

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2008-0023079 2008년03월12일
(51) Int. Cl.	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내	(72) 발명자 김종훈 서울시 용산구 이태원2동 이태원 주공아파트 108동 301호 우동훈 경기도 군포시 산본동 목련아파트 1213동 205호	(74) 대리인 손민
(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자 (30) 우선권주장	10-2006-0110630 2006년11월09일 2006년11월09일 60824908 2006년09월08일 미국(US)		

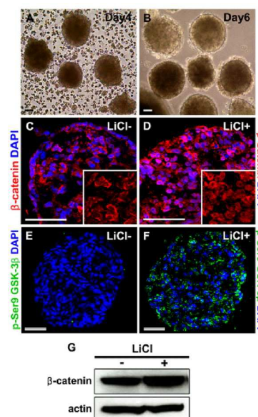
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 줄기세포의 분화유도 방법

(57) 요약

본 발명은 줄기세포의 분화유도 방법 및 그로부터 분화된 세포에 관한 것으로, 상세하게는 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계 및 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화유도 방법, 상기 방법으로 제조된 세포 및 이를 포함하는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계; 및 (b) 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화유도 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, (a) 단계의 배상체 형성은 줄기세포를 부유 응집 배양하여 이루어지는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, (b) 단계의 배양은 배상체를 배양용기에서 평면 배양하여 이루어지는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 배양용기에는 세포외 기질이 포함되는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 세포외 기질은 라미닌, 콜라겐, 또는 앵겔브레드-홀름-스왈 인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, (b) 단계의 염화리튬을 상기 배상체에 수일간 처리한 후 염화리튬을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 염화리튬의 처리 후 제거는 염화리튬을 1일 내지 3일간 처리한 다음 처리된 세포를 염화리튬이 없는 배양액에서 더 배양하는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 염화리튬의 처리 후 제거는 염화리튬을 2일간 처리한 다음 처리된 세포를 염화리튬이 없는 배양액에서 더 배양하는 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 염화리튬을 5 mM 내지 20 mM로 처리하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 염화리튬을 10 mM로 처리하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항의 어느 한 항에 있어서, (c) 간세포 분화 제제를 첨가 배양하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 간세포 분화 제제가 HGF 또는 OSM인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 줄기세포는 시험관 내 배양에서 간세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 포유동물 유래의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 포유동물 유래의 세포는 만능 줄기세포 또는 상기 세포의 기원 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 만능 줄기세포는 배아 줄기세포, 배아 줄기세포와 유사한 형질을 가지는 세포, 배아 생식세포, 또는 성체 다능성 줄기세포인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 만능 줄기세포는 배아 줄기세포인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 배아 줄기세포는 인간 배아 줄기세포인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 방법에 의해 분화된 세포 및/또는 상기 세포의 자손.

청구항 19

제18항에 있어서, 하기 특징 중 3가지 이상을 갖는 세포 및/또는 이의 자손:

- (a) GATA4와 Sox17의 동시 발현의 증가;
- (b) Foxa2와 Sox17의 동시 발현의 증가;
- (c) 네스틴과 Pax6의 동시 발현의 감소 또는 부재;
- (d) Mixl1, Brachyury, Foxa2, 또는 Sox17의 발현;
- (e) Sox1 또는 Pax6의 감소 또는 부재;
- (f) Prox1, Hnf4, 또는 Hex의 발현; 및
- (g) 간세포의 형태학적 특성.

청구항 20

제18항에 있어서, 하기 특징 중 2가지 이상을 갖는 세포 및/또는 이의 자손:

- (a) ALB 또는 AAT의 발현;
- (b) 인슐린 또는 Pdx1의 발현;
- (c) Cdx2의 발현; 및
- (d) 내장상피 세포 또는 간세포의 전구세포인 난원형세포의 형태학적 특성.

청구항 21

제18항에 있어서, 하기 특징 중 3가지 이상을 갖는 세포 및/또는 그 자손:

- (a) ALB, AFP, TTR, TAT, CPS1 및/또는 Hnf4의 발현;
- (b) ALB, AFP, GATA4, CK8 및/또는 CK18의 발현;
- (c) 간세포의 다각형 모양 또는 두 개의 핵을 가지는 형태학적 특성;
- (d) 분화된 세포가 인간 태아단계의 간세포와 유사한 특성; 및
- (e) 정상 간세포의 기능.

청구항 22

제21항에 있어서, 약 40% 이상의 세포가 하기의 특징을 갖는 세포 및/또는 이의 자손:

- (a) ALB와 CK18의 동시 발현;
- (b) ALB와 CK8의 동시 발현; 및
- (c) 정상 간세포의 기능.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자들의 발현의 증가 또는 감소는 항체 및/또는 RT-PCR로 검출가능한 것을 특징으로 하는 세포 및/또는 이의 자손.

청구항 24

제18항에 있어서, 하기 특징의 정상 간세포 기능 중 3가지 이상을 갖는 세포 및/또는 이의 자손:

- (a) ICG 흡수;
- (b) GGT 활성;
- (c) PAS로 검출 가능한 세포질 내의 글리코겐 저장 증거; 및
- (d) 세포대사에 의한 우레아의 분비.

청구항 25

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항의 세포 및/또는 이의 자손을 포함하는 치료용 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 조성물은 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상의 치료에 필요한 간기능 회복을 위한 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 줄기세포의 분화유도 방법 및 그로부터 분화된 세포에 관한 것으로, 상세하게는 줄기세포로부터 배상체 (embryoid body)를 형성하는 단계 및 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화유도 방법, 상기 방법으로 제조된 세포 및 이를 포함하는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <8> 줄기세포 (stem cell)는 그 기초 연구뿐만 아니라 이식 (transplantation) 또는 재생 (regeneration)을 통한 치료제 (therapeutic medicine)로 주목받고 있다. 이러한 학문적, 산업적 가치로 인해 줄기세포에 대한 연구는 치열한 경쟁 속에서 진행되고 있으며, 특히 줄기세포의 유지 (maintenance) 및 자가 재생산 능력 (self-renewal capacity)에 대한 반응 기작 및 원하는 특정 조직으로의 분화 (differentiation)를 유도할 수 있는 방법 개발 등이 주요 연구분야이다.
- <9> 최근 다수의 발명에서, 줄기세포가 질병, 감염 과정에서 또는 선천적 기형으로 인해 손상 받는 것들을 대체하기 위한 다양한 세포 유형 및 조직의 출처가 될 수 있다는 예측이 제시되었다. 다양한 유형의 추정 줄기세포는 이들이 분열함에 따라 분화하여, 특정 조직, 예컨대 심장, 간 또는 뇌의 독특한 기능을 수행할 수 있는 세포로 성숙한다.
- <10> 특히 중요한 연구는, 배아 조직 (embryonic tissues)으로부터 2 가지 유형의 인간 만능 줄기세포 (human pluripotent stem cells)의 단리(isolation)였다. 만능 줄기세포는 체내에서 대부분의 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력을 갖는 것으로 여겨지고 있다 (R.A. Pedersen, *Scientif. Am.* 280(4):68, 1999). 배아 줄기세포 (embryonic stem cells)에 대한 초기 연구는 마우스에서 수행되었으나 (Robertson, *Meth. Cell Biol.* 75:173,

1997; 및 Pederson, *Reprod. Fertil. Dev.* 6:543, 1994), 원숭이 및 인간 만능 줄기세포는 훨씬 더 연약해서 마우스 배아 줄기세포와 동일한 배양 조건에서 분화되지 않는 것으로 나타났다.

<11> 최근 Thomson 등은 최초로 영장류로부터 배아 줄기세포를 성공적으로 배양하였다 (미국 등록특허 제5,843,780호; Thomson *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995). 이어서 이들은 인간 포배 (blastocysts)로부터 인간 배아 줄기세포를 유도하였다 (Thomson *et al*, *Science* 282:114, 1998). Gearhart 등은 태아 생식선 조직으로부터 인간 배아 생식세포 (human embryonic germ cells)의 분화를 유도하였다 (Shamblott *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998 및 국제 공개특허 W098/43679). 상기 인간 배아 줄기세포 및 인간 배아 생식세포는 둘 다 오랫동안 찾던 인간 만능 줄기세포의 특징을 지니고 있다. 이들은 분화하지 않고 시험관 내에서 증식을 지속할 수 있고, 정상 핵형을 보유하며, 모든 성인 세포 유형을 생성하도록 분화하는 능력을 보유한다.

<12> 인간을 포함한 대부분의 척추동물은 초기 배아 (early embryo)의 장배형성과정 (gastrulation)을 거쳐 초기 삼배엽성세포, 즉 내배엽, 중배엽 그리고 외배엽을 형성하며, 상기 삼배엽성 세포로부터 인체조직을 구성하는 모든 세포들이 분화된다. 초기배아인 배반포 (blastocyst)의 내세포괴 (inner cell mass)를 추출하여 *in vitro*에서 확립된 배아 줄기세포 (embryonic stem cell)의 경우, 이러한 장배형성과정과 유사한 현상이 배상체 (embryoid body) 형성과정 동안 관찰된다. 따라서 배아줄기세포로부터 특정세포를 분화해 내기 위한 첫 번째 중요한 단계는, 분화해내고자 하는 목적 세포의 기원이 되는 특정 배엽세포를 증가시키는 것이며, 이로부터 원하는 세포를 분화해 내는 것이 가장 효율적인 분화방법이 될 것이다. 한 예로, 인간 배아 줄기세포로부터 간세포를 분화해내기 위해서는 우선적으로 간세포의 기원이 되는 내배엽 세포를 증가시키고, 이로부터 간세포를 분화해내는 것이 효율적인 분화방법이다. 다만, 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽의 증가와 간세포로의 분화를 연관지어 개발된 분화방법에 관련된 보고는 현재까지 전무한 실정이다.

<13> 또한, 내배엽성 유래 특정 세포 (예로, 내배엽 세포 유래 간세포 또는 췌장 세포)는 중배엽 또는 외배엽성 유래 특정 세포들보다 인간 배아 줄기세포로부터 분화해내기가 어려운 반면, 당뇨병, 간경화 및 여러 난치성 질환의 세포치료에 요구되는 세포들 (간세포 혹은 인슐린 분비성 췌장 세포)은 내배엽성 세포에서 유래하기 때문에 내배엽성 세포로부터 특정 세포 (예로, 간세포 또는 췌장 세포)로의 분화유도에 관련된 많은 연구가 진행되었다 (Kubo *et al*, *Development*, 131:1651-1662, 2004; Tada *et al*, *Development*, 132:4363-4374, 2005; D'Amour *et al*, *Nat. Biotechnol.*, 23:1534-1541, 2005; Yasunaga *et al*, *Nat. Biotechnol.*, 23:1542-1550, 2006). 하지만, 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포를 형성하였다는 보고는 D'Amour 등이 유일하며 (D'Amour *et al*, *Nat. Biotechnol.*, 23:1534-1541, 2005), 또한 액티빈 (activin) A라는 고가의 사이토카인을 고농도 (100 ng/ml)로 사용하기 때문에, 현재로는 D'Amour 등의 방법을 이용하여 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하는데 많은 비용이 소요되는 문제점이 있다.

<14> 내배엽성 유래 세포 중, 간은 다른 기관에 비해 현저하게 높은 재생능력을 갖는다. 그러나 간질환 환자들에게 일반적으로 행해지는 현재의 간 이식 수술은 면역거부반응, 공여자의 희소성 그리고 높은 수술비용 등의 많은 문제점 등으로 인해 그 수혜자가 극히 제한적이다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 간 이식의 대체물 (alternative source)로 떠오르는 것이 줄기세포를 이용하여 분화시킨 간세포의 이식이다. 배아 줄기세포의 경우 무한 증식능력을 갖기 때문에 그 분화 기작이 규명된다면 세포 대체 치료법 (cell replacement therapy)의 무한한 소스가 될 것이며, 따라서 설치류 배아 줄기세포로부터 간세포를 분화시키는 기작을 규명하려는 많은 연구가 시도되고 있었다 (Lavon *et al*, *J. Cell Biochem.*, 96:1193-1202, 2005). 하지만, 인간 배아 줄기세포로부터 간세포 분화유도에 관한 보고는, 내배엽성 세포의 분화유도에 관한 연구와 마찬가지로, 전 세계적으로 현재 단 4편의 연구결과 (Rambhatla *et al*, *Cell Transplant*, 12:1-11, 2003; Lavone *et al*, *Differentiation*, 72:230-238, 2004; Shirahashi *et al*, *Cell Transplant*, 13:197-211, 2004; Schwartz *et al*, *Stem Cell Dev.*, 14:643-655, 2005)만이 보고되었다. 이러한 사실은 인간 배아 줄기세포로부터 간세포로의 분화유도 방법의 개발에 대한 어려움 시사한다. 또한, 상기 보고는 만능 줄기세포인 인간 배아 줄기세포로부터 배상체 형성과정에서 내배엽의 생성 촉진 없이, 성장인자의 처리를 통해 간세포로의 직접분화를 유도하였거나 특정 유전자 도입에 의한 분화 유도방법으로서, 그 분화효율이 낮으며, 정상적인 간세포의 발생과정을 대변하고 있지 못하다는 문제점이 있었다.

<15> 이에, 본 발명자들은 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화유도 및 이의 내배엽성 유래 간세포로의 분화를 연관지어 보다 나은 분화효율을 가지는 분화유도 방법을 개발하기 위해 예의 노력하였으며, 그 결과 저렴한 비용의 염화리튬을 사용하여 정상발생과정과 유사한 분화현상을 실험실 내의 배양에서 유도해 냄으로써 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 높은 분화효율 및 이로부터 간세포로의 분화를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었

다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <16> 본 발명의 목적은 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계 및 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화유도 방법을 제공하는데 있다.
- <17> 본 발명의 다른 목적은 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계, 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계 및 이에 간세포 분화 제제를 첨가 배양하는 단계를 더 포함하는 줄기세포의 간세포로의 분화유도 방법을 제공하는데 있다.
- <18> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화유도 방법으로 유도된 세포 및/또는 이의 자손 (progeny)를 제공하는데 있다.
- <19> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 분화유도 방법으로 유도된 세포를 포함하는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <20> 일 양태로, 본 발명은 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계 및 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화유도 방법을 제공한다. 구체적으로는, Wnt/ β -catenin signaling을 유도하는 물질인 염화리튬을 미분화 줄기세포 유래 배상체에 수일간 처리한 후 염화리튬을 제거하여 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포 분화 유도 방법을 제공한다.
- <21> 바람직하게는 미분화 줄기세포를 1일 내지 3일간 배양하여 배상체를 형성한 후, 여기에 염화리튬을 1일 내지 3일간 처리하고, 처리된 세포를 염화리튬이 없는 배양액에 옮겨 추가 배양하여 줄기세포를 분화유도하는 방법을 제공한다. 더욱 바람직하게는, 미분화 줄기세포를 2일간 배양하여 배상체를 형성한 후, 여기에 염화리튬을 2일간 처리하고, 처리된 세포를 염화리튬이 없는 배양액에 옮겨 2일간 추가 배양하여 줄기세포를 분화유도하는 방법을 제공할 수 있다. 상기 방법에서 염화리튬은 배양액에 1 mM 내지 50 mM의 농도, 바람직하게는 5 mM 내지 20 mM의 농도, 더욱 바람직하게는 10 mM 농도로 첨가하는 것이 바람직하다.
- <22> 본 발명의 줄기세포 분화유도 방법에서, 줄기세포는 시험관 내 배양에서 간세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 포유동물 유래의 세포, 바람직하게는 만능 줄기세포 (pluripotent stem cells) 또는 상기 세포의 기원 세포인 것을 특징으로 할 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, 사람일 수 있으며, 구체적으로는 사람일 수 있으나, 시험관 내 배양에서 간세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 포유동물 유래의 세포라면 그 출처에 제한되는 것은 아니다.
- <23> 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.
- <24> 일 양태로서, 본 발명의 줄기세포의 분화유도 방법에 있어서, 만능 줄기세포는 ES 세포, 배아 줄기세포와 유사한 형질을 가지는 세포, EG 세포, 또는 MAPC인 방법, 바람직하게는 ES세포, 더욱 바람직하게는 인간 ES 세포인 줄기세포의 분화유도 방법일 수 있다.
- <25> 마우스 유래 ES 세포의 구체적인 예로는, EB3 세포, E4 세포, D3 세포, CCE 세포, R1 세포, 129 SV 세포, J1 세포 등이 있다. 또한, ES 세포, EG 세포, MAPC의 제조, 계대, 보존 방법에 대한 표준적인 프로토콜이 이미 확립되어 있으며, 공지된 방법 (Matsui *et al*, *Cell* 70:841, 1992; Shambloott *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998; Jiang *et al*, *Nature* 418:41, 2002; 미국 등록특허 제 6,060,622호; 국제 공개특허 01/11011호)을 참조하여, 이들 만능 줄기세포를 용이하게 사용할 수 있다.
- <26> 또한, 본 발명에서 이용가능한 세포는, 상기 3종으로 한정되지 않으며, 포유동물의 배아나 태아, 제대혈, 또는

성체 장기나 골수 등의 성체 조직, 또는 혈액 등으로부터 유래된, 모든 다능성 줄기세포를 포함한다. 구체적인 예로, 모근 초세포나 표피세포에 5-아자사이티딘(5-azacytidine, 이하 "AZC"로 약칭함) 등의 약제를 처리하여 수득한 줄기세포 (Sharda & Zahner, 국제공개특허 제02/051980호)나, 단핵구 세포에 CR3/43 항체를 처리하여 수득한 줄기세포 (Abuljadayel, *Curr. Med. Res. Opinion* 19: 355, 2003), 또는 성체내 귀세포 유래 줄기세포 (Li *et al*, *Nature Med.*, Advance online publication) 등의 ES 세포와 유사한 형질을 가지는 줄기세포를 들 수 있다. 이 경우, ES 세포와 유사한 형질이란, ES 세포에 특이적인 표면(항원) 마커가 존재하거나, ES 세포 특이적인 유전자를 발현하거나, 또는 테라토마 (teratoma) 형성 기능을 가지거나, 또는 키메라 마우스 형성능이 있는 등의 ES 세포에 특이적인 세포 생물학적 성질로 정의할 수 있다.

<27> 또한, ES 세포와 유사한 형질을 갖지 않는 세포, 또는 만능 줄기세포가 아닌 세포라도, 적어도 시험관 내 배양에서 간세포형의 형질을 가지는 세포로 분화할 수 있는 성질을 가진 세포라면, 본 발명에 기재된 방법에 사용될 수 있다.

<28> 본 발명의 용어 "배상체 (embryoid body)"는 줄기세포의 분화 초기에 줄기세포들이 뭉쳐 동그란 공 모양의 세포 덩어리인 응집체를 형성하는데, 상기 배상체는 이러한 "응집체 (aggregate bodies)"와 동일한 의미의 기술 용어이다. 상기 용어는 만능 줄기세포가 단층 배양물에서 과성장되거나 현탁액 배양물에서 유지될 때 나타나는 분화 및 미분화 세포들의 응집체를 의미하며, 배상체는 형태학적 기준으로 구별할 수 있는, 전형적으로 여러 배엽으로부터의, 상이한 세포 유형의 혼합물이다

<29> 본 발명의 분화유도 방법에 있어서, 줄기세포로부터의 배상체의 형성은 일반적으로 사용되는 공지의 부유 응집 배양법, 현적 (hanging drop) 배양법 및 영양세포(feeder)를 이용한 공배양법 (co-incubation method) 등을 통해 당업자에게 잘 알려진 방법을 통해 이루어질 수 있다.

<30> 상기 '영양세포(feeder)' 또는 '피더세포'는 다른 유형의 세포와 공배양되어 제2 유형의 세포가 성장할 수 있는 환경을 제공하는, 한 유형의 세포를 기술하기 위해 사용되는 용어이다.

<31> 상기 배상체의 배양은 배상체를 배양용기에서 평면 배양하여 이루어질 수 있으며, 상기 배양용기에는 세포의 기질(extracellular matrix) (예로, 라미닌 (laminin), 콜라겐, 또는 엔겔브레드-홀름-스왐 (Engelbreth-Holm-Swarm))이 포함될 수 있다. 세포의 기질은 세포와 조직을 지지하며 고착, 이동, 유전자 발현, 분화 등과 같은 세포의 여러 과정을 조절한다. 콜라겐과 라미닌은 결합 조직과 혈관에서 발견되는 세포의 기질 단백질로서, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 세포의 기질이 라미닌인 줄기세포의 분화유도 방법을 제공한다. 바람직하게는, 줄기세포로부터 배상체를 형성한 후 수일간 염화리튬을 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 상기 형성된 배상체를 수일간 더 배양하고, 이를 세포의 기질이 도포된 배양접시에 옮긴 후 추가로 배양하여 분화시키는 방법일 수 있다. 또한, 상기 세포의 기질이 도포된 배양접시에 간세포 분화 체제를 첨가하여 줄기세포의 간세포로의 분화유도 방법을 제공할 수 있다.

<32> 본 발명의 실시예에 있어서, 줄기세포를 이용한 세포 배양 및 발생, 세포 생물학 실험의 일반적 방법에 대해 당업계의 표준적인 참고서적을 참조할 수 있다. 그 예로는, Guide to Techniques in Mouse Development (Wasserman 등 편저, Academic Press, 1993); Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro* (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual (Hogan 등 편저, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994); Embryonic Stem Cells (Turksen 편저, Humana Press, 2002)가 포함된다.

<33> 초기 배아 발생 중 내배엽 형성에 관여하는 신호전달 체계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 하나로, Wnt/ β -catenin signaling이 신경외배엽 (neuroectoderm)의 분화를 억제하는 반면 내배엽 (endoderm)과 중배엽 (mesoderm)을 형성하는 중내배엽 (mesendoderm)의 분화를 증진시키고 (Aubert *et al*, *Nature Biotechnol.*, 20:1240-1245, 2002), 간의 성장과 발생에 중요한 역할을 한다 (Hussian *et al*, *Exp. Cell Res.*, 292:157-169, 2004)는 연구결과이다.

<34> Canonical Wnt signaling은 β -catenin을 통하여 목적 유전자 (target gene)로 알려진 cyclin D1, c-myc 등의 발현을 증가시키며, Wnt/ β -catenin signaling은 줄기세포의 증식 (proliferation)과 암 형성 (cancer formation)에 관여할 뿐만 아니라, 일부 줄기세포의 분화과정에도 관여한다고 보고되고 있다 (Aubert *et al*, *Nature Biotechnol.*, 20:1240-1245, 2002).

<35> Paul Greengard 박사 그룹은 인간 배아 줄기세포와 마우스 배아 줄기세포의 gene profiling을 통해 유전자 발현 패턴을 조사한 후 (Sato N., *et al*, *Dev. Biol.*, 260:404-413, 2003), "6-bromoindirubin-3'-oxime(BIO)"라는

GSK3 β 저해제(inhibitor)를 이용하여 활성화된 Wnt/ β -catenin signaling이 인간과 마우스의 배아 줄기세포의 다능성(pluripotency)과 자가 재생산 능력(self-renewal capacity)을 유지시킨다는 결과를 보고하였다(Sato N., *et al*, *Nat. Med.*, 10:55-63, 2004).

<36> 본 발명자들은 상기 Wnt/ β -catenin signaling이 신경외배엽의 분화를 억제하는 반면 내배엽과 중배엽을 형성하는 중내배엽의 분화를 증진시킨다 것과 Wnt/ β -catenin signaling이 간의 성장과 발생에 중요한 역할을 한다는 두 이론을 최초로 전분화능의 줄기세포, 구체적으로는 배아줄기세포, 더욱 구체적으로는 인간 배아줄기세포로부터 내배엽으로의 분화유도에 적용하기 위하여, Wnt/ β -catenin signaling을 여러 종류의 세포에서 활성화하는 것으로 알려진 염화리튬(LiCl) (Klein and Melton, *PNAS*, 20:1240-1245, 1996)을 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포로부터 분화된 배상체에 수일간, 바람직하게는 1 내지 3일간, 더욱 바람직하게는 2일간 처리함으로써 Wnt/ β -catenin signaling을 배상체 내에서 유도하는데 성공하였다.

<37> 바람직한 일 양태로, 본 발명은 또한, 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계, 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계 및 간세포 분화 제제를 첨가 배양하는 단계를 더 포함하는 줄기세포의 간세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공한다.

<38> 상기 "간세포 분화 제제"는 줄기세포의 분화에 의해 취득되는 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.

<39> 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.

<40> 또 다른 간세포 분화 제제로는 디메틸 설펝시드(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.

<41> 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 간세포 분화 유도물질이 HGF 또는 OSM, 바람직하게는 HGF인 줄기세포의 분화 유도 방법을 제공한다.

<42> 본 발명의 또 다른 양태에서는, 상기 줄기세포의 분화를 유도하는 방법에 의해 분화된 세포 및/또는 상기 세포의 자손(progeny)을 제공한다.

<43> 본 발명자들은, 본 발명의 방법으로 줄기세포의 분화유도를 시킬 경우, 중배엽과 내배엽의 공통 전구세포인 중내배엽의 형성에 관련된 유전자(Foxa2, Sox17, Mixl1, Brachyury, GATA4)들은 증가하고, 초기 간세포 형성에 중요한 유전자(Prox1, Hex, 헤파틱 뉴클레아 팩터 4(hepatic nuclear factor 4, 이하 "Hnf4"로 약칭함))들도 증가하나, 외배엽 형성에 관련된 유전자(Sox1, Pax6, 네스틴)의 발현은 감소됨을 발견하였다. 따라서 본 발명의 방법으로 줄기세포의 분화 유도를 시킬 경우, 줄기세포의 신경외배엽으로의 분화는 억제되는 반면, 내배엽과 중배엽을 형성하는 중내배엽의 분화는 증진되며, 또한 간의 성장과 발생에 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

<44> 따라서, 본 발명에 따라 분화된 상기 분화세포 및/또는 그 자손은 GATA4와 Sox17의 동시 발현의 증가; Foxa2와 Sox17의 동시 발현의 증가; 네스틴(nestin)과 Pax6의 동시 발현의 감소 또는 부재; Mixl1, Brachyury, Foxa2, 또는 Sox17의 발현; Sox1 및/또는 Pax6의 감소 또는 부재; Prox1, Hnf4, 또는 Hex의 발현; 및 간세포의 형태학적 특성을 포함하는, 상기에서 언급한 다수의 특성을 가질 수 있다. 상기 유전자 발현의 증가 또는 감소의 확인

은 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 대한 항체 또는 RT-PCR 등의 당업자에게 잘 알려진 방법으로 이루어질 수 있다. 특정 세포 중에 존재하는 상기의 특성이 많을수록, 간세포 계통 세포로서 더욱 특징 지워질 수 있다. 상기 특성 중 2, 바람직하게는 3, 더욱 바람직하게는 5 이상을 갖는 세포 및/또는 이의 자손이 바람직하다. 본 발명의 방법으로 분화유도한 세포의 약 40%, 60%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상이 목적하는 특성을 갖는 세포인 것이 바람직하며, 클수록 더욱 바람직하다.

<45> 본 발명의 방법으로 줄기세포의 분화유도를 장기간 시킬 경우, 내배엽 유래 세포(간, 췌장, 내장세포)에서 특이적으로 발현하는 알부민(albumin, 이하 "ALB"로 약칭함), 알파₁-안티트립신(α_1 -antitrypsin, 이하 "AAT"로 약칭함), Pdx1, 인슐린, Cdx2의 증가, 내배엽 유래 세포인 내장상피세포와 간세포의 전구세포인 난원형세포의 다수 존재, 내장상피세포에서 특이적으로 발현하는 Cdx2, CK8의 발현, 간세포에서 특이적으로 발현하는 알부민과 CK8의 동시 발현, 알부민과 CK18의 동시발현, 외배엽 유래 세포(신경 등)에서 특이적으로 발현하는 네스틴, Tuj1, MAP2, D β H의 감소, 중배엽 유래의 세포분화에 관여하는 CMP, 레닌(renin), MLC-2a의 유의성 없는 변화를 확인할 수 있었다.

<46> 따라서, 본 발명에 따라 분화된 상기 분화세포 또는 그 자손은 ALB 또는 AAT의 발현; 인슐린(insulin) 또는 Pdx1의 발현; Cdx2의 발현; 및 내장상피 세포 또는 간세포의 전구세포인 난원형세포의 형태학적 특성을 포함하는, 상기에서 언급한 다수의 특성을 가질 수 있다. 상기 유전자 발현의 증가 또는 감소의 확인은, 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 대한 항체 또는 RT-PCR 등의 당업자에게 잘 알려진 방법으로 이루어질 수 있다. 특정 세포 중에 존재하는 상기의 특성이 많을수록, 간세포 계통 세포로서 더욱 특징 지워질 수 있다. 상기 특성 중 2, 바람직하게는 3 이상을 갖는 세포 및/또는 이의 자손이 바람직하다. 본 발명의 방법으로 분화유도한 세포의 약 40%, 60%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상이 목적하는 특성을 갖는 세포인 것이 바람직하며, 클수록 더욱 바람직하다.

<47> 본 발명의 일 양태인, 줄기세포로부터 배상체를 형성한 후, 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양한 다음, 이에 간세포 분화 제제로서 HGF 또는 OSM을 첨가하여 추가로 배양시켰을 경우, 생성된 분화세포 또는 그 자손에서 ALB, 알파-페토탄백질(α -fetoprotein, 이하 "AFP"로 약칭함), AAT, 티로신 아미노트랜스퍼라제(thyrosine aminotransferase, 이하 "TAT"로 약칭함), 트란스티레틴(transthyretin, 이하 "TTR"로 약칭함), 카바모일-포스페이트 신세타제 1(carbamoyl-phosphate synthetase 1, 이하 "CPS1"으로 약칭함)의 발현 증가를 확인하였다. 또한, 간세포 분화 제제로서 HGF를 첨가하여 추가로 배양시켰을 경우, 생성된 분화세포 또는 그 자손에서는 간세포 특이적 형태인 다각형 모양의 세포(polygonal cells), 특히 간세포의 특징인 두 개의 핵을 소유하는 세포가 월등히 많아짐을 확인할 수 있었으며, 간세포 특이적 유전자(ALB, CK8, 사이토케라틴(cytokeratin, 이하 "CK"로 약칭함)18, AFP, GATA4)의 발현, ALB와 CK8의 동시 발현, CK8과 GATA4의 동시발현, ALB와 CK18의 동시 발현, AFP와 ALB의 동시발현을 확인할 수 있었다.

<48> 따라서, 본 발명에 따라 분화된 상기 분화세포 및/또는 그 자손은 ALB, AFP, TTR, CPS1, GATA4, CK8, CK18, 및/또는 Hnf4의 발현; 간세포의 다각형 모양 또는 두 개의 핵을 가지는 형태학적 특성; 분화된 세포가 인간 태아 단계의 간세포와 유사한 특성; 및 정상 간세포의 기능을 포함하는, 상기에서 언급한 다수의 특성을 가질 수 있다. 상기 유전자 발현의 증가 또는 감소의 확인은 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 대한 항체 또는 RT-PCR 등의 당업자에게 잘 알려진 방법으로 이루어질 수 있다. 특정 세포 중에 존재하는 상기 특성이 많을수록, 간세포 계통 세포로서 더욱 특징 지워질 수 있다. 상기 특성 중 2, 바람직하게는 3 이상을 갖는 세포가 바람직하다. 본 발명의 방법으로 분화유도한 세포의 약 40%, 60%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상이 목적하는 특성을 갖는 세포인 것이 바람직하며, 클수록 더욱 바람직하다. 바람직하게는 상기의 분화세포 및/또는 그 자손은 ALB와 CK18의 동시 발현; ALB와 CK8의 동시 발현; 및 정상 간세포의 기능을 포함하는, 본 발명에 따라 분화된 상기 분화세포 및/또는 그 자손의 약 40% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더더욱 바람직하게는 90% 이상의 세포가 상기 특성을 갖는 세포일 수 있다.

<49> 본 발명의 일 양태인, 줄기세포로부터 배상체를 형성한 후, 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양한 다음, 이에 간세포 분화 제제로서 HGF를 첨가하여 추가로 배양시켰을 경우, 생성된 간세포 특이적 분화세포 및/또는 이의 자손이 정상적인 간세포의 기능적 특성을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따라 분화된 상기 분화세포 및/또는 그 자손으로서, 상기 정상 간세포의 기능을 갖는 세포는 인도시아닌(indocyanine, 이하 "ICG"로 약칭함) 흡수; 감마-글루타밀 트란스펩티다제(γ -glutamyl transpeptidase, 이하 "GGT"로 약칭함) 활성; 페리오딕산-쉬프의 염색(periodic acid-Schiff's staining, 이하 "PAS"로 약칭함)로 검출 가능한 세포질 내의 글리코겐(glycogen) 저장의 증거; 및 세포대사에 의한 우레아(urea)의 분비 특성을 포함하는, 상기에서 언

급한 다수의 특성을 가질 수 있다. 특정 세포 중에 존재하는 상기 특성이 많을수록, 간세포 계통 세포로서 더욱 특징 지워질 수 있다. 상기 특성 중 2, 바람직하게는 3 이상을 갖는 세포가 바람직하다. 또한, 본 발명의 방법으로 분화유도한 세포의 약 40%, 60%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상이 목적하는 특성을 갖는 세포인 것이 바람직하며, 클수록 더욱 바람직하다.

<50> 본 발명은 또한, 본 발명의 방법으로 분화유도하여 상기에서 제공되는, 줄기세포로부터 분화유도된 세포를 포함하는 치료용 조성물, 바람직하게는 급성, 만성 또는 유전적 간 기능 손상의 치료에 필요한 간기능 회복을 위한 치료용 조성물, 더욱 바람직하게는 유전적 간 기능 손상의 치료용 조성물을 제공한다.

<51> 본 발명의 치료용 조성물은 투여 방식에 따라 허용 가능한 담체를 포함하여 적절한 제제로 제조될 수 있다. 투여 방식에 적합한 제제는 공지되어 있으며 전형적으로 막을 통과하는, 이동을 용이하게 하는 제제를 포함할 수 있다.

<52> 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.

<53> 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, 운환제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

<54> 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, 비내 투여, 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.

<55> 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 에스테르 (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 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.

<56> 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 좀더 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 본 발명의 예시에 불과하며 이로써 본 발명이 제한되지는 않는다.

<57> <실시예 1> 인간 배아줄기세포(hESC)의 배양 및 유지

<58> 실시예 1-1. 인간 배아줄기세포의 배양

<59> 미분화세포의 계대 및 유지를 위해서 배아줄기세포는 mitomycin-C가 처리된 지지세포 위에서 배양하였으며, 배양액은 20 % Knockout serum replacement (이하, "KOSR"라 약칭함), 2 mM L-글루타민(glutamin), 4 ng/mL basic fibroblast growth factor (이하, "bFGF"라 약칭함), 1 % non essential amino acids (이하, "NEAA"라 약칭함), 1 % penicillin-streptomycin, 0.1 mM beta-mercaptoethanol이 포함된 DMEM/F12 배지를 사용하였다. 5~7일간 배양 후 증식된 인간 배아줄기세포 (도 1-A)는 200~300개의 세포를 갖는 덩어리가 되도록 기계적으로 분할하여 다시 지지세포위에서 배양하였다.

<60> 실시예 1-2. 인간 배아 줄기세포의 유지

- <61> 인간 배아 줄기세포를 무혈청 배지 중 일차 마우스 배아 섬유아세포 상에서 유지하였다. 인간 배아 줄기세포를 약 40,000 세포/cm²의 조사된 마우스 배아 섬유아세포 상에 작은 덩어리로 접종하였다. 상기 배양물을 1 % 불필수 아미노산, 0.1mM β -머캅토에탄올 및 4 ng/mL 인간 bFGF (R&D systems)가 보충된, 80% DMEM/F12 (Gibco) 및 20 % 혈청 대체제 (Gibco) 로 이루어진 배지에서 유지하였다. 세포를 ESC 콜로니의 연속 계대로 증식시켰다. 이어서 증식한 세포를 1 mg/ml 콜라게나제 IV를 이용하여 분리시켜, 새로운 영양 세포 상에 작은 덩어리로 재플레이트하였다.
- <62> <실시예 2> 배상체 (embryoid body, EB)내의 Wnt/ β -catenin signaling 유도
- <63> 2-1. 배상체의 준비
- <64> 상기 실시예 1의 방법으로 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간배아줄기세포 콜로니를 1 mg/ml 콜라게나제 IV (collagenase IV)를 이용하여 영양세포에서 분리한 후 이를 작은 덩어리로 쪼갬 다음, 이에 1 % 불필수 아미노산, 0.1mM β -머캅토에탄올이 보충된, 80% DMEM/F12 (Gibco) 및 20 % 혈청 대체제 (Gibco) 로 이루어진 배지에 약 200개의 세포 덩어리를 넣어 배상체를 형성 후 2일간 배양한 다음, 10 mM 염화리튬 (LiCl)을 2일간 더 처리하여 Wnt/ β -catenin signaling을 유도한 배상체 (도 2-A)를 형성하였다.
- <65> 2-2. 면역세포화학
- <66> 실시예 2-1에서 분화된 배상체를 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde) 함유 PBS에 1시간 동안 고정한 다음, 20% 수크로스 (sucrose)가 포함된 증류수 (D.W.)에 밤샘 (overnight) 정치하여 두었다. 이를 O.C.T compound (Sakura Finetek., Tokyo)에 담아 열린 후 크리오스타트 (cryostat)를 이용하여 10 μ m 두께로 절편 (section)하였다. 이후 절편된 배상체를 20% 염소혈청 (normal goat serum) 및 0.3% tritonX-100이 포함된 PBS를 45분간 처리하여 blocking 및 permeabilization시킨 후 β -카테닌(catenin) 1차 항체 (primary antibody)를 1:200, GSK3 β 의 비활성 상태인 phospho-serine⁹-GSK3 β 를 1:100으로 희석하여 처리한 후 밤샘 (over night) 정치하여 두었으며, 이를 적당한 2차 항체 (secondary antibody)를 1:400으로 희석하여 1시간 30분 동안 처리한 다음, 이를 대조군으로 DAPI를 1:1000 희석하여 5분간 처리하였다.
- <67> 2-3. RT-PCR 증폭
- <68> 전사 수준에서의 발현에 대한 RT-PCR 분석을 다음과 같이 수행하였다.
- <69> RNA를 제조자의 매뉴얼에 따라 RNAeasy Kit TM (Trizol (invitrogen))을 이용하여 세포로부터 추출한 다음, 최종 산물을 DNase로 분해시켜 오염성 게놈 DNA를 제거하였다. 10 mM Tris 버퍼(pH 7.5), 10 mM MgCl₂ 및 5 mM DDT를 함유하는 완충액 에 RNA 가드 (Pharmacia Upjohn), DNase I(Pharmacia Upjohn) 및 상기 추출한 RNA를 넣고 37 $^{\circ}$ C, 30~45 분 동안 반응을 수행하였다. 표본으로부터 단백질을 제거하기 위하여, 페놀 클로로포름 추출을 수행하였으며, 3M 아세트산나트륨 및 100% 냉 에탄올로 RNA를 침전시켰다. 상기 침전된 RNA 펠릿을 70% 에탄올로 세척하고 난 다음, 이를 풍건 및 DEPC-처리수에 재현탁하였다. 역전사효소 (Reverse Transcriptase)와의 반응을 위해서, 1 μ g의 전체 RNA를 최종농도 1 $\times$ First Strand Buffer (Gibco), 20 mM DDT 및 25 μ g/mL 랜덤 헥사머 (Pharmacia Upjohn)와 배합하였다. 상기 RNA를 70 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 변성시킨 후, 실온에서 10 분 동안 어닐링시켰다. dNTP를 0.5 μ l의 Superscript II RT (Gibco)와 더불어 1 mM의 최종 농도로 첨가한 다음, 이를 42 $^{\circ}$ C에서 50 분 동안 반응을 수행하였고, 80 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 열 불활성화시켰다. 이어서 PCR 분석을 위해, 표본을 -20 $^{\circ}$ C 에 저장하였다.
- <70> 표준 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR)은 목적하는 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 다음의 반응 혼합물 중에서 수행하였으며, 선택된 마커 및 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다: cDNA 1.0 μ l, 10 $\times$ PCR 버퍼 (Gibco) 2.5 μ l, 10 $\times$ MgCl₂ 2.5 μ l, 2.5 mM dNTP 3.0 μ l, 5 μ M 3'프라이머 1.0 μ l, 5 μ M 5'프라이머 1.0 μ l, Taq 0.4 μ l, DEPC-수 13.6 μ l.

표 1

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Product size (bp)
<i>Sox1</i>	caatcggggaggagaagtc	ctctggaccaaaactgtggcg	464
<i>Pax6</i>	ccgagagtagcgactccag	cttcgggtctgcccgttc	239
<i>Brachyury</i>	agccactgttccctgagac	aggctgggtactgactgga	500
<i>Mixl-1</i>	ggtaccccgacatccact t	tgagtcagctttgaaccaa	335
<i>Foxa2</i>	ctacgccaaacatgaactcca	aagggaagagggtccatgat	207
<i>Sox17</i>	agcgcccttcacgtgtacta	cttgacacaggaagtgcagat	246
<i>Hex</i>	gcccttttacatcgaggaca	ttcttctccagctcgatggt	375
<i>Prox1</i>	cagcccgaaaagaacagaag	gggtctagctcgacatctc	235
<i>Hnf4</i>	caggctcaagaaatgcttcc	gtgccgagggaacaatgtagt	418
<i>Nestin</i>	cagctggcgccacctcaagatg	agggaagtgtgggtcaggactgg	208
<i>Tuj1</i>	catggacagtgtccgctcag	caggcagtcgcagtttccac	175
<i>MAP2</i>	aatagaacctaacccatgtgacatcc	agaaccaactttagcttgggcc	133
<i>DβH</i>	gactgggagaaagggtgtca	agtgtggagatgacctggg	522
<i>CMF</i>	aaaaagggaatgacaccag	ttgtgcagctctctgaggtgg	451
<i>CD34</i>	tgaagcctagcctgtcacct	cgcacagctggaggtcttat	200
<i>Renin</i>	gctttctcagccaggacate	tattctttgcctcccagggtg	562
<i>MLC-2a</i>	acagagtttattgagggtcccc	aagggtcaagtgtccagagg	381
<i>Albumin</i>	cttctgggcatgttttgt	gggttcaggaccacggataga	401
<i>AFP</i>	tgaaaaccctcttgaatgcc	tcttgcctcatcgtttgacg	492
<i>AAT</i>	actgtcaacttcggggacac	ccccattgctgaagacctta	517
<i>TTR</i>	tagatgctgtccgaggcagt	agccgtggtggaataggagt	311
<i>TAT</i>	tgaggcacccctagaagcta	gagctccctggacaatggta	593
<i>CPS1</i>	caaggagccattgtttggaa	ccaatggacagacctctga	450
<i>Pdx1</i>	cccattggtgaagtctacc	gtctctctctttttccac	262
<i>Insulin</i>	agcctttgtgaaccaacacc	gctggttagaggagcagatg	245
<i>Cdx2</i>	gccaccatgtacgtgagcta	ctcagcctggaattgctctg	250
<i>β-actin</i>	atctggcaccacacctctacaatgagctgg	cgctactactcctgcttctdateccacatctgc	838

<71>

<72>

세포내에 Wnt/ β -catenin signaling이 유도되면 세포내에서 wnt에 의해 β -catenin을 억제하고 있는 GSK3 β 의 N-terminal serine⁹이 인산화(phosphorylation)된다 (Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:33067-33077, 2003). 이 결과, β -catenin이 자유로운 상태가 됨으로서 세포질내 β -catenin의 양이 증가할 뿐만 아니라 핵 내로 이동하여 여러 유전자의 발현을 조절하게 되는데 (Behrens *et al.*, *Nature*, 382:638-642, 1996; Rubinfeld *et al.*, *Science*, 272:974-975, 1996), 이러한 연구결과를 기초로, 도 2는 본 발명의 염화리튬 (LiCl)에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체 (embryoid body)내의 wnt/ β -catenin signaling 유도를 확인한 사진이다.

<73>

도 2-A는 실시예 2-1의 방법에 따라 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간배아줄기세포를 2일간 배양한 후 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리하여 분화시킨 세포 사진으로 세포사 (apoptosis)가 일어남을 확인할 수 있었다. 반면, 상기 분화세포를 염화리튬이 없는 배양액에서 2일 더 배양하여 분화시켰을 경우, 살아남은 세포는 증식을 하여 정상적인 배상체의 형태를 갖게 됨을 확인(도 2-B) 할 수 있었고, 또한 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(도 2-C)과 비교하여 일부 β -catenin이 핵 내로 이동하였음을 확인(도 2-D)할 수 있었다. 또한, 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(도 2-E)과 비교하여 β -catenin 활성을 저해하는 GSK3 β 의 비활성 상태인 phospho-serine⁹-GSK3 β 양의 증가를 확인(도 2-F)할 수 있었다.

<74>

상기 결과를 뒷받침하기 위하여, 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 염화리튬을 처리하였을 경우 세포 내의 전체적인 β -catenin 양의 증가를 RT-PCR을 통해 확인(도 2-G)하였으며, 상기 결과로부터 염화리튬에 의해 배상체내에 Wnt/ β -catenin signaling이 효과적으로 활성화되었음을 확인할 수 있었다.

<75>

<실시예 3> 배상체로 내의 내배엽성 세포의 증가 및 외배엽성 세포의 감소 확인

<76>

실시예 3-1. 배상체의 준비

- <77> 실시예 2-1의 방법과 같이 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간배아줄기 세포를 1 mg/ml의 콜라게나아제를 처리한 다음, 이를 지지 세포로부터 분리하여 배상체를 형성하였고, 이를 2일간 배양한 다음, 이에 2일간 10 mM 염화리튬을 처리한 후 염화리튬이 없는 배양액에서 2일간 추가 배양 한 배상체를 실험군으로 하고, 최초의 배상체 형성 후 염화리튬의 처리 단계를 거치지 않고 6일간 계속 배양한 배상체를 음성 대조군으로 사용하였다.
- <78> 실시예 3-2. 면역세포화학 조건
- <79> 실시예 2-2의 면역세포화학 조건과 동일한 방법으로 면역염색법을 수행하였다.
- <80> 실시예 3-3. RT-PCR 증폭
- <81> 실시예 2-3의 RT-PCR 증폭 조건과 동일하며, 마커와 프라이머 서열은 상기 표 1에 나타내었다.
- <82> 도 3은 실시예 2-1과 같이, 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양한 후 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일 더 배양하여 분화시켜 염화리튬에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체 내의 내배엽성 세포 및 초기 간세포 전구세포 형성에 관여하는 유전자들의 증가를 확인한 사진이다.
- <83> RT-PCR을 통해 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 염화리튬을 처리하였을 경우, 내배엽 또는 중배엽과 내배엽의 공통 전구세포인 중내배엽 (mesendoderm) 형성에 관련된 유전자 (Foxa2, Sox17, Mix11, Brachyury)의 증가, 초기 간세포형성에 중요한 유전자 (Prox1, Hex, Hnf4)의 증가 및 외배엽 형성에 관련된 유전자 (Sox1, Pax6)의 현저한 감소를 확인하였다 (도 3-A).
- <84> 또한, 상기 RT-PCR 결과를 뒷받침기 위한 면역염색법을 실시한 결과(도 3-B ~ 도 3-I), 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(도 3-B)과 비교하여 GATA4, Sox17의 동시 증가를 확인하였고(도 3-C), 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(도 3-D)과 비교하여 Foxa2, Sox17의 동시 증가를 확인하였다(도 3-E). 또한, 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(도 3-F)과 비교하여 Nestin, Pax6의 동시 감소를 확인하였고(도 3-G), 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(도 3-H)과 비교하여 AFP, GATA4의 동시 증가를 확인하였으며(도 3-I), 태반형성에 관여하는 원시내배엽 (primitive endoderm)의 양은 유의할만한 변화가 없음을 확인할 수 있다 (데이터를 나타내지 않음).
- <85> <실시예 4> 내배엽성 유래 특이적인 세포의 증가 확인
- <86> 실시예 4-1. 배상체의 분화유도
- <87> 염화리튬이 처리된 배상체의 분화능력을 확인하기 위해, 염화리튬을 일시적으로 처리하여 상기 실시예 2-1의 방법으로 형성된 배상체를 4주간 염화리튬이 없는 배양액에 추가로 배양하였으며, 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간배아줄기세포에 염화리튬을 처리하지 않고 6일 더 배양한 배상체도 같은 기간 배양하여 음성 대조군으로 사용하였다.
- <88> 4-2. Hematoxylin-Eosin Staining 조건 및 수치적 분석
- <89> 파라핀 블록에 임베딩 (embedding)된 배상체 세포 내에 침윤되어 있는 파라핀을 자일렌 (Xylene), 알콜 시리즈를 거쳐 제거한 다음, 이를 헤마톡실린 (Hematoxylin)으로 3분간 처리하여 핵을 염색하였다. 이를 증류수에 5분간 정지하여 세척한 다음, 0.1% HCl이 포함된 70% acid alcohol를 이용하여 핵 이외의 부분을 탈색시켰다. 이를 에오신 (Eosin)으로 30초간 처리한 다음, 핵 이외의 세포질을 염색하였다. Hematoxin-Eosin 염색 후에 각각의 실험군과 대조군 5개의 그룹을 광학 현미경으로 내장상피세포 또는 간세포의 전구세포인 난원형 형태의 세포를 가진 배상체의 개수를 센 다음, 전체 배상체의 개수를 세어 각각의 세포를 가진 배상체의 퍼센트를 구하였다.
- <90> 실시예 4-3. RT-PCR 증폭
- <91> 실시예 2-3의 RT-PCR 증폭 조건과 동일하며, 마커와 프라이머 서열은 상기 표 1에 나타내었다.
- <92> 실시예 2-1의 방법에 따라 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양한 후 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일 더 배양하여 분화시킨 세포를 4주간 추가 배양하여 분화시켜 염화리튬에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체의 분화능을 확인하였다 (도 4).
- <93> RT-PCR을 통해, 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여, 염화리튬을 처리하였을 경우 내배엽 유래 세포(간, 췌장, 내장세포)에서 특이적으로 발현하는 유전자들(알부민(albumin), AAT, Pdx1, 인슐린(insulin), Cdx2)의 증가, 외배엽 유래 세포(신경 등)에서 특이적으로 발현하는 유전자들(네스틴(nestin), Tuj1, MAP2, Dβ

H)의 감소, 중배엽 유래의 세포분화에 관여하는 유전자 중 CMP, 레닌(renin), MLC-2a의 유의성 없는 변화, CD34의 증가를 확인하였다(도 4-A). 상기 결과 중에서, 중배엽 유래의 세포분화에 관여하는 CD34 유전자의 발현이 증가하는 것은 CD34이 혈액계통 세포 이외에 간세포의 전구세포인 타원세포(oval cells)에서도 발현되기 때문인 것으로 사료된다.

<94> 상기 RT-PCR 결과를 뒷받침하기 위하여, H&E 염색(Hematoxylin-Eosin staining)한 결과, 염화리튬을 처리한 후 분화시킨 배상체 내에 내배엽 유래 세포인 내장상피세포(gut epithelial cells)와 간세포의 전구세포인 난원형세포(oval cells)가 다수 존재함을 확인할 수 있었다(도 4-B, 도 4-E). 이를 수치적으로 분석해보면, 염화리튬을 처리하지 않고 분화시킨 배상체 내에서는 내장상피세포와 간세포의 전구세포가 각각 $6.1 \pm 2.8\%$, $0.81 \pm 0.8\%$ 존재한 반면에 염화리튬을 처리한 후 분화시킨 배상체 내에는 각각 $16.7 \pm 4.5\%$, $8.2 \pm 1.1\%$ 존재함을 확인하였으며, 내장상피세포로는 경우 약 2.7배, 간세포의 전구세포로는 약 10배의 증가된 분화수율을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다(데이터를 나타내지 않음).

<95> 또한, 상기 RT-PCR 결과를 뒷받침하기 위하여, 면역염색법을 수행한 결과, 장상피세포 특이적 단백질인 Cdx2, CK8의 발현(도 4-C, 도 4-D), 간세포 특이적 단백질인 알부민 및 CK8의 동시 발현(도 4-F), 알부민 및 CK8의 동시 발현(도 4-G)을 확인할 수 있었다.

<96> <실시예 5> 인간 배아 줄기세포의 간세포로의 분화유도 확인

<97> 실시예 5-1. 간세포로의 분화유도

<98> 본 발명에 따른, 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포 이후부터 총 배양기간 6일 중 배상체 형성 3~4일의 2일간 10 mM 염화리튬을 처리한 배상체를 5 ug/ml 라미닌이 도포된 배양접시에 플레이팅하였다. 음성대조군으로는 DMEM/F12 배양액에 ITS (10 ug/ml 인슐린, 5.5 ug/ml 트랜스페린(transferrin) 및 5 ng/ml 나트륨 투석고(sodium selenite))가 포함된 배양액을 사용하였으며, 각각의 실험군으로는 DMEM/F12 배양액에 ITS 및 10 ng/ml OSM 또는 20 ng/ml HGF가 포함된 배양액을 사용하였다.

<99> Hepatocyte growth factor (HGF, Maina *et al*, *Cell*, 87:531-542, 1996) 또는 oncostatin M (OSM, Kamiya *et al*, *EMBO J.*, 18:2127-2136, 1999)는 효과적인 간세포 분화 제제로 알려져 있다. 본 발명의 염화리튬에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체의 간세포 특이적 분화유도를 확인한 결과는 도 5에 나타내었으며, 도 5-A는 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 본 발명에 따라 분화유도한 타임 테이블이다.

<100> 실시예 5-2. 분화수율에 대한 수치적 분석

<101> 세포치료를 최종 목표로 하는 분화유도기법은 보다 높은 분화수율을 요구한다. 본 발명에 따른 분화방법이 효율적인 분화수율을 가지는지 여부를 다음의 방법으로 확인하였다.

<102> 실시예 2-1의 방법에 따라 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양한 다음, 이에 2일간 10 mM 염화리튬을 처리한 배상체를 염화리튬이 없고 5 ug/ml 라미닌이 도포된 배양접시에 플레이팅하였으며, 추가적으로 14일간 더 배양하였다. 분화시킨 세포를 알부민과 사이토케라틴 8 (CK8) 또는 사이토케라틴 18 (CK 18)과 함께 면역염색하여 형광현미경하에서 각각의 마커들이 동시 발현한 세포의 개수를 센 다음, DAPI의 수를 대조군으로 하여 각각의 실험군과 대조군에서 간세포의 분화 수율을 계산하였다. 상기 결과로부터 간세포 특이적인 ALB, CK8/18의 발현 수율을 확인한 결과, HGF를 처리하여 분화시킬 경우, 대조군이나 OSM을 처리하여 분화시킨 실험군에 비해 약 4배 정도 (총 분화율, 40%)의 간세포 분화 수율 증가를 확인할 수 있었다(도 5-J).

<103> 실시예 5-3. RT-PCR 증폭 조건

<104> OSM 또는 HGF의 첨가 또는 미첨가한 대조군에 따른 간세포 특이적 유전자(알부민, AFP, AAT, TTR, TAT CPS1)의 증가 또는 감소를 확인하기 위하여, 실시예 2-3의 RT-PCR 증폭 조건과 동일한 조건으로 RT-PCR을 수행하였으며, 마커와 프라이머 서열은 상기 표 1에 나타내었다. 상기 RT-PCR 증폭 결과는 도 5-H 및 도 5-I에 나타내었다.

<105> 실시예 5-4. 면역세포화학 조건

<106> 상기 실시예 5-3의 RT-PCR 결과(도 5-H, 도 5-I)를 뒷받침하기 위해, 실시예 2-2의 면역세포화학 조건과 동일한 방법으로 면역염색법을 수행하였다.

<107> 상기 면역염색법 결과, 간세포 분화 제제로 10 ng/ml OSM을 사용한 경우보다 20 ng/ml HGF를 사용하여 분화유도를 하였을 경우, 간세포 특이적 형태인 다각형 모양의 세포(polygonal cells), 특히 간세포의 특징인 두 개의

핵을 소유하는 세포 (binucleate cells) (도 5-C의 화살표)가 월등히 많음을 확인할 수 있었다 (도 5-B, 5-C). 또한, 간세포 분화 제제로서 HGF를 사용하여 분화유도를 하였을 경우, 간세포 특이적인 알부민(ALB), CK8/18, AFP, GATA4의 발현을 확인할 수 있었으며 (도 5-D ~ 도 5-G), ALB와 CK8의 동시 발현(도 5-D), CK8과 GATA4의 동시 발현(도 5-E), ALB와 CK18의 동시 발현(도 5-F), AFP와 ALB의 동시 발현(도 5-G)을 확인할 수 있었다.

<108> <실시예 6> 간세포 특이적 분화세포의 정상 간세포의 기능적 특성 확인

<109> 세포치료에 사용될 줄기세포 유래 간세포는 정상 간세포와 동일한 기능을 소유하여야 한다. 정상 간세포는 인도시아닌 그린 (indocyanine green, 이하 "ICG"로 약칭함)을 세포 내로 수송하여 축적할 수 있으며 (Yamada *et al*, *Stem Cells*, [Vol;페이지(000-000)], 2003), 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (γ -glutamyl transpeptidase, 이하 "GGT"로 약칭함) 활성을 소유하고, 글리코겐 (glycogen)을 저장하며 (PAS로 확인), 우레아 (urea)를 분비하는 능력을 소유하기 때문에 이러한 능력이 줄기세포로부터 분화된 간세포의 정상 간세포의 기능적 특성을 확인하는데 널리 사용된다.

<110> 실시예 6-1. ICG uptake 확인

<111> 분화된 세포에 1 mg/ml의 ICG 용액 (sigma)이 포함된 DMEM/F12 배양액을 첨가하여 37°C에서 30분간 인큐베이션 후, 이를 PBS로 수차례 세척 (washing) 한 다음, 광학현미경으로 ICG가 흡수된 부분을 확인하였다 (도 6-A).

<112> 실시예 6-2. GGT 활성 확인

<113> 분화된 세포에 기질용액 (substrate solution: γ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide, 2.5% DMSO, 1 N sodium hydroxide, glycylglycine 및 fast blue BB salt (diazotized 4'-amino-2',5'-diethoxybenzanilide)를 첨가하여 실온에서 15분 인큐베이션 후 0.85% 살린(saline) 용액으로 상기 세포를 세척하였다. 이를 0.1 M 황산동 (cupric sulfate)으로 2분간 처리한 다음, 증류수로 세척하였으며, 이를 광학현미경하에서 GGT 활성을 띄는 세포를 관찰하였다 (도 6-B).

<114> 실시예 6-3. PAS 염색법에 의한 세포 내 글리코겐의 축적 확인

<115> 과요오드산 시프 염료 (Periodic Acid Schiff's stain, 이하"PAS"이라 약칭함) kit를 sigma로부터 구입하였다. 본 발명에 따라 분화된 세포를 10% 포르말린이 포함된 95% 에탄올로 1분간 고정한 다음, 여기에 페리오딕산 용액 (periodic acid solution, sigma)을 5분간 실온에서 처리하였다. 이를 증류수로 여러 번 행궤준 다음 쉬프 시약 (shiff's reagent)을 실온에서 15분간 처리하였다. 이를 증류수로 여러 번 행궤준 다음, 헤마톡실린 (hematoxlin)을 90초간 염색하여 핵을 염색한 다음, 광학현미경하에서 글리코겐이 축적된 세포를 관찰하였다.

<116> 실시예 6-4. 세포대사에 의한 우레아의 분비 확인

<117> 세포배양액 내의 우레아 분비량을 측정하기 위한 kit를 Bioassay systems에서 구입하였다. 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포의 분화 과정 동안 (0, 6, 9, 13, 20일) 분화된 세포를 회수하여 이를 PBS로 행궤준 다음, 새로운 배양액을 첨가해 2일간 배양하였으며, 상기 배양액 중 20 μ l를 추출하여 매뉴얼에 기재된 방법으로 배양액 내의 우레아 양을 측정하였다. 이를 간략하게 설명하면 다음과 같다. Bioassay systems에서 제공한 시약 (reagent) A와 B를 섞은 다음, 이를 각 1 ml에 담고, 이에 상기 준비한 분화세포 시료를 분주한 다음, 여기에 각각의 세포 배양액을 넣어 30분간 실온에서 인큐베이션 하였으며, 이를 520 nm 파장의 흡광도에서 분광 광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 배양액 내의 우레아 양을 측정하였다.

<118> 도 6은 실시예 2-1의 방법에 따라 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양한 후 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일 더 배양하여 분화시킨 세포를 라미닌이 도포된 배양접시에 옮긴 후 간세포 분화 제제인 HGF를 첨가하여 2주간 추가 배양하여 분화시킨 인간 배아 줄기세포 유래 배상체의 간세포 특이적 분화세포가 정상적인 간세포의 기능적 특성을 보유하고 있음을 확인한 면역염색법 결과로, ICG의 세포질 내 선택적 축적현상(도 6-A), GGT 활성(도 6-B), PAS 염색법에 의한 글리코겐의 세포질 내 저장(도 6-C), 세포대사에 의한 우레아(urea) 분비 (도 6-D)를 시간에 따라 각각 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, 본 발명의 분화 유도방법을 이용하여 인간 배아 줄기세포로부터 분화된 간세포가 정상 간세포와 유사한 기능을 소유하고 있음을 확인할 수 있었다.

<119> 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든

변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포섭되는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 효과

<120> 본 발명은 줄기세포의 분화유도 방법 및 그로부터 분화된 세포, 상세하게는 줄기세포로부터 배상체를 형성하는 단계 및 상기 배상체에 염화리튬을 첨가 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화유도 방법, 상기 방법으로 제조된 세포 및 이를 포함하는 치료용 조성물을 제공하는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 의한 줄기세포의 분화유도 방법은, 값비싼 성장인자 대신 저렴한 가격의 염화리튬을 분화유도 제제로 사용함으로써 줄기세포로부터 분화유도가 어려운 내배엽 세포 및 초기 간세포 분화에 중요한 역할을 하는 유전자들을 효과적으로 발현시킴으로써 줄기세포 유래 내배엽 세포로부터 간세포 등 내배엽 유래 세포들을 효과적으로 분화시켜 세포 치료제의 제공에 효과가 있을 뿐만 아니라, 정상발생과정과 유사한 현상을 실험실 내의 배양을 통해 유도함으로써, 인간의 초기발생, 특히 내배엽으로의 발생과정에서 일어나는 많은 유전자와 단백질의 발현분석이 가능하여 윤리적 문제로 불가능한 인간 배발생 과정 중 내배엽형성 연구의 기본이 되는 연구방법을 제공하는 효과가 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 영양세포 위에서 증식한 미분화의 인간배아줄기세포와 미분화 특징을 확인할 수 있는 여러 마커의 발현에 관한 사진이다. A는 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간배아줄기세포를 나타낸 사진이며, B, C, E, F는 미분화 인간배아줄기세포가 발현하는 미분화관련 마커로, 각각 Oct4, alkaline phosphatase (AP), SSEA4, TRA1-81의 발현을 나타낸 것이다. D는 음성대조군으로 미분화의 마우스 배아줄기세포에서 SSEA1의 발현을 확인한 것으로, 본 발명에서 사용한 인간배아줄기세포는 SSEA1으로 염색되지 않았음을 나타낸다. 눈금자는 50 μ m를 나타내며, 이하 동일하다.
- <2> 도 2는 염화리튬(LiCl)에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체(embryoid body)내의 Wnt/ β -catenin signaling 유도를 확인한 사진이다. A는 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양하여 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리하여 분화시킨 세포 사진이며, B는 A의 세포를 염화리튬이 없는 배양액에서 2일간 더 배양하여 분화시킨 세포 사진이다. D는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(C)과 비교하여, 일부 β -catenin이 핵 내로 이동하였음을 확인한 사진이며, F는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(E)과 비교하여 β -catenin 활성을 저해하는 GSK3 β 의 비활성 상태인 phospho-serine-GSK3 β 양의 증가를 확인한 사진이다. G는 마커로 β -catenin을 사용하여, 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 염화리튬을 처리하였을 경우, 세포 내의 전체적인 β -catenin 양의 증가를 확인한 웨스턴 블랏 (western blot) 결과이다.
- <3> 도 3은 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양하여 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일간 더 배양하여 분화시켜, 염화리튬에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체 내의 내배엽성 세포 및 초기 간세포 전구세포 형성에 관여하는 유전자들의 증가를 확인한 사진이다. A는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여, 염화리튬을 처리하였을 경우 내배엽, 또는 중배엽과 내배엽의 공통 전구세포인 중내배엽 (mesendoderm)의 형성에 관련된 유전자 (Foxa2, Sox17, Mixl1, Brachyury)의 증가, 초기 간세포형성에 중요한 유전자 (Prox1, Hex, Hnf4)의 증가, 및 외배엽 형성에 관련된 유전자 (Sox1, Pax6)의 현저한 감소를 확인한 RT-PCR의 결과이다. B 내지 I는 상기 A의 RT-PCR 결과를 뒷받침하는 면역염색법 (immunoblotting) 결과로서, C는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(B)과 비교하여 GATA4, Sox17의 동시 증가, E는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(D)과 비교하여 Foxa2, Sox17의 동시 증가, G는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(F)과 비교하여 네스틴(nestin), Pax6의 동시 감소, I는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군(H)와 비교하여 AFP, GATA4의 동시 증가를 확인한 사진이다.
- <4> 도 4는 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양하여 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일간 더 배양하여 분화시킨 세포를 4주간 추가 배양하여 분화시켜, 염화리튬에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체의 분화능을 확인한 사진이다. A는 염화리튬을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여, 염화리튬을 처리하였을 경우 내배엽 유래 세포(간, 췌장, 내장세포)에서 특이적으로 발현하는 유전자들 (알부민(ALB), AAT, Pdx1, 인슐린, Cdx2)의 증가, 외배엽 유래 세포(신경 등)에서 특이적으로 발현하는 유전자들 (네스틴, Tuj1, MAP2, D β H)의 감소, 중배엽 유래의 세포분화에 관여하는 유전자 중 CMP, 레닌(renin), MLC-2a의 유의성 없는 변화 및 CD34의 증가를 확인한 RT-PCR의 결과이다. B, E는 상기 A의 RT-PCR 결과를 뒷받침하는 H&E 염색 (Hematoxylin-Eosin staining) 결과로서, 염화리튬을 처리하여 분화시킨 배상체 내에 내배엽유래 세포인 내장상피세포 (gut epithelial cells)와 간세포의 전구세포인 난원형세포 (oval cells)가 다수 존재함을 확인한 사진이다. 또한, C, D, F, G는 상기 A의 RT-PCR 결과를 뒷받침하는 면역

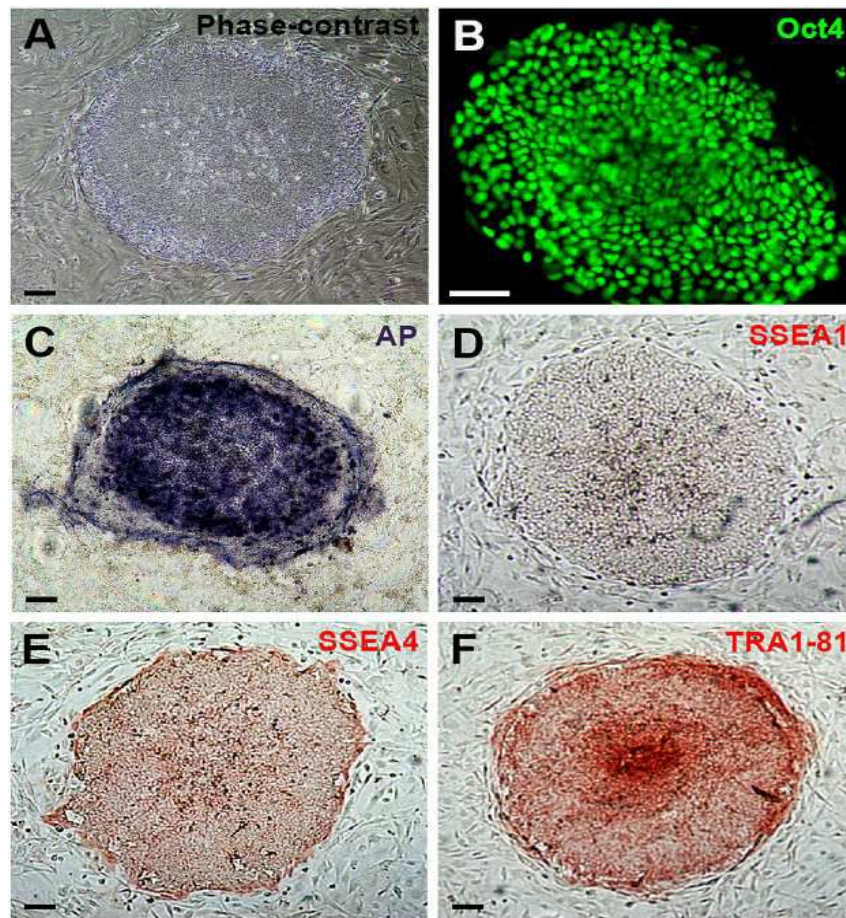
염색법 결과로서, C와 D는 각각 장상피세포 특이적 Cdx2, CK8의 발현, F와 G는 간세포 특이적 알부민, CK8의 동시 발현(F), 알부민, CK18의 동시 발현(G)을 확인한 사진이다.

<5> 도 5는 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양하여 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일간 더 배양하여 분화시킨 세포를 라미닌(laminin)이 도포된 배양접시에 옮긴 후 간세포 분화 제제(HGF 또는 OSM)를 첨가하여 2주간 추가 배양하여 분화시켜, 염화리튬에 의한 인간 배아 줄기세포 유래 배상체의 간세포 특이적 분화유도를 확인한 사진이다. A는 본 발명에 따른 줄기세포의 분화유도를 타임 테이블로 나타낸 그림으로, 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화 인간 배아 줄기세포 형성은 나타나지 않았다. H는 미분화의 줄기세포 대조군(hES cells), 간세포 분화 제제를 처리하지 않은 대조군(control), OSM을 처리한 실험군(OSM)과 비교하여, HGF를 처리한 실험군(HGF)에서 간세포 특이적 유전자들(ALB, AFP, AAT, TAT, TTR, CPS1)의 발현 증가를 확인한 RT-PCR 결과이고, I는 상기 H의 RT-PCR 결과가 인간 태아의 간세포에서 발현하는 유전자의 양상과 비슷함을 확인한 RT-PCR 결과이다. B 내지 G는 상기 H 및 I의 RT-PCR 결과를 뒷받침하는 면역염색법 결과로서, B와 C는 간세포 분화 제제로 OSM을 사용한 경우보다 HGF를 사용하여 분화유도를 하였을 경우, 간세포 특이적 형태인 다각형 모양의 세포(polygonal cells), 특히 간세포의 특징인 두 개의 핵을 소유하는 세포(binucleate cells, C의 화살표)가 월등히 많음을 확인한 결과이다. 여기에서, B는 인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포의 전체적 양상을 보여준 사진이고, 박스부분을 확대한 사진이 C이다. 또한, D~G는 간세포 분화 제제로서 HGF를 사용하여 분화유도를 하였을 경우, 간세포 특이적 ALB, CK8, CK18, AFP, GATA4의 발현을 확인한 결과로서, D는 ALB와 CK8의 동시 발현, E는 CK8과 GATA4의 동시 발현, F는 ALB와 CK18의 동시 발현, G는 AFP와 ALB의 동시 발현을 확인한 사진이다. J는 간세포 분화 제제로서 HGF 또는 OSM을 처리하였을 경우 분화 효율을 비교한 결과로서, 대조군으로 분화시 어떠한 성장인자도 처리하지 않은 그룹을 사용하였으며(control), 간세포 특이적 ALB과 CK8의 동시 발현, ALB와 CK18의 동시 발현 효율을 확인한 그래프이다.

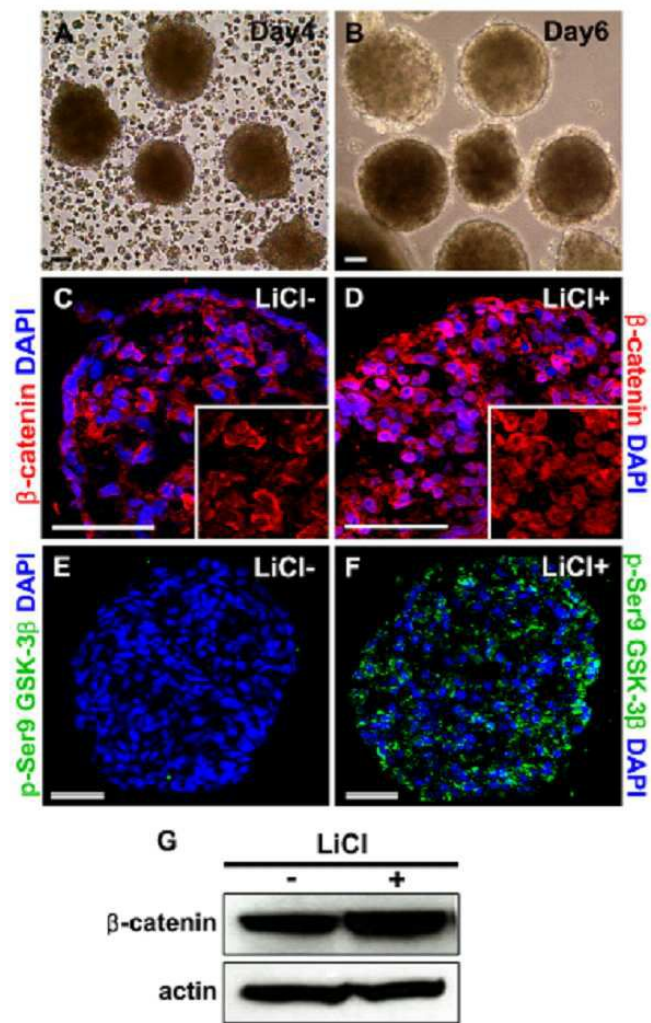
<6> 도 6은 영양세포 위에서 5~7일 증식한 미분화의 인간 배아 줄기세포를 2일간 배양하여 형성된 배상체에 염화리튬을 2일간 처리한 다음, 염화리튬이 없는 배양액에서 2일간 더 배양하여 분화시킨 세포를 라미닌이 도포된 배양접시에 옮긴 후 간세포 분화 제제인 HGF를 첨가하여 2주간 추가 배양하여 분화시켜, 인간 배아 줄기세포 유래 배상체의 간세포 특이적 분화세포가 정상적인 간세포의 기능적 특성을 보유하고 있음을 확인한 사진이다. A는 ICG(indocyanine green) 축적현상, B는 GGT(γ -glutamyl transpeptidase) 활성을 확인한 염색 결과이며, C는 PAS(periodic acid-Schiff's staining) 염색법에 의한 글리코겐의 세포질 내 저장을 확인한 결과이다. D는 세포대사에 의한 우레아(urea) 분비를 시간에 따라 확인한 그래프이다. D에서 *는 $p<0.05$, **는 $p<0.01$ 로, 이 수치가 통계적으로 의미가 있음을 나타낸다.

도면

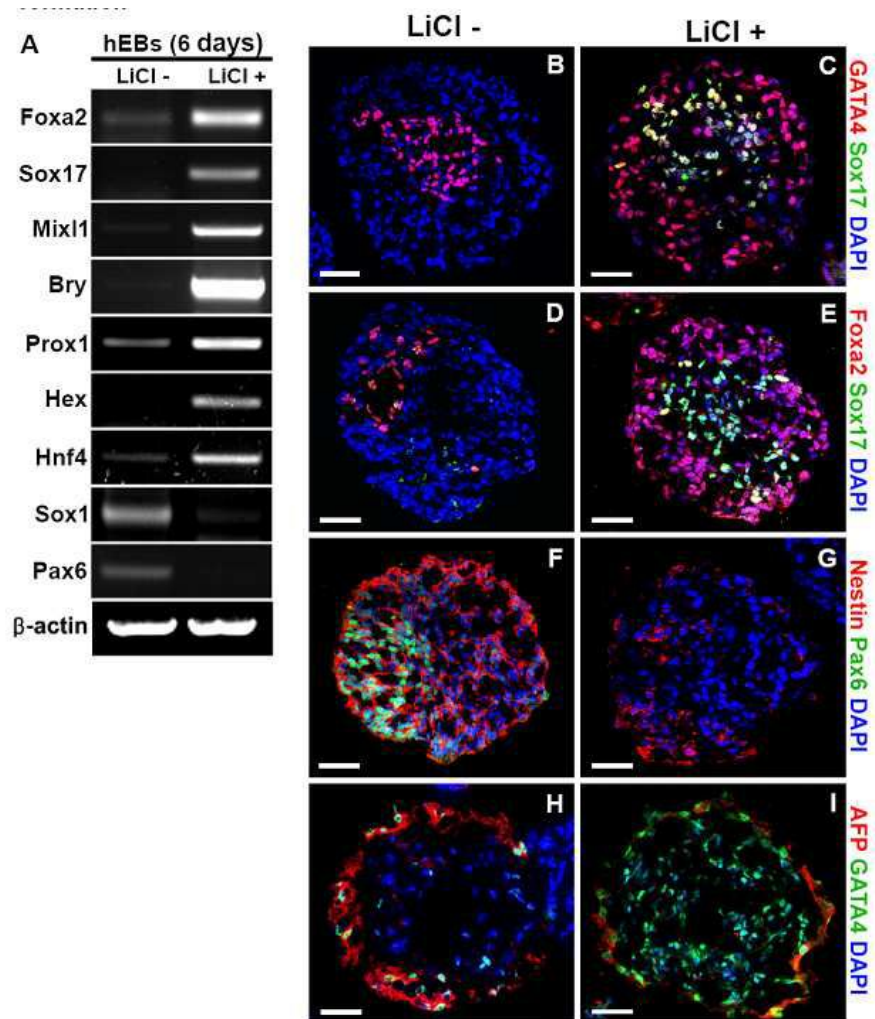
도면1



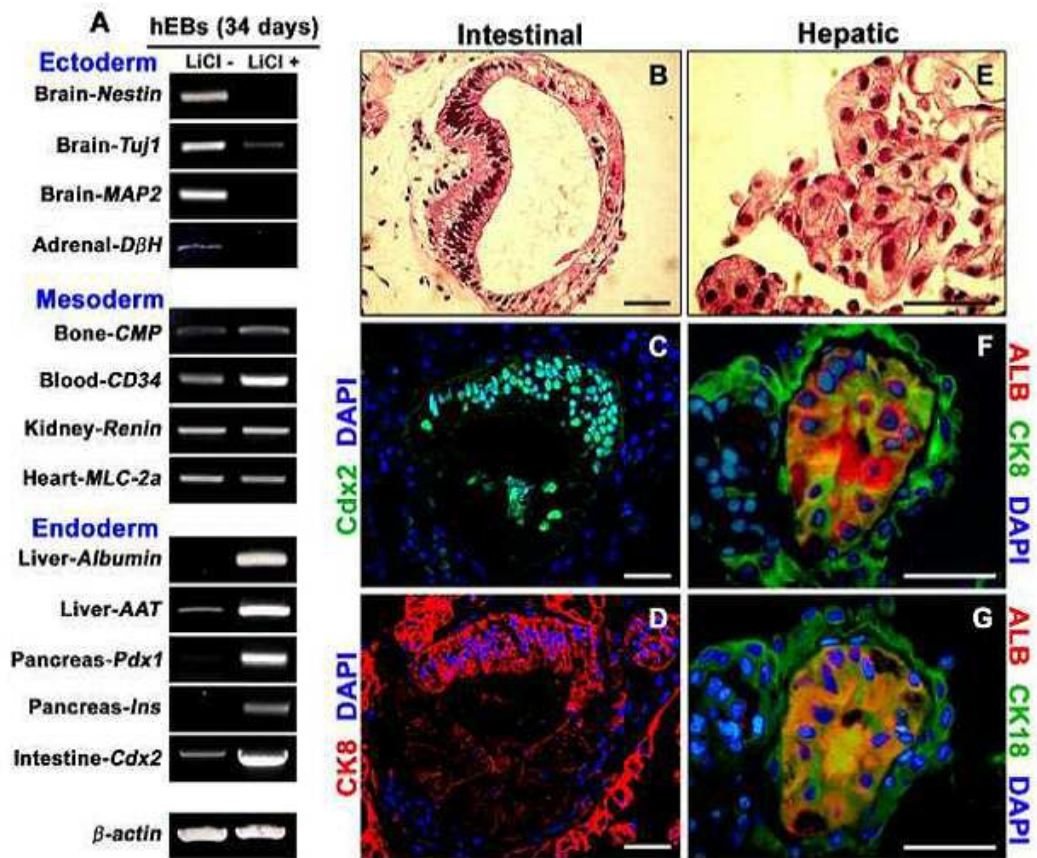
도면2



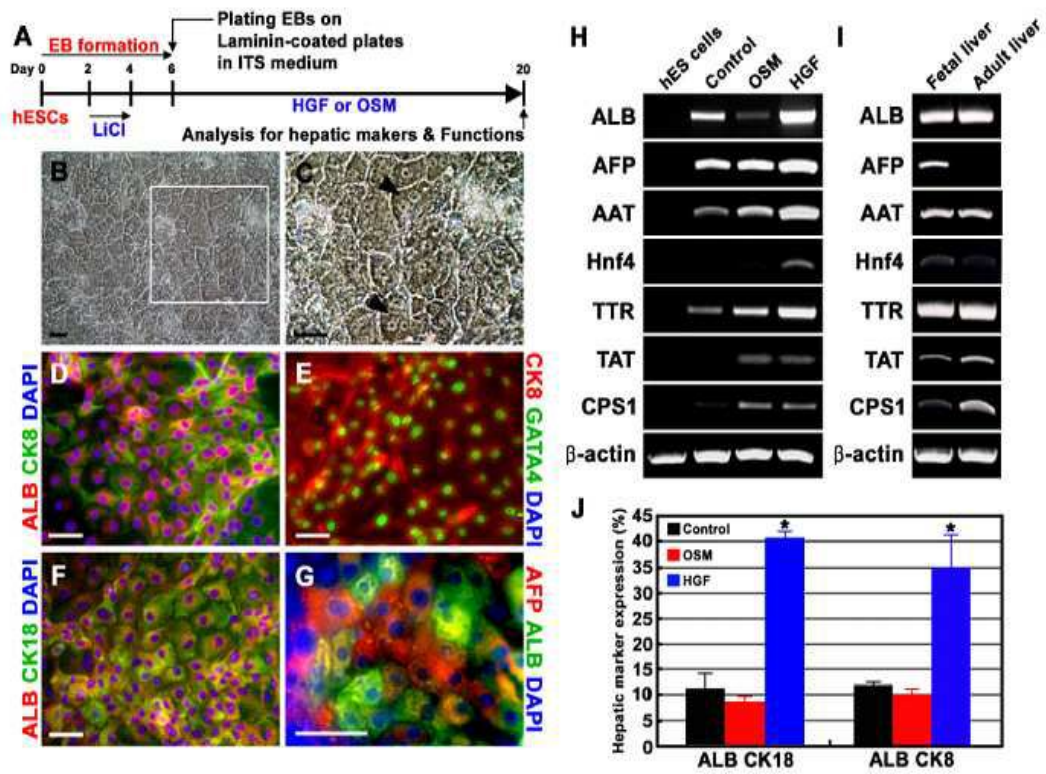
도면3



도면4



도면5



도면6

