



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0060670
(43) 공개일자 2013년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/18 (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0126862

(22) 출원일자 2011년11월30일

심사청구일자 2012년10월16일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김중훈

서울특별시 용산구 이태원2동 주공아파트 108동 301호

우동훈

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

(74) 대리인

특허법인다나

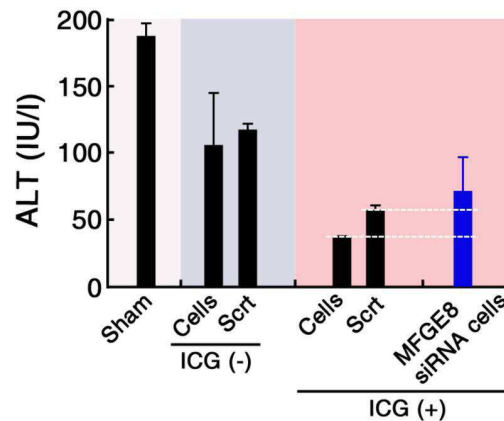
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 Milk fat globule - EGF factor 8 (MFGE8) 을 이용한 간 재생 및 간 질환 개선 용도

(57) 요약

본 발명은 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8)을 이용한 간 재생 및 간 질환 개선 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 MFGE8는 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포에서 높은 발현율을 나타내며, 간세포 증식 및 혈관 재생을 촉진하여 단독으로 사용하거나, 간세포와 함께 사용하여 간 재생 및 간 질환 개선을 달성할 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000326

부처명 한국과학재단

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 [협동]인간배아줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화유도기법 개발(세포응용연구사업단)

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) 단백질을 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

MFGE8은 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포 유래인 간 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

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 A_I, follistatin-like 1, profilin 1), peroxidasin, alpha 1 type XVIII collagen, appha 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), gelsolin, growth arrestspecific 6 및 dickkopf homolog 3로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) 단백질; 및

간세포를 포함하는 세포치료제.

청구항 6

제5항에 있어서,

간세포는 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 것인 세포치료제.

청구항 7

제5항에 있어서,

간 재생 또는 간 질환 치료용인 세포치료제.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8)의 발현을 향상시켜 간 재생 및 간 질환을 개선할 수 있는 MFGE8의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 간질환의 간 이식 치료에 있어서 가장 큰 문제점은 공여자의 부족이다. 이러한 간 이식의 문제점에 대한 대안으로 최근 간세포를 이용한 세포 대체 치료 방법이 새로운 대안으로 떠오르고 있고, 이에 따라, 무한 증식할 수 있는 인간 배아줄기세포는 간질환의 세포 치료에 사용될 간세포를 다량 공급할 수 있는 재료로 각광을 받고 있다.
- [0003] 하지만, 줄기세포로부터 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, 줄기세포 유래 간세포의 간질환 실험동물에 이식 시, 결론적으로 낮은 생착률을 보이며, 이에 따라, 손상된 간 기능을 효율적으로 회복시킬 수 없다는 것이다. 셋째로는, 분화 유도 후 잔여 미분화 줄기세포로 기인한 기형종 생성 등의 부작용이 있다. 따라서, 줄기세포로부터 분화 유도한 간세포를 간질환의 세포 대체 치료 목적으로 사용하기에는 현재까지 많은 어려움이 따른다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0004] (비특허문헌 0001) 1. Int J Clin Exp Med, vol.2, pp.36-40, 2009.02.02
- (비특허문헌 0002) 2. Hepatology, vol.46(2), pp.535-547, 2007.08

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 간세포 이식을 이용한 간 질환 치료에 따른 부작용을 해소하기 위해 간 질환 개선 효과가 있는 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포의 유래물질을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 간세포의 유래물질을 간 질환 개선 용도로 사용하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) 단백질을 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0008] 본 발명은 또한 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) 단백질; 및
- [0009] 간세포를 포함하는 세포치료제를 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명은 간세포 증식, 혈관 생성 촉진 등을 통해 간 재생 또는 간 질환 개선 효과를 갖는 MFGE8의 약제학적 용도를 제공할 수 있다. 상기 MFGE8은 그 자체로서도 간 질환을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 줄기세포 유래의 간세포와 함께 사용하여 간세포의 세포이식에 의한 간 질환 개선에도 효과적일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포(ICG+ 세포)에서 MFGE8을 녹아웃 시킨 ICG+ 세포(MFGE8 siRNA ICG+ 세포)의 간 재생에 대한 효과를 나타낸 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 2는 MFGE8을 녹아웃 시킨 ICG+ 세포를 이식하여 얻은 손상된 간세포의 세포 분열 및 혈관 재생 정도를 나타내는 BrdU 및 PECAM 염색 결과이다.
- 도 3은 간 질환 실험동물에 아무것도 이식하지 않은 sham 그룹, 인간 배아줄기세포 유래 간세포를 분리 정제하고 남은 간세포 이외의 세포 (ICG- 세포) 및 그의 조건배양액(conditioned medium, CM), ICG+ 세포 및 그의 조건 배양액 이식에 따른 간 세포 증식(a) 및 혈관 재생(b) 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 간 질환 실험동물에 아무것도 이식하지 않은 sham 그룹, ICG- 세포 및 그의 조건배양액, ICG+ 세포 및 그의 조건배양액, 그리고 MFGE8을 녹아웃 시킨 ICG+ 세포이식에 따른 간 기능 회복을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명자들은 인간 배아줄기세포로부터 간세포 분화를 유도하고, 상기 간세포를 순수 분리 정제 후, ICG+ 세포 조건배지에서 ICG- 세포 조건배지에 비하여 상대적으로 2배 이상 증가한 단백질을 분석하였다(표 1 내지 3 참조). 이중 세포사에 의해 사멸된 세포들의 인지와 식작용을 향상시키는데 관여하고, 세포막에 위치하는 MFGE8의 간 재생 효과를 검증하여 MFGE8 단백질의 간 질환 개선을 위한 이용 가능성을 제공함으로써 본 발명을 완성하였다.

표 1

Accession	Protein name	Average Rsc ratio ($\sim \log(+/-)$) ^a	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 ± 0.67	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		
41393802	complement component 1, s subcomponent	3.86 ± 0.68	Yes	S		
189083782	gelatinin isoform c	3.78 ± 0.63	Yes (non-parenchymal cells)	S	Yes	Yes
39358541	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		
55925578	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 X collagen isoform B preproprotein	3.04 ± 0.73	No	S, ECS, ECM		
89969017	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
19743603	fibulin 5 precursor	2.87 ± 0.65	No	S		Yes
67782958	complement factor B preproprotein	2.79 ± 1.02	Yes	S		
61699228	pulmonary surfactant-associated protein D precursor	2.72 ± 0.90	No	S		
66659069	vitronectin precursor	2.66 ± 0.45	Yes	S	Yes	
51873061	quiescetin G6 sulfhydryl oxidase 1 isoform b	2.59 ± 1.26	Yes	S	Yes	
64798622	mannosidase, beta, A, lysosomal	2.58 ± 0.67	Yes	Ly		

[0013]

표 2

Accession	Protein name	Average Rac ratio ($\sim \log(+/-)$) ^a	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 ± 0.67	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		
41393802	complement component 1, s subcomponent	3.86 ± 0.68	Yes	S		
189083782	gelatinin isoform c	3.78 ± 0.63	Yes (non-parenchymal cells)	S	Yes	Yes
39358541	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		
55925578	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 X collagen isoform B preproprotein	3.04 ± 0.73	No	S, ECS, ECM		
89969017	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
19743603	fibulin 5 precursor	2.87 ± 0.65	No	S		Yes
67782958	complement factor B preproprotein	2.79 ± 1.02	Yes	S		
61699228	pulmonary surfactant-associated protein D precursor	2.72 ± 0.90	No	S		
66859069	vitronectin precursor	2.66 ± 0.45	Yes	S	Yes	
51873061	quiescetin G6 sulfhydryl oxidase 1 isoform b	2.59 ± 1.26	Yes	S	Yes	
64798622	mannosidase, beta, A, lysosomal	2.58 ± 0.67	Yes	Ly		

[0014]

표 3

54734086	fibulin 1 isoform D	1.66 ± 0.03	Yes	S, ECS, ECM		Yes
21536285	brain creatine kinase	1.57 ± 0.60	No	Cy		
4756906	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovabumin), 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		
4626696	profilin 1	1.45 ± 0.69	Yes	Cy, Nu	Yes	
42740907	clusternin isoform 2	1.45 ± 0.89	Yes	S		Yes
4504373	hexosaminidase B preproprotein	1.35 ± 0.78	Yes	Ly		
20999800	RPE- spondin	1.35 ± 0.70	Yes	S		
28110957	cathepsin H isoform b precursor	1.35 ± 0.52	Yes	Ly		
105990514	filamin B, beta (actin binding protein 278)	1.30 ± 0.52	Yes	Cy		
209364544	calyculin 2	1.30 ± 0.52	Yes	M, ERM, GM		
4507725	transferrin precursor	1.26 ± 0.49	Yes	S		
5453678	epididymal secretory protein E1 precursor	1.26 ± 0.49	No	S		
25065552	glutathione S-transferase mu 3	1.26 ± 0.55	Yes	Cy		
55748096	collagen, type XIV, alpha 1	1.26 ± 0.55	No	S, ECS, ECM		
57242757	calyculin 1 isoform 1	1.26 ± 0.55	No	ERM, GM, PM		
66346689	dictyopt homolog 3 precursor	1.26 ± 0.55	Yes (Hepatic stem cells)	S	Yes	Yes
115527062	alpha 2 type VI collagen isoform 2C2 precursor	1.26 ± 0.55	Yes	S, ECS, ECM, M		Yes
11342666	matrix metalloproteinase 2 isoform a preproprotein	1.26 ± 0.49	No	S		
4507171	secreted protein, acidic, cysteine-rich	1.23 ± 0.86	No	S, ECS, ECM, BM		Yes
166910296	heptaglobin isoform 2 preproprotein	1.17 ± 0.44	Yes	S		
194097382	ADP-ribosyltransferase 3 isoform c	1.17 ± 0.40	No	M		
181702986	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 Bioinformatics Harvester V (<http://harvester4.izk.de>) and WikiProtein (<http://wiki.protein.org/>))

[0015]

[0016] 따라서, 본 발명은 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) 단백질을 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0017] 상기 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8)는 포유류, 조류 등의 포유동물에서 발견되는 단백질로, 아르기닌-글리신-아스파르트산 모티프뿐만 아니라 포스포티딜세린 결합 도메인을 포함하고 있어 인터그린과 결합할 수 있다. MFGE8은 세포사멸 세포의 표면에 노출된 포스포티딜세린과 결합하여 세포사멸 세포의 옅소닌 작용과 식세포의 표면에 있는 인터그린과의 결합을 통해 죽은 세포의 포식을 매개하는 기능이 있다.

[0018] 본 발명에 따르면, 인간 배아줄기세포(Human embryonic stem cells)에서 유도 분화된 간세포(ICG(Indocyanine green)+ 세포)를 분리 정제하고 남은 간세포 이외의 세포 (ICG- 세포) 대비 발현이 2배 이상 증가한 단백질 중 MFGE8의 간 재생 효과를 확인하기 위하여 ICG+ 세포(인간 배아줄기세포에서 유도 분화하여 순수 분리 정제한 간 세포)에 MFGE8 siRNA를 도입하여, MFGE8을 억제시킨 ICG+ 세포를 제조하고, 이의 조건배양액과 ICG- 세포 및 그의 조건 배양액을 간 질환 실험동물에 이식하여 간세포 증식 및 혈관 재생 효과를 측정한 결과, MFGE8을 억제시킨 ICG+ 세포의 세포이식 시 간 재생(간세포 증식 및 혈관 재생) 효과가 ICG+ 세포 또는 그의 조건배양액의 간 재생 효과에 비하여 현저히 감소하므로 ICG+ 세포 유래 물질 중 MFGE8은 간 재생에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.

- [0019] 또한, MFGE8을 녹아웃 시킨 ICG+ 세포는 ICG+ 세포 및 이의 조건 배양액에 비해 손상된 간 기능의 회복 효과가 떨어지므로 MFGE8은 간 기능 회복에 영향을 주는 단백질을 알 수 있다.
- [0020] 따라서, MFGE8은 간 재생 및 간 질환 개선 용도로 사용할 수 있다.
- [0021] 상기 MFGE8은 천연형 또는 재조합 MFGE8, 또는 이들과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질에는 천연형/재조합 MFGE8과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.
- [0022] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 MFGE8과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.
- [0023] "기능적 유도체"는 상기 MFGE8 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 MFGE8과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 MFGE8은 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포(hepatocytes)에서 분리한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.
- [0025] 상기 "분화"란 줄기세포로부터 특정 세포로 구조와 형태를 변화시키는 과정을 총칭하는데, 각각의 기능을 수행하기에 알맞은 구조와 형태를 변화시키는 과정을 말한다.
- [0026] 상기 분화는 자연발생적 분화 및 유도 분화를 포함한다.
- [0027] 상기 줄기세포로부터 특정 세포로의 유도 분화는 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용 또는 이를 응용하여 수행될 수 있다. 보다 구체적으로 배아줄기세포의 분화 유도 방법은 본 발명자들의 대한민국 특허 제861632호에 기재된 방법을 참고할 수 있다.
- [0028] 상기 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포(ICG+) 세포는 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 세포 중 배아줄기세포의 유전적 변형(genetic modification) 없이 세포를 고정하지 않고 살아있는 상태로 염색하는 vital dye인 ICG(indocyanine green) 염색 후 LMPC(laser microdissection and pressure catapulting) 방법으로 분리된 ICG+ 간세포 집단일 수 있다.
- [0029] 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 사용할 수 있다.
- [0030] 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.
- [0031] 본 발명에서 사용된 용어, LMPC 방법은 목적 대상 세포를 분리 정제하는 방법으로 목적 대상 세포 둘레에 레이저 빔을 조사하여 목적 대상 세포만을 오퍼내어 수득할 수 있으며, LMPC 방법은 PALMMicroBeam instrument를 사용하여 수행한다 (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Germany; Cat.-No. 1440-0250).
- [0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, LMPC 방법을 이용하여 ICG 염색된(ICG(+)) 간세포 집단의 둘레에 레이저 빔을 조사하여 오퍼내어 간세포를 수득할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용된 용어, ICG+ 및 ICG-는 각각 ICG 염색 시 양성반응을 보이는 세포와 음성 반응을 보이는 세포를 나타내는데, 각각 ICG+ 세포는 외부로 암녹색을 발색하나, ICG- 세포는 외부로 암녹색을 발색하지 않는 것으로 발색 여부로 구분된다.
- [0034] 따라서, 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포(hepatocytes)에서 분리한 MFGE8은 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 동물세포배지에서 1 내지 3일간 배양하고, 상기 배양물을 원심 분리하여 세포찌꺼기를 제거하여 제조되는 조건배지에서 분리할 수 있다. 상기 동물세포배지는 DMEM/F12, 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄을 포함하는 것을 사용할 수 있다. 상기 조건배지는 5×10^5 내지 1×10^6 세포 당 1mL의 배지를 이용하여 배양한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.
- [0035] 또한, 상기 MFGE8은 공지의 서열, 예컨대 GenBank NM_005928에 공개된 사람 MFGE8의 서열로부터 당업자에 공지

된 유전공학적 방법으로 제조할 수 있다.

[0036] 재조합 MFGE8는 통상의 컬럼 크로마토그래피 방법 등을 통해 분리할 수 있고, 단백질의 정제 정도는 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) 등으로 확인할 수 있다.

[0037] 본 발명에서, 상기 “간 질환”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, 임신중독증, 비호지킨 림프종, 라이 증후군, 기타 신생아 황달, 가와사키병, 루푸스, 칸디다증, 말라리아, 랩토스피라증, 뎅기열, 간흡충증, 급성 간경화, 만성 간경화, 선천성 대사 이상(inherited metabolic diseases), 및 담관질환(bile duct disease) 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0038] 또한, 본 발명의 간 질환 예방 또는 치료용 조성물은 간 재생 및 발생에 직접적으로 관여하는 단백질, 및 간접적으로 세포의 성장, 조직 재건, 혈관 생성, 세포사 방지 등에 관여하는 것으로 알려진 단백질, 예컨대, 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 A_I, follistatin-like 1, profilin 1), 2) 세포의 성장, 조직 재건, 혈관생성 및 세포사 방지에 관여하는 18개 단백질(oxidized low density lipoprotein, 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, polydym, 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 arrestspecific 6, dickkopf homolog 3)을 더 포함하여 간 질환의 예방 또는 치료적 효과를 높일 수 있다.

[0039] 상기 단백질들은 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포 유래 물질일 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.

[0040] 구체적으로, 수확한 ICG+ 세포 조건배지 및 ICG- 세포 조건배지를 Centricon Plus-20 filter (Millipore)를 사용하여 농축하고, 농축한 단백질 각각을 4-12% Bis-Tris gel을 이용하여 로딩한 후, GelCode Blue Stain Reagent (Thermo scientific에서 구입)로 염색한 후 10개 컷으로 잘라, 각각의 자른 겔을 트립신으로 처리한다. 트립신을 이용하여 처리한 단백질들을 이용하여 LC-MS/MS 분석 후, BioWorksBrowserTM 소프트웨어를 이용하여 검출된 단백질들을 동정한다. 각각 세 번의 ICG+ 세포 조건배지 및 ICG- 세포 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+ 세포 조건배지에서 증가한 단백질들과, ICG- 세포 조건배지에서 증가한 단백질들을 선택한 후 ICG+ 세포 조건배지에서 2배 이상 증가한 단백질 84개를 좀 더 선별하고(표 1 내지 3), 이 중 간 재생에 직접적 또는 간접적으로 관여하는 단백질들을 선별하여 채택된 것일 수 있다.

[0041] 상기 방법 외에도 통상의 펩타이드 합성법 또는 유전공학적 방법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명의 간 질환 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0043] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0045] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 전신계 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지의 기술로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0047] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. MFGE8은 식염수 또는 완충용액에 잘 용해되므로 냉동 건조 상태로 보관한 후, 유효량의 MFGE8을 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등에 적합한 형태로 식염수 또는 완충액에 투여 직전에 용액으로 제제화하여 투여할 수도 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 성인에게 1일에 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg의 용량을, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또한 약학적 유효량의 MFGE8을 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 동물의 간 질환의 치료방법을 제공한다.
- [0050] 상기 간 질환의 치료 방법에 사용되는 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0051] 한편, 상기 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 투여할 수 있는 개체는 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 마우스와 같은 인간을 제외한 동물일 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또한 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8) 또는 이와 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질; 및
- [0053] 간세포를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명에 따르면, MFGE8 단백질은 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 간세포에서 분비되는 단백질로서 간 재생, 혈관 생성, 간 기능 회복을 촉진할 수 있는 특징이 있으므로 간세포의 세포이식을 통한 간 질환 치료 시 치료적 효과를 더욱 높일 수 있다.
- [0055] 따라서, MFGE8 단백질과 간세포를 이용한 세포 치료 요법을 통한 간 질환 치료용 세포치료제로 사용할 수 있다.
- [0056] 상기 간세포는 인간 배아줄기세포에서 유도 분화된 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0057] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0058] <실시예 1> 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 MFGE8 siRNA 도입에 따른 MFGE8 녹아웃 및 MFGE8을 녹아웃 시킨 간세포의 간 재생 효과
- [0059] 대한민국 공개특허 제2010-0086372호에 기재된 방법을 사용하여 순수 분리 정제한 인간 배아줄기세포 유래 간세포(ICG+ 세포)를 얻을 수 있었다. 이를 간략히 설명하면 다음과 같다.
- [0060] 인간 배아줄기세포로부터 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 구

입, LMPC 전용 배양접시로, 배양접시 위에 별도의 멤브레인이 장착되어 있어 LMPC 수행 시 배양접시는 그대로 있고 오려진 멤브레인과 그 위의 세포만 떼어져 나가 선별적으로 원하는 세포 부분만 골라낼 수 있도록 만들어진 배양접시)에 옮겼다. 그 다음, DMEM/F12 배양액에 ITS(10 $\mu\text{g/mL}$ 인슐린, 5.5 $\mu\text{g/mL}$ 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.

[0061] 상기 인간 배아줄기세포로부터 유도 분화된 간세포의 배양액에 1 mg/mL indocyanine green(ICG)를 첨가하여 분화된 간세포가 ICG 염색될 수 있도록 30분간 37°C에서 인큐베이션 하였다.

[0062] 상기 PALMDuplex Dishes 상의 ICG가 염색된 부분의 모서리를 따라 레이저로 ICG+ 클러스터를 오려내었다. 오려진 ICG+ 클러스터는 오려진 부분(target area)의 바로 윗부분에 위치하여 HGF, OSM 및 DEX가 포함된 배양액으로 뚜껑 부분이 채워진 원심분리용 튜브(microcentrifuge tube)로 사출되어 모아졌다 (표적 부위에서 레이저를 이용하여 오려낸 부분을 표적 부위의 위쪽에 있는 튜브로 쏘아 올려줌).

[0063] 상기 방법으로 모아진 ICG+ 클러스터와 PALMDuplex Dishes사에 남아있는 ICG- 세포는 피펫팅하여 세포에 붙어있는 멤브레인을 제거한 후, 5 $\mu\text{g/mL}$ collagen type I이 도포된 일반 배양접시에 옮겨져, DMEM/F12 배양액에 ITS(10 $\mu\text{g/mL}$ 인슐린, 5.5 $\mu\text{g/mL}$ 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.

[0064] 상기로부터 순수분리 정제한 인간 배아줄기세포 유래 간세포(ICG+ 세포)에 Santa curz biotechnology에서 구입한 human MFGE8 siRNA 80pmol을 lipofectamine 200 (Invitrogen에서 구입)을 이용하여 48 시간 동안 도입 후, 웨스턴 블랏을 이용해 MFGE8의 넋아웃 여부를 MFGE8 siRNA를 도입하지 않은 ICG+ 세포 및 negative siRNA를 도입한 ICG+ 세포를 대조군으로 사용하여 확인하였다.

[0065] MFGE8 siRNA를 도입한 ICG+ 세포는 배양접시에서 떼어내 트립신(Invitrogen에서 구입)을 이용하여 단일 세포로 분리한 후, 2×10^6 개 세포를 CCl_4 (carbon tetrachloride, sigma에서 구입)를 복강내에 주사(올리브 오일내에 10% CCl_4 를 포함한 용액을 생쥐 몸무게 20g당 100 μL 를 복강내 주사)하여 간 질환을 유도한 생쥐의 비장(spleen)을 통해 이식하였다. 이식 3일 후, 실험동물의 간을 적출하여 BrdU 염색 및 PECAM 염색을 수행하였다.

[0066] 도 1에 나타난 바와 같이, MFGE8 siRNA를 처리한 ICG+ 세포에서 MFGE8이 발현되지 않음을 확인하여 MFGE8이 성공적으로 넋아웃 되었음을 확인하였다.

[0067] 도 2는 BrdU 염색 및 PECAM 염색을 통한 간세포 증식 및 혈관 재생 정도를 확인한 것으로, 대조군인 Sham 군에 비해 세포 분열한 간세포를 확인하였고(BrdU 염색), PECAM 염색을 통해 간 내에 재생된 혈관을 확인하였다.

[0068] <실시예 2> MFGE8이 넋아웃된 ICG+ 세포의 재생 효과 비교

[0069] MFGE8이 넋아웃된 ICG+ 세포의 간 재생 효과를 아무것도 주입하지 않은 sham 그룹, ICG- 세포 및 그의 조건배양액, ICG+ 세포 및 그의 조건배양액의 재생효과와 비교 검증하였다.

[0070] ICG- 세포, ICG+ 세포 및 MFGE8이 넋아웃된 ICG+ 세포는 각각 2×10^6 개 세포를 실험동물의 비장을 통해 이식하였고, ICG-세포 조건배양액 및 ICG+ 세포 조건배양액의 농축된 조건배양액을 실험동물의 복강을 통해 주사하였다.

[0071] 상기 농축된 조건배양액은 순수분리 정제한 인간 배아줄기세포 유래 간세포(ICG+ 세포) 및 순수분리 정제 후 남은 간세포 이외의 세포(ICG- 세포)를 콜라겐 I(collagen I)이 도포된 배양접시에 부착시킨 후, 5×10^5 내지 1×10^6 개 세포 당 1 mL의 ITS 배지 (DMEM/F12 배지에 100 $\times$ ITS supplement(GIBCO)를 1배로 희석하여 첨가한 배지)를 첨가하여, 2일간 배양한 후, 배양한 조건배지를 수확하여, 1000rpm으로 5분간 원심분리 하여, 세포 찌꺼기를 제거한 후 10 kDa cut off centrifugal filter unit (Millipore)를 이용하여 조건배지를 약 20배 농축한 것이다.

[0072] 세포이식 또는 조건배양액 주입 3일 후, 실험동물의 간을 적출하여, BrdU 염색 및 PECAM 염색을 통하여 간 재생

정도를 측정하고, 각 그룹들간의 간 재생 정도를 비교하였다.

[0073] 도 3에 나타난 바와 같이, MFGE8을 녹아웃한 ICG+ 세포의 이식 시, ICG+ 세포(MFGE8을 녹아웃하지 않은 ICG+ 세포)에 비하여 간세포의 증식(도 3A) 및 혈관 재생 효과(도 3B)가 현저히 떨어짐을 확인하여, MFGE8 간 재생에 중요한 역할을 수행함을 확인하였다.

[0074] <실시예 3> MFGE8이 녹아웃된 ICG+ 세포의 간질환 개선 효과 비교 검증

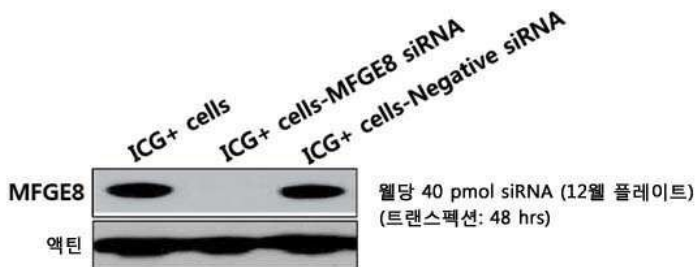
[0075] Sham 그룹, ICG- 세포 및 그의 조건배양액, ICG+ 세포 및 그의 조건배양액, 그리고 MFGE8을 녹아웃한 ICG+ 세포의 간질환 치료 효과를 ALT를 측정함으로써 비교 검증하였다.

[0076] ICG- 세포, ICG+ 세포 및 MFGE8이 녹아웃된 ICG+ 세포는 각각 2×10^6 개 세포를 실험동물의 비장을 통해 이식하였고, ICG- 세포 조건배양액 및 ICG+ 세포 조건배양액은 상기 실시예 2에 기재된 방법에 따라 농축된 조건배양액을 실험동물의 복강을 통해 주사하였다. 세포이식 또는 조건배양액 주입 3일 후, 각 그룹의 실험동물에서 혈청을 채취한 후, GPT/GOT 측정 키트(아산제약에서 구입)이용하여 간 질환 진단 방법 중 하나인 ALT(alanine aminotransferase)를 측정하였다.

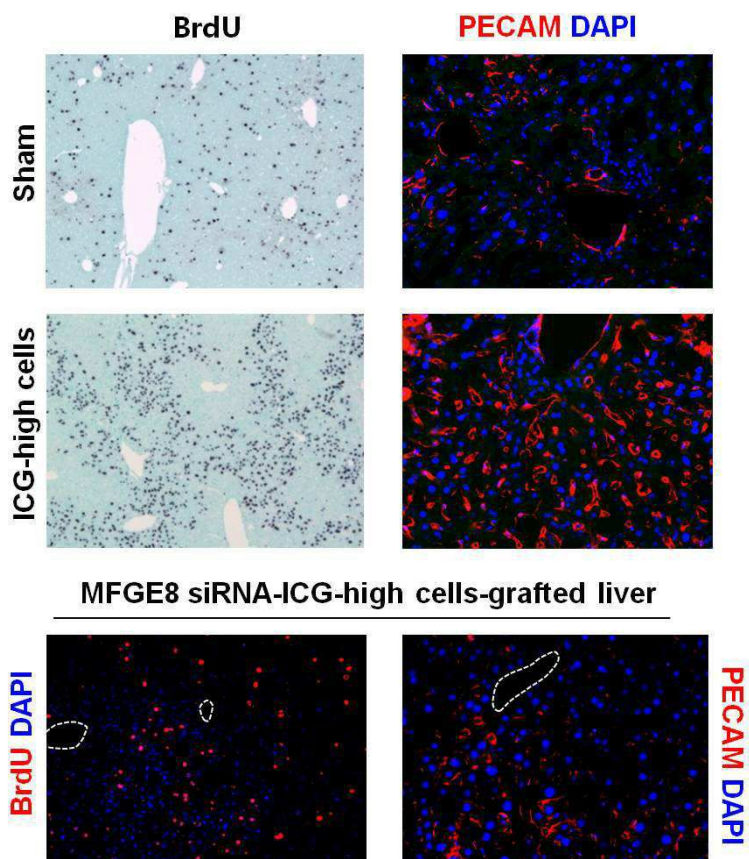
[0077] 도 4에 나타난 바와 같이, MFGE8을 녹아웃한 ICG+ 세포의 이식 시, ICG+ 세포(MFGE8을 녹아웃하지 않은 ICG+ 세포) 또는 그의 조건배양액을 이식한 실험동물에 비하여 ALT가 높은 것으로 확인되어 MFGE8이 녹아웃된 ICG+ 세포는 이식 시 간 기능 회복이 감소됨을 확인하였다. 따라서, MFGE8은 간 질환 개선에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다.

도면

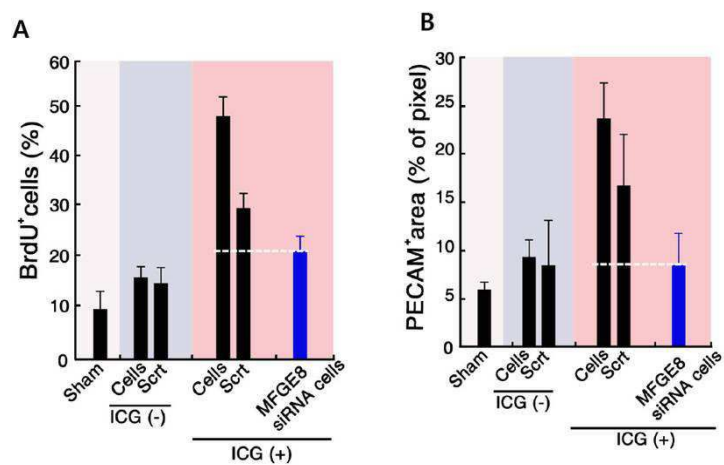
도면1



도면2



도면3



도면4

