

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0135367 (43) 공개일자 2014년11월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)	
(21) 출원번호 10-2013-0055467	(72) 발명자 유경하 서울 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성대우멤버스카운티1차)	
(22) 출원일자 2013년05월16일 심사청구일자 2013년05월16일	박민화 대구 달서구 구마로12길 89, 502동 107호 (본동, 월성주공5단지아파트) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 손민	

전체 청구항 수 : 총 17 항

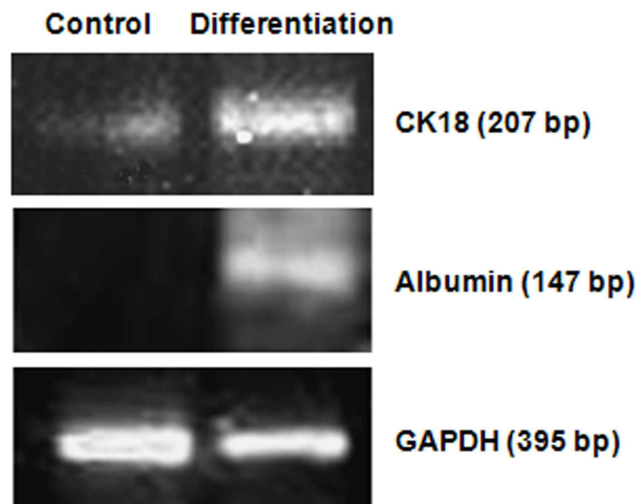
(54) 발명의 명칭 **편도유래 줄기세포의 간세포로의 분화 방법 및 편도유래 줄기세포를 포함하는 간 기능 손상 치료용 세포치료제 조성물**

(57) 요약

본 발명은 편도유래 줄기세포로부터 간세포로의 분화를 유도하는 방법, 상기 방법에 의해 수득한 간세포 및 편도유래 줄기세포를 포함하는 간 기능 손상 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 편도유래 줄기세포로부터 간세포를 분화시키는 방법은 편도적출술 이후에 폐기되는 편도조직을 이용하여 간세포를 단기간에 효과적으로 분화시킬 수 있으며, 이로부터 수득되는 간세포는 체내에서 손상된 간으로의 이동능력 및 간세포로의 분화능을 가짐으로써, 손상된 간 기능을 회복하는 세포치료제 용도로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

우소연

서울 동대문구 정릉천동로 36, 102동 601호 (용두동, 래미안허브리츠)

김한수

서울 영등포구 의사당대로 110, E동 503호 (여의도동, 미성아파트)

조인호

충남 천안시 서북구 천안대로 999-7, 108동 1001호 (두정동, 천안두정역이안더센터럴)

박윤신

서울 구로구 새말로 31, 110동 402호 (구로동, 롯데아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049823

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)-바이오의료기술개발사업-세포재생기술개발사업

연구과제명 새로운 세포치료제로서 편도줄기세포의 발굴 및 기능검색 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2013.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor; IGF), 텍사메타손(dexamethasone), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor; HGF) 및 온코스타틴 M(oncostatin M)을 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 편도유래 줄기세포의 간세포로의 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손 및 간세포 성장인자를 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 배지에 온코스타틴 M을 첨가하고 추가적으로 배양하여 간세포로의 분화를 유도하는 단계를 포함하는 분화 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양기간은 5일 내지 8일이고, (b) 단계의 배양기간은 10일 내지 15일인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린-유사 성장인자는 5 내지 50 ng/ml, 텍사메타손은 10 내지 500 nM, 간세포 성장인자는 5 내지 50 ng/ml 및 온코스타틴 M은 5 내지 20 ng/ml의 농도로 배지에 존재하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인슐린-유사 성장인자는 25 ng/ml, 텍사메타손은 100 nM, 간 성장인자는 25 ng/ml, 및 온코스타틴 M은 10 ng/ml의 농도로 배지에 존재하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 DMEM(Delbecco's modified Eagle medium) 배지인 조성물.

청구항 7

편도유래 줄기세포로부터 분화된 간세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 간세포는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 분화된 것인 간세포.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 간세포는 알부민(albumin), 사이토케라틴(cytokeratin) 18 또는 19 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는 간세포.

청구항 10

편도유래 줄기세포를 포함하는 간 기능 손상 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 줄기세포는 기능이 손상된 간으로의 이동능력(homing capacity)이 있는 것을 특징으로 하는 세포치료제 조성물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 줄기세포는 체내에서 간세포로의 분화능을 가진 것인 세포치료제 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 간 기능 손상은 간염, C형 간염(hepatitis C), 지방간, 알코올성 간 질환, 간독성, 간암, 간경변, 간허혈, 간농양, 간성 혼수, 간위축증 및 담즙울체로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 세포치료제 조성물.

청구항 14

편도유래 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 간 기능 손상이 의심되는 비인간 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 기능 손상의 치료방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 줄기세포는 기능이 손상된 간으로의 이동능력(homing capacity)이 있는 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 세포치료제는 체내에서 간세포로의 분화능을 가진 것을 특징으로 하는 치료방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 간 기능 손상은 간염, C형 간염(hepatitis C), 지방간, 알코올성 간 질환, 간독성, 간암, 간경변, 간허혈, 간농양, 간성 혼수, 간위축증 및 담즙울체로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상인 것

을 특징으로 하는 치료방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 편도유래 줄기세포로부터 간세포로의 분화를 유도하는 방법, 상기 방법에 의해 수득한 간세포 및 편도유래 줄기세포를 포함하는 간 기능 손상 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근에 들어, 기관 재생과 면역반응 조절 능력을 가지는 성체 줄기세포에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재 임상 및 연구에서 사용되고 있는 성체 줄기세포의 공급원은 골수, 지방세포, 제대혈 등이 있다(Ding DC, et al., Cell Transplant., 20:5-14, 2011; Lee OK, et al., Blood, 103:1669-1675, 2004). 그러나, 종래의 성체 줄기세포는 사용에 몇 가지 제한점이 있는데, 조직을 채취하는 과정이 침습적이고, 충분한 양을 얻기 어려우며, 대부분이 중배엽 기원의 조직이어서 외배엽과 내배엽 기원의 조직으로 분화가 용이하지 않다. 이러한 제한점을 극복하기 위하여 줄기세포의 공급원을 다양화하는 연구가 필요하다.

[0003] 한편, 인간의 편도선은 일종의 림프상피 면역조직으로서 인체의 구인두, 비인두에 존재하며, 사춘기까지 그 면역기능을 수행하여 이후에는 서서히 퇴화하므로, 편도선이 비정상적으로 비대해지거나(아데노이드편도 과형성: adenotonsillar hyperplasia), 감염(편도염: tonsillitis)되는 등의 문제가 발생하면 편도선 절제수술(tonsillectomy)을 통해 제거하게 된다.

[0004] 최근, 편도선의 조직에서 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSC)를 추출한 연구결과가 보고되어, 상기 편도조직이 성체 줄기세포의 새로운 공급원으로 주목되고 있다(Janjanin SF, et al., Arthritis Res. Ther., 10:R83, 2008). 상기 편도조직으로부터 유래된 줄기세포는 다른 성체 줄기세포와 동일한 수준의 줄기세포능을 나타내어, 중배엽성 세포-지방세포형성(adipogenesis), 골세포형성(osteogenesis), 연골세포형성(chondrogenesis)-로 분화될 수 있는 것으로 알려져 있으나 내배엽성 세포로의 분화에 대해서는 알려진 바가 없다. 이러한 편도조직의 장점은 편도선 절제수술을 통해 버려지는 조직이기 때문에 재료의 공급이 비교적 원활하다는 점이다.

[0005] 한편, 간은 인간 체중의 3% 정도를 차지하며, 중요한 기능을 수행하는 장기이다. 간을 이루는 핵심세포인 간세포는 글리코겐, 단백질, 지질, 핵산, 비타민류 등의 생합성 및 분해의 기능과 독성이 있는 물질을 해독하는 기능을 나타낸다. 그러나 이런 정상적인 간 기능을 갖지 못하는 간질환 환자의 대부분은 간 조직 손상으로 인해 간세포의 재생 능력이 감소함에 따른다. 현재 국내 간질환 사망자는 10만 명당 1만 천명에 이른다는 보고가 있다. 간질환의 경우, 조직적합성을 갖는 간 조직 이식이 현재까지 가장 효과적인 치료방법으로 알려져 있으나, 공여자를 찾기에 어려움이 따른다는 중대한 단점이 있다. 이에 대한 대안으로 현재 줄기세포에 대한 연구가 활발해지면서 줄기세포를 이용한 세포 치료에 많은 관심이 집중되고 있다.

[0006] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 편도유래 줄기세포로부터 분화될 수 있는 조직을 찾기 위하여 예의 노력한 결과, 편도유래 줄기세포로부터 간세포가 분화될 수 있으며, 편도유래 줄기세포를 체내에 주입하면 손상된 간으로 이동하여 간세포로 분화됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은, 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor), 덱사메타손(dexamethasone), 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor; HGF) 및 온코스타틴 M(oncostatin M)을 포함하는 배지에서 편도유

래 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 편도유래 줄기세포의 간세포로의 분화 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, 편도유래 줄기세포로부터 분화된 간세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 편도유래 줄기세포를 포함하는 간 기능 손상 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 편도유래 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 간 기능 손상이 의심되는 비인간 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 기능 손상의 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor; IGF), 덱사메타손(dexamethasone), 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor; HGF) 및 온코스타틴 M(oncostatin M)을 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 편도유래 줄기세포의 간세포로의 분화 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명 이전에 일부 미분화된 인간배아 줄기세포나, 지방조직 또는 탯줄조직 유래의 성체 줄기세포로부터 간세포로 분화시키기 위한 연구가 이루어진 적은 있었으나, 편도유래 줄기세포로부터 간세포를 분화시키는 방법에 대한 연구는 이루어진 적이 없었다.

[0013] 하지만, 본 발명에서는 지금까지 간세포로 분화될 수 있는 후보로서 고려된 적이 없었던 편도유래 줄기세포로부터 단기간 내에 간세포로의 분화를 유도할 수 있는 방법을 최초로 확인하였다.

[0014] 본 발명에서 용어, "편도"는 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여, 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직을 의미한다. 상기 편도는 인두편도, 귀인두관편도, 구개편도, 혀편도 등을 포함한다. 본 발명에 있어서 상기 편도는 편도유래의 중간엽 줄기세포를 제공하는 원천조직으로 사용된다.

[0015] 본 발명의 용어, "줄기세포"는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cells)란, 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 세포를 의미한다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells)란, 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아줄기세포라 하며, 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못하는 세포를 의미한다.

[0016] 본 발명의 용어, "편도유래 줄기세포"는 편도에서 유래한 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)를 의미하며, 중간엽 줄기세포란, 골, 연골, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등으로 분화될 수 있는 미분화된 줄기세포를 의미하는데, 성인에서는 일반적으로 골수에 머물러 있지만 제대혈, 말초혈액, 기타 조직 등에도 존재한다.

[0017] 본 발명의 방법에 있어서, 편도유래 줄기세포는 편도선 절제수술을 받은 환자에서 분리한 편도선 조직으로부터 채취하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 환자에서 분리한 편도선 조직으로부터 채취할 경우, 채취한 편도조직을 완충액으로 세척한 후, 효소혼합액을 처리하여 결합조직을 분해하고, 이때 부유된 조직을 원심분리하고, 잘라진 조직 내의 세포 혼합액을 Ficol1을 이용한 세포분획법과 원심분리법으로 하층의 침전된 부분만을 배양하고, 세포바닥에의 부착능을 보이는 세포부분만을 분리한 후, 배양접시 바닥에의 부착능을 보이는 세포 중 세포표면 표지자를 이용한 면역화학방법을 이용하여 편도유래 줄기세포를 분리할 수 있다(실시예 2).

[0018] 본 발명의 용어, "간세포"는 간소엽을 구축하는 간의 주요 구성세포를 의미한다. 간 전체의 약 80%를 차지하고 있으며, 포체 내에서는 잘 발달된 다수의 조면소포체, 미토콘드리아, 글리코겐과립 등을 쉽게 관찰할 수 있다. 아미노산, 글루코오스, 지방산, 트리아실글리세롤, 콜레스테롤의 대사, 호르몬, 약제, 유해물질의 분해, 해

독 등의 대사기능을 하며, 생체의 항상성을 유지한다. 그 밖에 알부민, 혈액응고인자, 보체 등 여러 종의 혈청 단백질과 빌리루빈을 생산한다. 생리적 조건 하에서는 분열능을 나타내지 않는 정상세포이지만, 태생기, 간 질환, 인 중독이나 염증에 의한 고도의 간세포장애에서는 왕성한 세포분열에 의한 증식과 재생능을 발휘한다. 생체에 염증이 있을 때에는 대식세포 등에 의해 인터류킨-1(IL-1)이 생산되어 그 작용으로 간세포는 반응성단백질 등의 급성 반응물질을 생산한다.

[0019] 본 발명의 간세포는 간 전구세포(hepatic progenitor cell), 간 정상세포(hepatic stellate cell), 간 실질세포 등을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 편도유래 줄기세포의 간세포로의 분화 방법은 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자, 온코스타틴 M을 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 상기 배지에는 텍사메타손, 간세포 성장인자, 온코스타틴 M 외에 페니실린, 스트렙토마이신 등의 항생제, 소태아혈청(Fetal bovine serum; FBS) 등을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에서 용어, “인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor; IGF)”는 인슐린과 구조가 비슷한 분자량 7,500의 폴리펩티드로 이루어진 성장인자를 의미한다. 혈청 내에서 인슐린과 유사한 작용을 하지만 인슐린 항체로 억제되지 않는 물질로서, 연골세포의 증식이나 단백질 생합성에서 성장호르몬의 작용을 매개하는 것 외에 인슐린과 유사한 생리작용을 한다. 혈장 내에 고농도로 존재하지만, 대부분 결합단백질과 결합하여 불활성화된다. IGF는 결합단백질과 함께 주로 간에서 합성되며, IGF의 합성·분비는 성장호르몬에 의해 촉진된다. 혈장만이 아니라 신장, 췌장, 심장, 뇌하수체, 골격근 등 대부분의 조직에 분포한다.

[0022] 본 발명에서 용어, “텍사메타손(dexamethasone)”은 글루코코르티코이드-유사의 생리활성을 하는 합성스테로이드를 의미한다. 강력한 항염활성이나 항충격활성을 가지는 약품으로 사용하고 있다. 또 음성 피드백작용에 의해 뇌하수체에서의 부신피질자극호르몬(ACTH) 생산을 억제하기 때문에 부신피질호르몬의 억제시험시의 투여약제로 이용하기도 한다.

[0023] 본 발명에서 용어, “간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor; HGF)”는 초대배양 간세포에 대한 증식촉진인자로서, 여러 가지 간엽계세포에 의해 생산되며, 대부분 상피계 세포, 뉴런, 내피세포, 일부의 간엽계세포를 표적으로 한다. 발생과정에서는 상피-간엽 상호작용의 매개체로서 간, 신장, 폐 등의 내장기관, 태반, 골격계의 형성에 관여하고, 성체에서는 간을 비롯하여 신장, 폐, 소화관의 재생을 촉진하는 기관재생인자로 기능하며, 신경영양인자, 혈관신생인자로서도 작용한다.

[0024] 본 발명에서 용어, “온코스타틴 M(oncostatin M)”은 인터류킨-6(IL-6) 군에 속하는 다발성 사이토카인(pleiotropic cytokine)으로서, 구조와 기능에 있어 백혈병 억제인자(leukemia inhibitory factor; LIF)와 상당히 유사한 것으로 알려졌다. 간 발달, 혈액생성, 감염, 중추신경계 발달에 있어 중요한 인자로 알려져 있으며, 뼈 형성 및 파괴와도 연관되어 있다는 보고도 있다.

[0025] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자 및 온코스타틴 M은 시판되는 임의의 소재를 구입하여 사용할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예로 텍사메타손은 시그마-알드리치사, 간세포 성장인자는 R&D사, 인슐린-유사 성장인자 및 온코스타틴 M은 R&D시스템사로부터 구입하여 사용하였으나(실시예 3), 이에 제한되지 않는다.

[0026] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 (a) 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자를 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 배지에 온코스타틴 M을 첨가하고 추가적으로 배양하여 간세포로의 분화를 유도하는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 (a) 단계는 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자를 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계로서, 이외에도 페니실린, 스트렙토마이신 등의 항생제, 소태아혈청(FBS)등을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 배양기간에 있어서 바람직하게는 5일 내지 8일, 더욱 바람직하게는 7일일 수 있다.

[0028] 상기 (b) 단계는 (a) 단계의 배지에 온코스타틴 M을 첨가하고 추가적으로 배양하여 간세포로의 분화를 유도하는 단계이다. 배양기간에 있어서 바람직하게는 10일 내지 15일, 더욱 바람직하게는 14일일 수 있다.

- [0029] 바람직하게는 상기 배지를 배양기간이 4일을 초과할 경우, 4-5일 마다 신선한 배지로 배지를 교체하여 줄 수 있다.
- [0030] 상기와 같은 2단계로 진행된 분화 방법에 의하여 분화를 유도할 경우 보다 짧은 배양기간 동안의 분화의 효율을 증가시킬 수 있으며, 본 발명의 일 실시예로서, 이와 같은 2단계의 분화 방법을 사용한 세포에서 간세포의 특이적 마커로 사용되는 사이토케라틴 18(CK18) 및 알부민(ALB) 유전자가 발현됨을 확인할 수 있었다(실시예 3).
- [0031] 본 발명의 일 실시예로서, 간세포 분화를 유도하기 위하여 편도유래 줄기세포의 3번째 계대 배양물을 21일간 2단계의 과정으로 나누어 세포배양 하였으며, 구체적으로 i) 첫 번째 과정으로서, 100 mm의 세포배양 용기에 일백만 개의 세포를 깔았으며 5% FBS, 100 μ g/ml의 스트렙토마이신, 100 U/ml의 페니실린, 25 ng/ml의 인슐린 유사 성장인자, 25 ng/ml의 간세포 성장인자, 100 nM 텍사메타손을 포함하는 DMEM 배지에서 7일간 세포배양을 하였다. ii) 두 번째 과정에서, 10 ng/ml의 온코스타틴 M을 첫 번째 과정 배지에 첨가하였고, 세포를 14일을 더 추가적으로 세포배양 하였다. 이러한 세포배양 배지는 일주일에 두 번 갈아 주었다(실시예 3).
- [0032] 바람직하게는, 상기 인슐린-유사 성장인자는 5 내지 50 ng/ml, 텍사메타손은 10 내지 500 nM, 간세포 성장인자는 5 내지 50 ng/ml, 및 온코스타틴 M은 5 내지 20 ng/ml의 농도로 배지에 존재할 수 있다.
- [0033] 편도유래 줄기세포의 간세포로의 분화를 위한 배지에 첨가되는 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자 및 온코스타틴 M의 농도가 각각 5 ng/ml, 10 nM, 5 ng/ml 및 5 ng/ml 미만일 경우에는 편도유래 줄기세포로부터 간세포로의 분화에 필요한 기간이 훨씬 길어지거나, 분화 효율이 떨어지는 단점이 있다. 또한, 텍사메타손, 간세포 성장인자 및 온코스타틴 M의 농도가 각각 50 ng/ml, 500 nM, 50 ng/ml 및 20 ng/ml을 초과할 경우에는 분화유도 효율에 있어 개선이 없어, 이와 같은 고농도의 물질을 사용하는 것은 비효율적인 단점이 있다.
- [0034] 더욱 바람직하게는, 상기 인슐린-유사 성장인자는 25 ng/ml, 텍사메타손은 100 nM, 간세포 성장인자는 25 ng/ml, 및 온코스타틴 M은 10 ng/ml의 농도로 배지에 존재할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 방법에 있어서, 분화 유도시 사용되는 배지는 줄기세포의 배양을 위해 이용될 수 있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들면, DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), Keratinocyte-SFM (Keratinocyte serum free medium), RPMI-1640 등을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 DMEM 배지를 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "DMEM 배지"는 Basal Eagle Medium(BEM)의 변형된 배지로서, 다양한 포유동물 세포주 배양에 일반적으로 사용되는 배지이다. BEM에 비하여 아미노산의 함량이 약 4배 많이 첨가된 것이 특징이며, 기본 배지 조성은 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)이다.
- [0037] 상기 줄기세포 배지는 첨가제로 보충될 수 있다. 일반적으로, 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.
- [0038] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 편도유래 줄기세포로부터 분화된 간세포를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서의 용어, 편도유래 줄기세포 및 간세포는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0040] 구체적으로, 본 발명의 간세포는 편도유래 줄기세포로부터 분화시킴으로써 시험관 내 또는 생체 내에서 얻을 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 용어, "분화"란 줄기세포로부터 특정 세포로 구조와 형태를 변화시키는 과정을 총칭한다. 구체적으로 정자와 난자가 수정하여 만들어진 수정란이라는 하나의 세포는 초반에 난할이라는 분열을 통하여 여러 개의 같은 모습의 세포로 분열한다. 그 후 각 세포는 분열, 성장 등을 통하여 다양한 조직이나 기관을 이루는 특수화

된 구조로 변화하게 된다. 이렇게 특수화된 구조를 지니게 된 세포들은 각각에게 주어진 기능을 수행하게 된다. 이렇게 각각의 기능을 수행하기에 알맞은 구조와 형태를 변화시키는 과정을 말한다.

[0042] 상기 분화는 자연발생적 분화 및 유도 분화 등을 포함한다.

[0043] 바람직하게는, 본 발명의 간세포는 상기한 바와 같은, 편도유래 줄기세포를 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자 및 온코스타틴 M을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 간세포로의 분화 방법에 의하여 얻어질 수 있다. 더욱 바람직하게는, (a) 인슐린-유사 성장인자, 텍사메타손, 간세포 성장인자를 포함하는 배지에서 편도유래 줄기세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 배지에 온코스타틴 M을 첨가하고 추가적으로 배양하여 간세포로의 분화를 유도하는 단계를 포함하는 분화 방법에 의하여 얻어질 수 있다.

[0044] 배양기간에 있어서, (a) 단계의 배양기간은 바람직하게는 5일 내지 8일, 더욱 바람직하게는 7일일 수 있고, (b) 단계의 배양 및 분화유도기간은 바람직하게는 10일 내지 15일, 더욱 바람직하게는 14일일 수 있다.

[0045] 배지에 첨가된 화학물질의 농도와 관련하여 바람직하게는, 인슐린-유사 성장인자는 5 내지 50 ng/ml, 텍사메타손은 10 내지 500 nM, 간세포 성장인자는 5 내지 50 ng/ml, 및 온코스타틴 M은 5 내지 20 ng/ml의 농도로 배지에 존재할 수 있고, 더욱 바람직하게는 인슐린-유사 성장인자는 25 ng/ml, 텍사메타손은 100 nM, 간세포 성장인자는 25 ng/ml, 및 온코스타틴 M은 10 ng/ml의 농도로 배지에 존재할 수 있다.

[0046] 또한 상기 배지에는 페니실린, 스트렙토마이신 등의 항생제, 소태아혈청(FBS) 등을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 바람직하게는, 본 발명의 간세포는 알부민(albumin), 사이토케라틴 18(cytokeratin 18) 및 사이토케라틴 19(cytokeratin 19) 유전자를 발현할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 용어, “알부민”은 생체세포나 체액 중에 널리 함유되어 있는 일군의 단순 또는 복합단백질을 의미한다. 수소이온농도나 염류농도의 영향을 받고, 또한 열(응고온도 60-70℃)이나 알코올 등에 의해 응고, 변성하는 등 환경의 변화에 예민하다는 점에서, 세포의 생활과 대단히 밀접한 관련을 갖는 것으로 알려져 있다. 전기영동 혹은 염을 이용한 분별침전 등에 의해 혈액에서 혈청알부민을 분리할 수 있다. 알부민 유전자(ALB)는 간세포에 대한 특이적인 표지자(marker)로 알려져 있는 바, 이의 발현정도에 따라 간세포로의 분화여부를 관찰할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 용어, “사이토케라틴(cytokeratin, CK)”은 세포골격 필라멘트 단백질(cytoskeletal filament protein)로서, 약 20종의 아형(subtypes)이 다양한 형태의 인간의 상피세포(epithelial cells)에서 발현되는 것으로 현재까지 보고되고 있다. 상기 사이토케라틴은 40 KDa와 68 KDa사이의 분자량과 4.9-7.8 사이의 등전(isoelectric) pH의 범위에 있고, 인간 사이토케라틴의 각각은 1부터 20까지 숫자화되어 있다. 인체의 다양한 상피 내에서 성숙(maturation)이나 분화(differentiation)의 정도와 관련된 사이토케라틴을 발현한다. 사이토케라틴 아이소타입(isotype)은 세포질에서 사이토케라틴의 위치(localization)와 세포유형(cell type)에 의존하여 결정된다. 서로 다른 사이토케라틴 형태들은 분자량뿐만 아니라 그들이 산성형 또는 염기형 인지지에 따라 다양한 사이토케라틴이 인체를 통틀어 여러 종류의 상피 사이에 다르게 분포되어 있다. 사이토케라틴 아형의 발현 양상은 다른 형태의 상피성 암종(epithelial malignancies)의 특징에서 증가하는 정도로 사용되기도 한다. 또한, 세포질 분자(cytoplasmic molecules)인 사이토케라틴은 HSP70(heat shock protein 70)과 마찬가지로 여러 가지 암세포의 표면에서 과발현되고 일부는 나쁜 예후와 관련되어 있다는 점에서 현재 주목받고 있다. 사이토케라틴 18 및 19 유전자(CK18 및 CK19) 또한 간세포에 대한 특이적인 표지자(marker)로 알려져 있는 바, 이의 발현정도에 따라 간세포로의 분화여부를 관찰할 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 실시예로서, 분화 배지에서 배양한지 3주 후에 세포를 모아 사이토케라틴 18 및 19와 알부민의 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 수행하기 위하여 RNA를 추출한 결과, mRNA 레벨에서 CK18, CK19 및 ALB가 발현됨을 확인할 수 있었고(실시예 3, 도 4b 및 도 4c), 편도유래 줄기세포를 CC1₄-손상된 간의 쥐에 주입한 결과, 인간형의 ALB, CK18 및 CK19가 발현됨을 역시 확인할 수 있었다(실시예 4, 도 5a 및 도 5b).

[0051] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 편도유래 줄기세포를 포함하는 간 기능 손상 치료용 세포치료제

조성물을 제공한다.

- [0052] 본 발명에서 용어, 편도유래 줄기세포에 대하여는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0053] 본 발명에서 용어, “간 기능 손상”은 간손상, 간질환, 간장애라고도 하며, 이는 간의 기능이 정상적으로 작동하지 않음으로써 발생하는 질병을 총칭한다. 구체적으로, 간 기능 손상에는 간염, C형 간염(hepatitis C), 유육종증, 약물 알레르기, 지방간, 알코올성 간 질환, 간독성, 간암, 간경변증, 간허혈, 간농양, 간성 혼수, 간위축증, 담즙울체, 임신 중독증, 비호지킨 림프종, 라이 증후군, 기타 신생아 황달, 가와사키병, 루푸스, 칸디다증, 말라리아, 랩토스피라증, 탕기열, 간흡충증, 급성 간경화, 만성 간경화, 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases) 및 담관질환(bile duct disease) 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases)에는 윌슨병(wilson disease), 타이로신혈증(tyrosinemia), 혈색소침착증(hemochromatosis), 당원병(glycogen storage disease)를 포함되나 이에 한정되지 않으며, 상기 담관질환(bile duct disease)에는 담도폐쇄(biliary atresia), 원발성 담즙성 경화(primary biliary cirrhosis(PBC)), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis (PSC))이 포함되나 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 바람직하게는 상기 간 기능 손상은 간염, C형 간염(hepatitis C), 지방간, 알코올성 간 질환, 간독성, 간암, 간경변, 간허혈, 간농양, 간성 혼수, 간위축증 및 담즙울체로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 용어, “세포치료제”는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0056] 본 발명에서 용어, “치료”는 상기 세포치료제의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0057] 바람직하게는, 본 발명의 줄기세포는 기능이 손상된 간으로의 이동능력(homing capacity)을 가질 수 있다.
- [0058] 구체적으로, 편도유래 줄기세포를 포유동물 등의 체내에 주입할 경우, 다른 기관에 비하여 손상된 간으로 특이적으로 이동함으로써, 간세포로 분화하여 간 기능을 향상시킬 수 있다.
- [0059] 본 발명의 일 실시예로, 편도유래 줄기세포에 PKH26으로 라벨링하여 마우스에 주입한 결과, 섬유아세포를 주입한 대조군은 비장에서 PKH-양성세포가 관찰된 것과는 달리, 편도유래 줄기세포를 주입한 쥐에서는 CC14-손상된 간에서 주로 PKH-양성세포가 관찰되었다(실시예 4). 이는 편도유래 줄기세포가 손상된 간으로의 특이적인 이동능력을 가짐을 시사한다.
- [0060] 바람직하게는, 본 발명의 세포치료제 조성물은 체내에서 간세포로의 분화능을 가질 수 있다.
- [0061] 구체적으로, 상기 조성물은 편도유래 줄기세포를 포함하고 있으며, 상기에서 설명한 바와 같이 편도유래 줄기세포가 간세포로의 분화능을 가짐으로써 손상된 간 기능을 회복시키는 치료제 용도로 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 일 실시예로, 편도유래 줄기세포에 PKH26으로 라벨링하여 마우스에 주입한 결과, CC14-손상된 간에서 주로 PKH-양성세포가 관찰되었으며 손상된 간에서 편도유래 줄기세포가 머무르는 동안, 주입된 PKH-양성의 편도유래 줄기세포가 알부민, 사이토케라틴 18 및 사이토케라틴 19 유전자를 발현하였음을 확인하였다(실시예 4). 이는 편도유래 줄기세포가 체내에서 간으로 이동한 후 간세포로 분화되었음을 시사한다.
- [0063] 또한, CC14-손상된 간에서의 편도유래 줄기세포의 간 기능 손상의 치료효과를 확인하기 위하여, 편도유래 줄기세포 주입한지 7일 후에 마우스를 희생시켜 간섬유화 부위를 헤마토자일린(hematoxylin)과 에오신(eosin)(H&E) 및 시리우스 레드로 염색하였다. 그 결과, CC14로 인하여 광범위하고 무작위로 분포되었던 섬유증은 편도유래 줄기세포 이식 후에 거의 정상화되었음을 확인하였고, 콜라겐 지수를 계산한 결과 또한 간섬유증 완화정도가 상당함

을 보였다(실시예 5).

- [0064] 본 발명의 세포치료제 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프(Epilife®) 세포 동결 배지(Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 세포치료제 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입 백과 같은 주입제, 및 에어로졸 제제와 같은 분무제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다. 또한, 주입 백은 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 재질의 것을 사용할 수 있으며, 박스터(Baxter), 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), 메드셉(Medcep), 내셔널 호스피탈 프로덕츠(National Hospital Products) 또는 테루모(Terumo) 사의 주입 백을 예시할 수 있다.
- [0066] 상기 약학적 제제에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기재(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0067] 이렇게 제조된 본 발명의 세포치료제 조성물 또는 약학적 제제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 기타 용도에 사용되는 다른 줄기세포와 함께 또는 그러한 줄기세포와의 혼합물의 형태로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식하거나 복강에 직접 이식 또는 주입하는 것이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하나 카테터를 이용한 비외과적 투여방법이 보다 바람직하다. 또한 통상의 방법에 따라 비경구적으로, 예를 들면 직접 병변에 투여하는 것 외에 조혈계 줄기세포 이식의 일반적 방법인 혈관 내 주입에 의한 이식도 가능하다.
- [0068] 상기 줄기세포의 1일 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0069] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 편도유래 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 간 기능 손상이 의심되는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 기능 손상의 치료방법을 제공한다.
- [0070] 본 발명에서 용어, 편도유래 줄기세포, 세포치료제, 간 기능 손상, 치료에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0071] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 세포치료제를 도입하는 것을 의미하며, 분화된 세포의 이식을 포함한다. 본 발명의 세포치료제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 세포치료제의 투여는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 쥐, 랫트 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명의 편도유래 줄기세포로부터 간세포를 분화시키는 방법은 편도적출술 이후에 폐기되는 편도조직을 이용하여 간세포를 단기간에 효과적으로 분화시킬 수 있으며, 본 발명의 편도유래 줄기세포는 체내에서 손상된 간세포의 이동능력 및 간세포로의 분화능을 가짐으로써, 손상된 간 기능을 회복하는 세포치료제 용도로 사용될 수

있다.

도면의 간단한 설명

[0074]

데이터는 “평균값±표준오차(SEM)”와 같이 표현하였다. GraphPad Prism Software(GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 유의적 차이를 분석하기 위하여($P<0.05$), 일원 또는 이원분산분석은 그룹 분석에 적용하였고, student t-test는 분리된 각 실험군에 적용하였다.

도 1a는 배양된 편도유래 줄기세포와 섬유아세포에 모두 부착성이 있음을 나타내는 사진이다.

도 1b는 유세포 분석기를 통하여 분석된 표면 표지자(surface marker)를 나타낸 도이다.

도 1c는 편도유래 줄기세포와 섬유아세포 간의 표현형 차이를 비교하기 위하여, 발현 단계를 확인하는 표면 마커(surface marker)와 함께 염색한 그래프로서, 양 세포는 CD14, CD34, CD45 음성 및 CD73, CD90, 및 CD105 양성임을 나타낸다.

도 2a는 편도유래 줄기세포가 알부민 양성 세포로 분화되었음을 확인하기 위하여, 인슐린-유사 성장인자, 간세포 성장인자, 텍사메타손 및 온코스타틴 M 조건 하에서 3주간 편도유래 줄기세포의 3번째 계대를 분화시킨 후 RT-PCR을 하여 전기영동을 한 사진이다.

도 2b는 상기 분화 조건을 21일간 유지한 후, 편도유래 줄기세포를 고정시키고 알부민과 CK18을 형광염색하여 관찰한 도이다.

도 2c는 상기 분화 조건을 21일간 유지한 후, 편도유래 줄기세포를 고정시키고 알부민과 CK19를 형광염색하여 관찰한 도이다.

도 3a는 편도유래 줄기세포와 섬유아세포(fibroblast)를 마우스의 미정맥에 주입하고 7일 후의 골수, 간 및 비장에서의 PKH-양성 세포 비율의 대표적인 유세포분석을 나타낸 도이다.

도 3b는 유세포분석기에 의한 골수, 간 및 비장에서의 PKH-양성세포 비율의 통계적인 분석을 나타내는 도이다. 데이터는 평균값±SEM으로 표시되었으며, 일원분산분석 또는 이원분산분석으로 분석되었다(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; 및 ***, $P<0.001$). 이들은 서로 다른 5마리의 쥐의 결과값이다.

도 3c는 PKH-양성 및 핵 세포(DAPI 양성)를 보여주는 대표적인 조직 절단면을 형광염색하여 관찰한 도이다.

도 3d는 DAPI 양성 세포 중에서 PKH-양성 세포의 정량적 분석. 이를 분석하기 위하여, 같은 영역 내에서 100개 이상의 DAPI 양성 세포와 PKH-양성세포를 세어 그린 그래프이다.

도 4a는 쥐의 미정맥(tail vein)을 통하여 편도유래 줄기세포를 주입한 후, 쥐를 희생시켜 간 조직을 모았고, 이를 다중초점 분석(confocal analysis)으로 나타낸 도이다. 편도유래 줄기세포는 주입 전에 PKH26으로 염색되기 때문에, 편도유래 줄기세포는 붉게 나타났다.

도 4b는 세포주입 후 3일, 7일, 10일 및 17일 이후의 PKH-양성세포의 비율을 나타낸 도이다.

도 4c는 편도유래 줄기세포 주입 후 알부민 양성 세포를 검출하기 위하여 표시된 날짜에 따라 조직 절단면을 준비하고, 항-알부민 항체로 염색된 도이다.

도 5a는 편도유래 줄기세포를 CCl_4 로 손상된 쥐에 주입한지 3일, 7일, 10일 및 17일 후에, 생체 내(*in vivo*) 염색으로 관찰된 CK18 사진이다. CCl_4 -손상 후 편도유래 줄기세포를 쥐에 주입하였고, 표시된 날짜에 따라 쥐를 희생시켰다. 서로 다른 5마리의 쥐 중에서 대표적인 다중초점(confocal) 사진이다.

도 5b는 상기와 동일하게 편도유래 줄기세포를 CCl_4 로 손상된 쥐에 주입한지 7일 후에, 생체 내(*in vivo*) 염색으로 관찰된 CK19 사진이다.

도 6a는 편도유래 줄기세포와 섬유아세포(fibroblast)를 주입한 쥐의 CCl_4 로 손상된 간에서의 조직 절단면을 염색한 도이다.

도 6b는 간 절단면 영역 뿐만 아니라 붉은색으로 염색된 영역(섬유화) 역시 이미지 분석 프로그램을 사용하여 슬라이드당 7개 이상의 무작위 영역에서 측정된 콜라겐지수 그래프이다. 콜라겐 지수는 총 면적에 대한 붉은색

으로 염색된 영역의 면적으로 계산되었다. 이들 데이터는 평균값±SEM으로 표시되었다(***, $P < 0.001$ student t-test)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기 예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 편도 유래 중간엽줄기세포(편도유래 줄기세포)의 분리와 세포배양

이화여자대학교 목동병원의 이비인후과의 두경부(head and neck)수술과의 외과의사에 의해 편도선 절제술로 사람의 편도를 얻었다(IRB #ECT11-53-02). 모든 편도를 50ml 용량의 깔대기 모양의 시험관(conical tube)에 넣고, 인산완충용액(phosphate-buffered saline; PBS)으로 3번 세척하였고, 5 mm 이내의 크기로 잘랐다. 잘게 썬 편도조직은 10ml의 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 내의 210 U/ml의 I형 콜라게나제(collagenase type I)(GIBCO BRL, Carlsbad, 캘리포니아주, 미국)와 10 µg/ml의 DNase I (시그마-알드리치, 세인트루이스, 미주리, 미국)을 포함하는 효소 용액에서 37℃에서 섞어주면서 30분간 배양함으로써 분해시켰다.

수확해 모은 세포는 세포 필터인 cell strainer를 통해 여과시켰고(pore 크기 70 µm) (SPL사, 대한민국), 20%의 열-비활성화시킨 FBS(heat-inactivated Fetal bovine serum)가 들어 있는 DMEM으로 두 번 세척하였으며, 10%의 FBS(Fetal bovine serum)가 들어 있는 DMEM으로 한 번 세척하였다. 단핵세포(Mononuclear cells, MNCs)는 Ficoll-Paque™ PREMIUM(GE Healthcare사, 미국(USA)) 밀도 경사 원심분리에 의해 1200 rpm(분당 회전수, revolutions per minute)으로 실온에서 30분 동안 원심분리를 해서 얻었다. 모은 단핵세포(MNCs)는 10% FBS, 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)과 100 U/mL 페니실린(penicillin)을 첨가한 DMEM에 들어 있는 T-150 플라스크(SPL사) 당 1×10^8 개의 세포의 밀도로 분배하여 플레이트하였다. 48시간 후, 비흡착성 세포는 부드러운 피펫(pipet) 작업에 의해 제거되고, 배지를 첨가하기 전에 인산완충용액(PBS)으로 세포배양용기를 세척하였다. 부착 세포는 10% FBS와 항생제가 들어 있는 DMEM으로 세포배양 하였으며, 세포는 일주일에 2번씩 계대 세포배양을 하였다.

사람의 섬유아세포(fibroblast cells)은 한국 세포주 은행(KCLB 번호 21947, 서울, 한국)으로부터 구입하였다. T-75 플라스크에 10% FBS와 항생제를 함께 넣은 DMEM에 세포를 2×10^6 /ml의 밀도로 분배하여 바닥에 플레이트 하였다.

실시예 2: 유세포 분석을 통한 편도유래 줄기세포 및 섬유아세포의 비교

이 연구를 위하여 6주령에서 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(오리엔탈 바이오, 대한민국)를 사용하였다. 실험과 실험과정은 이화여자대학교 의과대학 동물 윤리위원회에 의해 승인을 받았다(ESM #11-0185). 마우스의 사육조건은 21~23℃의 온도와 51~54%의 습도를 유지하였으며, 12시간 주기로 밝은 환경과 어두운 환경으로 바꾸어 주었고, 사료와 음료를 자유롭게 주었다.

마우스의 미정맥에 편도유래 줄기세포 및 섬유아세포의 주입 후 3, 7, 10, 17일에 마우스를 희생시켰고, 간 조직을 모았다. 세포 부유물을 준비하기 위하여, 간 조직(1cm 크기)을 5ml 인산완충용액(PBS)으로 세척하였고, 가위로 잘라 썰어서 100 µl/ml의 콜라게나제 D(collagenase D, Roche)가 담긴 DMEM으로 37℃에서 20분 동안 효소가 소화되게 하였다. 세포 부유물을 모았고, 세포 필터인 cell strainer를 통해 여과시켰다. 10% FBS가 들어 있는 DMEM으로 세포를 두 번 세척하였고, 다음의 항체로 세포를 염색하였다: 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)-결합된 마우스 IgG₁ 아이소토프 항체(mouse IgG₁ isotype antibody)(Cat.88023A, DINONA, Korea), phycoerythrin(PE)-결합된 마우스 IgG₁ 아이소토프 항체(mouse IgG₁ Isotype antibody)(Cat.88024A, DINONA), PE-결합된 마우스 IgG_{2b} 아이소토프 항체(mouse IgG_{2b} isotype antibody)(Cat.88044A, DINONA), FITC-결합된 항-CD45 항체(anti-CD45 antibody) (2D1, mouse IgG₁; BD

Biosciences, USA) and PE-결합된 CD14 항체(anti-CD14 antibody) (MφP9, mouse IgG_{2b};BD), FITC-결합된 항-CD34 항체(anti-human CD34 antibody) (BIRMAK3, mouse IgG₁;IBGRL, 영국(U.K.)), PE-결합된 항-사람 CD73 항체(anti-human CD73 antibody) (AD2, mouse IgG₁;Biolegend사, CA, 미국(USA)), FITC-결합된 항-사람 CD90 항체(anti-human CD90 antibody) (5E10, mouse IgG₁;BD사), 그리고 FITC-결합된 항-사람 CD105 항체(anti-human CD105 antibody) (266, mouse IgG₁;BD사). 세포는 유세포분석기(flow cytometer)로 측정하였고 Cell Quest 프로그램(BD사)을 사용하여 분석하였다.

[0083] 분석 결과, 편도유래 줄기세포와 섬유아세포 모두 세포 배양 간에 부착성(adherent characteristics)을 나타냈다(도 1a). 유세포분석기의 FSC-SSC 그래프에서 섬유아세포는 전방 산란(forward scatter, FSC)에 의해 더 커다란 크기로 그려짐을 확인하였다(도 1b).

[0084] 편도유래 줄기세포와 섬유아세포 간의 표현형 차이를 비교하기 위하여, 발현 단계를 확인하는 표면 마커(surface marker)와 함께 염색하였다. 그 결과, 양 세포는 CD14, CD34, CD45 음성 및 CD73, CD90, 및 CD105 양성이었다(도 1c).

[0085] **실시예 3: 시험관 내 간세포의 분화를 위한 역전사-중합효소반응과 이에 의한 간세포 특이마커(ALB, CK18)의 발현양상 관찰**

[0086] 간세포 분화를 유도하기 위하여 편도유래 줄기세포의 3번째 계대 배양물을 21일간 2번의 과정으로 나누어 세포 배양 하였다: 첫 번째 실험과정을 위하여, 세포배양을 위해 100mm의 세포배양 용기에 일백만 개의 세포를 플레이트 하였으며, 5% FBS, 100 µg/ml의 스트렙토마이신(streptomycin), 100 U/ml의 페니실린(penicillin), 25 ng/ml의 인슐린-유사 성장인자(insulin-like growth factor) (IGF, R&D시스템사), 25 ng/ml의 간 성장인자(HGF, R&D사), 100 nM 덱사메타손(dexamethasone, 시그마-알드리치사)을 포함하는 DMEM에서 7일간 세포배양을 하였다. 두 번째 과정에서, 10 ng/ml의 oncostatin M (OSM, R&D시스템사)를 첫 번째 과정 배지에 첨가하였고, 세포를 14일을 더 추가적으로 세포배양 하였다. 이러한 세포배양 배지는 일주일에 두 번 갈아 주었다.

[0087] 상기와 같은 분화배지에서 배양한 지 3주 후에 세포를 모아 알부민(ALB), 사이토케라틴 18(cytokeratin 18; CK18)의 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 수행하기 위하여 RNA를 추출하였다.

[0088] 상기 역전사-중합효소반응(RT-PCR)에 있어서, 총 mRNA는 트리졸(TRIZOL, 인비트로젠사(Invitrogen사), 칼즈배드(Carlsbad), 캘리포니아주(CA)) 시약으로 편도유래 줄기세포(T-MSCs)로부터 추출하였다. 역전사(reverse transcription) master premix 5x (엘피스 바이오텍(ELPIS Biotech, 대전, 한국))를 사용하여 cDNA 합성을 수행하였다.

[0089] 증폭에 사용된 프라이머(primers)는 다음과 같다 : GAPDH (395 bp) 5'-GTC TTC ACC ATG GAG AAG GCT-3' (forward)(서열목록 1), 5'-CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA-3' (reverse)(서열목록 2); 사람 알부민(human albumin) (147 bp) 5'-ATG AAC TTC GGG ATG AAG GG-3' (forward)(서열목록 3), 5'-CTG CAA ACT CAG CTT TGG GA-3' (reverse)(서열목록 4); 사이토케라틴 18 (cytokeratin 18) (207 bp) 5'-ACA GAT GGA GCA GCT CAA CG-3' (forward)(서열목록 5), 5'-CTG TCC AAG GCA TCA CCA AG-3' (reverse)(서열목록 6). 95℃로 45초간 35주기를 돌리고 나서, 95℃에서 3분간, 55℃에서 1분간, 68℃에서 1분간 두었다.

[0090] 증폭된 생산물은 1% 아가로스 겔에서 전기영동에 의해 분해되었고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr)로 염색하였다. 화소밀도(Pixel densities)는 Un-Scan-It gel (실크과학(Silk Scientific, Inc.), 오렘(Orem), 유타주(UT), 미국(USA)) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0091] 면역 형광염색을 위하여, 적절한 절개 온도(OCT)에서 동결 보존한 간 조직 절편을 4℃에서 하룻밤 동안 다음의 일차항체로 조건을 유지하여 반응시켰다: 2.5 µg/ml의 항-인간 알부민 항체(15C7, IgG_{2b}), 10 µg/ml의 항-인간 사이토케라틴 18 (cytokeratin 18) 항체(IgG_{2a}), 10 µg/ml의 항-인간 사이토케라틴 19 (cytokeratin 19) 항체(236-11221, IgG_{2a}).

- [0092] 인산완충용액(PBS)로 일차항체를 세척한 후, 조직 슬라이드를 다음의 이차항체로 염색하였다: FITC-결합된 goat anti-mouse IgG H&L 항체(1/1000 희석), Cy3-결합된 goat anti-mouse IgG H&L 항체 (1/500 희석). 모든 항체는 Abcam (케임브리지(Cambridge), 메사추세츠주(MA), 미국(USA))으로부터 구입하였다. 인산완충용액(PBS)로 5분간 마지막으로 세척 후, DAPI 봉입액(4',6-diamidino-2-phenylindole mounting solution, Vector laboratories, Burlingame, 캘리포니아주(CA), 미국(USA))을 이용해 슬라이드를 커버슬립(cover slip)으로 봉입하였다. 면역형광염색은 LSM 5 파스칼(Pascal) (칼 자이스(Carl Zeiss), Oberkochen, 독일 (Germany)) 현미경을 이용하여 평가하였다.
- [0093] 그 결과, 분화 배지 하에서 편도유래 줄기세포는 mRNA 레벨에서 CK18과 ALB을 발현함을 확인할 수 있었다.
- [0094] 나아가, 분화된 세포는 CK18과 ALB 뿐만 아니라, CK19 단백질도 발현하였으며, 다중초점 이미지 분석(confocal image analysis) 하에 co-localization을 확인하였다(도 4b 및 도 4c).
- [0095] **실시예 4: 편도유래 줄기세포의 세포 내 주입 후의 손상된 간으로의 이동능력(homing capacity) 및 간세포 특이적 마커(ALB,CK18)의 발현양상 관찰**
- [0096] 급성 간 손상은 사염화탄소(CCl₄)를 이용하여 유도하였다 (CCl₄, 시그마-알드리치). C57BL/6 마우스는 무작위로 2개의 그룹으로 나누었다: 미처리군과 CCl₄-손상군. 간-손상된 마우스는 사염화탄소(CCl₄)를(10% 올리브유(olive oil)에 10 μ l/g), 복강 내 주사(IP)로 이를 연속 주사하였다. 세포 이식체를 위하여, 다음 날에 미정맥으로 마우스당 2×10^6 개의 편도유래 중간엽줄기세포(T-MSCs) 또는 사람 섬유아세포(fibroblasts)를 주입하였다.
- [0097] 이식된 편도유래 줄기세포가 CCl₄-손상된 간으로의 특이적인 이동 능력(homing capacity)을 갖는지 확인하기 위하여, 편도유래 줄기세포에 PKH26으로 라벨링하였고, 이를 아무 처리하지 않은 마우스(sham)에 주입하였다. 편도유래 줄기세포와 비교하기 위하여 섬유아세포를 사용하여 상기와 동일한 절차를 수행하였다. 구체적으로, 편도유래 줄기세포 또는 섬유아세포에 PKH26을 라벨링함에 있어서, 제조사의 프로토콜에 따라 3번째 계대배양에서 5번째 계대배양의 편도유래 중간엽줄기세포(T-MSCs)를 PKH26 미니 키트(MINI kit) (시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich)에 의해 표지하였다. 간단히 말해서, 세포 부유물(1×10^7 cells/ml)을 염색액에 추가했으며, 피펫(pipet)에 의한 혼합으로 샘플을 즉시 혼합하였다. 실온에서 5분간 혼합물을 일정하게 유지하여 반응시켰으며, 같은 양의 FBS(Fetal bovine serum)를 첨가했고, 추가적으로 1분간 반응시킨 후, 10분간 원심분리를 하였으며, 10% FBS, 100 μ g/ml의 스트렙토마이신(streptomycin)과 100 U/ml의 페니실린(penicillin)이 포함된 같은 용량의 DMEM을 추가하였다.
- [0098] DMEM이 포함된 FBS로 세포를 3번 세척한 후, 마우스에 주입하기 위하여 세포를 2ml의 인산완충용액(PBS)으로 다시 재부유(resuspension) 시켰다.
- [0099] 유세포분석기를 통해 관찰한 결과, 편도유래 줄기세포를 주입한 마우스에서 CCl₄-손상된 간에서 PKH-양성 세포가 주로 발견되었다(도 3a 및 도 3b). 그러나 섬유아세포를 주입한 마우스 군의 간에서는 PKH-양성세포가 많이 검출되지는 않았으며, 대부분의 PKH-양성 섬유아세포는 비장에서 관찰되었다. 아무런 처리하지 않은 마우스 또는 CCl₄-손상된 마우스의 미정맥에 주입한 이후, 이들의 크기 차이로 인하여 더 큰 섬유아세포가 그에 비해 작은 편도유래 줄기세포보다 비장에서 더 쉽게 걸렸다.
- [0100] 통계적으로, 편도유래 줄기세포와 섬유아세포 군의 차이는 골수(BM)와 비장에서 나타났다. 다중초점 현미경 분석에 의할 때, CCl₄-손상된 간에서 PKH-양성 세포가 주로 발견되었다(도 3c 및 도 3d).
- [0101] 편도유래 줄기세포 주입 후 3, 7, 10, 17일째 되는 날에 CCl₄-손상된 간에서의 PKH-양성 세포의 변화를 추적하였다. 세포 주입 후 7일째 되는 날까지는 PKH-양성의 편도유래 줄기세포가 증가하다가, 그 이후로는 대부분 감소함을 확인하였다(도 4a 및 4b). 또한 손상된 간에서 머무르는 동안, 주입된 PKH-양성 편도유래 줄기세포는 알부민을 발현하였다(도 4c).

[0102] 나아가, 주입된 편도유래 줄기세포는 CCl_4 -손상된 간에 분포하였으며, 인간형의 ALB를 발현하였고, 알부민, CK18 또는 CK19와 co-localize된 양성 세포는 생체 내에서 3, 7, 10 및 17일째 되는 날에 도 5a 및 도 5b와 같이 나타내었다.

[0103] **실시예 5: 콜라겐 염색에 의한 간섬유화 완화효과**

[0104] 조직학적 분석을 위하여 간 조직 파라핀 절편($5\mu\text{m}$ 두께)을 헤마톡실린과 에오신(Hematoxylin & eosin; H&E)으로 염색하였고, 콜라겐이 쌓이는 것을 보기 위하여 시리우스 레드 (Sirius Red)로 염색하였다. 간에서 콜라겐 축적과 섬유화 부위는 화소밀도(pixel densities)와 함께 얻었으며, AnalySIS FIVE 소프트웨어(Olympus Corporation, 도쿄, 일본)를 이용하여 분석하였다.

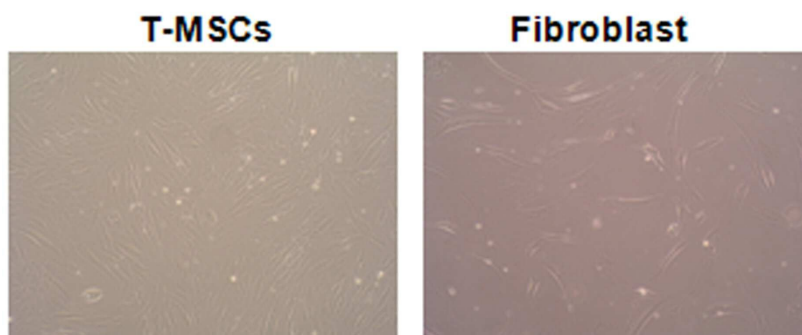
[0105] CCl_4 -손상된 간에서의 편도유래 줄기세포의 치료효과를 확인하기 위하여, 편도유래 줄기세포 주입한지 7일 후에 마우스를 희생시켰고, 간의 조직병리학적 변화 분석을 위하여 파라핀 블록(block)을 준비하였다. 조직 절단면은 섬유증에 대하여 헤마토자일린(hematoxylin)과 에오신(eosin)(H&E) 및 시리우스 레드로 염색하였다. CCl_4 로 인하여 광범위하고 무작위로 분포되었던 섬유증은 편도유래 줄기세포 이식 후에 거의 정상화되었음을 확인하였다 ($P<0.001$)(도 6a).

[0106] 대조군의 뇌정맥 주위에 콜라겐을 약간 주입하였다. 그러나 편도유래 줄기세포를 주입한 마우스에서, 총 면적에 대한 붉게 염색된 비율로 계산된 콜라겐 지수를 나타낸 결과, 섬유증 완화정도가 상당함을 확인하였다 ($P<0.001$)(도 6b).

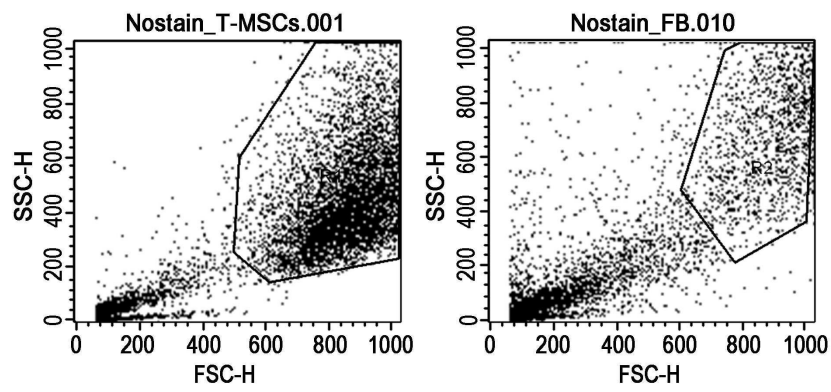
[0107] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

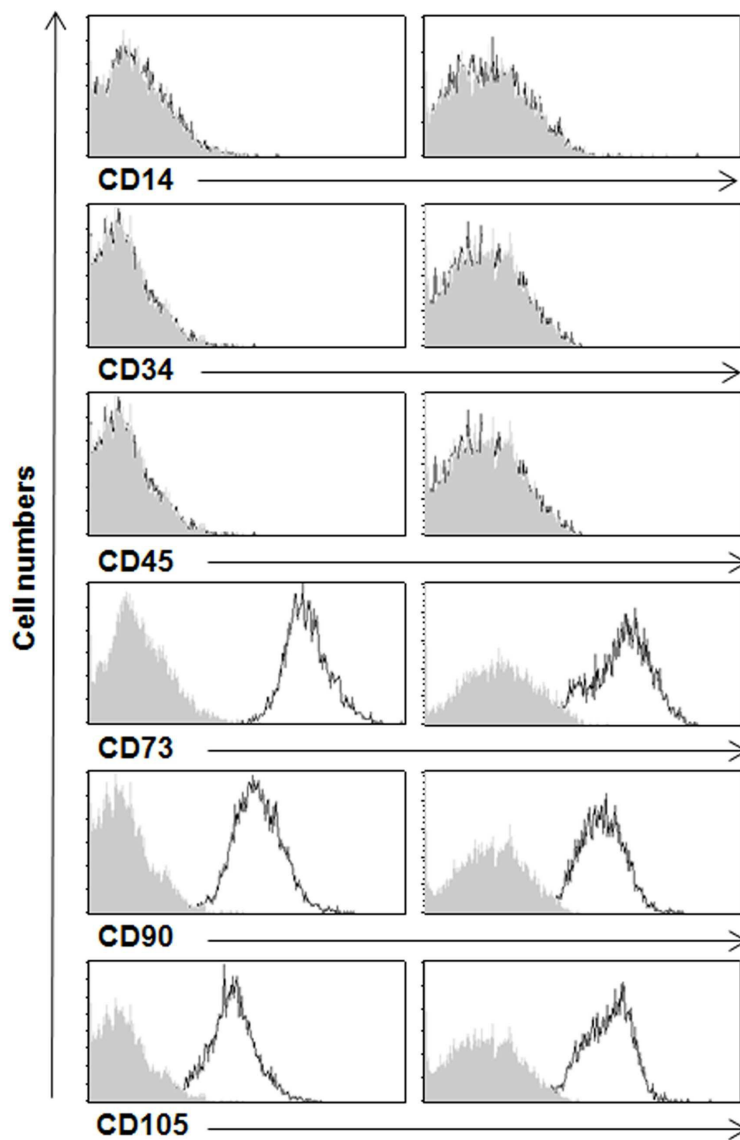
도면1a



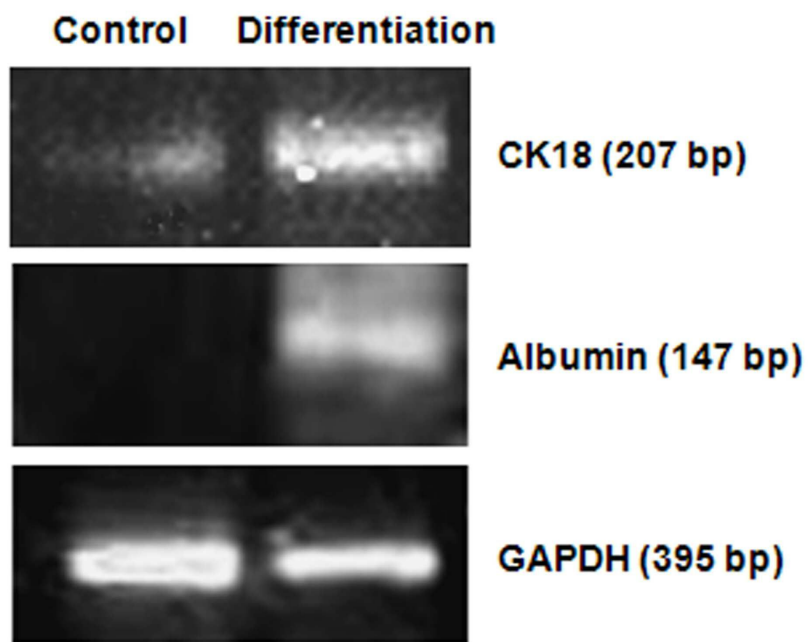
도면1b



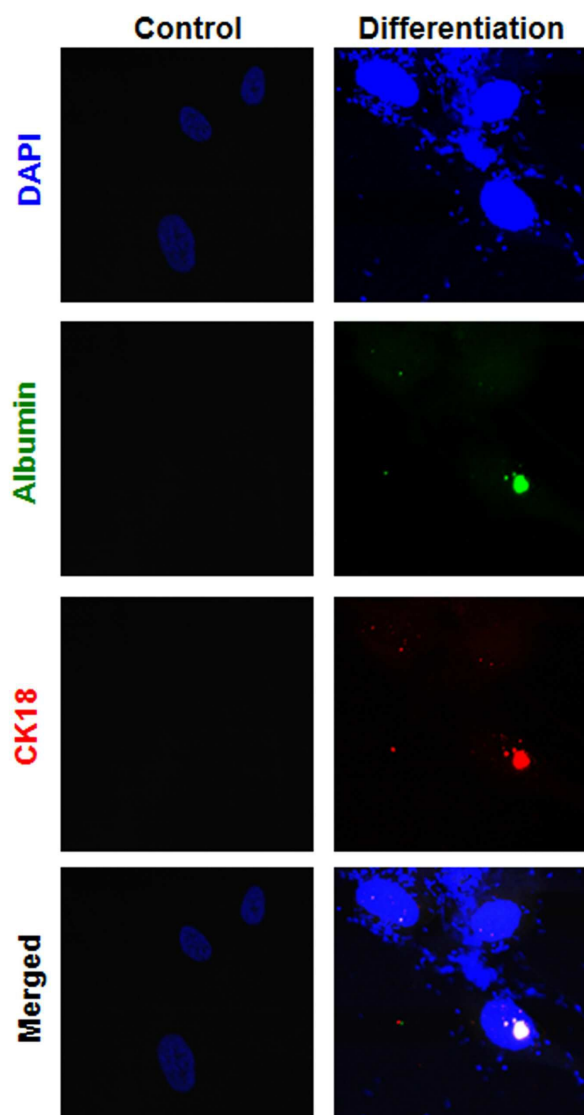
도면1c



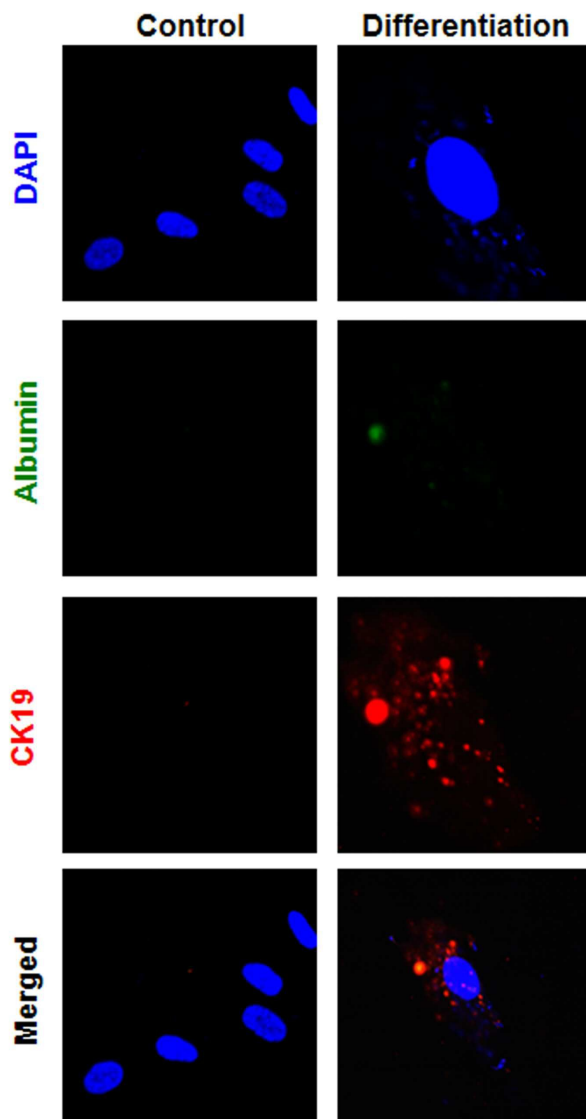
도면2a



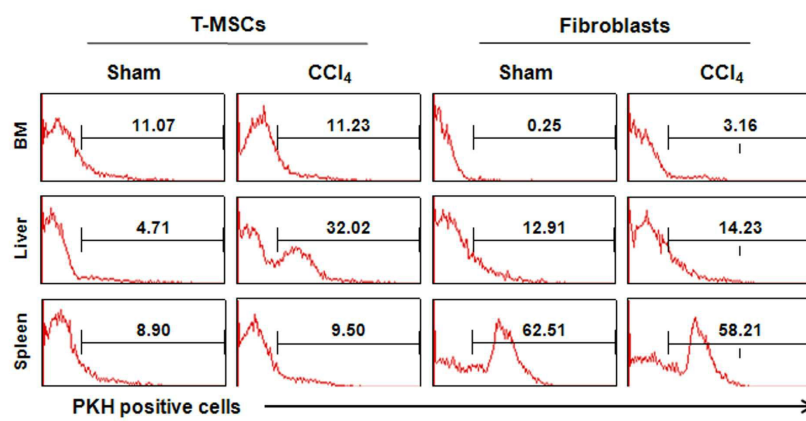
도면2b



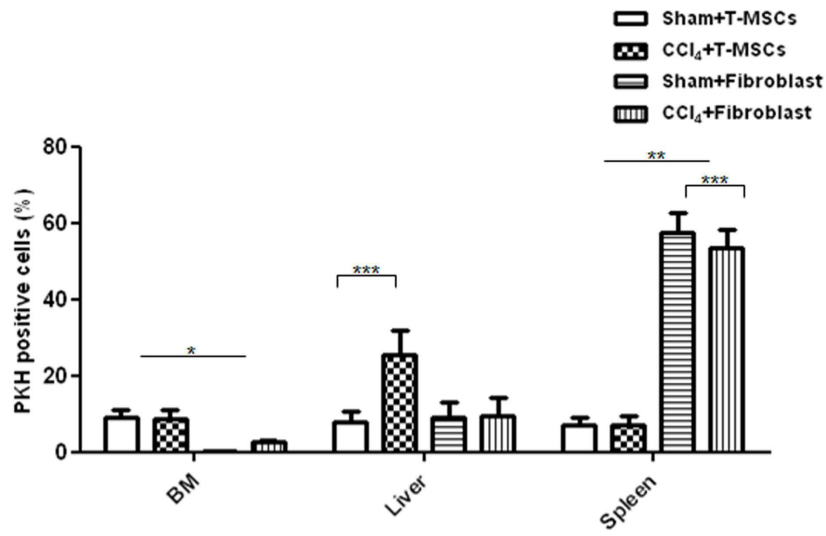
도면2c



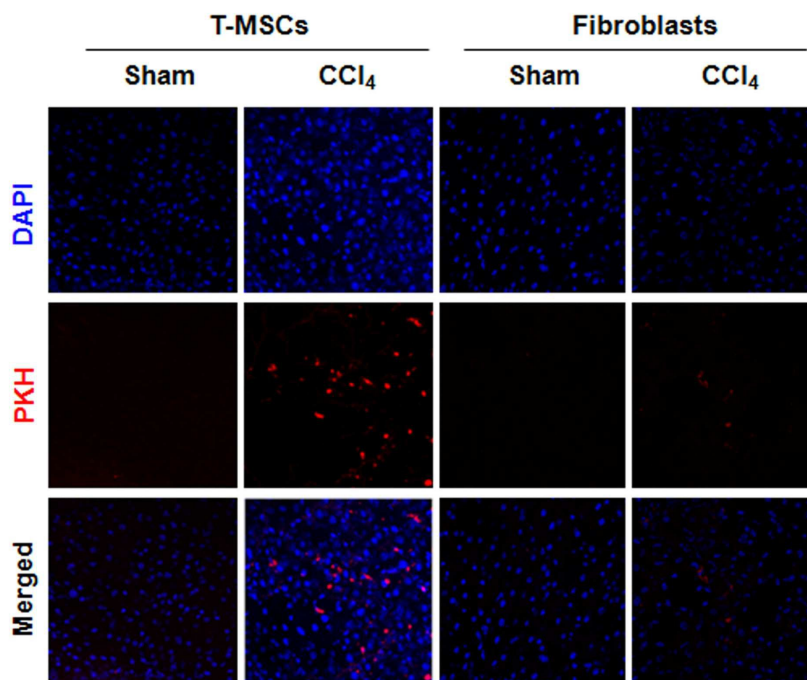
도면3a



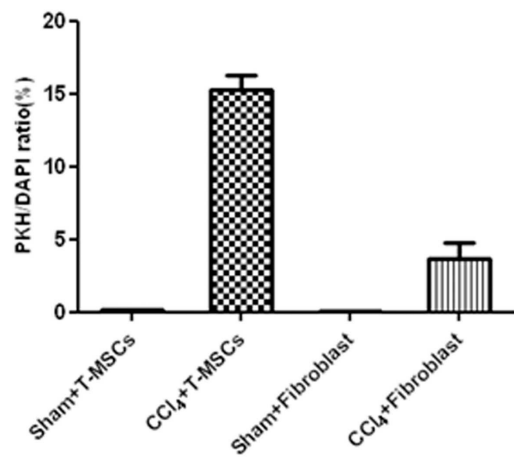
도면3b



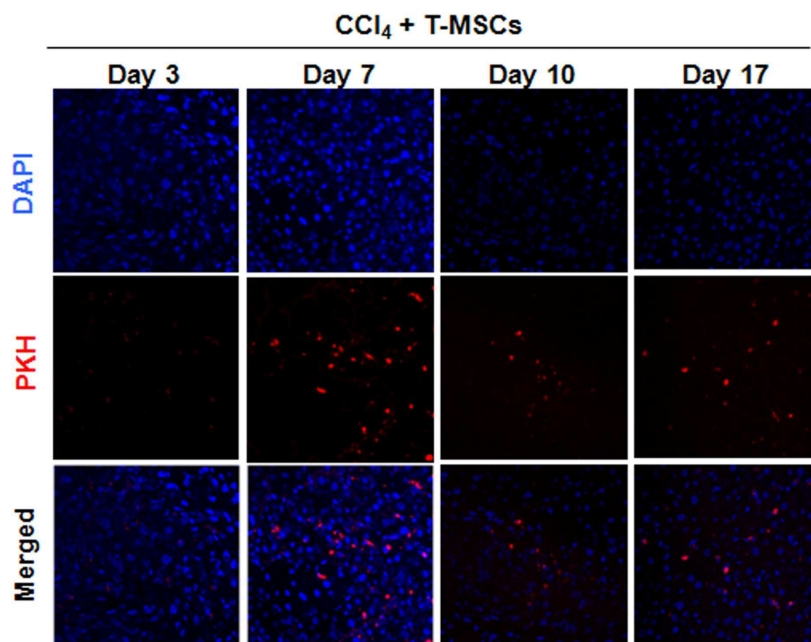
도면3c



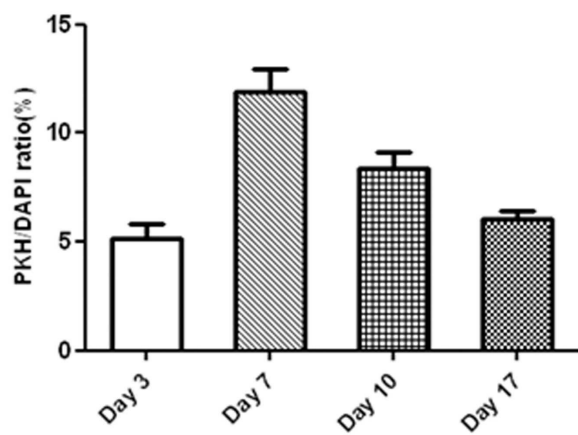
도면3d



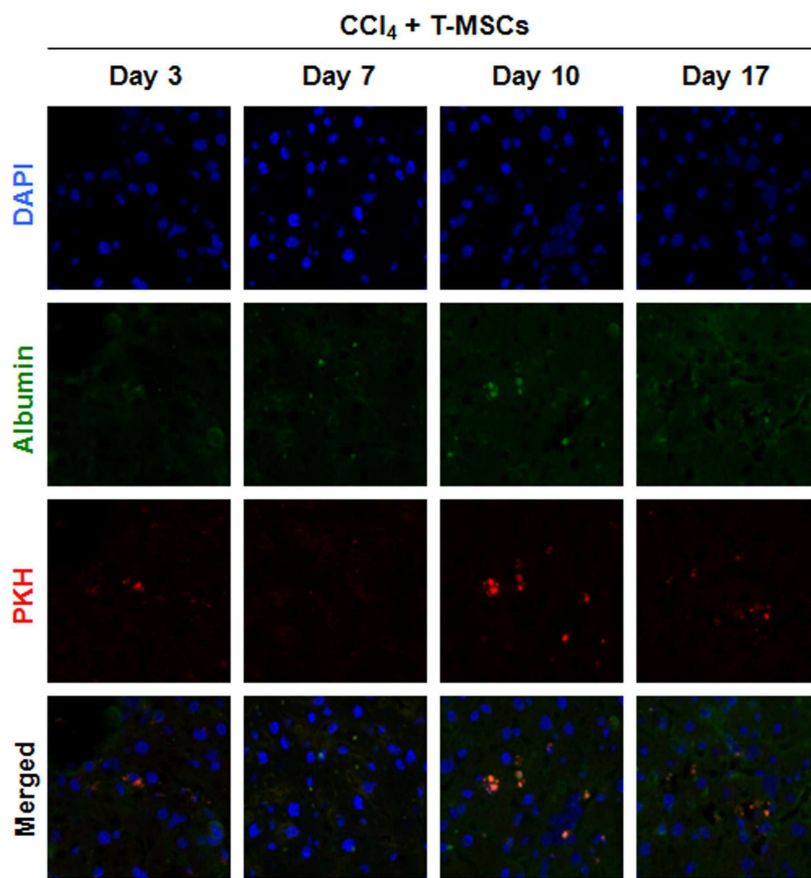
도면4a



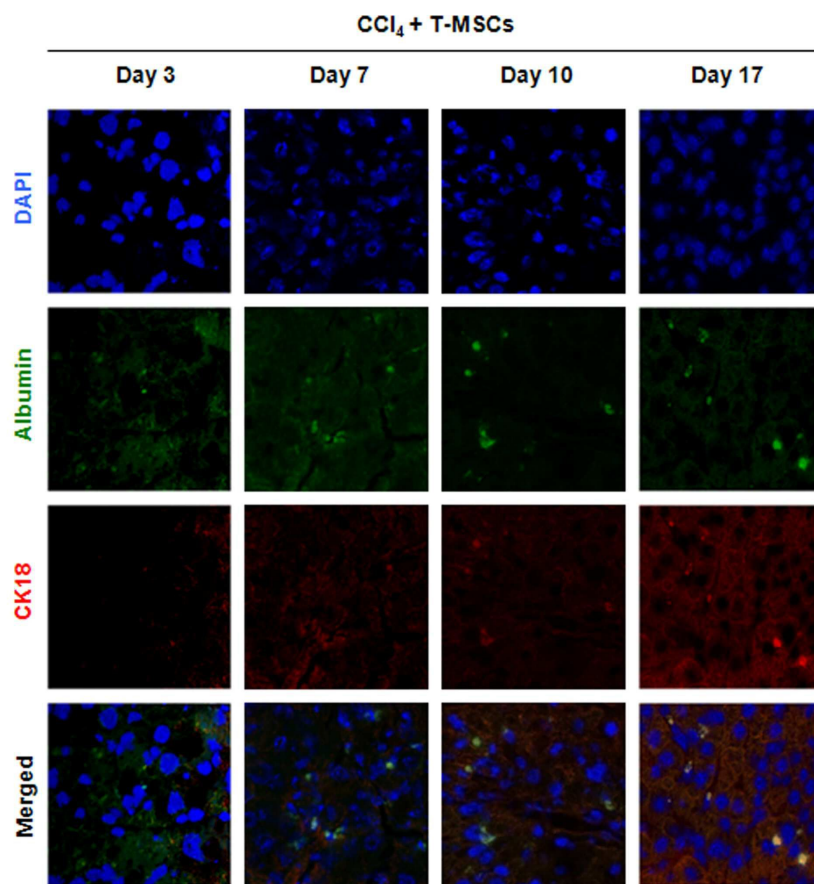
도면4b



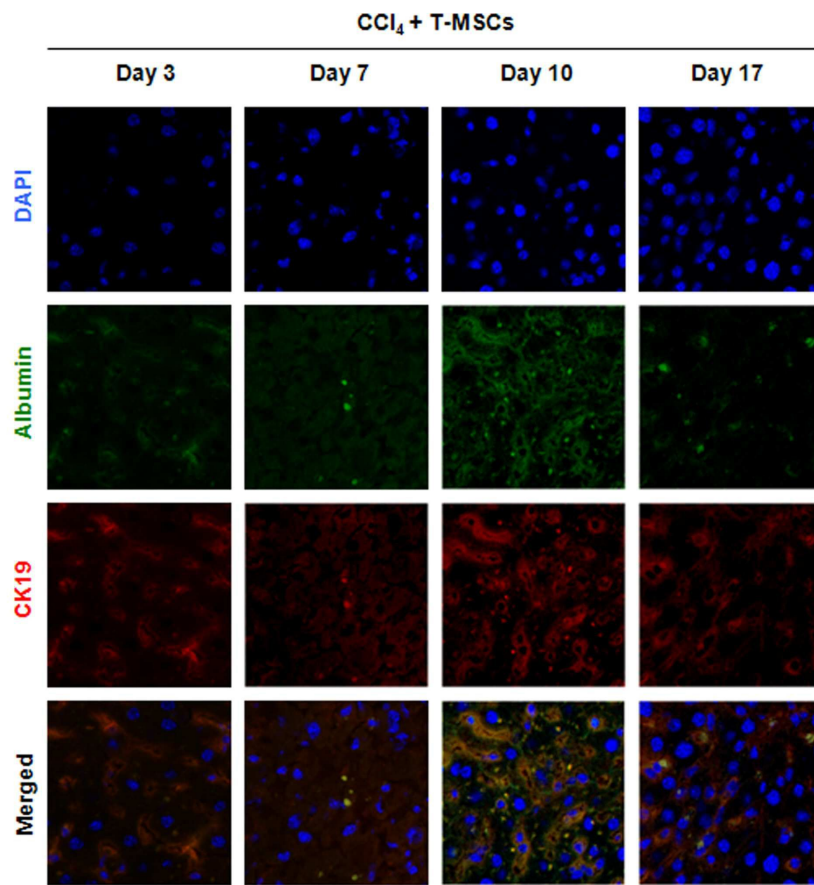
도면4c



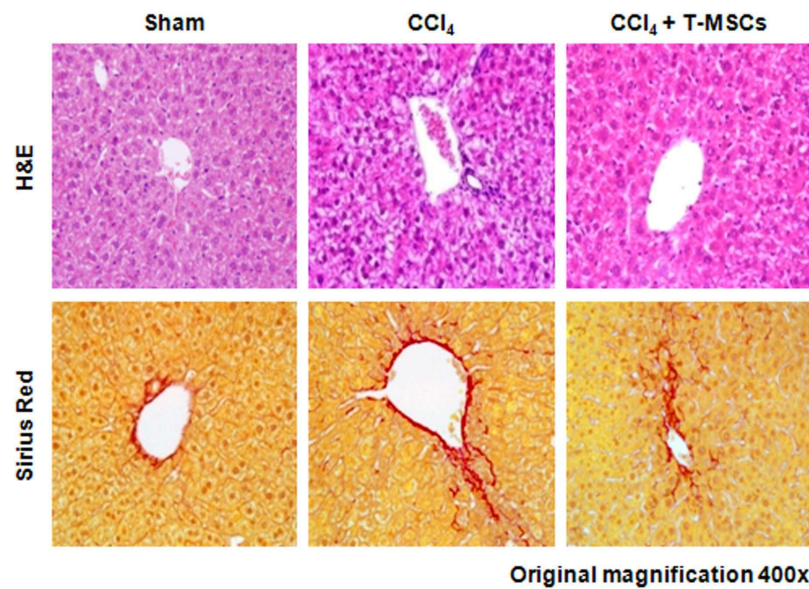
도면5a



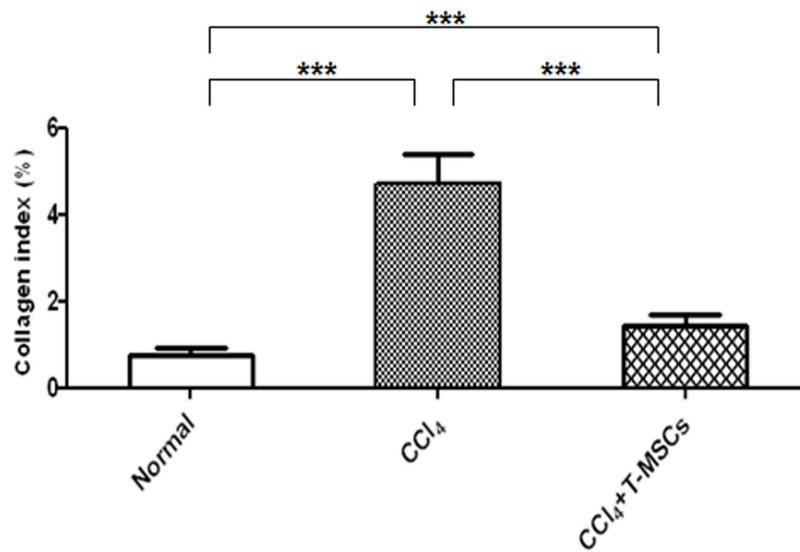
도면5b



도면6a



도면6b



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
 - <120> Differentiation method from tonsil-derived mesenchymal stem cells to hepatocytes and cell therapy composition comprising tonsil-derived mesenchymal stem cells for treatment of hepatopathy
 - <130> PA130332/KR
 - <160> 6
 - <170> Kopatent In 2.0
 - <210> 1
 - <211> 24
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> GAPDH forward primer
 - <400> 1
- gtcttctcca ccatggagaa ggct

24

- <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH reverse primer
- <400> 2

catgccagtg agcttcccg tca	23
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human albumin forward primer	
<400> 3	
atgaacttcg ggatgaaggg	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human albumin reverse primer	
<400> 4	
ctgcaaactc agctttggga	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cytokeratin 18 forward primer	
<400> 5	
acagatggag cagctcaacg	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cytokeratin 18 reverse primer	
<400> 6	
ctgtccaagg catcaccaag	20