분화능 세포는

(i) 초기 단계 간 세포 혈통을 나타내는 적어도 하나의 마커;

(ii) 초기 단계 췌장 세포 혈통을 나타내는 적어도 하나의 마커; 및 카테고리 (a)-(c)의 것들로부터 선택되는 적어도 하나의 마커;

(a) 줄기/전구 세포에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커(surface marker);

(b) 내배엽 줄기/전구체(endodermal stem/progenitor)를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자, 및

(c) 발현이 약하게 완화된 전분화능 유전자(pluripotency gene)

를 발현하는, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

초기 단계 간 세포 혈통을 나타내는 상기 적어도 하나의 마커는 HNF6, HES1, CK19, 알부민(albumin), 또는 AFP인, 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

초기 단계 췌장 세포 혈통을 나타내는 상기 적어도 하나의 마커는 PDX1, PROX1, NGN3, 또는 인슐린(insulin)인, 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

줄기/전구 세포에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커는 CD133 (프로미닌; prominin), CD44H (히아루로난 수용체; hyaluronan receptor), N-CAM, CXCR4, 또는 EpCAM인, 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

내배엽 줄기/전구체를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자는 SOX 9, SOX17, 또는 FOXA2인, 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 전분화능 유전자는 SOX2, NANOG, KLF4, OCT4A 또는 OCT4인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 다분화능 세포는

- (i) 초기 단계 간 세포 혈통을 나타내는 적어도 하나의 마커;
- (ii) 초기 단계 췌장 세포 혈통을 나타내는 적어도 하나의 마커;
- (iii) 줄기/전구 세포에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커;
- (iv) 내배엽 줄기/전구체를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자; 및
- (v) 발현이 약하게 완화된 전분화능 유전자(pluripotency gene)

를 발현하는, 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 다분화능 세포는

- (i) 텔로머라아제 프로테인(telomerase protein)의 핵 발현(nuclear expression);
- (ii) 전분화능 유전자의 발현 레벨을 완화하도록 낮게 발현;
- (iii) 전형적인 내배엽 전사 인자의 핵 또는 핵주위 발현(perinuclear expression);
- (iv) 내배엽 줄기/전구체 표면 마커의 발현;
- (v) 성숙한 간(mature liver), 성숙한 담관(mature bile duct), 또는 성숙한 내분비 췌장(mature endocrine pancreas)의 혈통 마커(lineage marker)의 낮으며 다양한 레벨의 발현 또는 결핍된 발현;
- (vi) 간증직 세포(mesenchymal cell), 내피 세포(endothelial cell) 또는 조혈 세포(hemopoietic cell)에 대한 마커의 결핍된 발현

중 적어도 하나를 발현하는, 조성물.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 내배엽 줄기/전구체(endodermal stem/progenitor) 표면 마커는 CD326/EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), CD56/NCAM(Neuronal cell adhesion molecule), CD133(프로미닌(prominin)), CD44H (히아루로난 수용체(hyaluronan receptor)), CXCR4, 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

청구항 19

제10항에 있어서,

상기 전형적인 내배엽 전사 인자는 SOX17, SOX 9, FOXA2, HES1, HNF6, PROX1, HNF3B (간세포 핵인자 (hepatocyte nuclear factor)-3B, FOXA2, SALL4 (Sal-like protein 4), PDX 1, NGN3, 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

청구항 20

제10항에 있어서,

상기 성숙한 간의 혈통 마커는 P450-3A4, 트랜스페린(transferrin), 티로신 아미노 전달효소(tyrosine aminotransferase) (TAT) 및 고레벨 알부민(albumin)을 포함하고; 상기 성숙한 담관의 혈통 마커는 AE2, CFTR, 세크레틴 수용체(secretin receptor), 아쿠아포린(aquaporins), 또는 이들의 조합을 포함하고; 상기 성숙한 췌장의 혈통 마커는 고레벨 인슐린(insulin), 글루카곤(glucagon), 소마토스타틴(somatostatin), 아밀라제 (amylase) 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

청구항 21

제10항에 있어서,

상기 간충직 세포(mesenchymal cell)의 마커는 CD 146, 데스민(desmin), ASMA(alpha-smooth muscle actin), 또는 이들의 조합을 포함하고; 상기 내피 세포(endothelial cell)의 마커는 VEGF 수용체(receptor), CD31, 반 빌레브란드 인자(Van Willebrand Factor), 또는 이들의 조합을 포함하고; 상기 조혈 세포(hemopoietic cell)의 유전적 마커는 CD45인, 조성물.

청구항 22

제10항에 있어서,

상기 빌현은 생체내 조직, 새로 분리된 세포 또는 배양된 세포의 면역조직화학 및/또는 종말점(endpoint) 및 정량적 RT-PCR 분석에 의해 측정되는, 조성물.

청구항 23

제10항에 있어서,

상기 담도계 조직은 담낭관(cystic duct), 문(hilum), 총간관(common hepatic duct), 총간-췌장관(common hepato-pancreatic duct), 담낭(gall bladder), 및 이들과 연결되는 상기 담도계의 임의의 일부 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

청구항 24

제10항에 있어서,

상기 담도계 조직은 담도계가 갈라지는 위치를 포함하는, 조성물.

청구항 25

제1항에 따른 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포의 군(population of cell)을 포함하는 조성물.

청구항 26

제1항에 따른 다분화능 줄기/전구 세포가 놓축된 포유류 세포의 군을 포함하는 조성물.

청구항 27

다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 수득하는 방법으로서:

상기 세포들은 포유류의 담도계 조직(biliary tree tissue of a mammal)으로부터 수득되고,

상기 방법은,

담도계 조직을 수득하는 단계, 및

순차적으로, 하기에 대해 포지티브한 세포를 임의의 순서로 또는 실질적으로 동시에 수득하는 단계를 포함하는, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법:

(i) 초기 간 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커;

(ii) 초기 췌장 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커; 및 선택적으로, (a)-(c)로부터 선택되는 적어도 하나의 마커:

(a) 줄기/전구 세포에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커;

(b) 내배엽 줄기/전구체를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자, 및

(c) 발현이 약하게 완화된 전분화능 유전자(pluripotency gene).

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 분리는 면역 선택 기술 및/또는 선택적 배양 조건(selective culture condition)을 통한 것인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 면역 선택 기술은 패닝(panning), 마그네틱 비드 선택(magnetic bead selection), 유동 세포 계수법(flow cytometry), 또는 이들의 조합을 포함하는, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 면역 선택 기술은 유동 세포 계수법인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 31

제28항에 있어서,

상기 선택적 배양 조건은, 상기 세포를 플라스틱에(onto plastic), 히아루로난에(onto hyaluronans), 또는 콜라겐 IV, 콜라겐 III, 라미닌, 히아루로난, 배아, 태아, 신생아 조직으로부터의 다른 매트릭스 성분 또는 이들의

조합으로 선택적으로 코팅된 플라스틱에(onto plastic) 플레이팅(plating)하는 것을 포함하는, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 32

제28항에 있어서,

상기 세포를, 칼슘이 적고, 구리가 없고, 인슐린, 트랜스페린/Fe, 셀레늄, 아연, 혈청 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin), 및 선택적으로 고밀도 리포프로테인(lipoprotein)이 보강된 기본 배지(basal medium)를 포함하는 무혈청 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 기본 배지는 RPMI 1640을 포함하는 것인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 34

제32항에 있어서,

상기 기본 배지는 칼슘을 0.5mM 이하 포함하는 것인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 35

제28항에 있어서,

상기 세포는 7-21일 또는 그 이상 배양되는 것인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 36

제27항에 있어서,

상기 담도계 조직은 문(hilum), 총간관(common hepatic duct), 담낭관(cystic duct), 총관(common duct), 총간-췌장관(common hepato-pancreatic duct) 및 담낭(gall bladder), 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 37

제27항에 있어서,

상기 담도계 조직은 담도계가 갈라져 있거나 많은 수의 담관 주위 관을 함유하는 위치로부터 유래되는 것인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 38

다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 포유류의 다분화능 세포의 군을 확인 및 분리하는 방법으로:

상기 세포들은 포유류의 담도계 조직(biliary tree tissue of a mammal)으로부터 수득되고,

상기 방법은,

담도계 조직을 수득하는 단계, 및

순차적으로, 하기에 대해 포지티브한 세포를 임의의 순서로 또는 실질적으로 동시에 수득하는 단계를 포함하는, 방법:

(i) 초기 간 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커;

(ii) 초기 췌장 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커; 및 카테고리 (a)-(c) 중 하나 이상의 것으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커:

(a) 줄기/전구체에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커;

(b) 내배엽 줄기/전구체(embryonal stem/progenitor)를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자, 및

(c) 발현이 약하게 완화된 전분화능 유전자(pluripotency gene).

청구항 39

제1항에 따른 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포가 농축된 포유류의 다분화능 세포의 군을 확인 및 분리하는 방법으로:

담도계 조직을 수득하는 단계, 및

순차적으로, 하기에 대해 포지티브한 세포를 임의의 순서로 또는 실질적으로 동시에 수득하는 단계를 포함하는, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법:

(i) 초기 간 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커;

(ii) 초기 췌장 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커; 및 카테고리 (a)-(c) 중 하나 이상의 것으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커:

(a) 줄기/전구체에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커;

(b) 내배엽 줄기/전구체를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자, 및

(c) 발현이 약하게 완화된 전분화능 유전자(pluripotency gene).

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서,

초기 간 세포 혈통 단계를 나타내는 상기 적어도 하나의 마커는 HNF6, HES1, C19, 알부민, 또는 AFP인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 41

제38항 또는 제39항에 있어서,

초기 췌장 세포 혈통 단계를 나타내는 상기 적어도 하나의 마커는 PDX1, PROX1, NGN3 또는 인슐린인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 42

제38항 또는 제39항에 있어서,

상기 줄기/전구체에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커는 CD133 (프로미닌(prominin)), CD44H (히아루로난 수

용체(hyaluronan receptor)), N-CAM, CXCR4, 또는 EpCAM인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 43

제38항 또는 제39항에 있어서,

내배엽 줄기/전구체를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자는 SOX9, SOX17, 또는 FOXA2인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 44

제38항 또는 제39항에 있어서,

상기 전분화능 유전자(pluripotency gene)는 SOX2, NANOG, KLF4, OCT4A 또는 OCT4인, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 수득 방법.

청구항 45

제1항에 따른 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을 번식 및/또는 확대시키는 방법으로서:

상기 세포를 플라스틱에(onto plastic), 히아루로난에(onto hyaluronans), 또는 선택적으로 타입 III 또는 IV 콜라겐, 히아루로난 또는 배아, 태아, 신생아 조직으로부터의 다른 매트릭스 성분으로 코팅된 플라스틱에(onto plastic), 또한 구리가 없고, 칼슘이 적고(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, 혈청 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물, 및 선택적으로 고밀도 리포프로테인(lipoprotein)을 함유하는 기본 배지에서(in a basal medium) 배양하는 단계를 포함하는, 번식 및/또는 확대 방법.

청구항 46

제1항에 따른 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포의 파트너 세포(partner cell)를 번식 및/또는 확대시키는 방법으로서:

상기 세포를 플라스틱에(onto plastic), 히아루로난에(onto hyaluronans), 또는 선택적으로 타입 III 또는 IV 콜라겐, 히아루로난 또는 배아, 태아, 신생아 조직으로부터의 다른 매트릭스 성분으로 코팅된 플라스틱에(onto plastic), 또한 구리가 없고, 칼슘이 적고(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, 혈청 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물, 및 선택적으로 고밀도 리포프로테인(lipoprotein)을 함유하는 기본 배지에서(in a basal medium) 배양하는 단계를 포함하고,

이러한 파트너 세포는 간충직 세포(mesenchymal cell), 혈관모세포(angioblast) 및 성상 세포(stellate cell) 또는 전구체를 포함하는, 번식 및/또는 확대 방법.

청구항 47

다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포, 및/또는 이러한 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하거나 농축된 다분화능 세포 군의 간 세포로의 혈통을 제한하는 방법으로서:

(a) 다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포 혼탁액을 수득하는 단계로서, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는, 세포 혼탁액을 수득하는 단계;

(b) 상기 세포 혼탁액을 히아루로난 또는 다른 매트릭스 성분과 조합된 히아루로난을 포함하는 하이드로겔(hydrogel)로 임베딩(embedding)하는 단계; 및

(c) 구리, 칼슘(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, bFGF, 하이드로코티손(hydrocortisone), 글루카곤(glucagon), 갈락토오스, 트리-아이오도티록신(tri-iodothyroxine)(T3), 유피 생장 인자(epidermal growth factor)(EGF), 간세포 생장 인자(hepatocyte growth factor)(HGF), 고밀도 리포프로테인(lipoprotein), 및 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물로 보완된 기본 배지에서 간 세포로 분화를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 상기 세포 혼탁액을 배양하는 단계를 포함하는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서,

다른 매트릭스 성분은 타입 IV 콜라겐, 라미닌(laminin), 또는 둘다 포함하는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 49

제47항에 있어서,

상기 배양은 7-14일 동안인, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 50

다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 및/또는 이러한 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하거나 농축된 다분화능 세포 군의 체장 세포로의 혈통을 제한하는 방법으로서:

(a) 다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포 혼탁액을 수득하는 단계로서, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는, 세포 혼탁액을 수득하는 단계;

(b) 상기 세포 혼탁액을 히아루로난 또는 다른 매트릭스 성분과 조합된 히아루로난을 포함하는 하이드로겔로 임베딩하는 단계; 및

(c) 구리, 칼슘(<0.5 mM), B27, 아스코르브산, 인슐린, 트랜스페린/Fe, bFGF, 시클로파민(cyclopamine), 레티노산(retinoic acid), 엑센딘(exendin) 4, 고밀도 리포프로테인(lipoprotein), 및 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물로 보완되고, 하이드로코티손이 부족한 기본 배지에서 체장 세포로 분화를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서,

다른 매트릭스 성분은 타입 IV 콜라겐, 라미닌, 또는 둘다를 포함하는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 52

다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포(mammalian multipotent stem/progenitor cells), 및/또는 이러한 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하거나 농축된 다분화능 세포 군의 담도계 세포로의 혈통 제한하는 방법으로서:

(a) 다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포 혼탁액을 수득하는 단계로서, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는, 세포 혼탁액을 수득하는 단계;

(b) 상기 세포 혼탁액을 히아루로난 또는 다른 매트릭스 성분과 조합된 히아루로난을 포함하는 하이드로겔(hydrogel)로 임베딩(embedding)하는 단계; 및

(c) 구리, 칼슘(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, 하이드로코티손(hydrocortisone), bFGF, 혈관 내피 세포 성장 인자(vascular endothelial cell growth factor)(VEGF), 간세포 생장 인자(hepatocyte growth factor)(HGF), 고밀도 리포프로테인(lipoprotein), 및 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물로 보완된 기본 배지에서 담관 세포(cholangiocyte)로 분화를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서,

상기 담도계 세포는 담관 세포를 포함하는 것인, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 54

제52항에 있어서,

상기 다른 매트릭스 성분은 타입 I 콜라겐을 포함하는 것인, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 55

제1항의 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을 적당한 배양 조건 하에서, 사전 혈통 제한이 있거나 없이 세포 혼탁액 또는 임플란트 또는 그래프트로서 생체 내에서 간 조직으로 분화하는 간으로 이식하는 단계를 포함하는, 생체 내에서 세포를 분화시키는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 56

제1항의 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을 적당한 배양 조건 하에서, 사전 혈통 제한이 있거나 없이 세포 혼탁액 또는 임플란트 또는 그래프트로서 생체 내에서 담도계 조직으로 분화하는 담관으로 이식하는 단계를 포함하는, 생체 내에서 세포를 분화시키는, 혈통을 제한하는 방법.

청구항 57

제1항의 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을 적당한 배양 조건 하에서, 사전 혈통 제한이 있거나 없이 세포 혼탁액 또는 임플란트 또는 그래프트로서 생체 내에서 신장 캡슐 하에서 체장으로 또는 기능적 체장 조직으로 분화하는 정소상체 지방체로 이식하는 단계를 포함하는, 생체 내에서 세포를 분화시키는, 혈통을 제한하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] (관련 출원의 상호 참조)

[0002] 본 출원은 2009년 10월 30일에 출원된 미국 가출원 61/256,846으로부터 우선권을 주장하고, 이 내용은 전체가 참조로서 인용된다.

[0003]

본 발명은 일반적으로 다분화능 줄기 세포를 포함하는 다분화능 전구 세포, 및 담도계, 간 및 췌장에 이러한 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 군에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 다분화능 전구체 또는 줄기 세포 및 간의 담도계의 군에서 유래되는 이러한 전구체 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 군에 관한 것이다. 이는 이들을 포함하는 조성물, 생체내 및 생체외에서 이러한 세포 및 세포 군을 확인, 분리, 유지, 확대 및 구별하는 방법을 포함한다.

배경 기술

[0004]

죽어버린, 죽어가는, 또는 기능 장애의 세포(dysfunctional cell)는 당뇨병 및 알츠하이머병을 포함하는 잘 알려진 질병의 원인이다. 이들 질병을 치료하는 하나의 방법으로 "질병에 걸린(diseased)" 세포의 기능의 일부 또는 모두를 대체하기 위해 기증자(donor)로부터 그것의 전체 기관 또는 일부를 이식하는 것에 초점을 맞춰왔다. 일부 질병의 경과를 스테밍(stemming) 또는 억제(retarding)하는 것이 종종 성공적이지만, 장기 이식(organ transplantation)은 주요 외과적 수술(surgical intervention)과 같이, 상당한 질병률/사망률(morbidity/mortality)을 동반하고, 이식된 장기의 생존은 바람직하지 않은 부작용을 야기하기도 하는 강력하고 전체에 영향을 주는 면역-억제제(immuno-suppressant)의 만성적 투여에 의존한다. 그러나, 이러한 접근이 성공할지라도, 기증자(donor)의 이용 가능성에 의해 본질적으로 제한된다.

[0005]

"재생 의학(regenerative medicine)"의 다른 접근은 전체 기관, 이를 부분, 또는 적어도 그 기능을 다시 살리기 위해(to repopulate) 줄기 세포 및 전구체(progenitor)를 사용하는 것이다. 줄기 세포는 유해 사례의 발생이 적은 상대적으로 덜 중요한 외과적 절차로 주입되거나 이식될 수 있다. 줄기 세포는 면역성이 아니기(또는 미량으로 면역성이) 때문에, 있다 하더라도, 세포의 최초 시딩(seeding)에 대한 면역 억제가 상대적으로 적게 요구된다.

[0006]

줄기 세포는 분리하기 위해 정확한 기술 및 생체내 및 생체외에서 번식시키기 위해 명확한 조건을 필요로 한다. 따라서, 임상적 용도를 위한 이식 가능하고, 기능적인 줄기 세포 및 전구 세포 및 조직의 다른 및 보충적인 원료(alternative and complementary source)를 확립할 긴급한 필요가 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0007]

본 발명의 일 실시형태에 따라서, 다중 내배엽 혈통(예컨대, 간 혈통(hepatic lineage), 담도 혈통(biliary lineage), 췌장 혈통(pancreatic lineage) 또는 이들의 조합)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 조성물이 제공되고, 상기 세포는 인간 포유류(human mammal), 태아(fetus), 신생아(neonate), 아동(소아), 성인, 또는 사후 72시간까지의 사망자(deceased person)을 포함하는 포유류의 담도계 조직(예컨대, 담도계의 일부, 예컨대 문(hilum), 총간관(common hepatic duct), 담낭관(cystic duct), 총관(common duct), 총간-췌장관(common hepato-pancreatic duct) 및 담낭(gall bladder) 및 담관주위선(peribiliary gland) 또는 담관주위선(peribiliary gland)으로부터 유래된 전구 세포 또는 줄기 세포)으로부터 수득된다. 또한, 이러한 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 및/또는 이러한 다분화능 줄기/전구 세포가 농축된 포유류 세포의 군을 포함하는, 세포의 군을 포함하는 조성물이 제공된다.

[0008]

다분화능 줄기/전구 세포는 (i) 초기 단계의 간 세포 혈통을 나타내는 적어도 하나의 마커(예컨대, HNF6, HES1, CK19, 알부민, 또는 AFP); (ii) 초기 단계의 췌장 세포 혈통을 나타내는 적어도 하나의 마커(예컨대, PDX1, PROX1, NGN3, 또는 인슐린); 및 카테고리 (a)-(c)의 것으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커: (a) 줄기/전구 세포에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커(예컨대, CD133 (프로미닌(prominin)), CD44H (히아루로난 수용체(hyaluronan receptor)), N-CAM, CXCR4, 또는 EpCAM); 내배엽 줄기/전구체를 나타내는 적어도 하나의 전사 인

자(예컨대, SOX 9, SOX17, 또는 FOXA2), 및 (c) 적당한 발현(moderate expression)에 약한 전분화능 유전자(pluripotency gene)(예컨대, SOX2, NANOG, LF4, OCT4A 또는 OCT4)를 발현할 수 있다. 일부 예에 있어서, 다분화능 줄기/전구 세포는 각각의 카테고리 (i), (ii) 및 (a)-(c)로부터 하나의 마커를 발현할 수 있다. 발현(expression)은 생체내 조직, 새로 분리된 세포 또는 배양된 세포의 면역조직화학 및/또는 종말점(endpoint) 및 정량적 RT-PCR 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0009] 또한, 다분화능 세포는 (i) 텔로머라아제 프로테인(telomerase protein)의 핵 발현(nuclear expression); (ii) 전분화능 유전자의 발현 레벨을 완화하도록 낮게 발현; (iii) 전형적인 내배엽 전사 인자의 핵 또는 핵주위 발현(perinuclear expression)(예컨대, SOX17, SOX9, FOXA2, HES1, HNF6, PROX1, HNF3B (hepatocyte nuclear factor-3B, FOXA2, SALL4 (Sal-like protein 4), PDX1, NGN3, 또는 이들의 조합); (iv) 내배엽 줄기/전구체(endodermal stem/progenitor) 표면 마커의 발현; (v) 성숙한 간(mature liver)의 혈통 마커(P450-3A4, 트랜스페린(transferrin), 티로신 아미노 전달효소(tyrosine aminotransferase) (TAT) 및 고레벨 알부민(albumin); 성숙한 담관(mature bile duct)의 혈통 마커는 AE2, CFTR, 세크레틴 수용체(secretin receptor), 아쿠아포린(aquaporins), 또는 이들의 조합을 포함하고), 성숙한 담관, 또는 성숙한 췌장(mature endocrine pancreas)의 혈통 마커(예컨대, 인슐린(insulin), 글루카곤(glucagon), 소마토스타틴(somatostatin), 아밀라제(amylose) 또는 이들의 조합)의 낮고 다양한 레벨의 발현 또는 결핍된 발현; (vi) 간충직 세포(mesenchymal cell), 내피 세포(endothelial cell) 또는 조혈 세포(hemopoietic cell)에 대한 마커의 결핍된 발현 중 적어도 하나를 발현할 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 실시형태에 있어서, 다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 수득하고, 분리하고, 및/또는 확인하는 방법이 제공되고, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직(예컨대, 상기 담도계 조직은 문(hilum), 총간관(common hepatic duct), 담낭관(cystic duct), 총관(common duct), 총간-췌장관(common hepato-pancreatic duct) 및 담낭(gall bladder), 또는 이들의 조합을 포함함)으로부터 수득되고, 상기 방법은 담도계 조직을 수득하는 단계, 이어서 (i) 초기 간 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커(예컨대, HNF6, HES1, C19, 알부민, 또는 AFP); (ii) 초기 췌장 세포 혈통 단계를 나타내는 적어도 하나의 마커(예컨대, PDX1, PROX1, NGN3, 또는 인슐린); 및 선택적으로, (a)-(c)로부터 선택되는 적어도 하나의 마커: (a) 줄기/전구 세포에서 발견되는 적어도 하나의 표면 마커(예컨대, CD133 (프로미닌), CD44H (히아루로난 수용체), N-CAM, CXCR4, 또는 EpCAM); (b) 내배엽 줄기/전구체(endodermal stem/progenitor)를 나타내는 적어도 하나의 전사 인자(예컨대, SOX 9, SOX17, 또는 FOXA2), 및 (c) 적당한 발현(moderate expression)에 약한 전분화능 유전자(pluripotency gene)(예컨대, SOX2, NANOG, LF4, OCT4A 또는 OCT4)에 대해 포지티브한 세포를 임의의 순서로 또는 실질적으로 동시에 수득하는 단계를 포함한다. 또한, 포유류의 다분화능 줄기/전구체가 농축된 포유류의 다분화능 세포의 군을 확인 및 분리하는 방법이 제공된다.

[0011] 본 발명에 따라서, 기본 배지는 구리가 없고, 칼슘이 적고(0.5 mM 미만), 바람직하게는 인슐린, 트랜스페린/Fe, 셀레늄, 아연, 혈청 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin), 및 선택적으로 고밀도 리포트로테인(lipoprotein)이 보강된, 영양 성분이 농축된 임의의 기본 배지일 수 있다. 기본 배지의 예는 RPMI 1640이다. 세포는 단지 플라스틱에(onto plastic), 히아루로난에(onto hyaluronans), 콜라겐 IV, 콜라겐 III, 라미닌, 히아루로난과 배아, 태아, 신생아 조직으로부터의 다른 매트릭스 성분 또는 이들의 조합으로 코팅된 플라스틱에서 선택적으로 배양될 수 있다. 세포는 적어도 24시간, 바람직하게는 7-21일 동안 배양된다. 본 발명에 따라서, 분리된 세포는 본 발명의 줄기 세포가 80%, 90%, 95%, 95%, 바람직하게는 100% 농축된 것이다. 상기 분리(isolation)는 면역 선택(immunoselection) 기술(예컨대, 패닝(panning), 마그네틱 비드 선택(magnetic bead selection), 유동 세포 계수법(flow cytometry), 또는 이들의 조합) 및/또는 선택적 배양 조건(selective culture condition)을 통해 행해질 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 새로운 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포 또는 이들의 파트너 세포(예컨대, 간충직 세포(mesenchymal cell), 혈관모세포(angioblast) 및 성상 세포(stellate cell) 또는 전구체)를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군(population)을 번식(propagating) 및/또는 확대

(expanding)시키는 방법으로, 상기 세포를 플라스틱에(onto plastic), 히아루로난에(onto hyaluronans), 또는 선택적으로 타입 III 또는 IV 콜라겐, 히아루로난 또는 배아, 태아, 신생아 조직으로부터의 다른 매트릭스 성분으로 코팅된 플라스틱에(onto plastic), 또한 구리가 없고, 칼슘이 적고(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, 혈청 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물, 및 선택적으로 고밀도 리포프로테인(lipoprotein)을 함유하는 기본 배지에서(in a basal medium) 배양하는 단계를 포함한다.

[0013]

본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 새로운 다분화능 줄기/전구 세포의 성인 간 세포 운명(liver cell fates)으로의 혈통 제한하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포 혼탁액을 수득하는 단계로서, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는 단계; (b) 상기 세포 혼탁액을 히아루로난 또는 다른 매트릭스 성분(예컨대, 타입 IV 콜라겐, 라미닌, 또는 둘다)과 조합된 히아루로난을 포함하는 하이드로겔(hydrogel)로 임베딩(embedding)하는 단계; 및 (c) 구리, 칼슘(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, bFGF, 하이드로코티손(hydrocortisone), 글루카곤(glucagon), 갈락토오스, 트리-아이오도티록신(tri-iodothyroxine)(T3), 표피 생장 인자(epidermal growth factor)(EGF), 간세포 생장 인자(hepatocyte growth factor)(HGF), 고밀도 리포프로테인(lipoprotein), 및 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물로 보완된 기본 배지에서 간 세포로 분화를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 상기 세포 혼탁액을 배양하는 단계를 포함한다.

[0014]

본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 새로운 다분화능 줄기/전구 세포의 성인 췌장 세포 운명(pancreatic cell fates)으로의 혈통 제한하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포 혼탁액을 수득하는 단계로서, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는 단계; (b) 상기 세포 혼탁액을 히아루로난 또는 다른 매트릭스 성분과 조합된 히아루로난을 포함하는 하이드로겔(hydrogel)로 임베딩(embedding)하는 단계; 및 (c) 구리, 칼슘(<0.5 mM), B27, 아스코르브산, 인슐린, 트랜스페린/Fe, bFGF, 시클로파민(cyclopamine), 레티노산(retinoic acid), 엑센딘(exendin) 4, 고밀도 리포프로테인(lipoprotein), 및 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물로 보완되고, 하이드로코티손이 부족한 기본 배지에서 췌장 세포로 분화를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0015]

본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 새로운 다분화능 줄기/전구 세포의 성인 담도계 운명(biliary cell fates)으로의 혈통 제한하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 다중 내배엽 혈통(multiple endodermal lineages)으로 분화될 수 있는 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포를 포함하는 세포 혼탁액을 수득하는 단계로서, 상기 세포는 포유류의 담도계 조직으로부터 수득되는 단계; (b) 상기 세포 혼탁액을 히아루로난 또는 다른 매트릭스 성분(예컨대, 타입 I 콜라겐)과 조합된 히아루로난을 포함하는 하이드로겔(hydrogel)로 임베딩(embedding)하는 단계; 및 (c) 구리, 칼슘(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, 하이드로코티손, bFGF, 혈관 내피 세포 성장 인자(vascular endothelial cell growth factor)(VEGF), 간세포 생장 인자(hepatocyte growth factor)(HGF), 고밀도 리포프로테인(lipoprotein), 및 알부민에 연결된 유리 지방산(free fatty acids bound to serum albumin) 혼합물로 보완된 기본 배지에서 담관 세포(cholangiocyte)로 분화를 가능하게 하는 충분한 시간 동안 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0016]

본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포, 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을, 간 조직으로 분화되는 간으로, 적당한 배양 조건 하에서, 사전 혈통 제한이 있거나 없이, 세포 혼탁액 또는 임플란트 또는 그래프트로서 생체 내에 이식하는 단계를 포함하는, 생체 내에서 세포를 분화시키는 방법이 제공된다.

[0017]

본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 제1항의 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을, 담도계 조직으로 분화되는 담관으로, 적당한 배양 조건 하에서, 사전 혈통 제한이 있거나 없이, 세포 혼탁액 또는 임플란트 또는 그래프트로서 생체 내에서 이식하는 단계를 포함하는, 생체

내에서 세포를 분화시키는 방법이 제공된다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 제1항의 포유류의 다분화능 줄기/전구 세포 또는 이러한 세포를 포함하거나 이러한 세포가 농축된 군을, 적당한 배양 조건 하에서, 사전 혈통 제한이 있거나 없이, 세포 혼탁액 또는 임플란트 또는 그래프트로서 생체 내에서 신장 캡슐 하에서 췌장으로 또는 기능적 췌장 조직으로 분화하는 정소 상체 지방체(epididymal fat pads)로 이식하는 단계를 포함하는, 생체 내에서 세포를 분화시키는 방법이 제공된다.

[0019] 이러한 점에서, 본 발명의 적어도 하나의 실시형태를 자세히 설명하기 전에, 본 발명은 본 출원에서 구성의 상세 및 이하 기재로 설명하거나 또는 도면으로 나타내는 성분의 배열에 한정되지 않음을 이해해야 한다. 본 발명은 기재된 것 이외의 실시형태 및 다양한 방법으로 행해질 수 있다. 또한, 추상적인 것뿐만 아니라, 여기에 채용된 어법 및 용어는 설명을 위한 것이고, 한정되는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0020] 당업자라면, 발명이 기본으로 하고 있는 개념은 본 발명의 일부 목적을 행하기 위한 다른 구조, 방법 및 시스템을 고안하는 기초로서 쉽게 이용될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 청구항은 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않는 한 동등한 구성을 포함하는 것으로 간주된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 내배엽 조직의 일부 형태로 분화될 능력이 있는 본 발명의 다분화능 담도계 줄기 세포를 나타내는 개략도이다. 세포 모두는 "내배엽(endodermal)"(E) 전사 인자(예컨대, SOX9, SOX17, FOXA2) 및 줄기/전구체 군의 다른 마커(표면 항원, 예컨대 CD133, CD44H, EpCAM, CXCR4, NCAM)를 발현한다. 혈통 제한은 간, 췌장, 및 담도계를 포함하는 다양한 성인 운명(adult fates)을 야기한다.

도 2는 간, 췌장 및 십이지장과의 연결을 나타내는 담도계의 개략도이다. 담관주위선(peribiliary gland), 담도계의 줄기 세포 틈새의 수가 많이 발견될 수 있는 부위는 별로 나타냈다.

도 3은 마커 및 담도계를 통해 담관주위선의 수 및 사이즈를 확인하는데 사용되는 담도계의 다양한 부위의 조직학 및 면역 조직 화학의 이미지의 컴포지트이다. (a) 간외 담도계에서 담관주위선(PBGs)의 분포 및 특성 해석. PBGs는 담도계의 관벽 내에 존재하고, 담도계 줄기/전구체에 위치한다. PBGs의 마커 프로파일의, 담도계 내에서 다양한 부위에서 담관주위선의 수 및 사이즈의 조사가 행해졌다(n=5 조사된 인간 담도계). 이미지 분석에 의해 평가되는 바와 같이, PBGs 아치니(acini)/총 영역으로 점유되는 표면으로서 발현되는, PBGs의 밀도; 수 및 환경은 인간 간외 담도계의 다양한 부위에서 조직학적으로 분석되었다. 간-췌장 팽대부(ampulla)는 가장 밀도가 높고, PBGs의 수가 많은 것으로 나타났고; 비슷한 수가 담낭관 및 문(hilum)에서 발견되었고; 담관에서 덜 발견되었고; 담낭에서는 발견되지 않았다. *p< 0.01. 원배율(Original magnification) x 10. b: 제자리에(in situ) PBGs의 면역조직화학(Immunohistochemistry). PBGs는 CK7, CK19, NCAM, CD 133, 인슐린, EpCAM, SOX9, SOX 17 및 PDX1에 포지티브하고, 알부민에 대해 네거티브(또는 매우 낮은 레벨)하다. 이러한 초기 혈통 마커(예컨대, 알부민)의 변이는 다양한 담관주위선 사이에 나타난다(알부민에 대한 증거로 도 7 참조). 원배율 x 40.

도 4는 줄기 세포가 담관주위선(PBGs) 내에서 주로 위치한다는 것을 보여준다. 이번 경우는 PDX1인 줄기 세포 마커의 발현에서, 단일 담관주위선 내에 가변성이 있다는 것을 알았다. 적색 화살표는 전사 인자를 발현하는 세포의 핵을 나타내고; 흑색 화살표는 그것을 발현하지 않는 것들을 나타낸다.

도 5는 담낭관의 담관주위선에 EpCAM (녹색) 및 nuclei stained blue with 4',6-디아미디노-2-페닐린돌(phenylindole) (DAPI)로 청색으로 스테이닝된 핵과 함께 SOX17 (A) 및 PDX1 (B)를 나타낸다.

도 6은 인간 담도계의 면역 조직 화학 데이터를 제공하고, 담낭관 및 문(hilum)에서 담관주위선에서의 EpCA, SOX 9, 및 SOX 17의 발현을 나타낸다.

도 7은 다분화능 담도계 줄기 세포의 주요 특성의 요약을 제공한다. 이들은 줄기/전구체의 표면 마커; 내배엽

전구체의 일반적인 전사 인자; 간, 담도계, 및 췌장의 초기 혈통 단계 마커의 다양한 발현; 및 도 8에서의 적당한 발현에 약한 전분화능 유전자를 포함한다. 간문(hepatic hilum)에 대한 대표적인 RT-PCR 분석은 내배엽 전사 인자(SOX 9, SOX 17, FOXA2, PDX1, NGN3 등)의 브로드한 레퍼토리 및 전형적인 줄기/전구체 표면 마커(예컨대, EpCAM, NCAM, CXCR4, CD 133)를 나타낸다.

도 8은 담낭관 및 문(hilum) 조직으로 다분화능 유전자의 발현을 나타내는 RT-PCR 데이터를 나타낸다. 완화시킨 약한 발현은 자가-복제하기 위한 담도계 줄기 세포의 능력에 대한 추가적인 증거를 제공한다. 다분화능 유전자는 배아 줄기(ES) 세포에 발현되고, 이들 유전자의 다양한 조합이 체세포로 감염되는 경우에, 유도된 다분화능 줄기(iPS) 세포를 수득할 수 있다는 것을 발견했다. 적어도 5개의 유전자 OCT 4, SOX2, NANOG, LIF4 및 c-MYC가 확인되었다. 발현 레벨을 완화하도록 낮게 발현하는 것은 c-MYC를 제외하고, 담도계 조직 및 OCT 4, SOX2, NANOG, KLF4로 분리된 담도계 줄기 세포에서 발생한다.

도 9는 담낭(gall bladder)은 담관주위선을 함유하지 않는다(도 3에 나타낸 바와 같음). 그러나, 줄기/전구체 전사 인자 및 표면 마커의 일부를 발현하는 세포는 담낭 세포에 존재한다. 분석된 마커(EpCAM 또는 PDX1)의 발현을 나타내는 갈색의 얼룩은 담낭의 표면에서 세포에 존재함을 알 수 있다.

도 10은 담관주위선을 갖지 않는 담낭 조직에 대한 면역 조직 화학 데이터를 나타낸다(a,c,d). 세포는 EpCAM(녹색)에 포지티브하고, 내배엽 전사 인자(SOX 17-적색으로 나타냄)에 대해 핵주변 스테이닝을 갖는다. (b) 또한, 세포는 PDX1(분홍색)을 발현하고, Ki67 스테이닝(녹색)으로 나타내는 바와 같이 현저히 급증했다.

도 11은 담도계 조직으로부터의 줄기/전구 세포 군집이다. 세포는 무혈청 우보타 배지(serum-free Kubota's Medium) 및 배양 플라스틱에서 분리되고 배양되었다. 3개의 분명한 군집 형태, 타입 1-3은 내배엽 줄기/전구체에 대해 선택하기 보다, 성숙한 세포에 허용되는 조건 하에서 관찰되었다. 면역 조직 화학 스테이닝(Immunohistochemical staining)은 마커에 대해 표시되는 색깔에 텍스트로 나타낸 특정 유전자의 발현을 나타낸다. 모든 부분은 핵을 청색으로 나타내는 4',6-디아미디노-2-페닐린돌(DAPI)로 스테이닝되었다. 군집 타입(Colony type) 1(a)은 EpCAM, NCAM, 및 ASBT를 발현하는 세포의 집합. 세포는 천천히 성장한다(매 3-4일 또는 그 이상으로 분배되어). 군집 타입 2(b)는 hHSCs의 표현형과 매우 유사한 표현형을 갖고, EpCAM, NCAM를 100% 발현하지만, AFP를 발현하지 않는 세포를 가짐(매 36-40시간으로 분배되어). 군집 타입 3(c)은 군집의 내부가 아닌 애지(edge)에서 EpCAM 발현 및 세포 내부에서 SOX 17, PDX1, 또는 SOX 9를 높은 레벨로 발현하는 세포를 언듈레이팅(undulating) 및 스월링(swirling)하여 이루어진다(매 36-40시간으로 분배되어). 모든 이미지의 배율은 20X이다. 그림은 군집이 4-8주 동안 모니터링된 10회 이상의 실험으로부터 발견된 것을 나타낸다.

군집 타입 2 및 3의 세포 사이의 관계의 증거는 낮은 배율(4X) 이미지(d)에 나타냈다. 하나가 다른 것의 전구체인 경우에는 알려지지 않았다. RT-PCR 분석 (e)은 담낭(gall bladder)에 비해, 담낭관(cystic duct)으로부터 군집의 다양한 유전자의 발현을 나타낸다. 2개의 조직으로부터 RT-PCR 분석은 매우 유사하지만, 담낭관으로부터의 것들은 일부만 및 인슐린의 발현이 약하고, 2개의 유전자는 무혈청 쿠보타 배지(serum-free Kubota's Medium) 및 플라스틱에서 자라고, 담낭으로부터 수득되는 전구 세포로 발현되지 않는다(The RT-PCR assays from the two tissues are quite similar, but those from cystic duct have weak expression of albumin and insulin, two genes not expressed by progenitor cells which were obtained from the gallbladder and growing in serum-free Kubota's Medium and on plastic.).

도 12의 특히 군집 타입 2 또는 3의 담도계 줄기 세포는 세포의 군집의 줄기/전구체 마커의 안정한 발현을 야기하는 몇 달 동안 천천히 확대된다. 이는 세포의 자가-복제의 일부 증거이고; 추가적인 증거는 다분화능 유전자의 발현에 의해 제공된다(도 8). 군집의 중앙에 있고, 약간 분화되는 부위인 군집의 애지에서만 발현되는 EpCAM(녹색)을 갖는 세포 내에서 PDX1(주황/적색)의 발현을 유지하는 배양물에서 한달 후에 타입 3 군집을 볼 수 있다. DAPI 스테이닝(청색)은 세포의 핵을 나타낸다.

도 13은 배양 플라스틱 및 무혈청 쿠보타 배지 (serum-free Kubota's Medium)에서 8주 이상 배양한 담도계 줄기 세포 군집의 상의 현미경 상이다. 군집은 성인 담도계 조직으로부터 유래된 1-2개의 세포로부터 시작되었다. 군집 내에 세포의 수를 가늠하기 위해서, 확대된 이미지는 군집의 다중 영역으로부터 제조되고(대표적인 것은 착색된 윤곽으로 표시된 직각 영역으로 나타냄), 이를 영역은 메타포프 소프트웨어로 이미지화되고, 세포 수를 수득하기 위해 사용된다(To estimate the number of cells within the colony, magnified images were prepared from multiple regions of the colony (representative ones are indicated in the rectangular areas demarcated by colored outlines) and these areas imaged with Metamorph software and used to obtain cell numbers.). 영역의 샘플링(sampling)은 군집에서 500,000 이상의 세포가 추산되었다. 태아의 담

도계 조직으로부터, 보통 >50의 이러한 군집이 관찰되었고, 성인의 담낭관 및 문 조직(hilum tissue)으로부터, 보통 >100의 이러한 군집이 관찰되었다.

도 14는 담도계 줄기 세포의 조직(제자리에; *in situ*) 또는 배양물에서 전사 인자의 위치(텔로머라아제 프로테인의 위치)이다. 면역 조직 화학은, 전사 인자 및 텔로머라아제 프로테인이 일부 세포 및 다른 세포의 핵주변 또는 세포질에 존재한다는 것을 드러냈다. 핵 위치가 활성 인자의 원인이 되고, 핵주변 또는 세포질 위치는 저장 형태임을 가정하지만, 확실한 것은 알려지지 않았다. 이들 이미지에 있어서, SOX 17은 생체 내에서(제자리의 데이터; *in situ* data) 담관주위선의 세포의 일부이지만, 전체는 아닌 핵 내에서 발현되고, 플라스틱 및 쿠보타 배지(Kubota's Medium)의 배양물에서 모든 담도계 줄기 세포의 핵 내에서 발현된다. 배양물의 이미지에 있어서, 핵은 DAPI로 스테이닝한 청색이고; 세포의 일부는 EpCAM(녹색)을 발현하지만; 모두 SOX 17 (적색)의 핵 내 위치를 갖는다. 이미지가 구분이 안되게 섞인 경우, 핵은 분홍색으로 나타낸다(혼합된 청색 및 적색).

도 15는 전사 인자, SOX 17 (적색/분홍색)의 핵 및 핵주변 위치를 나타내는 담도계 줄기 세포의 타입 3 군집이다. 군집의 주위에서 세포는 EpCAM(녹색)에 포지티브하다. 핵은 DAPI로 청색으로 스테이닝된다.

도 16은 SOX 17 (적색/오렌지색)의 핵주변 및 세포질 스테이닝을 나타내는 담낭관의 제자리 스테이닝(*in situ staining*)이다. 세포 멤브레인은 EpCAM (녹색)에 포지티브하고, 핵은 DAPI로 청색으로 스테이닝했다.

도 17은 담도계 줄기 세포의 다분화능(Multipotentiality)이다. 간세포(hepatocytic) 또는 담관 세포의 운명(cholangiocytic fate)으로의 분화에 대한 HDM(Hormonally Defined Media)의 효과. 줄기 세포는, 플라스틱 및 쿠보타 배지에서 배양되는 경우에 줄기/전구체로서 확실히 남아 있다. 배지가 성인 운명(adult fate)에 맞춰진 HDM(Hormonally Defined Medium)으로 변화되는 경우에, 성인의 운명을 향해 분화될 것이다. 이들은 HDM이 세포를 플레이팅하거나 세포외 매트릭스의 형태로 임베딩하는 것의 조합으로 사용되는 경우에, 성인 운명으로 더욱 빠르고 효율적으로 분화될 것이다(도 20-22). 이들 연구에서는 담관 세포(HDM-C) 운명에 의해 간 세포(HDM-L) 운명을 향해 담도계 줄기/전구체의 분화에 대한 특정 HDM의 효과를 나타내는 대표적인 데이터를 보여준다.

자가-복제 조건(플라스틱 및 무혈청 코보타 배지 또는 등가물의 배양) 하에서 유지되는 군집으로부터 담도계 줄기 전구체는 윗줄의 이미지인 간 세포(HDM-L), 또는 아랫줄의 이미지인 담관 세포(HDM-C)에 맞춰진 HDM에서 이식되었다(transferred). HDM-L 효과: 7일 후 면역 형광법(a). 세포는 CK18 (적색) 및/또는 알부민 (청색-녹색)에 분산되게 포지티브하다. 배율: 20X. HDM-L (스코어(score): 2.2 ± 0.8)에 의해 자가-복제 조건(스코어(score): 0) 하에서 간 세포(CK18+/알부민+세포들)의 수와 비교한 반-정량적 데이터(c). HDM-C 효과: 7일 후 면역 형광법(b). 세포는 CK7, 세크레틴 수용체 (SR), 및 CFTR에 분산되게 포지티브하다. 이들은 CK7/SR 및 CK7/CFTR을 동시에 발현한다(co-expressed). 원배율은 c4 및 c5가 40X인 것을 제외하고는 20X이다. HDM-C (담관 세포를 제한하는 세포 혈통의 30% 이상과 동일한 3±0.7)에 의해 자가-복제 조건(세포의 0.2 ± 0.4;<5%)에서 SR+/CFTR+ 세포의 %의 반-정량적 데이터(c).

도 18은 담도계 줄기 세포의 다분화능이다. 췌장 운명(cholangiocytic fate)으로의 분화에 대한 췌장(HDM-P)에 맞춰진 HDM(Hormonally Defined Media)의 효과. HDM-P 효과: HDM-P에서 배양 7일 후 췌장 마커에 대한 면역 형광법(a). 군집의 주변에서, c-펩티드 (a,b), PDX-1 (c) 및 인슐린 (d)를 함유하는 췌도와 같은 구조(Islet-like structures) (a-d)를 형성하기 위해 세포 집합 및 농축이 발생된다. 분화되지 않은 세포(EpCAM+ 세포)는 군집 중앙(e) 내에서 발견되었다. 원배율: 20X. 자가-복제(세포의 1±0.7; <10%)의 조건에서 발견되는 췌도와 같은 구조(islet-like structures) (f)의 수는 HDM-P (세포의 3.8±0.3; ~40%)에서보다 더욱 낮다. 자가-복제의 조건에서 2시간 동안 모든 RPMI 1640 포뮬레이션 (11.1 mM)에서 발견되는 글루코오스 농도 하에서 프로테인ng/g의 C-펩티드(g)의 레벨은, HDM-P에서 12.3±1.9 ng/ μ 인 것에 비해, 4.5±2.25이다. 데이터는 평균±표준오차, N=4; *p < 0.05로 표현된다. (h) c-펩티드 세크레틴에 자극된 글루코오스는 g/l로 저레벨의 글루코오스(5.5 mM)에서 1.10 ± 0.32 ug/1, 고레벨의 글루코오스(22 mM)에서 1.92 ± 0.43 ug/1이고, n=7; *p < 0.01인 배지에서의 c-펩티드의 레벨로 HDM-P 대조군에서 관찰된다.

도 19는 담도계 줄기 세포의 다분화능이다. 배지의 정량적 (q)-RT-PCR 분석. 이러한 분석은, 췌장 세포에 의해 간 세포, 담관 세포에 맞춰진 무혈청, HDM(hormonally defined medium; HDM -L 또는 HDM-C 또는 HDM-P)에 비해 자가-복제 조건(플라스틱 및 쿠보타 배지의 배양) 하에서 유지되는 담도계 줄기 세포 배양물에서 행해졌다. mRNA 상대적 발현 레벨은 3개의 가장 안정한 하우스키핑 유전자(housekeeping genes)의 기하 평균에 대한 정상화된 ACT 값을 랭킹함으로써 산출했다. 데이터는 플러스 또는 마이너스(±) 표준 편차를 나타냈다. 이를 각각에 대한 유의 수준(significance level)은 *p<0.05. n=실험이 행해진 횟수이다.

도 20은 담도계 줄기 세포의 다분화능이다. 담도계 줄기 세포의 분화에 대한 HDM 및 세포외 매트릭스 성분의 효과. 담도계 줄기 세포는 한달여 동안 플라스틱 및 쿠보타 배지 또는 등가물(자가-복제 조건)에서 배양되어, (a)에서의 것과 같이 군집을 야기했다. 이러한 대표적인 군집은 분산되고, 세포는, 3-차원(3-D) 포맷으로 제공되고, 바람직한 성인 운명에 맞춰진 매트릭스 성분 + HDM으로 이루어진 3가지 분화 조건 중 하나로 이동된다 (transferred): 담관 세포(b), 간 세포(c), 또는 췌장/3-세포(d). 이들은 배양물 내에서 9일 동안 유지된 후, 이들 담도계 줄기 세포가 배양 조건에 따라 달라지는 다중 성인 운명(담관 세포, 간 세포 또는 췌장/3-세포의 예로 제공됨)을 혈통 제한할 수 있는 것을 나타내는 조직-특이 운명에 대해 분석되었다. Row 3=디티존(dithizone) (DTZ) 스테이닝(staining), (췌장 a 및 β 세포로 나타냄). D=배양 일수; Glu=글루카곤(glucagon); C-P= C-펩티드, 인슐린 세크리틴을 나타냄.

도 21은 자가 복제 조건(a-b) 하에서 vs 성숙한 간 세포(c-d)를 수득하기 위한 3-D 분화 조건하에서 담도계 줄기 세포의 투과 전자 현미경. 크고, 각각의 세포가 제공되고, 세포의 핵은 하나 이상의 핵소체(nucleoli)를 나타낸다. (c) 근접한 세포는 잘 정의된 모세 담관(bile canaliculi)을 형성한다(화살표). 모세 담관은 결속 착제에 의해 근접된다(화살표 머리). 미세 융모(microvilli)는 루멘(lumen), (d)에 존재한다. 따라서, 세포는 성인 간 세포 및 간내 담관 세포로 성숙될 수 있다.

도 22는 3-D 분화 조건에 비해 자가 복제 하에서 배양물에서 정량적 (q)-RT-PCR에 의해 제공되는 담도계 줄기 세포/전구체의 다분화능 증거이다. a. 담도계 줄기/전구 세포는 2달 동안(자가 복제 조건) 쿠보타 배지 및 플라스틱에서 배양되었다. 군집은 이러한 조건에서 유지되고, 담도계 줄기/전구 세포(BP)을 수득하거나, 간 세포(B-L), 담관 세포(B-C) 또는 췌장의 췌도(B-P)의 3-D 분화 조건으로 이동되고, 모두는 추가로 2주 동안 배양되었다. 그 후, 배양물은 각각의 성인 운명에 적합한 유전자의 qRT-PCR 분석을 준비했다. 데이터는, 자가-복제 조건(BP)에서 유전자의 발현 레벨이 1.0의 값으로 주어지는 히스토그램으로 준비하고, 성인 운명으로 분화된 후 세포에서 각각의 유전자의 값은 BPs에서와 상대적인 폴드 변화(fold change)로서 제공된다. 히스토그램의 일부에서 별표는 통계적 유의도(statistical significance)를 나타낸다($p<0.01$ or $p<0.001$). N=2, 각각의 실험은 3번의 샘플로 행해짐. BP = 담도 줄기/전구체(biliary stem/progenitors); B-C = 담관으로 혈통 제한된 세포(cells lineage restricted to bile duct) (담관 세포(cholangiocytes)); B-L = 간으로 혈통 제한된 세포(cells lineage restricted to liver) (간 세포(hepatocytes)); B-P = 췌장으로 혈통 제한된 세포(cells lineage restricted to pancreas) (췌도(islets)). 분석된 유전자는 GGT1 =감마 글루타밀 트랜스펩ти다제(gamma glutamyl transpeptidase)- 1 ; AE2 = 음이온 교환체(anion exchanger) 2; CFTR = 낭포성 섬유종 트랜스막 전도도 조절기(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); HNF4a = 간 세포 핵 인자(hepatocyte nuclear factor) 4A; AFP = 알파-페토프로테인(alpha-fetoprotein); ALB= 알부민(albumin); TF= 트랜스페린(transferrin); TAT =티로신 아미노트랜스페라아제(tyrosine aminotransferase); CYP3A4 = 사이토그롬(cytochrome) P450 3A4; pdxl= 췌장 및 십이지장의 호미오박스(Pancreatic and duodenal homeobox) 1 ; ISL-1 = ISL LIM 호미오박스(homeobox) 1 ; NGN3 =뉴로제닌(neurogenin) 3; INS = 인슐린(insulin); GCG = 글루카곤(glucagon).

도 23은 생체 내 연구로 나타낸 바와 같은 담도계 줄기 세포의 다분화능이다: 간 운명(Hepatic Fate). 담도계 줄기 세포는 자가-복제 조건(쿠보타 배지 또는 등가물 및 배양 플라스틱) 하에서 배양물에 유지되고, 그 후 잠잠한 간(quiescent liver)을 가진 면역력을 가진(immunocompromised) 성숙한 마우스의 간에 주입했다(즉, 어떠한 간 손상도 유도되지 않았음). 마우스로부터 준비된 간 영역은 간 세포를 나타내는 인간의 특정 마커에 대한 면역 조직 화학에 의해 분석했다. 이미지에서, 영역은 Dako's Anti human Hepar-1로 스테이닝되었다. 이러한 영역은 인간 Hepar-1, 종래의 간 세포 마커에 포지티브한 인간 간 세포에 의해 점유되는 총 면적의 $6.52 \pm 2.5\%$ 확인된다는 것을 알 수 있었다.

도 24는 생체 내 이식에 의해 나타낸 바와 같은 담도계 줄기 세포의 다분화능이다: 담도계 운명(Biliary Tree Fate). 담도계 줄기 세포는 자가-복제 조건(쿠보타 배지 또는 등가물 및 배양 플라스틱) 하에서 배양물 내에 유지된 후 잠잠한 간(quiescent liver)을 가진 면역력을 가진(immunocompromised) 성숙한 마우스의 간에 주입했다(즉, 어떠한 간 손상도 유도되지 않았음). 마우스로부터 준비된 간 영역은 담도 세포를 나타내는 인간의 특정 마커에 대한 면역 조직 화학에 의해 분석했다. Dako's Anti human CK7, 담도 세포의 마커는 모든 담도 세포의 평균 $12.7 \pm 5.5\%$ 로 발견되었다. 큰 담관에 비하여 작은 인간 담관 세포의 증거와 비교하여, 큰 담관에서 ~ $14.92 \pm 5.9\%$ 세포, 작은 담관에서 ~ $5.02 \pm 1.95\%$ 세포가 인간 CK7에 포지티브하다는 것을 발견했다.

도 25는 생체 내 이식에 의해 나타낸 바와 같은 담도계 줄기 세포의 다분화능이다: 췌장 운명(Pancreatic Fate). 담도계 줄기 세포는 자가-복제 조건(쿠보타 배지 또는 등가물 및 배양 플라스틱) 하에서 배양물 내에

유지된 후 수컷 Balb/C $Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}$ 마우스의 정소상체 지방체(epididymal fat pads; EFP)로 주입했다. 각각의 마우스는 200-400 네오이스렛(neoislets)에 주입되고, HDM-P와 하이드로겔 함유 히아루로난(hydrogel containing hyaluronan), 담도계 줄기 세포의 세포 집합은 타입 IV 콜라겐 및 라미닌의 3-D 분화 조건에서 췌장 췌도 운명 쪽으로 7-14일 동안 혈통 제한되었다. 각각의 네오이스렛(neoislet)은 1000 이상의 세포로 이루어진다. 대조군 마우스는 세포 없이 마트리겔(Matrigel)로 이식되었다. 마우스는 글루코오스 레벨로 매일 모니터링되었고, 3개월 동안 혈당 상승되었다(600- 750 mg/dl). 3개월까지, 이식된 마우스에서 글루코오스 레벨은 대조군의 반 이하로 레벨이 떨어졌다. 글루코오스 내성 테스트는 수술 후 68 및 91일에 행해졌고, 실험 마우스에서 인간 C-펩티드의 상당한 혈액 레벨을 보여주었고, 이러한 레벨은 글루코오스에 의해 조절가능했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

다분화능 줄기 또는 전구 세포, 및 다분화능 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 군의 예상치 못한 발견으로부터의 본 발명의 줄기는, 간, 췌장, 및 담도계를 포함하는 다중 내배엽 혈통으로 분화될 수 있고, 담고계 내에서 발견된다(도 1). 본 발명의 명확성을 위해, "담도계 줄기 세포(Biliary Tree Stem Cell)"는 독창적인 포유류의 다분화능 줄기 또는 전구 세포, 이러한 독창적인 세포를 포함하고, 독창적인 세포가 농축된 세포 군을 말하기 위해 사용되었다.

[0023]

새로운, 다분화능 담도계 줄기 세포는 담도계 조직의 일부로부터 분리될 수 있지만, 도 2의 개략도에 별로 나타내는 담관주위선 및 담도계의 가지점에 특히 많은 수가 발견되었다. 간 내에서 가장 작은 가지 끝에서 발견되는 별은 간내 간 줄기 세포의 줄기 세포 틈새인, 헤링의 관(canals of Hering)을 말한다. 담도계 줄기 세포는 간내 간 줄기 세포의 전구체이다.

[0024]

세포 소싱-담도계(cell sourcing-Biliary tree)

[0025]

담도계 또는 간의 담도계 시스템은 십이지장과 간 및 췌장을 연결하는 일련의 관과 담낭이 포함된다(도 2의 도식 참조). 관 벽 내부에 담도계 전체는 담관주위선(도 3-11)이고, 이는 문, 총간관, 담낭관, 총관, 총간-췌장관 및 담낭과 같은 분기상 부위에서 특히 많은 수가 발견될 수 있다. 간 또는 복측췌로부터의 유체는 바터(Vater)의 돌기(Papilla)를 통해 십이지장으로 비워진다. 담낭을 포함하는 구조의 전체 그룹은 담도계로서 언급된다.

[0026]

모든 담도계(예컨대, 문, 총간관, 담낭관, 총관, 총 간-췌장관 및 담낭)는 종래의 기저막(basement membrane)으로 지지되는 매우 원주형의 담관 상피(biliary epithelium)의 층으로 라인화된 루멘(lumen) 및 밀집한, 섬유성 연결 조직으로 이루어진 벽을 갖는다. 불수의근 세포는 관, 특히 바터의 돌기 근처를 따라 분산되었다. 혈관, 신경 섬유 및 일부 임파상 세포(lymphoid cell)는 관 벽내에서 종종 발견된다. 담관주위선은 담도계의 전체 길이를 따라, 특히 총간-췌장관 및 문, 총간관, 담낭관, 총관 및 담낭에서 많이 발견된다. 도 3-7.

[0027]

담낭은 다른 특징을 갖는다(도 9, 10). 루멘은 원주형 상피, 적당한 근육층 및 근종 연결 조직에 의해 라인화된다. 담관주위선은 담낭에 존재하지 않는다(도 3, 9). 그러나, 담낭은 담관주위선 내부에서 발견되는 담도계 줄기 세포 군집의 표현형의 오버랩을 갖고, 수송 증폭 세포 및/또는 수임 전구체인, 세포를 갖는다(However, the gallbladder does have cells with overlapping phenotypes to those of the biliary tree stem cell populations found within the peribiliary glands are transit amplifying cells and/or committed progenitors.).

[0028]

본 발명의 세포는 발전의 어느 단계의 담도계 조직으로부터 분리될 수 있다. 따라서, 본 발명은 최근에 사망한 자로부터의 조직(바람직하게는 10시간 내외, 본 발명의 세포는 사망 후 72시간까지 분리하여 생존 가능함)을 포함하여, 태아, 신생아, 소아 및 성인 조직으로서 실험될 수 있다. 사실, 담도계 조직은 태아, 소아 및 성인 기증자로부터 쉽게 이용 가능하다는 점에서 특징이 있다. 또한, 본 발명은 이식에 의해 수득되지만, 거부되지 않는

간 및 췌장 기관으로부터의 조직, 또는 생검 조직, 절제 조직으로 실험될 수 있다.

[0029] 여기에 기재되는 것은 한정되지 않거나 임의의 포유류의 종이 적용 가능한다. 사실, 여기에 제공되는 실시예는 단지 예이고, 한정을 의미하지 않는다는 것을 이해해야 한다. 이렇게 하여, 본 발명은 담도계 조직에 대한 포유류의 소스(mammalian source)로 한정되지 않는다. 담도계 줄기 세포가 유래될 수 있는 포유류로는 그것에 한정되지 않지만, 인간, 설치류(예컨대, 래트, 마우스, 햄스터), 토끼, 소, 말, 돼지, 양, 개 및 고양이를 포함한다. 바람직하게, 담도계 줄기 세포는 인간에서 유래된다.

[0030] 공지한 바와 같이, 본 발명의 신규 클래스의 담도계 줄기 세포는 다중 내배엽 운명으로 분화될 수 있다. 본 발명의 담도계 줄기 세포는 간, 담도계 및 췌장을 포함하는 일부 내배엽 혈통의 성숙한 세포 형태로 분화되기 위해 유도될 수 있다. 도 17-25.

[0031] 담도계 조직의 샘플은 이식으로 수득된 후 지방증; 해부학상 이상 또는 주요 유관 속병(vascular disease)과 같은 이유에 기인하여 거부되는 간 또는 췌장으로부터 외과적으로 절개될 수 있거나; 또는 절제 물질로부터 얻어질 수 있다. 이는 다양한 이유로 제거된 담낭으로부터일 수 있다. 담도계 조직은 복부의 연결 조직으로부터 제거될 수 있다. 이러한 조직은 단편으로 나누어 더 진행된다. 담도계 줄기 세포가 특히 농축된 단편은, 문, 총간관, 담낭관, 총관, 총 간-췌장관 및 담낭을 포함한다. 각각의 부분은 길이 방향의 직경을 따라 커팅한 피스로 더 절개될 수 있다.

[0032] 담도계 줄기 세포는 간, 담도계 및 췌장 세포를 포함하는 다중 내배엽 운명을 야기하는 것을 나타낸다(도 17-25). 담도계 줄기 세포는 텔로머라아제 프로테인; 레벨을 완화시키기 위해 낮춘 다분화능 유전자(Nanog, SOX2, KLF4 and OCT4? Figure 8); 전형적인 내배엽 전사 인자(예컨대, SOX 17, SOX 9, FOXA2, HNF6, PROX1 , HNF3B (간 세포 핵 인자/hepatocyte nuclear factor)-3B (a.k.a. FOXA2), SALL4 (Sal-like protein 4), PDX1 및 NGN3); 내배엽 표면 마커(dermal surface markers) (예컨대, CD326/상피 세포 부착 분자(Epithelial cell adhesion molecule) 또는 EpCAM; CD56 신경 세포 부착 분자(Neuronal cell adhesion molecule) 또는 NCAM); CXCR4; 및 일부 줄기/전구체 유전자 (예컨대, CD44H--히아루로난 수용체(hyaluronan receptors), 및 CD133, 프로피닌이라고도 함)를 발현한다. 도 7, 8, 9, 13.

[0033] 또한, 표면상으로 다분화능에 기인하여, 담도계 줄기 세포는 간(예컨대, HNF6, HES 1 , FOXA2, 및 다양한 알부민), 담관(예컨대, 사이토케라틴(cytokeratin) 19) 및 내분비 췌장(endocrine pancreas)(예컨대, PDX1, NGN3, SALL4, 인슐린(insulin))의 낮고 다양한 레벨의 초기 혈통 마커를 발현한다. 도 7, 22.

[0034] 담도계 줄기 세포는 각각 췌장 및 내배엽 췌장의 발전에 필수적인 것으로 알려진 전사 인자 PDX1 및 NGN3 (도 3, 4, 7, 11)을 발현한다. 그러나, 담도계 줄기 세포는 담관 세포(예컨대, 세크레틴 수용체, 아쿠아포린), 간 세포(예컨대, 알부민, 티로신 아미노트랜스퍼라아제 또는 TAT, 트랜스페린, "레이트(late)" P450, 예컨대 P450-3A4) 또는 췌도 세포(예컨대, 글루카곤, 소마토스타틴, 아밀라아제 또는 고레벨의 인슐린)의 성숙한 마커를 발현하지 않거나 약하게 발현한다(도 3, 7, 13). 담도계 줄기 세포는 간충직 세포(mesenchymal cell)(예컨대 CD146, 테스민(desmin)), 내피 세포(예컨대, VEGF 수용체, CD31, 반 빌레브란드 인자(Van Willebrand Factor)) 또는 조혈모 세포(hemopoietic cell)(예컨대, CD45)의 모든 마커를 발현하지 않는다. 항원의 발현 패턴은, 이들이 배양 플라스틱 또는 히아루로난의 기층을 갖는 쿠보타 배지 또는 등가물로 이루어진 자가-복제 조건 하에 유지되는 한, 배양물의 수명 동안 안정하다.

[0035] 이러한 발현 패턴은 종말점(endpoint) 및 정량적 (q)-RT-PCR 분석 및 생체 내 조직, 새로 분리된 세포 또는 배양된 세포의 면역조직화학에 의해 측정될 수 있다. 내배엽 줄기/전구체의 다중 마커(예컨대, SOX 9, SOX17, PDX1, NGN3, FOXA2)의 동일한 담관주위선 내에서 세포의 동시-발현(co-expression)은 췌장에 혈통 제한을 하는

배아 줄기 세포(ES)에 관한 발견으로부터 구별되고, 이들 전사 인자는 모든 것이 동시에 아니지만 순차적으로 관찰된다는 특이하고 놀라운 특징이 있다. 또한, 이러한 전사 인자의 발현은 담관의 루멘의(lumenal) 표면에서 성숙한 담도계 세포에 존재하지 않았다.

[0036] 상기 설명한 바와 같이, 본 발명의 담도계 줄기 세포는, 성숙한 내배엽 조직의 전구체이고, 간, 담도계, 및 췌장을 야기할 수 있는 다중 조직의 세포와 마커를 공유한다.

[0037] 상대적인 발현 레벨 이외에도, 담도계 줄기 세포 내에 발현된 텔로머라아제 및 전사 인자(예컨대, SOX 17, PDX1)의 세포 위치는 성숙 기간(maturation) 동안 핵 위치로부터 핵주변(perinuclear)/세포질(cytoplasmic) 위치까지 변화된다(도 7 및 도 14-16 참조). 단일 담관주위선 내에서, 핵을 갖는 일부 세포, 핵주변 위치 또는 제공되는 마커의 발현이 없는 일부 세포가 관찰된다(도 4, 6, 7, 14). 이론에 얹매이지 않고, 핵내 위치는 전사 인자의 핵주변 위치의 것보다 더욱 본래의 세포와 관련된다. 후자의 세포는 나중 혈통 단계(later lineage stage)로 전이될 것으로 추정된다. 또는, 핵주변 위치(perinuclear localization)는, 인자가 적당한 재생 요구(regenerative demand) 하에서 핵으로 이동될 수 있는 불활성 저장 형태(inactive storage form)임을 나타낼 수 있다.

[0038] 본 발명은 담도계 세포의 분리 및 증식의 기술을 제공한다. 인간 담도계 조직으로부터의 줄기 세포 군은 배양 선택 기술에 의해 확인되지만, 면역 선택 기술(예컨대, 유동 세포 계수법(flow cytometry), 패닝(panning), 마그네틱 비드 선택(magnetic bead selection))에 의해 분리될 수 있다. 또한, 면역 선택 이외에, 본 발명의 담도계 줄기 세포는 조직 배양 조건에 의해 분리될 수 있다. 예컨대, 담도계 조직으로부터 준비된 세포 혼탁액은 플라스틱 또는 히아루로난에 플레이팅될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 플라스틱은 콜라겐 IV, 콜라겐 III, 라미닌, 히아루로난, 배아/태아 조직에서 발견되는 다른 매트릭스 성분, 또는 이들의 조합으로 선택적으로 코팅된다.

[0039] 배양 선택에 사용되는 배지, 무혈청 쿠보타 배지 또는 등가물은, 담도계 줄기 세포 및 파트너 간충직 세포(mesenchymal cell), 혈관모세포(angioblast) 및 쿠퍼 세포 전구체의 생존 및 번식에 강하게 선택적이지만, 담도계의 성숙한 세포에는 선택적이지 않다. 이러한 배지의 에센스(essence)는 구리가 없고, 칼슘이 적고(<0.5 mM), 인슐린, 트랜스페린/Fe, 정제된 알부민에 연결된 유리 지방산, 및 선택적으로 고밀도 리포프로테인(lipoprotein)을 함유하는 임의의 기본 배지인 것이다.

[0040] 쿠보타 배지 또는 등가물은 무혈청이고, 정제되고, 정의된 호르몬의 혼합, 성장 인자, 및 영양성분을 함유한다. 더욱 구체적으로, 배지는 구리가 없고, 칼슘이 적고(<0.5 mM), 인슐린(5 µg/ml), 트랜스페린/Fe(5 µg/ml), 고밀도 리포프로테인(lipoprotein) (10 µg/ml), 셀레늄(10^{-10} M), 아연(10^{-12} M), 니코틴아미드(5 µg/ml), 정제된 알부민에 연결된 유리 지방산의 혼합물로 보완된 무혈청 기본 배지(예컨대, RPMI 1640)로 이루어진다. 이러한 배지의 제조의 상세한 방법은, 예컨대 Kubota H, Reid LM, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 2000; 97: 12132- 12137에 공개되었고, 이 내용은 전체가 참조로서 인용된다.

[0041] 이들 조건은 몇주 동안 빠르게 자라고(8주 이상), 매 36-40시간 분배로 추정되는 번식율을 갖는 담도계 줄기 세포의 군집을 수득한다. 도 11-13. 배양물은, 자가-복제가 행해지는 증거인, 8주 이상 동안 줄기/전구체로서 안정하게 유지될 수 있다(도 13). 자가-복제의 이러한 증거는 다분화능 유전자의 발현 레벨을 완화하도록 낮게 발현하는 발견에 의해 더 지지된다. 도 8. 수득된 군집(colonies)의 수는 많은 수의 담관주위선을 갖는 담도계의 부분 및 담관주위선이 없는 담낭으로부터 또는 담도계의 분기상 포인트(branching points) 이외의 부분(sites)으로부터의 중간 물질(intermediate)로부터의 배양물에서 가장 높다.

[0042] 성인 운명으로의 혈통 제한 및 분화(Lineage Restriction and Differentiation to Adult Fates)

담도계 줄기 세포의 다분화능과 일치하여, 군집이 자가-복제 조건 하에서 몇주 동안(예컨대, 배양물에서 한달 이상) 유지된 후, 상기 배지는 특정 성인 세포 타입에 맞춰진 HDM(hormonally defined medium), 무혈청으로 변화되는 경우에, 세포는 고안된 성인 세포 타입으로 부분적으로 분화할 것이다(도 17-19)(Consistent with the multipotency of the Biliary Tree Stem Cells, if a colony is maintained for weeks (e.g., over a month in culture) under self-replication conditions and then the medium changed to a serum-free, hormonally defined medium (HDM) tailored for a specific adult cell type, the cells will partially differentiate towards the designated adult cell type). 간(HDM-L)의 HDM에서, 세포의 20-30%는 사이토케라틴 8 및 18 및 알부민의 발현이 얻어지는 반면에, 담관 세포의 HDM에서(HDM-C), 이들의 반 이상은 세크레틴 수용체 및 CFTR를 발현하는 세포로 성숙된다. 도 17. HDM-L에서 배양물 중 인간 알부민의 발현의 레벨 및 HDM-C에서 세크레틴 수용체의 발현의 레벨은 정량적 RT-PCR을 사용한 분석에서 쿠보타 배지 또는 등가물(자가-복제 조건)보다 현저히 높았다(도 19).

[0044] 췌장 췌도 운명의 세포의 부분적 혈통 제한은, 담도계 줄기 세포가 췌장(HDM-P)의 HDM에 배양되는 경우에 일어난다. 도 18. 분화는 군집의 에지, 세포의 집합이 형성되는 부위 및 인간 C-펩티드, PDX1, 및 인슐린이 발견되는 내부에서 주로 일어난다. 세포의 군집의 반 이상은 인간 인슐린 합성을 나타내는 인간 C-펩티드(도 18h 및 18g)를 생성하는 능력을 얻고, 이러한 C-펩티드 합성은 글루코오스 레벨로 조절될 수 있다(도 18h). 제조된 인간 인슐린의 레벨은 자가-복제 조건 하에 줄기 세포로서 남아있는 것들과 비교하여 HDM-P에서 배양물에서 현저히 높다(도 19).

[0045] 다분화능의 크기는, 세포가 관심 있는 성인 세포의 형태에 맞춰진 특정 세포외 매트릭스 성분을 함유하는 하이드로겔에서 세포를 임베딩하면서, 특정 HDM (HDM-L, HDM-C, HDM-P)로 이루어진 분명한 3-D 분화 조건에 놓이는 경우, 더욱 극적으로 설명된다(도 20). 세포는 특정 성인 세포 타입으로 빠르게 분화된다(예컨대 7-10일)- 타입 IV 콜라겐 및 라미닌을 함유하는 히아루로난의 하이드로겔과의 조합으로 HDM-L에서 간 세포의 코드를 수득하고; 타입 I 콜라겐을 함유하는 히아루로난의 하이드로겔과의 조합으로 담관, 즉 담도계; 또는 타입 IV 콜라겐 및 라미닌을 함유하는 하이드로겔 및 HDM-P인 경우에 췌장 네오이스렛(neoislets) (내분비 췌장)을 분기화한다.

[0046] 또한, 3-D 배양 조건 하에서 분화의 증거는, 간 세포에 맞춰진 조건에 비해 자가-복제 조건(도 21 a 및 b) 하에서 담도계 줄기 세포에서 발견되고, 그 후 투과 전자 현미경에 의해 특징화된다. 간 세포(c-d)에 비해 자가-복제 조건(a-b) 하에서 담도계 줄기 세포의 전자 투과 현미경. 분화 조건 하에서, 크고, 다각의 세포는 제공되고, 세포의 핵은 하나 이상의 핵소체를 나타낸다. 인접한 세포는 잘 정의된 담도 모세 담관(화살표)를 형성한다. 모세 담관은 결속 착재(junctional complexes)에 의해 근접된다(화살표 머리). 미세 융모(microvilli)는 루멘(lumen), (d)에 존재한다. 도 상의 바는 $2\mu\text{m}$ 와 같다.

[0047] 분화 조건이 기능적인 성인 세포를 야기한다는 증거는, 간(B-L), 담도계/담도 세포(B-C), 또는 췌장(B-P)에 비해서 담도계 줄기/전구체(BP)를 수득하는 자가-복제 조건 하에서 배양물으로부터 정량적인 RT-PCR을 포함하는 도 22에서 제공된다. 윗줄은, 줄기/전구체 또는 담도계 또는 췌장 하에서가 아닌, 간의 조건 하에서 배양물 중 전형적인 간 유전자--HNF4, AFP, 알부민, 티로신 아미노트랜스퍼라아제(TAT), 트랜스페린(TF) 및 P450-3A4의 발현의 급격한 증가를 나타낸다. 그와 대조적으로, 췌장의 조건 하에서 플레이트된 것들(두번쩨 줄)은 줄기/전구체 또는 간 또는 담도계가 아닌 췌장(B-P)의 조건 하에서 PDX-1, ISL-1, NGN3, 인슐린, 글루카곤(GCG)의 유전자 발현의 급격한 증가를 보여준다. 담도계 조건 하에서 플레이팅된 것들은 GGT1, AE2, CFTR의 발현의 증가를 설명한다. 자가-복제 하에서 이동된(transferred) 담도계 줄기 세포의 배양은 높은 레벨의 EpCAM을 유지하고, 낮은 레벨의 모든 성인-특정 유전자(adult-specific genes)를 유지한다.

[0048] 다분화능은, 세포가 생체 내에 이식되는 경우에 설명된다(도 23-25). 인간 담도계 줄기 세포는 면역 시스템이

손상된(immunocompromised) 마우스에 이식한 후, 조직이 그래프팅된 성숙한 인간 세포의 존재에 대해 이후에 평가했다. 잠잠한 간(quiescent liver)을 가진 마우스에서 조차, 간 손상이 일어나지 않았고, 세포는 상당한 수의 간 세포(도 23) 및 담관 세포(cholangiocytes)(도 24)에 접목되고(engraft), 성숙(mature)될 수 있다. 또한, 췌장 운명으로 가는 세포가 이식된 마우스는 그들을 당뇨병에 걸리게 하는 약물이 주입되고, 이식된 세포는 당뇨병 상태(diabetic condition)로부터 그들을 치료할 수 있고, 이를 세포는 인간 C-펩티드의 생성의 관점에서 글루코오스 레벨에 반응할 것이 입증되었다(도 25).

[0049] 다중 전구체가 확인되고, 성숙한 간 세포로 분화하는 것이 나타나지만, 본 발명에서 확인되고, 태아, 신생아, 소아 및 성인 조직에 존재하는 담도계 줄기 세포는 제1 줄기 세포(the first stem cell)이고, 성인 조직으로부터 분리될 수 있는 지금까지 확인되고, 성숙한 췌장 세포 타입으로 분화될 수 있는 것으로 입증된 세포 군(cell population)이다. 또한, 이러한 세포는 췌장 췌도 세포로 분화될 수 있는 증명된 능력, 발암 가능성(tumorigenic potential)(ES 세포 또는 췌장으로의 분화에 중요한 유전자에 감염된 세포가 존재하여)의 부족, 및 면역원성(immunogenicity)의 부족 때문에 당뇨병을 위한 임상 프로그램에 즉시 사용될 수 있다는 것이 확인되었다.

[0050] 담도계 줄기 세포는 췌장으로의 자연 전구체(natural precursor)이고, 특정 미세 환경 조건(micro-environmental condition)을 이용함으로써 췌장 운명으로 쉽고 빠르게(배양 시 며칠 내에) 분화할 수 있다. 또한, 임상으로의 이행(transition to the clinic)은, 미세 환경적 조건적 필요가 GMP 형태로 이용 가능하고, 혼존하는 임상적 요법의 일부라는 사실에 의해 가능하다. 적어도 하나의 임상적 어플리케이션은 당뇨병의 치료(도 25), 또는 간부전, 기능 부전(insufficiency), 또는 퇴화(degeneration)(도 23 및 24)의 치료를 위한 췌장 베타와 같은 세포의 완전한 또는 부분적 재분포(repopulation), 치료(rescue), 지원(support), 회복(repair), 대체(replacement) 또는 도입(introduction)에 대해 여기에 기재된 담도계 줄기 세포의 용도이다.

[0051] 담도계 줄기 세포가 임상적 요법 및 치료의 다양한 어플리케이션을 갖는다는 것은 당업자에 있어서 명백하다. 담도계 줄기 세포의 수집은 환자에게 상대적으로 비외과적인 절차 및 상대적으로 해롭지 않을 수 있다. 생체 외에서 이들 담도 줄기 세포를 번식시키기 위한 능력은 임상 프로그램을 위해 충분한 세포를 수득하는 것을 가능하게 한다(예컨대, 106-109 세포). 세포 요법 프로그램에 필요한 줄기 세포의 양은, 세포가 입수되고, 처리되고, 도 13에 나타낸 바와 같이 배양된 후 몇주 내에 쉽게 생성된다.

[0052] 요법에 제공되는 담도계 줄기 세포는 제공한 기증자로부터 준비된 후, 동일한 사람에게 제공하고, 세포와 받는 사람이 바람직하게는 유전적으로 동일하기 때문에, 세포 거부에 관해서 면역학적 문제가 없는 자가 조직의(autologous) 요법을 구성한다. 또한, 요법에 제공되는 담도계 줄기 세포 또는 세포 군은 제공한 기증자로부터 준비된 후, 다른 사람에게 제공하고, 담도계 줄기 세포는 비면역 또는 최소의 면역성이기 때문에, 동종 이게 요법(allogeneic therapy)을 구성한다. 최종적으로, 본 발명에 따른 담도계 줄기 세포는 발암 가능성에 관하여 동물 실험 및 배양물에서 상대적으로 위협이 없다. 최근 모든 생체내 연구에 있어서, 발암 가능성이 증거가 전혀 없다.

[0053] 본 발명의 다른 실시형태에 있어서, 담도계 줄기 세포 또는 세포 군은 타겟 내배엽 세포 및 타겟 내배엽 조직(예컨대, 췌장, 간, 담관)의 생체 외 생산에 사용된다. 따라서, 본 발명은 담도계 줄기 세포 또는 세포 군으로부터 "타겟" 세포 및 조직을 생성하는 방법을 제공 및 포함하고, 이러한 방법은 담도계 줄기 세포의 분리(isolation), 타겟 조직 또는 이러한 조직의 세포로 분화시키는 조건 하에서의 배양(incubation), 및 필요에 따라 환자에게 세포의 도입(introduction)을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 담도계 줄기 세포의 분화에 의해 수득되는, 분화된 조직 세포 또한 본 발명의 대상이다.

[0054] 본 발명에 따른, 특정 성인 운명으로 향하는 담도계 줄기 세포의 부분적 분화에 대해 상기에 나타내고, 도 14-16에 설명한 바와 같이, 영양성분, 호르몬 및 성장 인자의 특정 혼합을 함유하고, 이상적으로는 무혈청이고, 관

심 있는 성인 운명이 되는 세포에 맞춰진 정의된 배지(defined medium)(Hormonally Defined Medium 또는 HDM)라고도 함)을 사용할 수 있다. 췌장 췌도에 비해 간 세포, 담관 세포의 대표적인 HDM은 이하 기재된다. HDM은 바람직한 성인 운명으로 일부의 혈통 제한을 이끌지만, 모든 분화를 이끌지는 못한다. 모든 분화는 생체 내에서 이식 후 일어나거나, 세포가 생체 밖에 있는 경우에, 세포의 매트릭스 성분의 혼합과의 조합으로 특정 HDM의 사용이 더 요구되고, 혼합물의 정밀한 조성물은 바람직한 성인 세포 타입에 특이하고, 세포는 여기에 기재된 바와 같이 3차원 포맷으로 확립되어 있다. 도 17-19.

[0055] 본 발명에 따른 담도계 줄기 세포 또는 세포 군의 생체 내 분화를 위한 어플리케이션의 특히 바람직한 형태는, 담도계 줄기 세포를 그곳에 분화시키기 위해, 담도계 줄기 세포 또는 세포 군을 인체의 한 부분에 그래프팅시킴으로써, 타겟 혈통의 세포와 직접 연결함으로써, 또는 담도계 줄기 세포 또는 세포 군이 타겟 조직에 이르게 하기 위해 담도계 줄기 세포 또는 세포 군의 주입함으로써, 주사(injection), 주입(infusion) 또는 이식(implantation)이다. 주사 또는 주입을 위해, 담도계 줄기 세포는, 호환될 수 있는 배지, 예컨대 우보타 배지(또는 등가물) 또는 HDM 중 하나, 또는 담도계 줄기 세포는 호환될 수 있는 매트릭스 성분으로 이루어진 조건 하에서 그래프트(graft) 또는 임플란트(implant)에 투여될 수 있다.

치료적 어플리케이션(Therapeutic applications)

[0057] 본 발명에 따른, 담도계 줄기 세포 또는 세포 군으로부터 수득될 수 있는 타겟 세포의 치료적 용도를 위해, 본 발명에 의해 포함되는 다양한 컨셉이 이용 가능하다(Science 287; 1442-1446, 2000 참조). 이러한 연결에서 적합한 지시의 예는: 대사 작용의 선천적 이상(inborn error), 간 부전(liver failure), 간 경변(cirrhosis), 췌장 부전증(pancreatic insufficiency), 및 당뇨병이다.

[0058] 본 발명의 담도계 줄기 세포 또는 세포 군은 재구성되고(reconstituted), 재개되거나 복구될 기관으로 직접적으로 도입될 수 있다. 이러한 도입(introduction)은, 세포의 매트릭스 성분과 HDM 또는 다른 타입의 스캐폴드(scaffold)(예컨대, 마이크로캐리어(microcarrier), 폴리락티드(polylactides))의 혼합물에 포함되는 담도계 줄기 세포 또는 세포 군으로 이루어진 그래프트로서(as grafts) 또는 주입으로서(as infusions) 행해질 수 있다. 새로 도입된 세포 또는 세포 군은 존재하는 세포와 함께 자라는 반면에, 스캐폴드는 바람직하게는 생분해성이어서, 이들은 인체로부터 "사라진다(disappear)". 이러한 방법으로, 바람직하게는 자가 조직 이식(autologous transplant)에 의해, 재구성되고, 치료되고, 지지되고, 복구되고, 대체되거나 도입될 수 있는 세포는, 췌도 세포 또는 다른 췌장 세포, 간 세포 또는 다른 간 세포, 및 담관 세포 또는 다른 담도계 세포를 포함한다. 재구성, 치료(rescue), 복구, 지지(support), 대체(replacement) 또는 도입은, 예컨대 부족하거나 불충분한 기관의 기능의 경우에, 트라우마(trauma) 후 복구 또는 사용을 지지하기 위한 기관의 부분적 외과적 절제(resection)가 따를 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 담도계 줄기 세포 또는 세포 군 및 이들로부터 수득되는 타겟 세포는 생체 적합성을 증가시키기 위해, 이식 가능한 물질과 더 결합될 수 있다. 따라서, 담도계 줄기 세포로 코팅되는 경우에, 이식 가능한 물질도 본 발명의 대상이다. 또한, 이식 가능한 물질은 그들로부터 유래되는 담도계 줄기 세포 또는 세포 군 및/또는 타겟 세포를 함유하는, 인공적 및/또는 생물학적 캐리어 또는 지지 물질일 수 있다. 이러한 점에서, 캐리어 물질(carrier material) 또는 지지 물질(support material)은 인체에 삽입 또는 이식을 위한 마이크로캐리어, 지지체, 컨테이너(container), 또는 챔버(chamber)일 수 있다.

[0060] 본 발명의 이러한 실시형태에 있어서, 담도계 줄기 세포 또는 세포 군으로부터 유래된 췌도 세포를 갖는 컨테이너는 생체 내에 인슐린을 공급하기 위한 인공적인 췌도 세포 포트 챔버(artificial islet cell port chamber)로서 사용을 위해 약제학적 구성물(pharmaceutical construct)의 생성에 사용된다. 본 발명의 다른 실시형태에 있어서, 담도계 줄기 세포 또는 세포 군의 주입(infusion) 또는 그래프트(graft)는 생체 내에 췌도 또는 췌도 세포를 재구성, 치료, 복구, 지지, 대체 또는 도입하는데 사용되었다. 유사한 구성물은 본 발명에 따른 담도계 줄기 세포로부터 유래되는 간 세포 또는 담관 세포로 제조될 수 있다.

[0061]

본 발명에 따른 담도계 줄기 세포로부터 수득되는 타겟 세포 또는 세포 군은, 예컨대 타겟 세포 또는 조직에 의해 생체 내에서 일반적으로 생성되는 물질을 제조하거나, 해독 반응(detoxification reaction)을 행하기 위해 생물 반응기(bioreactor)(예컨대, 인체 외부) 내에서 세포 배양으로서 사용될 수 있다. 용도의 이러한 형태는 급성 상태의 경우, 예컨대 생인공 내분비 체장으로서 심각한 당뇨병을 또는 생인공간으로서 급성 간부전의 경우에, 특히 적합하다.

[0062]

마지막으로, 본 발명에 따른 다분화능 담도계 줄기 세포 또는 세포 군은 유전자 이식 변형 및 요법에 널리 채용될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에 따라서, 담도계 줄기 세포, 또는 세포 또는 그것으로부터 분화된 조직은, 하나 이상의 유전자로 세포 감염된다. 이러한 방법으로, 소정의 기관, 예컨대 간 또는 체장의 대사를 유지하기 위해 요구되는 하나 이상의 유전자는 회복되고(restored), 및/또는 지지되고(supported) 또는 재도입된다(reintroduced). 예컨대, 줄기 세포 또는 간 세포는 FAH (fumarylacetoacetate hydrolase) 유전자로 세포 감염될 수 있다. FAH-부족(deficient) 마우스 모델에서, 1000 FAH-포지티브 기증자(donor) 간 세포의 비장내(intrasplicenic) 주입은 간을 완전히 재구성하는데 충분하고, 간경변을 이끄는 대사 결함(metabolic defect)을 충분히 보상한다. Overturf, K., M. Al-Dhalimy, C.-N. Ou, M. Finegold, and M. Grompe. American Journal of Pathology 151 : 1273-1280 (1997). 또한, 담도계 줄기 세포 또는 세포 군은 기증자로부터 준비되고, 소정의 기관, 예컨대 간 또는 체장의 대사를 유지하는데 요구되는 받는 사람의 하나 이상의 유전자에 회복 restore, 지지(support), 또는 도입(introduce)하기 위해, 동종 이계 요법(allogeneic therapy)으로서 다른 사람에 전달될 수 있다.

[0063]

이하 실시예는 본 발명을 설명한 것이지만, 본 발명은 특정 실시예에 한정되는 것을 의미하지 않는다. 당업자는 이러한 실시예에서 본 발명을 시행하기 위한 것임을 발견한다. 또한, 본 실시예는 실험적 편의를 위한 인간이 아닌 콘텍스트(context)에서 제공되지만, 여기에 기재된 방법 및 시약은 이하 기재된 것들로부터 당업자에 의해 인간의 어플리케이션으로 쉽게 바뀔 수 있다.

[0064]

실시예

실시예 I - 세포 제조(Cell preparation)

[0066]

효소에 의한 분리(Enzymatic dissociation)를 콜라겐나제(collagenase(s))와 같은 프로테아제(protease(s)), 및/또는 DNase와 같은 뉴클레아제(nuclease(s))의 존재 하에서 수행될 수 있다. 간 세포의 효소에 의한 분리 방법은 기재되어 있고, 본 분야에서 실행되었다. 예로서, 간 전구체(hepatic progenitors)의 분리 및 확인 방법은, 예를 들어 이의 내용이 참고문헌으로서 본원에 포함되는, USP 제6,069,005호 및 USP 출원(Application) 번호 제09/487,318호; 제10/135,700호; 및 제10/387,547호에 기재되어 있다. 실제로, 다양한 절차(various procedures)는 세포 혼탁액(cell suspensions)의 제조를 위해 존재한다. 따라서, 본 발명의 범위는 전제 조직의 획득 또는 이의 세포 혼탁액의 제조의 특정한 방법에 제한되어 있지 않음을 이해할 수 있다.

실시예 II - 3D 배양 조건(3D culture conditions)

[0068]

교차결합(cross-linked)되지 않았을 때 액체이고, 교차결합되었을 때 겔 상태가 되는 3-차원(3-dimensional, 3-D) 젤은, 히아루로난(hyaluronans) 내로 매트릭스 성분(matrix components), 호르몬, 사이토카인(cytokines), 성장 인자(growth factors), 영양소 및 기본 배지(basal medium)를 혼합함으로써 형성될 수 있다. 이러한 제조의 상세한 사항은, 예를 들어 이의 전체가 본원의 참고문헌으로서 포함된, W. S. Turner, E. Schmelzer, McClelland et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater 82B (1), 156 (2006); and W. S. Turner, C. Seagle, J. A. Galanko et al., Stem Cells 26 (6), 1547 (2008)에서 공개되었다. 배양물을 2 내지 4 주 또는 더 오랫동안 일반적으로 유지시킨 다음에, 조직학(histology), 종말점(endpoint) 및 양적인 RT-PCR과 같은 유전자 발현 분석(gene expression assays), 면역 형광법(immunofluorescence) 및 웨스턴 블로트(Western blots)과 같은 단백질 발현 검정, 및 메타볼로믹 풋프린팅(metabolomic footprinting)에 의해 분석되었다.

[0069] 겔 복합체(gel complexes)의 주요한 성분은 화학적으로-변형된 히아루로난(chemically-modified hyaluronans)의 형태이다. 카르빌란-S(또는 CMHA-S)는 교차결합을 위해 다수의 티올(multiple thiols)과 변형된 카르복시메틸화된 히아루로난 유도체(carboxymethylated hyaluronan derivative)이다. 모든 물질은 적어도 Glycosan Biosciences(미국 유타주 솔트레이트 시티)로부터 상업적으로 입수하였다.

[0070] 간단히, 하나의 실시형태에서, 히아루로난-매트릭스는, 2.0 % 용액(무게/부피)을 수득하기 위해 쿠보타(Kubota's) 배지에서 건조 시약(dry reagent)으로서 히아루로난을 용해시킴으로써 제조되었다. 라미닌(Laminin)(미국 미주리주 세인트루이스에 위치한 Sigma)을 1.5 mg/ml의 농도로 첨가하고, 6 mg/ml의 농도로 타입 IV 콜라겐을 첨가하였다. 공기에서의 산소에 대한 노출과 함께 실온에서 수 시간 내에 또는 만약 교차-결합시약, 예를 들어 PEGDA[폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(polyethylene glycol diacrylate)]에 노출시킨다면 수 분 내에 교차-결합이 발생한다. 그래서, 만약 교차-결합을 원하지 않는다면, 용액을 4 °C로 차게 유지시키고, 산소 및/또는 PEGDA 와의 접촉을 피해야 한다.

[0071] 실험이 완료되었을 때, 히알루로니다아제(hyaluronidase)(1 mg/ml), DNase (0.5 mg/ml) 및 쿠보타(Kubota's) 배지[트랜스페린(transferrin) 없이]에서 제조된 디티오프레이톨(dithiothreitol)(40 mgs/ml)의 혼합으로 첫 번째로, 그 다음에 하이드로겔을 소화시킨 다음에 인슐린 및 트랜스페린 없이 쿠보타(Kubota's) 배지에서 제조된 리버라아제(Liberase)(0.5 mg/ml)의 혼합으로 하이드로겔(hydrogels)로 소화시킴으로써 세포를 되찾을 수 있다(recovered). 이러한 방식으로 수득한 세포는 유동 세포 계수법(flow cytometry), RT-PCR 또는 면역형광염색법(immunohistochemistry)에 의한 특성화(characterization)에 적절하다.

실시예 III - 다능성의 증거(Evidence of multipotency)

[0073] 자가-복제 조건(self-replication conditions)[배양 플라스틱 또는 히아루로난과 결합하여, 쿠보타(Kubota's) 배지 또는 등가물(equivalent)] 하에서 담도계 줄기 세포(Biliary Tree Stem Cells) 또는 세포 군(cell populations)를 7 내지 30 일 또는 보다 길게 배양한 후에, 잔여 세포(즉, 담도계 줄기 세포)의 단층 배양(monolayer cultures)은 분화 배지(differentiation medium)로 옮기고, 여기에서, 줄기 세포는 48 시간 내에 유전자 발현에 있어서의 빠른 형태 변화 및 변화를 겪는다. 모든 분화 배지는 자가-복제(즉, 쿠보타(Kubota's) 배지 또는 등가물)에 사용된 배지에 대한 변형물(modifications)로 이루어져 있어서, 상기 호르몬으로 나타낸 배지(hormonally defined medium)는 자가-복제 배지에서의 성분 뿐만 아니라 칼슘(≥ 0.5 mM), 구리, bFGF 와 함께 보충물(supplementation)을 포함할 것이다; 이는 "변형된 배지(modified medium)"로서 언급되었다. 특정한 성인 세포 타입(specific adult cell type)을 획득하기 위해서, 하기를 필요로 한다:

[0074] 간 : 간 운명(liver fate)에 대한 혈통 제한(lineage restriction)(예를 들어, 간세포)은, 글루카곤, 갈락토스, 트리이오도티록신(triiodothyroxine), 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF) 및 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor, HGF)로 추가적으로 보충된 "변형된 배지"와 함께, 타입 IV 콜라겐 및 라미닌으로 혼합된 내의 히아루로난의 하이드로겔 내로 단도계 줄기 세포를 끼워 넣음으로써(by embedding) 성취될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 성분의 양은 하기와 같다: MKM은 7 μ g/L 글루카곤, 2g/L 갈락토스, 10^{-9} M 트리이오도티록신 3, 10 ng/ml EGF 및 20 ng/ml HGF로 보충되었다.

[0075] 췌장 조직(Pancreatic tissue) : 췌장 운명(pancreatic fates)에 대한 혈통 제한[즉, 췌도(islets)]은, 히드로코르티손(hydrocortisone)을 제거하고, B27, 아스코르브산(ascorbic acid), 시클로파민(cyclopamine), 레티노산(Retinoic acid) 및 엑센딘 4(exendin 4)를 포함하도록 추가적으로 변화시킨 "변형된 배지"와 함께, 타입 IV 콜라겐 및 라미닌을 포함하는 히아루로난의 하이드로겔(hydrogel) 내로 단도계 줄기 세포를 끼워 넣음으로써 성취될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 성분의 양은 하기와 같다: MKM은 히드로코르티손을 제거하도록 변형시켰고, 2 % B27, 0.1 mM 아스코르브산, 0.25 μ M 시클로파민(cyclopamine), 0.5 μ M 레티노산 및 50 ng/ml 엑센

딘 4 를 포함한다.

[0076] 담도계/담관 세포(Biliary Tree/Cholangiocytes): 유사하게, 담도계 줄기 세포는, 혈관 내피세포 성장 인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 165 및 HGF로 추가적으로 보충된 "변형된 배지"에서 타입 I 콜라겐과 혼합된 히아루로난 새로 줄기 세포를 끼워넣음으로써 담도 운명(biliary fates)(즉, 담관 세포)으로 혈통이 제한될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 성분의 양은 하기와 같다: MKM 은 20 ng/ml 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF) 165 및 10 ng/ml HGF로 추가적으로 보충되었다.

[0077]

실시예 IV - 이식(Transplantation)

[0079]

프로토콜 이식을 통해(via grafting protocols) 단단한 장기(solid organs)로부터의 세포의 이식은, 수송(delivery)의 어느 하나의 방식이 실현 가능할지라도, 많은 어플리케이션(applications)을 위한 주사(injection) 또는 주입(infusion) 상에서 선호된다. 본원에 기재된 하이드로겔 배양(hydrogel cultures)이 이식을 위한 좋은 조건을 제공하는 것으로 발견되었다. 세포는, 증식(expansion) 및/또는 분화(differentiation)를 위해 조정된(tailored) 교차결합되지 않은 히아루로난(un-crosslinked hyaluronans)에 혼탁될 수 있고, 호르몬, 성장 인자 및 그 밖의 수용성 신호(soluble signals) 뿐만 아니라 기본 배지를 포함하는 배지에 그 밖의 매트릭스 성분과 혼합된다.

[0080]

이식에 사용된 세포 군(cell populations)은, 이들의 천연의 간엽성 파트너(their native mesenchymal partners)[예를 들어, 혈관모세포(angioblasts), 쿠퍼성 상세포(stellate cells)]와 함께(또는 없이) 이식되고, 이식을 위한 타겟 조직[또는 그 밖의 소스(other source)]으로부터 유도된, 바람직하게 담도계 줄기 세포 또는 세포 군을 생체 내에서 발견된 것과 유사한 비율로 포함한다. 이론에 얹매임 없이, 줄기 세포 및 파트너 간엽세포(the partner mesenchymal cells)의 이러한 조합(combination)은, 혈관을 발달시키고(vascularized), 생리학적으로 작용할 수 있는, 조직의 완전한 성숙(full maturation)을 위한 적절한 미세환경(microenvironment)을 제공하는 것으로 알려져있다.

[0081]

하나의 실시형태에서, 췌장의 그래프트(pancreatic grafts), 이식(implants) 또는 주사(injection)에 대해서, 이식의 세포의 성분은 생체 내 조직에서 발견되는 이러한 세포 군의 측정된 비율로 인간 태아 또는 신생아 조직-유도된 혈관모세포(human fetal or neonatal tissue-derived angioblasts)(VEGFR+, CD117+ 세포) 및 쿠퍼 세포(stellate cells)(CD146+ 세포)와 함께 이식(graft) 새로 공동-시드된(co-seeded) 담도계 줄기 세포 또는 세포 군으로 구성될 수 있다. 상기 줄기 세포 군은 본원에 기재된 바와 같은 배양물에서의 확장된 세포(expanding cells)로부터 획득할 수 있다. 혈관모세포(angioblast) 및 쿠퍼 세포는 인간 태아 또는 신생아 췌장 조직(pancreas tissue)의 것 제조된 세포 혼탁액(freshly prepared cell suspensions)으로부터 자가적으로 활성화된 세포 세포 선별(magnetically activated cell sorting, MACS) 시스템 또는 유량 혈구계산의 선별(flow cytometric sorts)로 면역학적으로 선택(immunoselected)할 수 있다.

[0082]

모든 담도계 줄기 세포 군은 줄기/간세포(stem/progenitors)(예를 들어, CD 133, CD44H, EpCAM, NCAM)에 공통된 세포 표면 마커(cell surface marker)에 대한 양성 세포에 대해서 면역학적으로 선택될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 세포는, FITC-접합된 일차 항체(FITC-conjugated primary antibodies)와 함께 0.5 % 소혈청알부민(bovine serum albumin) 및 2 mM EDTA 를 포함하는 500 μl 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에서의 50 x 10⁶ 전체 세포에 대해서 50 μl의 농도로 20 분 동안 4 °C 로 배양하였다. 표지된(labeled) 세포는 항-FITC 항체를 사용한 마그네틱 비드(magnetic bead)와 반응시킨 다음에 Midi- 또는 MiniMACS 컬럼(columns) 및 분리 장치(separation units)에 의해 선별되었다. 모든 배양 및 선택 단계는 세포의 응집을 예방하기 위해 10% ACCUTASE(미국 캘리포니아 샌디에고에 위치한 Innovative Cell Technologies)의 첨가와 함께 얼음에서 실행해야한다. 선택적으로, 세포는 유세포 분석기(flow cytometer)를 사용하여 면역학적으로 선택된 플루오로프로브-표지된 항체(fluoroprobe-labeled antibody) 및 세포로 표지될 수 있다.

[0083] 실시예 V - 배지(Media)

[0084] 모든 배지는 멸균-여과되었고(sterile-filtered)(0.22- μm 필터), 사용되기 전에 4 °C로 어둠 속에서 보관하였다. 쿠보타(Kubota's) 배지(KM)는, 구리가 없고(no copper), 칼슘이 적고(low calcium)(<0.5 mM), 10⁻⁹ M 셀레늄(selenium), 4.5 mM 니코틴아미드, 0.1 nM 황산아연, 10⁻⁸ M 히드로코르티손, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 트랜스페린/Fe, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린, 혈청 알부민(serum albumin)(0.1 %)에 결합되어 추가된 유리 지방산의 혼합물 및, 선택적으로 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 고밀도 지질단백질과 함께 어떠한 기본 배지(예를 들어, RPMI 1640)로 구성되어 있다.

[0085] 실시예 VI - 분화 조건(Differentiation conditions)

[0086] 삼차원의 배양물은, 히아루로난, 그 밖의 매트릭스 분자, 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 배지에서 제조된 모든 것을 포함하는 하이드로겔로 확립되었다(established). 모든 하이드로겔은, 0.6 mM의 농도, 10⁻¹² M 구리, 및 10 μm 의 염기성 섬유모세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)를 획득하기 위해, 칼슘으로 보충된 변형된 쿠보타(Kubota's) 배지(또는 등가물)(변형된 KM 또는 MKM으로서 언급)를 사용하여 제조되었다:

[0087] 간 세포: 7 $\mu\text{g}/\text{L}$ 글루카곤, 2g/L 갈락토스, 10⁻⁹ M 트리-이오도티록신 3(tri-iodothyroxine 3), 10 ng/ml 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF) 및 20 ng/ml 간세포 성장 인자/hepatocyte growth factor, HGF)를 갖는 MKM-L. 매트릭스 스캐폴드(matrix scaffold)는 60 % 타입 IV 콜라겐 및 라미닌 및 40 % 히아루로난으로 이루어져 있다.

[0088] 담도계/담관 세포: 20 ng/ml의 혈관내피 세포 성장 인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 165 및 10 ng/ml HGF로 보충된 MKM-C. 매트릭스 스캐폴드는 60 % 타입 I 콜라겐 및 40 % 히아루로난으로 구성되어 있다.

[0089] 췌장, 췌도(islets): 2 % B27, 0.1 mM 아스코르브산, 0.25 μM 시클로파민, 0.5 μM RA 및 50 ng/ml의 엑센딘-4(exendin-4)으로 추가적으로 보충된 MKM-P(히드로코르티손 없이). 매트릭스 스캐폴드는 60 % 타입 IV 콜라겐 및 라미닌 및 40 % 히아루로난으로 이루어져 있다.

[0090] 실시예 VII-세포 분리 및 표현형(Cell isolation and phenotyping)

[0091] 인간 담도 조직(Human biliary tissues)은 이식을 위해 획득된 간 및 췌장으로부터 획득된 다음에, 환자 내로 이식에 대해서 거부반응을 보였다(rejected). 인간 담도 조직의 세포 혼탁액은, 0.1 % 소혈청 알부민, 1 nM 셀레늄 및 항생제(antibiotics)로 보충된 RPMI 1640을 사용하여 처리되었다. 효소 처리된 완충용액은 15-20 분 동안 빠른 교반(frequent agitation)으로 32 °C에서 300 U/ml 타입 IV 콜라겐나제 및 0.3 mg/ml의 디옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease)를 포함한다. 농축된 혼탁액(Enriched suspensions)을 75 게이지 메시(gauge mesh)를 통해 압력을 가하고, 재현탁시키기 전에 5 분 동안 1200 RPM에서 회전시켰다. 트립판 블루 배제(trypsin blue exclusion)에 의해 측정된 세포 생존력(cell viability)은 일반적으로 95 % 보다 높았다.

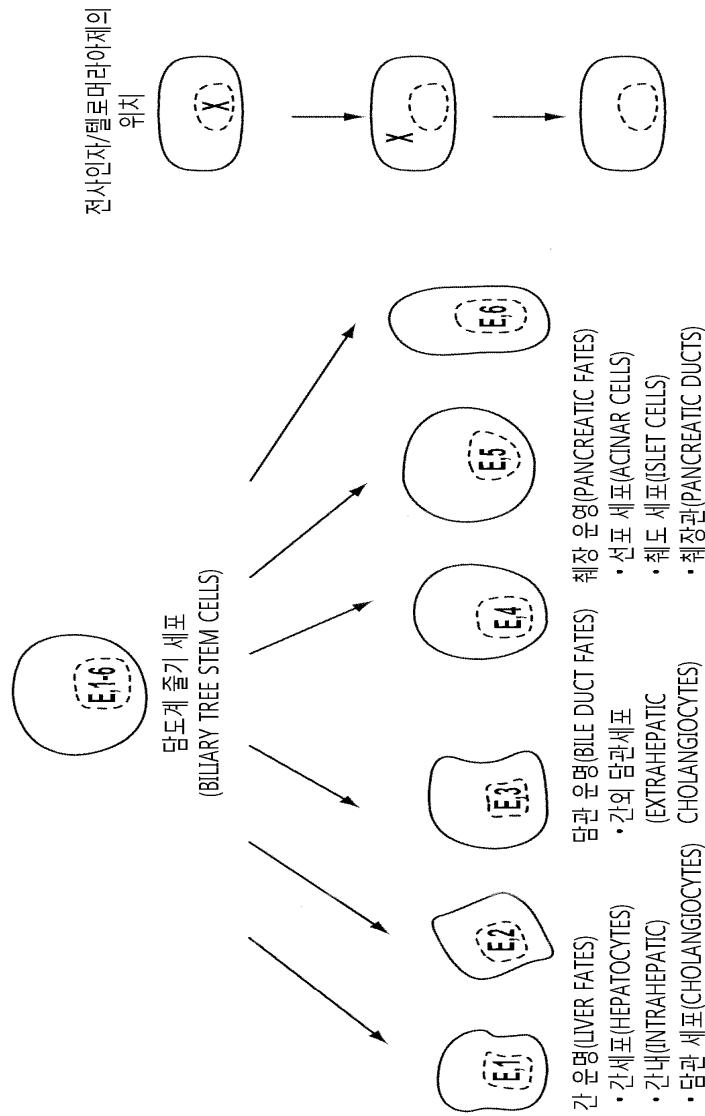
[0092] 대략 3×10^5 세포는 10 cm 조직 배양 디쉬 및 매 3 일마다(every 3 days) 교체된 무혈청 쿠보타(Kubota's) 배지에 플레이팅했다(plated). 군집(Colonesies)이 5 내지 7 일 내에 형성되었고, 3 달까지 관찰되었다. 군집은 도립현미경(inverted microscope)을 사용하여 연속적인 시간(varying times)에 사람 손으로 선택하였다(picked by hand).

- [0093] 다분화능(Multipotent) 담도계 줄기 세포는, 제조업자의 지시에 따라 Miltenyi Biotech MACS 시스템(독일 베르기슈 글라드바흐에 위치)으로 마그네틱 비드 면역선택 기술(magnetic bead immunoselection technologies)을 사용하여, 줄기/간세포(stem/progenitors)(CD133, CD44H, NCAM, EpCAM- CD326)에 공통된 하나 또는 그 이상의 세포 표면 마커(cell surface marker)의 양성 발현(positive expression)에 기초한 것 제조된 세포 혼탁액으로부터 면역선택(immunoselection)에 의해 또한 분리되었다. 간단하게, 분리된 세포는 4 °C에서 30 분 동안 마그네틱 마이크로비드(magnetic microbeads)에 결합된 EpCAM 항체와 함께 배양하였고(incubated), 제조업자의 추천 절차에 따라 Miltenyi로부터 마그네틱 컬럼 분리 시스템(magnetic column separation system)을 사용하여 분리되었다. 배지를 매일 교체하였고, 수집된 배지를 추가적인 분석을 위해 -20 °C에 저장하였다.
- [0094] 형광 염색(fluorescent staining)을 위해, 세포를 실온에서 20 분 동안 4 % 파라포름알데히드(PFA)로 고정시키고, HBSS로 씻어 냈고(rinsed), 2 시간 동안 HBSS에서 10 % > 염소 혈청(goat serum)으로 차단시키고(blocked), 씻어 냈다. 고정된 세포는 밤새 4 °C에서 일차 항체로 배양하였고, 세척하고, 표지된 아이소타입-특이적인 2차 항체(labeled isotype-specific secondary antibodies)로 1 시간 동안 배양시키고, 세척하고, 세포 핵(cell nuclei)의 시각화(visualization)를 위한 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)로 대비염색하였다(counterstained).
- [0095] 면역형광염색법(immunohistochemistry)에 대해, 조직은 밤새 4 % 파라포름알데히드(PFA)에서 고정시키고, 70 % 에탄올에서 저장하고, 그 다음에 파라핀(paraffin)에 끼워 넣었고(embedded), 5 μm 박편(section)으로 잘랐다. 박편을 탈파라핀화하고(deparaffinized), 항원을 회수하였다. 내생의 페록시다아제(Endogenous peroxidases)는 0.3% H₂O₂ 용액에서 30 분 동안 배양에 의해 차단하였다. 10 % 말 혈청(horse serum)으로 차단시킨 후에, 일차 항체를 밤새 4 °C에 두었다; 이차 항체 및 ABC 염색(staining)을 RTU Vectastain 키트(미국 캘리포니아 벌링게임에 위치한 Vector Laboratories)를 사용하여 실행하였다. Vector Nova RED는 기질로서 사용되었다. 박편은 건조시키고(dehydrate), 고정시키고, Eukitt Mounting 배지(미국 웜실베니아 하트필드에 위치한 Electron Microscopy Sciences)에 끼워 넣었고(embedded), 도립 현미경을 사용하여 분석하였다.
- [0096] 양적인 역전사 중합효소 연쇄 반응(quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)에 대해, 배양물로부터의 담도계 조직 또는 세포를 용해시키고, 전체 RNA는 제조업자의 지시에 따라 RNeasy Plus Mini Kit(미국 캘리포니아 벌렌시아에 위치한 Qiagen GmbH)를 사용하여 추출하였다. 역전사(Reverse transcription)를, RT-PCR을 위한 Superscript First-Strand Synthesis System(미국 캘리포니아 칼즈 배드에 위치한 Invitrogen)으로 실행하였다. HotStarTaq Master Mix Kit(Qiagen)를 PCR에 대해 사용하였다.
- [0097] 세포를 분석하였고, 이중의 Coherent I-90 레이저가 갖추어진 FACStar Plus 세포분별장치(BD Biosciences)에 의해 분류하였다. 형광-복합된 항체(Fluorescence-conjugated antibodies)를 488 nm로 여기시키고(excited), 이의 형광 방출(fluorescence emission)을 표준 필터에 의해 검출하였다.
- [0098] 본 발명은 이의 특정한 실시형태와 관련되어 기재하면서, 이는 추가적으로 변형될 수 있고, 이러한 적용은 세포로부터의 정확한 반응(precise responses)을 끌어내도록 정확한 농도의 매트릭스 성분 또는 성장인자 또는 호르몬에서의 변화(variation)와 같은 하기의 발명의 어떠한 변화, 사용 또는 수정(alteration)을 포함하려는 의도임을 이해할 수 있을 것이다. 일반적으로, 본 발명의 원리 및 본 발명에 존재하는 것에 대해 본 분야 내에서 알려지거나 또는 통상적인 실행(practice) 내에 이르게 되는 본 발명의 내용으로부터 이러한 벗어남(departures)을 포함하는 내용은, 상기에 나타내고 하기의 첨부된 청구항의 범위 내에서 필수적인 특징에 적용될 수 있다.
- [0099] 약어 : AE2, 음이온교환체 2(anion exchanger 2); AFP, α-태아단백(fetoprotein); ALB, 알부민(albumin); ASMA, 알파-평활근 액틴(alpha-smooth muscle actin); ASBT, 정점의 나트륨-의존 담즙산 운반체(Apical

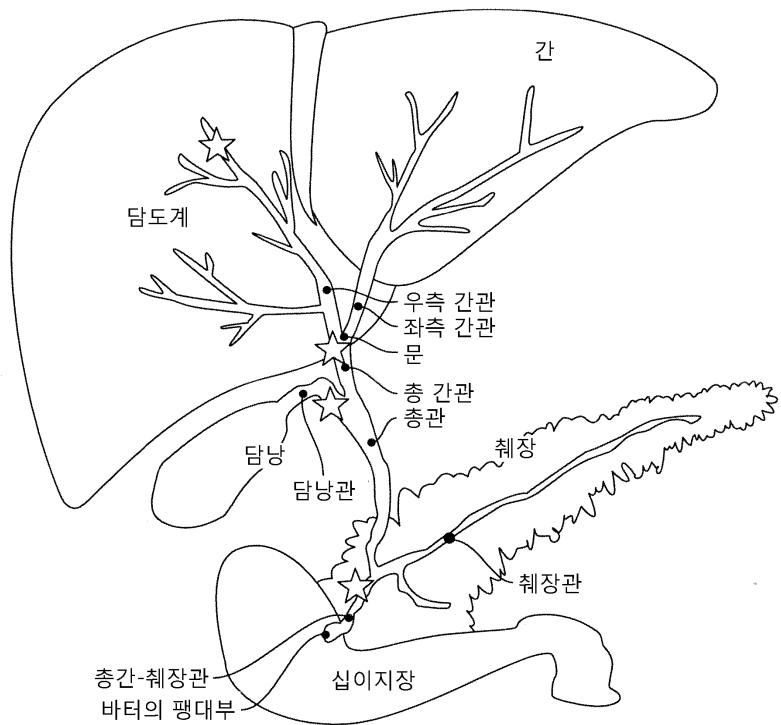
sodium-dependent bile acid transporter); **bFGF**, 염기성 섬유모세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor); **CD**, 공통의 결정요인(common determinant); **CD133**, 프로미닌(prominin); **CD146**, Mel-CAM; **CD31**, PECAM; **CD44H**, 히아루로난 수용체(hyaluronan receptor); **CD45**, 일반적인 백혈구 항원(common leucocyte antigen); **CFTR**, 낭포성 섬유증 막투과 전도성 조절인자(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); **CK**, 사이토케라틴(cytokeratin); **CXCR4**, CXC-케모타인 수용체 4(CXC-chemokine receptor 4); **CYP450**, 사이토크롬(Cytochrome) P450; **EGF**, 표피 성장 인자(epidermal growth factor); **EpCAM**, 상피 세포 부착 분자(epithelial cell adhesion molecule); **FOXa2**, 포크머리 상자 a2(forkhead box a2); **GGT**, 감마 글루타밀 트랜스펩ти다제(gamma glutamyl transpeptidase); **HDM**, 호르몬 한정 배지(hormonally defined medium), 특정한 세포 타입에 대해 맞춘 하나(one tailored for a specific cell type); **HDM-L**, 간에 대한 호르몬 한정 배지; **HDM-C**, 담관 세포(담도계)에 대한 호르몬 한정 배지; **HDM-P**, 췌장에 대한 호르몬 한정 배지; **HGF**, 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor); **HNF**, 간세포 핵인자(hepatocyte nuclear factor); **KM**, 쿠보타(Kubota's) 배지, 줄기/간세포에 대해 제작된 무혈청 배지(serum-free medium); **NCAM**, 신경 세포 부착 분자(neural cell adhesion molecule); **NGN3**, 뉴로제닌 3(neurogenin 3); **PDX1**, 췌장 및 십이지장의 호미오박스 1(Pancreatic and duodenal homeobox 1); **PROX1**, 프로스페로 호미오박스 단백질 1(Prospero homeobox protein 1); **SALL4**, Sal-유사 단백질 4(Sal-like protein 4); **SOX**, Sry-관련된 HMG 박스(Sry-related HMG box); **SR**, 세크레틴 수용체(secretin receptor); **VEGF**, 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor).

도면

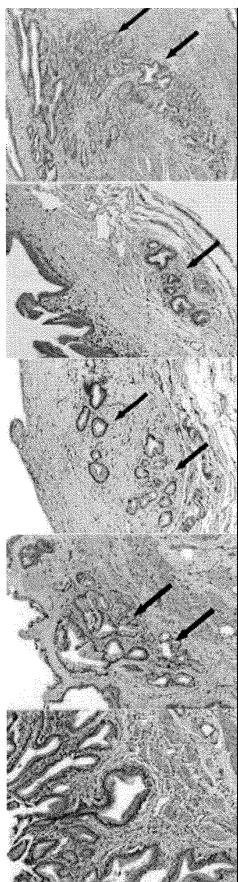
도면1



도면2

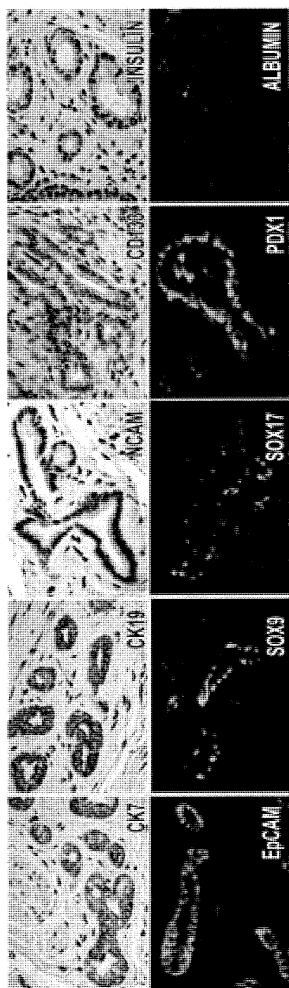


도면3a

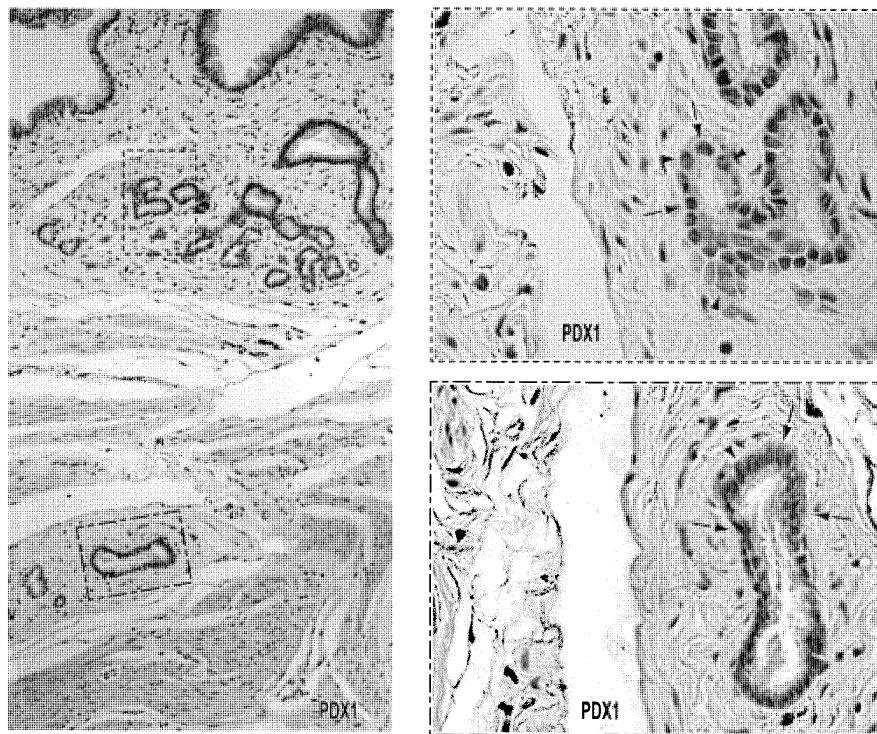


간외 담도계 (N=5)	담낭	담낭관	간문(총간관)	담관	간-췌장 펑대부
PBGS로 점유된 표면	/	3.22±0.87 (0.39)	3.68±0.79 (0.35)	1.29±0.37 (0.16)*	7.47±2.20 (0.98)*
PBGS/필드의 평균수	/	8.15±2.03 (0.91)	10.25±2.27 (1.01)	4.37±1.15 (0.51)*	27.83±3.16 (1.41)*
PBGS의 평균 둘레	/	115.07±9.11 (4.07)	106.44±19.79 (8.85)	101.01±10.44 (4.67)	130.95±14.22 (6.36)*

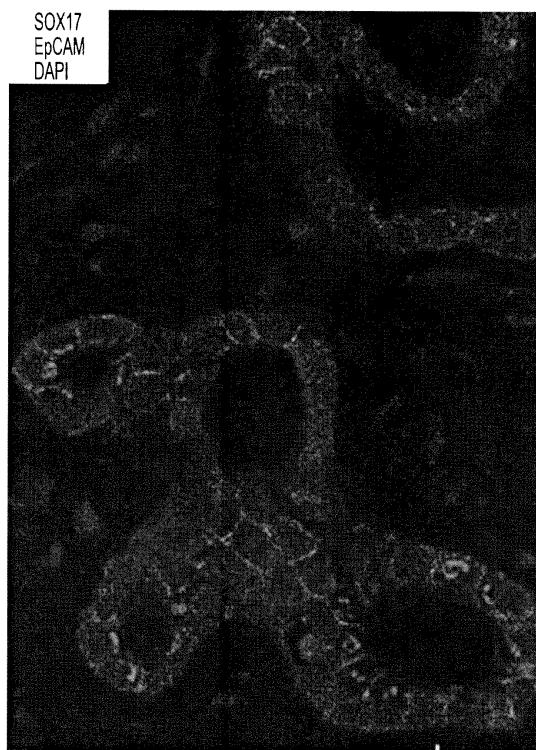
도면3b



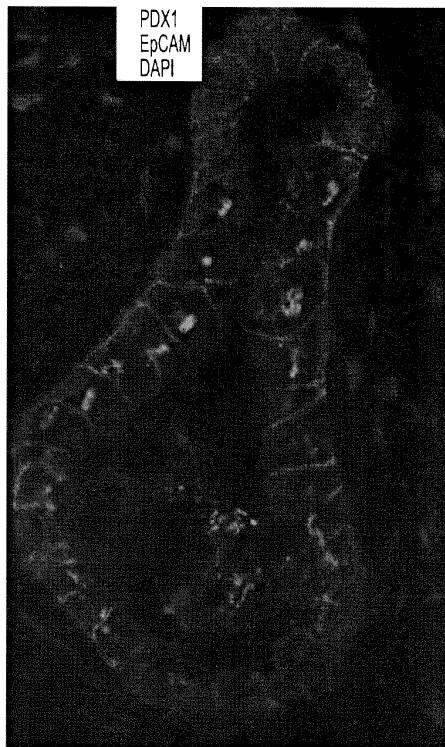
도면4



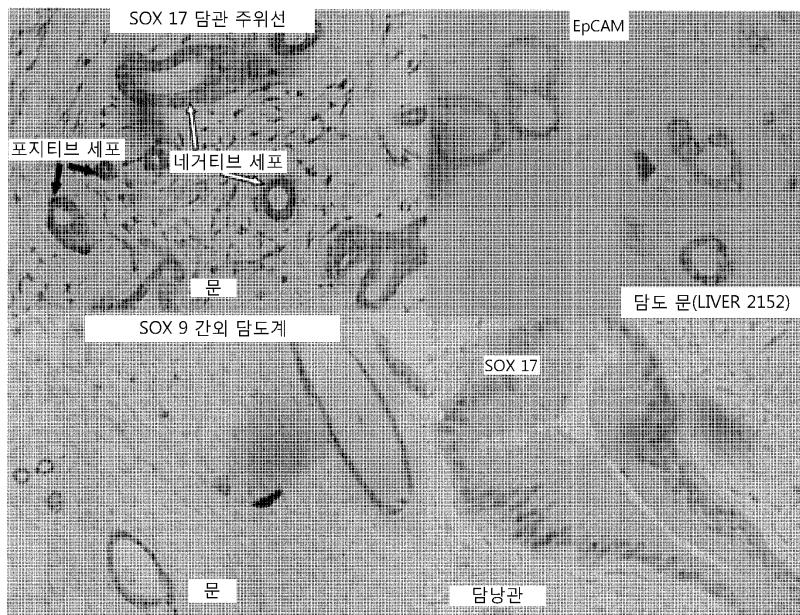
도면5a



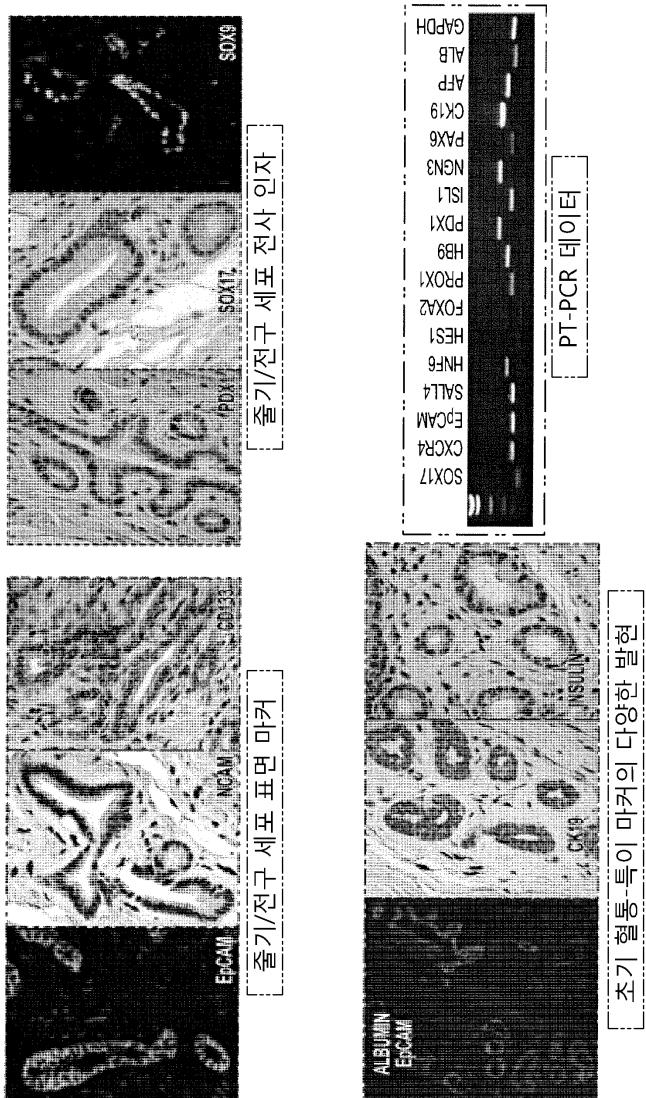
도면5b



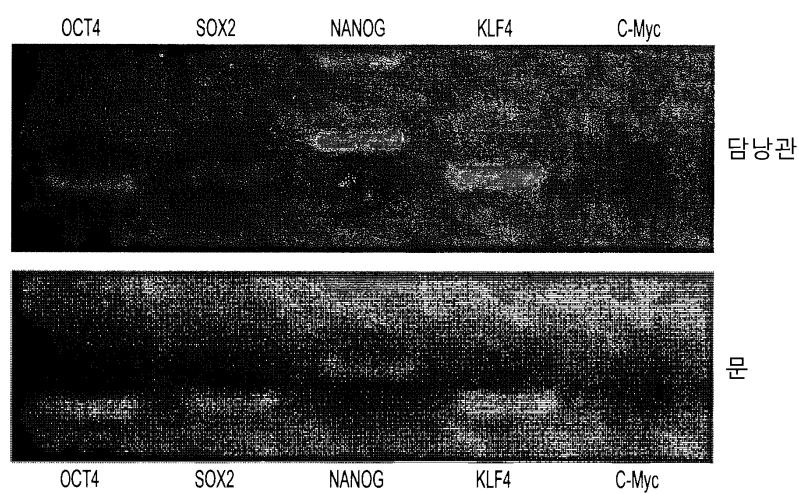
도면6



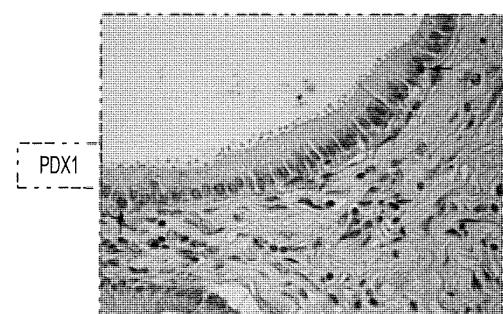
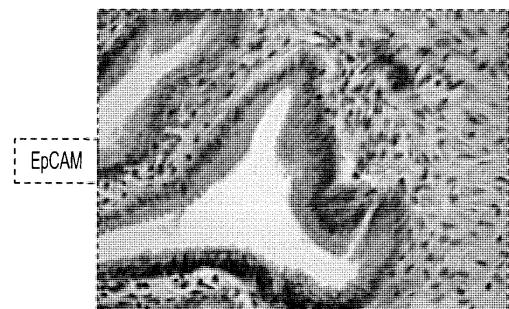
도면7



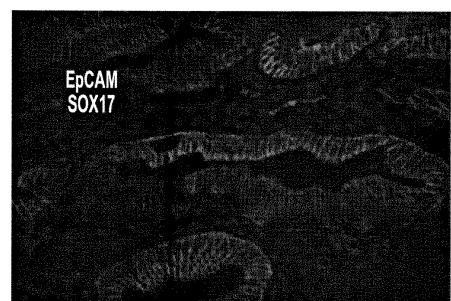
도면8



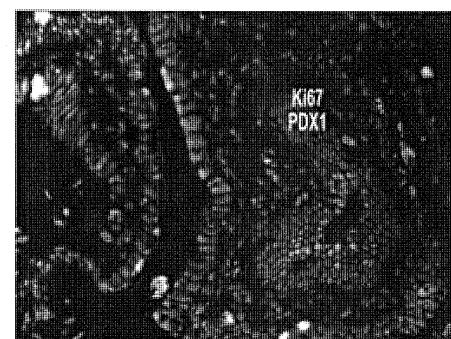
도면9



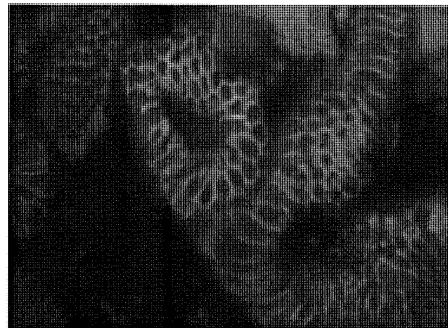
도면10a



도면10b



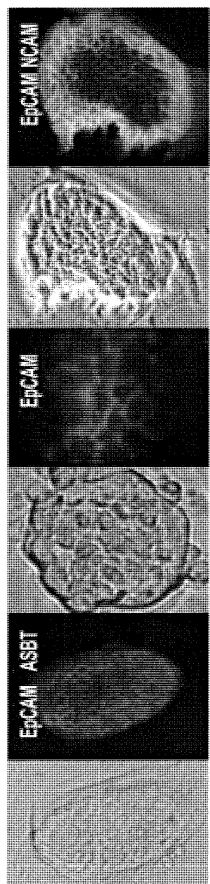
도면10c



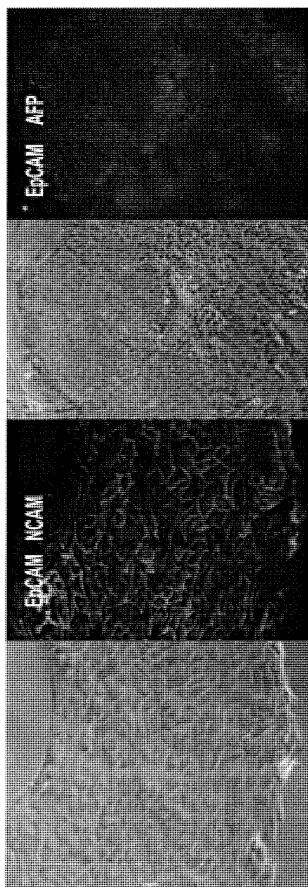
도면10d



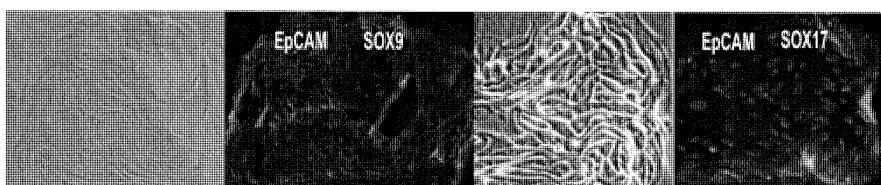
도면11a



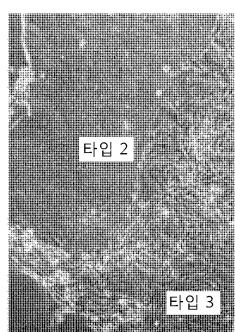
도면11b



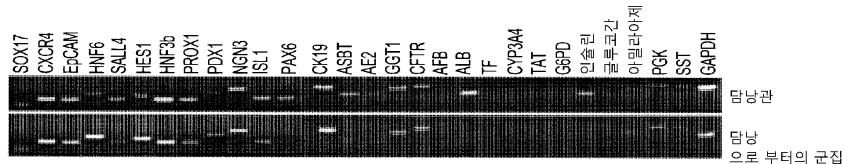
도면11c



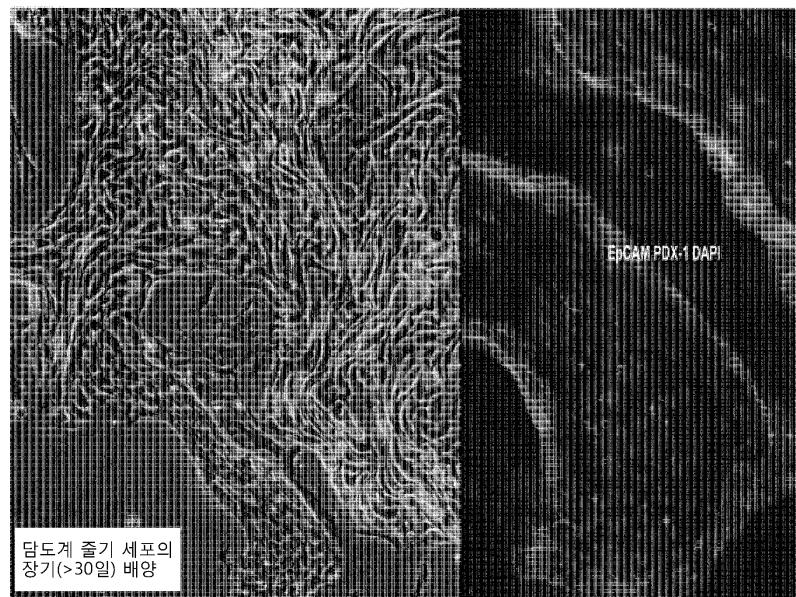
도면11d



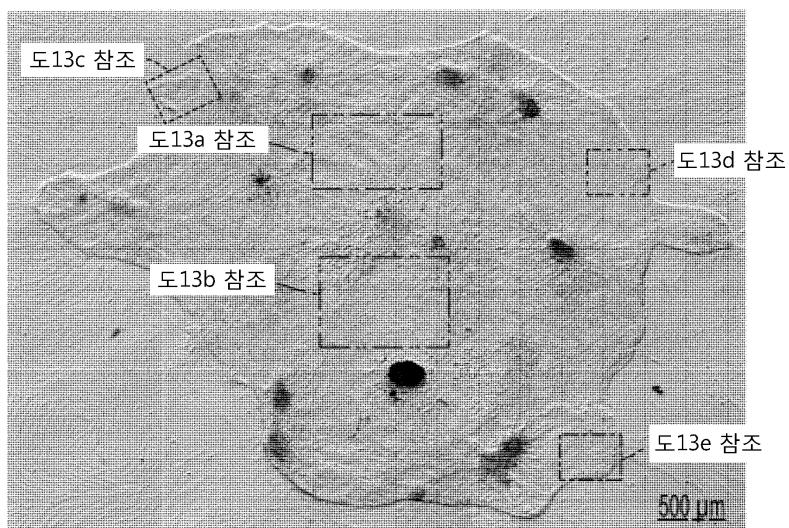
도면11e



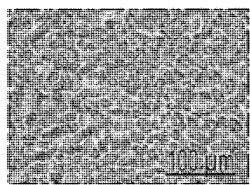
도면12



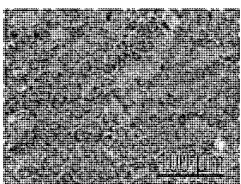
도면13



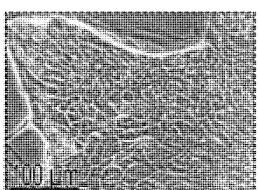
도면13a



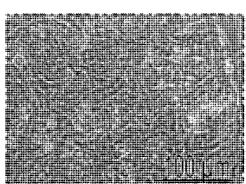
도면13b



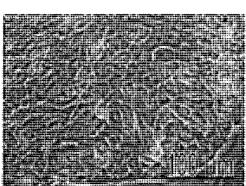
도면13c



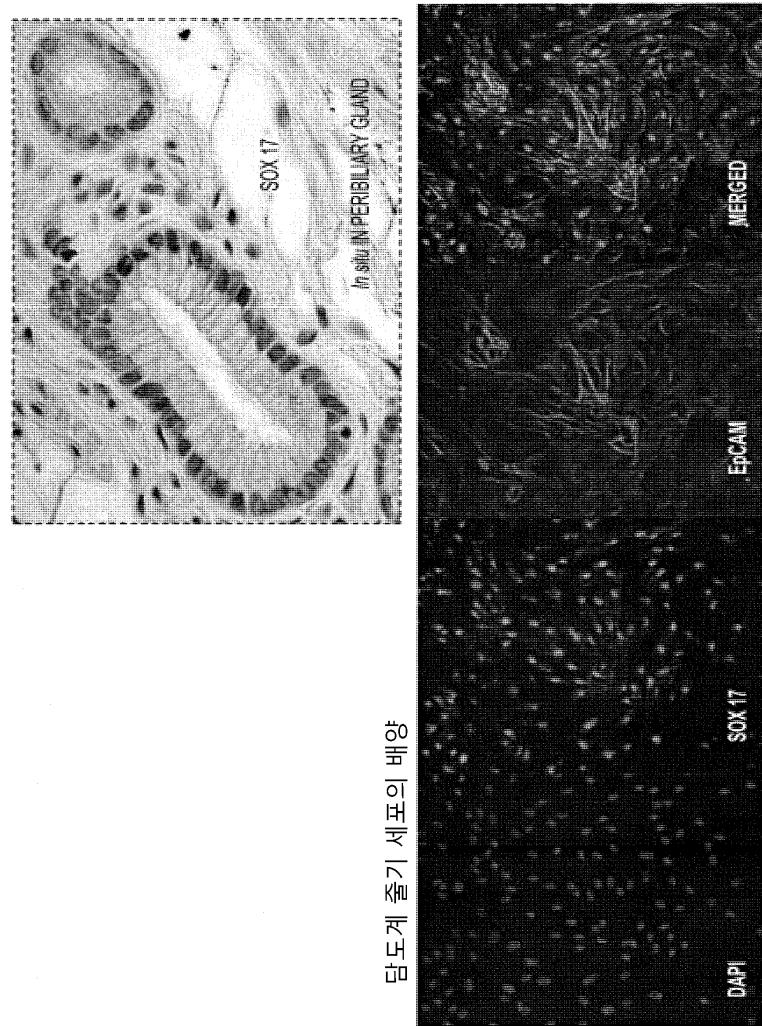
도면13d



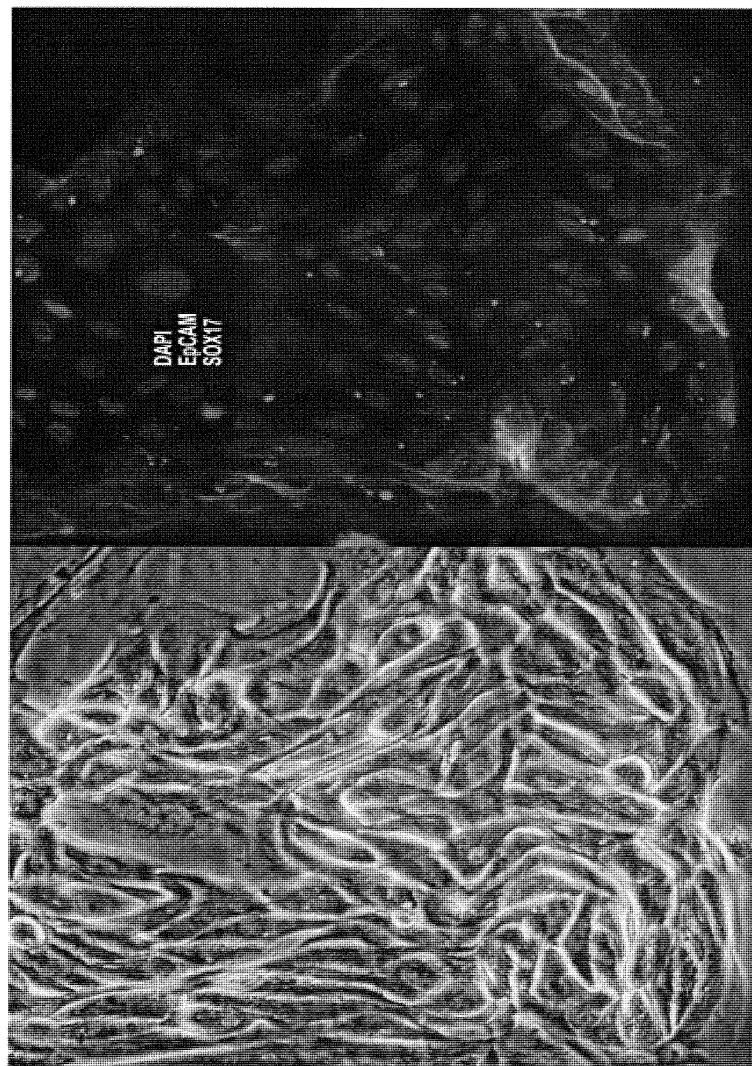
도면13e



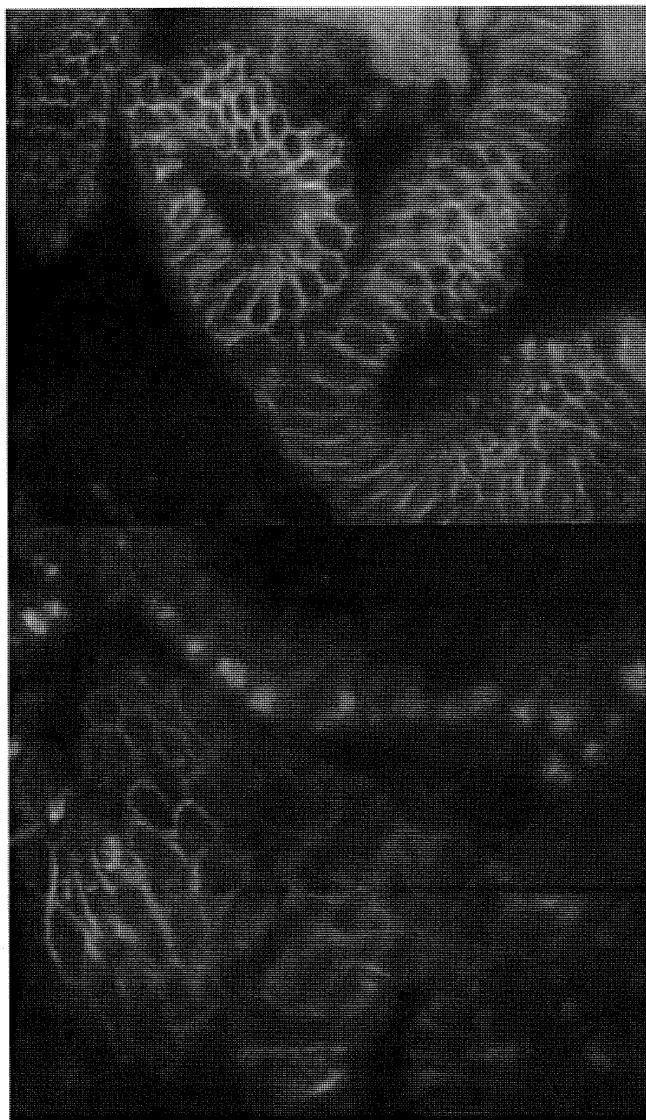
도면14



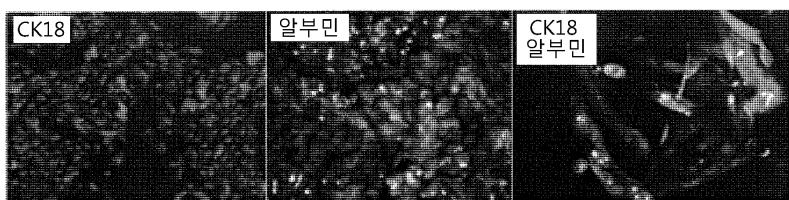
도면15



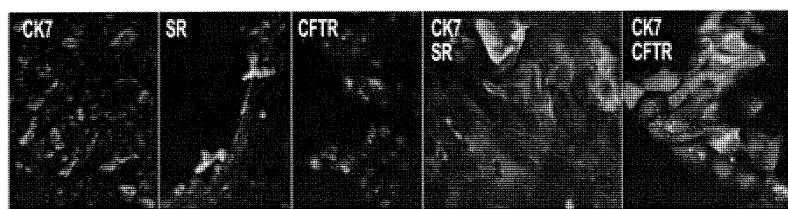
도면16



도면17a



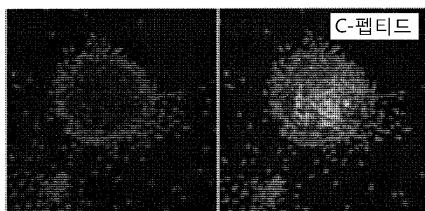
도면17b



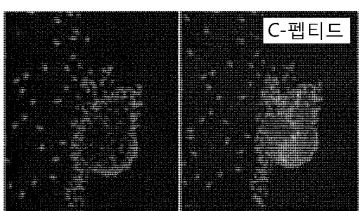
도면17c

통제 조건	스코어링 : 담관 세포 또는 간 세포의 반-정량적 데이터 추정	
	SR+/CFTR+세포	ALB+/CK18+세포
줄기 세포 대조군	0.2±0.4	0
HDM 대조군	3±0.7*	2.2±0.8*

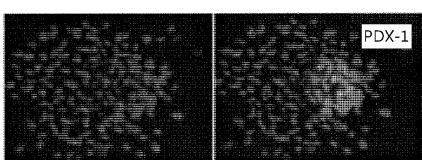
도면18a



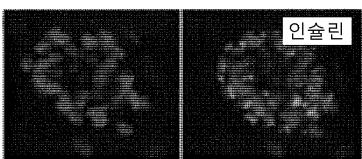
도면18b



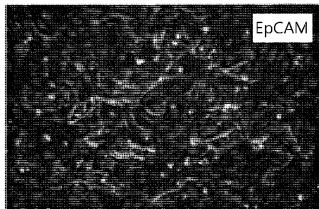
도면18c



도면18d



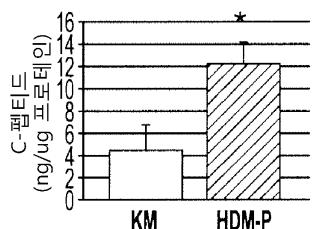
도면18e



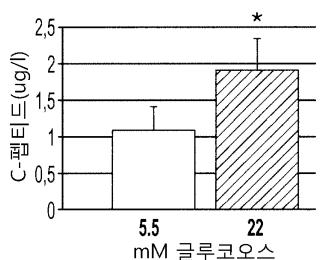
도면18f

췌도와 같은 구조(c-pep+)	
줄기 세포 대조군	1±0.7
HDM-P 대조군	3.8±1.3*

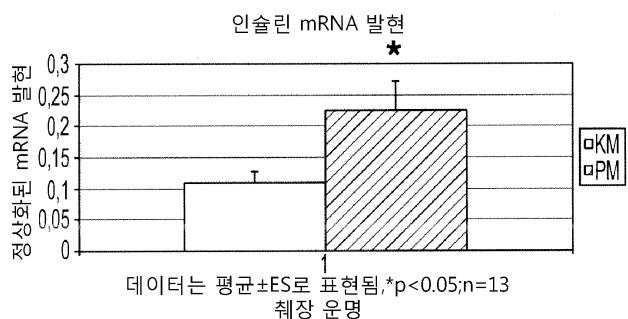
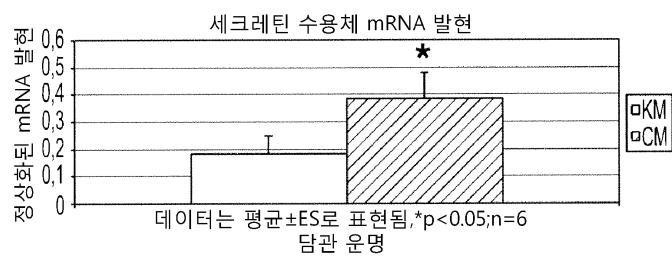
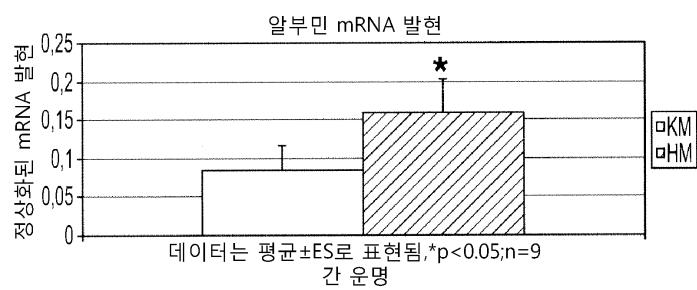
도면18g



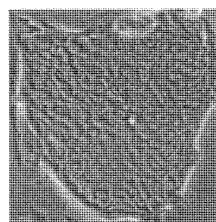
도면18h



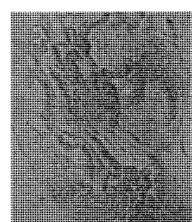
도면19



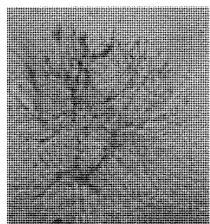
도면20a



도면20b



도면20c



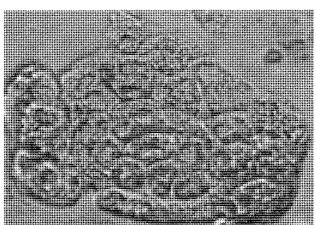
도면20d



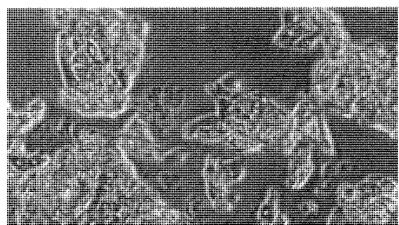
도면20e



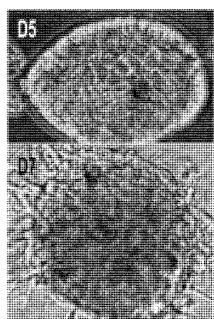
도면20f



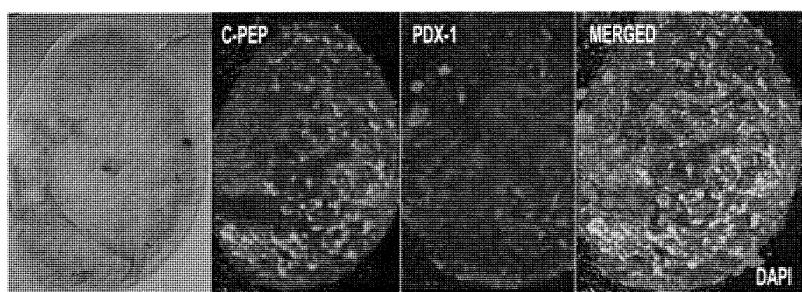
도면20g



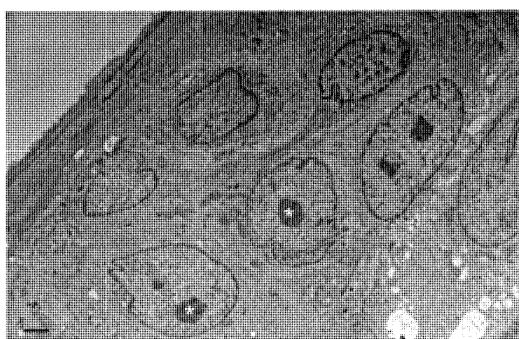
도면20h



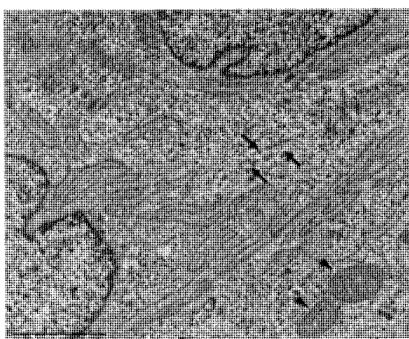
도면20i



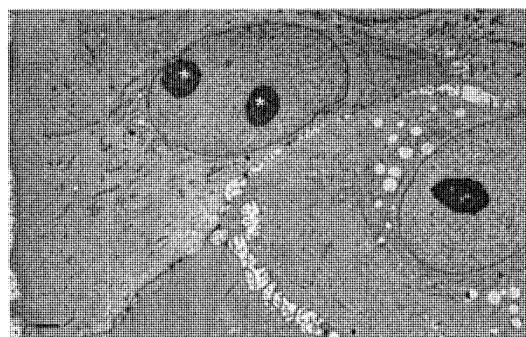
도면21a



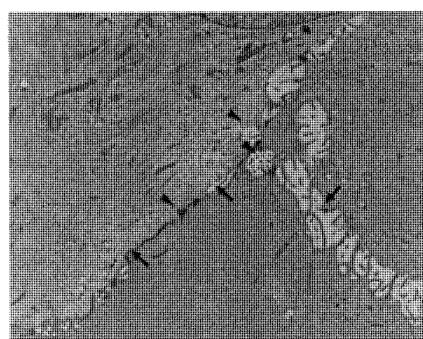
도면21b



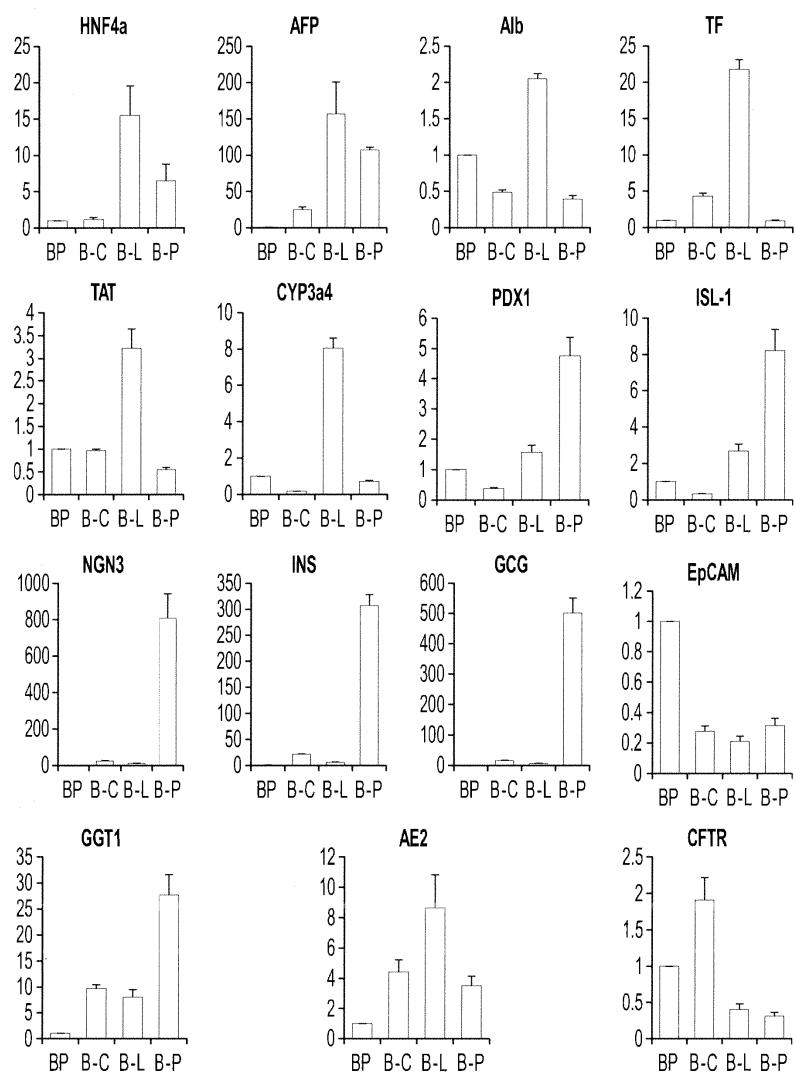
도면21c



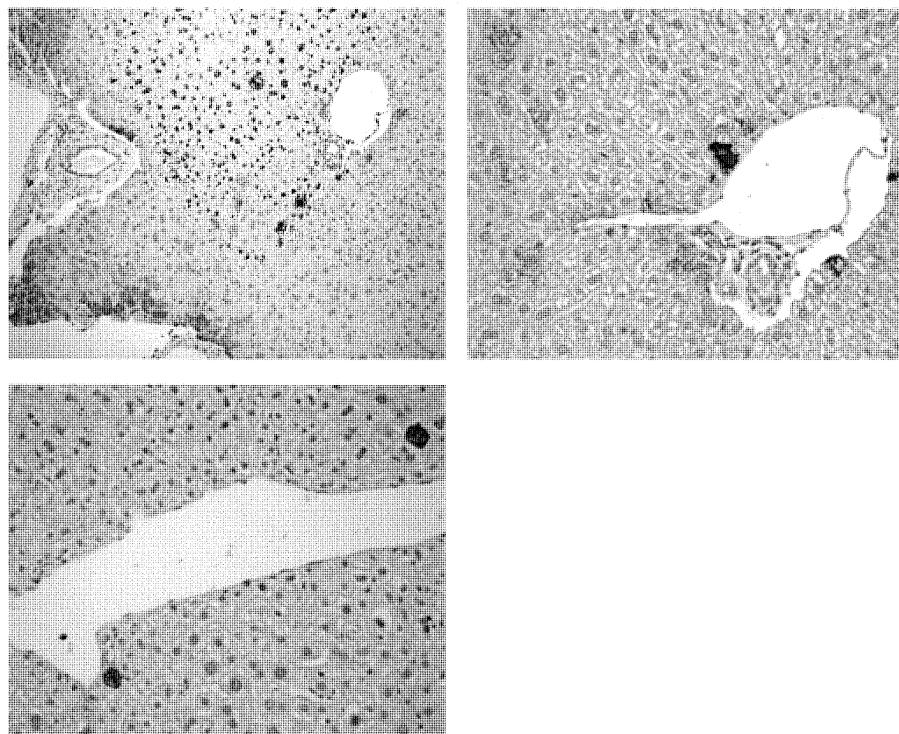
도면21d



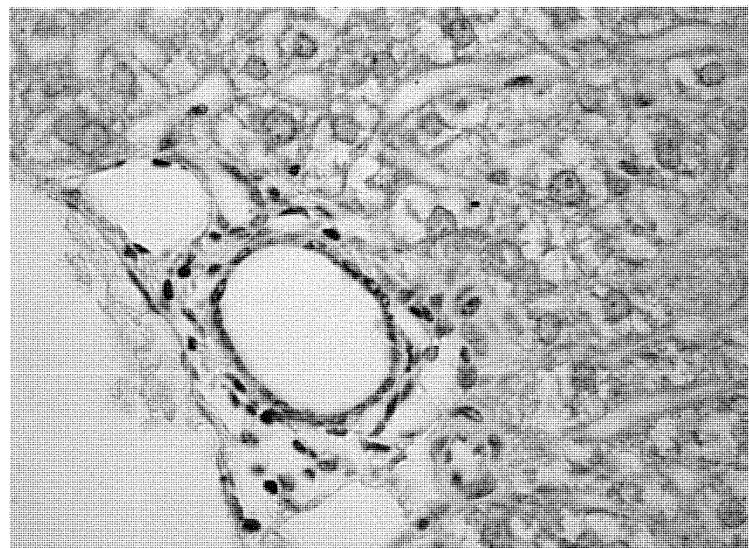
도면22



도면23



도면24



도면25

