



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0097985
 (43) 공개일자 2008년11월06일

(51) Int. Cl.
C12N 5/08 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7014599
 (22) 출원일자 2008년06월16일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년06월16일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/060904
 국제출원일자 2006년11월15일
 (87) 국제공개번호 WO 2007/059501
 국제공개일자 2007년05월24일
 (30) 우선권주장
 60/736,873 2005년11월16일 미국(US)

(71) 출원인
 유니버시티 오브 노스캐롤라이나 앳 채플 힐
 미합중국 노스캐롤라이나 27599-4105 채플 힐 캠퍼스 박스 4105 바이넘 홀 308
 (72) 발명자
 맥클리랜드, 랜달, 이.
 미국 노스 캐롤라이나 27516, 채플 힐, 벨로즈 플레이스, 아파트비 102
 레이드, 로라, 엠.
 미국 노스 캐롤라이나 27514, 채플 힐, 스위트 크리크 로드 3621
 (74) 대리인
 임훈빈

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 간 전구체의 확대 또는 분화를 위한 세포의 매트릭스 성분

(57) 요약

줄기 세포 구획 또는 간 적소에서 발견되는 하나 또는 다종의 세포의 매트릭스 성분 상에서 또는 내에서, 시험관 내 간 전구체를 증식시키는 방법이 제공된다. 배양 접시, 생물반응기 또는 랩 칩을 포함하는, 전구체의 증식을 위한 컨테이너가 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 분리된 간 전구체를 제공하고,

(b) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 하나 이상의 세포의 매트릭스 성분 상에서 분리된 간 전구체를 배양하는 것을 포함하는, 시험관 내 간 전구체의 증식 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 세포의 매트릭스 성분이 III형 콜라겐, IV형 콜라겐, 라미닌(laminin), 히아루로난(hyaluronan) 또는 이의 배합물로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 세포의 매트릭스 성분이 III형 콜라겐 또는 IV형 콜라겐 또는 이의 배합물인 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 간 전구체가 III형 콜라겐, 기저 부착 분자, 프로테오글리칸(PG), 글리코사미노글리칸, 헤파란 설페이트, 엘라스틴 및 이의 배합물로 구성된 군에서 선택되는 세포의 매트릭스 성분 상에서 추가로 배양되는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 기저 부착 분자가 피브로넥틴인 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, PG가 헤파란 설페이트-PG, 콘드로이틴 설페이트 PG 또는 이의 배합물인 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서, 글리코사미노글리칸이 헤파란 설페이트, 헤파린, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 히아루로난 또는 이의 배합물인 방법.

청구항 8

제 2항에 있어서, 세포의 매트릭스 성분이 III형 콜라겐 및 라미닌인 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 분리된 간 전구체가 분리된 간 줄기 세포, 분리된 간모세포종, 수임 간 전구체 또는 이의 배합물인 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 분리된 간 전구체가 분리된 간 줄기 세포인 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 간 전구체가 공급자 세포의 존재 하에서 추가로 배양되는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 공급자 세포가 배아 또는 태아의 것인 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 공급자 세포가 혈관 아세포 또는 간 별(stellate) 전구체 세포인 방법.

청구항 14

제 11항에 있어서, 공급자 세포가 임의의 포유동물 조직으로부터 유래되는 방법.

청구항 15

제 11항에 있어서, 공급자 세포가 간 전구체와 동일한 종으로부터 유래되는 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서, 공급자 세포가 무린인 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 공급자 세포가 STO 공급자 세포인 방법.

청구항 18

제 1항에 있어서, 무혈청 배양 배지를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제 1항에 있어서, 간 전구체가 성체 간으로부터 수득되는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 성체 간이 성체 인간 간인 방법.

청구항 21

제 2항에 있어서, 라미닌이 약 0.1 내지 약 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 사이의 농도인 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 라미닌이 약 0.5 내지 약 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 사이의 농도인 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 라미닌이 약 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도인 방법.

청구항 24

제 22항에 있어서, 라미닌이 약 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도인 방법.

청구항 25

제 2항에 있어서, III형 또는 IV형 콜라겐이 개별적으로 약 0.1 내지 약 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 사이의 농도인 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, III형 또는 IV형 콜라겐이 개별적으로 약 0.5 내지 약 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 사이의 농도인 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, III형 또는 IV형 콜라겐이 약 1 내지 약 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 사이의 농도인 방법.

청구항 28

- (a) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 제1 세포의 매트릭스 성분을 포함하는 제1 층을 제공하고;
- (b) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 제2 세포의 매트릭스 성분을 포함하는 제2 층을 제공하며;
- (c) 제1 층 및 제2 층 사이에서 분리된 간 전구체를 배양하는 것을 포함하는, 간 전구체의 증식 방법.

청구항 29

(a) 컨테이너(container), 및

(b) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 적어도 하나의 세포의 매트릭스 성분을 포함하는 불용성 물질(여기서, 불용성 물질은 실질적으로 컨테이너의 적어도 한 면을 코팅함)을 포함하는 간 전구체 증식용 컨테이너.

청구항 30

제 29항에 있어서, 조직 배양 판, 생물반응기, 랩 셀(lab cell) 또는 랩 칩인 컨테이너.

명세서

기술분야

<1> 관련 출원의 상호 참조

<2> 본 출원은 전체가 본원에 참조로 인용된 개시물인, 2005년 11월 16일자 출원된 미국 가출원 제 60/736,873호에 대한 우선권을 주장한다.

<3> 본 발명은 일반적으로 간 전구체 세포의 생체 외 증식 또는 분화에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 시험관 내 간 줄기 세포를 포함하는 간 전구체 세포의 증식 및/또는 분화를 가능하게 하는 세포의 매트릭스 성분의 확인 및 선별에 관한 것이다.

배경기술

<4> 간 줄기 세포 및 그의 자손 (예를 들어, 간모세포종 및 수임(committed) 전구체)는 상당한 확대 가능성을 갖고 있다. 이러한 이유로, 이들 세포 집단은 세포 요법, 이를 테면, 생인공 간 또는 세포 이식에 대한 바람직한 후보자이다. 이러한 가능성에도 불구하고, 간 세포 요법의 완전한 능력은 아직 알려지지 않았다.

<5> 부분적으로, 간 줄기 세포 및 그의 자손의 세포 외 증식은 도전될 것으로 입증되었다. 간 줄기 세포 및 그의 자손이 시험관 내에서 성공적으로 증식되는 경우, 배양 조건은 실험실 벤치에서 임상으로 전환하기 위해 최적화 되지 않는다. 예를 들어, 일부 배양 조건은 세포 분열을 크게 지연시키거나, 임의로 세포 분화를 증진시켜, 증식 효능이 감소된다. 또한, 일부 배양 조건은 오염균을 도입할 수 있으며, 이에 따라 인간을 치료하는 데에서 그의 적용이 제한될 수 있는 인자(예를 들어, 혈청 또는 공급자 세포)의 첨가가 요구된다.

<6> 이에 따라, 간 줄기 세포 및 그의 자손의 증진된 생체 외 증식을 제공할 수 있는 배양조건 및 그의 적절한 운명으로 줄기 세포 계통을 한정할 수 있는 조건이 필요하다. 또한, 이전의 공급자 세포를 요구하지 않는 배양 조건이 필요하다.

<7> **[발명의 요약]**

<8> 본 발명의 일 구체예에서, (a) 분리된 간 전구체를 제공하고 (b) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 세포의 매트릭스 성분 중 하나 또는 배합물을 포함하는 층 상에서 분리된 간 전구체를 배양하는 것을 포함하여, 시험관 내에서 간 전구체를 증식시키는 방법이 제공된다. 세포의 매트릭스 성분(들)은 III형 콜라겐, IV형 콜라겐, 라미닌, 히아루론산, 다른 글리코사미노글리칸, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 또는 이의 배합물일 수 있다. 일부 구체예에서, 층은 다른 세포외 매트릭스 성분을 포함할 수 있으며, 이는 프로테오글리칸, 이를 테면, 아그린(agrín), 퍼레칸(perlecan), 인테그린(integrin), 니도젠(nidogen), 디스트로글리칸(dystroglycan) 등 또는 기저 부착 분자, 이를 테면 피브로넥틴 또는 다른 단백질, 이를 테면 엘라스틴 및 이의 배합물일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 제1 세포의 매트릭스 성분은 III형 콜라겐이며, 제2 세포의 매트릭스 단백질은 라미닌이다.

<9> 본 발명의 방법에 따라, 분리된 간 전구체는 분리된 간 줄기 세포, 분리된 간모세포종, 수임 간 전구체 또는 이의 배합물일 수 있다. 또한, 본 발명은 공급자 세포의 존재 하에서 간 전구체를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 이 세포는 배아, 태아, 신생아 및/또는 무린 기원일 수 있다. 바람직하게, 공급자 세포는 혈관 아세포이다. 상기 방법은 무혈청 배양 배지에서 간 전구체를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게, 무혈청 배지는 인슐린 (5 µg/ml), 트랜스페린/fe (5 µg/ml), 및 지질(유리 지방산, 고밀도 지질 단백질)의 혼합물, 적은 칼슘 (<0.5 mM)를 포함하며, 구리를 거의 포함하지 않거나 구리가 없다. 간 전구체는

태아, 신생아, 소아 또는 성체 간에서 수득될 수 있다.

- <10> 라미닌은 약 0.1 내지 약 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 바람직하게 약 0.5 내지 약 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 및 더욱 바람직하게 약 0.5 내지 약 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도일 수 있다. III형 또는 IV형 콜라겐은 각각 약 0.1 내지 약 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 바람직하게 약 0.5 내지 약 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 및 가장 바람직하게 약 1 내지 약 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도이다.
- <11> 본 발명의 또다른 구체예에서, (a) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 하나 이상의 세포외 매트릭스 성분(들)을 포함하는 제1 층을 제공하고; (b) 간의 줄기 세포 구획에서 발견되는 하나 이상의 세포외 매트릭스 성분(들)을 포함하는 제2 층을 제공하며; (c) 제1 및 제2 층 사이에 분리된 간 전구체를 배양하는 것을 포함하여, 간 전구체를 증식시키는 방법이 제공된다. 세포외 매트릭스 성분(들)은 III형 콜라겐, IV형 콜라겐, 라미닌, 히아루로난, 프로테오글리칸(예를 들어, 헤파란 설페이트 및/또는 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸) 또는 이의 배합물일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 층은 다른 세포외 매트릭스 성분을 포함하며, 이는 다른 프로테오글리칸(예를 들어, 아그린, 퍼레칸, 니도젠, 디스트로글리칸), 다른 기저 부착 분자(예를 들어, 피브로넥틴) 및 다른 세포외 매트릭스 단백질(예를 들어, 엘라스틴) 및 이의 배합물일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 제1 세포외 매트릭스 성분은 III형 콜라겐이고 제2 세포외 매트릭스 성분은 라미닌이다.
- <12> 본 발명의 방법에 따라, 분리된 간 전구체는 분리된 간 줄기 세포, 분리된 간모세포종, 수임 간 전구체, 또는 이의 배합물일 수 있다. 또한, 본 발명은 공급자 세포로서 제시되는 중간엽(mesenchymal) 전구체의 존재 하에서 간 전구체를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 이 세포는 배아, 태아, 신생아, 유아 또는 성체 조직에서 유래될 수 있으며, 임의의 포유 동물 종 기원일 수 있다. 바람직하게, 공급자 세포는 혈관 아세포이다. 바람직하게, 혈관 아세포는 간으로부터 유래하며, 바람직하게 혈관 아세포는 간 전구체의 것과 동일한 종으로부터 유래된다. 상기 방법은 무혈청 배양 배지에서 간 전구체를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 간 전구체는 태아, 신생아, 유아 또는 성체 간으로부터 수득될 수 있다.
- <13> 라미닌은 약 0.1 내지 약 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 바람직하게 약 0.5 내지 약 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 및 더욱 바람직하게 약 0.5 내지 약 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도일 수 있다. III형 또는 IV형 콜라겐은 각각 약 0.1 내지 약 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 바람직하게 약 0.5 내지 약 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 및 가장 바람직하게 약 1 내지 약 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도이다.
- <14> 본 발명의 또다른 구체예에서, (a) 컨테이너(container)(예를 들어, 조직 배양 판, 랩 칩(lab chip), 생물 반응기) 및 (b) 간의 줄기 세포 구획 또는 적소(Niche)에서 발견되는 적어도 하나의 세포외 매트릭스 성분을 포함하는 불용성 층(여기에서 불용성 물질은 실질적으로 컨테이너의 표면 또는 내부에 코팅됨)을 포함하는, 간 전구체 증식을 위한 컨테이너가 제공된다.
- <15> 이와 같이, 본 분야의 숙련자는 본 개시물이 기초로 한 개념이 본 발명의 일부 목적을 수행하기 위하여 다른 구조, 방법 및 시스템을 설계하기 위한 기초로서 용이하게 활용될 수 있는 것을 인지할 것이다. 이에 따라, 청구항은 그들이 본 발명의 범위 및 목적으로부터 벗어나지 않는 한 그러한 균등물을 포함하는 것으로 간주되는 것이 중요하다.

발명의 상세한 설명

- <38> 본 발명의 일 구체예에서, 간 줄기 세포 및 그의 자손의 부착, 생존 및 생체 외 증식을 촉진시키는 세포외 매트릭스 성분이 확인되었다. 본원에 이용된 용어 "간 전구체"는 간 줄기 세포 및 그의 자손을 포함하는 것으로 광범위하게 정의된다. "자손"은 자기-복제 간 줄기 세포, 간모세포종, 이의 다능성 전구체 및 특정 세포 타입(예를 들어, 간 세포)으로 분화시키기 위한 수임 전구체를 포함할 수 있다.
- <39> "클론원성 확대"는 단일 세포로부터 확대될 수 있으며, 모 세포의 표현형을 보유하면서 반복적으로 계대 배양되고 확대될 수 있는 세포의 성장 능력을 말한다. "콜로니 형성"은 일주일 또는 이주일 내에 제한된 수의 세포 분열(통상 5-7 세포 분열)을 수행할 수 있는 2배체 실질 세포의 특성을 말하며, 제한된 계대 배양 또는 계대 수행 능력을 지니는 세포를 포함한다. "다능성"은 하나 이상의 운명을 지닌 딸 세포를 형성할 수 있는 세포를 의미하며; "단일능성" 또는 "수임 전구체"는 단일의 성체 운명을 지니는 세포이다.
- <40> 간 줄기 세포 (HSCs)는 태아 및 신생아 간에서 관상 판(ductal plate)(한계판(limiting plate)으로도 불림)으로, 및 소아 및 성체 간에서 헤링관(canals of Hering)으로 발견되는 다능성 세포이며, 텔로머라아제의 발현을 지니는 자기-복제(ref)의 증거를 나타내며 이식되는(refs) 경우 성숙 간 세포를 형성할 수 있다. 이들 세포는 EpCAM+, NCAM+, ALB+, CK8/18+, CK19+, CD133/1+이며, P450 또는 알파-태아 단백질의 발현에 대하여, 그리고 중간엽 세포 마커 (CD146, VEGFr, CD31) 및 시험된 모든 조혈 마커(예를 들어, CD34, CD38, CD45, CD14)에 대

하여 음성이다. HSC는 간모세포종 및 수임(단일능) 담도 전구체가 되는 것으로 발견되었다.

- <41> 간모세포종 (HBs)은 헤링관의 말단에 계류된 세포의 소 집합체 또는 단일 세포로서 태아 및 신생아 간의 실질을 통하여 발견되는 다능성 세포이다. HBs는 HSCs로부터 유래된다. HBs는 HSCs 상에 제시된 많은 항원을 공유하나, 중요한 차이점을 갖는다. 예를 들어, HBs는 NCAM을 발현시키지 않으나, ICAM1을 발현시키고, 그들은 상당한 양의 알파-태아 단백질 및 P450s의 태아 형태를 발현시킨다. 이들 HB는 단일성 전구체, 수임 간 및 담도 전구체가 된다.
- <42> 수임 간 전구체는 간 및 담도 계통의 단일능성 전구체이다. 그들의 항원성 프로파일은 HB의 것과 겹치나; 담도 수임 전구체는 CK19를 발현하나 AFP 또는 ALB를 발현하지 않는 반면, 수임 간 전구체는 AFP 및 ALB를 발현하나 CK19를 발현하지 않는다. 수임 담도 전구체는 간 줄기 세포 및 간모세포종으로부터 직접적으로 유래된다.
- <43> 중간엽 세포(MCs)는 많은 다른 중간엽 세포 타입(성숙 세포로 열거하고, 괄호 안에 그의 전구체), 이를 태면, 스트로마 (중간엽 줄기 세포), 내피 (혈관 아세포), 별 세포 (별 세포 전구체), 및 다양한 조혈 세포 (조혈 줄기 세포)의 다양한 계통 단계에 있는 세포를 포함한다.
- <44> 전체는 아니더라도, 본원의 간 전구체의 설명 및 예시의 대부분이 인간-유래 세포 집단에 참조될 것이라도, 본원의 교시는 인간에 한정되지 않을 것이다. 사실상, 본 분야의 숙련자가 본원의 기술을 일반적으로 포유 동물 (예를 들어, 마우스, 랫트, 개 등)으로부터의 간 전구체에 확대 적용하는 것을 예상될 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 목적은 임의의 및 모든 포유 동물의 간 전구체를 포함하는 것으로 의도된다.
- <45> 본 발명에 따른 시험관 내 증식에 적합한 간 전구체가 임의의 특정 방법에 의해 분리되거나 확인된 것에 한정되지는 않는다. 예를 들어, 간 전구체의 분리 및 확인을 위한 방법은 예를 들어, 본원에 그 전체가 참조로 인용된 개시물인 USP 제6,069,005호 및 USP 출원 제09/487,318호; 제10/135,700호; 및 제10/387,547호에 개시되었다.
- <46> 간 줄기 세포 및 간모세포종은 특색있는 항원 프로파일을 가지며, 이전에 개시된 프로토콜을 이용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 간 줄기 세포 및 간모세포종은 수많은 항원(예를 들어, 사이토케라틴 8, 18, 및 19, 알부민, CD133/1, 및 상피 세포 부착 분자 ("EpCAM")을 공유하며, 조혈 마커 (예를 들어, 글리코포린 A, CD34, CD38, CD45, CD14) 및 중간엽 세포 마커 (예를 들어, CD 146, CD31, VEGFr 또는 KDR)에 대하여 음성이다. 택일적으로, 간 줄기 세포 및 간모세포종은 크기로 (줄기 세포는 7-9 μm 이고, 간모세포종은 10-12 μm 이다), 배양에서 형태에 의하여 (줄기 세포는 밀집된, 형태적으로 균일한 콜로니를 형성하는 반면, 간모세포종은 투명 채널, 추정되는 세관에 의해 산재된 줄모양 구조를 형성한다), 특정 항원의 발현 패턴에서의 차이에 의하여(EpCAM은 간 줄기 세포를 통하여 발현하나, 간모세포종에서 세포 표면에 간한다) 또는 다른 항원 프로파일에 의하여 (N-CAM은 간 줄기 세포에 존재하나, 알파 태아 단백질 (AFP) 및 ICAM1은 간모세포종에 의하여 발현됨), 서로 구별될 수 있다. 태아 및 신생아 간에서, 간 줄기 세포는 관상 판(한계판으로도 불림)에 있는 반면, 간모세포종은 우성의 실질 세포 집단 (>80%)이다. 소아 및 성체 조직에서, 간 줄기 세포는 헤링관에 존재하나, 간모세포종은 헤링관의 말단에 계류된 세포이다. 간모세포종은 정상 조직 중에서 소수의 세포로 구성되나, 간 질환(예를 들어, 경화증)에서 많은 수(예를 들어, 결절)로 발견된다.
- <47> 본 발명자들은 간 줄기 세포 적소에서 또는 근처에서 발견되는 세포 외 매트릭스 성분이 기존하는 기술보다 더 분화를 유도하는 것 없이 간 전구체의 확대를 제공하는 것을 발견하였다. 하지에서 더욱 상세하게 기술될 바와 같이, 매트릭스 성분에 배양된 세포는 간 줄기 세포 적소에서 또는 근처에서 풍부하게 발견되며, 결집되어 일부 매트릭스 성분(예를 들어 라미닌)에 구상체(spheroid)-유사 구조를 형성하고 다른 것들(예를 들어 III형 콜라겐) 상에 단층으로 스프레딩된다. 줄기 세포 적소에서 발견되는 세포외 매트릭스 성분의 특정 타입은 간 전구체 세포를 위해 필수적인 신호들 사이에 있어 대칭형 세포 분열인 자기-복제 모드에서 확대를 수행한다 (말 세포는 모 세포와 동일하거나 거의 동일하다).
- <48> 간 줄기 세포의 성숙이 적어도 부분적으로 그들의 분화를 지지하는 매트릭스 성분의 독특한 배합과 동시에 일어난다고 여겨진다. 일부 세포외 매트릭스 성분은 일부 분화와 함께 확대되는 비대칭의 분열과 관련된 확대를 수행하기 위한 간 전구체에 허용가능하다. 완전 성숙 간 세포가 발견되는 간 조직의 영역에 위치하는 다른 것들은 세포의 완전한 분화 및 성장 저지를 유도한다.
- <49> 이에 따라, 그들의 성숙되지 않은 형태로 간 줄기 세포를 시험관 내에서 유지시키는 것은 배아 조직(또는 줄기 세포 적소에서)에서 발견되는 매트릭스 성분 중에 그들을 배양하여 촉진된다. 마찬가지로, 그들의 분화는 시험관 내에서의 배양에 의하여 성숙 조직에서 발견되거나, 풍부하게 발견되는 매트릭스 성분으로 시험관 내에서의

배양에 의하여 영향을 받을 수 있다. 실제로, 간 전구체는 간샘파리의 중추 정맥 근처 디세스강(Space of Disse)에 위치한 성숙 실질 세포, 이를 테면, I형 콜라겐 및 피브로넥틴의 특정 형태와 관련되어 발견되는 매트릭스 성분 상에 플레이팅되며, 천천히 분열한 다음 증식을 중단하고, 간세포 운명으로서의 계통 제한에 의하여 성취된다.

- <50> 간 전구체는 피브로넥틴에서 부착되거나 생존할 수 없으며, 부착된 것들은 빠른 세포 자멸사 및 사멸이 수행된다. 그러나 간 전구체는 부착, 생존 및 작용을 위하여 피브로넥틴을 필요로 하는 하행을 일으킨다. 이에 따라, 세포의 매트릭스 성분의 특정 타입 또는 화학을 위한 요구는 계통 의존적이며, 그들은 세포의 특정 성숙 단계와 관련된다.
- <51> 본 발명의 범위는 임의의 하나의 매트릭스 성분 또는 이의 배합물에 한정되지 않을 것이다. 본원의 교시와 함께, 본 발명은 확대 또는 분화를 위하여 세포의 세포 외 유지를 위해 이용될 수 있는 물질의 생성에서 임의의 및 모든 세포의 매트릭스 성분 및 그들의 배합물의 용도를 기술하고 교시한다. 많은 이들 성분이 하기에서 기술될 것이나, 명확하게 하기 위하여, 라미닌, IV형 콜라겐 및/또는 III형 콜라겐은 배아 조직 또는 줄기 세포 적소에서 발견되거나 매우 풍부하게 발견되는 세포의 매트릭스 성분의 부류의 단순한 대표물로 기술될 것이다.
- <52> 배아 매트릭스 성분의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 특정 타입의 콜라겐, 이를 테면, IV형 콜라겐 ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ 를 추가로 포함) 및 III형 콜라겐; 라미닌 (1 , $\gamma 1$, $\beta 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ 포함); 히아루로난; 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(PG)의 형태 또는 그들의 글리코사미노글리칸 쇄; 및 헤파란 설페이트-PG의 형태 또는 그들의 글리코사미노글리칸 쇄(예를 들어, 특정 신데칸(syndecan)). 성숙 조직에서 발견되는 매트릭스 성분의 비-제한적 예는 콜라겐(예를 들어, I형 및 II형)의 안정한 형태, 피브로넥틴의 형태; 헤파란 설페이트-PG (예를 들어, 아그란, 퍼레칸), 헤파란-PG; 더마탄-PG (예를 들어, 연골-관련 더마탄 설페이트-PG); 및 엘라스틴을 포함한다.
- <53> 다양한 세포 배양 배지는 본 발명에 적절할 수 있다. 배양 배지로부터 성장 및/또는 분화 인자를 첨가 또는 제거하여, 세포 증식 및/또는 분화율은 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 혈청을 첨가하면, 간 전구체를 느리게 성장시킬 수 있으며, 간세포 운명으로서 계통 제한을 유발할 수 있고, 동시에 중간엽 세포 집단(스트로마 및 내피 세포)의 빠른 확대를 유발한다. 상피 세포 성장 인자를 첨가하면, 간세포 운명으로서 계통 제한이 유발된다.
- <54> 바람직하게, 일부 구체예에서, 본원에 기술된 매트릭스 성분은 무혈청 배지와 배합되어 사용된다. 무혈청 배지는 간모세포종을 위해 개발되었으며, 전체가 본원에 이용된 미국 출원 제 09/678,953호에 개시되었다. 이론에 의한 도약 없이, 본 발명의 매트릭스 성분이 공급자 세포에 의하여 일반적으로 제공되는 많은 생존, 성장 및/또는 증식 신호를 제공하는 것으로 현재 여겨지고 있다. 이에 따라, 본 발명은 유의미한 부분으로 간 전구체의 생존력 및 확대 능력을 유지하기 위한 배아 스트로마 공급자 세포의 요구를 교체시킬 수 있다.
- <55> 본 발명의 일구체예는 비-제한적 실시예의 방법으로 기술될 것이다.

실시예

- <56> 배지 및 완충액
- <57> 달리 언급되지 않는다면, 무혈청 배지는 간 조직을 처리하고 세포 배양을 유지하는 때 이용된다. 본 배지는 미국 특허 출원 제 09/678,953호에 공개된 바와 같이 0.1% 소 혈청 알부민으로 보충된 500 ml RPMI 1640, Fraction V 10 $\mu\text{g/ml}$ 소 홀로-트랜스페린 (포화된 철), 5 $\mu\text{g/ml}$ 인슐린, 500 μl 셀레늄, 5 ml L-글루타민, 270 mg 니아신아미드, 5 ml AAS 항생제, 500 μl 하이드로코르티손, 1.75 μl 2-머캅토에탄올 및 유리 지방산 혼합물 38 μl 를 포함한다. 이러한 배지는 이용전에 멸균시키고, pH를 7.4로 적정하였다.
- <58> "세포 세척 완충액"은 1% 소 혈청 알부민으로 보충된 500 ml RPMI 1640, 500 μl 셀레늄 및 5 ml AAS 항생제를 포함한다. "효소 절단 완충액"은 60 mg IV형 콜라지나아제로 보충된 100 ml 세포 세척 완충액 및 37°C에서 용해된 30 mg DNase를 포함한다.
- <59> 조직 수득 및 체제
- <60> 16 내지 22주 태아 나이의 인간 태아로부터의 간 조직을 공인된 회사, 이를 테면, Advanced Biosciences Resources of Alameda, CA로부터 수득하였다. 바람직하게, 조직은 분리 후 18 시간 내에 받았으며, 간 조직의 다중 섹션으로서 또는 때때로 상당히 온전한 간으로서 도착하였다. 일반적으로, 전체 조직 부피는 약 4 ml 내

지 약 12 ml 범위였으며, 많은 양의 적혈구 세포(RBCs)를 함유하였다.

<61> 간을 기계적으로 분리시키고, 조직을 효소 절단 완충액으로 부분적으로 절단하여, 실질 세포의 덩어리를 얻었다. 이러한 덩어리를 세척하고, 저속도 원심분리하여, 아직 간 실질세포를 보유하는 유리 부유 조혈 세포를 실질적으로 제거하였다. 그 다음, 분리된 간을 3 ml 분주액으로 나누고, 여기에 25 ml의 효소 절단 완충액을 첨가하였다. 32°C에서 30분 동안 적당한 교반을 한 다음, 상층액을 제거하고, 4°C에 보관하였다. 임의의 잔류 파편이 아닌 펠렛을 새로운 효소 절단 완충액을 추가로 30분 동안 재-절단시켰다. 조직 단편의 효소 절단 완료 후, 세포 현탁액을 250 원심력(RCF)에서 원심분리하고; 상층액을 제거하고; 펠렛을 동량의 세포 세척 완충액에 재현탁시켰다.

<62> 분리 기술

<63> 태아 간으로부터의 간 세포 현탁액을 조혈 세포, 특히 적혈구 세포와 함께 증만되어있다. 사실상, 인간 태아 간의 원래 세포 현탁액은 평균적으로 오직 6-9% 실질 세포 및 다양한 실질 세포가 아닌 나머지, 특히 적혈구 세포로 구성된다. 적혈구 세포의 제거를 위한 통상의 방법으로서, 이를 테면, 용해 완충액의 이용은 간 전구체에 독성이 있을 수 있고 다른 방법들은 바람직할 수 있다. 예를 들어, 이전에 공지된 방법을 이용하여 반복된 저속 원심분리로 실질 세포로부터 적혈구 세포를 분리시킬 수 있다(Lilja et al., 1997; Lilja et al., 1998).

<64> 대안적인 및 더욱 효율적인 방법, 보체-매개의 세포 독성은 후보자 줄기 세포의 손실을 최소화하기 위하여 이용될 수 있다. 콜라지나아제 절단 후, 항-인간 적혈구(RBC) 항체는 세포 현탁액과 함께(1:5000 희석) 37°C에서 15분 동안 인큐베이션될 수 있다. 항체-표지된 적혈구를 손상시키고 용해시키기 위하여, 보체(예를 들어, LowTox Guinea Pig complement)를 첨가하고(1:3000 희석), 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 적혈구로부터 방출된 헤모글로블린으로, 세포 상층액은 분홍빛이 되었다. 조혈 세포를 제거한 현탁액은 적어도 80-90% 실질 세포로 구성된다.

<65> 그 다음, 조혈 세포가 제거되어 만들어진 현탁액을 새로운 콜라지나아제 용액 중에서 30분 동안 두 번째 효소로 절단시켜, 세포 덩어리를 최소화시키고, 75 μm 나일론 체를 통하여 걸렀다. 트립판 블루 배체에 의하여 측정된 세포 생존력은 통상 95% 보다 더 높았다. 여과 후, 대부분의 간모세포종은 집합체 당 4 내지 8 세포를 함유하는 덩어리 세포로서 가시화되었다. 이들 기술은 실질 간 세포가 풍부한 적혈구가 실질적으로 없는 세포 현탁액을 생성한다.

<66> 다른 풍부 프로토콜은 간모세포종의 분리를 위한 피콜(Ficoll) 분류를 포함한다. 간단하게, 세포를 페놀 레드 가 없는 기저 배지 10 ml 중에 현탁시키고, 50 ml 원심분리 튜브 중에 동량의 Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia) 상에 첨가하였다. 그 다음, 세포를 1000 xg에서 25 분 동안 원심분리하였다. 경계면과 펠렛화된 세포 둘다를 수집하였다. 피콜 분류는 필수적으로 모두가 간모세포종인 실질세포가 일반적으로 80% 초과인 펠렛 및 13-14%의 실질, 조혈 및 내피 세포를 나타내는 다양한 항원 프로필을 지닌 원래 세포 집단의 경계면을 생성하였다. 피콜 경계면 세포는 원래 세포 현탁액의 것보다 10-배 증가된 0.1 %의 관상 관 세포의 콜로니를 생성한다. 피콜 분류의 결과는 간모세포종의 분리와 일치하는 것이지만, 그들은 줄기 세포의 분리에서 제조 사이에 더욱 생존력이 있는 경향이 있다.

<67> 면역선택은 간 줄기 세포(관상 관 세포) 또는 다른 하위집단의 풍부 및/또는 분리를 위한 또다른 기술이다. 바람직한 면역선택 프로토콜은 세포 상에서 강하게 발현하는 항원(예를 들어, 모든 간 전구체에서 발견되는 EpCAM) 및 간 전구체의 하위집단에서의 다른 것(예를 들어, 관상 관 세포에서 NCAM)을 사용하는 것이다. 면역선택은 이들 과정을 위한 다양한 방법 중 임의의 것에 의한 것일 수 있으며, 세포측정기, 패닝법 또는 마그네틱 비드일 수 있다.

<68> 마그네틱 면역선택은 예를 들어, 제조자의 추천된 프로토콜에 따른 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)로부터 CliniMACS® 마그네틱 컬럼 분리 시스템 또는 autoMACS™ 및 마그네틱 마이크로비드에 커플링된 단일클론 항체 HEA125를 이용하여 인간 간 세포 현탁액으로부터 EpCAM을 발현하는 세포의 분리를 포함한다. 유사 방법이 NCAM, CD146, KDR (VEGFr) 및 CD133/1 세포의 면역선택을 위하여 이용된다.

<69> 분석

<70> 수행된 모든 분석을 위하여, 6-웰 페트리 접시를 이용하여, 웰당 0.8 x 10⁶ 실질 세포를 씨딩하였다. 초기 씨딩 후, 첫번째 10 시간 후, 배지를 10% 우태아 혈청으로 보충하였다. 초기 플래이팅하는 동안 혈청으로의 보충은 조직 절단에서 이용되며 초기 부착을 돕는 효소의 불활성화를 촉진하는 것으로 여겨진다. 이에 따라, 무혈

청 배지만 이용하였다. 무혈청 배지만 이용하였다. 일반적으로, 24-시간 간격 및 때때로 3-일 간격으로 배지를 바꾸었다. 달리 언급되지 않는다면, 실험값을 영양 배지 부피 및 세포 수에 대하여 표준화하였다.

<71> 우레아

<72> 디아세틸 모노옥심과 우레아의 직접적인 상호작용에 기초한 분석을 수행하여, 수집된 배지 샘플의 우레아 농도를 결정하였다. 표준 및 시약을 Sigma의 진단 키트로 구입하였다. 96-웰 마이크로판로 이용하기 위하여 키트를 변형시켰다. 이러한 변형을 위하여, 희석된 농도 표준을 처음으로 준비하였다. 단계 희석하여, 표준 농도를 감소시켜, 0 - 30.76 mg/dL의 표준 범위를 생성시켰다. 그 다음, 결합된 시약("Reagentcombined")은 1.3 대 1.0 비율로 혈액-우레아-질소 (bun) 산 시약 및 bun 색 시약을 혼합시켜 제조된다.

<73> 이러한 분석 프로토콜은 각각의 마이크로판 웰 중에 적절한 샘플(예를 들어, 블랭크(blank), 표준 또는 샘플) 9 ml을 로딩한 다음, 결합된 시약 100 ml을 로딩하였다. 그 다음, 로딩된 마이크로판을 약 25분 동안 또는 농도 표준 내에서 별개의 표준 색상 변화가 가시화될 때까지 50°C로 가온시켰다. 그 다음, 마이크로판의 바닥을 3분 동안 얼음으로 차갑게 했다. 냉각 직후, 사이토플루오르(cytofluor) 멀티-웰 리더를 이용하여 광학 밀도 변화를 535nm에서 측정하였다.

<74> 암모니아-NH₃

<75> NH₃와 브로모페놀 블루(암모니아 지시자)의 반응에 기초한 시험 분석을 VITROS DT60 II 화학 시스템 (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester NY)로 분석하였다. 자동화된 과정은 10 µl 샘플, 5 분 인큐베이션 시간, 37 °C 환경 챔버 및 605 nm 흡광도 측정 큐브를 요구한다. 화학 분석기 내에서 광학 밀도 변화를 위하여 슬라이드를 표지하고 미리 조정된 표준에 대하여 작도하였다.

<76> 글루코오스

<77> VITROS DT60 II 화학 시스템은 이중 반응 결과를 이용한다. 초기에, 글루코오스 옥시다아제에 의하여 샘플 글루코오스의 산화를 촉진시켜, H₂O₂를 형성하였다. 이러한 반응 후 산화 커플링을 다이(dye) 전구체의 존재 하에서 퍼옥시다아제에 의해 촉진시켰으며, 여기서, 다이의 감도를 반사된 빛으로 측정하였다. 각각의 분석은 첫째로 각 화학 슬라이드 상에 적절한 샘플(예를 들어, 블랭크, 표준 또는 샘플) 10 µl를 로딩하는 것으로 구성된다. 화학 분석기 내에서 광학 밀도 변화를 위하여 슬라이드를 표지하고 미리 조정된 표준에 대하여 작도하였다.

<78> 면역염색

<79> 50/50의 아세톤 및 메탄올의 혼합물을 이용하여 배양을 2 분 동안 고정시키고, 1xPBS로 세척하고, 45분 동안 10% 염소 혈청으로 블로킹한 후, 세포의 면역염색을 수행하였다. 그 다음, 형광 프로브와 결합된 1차 인간 항체를 실온에서 1 내지 8 시간 동안 첨가하였다. 결합되지 않은 1차 항체가 이용되는 경우, 형광 프로브와 결합된 2차 항체로 세포를 염색하였다.

<80> 증식

<81> 4x, 10x, 및 20x 확대경으로 상 현미경 검사를 이용하여 콜로니 성장의 크기 변화를 이미지화하여 간 전구체의 증식을 육안으로 평가하였으며; 낮은 확대 목적물은 전체 콜로니의 관찰을 허용하였다. 통계 비교 분석을 위한 MetaMorph Image Software 상에서 미리 조정된 크기에 대하여 표준화된 현미경 사진 및 반복적인 콜로니 이미지화로 성장 곡선을 수득하였다.

<82> 조직 배양 매트릭스의 제조

<83> 대조 연구는 조직 배양 플라스틱 (TCP) 상에 직접적으로 태아 인간 간 세포를 씨앗하는 것을 포함한다 (도 1A). 3가지 다른 농도(0.5, 1.0, 또는 2 µg/cm²)의 피브로넥틴 판을 제조하고, pH 7.5로 조정하였다. 콜라겐 I-형 판을 1 내지 1.5 mg/µl로 제조하였다. 이러한 제조를 위하여, 특정 비율의 10x DMEM 및 0.1M NaOH를 첨가하여, 고밀도 Vitrogen 100 (Cohesion Technologies, Palo Alto, CA)를 액체 I-형 콜라겐으로 변형시켰다. 더욱 자세하게, 도 1B는 0.25 ml 0.1M NaOH, 0.25 ml 10x DMEM 또는 PBS, 1.5 mg/ml Vitrogen 100이 4°C에서 서서히 결합되고 혼합되어 균질한 용액을 생성하는 한 구체예를 나타낸다. 이러한 과정 중, 콜라겐을 불안정하게 하는 공기 갭으로서 새로 형성된 I-형 콜라겐 현탁액 중에 공기 거품을 도입하는 것을 피하는 것이 바람직할 수 있다.

- <84> I형 콜라겐 현탁액을 이용하여 각각 도 1C 및 1D에 나타낸 바와 같은 평판(Flat Plate, FP) 및 "샌드위치" 설계를 위한 페트리 웰 표면을 미리 코팅하였다. FP는 6 웰 판의 각 웰에 0.4 ml의 I-형 콜라겐 현탁액으로 제조하였다. I형 콜라겐 현탁액을 1 시간 동안 37℃ 및 5% CO₂에서 겔화되도록 하였다. 겔화 후, 판/웰은 간 전구체를 받아들일 준비가 된다.
- <85> 샌드위치 판은 FP의 그것과 동일한 방식으로 제조될 수 있다. 그러나 "샌드위치" 세포를 위하여, 2층의 콜라겐 현탁액을 거기에 세포가 부착된 FP 상에 부었다. FP와 같이, 샌드위치 판은 37℃ 및 5% CO₂에서 1 시간 동안 인큐베이터-겔화시켜, 새로운 상층 콜라겐 층을 고형화시켰다. 겔화 후, 영양 부양을 위하여, 0.5 ml의 무혈청 배지를 첨가하였다.
- <86> 라미닌 코팅된 판을 두개의 다른 농도(0.52 또는 1.0 µg/cm²) 로 제조하고, pH 7.5로 조정하였다. 5개의 다른 단백질 농도(2.1, 4.2, 6.3, 8.3 또는 10.4 µg/cm²) 중 하나를 이용하여 접시 상에 콜라겐을 코팅하였다. 코팅 후, 37℃ 및 5% CO₂에서 10 시간 동안 매트릭스가 부착되도록 하였다. 코팅 과정을 도 2에 나타내었으며, 여기서, 임의의 매트릭스 분자는 접시 내부에서 그리고 아세트산 완충액 내에서 이형적으로 분배된다. 약 10분 내에, 매트릭스 분자는 단일의 균일 층으로 웰 표면에 부착되고 안정화되었다. 그 다음, 2 시간 동안 판을 UV 멸균시키고, 1xPBS로 헹구어, 산성 pH를 중화시켰다. III형 콜라겐 판은 pH 3 아세트산으로 유사하게 제조하였고, IV형 콜라겐 판을 0.5M 아세트산으로 제조하였다.
- <87> 배합되어 플레이팅되는 경우, 그들 개개의 농도가 각각 6.25 µg/cm² 및 0.52 µg/cm²가 되도록 III형 콜라겐 및 라미닌을 TCP 표면에 공동-플레이팅하였다. 그들 개개의 농도가 각각 4.2 µg/cm² 및 1.0 µg/cm²가 되도록 IV형 콜라겐 및 라미닌을 TCP 표면에 공동-플레이팅하였다.
- <88> 간 줄기 세포 구획에서 매트릭스 성분의 확인
- <89> 줄기 세포 구획에서 매트릭스 성분은 생체 내에서 태아 간 섹션 상의 면역조직화학에 의하여, 그리고 시험관 내에서 배아 중간엽 공급자 세포에 의하여 생산된 매트릭스 성분을 위한 분석으로 확인되었다. 무린 배아 스트로마 공급자 (예를 들어, STO 세포) 및 간 줄기 세포에 대한 본래 중간엽 파트너인 혈관 아세포는 이들 실험을 위한 예시적인 세포로서 이용된다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 연구는 공급자 세포(예를 들어, 혈관 아세포 및 STO 공급자)가 라미닌, III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐, 히아루로난 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸을 생산하는 것으로 나타났다. 간 줄기 세포는 확인된 히아루로난 (도 3) 및 콜라겐에 대한 수용체를 갖는다,

표 1

<90>

매트릭스 성분	위치	시험관 내 분석(간 줄기 세포의 존재 하에서)		생체 내 분석 관상 판
		STO 공급자	혈관모세포	
라미닌	문맥주위	++	+	+
피브로넥틴	중심 주위	+	-	-
I형 콜라겐	중심 주위	+	-	-
III형 콜라겐	문맥주위	++	++	++
IV형 콜라겐	문맥주위	++	++	++
히아루로난	문맥주위	++	++	++
헤파란 설페이트 (HS) 프로테오글리칸	문맥주위	+	+	+
헤파란 프로테오글리칸	중심주위	-	알려지지 않음	-
콘드로이틴 설페이트 (CS) 프로테오글리칸	문맥주위	+	알려지지 않음	알려지지 않음
더마탄 설페이트 (DS) 프로테오글리칸	중심주위	수행되지 않음	알려지지 않음	알려지지 않음

<91> 더욱 상세한 비교 조사를 표 2에 나타내었다.

표 2

<92>

마커/작용	특성	줄기 세포 적소: 관상 관			성숙 간: 디씨 공간	
		라미닌	III형 콜라겐	IV형 콜라겐	I형 콜라겐	피브로넥틴
부착		+	+	+	+	한정된
생존		+	+	+	+	빠른 세포자멸사
구상체 대 단층 형성		구상체 형성	단층	단층	단층(3D)	구상체
콜로니 형성(스트로마 세포) 대 클론원성 확대(줄기 세포)		클론원성 확대	클론원성 확대	클론원성 확대	콜로니 형성	성장 없음; 세포 자멸사
분열 속도(배가 시간(시))		수행되지 않음	<24 시간	<36 시간	>3-5일 또는 더 느리게	----
알부민	간세포 마커	+	+	+	++	+
사이토케라틴 19(CK 19)	담도 마커	+	+	+	-	-
알파-태아단백질(AFP)	간모세포종 & 수임 간세포 전구체	-	-	+	++	-
E-Cadherin	상피의 세포 표면 마커	+	+	+	+/-	+
Ep CAM	간 줄기 세포, 간모세포종, 수임 전구체	++	++	++	+	+
N-CAM	간 줄기 세포	+	+	+	-	-
사이토케라틴 8&18(CK 8/18)	상피의 마커	+	+	+	+	+
글루코오스 생산	문맥 주위 간 세포의 작용	수행되지 않음	-	+	+	-
우레아 생산	성숙 중심 주위 간세포의 작용	수행되지 않음	-	?	+	분석될 만큼 오래 생존하지 않음

<93>

표 2의 조사는 작용적 글루코오스 및 우레아 생산과 함께 세포 부착, 세포 생존, 기하학적 배양 형성, 독특한 콜로니 형성, 분열 속도, 면역조직화학 반응을 포함하는 인간 간 줄기 세포 반응을 설명한다. 부착하기 위하여, 라미닌 또는 III형 또는 IV형 콜라겐 또는 성체 하층 I형 콜라겐 상에서 배양되는 경우, 인간 간 줄기 세포는 세포 매트릭스 상호작용을 확립한다. 피브로넥틴 상에서 최소의 부착이 있었던 오직 물질만이 조사되었다. 또한, 10일 초과인 세포 생존은 거의 부착되지 않은 세포에 대하여 빠른 세포 자멸사를 증진시키는 피브로넥틴을 제외한 모든 매트릭스 물질에서 명백하였다. 성숙 실질 세포가 부착, 생존 및 작용을 위하여 피브로넥틴을 필요로 하기 때문에 이는 주목할 만하다.

<94>

다음으로, 배양의 기하학적 형성을 관찰하였다. 라미닌 및 피브로넥틴은 3D 구상체 집합체를 유발하였으나, 다른 물질들은 단층의 세포를 유도하였다. 더욱이, 클론원성 확대는 라미닌, III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐 상에서 플레이팅된 세포에 대하여 관찰되었으나; I형 콜라겐 및 피브로넥틴 각각에 대하여 콜로니 형성이나 무성장이 관찰되었다. 또한, III형 콜라겐은 약 24시간 미만의 분열 속도를 유발한 반면, I형 콜라겐에 씨딩된 세포는 느렸고, 이에 따라, 성장이 저지되어, 생존가능적 및 작용적으로서 세포를 유지하였다.

<95>

또한, 알부민 (ALB), 사이토케라틴19 (CK19), α-태아단백질 (AFP), E-Cadherin (E-CAD), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 신경 세포 부착 분자 (NCAM) 및 사이토케라틴 8 및 18 (CK8 및 18)에 대하여 면역조직화학 반응을 비교하였다. 가장 우세하며 양성의 반응은 NCAM+, EpCAM (++) , ALB (+) 및 CK8 및 CK18 (+)로서 나타났다. 흥미롭게도, CK19는 라미닌, III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐에서 배양된 줄기 세포에 의하여 강하게 발현되었으며, I형 콜라겐 및 피브로넥틴 상에 플레이팅된 것에 대하여는 음성이었다. 이러한 발견으로 초기 이능성(bipotnt) 활성화는 성숙 조직에서 풍부한 매트릭스 성분에 의하여 제한된 계통이라고 제안된다. 더욱이, I형 콜라겐 상의 세포에 대한 높은 AFP 및 ALB 활성화는 수임 간세포 전구체를 향한 계통 제한을 수행하는 실질 세포를 나타내며, 데이터에 의하여 확증된 발견은 글루코오스 및 우레아 생산의 강한 발현을 나타낸다.

<96>

먼저 TCP 표면에 직접적으로 플레이팅된 간 전구체로 돌아가, 인간 간모세포종 및 간 줄기 세포 및 관련 중간엽

세포 파트너의 형태 특성은 31일 간헐적 조사로 수행하였다. 0일째, 간 세포를 TCP 표면에 균질하게 분배하였다. 초기 간모세포종(h) 집단은 3-8 간모세포종(↓)함유하는 구상체 덩어리로서 조직되나, 도 4A의 20x 현미경 사진으로 나타난 바와 같이 단일 세포(↑)로서 발견되었다. 본 도면에서, 간모세포종은 약 10 μm 내지 약 12 μm 평균 크기로 확인된 반면, 약 10 μm 미만의 크기의 더 작은 세포는 중간엽 세포, 잔류 RBC 또는 간 줄기 세포로 간주된다. 세포 배양은 표면에 부착된 다종의 이형 구상체 집합체로 채워지지 않았다.

<97> 배양 5일까지, 잔류 RBC는 TCP 표면으로부터 분리되었으며, 사멸하였다. 대부분 간모세포종 및 다양한 중간엽 세포(mcs)인 남아있는 세포 집단은 도 4B에 나타난 바와 같은 각각의 형태로 안정화되었다. 이러한 안정화는 평평하게 하고, 스프레딩된 세포-세포 접촉이 개시되는 간모세포종 집단에서 증명된 바와 같이 간모세포종(h) 배양 컨플루언트를 증진시킨다. 더욱이, 간모세포종은 날카로운 막 외형 및 매끄러운 세포질 특성을 지니는 훌륭한 세포 특징을 보유한다. 또한, 한정된 공동-배양 상호작용은 거의 나타나지 않으며, 간모세포종 및 중간엽 세포 타입 사이의 분배된 경계가 분리된다.

<98> 15일까지(도 4C), 간모세포종은 "과립" 막을 가지며, 약화된 세포와 일치하는 세포질 특성을 갖는다. 또한, 간모세포종 및 중간엽 세포의 비율이 같게 되었으며, 이로서 비-실질 세포는 제거된 간모세포종으로 표면 면적을 더 차지하는 것으로 제안된다. 이러한 발견은 배지 중 혈청 보충의 부재 하에서 "섬유모세포 과성장"의 통상의 현상과 일치한다. 이러한 변화는 TCP 배양 조건은 중간엽 세포 확대를 위하여 수행되며, 간모세포종 증식 및 생존을 위하여 바람직하지 않은 것을 지시한다. 실제로, 31일째, 간모세포종은 도 4D의 20x 현미경 사진으로 나타난 바와 같이 사멸하거나, 배양 표면을 압도하는 중간엽 세포로서 골격으로 재조직된다.

<99> 다음, TCP 상에서 단독으로 배양되는 경우 대 FP 또는 샌드위치 콜라겐 I형 겔에서 배양되는 경우, 인간 간 전구체를 비교하였다. 배양 10일째는 도 5에 나타난 바와 같다. 도 4A에 나타난 "TCP 상 세포"의 배양 대조군을 위하여, 간모세포종(h)은 희미한 세포 가장자리를 지니는 과립 세포질 특성을 나타낸다. 또한, 대부분 내피 세포 및 스트로마인 중간엽 세포(mcs)는 간모세포종 콜로니를 둘러싼다. 플라스틱 상에서 간모세포종(h)이 나타나는 것은 배양 중 동시에 I-형 콜라겐(FP)에서 씨딩되는 경우의 것과 현저하게 다르다(도 5B). 간모세포종은 한정적인 세포 가장자리 및 과립 세포 세포질-안정한 간모세포종의 특성을 나타내었다. 또한, 중간엽 세포는 한정된 증식을 나타내었으나, 또한 두드러진 세포 가장자리 특성을 나타내었다.

<100> 도 4C에 나타난 샌드위치 설계를 이용하여 배양된 간모세포종은 알부민(빨간색) 및 CK19(녹색) 발현을 위한 면역염색에 의한 증거로서, 확립된 세포-세포 접촉, 한정적인 세포 가장자리 및 담도 작용 및 간세포의 이중 발현을 나타내었다. 결과는 이들 전구체 집단에서 이중 분화의 안정화를 지시한다.

<101> 우레아는 성숙 간 세포에 의하여 독특하게 생산된다. 이에 따라, 그의 발현은 조직-특이적 유전자 발현 및 유의미한 범위의 분화를 암시할 수 있다. 이에 따라, 시험관내 매트릭스 단백질의 작용으로서 비성숙 간 세포의 분화의 범위를 연구하기 위하여, 배양 중 수 시간 후에, 배지 중 우레아의 농도를 결정하였다.

<102> 도 6은 배아 및 태아 간 조직에서 우세한, 세포외 매트릭스에서 배양된 간모세포종을 나타낸 것이다. 생체 내 매트릭스 중 이들의 부분적인 열거는 III형 콜라겐(■), IV형 콜라겐(●), 라미닌(o) 및 IV형 콜라겐-라미닌의 배합물(▽)을 포함하며, 이는 TCP 대조군(▼)에 대하여 비교 분석하였다. 우레아 분석을 위하여, 1-5일 동안 간모세포종을 모니터링하였으며, 그들의 표준화된 우레아 결과는 수직 축 상에서 나타내었다.

<103> 결국, TCP(▼) 상의 대조군 세포는 각각 5.5×10^{-6} 및 1.5×10^{-6} mg/dL의 최대 및 최소 우레아 크기를 갖는 조사를 통하여 열등한 활성을 나타내었다. 더욱 자세하게, 간모세포종이 9.5×10^{-6} mg/dL의 우레아 수준에 도달된 'IV형 콜라겐' 또는 'IV형 콜라겐 및 라미닌 배합물' 상에 씨딩되는 경우, 1일째에 직접적 차이가 관찰되었으며; 분석된 모든 다른 배양은 약 5.3×10^{-6} mg/dL의 우레아 수준 또는 매우 활성이 있으며 정착된 간모세포종 사이에 56% 편차를 갖는다. 우레아 작용에서 약간의 감소의 증거를 나타낸 'IV형 콜라겐 및 라미닌' 상에 씨딩된 간모세포종을 제외하고, 1일 및 2일 결과 사이에는 변화가 거의 기록되지 않았다. 그러나 3일까지, IV형 콜라겐(●) 배양이 1.2×10^{-5} mg/dL에 달하는 최적의 우레아 작용 활성을 나타낸 반면, 다른 배양은 33% 낮은 우레아 수준을 발현하였다. 5일까지, 모든 우레아 수준은 2×10^{-6} mg/dL의 최소 우레아 발현 레벨로 바뀌었으며, 우레아 발현이 암모니아 인자를 요구하기 때문에, 이로서 배양 배지로부터 암모니아가 고갈되었음이 제안된다.

<104> 우레아 생산은 우레아의 '세포 당' 농도로 나타내었다(도 6B). 이러한 도면은 24 시간에 걸친 우레아의 농도를 나타내며, 원형의 '순 검은색(●)' 데이터 점은 TCP(대조군) 상의 간모세포종을 나타내며, 원형의 '순 하얀색

(o)' 데이터 점은 I형 콜라겐 상(평판, FP)에 씨딩된 배양으로부터의 간모세포종이며, 삼각형 (Δ) '회색' 데이터 점은 각각 I형 콜라겐 층(샌드위치 설계) 사이에서 배양된 간모세포종을 나타내도록 표지하였다. 이러한 방식으로, 3일 내지 6일의 배양에 대하여 간헐적 평가를 분석하였다.

- <105> 각 시스템에 대하여 나타낸 바와 같이, 우레아 농도 수준은 3일 째에 높았으나, 조사하는 동안 계속적으로 감소하였다. 또한, 본 연구 중 대조군에서 더 낮은 우레아 수준이 기록되었다. FP 및 샌드위치 구성에서 배양된 간모세포종은 각각 3일 및 4일에 8.0×10^{-5} 및 5.0×10^{-6} mg/dL의 유사한 활성을 가졌다. 이들 값은 플라스틱 배양에서의 대조군 배양과 비교할 때 ~80% 활성 개선에 상응하는 것이다. 또한, 평판 시스템은 5일 및 6일에 더 높은 간모세포종 활성을 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 간모세포종 FP 활성은 샌드위치보다 ~8% 더 나은 활성을 보유하고 있었으며, TCP 분석된 배양보다 ~115% 더 나은 활성을 보유하고 있었다.
- <106> 두개의 추가의 분석을 이용하여, 다양한 매트릭스 상에 씨딩된 세포에 대한 작용 활성을 비교하였다. 도 7은 3일째에 각각 글루코오스 및 암모니아 생성을 도시하였으며, 이는 매일 최고 우레아 활성 시간으로 나타내었다 (도 6). 도 7A에서 글루코오스 비교는 순 검은색(■)으로 표지된 1.5×10^{-3} mg/dL에서 TCP 배양 대조군 수준, 순 하얀색(□)으로 표지된 1.63×10^{-3} mg/dL에서의 I형 콜라겐 FP 배양 수준 및 순 회색으로 표지된 2.6×10^{-3} mg/dL에서 샌드위치 I형 콜라겐 배양으로 나타내었다. 샌드위치 및 TCP 또는 FP 배양에서의 비교에서, 샌드위치 배양이 다른 세포-시스템 반응보다 ~64% 더 높은 글루코오스 수준을 지니는 것으로 나타났다.
- <107> 도 7B는 4.5×10^{-3} mmol/L의 TCP 배양 중, 2.8×10^{-3} mmol/L의 FP 시스템 중 및 2.6×10^{-3} mmol/L 농도 세기의 샌드위치 콜라겐 시스템 중에서의 암모니아 누적을 나타낸 것이다. FP 및 샌드위치 배양은 암모니아 수준이 감소되었으며, 대조군은 ~60% 더 큰 세기의 암모니아 수준을 나타내었다.
- <108> 간모세포종은 도 8에 나타낸 바와 같이, 그의 하층의 화학에 의하여 지령받은 형태 변화를 나타내었다. 도 8A1, 8B2 및 8C1은 배양 10일에 저 확대 이미지 및 전체 표면 특성을 나타내었다. 도 8A2, 8B2 및 8C2는 동일한 배양의 더 큰 이미지 확대를 세부적인 형태의 독특함을 나타내었다. 도 8A1에서, 태아 간 세포를 씨딩하기 전에 6.25 mg/cm^2 로 페트리 표면을 미리 코팅하였다. 10일째, 많은 양의 상호연결된 조직 덩어리 및 점착력있게 겹쳐진 물질이 확립되었다. 또한, 이러한 배양은 최근 발달된 것으로 보이나, 무작위적으로 분산된, 무세포성 및 원형 하위 분류이다. 더욱 상세한 이미지 분석을 위하여, 현미경 사진 도 8A2는 도 8A1의 확대된 구획을 나타내었다. 이러한 확대를 가까이 그룹화된 패턴의 인간 간모세포종 네트워크를 나타내었다.
- <109> 이러한 세포-환경 영향을 대조하기 위하여, 도 8B1 및 8B2에 나타낸 바와 같이 간모세포종 스톱을 0.52 mg/cm^2 라미닌-코팅된 페트리 표면 상에 배양하였다. 도 8B1에서, 다량의 분절된 "백색 소반점"이 씨딩 표면에 분산되었다. 이들 그룹은 도 8B2에서 연장된 구상체-대 표면 접촉을 지닌 매우 밀집된 구상체 집합체로서 입증되었다. 구상체가 성장하고, 이동하는 배지 힘이 큰 구상체의 흔들림을 유발함에 따라, 많은 표면 부착 결합이 깨지고, 배양으로부터 세포가 세척된다. 그러나, 구상체는 I형 콜라겐 및 III형 콜라겐 하층으로 이식되어, 세포 부착 및 추가의 스프레딩을 유도할 수 있다.
- <110> 세포-매트릭스 영향의 세번째 대조를 위하여, 동일한 태아 간 세포를 각각 6.25 및 0.52 mg/cm^2 로 미리-코팅된 III형 콜라겐-라미닌 페트리 표면 상에서 배양하였다. 도 8C1에 나타낸 바와 같이, 총 배양 효과는 백색 백그라운드를 이용하여 상호연결된 조직 덩어리의 많은 양을 나타내었다. 조직 및 매트릭스 성분이 없는 유형의 무세포 면적도 입증되었다. 마찬가지로, 도 8C2는 활성이 있으며 안정한 공동-배양된 간모세포종 및 비-실질세포를 나타내었다. 대부분의 세포는 "자갈(cobblestone)" 배양 배열을 지니는 간모세포종이었다. 또한, 실질 및 비-실질 세포 파트너 사이의 일부 가장자리 상호작용이 관찰되었다.
- <111> 배아 조직에서 풍부하게 발견되는 매트릭스 물질(예를 들어, 라미닌 및 III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐)의 이용으로, 간모세포종에서 특정 형태 및 작용적 변화가 유도되며, 또한 간모세포종에 대한 전구체인 간 줄기 세포(HSC)를 위해 선택된다. 도 9는 TCP, 라미닌, III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐 표면에 씨딩되었으며, 3 내지 10일 동안 배양된 태아 간 세포의 형태를 나타낸 것이다. 3일째 10x 이미지는 TCP3, 라미닌3, 콜라겐III3, 및 콜라겐IV3으로 언급되고, 10일째 4x 이미지는 TCP10, 라미닌10, 콜라겐III10, 및 콜라겐IV10로 언급되었다.
- <112> 3일: 대조군 TCP3 콜로니는 소수의 비-실질 (np) 세포와 함께 다수의 간모세포종 (h)을 나타내었다. 비교적으로, 라미닌 상 3일 배양은 더 적은 부착 세포 및 증가된 스프레딩한 세포와 함께 우세하게 간모세포종으로 구성된다. 반면, III형 콜라겐 상의 세포는 간 줄기 세포를 위하여 선택하였다. 간 줄기 세포의 콜로니는 1, 2일의 배가 시간을 지니며, 균일한 형태를 갖는 단단히 패킹된(packed) 세포로서 여겨질 수 있다. 상기 세포는

HSC 특이 항원(예를 들어, EpCAM+, NCAM+, 알부민+, AFP-, CK19+, CK8+ 및 18+)의 특징적인 발현을 갖는다. 또한, HSC 콜로니 세포는 세포의 세포질의 대부분을 점령하는 핵과 함께 7-9 mm 범위의 특징적인 크기를 갖는다. 콜로니 세포는 약 3일에 나타나며, 간모세포종에 의하여 둘러싸인 채로 있다. 또한, IV형 콜라겐 상에 씨딩된 간 세포는 두개의 작은 HSC 콜로니의 발달의 시작과 함께 배양 표면을 통하여 많은 간모세포종을 나타내었다.

<113> 10일: 일부 HSC 콜로니의 온전함의 이미지화를 촉진하기 위하여 4x 확대로 10일째의 현미경 사진을 취하였다. TCP10 대조군 배양에서, 작은 HSC 콜로니가 발달되었으며, 많은 수의 간모세포종에 의하여 둘러싸여 있었다. 이러한 작은 콜로니는 중앙 볼록면과 함께 독특한 두꺼운 외부 능선(ridge)을 획득하였다. 라미닌10 배양을 위하여, 간모세포종은 작은 크기 콜로니 내부에 두꺼운 조직층 및 구상체 배열을 갖는 3-차원 구조를 형성하는 단단히 결합된 작은 집합체로 결집되었다. 콜라겐III10 배양은 외관상으로 다른 세포 타입의 존재를 배제하는 단단하게 패키징된 세포-세포 상호작용으로 유지되며, 다량의 '평평하게 되고 스프레딩된' HSC 콜로니를 함유한다. 나타낸 현미경 사진에서, HSC 증식 콜로니 사이에 생존하는 간모세포종이 거의 없다. 마지막으로, 콜라겐IV10 배양은 간모세포종 및 새로 나타난, 독특한 콜로니 가장자리 및 높아진 가장자리 능선을 지닌 HSC 콜로니를 둘다 함유한다.

<114> HSC 콜로니의 상세한 추가의 조사를 도 10에 나타내었다. 이들 도면에서, 부착 물질은 4.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 코팅된 IV형 콜라겐이며, 간 줄기 세포 콜로니는 12일째 이미지화하였다. 현미경 사진에서 나타낸 바와 같이, 이러한 콜로니의 근처 또는 다른 곳에서 다른 세포 표현형은 거의 발견되지 않았다. 이에 따라, 이러한 환경은 특정 세포 타입을 선택하기 위한 것으로 여겨질 수 있다. 도 10A에 나타낸 10x 현미경 사진을 획득하기 전에, 4-11일 동안 HSC 콜로니를 가지적으로 모니터하였다. 이러한 시간 중, 단단히 밀집된 HSC는 약 10개 세포 미만의 작은 집합체로서 구성되며, 도 10A에 표지된 강조된 원형 영역 내에서 나타난 바와 같이 수백 내지 수천 세포를 함유하는 더 큰 콜로니로 증식된다.

<115> 그러나 12일째 및 8시간 내에, HSC 콜로니 가장자리에서 분화된 세포의 두 유의미한 과성장(outgrowth) 또는 "불출(eruption)"이 발생하였으며, 이는 전형적 간모세포종의 항원성 및 형태 프로필을 지니는 세포를 유발하였다. 이러한 과성장은 더 큰 크기와 독특한 채널(담즙 세관)을 지닌 느슨하게-패키징된, 분화된 세포로서 식별 가능하다. 도 10B는 세포 과성장에 중심 초점을 지닌 20x 현미경 사진을 나타내었다. 이러한 도면에서, 간 전구체 세포의 과성장은 15 내지 21 mm 범위의 크기, 핵 비율로 증가된 세포질, 단일 핵 및 세포의 매트릭스 분리 및 한정된 세포 가장자리로 유지되는 세포-세포 접촉을 갖는다. 또한, HSC 콜로니로부터 나타나는 분화된 세포의 형태적 트래킹(tracking)으로 이러한 확대의 첫 번째 8 시간 동안 약 1200개의 새로운 세포가 나타났다.

<116> 문맥 주위 지역 내 및 간 줄기 세포 적소 내의 매트릭스 성분은 성숙 실질 세포와 관련되어 발견되는 것과 다르며, 인간 간 줄기/전구체 세포의 정제된 하위 집단으로부터 상이한 생물학적 반응이 도출된다. 이들 차이점은 세포 반응을 변형시키고 동적인 발현을 활성화시키는 다양한 신호를 제공하는 것으로 보인다. 세포의 매트릭스 성분의 다른 부류가 생체 내에서 및 시험관 내에서 세포 활성을 유도하는 방법을 결정하여, 미세환경은 질병 조직의 대체 또는 재증식에 대하여 HSC 집단을 시험관 내에서 확대 및 분화하기 위하여 재생될 수 있다.

<117> 이러한 방법으로, 이식된 세포는 전체 기관 교체를 모두 함께 제거한다. 더욱이, 시험관 내 장치, 이를 테면, 생물 반응기는 적절한 세포의 매트릭스 및 가용성 신호 환경에 싸여진 간 전구체로 씨딩될 수 있으며, 그들은 생존 가능한 조직 구조를 지닌 장치 하위 구획이 있다. 이러한 방법으로, 생물 인공 장치는 약리학 연구, 백신 개발 및 기관 기능 상실 및 기관 이식 사이의 다리로서 이용될 수 있다. 실제로, 이들 조사로부터 획득된 결과로, 이들 세포를 이용하는 것이 일반적으로 세포 요법 및 생물반응기 장치 의료 치료 옵션을 억제하는 세포 소싱(sourcing) 한정을 개선시키는 수단일 수 있는 것으로 제안된다.

<118> 본 발명은 이의 특정 구체예와 관련하여 기술되나, 추가로 변형될 수 있으며, 본 출원은 다음 반응의 임의의 변화, 용도 또는 변형을 포함하는 것으로 의도되는 것으로 이해하여야 할 것이다. 일반적으로, 본 발명의 원리는 이하 나타낼 필수적 특성에 적용될 수 있고 첨부된 청구항의 범위 내에서 수행되는 바와 같은 본 발명에 적합한 본 기술 내에서 공지이거나 통상 실행되는 본 개시물로부터의 출발을 포함한다.

도면의 간단한 설명

<16> 도 1은 배양 설계 시스템 및 콜라겐 매트릭스 물질을 도식적으로 나타낸 것이다. A.) 영양 배지로 부양되면서 조직 배양 플라스틱 (TCP) 표면 상에 씨딩된 간모세포종인 대조군 배양. B.) 콜라겐 매트릭스 물질을 확립하기 위하여 이용되는 성분의 비를 나타낸다. C.)는 간모세포종으로 씨딩된 콜라겐의 평판 설계이다. D.) 콜라겐

및 간모세포종의 "샌드위치" 설계이다.

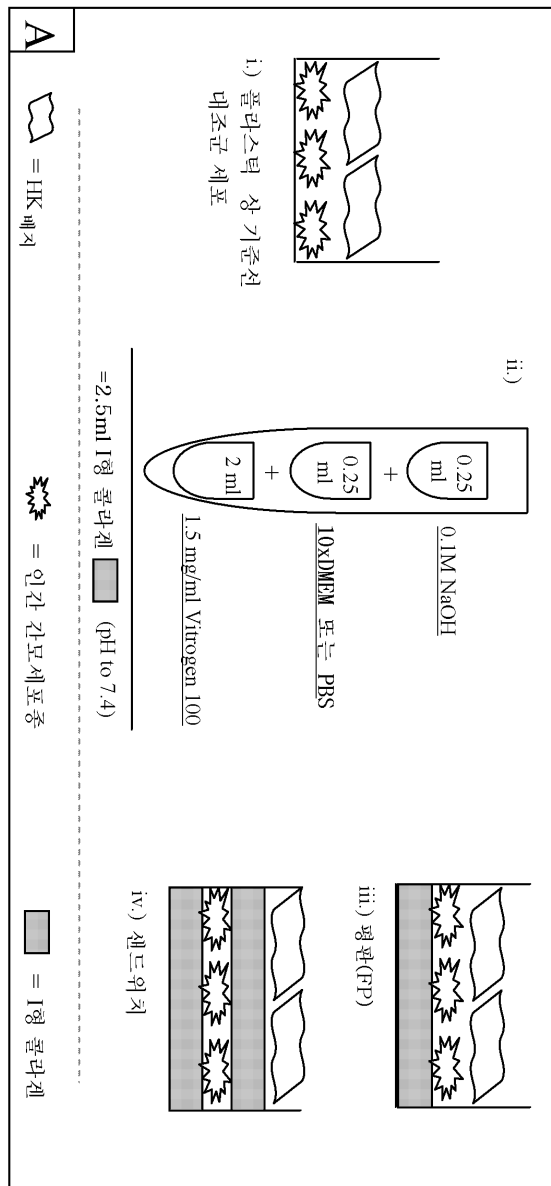
- <17> 도 2는 TCP 표면 상에 단층의 매트릭스를 적용하기 위한 기술을 도식적으로 나타낸 것이다. A.) 표면을 미리 코팅하는 유용한 개시 단계를 나타낸다. 매트릭스 분자는 일정 기간의 시간 동안 표면에 이형적으로 분배된다. B.) 멸균 방법. C.) 콜라겐 겔 또는 원섬유(fibril)를 확립하기 위한 과정 중 발생하는 산성 pH를 중화하기 위한 3번의 1x PBS 세척. D.) 매트릭스 상에 단층으로 씨딩하는 간 세포 및 영양 배지로 부양되는 최종 산물.
- <18> 도 3은 STO 5 배양에서 발견되는 매트릭스 성분에 대한 면역조직화학 결과의 사진을 제공하는 것이다.
- <19> 도 4는 0, 5, 15 및 31일 배양하는 동안 간 세포 특성의 저속도 촬영의 20x 현미경 사진을 나타낸 것이다. 도 4A: 분산된 단일 세포와 함께 큰 덩어리 세포로서 간모세포종을 나타내는 0일. 도 4B: 중간엽 세포와 관련된 컨플루언트(confluent) 간모세포종을 나타내는 5일. 도 4C: 동량의 간모세포종 및 중간엽 세포를 지니는 15일. 도 4D: 중간엽 세포가 풍부한 31일.
- <20> 도 5는 10일에 대조군 TCP, 평판 및 샌드위치 설계 시스템에서 배양된 인간 태아 간 세포의 10x 현미경 사진을 나타낸 것이다. A.) 대조군 배양 반응 - 중간엽 (np) 세포에 의해 둘러싸인 간모세포종(h) B.) 평판 배양 반응 - 소수의 중간엽 세포를 지닌 간모세포종 (h) 콜로니 C.) 샌드위치 배양 반응 - 알부민 (빨간색) 및 CK19(녹색)에 대해 면역 염색된 간모세포종 (h) 콜로니.
- <21> 도 6은 다양한 매트릭스에서 성장한 세포로부터의 우레아 생산을 나타낸 것이다. A.) III형 콜라겐(■), IV형 콜라겐(●), 라미닌(o) 및 IV형 콜라겐-라미닌의 배합물(▽) 상에서 배양된 간모세포종에서 발견되는 우레아의 기능을 플라스틱 대조 배양(▼)에 대하여 비교 분석하였다. B.) TCP (●), 평판 I형 콜라겐 (o), 및 샌드위치 I형 콜라겐 I (▽)에서 배양된 간모세포종에 대한 우레아 기능.
- <22> 도 7은 다양한 매트릭스에서 성장한 세포로부터의 글루코오스 및 암모니아 생산을 나타낸 것이다. A.) 대조군 TCP (■), 평판 () 및 샌드위치 (▣) 시스템 설계에서 배양된 간모세포종에 대한 글루코오스 간 기능. B.) 대조군 TCP (■), 평판 () 및 샌드위치 (▣) 시스템 설계에서 배양된 간모세포종에 대한 암모니아 간 수준.
- <23> 도 8은 줄기 세포 적소의 매트릭스 성분에서 성장하는 간 전구체 세포의 시험관내 성장 특성을 나타낸 것이다. A1.) III형 콜라겐, B1.) 라미닌 및 C1.) III형 콜라겐 및 라미닌의 혼합물에 씨딩한 간모세포종에 대한 전체 페트리 접시 표면에서의 10-일 배양 이미지를 나타낸 것이다. 비교적으로, 세포 수준 반응을 설명하기 위하여 동일한 배양을 10x 배율(A2, B2 및 C2)로 관찰하였다.
- <24> 도 9는 배아 매트릭스 물질(III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐)에서 태아 인간 간 세포를 씨딩한 후의 간 줄기 세포 콜로니의 과성장을 나타낸 것이다. 3일 간모세포종 (h)은 모든 매트릭스 물질에서 명백하다. 비-실질 세포 (np)는 모든 조건 하에서 명백하며, 현미경 사진에서 표지된다. 간 줄기 세포는 III형 콜라겐에서 배양 중 3일에 처음에 발견되나, 그들은 TCP, III형 콜라겐 및 IV형 콜라겐에서 10일 배양에서도 나타난다.
- <25> 도 10은 본 발명에 따라 선택된 간 줄기 세포를 나타낸 것이다. 간모세포종으로 결정되는 특이한 세포 타입이 발생하는 장기간 배양에서 분화 동력은 12일에 HSC 콜로니의 가장자리로부터 나타난다. A)의 강조된 영역은 3-11일로부터 발전된 HSC 콜로니를 나타내며, B)는 8 시간 내의 분화를 나타낸다.
- <26> 도 11은 간세포-스톡(stock)을 HS 세포-스톡으로 정제하는 도식적인 방법을 제공한다.
- <27> 도 12는 계대 프로토콜의 도식을 제공한다: HSC는 먼저 A에 나타난 바와 같이 대조군 TCP 접시에 씨딩하였다. 그 다음, B에 나타난 바와 같이 6-웰 배양 컨테이너에 유지된 0.4 μm 다공성 삽입물로 계대하였다. C는 처리되지 않은 삽입물의 정면도이다. D는 삽입물로 미리 코팅된 III형 콜라겐의 정면도이다. E는 삽입물 표면으로 계대된 세포의 최종 산물을 나타낸 것이다.
- <28> 도 13: A1.) TCP 상에 씨딩된 간모세포종에 의해 둘러싸인 결집된 HSC. A2.) A1의 HSC 집합체의 확대도. B1.) TCP 상에 씨딩된, 피콜 분류에 의한 정제 후에 결집된 HSC. B2.) B1의 HSC 집합체의 확대도. 현미경 사진 하부 정보를 제공하는 표는 면역 형광 반응을 나타낸 것이다. 고효성 (++) , 활성 (+), 가변적 (+/-), 및 음성 (-).
- <29> 도 14는 EpCAM, CK19 및 NCAM에 대한 면역형광 표지를 나타낸 것이다. EpCAM은 매우 양성적인(A1 상) 대 (A2 형광)을 나타내었다. Ck19는 가변성 (B1 & C1 상) 대 (B2 음성 HSC 형광 & C2 양성 형광)을 나타내었다. NCAM 도 가변성 (D1 & E1 상) 대 (D2 양성 & 음성 HSC 형광 & E2 양성 형광)을 나타내었다.
- <30> 도 15는 TCP 또는 Bornstein 및 Traub (BoTr) 콜라겐 I-형 단편 물질(Sigma III형 콜라겐)상에서 씨딩하는 경

우 형성된 HSC 콜로니 수의 비교를 나타낸 것이다. 또한, 다른 성체 (I형 콜라겐) 및 태아 (III & IV형 BD 콜라겐) 매트릭스 상에서 콜로니 형성을 자세히 나타낸다.

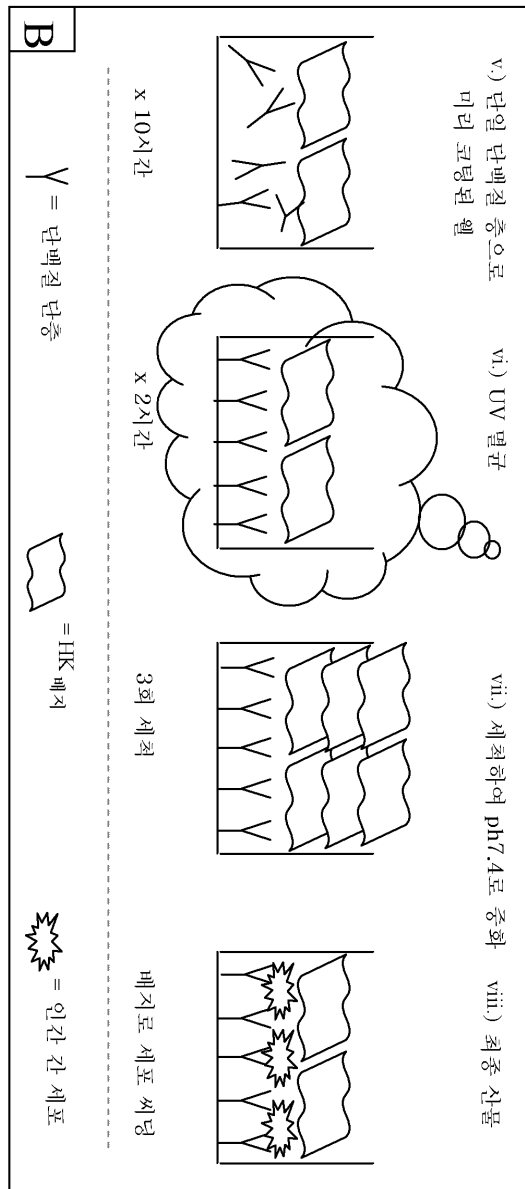
- <31> 도 16은 TCP 또는 Bornstein 및 Traub (BoTr) 콜라겐 I-형 단편 물질(Sigma III형 콜라겐)상에서 씨딩된, HSC 콜로니 확대의 반응을 나타낸 것이다. 화살표는 7일에 새롭게 가시화된 콜로니를 가리킨다. 18일은 4x 현미경 사진에서 BoTr 표면과 함께 큰 콜로니 집합체를 나타낸 것이다. 30일은 두 씨딩 표면에 대하여 집합체가 해산되는 것을 나타낸 것이다. 플라스틱, BoTr, 및 III & IV 형 태아 콜라겐 매트릭스에 대하여 20x 세부 형태를 나타내었다.
- <32> 도 17은 TCP(검은 색) 또는 Bornstein 및 Traub (BoTr) 콜라겐 I-형 단편 물질(Sigma III형 콜라겐 (회색)상에 씨딩된 HSC에 대한 전체 집합체 증식 패턴을 나타낸 것이다. 이미지 표준화를 위하여, "웨이브" 선을 지닌 큰 원 패턴은 총 씨딩 표면(35mmD 접시)을 나타낸 것이다. BoTr에서 씨딩된 HSC는 대조군보다 더 일찍 증식되고(5일), 더 큰 표면 덮임 (20 일)을 성취하고, 표면으로부터 더 느리게(30 일) 없어졌다. 상세한 이미지는 BD의 III & IV형 콜라겐 및 Vitrogen의 I형 콜라겐의 다른 매트릭스 물질에 씨딩되는 경우 콜로니 성장을 비교한 것이다.
- <33> 도 18은 대수기(log phase) 성장(5-10일) 대 포화 밀도 역학 (10-20일) 대 컨플루언스-후(20-30일)에서 가변성을 나타내는 5-30일에 대한 표준화된 세포 량을 제공하는 것이다. HSC BoTr 씨딩된 배양은 배양 기간 동안 개선된 증식 수를 나타내는 것이다.
- <34> 도 19는 세포 증식의 "배가" 또는 "감퇴" 특성을 나타내는 대수기 성장(5-10일), 포화 밀도 역학 (10-20일) 및 컨플루언스-후(20-30일)의 가변성을 나타내는 것이다.
- <35> 도 20은 4개의 독특한 표면에 HSC의 계대를 나타낸 것이다. 먼저 17개 콜로니를 계대하였다. 계대 후 14일에 HSC 콜로니 특성을 비교하였다. Bornstein 및 Traub (BoTr) 콜라겐 I-형 단편 물질(Sigma III형 콜라겐, 6 μ g/cm₂)에서 계대된 HSC는 가장 효율적인 환경을 제공한다.
- <36> 도 21은 간모세포종 (5-11일), HSC 및 간모세포종 (9-17 일), 및 오직 HSC (12-30일)을 비교하는 표준화된 알부민 기능을 나타낸 것이다.
- <37> 도 22는 10일 및 20일에 "기준선 비교"로서 HeLa 세포(어두운 회색 막대)와 함께, TCP (검은 색 막대) 및 Bornstein 및 Traub (BoTr) 콜라겐 I-형 단편 물질(Sigma III형 콜라겐)(밝은 회색 막대)에서 배양된 간 줄기 세포의 텔로머라아제(telomerase) 활성 수준을 나타낸 것이다. A.)는 단백질 수준에 대하여 표준화된 샘플에 대한 활성을 나타낸 것이다. B.)는 세포 수에 대하여 표준화된 샘플에 대한 활성을 나타낸 것이다. 현미경 사진은 상, 음성 대조군 및 텔로머라아제 발현을 지닌 같은 인간 HSC이다.

도면

도면1



도면2



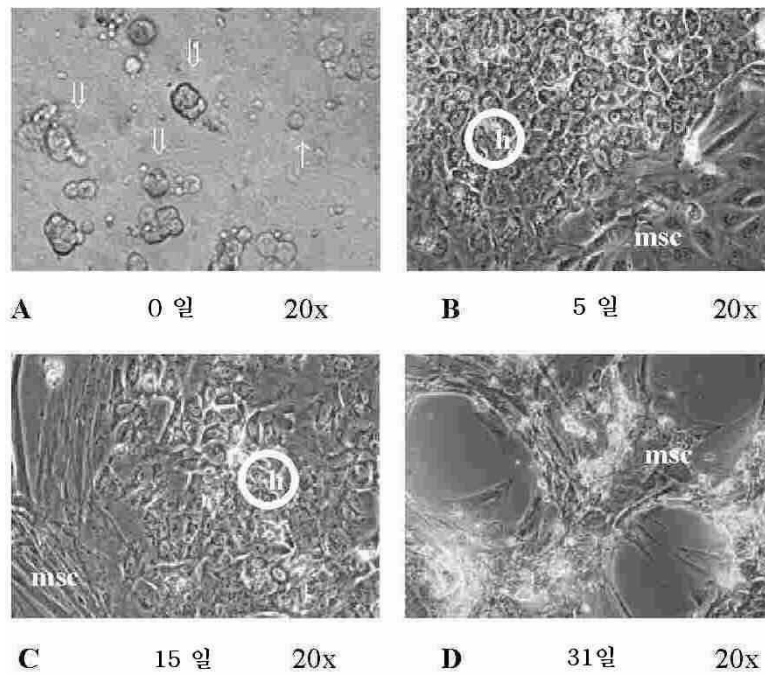
도면3

STO 5 배양에서 발견되는 매트릭스 성분	상	면역형광
III형 콜라겐(++)		
라미닌(++)		
NCAM(+)		

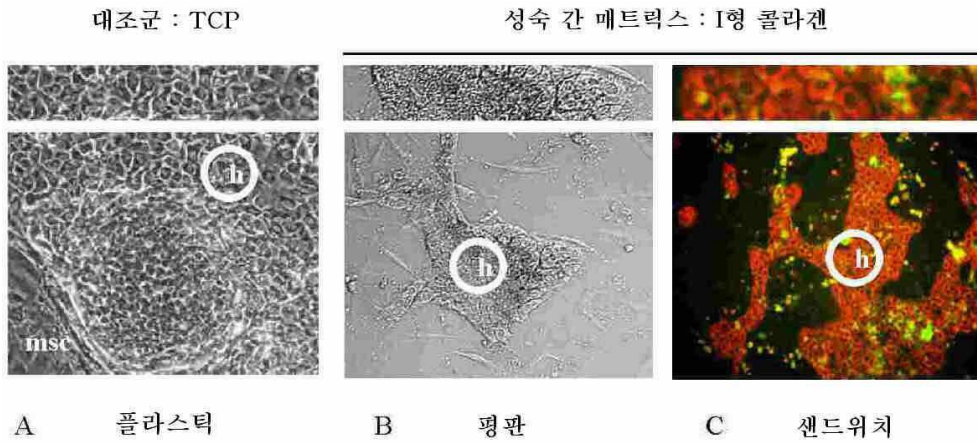
다른 매트릭스 성분 :

I형 콜라겐	(+)
피브로넥틴	(+)
IV형 콜라겐	(-)
헤파란 설페이트 글리코사미노글리칸	(+)

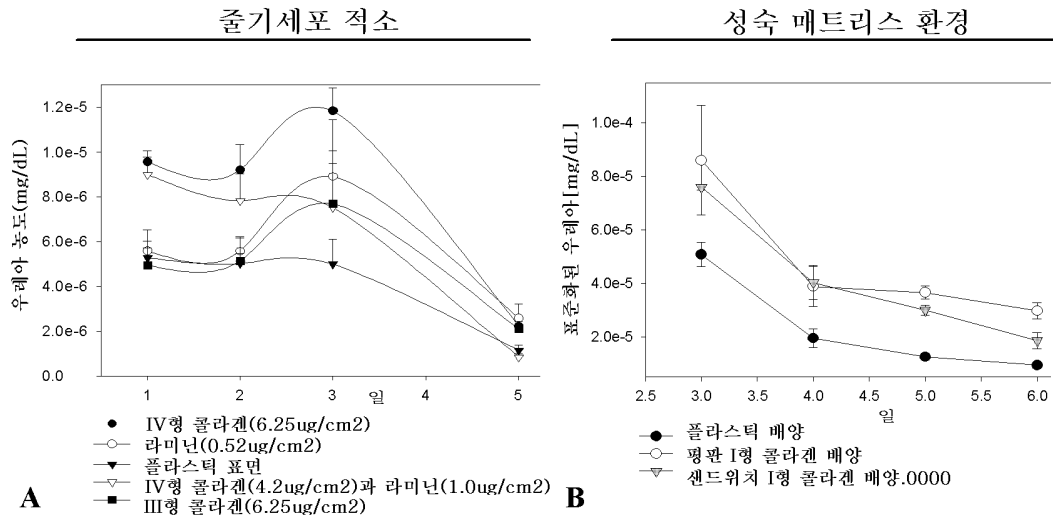
도면4



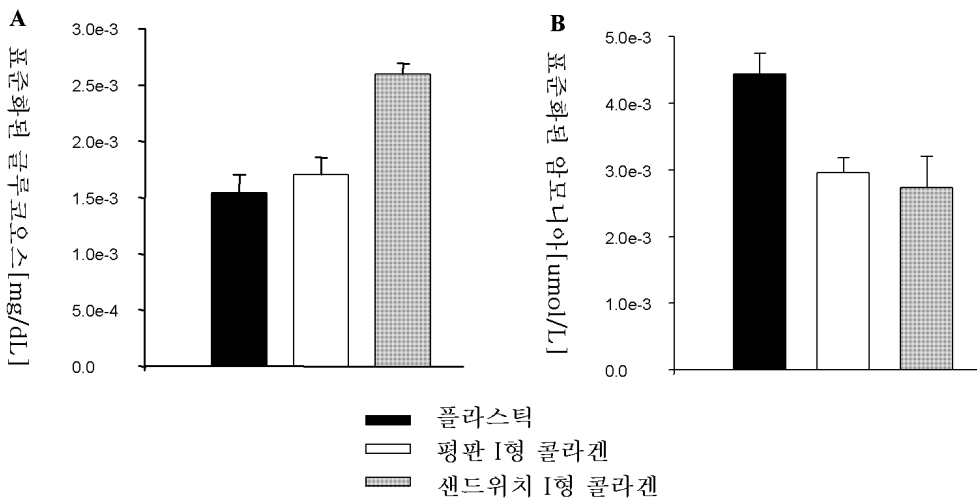
도면5



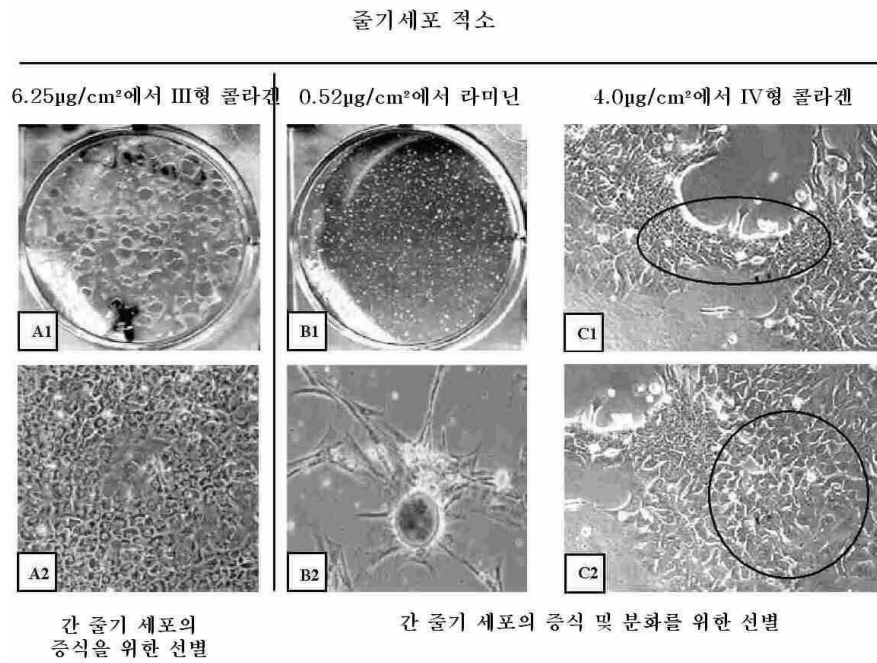
도면6



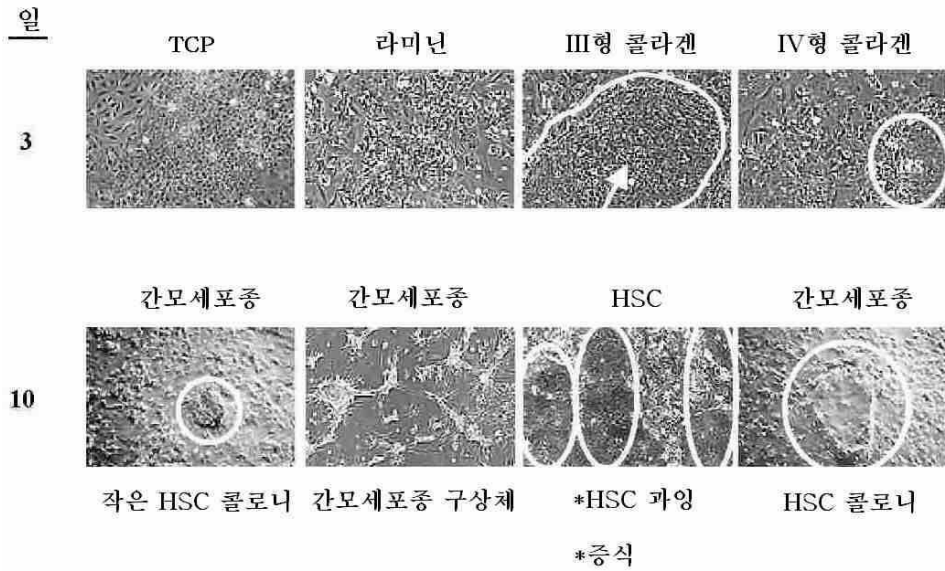
도면7



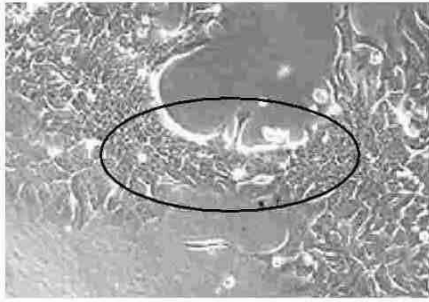
도면8



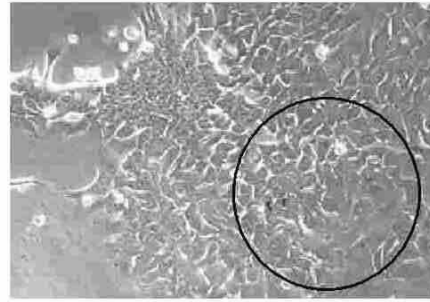
도면9



도면10

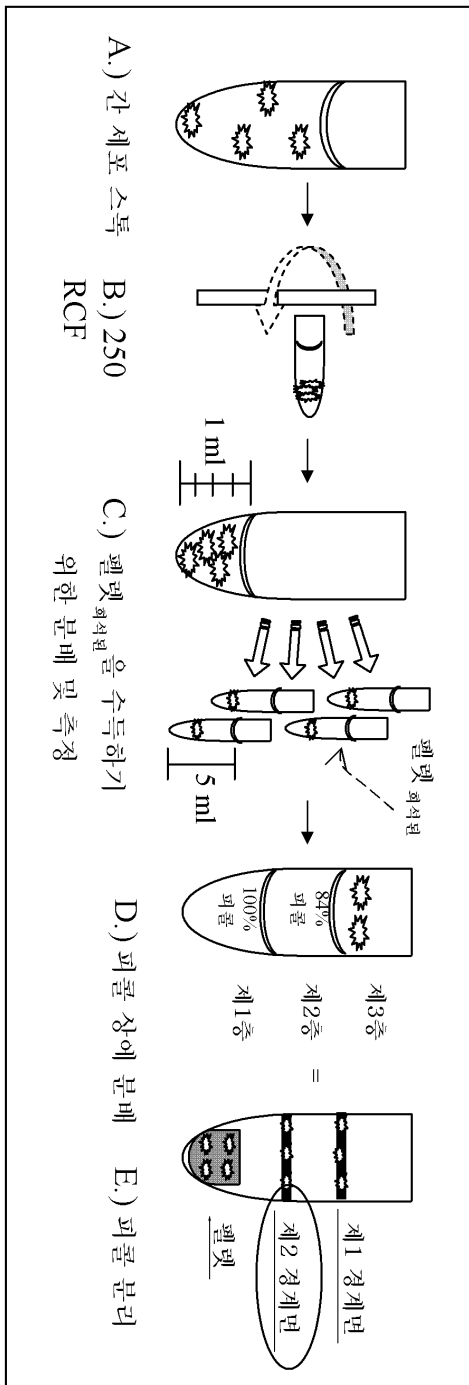


A) 간 줄기 세포(HSC) 콜로니

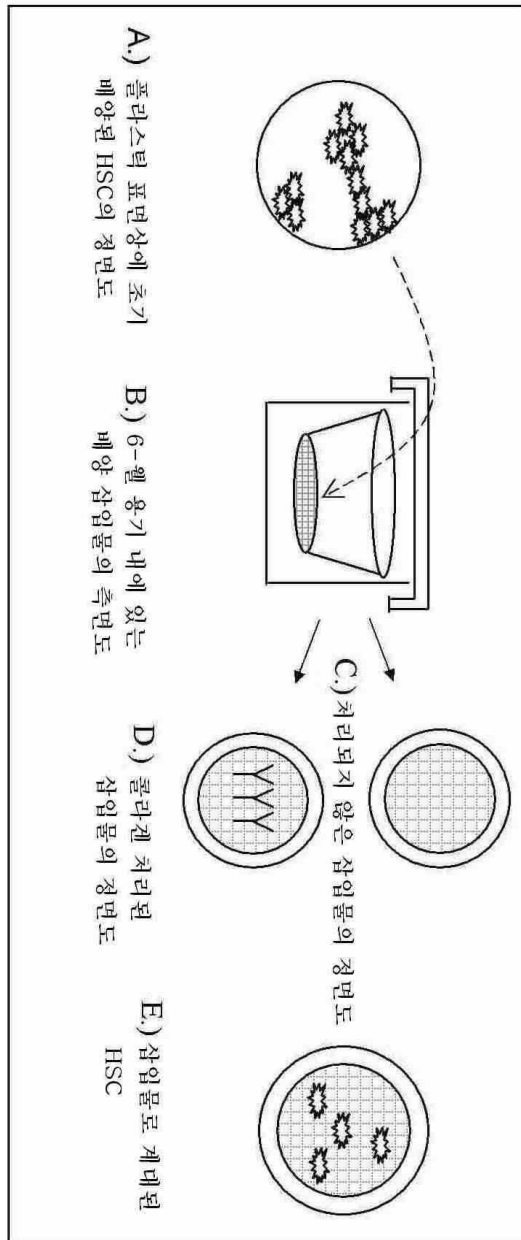


B) 간모세포종

도면11

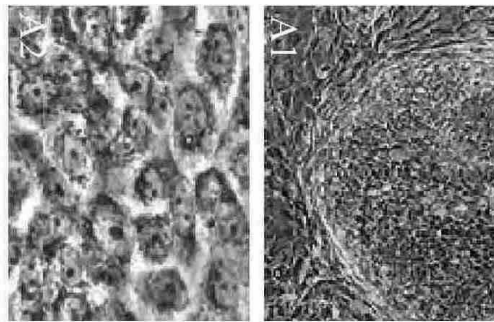


도면12

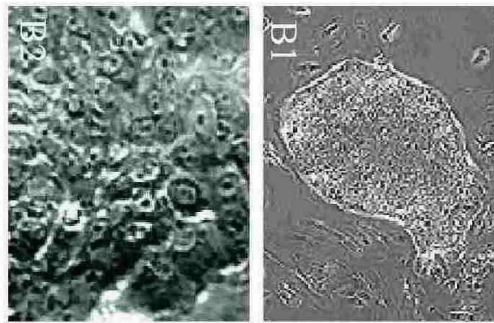


도면13

7일 형태



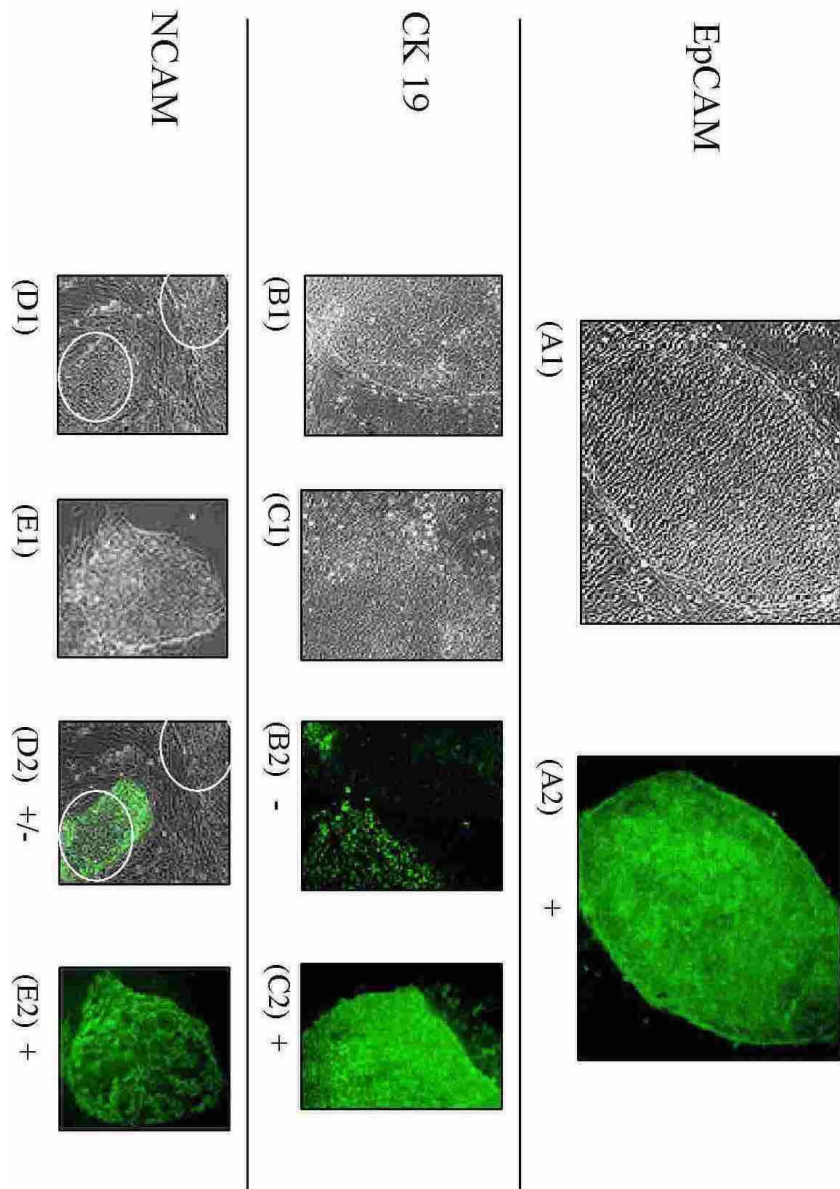
TCP 상의 간 줄기 세포



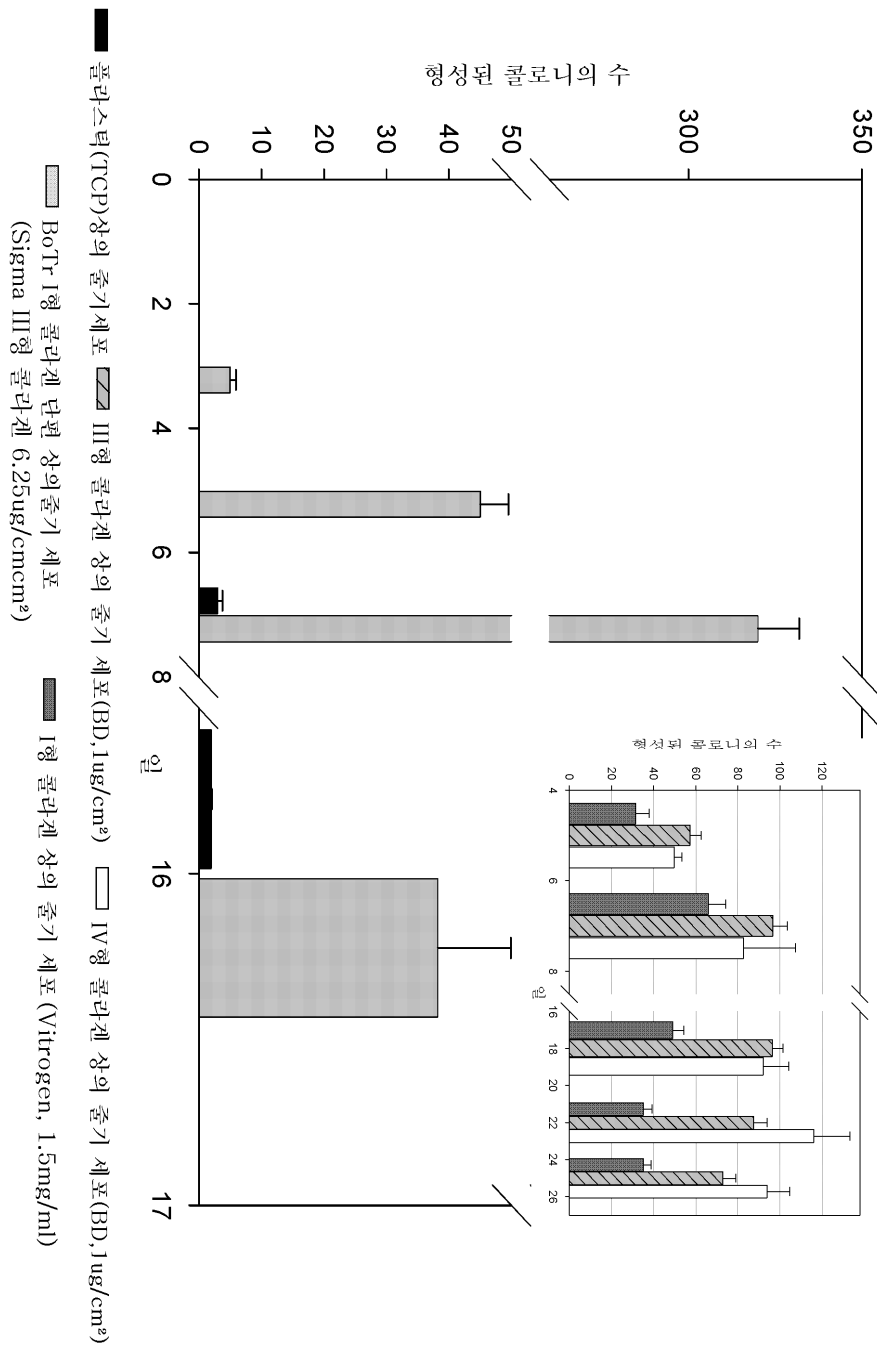
TCP 상의 정제된 간 줄기 세포를
생산하는 피물-분류

알부민	+	+
AFP	-	-
EpcAM	++	++
NCAM	가변적 : 일부 콜로니는 + ; 일부는 -	가변적 : 일부 콜로니는 + ; 일부는 -
CK19	가변적 : 일부 콜로니는 + ; 일부는 -	가변적 : 일부 콜로니는 + ; 일부는 -
E-Cadherin	가변적 : 일부 콜로니는 + ; 일부는 -	+

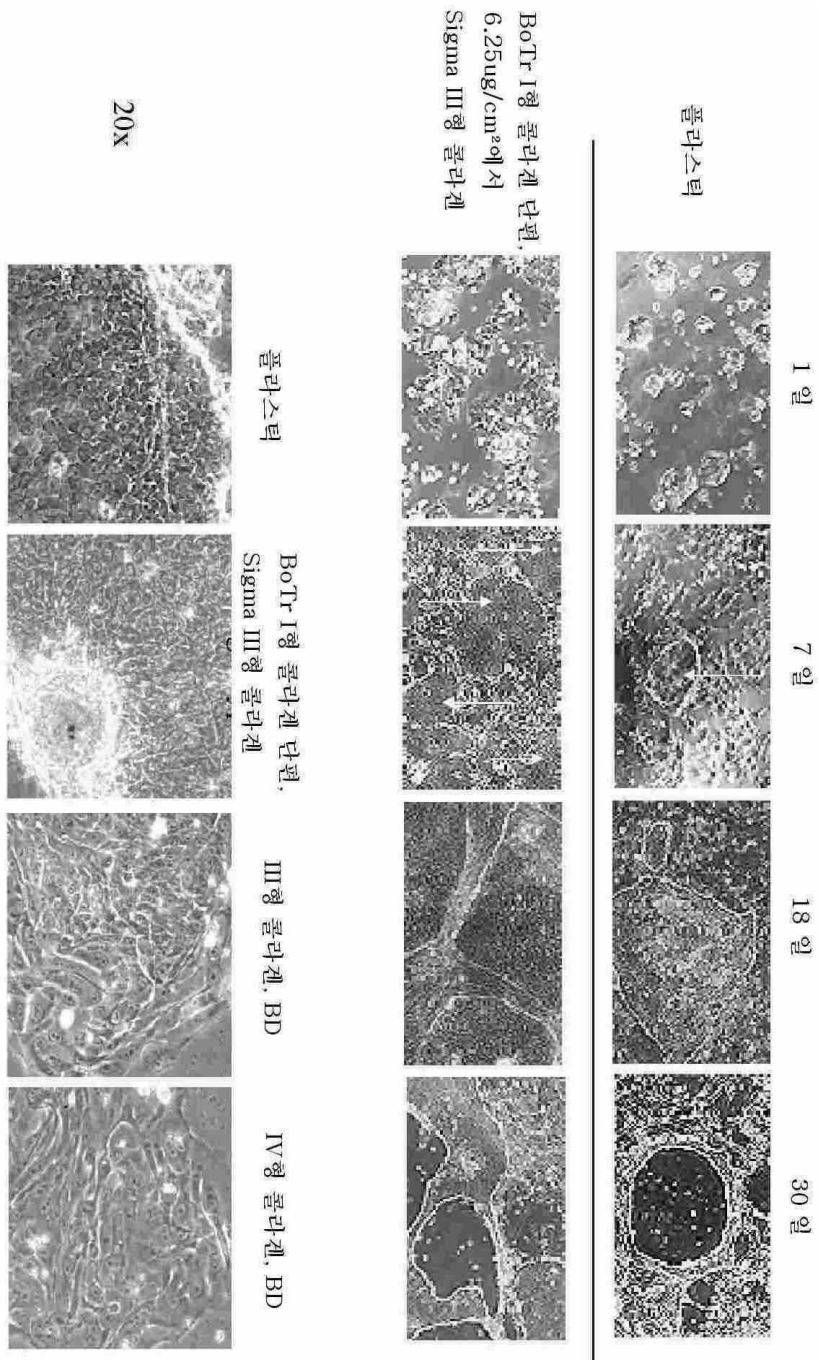
도면14



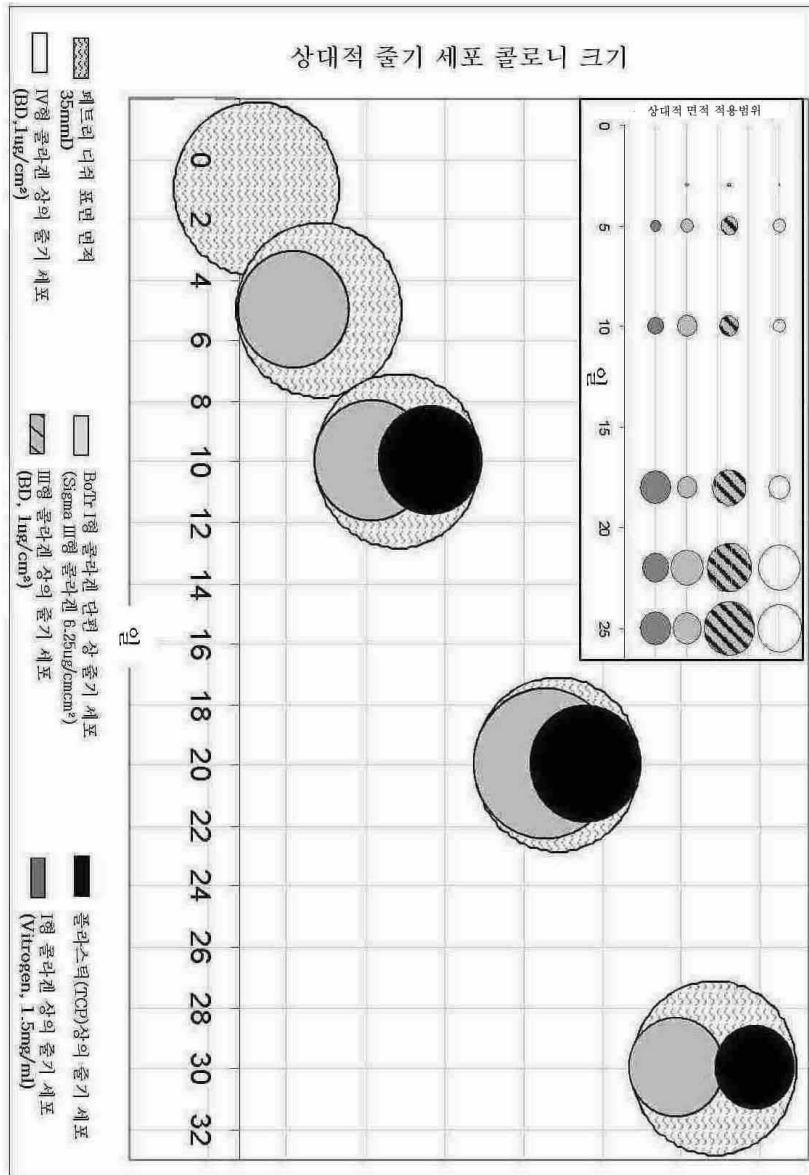
도면15



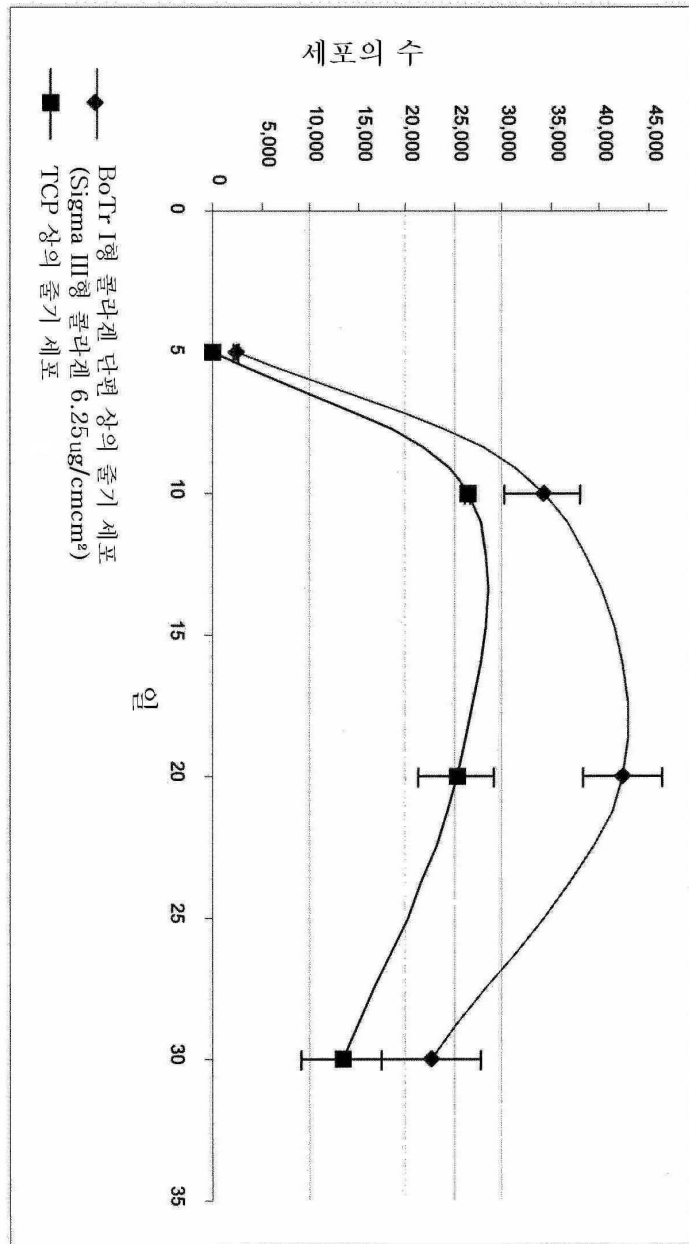
도면16



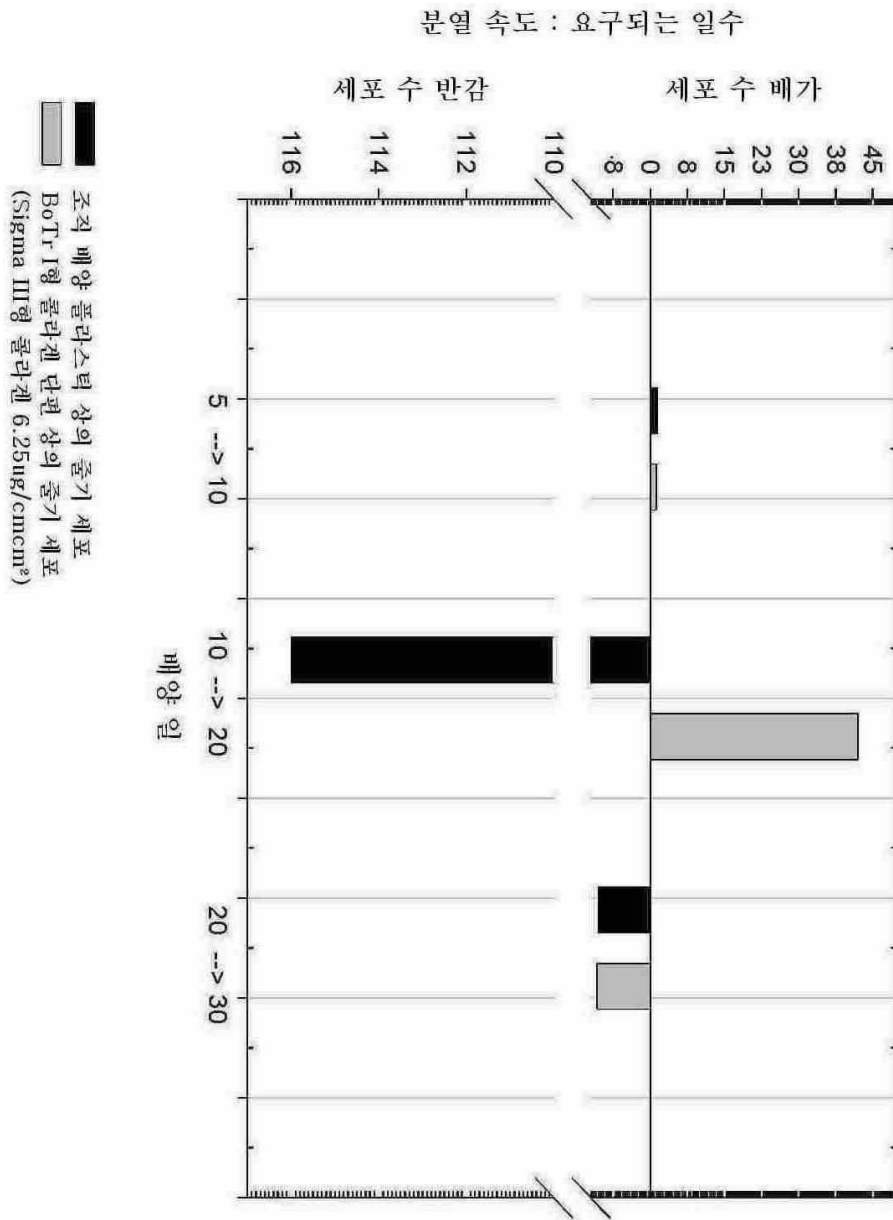
도면17



도면18

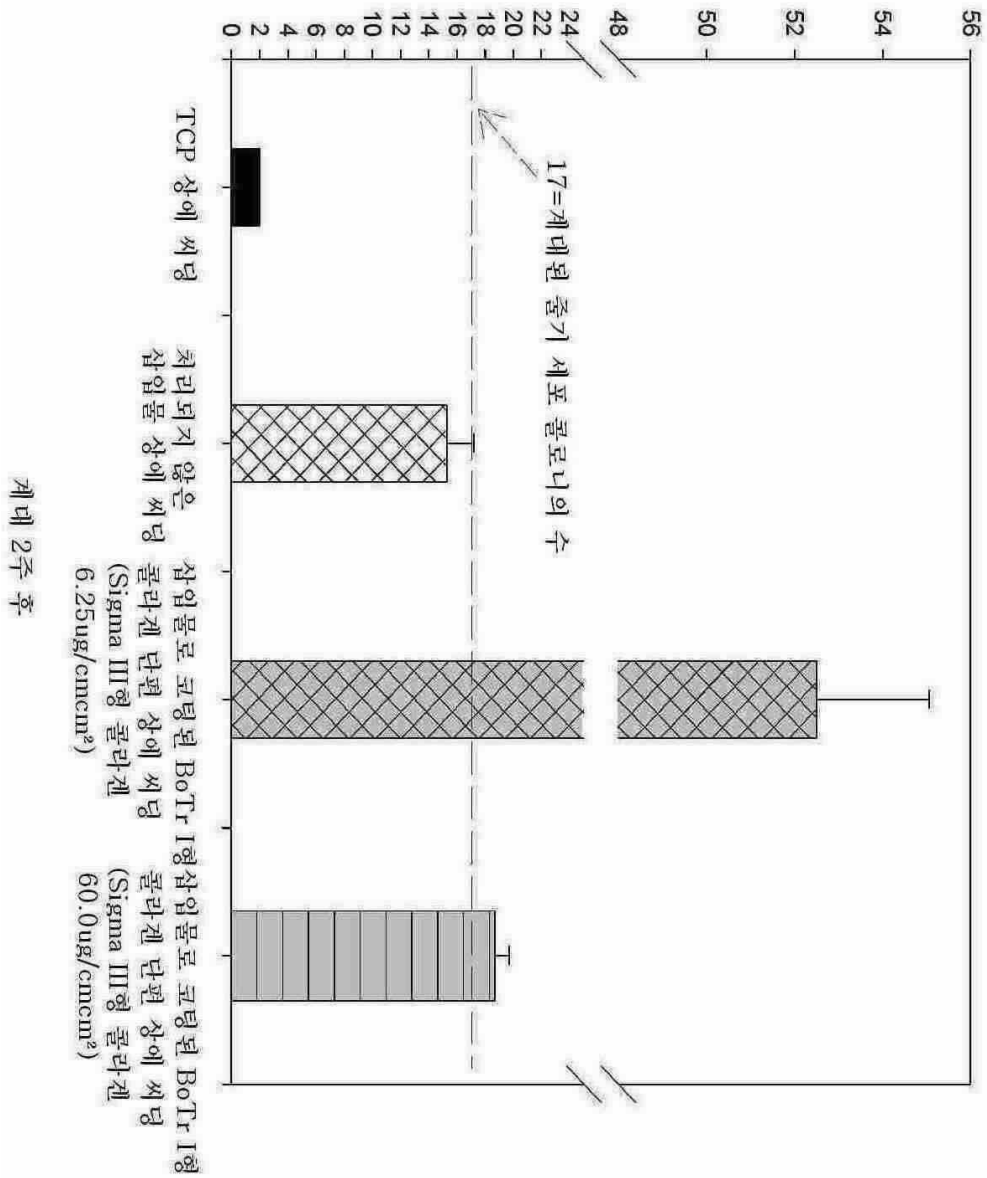


도면19

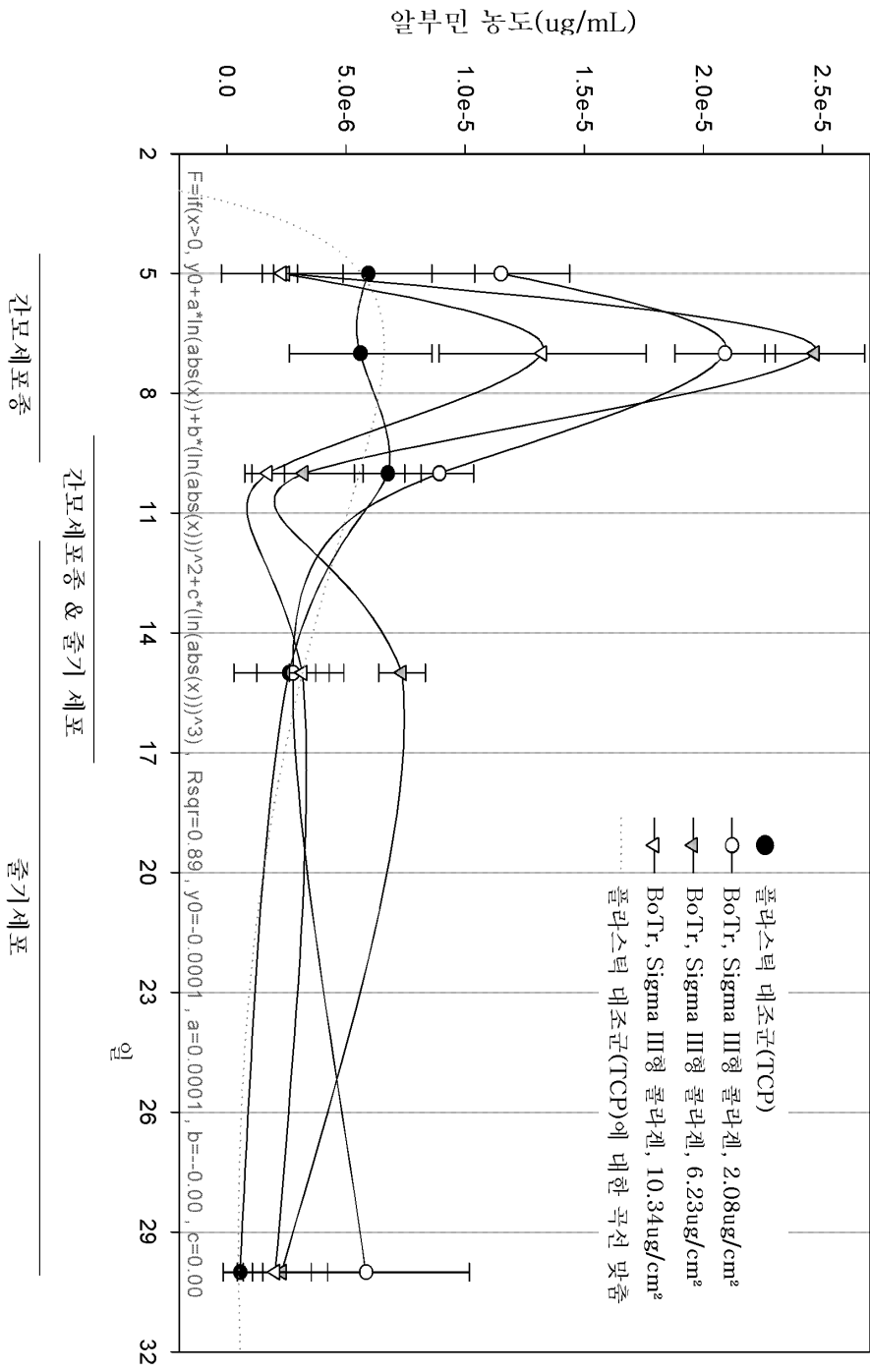


도면20

줄기 세포 계대 후 콜로니 양



도면21



도면22

