



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월11일
 (11) 등록번호 10-0887623
 (24) 등록일자 2009년03월02일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C12N 5/06</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2003-7004803
 (22) 출원일자 2003년04월03일
 심사청구일자 2005년10월04일
 번역문제출일자 2003년04월03일
 (65) 공개번호 10-2004-0047732
 (43) 공개일자 2004년06월05일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2000/027428
 국제출원일자 2000년10월03일
 (87) 국제공개번호 WO 2002/29012
 국제공개일자 2002년04월11일
 (56) 선행기술조사문헌
 US04914032 A1
 W01993003142 A1
 American Journal of Pathology
 Vol.150(2):591-602 (1997. 2.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
 유니버시티 오브 노스 캐롤라이나
 미국 노스 캐롤라이나 27599 채플 힐 비숍 홀 308</p> <p>(72) 발명자
 구보타히로시
 미국노스캐롤라이나채플힐썸머워크써클273
 레이드플라엠
 미국노스캐롤라이나채플힐스위튼크리크로드3621</p> <p>(74) 대리인
 신용길</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 42 항

심사관 : 안규정

(54) 간 전구세포의 클론 증식방법

(57) 요약

본 발명은 배지 존재하에 피더 세포로 이루어진 층상에 내배엽 유래 초대 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물을 배양함을 특징으로 하는 내배엽 유래 초대 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물을 증식하는 방법 등을 개시한다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 그라나다, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

특허청구의 범위

청구항 1

내배엽 유래의 초대(primary) 간 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물을 이들의 분화를 유도하지 않고 증식시키는 방법에 있어서, 혈청 및 상피성장인자(EGF)가 존재하지 않는 배지 존재 하에서 피더 세포를 함유하는 층상에서 내배엽 유래의 초대 간 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물을 배양하여, 내배엽 유래의 초대 간 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물을 그들의 분화를 유도하지 않고 증식시킴을 특징으로 하는 증식방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 초대 간 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물이 척추동물 세포임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 초대 간 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물이 인간 세포, 비인간 영장류 세포, 돼지 세포, 개 세포, 토끼 세포, 랫트 세포, 마우스 세포 또는 그의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서, 배지가 기초 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 기초 배지가 돌베코 변형 이글(Dulbecco's modified Eagle's) 배지 및 햄스 F12(Ham's F12)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 배지가 1종 또는 그 이상의 호르몬을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 호르몬이 인슐린, 트랜스페린 또는 이들 양자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 배지가 추가로 글루코코르티코이드 호르몬을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서, 글루코코르티코이드 호르몬이 텍사메타손인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 배지가 추가로 철 포화 트랜스페린을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 배지가 추가로 니코틴아미드를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 배지가 추가로 혈청 알부민을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 배지가 추가로 1종 또는 그 이상의 환원제를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 환원제가 머캅토에탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서, 배지가 1종 또는 그 이상의 리피드 첨가물을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 리피드 첨가물이 유리 지방산 혼합물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 유리 지방산 혼합물이 팔미틴산, 팔미톨레인산, 스테아린산, 올레인산, 리놀레인산, 리놀레닌산, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1항에 있어서, 배지가 글루타민을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1항에 있어서, 배지가 추가로 미량 원소를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 미량 원소가 $CuSO_4$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 21항에 있어서, 미량 원소가 H_2SeO_3 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 1항에 있어서, 배지가 항산화제를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서, 항산화제가 H_2SeO_3 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 1항에 있어서, 배지가 항생물질을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

제 1항에 있어서, 피더 세포 공급원이 1종 또는 그 이상의 척추동물로부터 얻은 조직을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 척추동물이 배아인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 29항에 있어서, 척추동물이 인간, 비인간 영장류, 돼지, 개, 토끼, 랫트, 마우스 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 1항에 있어서, 피더 세포가 클론인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 31항에 있어서, 클론이 ST05인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제 1항에 있어서, 피더 세포가 기질 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 1항에 있어서, 피더 세포가 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 1항에 있어서, 초대 간 전구세포가 MHC 클래스 Ib를 발현하고, OX18을 발현하며, 알파-페토프로테인을 발현하고, 알부민을 발현하며, 사이토케라틴-19 또는 그의 조합을 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

삭제

청구항 37

제 1항에 있어서, 간 자손세포가 MHC 클래스 Ib를 발현하고, ICAM을 발현하고, OX18을 발현하며, 알파-페토프로테인을 발현하고, 알부민을 발현하며, 사이토케라틴-19 또는 그의 조합을 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, ICAM이 ICAM-1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 1항에 있어서, 초대 간 전구세포, 그의 자손 또는 그의 조합이 축적 콜로니로 증식함을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 1항에 있어서, 초대 간 전구세포를 추가로 클로닝함을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 40항에 있어서, 클로닝이 세포수 회식, 클로닝 칼라(cloning collars), 한천중 증식, 비드상의 증식, 유동 사이토메트리 또는 이들의 조합을 이용함을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 1항에 있어서, 초대 간 전구세포가 1회 또는 그 이상의 유사분열을 행함을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제 42항에 있어서, 초대 간 전구세포가 10회 또는 그 이상의 유사분열을 행함을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제 1항에 있어서, 초대 간 전구세포가 개별적 운명을 갖는 딸세포를 발생시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제 44항에 있어서, 딸세포가 담관 세포로 분화함을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 44항에 있어서, 딸세포가 간세포로 분화함을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

- 청구항 61
삭제
- 청구항 62
삭제
- 청구항 63
삭제
- 청구항 64
삭제
- 청구항 65
삭제
- 청구항 66
삭제
- 청구항 67
삭제
- 청구항 68
삭제
- 청구항 69
삭제
- 청구항 70
삭제
- 청구항 71
삭제
- 청구항 72
삭제
- 청구항 73
삭제
- 청구항 74
삭제
- 청구항 75
삭제
- 청구항 76
삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 다능성 세포(pluripotent cell), 줄기세포 및 기타 초기 간 전구세포(hepatic progenitor cell)를 포함한 포유류의 간 전구세포의 클론 증식을 위한 신규방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 규정배지 및 공배양에서 피더 세포를 사용하여 간 전구세포의 증식시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 피더로서 사용되며, 전구세포의 증식을 지지하는 능력이 있는 세포에도 관한 것이다.

배경기술

<2> 포유류 조직중의 다능성(multipotential) 전구세포의 동정은 임상적 및 상업적으로 매우 중요하며, 또한 발생과정 및 조직 호메오스타시스를 이해하는 데도 중요하다. 전구세포군은 유전자 요법, 세포 이식 및 생체 인공 장기의 조직 공학의 이상적 표적이다(Millar, AD. 1992 Nature 357, 455; Langer, R. and Vacanti, J. P. 1993 Science 260, 920; Gage, F. H. 1998 Nature 392, 18).

<3> 증식능 및/또는 다능성이 높은 조직 특이적인 "운명된" 줄기 세포 또는 전구 세포가 존재하는 것은 각각 조직에 맞는 특정의 방법을 사용하여 클론을 동정한, 조혈 줄기세포(Spangrude, G. J. et al. 1988 Science 241, 58), 신경 줄기세포(Davis, A. A., and Temple, S. 1994 Nature 372, 263; Stemple, D. l., and Anderson, D. J. 1992 Cell 71, 973) 및 상피 줄기세포(Jones, P. J. and Watt, F. M. 1993 Cell 73, 713)의 연구로부터 밝혀졌다. 이들 전구세포는 정상적인 조혈, 신경 또는 상피 조직의 호메오스타시스를 담당하고, 또한 중상 후에 재생 반응을 담당하는 것으로 간주되어 왔다(Hall, P. A., and Watt, F. M. 1989 Development 106, 619).

<4> 포유류의 성체 간장은, 통상 대사 회전이 늦고, 정지상태의 조직인 것에 관계없이 고도의 간독성에 의한 상해 또는 부분적 간장 절제술 후에 회복하는 능력이 대단히 높다(Fishback, F. C. 1929 Arch. Pathol. 7, 955); (Higgins, G. M. and Anderson, R. M. 1931 Arch, Pathol. 12, 186). 마우스에서의 최근 시험 데이터에서는 일련의 이식실험에서 조사한 바, 성체의 실질 세포(parenchymal cells)는 거의 무한적 증식 가능성을 갖는 것이 시사되었다(Overturf et al. 1997 Am. J. Pathol. 151, 1273; Rhim, J. A. et al. 1994 Science 263, 1149). 이들 실험에서는 불균질한 간 세포(liver cell)를 이용하기 때문에 관찰된 증식 가능성이 성체의 실질 세포에 유래하는 것인가, 성체의 실질 세포의 아집단에 유래하는 것인가, 및/또는 실질세포의 미성숙기(즉, 전구)에 유래하는 것인가를 증명하는 능력이 한정되어 있다. 더욱이 실험에서는 사용된 숙주가 알부민-유로키나제 도입 유전자 또는 티로신 분해효소의 결손을 가지기 때문에 담관 상피 분화의 증가가 나타나 있지 않으며; 어떤 숙주도 간세포계를 선택하도록 하는 특성을 갖는다. 따라서 상기 샷세이법에서는 양능성(bipotent) 세포군의 시험이 이루어질 수 없었다.

<5> 몇 개의 조직학적 시험에 의해 임신 중기 태아의 초기 간장 세포(hepatic cell)가 담관 상피 및 간세포(hepatocyte)로 분화하는 양능성의 능력을 갖는 것이 확립되어 있다(Shiojiri, N. 1997 Microscopy Res. Tech. 39, 328-35). 간장 발생은 내배엽(內胚葉) 상피가 태아 심장 발생 중배엽(中胚葉)과 상호 작용한 직후에 복부 창자 내배엽에서 시작한다(Douarin, N. M. 1975 Medical Biol. 53, 427; Houssaint, E. 1980 Cell Differ. 9, 269). 이 간장으로의 관계는 마우스에서는 태생일(E) 8일에 일어난다. 간장 발생의 최초 단계는 형태학적 변화 전에 내배엽중의 혈청 알부민과 알파-페토프로테인 mRNA가 유도되어 명백하게 된다(Gauadi, R et al. 1996

Genes Dev. 10, 1670). 마우스 태생 9.5일에 특정 세포가 증식하여 실과 같은 형태로 황경막의 간엽(間葉)에 침입하여 간장 원기(anlage)를 형성한다. 그런 다음, 간장 질량은 극적으로 증가하나, 간장 질량의 증가는 주로 조혈세포에 의한 것이며, 이것은 마우스에서 E10에서 태아 간으로 클론을 형성하여(Houssaint, E. 1981 *Cell Differ.* 10, 243), 간장 세포에 영향을 주어 극도로 일그러져 불규칙한 형태로 된다(Luzzatto, A. C. 1981 *Cell Tissue Res.* 215, 133). 흥미롭게도, 유전자 타겟 변종 마우스를 사용한 최근의 데이터는 수많은 유전자의 결손에 의해 E12에서 E15사이에 치사적인 간 부전, 실질세포의 아포토시스(apoptosis) 및/또는 괴사가 일어난 것을 보여준다(Gunes, C. et al. 1998 *EMBO J.* 17, 2846; Hilberg, F. et al. 1993 *Nature* 365, 1791; Motoyama, J. et al. 1997 *Mech. Dev.* 66, 27); (Schmidt, C. et al. 1995 *Nature* 373, 699). 특히, 스트레스로 활성화된 캐스케이드(Ganiatsas, S. et al. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6881); (Nishina, H. et al. 1999 *Development* 126, 505) 또는 엔티 아포토 캐스케이드(Beg, A. et al. 1995 *Nature* 376, 167); (Li, Q. et al. 1999 *Science* 284, 321; Tanaka, M. et al. 1999, *Immunity* 10, 421)의 일부인 유전자의 파괴는 불활화된 유전자가 널리 발현되어 있음에도 불구하고, 간발생을 심하게 손상시키나, 조혈은 손상되지 않는다. 간장 세포가 발생 스트레스 자극에 본래 감수성인 것인지, 또는 태아 간 자체의 특정 미소 환경이 이와 같은 파괴적인 효과를 일으키는지는 명백하지 않다(Doi, T. S. et al 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2994). 한편, 성체 간장의 기초적인 구축은 문맥(portal vein)을 둘러싸는 담관 상피의 최초의 원주의 출현에 의존한다(Shiojiri, N. 1997 *Microscopy Res. Tech.* 39, 328). 번역조직학적으로, 간내 담관 상피 세포의 분화의 최종 징후는 담즙 특이적 사이토크라틴(CK)의 발현이다. 상피 세포의 세포질 중간경 필라멘트(IF) 프로테인인 CK 프로테인은 다중 유전자족(multigene family)에 의해 코딩되고, 조직 및 분화에 특이적으로 발현된다(Moll, R. et al. 1982 *Cell* 31, 11). 성체 간세포(adult hepatocytes)는 CK19를 전혀 발현시키지 않으나, 성체의 담관 상피 세포는 발현하기 때문에 CK19는 담즙 마커 중에서 가장 눈을 끄는 것의 하나이다. CK8 및 CK18만이 초기 간장 세포로부터 성체 간세포까지 통하여 발현한다(Moll, R. et al. *Cell* 1982, 31, 11). 마우스 E14에 상응하는 랫트의 발현중 E15.5에서 담관 전구 세포는 CK18 및 CK8항체의 양쪽에 의해 강하게 염색되고, 일부의 담관 전구 세포는 CK19를 발현시킨다. 발생이 진행하면서 성숙하고 있는 담관은 CK19와 더불어 CK7도 점차 발현시키기 시작하여, ALB의 발현을 잃어버린다(Shiojiri, N. et al. *Cancer Res.* 1991, 51, 2611). 랫트중 E13과 같이 빠른 시기의 간장 세포는 균일한 세포군이라고 생각되나, 모든 초기 간장 세포가 담관 상피세포계로 분화할 수 있는지 여부, 및 이와 같은 운명이 어떻게 결정되는지는 아직 알지 못한다. 레트로바이러스 벡터를 사용하는 것과 같은 결정적 계통 마킹 시험은 간장 세포에 대해 행하여지지 않았으며, 양능성 간 전구세포의 입증에 필요한 클론 배양 조건은 결정되어 있지 않았다.

<6> 클론 증식 분석의 하나의 큰 장애는 조혈세포의 폭발적인 증가이며, 이에 의해 간장 세포의 생체의 증식이 관찰할 수 없게 한다. 따라서, 간세포의 농축방법을 이용할 필요가 있다. 태아 간에 있어서, 조혈세포를 분획하는데 필요한 표면 마커가 상세하게 조사되고 있으나(Dzierzak, E. et al. *Immunol. Today* 1998, 19, 228), 간 전구 세포의 마커의 연구는 초기단계이며, 이들은 아직 그다지 결정되어 있지 않다.(Sigal, S. et al. *Hepatology* 1994, 19, 999). 더욱이 성체 간세포(adult liver cell)에서 통상 사용되는 생체의 증식 조건에서는 ALB 발현과 같은 조직 특이적 기능의 손실을 수반한 분화가 일어난다(Block, G. D. et al. *J. Cell Biol.* 1996, 132, 1133). 조직 특이적 mRNAs를 합성하는 약간 개선된 능력과 전사후 완전히 조직 특이적 유전자를 조절하는 능력의 회복은 무혈청에서, 호르몬, 증식 인자 및/또는 일부 세포외 매트릭스 성분이 정의되어 있는 혼합물을 사용하여 유지시킨 간 세포(liver cell)에서만 나타난다(Jefferson, D. M. et al. *Mol. Cell. Biol.* 1984, 4, 1929; Enat, R. et al *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, 81, 1411). 그러나, 증식하는 태아 간장 세포는 이와 같은 생체중 혈청 단백질의 발현을 지지한다. 이 분야에서 명백하지 않은 것은 생체의외에서 간 전구세포를 지지하여 증식시키기 위하여 어떻게 하느냐는 것이다. 간 전구세포의 체외 증식을 지지하는 조건의 동정에는 충족시키지 못하는 수요가 있다. 마찬가지로 새로운 간 조직에서 분리한 간 전구세포의 클론 증식능력을 결정하기 위한 생체의외 콜로니 형성 assay(CFA)법에 대한 미충족의 수요가 있으며; 클론 증식은 배양액에 접종된 단일 세포가 접종된 세포에 유래하는 클론의 딸 세포군을 생성하는 능력으로 정의된다. 높은 세포밀도로 접종된 간장 배양에 있어서 근접하여 증식하는 세포 덩어리로 이루어진 클론 증식도 다른 연구자에 의해 기술되어 있다(Block, G. D. et al. *J. Cell Biol.* 1996, 132, 1133); 그러나, 이들의 이전 연구에 기술되어 있는 세포 콜로니는 계대 배양할 수 없어서 정의하고 있는 클론이라 말할 수 없고, 그의 유용성에 한계가 있다.

<7> 생체의외 간세포(hepatocytes)를 증식시키는 시도가 있었다. 미국특허 제 5,510,254호에 간세포의 배양은 생체 적 합성이나 살아있지 않은 재료의 3차원 프레임 워크에 의존한다고 주장하고 있다. 인공적 프레임 워크가 아니고, 간 전구세포가 증식 및 배양될 수 있는 배양조건에는 만족스럽지 못하다. 또한, 담관 세포 및 간세포의 양자를 생성하는 능력이 있는 양능성 분화능(bipotential differentiation capability)을 가지며, 더불어 특히 인공

간장의 성분으로서의 이용, 간독성의 시험 및 약제 개발에 적합한 클론화 간 전구세포에는 아직 충족할 수 없다.

<8> 삭제

<9> 미국특허 제 5,559,022호에서는 "예비 세포(reserve cells)"를 특정짓는데 사용되는 염료인 예오신 Y를 결합하는 간 예비 세포를 특허청구하고 있으나, 간 세포의 동정에 확립된 마커를 사용하고 있지 않으며, 또한 예비 세포의 클론 증식 방법도, 생존 능력이 있는 간 예비 세포의 분리에 사용한 마커도 제공하지 않고 있다. 적어도 하나의 특이적 마커의 발현 및 간세포나 담관 세포의 어느 것으로 분화하는 능력을 포함한 간 전구세포에 필수적인 많은 특징을 갖는 세포의 분리 및 배양법을 개시하고 있는 방법에는 만족스럽지 못하다. 또한, 간 전구세포의 클론 증식용 방법은 충분치 않다. 클론 증식은 다능성 간 전구세포의 명백하고 엄밀한 구별 및 동정방법이 필수적이다.

<10> 미국특허 제 5,405,722호에는 세포 증식을 위한 배지를 청구하고 있다. 미국특허제 5,405,722호에는 3-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 콜레스테롤, 5-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 뉴클레오시드 및 2-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 콜라겐 IV 또는 0.5-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 피브로넥틴의 어느 하나를 필수 성분으로 하고 있다. 이것에는 간 전구세포 증식에 특이적이며, 또한 최적화된 배지가 필요하다.

<11> 미국특허 제 4,914,032호에는 간세포를 배양하는 과정을 특허청구하고 있다. 본 발명과는 반대로 특허 제 4,914,032호는 간 전구세포의 배양 또는 간장 세포의 클론 증식 조건의 어느 하나도 개시하지 않고 있다. 마찬가지로 미국특허 제 5,030,105호는 간세포 배양을 처리함으로써 약제를 평가하는 방법을 청구하고 있다. 규정된 세포군을 시험에 사용하기 위한 클론 증식 조건, 및 간 전구세포의 배양방법은 아직 만족스럽지 못하다.

<12> 미국특허 제 5,858,721호는 기질 세포(stromal cells)의 트랜스팩션을 청구하고 있다. 그러나, 이 미국특허 제 5,858,721호는 생체 적합성의 살아있지 않은 재료의 프레임 워크를 필요로 하는 점에서 한정되어 있다. 이것과는 대조로 본 발명에서는 합성 메쉬워크를 필요로 하지 않는 증식 조건으로, 상기 발명은 만족스럽지 못하다.

<13> 본 발명자들은 보다 훨씬 유용한 간 전구세포가 아닌 간세포와 같은 성숙한 간 세포를 배양하는 것은 적당하지 못함을 인식하였다. 본 발명자는 간 전구세포의 분리 파라미터 및 클론 증식 요건을 주의 깊게 결정하였다. 전구세포 및 전구세포를 선택 배양하는 방법은 간 부전 환자의 치료약, 및 독성 물질의 평가 및 약제의 평가를 포함한 많은 유용성을 가진다.

<14> 미국특허 제 5,576,207호 및 5,789,246호에는 피더 및 호르몬 첨가 규정 배지의 필요성을 개시하고 있다. 이들의 선행 연구는 배아 간장의 기질세포와 규정된 세포외 매트릭스 기저 및 무혈청의 호르몬 첨가 배지를 조합하여 사용하여 간 전구세포의 증식조건으로 하고 있다. 그러나, 사용된 규정배지는 본 발명에 의해 사용된 것보다 훨씬 복잡하고; 세포를 정제된 매트릭스 기저(타입 IV 콜라겐 및 라미닌)상에 접종되나, 본 발명에서는 피더(메트릭스를 공급한다)상에 직접 접종하며; 또한 배아 기질 세포는 배아 간장의 초대 배양(primary cultures)으로 조제되고 세포주로서 확립되어 있지 않았다. 배아 기질 세포주를 사용함으로써, 피더 세포는 훨씬 간단하고, 실질적으로 재현성이 있는 세포 지지 수단으로 된다. 더욱이, STO 피더는 간 전구세포에 한정하여 지지되는 것은 아니며, 복수 종류의 조직으로부터 얻은 전구 세포에도 사용할 수 있는 것으로 생각되는 것은 합리적이다. 선행 특허에서는 간 전구 배양액은 높은 세포 밀도로 접종하여, 이들 증식이 콜로니 형성으로 관찰되는데, 이는 세포의 클론이 아닌 세포의 덩어리가 유도된 것임을 의미한다.

발명의 상세한 설명

<15> 본 발명은 전구세포, 그의 자손, 또는 그의 혼합물을 증식시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 내배엽 유래의 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물을 증식시키는 방법에 관한 것이다. 세포는 내배엽 조직으로부터 얻어진다. 그 후, 내배엽 유래 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물은 배지중에서 피더 세포를 함유하는 층상에서 배양된다. 이 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물은 척추동물 세포일 수 있다. 이 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물은 ICAM 또는 ICAM-1 양성 및 고전적 MHC 클래스 I 항원 음성의 표현형으로 표시될 수 있다. 이 고전적 MHC 클래스 I 항원은 MHC 클래스 Ia 항원으로 불린다.

<16> 본 발명은 무혈청, 호르몬 첨가 규정배지 및 피더 세포를 사용하는 간 줄기세포 및 기타 전구세포의 배양 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 전구세포의 자손 또는 전구세포 및 전구세포의 자손의 조합을 배양시키는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 전구세포는 간 전구세포이다. 마찬가지로 본 발명은 특정의 배양조건을 사용하

여 간장의 다능성 전구세포를 클로닝하는 방법에도 관한 것이다. 바람직하기로는 본 발명은 간 다능성 전구세포의 클로닝 방법에도 관한 것이다. 간장의 다능성 전구세포는 임의의 무척추동물 또는 척추동물 중, 보다 바람직하기로는 포유류로부터 유래될 수 있다. 더욱 더 바람직하기로는 간장의 다능성 전구세포는 사람, 영장류, 돼지, 개, 랫트, 토끼, 또는 마우스 유래이다. 가장 바람직하기로는 다능성 전구세포는 사람 유래이다. 본 발명은 간 전구세포 및 그의 자손의 생체외 증식에 필요한 특성의 배양 조건을 개시한다. 본 발명은 또한, 간 전구용 피더 세포로서 STO 마우스 배아 세포와 같은 배아 피더 세포의 사용도 개시한다. 피더 세포는 본 발명에서 개시하는 새로운 무혈청 호르몬 첨가 규정배지(HDM)와 조합하여 사용한다. 이 조합에 의해 세포가 악성 형질 전환되지 않고, E15 랫트 간에서 각종 랫트 태아 간장 세포주를 확립할 수 있었다.

- <17> 더욱이, 본 발명은 간 전구세포 및 그의 자손의 증식을 지지할 수 있는 피더 세포의 클로닝 방법에 관한 것이다.
- <18> 또한, 본 발명은 피더로서 사용할 때, 간 전구세포 증식을 지지하는 특정 세포주에 관한 것이다.
- <19> 또한, 본 발명은 간 전구세포의 클로닝 방법에도 관한 것이다. 본 발명은 신선하게 분리된 간 전구세포의 클론 증식능력을 결정하는 생체내 콜로니 형성 앳세이(CFA)법의 개발을 위한 간장 세포주 및 HDM-STO 공배양계의 사용을 개시한다. CFA를 특이적 항원 프로파일에 의해 정제된 세포와 조합하면, 양능성 간 전구세포가 명백하게 된다. 예를 들면, E11.5 마우스에 상응하는 E13 랫트 간으로부터 얻은 증식 증력이 높은 전구세포는 고전적 MHC 클래스 I(RT1A)⁻, OX18(pan-MHC 클래스 I)^{du11}, 및 세포내 접착 분자 1(ICAM-1)⁺와 같은 동일 표현형을 갖는다.
- <20> 또한 본 발명은 클로날 간장 세포 증식을 지지할 수 있는 배지에도 대한 것이다. 이 배지는 특정 호르몬 및 영양을 특징으로 하고, 혈청을 함유하지 않는다.
- <21> 더욱이, 본 발명은 피더 세포의 생합성 산물을 함유하는 배지의 간 전구세포의 배양에 관한 것이다.
- <22> 또한, 본 발명은 간세포 및 담즙 세포 표현형을 함유하는, 간장 세포의 분화의 유도방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 상피성장인자(EGF)가 전구세포 콜로니의 증식과, 간세포(hepatocytes) 또는 담관 상피세포와 같은 그들의 운명에 영향을 주는 것이 개시된다.

산업상 이용 가능성

- <94> 본 발명은 전구세포, 그의 자손 또는 그의 혼합물의 증식방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 내배엽 유래의 전구, 그의 자손 또는 그의 혼합물의 증식방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- <23> 도 1은 15일령 랫트 태아 간장으로부터 얻은 간장 세포주의 특징을 나타낸다.
- <24> 도 2는 섬유아세포 피더 세포상 콜로니 형성의 앳세이법을 나타낸다.
- <25> 도 3은 성체 간 세포(adult liver cells)중의 각종 간장 세포주의 랫트 세포 표면 항원의 발현을 나타낸다.
- <26> 도 4는 13일령 태아 랫트 간장의 표현형 분석을 나타낸다.
- <27> 도 5는 EGF의 존재 및 부재하에서의 간장 콜로니의 특성을 나타낸다.
- <28> 도 6은 RT1A⁻ 간장 세포상의 CK19 발현의 유도를 나타낸다.
- <29> 도 7은 ST05 피더 세포상의 간장 콜로니 형성의 모식도이다.
- <30> 본 발명은 줄기 세포의 증식 및 이용 방법이다. 외배엽, 중배엽, 내배엽 기원의 조직을 포함하며, 각종 조직이 전구세포의 적당한 공급원이다. 외배엽 조직에는 피부 조직, 뇌 조직 및 기타 신경조직이 포함된다. 중배엽 조직에는 근육, 혈액, 조혈계가 포함된다. 내배엽 조직에는 창자, 위, 췌장, 갑상선 및 소화기계에 수반하는 선(gland)이 포함된다. 특히, 본 발명은 간 줄기세포 및 기타 간 전구세포의 증식방법이다. 본 방법은 분리된 간 줄기세포 및/또는 간 전구세포 및/또는 그의 자손의 세포군을, 클론 증식, 즉 세포 밀도에서 증식을 지지하는 능력의 어떤 조건에 노출시키는 것을 포함한다. 바람직한 실시태양에서는, 이 방법에는 피더 세포층에서의 간 전구세포의 증식을 지지하기 위하여 무혈청의, 호르몬 첨가 규정배지의 사용을 포함한다. 피더 세포의 기능은 복수이며, 영양분의 공급, 접착 표면의 제공 및 간 전구세포의 생존, 증식 및/또는 분화에 필요한 특정 증식 인자 및 세포의 매트릭스를 배지중에 분비하는 것을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시태양으로서, 이 방법에는 간

줄기세포 및 간 전구세포의 증식을 지지할 수 있는 세포의 선택이 포함된다. 피더 세포는 과충류, 조류, 갑각류, 어류, 환형동물, 연체동물, 선충류, 곤충, 또는 포유류, 바람직하기로는 사람으로부터 얻어진다. 또한, 바람직하기로는 피더 세포는 배아 조직으로부터 유래한다. 또한, 바람직하기로는 피더 세포는 배아 간 조직으로부터 유래한다. 또한 피더 세포는 유전자 재조합되어도 좋다. 더욱 더 바람직하기로는 이 방법은 간장 세포를 최적으로 지지하는 피더 세포를 클로닝하는 것을 포함한다.

- <31> 삭제
- <32> 친화성에 기초로 한 상호작용, 예를 들면, 어피니티 페닝, 보체와 조합한 면역절제술, 유동 사이토메트리, 원심 세정, 분획 원심 등, 간 줄기세포 및 간 전구세포를 분리하는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 분리된 간 줄기세포 및 전구세포는 일부 또는 모든 표현형 마커(고전적 MHC 클래스 I⁻, ICAM-1⁺, OX18^{du11}, 알파-페토프로테인⁺, 또는 알부민⁺)를 발현하는 능력을 갖는다. 본 발명의 다른 실시 태양으로, 간 전구세포는 덩어리, 콜로니 또는 클라스터로 축적된 세포의 형성으로 특정 지워지는 증식 패턴을 발현한다.
- <33> 본 발명의 바람직한 실시 태양으로 간장 세포가 무혈청의 호르몬 첨가 규정배지(HDM)중에서 선택적으로 증식된다.
- <34> HDM의 조성은 40 ng/ml EGF, 약 5-10 µg/ml이하의 인슐린, 약 10⁻⁶M 텍사메타손 또는 기타 글루코코르티코이드 호르몬, 약 10 µg/ml이하의 철 포화 트랜스페린, 약 5×10⁻²M 니코틴아미드, 약 2%이하의 소혈청 알부민, 약 5×10⁻⁴M 2-머캅토에탄올 또는 당량 환원제, 약 8µeq/l 유리 지방산, 약 2×10⁻²M 글루타민, 약 1×10⁻⁶M CuSO₄, 약 3×10⁻⁸M H₂SeO₃ 및 필요에 따라, 항생물질이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's 배지 및 Ham's F12의 혼합물을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니며, 영양배지가 포함된다. 항생물질로서는 페니실린, 스트렙토마이신, 겐타마이신, 및 기타 상용되는 것 및 이들의 혼합물을 들 수 있다. 당분야에 통상의 지식을 가진 자는 기타 영양 배지, 예를 들면, Ham's F-10, Medium 199, 또는 MCDB 151 및 MCDB 302를 포함한 MCDB계의 하나를 DMEM/F12 대신 사용할 수 있음을 인지한다. 세포 증식의 가장 최소 조건은 호르몬 부재 하에서 피더를 사용하는 것이며; 상기에 기재된 결정적으로 요구되는 호르몬으로서의 글루코코르티코이드, 인슐린, 트랜스페린, 및 전구세포 증식을 위한 호르몬 미토겐을 구성하는 EGF를 들 수 있다. 다른 호르몬 요소가 첨가되어 2차 증식효과를 거둘 수 있으나, 상기 중요한 요건을 대체할 수 없다. 또, 이와 같은 호르몬 조성물의 변경은 당분야에 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 범위 내에서 가능하다.
- <35> 바람직한 범위는 10-50 ng/ml EGF, 2-10 µg/ml 인슐린, 약 5×10⁻⁷ 내지 10⁻⁶M 텍사메타손(9α-플루오로-16α-메틸-프레드니솔론), 5-20 µg/ml 철 포화 트랜스페린, 2-8×10⁻³M 니코틴아미드, 0.05-0.5% 혈청 알부민, 2-8×10⁻⁵M 2-머캅토에탄올, 5-10 µeq유리 지방산, 1-3×10⁻³M 글루타민, 0.5-2×10⁻⁶M CuSO₄, 1-5×10⁻⁸M H₂SeO₃ 및 1-5 µM 팔미틴산, 0.1-0.4 µM 팔미톨레인산, 0.5-1.2 µM 스테아린산, 0.5-2 µM 올레인산, 1-5 µM 리놀레인산, 및 0.2-0.8 µM 리놀레닌산을 포함한다.
- <36> 본 발명의 무혈청, 호르몬 첨가 규정 배지는 간장 세포의 클론 증식에 적합하다. 이 HDM은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), Ham's F12, RPMI 1640, William's E 배지 등과 다수의 옵션 중 어느 하나 일 수 있는 기초 배지를 포함한다. 바람직한 실시태양은 Dulbecco's modified Eagle's 배지와 Ham's F12의 1: 1 혼합물(DMEM/F12, 예를 들면 Grand Island, NY의 GIBCO/BRL)이다. 기초 배지는 10 ng/ml의 바람직한 농도의 상피 성장인자, EGF(예, Collaborative Biomedical Products로부터), 5 µg/ml의 바람직한 농도의 인슐린(예, Sigma로부터), 10⁻⁶M 텍사메타손(예, Sigma로부터), 10 µg/ml 철 포화 트랜스페린(예, Sigma로부터), 4.4×10⁻³M 니코틴아미드(예, Sigma로부터), 0.2% 혈청 알부민(예, Sigma로부터), 5×10⁻⁵M 2-머캅토에탄올(예, Sigma로부터) 7.6 µeq/l 유리 지방산 혼합물(2.4 µM 팔미틴산, 0.21 µM 팔미톨레인산, 0.88 µM 스테아린산, 1 µM 올레인산, 2.7 µM 리놀레인산, 및 0.43 µM 리놀레닌산), 2×10⁻³M 글루타민(예, GIBCO/BRL로부터), 1×10⁻⁶M CuSO₄, 3×10⁻⁸M H₂SeO₃ 및 항생물질이 첨가된 것이다. 인슐린 유사 증식 인자(IGFs), 인터루킨(IL)-6계, 간세포 증식 인자(HGFs), 및 섬유아세포 증식 인자(FGFs)를 함유하는(이들에 한정되는 것은 아님) 피더 세포에 의해 분

비되는 증식 인자는 배양 배지에 첨가되어 피더 효과를 증가시키나, 단일 또는 각종 조합으로 첨가될 때 피더 효과를 대체하는 것은 발견되지 않았으며, 이는 피더 세포가 다른 시그널을 생성하는 것을 의미하나 이들 증식 인자가 조합 또는 단독으로 요구되는 지는 확인되지 않았다.

<37> 본 발명의 또 다른 실시 태양은 간 전구세포가 단일 전구세포로부터 증식, 즉, 세포가 클로닝되는 것이다. 콜로니에서 세포를 증식시키는 것은 단일 세포로부터 유래된 세포의 증식과 목시적 및 명시적으로 정의되는 클론 증식과 반드시 동등한 것은 아니다. 한계 희석법으로 불리는, 전구세포를 세포 배양 플레이트 웰당 하나의 세포 또는 더 적게 희석하는 방법을 포함한, 당분야에 알려진 각종의 클로닝 방법의 임의의 것이 적당하다. 마찬가지로, 전구세포는 클로닝 링, 선택적 박리, 미립자 상에서 희석 배양, 플로우 사이토메트리를 사용하는 단세포 소오트, 마이크로피펫 또는 광학 트위저를 사용한 각각의 세포의 선택 및 한천을 사용한 클로닝일 수 있다.

<38> 본 발명의 다른 실시태양은 클로닝된 전구세포의 다수가 유사분열(mitosis)될 수 있다. 전구세포는 적어도 1회의 유사 분열할 수 있는 것이 바람직하며, 적어도 10회의 분열할 수 있는 것이 바람직하다.

<39> 본 발명의 또 다른 실시태양은 간 전구세포 및 그의 자손은 피더 세포의 대사 및 생합성 생산물을 첨가한 배지에서 증식하는 것이다. 첨가는 조정배지 즉, 살아있는 피더 세포가 미리 인큐베이트된 배지의 형태이어도 좋다. 바람직하기로는 첨가는 피더 세포의 조정배지로부터, 간 전구 및 그의 자손의 증식을 지지하여 증가하는 단백질, 펩티드, 리피드, 탄수화물 및 대사 조절 인자를 함유하는 인자를 분리하는 형태이어도 좋다. 단백질은 세포외 매트릭스의 가용성 및 불용성 성분, 및 상피 성장 인자 및 인슐린 유사 증식 인자를 함유하는 증식 인자를 함유할 수 있다.

<40> 보다 바람직하기로는, 배아 또는 성체세포 또는 기타 적당한 세포인 피더 세포의 층을 사용하여 간장 세포는 배양에서 선택적으로 증식한다. 하나의 실시 태양으로, 피더 세포는 기질 세포 또는 섬유아세포이다. 섬유아세포 또는 기타 적당한 세포는 예를 들면, 트랜스펙션에 의해 유전자 재조합되어 있어도 좋다. 섬유아세포 또는 기타 적당한 세포는 사람, 비인간 영장류, 돼지, 개, 토끼, 랫트 또는 마우스 중배엽 세포 및 기타 포유류 및 조류 중배엽 세포가 적당하다. 더욱이, 섬유아세포는 간 전구세포를 지지하는 능력 때문에 클로닝하여 선별한다.

<41> 본 발명의 바람직한 실시태양은 분리된 간 전구세포가 상피 성장 인자(EGF) 또는 기탄 분화 시그널의 선택적 사용 또는 그의 결여에 의해 간세포 또는 담관 세포계로 운명지어진다.

<42> 본 발명의 또 다른 바람직한 실시태양은 분리된 줄기 세포 및 기타 간 전구 세포를 체외 간 보조 장치로서 이용할 수 있는 인공 간장의 성분으로 이용할 수 있다. 본 발명의 더욱 바람직한 실시태양은 분리된 간 전구세포 및 그의 자손을 함유하는 인공 간장을 간 기능부전증이나 간부전으로 고통 받는 환자의 생명을 지지하는 데 사용하는 것이다.

<43> [실시예]

<44> 다음 실시예는 본 발명을 예시하는 것이나, 본 발명은 이들 구체적인 실시예에 한정되는 것은 아니다. 당업자는 이들 실시예로부터 본 발명을 실행하는 수단을 얻을 수 있는 것으로 생각된다. 당업자는 본 발명의 범위에 포함되는 많은 다른 실시 태양을 인지할 것이다.

<45> **실시예 1. 간 줄기세포와 간 전구세포의 조제 및 분석**

<46> 랫트.

찰스 리버 브리딩 래보러토리(Wilmington, MA)에서 임신한 피서344 랫트를 입수했다. 시각을 설정한 임신에는 오후에 동물을 일제히 플러그가 관찰된 아침을 0일로 한다. 성체의 간 세포에는 수컷 피서344 랫트(200-250g)를 사용한다.

<47> 간장 세포주의 확립.

<48> 임신 15일의 태아의 간을 조제한다. 단세포 현탁액은 0.05% 트립신과 0.5mM EDTA 또는 10units/ml 서몰리신(Sigma, St. Louis, MO)과 100units/ml 디옥시리보뉴클레아제 I(Sigma)에서 간장을 37℃에서 인큐베이트하여 얻었다. 세포는 피콜-파크(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 가하고, 15분 동안 450g로 밀도구배 원심을 행하였다. 저부의 핵분 세포를 각각 th1120-3과 rter6 또는 rhe14321에 대하여 17mg/ml 콜라겐 타입IV(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)이나 12µg/ml 라미닌(Collaborative Biomedical Products)으로 코팅된 조직 배양접시에 접종한다. 무혈청 호르몬 첨가 배양배지, HDM은 Dulbecco's modified Eagle's 배지와 Ham's F12(DMEM/F12, GIBCO/BRL, Grand Island, New York)의 1:1혼합물이다. 이 혼합액에 20ng/ml

EGF(Collaborative Biomedical Products), 5 μ g/ml 인슐린(Sigma), 10⁻⁷M 텍사메타손(Sigma), 105 μ g/ml의 철이 포화된 트랜스페린(Sigma), 4.4 \times 10⁻³M 니코틴아미드(Sigma), 0.2% 소혈청알부민(Sigma), 5 \times 10⁻⁵M 2-머캅토에탄올(Sigma), 7.6 μ eq/l 유리지방산, 2 \times 10⁻³M 글루타민(GIBCO/BRL), 1 \times 10⁻⁶M CuSO₄, 3 \times 10⁻⁸M H₂SeO₃와 항생제를 첨가한다. 위의 각각의 농도는 배지중의 최종농도이다. 배양 4주 후에 마이토마이신 C를 처리한 STO 마우스 배아섬유아세포주(American Type Culture Collection, Rockville, MD)의 피더 층에 트립신이 처리된 세포를 배양한다. Th1120-3, rter6 와 rhe14321은 태아 간장 세포의 3개의 독립적인 조제물에서 클로닝되고, HDM배양액에 STO 피더 세포 상에서 유지된다. 세포주 확립 후, 모든 배양에 관하여 EGF농도는 10ng/ml로 저하시켰다.

<49> 세포 접착 억제법.

<50> 피브로넥틴(Collaborative Biomedical Products), 라미닌 및 IV형 콜라겐에 대한 접착은 이들 단백질을 0.3~10 μ g/ml로 코팅한 96웰 마이크로타이터 플레이트(Corning, Cambridge MA)를 사용하여 평가한다. 200g에서 15분간 피콜(Pharmacia Biotech) 밀도구배 원심에 의해 STO세포를 제거한 후, 각 웰중에서 3 \times 10⁴세포의 간장 세포주 th1120-3, rter6 및 rhe14321을 HDM을 사용하여 10시간 배양한다. 부유 세포를 제거하기 위해 2회 린스한 후, 테트라졸리움염 WST-1(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)을 첨가하여 생존 가능한 접착세포의 수를 측정한다. 4시간 후, 제조원의 프로토콜에 따라 흡광도를 결정한다.

<51> STO 아계통(sublines)

<52> ATCC에서 얻은 STO 100개의 세포를 10%의 열로 불활성화한 태아 소혈청, 2 \times 10⁻³M 글루타민, 5 \times 10⁻⁵M 2-머캅토에탄올 및 항생제를 첨가한 DMEM/F12에서 100mm 배양접시에 7일간 배양한다. 세포 형태와 증식속도에 따라 다시 해석하기 위하여 4개의 서브클론을 선택한다. rter6의 CFA를 4개의 서브클론에서 행하나, 그들 중의 하나인 STO6는 마이토마이신C 처리 후에는 배양접시에 접착하지 않았다. 또 다른 서브클론 STO5를 윌터와 엘리자홀의 학연구소의 J. M. 아담스박사가 제공한 pEF-Hlx-MC1neo 또는 pEF-MC1neo로 트랜스펙션시켰다. *Nde I* 부위에서 선상으로 한 플라스미드를 DOSPER 리포솜 트랜스펙션 시약(Boehringer Mannheim)에 의해 세포 중에 도입한다. G418 선택 후, 6개의 클론이 분리되었다. 각 3개의 클론이 CFA로 분석되었다.

<53> 콜로니의 면역조직화학적 염색

배양접시를 메탄올-아세톤(1:1)으로 실온에서 2분간 고정한 후 20% 염소 혈청이 함유되어 있는 Hanks Balanced Salt Solution(HBSS)으로 4 $^{\circ}$ C에서 린스하고 블로킹한다. 알파-페토프로테인과 알부민의 이중면역 조직화학을 위해서, 플레이트에 항-랫트 알부민 항체(ICN 바이오메디칼, 코스타 메사, CA)로 처리 후에 텍사스 레드(Texas Red)-결합 항-토끼 IgG(Vector laboratories, Burlingame, CA) 및 FITC-결합 항랫트 알파-페토프로테인 폴리클론 항체(Nordic Immunology, Tilburg, Netherlands)와 인큐베이트한다. 알부민과 CK19의 이중표지에는 항 알파-페토프로테인 항체 대신에 항-CK19 단일클론항체(Amersham, Buckinghamshire, England) 및 FITC-결합 항-마우스 IgG(Caltag, Burlingame, CA)가 사용된다.

<54> E13의 태아 간의 분리

태아 간을 10mM HEPES, 0.8mM MgSO₄와 1mM EGTA(pH7.4)를 첨가한 Ca⁺⁺가 없는 빙냉 HBSS에서 절개한다. 간장은 10mM HEPES, 0.8mM MgSO₄ 및 1mM CaCl₂로 조제된 HBSS중의 0.2% IV형 콜라게나아제(Sigma)와 16.5 units/ml 서몰리신(Sigma)을 사용하여 분쇄한다. 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 인큐베이트한 후, 세포 현탁액을 0.025% 트립신과 2.5mM EDTA(Sigma)를 10분간 소화한다. 그런 다음, 1mg/ml 트립신 저해제(Sigma)를 첨가하여 트립신의 작용을 억제한다. 마지막으로 세포를 200units/ml 디옥시리보뉴클레아제 I (Sigma)로 처리한다. 모든 실험에서 하나의 간에서 3~5 \times 10⁵세포가 얻어진다.

<55> 성체 간 세포(adult liver cell)의 분리

간 세포를 분리하기 위하여 2단계의 간장 관류법이 이용된다. 관류 후, 세포를 50g에서 1분간, 2회 원심분리하여 커다란 실질 세포를 농축한다. 생존도는 트리판블루배제에 의한 측정에 의하면 >90%이다.

<56> 유동 사이토메트리 분석

세포를 FACScan(Becton-Dickinson, Mountain View, CA)으로 분석하고, Moflow Flow Cytometer(Cytomation,

Fort Collins, CO)를 사용하여 소오트한다. E13태아 간에서 얻은 세포 현탁액을 비특이적인 항체결합을 예방하기 위해서, 병상에서 20% 염소혈청(GIBCO/BRL)과 1% 경골류(硬骨類) 젤라틴(Sigma)를 함유하는 HBSS와 인큐베이트한다. 린스한 후에 세포를 FITC가 결합된 항맷트 RT1A^{a,b,1} 항체 B5(Pharmingen, San Diego, CA) 및 PE 결합 항맷트 ICAM-1 항체 1A29(Pharmingen)로 현탁한다. 일부 실험에서는 삼색 염색을 위해, 세포를 바이오티닐화 항-맷트 단형성 MHC class I 항체 OX18(Pharmingen)로 염색한 후, 스트렙타비딘-레드670(GIBCO/BRL)에 의한 제 2 염색을 했다. 모든 염색은 10mM HEPES, 0.8mM MgSO₄, 0.2mM EGTA 및 0.2% BSA(pH7.4)를 함유하고, Ca⁺⁺ 프리빙냉 HBSS를 사용하여 행한다. 확립된 3개의 세포주를 트립신을 처리하고, 피펫 밀도구배 원심분리하여 피더세포를 제거한다. 맷트의 간암세포주 FTO-2B와 맷트 간 상피세포주 WB-F344 및 성체 간 세포를 태아 간장 세포주와 비교하기 위해서 염색한다. 세포주들은 각각 포아니에 박사(Dr. R. E. K. Fournier, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) 및 소우 박사(Dr. M. -S. Tsao, University of North Carolina Chapel Hill, NC)가 증여하였다. 세포를 블록킹하고, FITC 결합 B5, OX18, PE 결합 1A29 또는 항 FITC 결합 맷트 인테그린 β1 항체 Ha2/5(Pharmingen)로 염색한다. OX18에는 FITC 결합 항 마우스 IgG를 사용한다. 마우스 세포군을 배제하기 위해서, 3개의 태아 간장 세포주의 세포현탁액을 바이오티닐화 항 마우스 CD98로 염색한 후, 스트렙타비딘-레드 670 및 항-맷트 모노클로날 항에 의한 제2의 염색을 한다.

세포마다 다른 상대수로 각종 항원이 발현된다. 실질적인 사용법에서는 특정 항원의 발현 정도는 발현 없음, 낮은 레벨의 발현, 많은 항원에 있어 통상의 발현 레벨 및 높은 레벨의 발현이 일어날 수 있다. 이 사용법에서는 "낮은(low)"란 용어는 약한(weak) 또는 무딘(dull)이란 용어와 호환적으로 사용된다. 발현의 정도를 더욱 상세하게 기술할 수 있지만, 많은 목적에는 이들 4개의 레벨로 충분하다. 예를 들어 유동 사이토메트리에 의한 항원 발현의 측정은 항원발현에 대한 연속적인 범위를 제공하는 것은 명백하다.

<57> *간장 세포주, 소오트한 세포, 성체 간 세포를 위한 CFA*

간장 세포주는 세포주의 유지에 사용된 것과 동일한 HDM을 사용하여 마이토마이신 C가 처리된 STO 피더 층에 9.6cm² 당 500개의 세포를 3개의 플레이트에 과종한다. 세포를 트립신 처리하여 피펫 밀도 구배 원심분리에 의해 피더세포를 제거한다. 배양액은 2일마다 배지를 교환하여 10~14일 동안 배양한다. 그런 다음, 알파-페토프로테인과 알부민의 이중면역 형광염색을 한다. 웰당 100개의 콜로니를 콜로니형태, P 또는 F형 및 알파-페토프로테인과 알부민의 발현에 대해 분석한다. 콜로니는 Diff-Quick(Baxter, McGaw Park, IL)을 사용하여 염색하여 각 웰의 콜로니 수를 계측한다. 초대(primary) 소오트한 세포 및 성체 간 세포의 CFA에서는, 전술한 바와 같이 과종하여 세포수를 변경한다. 또 다른 조그만 변경으로서, 배양기간을 14~17일 사이로 연장하고 텍사메타손의 농도를 10⁻⁶M로 높인다. 모든 다른 과정은 위에 언급된 것처럼 행한다. 성체 간 세포의 CFA에서는 조제 후, 세포 현탁액으로부터 소수의 간 세포 크럼프가 제거되지 않는다. 따라서, 크럼프로부터 불확정수의 콜로니가 생성될 가능성이 있다. 소오트된 세포에서 담즙분화의 CFA에서는 콜로니의 알부민 및 CK19의 이중면역 형광염색이 EGF 존재하 또는 부재하에서 배양 5일째에 행한다. 배양 5일째에 CK19⁺ 세포를 1개를 넘게 가진 콜로니는 CK19⁺ 콜로니로 계산된다. 10일 및 15일째에 2개의 CK19⁺ 세포의 클러스터를 다수 함유하는 콜로니, 또는 세개를 넘는 CK19⁺ 세포의 클러스터를 1개 포함하는 콜로니는 CK19⁺ 콜로니로서 계산한다. 각 웰당 약 100개의 콜로니가 측정된다. 각각의 포인트는 삼중으로 염색된 배지에서 나온 평균±SD를 나타낸다.

<58> **실시예 2. 호르몬 첨가 규정배지를 이용한, 마우스 배아세포의 피더를 이용한 태아 맷트 간장 세포주의 생성 및 특징**

<59> 어느 정도의 기간에서 태아 간장 세포가 생체 외에서 증식하여 자손을 생산시킬 수 있는지를 확인하기 위해, 맷트 E15 간장 세포의 단순한 장기 배양을 시도해 보았다. 조혈단핵세포를 제거하기 위해 밀도구배 원심분리 후, 태아 간 세포(fetal liver cell)를 IV형 콜라겐 또는 라미닌으로 코팅한 배양접시 및 HDM(실시예 6.1 참고)를 사용하여 배양한다. 세포가 4주 이상 동안 생존한다. 그러나 새로운 IV형 콜라겐 및 라미닌이 코팅된 배양접시에서의 2차 배양에서는 더 이상 증식하지 않는다. 마이토마이신C를 처리한 STO 배아 마우스 섬유아세포주를 2차 배양에서 피더 층으로 사용하면, 많은 세포 덩어리가 증식한다. 최종적으로 4개의 독립된 실험에서 몇 가지 안정적인 간장 세포주가 확립된다.

<60> 알파-페토프로테인 및 알부민의 면역조직 분석은, 세포주의 클로닝 전에 연속적으로 증식하는 세포군에서 행하여진다. 알파-페토프로테인 및 알부민의 양쪽 단백질은 세포군이 간세포계 기원인 것을 확인하기 위해 마커로

사용한다. 세포 더미를 형성하려는 경향이 있는 세포군은 P-콜로니라고 하고, 이는 알파-페토프로테인 및 알부민을 강하게 발현한다. 반면에 F-콜로니라고 불리는 평평한 단층은 알파-페토프로테인의 발현이 저하하고, 알부민을 발현하지 않았다. 배아 마우스 섬유아세포, STO는 어떠한 항체에 대한 반응도 보이지 않는다. 더욱이, 해석하기 위해, P형 또는 F형 이라는 형태적인 기준에 의해, 독립적인 실험에서, 3개의 클로닝된 간장 세포주가 선택된다. Rhe14321(도 1a)는 주로 작은 세포로 채워진 P형 콜로니로 구성되어 있는 반면, th1120-3(도 1c)는 F형 콜로니의 평평한 단일층을 형성한다. Rter6(도 1b)는 이 2개의 표현형의 중간이다. 흥미롭게도 rter6의 불균일성은 평평한 콜로니의 3회 연속 클로닝 후에도 관찰되었다. Rhe 14321 및 rter6의 단일세포 유래 콜로니의 불균일성을 알아보기 위해서, 9.6cm² (6-웰 플레이트의 1개의 웰)당 500개의 세포 밀도로 파종하고, 세포를 STO 섬유아세포상에서 10~14일간 배양했다. 그런 다음, 콜로니의 형태 및 알파-페토프로테인 및 알부민의 발현의 해석을 행했다. 도 2a, 2b, 2c, 2d, 2e와 2f에서 그 결과를 나타낸다. 세포주, rhe14321(도 2b)과 rter6(도 2c)의 세포주 및 클로닝하기 전의 최초의 세포군에서 거의 모든 P형 콜로니는 강한 알파-페토프로테인을 발현하는 반면에, 세포의 F형 콜로니는 발현하지 않았다.

<61> 게다가, 알파-페토프로테인과 알부민 양쪽의 강한 발현은 P형 콜로니에서만 관찰된다. 클로닝된 간장 세포주의 형태적 차이는 P형 콜로니(도 2b와 2c)비율과 상관하고 있다. Rter6와 rhe14321의 CFA에서 P형 콜로니의 비율은 각각 33.3%(±8.6% SD)와 65.7%(±4.0%SD)이다. 1웰당 총콜로니수를 세어 클론 증식효율(콜로니 효율)을 계산한다. Rter6 및 rhe14321의 효율은 각각 45.7%(±1.3% SD)와 36.4%(±1.1% SD)이다. Th1120-3세포는 측면 경계에 따라 서로 단단하게 접촉하고 있어 단세포액의 조제를 매우 어렵게 한다. 그러나 th1120-3세포는 쌓여서 클러스터를 형성하지 않는다.

<62> 마우스 간 세포의 라미닌, IV형 콜라겐 및 피브로넥틴과 같은 세포의 매트릭스(ECM) 단백질에 대한 접촉은 발생 단계에 따라 다르기 때문에 각 세포주가 특정의 ECM 성분에 접촉할 때의 선택성을 다음에 조사하였다. 성체 간 세포에서의 소견과 동일하게 IV형 콜라겐은 이는 마우스간장 세포가 접촉하는 것은 발달단계마다 다르기 때문이다. 타입 IV이 성체 간장 세포의 조사결과와 유사하게 th1120-3의 접촉에 가장 효과적이거나(도 1c), rter6(도 1b)와 rhe14321(도 1a)에서는 그 정도는 아니었다. 라미닌은 rhe14321(도 1a)의 접촉에 가장 유효한 기질이다. 이러한 선택성은 마우스 태아 간 세포의 초대배양과 동일하다. 요약하면, P형 콜로니에서의 알파-페토프로테인 및 알부민의 보존된 발현과 rhe14321에 의한 라미닌에의 우선한 접촉은 P형 콜로니를 생산하고 있는 세포군이 보다 엄밀히 간 전구세포와 관련되어 있음을 시사한다.

<63> **실시예 3. 콜로니 형성을 위한 STO의 서브클론의 분리; 간 전구세포의 분석**

<64> 증식능력이 높은 양능성 간 전구세포를 동정하기 위한 CFA 시스템을 개발하기 위하여, 배양계는 클론 파종 밀도에서 세포의 증식을 지지하고, 중요한 본래의 간기능을 보존하는 것이어야만 한다. 초기 간장 발생에 가장 중요한 마커중 2개가 알부민 및 알파-페토프로테인이다. F형에서는 아니고, P형 콜로니가 클론 증식 동안 알파-페토프로테인과 알부민의 발현을 지지하기 때문에 P형 콜로니를 최적화하는 배양 조건이 최량이다. 따라서, rter6의 P형 콜로니를 지지하는 STO 서브클론의 능력이 비교된다. 1개의 클론 STO5는 다른 모든 서브라인 및 친주 라인 이상으로 P형 콜로니 형성을 지지한다(도 2d). 또한 rhe14321의 CFA도 STO5가 친STO보다도 유효한 피더인 것을 확인한다(도 2e). E10.5의 소화관의 내부를 덮고 있는 중간엽 세포에서 발현되는 마우스 H1x 유전자 생성물은 태아 간장 세포의 증식에 필수이다. 비록 H1x 유전자의 mRNA 발현이 모든 STO 서브클론에서 분석되지만, 서브클론 사이에서의 발현의 유의한 차는 없다(데이터 미제시). 더욱이, 마우스 H1x의 STO5중의 안정한 트랜스펙턴트(transfectant)는 콜로니 형성 앗세이법을 개선하지 않는다(도 2f). 그러나 트랜스펙턴트 중 1개의 클론은, 비교적 고밀도의 계대에서 STO5의 본래형태를 보다 안정적으로 지속시키기 때문에, 이 클론은 보다 심화된 실험에 사용된다.

<65> **실시예 4. 표면 항원 마커 및 콜로니 형성 앗세이법을 이용한 E13 태아 간으로부터 간 전구세포의 동정**

<66> 간 형성(hepatopoiesis)과 대량의 조혈은 태아 간에 공존한다. 지금까지 조혈 전구세포의 항원성 프로파일은 널리 분석되어 왔으나, 초기 간 전구세포의 연구는 아직 초기 단계이다. 본 연구에서 확립된 3개의 간장 세포주, 즉 성체 간암 세포주(FTO-2B), 성체 랫트 간 유래의 상피 세포주(WB-F344) 및 신선하게 분리된 성체 간 세포를 이용하여 간장 세포의 항원 프로파일이 분석되었다. FTO-2B, WB-F344 및 성체 간 세포와 비교하여 가장 미숙한 태아 간장 세포주, rhe14321은 고전적 MHC class I(RT1A¹)의 발현이 없다는 점에서 매우 독특하다(도 3a-3x). 세포 주, th1120-3(도 3i-3l)은 RT1A¹, OX18 (pan-MHC class I) 및 ICAM-1의 패턴이 rhe14321(도 3a-3d)과 유사한 반면, rter6(도 3e-3h)은 RT1A¹과 OX18 (도 3)의 발현이 비교적 높다. 나아가, 다른 실험으로부터 얻어진

rhe14321과 동일한 형태를 가지나, 역시 RT1A¹⁻, OX18^{du11} 및 ICAM-1⁺이다. 인테그린 b1의 발현은 모든 세포주에서 유사하나, RT1A^{a,b,1} 및 ICAM-1의 패턴은 세포에 있어서 독특하다. 성체 간 세포의 항원성 프로파일은 RT1A¹⁺, OX18⁺ 및 ICAM-1⁺이다. 성체 랫트중에서는 적혈구를 제외한 모든 골수 세포가 MHC class I 분자를 강하게 발현하기 때문에, 태아 간 세포군은 MHC class I 발현에 의하여 조혈 세포 집단으로부터 분리될 수 있다. 랫트 E13 간에서 얻어진 세포 현탁액을 항 RT1A¹ 및 ICAM-1 항체에 염색된다. 도 4a는 RT1A¹과 ICAM-1의 2가지 색으로 염색하는 패턴을 나타낸다. 어떤 획분에 간장 세포군을 함유하고 있는지를 결정하기 위해, 형광 활성화 세포 소오트에 의하여 5개의 획분으로 분리한 후, 클론 증식능력을 CFA로 스크리닝한다. 도 4b는 소오트 후의 5개의 획분의 재 소오트 결과를 나타낸다. 알부민 및 알파-페토프로테인의 발현으로 정의되는 간장 세포 콜로니는 형태적으로도 구별되기 때문에, 각 웰의 간 콜로니의 수를 세는 것이 가능하다. 간 콜로니의 대부분은 RT1A^{1du11} 및 ICAM-1⁺의 게이트에서 검출되고(표1, 도 4b gate 2), P형 콜로니의 빈도는 75.6%(±4.9% 표준편차)이다. 게이트 1은 매우 적은 수의 콜로니를 나타내고, 다른 획분의 콜로니 형성능력을 갖는 세포수는 무시해도 좋을 정도로 적다. Gate 1 및 Gate 2에서는, 모든 간 콜로니에서, 알파-페토프로테인 및 알부민의 양쪽의 발현이 확인된다. Gate 2의 세포에서 유래하는 콜로니는 다른 것보다 크다. 간장 세포에서의 MHC class I의 발현을 자세히 조사하기 위하여, 세포분획을 위하여 RT1A¹, ICAM-1, OX18의 삼색 염색 및 또 하나의 파라미터로서 측방 산란광(SSC)이 사용된다. 태아의 간장 세포는 E11이라는 조기 태령에서도 지질 방울을 포함하고 있기 때문에(Luzzatto, 1981), 세포의 입상도를 반영하는 측방광산란(SSC)은 조혈 세포로부터 간세포를 분리하기 위하여 유용한 파라미터이다. 도 4c는 게이트 2에 가장 많은 수의 콜로니 형성 세포를 포함하고 있음을 나타낸다. SSC에 기초하여 R2에서 게이트를 걸면, gate 2에 대응하는 세포군은 명백히 RT1A¹⁻ 및 OX18^{du11} 표현형을 나타낸다(도 4c, 4d). CFA에 의해 R4에는 게이트 2보다 더 많은 콜로니 형성 세포가 포함되어 있음을 확인하였다(표1). 이들 결과는 E13 랫트 간으로부터 얻어진 RT1A¹⁻, OX18^{du11} 및 ICAM-1⁺ 세포군의 대부분이 알파-페토프로테인⁺ 및 알부민⁺ 콜로니를 생산하는 간장 세포임을 시사한다. 이것은 rhe14321 세포에서 보여지는 항원성 프로파일과 동일하다(도3).

<67> [표 1] RT1A와 ICAM-1의 발현에 기초한 소오트된 E13 태아 유래의 간 콜로니 빈도수

Gate	접종된 세포(웰당)	간 콜로니(웰당)	콜로니 형성의 효율(%)
1	1000	8.7±4.0	0.87
2	500	136.3±4.6	27
3	5000	10.0±7.9	0.13
4	5000	6.3±0.6	0.13
5	5000	5.0±1.0	0.10
R3	1000	7.0±2.6	0.70
R4	500	269.3±9.8	54

<68> ST05h1x상에서의 콜로니 형성 배양은 E13 태아 간의 각 획분으로부터 얻어지는, 나타난 수의 세포를 나타낸다. 간 콜로니의 수는 삼중 염색 배양으로부터 얻어졌다(평균±표준편차). 콜로니 형성의 효율은 배양액에 접종한 세포중, 16일 배양 후에 분석한 바, 콜로니를 형성하도록 한 비율을 나타낸다.

<69> **실시예 5. E13 간장 세포(hepatic cell) 및 성체 간 세포(adult liver cells)의 다른 배양조건**

<70> E13 간장에서 얻어진 소오트된 간장 세포의 성장요건은 결정된 ST05 피더 및 HDM을 이용하여 조사하였다. EGF는 성체 간 세포의 강력한 증식 인자인 것이 이전부터 알려져 왔다. 따라서, 소오트된 간장 세포의 콜로니 형성에 대한 EGF의 효과를 조사하였다. RT1A¹⁻, OX18^{du11}, ICAM-1⁺ 간장 세포의 콜로니 크기는 EGF가 없을 때 보다 크게 되는 반면, 성체 간 세포는 EGF가 있을 때에만 콜로니를 생성한다. 나아가, 성체 간 세포로부터 유래된 콜로니의 형태는 통상 F형인 반면, 모든 RT1A¹⁻ 간장 세포는 EGF 없이 P형의 콜로니를 형성한다. 그러나, 콜로니의 효율은 EGF가 없으면 약간 감소한다(도 6a). 흥미롭게도, EGF가 없는 배양조건은 2종류의 P 콜로니, 즉, P1과 P2를 강조한다. 배양 12일 째에 콜로니의 대부분은 P2형이나, 도 6a에서와 같은 전형적인 형태를 갖지 않기 때문

에 2개의 타입을 명확히 구별하기는 어렵다. 이러한 결과는 태아 간장 세포와 성체 간 세포는 그의 증식 및 RT1A¹의 발현 (도3 및 도 4) 및 콜로니의 형태에 있어서 본질적으로 다르다는 것을 시사하고 있다.

<71> 배양 3주 후, 증식이 최대에 이르렀을 때, RT1A¹⁺, OX18 및 ICAM-1의 발현을 평가했다. 도 5b~5d에 나타난 바와 같이, RT1A¹의 발현은 유도되지 않은 반면, OX18의 발현은 저하하고 있다. ICAM-1의 수준은 변함이 없었다. 또한, 단일 콜로니의 평균 세포수를 회수한 세포수, 랫트 간장 세포의 비율 및 콜로니 효율로부터 계산한다. 추정된 세포의 수는 3~4×10³ (표 2)에 이른다. 이것은 콜로니를 형성하는 단일 세포가 본 배양 조건에서 평균 약 11~12회 분열한 것을 나타낸다.

<72> [표 2] 단일 간 콜로니의 세포수 계산

접종된 세포수	접종밀도 (세포/cm ²)	배양기간 (일)	회복된 세포수	랫트 세포 비율(%)	콜로니 효율(%)	단일 콜로니의 평균 세포수
500	18	18	1.5 x 10 ⁶	58	41	4.2 x 10 ³
4000	51	21	6.0 x 10 ⁶	90	44	3.1 x 10 ³
4000	51	20	4.0 X 10 ⁶	69	21	3.3 x 10 ³

<73> 도 4c의 R4에서 소오트된 세포는 60mm 또는 100mm 접시에서 ST05h1x 피더 상에서 배양하였다. 나타난 기간 배양한 후, 모든 세포를 회수하고, 총세포수를 계산되었다. 랫트 세포의 비율은 랫트 ICAM-1 및 마우스 CD98의 발현에 기초한 유동 사이토메트리 분석에 의한다. 콜로니 효율은 배양에 접종된 세포중, 콜로니를 형성한 것의 비율을 나타낸다. 삼중 염색 배양(평균)으로부터 얻은 데이터는 함께 행한 실험으로부터 얻어졌다.

<74> 단일 콜로니의 평균 세포 수 = (회수된 세포 수×랫트 세포의 비율/100)/접종된 세포 수×콜로니 효율/100)

<75> **실시예 6. RT1A¹⁺ 간 전구세포의 양능성에 대한 증명**

<76> 랫트의 임신 E13에서 간장 세포는 성숙한 간세포와 담관 상피를 발생시키는 양능성 전구세포로 생각되어져 왔다. 그러나 본 발명 이전에는 2개의 운명이 단일 세포에서 유래하는 것인지에 대한 직접적인 증거는 없었다. RT1A¹⁺ OX18^{du11} ICAM-1⁺ 태아 간장 세포가 본 배양계에서 담즙 계통으로 분화할 수 있는지 없는지를 알아보기 위하여, 담관 상피 세포에 특이적인 마커로서 항-CK19로 콜로니를 염색하였다. CK19는 태아 랫트 간 15.5일 이후에 담관 상피 전구체에서 발현되며, 이 시점에서 세포의 알부민 발현이 소실된다. 소오트된 RT1A¹⁺ ICAM-1⁺ 세포는 EGF가 존재하 또는 부재하에서 배양되고, 그의 운명은 배양 5일 후에 CK19 및 알부민의 발현에 의해 모니터 된다. 처음 5일 후에 EGF로 처리된 배양물에서는 CK19⁺ 콜로니는 거의 없으나, EGF가 없는 배양물에서는 CK19⁺ 세포를 함유하는 콜로니가 약간 나타난다. CK19의 발현의 정도는 매우 약하지만, CK19⁺ 세포에서는 알부민 발현이 감소하고 있다. 배양 후 10일째에 일부 콜로니가 CK19 또는 알부민만을 발현하고, 그 외 콜로니는 양쪽 양성 발현을 나타낸다. 단일 콜로니에서 CK19⁺ 및 알부민⁺ 세포의 패턴은 상반된다. 양쪽 양성 콜로니 및 CK19만 양성인 콜로니의 수는 역시 EGF가 없을 때 더 많다(도 6a). EGF가 있을 때에는, 배양 후 10일 째에는 많은 콜로니들이 알부민⁺ 세포로만 구성되어 있다 (도 6b). 최종적으로 양쪽 양성 콜로니의 수는 15일 째에 EGF 부재하에서 거의 100%에 이른다(도 6a). 요컨대 EGF는 배양을 통하여 CK19⁺ 콜로니의 출현을 극적으로 억제한다(도 6b). 이러한 결과는 E13 태아 간에서 얻은 RT1A¹⁺ OX18^{du11}, ICAM-1⁺ 세포가 담관 세포계로 분화할 수 있고, 그들의 운명은 시험관 내에서 EGF에 의해서 영향을 받을 수 있다는 것을 시사한다(도 7).

<77> **실시예 7. 간 줄기세포 및 간 전구세포의 클론 증식을 지지하는 능력이 있는 피더 세포의 분리 및 클로닝을 위한 프로토콜**

<78> 돼지, 비글, 토끼, 마우스 또는 원숭이의 신선한 배아 조직 또는 동결 조직(예를 들면, 간, 폐, 신장, 근육, 장)을 칼슘을 함유하지 않는 인산 완충 위생 식염수(PBS)중에서 잘게 썬다. PBS로 2회 세정한 후, 세포 현탁액은 0.25% 트립신으로 37℃에서 10분간, 또는 상온에서 60분간 마그네틱 교반기를 사용하여 교반하면서, 세포현탁액을 인큐베이트한다. 남은 세포 덩어리는 메쉬로 여과하여 제거한다. 이후, 세포를 혈청(예를 들면, 10% 소태아혈청) 및 임의의 각종 증식 보충제(예를 들면, 2mM 글루타민, 피루브산나트륨, MEM 비필수 아미노산)를 첨

가한 기초 배지(예를 들면, Eagle's MEM)를 이용하여 조직 배양 접시에서 배양된다. 플라스틱 기저 및 무혈청 첨가배지는 많은 경우, 중배엽 유래(예, 기질세포)인 지지세포(피더 세포)의 후보인 세포군의 증식을 가능하게 하고, 또 다른 세포(예, 전구세포)의 생존, 증식 및/또는 기능을 지지하는 인자를 제공하는, 일반적인 조건이다. 피더 세포는 콘플루엔트 또는 그에 거의 되면 0.05% 트립신을 사용하여 계대 배양한다. 수회 계대 배양한 후, 증식한 세포를 동결 스톱으로 조제하고, 사용될 때까지 동결 보존한다. 피더 세포의 또 다른 공급원은 시판의 초대배양 피더세포 또는 피더 세포주이다. 어떠한 경우에도 적당한 피더 세포를 동정하기 위하여는 하기 기준이 필요하다.

<79> 피더 세포는 하기를 지지한다:

<80> 1) 고전적 MHC class I 항원 음성, ICAM-1 양성 및/또는 비고전적 MHC class I 항원 양성의 표현형 마커를 갖는 간 전구세포의 클론 증식;

<81> 2) 고전적 MHC class I 항원 음성, ICAM-1 양성, 비고전적 MHC class I 항원 약 양성, 알파 페토프로테인 양성, 알부민 양성 또는 CK19 양성의 표현형 마커를 갖는 자손을 갖는 전구세포의 클론 증식; 또는

<82> 3) 양성성 간 전구세포의 정의에 필요한 간세포계 및 담관 세포계의 양쪽으로의 유도 가능한 분화.

<83> 당해 분야에서는, 고전적 MHC class I 항원은 MHC class Ia 항원으로서도 알려져 있다. 비고전적 MHC class I 항원은 MHC class Ib 항원으로도 알려져 있다. MHC 항원은 서로 다른 종에 있어서 상이한 호칭을 가지고 있다. 예를 들면, 랫트의 RT1, 마우스의 H-2, 사람의 HLA이다.

<84> 상기 앓세이법은 다음과 같이 설명된다:

<85> 간 전구세포의 클론 증식 조건

<86> 간 전구세포는 증식을 억제한, 증식하지 못하도록 처리된 피더 세포 상에 9.6cm²당 500세포를 접종한다. 피더 세포는 마이토마이신 C 또는 방사선 조사(세포의 종류에 따라 3000~5000 rads)로 처리하여 증식을 정지한다. 증식 정지된 피더 세포 및 전구세포에는 무혈청 HDM을 공급한다. 예를 들면, 설치류 세포용 HDM은 Dulbecco's modified Eagle's 배지와 Ham's F12의 1:1 혼합물에 10ng/ml EGF, 5μg/ml 인슐린, 10⁻⁶M 텍사메타손, 10μg/ml 철 포화 트랜스페린, 4.4×10⁻³M 니코틴아미드, 0.2% 소혈청 알부민, 5×10⁻⁵M 2-머캅토에탄올, 7.6 μeq/I 유리 지방산, 2×10⁻³M 글루타민, 1×10⁻⁶M CuSO₄, 3×10⁻⁸M H₂SeO₃ 및 항생물질이 첨가된 것이다. 배양액은 2일마다 교환하면서 10~14일 동안 인큐베이트한다. 그런 다음, 알파 페토프로테인, 알부민 및/또는 CK19의 이중 면역형광 염색을 행하여 자손의 운명을 동정한다. 알파 페토프로테인과 알부민의 발현에 의해 약 100 콜로니가 분석된다. 또한, 콜로니 형태, P형 또는 F형인가도 자손의 동정에 유용하다.

<87> 삭제

<88> 피더 세포 및 간 전구세포의 이상적인 조합은 동일한 종으로부터 얻어진 것이다. 바람직하게는 피더 세포는 간 전구세포와 동일한 조직 및 동일한 종으로부터 얻어진다. 그러나, 1개의 종에서의 피더와 다른 종으로부터의 전구 세포를 혼합하는 것도 가능하다. 예를 들면, 설치류의 피더 세포의 경우에도, 사람 간 전구에 사용될 수 있다. 가용성 또는 불용성 인자(종 및/또는 조직-특이적인 가능성이 있다)는 간 줄기 세포 또는 간 전구세포의 클론 증식을 도와준다. 이들 인자들의 공급원은 다음과 같다:

<89> 1) 최적의 종과 조직의 피더 세포를 배양한 조건 배지. 피더 세포는 기질 세포가 아니라면 어떠한 세포 형태라도 좋다.

<90> 2) 중요한 인자가 알려진 경우에는, 간 전구세포에 활성을 나타내는 최적인 피더 세포에 유래하는 적절한 분자(시그널)를 합성하기 위해, 각각 전사 또는 번역을 위한 cDNA 또는 mRNA를 임의의 세포에 도입함으로써 생물 활성이 있는 피더 세포군을 제작할 수 있는 공급원.

<91> 3) 간 전구세포에 활성인 최적 피더 세포에서 얻어진 시그널이 단백질, 펩티드, 탄화수소, 리피드, 당펩티드, 당단백질, 리포단백질, 당지질 또는 그의 조합에 관계없이, 중요한 인자가 알려진 것인 경우에는, 그와 같은 시그널을 배지에 첨가함으로써 피더 세포를 완전히 치환할 수 있는 공급원.

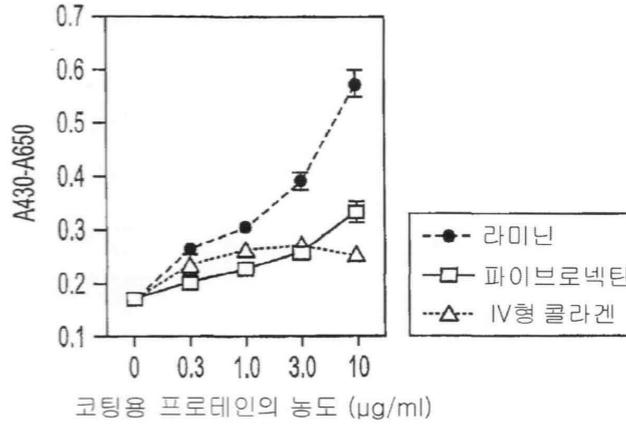
<92> 상기 실시예는 예시를 위해서만 서술한 것이며, 본 발명의 범위 또는 실시태양을 제한하는 것은 아니다. 상기에

특히 설명되지 않은 다른 실시 태양도 당업자에게 명백할 것이다. 그러나, 그와 같은 다른 실시태양도, 본 발명의 범위 및 정신에 포함되는 것으로 고려된다. 그러므로, 본 발명은 첨부된 청구범위에 의해서만 올바르게 한정된다.

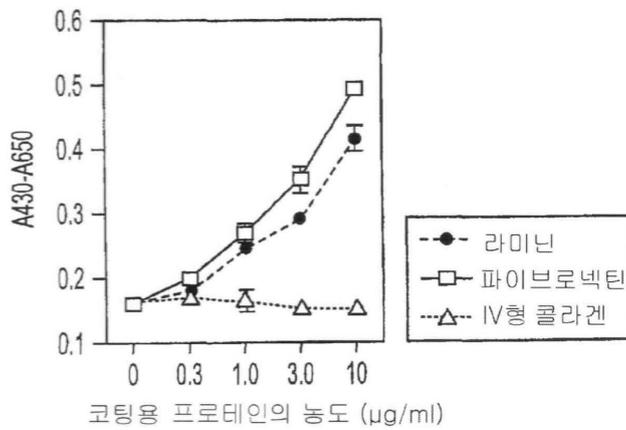
<93> 본 명세서에서 인용된 모든 특허 및 출판물은 그의 전체가 참고로서 본 명세서에 추가된다.

도면

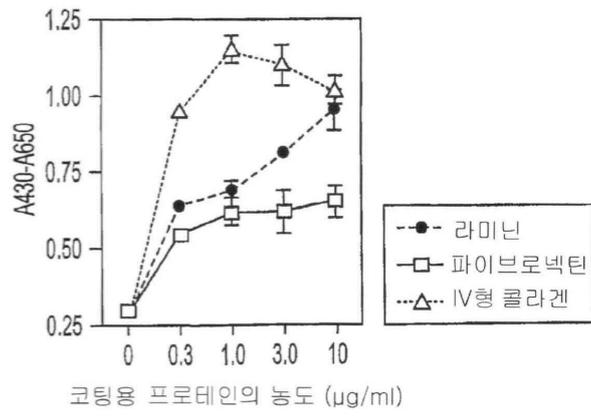
도면1a



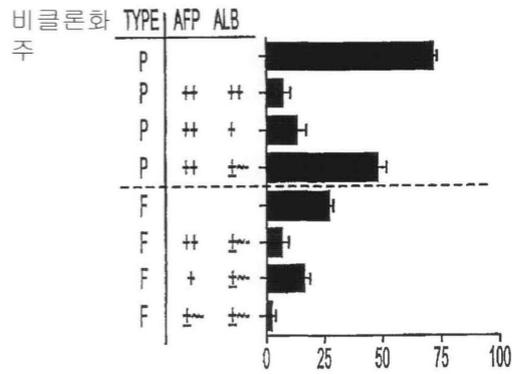
도면1b



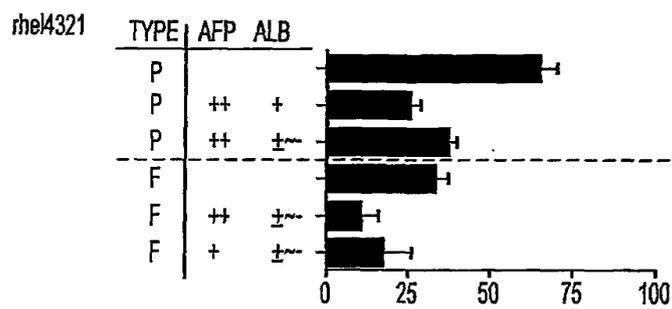
도면1c



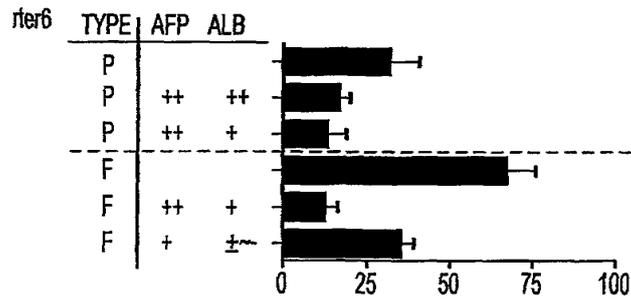
도면2a



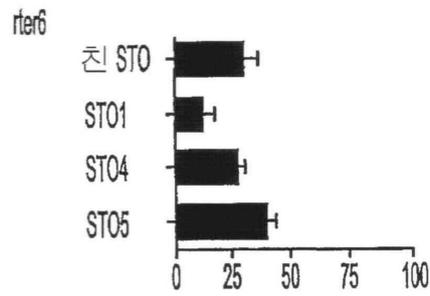
도면2b



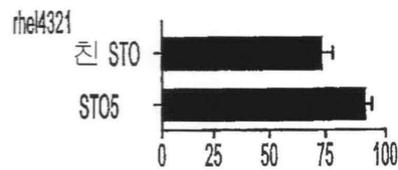
도면2c



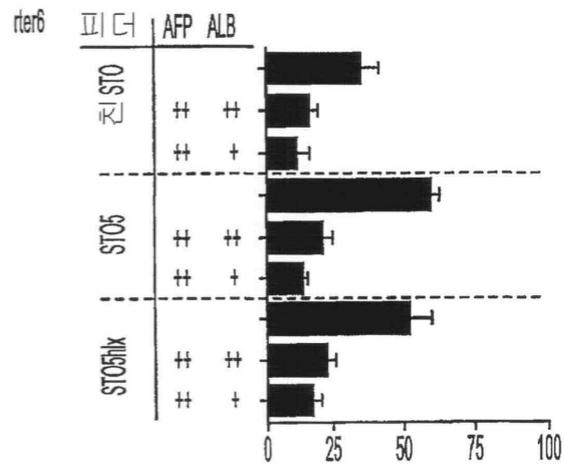
도면2d



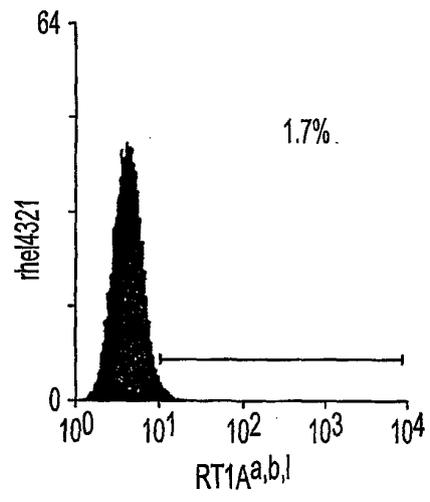
도면2e



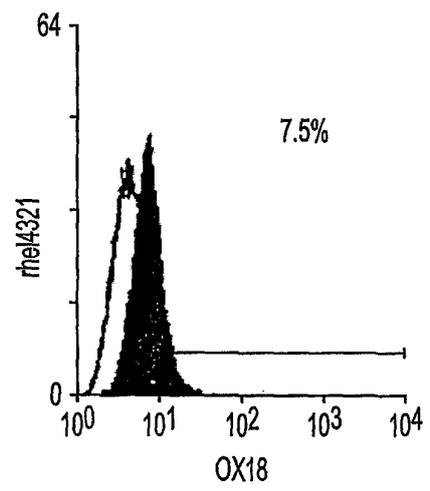
도면2f



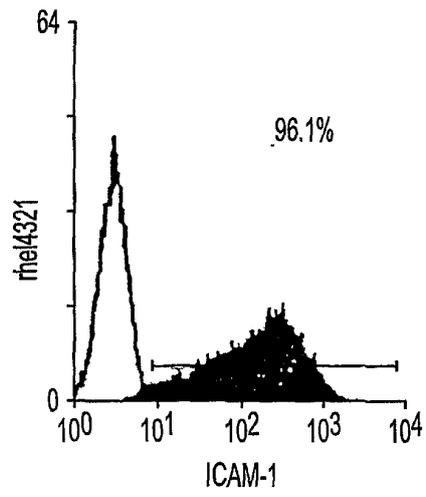
도면3a



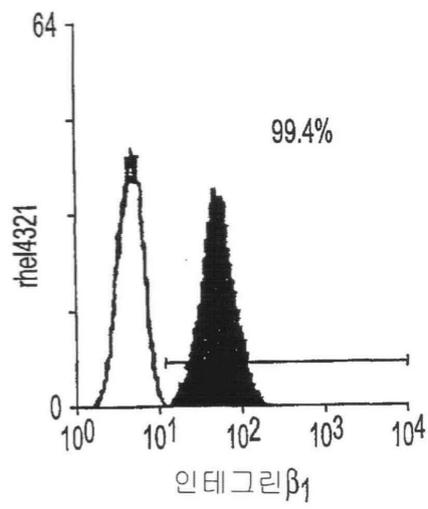
도면3b



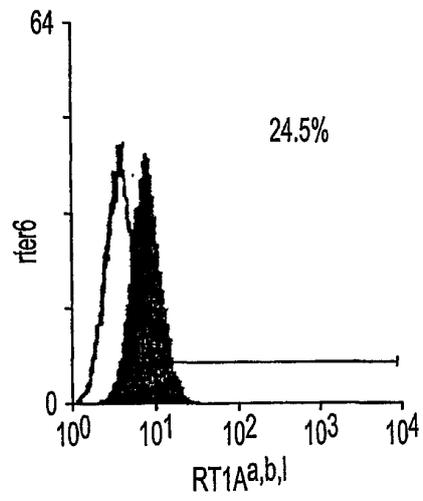
도면3c



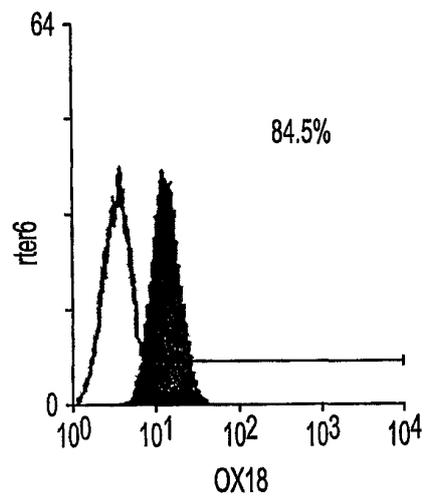
도면3d



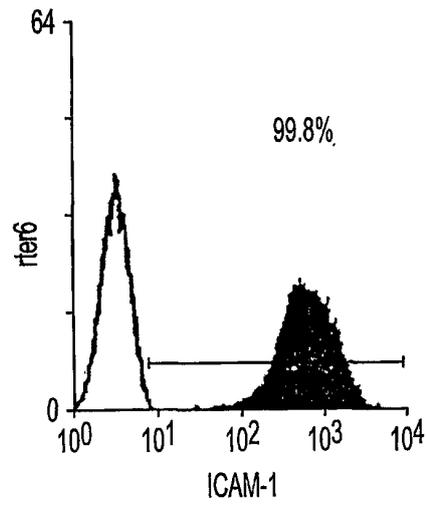
도면3e



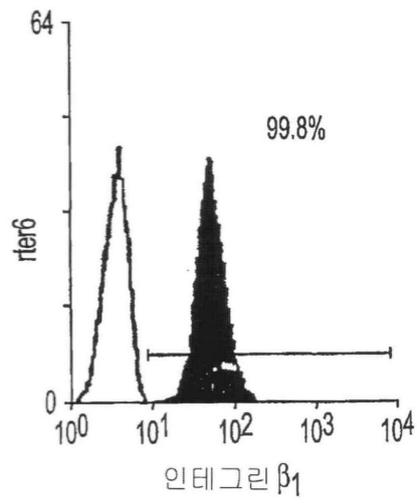
도면3f



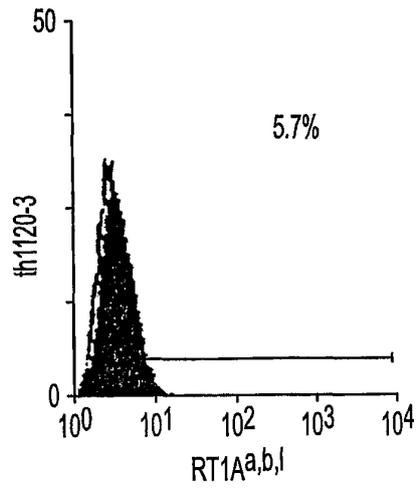
도면3g



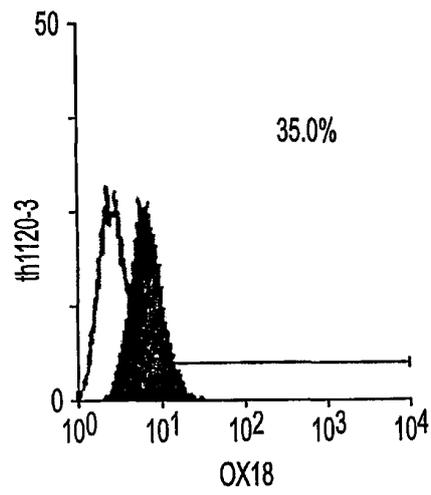
도면3h



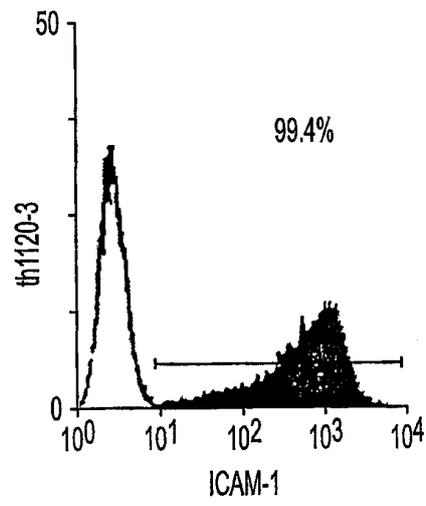
도면3i



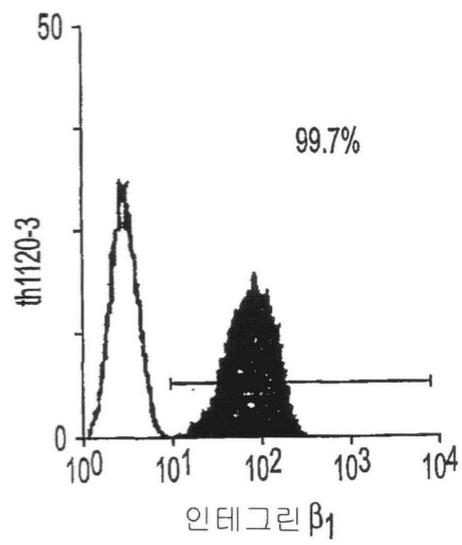
도면3j



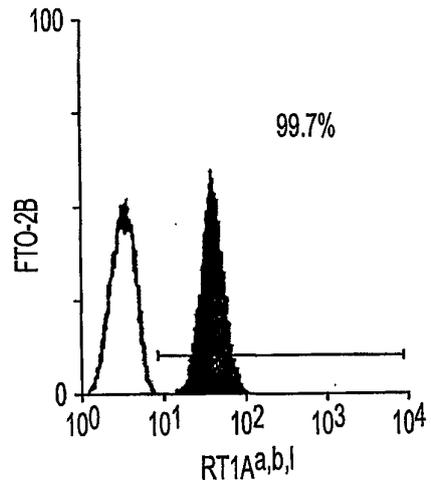
도면3k



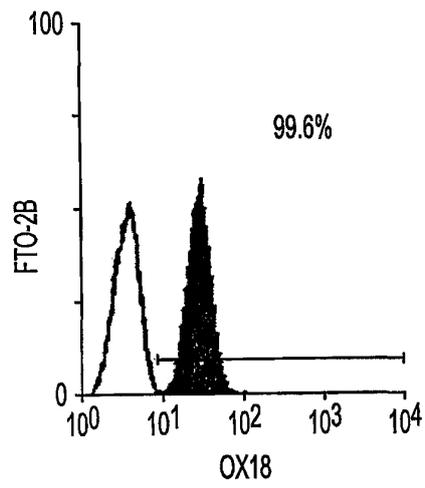
도면3l



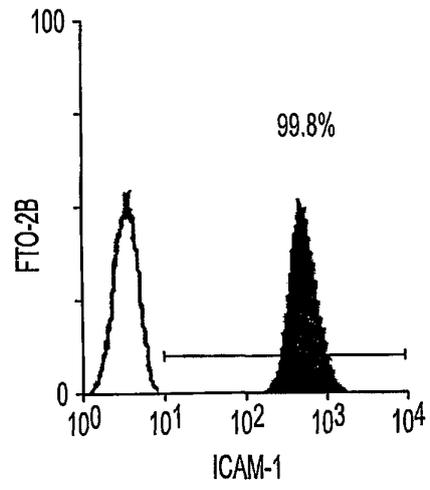
도면3m



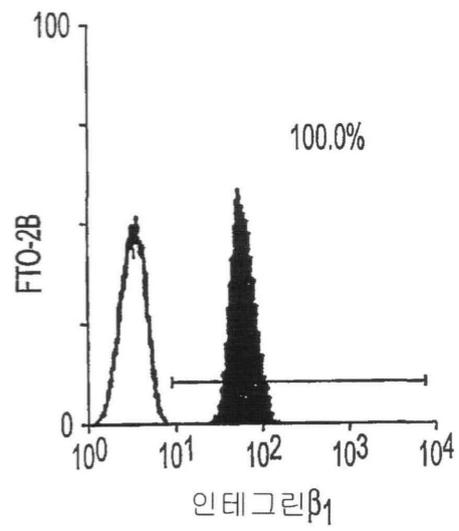
도면3n



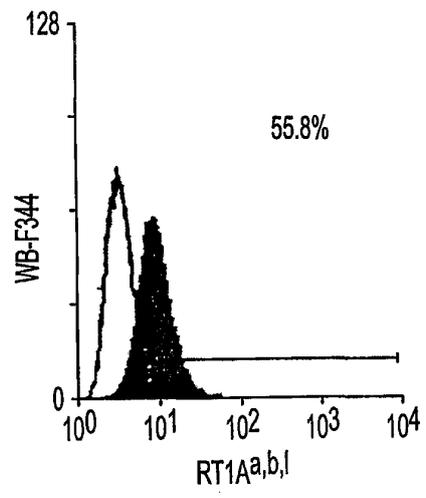
도면3o



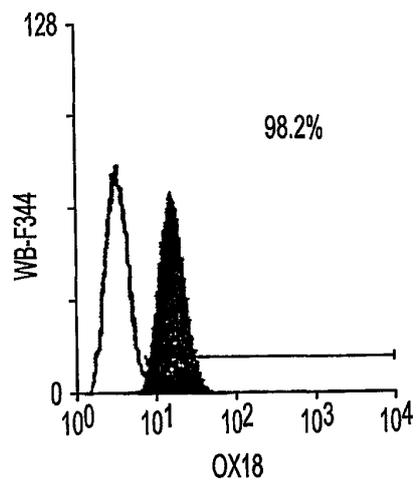
도면3p



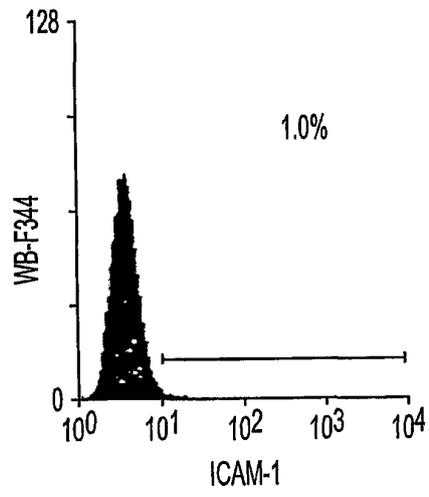
도면3q



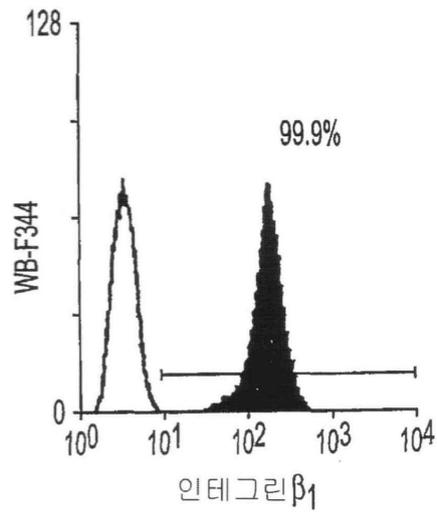
도면3r



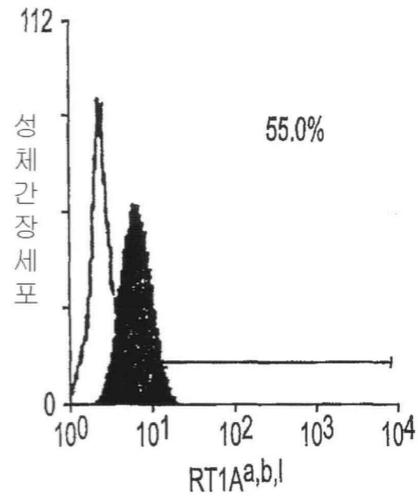
도면3s



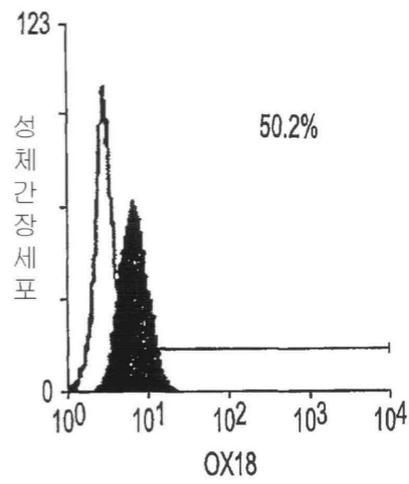
도면3t



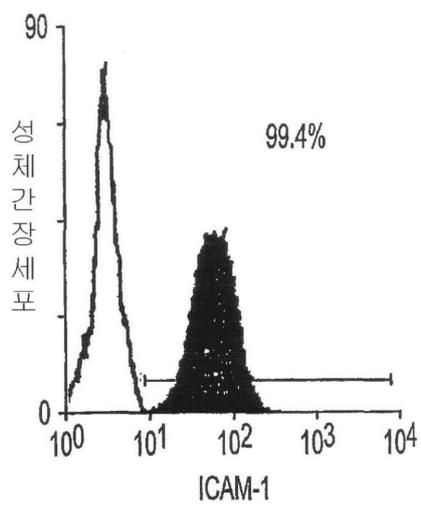
도면3u



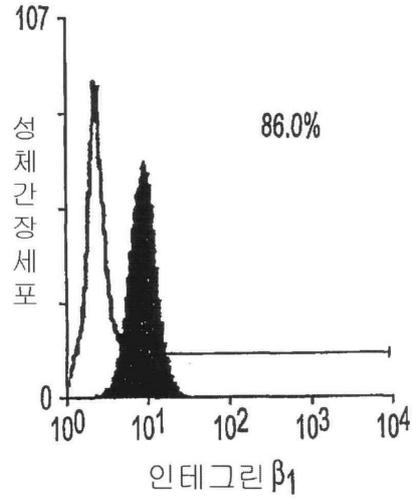
도면3v



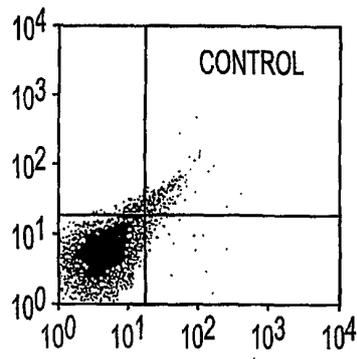
도면3w



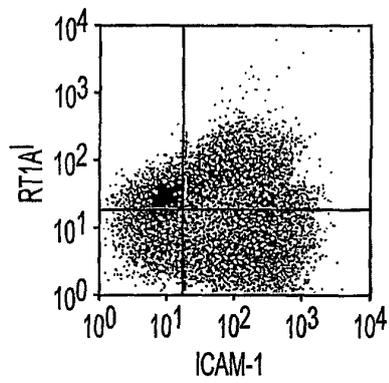
도면3x



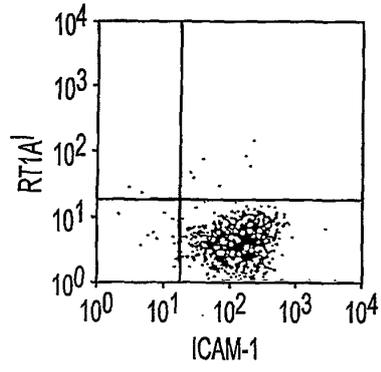
도면4a-1



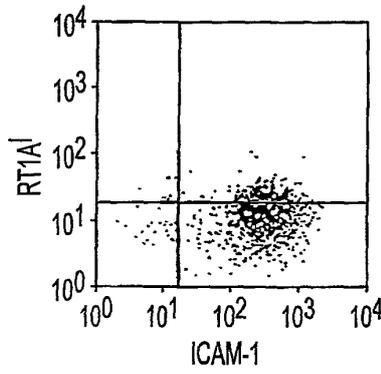
도면4a-2



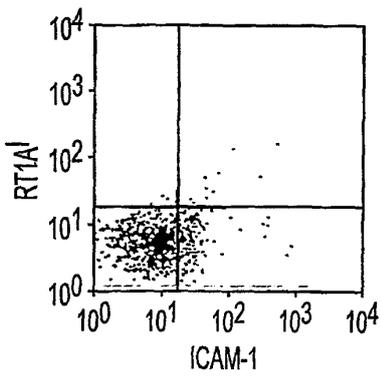
도면4b-1



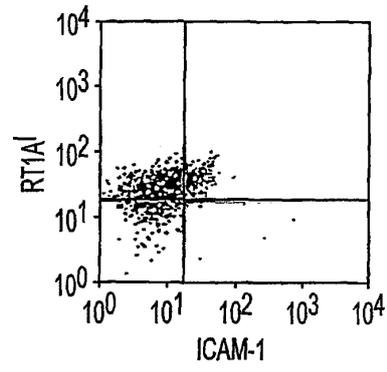
도면4b-2



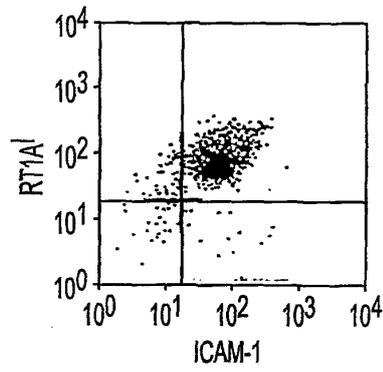
도면4b-3



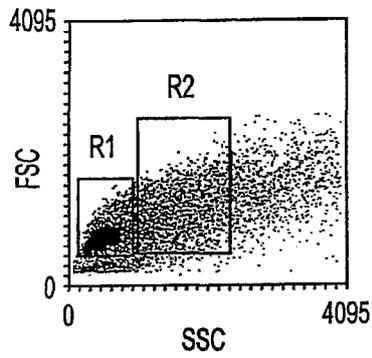
도면4b-4



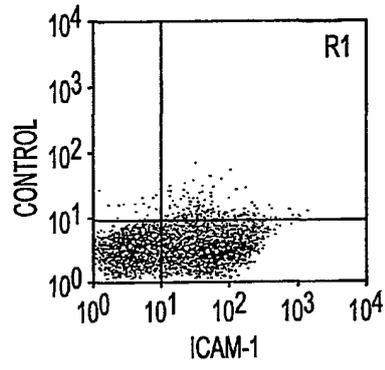
도면4b-5



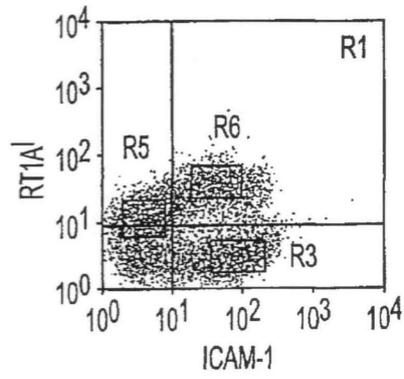
도면4c-1



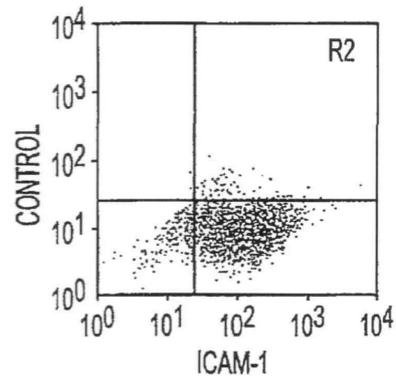
도면4c-2



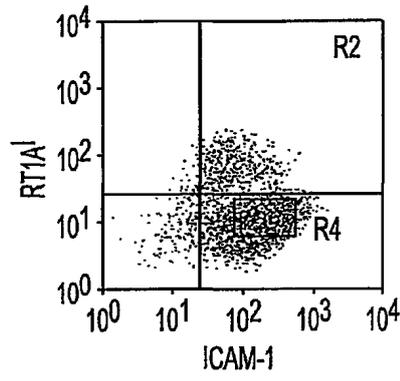
도면4c-3



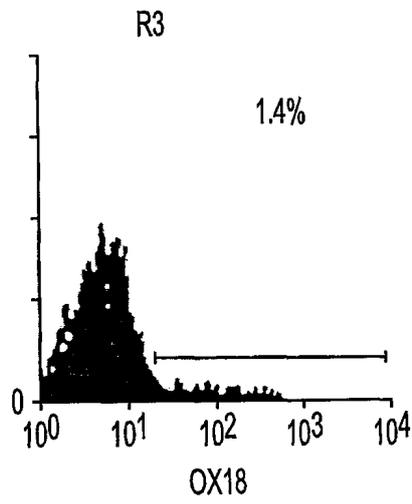
도면4c-4



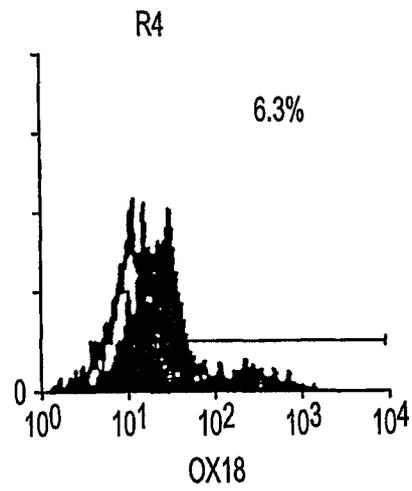
도면4c-5



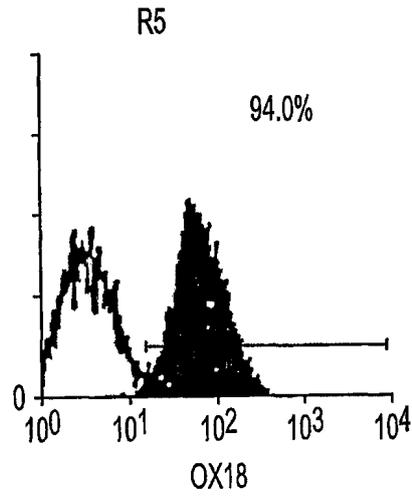
도면4d-1



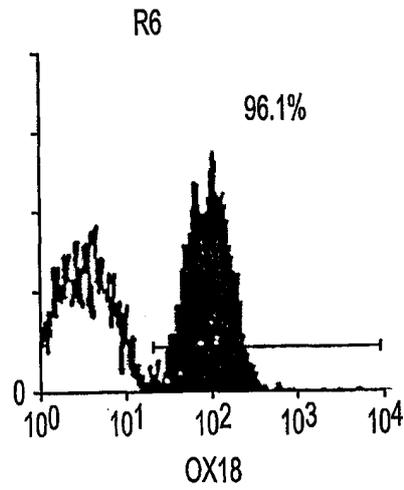
도면4d-2



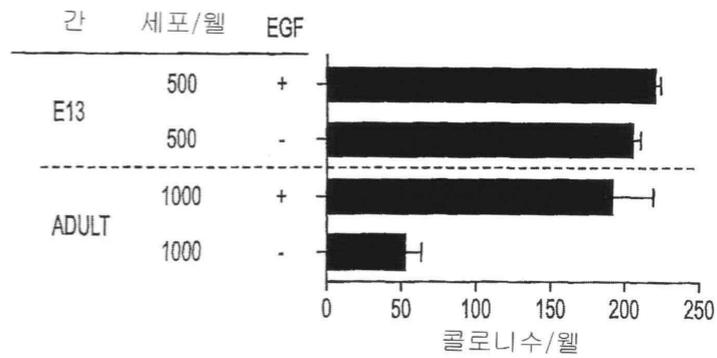
도면4d-3



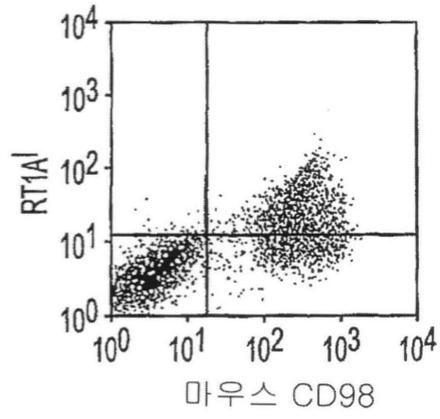
도면4d-4



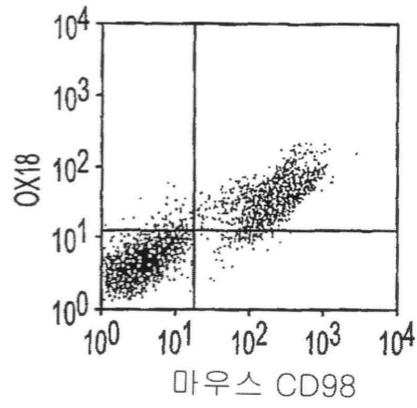
도면5a



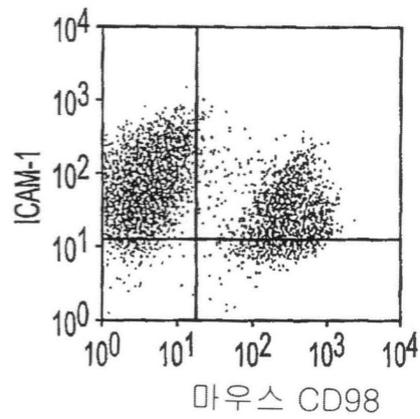
도면5b



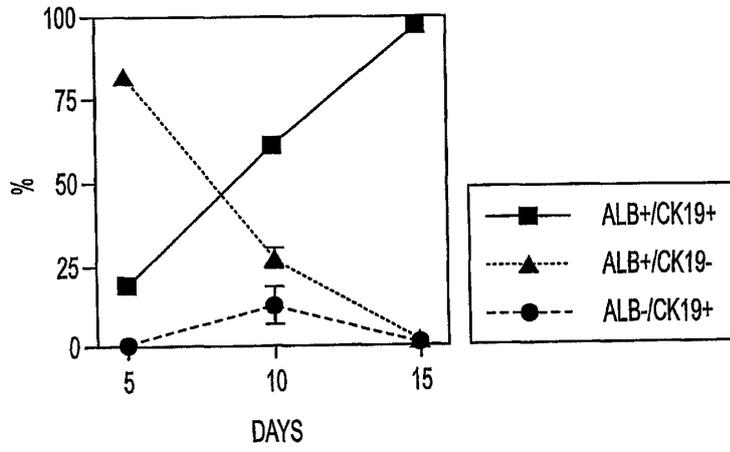
도면5c



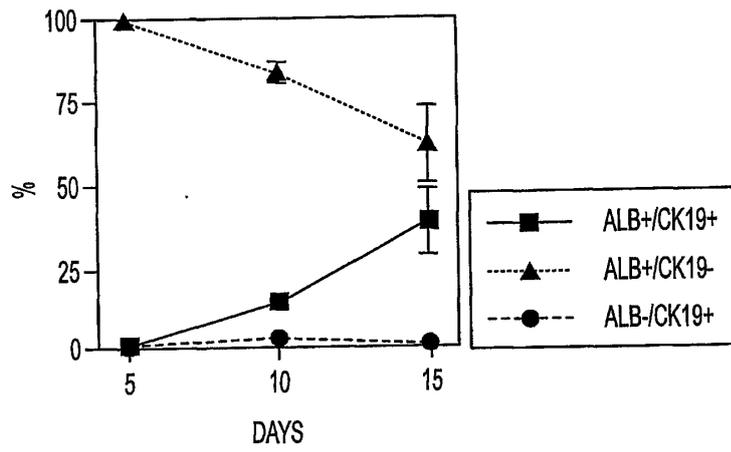
도면5d



도면6a



도면6b



도면7

