



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0086372
(43) 공개일자 2010년07월30일

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
A61K 35/54 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0005708

(22) 출원일자 2009년01월22일

심사청구일자 2009년01월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김중훈

서울시 용산구 이태원2동 이태원 주공아파트 108동 301호

우동훈

경기도 군포시 산본동 목련아파트 1213동 205호

(74) 대리인

이문섭

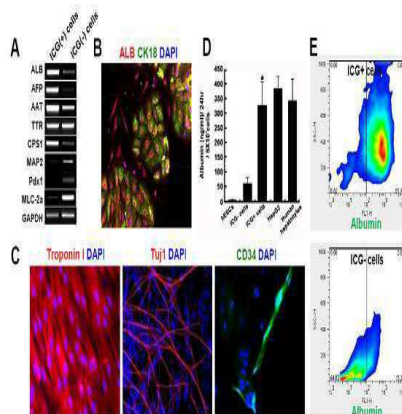
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법 및 분리 정제된 간세포의 간질환 치료제로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 줄기세포로부터 분화된 세포를 ICG(indocyanine green)로 염색하는 단계 및 상기 ICG(indocyanine green) 염색된(ICG(+)) 간세포(hepatocytes) 집단을 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법 및 이 방법을 통하여 분리된 ICG(+) 간세포 집단을 유효성분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 세포를 고정하지 않고 살아있는 상태로 염색하는 vital dye인 ICG 염색으로 염색 전후 간세포의 형태 및 기능성에 변화없이, LMPC 방법을 통해 높은 분획율로 유전적 변형(genetic modification)을 거치지않은 간세포를 순수 분리 정제할 수 있으므로 이를 이용한 세포 치료제는 간기능 손상 치료 및 개선에 효과적일 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SC-3130

부처명 교육과학기술부

연구사업명

연구과제명 인간배아줄기세포로부터 내배엽성세포로의 분화유도기법개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008년 4월 1일 ~ 2012년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

줄기세포로부터 분화된 세포를 ICG(indocyanine green)로 염색하는 단계; 및 상기 ICG(indocyanine green) 염색된(ICG(+)) 간세포(hepatocytes) 집단을 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 분화된 간세포(hepatocytes)의 분리 정제 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포는 배아줄기세포로부터 간세포(hepatocytes)로 유도 분화된 세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 줄기세포로부터 간세포로의 분화 유도는 HGF(hepatocyte growth factor), OSM(oncostatin M) 및 DEX(dexamethasone)으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 간세포 분화 제제를 처리하는 것을 특징으로 하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 배아줄기세포는 인간배아줄기세포인 것을 특징으로 하는 배아줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 LMPC 방법은 ICG 염색된(ICG(+)) 간세포 집단의 둘레에 레이저 빔을 조사하여 내려내는 것을 특징으로 하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 LMPC 방법으로 분리된 ICG 염색된(ICG(+)) 간세포는 알부민(albumin) 또는 싸이토케라틴 18(cytokeratin 18) 상의 인간세포 특이적 표지인자를 발현하는 것을 특징으로 하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 배아줄기세포의 유전적 변형(genetic modification) 없이 세포를 고정하지 않고 살아있는 상태로 염색하는 vital dye인 ICG로 염색하는 것을 특징으로 하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 ICG 염색은 ICG 0.5~1mg/ml로 30분~1시간 동안 30~40℃에서 염색하는 것을 특징으로 하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법.

청구항 9

인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 ICG 염색 후 LMPC 방법으로 분리된 ICG(+) 간세포 집단을 유효성 분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 ICG(+) 간세포 집단은 간 재생에 관여하는 싸이토카인(cytokine)을 분비하여, 손상된 간의 재생을 촉진하는 것을 특징으로 하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 ICG(+) 간세포 집단은 손상된 간 내에 장기간 생존하여, 기능을 유지하는 것을 특징으로 하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 12

인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 ICG 염색 후 LMPC 방법으로 분리된 ICG(+) 간세포 집단을 배양한 조건 배지(conditioned medium)를 유효성분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간 기능 손상은 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)으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포로부터 분화된 세포를 ICG(indocyanine green)로 염색하는 단계 및 상기 ICG(indocyanine green) 염색된(ICG(+)) 간(liver)세포 집단을 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법 및 이 방법을 통하여 분리된 ICG(+) 간세포 집단을 유효성분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 여러 간 질환의 최종적인 치료법이 간이식이다. 간이식은 공여 간의 부족이라는 심각한 문제를 안고 있어서 이러한 문제의 해결방안으로 세포 이식이 연구되고 있다. 공여자의 간세포를 수혜자에게 투여하면 이 세포들이 간 또는 비장에서 생착하여 분열하고 간세포로서의 기능을 수행하는 것을 볼 수 있다. 간 질환 중 유전적 질환들인 Wilson's disease, Crigler-Najjar syndrome, tyrosinemia, Factor IX deficiency 등이나 여러 가지 대사성 간 질환의 치료 및 간이식에 이용될 수 있다.

[0003] 일반적으로 배아줄기세포(ESCs)에서 유도 분화된 기능성 세포의 순수 분리 정제 방법은, 특정 기능성 세포가 특이적으로 발현하는 표지 인자(cell surface marker)를 매개로한 fluorescece activating cell sorter(FACS) 또는 magnetic cell sorter(MACS)를 이용하여, 특정 기능성 세포 특이적 표지 인자를 발현하는 세포만을 분리해 내는 것이 통상적인 기술이다. 하지만 간세포의 경우에는 이러한 표지 인자를 통한 분리 방법이 시도되고, 분리 정제 가능한 몇몇 표지 인자들이 제시되고는 있으나, 이는 아직 미성숙 간세포(hepatic stem cells 및 hepatic progenitors를 포함)에 국한되어 있으며, 아직 성숙한 기능성 간세포만이 특이적으로 발현하는 절대적인 표지 인자는 찾지 못하고 있는 실정이다.

[0004] 또한, 절대적인 간세포 특이적 표지 인자의 부재로 인해, 여러 연구자들은 간세포가 특이적으로 발현하는 유전자 프로모터에 reporter gene을 달아(예를 들어, albumin promoter, α 1-anti-trypsin promoter 등) 배아줄기세포에 도입시킨 후, 유도 분화 과정 중 이들 reporter gene의 발현 유무에 기초하여, FACS 또는 MACS로 배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 순수 분리 정제하였다. 그러나, 이러한 방법은 배아줄기 세포 자체가 genetic modification을 거치기 때문에, 인간 배아줄기세포를 세포치료에 이용하는데 어려움이 따른다.

[0005] 그러나 본 발명의 분리 정제 방법에 사용된 ICG는 간세포에 특이적으로 염색되는 vital dye(세포를 고정과정을 거치지 않고 살아있는 상태로 염색 됨)로 염색 후 수 시간 후에 간세포 자체적인 대사로 인해 분해되어 배출되는 염색 시료이기 때문에 ICG 염색 전후의 간세포의 형태 및 기능성에 변화를 초래하는 부작용이 없다.

- [0006] 또한, ICG를 이용한 간세포의 순수 분리 정제 방법은, 기존의 간세포 특이적 표지 인자를 이용한 분리 방법 과정에 포함되는 효소(enzyme)를 이용하여, 세포를 단일 세포(single cell)로 분해하는 과정 중에 발생할 수 있는 표지 인자의 손실 또는 효소(enzyme)에의 과노출에 의한 세포사에 기인한 간세포 분리 수확물의 감소를 방지할 수 있다.
- [0007] 뿐만 아니라, 기존의 간세포 특이적 유전자 프로모터(promoter)를 형질 도입하여, 배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 분리 정제 하는 기술과 비교하였을 때, 본 발명의 기술은 genetic modification를 거치지 않았다는 점에서 세포 치료제로서의 안전성을 확보하고 있다.
- [0008] 즉, 본 발명자들은 상기 기존 간세포 분리 정제 방법의 문제점을 해결하기 위하여, 표지인자를 이용한 분리 방법 또는 genetic modification를 통한 reporter gene을 이용한 분리 방법을 포함한 기존의 간세포 분리 정제 방법을 대신하여 줄기세포로부터 유도 분화된 순수한 집단의 간세포를 다량 확보하는 기술을 개발하여, vital dye인 ICG(indocyanine green)를 이용하여 염색한 간세포를 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리 정제하는 줄기세포로부터 분화된 간세포 분리 정제 방법을 제공한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 배아줄기세포로부터 분화된 세포를 ICG(indocyanine green)로 염색 후 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법을 사용하여 배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 효과적으로 분리 정제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 ICG 염색 후 LMPC 방법으로 분리된 ICG(+) 간세포 집단 또는 이를 배양한 조건 배지(conditioned medium)을 유효성분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0011] 일 양태로 본 발명은 줄기세포로부터 분화된 세포를 ICG(indocyanine green)로 염색하는 단계 및 상기 ICG(indocyanine green) 염색된(ICG(+)) 간세포(hepatocytes) 집단을 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리 정제 방법을 제공한다.
- [0012] 본원의 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.
- [0013] 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, 이하 "ES 세포"로 약칭함), 배아기(embryonic stage)의 원시 생식세포에서 분리한 배아 생식세포(embryonic germ cells, 이하 "EG 세포"로 약칭함) 및 성체의 골수에서 분리한 다능성 줄기세포(multipotent adult progenitor cells, 이하 "MAPC"으로 약칭함) 등이 있다. 바람직하게는 배아줄기세포이다.

- [0014] 또한, 상기 "분화"란 줄기세포로부터 특정 세포로 구조와 형태를 변화시키는 과정을 총칭하는데, 보다 구체적으로 정자와 난자가 수정하여 만들어진 수정란이라는 하나의 세포는 초반에 난황이라는 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.
- [0015] 상기 분화는 자연발생적 분화 및 유도 분화를 포함한다.
- [0016] 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 간썸(hepatic diverticulum)이라 한다. 이 세포들이 며칠 간의 증식후 난황으로부터 발생하는 심장을 분리하는 실질인 septum transversum으로 이동하여 간을 형성한다.
- [0017] 줄기세포로부터 특정 세포로의 유도 분화는 당업계에 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.
- [0018] 본원의 줄기세포로부터 분화된 세포는 줄기세포로부터 간세포(hepatocytes)로 유도 분화된 세포일 수 있다. 보다 바람직하게는 인간줄기세포로부터 간세포(hepatocytes)로 유도 분화된 세포일 수 있다. 본원의 인간줄기세포는 가장 바람직하게는 인간배아줄기세포인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인간배아줄기세포로부터 간세포로 분화 유도된 세포를 분리 정제의 대상으로 하였다.
- [0019] 상기 줄기세포로부터 간세포로의 분화 유도는 간세포 분화 제제를 처리함으로써 수행될 수 있다.
- [0020] 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, 이하 "EGF"로 약칭함), 인슐린, 형질전환 성장 인자 (transforming growth factor, 이하 "TGF"라 약칭함)- α , TGF- β , 섬유아세포 성장 인자 (fibroblast growth factor, 이하 "FGF"라 약칭함), 헤파린, 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, 이하 "HGF"로 약칭함), 덱사메타존 (dexamethazone) 존재하의 온코스타틴 엠(oncostatin M, 이하 "OSM"으로 약칭함), 인터류킨 (interleukin, 이하 "IL"이라 약칭함)-1, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자 (insulin-like growth factor, 이하 "IGF"라 약칭함)-I, IGF-II, 헤파린-결합 성장 인자 (heparin-binding growth factor, 이하 "HBGF"라 약칭함)-1 및 글루카곤 (glucagon)이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 다른 간세포 분화 제제로는 코르티코스테로이드 (corticoid), 특히 당질코르티코이드 (glucocorticoid)가 있다. 상기 화합물은 스테로이드 또는 스테로이드 모방제 (steroid mimetic agents)로 중간대사, 특히 간의 글리코젠 (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.
- [0022] 또 다른 간세포 분화 제제로는 디메틸 설펍사이드 (dimethyl sulfoxide, 이하 "DMSO"라 약칭함)와 같은 유기 용매로, 디메틸아세트아미드 (dimethylacetamide, 이하 "DMA"라 약칭함), 헥사메틸렌 비스아세트아미드 (hexamethylene bisacetamide, 이하 "HMB"라 약칭함)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 간세포 분화 제제로 HGF(hepatocyte growth factor), OSM(oncostatin M) 및 DEX(dexamethasone)의 간세포 유도 사이토카인(cytokine)을 사용하였다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 배아줄기세포의 유전적 변형(genetic modification) 없이 세포를 고정하지 않고 살아있는 상태로 염색하는 vital dye인 ICG로 염색하는 것을 특징으로 하는 배아줄기세포로부터 분화된 간세포의 분리

정제 방법을 제공한다.

- [0025] 본원에서 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 발명의 구체적인 실시예에서는 인간배아줄기세포로부터 간세포를 유도분화한 경우, 간세포를 간세포 이외의 세포들과 구별하기 위한 목적으로 사용하였다.
- [0026] ICG 염색은 세포 고정과정을 거치지 않고 살아있는 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.
- [0027] 본 발명의 구체적인 예에서, ICG 염색은 ICG 0.5~1mg/ml로 30분~1시간 동안 30~40℃에서 수행하였다.
- [0028] 본원에서 사용된 용어, LMPC 방법은 목적 대상 세포를 분리 정제하는 방법으로 목적 대상 세포 둘레에 레이저 빔을 조사하여 목적 대상 세포만을 내려내어 수득할 수 있으며, LMPC 방법은 PALM[®] MicroBeam instrument를 사용하여 수행한다.(P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Germany; Cat.-No. 1440-0250).
- [0029] 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 비효율적일 뿐만 아니라 비경제적이며, 간세포 외의 다른 특정세포가 포함된 상태로 분리되어 정확성이 떨어질 가능성이 농후하다.
- [0030] 본원의 구체적인 실시예에 따르면, LMPC 방법을 이용하여 ICG 염색된(ICG(+)) 간세포 집단의 둘레에 레이저 빔을 조사하여 내려내어 간세포를 수득하였다.
- [0031] 본 발명자들은 본원의 방법으로 분리 정제된 ICG(+) 간세포 집단의 하기와 같은 특성을 확인할 수 있었다.
- [0032] 첫째, 간세포 특이적 유전자(ALB, AFB, AAT, CPS1)를 다량 발현하고(도 3A 참고),
- [0033] 둘째, 대부분 세포가 간세포 특이적 표지인자를 발현하는 바, 상기 간세포 특이적 표지인자는 예를 들어 알부민(albumin), 싸이토케라틴18(cytokeratin 18)이다(도 3B 참고).
- [0034] 셋째, 알부민(albumin)을 세포 외로 분비하는 능력이 높다(도 3C 참고).
- [0035] 본원의 구체적인 실시예에 따르면, 본원 방법을 이용하여 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포를 분리하였을 시, 약 90%의 세포가 간세포 특이적인 표지 인자를 발현하고 있었으며, 그 기능성 또한 정상 간세포에서 보여지는 수준과 유사한 수준을 보유하고 있음을 확인하였다(도 3).
- [0036] 따라서, 본원의 방법으로 분리 정제된 간세포는 상기 언급된 다수의 특성 중 하나 이상의 특성을 가질 수 있다.
- [0037] 본원에서 사용된 용어, (ICG(+)) 및 (ICG(-))는 각각 ICG 염색시 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.
- [0038] 또한, 다른 양태로 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 ICG 염색 후 LMPC 방법으로 분리된 ICG(+) 간세포 집단을 유효성분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명자들은 상기 LMPC 방법으로 분리 정제된 ICG(+) 간세포 집단을 이식할 경우 하기와 같은 특성을 확인할 수 있었다.
- [0040] 첫째, 이식된 간세포 집단의 생존 기간이 길고(약 1일 - 35일) (도 4 B, C참고)

- [0041] 둘째, 이식된 동물 간의 일부에 밀집되어 존재하며 central vein 주위에 군집을 이루어 존재하며(도 4 D참고),
- [0042] 셋째, 세포사(apoptosis)가 거의 일어나지 않는다(도 4 D참고).
- [0043] 본원의 구체적인 실시예에 따르면, 본원 방법을 이용하여 분리 정제한 간세포 집단을 이식하였을시, ICG에 염색되지 않는 세포들(ICG(-) cells)에 비하여, 질환 동물모델의 간질환 부위로 효과적으로 이동하여 자리 잡고 있으며, 생존함을 확인하였다(도 4).
- [0044] 따라서, 본원의 방법으로 분리 정제되어 이식된 간세포는 상기 언급된 다수의 특성 중 하나 이상의 특성을 가질 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명자들은 본원 방법으로 분리 정제된 ICG(+) 간세포 집단을 이식한 후의 간세포에서 하기와 같은 특성을 확인할 수 있었다.
- [0046] 첫째, 간세포가 증식하여 간세포 수가 증가하고(도 5 A참고)
- [0047] 둘째, LSECs(liver sinusoidal endothelial cells)가 증식한 간세포를 둘러싸며, LSECs가 새로 생성하며(도 5 B참고)
- [0048] 셋째, HGF, OSM, EGF와 같은 간 재생에 관여하는 사이토카인(cytokine)을 분비한다(도 5 C참고).
- [0049] 넷째, 정상 생쥐의 간과 형태적으로 유사하게 회복된다(도 6 참고).
- [0050] 다섯째, 알부민의 분비 능력이 정상 생쥐와 유사하게 회복된다(도 6 참고).
- [0051] 본원의 구체적인 실시예에 따르면, 본원 방법으로 분리 정제된 ICG(+) 간세포 집단을 이식한 후의 간세포들은 간질환 실험동물의 간으로 효과적으로 이동하여 생존할 뿐만 아니라, 간의 재생에 관여하는 다량의 사이토카인을 분비함으로써, 간세포 이식을 받은 recipient mice의 간 재생능력을 촉진하여, 간질환 개선에의 효과가 있음을 확인하였고(도 5), 이식 후 장기간 recipient mice liver에 생존하여 그 기능성을 유지하고 있음을 확인하였다(도 6).
- [0052] 따라서, 본원의 방법으로 분리 정제되어 이식된 간은 상기 언급된 다수의 특성 중 하나 이상의 특성을 가질 수 있다.
- [0053] 상기 본원 방법으로 분리된 ICG(+) 간세포 집단이 간 재생에 관여하는 사이토카인(cytokine)을 분비하여, 손상된 간의 재생을 촉진하고, 손상된 간 내에 장기간 생존하여, 기능을 유지함으로써 간 기능 손상을 치료할 수 있다.
- [0054] 또한, 다른 양태로 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 ICG 염색을 통하여 LMPC 방법으로 분리된 ICG(+) 간세포 집단을 배양한 조건 배지(conditioned medium)을 유효성분으로 포함하는 간기능 손상 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [0055] 본 발명은 본 발명의 방법으로 분화유도하여 상기에서 제공되는, 줄기세포로부터 분화유도된 세포 또는 이 세포를 배양한 조건 배지를 포함하는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명은 바람직하게는 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상의 치료에 필요한 간기능 회복을 위한 치료용 조성물, 더욱 바람직하게는 유전적 간 기능 손상을 위한 치료용 조성물을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 간 기능 손상에는 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.
- [0057] 보다 구체적으로, 상기 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases)에는 윌슨 병(wilson disease), 타이

로신혈증 [tyrosinemia], 혈색소침착증(hemochromatosis), 당원병(glycogen storage disease)를 포함되나 이에 한정되지 않으며, 상기 담관질환(bile duct disease)에는 담도폐쇄(biliary atresia), 원발성 담즙성 경화(primary biliary cirrhosis(PBC)), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis (PSC))이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0058] 본 발명의 치료용 조성물은 투여 방식에 따라 허용 가능한 담체를 포함하여 적절한 제제로 제조될 수 있다. 담체(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.

[0059] 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.

[0060] 또한, 본 발명의 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 결합체, 활탁제, 봉해제, 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.

[0061] 또한, 본 발명의 치료용 조성물을 이용하여 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상을 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, 세포가 소화될 수 있으므로 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서 분해되는 것을 보호하기 위해 제형화 하는 것이 바람직하다.

[0062] 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, 치메르살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약제학적 담체를 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 치료용 조성물을 이용하여 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상을 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.

[0063] 한편, 본 발명의 투여량은 바람직하게는 사람 간의 1~4% mass에 해당하는 $10^7 \sim 10^{10}$ 개의 세포이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0064] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 좀더 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 본 발명의 예시에 불과하며 이로써 본 발명이 제한되지는 않는다.

효 과

- [0065] 본 발명은 줄기세포로부터 간세포 분화를 유도한 후, ICG염색을 기반으로, LMPC방법을 이용하여 분화된 간세포만을 순수 분리 정제하는 기술을 개발하여, 간질환의 세포치료제로서 이용될 수 있는 많은 수의 순수한 집단 간세포를 다량 확보하여 확보한 간세포를 간질환 개선을 위한 세포치료제로써 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0066] 실시예 1. 간세포의 분화 유도

- [0067] 본 발명자의 등록특허(등록번호: 10-0861632)에서 사용한 방법으로 인간배아줄기세포로부터 간세포로 분화 유도하였다. 인간배아줄기세포로부터 배아체를 형성하여 배아체 내에 중내배엽 세포 집단의 양을 증가시킨 후, 중내배엽이 증가한 배아체를 5ug/ml collagen type I이 도포된 PALM® Duplex Dishes(PALM microlaser technologies에서 구입, LMPC 전용 배양접시로, 배양접시 위에 별도의 membrane이 장착되어있어 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 ug/ml 인슐린, 5.5 ug/ml 트랜스페린 (transferrin) 및 5 ng/ml 나트륨 투석고 (sodium selenite)), 20ng/ml hepatocyte growth factor(HGF), 10ng/ml oncostatin M(OSM) 및 10^{-6} M dexamethasone(DEX)을 첨가하여 14일간 간세포로 유도 분화하였다.

- [0068] 도 1-A는 미분화 인간 배아줄기세포로부터 배아체를 형성하여, 간세포 분화 유도를한 타임 테이블이다.

[0069] 실시예 2. 분화된 세포를 ICG(indocyanine green)로 염색

- [0070] 위의 방법으로 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포의 배양액에 1mg/ml indocyanine green(ICG)를 첨가하여 분화된 간세포가 ICG 염색될 수 있도록 30분간 37℃에서 인큐베이션 하였다.
- [0071] 도 1-B와 C는 HGF, OSM 및 DEX를 이용하여 유도 분화된 간세포(C)와 이들 사이토카인을 처리하지 않은 대조군(B)의 ICG 염색 차이를 나타낸 것이다.

[0072] 실시예 3. LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법을 이용한 간세포의 분리

- [0073] PALM® Duplex Dishes상의 ICG가 염색된 부분의 모서리를 따라 laser로 ICG+ clusters를 오려 내었다. 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 윗 쪽에 있는 튜브로 쏘아 올려줌).
- [0074] 도 2-A~D는 LMPC를 이용하여 ICG가 염색된 부분을 오려내는 과정을 나타내는 도면이다.
- [0075] 상기 방법으로 모아진 ICG+ clusters(도2-E)와 PALM® Duplex Dishes사에 남아있는 ICG- cells는 pipetting하여 세포에 붙어있는 membrane를 제거한 후, 5ug/ml collagen type I이 도포된 일반 배양접시에 옮겨져, DMEM/F12 배양액에 ITS (10 ug/ml 인슐린, 5.5 ug/ml 트랜스페린 (transferrin) 및 5 ng/ml 나트륨 투석고 (sodium selenite)), 20ng/ml hepatocyte growth factor(HGF), 10ng/ml oncostatin M(OSM) 및 10^{-6} M dexamethasone(DEX)을 첨가하여 실험동물에 이식 전까지 배양되었다.

[0076] 실시예 4. 분리 정제된 간세포의 순도(purity) 파악

- [0077] LMPC를 이용하여 분리 정제한 간세포의 순도를 파악하기 위하여 LMPC로 분리한 ICG+ cells와 ICG- cells를 PCR 및 면역 염색방법으로 확인한 결과, ICG+ cells는 ICG- cells에 비하여 주로 간세포 특이적 유전자

(albumin(ALB), α -fetoprotein(AFP), α 1-anti-trypsin(AAT) transthyretin(TTR), carbamoyl-phosphate synthetase I(CPS1)을 발현하는 반면에, ICG⁻ cells는 약간의 간세포 특이적 유전자 발현 외에도 주로 신경세포(MAP2), 췌장세포(Pdx1), 및 심근세포(MLC-2a)관련 유전자를 주로 발현하고 있음이 PCR을 통해 확인되었고(도3-A),

[0078] 면역 염색 결과 ICG⁺ cells는 간세포 특이적 표지 인자인 ALB와 CK18(cytokeratin 18)을 발현하는 세포가 대부분인 반면에, ICG⁻ cells는 대부분, 심근세포(Troponin I), 신경세포(Tuj1) 및 혈관세포(CD34)를 포함한 간세포 이외의 표지 인자를 발현함을 면역염색을 통하여 확인하였다(도3-B and C).

[0079] 또한, LMPC를 이용하여 분리정제한 간세포가 실질적으로 간세포가 생성하는 대표적인 단백질인 알부민을 생성해 분비하는지 확인하기 위하여, 미분화 인간 배아줄기세포, ICG⁻ cells, ICG⁺ cells, HepG2 cells, 및 primary human hepatocytes를 배양한 조건배지(conditioned medium)을 가지고 ELISA 방법을 통하여 알부민 분비 능력을 확인한 결과, ICG⁺ cells는 다른 실험군(ES cells, ICG⁻ cells)에 비하여 양성 대조군(HepG2, primary human hepatocytes)가 분비하는 양과 유사한 수준으로 알부민을 생성하여 분비하는 것을 확인함(도3-D).

[0080] 또한, LMPC를 이용하여 분리 정제한 간세포 집단 중 대표적 간세포 특이적 표지인자인 알부민을 발현하는 세포의 양을 확인하기 위하여, ICG⁻ cells와 ICG⁺ cells를 FACS 방법을 통하여 ALB⁺ cells의 %를 확인한 결과 ICG⁺ cells는 약 91%가 ALB⁺ cells인 반면, ICG⁻ cells는 단 15% 정도만이 ALB⁺ cells임을 확인하였다(도3-E). 결과적으로, ICG 염색 후 LMPC를 통하여 분리 정제한 ICG⁺ cells는 정상 간세포의 특징 및 기능을 유지한 고순도의 간세포로 구성되어있음을 확인하였다.

[0081] 실시에 5. 분리 정제한 간세포의 실험동물내의 이식 - 이식 초기 생존(survival) 및 생착(integration)

[0082] 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포를 이식하기 전, 실험동물 모델에 간질환을 유도 하였다. 5 내지 6 주령의 수컷 누드 마우스에 세포를 이식하기 24시간 전에, CCl₄(carbon tetrachloride, sigma에서 구입)를 복강 내에 주사(올리브 오일내에 10% CCl₄를 포함한 용액을 생쥐 몸무게 20g당 100ul를 복강내 주사)하여 간질환을 유도하였다.

[0083] 실험동물의 간질환 유도를 위해 CCl₄를 주입하면서, LMPC를 이용하여 분리한 ICG⁺ cells와 ICG⁻ cells를 실험동물내에서 생존 및 이동을 추적하기 위하여, 각각의 세포 집단을 40MOI(multiplicity of infection)의 luciferase가 달린 adenovirus를 도입하였다(도4-A). adenovirus를 도입한 후 24시간 후에 ICG⁺ cells와 ICG⁻ cells는 trypsin을 이용하여 단일 세포로 분리한 후, CCl₄를 주입하여 간질환이 유도된 실험동물을 마취 후, 복강을 절개하여 비장(spleen)에 각각 각각 2X10⁶ 개의 ICG⁺ cells 및 ICG⁻ cells를 이식하였다. 이와 동시에 세포를 이식한 동물의 대조군으로 세포를 포함하지 않은 medium을 동일하게 CCl₄를 주입하여 간질환을 유도한 생쥐의 비장에 주입하였다(Sham). 세포를 이식하고 2시간 이후(day 0)부터 이식 후 7일까지 Xenogen In Vivo Imaging System(Xenogen, IVIS-200)을 이용하여, 실험동물 내의 이식해준 세포에 대한 Bioluminescence imaging을 수행하였다.

[0084] 결과 Sham에서는 luciferase signal이 이식 후 luciferase signal이 7일까지 발현하지 않았으며, ICG⁺ Cells를 이식해준 생쥐에서는 luciferase signal이 비장에서 간으로 점진적으로 이동하여 7일째에는 대부분의 signal이 간에서 발현되는 반면에, ICG⁻ cells를 이식해준 생쥐는 이식 직후, luciferase signal이 간쪽으로 빠르게 이동하였으나, 이식 후 2 내지 3일 후 signal이 완전히 소멸됨을 확인하였다(도4-B and C).

[0085] 실험 동물의 생체내에서 상기 signal의 차이는 ICG⁺ cells는 간질환 실험동물 내에서 질병 부위인 간으로 점진적으로 이동하여, 일정기간 생존할 수 있는 반면에, ICG⁻ cells는 실험동물 내에서 생존할 수 없음을 시사한다.

[0086] 실험동물 내에서 ICG⁺ cells와 ICG⁻ cells의 상기 생존 차이를 좀더 확인하기 위하여, 각 실험군간의 luciferase signal차이가 현저하게 발생하는 이식 후 2 내지 3일 후의 생쥐 간을 적출하여, 절편한 후 In Situ Hybridization 및 면역염색 방법으로 확인한 결과, ICG⁺ cells는 간질환 동물의 간에 이동하여, 간의 central vein 주위에 cluster형태로 모여있는 반면에, ICG⁻ cells는 실험동물의 간에 전반적으로 흩어져 있음이 인간 세포 특이적인 Alu DNA sequence를 이용한 In Situ Hybridization을 통해 확인하였다(도4-D). 하지만, ICG⁻ cells가 실험동물의 간 전반에 걸쳐 존재하고 있지만, 이들 세포는 대부분 세포사로 인해 소멸되어감이 Alu DNA와 TUNEL In Situ Hybridization 및 human Albumin과 TUNEL의 동시 염색을 수행한 결과 확인되었다(도4-D). 이

와는 대조적으로 ICG+ cells는 대부분의 세포가 TUNEL로 염색이 되지 않아 생존하고 있음을 확인하였다(도4-D).

[0087] 실시예 6. 분리 정제된 간세포의 실험동물내의 이식 - 이식한 세포에 의한 숙주 간세포(host liver cells)의 재생 촉진

[0088] 이식하여준 간세포가 간질환 실험 동물 모델의 간세포(host liver)의 재생에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 이식 후 2 내지 3일 후의 생쥐를 죽이기 2 시간 전, 150mg/kg의 BrdU(bromodeoxyuridine)를 생쥐에 복강 내에 주입한 후, 실험동물의 간을 적출하여 절편한 후, 면역염색을 수행하였다.

[0089] 그 결과, ICG+ cells를 이식해준 생쥐의 간 내의 간세포들은 다른 그룹(normal, sham, ICG- cells)에 비하여 증식하는 세포의 수가 증가했음을 mouse Albumin과 BrdU 염색을 통하여 확인하였다(도5-A). 이와 동시에 간세포 주위를 감싸고 있는 모세혈관의 일종인 liver sinusoidal endothelial cells(LSECs)의 양 또한 다른 그룹에 비하여 ICG+ cells를 이식하였을 때 증가 하였음을 PECAM 염색을 통하여 확인하였고, ICG+ cells를 이식한 마우스의 간에서 일반 간 재생과정에서 보여지는 간세포가 증식한 후 간세포 사이 사이에 LSECs가 새로 생기는 과정 또한 관찰 되었다(도5-B, 정상적인 간세포는 LSECs가 간세포들을 단일 라인(single line)을 감싸고 있는데, 간 이 손상을 입어 재생을 하게되면, 간세포가 먼저 증식을 하여 한 라인의 LSECs내에 여러 겹의 간세포층이 생기게 되고, 이후 증식한 간세포들 사이 사이에 새로 생성된 LSECs가 중간 중간에 끼워들어가 결국엔 다시 단일 라인의 LSECs가 간세포들을 둘러 싸게된다).

[0090] 상기와 같은 현상 차이가 이식해준 세포의 종류에 기인한다는 것을 확인하기 위하여, LMPC를 이용해 분리해낸 ICG+ cells와 ICG- cells 각각을 48hr 배양한 조건 배지(conditioned medium)을 이용하여 cytokine array를 수행하여 각각의 세포 집단이 분비하는 사이토카인의 종류를 스크리닝 해보았다(Ray biotechnology에서 구입한 kit사용, array는 Ray biotechnology에서 제공한 매뉴얼에 따라 수행함.). 그 결과, ICG- cells 조건 배지에 비하여, ICG+ cells 조건 배지 내에는 간세포 재생에 관여하는 hepatocyte growth factor(HGF)가 다량 함유되어 있음을 확인하였다(도5-C). 이는 ICG+ cells가 간 질환 동물에 이식된 후, HGF를 분비하여, host liver의 재생을 촉진한다는 것을 의미하고, 상기에서 설명된 이식한 세포에 따라 host liver 재생의 차이를 뒷받침 해주고 있다. ICG+ cells의 이식에 의하여 host liver의 재생 촉진을 좀 더 증명하기 위하여, mouse의 간을 적출하여, 간세포와 LSECs를 분리하여 In Vitro에서 배양한 후, 각각 control medium, ICG- cells 조건배지, ICG+ cells 조건 배지를 첨가하여 24시간 배양한 후 BrdU incorporation 실험을 수행하여, 각각 mouse albumin과 PECAM을 BrdU와 함께 염색해 본결과 생쥐 간세포, LSECs 모두 각각 mouse albumin과 BrdU, PECAM과 BrdU를 동시에 발현하는 세포가 ICG+ cells 조건 배지를 처리했을 때 증가하였음을 증명하였다(도5-D).

[0091] 실시예 7. 분리 정제된 간세포의 실험동물내의 이식 - 이식한 세포의 실험동물 내에서의 장기간 생존 및 기능성 유지

[0092] 상기의 실시예 4 및 5에서 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포의 이식 초기 생착 및 생존, 이식을 받은 host liver의 재생 촉진 능력을 확인하였다. 본 실시예에서는, 실험동물 내에서 이식한 간세포의 장기간 생존 및 장기간 기능성 유지가 가능한지를 확인하였다. 인간배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포를 이식한 후, 이식 직전부터 이식 후 35일까지 이식을 받은 실험동물에서 혈액을 채취 하여 혈청을 수확한 후, 생쥐 혈청 내에 인간 알부민의 존재 유무를 human albumin ELISA kit(Bethyl laboratory에서 구입) 및 western blot으로 확인하였다.

[0093] 그 결과 ICG+ cells를 이식한 생쥐의 혈청내에 인간 알부민의 양이 sham이나 ICG- cells를 이식해준 생쥐에 비하여 35일간 높은 수준으로 존재함을 확인하였고, ICG+ cells 이식 후 35일 쯤의 생쥐의 혈청내에 **인간알부민의 존재**를 western blot으로 한번 더 확인하였다(도6-A). 이는 이식해준 ICG+ cells가 간질환 동물내에서 장기간 생존하여, 인간 알부민을 분비하고 있다는 것을 증명한다.

[0094] 이와 동시에 이식 후 35일 쯤에, ICG+ cells를 넣어준 생쥐의 간 조직은 정상 간 조직과 유사한 수준으로 복구가 되었으며, 간 조직 내에 인간 특이적인 Alu DNA sequence, human Albumin, human α -fetoprotein, human cytokeratin 18를 발현하는 세포가 존재함을 확인하였다(도6-B).

[0095] 이는 이식해준 ICG+ cells가 간질환 동물의 간내에 장기간 생존해 있음을 한번더 증명한 결과이다. 이에 더하여, 간세포를 이식해준 생쥐의 간기능 증진 정도를 확인하기 위하여, 생쥐 혈청내의 total albumin 존재 양

을 Wako사에서 구입 가능한 Albumin BII kit를 사용하여 확인한 결과, ICG+ cells를 이식한 생쥐의 알부민 분비량은 정상 생쥐가 분비하는 알부민 양과 유사한 수준으로 회복되었음을 확인하였다(도6-C).

산업이용 가능성

[0096] 본 발명에 따르면, vital dye인 ICG 염색으로 염색 전후 간세포의 형태 및 기능성에 변화없이, LMPC 방법을 통해 높은 분획율로 유전적 변형(genetic modification)을 거치지않은 간세포를 순수 분리 정제할 수 있으므로 이를 이용한 세포 치료제는 간기능 손상 치료 및 개선에 효과적일 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0097] 도1은 인간 배아줄기세포(Human embryonic stem cells)로부터 간세포 분화를 유도하는 과정(A) 및 분화 유도된 간세포에 ICG(Indocyanine green)가 염색되는 정도(A 및 B)를 나타내는 도면이다. 대조군(control)에 비하여 특정 간세포 유도 사이토카인(cytokine)을 처리하여 간세포로 유도 분화시킨 실험군(HGF+OSM+DEX)에 많은 세포들이 ICG가 염색되었음을 나타낸다.

[0098] 도2는 ICG염색 후 LMPC(Laser microdissection and pressure catapulting) 방법을 이용하여 분화된 간세포만 특이적으로 분리 정제하는 과정을 나타내는 도면이다. ICG가 염색된 세포(ICG+ cells)를 laser를 통하여 오퍼네어(A, B, C, and D) ICG가 특이적으로 염색된 세포들을 수집하였다(E).

[0099] 도3은 LMPC를 통하여 분리한 ICG(+) cells와 ICG(-) cells의 특징을 분석한 도면이다.

[0100] PCR을 통하여 간세포 특이적 유전자들과 간세포 이외의 다른 세포 특이적 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 ICG(+) cells는 간세포 특이적 유전자를 다량 발현하고 있는 반면에, ICG(-) cells는 간세포 외의 다른 유전자가 높이 발현되는 것을 확인하였다(A).

[0101] 또한 면역염색 결과 또한 ICG(+) cells는 대부분이 간세포 특이적 표지인자인 albumin과 cytokeratin 18을 발현하는 세포들로 구성되어있고(B), ICG(-) cells를 구성하고 있는 세포들은 심근 세포 특이적 표지인자(troponin I), 신경 세포 특이적 표지인자(Tuj1) 및 혈관세포 특이적 표지인자(CD34를 발현함을 확인하였다(C).

[0102] 또한 albumin을 세포외로 분비하는 능력 또한 ICG(+) cells가 현저히 높음을 확인하였다(D),

[0103] FACS 분석 결과 또한 분리한 ICG(+) cells를 구성하는 세포 중 약 90% 세포가 간세포 특이적 표지 인자인 albumin을 발현함을 확인하였다(E).

[0104] 도4는 LMPC를 통하여 분리한 ICG(+) cells와 ICG(-) cells를 간질환 실험동물 모델에 이식하였을 때, 이식한 세포의 질환 부위(간)으로의 이동 및 초기 생존의 차이를 나타내는 도면이다.

[0105] 이식 한 ICG(+) cells와 ICG(-) cells의 이동 및 생존을 추적하기 위하여, 이식 전 luciferase를 발현하는 adenovirus(Ad-luci)를 도입하였다(A).

[0106] Ad-luci를 도입한 ICG(+) cells와 ICG(-) cells를 간질환 실험동물의 비장(spleen)을 통하여 이식 후, 7일간 Bioluminescence imaging을 통하여 monitoring한 결과 ICG(+) cells는 비장에서 질환 부위인 간으로 점진적으로 이동하며, 7일간 간내에 계속 생존해 있는 반면에, ICG(-) cells는 ICG(+) cells에 비하여 간으로 빠르게 이동하지만 luciferase signal이 2일 내에 사라짐을 확인하였다(B 및 C).

[0107] Bioluminescence imaging을 통하여 확인한 ICG(+) cells와 ICG(-) cells의 간질환 실험동물 내에서의 이동 및 생존의 차이를 확인하기 위하여, ICG(-) cells의 luciferase signal이 사라진 2일째의 간 조직을 적출하여 절편한 후 In situ hybridization 및 면역 염색 기법을 통해 확인한 결과 ICG(+) cells는 간질환 동물 간의 central vein 주위에 군집을 이루어 존재하는 반면에 ICG(-) cells는 간 조직 전반에 걸쳐 퍼져있음을 human specific Alu DNA sequence의 In situ hybridization을 통하여 확인하였으며, 간질환 동물의 간에 존재하는 ICG(+) cells는 세포사(apoptosis)를 나타내는 TUNNEL+ cells가 드물게 발견되는 반면에, 대부분의 이식한 ICG(-) cells는 TUNNEL+ cells로 이식 된 후 간질환 동물의 간 내에서 세포사가 일어남을 확인하였다(D).

[0108] 도5는 이식한 ICG(+) cells에 의한 간질환 동물의 간세포(host liver cells)의 증식 및 재생을 확인한 도면이다.

[0109] ICG(+) cells를 이식한 실험동물의 간세포는 정상 쥐의 간, medium만 주입한 sham그룹 및 ICG(-) cells를 이식

한 그룹에 비하여 많은 간세포들이 세포증식을 나타내는 Brdu+ 인것을 확인하였다(A).

[0110] 또한 LSECs(liver sinusoidal endothelial cells) 특이적 표지 인자인 PECAM을 면역염색 해본 결과, ICG(+) cells를 이식한 생쥐의 간 내의 PECAM 발현 정도는 정상 쥐의 PECAM 발현 양과 유사하게 회복되었으며, 간세포 재생 과정 중에 나타는 현상과 일치하게 LSECs가 증식한 간세포를 둘러 싸는 동시에 증식한 간세포 사이 사이에 새로 LSECs가 생성되는 것을 확인하였다(B).

[0111] ICG(+) cells를 간질환 실험동물에 이식하였을 때, host liver cells의 증식 및 재생을 촉진하는 원인을 분석하기 위하여, LMPC로 분리 정제한 ICG(+) cells와 ICG(-) cells가 분비하는 사이토카인을 확인해본 결과 ICG(+) cells는 ICG(-) cells에 비하여 현저히 많은 양의 HGF(hepatocyte growth factor)를 분비하며, ICG(-) cell에서는 분비되지 않는 OSM(oncostatin M)을 분비하는 것을 확인하였다(C).

[0112] ICG(+) cells가 특이적으로 분비하는 사이토카인과 hepatocytes이 LSECs의 증식에 영향을 주는지 확인하기 위하여, 생쥐로부터 분리해낸 간세포와 LSECs에 각각 ICG(+) cells를 배양한 conditioned medium(ICG(+) cell CM) 또는 ICG(-) cells를 배양한 conditioned medium(ICG(-) cell CM)을 처리한 결과, In vivo 결과와 마찬가지로 생쥐에서 분리해낸 간세포 및 LSECs가 ICG(+) cell CM을 처리 하였을 때 증식이 현저히 증가함을 확인하였다(D).

[0113] 도6은 이식한 ICG(+) cells의 간질환 실험동물 모델의 생체 내에서의 장기간 생존 및 간 기능성 회복에 관한 도면이다.

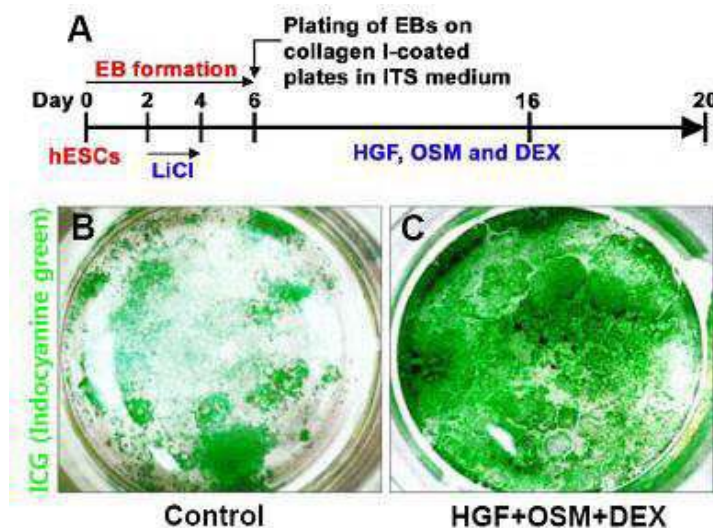
[0114] sham 및 ICG(-) cells 이식 생쥐 모델에 비하여, ICG(+) cells를 실험동물에 이식하였을 때는 35일째 까지 간 알부민의 분비가 유지됨을 확인하였다(A).

[0115] 간을 적출하여 절편한 조직을 여러 염색법을 통하여 확인해 본 결과, ICG(+) cells를 이식한 질환 동물의 간은 정상 생쥐의 간과 형태적으로 유사하게 회복되었을 뿐만 아니라, 인간세포 또는 인간 간세포 특이적인 표지 인자로 염색해 보았을 때 실험동물의 간내에 생존하여 존재하고있음을 확인하였다(B).

[0116] 뿐만아니라, 알부민의 분비 능력 또한, ICG(+) cells를 이식하였을때 정상 생쥐의 수준과 유사하게 회복되었음을 확인하였다(C).

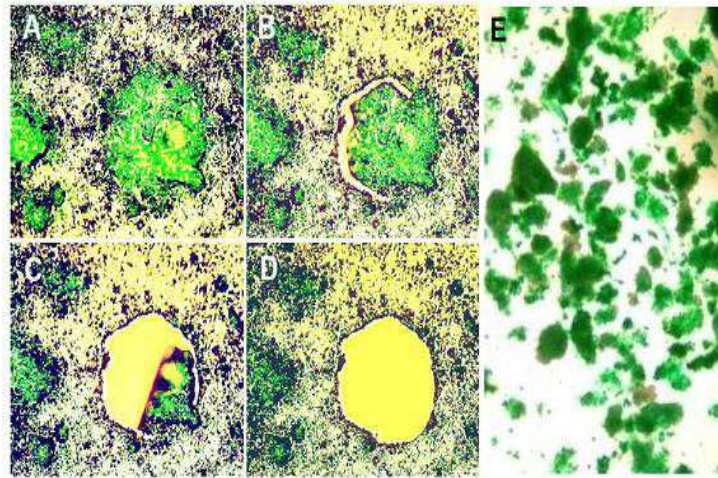
도면

도면1

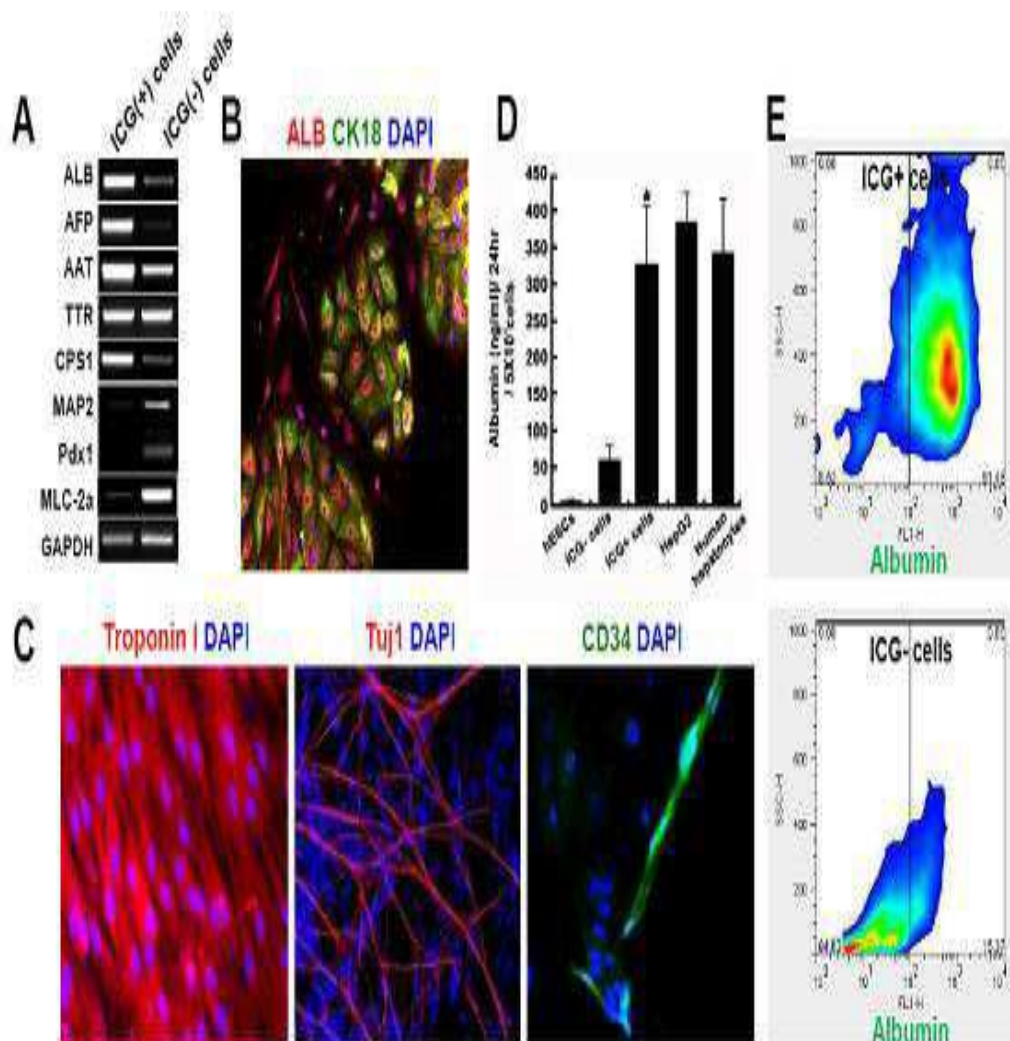


도면2

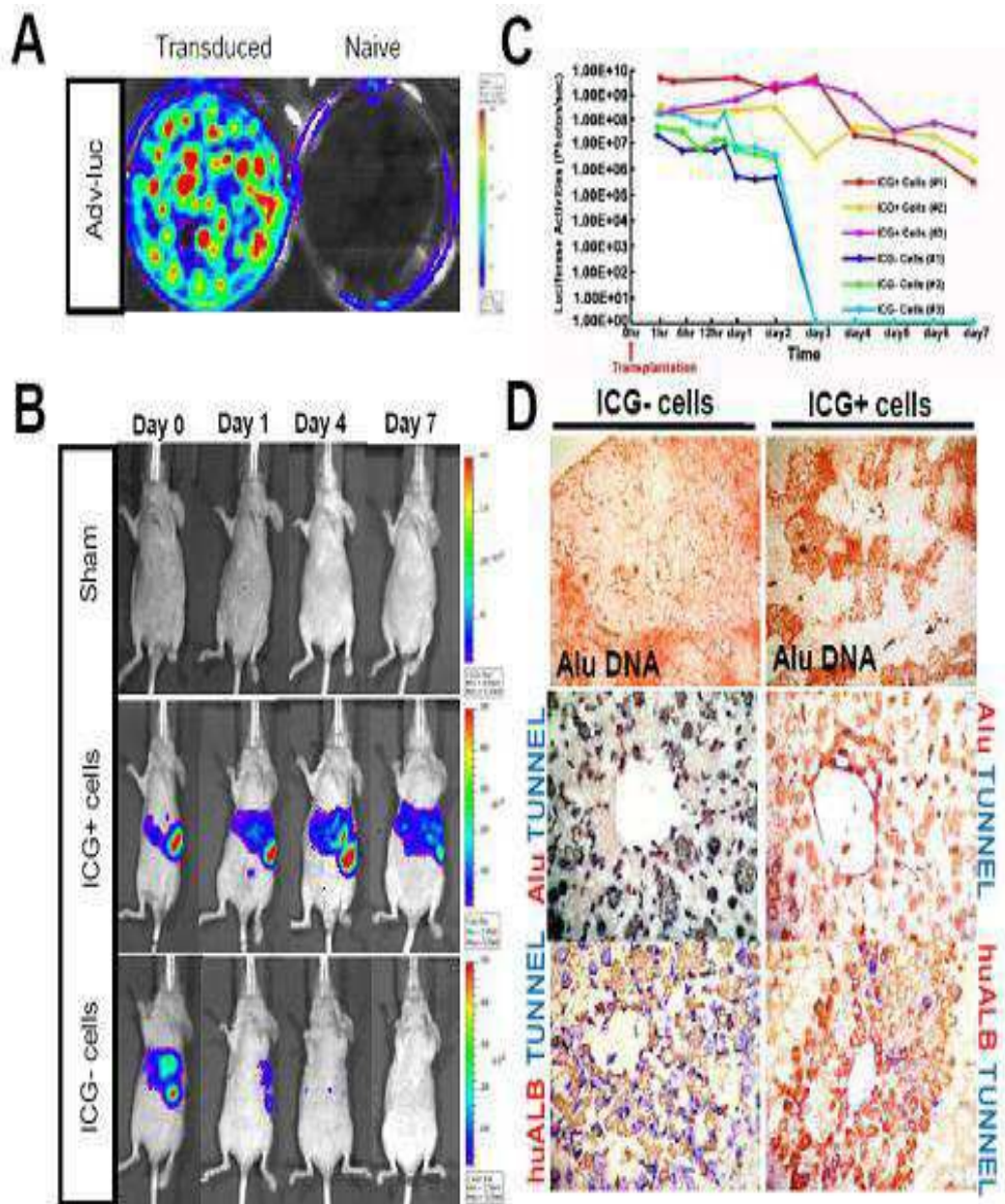
Laser capture microdissection of ICG + cells



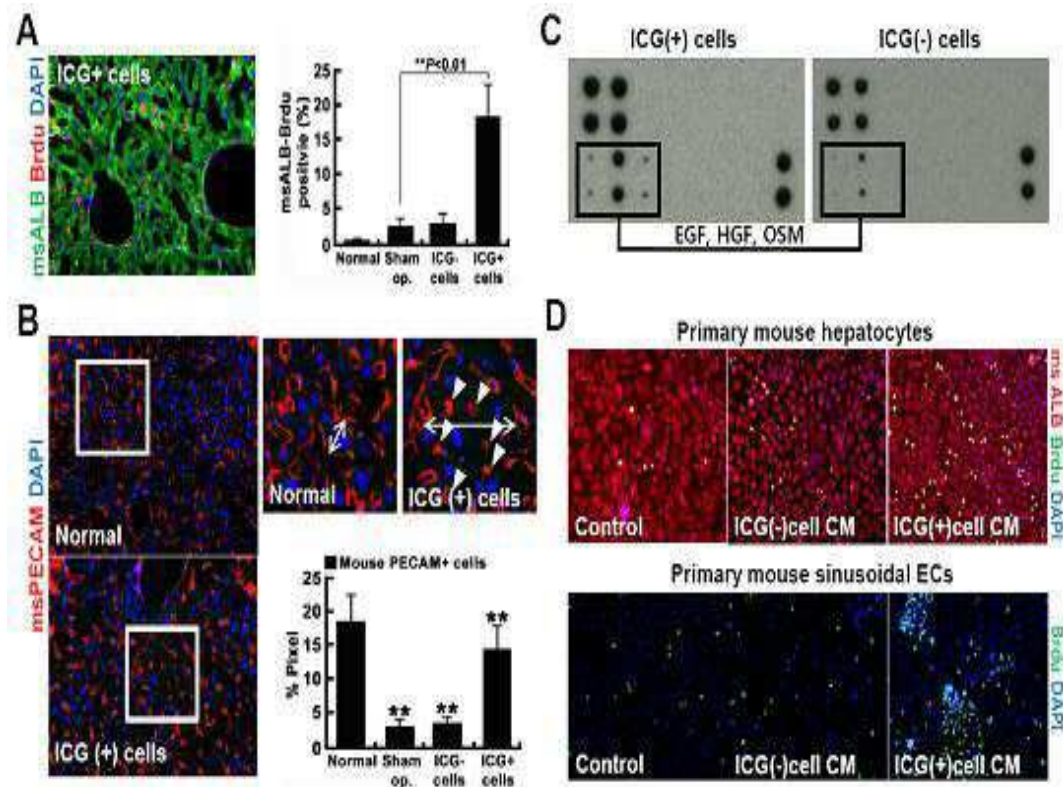
도면3



도면4



도면5



도면6

