



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0003760
(43) 공개일자 2012년01월11일

(51) Int. Cl.

A61K 35/12 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0064540

(22) 출원일자 2010년07월05일

심사청구일자 2010년07월05일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 중암로 1 (안암동5가, 고려대역)

(72) 발명자

김중훈

서울특별시 용산구 녹사평대로 286, 108동 301호 (이태원동, 이태원주공아파트)

우동훈

서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 서관 305호 줄기세포실험실 (안암동5가, 고려대학교)

(74) 대리인

이문섭

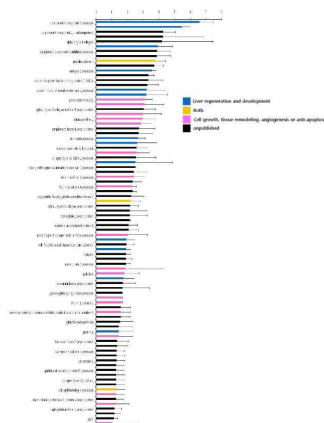
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 인간 배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 배양한 조건배지를 함유하는 간질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 인간 배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 배양한 조건배지를 함유하는 간질환 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 조건배지는 인간배아줄기세포 유래 간세포가 분비하는 단백질들을 포함하고 있고, 이들 단백질 중 다수의 단백질이 직접 또는 간접적으로 손상된 간의 회복에 관여하는 물질들을 포함하고 있어 간질환 개선 및 치료에 도움이 될 뿐만 아니라, 간질환 치료 목적으로 세포를 이식하지 않고도 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화한 간세포 유래 물질을 전달하여 치료 효과를 얻을 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K000441

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 인간배아줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화유도기법 개발

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010년 04월 01일 ~ 2011년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 ICG(indocyanine green) 염색 후 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리된 ICG+ 간세포 집단을 배양한 조건배지를 유효성분으로 함유하는 간 질환 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조건배지는 표 1에 개시된 84개의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 간 질환 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조건배지는 표 2에 개시된 34개의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 간 질환 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조건배지는 인간 배아줄기세포를 간세포 분화 제제에 의해 유도 분화시키고, 상기 유도 분화된 세포를 ICG 염색 후 LMPC 방법으로 ICG+ 간세포 집단을 분리하고, 상기 분리된 ICG+ 간세포 집단을 동물 세포 배지에서 1-3일간 배양하고, 상기 배양물을 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 간 질환 치료용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 동물세포 배지는 DMEM/F12, 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄을 포함하는 것을 특징으로 하는 간 질환 치료용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 조건배지는 5×10^5 내지 1×10^6 세포 당 1 ml의 배지를 이용하여 배양한 것을 특징으로 하는 간 질환 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 배양한 조건배지를 함유하는 간 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 간 질환의 간 이식 치료에 있어서 가장 큰 문제점은 공여자의 부족이다. 이러한 간 이식의 문제점에 대한 대안으로 최근 간세포를 이용한 세포 대체 치료방법이 새로운 대안으로 떠오르고 있고, 이에 따라, 무한 증식할 수 있는 인간 배아줄기세포는 간 질환의 세포 치료에 사용될 간세포를 다량 공급할 수 있는 재료로 각광을 받고 있다.

[0003] 하지만, 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화한 간세포를 간질환 세포 치료제로서 사용하기에는 현재까지 몇 가지 한계점 가지고 있다. 첫째, 인간 배 발생 과정의 정확한 이해 부족으로 인한 정확한 분화 유도 기술의 부재로 완벽한 정상 간 기능을 가진 간세포를 만들기 어렵다는 것이고, 둘째, 상기 이유에 기인하여 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 간질환 실험동물에 이식 시 낮은 생착률을 보이며, 이에 따라 손상된 간 기능을 효율적으로 회복시킬 수 없다는 것이다. 셋째, 분화 유도 후 잔여 미분화 줄기세포로 기인한 기형종 생성 등의 부작용이 있다. 따라서 인간 배아줄기세포로부터 분화 유도한 간세포를 간질환의 세포 대체 치료 목적으로 사용하기에는 현재까지 많은 어려움이 따른다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화한 간세포 유래 물질을 이용하는 경우, 간세포 이식에 따른 부작용을 방지하면서도 간질환 치료효과를 얻을 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 세포 이식을 통한 간질환의 세포 대체 치료법을 대신하여 인간 배아줄기세포 유래 간세포를 간질환 치료 목적에 보다 안전한 방법으로서, 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화한 간세포 유래 물질을 직접 주입함으로써 간질환을 치료할 수 있는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 ICG(indocyanine green) 염색 후 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리된 ICG+ 간세포 집단을 배양한 조건배지를 유효성분으로 함유하는 간질환 치료용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명에서, 상기 “줄기세포”는 시험관 내 배양에서 간세포로 분화할 수 있는 능력을 가지는 것으로 포유동물 유래의 세포, 바람직하게는 만능 줄기세포(pluripotent stem cells) 또는 상기 세포의 기원 세포일 수 있다. 본 발명에서의 포유동물은 특별히 제한되지 아니하며, 설치목(rodentia), 토끼목(lagomorpha), 영장류(primates), 식육류(carnivora), 기제류(perissodactyla) 및 우제류(artiodactyla)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 포유동물일 수 있다. 일 양태로서 포유동물은 마우스, 토끼, 소, 돼지, 원숭이, 인간일 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간이다.

[0008] 또한, 상기 “만능 줄기세포(pluripotent stem cells)”란 시험관 내 배양에 의해 미분화 상태로 유지된, 거의 영속적 또는 장기간 세포 증식이 가능하며, 적당한 조건에서 삼배엽(외배엽, 중배엽, 내배엽)의 모든 계보의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 의미한다. 현재 만능 줄기세포는, 이미 배양 세포로서 널리 사용되고 있는 마우스, 원숭이, 인간 등의 포유동물 유래의 초기 배아에서 분리한 배아 줄기세포(embryonic stem cells), 배아기(embryonic stage)의 원시 생식세포에서 분리한 배아 생식세포(embryonic germ cells) 및 성체의 골수에서 분리한 다능성 줄기세포(multipotent adult progenitor cells) 등이 있다. 바람직하게는 배아줄기세포이다.

[0009] 또한, 상기 “분화”란 줄기세포로부터 특정 세포로 구조와 형태를 변화시키는 과정을 총칭하는데, 보다 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 특수화된 구조로 변화하게 된다. 이렇게 특수화된 구조를 지니게 된 세포들은 각각에게 주어진 기능을 수행하게 된다. 이렇게 각각의 기능을 수행하기에 알맞은 구조와 형태를 변화시키는 과정을 말한다.

[0010] 상기 분화는 자연발생적 분화 및 유도 분화를 포함한다.

[0011] 특정 세포 중 간세포 자연발생적 분화의 경우를 예를 들면, 수정란은 최초의 전능성 줄기세포이며, 여기에서 외배엽, 중배엽 및 내배엽의 줄기세포들을 생산한다. 3개 군의 줄기세포가 일단 생성되면 이들은 다른 배엽의 세포들을 생성할 수 없는 비가역적으로 된다. 태생기 9일째 간은 전장과 난황줄기의 사이에 있는 장관 내배엽의 한 부위가 돌출하여 발육하는데, 이 돌출된 주머니를 간썽(hepatic diverticulum)이라 한다. 이 세포들이 며칠

간의 증식후 난황으로부터 발생하는 심장을 분리하는 실질인 septum transversum으로 이동하여 간을 형성한다.

- [0012] 줄기세포로부터 특정 세포로의 유도 분화는 당업계에서 공지된 다양한 방법을 사용 또는 이를 응용하여 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 배아줄기세포의 분화 유도 방법은 본 발명자들의 선행 등록 특허인 특허(등록번호: 10-0861632)에 사용된 방법을 참고할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 줄기세포로부터 분화된 세포는 줄기세포로부터 간세포(hepatocytes)로 유도 분화된 세포일 수 있다. 보다 바람직하게는 인간 줄기세포로부터 간세포(hepatocytes)로 유도 분화된 세포일 수 있다. 본 발명의 인간 줄기세포는 가장 바람직하게는 인간 배아줄기세포이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인간 배아줄기세포로부터 간세포로 분화 유도된 세포를 분리 정제의 대상으로 하였다.
- [0014] 상기 줄기세포로부터 간세포로의 분화 유도는 간세포 분화 제제를 처리함으로써 수행될 수 있다.
- [0015] 상기 “간세포 분화 제제”는 줄기세포의 분화에 의해 획득되는 내분비 세포를 간세포 및/또는 간세포 전구세포로 분화촉진하는 생물학적 또는 합성 화합물 (예로, 펩티드, 올리고당 등)을 의미한다. 예로, 간세포 계통 세포의 성장을 촉진할 수 있는 가용성 성장 인자 (펩티드 호르몬, 시토카인, 리간드-수용체 복합체 등)가 있다. 가용성 성장 인자의 예로는 표피 성장 인자 (epidermal growth factor), 인슐린, 형질전환 성장인자 (transforming growth factor, TGF)- α , TGF- β , 섬유아세포 성장 인자 (fibroblast growth factor, FGF), 헤파린, 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, HGF), 덱사메타존 (dexamethazone) 존재하의 온코스타틴 엠(oncostatin M, OSM), 인터류킨 (interleukin, IL)-1, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자 (insulin-like growth factor, IGF)-I, IGF-II, 헤파린-결합 성장 인자 (heparin-binding growth factor, HBGF)-1 및 글루카곤 (glucagon)이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 다른 간세포 분화 제제로는 코르티코스테로이드 (corticoid), 특히 당질코르티코이드 (glucocorticoid)가 있다. 상기 화합물은 스테로이드 또는 스테로이드 모방제 (steroid mimetic agents)로 중간대사, 특히 간의 글리코겐 (glycogen) 축적 및 염증 억제에 영향을 미친다. 코르티솔 (cortisol)로 예시되는 천연 생성 호르몬 및 합성 글루코코르티코이드, 예컨대 덱사메타존 (dexamethazone) (미국 등록특허 US 3,007,923) 및 그 유도체, 프레드니손 (prednisone), 메틸프레드니손 (methylprednisone), 히드로코르티손 (hydrocortisone) 및 트리암시놀론 (triamcinolone) (미국 등록특허 US 2,789,118) 및 그 유도체가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또 다른 간세포 분화 제제로는 디메틸 설펝시드 (dimethyl sulfoxide, DMSO)와 같은 유기 용매로, 디메틸아세트아미드 (dimethylacetamide, DMA), 헥사메틸렌 비스아세트아미드(hexamethylene bisacetamide, HMBA)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서는, 상기 배아줄기세포의 유전적 변형(genetic modification) 없이 세포를 고정하지 않고 살아있는 상태로 염색하는 vital dye인 ICG로 염색하는 배아줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법을 이용한다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어, ICG 염색은 Indocyanine Green이라는 암녹색의 색소를 주입하여 간세포만 특이적으로 염색함으로써 간세포를 그 이외의 특정 세포(예를 들어, 신경세포, 혈관세포 등)들과 구별하기 위한 목적으로 사용되는 염색 방법을 말한다. 본 발명에서는 인간 배아줄기세포로부터 간세포를 유도 분화한 경우, 간세포를 간세포 이외의 세포들과 구별하기 위한 목적으로 사용하였다.
- [0020] ICG 염색은 세포 고정과정을 거치지 않고 살아 있는 상태로 염색하며, Indocyanine Green 색소는 간세포의 자체적인 대사에 의해 분해되어 방출될 수 있는 vital dye이므로 간세포의 형태 및 기능성에 변화를 초래하는 부작용이 없다는 장점이 있다. 상기 ICG 염색은 ICG 0.5 ~ 1 mg/ml로 30분 ~ 1시간 동안 30 ~ 40℃에서 수행될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 용어, LMPC 방법은 목적 대상 세포를 분리 정제하는 방법으로 목적 대상 세포 둘레에 레이저 빔을 조사하여 목적 대상 세포만을 오퍼레이팅 수득할 수 있으며, LMPC 방법은 PALMMicroBeam instrument를 사용하여 수행한다 (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Germany; Cat.-No. 1440-0250).
- [0022] LMPC 방법은 LMPC 프로그램 상에서 간세포를 분리 정제함으로써 신속, 정확하게 ICG+ cell을 분리해낼 수 있다는 장점이 있다. 분리하고자 하는 목적 대상 세포를 현미경 하에서 수작업으로 간세포를 분리하는 경우 개개인의 능력차로 인해 간세포 분리 수득율에 상당한 차이가 있을 뿐만 아니라 상당한 시간 및 노력이 요구되는바 비

효율적일 뿐만 아니라 비경제적이며, 간세포 외의 다른 특정세포가 포함된 상태로 분리되어 정확성이 떨어질 가능성이 농후하다.

- [0023] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, LMPC 방법을 이용하여 ICG 염색된(ICG(+)) 간세포 집단의 물레에 레이저 빔을 조사하여 오래내어 간세포를 수득하였다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어, ICG+ 및 ICG-는 각각 ICG 염색 시 양성 반응을 보이는 세포와 음성 반응을 보이는 세포를 나타내는 바, 각각 ICG+ 세포는 외부로 암녹색을 발색하나, ICG- 세포는 외부로 암녹색을 발색하지 않는 것으로 발색 여부로 구분된다.
- [0025] 본 발명의 조성물에서, 상기 조건배지는 표 1에 개시된 84개의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다. 표 1에 개시된 84개의 단백질들은 ICG- 세포(간세포 이외의 세포들)의 조건배지에 비해 ICG+ cell의 조건배지에서 2배 이상 발현이 증가된 단백질들로, ICG+ 세포, 즉 배아줄기세포 유래 간세포에서 분비되는 단백질들 중 발현이 2배 이상 증가한 것이므로 직접적인 간세포 이식에 따른 부작용이 없으면서도 간세포를 이식한 것과 유사하게 간 질환 치료에 이용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 간질환 실험 동물모델을 이용하여 본 발명의 ICG+ cell의 조건배지를 주입한 3일 후에, 간의 손상된 부위가 회복되었으며 간 내의 간세포의 증식이 증가하였고 미세 혈관 구조도 정상적으로 회복되었음을 확인하였다 (도 4a 내지 4g 참조).
- [0027] 더욱 바람직하게는, 상기 조건배지는 표 2에 개시된 34개의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다. 표 2에 개시된 34개의 단백질들은 표 1에 개시된 84개의 단백질들 중 간 재생 및 발생에 직접적으로 관여하는 단백질, 및 간접적으로 세포의 성장, 조직 재건, 혈관생성, 세포사 방지 등에 관여하는 것으로 알려진 단백질로서 본 발명의 조성물은 이들 34개의 단백질들을 필수적으로 포함한다.
- [0028] 상기 34개의 단백질은 구체적으로, 1) 간 재생 및 발생에 관여하는 13개 단백질(complement component 3, galectin 3 binding protein, matrix metalloproteinase 2, nidogen 2, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, autotaxin isoform 2, vitronectin, quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1, (serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin), member1), matrilin 2, apolipoprotein A₁, follistatin-like 1, profilin 1), 2) 세포의 성장, 조직 재건, 혈관생성 및 세포사 방지에 관여하는 18개 단백질(peroxidasin, alpha 1 type XVIII collagen, alpha 2 type V collagen, chitinase3-like 1, fibulin 5, nephronectin, decorin, fibulin 1 isoform A, alpha 2 type VI collagen, lumican, polydom, fibulin 1 isoform C, fibulin 1 isoform D, (serin (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovabumin), member 9), clusterin, alpha 2 type VI collagen, (secreted protein, acidic, cyteine-rich), cystatin C), 및 3) 상기 두 기능을 동시에 가지는 3개의 단백질(gelsolin, growth arrest-specific 6, dickkopf homolog 3)이다.
- [0029] 본 발명의 조성물에서, 상기 조건배지는 인간 배아줄기세포를 간세포 분화 제제에 의해 유도 분화시키고, 상기 유도 분화된 세포를 ICG 염색 후 LMPC 방법으로 ICG+ 간세포 집단을 분리하고, 상기 분리된 ICG+ 간세포 집단을 동물세포 배지에서 1-3일간 배양하고, 상기 배양물을 원심분리하여 세포찌꺼기를 제거함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다. 상기 동물세포 배지는 DMEM/F12, 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물에서, 상기 조건배지는 상기 조건배지에 포함되는 단백질들의 양은 배지의 양, 배양되는 세포의 양, 및 배양기간에 따라 달라질 수 있으나, 바람직하게는 5×10^5 내지 1×10^6 세포 당 1 ml의 배지를 이용하여 배양할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서, 상기 “간질환”은 급성 간질환, 만성 간질환 또는 유전적 간 기능 손상 등을 포함하는 것으로, 구체적으로 간염, C형 간염(hepatitis C), 유육종증, 약물 알레르기, 지방간, 알코올성 간 질환, 간암, 간경변증, 임신 중독증, 비호지킨 림프종, 라이 증후군, 기타 신생아 황달, 가와사키병, 루푸스, 칸디다증, 말라리아, 렙토스피라증, 뎅기열, 간흡충증, 급성 간경화, 만성 간경화, 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases), 및 담관질환(bile duct disease) 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 치료용 조성물은 투여 방식에 따라 허용 가능한 담체를 포함하여 적절한 제제로 제조될 수 있다. 담

체(들)은 제형의 다른 성분들과 양립하고, 이것의 수용자에게 무해해야한다는 점에서 허용될 수 있어야 한다. 투여 방식에 적합한 제제는 공지되어 있으며 전형적으로 막을 통과하는, 이동을 용이하게 하는 제제를 포함할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 치료용 조성물은 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구용 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 또는 동결건조제, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 또는 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 또는 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명의 치료용 조성물을 이용하여 간질환을 치료하는 방법은 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질이 도입되는 일반적인 경로를 통하여 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 투여방법으로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러나 경구 투여시, 유효성분들이 소화될 수 있으므로 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서 분해되는 것을 보호하기 위해 제형화 하는 것이 바람직하다.

[0036] 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제 또는 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액 또는 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르2(예로, 올레인산에칠 등), 알코올류(예로, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜 또는 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제 (예로, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예로, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약제학적 담체를 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 치료용 조성물을 이용하여 간질환을 치료하는 방법은, 본 발명의 치료용 조성물을 약학적으로 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 약학적 유효량은 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명의 조성물의 투여량은 바람직하게는 성인에게 1일에 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg의 용량을, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0038] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 조건배지는 인간배아줄기세포 유래 간세포가 분비하는 단백질을 포함하고 있고, 이들 단백질 중 다수의 단백질이 직접 또는 간접적으로 손상된 간의 회복에 관여하는 물질들을 포함하고 있어 간질환 개선에 도움이 될 뿐만 아니라, 간질환 치료 목적으로 세포를 이식하지 않고 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화한 간세포 유래 물질을 전달하여 치료 효과를 가지므로, 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 직접적인 이식에 따른 여러 부작용을 배제할 수 있는 장점이 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 조건배지를 간 질환 치료 목적으로 사용할 경우, 세포 이식 시 필요한 외과적인 수술 없이, 간단한 주사 방식으로 간 질환을 치료할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화하여, 순수 분리 정제한 간세포(ICG+ cells) 및 분리정제하고 남은 간세포 이외의 세포(ICG- cells)에서 추출한 조건배지(conditioned medium)의 secretome 분석에 의해 검출된 단백질의 수를 나타내는 도면이다.

도 2는 세 번의 secretome 분석결과에서, 세 번의 실험 중 2번 이상 검출된 287개 단백질들의 ICG+ cells의 조건배지와, ICG- cells 조건배지 내에서의 상대적인 양의 비교 및 그들의 분포를 나타내는 도면이다.

도 3은 ICG+ cells 조건배지에서 ICG- cells 조건배지에 비하여 상대적으로 2배 이상 증가한 단백질 84개 중, 1) 간 재생 및 발생에 관련된 단백질들 (파란색 막대그래프), 2) 세포 성장, 조직 재건, 혈관 생성 또는 세포사 방지에 관련된 단백질들 (분홍 막대그래프), 및 3) 상기 두 가지 기능을 동시에 한다고 알려진 단백질들 (노란 막대그래프)인 34개의 단백질 분포를 나타낸 도면이다.

도 4a 내지 도 4b는 인간 배아줄기세포 유래 간세포로부터 추출한 조건배지를 간질환 실험동물 모델에 주입하였을 경우, 간 손상의 회복 및 재생 효과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0042] 실시예 1. 인간배아줄기세포의 간세포 분화 유도 및 LMPC 방법을 이용한 간세포의 분리

[0043] 본 발명자들의 등록특허(등록번호: 10-0861632)에 개시된 방법을 이용하여 인간배아줄기세포로부터 간세포를 분화 유도하고, 특허출원(출원번호: 10-2009-0005708)에 개시된 방법을 이용하여 순수 분리 정제한 인간배아줄기세포 유래 간세포(ICG+ cells)를 얻을 수 있었다. 개시된 방법들을 간략히 설명하면 다음과 같다.

[0044] 인간배아줄기세포(Human embryonic stem cells)로부터 배아체를 형성하여 배아체 내에 중내배엽 세포 집단의 양을 증가시킨 후, 중내배엽이 증가한 배아체를 5 μ g/ml collagen type I이 도포된 PALMDuplex Dishes(PALM microlaser technologies에서 구입, LMPC 전용 배양접시로, 배양접시 위에 별도의 membrane이 장착되어 있어 LMPC 수행시 배양접시는 그대로 있고 오려진 membrane과 그 위의 세포만 떼어져 나가 선별적으로 원하는 세포 부분만 골라낼 수 있도록 만들어진 배양접시)에 옮겼다. 그 다음, DMEM/F12 배양액에 ITS (10 μ g/ml 인슐린, 5.5 μ g/ml 트랜스페린 (transferrin) 및 5 ng/ml 나트륨 투석고 (sodium selenite)), 20 ng/ml hepatocyte growth factor(HGF), 10 ng/ml oncostatin M(OSM) 및 10⁻⁶ M dexamethasone(DEX)을 첨가하여 14일간 간세포로 유도 분화하였다.

[0045] 상기 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포의 배양액에 1 mg/ml indocyanine green(ICG)를 첨가하여 분화된 간세포가 ICG 염색될 수 있도록 30분간 37℃에서 인큐베이션 하였다.

[0046] 상기 PALMDuplex Dishes 상의 ICG가 염색된 부분의 모서리를 따라 laser로 ICG+ clusters를 오려내었다. 오려진 ICG+ clusters는 오려진 부분(target area)의 바로 윗부분에 위치하여 HGF, OSM 및 DEX가 포함된 배양액으로 뚜껑 부분이 채워진 microcentrifuge tube로 catapulting되어 모아졌다 (target area에서 laser를 이용하여 오려낸 부분을 target area의 윗쪽에 있는 튜브로 쏘아 올려줌).

[0047] 상기 방법으로 모아진 ICG+ clusters와 PALMDuplex Dishes사에 남아 있는 ICG- cells는 pipetting하여 세포에 붙어있는 membrane를 제거한 후, 5 μ g/ml collagen type I이 도포된 일반 배양접시에 옮겨져, DMEM/F12 배양액에 ITS (10 μ g/ml 인슐린, 5.5 μ g/ml 트랜스페린 (transferrin) 및 5 ng/ml 나트륨 투석고(sodium selenite)), 20 ng/ml hepatocyte growth factor(HGF), 10 ng/ml oncostatin M(OSM) 및 10⁻⁶ M dexamethasone(DEX)을 첨가하여 하기 실험에 사용되기 전까지 배양되었다.

[0048] 실시예 2. 인간배아줄기세포 유래 간세포로부터 조건배지 추출 및 농축

[0049] 상기 실시예 1에 따라, 순수분리 정제한 인간배아줄기세포 유래 간세포(ICG+ cells) 및 순수분리 정제 후 남은 간세포 이외의 세포(ICG- cells)를 콜라겐 I(collagen I)이 도포된 배양접시에 부착시킨 후, 5 $\times$ 10⁵ 내지 1 $\times$ 10⁶ 개 세포당 1 ml의 ITS 배지 (DMEM/F12 배지에 100X ITS supplement(GIBCO)를 1배로 희석하여 첨가한 배지)를 첨가하여, 2일간 배양한 후, 배양한 조건배지를 수확하여, 1000 rpm으로 5분간 원심분리 하여, 세포 찌꺼기를 제거한 후 10 kDa cut off centrifugal filter unit (Millipore)를 이용하여 조건배지를 약 20배 농축하고 냉동고에 보관하였다.

[0050] **실시예 3: 인간배아줄기세포 유래 간세포 조건배지의 secretome 분석**

[0051] 수확한 ICG+ cells 조건배지 및 ICG- cells 조건배지 50 ml을 Centricon Plus-20 filter (Millipore)를 사용하여 100배 농축하였다. 농축한 단백질 각각의 80 μ g를 4-12% Bis-Tris gel을 이용하여 로딩한 후, GelCode Blue Stain Reagent (Thermo scientific에서 구입)로 염색한 후 10개 cut으로 잘라, 각각의 자른 gel을 12.5 μ g/ml 트립신(trypsin; Promega)으로 처리(digestion)하였다. 트립신을 이용하여 처리한 단백질들을 이용하여 LC-MS/MS 분석 후, BioWorksBrowser™ 소프트웨어를 이용하여 검출된 단백질들을 동정하였다. 각각 세 번의 ICG+ cells 조건배지 및 ICG- cells 조건배지를 상기와 같은 방법을 분석하여, 세 번의 실험 중 두 번 이상 검출된 단백질들을 label-free protein quantification 방법 (Briefings in Bioinformatics 9:156-165, 2007)으로 정량하여, ICG+ cell 조건배지에서 증가한 121개 단백질과, ICG- cells 조건배지에서 증가한 166개 단백질을 선택한 후 ICG+ cells 조건배지에서 2배 이상 증가한 단백질을 84개를 좀 더 선별하여 하기 표 1에 나타내고, 이중 간 재생에 직접적 또는 간접적으로 관여하는 단백질을 34개를 선별하여 하기 표 2에 나타내었다.

[0052] [표 1-1]. ICG+ cells 조건배지에서 2배 이상 증가한 단백질

Accession	Protein name	Average Rsc ratio (~log(+/-))*	Expressed proteins in livers	Subcellular localization	Liver regeneration and development	Cell growth, tissue remodeling, angiogenesis or anti-apoptosis
115298678	complement component 3 precursor	6,58 ± 0,87	Yes	S	Yes	
5031863	galectin 3 binding protein	5,46 ± 0,50	Yes	S, ECS, ECM	Yes	
66347875	complement component 1, r subcomponent	4,27 ± 0,80	Yes	S		
4502951	collagen type III alpha 1 preproprotein	4,25 ± 2,60	Yes	S, ECS, ECM		
48762934	alpha 2 type I collagen	4,20 ± 3,23	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM		
189217853	matrix metalloproteinase 2 isoform b	3,92 ± 0,95	Yes	S	Yes	
73858570	complement component 1 inhibitor precursor	3,88 ± 0,88	Yes	S		
41393602	complement component 1, s subcomponent	3,86 ± 0,88	Yes	S		
189083782	gelsolin isoform c	3,78 ± 0,63	Yes (non-parenchymal cells)	S	Yes	Yes
33356541	phospholipid transfer protein isoform b precursor	3,71 ± 0,56	Yes	S		
144953895	nidogen 2 precursor	3,57 ± 0,25	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM, BM	Yes	
32171249	prostaglandin H2 D- isomerase	3,34 ± 0,33	No	S, ECS, ECM, BM		
55925576	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	3,31 ± 0,94	Yes (fetal liver)	S		
50659080	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 (alpha-1-antichymotrypsin)	3,25 ± 0,71	Yes	S		
4507509	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 precursor	3,22 ± 1,20	Yes	S	Yes	
91823602	autotaxin isoform 2 preproprotein	3,21 ± 1,33	Yes	S	Yes	
109150416	peroxidasin homolog	3,10 ± 0,48	Yes	S		Yes
206597445	alpha 1 type XVIII collagen isoform 3 precursor	3,08 ± 1,24	Yes	S, ECS, ECM		Yes
98985810	alpha 1 type XI collagen isoform B preproprotein	3,04 ± 0,73	No	S, ECS, ECM		
89363017	alpha 2 type V collagen preproprotein	2,99 ± 1,14	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM		Yes
144226251	chitinase 3-like 1	2,98 ± 0,82	Yes	S		Yes
19743803	fibulin 5 precursor	2,87 ± 0,65	No	S		Yes
67782358	complement factor B preproprotein	2,73 ± 1,02	Yes	S		
61699226	pulmonary surfactant-associated protein D precursor	2,72 ± 0,90	No	S		
88853069	vitronectin precursor	2,66 ± 0,45	Yes	S	Yes	
51873067	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 isoform b	2,59 ± 1,26	Yes	S	Yes	
84798622	mannosidase, beta A, lysosomal	2,58 ± 0,67	Yes	Ly		

[0053]

[0054] [표 1-2]

75709198	nephronectin	2.58 ± 0.78	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM		Yes
87196339	collagen, type VI, alpha 1 precursor	2.53 ± 1.27	Yes	S, ECS, ECM		
39725934	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antipiasmin), member 1	2.50 ± 2.36	Yes	S	Yes	
91807125	family with sequence similarity 3, member C precursor	2.50 ± 0.03	Yes	S		
20149540	lysyl oxidase preproprotein	2.41 ± 0.89	Yes	S		
19743852	decorin isoform d precursor	2.40 ± 0.69	Yes	S, ECS, ECM		Yes
88702793	slit-like 2	2.32 ± 0.58	Yes	M, S (probable)		
34734068	fibulin 1 isoform A precursor	2.32 ± 0.22	Yes	S, ECS, ECM		Yes
167830475	milk fat globule-EGF factor 8 protein isoform	2.32 ± 0.22	Yes	M		
4758412	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	2.22 ± 0.84	Yes	S, G		
221316738	growth arrest-specific 6 isoform 3	2.20 ± 0.59	Yes (oval cells)	S	Yes	Yes
148536825	alpha 1 type IV collagen preproprotein	2.12 ± 0.51	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM, BM		
28559088	laminin alpha 2 subunit isoform a precursor	2.16 ± 1.09	No	S, ECS, ECM, BM		
116534898	desmoglein 2 preproprotein	2.16 ± 1.08	Yes	M, J		
189163542	serine proteinase inhibitor, clade A, member 1	2.14 ± 0.04	Yes	S		
23111005	microfibrillar-associated protein 4	2.08 ± 0.56	Yes	S, ECS, ECM		
5901944	elastin microfibril interfacier 1	2.07 ± 0.63	Yes	S, ECS, ECM		
115527070	alpha 2 type VI collagen isoform 2C2a precursor	2.01 ± 1.27	Yes	S, ECS, ECM		Yes
62548862	matrilin 2 isoform b precursor	1.95 ± 0.51	Yes (oval cells)	S	Yes	
167830477	milk fat globule-EGF factor 8 protein isoform b	1.94 ± 0.46	No	M		
4557321	apolipoprotein A-I preproprotein	1.89 ± 0.31	Yes	S	Yes	
31542986	intelectin	1.89 ± 0.31	Yes	S, M		
4507511	TIMP metalloproteinase inhibitor 2 precursor	1.89 ± 0.38	Yes	S		
119703755	laminin, beta 2 precursor	1.89 ± 0.31	Yes	S, ECS, ECM		
4505047	lumican precursor	1.86 ± 2.46	Yes	S, ECS, ECM		Yes
148886654	polydrom	1.79 ± 0.95	Yes	S		Yes
5901956	folistatin-like 1 precursor	1.74 ± 0.69	No	S	Yes	
189181666	hexosaminidase A preproprotein	1.70 ± 0.82	Yes	Ly		
89276751	alpha 1 type V collagen preproprotein	1.68 ± 1.70	Yes	S, ECS, ECM		
4503987	gamma-glutamyl hydrolase precursor	1.67 ± 0.003	Yes	S, ECS, Ly		
34734062	fibulin 1 isoform C precursor	1.65 ± 0.03	Yes	S, ECS, ECM		Yes

[0055]

[0056] [표 1-3]

34734066	fibulin 1 isoform D	1.65 ± 0.03	Yes	S, ECS, ECM		Yes
21536286	brain creatine kinase	1.57 ± 0.60	No	Cy		
4758906	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	1.57 ± 0.61	No	Cy		Yes
56682966	transforming growth factor, beta receptor III	1.57 ± 0.61	No	S, ECS, M		
4504183	glutathione transferase	1.52 ± 0.83	Yes	Cy		
4557032	L-lactate dehydrogenase B	1.45 ± 0.89	No	Cy		
4826898	profilin 1	1.45 ± 0.89	Yes	Cy, Nu	Yes	
42740907	clusterin isoform 2	1.45 ± 0.89	Yes	S		Yes
4504373	hexosaminidase B preproprotein	1.33 ± 0.72	Yes	Ly		
209969800	RPE- spondin	1.33 ± 0.70	Yes	S		
23110957	cathepsin H isoform b precursor	1.30 ± 0.52	Yes	Ly		
105990514	filamin B, beta (actin binding protein 278)	1.30 ± 0.52	Yes	Cy		
209364544	calsyntenin 2	1.30 ± 0.52	Yes	M, ERM, GM		
4507725	transferrin precursor	1.28 ± 0.49	Yes	S		
5453678	epididymal secretory protein E1 precursor	1.28 ± 0.49	No	S		
23065552	glutathione S-transferase mu 3	1.28 ± 0.55	Yes	Cy		
55743096	collagen, type XIV, alpha 1	1.28 ± 0.55	No	S, ECS, ECM		
57242757	calsyntenin 1 isoform 1	1.28 ± 0.55	No	ERM, GM, PM		
66346689	dickkopf homolog 3 precursor	1.28 ± 0.55	Yes (Hepatic stem cells)	S	Yes	Yes
115527062	alpha 2 type VI collagen isoform 2C2 precursor	1.28 ± 0.55	Yes	S, ECS, ECM, M		Yes
11342666	matrix metalloproteinase 2 isoform a preproprotein	1.28 ± 0.49	No	S		
4507171	secreted protein, acidic, cysteine-rich	1.23 ± 0.86	No	S, ECS, ECM, BM		Yes
186910296	haptoglobin isoform 2 preproprotein	1.17 ± 0.44	Yes	S		
194097382	ADP-ribosyltransferase 3 isoform c	1.17 ± 0.40	No	M		
161702986	ezrin	1.14 ± 0.21	No	M		
4503107	cystatin C precursor	1.02 ± 1.67	Yes	S		Yes

*More than 2-fold increased protein in ICG+ cell-CM in three dependent experiments

*Average fold increase in ICG+ cells-CM, compared to ICG- cells-CM. All data were expressed as mean±SD from three independent experiments

†S: secreted, ECS: extracellular space, ECM: extracellular matrix, M: cell membrane, BM: basement membrane, Ly: lysosome, G: golgi apparatus, J: cell junction, Cy: cytoplasm, Nu: nucleus, Ch: chromosome, ERM: ER membrane, GM: golgi membrane, PM: postsynaptic membrane

[Tissue distribution of detected proteins and their subcellular localization were searched by Bioinformatic Harvester V (<http://harvester4.fzk.de>) and WikiProtein (<http://wiki.protein.org>)]

[0057]

[0058] [표 2-1]. 간재생에 관여하는 단백질

Accession	Protein name	Average Rsc ratio (~ log(+/-))*	Expressed proteins in livers	Subcellular localization	Liver regeneration and development	Cell growth, tissue remodeling, angiogenesis or anti-apoptosis
115298678	complement component 3 precursor	6.58 ± 0.87	Yes	S	Yes	
5031863	galectin 3 binding protein	5.46 ± 0.50	Yes	S, ECS, ECM	Yes	
189217853	matrix metalloproteinase 2 isoform b	3.92 ± 0.95	Yes	S	Yes	
189083782	gelsolin isoform c	3.78 ± 0.63	Yes (non-paren chymal cells)	S	Yes	Yes
144953895	nidogen 2 precursor	3.57 ± 0.25	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM, BM	Yes	
4507509	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 precursor	3.22 ± 1.20	Yes	S	Yes	
91823602	autotaxin isoform 2 preproprotein	3.21 ± 1.33	Yes	S	Yes	
109150416	peroxidase homolog	3.10 ± 0.48	Yes	S		Yes
206597445	alpha 1 type XVIII collagen isoform 3 precursor	3.08 ± 1.24	Yes	S, ECS, ECM		Yes
89363017	alpha 2 type V collagen preproprotein	2.99 ± 1.14	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM		Yes
144226251	chitinase 3-like 1	2.98 ± 0.82	Yes	S		Yes
19743803	fibulin 5 precursor	2.87 ± 0.65	No	S		Yes
88853069	vitronectin precursor	2.66 ± 0.45	Yes	S	Yes	
51873067	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 isoform b	2.59 ± 1.26	Yes	S	Yes	
75709198	nephronectin	2.58 ± 0.78	Yes (fetal liver)	S, ECS, ECM		Yes
39725934	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin), member 1	2.50 ± 2.36	Yes	S	Yes	
19743852	decorin isoform d precursor	2.40 ± 0.69	Yes	S, ECS, ECM		Yes
34734068	fibulin 1 isoform A precursor	2.32 ± 0.22	Yes	S, ECS, ECM		Yes
221316738	growth arrest-specific 6 isoform 3	2.20 ± 0.59	Yes (oval cells)	S	Yes	Yes
115527070	alpha 2 type VI collagen isoform 2C2a precursor	2.01 ± 1.27	Yes	S, ECS, ECM		Yes
62548862	matrilin 2 isoform b precursor	1.95 ± 0.51	Yes (oval cells)	S	Yes	
4557321	apolipoprotein A-I preproprotein	1.89 ± 0.31	Yes	S	Yes	
4505047	lumican precursor	1.86 ± 2.46	Yes	S, ECS, ECM		Yes
148886654	polydrom	1.79 ± 0.95	Yes	S		Yes
5901956	folistatin-like 1 precursor	1.74 ± 0.69	No	S	Yes	
34734062	fibulin 1 isoform C precursor	1.65 ± 0.03	Yes	S, ECS, ECM		Yes
34734066	fibulin 1 isoform D	1.65 ± 0.03	Yes	S, ECS, ECM		Yes
4758906	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	1.57 ± 0.61	No	Cy		Yes
4826898	profilin 1	1.45 ± 0.89	Yes	Cy, Nu	Yes	
42740907	clusterin isoform 2	1.45 ± 0.89	Yes	S		Yes
66346689	dickkopf homolog 3	1.28 ± 0.55	Yes	S	Yes	Yes

[0059]

[0060] [표 2-1]

	precursor		(Hepatic stem cells)			
115527062	alpha 2 type VI collagen isoform 2C2 precursor	1.28 ± 0.55	Yes	S, ECS, ECM, M		Yes
4507171	secreted protein, acidic, cysteine-rich	1.23 ± 0.86	No	S, ECS, ECM, BM		Yes
4503107	cystatin C precursor	1.02 ± 1.67	Yes	S		Yes

[0061]

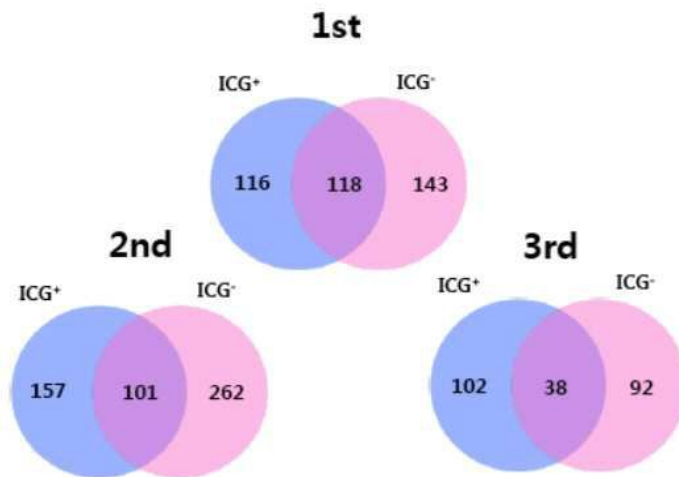
[0062] 도 1은 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화하여, 순수 분리 정제한 간세포(ICG+ cells) 및 분리정제하고 남은 간세포 이외의 세포(ICG- cells)에서 추출한 조건배지(conditioned medium)의 secretome 분석에 의해 검출된 단백질의 수를 나타내는 도면이다.

- [0063] 첫 번째(1st) 분석 결과, ICG+ cells의 조건배지에만 검출되는 단백질의 수는 116개, ICG- cells의 조건배지에만 검출되는 단백질의 수는 143개, 두 그룹 간에 공통적으로 발견되는 단백질의 수는 118개였고, 두 번째(2nd) 및 세 번째(3rd) 분석결과, 각각 157개 및 102개의 단백질이 ICG+ cells의 조건배지에서만 발견되었으며, 262개 및 92개의 단백질이 ICG- cells의 조건배지에서만 발견되었으며, 101개, 38개의 단백질이 두 그룹 간에 공통적으로 검출되는 단백질로 확인되었다.
- [0064] 도 2는 세 번의 secretome 분석결과에서, 세 번의 실험 중 2번 이상 검출된 287개 단백질들의 ICG+ cells의 조건배지와, ICG- cells 조건배지 내에서의 상대적인 양의 비교 및 그들의 분포를 나타내는 도면이다.
- [0065] 도 2에서, 선택된 287개 단백질 중 121개의 단백질이 ICG+ cells의 조건배지에서 상대적으로 많은 양으로 검출되었으며, 166개의 단백질이 ICG- cells의 조건배지에서 상대적으로 많은 양으로 검출되는 것을 확인하였다 (도 2의 a). 또한 ICG+ cells의 조건배지에서 상대적으로 많이 검출되는 121개 단백질 중 ICG- cells의 조건배지에서 검출되는 단백질에 비하여 2배 이상 많이 검출되는 단백질 84개의 세포내 위치 및 간에서의 발현 여부 조사 결과, 약 71%가 분비성 단백질(secretory proteins)이고 약 81%가 간에서 발현되는 단백질로 확인되었다 (도 2의 b).
- [0066] 도 3은 ICG+ cells 조건배지에서 ICG- cells 조건배지에 비하여 상대적으로 2배 이상 증가한 단백질 84개 중, 1) 간 재생 및 발생에 관련된 단백질들 (파란색 막대그래프), 2) 세포 성장, 조직 재건, 혈관 생성 또는 세포사 방지에 관련된 단백질들 (분홍 막대그래프), 및 3) 상기 두 가지 기능을 동시에 한다고 알려진 단백질들 (노란 막대그래프)인 34개의 단백질 분포를 나타낸 도면이다.
- [0067] **실시예 3: 간질환 동물 모델을 이용한 인간배아줄기세포 유래 간세포 조건배지의 간질환 개선 효과 확인**
- [0068] 농축한 조건배지를 주입하기 24시간 전, 실험동물 모델에 간질환을 유도하였다. 5 내지 6 주령의 수컷 Balb/C 마우스에 CCl₄(carbon tetrachloride; sigma)를 복강 내에 주사(올리브 오일 내에 10% CCl₄를 포함한 용액을 생쥐 몸무게 20 g 당 100 μ l을 복강 내 주사)하여 간질환을 유도하였다. CCl₄ 주입 24시간 후에 PBS, 기본배지 (ITS medium), 농축한 ICG- cells 조건배지, 농축한 ICG+ cells 조건배지 800 μ l을 각각 실험동물의 복강을 통하여 주입하였다. 조건 배지 주입 3일 후에 실험동물의 혈청을 추출하여 혈액내의 알부민 농도를 측정하였으며, 간을 추출하여 파라핀에 포매한 후 절편하여 hematoxylin 및 reticulin 염색을 통하여 조직학적 변화를 확인하였으며, Brdu 염색 및 PECAM 염색을 통하여, 간 재생 여부를 확인하였다.
- [0069] 도 4a 내지 4g는 인간 배아줄기세포 유래 간세포로부터 추출한 조건배지를 간질환 실험동물 모델에 주입하였을 경우, 간 손상의 회복 및 재생 효과를 나타내는 도면이다.
- [0070] 각각 약 20배 농축한 ICG+ cells 조건배지, ICG- cells 조건 배지, 기본배지(basal medium, ICG+ cells 조건배지 및 ICG- cells 조건배지를 생성하는 기본 배지), 및 PBS를 간질환 실험동물 모델의 복강을 통하여 주입 3일 후, 간 손상 정도가 ICG+ cells 조건배지를 주입시 상당부분 회복되었음을 hematoxylin 염색 및 reticulin 염색을 통해 확인하였고 (도 4a 및 4b), ICG+ cells 조건 배지의 주입에 따라, 실험동물 모델의 간세포의 증식이 증가하였음을 Brdu 염색을 통해 확인하였으며 (도 4c 및 4d), 실험동물 모델의 간 조직내의 미세혈관(sinusoid)도 회복하였음을 PECAM 염색을 통해 확인하였다 (도 4e 및 4f). 또한, ICG+ cells 조건배지 주입 후, 실험동물의 혈청내의 알부민 정도가 질병 유발 1일 째에 비하여 증가한 것을 확인하였다 (도 4g).

도면

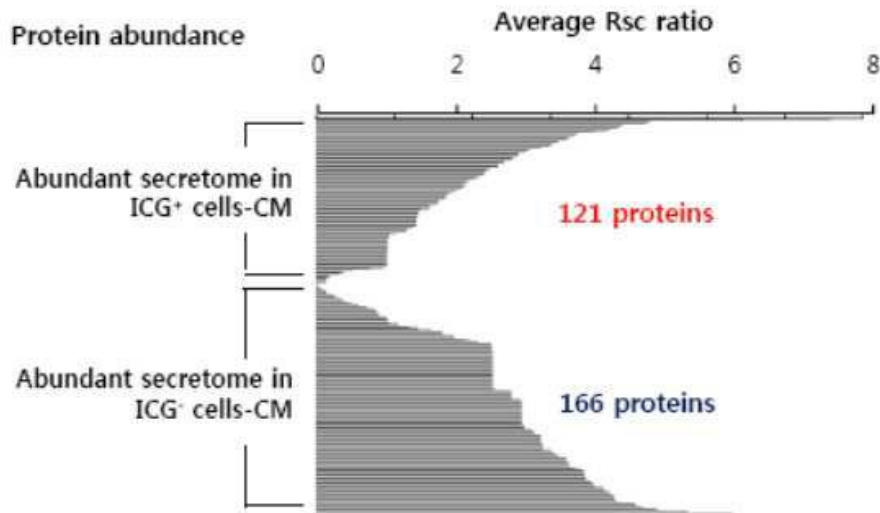
도면1

Numbers of detected proteins in three independent secretome analysis



도면2

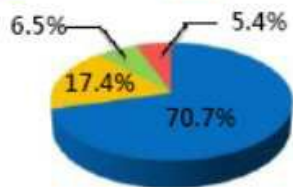
a



b

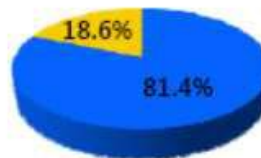
Cellular localization

Extracellular Cytoplasm
Membrane Nucleus

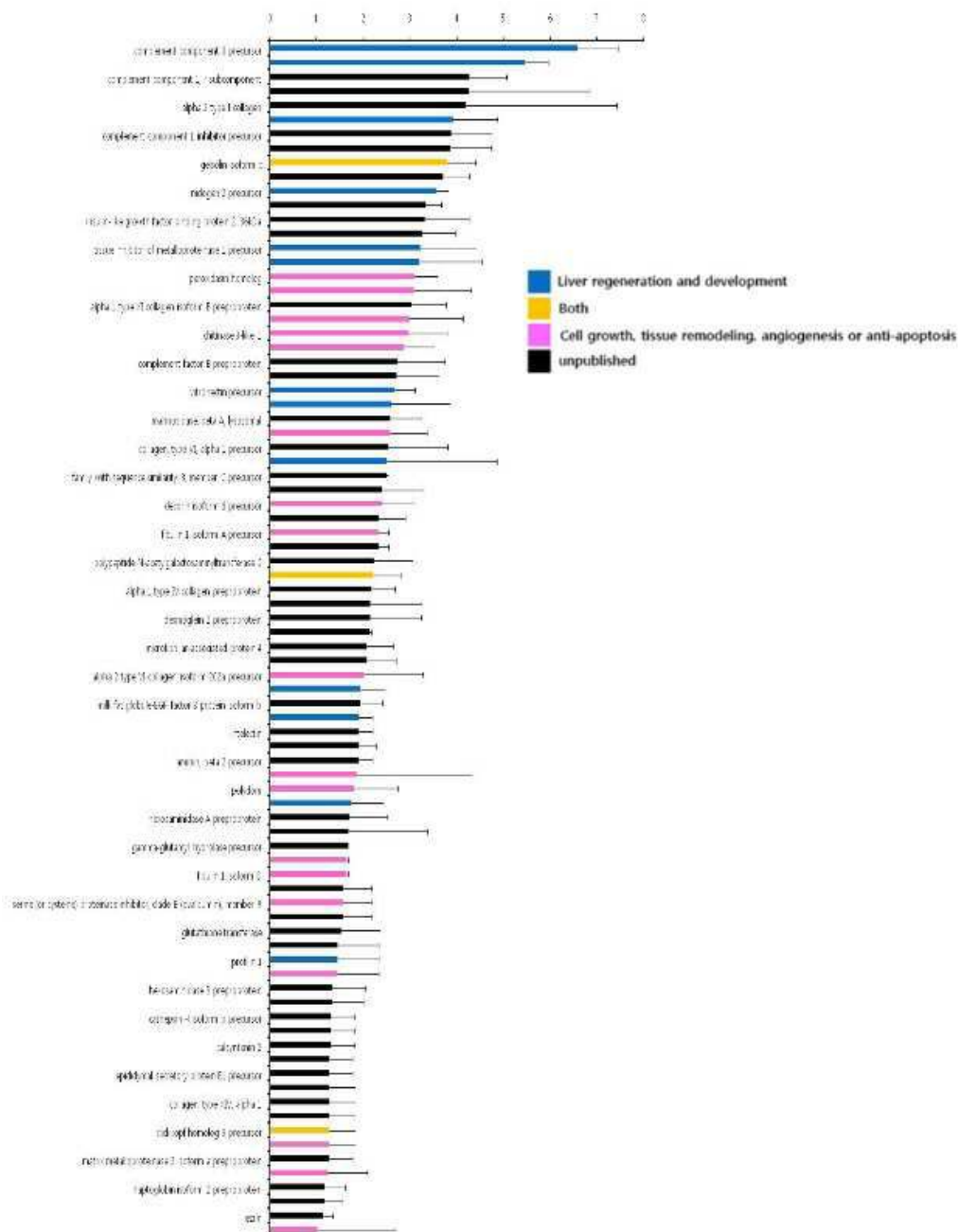


Production in the liver

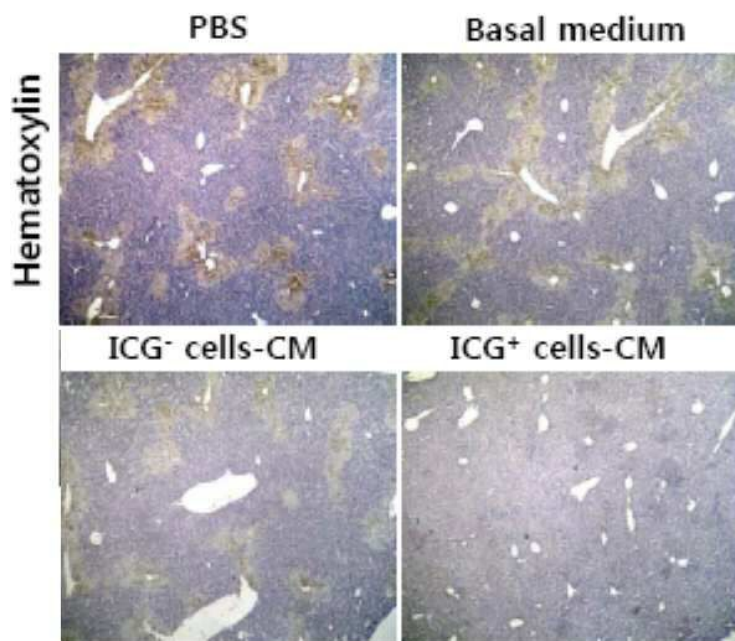
Known
Unknown



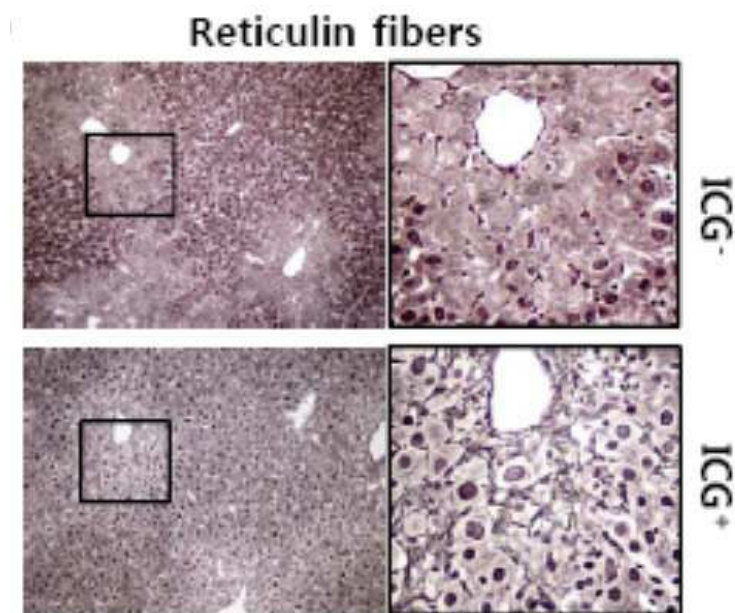
도면3



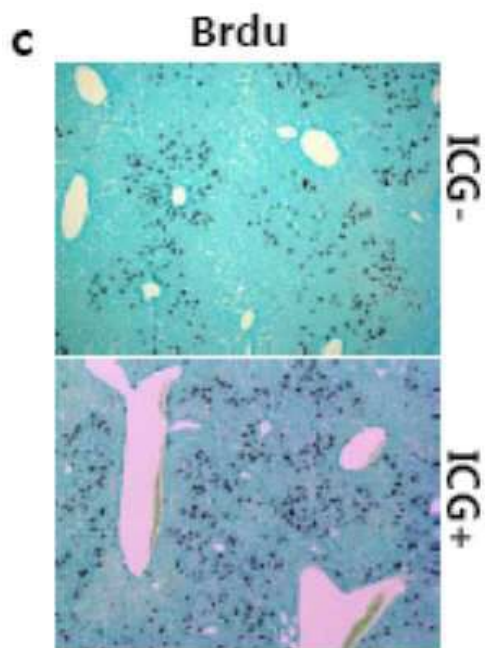
도면4a



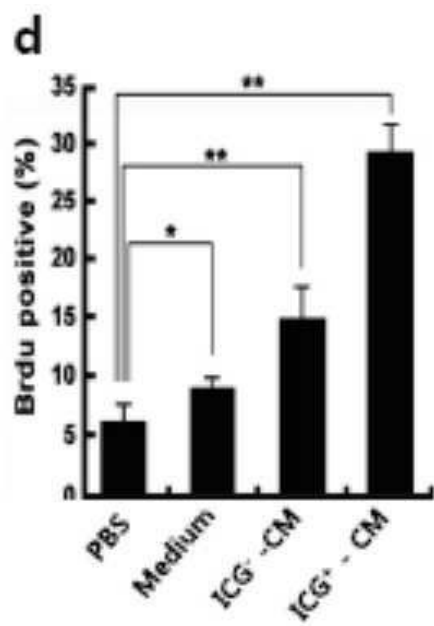
도면4b



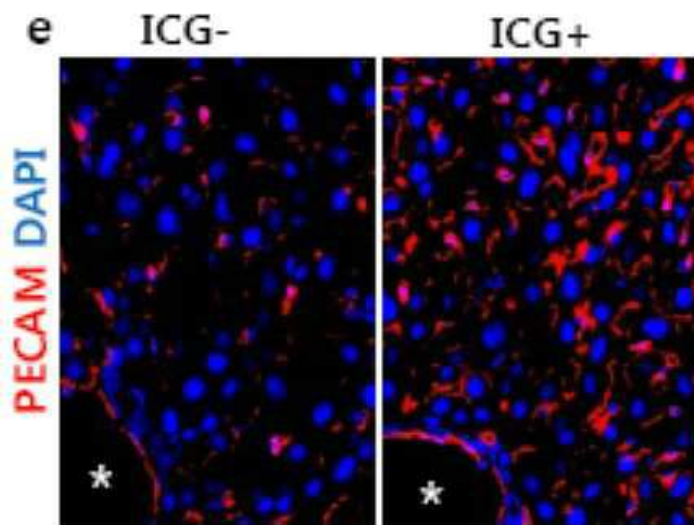
도면4c



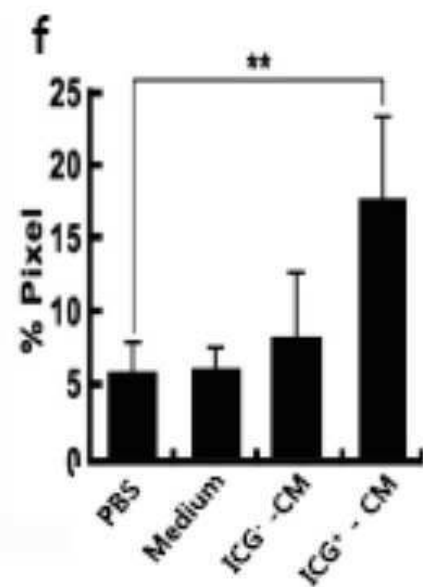
도면4d



도면4e



도면4f



도면4g

