



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052895
(43) 공개일자 2012년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0119864

(22) 출원일자 2011년11월16일

심사청구일자 2011년11월16일

(30) 우선권주장

1020100114148 2010년11월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

유경하

서울특별시 강남구 영동대로118길 76 (삼성동)

한호성

경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 (구미동, 분당서울대학교병원)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

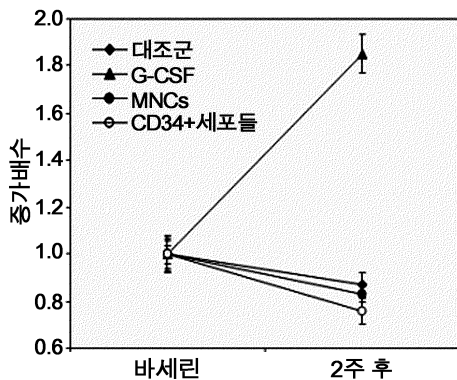
(54) 발명의 명칭 간 절제를 위한 간 부피 증가용 조성물

(57) 요약

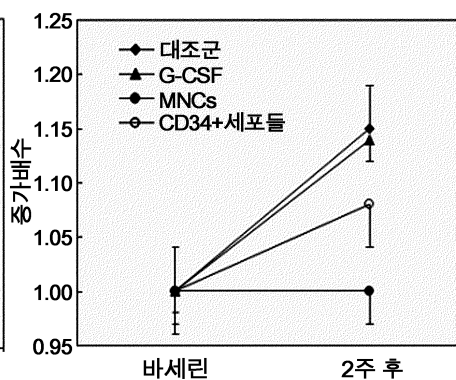
본 발명은 골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는, 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물, 및 간 부피 증가제를 포함하는 간 절제용 수술 키트에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 간의 손상이 심하여 간 절제술이 불가능한 대상의 간의 기능 호전 및 부피를 증가시켜, 광범위한 간 절제술을 가능하게 함으로써, 여러 간질환을 치료할 수 있다.

대표도 - 도7

(A) ICG



(B) 임상 점수



(72) 발명자

서주영

서울특별시 양천구 목동서로2길 22 (목동)

안근수

경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 (구미동,
분당서울대학교병원)

우소연

서울특별시 동대문구 왕산로19바길 29, 103호 (제
기동, 청솔그린빌)

조경아

서울시 강남구 일원동 615-1

주선영

서울특별시 양천구 목동중앙본로 10, 101동 1004
호 (목동, 극동늘푸른아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1355060444

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료기술연구개발

연구과제명 간질환 치료를 위한 자가 말초혈 줄기세포 이식술 개발

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.11.01 ~ 2010.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF(Granulocyte colony-stimulating factor)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는, 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단핵세포 또는 조혈모세포는 간 절제가 필요한 대상에 G-CSF를 3-5일간 주입한 후, 말 초혈액으로부터 분리된 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 간 절제가 필요한 대상에게 간 절제 전에 주입되는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 주사제의 형태로 제형화된 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조혈모세포는 CD34+ 또는 CD133+ 세포인 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단핵세포는 1×10^8 내지 1×10^{11} 개, 조혈모세포는 6×10^6 내지 8×10^6 개, G-CSF는 8 내지 12 $\mu\text{g/kg/day}$ 로 주입되는 것인 조성물.

청구항 7

골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 간 부피 증가제를 포함하는 간 절제용 수술 키트.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물, 및 간 부피 증가제를 포함하는 간 절제용 수술 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 지속적으로 효소반응 및 에너지 대사가 일어나는 생체기관으로 체외에서 들어온 물질 및 체내의 물질 대사과정에서 중추적인 역할을 담당한다. 또한, 간은 인체 내 소화기계와 전신순환계 사이에 위치함으로써 외부로부터 들어온 생체의 물질로부터 전신을 방어하는 기능을 수행하고 있다. 따라서 일단 생체 내로 들어온 생체의 물질이 간을 통과하는 까닭에 간은 영양소 이외에도 많은 독성물질에 노출될 위험이 다른 장기보다 많아 그만큼 손상될 확률도 다른 장기에 비해 높다.

[0003] 간은 재생능력이 우수한 장기로 약간의 손상의 경우에는 충분히 정상으로 회복된다. 그러나 지속적으로 손상될 경우 간 조직의 일부가 완전히 파괴되면서 파괴된 부분이 정상으로 회복되지 못하고 결합조직이 과다 축적되게 된다. 이에 따라 간조직에 흉터가 형성되고 간 기능이 정상으로 회복되지 못하는 상태가 된다. 간 손상이 만성적이 되면 그 원인에 상관없이 결국에 간섬유화 및 간경화가 초래된다.

[0004] 간섬유화 또는 간경화는 알코올의 과다섭취, 화학물질의 남용, 바이러스성 간염, 담즙 분비 정지 등에 의해 발생되는데, 초기단계에는 통증이나 자각증세가 나타나지 않고 말기에서야 발견되기 때문에 그 치료가 쉽지 않으며, 사망률이 높아 사회적인 문제가 되고 있다. 간경변의 원인은 지속적으로 축적된 상기 콜라겐이 중합

(polymerization)되어 비수용성 섬유로 변화되는 간섬유화에 기인한다. 그 밖에 장기간의 과도한 알콜 복용, 간염, 유독물질에의 노출 등으로 인하여 간세포의 파괴, 재생, 반흔 등을 수반하는 간 염증이 지속된 결과 간 경변이 발생되며, 간의 크기는 줄어들고 표면이 우둘두들해지게 된다. 간경변은 심할 경우 간문맥압 항진증을 비롯하여 출혈(특히 식도와 위 출혈), 간암, 노폐물 축적으로 인한 중독, 혼수 등의 생명에 위협을 주는 합병증을 유발할 수 있는 심각한 질병 중의 하나이다.

[0005] 간문맥압 항진증은 정상세포의 활성화, 간섬유화 및 간경변과 밀접한 연관이 있다. 정상세포의 활성화에 따른 근섬유아세포화(myofibroblast)는 간세포의 신축성 저하를 유발하여 이로 인한 간내 혈류의 저항(Intrahepatic Resistance)이 증가되므로 간문맥압 항진증(Portal Hypertension)이 발생하는 것으로 알려져 있다 (Semin Liver Dis 2001; 21:337-349).

[0006] 특히, 간섬유화는 간염 등 만성 간염에 수반되는 생체적응 반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세포로 복구되는 것이 아니라 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 말한다. 간섬유화는 조직손상의 복구과정에서 발생하는 생체 적응 반응이지만 물질 대사 및 담즙 분비 등의 고유 기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간 조직을 대체시키므로 필연적으로 간 기능 저하가 나타난다. 또한 이 같은 간섬유화는 결합조직의 합성 및 분해과정의 균형이 상실된 상태에서 그 결과 간 조직 내에 결합조직이 과다하게 축적되어 발생하며, 피사나 염증이 동반된다(Popper, Leber Magen Darm, 8, 65, 1978; Schuppan et al., Z. Gastro., 26 Suppl. 3, 28, 1988). 간 정상세포(Hepatic stellate cells)의 발현은 모든 형태의 간 손상 시에 나타나는 중요한 특징이다. 간 정상세포는 세포외기질(ECM)을 생산하는 주요 세포로서 수축성 단백질을 발현하고, ECM 특히, 섬유상 콜라겐(fibrillar collagens)을 많은 양으로 분비하며, α -평활근 액틴(α -smooth muscle actin: α -SMA)의 발현을 증가시킨다. 반면에 메탈로프로테이나제의 억제제(Tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)의 발현은 증가됨으로써, ECM 제거 매트릭스 메탈로프로테이나제(ECM-removing matrix metalloproteinases (MMPs))의 활성이 감소된다. 이러한 간질성아교질분해효소(interstitial collagenase)의 낮은 발현과 TIMPs의 높은 발현은 섬유상 콜라겐의 분해를 막게 된다. 현재 간섬유화 치료제의 개발에 관한 약물은 정상세포의 활성을 억제하는데 초점을 두고 있다.

[0007] 간섬유화를 억제하는 약물로 페니실라민, 16,16-디메틸프로스타글라딘 E2, 비페닐 디메틸 디카르복실산, 콜키친, 글루코코르티코이드, 말로틸레이트(malotilate), 감마 인터페론, 펜톡시필린, 피리딘-2,4-디카르복실릭-디에틸아미드, 피리딘-2,4-디카르복실릭-디(2-메톡시에틸)아미드 등이 보고되었으나, 임상에 적용 시 작용이 미약하거나 부작용이 심하다.

[0008] 최근 간 조직내의 대식 쿠퍼(Kupffer) 세포와 이토펜에서 유리되는 사이토카인인 TGF- β (transforming growth factor-beta)가 간섬유화의 중요 매개물로 밝혀졌다. 또한 TGF- β 의 항체, 안티센스 RNA, 세포 TGF- β 수용체 변형을 통하여 TGF- β 의 작용을 차단하였을 때에는 간섬유화 과정이 현저하게 억제되는 것으로 보고되었다. 그러나 이러한 연구는 실험적 차원에서 수행된 것일 뿐 현재까지 실제로 임상적으로 활용되는 약물은 없는 실정이다.

[0009] 또한 간 이식은 간섬유화 과정을 통해 손상된 만성 간 손상을 치료할 수 있는 대안이 될 수 있다. 그러나 간 이식은 간 공여자의 부족, 간 이식 수술의 복잡함, 높은 수술 비용, 면역거부반응 등 여러 가지 문제점이 존재하여 이를 대체할 수 있는 치료방법이 필요한 실정이다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 G-CSF를 처리하여 골수세포를 말초혈액으로 가동화시킨 후, 말초혈액으로부터 얻어진 단핵세포 또는 조혈모세포, 또는 골수세포 가동화 인자인 G-CSF 자체를 간 절제술이 필요하나 간의 손상이 심하여 수술이 불가능한 환자에 주입하였을 때, 간의 부피가 증가하고, 간의 기능이 개선되어 간 절제술이 가능하게 됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 간 부피 증가제를 포함하는 간 절제용 수술 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포,

및 G-CSF(Granulocyte colony-stimulating factor)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는, 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 다른 양태로서, 본 발명은 골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 간 부피 증가제를 포함하는 간 절제용 수술 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0016] 하나의 양태로서, 본 발명은 골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는, 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0017] 간의 손상으로 인해, 간 조직의 일부가 완전히 파괴되면서 파괴된 부분이 정상으로 회복되지 못하는 경우, 간 절제술 또는 간 이식이 필요하다. 간 이식의 경우 간 공여자의 부족, 간 이식 수술의 복잡성 등이 문제되며, 간 절제술의 경우, 간의 기능 손상이 심한 경우 수술이 불가능한 상태가 될 수 있으며, 간의 상태에 따라 광범위한 간 절제술이 불가능할 수 있다.

[0018] 이에 본 발명에서는 간의 기능 손상이 심하여 간 절제술이 불가능한 대상, 간이식을 할 수 없는 만성 간경화, 또는 광범위한 간절제술이 필요한 대상에게 단핵세포, 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상이 포함된 조성물을 주입하여, 간의 기능을 호전시키고 간의 부피를 증가시켜 간 절제술이 가능한 상태가 될 수 있음을 확인하고, 간 절제를 위한 간 부피 증가용 약학 조성물을 개발하였다.

[0019] 본 발명에서, "단핵세포(mononuclear)"는 백혈구의 일종으로 단핵 백혈구라고도 한다. 지름은 $14\sim 20\mu\text{m}$ 로 백혈구 중 가장 크며, 혈액 1mm^3 중에 $200\sim 900$ 개가 존재한다. 골수에서 생산되고 독특한 운동성을 가지며, 강한 식세포작용을 나타내는 세포이다.

[0020] 본 발명에서, "조혈모세포"는 모든 혈액세포를 만들어 낼 수 있는 능력을 지닌 줄기세포를 의미하며, 정상인의 골수 혈액에 약 1% 정도로 존재한다. 본 발명의 구체적인 양태에서, 상기 조혈모세포는 Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺의 발현 특징을 가지는 것이며, CD34⁺ 또는 CD133⁺ 세포이다.

[0021] 본 발명에서 "가동화"란 백혈구 성장촉진인자를 사용하여 말초 혈액으로 골수 유래 줄기세포의 이동을 촉진시키는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 상기 단핵세포 또는 조혈모세포는 자가 골수세포에서 유래된 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 간 절제가 필요한 대상에 G-CSF를 3-5일간 주입한 후, 말초 혈액으로부터 분리된 것으로서, 말초 혈액으로부터 용이하게 골수세포를 얻을 수 있으며 자가 세포이기 때문에 면역반응이 없는 장점이 있다.

[0023] 본 발명에서 "간 절제가 필요한 대상"은 간의 손상으로 인하여 간 절제가 필요한 대상일 수 있으며, 상기 "대상"은 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아피그를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 동물을 의미하고, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류를 의미한다. 또한, 상기 대상에는 간 절제가 필요하나 간의 기능 손상이 심하여 간 절제술이 불가능한 대상, 간이식을 할 수 없는 만성 간경화 환자, 광범위한 절제술이 필요한 대상 등 제한없이 포함될 수 있다. 또한, 상기 간 절제가 필요한 대상에는 간기능이 손상되면서 발생하는 모든 질환, 예를 들어, 간섬유증, 간경화, 간경변증 또는 간암 환자 등이 포함될 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

[0024] 상기 간섬유증은 간염 등 만성 간염에 수반되는 생체적응 반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세포로 복구되는 것이 아니라 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 말한다. 간섬유증은 조직손상의 복구 과정에서 발생하는 생체 적응 반응이지만 물질 대사 및 담즙 분비 등의 고유 기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간 조직을 대체시키므로 필연적으로 간 기능 저하가 나타난다. 간 손상시에 나타나는 중요한 특징 중 하나인 간 성상세포(Hepatic stellate cells)의 발현은 콜라겐 합성을 증가시켜서 간섬유화가 진행되게 하며, 이는 섬유질 사이에 남은 간세포가 간기능을 유지하기 위하여 증식하게 함으로써 재생결절들이 형성된다. 이러한 섬유화와 재생결절에 의하여 간소엽의 중심정맥의 혈관이 압박되어 문맥에서 간으로 혈액 유입이 막히게 되면, 문맥압 항진증이 나타난다. 즉, 간섬유화를 억제하면 문맥압도 감소될 수 있으며, 문맥압을 감소시키고 문맥 내 혈류량을 증가시키면 간의 혈류 흐름이 개선되어 전체적으로 간보호 효과가 나타날 수 있다.

[0025] 본 발명에서 "주입"은 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 투여와 동일

한 의미로 사용될 수 있다. 주입 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 비경구 주입될 수 있다. 또한, 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 주입될 수 있다.

[0026] 상기 약학 조성물은 간 절제가 필요한 대상에 주입되는데, 목적하는 바에 따라 복강내 주입, 정맥내 주입, 근육내 주입, 피하 주입, 피내 주입, 경구 주입, 비내 주입, 폐내 주입, 직장내 주입일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 혈관내 주입이며, 보다 바람직하게는 간문맥 또는 간정맥을 통해 주입하는 것이다. 보다 바람직하게는, 우측 앞쪽, 뒤쪽 간문맥을 색전한 후 카테터를 왼쪽 간문맥에 위치시켜 골수세포를 주입하는 것이다.

[0027] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체가 추가로 포함될 수 있다.

[0028] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용 액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여되는 것이다.

[0030] 또한, 상기 조성물은 비경구투여되는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 직접 이식되는 것이다.

[0031] 또한, 상기 조성물은 간 절제가 필요한 대상에게 간 절제 전에 주입되는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명에서 단핵세포, 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 간 절제를 위한 간 부피 증가용 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있는데, 바람직하게는, 단핵세포의 경우, 단핵세포는 1×10^8 내지 1×10^{11} 개, 보다 바람직하게는 1×10^9 개, CD34+ 세포는 6×10^6 내지 8×10^6 개, 보다 바람직하게는 7×10^6 개, G-CSF는 8 내지 $12 \mu\text{g/kg/day}$, 보다 바람직하게는 $10 \mu\text{g/kg/day}$ 이다.

[0033] 본 발명에서는 간 절제가 필요한 대상의 간의 부피를 증가시키기 위하여, 단핵세포, 조혈모세포 또는 G-CSF 이외에 공지된 다른 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 공지된 다른 방법과 병용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명은 간이식을 할 수 없는 만성간경화, 광범위한 간절제술이 필요한 환자를 대상으로 G-CSF를 3-4일동안 투여하여 골수세포를 가동화시킨 후, 말초혈액으로부터 골수세포를 분리하여 환자에 주입시켜 준 결과, ICG(indocyanine green)가 낮아지고, 혈액 검사시 간기능이 호전되며, 간부피가 증가됨을 확인하였으며, 이에 따라 수술이 가능한 상태가 되었음을 확인하였다(실시예 4)

[0035] 따라서, 본 발명의 약학 조성물을 사용하게 되면, 간의 기능이 호전되고 부피가 증가하게 되어 간 절제가 가능한 상태가 되므로 추후 광범위한 부피의 간을 절제할 수 있으며, 남겨질 간의 부피가 현저히 증가하여 좀더 빨리 간 절제술을 시행할 수 있다. 또한, 손상된 간의 절제로 인하여, 결과적으로 간 기능 손상으로 발생하였

던 간질환이 치료될 수 있다.

[0036] 또 다른 양태로서, 본 발명은 골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 간 부피 증가제를 포함하는 간 절제용 수술 키트에 관한 것이다.

[0037] 또 다른 양태로서, 본 발명은 골수세포 유래 단핵세포, 골수세포 유래 조혈모세포, 및 G-CSF로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 간 절제가 필요한 대상에 주입시켜 간의 부피를 증가시키는 단계를 포함하여, 간 절제가 필요한 대상의 간이 절제 가능한 상태가 되도록 하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 간의 손상이 심하여 간 절제술이 불가능한 대상의 간의 기능 호전 및 부피를 증가시켜, 광범위한 간 절제술을 가능하게 함으로써, 여러 간질환을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 본 발명에서 수행한 실험방법을 도식화하여 나타낸 것이다. (a)는 CCl₄로 유발된 간 손상이 자발적으로 치유될 수 있는지를 확인하기 위해 C57BL6 마우스를 4개의 그룹으로 나눈 실험이고, (b)는 골수세포의 분획 세포 중 간섬유증 치료효과가 가장 우수한 세포를 확인한 실험이다.

도 2는 공여 골수세포(BMCs)의 손상된 간으로의 생착을 유세포 분석을 통해 나타낸 것이다. (a)는 정상 마우스에서 GFP-양성 세포의 비율 차이를 나타낸 것이고, (b)는 간-손상 마우스에서 골수세포의 분포 비율을 나타낸 것이다.

도 3은 이식된 골수세포의 CCl₄ 처리로 유발된 간섬유증 치료효과를 확인한 것이다. (a)는 α-SMA의 발현양과 시리우스 레드 염색 양성 지역을 관찰한 것이고, (b)는 섬유화 지역의 비율을 나타낸 것이다.

도 4는 간섬유증 마우스에서 골수세포 이식에 따른 알부민, 콜라겐, TIMP1의 발현양을 나타낸 것이다.

도 5는 간섬유증 치료 효과가 가장 우수한 골수세포의 분획세포를 확인하기 위하여, CCl₄ 만을 처리한 군, G-CSF만 투여한 군, MNC를 이식한 군 및 HSC를 이식한 군에서의 α-SMA 발현량(a) 및 섬유화 부분(b)을 나타낸 것이다. (c)는 각 처리 군에서의 세포 사멸 변화를 유세포 분석으로 나타낸 것이다.

도 6은 세포외 기질 및 간섬유증과 관련된 염증인자들의 유전자 발현 변화를 나타낸 것이다.

도 7은 세포 이식 후 각 군 환자들의 변화된 ICG 및 임상점수를 나타낸 것이다.

도 8은 간의 AST 및 ALT의 수치 변화를 시간별로 비교하여 나타낸 것이다.

도 9는 간의 알부민 및 빌리루빈의 수치 변화를 시간별로 비교하여 나타낸 것이다.

도 10은 INR 및 피브리노겐의 수치 변화를 시간별로 비교하여 나타낸 것이다.

도 11은 간부피 변화를 나타내는 CT 촬영 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 참조예 1. 실험 대상 및 공여세포의 준비

[0042] 1-1. 실험 대상의 준비

- [0043] (1) 마우스의 준비
- [0044] 본 발명에서 수행된 절차와 프로토콜은 이화여자대학교 의과대학의 동물 관리 위원회로부터 승인받았다. 마우스는 실내 공기 및 실온에서 12시간의 명암주기로 빛에 노출시켰다. 6주령 암컷 C57BL/6 마우스(Koateck, Pyeong Taek, Korea)를 수용 마우스(recipient mice)로 사용하였다. M. Okabe(오사카 대학) 박사가 제조한 GFP가 형질전환된 마우스(Osaka University, Osaka, Japan)는 RIKEN BRC [BRC No. C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)C14-Y01-FM1310sb]으로부터 얻었고, 수용 마우스와 동일한 MHC를 가진 동계(syngenic) 마우스를 공여 마우스(donor mice)로 사용하였다.
- [0045] (2) 환자군 선정
- [0046] 간암으로 진단되어 간절제가 예정된 간경변 환자 또는 간경변 환자이지만 간이식의 기회가 없는 환자를 임상 실험의 대상자로 선정하였다. 필요조건은 동의서가 있는 자, 가임여성인 경우 피임이 가능한 자, 그렇지만 생존가능성이 적어도 3개월은 되는 자, 그리고 연령이 20-70세인 자로 하였다. 제외기준은 연령이 < 20세 혹은 > 70세인 환자, 임신이나 수유중인 여성, 급성감염이 있거나 예상이 되는 자, 동의서가 없는 자, 급성 간성 혼수인 환자 및 심부전이 있거나 혈소판 3만 이하, INR>2.2, Cr>2.5로 출혈성경향이 있는 경우로 설정하여 해당 환자를 제외하였다.
- [0047] 1-2. 공여 세포의 준비
- [0048] (1) 마우스 실험에서 이식된 공여세포의 준비
- [0049] GFP로 형질전환된 마우스를 경추 탈골시켜 희생시킨 후, 골수를 분리하였다. 25G 니들을 사용하여 무혈청 RPMI-1640 (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) 배지에서 대퇴골 및 경골의 골수강(medullary cavities)으로부터 골수를 분리하였으며, 이를 여과시키고, 5분 동안 1200rpm으로 원심분리시켰다.
- [0050] 분리된 골수 MNC(mononuclear cell)는 RBC 용해 용액(물 내의 0.15M NH_4Cl , 10mM NaHCO_3 , 10mM EDTA-disodium)에서 배양하였고, 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline)으로 두 번 세척하였다.
- [0051] Lin-Sca-1+c-kit+HSC(haematopoietic stem cell)는 MNC에서 자기 세포 분리 시스템(Magnetic cell separation systems)(Miltenyi Biotec, Germany)을 통해 획득하였다.
- [0052] (2) 임상실험에서 이식된 공여세포의 준비
- [0053] G-CSF $10\mu\text{g/kg}$ 를 하루에 한번 4일 동안 환자에게 피하주사하여 골수 줄기세포를 가동화시켰다. 가동화의 시작은 담당 주치의가 말초혈로 줄기세포가 최대로 가동화 되었다고 생각될 때로 결정되, 대략 3-4일의 G-CSF 투여 후 다음 날이 되었으며, 말초혈 백혈구(WBC) > 5,000/ μL 이상 혹은 말초혈 CD34+ 혹은 CD133+ 세포가 > 5/ μL 인 날이었다.
- [0054] 혈액 분반술은 CS-3000 혹은 COBE 스펙트라(spectra)를 이용해서 시행하는데, CS-3000의 경우는 단핵세포 채취를 위해 전체 혈류 속도(whole blood flow rate)를 70 mL/min, 29-60 mL/min, 26-50 mL/min의 속도로 맞춰서 진행하였다. 혈액을 분반하는 과정은 70 mL/min로부터 환자가 편안하게 느끼는 속도로 감속해 나가고, 목표로 하는 혈액 분반량은 10 L(전혈 11 + 항응고제 1)로 하였다. COBE 스펙트라를 이용하는 경우에는 전체 혈류 속도를 50 mL/min로 진행하여 10 L(전혈+항응고제)를 분반하는 것을 목표로 하였다. 모아진 단핵세포에서 CD34+ 세포가 잘 모아졌는지의 평가는 다음의 공식에 의해 평가하였다.

수학적 1

- [0055] $\text{효율(Efficacy)} = (\text{혈액분반술에 의해 얻어진 전체 CD34+세포수}) / (\text{분반술시 행전 말초혈 CD34+세포수} / \mu\text{L} \times \text{혈액분반한 총용량})$

[0056] CD133+ 혹은 CD34+ 세포 채취는 CliniMACS(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)을 이용하여 선별적으로 채취하였다. 우선 특별한 형광이 필요없는 1차 항체로 세포를 라벨링해 두고, 2차 항체로 Miltenyi Biotecs 회사의 콜로이달 수퍼-파라마그네틱 마이크로비드(colloidal super-paramagnetic microbeads)(goat, anti-rat IgG)를 준비해서 다시 한번 세포를 표식화하였다. 세포 배양액을 와이어-메쉬-분리 칼럼(wire-mesh separation column)에 통과시킨 후 강력한 자기장을 통과시켜 주었다. 자기장에 의해 붙지 못한 세포들은 버리고, 자기장에 의해 붙은 필요한 항체(CD34 또는 CD133)에 대한 세포만을 얻었다.

[0057] **참조예 2. 실험 디자인**

[0058] **2-1: CCl₄로 유발된 간손상의 자발적 치료여부 확인 실험**

[0059] C57BL/6 마우스를 대조군과 CCl₄(carbon tetrachloride)로 유발된 간염유증 그룹으로 나누었다. CCl₄를 5주간 주입한 후, CCl₄-주입 마우스 그룹을 다시 세 그룹으로 나누었다. 첫 번째는 CCl₄의 만성적 효과(chronic effect)를 평가하기 위해 5주간 마우스에 CCl₄를 주입한 후 희생시킨 그룹이었다. 두 번째는 CCl₄로 유도된 간염유증의 자발적 회복 효과를 확인하기 위하여 5주간 마우스에 CCl₄를 주입하고 5주 후에 희생시킨 그룹이었다. 마지막으로 만성 간염유증 모델에서 골수세포 이식의 효과를 확인하기 위하여 GFP가 형질도입된 마우스로부터 얻은 골수세포를 마우스에 이식시킨 후 4주 뒤에 희생시킨 그룹이었다(도 1a).

[0060] **2-2: 간 손상의 치료에 있어서, 가장 효과적인 세포 분획의 확인 실험**

[0061] 하루에 한번, 이틀 연속으로 CCl₄(10 ml/g)를 마우스 복강 내로 투여하여 간염유증 마우스 모델을 제조하였다

[0062] CCl₄로 유도된 간염유증을 가진 C57BL6 암컷 수컷 마우스를 5개의 그룹으로 나누었다(도 1b): CCl₄ 대신에 오일을 주입한 음성 대조군; CCl₄만 주입한 양성 대조군; G-CSF만 주입한 군; 단핵구 세포(mononuclear cells, MNC)를 주입한 군; 조혈모 세포(haematopoietic stem, HSC)를 주입한 군 (Lin-Sca-1+c-kit+HSCs).

[0063] G-CSF만 주입한 실험군에서는 마우스에 G-CSF(5 mg/mouse)를 이틀간 연속으로 피하 주사하였으며, 골수세포를 이식받은 군에서는 마우스에 CCl₄ 주입한 후 다음날에 GFP 공여 마우스로부터 유래된 MNC 또는 HSC를 투여하였다. 1주일 후 마우스를 희생시키고, 유세포 분석으로 사멸된 간세포(hepatocyte)의 비율을 측정하였다. 간의 손상 정도는 조직학적 분석(histological analysis)을 통해 결정하였다. 간 손상과 관련된 인자의 발현 정도는 면역조직화학 검사(immunohistochemistry) 및 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction)으로 확인하였다.

[0064] **2-3. 임상실험 디자인**

[0065] 임상실험을 위해 G-CSF로 가동화된 단핵세포를 다시 CD34+세포로 분리해서 주입한 제 1군, 단핵세포를 그대로 이식한 제 2군, 혈액 분반술의 과정을 거치지 않고 G-CSF만을 환자에 주사한 제 3군, 일반적인 방법으로 치료하는 제 4군(대조군)으로 나누었다.

[0066] **참조예 3: 실험방법**

[0067] **3-1. 조직병리학적 염색(histopathological staining)**

[0068] 조직학적 연구를 위해 간을 제거하여 10% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)으로 고정하고, 파라핀 내에 넣었다. 섬유증의 정도를 분석하기 위하여 조직의 각 부분을 헤마톡실린(haematoxylin), 에오신(eosin) 및 시리우스 레드(Sirius red)로 염색하였다. 각 마이크로그래프(micrograph)의 컬러 임계값을 설정하기 위하여 빨간색으로 염색된 콜라겐 섬유의 픽셀수를 추출하였다. 간 내에서 섬유화의 퍼센트는 간의 전체 영역을 빨간색 영역으로 나눔으로써 계산하였다.

- [0069] 3-2. 면역조직화학(Immunohistochemistry)
- [0070] 면역조직화학 분석을 위해 간의 각 영역을 4℃에서 마우스 α -평활근 액틴(α -SMA)(abcam, # ab5694, Cambridge, MA, USA)에 대한 토끼의 다클론 항체로 밤새 배양하였다.
- [0071] 면역반응성은 마우스 및 토끼 IgG (DakoCytomation, Denmark)에 대한 페록시다아제-결합 2차 항체로 탐지하였고, 헤마톡실린(haematoxylin)으로 대비염색하였다.
- [0072] 3-3. 실시간 중합효소연쇄 반응(RT-PCR)
- [0073] 실시간 PCR을 위한 RNA는 각 실험 마우스에서 트리졸(TRIZOL) 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 추출하였다. 역전사는 역전사 시스템(Promega, Madison, WI, USA)으로 수행하였다. PCR 수행 시 사용한 프라이머는 하기와 같다.
- [0074] GAPDH
- [0075] 5' -GTC TTC TCC ACC ATG GAG AAG GCT-3' (서열번호 1)
- [0076] 5' -CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA-3' (서열번호 2)
- [0077] 콜라겐
- [0078] 5' -TGG GAT TCC CTG GAC CTA AG-3' (서열번호 3)
- [0079] 5' -AGG TCT CCA GGA ACA CCC TG-3' (서열번호 4)
- [0080] TIMP1;
- [0081] 5' -GCA ACT CGG ACC TGG TCA TAA-3' (서열번호 5)
- [0082] 5' -CGG CCC GTG ATG AGA AAC T- 3' (서열번호 6)
- [0083] iNOS(inducible nitric oxide synthase)
- [0084] 5' -CAT GCT ACT GGA GGT GGG TG-3' (서열번호 7)
- [0085] 5' -GCT GTG TGG TGG TCC ATG AT-3' (서열번호 8)
- [0086] TNF- α (tumour necrosis factor- α)
- [0087] 5' -TTC TCA TTC CTG CTT GTG GC-3' (서열번호 9)
- [0088] 5' -GTT TGC TAC GAC GTG GGC TA-3' (서열번호 10)
- [0089] 알부민(ALB)
- [0090] 5' -TCG CTA CAC CCA GAA AGC AC-3' (서열번호 11)
- [0091] 5' -CAG CAG ACA CAC ACG GTT CAG-3' (서열번호 12)
- [0092] HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha)
- [0093] 5' -GGA ACA TGA TGG CTC CCT TT-3' (서열번호 13)
- [0094] 5' -TCT GCA TGC TAA ATC GGA GG-3' (서열번호 14)
- [0095] ABI PRISM 7000 시퀀스 탐지 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)은 실시간 PCR 증폭을 모니터링 하기 위해 사용하였다.

[0096] 3-4. 세포 사멸 분석(Apoptosis analysis)

[0097] 간 세포(10^6)를 실온에서 FITC-결합된 아넥신-V (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 및 결합완충액(binding buffer) 내의 프로피디움 요오드 화물(propidium iodide(PI, BD Pharmingen))로 10분간 배양하였다.

[0098] 아넥신-V의 발현을 위해 PI-음성 세포를 분석하였다. FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 샘플을 얻었으며, CELLQUEST 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0099] 3-5. 통계 분석

[0100] 본 발명의 데이터는 평균± 평균의 표준오차로 표시하였다. 통계적 유의성은 GRAPHPAD PRISM 소프트웨어(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 students t-test로 분석하였다. 모든 분석에는 $P<0.05$ 를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 모든 실험은 적어도 3번씩 수행되었다.

[0101] 3-6. 임상 실험 시 세포 이식후 효과 판정의 표준화 방법

[0102] 환자들은 세포주입 후 7일, 15일, 30일, 45일, 60일에 외래 방문하여 혈액검사(간 기능 실험(Liver function test), 일반혈액검사(CBC), 혈액응고실험(Coagulation test), α -페토프로테인(fetoprotein))를 받았다. 이식 후 60일째는 방사선 촬영 (abdomial CT)을 시행하였다.

[0103] 생존 예측은 Child-Pugh score, MELD(Model for end-stage disease) 점수로 임상양상을 점수화하여 비교하였다. Child-Pugh score는 간성뇌증의 정도, 복수의 정도, 혈청 빌리루빈치, 혈청 알부민치, 프로트롬빈 시간연장과 같은 5대 변수를 쉽고 간편하게 적용 평가하는 방법이다(표 1).

표 1

	1	2	3
간성뇌증정도	없음	약간(stage 1-2)	자연발생(stage 3-4)
복수의 정도	없음	약간, 가역적	불응성
혈청 빌리루빈(mg/dL)	<2.0	2.0-3.0	>3.0
혈청 알부민(g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
프로트롬빈 시간연장(sec)	0-4	4-6	>6

[0104]

[0105] 그러나 간성뇌증의 정도 및 복수의 정도 판단은 주관적인 요소가 많이 반영되어, 혈청 크레아티닌, 빌리루빈, 프로트롬빈의 국제표준화비(INR) 및 간질환 원인 등으로 구성된 MELD 방법도 사용하였다(표 2).

표 2

Mayo의 MELD score 방식
$9.6 \times \log_e (\text{creatinine, mg/dL}) + 3.8 \times (\log_e [\text{bilirubin mg/dL}] + 11.2 \times \text{Loge [INR]} + 6.4 \times \text{간경변의 원인 [0알코올성 혹은 담도정체성, 1 그 이외의 경우]})$
소아의 score 방식
PELD 1 (연령, bilirubin, INR)
PELD 2 (bilirubin, INR, albumin, 성장장애)
PELD 3 (bilirubin, INR, albumin, 성장장애, 연령)
생존율 예측
$-1.039 \times [\text{albumin (mg/dL)}] + 1.909 \times \log_e [\text{INR}] + 1.207 \times \log_e [\text{creatinine, (mg/dL)}]$

[0106]

[0107]

간 부피는 간문맥의 색전술을 시행할 경우 상복부의 CT 촬영으로 색전술 전 부피, 색전술 후 2주, 그리고 2주 간격으로 2회 간부피를 측정하여 간의 비대(Hypertrophy)를 비교하였다(색전술을 실시하지 않는 경우에는 광범위한 간절제술 전 부피로 대신함).

[0108]

광범위한 색전술 후 예측되는 간 부피 (II, III 분절)를 2주 간격으로 간의 부피가 정상화 될 때까지 같은 방법으로 측정하였다. CT상 측정 방법은 2-mm 시준(collimation), 3-mm 섹션 두께(section thickness), 3-mm 재구성 간격(reconstruction interval), 350 윈도우 폭(window width) 및 50 HU 윈도우 레벨(window level), 그리고 소프트-티슈 커널(soft-tissue kernel)을 기준으로 하였다. 횡단 스캔(Transverse scan)은 문맥기(portal venous phase)로 측정하여 전체 간부피, 남겨질 간부피 (segments II and III) 및 종양의 부피를 측정하였다.

[0109]

실시예 1: 이식된 골수세포의 이동성 확인

[0110]

이식된 골수세포가 손상된 장기로 이동하려는 특이적 귀소본능을 확인하기 위해, 형질전환 GFP 마우스에서 분리된 MNC를 CCl_4 가 주입된 수용 마우스에 이식시켰다.

[0111]

아무것도 처리하지 않은 정상 마우스에 GFP-양성 MNC를 이식시켜 대조군을 제조하였다. 이식 후 일정시간이 지나서 간, 골수, 비장 및 폐를 분리하고, GFP의 강도를 유세포 분석으로 측정하였다. 그 결과, 정상 마우스의 간, 비장, 골수 및 폐에서 GFP-양성 세포의 분포 비율 차이는 없었다(도 2a). 반면에, 간-손상 마우스에서 골수세포는 비장, 골수, 폐보다는 주로 간으로 이동되어 있는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$)(도 2b). 즉, 이식된 골수세포는 건강한 공여 마우스의 골수로 이동하기 보다는 만성 간-손상 공여 마우스의 손상된 간으로 이동되는 것을 확인할 수 있었다.

[0112]

실시예 2: 골수 이식을 통해 자발적으로 치유되지 않는 간섬유증의 병리적 손상 개선 확인

[0113]

간섬유증의 치료가 골수세포의 이식 또는 자발적인 회복으로 이루어지는지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 대조군, CCl_4 주입으로 만성 간 손상이 유도된 후 바로 희생된 그룹, CCl_4 주입으로 만성 간 손상이 유도된 후 자발적 치료 기간인 5주가 지나서 희생된 그룹 및 CCl_4 주입으로 만성 간 손상이 유도된 후 골수세포를 이식한 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다.

[0114]

간성상세포 (hepatic stellate cell)는 간에서 주요 ECM(extracellular matrix) 생성 세포로 알려져 있으며, α -SMA는 이의 활성 마커로서 알려져 있기 때문에 본 발명자들은 상기 4개의 각 그룹에서 α -SMA의 단백질 발현 레벨을 확인하였다.

- [0115] 만성 간 손상이 유도된 그룹에서 α -SMA 및 시리우스 레드 염색(Sirius red stain)이 관찰됨으로써, 광범위하고 부분별하게 분포된 섬유증이 확인되었다. 콜라겐 타입 I 및 III 은 피크로시리우스(picrosirius) 절차에 따라 붉은색으로 염색되었으며, 비-콜라겐 조직은 노란색으로 염색되었다. CCl_4 처리로 인해 콜라겐 타입 I 및 III의 유의적인 축적이 유도됨으로써 섬유증이 발생하였다. 이렇게 발현이 높게 나타난 부분은 5주가 지나도 계속 존재하였으나, 골수세포 이식된 경우에는 유의적으로 발현이 약해졌다(도 3a).
- [0116] 시리우스 레드 염색에 따른 콜라겐의 양에 있어서, 섬유화된 부분은 CCl_4 주입으로 유의적으로 증가되었으며, 5주 후에는 약간 증가하였다. 그러나 골수세포 이식 시에는 상기 섬유화가 유의적으로 감소되는 효과를 확인할 수 있었다($P < 0.01$) (도 3b).
- [0117] 간 섬유증과 관련된 ECM의 유전자 발현 활성을 측정한 결과, ALB mRNA 발현은 CCl_4 주입으로 감소하였으나, 5주 후에는 자발적으로 약간 증가하였다. 골수세포를 이식한 후에는 ALB mRNA 발현이 정상 대조군의 발현과 유사할 정도로 증가하였다. 한편 CCl_4 주입한 군에서 콜라겐 mRNA의 발현과 TIMPs-1 축적은 정상대조군에 비해 증가되었으나, 이는 골수세포 이식으로 인해 또는 자발적으로 감소하였다(도 4).
- [0118] **실시예 3: 우수한 간섬유증 치료 효과를 나타내는 골수세포의 분획 확인**
- [0119] 가장 높은 간섬유증 치료효과를 보이는 골수세포의 분획을 확인하기 위해, CCl_4 를 간에 주입한 후 5개의 그룹으로 나누었다: 정상 대조군; 아무것도 처리하지 않은 군; G-CSF로 줄기세포를 가동화시킨 군; MNC를 이식한 군; 및 HSC를 이식한 군.
- [0120] 조직학적 분석(histological assay) 결과, 정상대조군에서는 중심정맥 주위에 콜라겐이 축적되지 않았다. G-CSF 처리 후에는 간 섬유증의 정도가 눈에 띄게 줄었으며, 시리우스 레드 염색에서 콜라겐 타입 I 및 III의 부위가 유의적으로 감소하였다.
- [0121] MNC 또는 HSC 세포들을 이식한 군에서도 섬유증과 세포 사멸이 개선되었다. 유의적으로 증가된 α -SMA 활성과 CCl_4 주입으로 유도된 세포사멸은 G-CSF 투여 및 MNC, HSC 세포들의 이식으로 감소하였다(도 5a-c).
- [0122] 간에서의 섬유생성은 ECM의 양적 변화 및 조성 변화와 깊은 관련이 있는데, 이 과정에서 간성상세포 (hepatic stellate cell)는 수축성 단백질을 발현하고, ECM 특히, 섬유상 콜라겐(fibrillar collagens)을 많은 양으로 분비한다. 또한 기질 MMP와 TIMP의 불균형이 간 섬유증의 주요 원인으로 보고되고 있으므로, 본 발명자들은 콜라겐, TIMP의 발현양을 확인해보았다(도 6a).
- [0123] 또한 급성 간 손상은 염증과 동반되어지므로, iNOS, HIF-1 α 및 TNF- α 발현 레벨을 확인하였다. 대조군과 비교했을 때, CCl_4 처리한 마우스에서 콜라겐 I의 양은 증가하였으며, G-CSF 주입, MNC 이식 또는 HSC 이식 시 그 양은 유의적으로 감소하였다. 콜라겐과 반대로, CCl_4 처리한 마우스에서 TIMP-1은 G-CSF 주입, MNC 이식 또는 HSC 이식 시 발현양이 감소하였다. 면역반응 하에서 증가하는 iNOS, HIF-1 α 및 TNF- α 와 같은 인자들은 CCl_4 처리로 증가하였으나, G-CSF의 주입, MNC 이식 또는 HSC를 이식했을 때 다시 감소하였다. 다만, MNC를 이식한 군과, HSC를 이식한 군에서는 유의적인 차이가 없었다(도 6b).
- [0124] 여러 실험군 중에서 G-CSF로 조혈모세포를 가동화시킨 군 및 MNC 또는 HSC를 이식한 군에서 간섬유증 치료효과가 확인되었으며, 그 중에서 조혈모세포(Lin-Sca-1+c-kit+조혈모세포) 이식 군에서 가장 높은 간섬유증 치료 효과를 확인할 수 있었다.

[0125] **실시예 4: 임상실험의 진행 및 그 결과**

- [0126] 수술 전의 여러 가지 다양한 변수에 의한 결과 해석의 어려움이 예측되어, 이를 기준으로 비교하기 보다는 수술전 색전술을 실시하면서 말초혈줄기세포를 동시에 주입하고 이의 효과를 색전술 전후로 비교하기로 하였다. 따라서 대상자가 광범위한 간절제술이 필요한 환자에서 선별하여, 우엽의 광범위한 간절제술이 필요하면서 동시에 수술전 색전술이 필요한 경우로만 제한하여 실시하였다.

[0127] 4-1. G-CSF에 의한 골수 줄기세포 가동화

[0128] 혈액 분반술은 COBE 스펙트라를 이용해서 시행하였고, 색전술 당일 오전 1회 실시하여 아무런 조작 없이 상온에 보관하였다가 오후 색전술 시 세포를 간 문맥을 통해 주입하였다.

[0129] 표 3에서 알수 있듯이 충분한 양의 단핵세포를 얻을 수 있었고, 혈액분반술 과정의 어떤 부작용도 나타나지 않았다. 환자에게 주입된 세포유형별 세포수를 보면 혈액 분반술에서 얻어진 단핵세포를 그대로 주입한 군이나 이렇게 모아진 세포를 클리니맥스를 이용해 CD34+ 세포를 분리해서 주입한 모든 군에서 한번의 혈액 분반술 만으로도 충분한 세포를 얻어 주입할 수 있었다. 주입된 세포를 단핵세포, CD34+세포, CD133+세포로 나누어 비교를 해 보아도 통계적으로 의미있는 차이를 나타내지는 않았다.

표 3

	Collecting total volume (mL)	MNCs applied (x10 ⁹)	CD34+ applied (x10 ⁷)	CD133+cell applied (x10 ⁷)
MNCs infusion	79± 12.6	12.3±4.7	5.9 ±4.2	3.7 ±2.6
CD34+ cells infusion	46 ±7.6	19.4 ±5.8	5.0 ±4.0	2.0 ±1.2

[0130]

[0131] 4-2. 자가 골수줄기세포의 주입

[0132] 객관적인 비교를 위해 미리 간문맥 색전술을 수술전에 시행하여 간절제까지의 기간 및 간부피 증가 여부를 비교하였다. 색전술 시술을 요약하면, 초음파 guide로 경피 좌측 간문맥을 찢어 문맥 조영술(portography)을 하였고, 간문맥의 삼분지(trifurcation)를 확인한 후 좌측 간문맥으로 들어온 카테터를 우측 간문맥으로 진입시켰다. PVA 입자, 젤폼(gelfoam) 및 코일(coil)로 우측 앞쪽, 뒤쪽 간 문맥을 색전한 후 카테터를 왼쪽 간문맥에 위치시키고, 시술전 혈액 분반술로 모아진 골수세포를 주입하였다. 시술을 마치고 카테터를 제거하면서, 출혈을 막기 위해 카테터 구멍을 코일로 막고 시술을 종료하였는데 시술 과정의 특별한 부작용은 없었다.

[0133] 자가줄기세포는 간문맥 혹은 간동맥을 통해 세포를 주입하였다. 수술하는 환자인 경우는 직접 수술중에 주입할 수도 있고 간문맥 색전술을 미리 시행할 경우는 색전술과 함께 주입할 수도 있다. 50 mL가 초과 되면 나머지 양은 말초혈액을 통해 주입하였으며, 간문맥의 혈압을 주의 깊게 측정하면서 실시하였다. 준비된 세포는 각각 40 mL 정도씩 둘로 나눈 후 막히지 않은 간문맥으로 나누어 5분 이내에 주입하였다. 이때 5-F 코브라 카테터(cobra catheter)를 간문맥에 형광 투시경 하에 주입하였다. 세포를 주입 후 포털 카테터(portal catheter) 및 시스(sheath)를 제거하였다. 이때 특별한 전처치는 필요하지 않았으며 전체 수술시간이 3-5 시간 소요되었다. 주입하는 세포는 될 수 있으면 최대량을 주입하여야 하므로 단핵세포 기준으로 최소 1x10⁹ 개, CD34+세포로는 7x10⁶ 개 이상 되도록 주입하되, 채집된 전체량을 주입하였다.

[0134] 4-3. 자가 이식후 간기능 및 임상점수(MELD 점수)의 평가

[0135] (1) 인도사이아닌 그린(Indocyanine green) R15

[0136] 대상 환자들의 역동적인 간기능을 확인하기 위해 본 발명자는 간의 전체적인 기능을 인도사이아닌 그린(ICG)을 이용해 확인하였다. ICG 검사는 간혈류 장애를 평가하는 방법으로 내부제거율이 높은 ICG 염색을 이용하는 것이다. 원리를 간략히 요약하면, ICG 정맥주사 후 혈청알부민과 α-1-지질단백질이 결합하여 혈관 내에서 이동하다가 간에 일차 순환 시 선택적으로 유입되어 담즙으로 배출되는 능력을 보는 것이다. 본 연구에서는 ICG R15(15분 정체율), ICG Rmax (최대제거율), 간류 간 ICG Rmax, K 소실률, ICG Clearance, ICG Bmax(담즙내 최대 배출률) 중 ICG R15(15분 정체율)을 이용하였는데 시행하기가 비교적 간편하다. 일반적으로 15% 이상이 되면 간기능의 이상으로 수술 불가능하다고 생각되는데, G-CSF만을 주입한 군과 단핵세포 투여군은 수술 불가능 상태에서 시작되었으나 이후 자가이식 후 단핵세포군에서는 ICG가 낮아져 수술이 가능하였다(도 7a).

[0137] (2) 임상점수 (MELD score)의 변화

[0138] 혈청 크레아티닌, 빌리루빈, 프로트롬빈 시간의 국제표준화비(INR) 및 간질환 원인 등으로 구성된 생존예측을 위해 고안된 방법 중의 하나인 MELD(Model for end-stage liver disease score) 점수를 각 군에서 비교하였다. 각 군간의 의미 있는 차이는 없었으나 단핵세포 이식 군에서는 임상점수의 호전을 확인할 수 있었다(도 7b).

[0139] (3) 시간에 따른 기본 간 기능 검사 소견의 변화

[0140] 입원 시 기본검사와 더불어 외래방문일은 세포 주입후 1주, 2주, 4주, 8주, 6개월에 방문하여 혈액검사 (Liver function test, CBC, Coagulation test, α -fetoprotein)을 측정하여 비교하고, 방사선 촬영 (abdomial CT)을 실시하였다. 기본적인 간기능은 AST, ALT, 알부민 및 총 빌리루빈(bilirubin)으로 확인하였는데, 시작 및 수술 전에 손상된 간 기능이 이식 후 호전되는 양상이었다. 특히, 다른 군에 비해 CD34+세포 이식 군에서는 ALT 와 총 빌리루빈이 유의적으로 호전되었다(도 8).

[0141] 알부민은 수술 후 시간경과에 따라 상승하였지만 각 군간의 의미는 없었고 총 빌리루빈은 이식군보다는 대조군과 G-CSF군에서 감소소견을 보였다(도 9).

[0142] 간의 역할중의 하나인 응고인자 생성 및 지혈작용에 대한 분석을 위해 INR 및 피브로노겐(Fibrinogen)의 수치를 비교하였는데 단핵세포 및 CD34+세포군에서 INR이 감소하는 추세를 보이고 있으나 통계적으로 의미 있는 자료를 얻지는 못하였다(도 10).

[0143] (4) 자가 이식 후 간부피의 변화 확인

[0144] G-CSF군 보다는 단핵세포 이식군에서 기능적으로 남아있는 간부피 (FLRV)가 색전술 후 증가되어 손쉽게 간 절제술을 진행할 수 있었고, 단핵세포이식군 보다는 CD34+세포군에서 그 효과가 우수함을 알 수 있었다. 이는 대조군이었던 2례가 기본조건이 다른 군에 비해 월등히 우수하며 또한 대조군의 대상환자가 2례밖에 되지 않아 대조군의로의 역할을 하지 못했다고 자체적으로 평가되었다. 대조군으로 이용된 환자의 경우는 다른 군에 비해 비교적 간기능 및 간의 부피가 시작부터 양호한 상태여서 정확한 결론을 도출하기에 문제가 있었는데 대조군의 수가 증가하면 해결될 것으로 기대하였다(표 4).

표 4

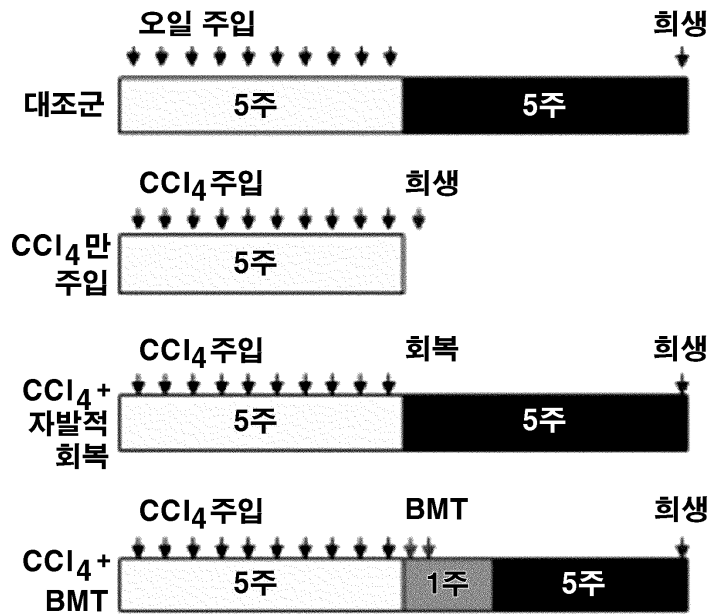
	TLV(mL) Baseline	FLRV(mL) Baseline	Absolute gain of FLRV (mL)	Relative gain of FLRV(%)
Control	1,419.4 ± 140.0	545.2 ± 50.6	102.7 ± 14.8	7.4 ± 0.1
G-CSF only	1,157.3 ± 132.1	282.9 ± 28.3	30.2 ± 24.0	4.0 ± 2.3
MNCs infusion	1,217.4 ± 95.5	432.2 ± 79.8	44.5 ± 34.0	3.9 ± 2.0
CD34+ cells infusion	1,398.6 ± 204.2	648.5 ± 173.2	77.4 ± 31.2	3.8 ± 3.2

[0145]

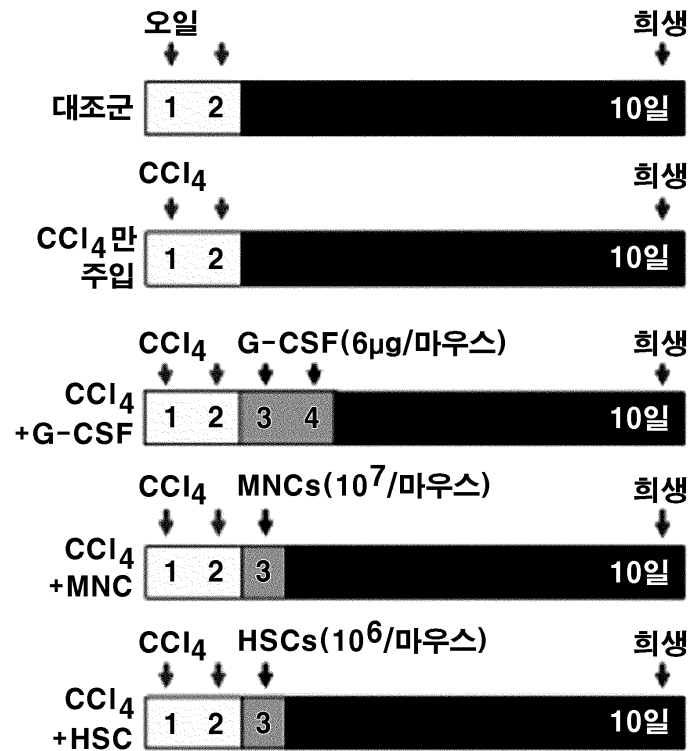
[0146] 실제 간의 복부 CR 소견에서 절제될 우측 간과 남겨질 좌측 간을 다른색으로 구별하여 부피를 측정하여 비율로 비교하여 보았다. 특히 단핵세포 및 CD34+세포 이식군 등 두 군에서 복부 CT 소견상 색전술과 이식 실시후 남겨질 간의 부피가 현격히 증가하였고 이로 인해 좀더 빨리 광범위 간절제술을 시행할 수 있었다(도 11).

도면

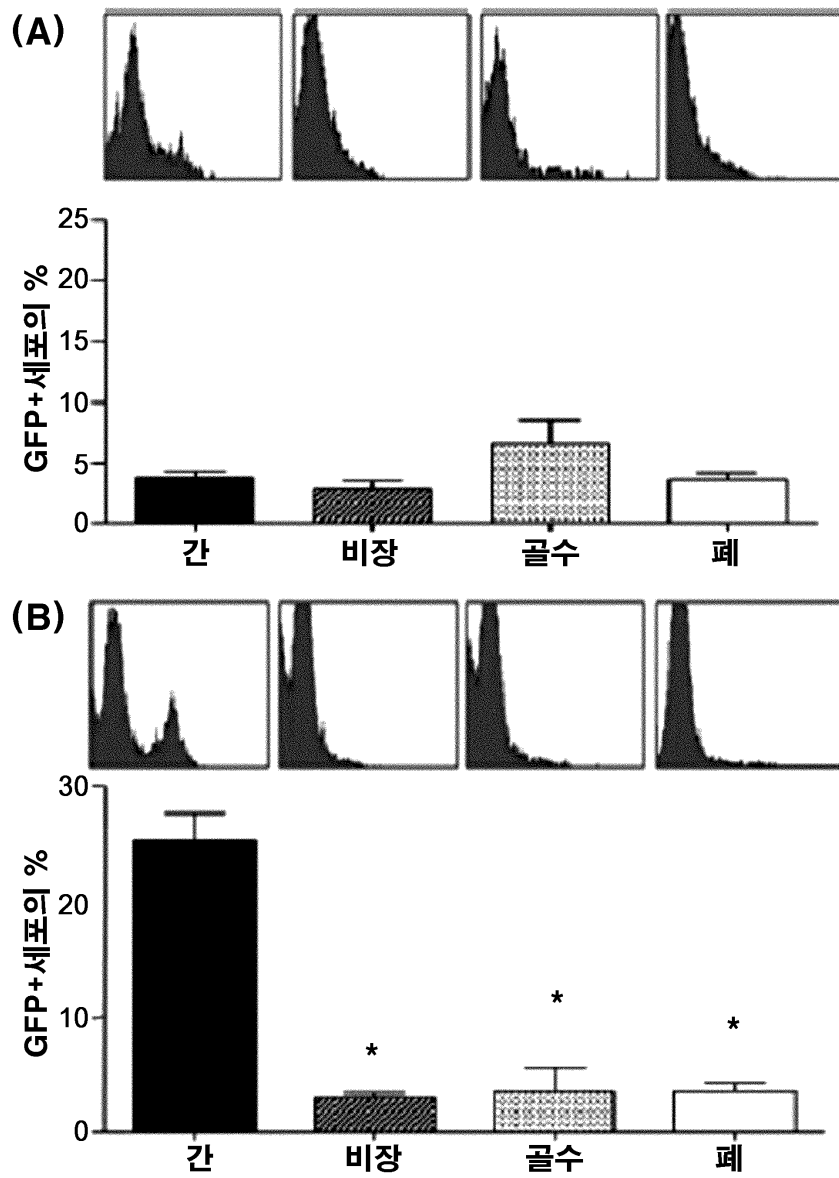
도면1a



도면1b

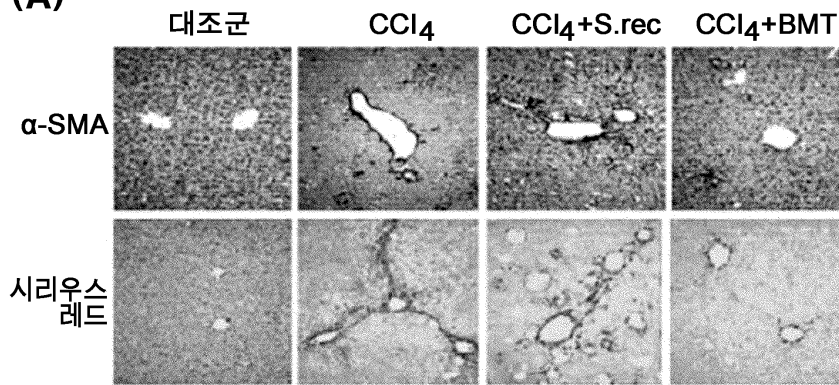


도면2

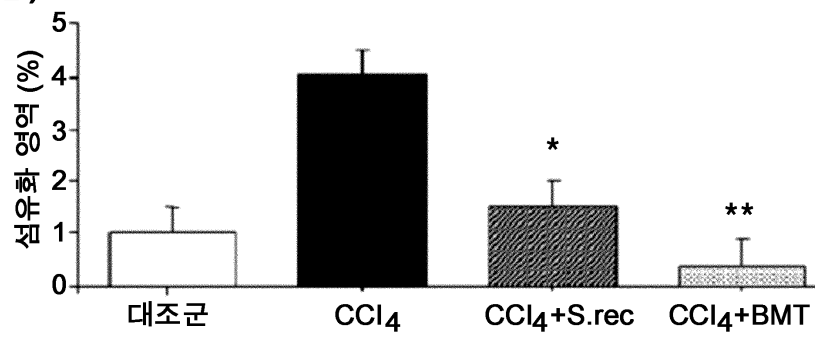


도면3

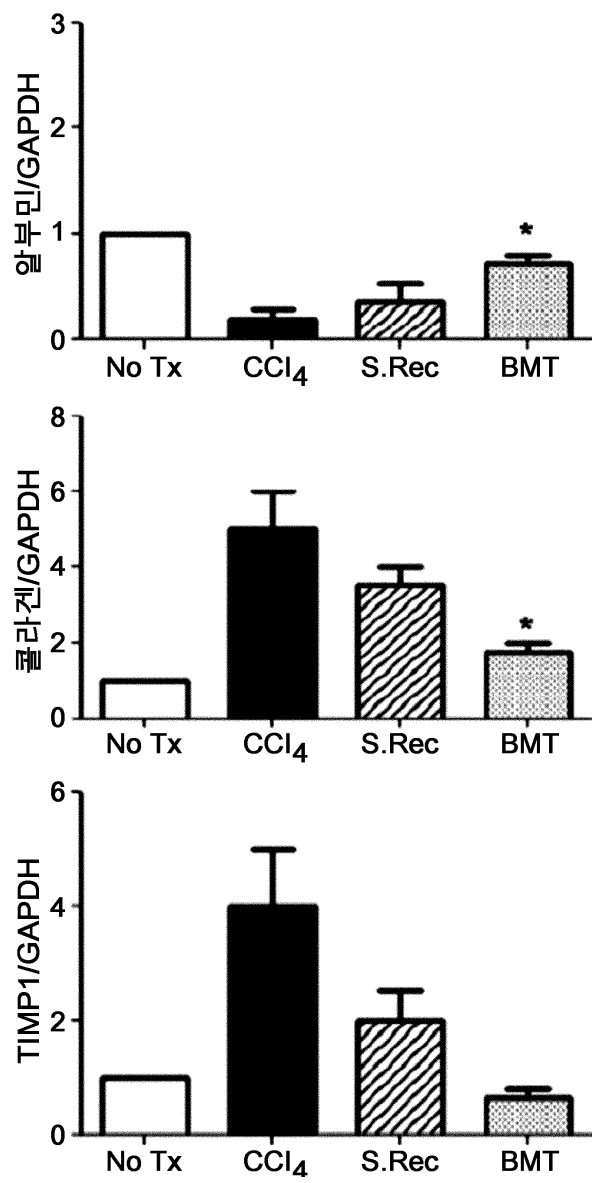
(A)



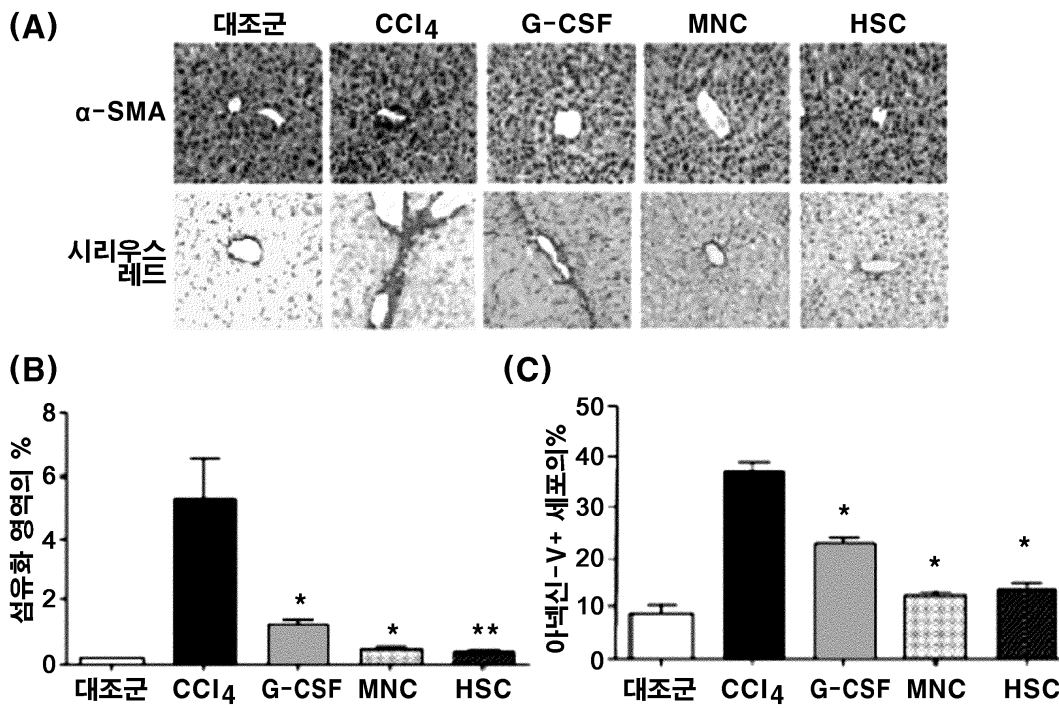
(B)



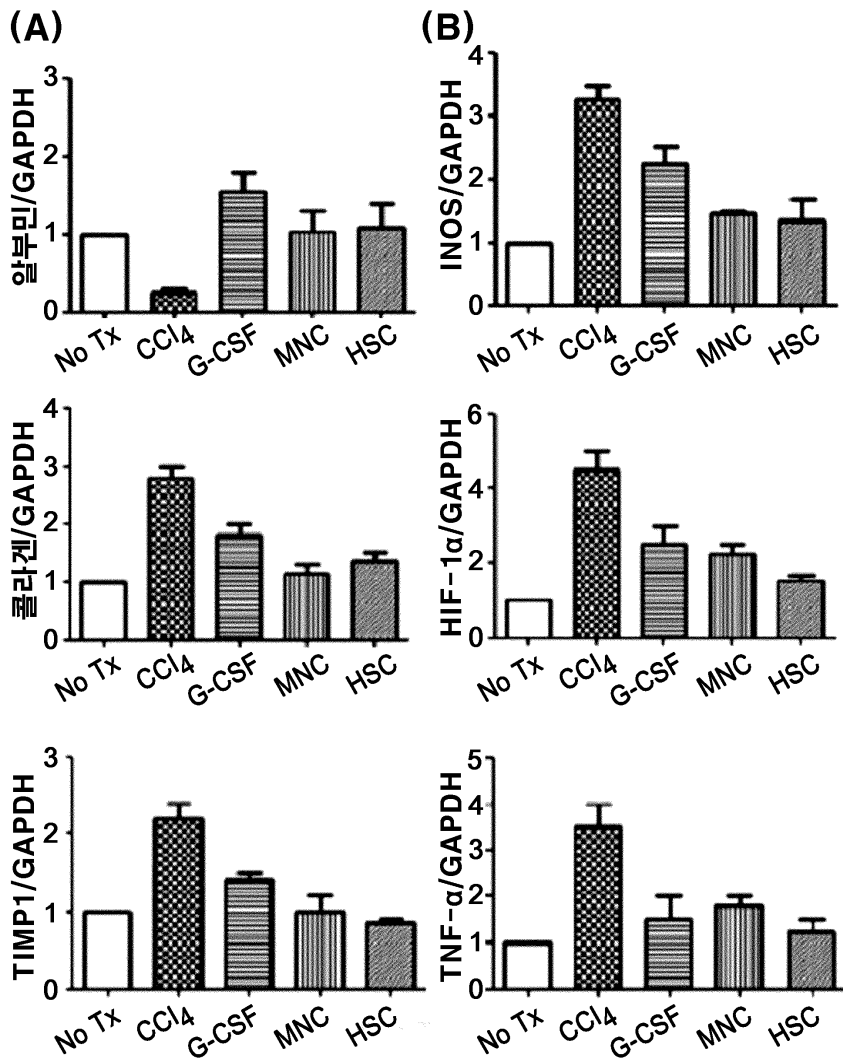
도면4



도면5

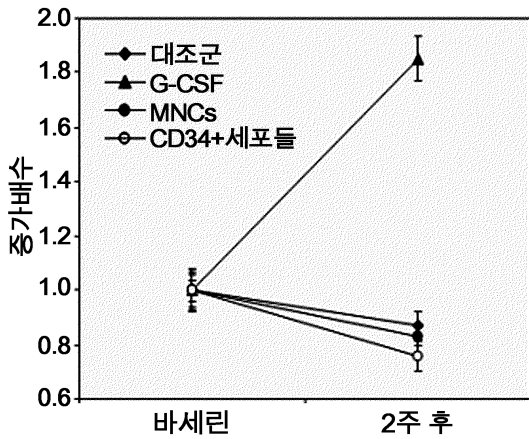


도면6

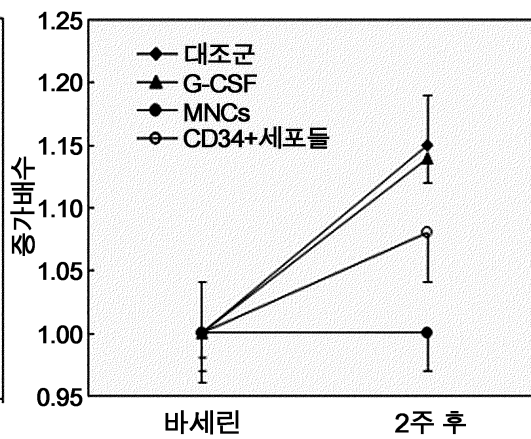


도면7

(A) ICG

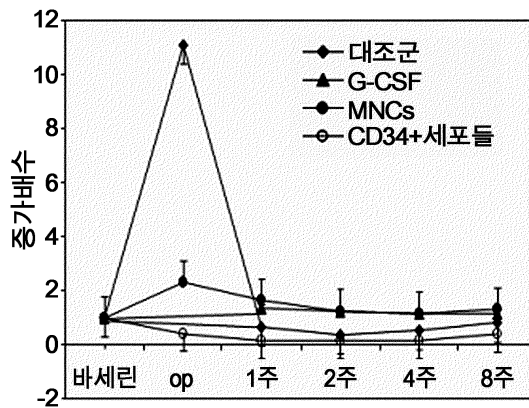


(B) 임상 점수

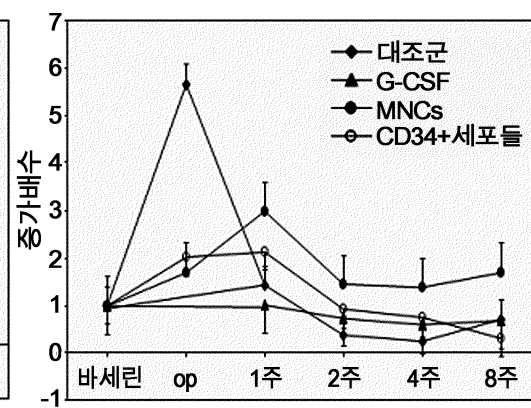


도면8

(A) AST

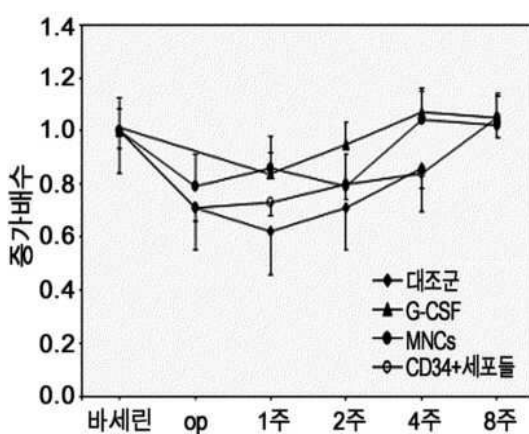


(B) ALT

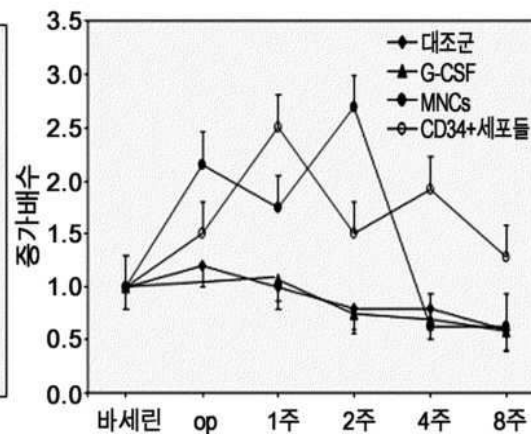


도면9

(A) 알부민

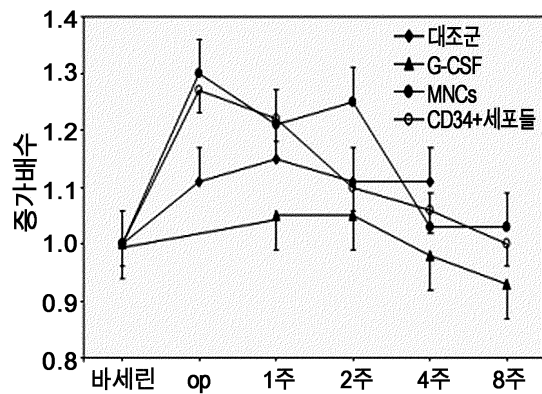


(B) 빌리루빈

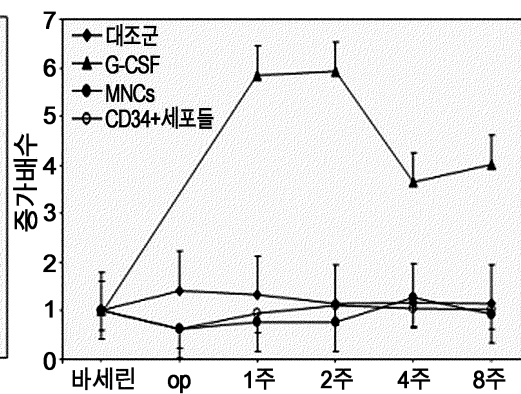


도면10

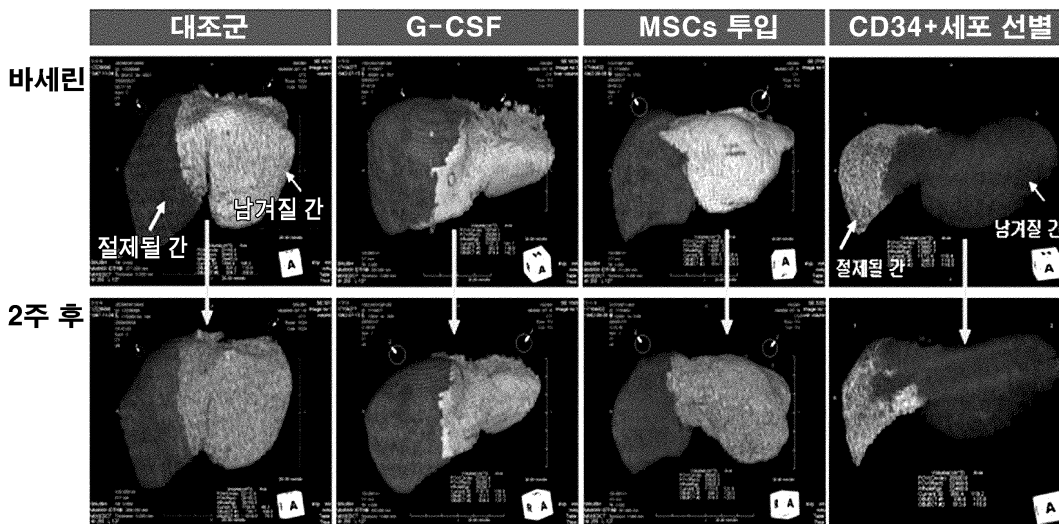
(A) INR



(B) 피브로노겐



도면11



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Compositions for increasing liver volume to resect liver
- <130> PA110873/KR
- <150> KR10-2010-0114148
- <151> 2010-11-16
- <160> 14
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer for GAPDH
- <400> 1

gtctttctcca ccatggagaa ggct	24
<210> 2	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer for GAPDH	
<400> 2	
catgccagtg agcttcccgt tca	23
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer for collagen	
<400> 3	
tgggattccc tggacctaa	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer for collagen	
<400> 4	
aggtctccag gaacaccctg	20
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer for TIMP1	
<400> 5	
gcaactcgga cctggtcata a	21
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer for TIMP1	

<400>	6	
cggcccggtga tgagaaact		19
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for iNOS	
<400>	7	
catgctactg gaggtgggtg		20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for iNOS	
<400>	8	
gctgtgtggt ggtccatgat		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for TNF-alpha	
<400>	9	
ttctcattcc tgettgtggc		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for TNF-alpha	
<400>	10	
gtttgctacg acgtgggcta		20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> primer for ALB

<400> 11

tcgctacacc cagaaagcac

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for ALB

<400> 12

cagcagacac acacggttca g

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for HIF-1 alpha

<400> 13

ggaacatgat ggctcccttt

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for HIF-1 alpha

<400> 14

tctgcatgct aaatcgagg

20