



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월31일

(11) 등록번호 10-2095483

(24) 등록일자 2020년03월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/407* (2015.01)
A61P 1/16 (2006.01) *C07K 14/475* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/067 (2013.01)
A61K 35/407 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0132571
- (22) 출원일자 2018년10월31일
 심사청구일자 2018년10월31일
- (56) 선행기술조사문헌
 Differentiation, vol.98, pp.25~34(2017)*
 Stem Cell Reports, vol.10, pp.1522~1536(May 8, 2018)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
 김정범
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 서홍대
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (74) 대리인
 리앤목특허법인

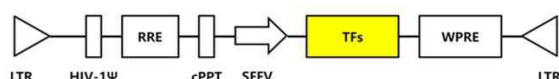
전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 체세포로부터 간 비실질세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이의 이용방법

(57) 요약

본 발명은 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 담관세포, 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제 및 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 이용하면 직접교차분화 유도인자 발현을 통해 역분화줄기세포의 전분화능 (Pluripotency) 단계를 거치지 않고 체세포로부터 담관세포로 효율적으로 분화를 유도할 수 있어, 이를 이용하면 간 질환 또는 담관질환에 대한 효과적인 예방 및 치료가 가능하다. 또한 본 발명의 방법으로 유도된 담관세포는 담관세포 본래의 분비기능이 나타나는 바, 약물의 기능을 검증할 수 있는 약물 스크리닝에 적합한 자원으로 사용될 수 있어 약물 제조분야에서 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)
C07K 14/475 (2013.01)
G01N 33/5067 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711070356
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오.의료기술개발
 연구과제명 유전자 비삽입형 in vivo 리프로그래밍 기술 기반 난치성 간질환 치료 원천기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2018.02.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064929
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오.의료기술개발
 연구과제명 조직 재건용 바이오잉크 기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질, HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, 및 HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질; 또는

OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질, HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질;

을 포함하는, 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포 (fibroblast), 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포(astrocyte) 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 포함하는 것인, 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus)벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus)벡터, RSV(Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adenoassociatedvirus) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 벡터인 것을 특징으로 하는, 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 6

청구항 1의 조성물을 *in vitro*상에서 체세포에 도입하는 단계를 포함하는, 체세포를 *in vitro*상에서 담관세포로 직접교차분화하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 조성물은 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 포함하는 것인, 체세포를 *in vitro*상에서 담관세포로 직접교차분화하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 담관세포, 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제 및 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기존의 배아줄기세포 및 역분화줄기세포를 이용한 담관세포 분화방법은 배아를 파괴하여 배아줄기세포를 확립하거나 체세포에서 역분화줄기세포의 단계로 역분화 과정(Reprogramming)하고 다시 담관세포로 분화단계(Differentiation)를 거쳐야 세포를 제작할 수 있었다. 아울러 종래의 방법은 배아줄기세포를 이용한다는 점에서 윤리적 문제가 발생할 수 있으며, 또한 역분화줄기세포를 이용할 경우 분화를 수행하는 단계에 있어서 시간적, 금전적 비용과 노력이 소요되나 수율(efficiency)이 낮고, 인위적인 분화능의 조절이 용이하지 않아 비효율적인 방법인 문제가 있었다. 또한 시험관수준에서 약물대사와 독성 검증에 요구되는 충분한 수의 세포를 확보하기 어렵고, 담관세포 기능 재생을 위한 세포치료를 적용단계에서 미분화세포로부터 유래한 기형종(teratoma)이 형성될 가능성이 높아 상기 세포를 사용하는데 안전성의 문제가 있었다.

[0004] 기존의 약물스크리닝에 사용되는 다양한 세포 자원들은 각각 문제점과 한계가 존재한다. 예를 들어 마우스 유래 일차성 담관세포는 사람에서 유래한 세포가 아닌바, 약물의 효과를 정확히 검증하기 어려웠으며, 또한 사람에서 유래한 일차성 담관세포는 확보가 제한적이며 시험관 환경에서 증식(proliferation)이 어렵고 세포 본래의 기능을 유지하기 어려운 한계점이 존재하였다. 특히 간암세포에서 유래한 HepG2와 HepaRG 의 경우 증식은 가능하지만 담관세포로서의 분화능이 없거나 매우 낮으며 약물의 기능을 검증하기에 부적절한 수준의 약물대사기능을 갖는 세포로 약물스크리닝에 부적절하다. 따라서, 약물 스크리닝에 적합한 세포 자원을 확보하여야 할 필요성이 존재하였다.

[0005] 이와 같은 흐름에 따라, 인체 내 다수 존재하는 체세포에서 담관세포로 직접교차분화하는 기술 개발의 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 체세포에서 담관세포로 직접교차분화 방법에 관한 연구를 수행하던 중 특정 조합의 전사인자를 체세포에 이소성 발현을 유도하면 효과적으로 체세포를 담관세포로 유도할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물, 상기 조성

물을 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 담관세포, 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제 및 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질을 포함하는 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 체세포로부터 담관세포로의 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 포함하는, 체세포를 담관세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질을 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 담관세포를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 직접교차분화 유도된 담관세포를 유효성분으로 포함하는 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 직접교차분화 유도된 담관세포를 유효성분으로 포함하는 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 제1 세포 시료에 후보 물질을 접촉시키는 단계; 상기 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 측정하는 단계; 상기 후보 물질을 접촉시킨 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준과 비교하는 단계; 및 상기 후보 물질을 접촉시킨 제1 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준이 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 후보 약물로 결정하는 단계를 포함하고, 상기 제1 세포 시료 및 제2 세포 시료는 각각 독립적으로 직접교차분화 유도된 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 조성물을 이용하면 직접교차분화 유도인자 발현을 통해 역분화줄기세포의 전분화능 (Pluripotency) 단계를 거치지 않고 체세포로부터 담관세포로 효율적으로 분화를 유도할 수 있어, 이를 이용하면 간 질환 또는 담관질환에 대한 효과적인 예방 및 치료가 가능하다. 또한 본 발명의 방법으로 유도된 담관세포는 담관세포 본래의 분비기능이 나타나는 바, 약물의 기능을 검증할 수 있는 약물 스크리닝에 적합한 자원으로 사용될 수 있어 약물 제조분야에서 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 담관세포 제작에 이용한 바이러스 전달 시스템 (viral delivery system)을 나타낸 도이다.
- 도 2는 담관세포 유도 과정을 모식화하여 나타낸 결과(도 2A) 및 담관세포 유도 과정 중 0, 5, 20 일 후, 3차원 배양하여 5일이 경과한 경우의 유도된 담관세포의 조직학적 형태를 나타낸 결과(도 2B)에 관한 것이다.
- 도 3은 유도된 담관세포에 대한 RT-PCR의 결과(도 3A) 및 면역 형광 염색을 수행한 결과(도 3B)를 나타낸 도이다.
- 도 4는 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)를 C57BL/6J 마우스의 식이에 포함시켜 제조한 담관성 섬유증증(biliary fibrosis) 마우스 질병 모델과 정상 마우스를 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 담관성 섬유증증 마우스 모델에 PBS 또는 직접교차분화 유도된 담관세포를 투여한 경우에 나타나는 간 또는 담관 질환 치료 효과를 확인한 도이다.
- 도 6은 담관성 섬유증증 마우스 모델에 PBS 또는 직접교차분화 유도된 담관세포를 투여한 경우 나타나는 간 또는 담관 질환 치료 효과를 Sirius red staining 결과를 통해 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질을 포함하는 체세포로부터 담관세포(Cholangiocytes)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0021] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명에서 사용하는 '직접교차 분화(Direct Conversion)'는 고등생물에서 전혀 다른 세포타입을 가지는 성숙한(분화가 끝난) 세포간의 전환을 유도하는 과정을 말한다(Kim, J. et al, Neurobiol. 22, 778-784, 2012). 이는 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)로 리프로그래밍 하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 만들어야 하는 종래 기술과 달리, 유도만능줄기세포단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 차이를 가지며, 현재 직접교차분화는 질병모델링과 신약 개발 등에 이용될 가능성을 인정받고 있어 유전자 치료 및 재생의학 등에도 응용될 수 있는 기술로 알려져 있다.
- [0024] 본 발명의 명세서에서 제공되는 직접교차분화 유도용 조성물은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 본 발명에서는 구체적인 일실시예로 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질을 포함한 조성물로 담관세포로의 직접교차분화를 확인하였다. 또한 본 발명에서는 구체적인 일실시예로 OCT4, HNF1 β 및 HNF6을 포함하는 조성물에 HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 또는 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질을 더 포함시키고, 상기 조성물에 의한 체세포로부터 담관세포로의 직접교차분화를 확인하였다.
- [0025] 본 발명의 직접교차분화 유도용 조성물에 포함된 단백질은 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터에 의하여 제공될 수 있으며, 이에 본 발명의 직접교차분화 유도용 조성물은 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질은 이의 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공될 수 있다. 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질은 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 모든 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용 가능한 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질은 이들의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질의 변이체 (예컨대, 각 단백질의 아형(subtype)들)를 포함할 수 있다.
- [0027] OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질의 변이체란 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질의 천연 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치

환 또는 이들의 조합에 의하여 천연 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지면서 천연(wild-type) 단백질의 고유의 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있고, 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0028] 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 분리되거나, 재조합적 또는 합성적으로 제조된(non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[0029] 또한, 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 염기서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA (mRNA) 분자일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예로, 본 발명에서 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 발현하는 벡터에 삽입된 상태로 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명에서 "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 전달체를 의미할 수 있다.

[0032] 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

[0033] 또한 본 발명의 조성물은 담관세포를 직접교차 분화 유도할 수 있는 전사인자를 벡터를 통하여 도입할 수 있는데, 본 발명에서 사용할 수 있는 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus)벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus)벡터, RSV(Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adenoassociatedvirus) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 구체적인 일실시예에서는 렌티바이러스를 통한 OCT4, HNF1 β , HNF6 및 HNF4 α 조합 또는 OCT4, HNF1

β , HNF6, HNF4 α 및 HHX 조합의 직접교차분화인자를 체세포의 대표예로서 선택된 섬유아세포에 도입하고 상기 인자를 이소성 발현시켜 섬유아세포를 담관세포로 직접교차분화 시켰다. 또한 상기 유도된 담관세포에 Reverse transcription PCR을 수행하여 직접교차분화 인자를 도입하기 전의 섬유아세포와는 다른 담관세포 마커가 유도된 담관세포에 나타내는 것을 확인하였다.

[0035] 본 발명에서 용어 "체세포"는, 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미하는 것일 수 있으며, 예컨대, 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 것 또는 분리된 것일 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 체세포를 담관세포로 직접교차 분화 유도할 수 있는데, 상기 체세포는 섬유아세포 (fibroblast), 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포(astrocyte) 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다만, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 체세포를 섬유아세포로 사용하였다.

[0036] 본 발명에서 용어 "담관세포 (Cholangiocytes)"는 담관 (bile duct) 상피세포 (epithelial cells)를 말한다. 건강한 간에서, 담관세포는 담즙의 분비하는 기능을 한다. 또한, 본 발명에서 "담관세포"는 유도된 담관세포를 말하고, 예를 들어, 본 발명의 방법에 따른 직접교차분화를 통하여 체세포로부터 유도된 담관세포 또는 상기의 유도된 간 줄기세포로부터 분화된 담관세포를 의미할 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 체세포로부터 담관세포로의 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 포함하는, 체세포를 담관세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

[0039] 상기 방법은 체세포를 간 줄기세포로 직접교차분화 유도하는 방법을 이용하여 생성한 간 줄기세포를 간세포 또는 담관세포로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구체예에서는 상기 직접교차분화 방법은 체세포를 배지에서 배양하는 단계, 상기 배양한 체세포에 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 삽입한 벡터의 특정조합을 형질감염 (transfection) 시키는 단계, 및 상기 감염된 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0041] 상기 체세포의 배양에 사용되는 배지는 당해 분야에서 체세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 프로타민 설페이트(protamine sulphate)를 함유하는 배지를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 또한, 상기 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건은 당해 분야에서 체세포에 대하여 직접교차분화를 유도하는 데 통상적으로 사용되는 배지 및/또는 통상적인 배양 조건을 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 10% FBS(Gibco, 10099-141)가 보충된 DMEM(Gibco, 10313-021), L-글루타민(Gibco, 25030-081), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, 15140-122), 10ng/ml Epidermal growth factor(Peprotech, 315-09-1000), 10mM 니코틴아미드(Sigma-Aldrich, N3376-100G), 및 20ng/ml Hepatocyte Growth Factor (Peprotech, 100-39-100) 로 이루어진 조성물 1; 및 10% FBS(Gibco, 10099-141)가 보충된 media E(Gibco, A12176-01), L-글루타민(Gibco, 25030-081), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, 15140-122), 50ng/ml Epidermal growth factor (Peprotech, 315-09-1000), 10mM 니코틴아미드(Sigma-Aldrich, N3376-100G), 20ng/ml Hepatocyte Growth Factor (Peprotech, 100-39-100), 50ng/ml Fibroblast growth factor 10(Peprotech, 100-26-100) 및 50ng/ml Vascular endothelial growth factor (Peprotech, 100-20-100)로 구성되는 조성물 2;를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 본 발명의 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 통하여, OCT4 등의 직접교차분화인자들의 이소성 발현 (Ectopic expression)을 유도할 수 있다. 이소성 발현이란, 어떤 유전자가 원래 발현하는 조직이나 세포 외에서 발현하는 것, 또는 원래 발현하는 시기와 다른 시기에 발현하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 따르면 체세포로부터 담관세포가 효과적으로 제조될 수 있다.

[0045] 또한 본 발명은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질을 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 담관세포를 제공한다.

- [0046] 본 발명에서 개시된 방법 및 조성물에 의하여 유도된 담관세포는 본래 세포 유래의 마커를 발현하지 않으면서 오로지 담관세포에서 발현되는 마커가 나타나는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서는 직접교차분화 유도된 담관세포를 수득하기 위하여 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 및 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 포함하는 조성물을 활용하여 직접교차분화를 유도할 수 있다. 본 발명에서는 구체적인 일실시예로 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, HNF1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 단백질 및 HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) 단백질을 포함한 조성물로 담관세포로의 직접교차분화를 확인하였다. 또한 본 발명에서는 구체적인 일실시예로 OCT4, HNF1 β 및 HNF6을 포함하는 조성물에 HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) 단백질 또는 HHEX(Hematopoietically-expressed homeobox protein) 단백질을 더 포함시키고, 상기 조성물에 의한 체세포로부터 담관세포로의 직접교차분화를 확인하였다. 또한 상기 조성물에 포함된 단백질은 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터에 의하여 제공될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 담관세포는 통상의 담관세포가 나타내는 분비기능을 나타내는 바, 약물의 기능을 검증할 수 있는 약물 스크리닝에 효과적으로 사용할 수 있는 특징을 가진다.
- [0049] 또한 본 발명은 직접교차분화 유도된 담관세포를 유효성분으로 포함하는 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0050] 또한 본 발명은 직접교차분화 유도된 담관세포를 유효성분으로 포함하는 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 용어 "예방"은 알레르기성 또는 염증성 피부질환의 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당 질환을 막는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 용어 "치료"는 본 발명의 조성물에 의해 알레르기성 또는 염증성 피부질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0053] 본 발명에서 용어 "세포치료제"는 조직의 기능을 복원하기 위하여 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 이용한 치료제로, 본 발명에서는 간 또는 담관질환의 억제를 위해 사용되는 치료제를 의미한다. 본 발명의 세포치료제는 간 또는 담관 조직들을 재생하기 위해 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 예방 또는 치료가 가능한 간 질환은 간 섬유화 (Liver fibrosis), 간경변증 (Liver cirrhosis), 간염 (Hepatitis; 예컨대, B형 간염, C형 간염 등), 간암 (Liver cancer), 비알코올성 지방간 (Nonalcoholic fatty liver), 알코올성 지방간 (Alcoholic fatty liver), 고호모시스테인혈증 (Hyperhomocysteinemia)과 이와 관련된 심뇌혈관계 질환, 혈전증 (Thrombosis), 동맥경화 (Atherosclerosis) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 간의 기능 저하, 소실, 및/또는 비정상적 기능에 의하여 야기되는 모든 질병 및/또는 병적 증상을 포함할 수 있다.
- [0055] 또한 본 발명에서 예방 또는 치료가 가능한 담관질환은 담관염 또는 담관암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 담관의 기능 저하, 소실, 및/또는 비정상적 기능에 의하여 야기되는 모든 질병 및/또는 병적 증상을 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 유도된 담관세포와 함께 피부질환 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 폴리이달릴리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 실제 임상투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's

Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 효과를 위하여 본 발명의 직접교차분화 유도된 담관세포는 1일 0.1 내지 10000 mg/kg(체중)의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육 또는 피부 내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 피부에 도포되는 방식이라는 어떤 경로로든지 투여될 수 있다.

[0061] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 간질환 또는 담관질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0063] 또한 본 발명은 제1 세포 시료에 후보 물질을 접촉시키는 단계; 상기 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 측정하는 단계; 상기 후보 물질을 접촉시킨 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준을 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준과 비교하는 단계; 및 상기 후보 물질을 접촉시킨 제1 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준이 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 세포 시료에서의 세포사멸, 약물 신진대사, 또는 지방흡수 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 후보 약물로 결정하는 단계를 포함하고, 상기 제1 세포 시료 및 제2 세포 시료는 각각 독립적으로 직접교차분화 유도된 담관세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 간 또는 담관질환의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0064] 상기 제1 세포 시료 및 제2 세포 시료는 각각 독립적으로 본 발명의 직접교차분화 방법에 의하여 생산된(직접교차분화 유도된) 담관세포일 수 있다.

[0065] 상기 후보물질은 각종 소분자 화학 약물 (small molecular drug), 펩티드, 단백질 (예컨대, 항체 등), 핵산분자, 천연물, 천연물의 추출물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0069] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0071] [실험예 및 실시예]

[0072] <실험예 1> 클로닝 및 렌티바이러스 플라스미드의 패키징

[0073] 전사 인자(OCT4, HNF1 β , HNF6, HNF4 α 및 HHEX)를 마우스 담관과 HepG2의 cDNA를 이용하여 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)으로 증폭시켰다. 이후, 상기 전사인자를 렌티 바이러스 벡터로 이동시키고 염기 서열 분석으로 이를 확인하였다. 렌티바이러스의 패키징을 X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, 06365787001)를 사용하여 렌티바이러스 트랜스퍼 플라스미드(lentiviral transfer plasmid), 패키징 플라스미드(packaging plasmid, psPAX2) 및 엔벨로프 플라스미드(envelope plasmid, VSV-G)를 각각 3 대 2 대 1비율로 첨가하여 수행하였다. DMEM을 첨가하여 총 부피를 200 μ l로 한 혼합물을 50 % 컨플루언시(confluent) 상태의 293T 세포(큰 T 항원을 갖는 293 HEK 세포)에 처리하여 48시간 동안 형질전환시켰다. 세포 배지를 초원심분리기에서 1시간 30분 동안 80,000g에서 원심 분리하였으며, 이후 원심 분리된 렌티 바이러스 펠렛을 1ml의 DMEM (Gibco, 10313-021)에 희석하고 형질전환에 사용하였다.

[0075] <실험예 2> 세포 배양 배지 및 유도담관세포(induced cholangiocyte-like cells, iCLC)의 제조

- [0076] 13.5일된 C3H 마우스 변형 배아로부터 유래한 마우스 strain 배아 섬유아세포를 직접교차분화에 사용하였다. Passage 5의 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 1.5×10^4 개를 매트릭젤로 코팅한 12-웰 배지에 접종시키고, 하루가 지난 후에 상기 실험에 1에서 제조한 렌티바이러스에 감염시켰다. 24 시간 경과 후, MEF 배지 조성물을 마우스 담관세포 유도 배지 조성물 1로 교체하고, 1 일 동안 배양시킨 후에 마우스 담관세포 유도 배지 조성물 2를 첨가하였다. 실험에 사용한 조성물 성분은 하기와 같다.
- [0077] - 조성물 1: 10% FBS(Gibco, 10099-141)가 보충된 DMEM(Gibco, 10313-021), L-글루타민(Gibco, 25030-081), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, 15140-122), 10ng/ml Epidermal growth factor(Peprotech, 315-09-1000), 10mM 니코틴아미드(Sigma-Aldrich, N3376-100G), 및 20ng/ml Hepatocyte Growth Factor (Peprotech, 100-39-100)
- [0078] - 조성물 2: 10% FBS(Gibco, 10099-141)가 보충된 media E(Gibco, A12176-01), L-글루타민(Gibco, 25030-081), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, 15140-122), 50ng/ml Epidermal growth factor (Peprotech, 315-09-1000), 10mM 니코틴아미드(Sigma-Aldrich, N3376-100G), 20ng/ml Hepatocyte Growth Factor (Peprotech, 100-39-100), 50ng/ml Fibroblast growth factor 10(Peprotech, 100-26-100) 및 50ng/ml Vascular endothelial growth factor (Peprotech, 100-20-100)
- [0080] 3일 후, 10%(v/v) 매트릭젤(Corning, 354234)을 배양배지에 첨가시켰다. 렌티바이러스 플라스미드 처리 20일 후, 생성된 세포 집합체를 수득하고 이를 3차원 배양시켰다. 상기 채취한 집합체를 매트릭젤 : 담관세포 유도 배지 조성물 2를 6 : 4의 비율로 포함하는 조성물과 혼합하였다. 상기 혼합물을 이후 4-웰 플레이트로 옮겨 이를 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 혼합물이 겔화가 된 후, 담관세포 유도 배양배지 조성물 2를 상기 겔에 첨가하였다. 공초점 이미징을 위하여, 상기 3차원 배양방법과 동일한 과정으로 Labtek (Thermo Scientific, 155409)에 샘플을 시딩하였다.
- [0082] <실험예 3> RNA 추출 및 cDNA 합성
- [0083] 세포 용해물의 total RNA를 RiboEX (Geneall, 301-001)에서 추출하였다. RNA 추출은 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 총 20 μ l의 반응 혼합물에 500ng의 RNA 및 oligo-dT 프라이머를 첨가하여 M-MuLV-역전사효소(NEB, M0253L)로 cDNA를 합성하였다.
- [0085] <실험예 4> RT-PCR 분석
- [0086] 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)은 Taq polymerase (Invitrogen, 10342-020)와 프라이머 쌍을 사용하여 58 °C에서 35사이클로 수행하였다. PCR 생성물을 1% 아가로스 겔에서 100V로 겔 전기 영동을 25 분 동안 수행하고, 이를 분석하였다.
- [0088] <실험예 5> 면역 형광 염색
- [0089] 세포를 실온에서 10분간 4% 파라 포르말데히드(Tech & Innovation, BPP-9004)로 고정시켰다. 고정된 세포를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Corning, 21-031-CV)로 3번 세척하였다. 이후 실온에서 10분 동안 0.1% Triton X-100 (Sigma, T9284)을 포함한 DPBS로 세포를 침투시켰다. DPBS로 3회 세척한 후, 4% FBS를 포함한 DPBS 로 실온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 결합을 차단하였다. 이어서, 세포를 실온에서 1 차 항체와 함께 1 시간 동안 배양시킨 후, 0.05% Tween-20(Sigma, P7949)을 포함하는 DPBS로 3 회 세척하는 단계를 수행하였다. 이후 2차 형광 항체를 샘플에서 처리하고, 암소에서 1 시간 동안 배양하였다. 이중 염색이 필요한 경우 상기의 절차에 따른 1차 항체를 처리하기 전 30 분 동안 추가적인 차단 단계를 수행하였다.
- [0091] 실시예 1. 직접교차분화인자에 의한 유도담관세포(induced cholangiocyte-like cells, miCLC)로의 유도
- [0092] 담관세포로 유도하기 위해서, 마우스 배아 섬유아세포를 배양 배지에 심고 24시간 동안 도 1과 같은 렌티바이러스 발현 시스템으로 담관세포로의 유도를 야기하는 전사인자의 조합인 OCT4, HNF1 β , HNF6; OCT4, HNF1 β , HNF6 및 HNF4 α ; 또는 OCT4, HNF1 β , HNF6, HNF4 α 및 HHX의 조합;을 섬유아세포에 도입시켰다. 마우스 배아 유래 섬유아세포를 젤라틴으로 코팅한 배양접시에 피부 조직을 부착시키고 이를 초대배양하여 사용하였다.
- [0093] 담관세포를 제작하는 과정은 다음과 같다. 섬유아세포는 렌티바이러스 감염 하루 전에 Passage 5의 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 1.5×10^4 개를 매트릭젤로 코팅한 12-웰 배지에 접종시키고, 하루가 지난 후에 상기 실험예 1의 렌티바이러스로 감염시켰다. 24 시간 경과 후, MEF 배지 조성물을 마우스 담관세포 유도 배지 조성물 1로 교체하고, 1 일 동안 배양시킨 후에 마우스 담관세포 유도 배지 조성물 2를 첨가하였다. 3일 후, 10%(v/v) 매트릭젤(Corning, 354234)을 배양배지에 첨가시켰다. 렌티바이러스 플라스미드 처리 20일 후, 생성된 세포 집합체를

수득하고 이를 3차원 배양으로 세포를 성장시켰다. 상기 채취한 집합체를 매트리지 : 담관세포 유도 배지 조성물 2를 6 : 4의 비율로 포함하는 조성물과 혼합하였다. 상기 혼합물을 4-웰 플레이트로 옮겨 이를 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 혼합물이 겔화가 된 후, 담관세포 유도 배양배지 조성물 2를 상기 겔에 첨가하였다. 공초점 이미징을 위하여, 상기 3차원 배양방법과 동일한 과정으로 Labtek (Thermo Scientific, 155409)에 샘플을 시딩하였다. 상기와 같은 담관세포 유도 과정을 모식화하여 도 2A에 나타내었으며, 상기 담관세포 유도 과정 중 0, 5, 20 일 후, 3차원 배양하여 5일이 경과한 경우의 세포의 조직학적 형태를 도 2B에 나타내었다.

[0094] 도 2B에 나타난 바와 같이, 렌티바이러스로 형질전환 이후 20일 정도에 집합체가 형성되며, 이를 3차원 배양시킨 후 5일째가 되면 낭포 구조(cystic structure)를 형성하여 전형적인 담관세포의 형태를 나타내는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과를 통하여 OCT4, HNF1 β , HNF6 및 HNF4 α 의 조합 또는 OCT4, HNF1 β , HNF6, HNF4 α 및 HHEX의 조합을 체세포인 섬유아세포에 처리하여 상기 인자들의 이소성 발현(ectopic expression)을 유도하면 효과적으로 담관세포를 제조할 수 있음을 확인하였다. 특히 상기와 같은 과정에 의하여 유도된 담관세포는 담관 상피 세포에서 나타나는 특징적인 낭포 구조를 나타내는 담관세포임을 확인할 수 있었다.

[0096] 실시예 2. 직접교차분화 유도된 담관 세포의 특징 확인

[0097] 상기 실시예 1에서 유도된 담관세포(iCLC)가 형태뿐 아니라 실제적인 담관세포의 특징을 나타내는지 여부를 확인하기 위하여, RT-PCR 분석을 수행하고 동시에 면역 형광 염색을 수행하였다. 실험에 4 및 5에 개시된 방법에 의하여 실험을 수행하였으며, RT-PCR의 결과를 도 3A에 면역 형광 염색을 수행한 결과를 도 3B에 나타내었다.

[0099] 도 3A에서 확인한 바와 같이, 제조된 iCLC 1 내지 4는 시토크라틴(cytokeratins)인 Ck19 및 Ck7와 상피 마커(Epcam)와 같은 담관세포 마커의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 아울러, 성숙한 담관 세포에 있어서 중요한 마커인 transmembrane transporter 마커 Cftr, Ae2, Scr, Aqp1 및 Asbt도 확연하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과에 따라서, 제조된 iCLC 1 내지 4는 형태뿐 아니라 담관세포의 마커가 확인하게 나타나는 실제의 담관세포와 특징 역시 동일한 것을 확인하였다. 도 3A에서 나타난 바와 같이, RT-PCR 분석을 통하여 사용한 직접교차분화 전사 인자의 조합에 따라 나타나는 마커의 발현 양상이 상이할 수 있음을 확인하였다.

[0100] 도 3B에서 확인한 바와 같이, 제조된 iCLC4의 낭포 구조에 대한 면역 염색한 결과에 제조된 낭포세포가 Ck19, Ck7 및 Ggt1을 강하게 발현하는 것을 확인하여 제조된 낭포 구조의 iCLC는 실제적인 담관세포와 동일한 것임을 확인하였다. 따라서, 체세포인 섬유아세포로부터 특정 전사 인자를 이소성 발현시키면, 효과적인 담관세포 직접교차 분화 유도가 가능함을 확인하였다.

[0102] 따라서, 상기와 같은 결과들을 종합해 보면, 섬유아세포로부터 유도된 담관세포는 실제 담관세포와 동일한 것을 확인하여, 상기 실시예에 개시된 방법을 통하면 효율적으로 담관세포를 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0104] 실시예 3. 담관 질환 모델에 대한 치료 효과의 확인

[0105] 상기 실시예를 통하여 제조된 담관세포가 담관 질환 동물 모델에 투여된 경우에 치료효과가 나타나는지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 이를 확인하기 위하여 0.1%의 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)를 C57BL/6J 마우스의 식이에 포함시키고 이를 30일 동안 섭취시켜 담관성 섬유증(biliary fibrosis) 마우스 질병 모델을 제조하였다. 또한 DDC 식이에 의하여 제조된 마우스 질병 모델을 대조군 마우스와 대비한 결과를 도 4에 나타내었다. 상기 도 4에 나타난 바와 같이, DDC를 식이로 섭취한 마우스는 담관성 섬유증증세가 현저히 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 상기 담관성 섬유증증 유도 마우스 질병 모델을 DDC 섭취 5일 이후부터 100 μ l PBS를 비장에 투여한 군을 대조군(PBS)으로 하고 본 발명의 직접교차분화 유도된 담관세포 10⁶ 개를 비장에 투여한 군(Cell)을 실험군으로 하여, 상기 조건을 한달 동안 유지시킨 이후의 간 조직에 대한 병리학적 진단을 실시하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0107] 도 5에 나타난 바와 같이, PBS 투여 대조군에서는 중심 정맥 주위로 중증도의 간세포 손상 및 염증을 확인할 수 있었으나, 본 발명의 유효성분인 담관세포를 투여한 군에서는 대조군과 대비하여 간세포 손상 및 염증이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

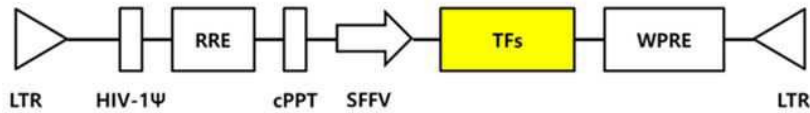
[0108] 또한 상기 제조된 담관성 섬유증증 마우스 질병 모델에 PBS를 비장에 투여한 군을 대조군(PBS)으로 하고, 본 발명의 직접교차분화 유도된 담관세포를 비장에 투여한 군(Cell)을 실험군으로 하여 Sirius red staining을 통한 간 조직 병리학적 진단을 실시하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0109] 도 6에 나타난 바와 같이, PBS 투여 대조군에서는 중심 정맥 주위로 중증도의 간세포 손상 및 염증이 나타났으나, 본 발명의 유효성분인 담관세포를 투여한 군에서는 대조군 대비 현저한 간세포 손상 및 염증의 감소를 확인할 수 있었다.

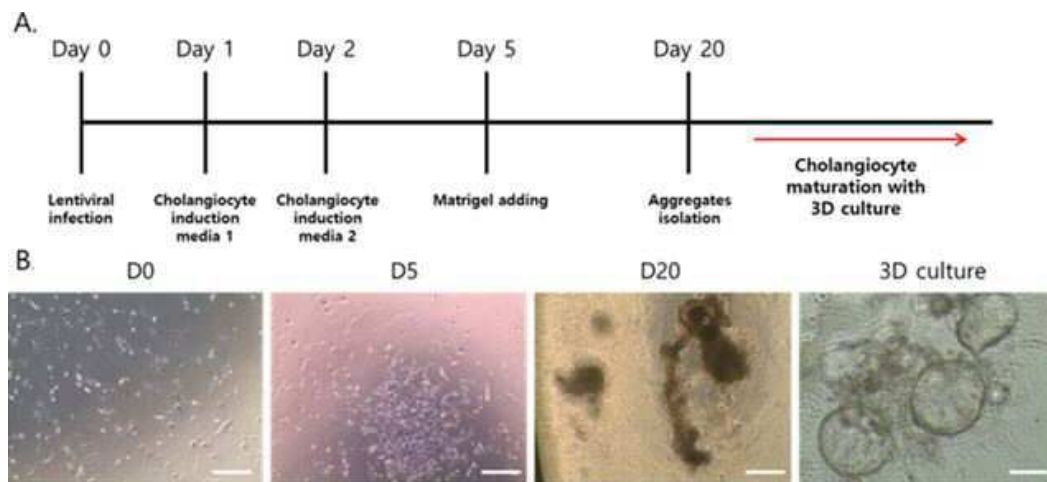
[0110] 상기와 같은 결과를 통하여 유도된 담관세포를 투여하면 간 또는 담관질환을 효과적으로 치료할 수 있는바, 상기 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제 조성물로 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

도면

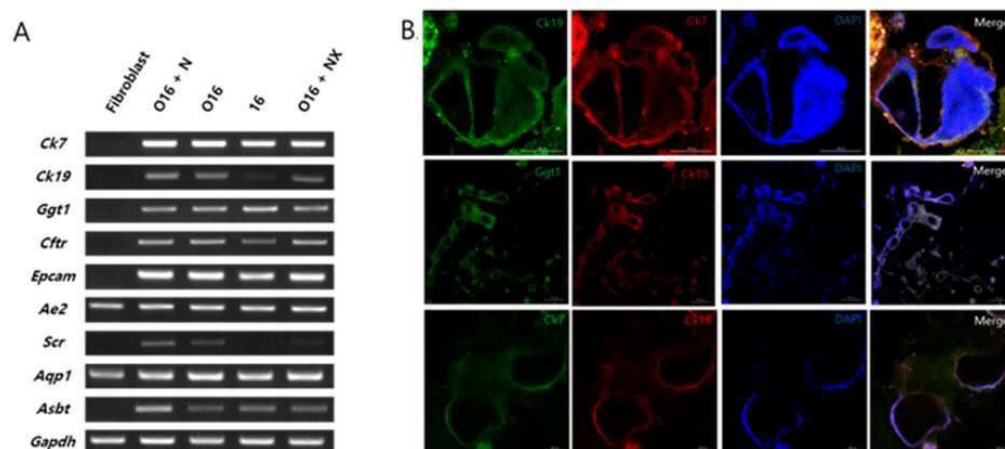
도면1



도면2



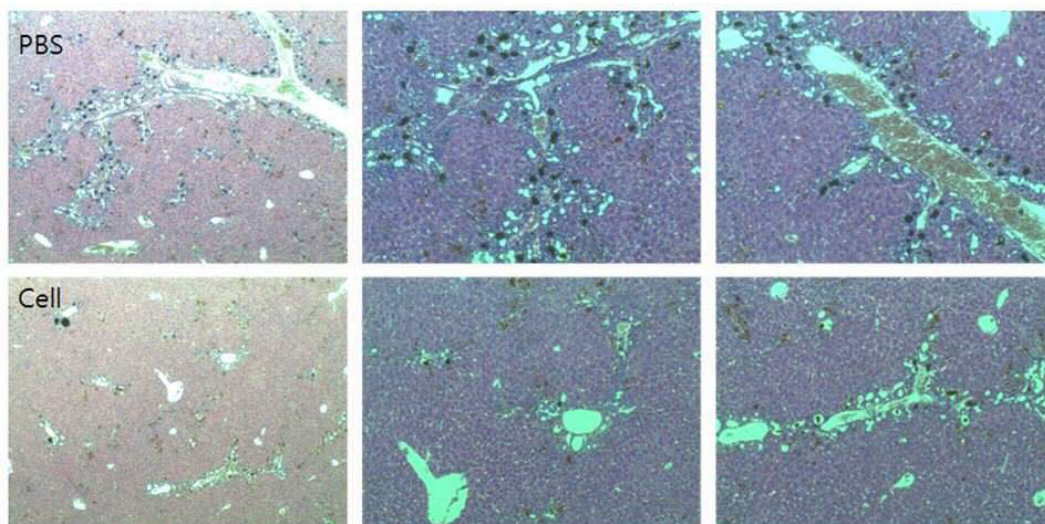
도면3



도면4



도면5



도면6

