(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0094970
(43) 공개일자 2010년08월27일

(51) Int. Cl.
*C12N 5/0775* (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7001049
(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년06월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2010년01월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/007397
(87) 국제공개번호 WO 2008/156667
국제공개일자 2008년12월24일
(30) 우선권주장
60/944,435 2007년06월15일 미국(US)

(71) 출원인
**유니버시티 오브 노스캐롤라이나 앳 채플 힐**
미합중국 노스캐롤라이나 27599-4105 채플 힐 캠퍼스 박스 4105 바이넘 홀 308
(72) 발명자
**레이드, 로라, 엠.**
미국 노쓰 캐롤라이나 27516, 채플 힐, 스위튼 크리크 로드 3621
**맥클리랜드, 랜달, 이.**
미국 노쓰 캐롤라이나 27516, 채플 힐, 멜로즈 플레이스, 아파트 비 102
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**임훈빈**

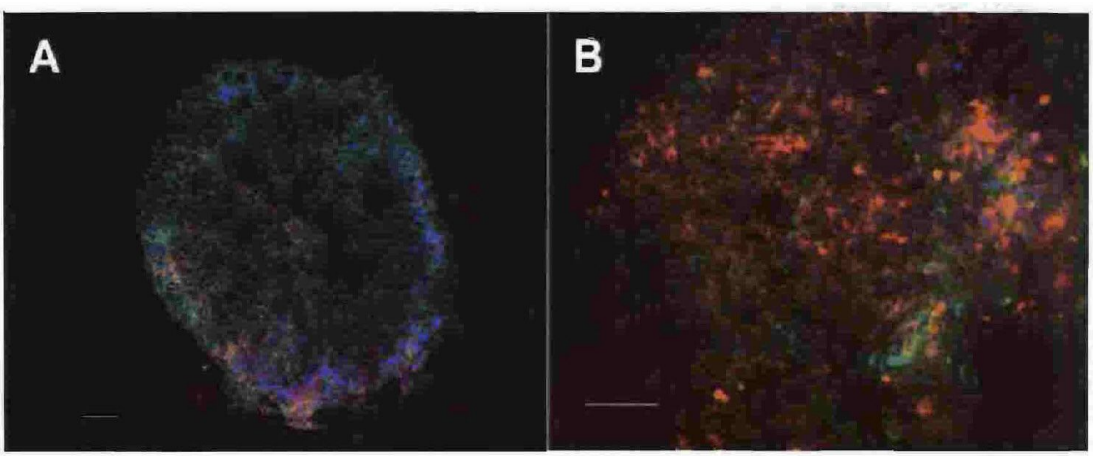
전체 청구항 수 : 총 31 항

# (54) 중간엽 공급자 세포로부터의 파라크린 시그널 및 이를 이용한 간 전구세포의 확장 및 분화 조절

## *(57) 요 약*

특정 타입의 중간엽 공급자 세포 또는 이러한 공급자에 의해 생성된 하나 이상의 파라크린 시그널을 사용하여 간 전구세포의 생존, 증식 및/또는 분화를 시험관내에서 조절하는 방법이 제공된다.

## *대 표 도*



(72) 발명자

**우로니스, 조수아**

미국 노쓰 캐롤라이나 27707-5558, 더럼, 칼브드 오크 드라이브 603

**야오, 신-레이**

미국 노쓰 캐롤라이나 27514, 채플 힐, 아파트 315, 메이슨 팜 로드 1401

**와우티어, 엘리안느**

미국 노쓰 캐롤라이나 27514, 채플 힐, 캔모어 로드 720

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

단리된 간 줄기 세포군을 무혈청 배양 배지내에 히알루로난, 다른 비황산화 또는 약황산화 글리코사미노글리칸(GAGs), 비황산화 또는 약황산화 프로테오글리칸, 배아 콜라겐 및 배아 기저 부착 분자 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분층상에서 배양하는 것을 포함하고, 여기에서 층은 실질적으로 성숙 콜라겐을 함유하지 않으며, 배양은 간 줄기 세포를 분화 유도없이 증식시키는, 간 줄기 세포를 그의 분화 유도없이 시험관내에서 증식시키는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 임의 또는 모든 매트릭스 성분이 혈관모세포 공급자 세포, 휴지 간별 공급자 세포, HUVEC 공급자 세포 또는 이들의 조합물에 의해 공급되는 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 배아 콜라겐이 타입 III의 것인 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 성숙 콜라겐이 콜라겐 타입 I의 것인 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 기저 부착 분자가 주로 태아 조직에서 발견되는 라미닌의 아이소형을 포함하는 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 히알루로난 외의 GAGs가 콘드로이틴 설페이트형인 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 프로테오글리칸이 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(CS-PGs) 형인 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 간 줄기 세포가 태아, 신생아, 소아 또는 성인 간으로부터 얻어진 것인 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 간이 인간 간인 방법.

**청구항 10**

제5항에 있어서, 라미닌의 농도가 약 0.1 to 내지 2 $\mu g/cm^2$인 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 라미닌의 농도가 약 1 $\mu g/cm^2$인 방법.

**청구항 12**

제3항에 있어서, 타입 III 또는 IV 콜라겐의 농도가 각각 약 0.1 내지 약 15 $\mu g/cm^2$인 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 층이 히알루로난을 포함하는 방법.

**청구항 14**

단리된 간 줄기 세포군을 무혈청 배양 배지내에 배아 콜라겐, 기저 부착 분자, CS-PGs 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택된 매트릭스 성분층상에서 배양하는 것을 포함하고, 여기에서 층은 실질적으로 성숙 콜라겐을 함유하지 않으며, 배양은 간 줄기 세포를 분화 유도없이 증식시키는, 간 줄기 세포를 시험관내에서 간모세포로 분화하는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 임의 또는 모든 매트릭스 성분이 활성화 내피, 활성화 간별 공급자 세포, 또는 이들 모두에 의해 공급되는 방법.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 배아 콜라겐이 타입 IV 콜라겐인 방법.

**청구항 17**

제14항에 있어서, 기저 부착 분자가 태아의 라미닌 아이소형을 포함하는 방법.

**청구항 18**

제14항에 있어서, 층이 히알루로난을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 19**

제14항에 있어서, 간 줄기 세포가 태아, 신생아, 소아 또는 성인 간으로부터 수득된 것인 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 간이 인간 간인 방법.

**청구항 21**

단리된 간 줄기 세포군을 무혈청 배양 배지내에 황산화 프로테오글리칸, 성숙 콜라겐, 피브로넥틴, 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택된 매트릭스 성분층상에서 배양하는 것을 포함하고, 여기에서 배양은 간 줄기 세포 또는 간모세포를 수임 간 또는 담관 전구세포 및 이들의 자손으로 분화되는 것을 유도하는, 간 줄기 세포 또는 간모세포를 시험관내에서 수임 간세포 또는 담관 전구세포 및 이들의 자손으로 분화하는 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 임의 또는 모든 매트릭스 성분이 간질 공급자 세포, 활성화 간별 공급자 세포, 근육섬유모세포 공급자 세포 또는 이들의 조합물에 의해 공급되는 방법.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 성숙 콜라겐이 콜라겐 타입 I인 방법.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 층이 실질적으로 히알루로난을 포함하지 않는 방법.

**청구항 25**

제21항에 있어서, 간 줄기 세포가 태아, 신생아, 소아 또는 성인 간으로부터 얻어진 것인 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 간이 인간 간인 방법.

**청구항 27**

제21항에 있어서, 황산화 프로테오글리칸이 헤파란 설페이트-PG 또는 헤파린-PG, 또는 이 둘 다인 방법.

**청구항 28**

(a) 컨테이너, 및

(b) 히알루로난, 다른 비황산화 또는 약황산화 글리코사미노글리칸(GAGs), 비황산화 또는 약황산화 프로테오글리칸, 배아 콜라겐 및 배아 기저 부착 분자 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분층을 포함하고;

상기 층은 실질적으로 성숙 콜라겐을 포함하지 않으며;

매트릭스 성분층은 실질적으로 컨테이너의 적어도 한 표면을 코팅하는,

간 전구세포 증식용 컨테이너.

**청구항 29**

제1항에 있어서, 조직 배양 플레이트, 생물반응기, 실험 셀 또는 실험 칩인 컨테이너.

**청구항 30**

(a) 컨테이너, 및

(b) 배아 콜라겐, 기저 부착 분자, CS-PGs 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분층을 포함하고;

상기 층은 실질적으로 성숙 콜라겐을 포함하지 않으며;

매트릭스 성분층은 실질적으로 컨테이너의 적어도 한 표면을 코팅하는,

간 전구세포 증식용 컨테이너.

**청구항 31**

(a) 컨테이너, 및

(b) 황산화 프로테오글리칸, 성숙 콜라겐, 피브로넥틴 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분층을 포함하고;

상기 매트릭스 성분층은 실질적으로 컨테이너의 적어도 한 표면을 코팅하는,

간 전구세포 증식용 컨테이너.

# *명 세 서*

## *기 술 분 야*

[0001] 관련 특허출원의 상호참조

[0002] 본 출원은 그의 전체내용이 본 원에서 참고로 포함되는 2007년 6월 15일자로 출원된 미국 가출원 제60/944,435호를 우선권으로 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 간 전구 세포의 생체외(*ex vivo*) 증식 및/또는 분화에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 중간엽 세포로부터 유래되는 가용성 및 불용성 파라크린 시그널을 동정 및 선택하고, 이를 시험관내에서 간 줄기 세포를 포함하여 간 전구 세포의 확장 및/또는 분화를 조절하는데에 적용하는 것에 관한 것이다.

## *배 경 기 술*

[0005] 발명의 배경

[0006] 간 줄기 세포 및 그의 자손(예를 들면, 간모세포 및 수임 전구세포)은 확장 잠재성이 상당하다. 이러한 이유로, 이들 세포군은 생인공 간 또는 세포 이식을 비롯한 세포 요법의 바람직한 후보군이다. 그러나, 이러한

보장에도 불구하고, 간 세포 요법의 전 잠재능력은 아직 실현의 여지가 남아 있다.

[0007] 간 줄기 세포 및 그 자손의 시험관내 증식은 실험실 벤치에서 임상 이행에 이르기까지의 시험관내 배양 조건이 언제나 최적인 것은 아니기 때문에, 과거 도전과제로 남았었다. 예를 들어, 일부 배양 조건은 생존에 우수하지 않고, 세포 분열을 크게 저지할 수 있거나, 세포 분화를 바람직하지 않은 과정으로 나아가게 할 수 있다. 마찬가지로, 일부 배양 조건은 오염물을 도입할 수 있는 추가의 인자(예: 혈청)를 필요로 하여 인간을 치료하는데 그의 적용을 제한할 수 있다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0008] 정상 세포, 특히 전구세포 유지는 전구세포의 생존 및 기능에 중요한 파라크린 시그널을 제공하는 것으로 알려진 중간엽 동료 세포의 공급자를 필요로 한다. 중간엽 세포 공급자의 범주를 규정하고, 이를 확장, 특정 과정으로의 계통 제한 또는 담관 상피 및 간세포의 성숙한 과정쪽으로 간 전구세포의 분화를 매개하는 그의 파라크린 시그널, 세포외 매트릭스 성분 및 가용성 시그널을 동정하기 위한 모델로 이용하는 것이 필요하다. 시그널을 한정함으로써 생존, 확장, 특정 과정으로의 계통 제한 및 간 세포를 성숙시키는 완전 분화를 포함하고, 시그널 자체를 간 전구세포로부터 원하는 생물학적 반응을 유도하기 위한 공급자없이 적절한 배합에 이용할 수 있는 것이 가능하다. 따라서, 지금까지의 공급자 세포 요건을 제거하도록 한정된 배양 조건이 요망된다.

### *과제의 해결 수단*

[0009] 발명의 개요

[0010] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 단리된 간 줄기 세포군을 무혈청 배양 배지내에 히알루로난, 기타 비황산화 또는 약황산화 글리코사미노글리칸(GAGs), 비황산화 또는 약황산화 프로테오글리칸, 배아 콜라겐(예: 타입 III) 및 배아 기저 부착 분자 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택된 매트릭스 성분층상에서 배양하는 것을 포함하고, 여기에서 층은 실질적으로 성숙 콜라겐(예: 타입 I)을 함유하지 않으며, 배양은 간 줄기 세포를 분화 유도없이 증식시키는, 간 줄기 세포를 그의 분화 유도없이 시험관내에서 증식시키는 방법이 제공된다.

[0011] 임의 또는 모든 매트릭스 성분은 혈관모세포 공급자 세포, 휴지 간별 공급자 세포, HUVEC 공급자 세포 또는 이들의 조합물에 의해 제공될 수 있다. 기저 부착 분자는 주로 태아 조직에서 발견되는 라미닌의 아이소형을 포함할 수 있으며, 히알루로난 외의 GAGs는 콘드로이틴 설페이트형일 수 있다. 간 줄기 세포는 인간의 것일 수 있으며, 태아, 신생아, 소아 또는 성인 간으로부터 유래될 수 있다. 라미닌은 약 0.1 내지 약 2 $\mu g/cm^2$, 바람직하게는 약 1 $\mu g/cm^2$의 농도로 제공될 수 있다. 유사하게, 타입 III 또는 IV 콜라겐은 각각 약 0.1 내지 약 15 $\mu g/cm^2$의 농도일 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 단리된 간 줄기 세포군을 무혈청 배양 배지내에 배아 콜라겐, 기저 부착 분자, CS-PGs 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택된 매트릭스 성분층상에서 배양하는 것을 포함하고, 여기에서 층은 실질적으로 성숙 콜라겐을 함유하지 않으며, 배양은 간 줄기 세포를 분화 유도없이 증식시키는, 간 줄기 세포를 시험관내에서 간모세포로 분화하는 방법이 제공된다.

[0013] 임의 또는 모든 매트릭스 성분은 활성화 내피, 활성화 간별 공급자 세포, 또는 이 둘다에 의해 제공될 수 있다. 배아 콜라겐은 타입 IV 콜라겐일 수 있고, 기저 부착 분자는 약 0.1 내지 약 2 $\mu g/cm^2$, 바람직하게는 약 1 $\mu g/cm^2$의 농도로 공급되는 라미닌의 태아 아이소형일 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 층은 히알루로난을 추가로 포함한다. 간 줄기 세포는 태아, 신생아, 소아 또는 성인 간, 및 바람직하게는 인간으로부터 유래될 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 단리된 간 줄기 세포군을 무혈청 배양 배지내에 황산화 프로테오글리칸, 성숙 콜라겐, 피브로넥틴, 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택된 매트릭스 성분층상에서 배양하는 것을 포함하고, 여기에서 배양은 간 줄기 세포 또는 간모세포를 수임 간 또는 담관 전구세포 및 이들의 자손으로 분화되는 것을 유도하는, 간 줄기 세포 또는 간모세포를 시험관내에서 수임 간세포 또는 담관 전구세포 및 이들의 자손으로 분화하는 방법이 제공된다. 임의 또는 모든 매트릭스 성분은 간질 공급자 세포, 활성화 간별 공급자 세포, 근육섬유모세포 공급자 세포 또는 이들의 조합물에 의해 제공될 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 층은 히알루로난을 실질적으로 포함하지 않으며, 황산화 프로테오글리칸은 헤파란 설페이트-PG 또는 헤파린-PG, 또는

이 둘다일 수 있다.

[0015] 본 발명의 그밖의 다른 구체예에 있어서, 간 전구세포 증식 또는 분화용 컨테이너가 제공된다. 컨테이너는 히알루로난, 다른 비황산화 또는 약황산화 글리코사미노글리칸(GAGs), 비황산화 또는 약황산화 프로테오글리칸, 배아 콜라겐 및 배아 기저 부착 분자 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분층을 포함하며; 여기에서, 층은 성숙 콜라겐을 실질적으로 포함하지 않으며; 매트릭스 성분층은 컨테이너의 적어도 한 표면을 코팅한다.

[0016] 다른 한편으로, 층은 배아 콜라겐, 기저 부착 분자, CS-PGs 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분을 포함할 수 있으며, 여기에서 층은 성숙 콜라겐을 실질적으로 포함하지 않으며; 매트릭스 성분층은 적어도 하나의 컨테이너 표면을 코팅한다. 마지막으로, 층은 황산화 프로테오글리칸, 성숙 콜라겐, 피브로넥틴 및 이들의 조합물로 구성된 그룹중에서 선택되는 매트릭스 성분을 포함하며, 여기에서 매트릭스 성분층은 컨테이너의 적어도 한 표면을 코팅한다. 컨테이너는 조직 배양 플레이트, 생물반응기, 실험실 세포 또는 실험칩일 수 있다.

[0017] 이로서, 당업자들은 본 발명의 다수의 목적을 실시하기 위한 그밖의 다른 구조, 방법 및 시스템을 설계하기 위한 기초로서 본 개시내용이 기초로 하는 개념이 용이하게 이용될 수 있음을 인식할 것이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0018] 도 1은 배양시 hHpSCs 콜로니 및 인간 간모세포를 나타낸다: hHpSC 콜로니(A) 및 인간 간모세포(B)는 둘 다 EpCAM(녹색으로 표시됨)을 발현하였다. NCAM(적색으로 표시됨, A)이 콜로니의 주변 영역 및 중심을 따라 발현되었다. 간모세포는 알파-페토프로테인(AFP, 적색으로 표시됨, B)을 강하게 발현하였다. 양 세포는 DAPI(블루)로 염색되었다. 스케일 바, 100 ㎛.

도 2는 hHpSCs 콜로니를 에워싼 세포가 αSMA+ hHpSTCs임을 나타낸다: 전형적인 인간 간 줄기 세포 콜로니(A)는 콜로니 내 NCAM(B, D) 및 콜로니 가장자리 동료 세포의 αSMA(C, D)에 양성이다.

도 3은 혈관모세포와 함께 hHpSCs의 일차 배양을 나타낸다: EGM-2에서 7 일간 배양된 KDR+ 선택 세포는 vWF(녹색)를 발현하였다(A 및 B). EGM-2에서 4 일간 배양된 CD31+ 선택 세포는 vWF(녹색) 및 CD31(적색)(C) 모두를 발현하였다. 스케일 바, 100 ㎛. 혈관모세포는 배양시 hHpSC 콜로니와 회합하였다(D). 10배율 확대.

도 4는 휴지 및 활성화 hHpSTCs를 비교한 것이다: 휴지 hHpSTCs는 데스민, αSMA+, CD146, 타입 I 콜라겐 및 다른 매트릭스 분자(피브로넥틴, 프로테오글리칸)를 저 수준으로 발현하였다. 손상 과정 - 예를 들어, 혈청 또는 특정 인자(예: PDGF 및 TGF-B1)에의 노출은 hHpSTCs를 활성화하여 근육섬유모세포-양 간질 세포로 전이시키고, αSMA 및 매트릭스 성분의 생산을 증가시키며, HGF와 같은 다양한 성장인자를 방출한다. 중간엽 동료 세포(혈관모세포 및 휴지 hHpSTCs)로 둘러싸인 hHpSCs 콜로니는 CD146을 낮은 수준으로 발현하는 것으로 나타났다. 동일한 플레이트에서, 활성화를 겪어 고 수준의 CD146으로 이어지는 인접 콜로니가 중간엽 동료 세포와 함께 나타났다.

도 5는 상이한 공급자의 형태 및 면역조직화학을 나타낸다: A: hMSCs. B: hUVECs. C-D: 4(C) 및 7(D) 일째 인간 태아 간-유래 공급자 세포. E-H: 무혈청 조건에서 자기적 면역선택 KDR+ 세포(E-F) 및 섬유모세포가 결여된 상등액 세포(G-H)의 -11 일 배양물은 αSMA에 양성이었다(F 및 H). 10배율 확대.

도 6은 EGM-2 배지에서 8 일간 배양된 섬유모세포가 결여된 상등액 세포의 면역조직화학을 나타낸다: 세포는 데스민(B 및 H), αSMA(I), 라미닌(C), 피브로넥틴(F), 콜라겐 타입 I(L) 및 IV(E)에 양성이었으며, 내피 마커 vWF(K)에 음성이었다. 다 많은 세포가 데스민 보다 αSMA를 발현하였음에 주목바란다. 각 이중 염색에 대한 위상차 이미지가 예시되었다(A, D, G, 및 J). 바, 50 ㎛.

도 7은 상이한 공급자와 공배양된 hHpSCs의 특정 효과를 나타낸다. A-F: 단독 배양된 hHpSCs(A), hUVECs와 공배양된 것(B), hMSCs와 공배양된 것(C), 또는 인간 태아 간-유래 공급자와 공배양된 것(D). 10배율 확대.

도 8은 인간 태아 간 유래 αSMA+ 상등액 세포와 공배양된 인간 hHpSCs를 나타내며, 섬유모세포가 결여된 것이다. 이들 공급자의 사용으로 간모세포로 계통 제한되었다. 인간 간 줄기 세포 콜로니(A 및 B) 및 hHpSCs 및 인간 태아 간-유래 공급자의 공배양물(C 및 D) 상에서 8 일째 인간 AFP에 대한 면역조직화학. 10배율 확대.

도 9는 매트릭스 분자를 코딩하는 mRNAs에 대한 정규화된 mRNA 발현을 나타낸다: 각 세포 타입에서 mRNA 발현 수준의 폴드 변화를 동일 세포 타입의 리보좀 RNA(18S) 함량으로 정규화하였다.

도 10은 정제된 매트릭스 성분의 기질상에서 hHpSCs 거동을 나타낸다: hHpSCs는 플라스틱 또는 타입 III 콜라겐(A 및 B) 상에서 줄기 세포 특성을 유지한다. 타입 IV 콜라겐 상부 또는 라미닌상에서 배양된 경우(C 및 D), 간모세포로 hHpSCs 계통 제한. hHpSCs는 타입 I 콜라겐 상부상에서 배양되는 경우 성숙 간세포로 더 분화된다. D에 고배율.

도 11은 분화동안 hHpSCs 및 그의 중간엽 세포 파트너에서의 매트릭스 화학 및 매트릭스 수용체 변화를 요약한 것이다.

도 12는 공배양 및 인간 태아 간 세포 배양시 생산된 인간 사이토킨을 비교하여 나타낸 것이다. 저(상부) 및 고(하부) 수준으로 인간 태아 간 세포 단일 배양 및 STO 공급자 세포 및 인간 태아 간 세포의 공배양시 생산된 인간 사이토킨의 농도(pg/ml).

도 13은 공배양 및 STO 공급자 세포 배양시 생산된 마우스 사이토킨을 비교하여 나타낸 것이다. 저(상부) 및 고(하부) 수준으로 STO 공급자 세포 단일 배양 및 STO 공급자 세포 및 인간 태아 간 세포의 공배양시 생산된 마우스 사이토킨의 농도(pg/ml).

도 14는 rter6 세포의 콜로니 형성에 대한 사이토킨 효과를 나타낸다. 사이토킨 존재하 또는 부재하에 호르몬 한정 배지(HDM)에서의 래트 간 전구(rter6) 세포의 콜로니 수(상부) 및 면적(픽셀; 하부).

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0019] 발명의 상세한 설명

[0020] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 부착, 생존 및 생체외 증식을 촉진하는 세포외 매트릭스 성분, 및 간 줄기 세포 및 그 자손의 분화를 유도하는 다른 매트릭스 성분이 동정되었다. 본 원 명세서에 사용된 용어 "간 전구세포"란 넓은 범위로 간 줄기 세포 및 그 자손 둘 다를 포함하도록 정의된다. "자손"은 간 줄기 세포 또는 간모세포, 이들의 다능성 전구세포 및 오직 하나의 계통을 특정 성숙 세포 타입(예: 간세포)으로 분화할 수 있는 수임 전구세포를 포함할 수 있다.

[0021] "클론원성 확장"이란 단일 세포로부터 확장될 수 있고, 어버이 세포의 표현형을 보유하면서 반복적으로 계대배양 및 확장될 수 있는 세포의 성장 특성을 말한다. "콜로니 형성"은 계대배양 또는 계대능이 제한된 세포를 포함하고 1 주일 또는 2 주일내에 제한된 수의 세포 분열(전형적으로 5 내지 7회 세포 분열)을 겪을 수 있는 이배체 실질 세포의 특성을 의미한다. "다능성"은 복수 과정으로 딸 세포를 형성할 수 있는 세포를 의미하며; "단일분화성" 또는 "수임 전구세포"는 단일 성숙 운명을 지니는 세포이다.

[0022] 간 줄기 세포(HpSCs)는 태아 및 신생아 간의 관상판(한계판으로도 언급됨) 및 소아 및 성인 간의 헤링관에서 발견되고, 텔로머라제의 발현으로 자기복제 흔적을 나타내며, 이식시에 성숙 간 세포를 형성할 수 있는 다능성 세포이다. 이들 세포는 EpCAM+, NCAM+, ALB+, CK8/18+, CK19+, CD133/1+이고, 시험된 모든 조혈 마커(예: CD34, CD38, CD45, CD14), 중간엽 세포 마커(CD146, VEGFr, CD31) 및 P450s 또는 알파-페토프로테인 발현에 음성이다. HpSCs는 간모세포 및 수임(단일분화성) 전구세포를 형성하는 것으로 나타났다.

[0023] 간모세포(HBs)는 헤링관 끝에 계류하는 세포 소응집체 또는 단일 세포로서 태아 및 신생아 간의 실질에서 발견되는 이능성 세포이다. HBs는 HpSCs로부터 유래된다. HBs는 HpSCs 상에 존재하는 많은 항원을 공유하나, 중요한 특징적인 차이가 있다. 예를 들어, HBs는 NCAM을 발현하기 보다는 ICAM1을 발현하며, 상당량의 알파-페토프로테인 및 태아 P450s 형을 발현한다. 이들 HBs는 단일분화성 전구세포, 수임 간세포 및 담관 전구세포를 초래한다.

[0024] 수임 간 전구세포는 간세포 또는 담관 계통의 단일분화성 전구세포가다. 그의 항원 프로파일은 HBs의 것과 중복되나; 담관 수임 전구세포는 AFP 또는 ALB가 아닌 CK19를 발현하는 반면, 간세포 수임 전구세포는 CK19가 아닌 AFP 및 ALB를 발현한다. 수임 담관 전구세포는 간 줄기 세포 및 또한 간모세포로부터 직접 유래된다.

[0025] 중간엽 세포(MCs)는 기질(중간엽 줄기 세포), 내피(혈관모세포), 별 세포(별 세포 전구체) 및 각종 조혈 세포(조혈 줄기 세포)를 포함하여 많은 상이한 중간엽 세포 타입(성숙 세포 및 괄호안에 그의 전구세포로서 나열)의 다양한 계통 단계의 세포를 포함한다.

[0026] 본 원에서 검토되고 예시된 간 전구세포는 전부는 아니지만 인간-유래 세포군을 의미하며, 본 원에서의 교시는 인간에만 한정되는 것은 아니다. 실제로, 당업자들은 본 원에서의 교시가 포유동물, 일반적으로(예: 마우스, 래트, 개 등)로부터의 간 전구세포로 확장될 수 있음을 예상할 수 있다. 따라서, 본 발명의 영역은 임의 모든

포유동물의 간 전구세포를 포함하도록 의도된다.

[0027] 본 발명에 따라 시험관내 증식에 적합한 간 전구세포는 임의의 특정 수단으로 단리되거나 동정된 것에만 한정되지 않음에 주목해 주기 바란다. 예로, 간 전구세포의 단리 및 동정 방법이, 예를 들어 미국 특허 제6,069,005호 및 미국 특허 출원 제09/487,318호; 10/135,700호; 및 10/387,547호에 기술되었으며, 이들의 내용은 그의 전체가 본 원에 참고로 포함된다.

[0028] 간 줄기 세포 및 간모세포는 특징적인 항원 프로파일을 지니며, 알려진 프로토콜로 단리될 수 있다. 예를 들어, 간 줄기 세포 및 간모세포는 다수 항원(예: 사이토케라틴 8, 18, 및 19, 알부민, CD133/1, 및 상피 세포 부착 분자("EpCAM"))를 공유하고, 조혈 마커(예: 글리코포린 A, CD34, CD38, CD45, CD14) 및 중간엽 세포 마커(예: CD146, CD31, VEGFr 또는 KDR)에 음성이다. 다른 한편으로, 간 줄기 세포 및 간모세포는 그의 크기(줄기 세포는 7-9 ㎛이고; 간모세포는 10-12 ㎛임), 배양시 형태(줄기 세포는 조밀하고 형태학적으로 균일한 콜로니를 형성하는 반면, 간모세포는 명확한 채널로 분리된 소관으로 추정되는 코드형 구조를 형성함), 특정 항원의 발현 패턴 차이(EpCAM은 간 줄기 세포를 통해 발현되나, 간모세포내 세포 표면으로 구속됨) 또는 상이한 항원 프로파일(N-CAM은 간 줄기 세포에 존재하나, 알파-페토프로테인(AFP) 및 ICAM1은 간모세포에 의해 발현됨)로 상호 구별될 수 있다. 태아 및 신생아 간에서, 간 줄기 세포는 관상판(한계판으로도 언급됨)인 반면, 간모세포는 주로 실질 세포군(>80%)이다. 소아 및 성인 조직에서, 간 줄기 세포는 헤링관에 존재하는 반면, 간모세포는 헤링관 끝에 체류하는 세포이다. 간모세포는 정상 조직에서 소수의 세포로 구성되나, 작아진 간(예: 간경화)에서는 다수(예: 소절)가 발견된다.

[0029] 본 발명은 HpSCs, 바람직하게는 인간 HpSCs(hHpSCs)의 생체외 유지를 시험관내에서 조절하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 방법은 (1) 분화 유도없이 HpSCs의 증식(즉, 자기 재생); (2) HpSCs를 간모세포로 분화(즉, "계통 제한"); 또는 (3) 더욱 "과다한" 분화(예: 수임 전구세포로)(총괄적으로 "생체외 유지"로 언급됨)을 가능케 한다. 이 방법은 공배양에 사용되는 특정 타입의 중간엽 공급자 세포를 선택적으로 사용함으로써 부분적으로 가능해 진다. 본 발명은 또한 바람직하다면 공급자 세포 부재하에 HpSCs를 증식시키도록 불용성(예: 매트릭스 분자) 및 가용성(예: 사이토킨) 성분을 단독으로 또는 조합하여 제공한다. 표 1에 상기 언급된 생체외 유지 모드에 영향을 미치는 것으로 관찰된 불용성 인자를 요약하여 나타내었다.

*표 1*

[0030]

| 인간 간 줄기/전구세포에 대한 공급자/기질 효과 | | |
|---|---|---|
| 기질/공급자 | | 1 주 이상 공급자상에서 유지된 세포의 형태/항원 프로파일 |
| | | |
| 플라스틱*** | | hHpSC |
| hUVECs | | hHpSC |
| hMSCs | | 간모세포 |
| 다음을 위해 면역선택된 간세포 현탁물: | 최초 1 주 KDR+ 세포 | hHpSCs |
| | 7-10 일후의 KDR+ 세포 | 간모세포로만으로 신속하게 전이되는 hHpSCs와 간모세포의 초기 혼합물 |
| | CD31+ 세포 | 간모세포 |
| | 기질 세포 결여 | 간모세포 |
| STO 세포 | | 간모세포 및 수임(단일분화성) 전구세포로 분화하는 성장 정지된 hHpSCs |
| 피브로넥틴 | | 세포 부착이 거의 없음; 생육성을 급속히 상실한 것 |
| 타입 III 콜라겐 | | 간모세포 |
| 타입 IV 콜라겐 | | hHpSCs |
| 타입 I 콜라겐의 표면상 | | 간모세포 |
| 타입 I 콜라겐내에 내입 | | 간모세포 및 수임(단일분화성) 전구세포의 혼합물인 성장 정지된 세포 |
| | | 성숙 간모세포 |

| |
|---|
| 모든 배양물은 무혈청 KM에 존재.<br>***: 세포가 배양 플라스틱상에 존재하는 경우에는, 혈관모세포 및/또는 간별세포 전구체로 구성된 동반 세포와 연합되는 경우에만 hHpSC 콜로니가 생존한다.<br>* 배양물 형태 및 항원 프로파일:<br>hHpSC 콜로니는 형태가 균일하고, 고 핵 대 세포질 비를 가지며, 직경이 약 7-9 ㎛이고, 단단하게 패킹되었으며, 혈관모세포 및/또는 hHpSCs를 포함하는 동반 세포에 의해 둘러싸인 세포를 가지는 단층이다. 고유 항원 프로파일: ICAM+, 클라우딘 3-, 알부민++, AFP+++.<br>hHpSCs와 간모세포가 공유하는 항원 프로파일: EpCAM, CK8, 18 및 19, 인디안 헤드게호그(Indian Hedgehog) 프로테인(sonic, Indian), 텔로머라제에 양성; 조혈 마커(CD34, CD45, CD38, 글리코포린 A), 간별세포 마커(데스및 및 αSMA) 및 내피 세포 마커(VEGFr, CD31, vWF)에 음성. |

[0031] 상술된 세가지 방식으로 생체외 유지를 보유하는 상이한 부류의 공급자가 동정되었다. 인간 간별세포(hHpSTCs)를 포함하지 않거나, 휴지 hHpSTCs를 포함하는 내피 전구세포 또는 혈관모세포의 공급자와의 공배양으로 HpSCs를 분화없이 확장시킬 수 있다. 공급자는 활성화 내피가 풍부하며, hHpSTCs는 HpSCs를 간모세포로 계통 제한시킨다. 마지막으로, 성숙 내피 또는 뮤린 기질을 포함하는 공급자 세포(STO 세포로 나타내어짐)는 HpSCs를 성숙 실질 세포(담관 및 간세포 세포 포함)로 분화시킨다. 따라서, 공배양물 행태는 간 발생동안 관찰된 유사성을 동정하며, 상피에 인접한 중간엽으로부터 파라크린 시그널로 조절되는 것으로 판단된다.

[0032] 매트릭스 화학은 배아 발생과 관련될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명자들은 간의 줄기 세포 장소(niche) 내 또는 그 부근에서 발견된 세포외 매트릭스 성분이 분화 유도없이 간 전구세포를 확장하는 것을 발견하였으며, 이는 기존의 기술을 진 일보시킨 것이다. 그의 전체내용이 본 원에 참고로 포함되는 2006년 11월 15일 출원된 미국 특허 출원 제11/560,049호에 기술된 바와 같이, 간의 줄기 세포 장소내 또는 그 부근에 풍부한 것으로 발견된 매트릭스 성분상에서 배양된 세포는 응집하여 일부 매트릭스 성분(예: 라미닌) 상에 회전 타원체-유사 구조를 형성하며, 다른 곳에서(예: 타입 III 콜라겐) 단층으로 전개된다. 줄기 세포 장소에서 발견된 특정 세포외 매트릭스 성분 타입은 자기 복제 모드, 즉 대칭 세포 분열(딸 세포는 어버이 세포와 동일하거나 거의 동일하다)로 확장되도록 간 전구 세포에 필요한 시그널에 존재한다.

[0033] 간 줄기 세포의 성숙은 적어도 부분적으로 그의 분화를 지향하는 매트릭스 성분의 독특한 조합과 함께 발생하는 것으로 여겨진다. 일부 세포외 매트릭스 성분은 비대칭 분열과 관련된 확장을 겪게 하는데 간 전구세포에 관대하며, 즉 확장은 일부 분화와 함께 일어난다. 완전 성숙 간 세포가 발견되는 간 조직 영역에 위치하는 다른 것이 세포의 성숙 정지 및 완전 성숙을 유도한다.

[0034] 모든 공급자는 여러 범주의 매트릭스 성분을 생성하며, 기저 부착 분자(피브로넥틴 및/또는 라미닌) 및 수개의 콜라겐을 포함한다. 피브로넥틴은 혈관모세포 또는 휴지 hHpSTCs에 의해 발현되지 않으나, 조사된 모든 다른 공급자에 의해 발현되는 매트릭스 성분인 것으로 입증되었다. 이는 인간 배꼽 정맥 내피 세포(hUVECs)에 의해 최고 수준으로 생성되나, HpSCs는 그에 잘 부착되지 않는다.

[0035] 따라서, 매트릭스내 그의 존재는 공급자에 의해 유도되는 생물학적 반응과 관련이 없는 것으로 보인다. 자기 복제를 유도하는 공급자는 타입 III 및 IV 콜라겐, 라미닌 및 히알루로난(혈관모세포, 휴지 HpSTCs, HUVEC 세포)을 발현하였다. 연속 확장 없이 간모세포로의 계통 제한을 유도하는 공급자는 타입 IV 콜라겐 및 라미닌을 생성하였으나, 타입 III, 일부 히알루로난 및 일부 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(상승된 αSMA 및 CD146 수준으로 입증된 바와 같이, 일차 배양으로 활성화 HpSTCs가 풍부)을 생성하지 않았다. 최대 분화를 유도하는 공급자는 매트릭스를 최고량으로 발현하였으며, 타입 I 및 IV, 라미닌, 피브로넥틴 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸을 고수준으로 유도하였다.

[0036] 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(CS-PG) 프로테인은 인간 섬유모세포-유사, 태아 간-유래 세포 및 골수-유래 중간엽 줄기 세포(hMSCs)에서 뚜렷이 나타난다. 이들 두가지 타입의 공급자는 hHpSCs를 간모세포로 계통 제한한다. 따라서, CS-PGs는 상기 과정을 적어도 부분적으로 시그널링할 것으로 보인다. 줄기 세포 장소는 히알루로난과 같은 설페이션화가 거의 없는 글리코사미노글리칸(GAGs)이 차지하며, 따라서 이들 최소한으로 황산화된 CS-PGs는 줄기 세포에 대한 시그널 제시를 최소화하는 배리어로 작용할 것으로 추정된다. 줄기 세포가 그 장소로부터 밀려나옴에 따라, 이들은 GAGs 및 더욱 과도하게 설페이션화된 프로테오글리칸과 접촉하여 성장 또는 단리된 세포 과정으로의 계통 제한 면에서 줄기 세포에 영향을 미칠 수 있는 성장 인자와 결합하게 된다.

[0037] 가장 과도한 분화가 STO 공급자 세포상에 플레이팅된 hHpSCs에서 관찰되었으며, hHpSCs는 성장 정지를 겪게 되고, 간모세포 및 단일분화성 전구세포(즉, 수임 담관 및 간세포 전구세포)로 분화된다. STO 공급자는 최고 수

준의 세포외 매트릭스 프로테인을 생성하였으며, HS-PGs 생성에 있어 독특하였다.

[0038] 가장 과도한 분화를 유도하도록 타입 I 콜라겐이 결정되었다. 분화 정도는 세포가 타입 I 콜라겐 겔의 상부상에 플레이팅되었는지, 또는 그 안에 내입되었는지에 따라 상이한 것으로 나타났다. 실제로, 성숙 간세포와 형태학적으로 유사한 세포가 콜라겐에 내입된 배양물에서 관찰되었다(도 10). 이러한 현상은 아마도 타입 I 콜라겐의 직접적인 효과 및 또한 타입 I 콜라겐에 의한 HS-PGs의 안정화를 통한 간접적인 효과 때문인 것으로 보인다.

[0039] 도 11에 hHpSCs가 간모세포를 통해 궁극적으로 성숙 실질 세포로 전이되면서 발생하는 매트릭스 성분 및 매트릭스 수용체에서 관찰된 일련의 변화를 요약하여 나타내었다. 따라서, 본 발명은 "공급자가 없는" 배양물에서 HpSCs를 증식시킬 수 있다. 표 2는 조사된 상이한 공급자에 의해 생성된 세포외 매트릭스 성분을 상세하게 제공한다.

표 2

<table>
<tr><td colspan="9">상이한 공급자에 의해 생성된 세포외 매트릭스</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">매트릭스 성분</td><td rowspan="2">플라스틱의 hHpSCs</td><td rowspan="2">hUVECs</td><td rowspan="2">hMSCs</td><td colspan="3">다음을 위해 면역선택된 인간 태아 간세포</td><td rowspan="2">STO 세포</td></tr>
<tr><td>CD31+</td><td>KDR+</td><td>기질 결여</td></tr>
<tr><td rowspan="3">콜라겐</td><td>타입 I</td><td>Neg</td><td colspan="4">Neg</td><td>+/+</td><td>+++</td></tr>
<tr><td>타입 III</td><td>++</td><td colspan="5">Neg</td><td>++</td></tr>
<tr><td>타입 IV</td><td>++</td><td>+</td><td>-</td><td colspan="3">++</td><td>+++</td></tr>
<tr><td rowspan="2">부착 분자</td><td>라미닌</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>++</td></tr>
<tr><td>피브로넥틴</td><td>Neg</td><td colspan="5">Pos</td><td>+++</td></tr>
<tr><td rowspan="3">프로테오글리칸</td><td>신데칸 (HS-PG)</td><td>Neg</td><td colspan="5">Neg</td><td>++</td></tr>
<tr><td>퍼레칸</td><td>Neg</td><td colspan="5">Neg</td><td>++</td></tr>
<tr><td>CS-PG</td><td>Neg</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td><td>+</td><td>+++</td></tr>
<tr><td>GAGs</td><td>히알루로난</td><td>++</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">hHpSCs 에 대한 공급자의 기능적 효과</td><td>자기 복제; 존재하는 경우 최소의 분화</td><td colspan="4">상당한 확장과 함께 간모세포로의 계통 제한</td><td>성장 정지; 분화</td></tr>
<tr><td colspan="9">GAGs = 글리코사미노글리칸. 사용된 항체는 다음과 같다:<br>• 시그마사(Sigma)에서 구입한 세트 (Sigma, St. Louis, MO): 항-인간 타입 I 콜라겐 마우스 IgG1, 항-인간 타입 III 콜라겐 마우스 IgG1 항-인간 라미닌 마우스 IgG1, 항콘드로이틴 설페이트 마우스 IgM.<br>• 항인간 피브로넥틴 마우스 IgG1 (Oncogene Research Products, Cambridge, MA),<br>• 토끼 항인간 타입 IV 콜라겐 IgG (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ),<br>• 래트 항인간 퍼레칸 IgG2a (Lab Vision, Fremont, CA),<br>• 항인간 신데칸<br>• 대조군: 항체가 정제된 매트릭스 성분에 대해 선별되었다.</td></tr>
</table>

[0040]

[0041] 본 발명은 어떤 한 매트릭스 성분, 가용성 성분 또는 이들의 조합물로만 한정되지 않는다. 본 원에서의 교시내용에 따라, 본 발명은 세포의 확장 또는 분화를 위해 생체외 유지되도록 사용될 수 있는 기질 및 배지를 생성하는데 임의 및 모든 가용성 및 불용성 성분 및 그의 조합물의 사용에 대해 기술하고 교시한다. 많은 이들 성분이 이하에 논의될 것이지만, 명확성을 위해, 라미닌, 타입 IV 콜라겐 및/또는 타입 III 콜라겐이 배아 조직 또는 줄기 세포 장소에서 발견되거나 이에 매우 풍부한 일부 세포외 매트릭스 성분을 단지 나타낼 목적으로 예시될 것이다.

[0042] 배아 매트릭스 성분에는 콜라겐 타입 IV(추가로 α1, α2, α3, α4, α5, α6 포함) 및 콜라겐 타입 III; 라미닌(1, γ1, β2, α3, α5 포함); 히알루로난; 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 형(PGs) 또는 그의 글리코사미노글리칸 사슬; 및 헤파란 설페이트-PGs 형 또는 그의 글리코사미노글리칸 사슬(예: 특정 신데칸)을 포함한 특정 타입의 콜라겐이 포함되나 이들에만 한정되지 않는다. 성숙 조직에서 발견되는 매트릭스 성분에는 콜라겐의 안정형(예: 타입 I 및 II), 피브로넥틴 형; 헤파란 설페이트-PGs(예: 아그린, 퍼레칸), 헤파린-PGs; 데르마탄-PGs(예: 연골-관련- 데르마탄 설페이트-PG); 및 엘라스틴이 포함되나 이들에만 한정되지 않는다.

[0043] 불용성 인자 외에, 가용성 성장 및/또는 분화 인자가 세포 증식 및/또는 분화율에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 혈청의 첨가로 간 전구세포의 성장을 지연시킬 수 있고, 간세포 과정으로의 계통 제한을 야기할 수 있으며, 동시에 반흔 조직 형성과 관련한 중간엽 세포군(기질 및 내피)의 신속한 확장을 야기할 수 있다. 표피 성

장 인자의 첨가로 간세포 과정으로의 계통 제한에 이르게 할 수 있다.

[0044] 바람직하게, 특정 구체예에 있어서, 본 원에 기술된 매트릭스 성분은 무혈청 배지와 함께 사용된다. HpSCs 및 간모세포를 위한 무혈청 배지가 이미 개발되었으며, 그의 전체내용이 본 원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 제09/678,953호에 개시되었다.

[0045] 본 발명자들은 인터류킨-11(IL-11) 및 백혈병 저해 인자(LIF)가 STO 공급자 상부상에서 래트 간 전구(rter6) 세포의 콜로니 형성을 촉진한다는 것을 발견하였다. IL-11 및 LIF는 둘 다 IL-6 사이토킨 슈퍼패밀리 일원이기 때문에, 이러한 발견으로 IL-6 사이토킨 패밀리가 시험관내 간 전구 세포의 성장을 촉진한다는 개념이 힘을 얻고 있다. EGF는 래트 간모세포의 콜로니 형성을 감소시켰으나, 이배체 성인 래트 간세포의 콜로니 형성을 증가시켰으며, 간세포로 계통 제한시켰고, 담관 상피를 저해하였다. 또한, TGF-b1은 STO 공급자상에서 증식되는 경우, 콜로니 수 및 rter6 세포 영역을 증가시켰으나, 플라스틱상에서 HepG2 세포 성장을 저해하였다.

[0046] hHpSCs 및 STO 공급자 세포의 공배양에 따라, 대다수 염증 시그널 및 간 성장을 자극하는 것으로 알려진 일부 인자를 포함하는 인간 및 마우스 사이토킨이 고수준으로 유도되었다. 인터류킨-4(IL-4)는 공배양시 현저히 상승되는 염증성 사이토킨중 하나이다. 이들 및 다른 가용성 인자가 본 원에서 더욱 상세히 논의되었다.

[0047] 이론적인 결부없이, 본 발명의 매트릭스 성분 및 가용성 성분은 일반적으로 공급자 세포에 의해 제공되는 생존, 증식 및/또는 분화 시그널을 상당히 제공하는 것으로 판단된다. 따라서, 본 발명은 간 전구세포의 생육성 및 확장 가능성 유지를 위해 배아 간질 공급자 세포에 필요한 것을 상당 부분 대체할 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명의 구체예가 비한정적인 실시예로 기술될 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] 쿠보타 배지(KM: Kubota's Medium)

[0051] 모든 배양은 간 전구세포에 적합시킨 무혈청 배지(달리 언급이 없는 한)인 KM에서 이루어졌다. 배지는 예를 들어 2000년 10월 3일자 출원된 일련번호 제09/679,663호의 미국 특허 출원에 기술되어 있으며, 그의 개시는 원용에 의해 그 전체 내용이 본 명세서에 포함된다.

[0052] 세포주의 공급원

[0053] hMSC는 26세 남성 공여자로부터 수득하였다. hUVEC는 Cam Patterson 박사(University of North Carolina; Chapel Hill, NC)로부터 입수하였다. 쥐과 배아 간질세포(STO 세포)의 클론은, ATCC에서 입수한 STO 세포로부터 준비하였다.

[0054] 인간 간 조직의 공급원

[0055] 임신주수 16-20주의 인간 태아 간은 어드밴스트 바이올로지컬 리소시스(Advanced Biological Resources)(ABR, San Francisco, California)로부터 입수하였다.

[0056] hHpSC의 분리 및 배양

[0057] 상기 문헌에 언급된 바와 같이 인간 태아 간을 처리하였다. 새로 분리한 실질세포(parenchymal cell)를 KM 및 배양 플라스틱(culture plastic) 또는 hUVEC, hMSC, STO 세포, 또는 인간 태아 간-유래 세포 초대 배양의 프리-플레이티드 공급자(pre-plated feeder) 상에 5,000 세포/$cm^2$의 평판배양 밀도로 두었다. 세포를 KM 및 2% FBS 내에 밤새 두었다가 KM으로 전환하였다. 플라스틱 상의 KM 내 배양에서 활성화되지 않은 hHpSTC 전구체 및 혈관모세포(angioblast)로 둘러싸인 hHpSC의 콜로니가 생성되었다.

[0058] 공급자의 준비

[0059] 중간엽 공급자(mesenchymal feeder)의 모든 스톡은 2% FBS가 들어있는 내피 성장 배지(EGM-2: Endothelial

Growth Medium)(Cambrex, Walkersville, MD) 내에서 배양 플라스틱 상에 배양하였다. 상기 조건의 예외는 hMSC 및 성체 간-유래 HpSTC로서, 이들은 하기와 같이 성장시켰다. 모든 세포를 포화상태에 이르도록 성장시켜, 마이토마이신-C로 성장을 정지시킨 후, hHpSC와의 공동배양에 사용하기 위해 KM으로 전환하였다. 추가로 상술하면 하기와 같다:

[0060] ● DMEM 및 1% 항생제, 아스코르브산, 2 mM L-글루타민 및 10% FBS가 들어있는 조직배양 접시에 hMSC를 평판배양하였다.

[0061] ● 성체 래트 및 성체 인간 간으로부터의 HpSTC 정제물은 YiWei Rong 박사에 의해 준비되었다. 공급자의 스톡은 KM + 5% FBS 내에서 플라스틱 상에 배양하였다.

[0062] ● ATCC로부터 입수한 STO 세포로부터 STO5 공급자를 클로닝하여 설치류 간 전구세포에 대한 그의 효능을 시험하였다. STO5의 냉동 스톡을 해동하여 5% 우태아 혈청이 첨가된 KM 내에서 성장시켰다.

[0063] ● 인간 태아 간-유래 중간엽 세포의 초대 배양을 준비하기 위하여, 0.45 mg/ml 콜라게나제 유형 IV 및 0.3 mg/ml 데옥시뉴클레아제를 사용하여 간을 효소적으로 분해한 후 크로스 스칼펠(cross scalpel)에 의해 기계적으로 해리시켜 단일 세포 현탁액을 만들었다. 과량의 효소를 세척해낸 후, 세포에 5분간의 저속 원심분리(20 X g)를 3회 실행하였다. 상등액을 수집하여 셀레늄($10^{-9}$M), 1% 항생제 및 0.1% BSA가 첨가된 RPMI-1640에 재현탁하였다. 이어서 10% FBS로 보충된 KM 내에서 배양 플라스틱 상에 세포를 평판배양하였다. 중간엽 세포는 수분 내지 수시간 내에 부착되어, 높은 수준의 데스민, CD146 및 αSMA를 보유함으로써 인식될 수 있는 활성화된 hHpSTC를 포함하는 간질 공급자로 신속하게 이행하였다.

[0064] ● 단클론성 항-인간 KDR 마우스 IgG1(Cell Sciences, Canton, MA), 자성 마이크로비드에 결합된 염소 항-마우스 IgG를 사용하거나 자성 마이크로비드에 접합된 단클론성 항-인간 CD31 마우스 IgG1을 사용하는 자성활성 세포 분류기(MACS: magnetically activated cell sorting) 시스템으로 태아 간 세포 현탁액으로부터 KDR+ 또는 CD31+ 세포를 분리하였다. $KDR^+$ 및 $CD31^+$ 세포의 평판배양 밀도는 20,000 cells/$cm^2$였다.

[0065] ● 제조자 지침(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)에 따라 자성 마이크로비드에 접합된 단클론성 항-인간 섬유모세포 마우스 IgG2a를 사용하여 섬유모세포를 음성 선택(negative selection)함으로써 간질세포가 고갈된 공급자를 준비하였다. 섬유모세포-고갈 상등액 세포에 대한 평판배양 밀도는 500,000 cells/$cm^2$였다.

[0066] 정제 매트릭스 기층(Matrix Substrata)

[0067] 시험관내 배양을 위한 매트릭스 기층의 준비는 2006년 11월 15일자 출원된 일련번호 제11/560,049호의 미국 특허 출원에 기술되어 있으며, 그의 개시는 원용에 의해 그 전체 내용이 본 명세서에 포함된다.

[0068] 피브로넥틴: 피브로넥틴(Sigma, F0895)을 0.5, 1.0 또는 2 $\mu g/cm^2$의 농도로 접시 위에 코팅한 후 pH 7.4로 중화시켰다.

[0069] 라미닌: 라미닌(Sigma, L2020)을 pH 7.4에서 0.52 또는 1.0 $\mu g/cm^2$의 농도로 접시 위에 코팅하였다.

[0070] 콜라겐 유형 III 및 IV: 5가지의 상이한 단백질 농도(2.1, 4.2, 6.3, 8.3 및 10.4 $\mu g/cm^2$) 중 하나의 농도로 콜라겐 코팅을 접시 위에 준비하였다. 매트릭스 구성성분을 산성 완충액 내에서 접시에 첨가하였다. 37 ℃ 및 5% $CO_2$에서 10 시간에 걸쳐 매트릭스가 부착되도록 하였다. 10 시간 후에 접시를 2 시간 동안 UV 조사로 멸균한 후 PBS로 3X 세척하였다. 콜라겐 III(Sigma, C-3511)는 pH 3 아세트산으로 형성시켰고 콜라겐 IV(Sigma, C-5533)는 0.5M 아세트산으로 형성시켰다.

[0071] 콜라겐, 유형 I: 고유 비율(specific ratio)의 10x DMEM 및 0.1M NaOH를 첨가함으로써 비트로겐 100(Cohesion Technologies, Palo Alto, CA)을 액체 콜라겐 유형-I으로 개질하였다. 기포가 겔을 불안정하게 할 수 있으므로, 기포의 형성을 방지하였다. 세포의 단일층 또는 2개 층의 콜라겐 사이에 세포를 포매하기 위한 "샌드위치"로서, 콜라겐 I을 사용하였다.

[0072] 콜라겐 I 상의 세포 단일층: 액체 콜라겐 I을 4 ℃에서 유지한 후, 6-웰 플레이트의 각 웰에 0.4 ml씩 분주하였다. 코팅한 후에, 콜라겐을 37 ℃ 및 5% $CO_2$ 에서 1 시간 동안 겔화시켰다.

[0073] 샌드위치(포매된 세포) 모델: 콜라겐 층 사이에 세포를 샌드위치 시켰다. 10 시간의 세포 부착 기간 후에, 미부착 세포를 제거하고, 콜라겐 I의 2 번째 0.4 ml 층을 첨가하였다. 시스템을 37℃ 및 5% $CO_2$에서 1 시간 동안 겔화시켜 상단 콜라겐 층을 고형화하였다.

[0074] 인간 간 전구세포 및 인간 태아 간-유래 공급자 세포에 대한 면역조직화학

[0075] 배양한지 1-2주 후, 면역 염색을 위해 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 사용된 항체는 다음과 같다: FITC-접합 항-인간 vWF 양 IgG(US Biologicals, Swampscott, MA), PE-접합 항-인간 CD56(NCAM) 마우스 IgG1, 항-인간 CD31 마우스 IgG1, PE-접합 항-인간 CD54 (ICAM-1) 마우스 IgG1(BD, San Jose, CA), 항-인간 αSMA 마우스 IgG2a, 항-인간 유형 I 콜라겐 마우스 IgG1, 항-인간 유형 III 콜라겐 마우스 IgG1, 항-인간 라미닌 마우스 IgG1, 항-콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 마우스 IgM(Sigma, St. Louis, MO), 항-인간 피브로넥틴 마우스 IgG1(Oncogene Research Products, Cambridge, MA), 토끼 항-인간 유형 IV 콜라겐 IgG(Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ), 래트 항-인간 펄레칸 IgG2a(Lab Vision, Fremont, CA), 토끼 항-인간 AFP IgG(Zymed-Invitrogen, South San Francisco, CA), 항-인간 KDR 마우스 IgG1(Cell Sciences, Canton, MA), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 염소 항-토끼 IgG, 알렉사 플루오르 568 염소 항-토끼 IgG, 알렉사 플루오르 568 염소 항-마우스 IgG1 및 알렉사 플루오르 488 염소 항-마우스 IgG2a(Molecular Probes-Invitrogen, Eugene, OR).

[0076] 정량적 실-시간 PCR

[0077] RNeasy® Mini(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 그 후, SuperScript® II RT(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 추출된 RNA를 cDNA로 역-전사하였다. 하기 표 3에 나타낸 서열 특이적 프라이머 및 탐침을 사용하여 실-시간 정량적 PCR을 수행하고, ABI 프리즘 7000 서열 검출 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 분석하였다. 각 세포 유형으로부터의 리보솜 RNA(18S)를 내부 대조군으로 사용하였다. 18S에 대해 상대적인 mRNA 발현 수준을 결정하고 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 사용하여 폴드 변화를 계산하였다. 사용된 프라이머를 하기에 표로 나타내었다:

표 3

[0078]

| PCR 프라이머 | |
|---|---|
| 유전자 | ABI 에세이 번호 |
| 리보솜 RNA(18S) | 4308329 |
| 유형 I 콜라겐-α1 쇄(Col1A1) | Hs00164004_m1 |
| 유형 III 콜라겐-α1 쇄(COL3A1) | Hs00164103_m1 |
| 유형 IV 콜라겐-α1 쇄(Col4A1) | Hs00266237_m1 |
| 유형 V 콜라겐-α1 쇄(COL5A1) | Hs006090088_m1 |
| 피브로넥틴 모듈 1(FN1) | Hs01549972_m1 |
| 라미닌-α2 쇄(LAMA2) | Hs00166308_m1 |
| 라미닌-α4 쇄(LAMA4) | Hs00158588_m1 |
| 라미닌-α5 쇄(LAMA5) | Hs00245699_m1 |
| 라미닌-β1 쇄(LAMB1) | Hs00158620_m1 |
| 라미닌-γ1 쇄(LAMC1) | Hs00267056_m1 |
| 신데칸-1(SDC1) | Hs00174579_m1 |
| 신데칸-2(SDC2) | Hs00299807_m1 |
| 글리피칸-3(GPC3) | Hs00170471_m1 |
| 글리피칸-5(GPC5) | Hs00270114_m1 |

[0079] hHpSC에 대한 "네이티브" 공급자 세포

[0080] 새로 분리된 hHpSC는 세포가 혈관모세포(VEGFR2+, CD31+, CD133/1+, CD117+) 및 휴지 hHpSTC(CD146-low,

desmin and αSMA)의 존재하에 있을 때 KM 내의 조직 배양 플라스틱 상에서 생체외 생존하였다(**도 1-3**). hHpSC의 콜로니는 그들의 측면 경계 상에 상호 단단하게 결합되어 있으나 배양 접시 자체에는 최소한으로 부착되어 있는 세포로 구성되어 있다. 그러나, 콜로니의 주위, 즉, 혈관모세포가 위치한 부위에서는 hHpSC가 접시에 부착되어 있다. 따라서 부착은 중간엽 동반 세포(예를 들어, 혈관모세포) 단독에 의해 또는 hHpSC와의 조합에 의해 이루어졌다.

[0081] —

[0082] "네이티브" 공급자를 모델화하기 위해 사용된 공급자 세포주 및 공급자 초대 세포

[0083] 배아 중간엽 세포의 몇 가지 형태, 초대 배양 또는 세포주를 "네이티브" 공급자(예를 들어, 혈관모세포 및 HpSTC)의 모델로서 준비하였다. hHpSC를 KM 내에서 이들 공급자 세포 상에 배양하였다. hHpSC의 자발적인 분화를 피하기 위해서는 혈청에의 노출을 최소화함이 필수적이지만, 중간엽 공급자의 생존을 위해서는 혈청으로부터의 인자들이 필요하다. 이러한 기술적 장애를 극복하기 위해, 공급자 및 hHpSC의 공동배양을 요하는 에세이에 있어서, 본 발명자들은 KM과 같은 무혈청 배지로 전환하기 전에 2% 혈청으로 보충된 EGM-2와 같은 배지에서 중간엽 공급자의 스톡을 성장시켰다.

[0084] 무혈청 배지 내에 유지할 때(**도 1-3**), hHpSTC는 휴지상태로서 낮은 수준의 CD146, 데스민 및 αSMA를 발현하는 것으로 나타났다. 그러나 낮은(1-2%) 수준 또는 5일 동안이라도 혈청에 노출되면, 높은 수준의 CD146, 데스민 및 αSMA에 의해 입증되는 바와 같이(도 4) hHpSTC의 활성화가 유발되었다. 혈청에 대한 노출은 또한 태아 간 세포의 초대 배양 또는 면역선택된 세포(즉, 하기 논의하는 KDR+ 또는 CD31+ 세포)가 hHpSTC로 분화하도록 유도하였다.

[0085] 시험한 공급자 세포주는 다음과 같다: hMSC(**도 5A**), hUVEC(**도 5B**), 및 배양 중에 ES 세포를 유지하기 위해 종종 사용되는 쥐과 배아 간질세포(STO). 초대 배양은 16-20주 인간 태아 간의 세포 현탁액으로부터 면역선택에 의해 준비되었다. KDR(a.k.a. flk-1/VEGFR2) 또는 CD31(a.k.a. PECAM)을 발현하는 세포, 또는 섬유모세포에 대한 음성 분류에서 잔류함으로써 간질세포를 감소시키거나 제거하는 세포를 MACS로 선택하였다. 전체 간은 각각 0.5% 및 1%의 KDR+ 및 CD31+ 세포를 포함한다. 이들 면역선택된 세포 집단을 EGM-2 배지 내에 배양하였다.

[0086] 면역선택된 KDR+ 세포는 배양 중에 신속하게 변화하였다. 제1주에, 세포들은 형태학적 및 항원적으로 혈관모세포 또는 내피세포로 나타났다(**도 3D**). 그러나 제2주까지는 HpSTC가 배양을 지배하였다. 사실상, 제11일에 배양이 포화되었으며, 대부분의 세포는 hHpSTC의 표지자인 αSMA에 대해 양성이었고, 내피세포의 세포내 표지자인 vWF에 대해 음성이었다(**도 5F 및 H 및 6I 및 K**). 평판배양에 앞서 간질을 제거하기 위해 세포 현탁액을 음성 분획화하였을 때에도 동일한 현상이 관찰되었다(**도 5C-E 및 G**).

[0087] CD31+ 세포는 최초 5일 동안 배양 중에 형태학상 조약돌형 세포(cobblestone-like cell)로 나타났으며 vWF 양성을 나타냄으로써, 이들 세포가 내피세포임을 시사하였다. 그러나 5-7일의 배양 후에는, 간별세포(hepatic stellate cell)(αSMA 및 데스민을 강하게 발현)가 접시를 지배하여 9-10일까지는 신속하게 포화상태에 달하였다. 이 결과는 EGM-2가 비록 내피세포를 위해 특이적으로 설계되었지만 hHpSTC의 증식을 허용함을 입증한다.

[0088]

[0089] 혈관모세포 또는 hUVEC의 공급자 상의 hHpSC는 줄기세포로서 잔류한다

[0090] 혈관모세포 및 휴지 HpSTC와 밀접하게 연계되어 있던 KM 내의 배양 플라스틱 상에서 hHpSC를 분리하여 클론원성 확장(clonogenic expansion)하면, 분화는 최소화되고 세포가 hHpSC로서 잔류하였다(**도 3**). 평판배양으로부터 2주 후에 hHpSC 콜로니를 관찰할 수 있었으며, 이들은 NCAM, EpCAM, 알부민, CK19 및 CLDN-3에 대해 양성이고 AFP에 대해 음성이었다. 분류 직후에 KM 내에서 hUVEC 또는 KDR+ 공급자 세포 상에 배양된 hHpSC 또한 EpCAM+, NCAM+, ICAM-1-, AFP-, CLDN-3+의 항원성 프로파일을 동반하는 hHpSC 줄기세포로 유지되었다(**도 7B**).

[0091] 활성화된 간별세포 계통의 공급자 상에 배양된 hHpSC는 간모세포에 제한된다

[0092] 활성화된 hHpSTC 상에 hHpSC를 배양하면 hHpSC가 수시간 이내에 간모세포로 신속하게 이행하였다(**도 4**). hMSC; 초대 인간 태아 간 간질세포; 섬유모세포가 고갈된 초대 인간 태아 간 간질세포; 초대 KDR+ 세포; 또는 초대 CD31+ 세포 상에 배양된 hHpSC 세포 또한 배양 중에 1주를 초과한 후에 간모세포로 이행하였다. 임의의 상기 공급자와 함께 공동 배양 8-9일 후에 간 전구세포 콜로니 형태는 쓸개 모세관(biliary canaliculi)으로 추정되는

투명 통로가 산재해 있는 코드-형 구조로 구성되었으며(**도 7 및 8**), 간모세포를 시사하는 항원성 프로파일(EpCAM+, NCAM-, ICAM-1+, AFP+)을 동반하였다(**도 1**). 더욱이, 간모세포 콜로니의 형태가 더욱 3차원적임으로 인해 명시야(bright field)에 의해 평가할 경우 굴절반사성(refractile)이 유발되며(**도 7 및 8**), 이는 세포의 다중층 및/또는 세포외 매트릭스의 축적에 기인할 가능성이 높다.

[0093] STO 공급자 상에 평판배양된 hHpSC

[0094] 최대의 분화를 유발하는 공급자 모델 시스템은 STO 공급자인 것으로 입증되었다. 이들 공급자 상에 hHpSC를 평판배양하면 성장이 현저하게 느려진 후 콜로니의 가장자리로부터 간모세포 및 수임 전구세포(committed progenitor)가 발생하였다.

[0095] 공급자에 의한 매트릭스 분자의 유전자 발현

[0096] hHpSC 표현형(hUVEC 세포)을 유지하거나; 간모세포(인간 태아 간 중간엽 세포 및 CD31+ 세포의 초대 배양)로의 분화를 유발하거나; 간세포 경로를 따라 더욱 진행된 분화(1주를 초과하여 배양된 태아 간-유래 내피세포로서, hHpSTC가 우세한 세포 집단인 시점에서 양자 모두 에세이함)를 유발하는 공급자를 대표하도록 3개의 공급자 세포 유형을 선택하였다. 실시간 PCR을 사용하여, 에세이된 3개 공급자 중에서 피브로넥틴 분자의 유형 I 모듈을 암호화하는 피브로넥틴 mRNA가 특히 hUVEC에서 가장 많이 발현되는 매트릭스 구성성분임을 발견하였다(**도 9**). hHpSC 표현형의 유지를 지원하는 hUVEC 공급자는 콜라겐 유형 IV, 라미닌(α4, β1 및 γ1 쇄)를 생산하였으며, 콜라겐 유형 I 및 III, 상기 언급한 것들과는 다른 라미닌 쇄 동형, 또는 프로테오글리칸 코어 단백질은 거의 또는 전혀 생산하지 않았다. 간모세포(인간 태아 간-유래 αSMA + 섬유모세포-유사 및 CD31+ 세포)에 대한 계통 제한을 유도한 것들은 유형 I, III 및 IV 콜라겐 , 라미닌(β1, γ1)을 생산하였고, 콜라겐 유형 V, 다른 라미닌 쇄 또는 에세이한 프로테오글리칸 코어 단백질 유전자(글리피칸-3 및 -5 및 신데칸-1 및 -2) 중의 어느 것도 생산하지 않았다.

[0097]

[0098] 공급자에 의한 매트릭스 분자의 단백질 발현

[0099] 하기의 7개 상이한 매트릭스 분자에 대해 공급자 상에서 면역조직화학(IHC: Immunohistochemistry)을 수행하였다: 유형 I, III 및 IV 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴, 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HS-PG)(즉, 펄레칸 및 신데칸) 및 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(CS-PG). 모든 공급자가 세포외 매트릭스 분자의 혼합물을 생산하였으나, 총 매트릭스 분자 생산의 최저 수준은 혈관모세포/내피세포의 초대 배양에서 발견되었으며; 그 다음은 hHpSTC가 배양 선별되었던 hUVEC 세포주 또는 초대 배양이었다. 매트릭스 분자의 최고 수준은 STO 세포에 의해 생산되었다. 기저 유착 분자(basal adhesion molecule)인 피브로넥틴은 모든 공급자에서 발견되었으며 STO 세포에서 최고 수준이었다. 흥미롭게도, 콜라겐 유형 III은 STO 세포에서만 발현되는 것으로 나타났으나, RT-PCR에 의해서는 다른 공급자에서도 발견되었다.

[0100] 이론에 구애받지 않으면서, 인테그린 α4 및 β6, 유형 IV 콜라겐, CS-PG와 함께 라미닌의 형태를 함유하고 HS-PG가 없는 세포외 매트릭스 상에서 배양할 때 hHpSC는 그의 표현형을 유지한다. 간모세포로의 계통 제한을 유도하는 매트릭스는 상승된 수준의 유형 I, III 및 IV 콜라겐, 라미닌(α4가 없고 β1 동형이 증가하지 않은), CS-PG를 가지고 있고 HS-PG가 없다. 최종적으로, 가장 현저한 분화(즉, 간모세포 단계를 넘어서는)를 유도하는 매트릭스도 언급된 매트릭스 구성성분 모두를 가지고 있으나 그 수준은 다른 공급자에서 관찰되는 것보다 높다. 그러나 이들 매트릭스는 HS-PGS를 함유한다는 점에서 독특하다(**도 11**).

[0101]

[0102] hHpSC 대 간모세포에 대한 정제 매트릭스 분자의 효과

[0103] KM 내에서 하기와 같이 플라스틱 접시 위에 코팅된 각각의 5개 유형의 매트릭스 구성성분 상에 hHpSC를 배양하였다: 피브로넥틴, 라미닌 및 유형 I, III 또는 IV 콜라겐. 피브로넥틴에는 hHpSC 세포가 거의 부착되지 않았고, 부착된 것들도 성장하지 않았다. 라미닌 및/또는 유형 IV 콜라겐 상에 배양되거나 유형 I 콜라겐 겔의 표면 상에 평판배양될 경우에 hHpSC는 간모세포에 계통 제한되었다(**도 10**). 유형 I 콜라겐 내에 포매될 경우, hHpSC는 가장 잘 분화되었으며 성숙한 간세포를 닮은 콜로니 형태 및 항원성 프로파일을 동반하였다.

[0104] 문맥주위부(periportal zone) 및 간장의 줄기세포 니치(niche) 내의 매트릭스 구성성분은 성숙한 실질세포와 관련하여 발견되는 것들과는 구별되며 정제된 인간 간 줄기/전구세포의 부차집단(subpopulation)으로부터 뚜렷한 생물학적 반응을 도출한다. 이러한 상이점은 세포 반응을 개질하고 동적 발현을 활성화하는 다양한 신호를 제공할 가능성이 있다. 세포외 매트릭스 구성성분의 별개 분류가 어떻게 생체내 및 시험관내 세포 활성을 유도하는지를 결정함으로써, 질환 조직의 대체(replacement) 또는 재증식(repopulation)을 위해 HpSC 집단을 확장 및 분화시키는 미세환경을 시험관내에 재현할 수 있다.

[0105] 매트릭스 단백질에 부가하여, 공급자 세포는 HpSC 생존, 증식, 및/또는 분화에 있어서 필수적인 가용성 인자(예를 들어 사이토킨, 성장 인자)를 제공하는 것으로 보인다. 관련 인자의 비한정적인 예는 하기와 같다:

[0106]

| | |
|---|---|
| 에오탁신(인간 및 마우스) | 에오탁신: 인간에서 CCL11 유전자에 의해 암호화되며(마우스에서는 Ccl11), 알러지항원의 존재 하에 호산구를 유인하는 것으로 알려졌다. |
| G-CSF(마우스) | 과립구 콜로니 자극 인자. 마우스 유전자 csf3에 의해 암호화되며, 이 208 aa 단백질의 발현은 과립구, 대식세포, 호산구 및 적혈구 계통으로부터 조혈전구세포의 성장 및 분화를 자극하는 것으로 알려졌다. |
| GM-CSF(인간 및 마우스) | 과립구-대식세포 콜로니-자극. 인간에서 CSF2 유전자에 의해 암호화되고(마우스에서는 csf2), 이 단백질은 과립구 및 대식세포의 전구체의 성장 및 발생에 있어서 필수적이며, 골수모세포(myeloblast) 및 단핵구모세포(monoblast)의 비가역적 분화를 촉발한다. |
| HGF(인간) | 간세포 성장인자. 인간 유전자 HGF(728 aa 전구체를 발생시킴)에 의해 암호화되는 HGF는 광범위한 조직 및 세포에 대한 성장인자이다. HGF는 간 줄기세포의 성숙에 관련된다. |
| IFN-γ(인간 및 마우스) | 인터페론 감마. 인간 유전자 IFNG (마우스 Ifng)에 의해 암호화되는 IFN-γ는 이량체 단백질로서 6개의 천연적인 변종 형태를 포함한다. 그의 면역조절활성에 부가하여, IFN-γ는 T-림프구에 대한 성장-촉진 인자이고 IL-4 유도성 B-세포, 평활근 세포 및 내피세포에 대한 성장 저해제이다.<br>근육섬유모세포(myofibroblast), 섬유모세포 성장인자 및 PDGF에 의해 매개되는 모세혈관 성장의 저해제로서 기능한다. |
| KC(마우스) | 케라티노사이트 화학유인물질(Keratinocyte Chemoattractant). KC의 새로운 표기는 CXCL1이며 유전자 기호는 Cxcl1이다. KC는 호중구의 화학주성 및 세포 활성화에 관여한다. 시험관내에서 조혈전구세포 증식을 저해한다. 골수 간질세포로부터 천연적인 N-말단 삭제 형태(4개 아미노산)를 분리할 수 있다. 이 인자는 다른 콜로니 자극 인자의 존재 하에 과립구-대식세포 콜로니 형성 단위의 형성을 증강한다. 전체-길이 KC에 비해, 단축된 인자는 GM.CFU에 대한 상승적 성장 자극제로서 약 1000만배 더 강력하다. |
| IL-1Ra (인간) | 인터류킨 1 수용체 길항제. IL1RA 유전자에 의해 암호화된다. 152 aa 분비성 단백질 및 177 세포내 형태는 IL-1 수용체에 결합함으로써 IL-1에 길항작용한다. |
| IL-1α(인간) | 인터류킨 1알파. 유전자 IL1A에 의해 암호화되는 271aa 전구체가 고도로 조절되는 기전에 의해 가공되어 159 aa 분비성 단백질이 된다. 다른 사이토킨과 조합된 IL1은 섬유모세포, 윤활세포(synovial cell), 연골세포(chondrocyte), 내피세포, 간세포, 및 파골세포에서 염증 반응의 중요한 매개자이다. IL1은 B-세포에 직접 작용하여 그들의 증식을 촉진할 뿐 아니라 섬유모세포, 흉선세포 및 교모세포종(glioblastoma) 세포의 증식도 촉진한다. IL1은 생체내에서 내피세포의 성장을 저해한다. 혈관 평활근 세포 및 피부 섬유모세포에서 IL1은 이들 세포에 대한 마이토젠인 bFGF의 합성을 유도한다. |
| IL-1β(인간 및 마우스) | 인터류킨 1 베타. 인간 유전자 IL1B(마우스 유전자 Il1b)에 의해 암호화된다. IL1-베타의 활성은 IL1알파와 유사하다. |
| IL-2(인간 및 마우스) | 인터류킨 2. 인간 유전자 IL2 및 마우스 유전자 Il2에 의해 암호화되는 이 단백질은 T 세포의 클론성 확장을 유도한다. |
| IL-4(인간 및 마우스) | 인간 유전자 IL4 및 마우스 유전자 Il4에 의해 암호화되는 인터류킨 4는 활성화된 B 세포의 증식 및 분화를 촉진하며 과립구 및 적혈구 전구세포 콜로니 생성에 있어서 Epo 및 G-CSF와 상승작용하는 것으로 알려졌다. IL4-델타2로 표기되는 자연적인 스플라이스(splice) 변종이 길항제로 작용한다. |
| IL-5(인간 및 마우스) | 인터류킨 5. 인간 유전자 IL5 및 마우스 유전자 Il5에 의해 암호화되는 이 단백질은 호산구의 성장 및 분화와 더불어 미숙 조혈전구세포의 증식 및 미숙 B 세포의 증식 및 분화를 자극하는 특이적 조혈 인자이다. |

| | |
|---|---|
| IL-6(인간 및 마우스) | 인간 유전자 IL6, 마우스 유전자 il6에 의해 암호화되는 인터류킨 6. 이 단백질은 특이적 선천 면역반응을 자극한다. 이는 간세포에서 급성기 단백질(acute phase protein)의 발현을 활성화시킨다. IL6 및 IL3이 상승작용하여 다능성(multipotent) 조혈전구세포의 증식을 촉진한다. IL6은 생체내 B-세포 분화 인자이며 T-세포에 대한 활성화 인자이다. IL6는 쥐과 포배(blastocyst)에서 초기에 발현되며, 이는 그것이 영양막(trophoblast) 또는 베아 줄기세포의 성장 및 발생을 조절할 수 있음을 시사한다. |
| IL-8(인간) | 인터류킨 8. IL8 유전자에 의해 암호화되는 이 단백질은 몇 가지 변종 형태(69 aa 내지 77 aa)로 발견된다. 화학주성 활성에 부가하여 IL8은 표피 세포에 대한 마이토젠이다. 상처 회복과 같은 생리학적 상황에서 대식세포-유래 IL8은 혈관신생을 지원한다. |
| IL-10(인간 및 마우스) | 인간 IL10 유전자(1110 마우스 유전자)에 의해 암호화되는 이 사이토킨은 CD8 세포독성 세포의 화학유인물질이며 몇 가지 사이토킨의 발현의 하향조절자이다. |
| IL-11(인간 및 마우스) | 인간 유전자 IL11(마우스 유전자 1111)에 의해 암호화되는 인터류킨 11은, 면역 반응을 촉진함과 더불어 몇 가지 다계통 조혈 전구세포를 자극하고 지방세포 전구체의 분화를 저해하며 간세포에서 급성기 단백질의 합성을 유도한다. |
| IL-12(인간 및 마우스) | 인터류킨 12. 인간 유전자 IL12A 및 IL12B(마우스 유전자 1112a 및 1112b)에 의해 암호화되는 이형이량체 단백질로서, 림프구의 증식을 자극하고 몇 가지 인자들과 상승작용하여 골수 전구세포의 골수혈구형성(myelopoiesis)을 촉진하는 것으로 알려졌다. |
| IL-13(인간) | 인터류킨 13. IL13에 의해 암호화되는 이 132 AA 단백질은 염증 반응을 약화시킨다. 또한, 단핵구의 분화를 유도하고 B 세포의 증식, 분화 및 동형전환(Isotype switching)을 조정하는 것으로 알려졌다. |
| LIX(마우스) | 지질다당류-유도성 CXC 케모카인, 인간 GCP2/ENA78의 92 aa 균등물로서, CLCX5로 개칭되었으며, clcx5 유전자에 의해 암호화된다. 박테리아성 LPS에 대한 반응으로 생산되는 단핵구 화학유인물질로 알려졌다. |
| MCP-1(인간 및 마우스) | 단핵구 화학주성 단백질 1. CCL2로 개명되었고, 인간 유전자 CCL2 및 마우스 Ccl2 유전자에 의해 암호화되며, 이 단백질은 단핵구에 대해 화학주성이고 호중구에 대해서는 그렇지 않다. 화학주성에 부가하여 MCP-1은 CHAK(CC-케모카인-활성화 살해 세포)로 알려진 살해 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있다.. |
| MCP-2(인간) | 단핵구 화학주성 단백질 2. CCL8로 개명되었고, 인간 유전자 CCL8에 의해 암호화되며, 이 화학주성 인자는 단핵구, 림프구, 호염기구 및 호산구를 유인한다. |
| MIP-1α(마우스) | 대식세포 염증 단백질 1a. Ccl3에 의해 암호화되는 이 92 aa 단백질은 섬유모세포에 의한 IL-1, IL-6 및 TNF의 합성을 유도하며, 조혈 전구세포의 성숙을 촉진함에 있어서 GM-CSF와 상승작용하는 반면에 조혈 줄기세포의 증식은 억제한다. |
| MIP-1β(인간) | 대식세포 염증 단백질 1베타. CCL4에 의해 암호화되는 이 92 aa 단백질은 염증 반응을 유도하며 조혈 전구세포의 성숙을 촉진한다. |
| MIP-2(마우스) | 대식세포 염증 단백질 2. Cxcl2 유전자에 의해 암호화되는 이 73 aa 단백질은 다형핵 림프구(polymorphonuclear lymphocyte)에 대해 화학주성이다. |
| RANTES | 정상적 T-세포 활성화에 의해 조절되어 발현 및 분비되며 CCL5라고도 지칭되는 이 케모카인은 T-세포, 호산구 및 호염기구에 대해 화학주성이다. 또한 살해 세포도 활성화 및 증식시킨다. |
| sTNFR2 | 분비성 종양괴사인자 수용체 2. 유전자 TNFRSF1B가 막 부착 439 aa 단백질을 암호화하며, 이는 절단되어 235aa가 되는 것으로 믿어진다. 수용체의 가용성 형태는 TNF알파를 저장 및 격리함으로써 TNF알파의 활성에 길항작용을 한다. |
| sTNFR1 | 유전자 TNFR1A에 의해 암호화되는 분비성 종양괴사인자 수용체 1으로서, TNF-α 수용체 1의 251 aa 가용성 형태는 TNF-α를 격리시킴으로써 길항작용을 하는 것으로 생각된다. |

[0107]

| | |
|---|---|
| TNF-α(인간 및 마우스) | 종양괴사인자 알파는 인간 유전자 TNFA 및 마우스 유전자 Tnfa에 의해 암호화된다. TNF-α는 광범위한 생물학적 활성을 나타낸다. 염증 과정에 참여하는 외에도, TNF는 생체내에서 혈관신생의 강력한 촉진자이며, 이는 IFN-감마에 의해 길항작용을 받는다. 이는 또한 정상적인 인간 이배체 섬유모세포, 성상아교세포(astroglial cell) 및 미세아교세포(microglial cell)에 대한 성장 인자이다. |

[0108]

[0109] 래트 간 전구세포(rter6) 및 인간 간모세포종 세포(HepG2) 콜로니 형성에 대한 중간엽 세포-순응화 배지의 영향

[0110] rter6는 플라스틱과 같은 불활성 기층 위에서나 세포외 매트릭스-코팅된 플레이트 위에서 효과적으로 콜로니를 생성하지 못하지만, STO 공급자 상에 평판배양하면 콜로니를 생산할 수 있다. 그러므로 STO 공급자에 의해 "순응화(conditioned)"된 배지에서 rter6 세포가 얼마나 잘 성장할 수 있는지를 결정하기 위해 실험을 수행하였다. "순응화" 배지를 생성시키기 위하여 공급자의 스톡(STO 세포 또는 인간 태아 폐 섬유모세포 세포주(MRC5))을 혈청-보충된 배지에서 포화될 때까지 성장시키고, 세척하여 혈청을 제거한 후, 무혈청의 KM으로 전환하였다. 추가의 48 시간 동안 무혈청 배지에서 세포가 성장하도록 하여 공급자에 의해 생산되는 인자들로 이를 "순응화"하였다. 이렇게 순응화된 배지를 실험에 사용하였다.

[0111] STO 공급자 세포 및 STO 순응화 배지와 10일 동안 공동배양한 rter6 세포의 콜로니 수는 KM에 비해 2.39-배 증가하였다(**표 4 및 5**). MRC5 공급자 세포 및 STO 순응화 배지와 10일 동안 공동배양하였을 경우, rter6 세포의 콜로니 수는 KM에 비해 1.57-배 증가하였다(**표 4 및 5**). 무혈청 HDM에서, MRC5 세포는 STO 공급자에 비해 더 많

은 rter6 세포 콜로니 형성을 촉진하는 것으로 나타났다. STO 순응화 배지에서는 2가지 공급자 상의 rter6 세포가 유사한 콜로니 형성 능력을 가지고 있었다.

표 4

[0112]

| STO 또는 MRC5 공급자 상에 배양된 rter6 세포의 콜로니 형성에 대한 STO 순응화-배지의 효과 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Rter6 접종 밀도(세포/$cm^2$) | | 100 | 200 | 400 | 콜로니 수의 평균 증가 배수: 2.39 |
| 평균 콜로니 수 | HDM | 7.25 | 15.25 | 27.25 | |
| | + STO-CM | 18 | 34.5 | 66 | |
| 증가 배수 | | 2.49 | 2.26 | 2.42 | |
| P-수치 | | 0.0065 | 0.0009 | 0.0003 | |

표 5

[0113]

| MRC5 공급자 상에 배양된 rter6 세포의 콜로니 형성에 대한 STO 순응화-배지의 효과 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Rter6 접종 밀도(세포/$cm^2$) | | 100 | 200 | 400 | 콜로니 수의 평균 증가 배수 1.57 |
| 평균 콜로니 수 | HDM | 14.75 | 23.5 | 42.5 | |
| | + STO-CM | 23 | 37.25 | 66.5 | |
| 증가 배수 | | 1.56 | 1.59 | 1.56 | |
| P-수치 | | | | | |

[0114] 인간 간모세포종(HepG2) 세포는 코팅되지 않은 조직 배양 프라스틱 상에서 콜로니를 형성할 수 있다. 4개의 상이한 공급자 세포 유형으로부터의 무혈청 순응화 배지를 사용하여 HepG2 세포의 콜로니 형성을 시험하였다: (1) STO 세포; (2) MRC5 세포; (3) 불멸화 성체 인간 간 성상세포(immortalized adult human hepatic stellate cell)(h-tert-HpSC); 및 (4) 초대 인간 태아 간-유래 간질세포. HDM에 비해 무혈청 STO-순응화 배지는 HepG2 세포의 콜로니 형성을 증가시킨 반면에, MRC5 세포, h-tert-HpSC 또는 초대 인간 태아 간-유래 간질세포에 의해 순응화된 무혈청 배지는 HepG2 세포 콜로니 형성을 저해하였다.

[0115] STO 세포, 인간 태아 간세포, 및 양자의 공동 배양으로부터의 순응화 배지에 대한 ELISA

[0116] STO 공급자, 인간 태아 간-유래 전구세포 및 양자의 공동 배양에 의해 순응화된 배양 배지 상에서 23개 인간 사이토킨, 17개 마우스 사이토킨 및 2개 비-종 특이적 사이토킨의 농도를 시험하였다. 인간 사이토킨에 있어서, 인간 태아 간-유래 전구세포 단독 배양에 비교할 때 가용성 인터류킨-1 수용체α(IL-1Rα), 인터류킨-1α(IL-1α), IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, 대식세포 화학유인물질 단백질-2(MCP-2), 에오탁신, 가용성 종양괴사인자 수용체-2(sTNF-R2), 및 정상적 T-세포 활성화에 의해 조절되어 발현되고 추정상 분비되는 것(RANTES)의 증가된 농도가 관찰되었다(**도 12, 표 6**). 공동 배양에서 농도가 감소한 사이토킨은 인터류킨-11(IL-11), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 대식세포 염증 단백질-1α(MIP-1α), MIP-1β, 가용성 TNF 수용체1 (sTNF-R1) 및 간세포 성장 인자(HGF) (**도 12, 표 6**)였다.

표 6

[0117]

| STO 세포 및 인간 태아 간 세포로부터의 순응화 배지의 ELISA 분석 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 마우스 사이토킨 | 농도(pg/ml) | | 인간 사이토킨 | 농도(pg/ml) | | |
| | STO | STO/hFLC 공동 배양 | | hFLCs | STO/hFLC 공동 배양 | |
| | | | | | 인간 사이토킨 | 인간 및 마우스 |
| TNF-α | 0 | 1.4 | TNF-α | 0 | 0.5 | 1.9 |
| IL-1β | 0 | 3 | IFN-γ | 0.8 | 2.5 | 23.4 |
| IL-12 | 0 | 11.3 | IL-10 | 1 | 4 | 62.8 |
| IL-2 | 7.7 | 12 | IL-1β | 3 | 4.8 | 7.8 |
| IFN-γ | 0 | 20.9 | IL-5 | 0 | 7.5 | 133.7 |
| GM-CSF | 5.8 | 35.3 | IL-12 | 1 | 8 | 19.3 |
| IL-11 | 0 | 46.2 | IL-2 | 0.8 | 10 | 22 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| IL-10 | 0 | 58.8 | GM-CSF | 73 | 11 | 46.3 |
| 에오탁신 | 33.96 | 68.3 | IL-13 | 0 | 16 | n/a |
| G-CSF | 2.6 | 118.7 | MCP-2 | 10 | 18 | n/a |
| IL-5 | 3.8 | 126.2 | IL-1α | 13.8 | 24.1 | n/a |
| MIP-2 | 0 | 182 | IL-4 | 5.2 | 34.3 | 317.8 |
| IL-6 | 28.2 | 192.3 | 에오탁신 | 15.5 | 34.4 | 102.7 |
| MIP-1α | 86.7 | 283.17 | IL-1Rα | 24 | 34.7 | n/a |
| IL-4 | 2.3 | 283.5 | IL-11 | 1221 | 43.1 | 89.3 |
| LIX | 299 | 499 | MIP-1β | 292 | 111 | n/a |
| KC | 800 | 794 | sTNFR2 | 66 | 166 | n/a |
| MCP-1 | 2095 | 2094 | IL-8 | 172 | 177 | 971 |
| | | | HGF | 399.9 | 253.8 | n/a |
| | | | sTNFR1 | 687 | 283 | n/a |
| | | | TGF-β1 | 136.3 | n/a | 287.8 |
| | | | IL-6 | 327 | 290 | 482.3 |
| | | | RANTES | 67 | 320 | n/a |
| | | | MIP-1α | 981 | 360 | 643.17 |
| | | | MCP-1 | 539 | 531 | 2625 |

[0118] 마우스 사이토킨에 있어서, STO 세포 단독 배양에 비교할 때 공동 배양에서는 인터류킨-2(IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 에오탁신, 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF), 대식세포 염증 단백질-1α(MIP-1α), 인터페론-γ(IFN-γ) 및 지질다당류-유도성 CXC 케모카인(LIX)의 증가된 농도가 관찰되었다(**도 13, 표 6**). 공동 배양에서 시험한 어떤 마우스 사이토킨에서도 농도의 유의적 감소는 없었다.

[0119] 비-종 특이적 사이토킨에 있어서, STO 세포 단독 배양(10.2 pg/ml) 및 인간 태아 간-유래 전구세포 단독 배양(22.3 pg/ml) 에 비교할 때 공동 배양에서는 전환성장인자-β1 (TGF-β1)가 증가하였다(532.3 pg/ml).

[0120] 인간 간 줄기세포를 STO 공급자 세포와 공동 배양하면 간모세포로 분화함이 발견되었다. 공동 배양에서 인간 및 마우스 사이토킨의 농도를 조합한 결과, 인간 태아 간 세포 단독 배양에 비교할 때 IL-4, IL-5, IL-10, CXC 케모카인(마우스 각질세포(keratinocyte)-유래 케모카인(KC) 및 인간 IL-8, 에오탁신, MCP-1 및 RANTES가 단백질 농도의 극적인 증가(≥5-배 및 > 50 pg/ml)를 보이는 것으로 밝혀졌다(**표 6**).

[0121] rter6 세포 및 HepG2 세포 콜로니 형성에 대한 가용성 사이토킨의 효과

[0122] 알려진 사이토킨 중에서 9개를 무혈청, 호르몬-정의된 배지(HDM: hormonally-defined medium)에 개별적으로 가하여 시험하였다. 배지에 부가하여 세포를 STO 공급자 층 상에서 성장시키고 10일 동안 인큐베이션 하였다. 백혈병 저해 인자(Leukemia inhibitory factor)(LIF, 0.5 ng/ml), 인터류킨-11(IL-11, 10 ng/ml), 및 전환성장인자-β1(TGF-β1, 0.05 ng/ml)이 rter6 세포의 콜로니 수 및 콜로니 면적을 대조군에 비해 증가시켰다(**도 14**). 인터류킨-6(IL-6), 인터류킨-13(IL-13), 간세포 성장 인자(HGF), 성장 관련 종양유전자-α(GRO-α), 대식세포 염증 단백질-1α(MIP-1α) 및 종양괴사인자-α(TNF-α)는 rter6 세포의 콜로니 형성에 관찰되는 효과를 미치지 않았다.

[0123] HDM 및 STO 순응화 배지에 몇 가지 사이토킨 및 후보 자극성 분자들도 개별적으로 첨가하여 HepG2 세포의 콜로니 형성에 대한 그들의 효과를 시험하였다. 하이드로코르티손은 HDM 및 STO 순응화 배지 양자 모두에서 콜로니 형성을 대조군에 비해 25% 증가시켰다. 인슐린-유사 성장인자-II(IGF-II), 인터류킨-6(IL-6), 인터류킨-11(IL-11), 인터류킨-13(IL-13), 종양괴사인자-α(TNF-α), 성장 관련 종양유전자(GRO; CXC 케모카인), 인간 성장 호르몬, 및 고밀도 지단백(HDL)은 HepG2 세포 콜로니 형성에 관찰되는 효과를 미치지 않았다. 전환성장인자-β1(TGF-β1)는 HepG2 세포의 성장 및 생존을 저해하였다. 표피성장인자(EGF)는 HepG2 콜로니 형성을 유의적으로 감소시키고 세포를 콜로니로부터 이동해 나가게 하였다.

[0124] 종합하면, 본 발명은 공급자 세포의 부재 하에 HpSC의 생존, 증식, 및/또는 제어된 분화를 가능하게 한다. 하기 **표 7**은 시험관내 및 생체외에서 HpSC를 번식시키기 위한 "공급자가 없는" 조건의 비한정적 예를 열거한다. 모든 예는 히알루로난을 포함하며, 이는 생체내에서 간의 줄기세포 니치에 어디에나 존재한다. 현재로서는 히알루로

난이 HpSC의 번식 효율을 증진하는 것으로 생각된다. 그러나, 이 예는 시험관내에서 HpSC를 배양하는데 있어서 히알루로난의 존재가 요구되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 원용에 의해 개시 내용이 전체로서 본 명세서에 포함되는, 2007년 3월 7일자 출원된 미국 특허 가출원 제60/893,277호를 참조한다.

표 7

[0125]

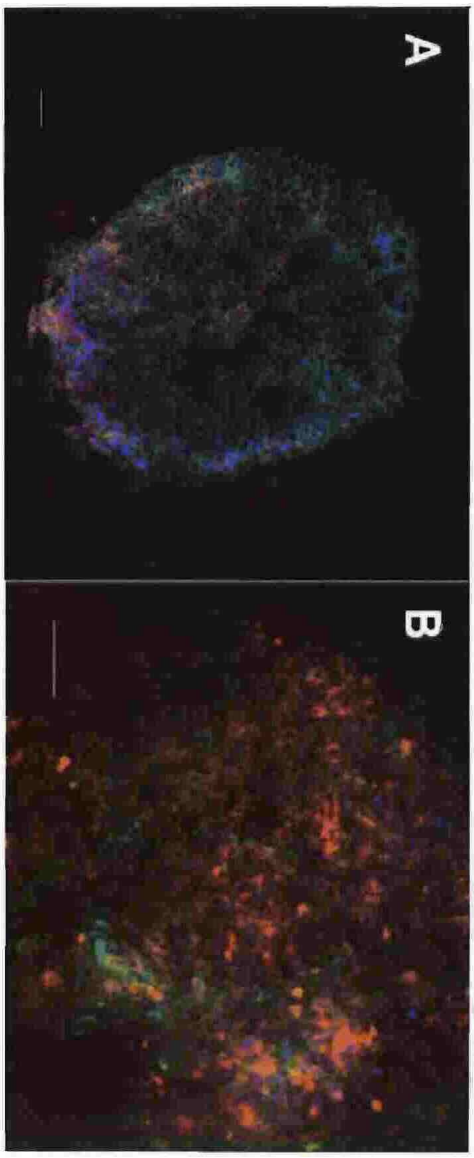
| 계통 단계 | 디설파이드 가교를 가지는 히알우로난은 하기와 함께 복합체화될 수 있다: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 콜라겐(s) | 기저 부착 단백질 | 프로테오글리칸 (또는 GAG 쇄) | 호르몬 및/또는 성장인자 |
| I. 세포 확장 조건 | | | | |
| 간 줄기세포 및/또는 간모세포 | 유형 III (및 IV) 콜라겐 | 라미닌 | 인간 태아 간으로부터의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(또는 HS) | 인슐린, 트랜스페린/fe, LIF, FGF4, IL6 (및/또는 IL11), HGF, HDL, 인간 알부민 상의 자유 지방산, 및 헤파토포이에틴 |
| 간 줄기세포 및/또는 간모세포(혈관모세포/내피와 혼합) [그라프트] | 유형 III (및 유형 IV) 콜라겐 | 라미닌 | 인간 태아 간으로부터의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(또는 HS) | 인슐린, 트랜스페린/fe, LIF, FGF4, IL6 (및/또는 IL11), HGF, VEGF, HDL, 인간 알부민에 결합된 자유 지방산 및 헤파토포이에틴 |
| II. 줄기/전구세포의 분화 조건 | | | | |
| 간 줄기세포 /간모세포 | 유형 IV 콜라겐(및 일부 유형 I) | 라미닌/피브로넥틴 | 성체 인간 간으로부터의 헤파린 프로테오글리칸 (또는 헤파린) | 인슐린, 트랜스페린/fe, T3, IGFI, HGF, 하이드로코르티손, HDL 및 인간 알부민에 결합된 자유 지방산 |
| III. 성체 간세포의 성장 조건 | | | | |
| 간세포(이배체 세포는 완전한 세포 분할을 위해 사용되어야만 한다) | 유형 IV 콜라겐 | 라미닌 | 인간 태아 간으로부터의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(또는 HS) | 인슐린, EGF, T3, IGF I, HGF, HDL, 인간 알부민에 결합된 자유 지방산, 헤파토포이에틴 |
| IV. 성체 간세포의 최대 분화 조건 | | | | |
| 간세포(이배체 및 다배체 세포 둘다) | 유형 I 콜라겐 (소량의 유형 III과 함께) | 피브로넥틴 | 성체 인간 간으로부터의 헤파린 프로테오글리칸 (또는 헤파린) | 인슐린, EGF, T3, IGF I, HGF, 하이드로코르티손, HDL, 인간 알부민에 결합된 자유 지방산, 및 글루카곤 |

[0126] 이러한 방법으로, 이식된 세포는 기관 전체를 모두 대체하는 상황을 미연에 방지한다. 또한 생물반응기(bioreactor)와 같은 시험관내 장치에 적절한 세포외 매트릭스 및 가용성 신호전달 환경으로 포장한 간 전구세포를 접종하여 이들이 장치의 하부 구획(subcompartment)을 생존가능한 조직 구조로 채우도록 할 수 있다. 이러한 방법으로, 생체인공 장치를 약리학적 연구, 백신 개발 및 기관 부전 및 기관 이식의 가교로서 이용할 수 있다. 사실상, 상기 조사로부터 얻어진 결과는 이들 세포의 이용이 현재 세포 요법 및 생물반응기 장치 의학적 치료 선택 모두를 저해하는 세포 공급원의 한계를 개선하는 수단이 될 수 있음을 제시한다.

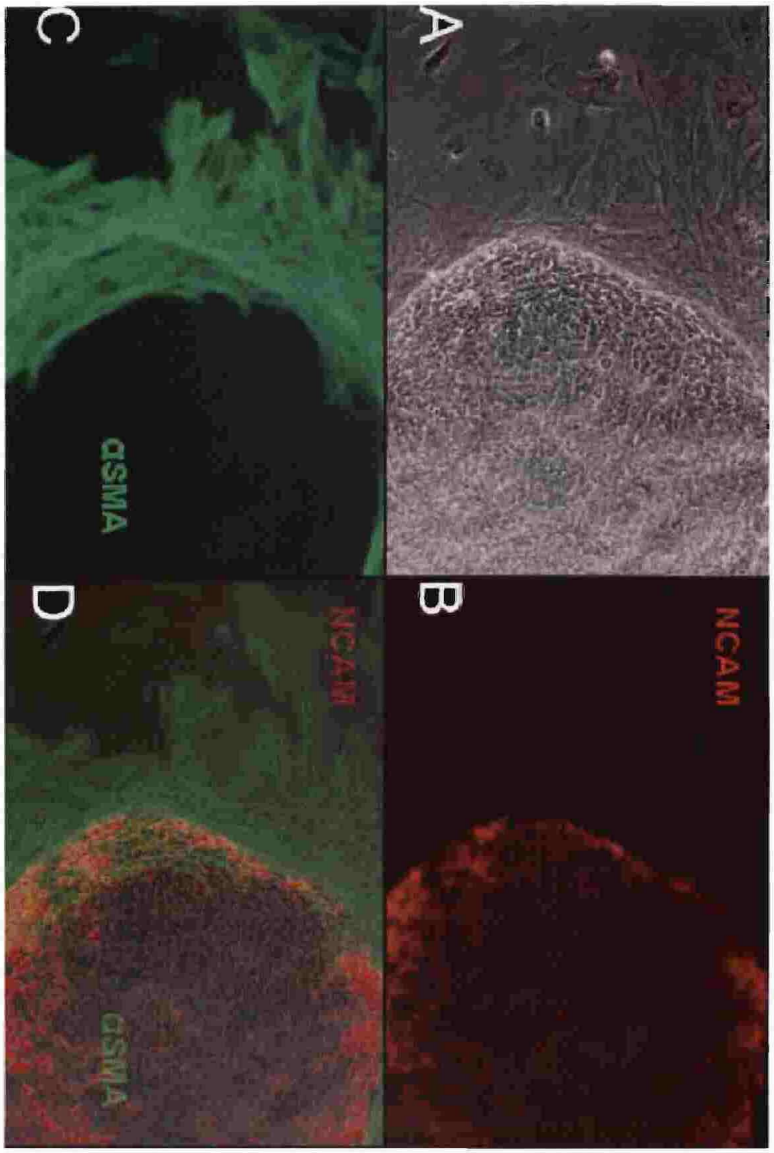
[0127] 본 발명은 특이적 구체예와 연계하여 기술되었지만, 추가의 개질이 가능하며 본 출원이 하기 발명의 임의의 변동, 용도, 또는 변경을 포함하는 것으로 이해될 수 있다. 일반적으로, 당업계에 공지되거나 통상적으로 실행되는 정도의 본 개시로부터의 이탈을 포함하는 본 발명의 원리는, 앞서 설명한 본질적 특징에 적용될 수 있으며 하기에 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함된다.

## 도면

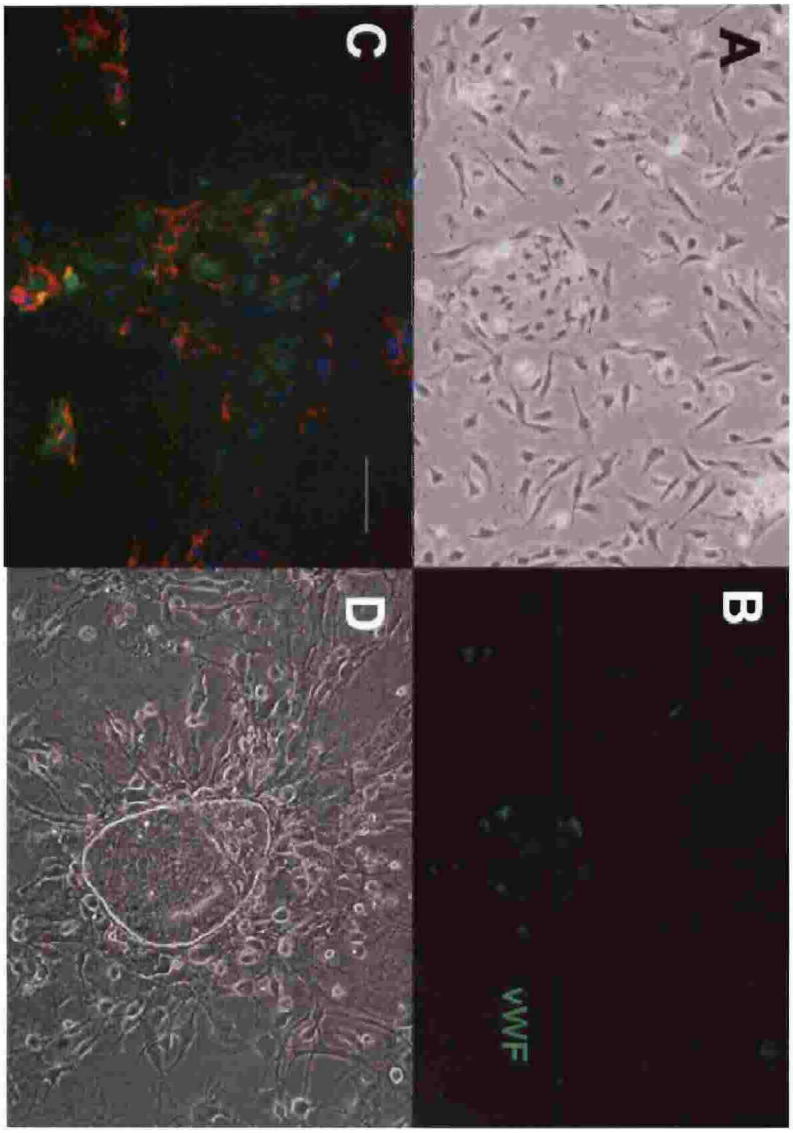
### 도면1



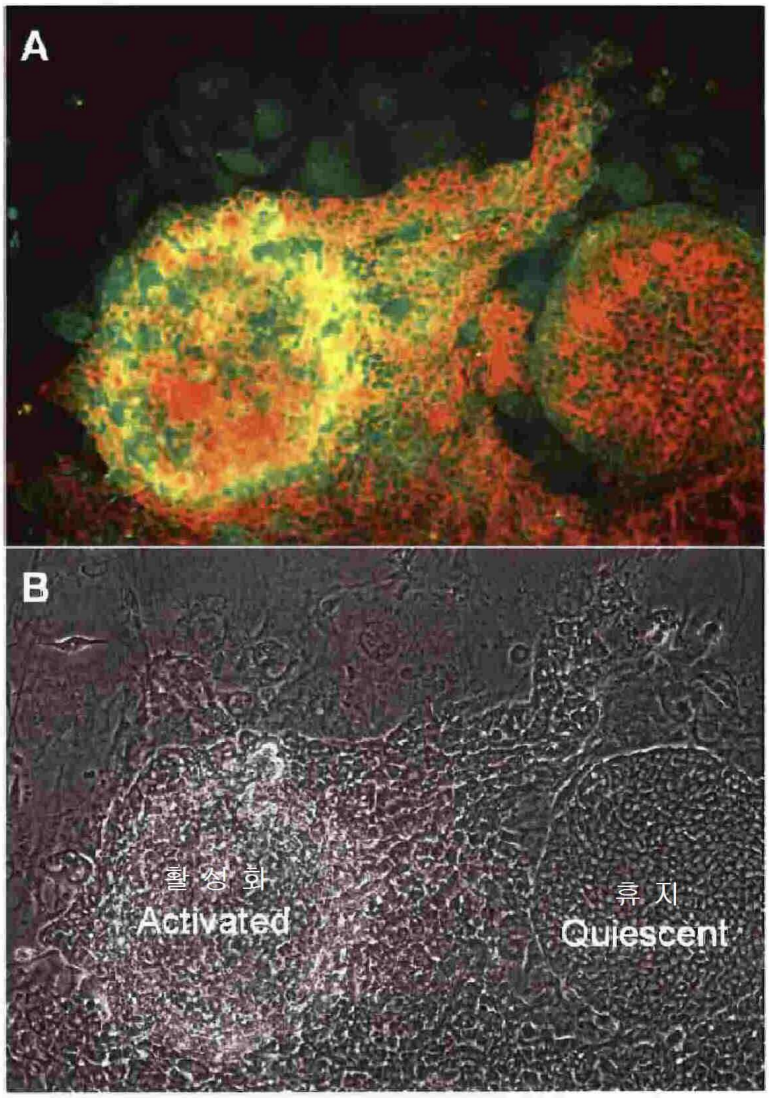
도면2



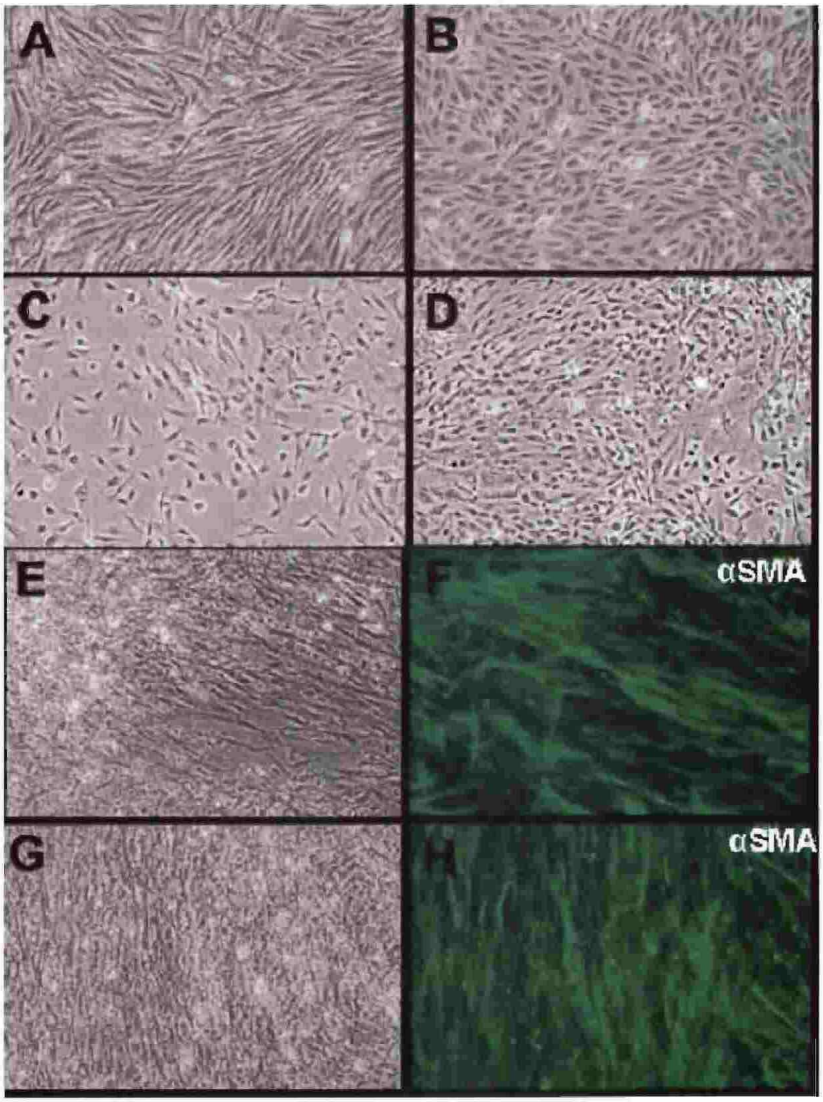
도면3



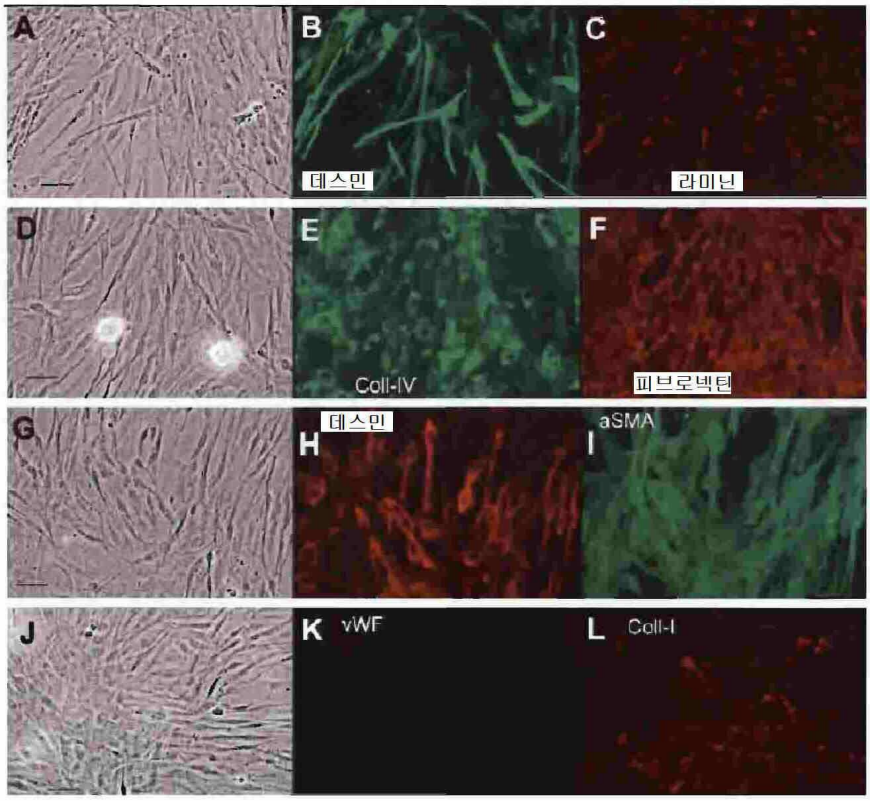
도면4



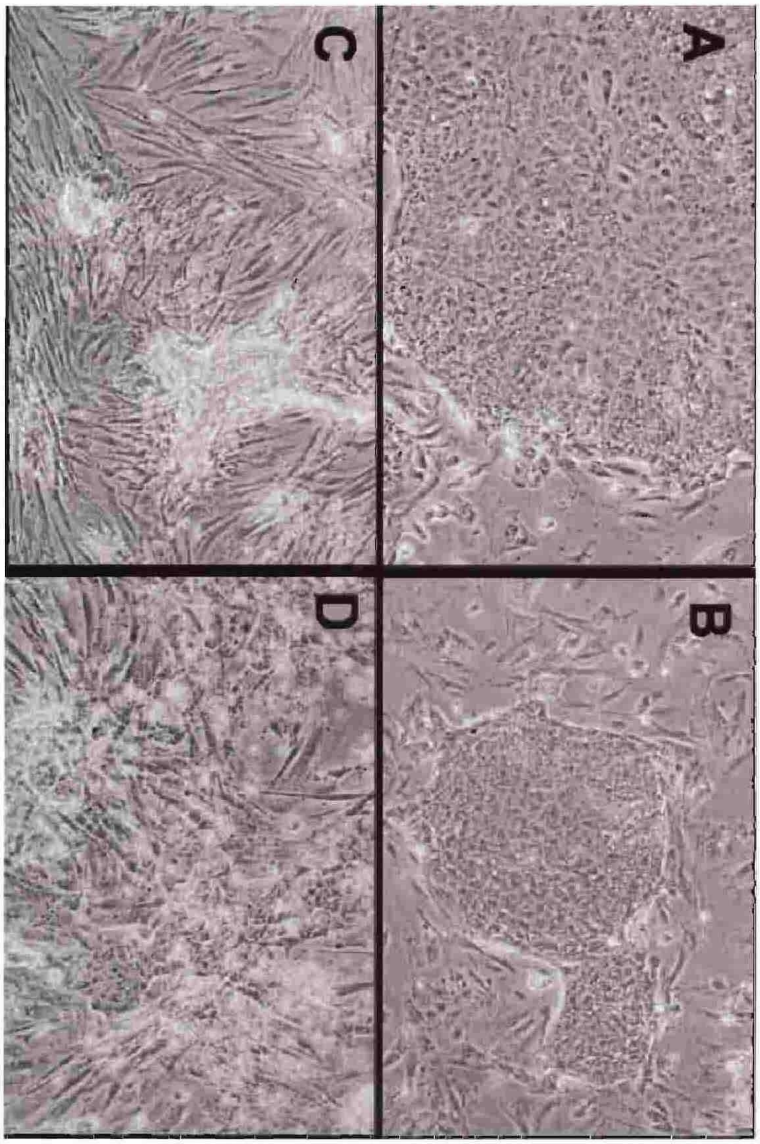
도면5



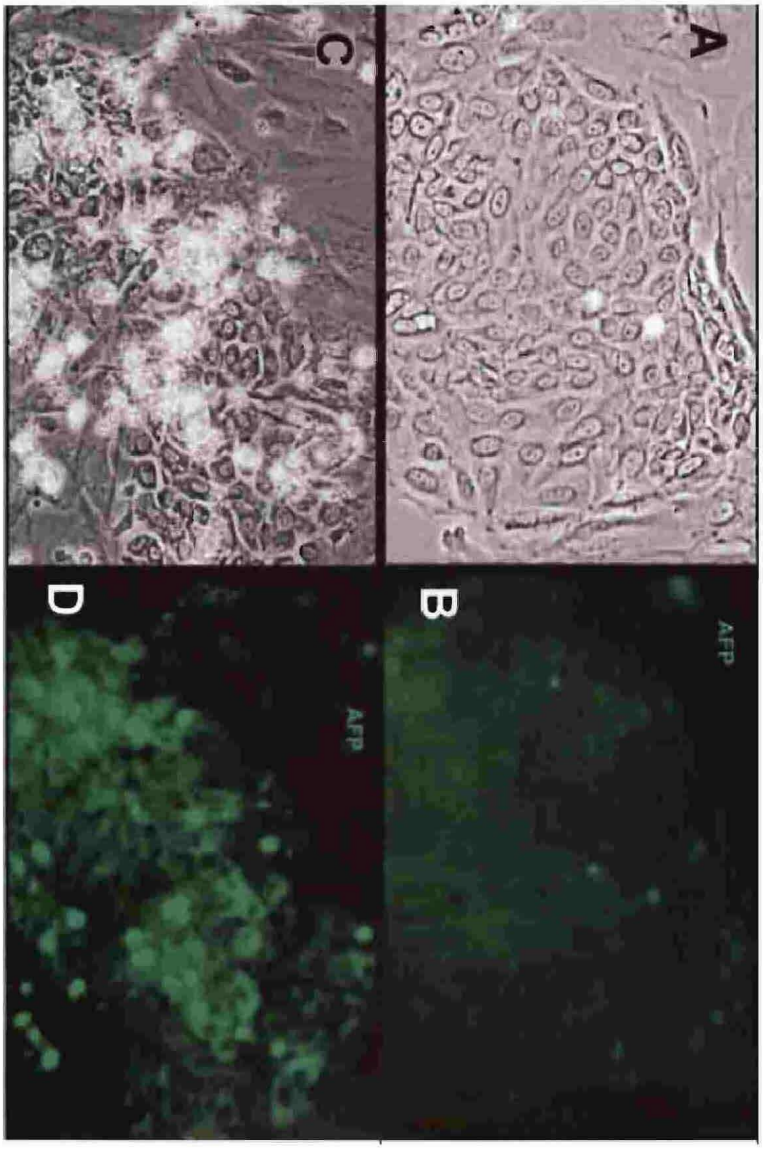
도면6



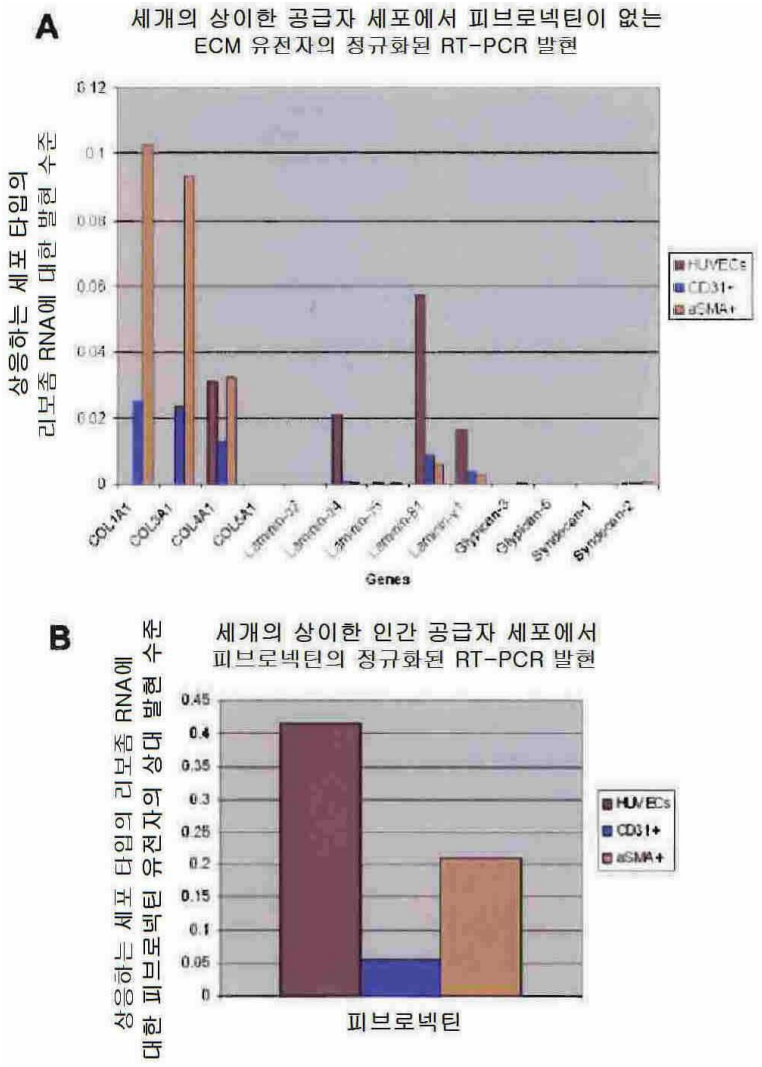
도면7



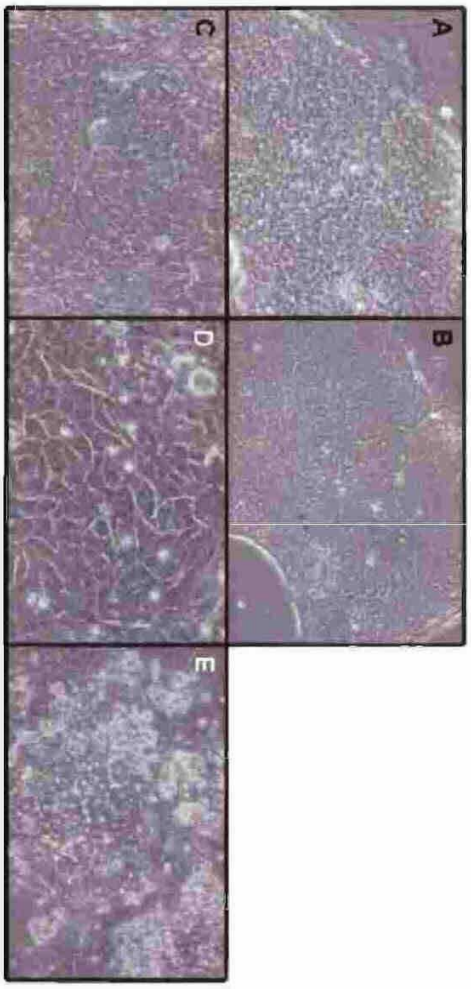
도면8



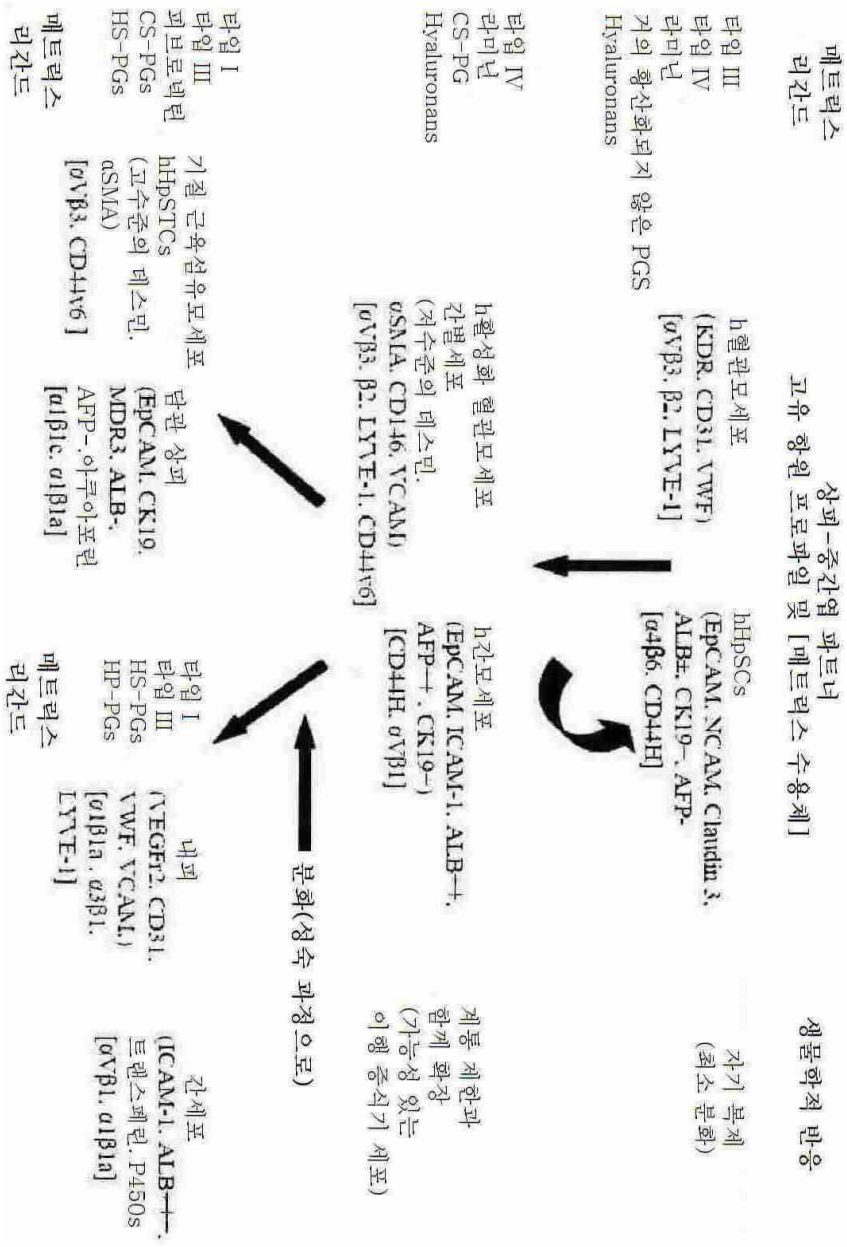
도면9


A
세개의 상이한 공급자 세포에서 피브로넥틴이 없는
ECM 유전자의 정규화된 RT-PCR 발현
상응하는 세포 타입의
리보좀 RNA에 대한 발현 수준
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
HUVECs
CD31+
aSMA+
COL1A1
COL3A1
COL4A1
COL5A1
Glypican-3
Glypican-6
Syndecan-1
Syndecan-2
Genes
B
세개의 상이한 인간 공급자 세포에서
피브로넥틴의 정규화된 RT-PCR 발현
상응하는 세포 타입의 리보좀 RNA에
대한 피브로넥틴 유전자의 상대 발현 수준
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
HUVECs
CD31+
aSMA+
피브로넥틴

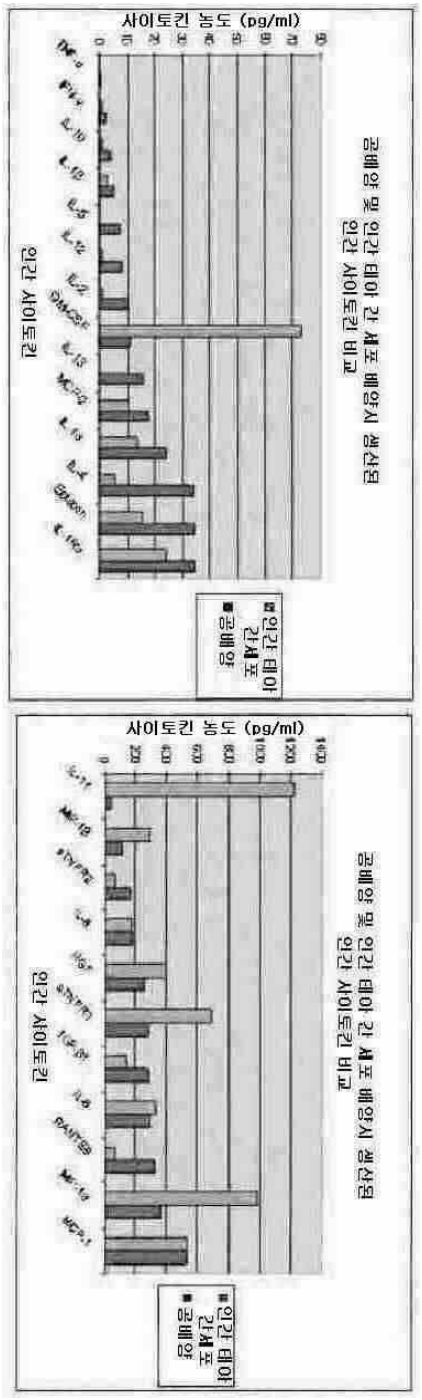
도면10



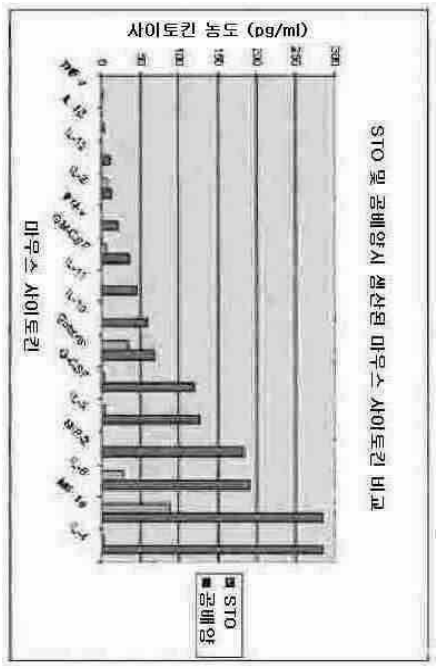
도면11

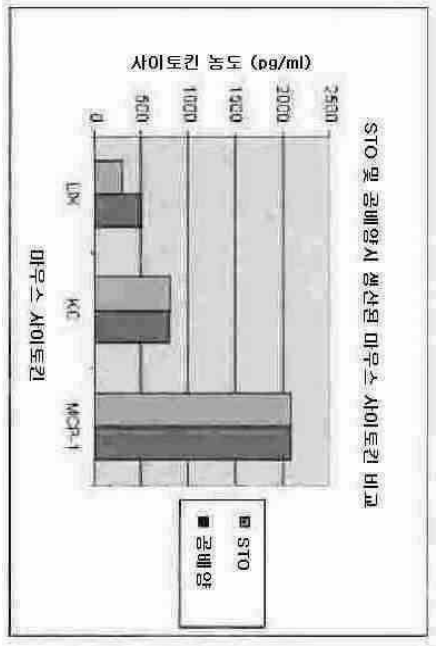

생물학적 반응
상피-중간엽 파트너
고유 항원 프로파일 및 [매트릭스 수용체]
매트릭스
리간드
타입 III
타입 IV
라미닌
거의 황산화되지 않은 PGS
Hyaluronans
h혈관모세포
(KDR. CD31. VWF)
[αVβ3. β2. LYVE-1]
hHpSCs
(EpCAM. NCAM. Claudin 3.
ALB±. CK19−. AFP-
[α4β6. CD44H]
자기 복제
(최소 분화)
타입 IV
라미닌
CS-PG
Hyaluronans
h활성화 혈관모세포
간엽세포
(저수준의 데스민.
αSMA. CD146. VCAM)
[αVβ3. β2. LYVE-1. CD44v6]
h간모세포
(EpCAM. ICAM-1. ALB−+.
AFP−+. CK19−)
[CD44H. αVβ1]
계통 제한과
함께 확장
(가능성 있는
이행 중식기 세포)
분화(성숙 과정으로)
타입 I
타입 III
피브로넥틴
CS-PGs
HS-PGs
매트릭스
리간드
기질 근육섬유모세포
hHpSTCs
(고수준의 데스민.
αSMA)
[αVβ3. CD44v6]
담관 상피
(EpCAM. CK19.
MDR3. ALB-.
AFP-. 아쿠아포린
[α1β1c. α1β1a]
내피
(VEGFr2. CD31.
VWF. VCAM.)
[α1β1a . α3β1.
LYVE-1]
타입 I
타입 III
HS-PGs
HP-PGs
매트릭스
리간드
간세포
(ICAM-1. ALB++.
트랜스페린. P450s
[αVβ1. α1β1a]

도면12

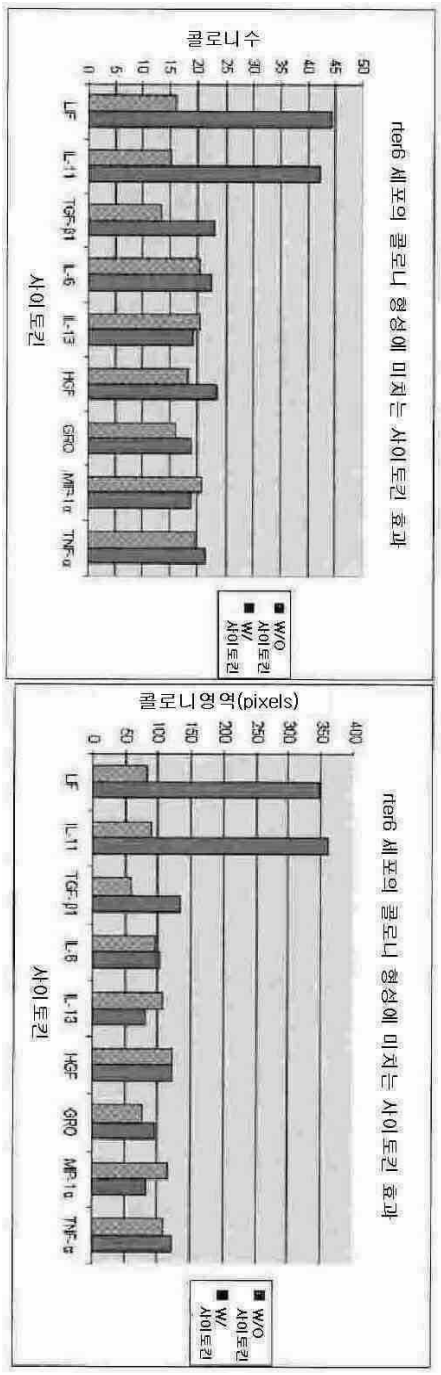

사이토킨 농도 (pg/ml)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
TNF-α
IFN-γ
IL-10
IL-12
IL-5
IL-4
IL-2
GM-CSF
IL-13
MCP-1
IL-8
IL-6
RANTES
MIP-1α
MCP-3
건강 사이토킨 타입 간 표준 배양시 혈청 농도 비교
운배양 및 인간 타입 간 표준 배양
인간 타입 간 표준 배양
운배양
사이토킨 농도 (pg/ml)
0
20
40
60
80
100
200
400
600
800
1000
1400
IL-17
MIP-1β
GM-CSF
IL-4
IL-2
IL-5
RANTES
IL-6
MIP-1α
MCP-3
건강 사이토킨 타입 간 표준 배양시 혈청 농도 비교
운배양 및 인간 타입 간 표준 배양
인간 타입 간 표준 배양
운배양

도면13


STO 및 공배양시 쌀산유 마우스 사이토킨 비교
사이토킨 농도 (pg/ml)
0
50
100
150
200
250
300
마우스 사이토킨
STO
공배양


STO 및 공배양시 쌀산유 마우스 사이토킨 비교
사이토킨 농도 (pg/ml)
0
500
1000
1500
2000
2500
LIX
KC
MCP-1
마우스 사이토킨
STO
공배양

도면14


rter6 세포의 콜로니 형성에 미치는 사이토킨 효과
콜로니수
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
LIF
IL-11
TGF-β1
IL-6
IL-13
HGF
GRO
MIP-1α
TNF-α
사이토킨
W/O 사이토킨
W/ 사이토킨
rter6 세포의 콜로니 형성에 미치는 사이토킨 효과
콜로니영역(pixels)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
LIF
IL-11
TGF-β1
IL-8
IL-13
HGF
GRO
MIP-1α
TNF-α
사이토킨
W/O 사이토킨
W/ 사이토킨