



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0079591
(43) 공개일자 2025년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/33 (2015.01) A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/33 (2013.01)

A61K 35/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0166939

(22) 출원일자 2023년11월27일

심사청구일자 2023년11월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍성희

서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 305동 1401호

김민재

서울특별시 강남구 삼성로111길 8, 202동 1202호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

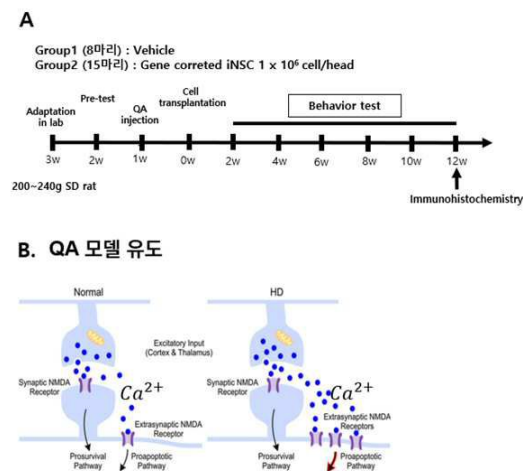
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 인간 섬유아세포 유래 신경줄기세포를 이용한 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간 섬유아세포로부터 직접 교차 분화로 유도된 유도신경줄기세포(ciNSC)의 헌팅턴병, 뇌졸중, 알츠하이머, 뇌전증, 다발성 경화증과 같은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

(72) 발명자

남궁용

경기도 과천시 별양로 164, 711동 401호

현동훈

서울특별시 성북구 장위로21길 49, 103동 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465038418

과제번호 00060247

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 (재단)범부처재생의료기술개발사업단

연구사업명 범부처재생의료기술개발사업

연구과제명 난치성 시신경척수염범주질환의 신경재생 및 재발억제를 위한 유도신경줄기세포 치료제 개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2025.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711153758

과제번호 2019M3E5D5065399

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발

연구과제명 환자세포-유래 유도신경줄기세포의 안전성과 유효성 검증을 통한 실용화 연구

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2019.06.01 ~ 2023.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711183820

과제번호 2020R1A2C1101294

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 헌팅톤병의 병리기전 규명 및 치료 인자 발굴 연구

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2020.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자 화합물; 또는

센다이바이러스, OCT4 및/또는 SOX4 발현 mRNA 및 miRNA 302/367 중 어느 하나 이상을 포함하는 직접 교차 분화 유도 조성물을 이용하여 체세포로부터 직접 변환된 유도 신경 줄기세포(iNSC)를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경계 질환은 헌팅턴병, 알츠하이머, 뇌졸중, 뇌전증, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증(루게릭), 뇌막염, 뇌수막염, 뇌성마비, 뇌염 및 허혈성 뇌혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인, 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 신경계 질환은 헌팅턴병, 알츠하이머, 뇌졸중, 뇌전증 또는 다발성 경화증 중에서 선택되는 것인, 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물,

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 체세포는 섬유아세포, 섬유아세포 유래 신경줄기세포 또는 신경전구세포로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 세포치료제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 정맥 내 투여 또는 원하는 조직 부위로 직접 이식하거나 이동하는 방식으로 투여되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 1.0×10^2 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 의 양으로 1일 1회 또는 수회로 나누어 투여되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 섬유아세포로부터 유도된 신경줄기세포(ciNSC)의 헌팅턴병, 뇌졸중, 알츠하이머, 뇌전증, 다발

성 경화증과 같은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 인간 섬유아세포를 유도 만능 역분화 줄기세포 (induced pluripotent stem cell)로 유도시킨 연구가 2007년 진행됨에 따라 세포의 리프로그래밍 (reprogramming)에 대한 연구가 진행되기 시작하였다. 이전의 줄기세포 연구에 이용된 인간 배아줄기세포 유래 신경줄기세포의 경우, 인간의 배아 사용으로 인한 윤리적 문제와, 면역 거부 반응 문제 그리고 분화되지 않은 배아줄기세포가 이식될 경우 종양 형성등의 문제가 있으며, 성체 줄기세포의 경우에는 세포의 확보가 어렵고 분화능에 제한이 있다는 문제점을 가지고 있다. 그러나 역분화 줄기세포는 윤리적 문제로부터 회피되고 면역 거부반응 문제는 없지만, 분화되지 않은 줄기세포가 이식될 경우 테라토마 형성의 문제를 일으킬 수 있다. 또한 최근 발표되고 있는 직접 교차분화한 신경줄기세포의 경우, 역분화줄기세포 및 배아 줄기유래 신경줄기세포와 유사한 성질을 가지고 있으나, 신경줄기세포를 형성하는데 주로 이용되는 방법인 바이러스 시스템은 유전자의 무작위적인 삽입에 의해 돌연변이 형성이 가능성이 있다. 또한, 인체내에 이식 시 바이러스의 문제점을 해결하고자 플라스미드, 단백질, RNA 등을 이용하고 있으나, 효율성이 낮고 암유전자를 이용한다는 점에서 확인되지 않은 새로운 문제가 발생할 수 있다.
- [0003] 따라서 이후 연구가 활발하게 진행되어, 인간의 섬유아세포에 다양한 조합의 신경세포 관련 전사인자를 도입하고, 이를 통해 신경세포를 형성하는 연구를 성공시켰다. 이는 난치성 뇌질환의 세포치료제로써 사용 가능성을 보여 주었으나, 신경세포로는 이미 분화된 세포이기 때문에 세포치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포를 확보하는 어려움이 있다. 이와 같은 문제로 인해 최근에는 섬유아세포를 이용하여 신경줄기세포로 직접 분화시키는 방법들이 연구되고 있다.
- [0004] 중추신경계는 신체 내부와 외부의 자극과 신호를 받아들여 다른 기관으로 전달하고 반응을 유도하여 신체의 활동을 상황에 맞도록 조절 통제하는 역할을 한다. 중추신경계는 뇌와 척수이며, 이를 신체의 다른부분과 연결하는 말초신경계로 구성되어 있다. 신경계는 뉴런이라는 기본단위로 구성되어 있으며, 뉴런은 뇌에 전기적 또는 화학적 메시지를 전달하는 네트워크로 배열되어 있다. 이런 신경계에 질환이 생기면 치명적이며, 대부분 완치가 어렵다.
- [0005] 헌팅턴병은 퇴행성 신경계 유전 질환 중 하나로써, 팔다리가 자기 의지와는 상관없이 마음대로 움직이는 무도증, 치매, 우울증 등의 정신질환이 발생하게 되며, 발병 10년 내외로 사망하게 하는 질병이다. 헌팅턴병의 원인은 상염색체 (4번 염색체) 의 16.3부분에 위치한 CAG반복서열의 과도한 증가에 의해 돌연변이 헌팅틴 단백질이 만들어지면서 조가비핵 (Putamen) 의 GABA성 중형돌기 신경세포(GABAergic medium spiny neuron) 의 손실로 발병하게 된다. 지금까지의 헌팅턴병을 치료하기 위한 약리학적인 치료법들은 뚜렷한 치료 효과를 나타내지 못하였다.
- [0006] 뇌졸중은 뇌에 혈액을 공급하는 혈관이 막히거나, 혈관이 터지면서 뇌에 손상이 생기고, 이로써 발생하는 마비 및 언어장애, 의식장애등의 신경학적 이상을 뇌졸중이라고 한다. 허혈성 뇌졸중은 전체 뇌졸중의 80% 이상을 차지하며, 뇌에 혈액을 공급하는 혈관이 혈전이나 고혈압등의 원인으로 인해 혈액을 공급하지 못하여 뇌세포가 죽게 되는 경우를 말한다. 출혈성 뇌졸중은 뇌로 가는 혈관이 터지면서 출혈이 발생하여 이로 인한 뇌손상이 발생하는 것으로 발생30일이 지면 50%정도의 사망률을 보이며, 사망의 절반은 첫 2일안에 발생한다. 뇌출혈이 발생하면 출혈 주위의 뇌 조직이 파괴되고 출혈로 인하여 형성되는 혈종에 의하여 기존에 뇌의 압력이 상승하여 이차적인 문제가 발생한다.
- [0007] 알츠하이머는 아밀로이드 베타 단백질, 타우단백질 등의 이상 단백질이 뇌 속에 쌓이면서 뇌 신경세포가 서서히 죽어가는 퇴행성 신경질환이다. 알츠하이머 병은 치매를 유발하는 가장 흔한 원인이며, 전체 치매 환자의 50~60%가 알츠하이머병에 의한 치매증상을 보인다. 기억력의 점진적인 퇴행을 가져오는 뇌의 이상에서 오는 병이다.
- [0008] 시신경 척수염과 다발성 경화증은 중추신경계의 염증탈수초질환으로 뇌, 시신경 또는 척수를 반복적으로 침범하는 비슷한 임상양상으로 나타난다. 예전에는 시신경척수염이 다발성경화증의 하위 범주로 알려져 있었지만, 2004년 시신경척수염 환자의 혈청에서 질병특이항체(AQP4)가 발견되면서, 이후 시신경척수염 범주질환으로 질환의 개념이 확대되었다. 또한 신경계에 광범위하게 염증 및 신경세포 사멸이 발생하여, 척수, 시신경, 뇌 등에 병변이 발생하며 이로 인해 시력저하 및 하지마비등 다양한 증상이 나타난다.
- [0009] 뇌전증은 뇌 신경세포가 일시적으로 이상을 일으켜 과도한 흥분 상태를 유발함으로써 나타나는 의식 소실, 발작, 행동변화 등과 같은 뇌 기능을 일시적 마비증상이 만성적 반복적으로 발생하는 뇌질환이다. 뇌전증의 원인

이 되는 요소들은 나이에 따라 변화하며, 여러 뇌질환 및 유전이 동반되어 발병하기도 한다. 선천성 질환, 여러 종류의 뇌손상, 뇌의 염증, 뇌종양, 뇌혈관질환(뇌출혈, 뇌경색) 퇴행성질환 등 각종 뇌질환에서 간질발작을 일으킬 수 있지만, 뇌전증 환자의 절반 이상은 원인을 불분명하여, 현재 다양한 약물치료가 병행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 이전 연구에서 소분자 화합물을 이용한 인간 섬유아세포로부터 직접 전환된 신경줄기세포를 개발하였으며 (PCT/KR2016/003819), 상기의 신경줄기세포를 통해 다양한 질환 동물모델에 투여한 결과, 효과적인 질환 치료 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물; 또는 센다이바이러스, OCT4 및/또는 SOX4 발현 mRNA 및 miRNA 302/367 중 어느 하나 이상을 포함하는 직접 교차 분화 유도 조성물을 이용하여 섬유아세포로부터 직접 변환된 유도 신경 줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기과 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물; 또는 센다이바이러스, OCT4 및/또는 SOX4 발현 mRNA 및 miRNA 302/367 중 어느 하나 이상을 포함하는 직접 교차 분화 유도 조성물을 이용하여 섬유아세포로부터 직접 변환된 유도 신경 줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물; 또는 센다이바이러스, OCT4 및/또는 SOX4 발현 mRNA 및 miRNA 302/367 중 어느 하나 이상을 포함하는 직접 교차 분화 유도 조성물을 이용하여 섬유아세포로부터 직접 변환된 신경 줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

[0015] 본 발명의 상기 신경줄기세포는 별도의 유전자 도입 또는 조작 없이, 소분자 화합물의 조합, 센다이바이러스, OCT4 및/또는 SOX4 발현 mRNA 및 miRNA 302/367 중 하나 이상을 포함하는 배양액에서 섬유아세포를 직접 교차 분화 유도하여 변환시킨 것이다.

[0016] 본 발명에서 상기 용어 "직접교차분화"란, 세포 리프로그래밍 기술 중 하나로, 이미 성숙한 분화 세포를 직접 리프로그래밍하여 줄기세포로 되돌리는 기술을 말한다. 본 발명은 인간 체세포, 예를 들어 섬유아세포, 섬유아세포 유래 신경줄기세포 또는 신경전구세포 중 하나 이상의 체세포를 직접교차분화를 통해 리프로그래밍하여, 신경줄기세포로 바로 분화시킬 수 있는 기술에 대한 것이며, 이는 특히 유도만능줄기세포로의 역분화 과정을 거치지 않고, 직접 신경세포로 분화하는 것이기 때문에 유도만능 줄기세포의 분화시 나타나는 수많은 단점을 극복하고, 세포 분화 효율을 높일 수 있다.

[0017] "신경줄기세포"는 자기복제능력을 가지고 있으며 뉴론(neuron) 및/또는 글리아(glia), 예를 들면, 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및/또는 슈반세포(Schwann cell) 등으로 분화하는 다분화 능력을 가진 미분화세포이다. 신경 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경 전구세포나 글리아 전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포(neural cell), 예를 들면 뉴론이나 글리아로 분화하게 된다. 상기 신경줄기세포는 이후 별아교세포(astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte), 뉴런 (neuron), 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포 및 콜린 신경세포로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상으로 분화될 수 있다.

[0018] 본 발명에서 상기의 신경줄기세포의 직접 교차 분화에 사용되는 배양액에 포함되는 소분자 화합물은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익산(Valproic acid, VPA), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301(TGF- β 타입 I 리셉터 억제제(TGF- β type I receptor inhibitor), SB43154(ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제), CHIR99021(GSK (glycogen synthase kinase) 억제제), 5-Aza-2'-deoxycytidine(데시타빈) 및 DZNep(3-Deazaneplanocin A) 중 선택되는 화합물일 수 있으며, 상기 배양액에는 이들을 조합하여 포함할 수 있다. 상기

각각의 소분자들은 섬유아세포의 신경줄기세포로의 분화를 위하여, 배지에 유효 농도로 포함되도록 하며, 배지의 종류 및 배양 방법 등 당해 기술 분야에서 공지된 요소에 따라 유효 농도를 조절하여 포함할 수 있다.

- [0019] 또한 본 발명의 상기 배양액에는 센다이바이러스를 포함할 수 있다. 상기 센다이바이러스는 체세포인 섬유아세포의 리프로그래밍을 위한 것으로, Yamanaka 팩터를 포함하여, 다분화능을 가지는 세포로 유도될 수 있는 특징을 가진다.
- [0020] 본 발명의 상기 배양액에 포함될 수 있는 mRNA 는 OCT4 및/또는 SOX4 발현을 위한 것으로, OCT4는 줄기세포의 만능성을 유지하는데 필요한 전사 인자이며, SOX2는 신경줄기세포의 대표적인 마커이자 체세포를 유도만능줄기세포로 전환할 때 필요한 인자이다. 태아 인간 섬유아세포에 OCT4 mRNA 및 SOX2 mRNA를 형질감염하여 유전자 발현을 조절한 다음 iNSC 미디어를 사용하여 신경 줄기세포로 직접 교차 분화를 유도할 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명의 상기 배양액에 포함되는 상기 miRNA는 miRNA302/367이며, 이는 줄기세포의 만능성을 유지시켜주는 유전자인 OCT4를 억제하는NR2F2 유전자의 발현을 억제하는 역할을 한다.
- [0022] 또한 본 발명의 배양액에는 상기의 성분 이외에, 신경 줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 배지는 DMEM/F12, N2, B27, bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 배양액에 의해 직접 교차분화된 신경줄기세포는 신경계 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 따라서, 상기의 신경줄기세포는 신경계 질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [0024] 상기 신경계질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 헌팅팅병, 알츠하이머, 뇌졸중, 뇌전증, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증(루게릭), 뇌막염, 뇌수막염, 뇌성마비, 뇌염 및 허혈성 뇌혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 상기 신경계 질환을 억제시키거나 발병을 지연시킬 수 있는 모든 행위를 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 상기 신경계 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 "세포치료제"일 수 있으며, 본 명세서에서 '세포치료제'는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 제작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 세포의 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종 또는 이종 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0029] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 제형화에 필요한 담체 혹은 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 유효 성분에 추가로 포함될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 포함된다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0030] 예를 들어, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물 또는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를

들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0031] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구 투여, 특히 정맥 내 투여 또는 원하는 조직 부위로 직접 이식하거나 이동하는 방식으로 투여되어, 손상된 신경계가 재생되거나 기능적으로 회복되도록 한다. 예컨대, 본 발명의 신경줄기세포를 손상된 신경 부위로 직접 이식한다. 이식은 단세포 현탁액 또는 일정 세포 밀도의 집합체를 이용하여 수행할 수 있다.

[0033] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 양으로, 질병을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 그 기준은 환자의 질환, 중증도, 약물 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 병용되는 성분 및 기타 사항에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 개별 치료제 혹은 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용을 최소화할 수 있는 수준으로 투여량을 결정할 수 있고, 이는 당업자에 의해 용이한 수준으로 결정될 수 있다.

[0034] 구체적으로 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중, 중증도, 성별 등에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 1.0×10^2 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^3 내지 1.0×10^6 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하며, 상기 투여량은 필요에 달리 설정할 수 있고 상기 기재된 용량에 의해 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0035] 본 발명은 인간 섬유아세포로부터 유도된 신경줄기세포(cINSC)의 헌팅턴병, 뇌졸중, 알츠하이머, 뇌전증, 다발성 경화증과 같은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로서, 상기 신경 줄기세포는 실제 신경계 질환을 유발한 동물 모델에 이식한 경우, 상기 질환 및 질환에 의해 유발되는 다양한 증상을 완화하여 높은 치료 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 독성물질인 Quinolinic acid 를 이용한 헌팅턴병 동물모델을 이용한 환자유래 피부세포를 이용한 직접변환 신경줄기세포 이식 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 독성 물질로 헌팅턴병을 유발한 동물 모델에 신경 줄기세포 치료제를 주입한 경우, 운동 회복효과를 관찰한 결과이다.

도 3은 독성 물질로 헌팅턴병을 유발한 동물 모델에 대한 투여량 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 mutant HTT gene을 삽입하여 형질전환을 통해 헌팅턴병을 유발한 동물 모델에 대한 운동 회복 효과를 확인한 결과이다.

도 5는 mutant HTT gene을 삽입하여 형질전환을 통해 헌팅턴병을 유발한 동물 모델에 대한 운동기능 회복 및 체중 변화를 측정한 결과이다.

도 6은 mutant HTT gene을 삽입하여 형질전환을 통해 헌팅턴병을 유발한 동물 모델의 뇌 조직 분석 결과로서, 신경 전달 물질 분비량의 변화를 확인한 것이다.

도 7은 mutant HTT gene을 삽입하여 형질전환을 통해 헌팅턴병을 유발한 동물 모델에 대한 신경 줄기세포의 독성 시험 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델에 대하여 본 발명의 신경줄기세포 투여로 인한 운동 능력 회복을 확인한 것이다.

도 9는 MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델에 신경줄기세포 투여 시, 내인성 신경 재생에

미치는 영향을 확인한 것이다.

도 10은 MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델에 신경줄기세포 투여 시, 뇌경색 부위 회복 여부를 확인한 실험 결과이다.

도 11은 MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델에 신경줄기세포 투여 시, 세포사멸 및 염증 반응에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 12는 MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델에 신경줄기세포 투여 시, 조직 내 염증 반응의 변화를 조사하기 위해 사이토카인 발현량을 mRNA 수준에서 확인한 결과이다.

도 13은 알츠하이머 병 (Alzheimer`s disease) 모델 마우스(5xFAD)에 신경줄기세포 투여 시 치매 치료의 효과를 확인하기 위한 전체적인 실험 설계도이다.

도 14는 알츠하이머 병 (Alzheimer`s disease) 모델 마우스(5xFAD)에 신경줄기세포를 투여하여 이를 면역조직화학을 통해 확인한 결과이다.

도 15는 알츠하이머 병 (Alzheimer`s disease) 모델 마우스(5xFAD)에 신경줄기세포 투여 시 대뇌 피질에서 치매 원인 물질인 베타아밀로이드 침착 개수를 대조군과 비교한 결과이다.

도 16은 알츠하이머 병 (Alzheimer`s disease) 모델 마우스(5xFAD)에 신경줄기세포 투여 시, 뇌의 해마에서 치매 원인 물질인 베타아밀로이드 침착 개수를 대조군과 비교한 결과이다.

도 17 및 도 18은 5xFAD 마우스와 정상 마우스(Wild Type: WT)의 대뇌 피질과 해마의 단백질인 BACE1 및 아밀로이드 전구체 단백질(APP)을 추출하여 웨스턴 블롯 실험을 진행한 결과이다.

도 19는 5xFAD 마우스에서 베타 아밀로이드의 독성에 의해 증가하는 성상교세포(Astrocyte)와 미세아교세포(Microglial cell)가 신경줄기세포의 주입에 의해 정상적인 분포를 회복하는지 여부를 확인한 결과이다.

도 20 및 도 21은 5xFAD 마우스에 신경줄기세포 투여 시, 공간 학습 능력 및 인지 능력의 개선 여부를 확인하기 위한 수중 미로 실험(Morris Water Maze)결과를 나타낸 것이다.

도 22는 5xFAD 마우스에 신경줄기세포 투여 시, 집중력의 개선 여부를 확인하기 위한 Novel Object Recognition 실험을 진행한 결과를 나타낸 것이다.

도 23은 5xFAD 마우스에 신경줄기세포 투여 시, 공간인지능력 개선을 확인하기 위한 T-maze 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 24는 5xFAD 마우스에 신경줄기세포 투여 시, 자발적 운동성 평가를 확인하기 위한 open field test 결과를 나타낸 것이다.

도 25는 5xFAD 마우스에서, 신경 줄기세포 투여에 의한 사이토카인 및 케모카인 분비량 변화를 mRNA 발현량 측면에서 확인하여 나타낸 것이다.

도 26은 5xFAD 마우스에서, 신경 줄기세포 투여에 의한 염증(면역) 및 신경영양인자의 양을 RNA 측면에서 분석하기 위한 실험 결과이다.

도 27은 5xFAD 마우스에서 신경 줄기세포 투여에 의한 노화 및 희소돌기아교세포 생성량을 RNA 측면에서 비교하여 나타낸 결과이다.

도 28은 신경줄기세포 투여군, HBSS 투여군, 그리고 WT 대조군에서 반구(hemi-sphere)를 적출하여 RNA 시퀀싱을 시행한 결과를 나타낸 것이다.

도 29는 5xFAD 마우스에서 다양한 데이터 베이스를 기반으로 유전자의 상관관계를 통계적으로 분석하여 주요 유전자 기능을 예측하기 위한 DAVID 분석을 시행한 결과로서, 신경 줄기세포 투여에 의한 과산화 반응 억제 효과를 확인한 것이다.

도 30은 신경 재생관련 유전자(13개)의 히트맵 분석 결과로서, 신경줄기세포 투여군 및 대조군을 비교한 결과이다.

도 31은 신경재생 관련 유전자 13개의 상관관계를 분석하기 위한 DAVID 분석 결과이다.

도 32는 EAE(experimental autoimmune encephalomyelitis) 모델에 신경 줄기세포를 투여하여 운동능력 회복,

중추신경계 내 염증 감소 및 탈수초화의 감소 여부를 확인한 결과이다.

도 33은 AE 마우스 모델에서 신경줄기세포 투여로 인한 면역반응의 감소로 반응성 별아교세포의 변화를 분석한 결과이다.

도 34는 EAE 마우스 모델에서 신경줄기세포 투여로 인한 면역반응의 감소로 미세아교세포의 변화를 분석한 결과이다.

도 35는 EAE 마우스 모델에서 다양한 염색 및 mRNA 발현분석을 통해 척수 내에서 면역반응의 강도와 희소돌기아교세포 소실 정도를 측정한 결과이다.

도 36은 신경줄기세포 투여군의 뇌에서 더 적은 반응성 별아교세포와 미세아교세포가 관찰되었고, 더 많은 미엘린수초가 보존되어 있음을 확인한 결과이다.

도 37 내지 도 38은 뇌전증(Epilepsy) 모델을 유도 후 iNSC 세포 주입하고 몇 가지 동물행동실험을 통해 뇌전증 개선 여부를 분석하기 위한 실험 모식도 및 실험 과정을 설명한 것이고, 도 39는 뇌전증 모델을 유도하기 위하여 사용한 제품을 나타낸 것이다.

도 40은 뇌전증 모델에서 신경줄기세포 주입 시, 공간 인지력 평가를 위한 T-maze 실험 결과이다.

도 41은 뇌전증 모델에서 신경줄기세포 주입 시, 주의 집중력 평가를 위한 Novel Object Recognition 실험을 진행한 결과를 나타낸 것이다.

도 42 내지 도 43은 뇌전증 모델에서 신경 줄기세포를 이식한 경우, paracrine effect에 의해 소실된 세포의 재생 효과를 확인한 결과이다.

도 44는 뇌전증으로 인해 세포 소실이 발생하여 비정상적으로 성상교세포(astrocyte) 개수가 증가하게 되는 astrogliosis가 세포 주입으로 인해 정상 개수로 줄어들게 된 결과를 확인한 것이다.

도 45는 뇌전증으로 인해 세포 소실이 발생하여 면역세포가 증가함을 microglia 세포 개수를 측정하여 비교한 결과이다.

도 46은 뇌전증 모델에 신경 줄기세포를 투여한 후 사이토카인 분비량의 변화를 분석하기 위한 RT-qPCR 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0039] <실험예 1> 섬유아세포로부터 신경줄기세포의 직접 교차 분화

[0040] 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 유도하기 위해, 인간 태아 섬유아세포 1×10^5 개를 60mm dish에 준비하고, 리프로그래밍과 관련된 8종의 소분자 화합물(티아조바이빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep) 및 센다이바이러스(OSKM, cytotune-ips 2.0 sendai reprogramming kit)를 DMEM/F12, N2 supplement, B27 supplement, bFGF 및 EGF로 구성된 neurobasal medium에 첨가하여 준비된 세포를 배양하였다.

[0041] 19일 동안 상기 배지에서 분화를 유도하였으며 이후 2~3일 마다 배양액을 바꿔주면서 섬유아세포가 신경줄기세포로 분화하는 과정을 도 2와 같이 확인하였다. 도 2에서 보듯이 배양 후 13일차에서 작은 신경 줄기세포 모양의 세포들이 관찰되었으며, 15일차에 신경 줄기세포의 콜로니를 확인하였고, 19일차에는 신경 줄기세포의 단일 콜로니를 확보할 수 있을 만큼 콜로니가 확인되었다.

[0043] <실시예 1> 헌팅턴병 모델에 대한 신경 줄기세포 투여 효과

[0044] **1-1. 퀴놀릭산으로 유도된 헌팅턴병 모델에서의 신경줄기세포 투여 효과**

[0045] 마우스를 대상으로 헌팅턴병 동물 모델을 제작하였다. 먼저 독성 물질인 퀴놀릭산(Quinolinic acid)를 뇌 내 직접 주입하여 신경세포 사멸을 유도한 동물 모델을 제작하였다. 상기 퀴놀릭산은 신경세포내에 NMDA Receptors를 활성화시켜 신경세포를 산화를 통해 헌팅턴병과 유사한 신경 세포 사멸을 유도한다. 상기 과정을 도 1에 나타내었다. 신경줄기세포 치료제를 병변 부위에 1×10^6 cell/ head로 이식 한 후, Rotarod, Balanced beam test, Apo-morphin induced rotation test를 실시하였다. 그 결과, 세포 이식 후 2주부터 운동 기능이 회복됨을 관찰할 수 있었다. (도 2)

[0046] 또한 적절한 투여량에 대한 분석을 위하여 dose test를 진행하였다. 각 그룹별로 1×10^3 cell, 1×10^4 cell, 1×10^5 cell을 뇌 내에 직접 투여하고, 아포모르핀 유도 회전 테스트, 로타로드 테스트, 악력 테스트를 각각 진행하였으며, 세포이식 후 6주정도부터 1×10^4 cell 이상 투여군에서 신경줄기세포 투여에 의한 운동기능 회복 효능을 보였으며, 가장 운동 기능 회복 효능이 뛰어난 group은 1×10^5 cell 투여군으로 확인되었다(도 3).

[0048] **1-2. 돌연변이 헌팅턴 유전자의 형질 전환에 의한 헌팅턴병 모델에서의 신경 줄기세포 주입에 따른 효과**

[0049] 헌팅턴병의 원인이 되는 돌연변이 HTT 유전자를 마우스에 형질전환하여, 헌팅턴병 동물 모델을 제작하였다 (Trangenic mice R6/2 mice).

[0050] 상기 동물 모델에 실험에 1의 신경줄기세포를 이식하고 운동 기능회복 효과를 확인하였다 (도 4). 상기 모델을 이용하여, 몸의 수축 정도와 운동기능 이상 여부를 클래핑 테스트를 통해 확인하였으며, 신경줄기세포 이식 후 4주 후부터 기능 회복 효과를 확인할 수 있었다. 또한 로타로드 시험, 악력 시험에서도 운동기능의 회복 효과를 확인할 수 있었으며, 신경줄기세포를 이식한 군은 대조군에 비해 체중 감소가 줄어들고, 생존 수명이 연장되는 효과가 있음을 확인하였다(도 5).

[0051] 또한, 상기 Trangenic mice R6/2 마우스에 대한 신경줄기세포 투여군 및 대조군의 뇌 조직을 각각 분석하여, 신경 보호물질의 또는 이의 전달 물질 유전자인 GDNF, BDNF, GABA 유전자의 발현률을 조사한 결과, 이들의 발현이 증가되었으며, ELISA 분석을 통해 확인한 결과, GABA의 분비량이 증가된 것을 알 수 있었다. 또한, 조직 염색을 통하여 이식된 신경 줄기세포의 생존 및 신경 세포로의 정상적인 분화 여부도 확인하였다. (도 6)

[0052] **1-3. 독성 평가**

[0053] 면역력이 결핍된 scid mice를 이용하여 신경줄기세포 이식후 독성시험, 종양원성시험, 분포 시험을 각각 진행하였다. 독성시험 및 종양 원성시험결과, 도 7에서 보듯이 본 발명의 신경줄기세포의 투여가 안전하다는 것이 증명되었으며, 분포시험결과 투여된 신경줄기세포가 투여부위인 뇌내에만 존재하며, 다른 장기로 이동하지 않는다는 것을 증명하였다(도 7).

[0055] **<실시예 2> 뇌졸중 모델에 대한 신경 줄기세포 투여 효과**

[0056] **2-1. 뇌졸중 모델에서 신경줄기세포 투여 시 운동 능력 회복 효과**

[0057] MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델을 이용하여 4주간 정맥 또는 척수강 내로 실험에 1의 신경 줄기세포를 투여하여, 운동능력 회복을 관찰하였다. mNSS test는 실험동물의 신경학적 행동지수를 측정하는 실험으로 운동능력, 감각기능, 평형 유지력 등을 종합적으로 평가하여 점수화하는 것으로, 상기 본 발명의 신경 줄기세포 투여에 의해 상기 점수가 개선되는 것을 확인하였다. 또한 로타로드 시험 결과에서도, 신경 줄기세포 투여에 의해 운동능력이 보다 개선되는 점을 확인할 수 있었다. (도 8)

[0058] **2-2. 뇌졸중 모델에서 신경줄기세포 투여 시 내인성 신경 재생 효과**

[0059] MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 뇌졸중 모델에 대하여, 상기 2-1과 같이 정맥 및 척수강을 통한 신경줄기세포의 투여를 통해, 내인성 신경 재생 효과가 있음을 확인하였다. 상기 모델에 대하여, 증식세포의 표지로 이용되는 BrdU와 미성숙 뉴런 마커인 DCX를 이용해 뇌 내측 뇌질을 염색하여 확인한 결과, 정맥 투여 그룹과 뇌척수강 투여 그룹 모두에서 내인성 신경 재생이 촉진되었음을 확인할 수 있었다. (도 9)

[0060] **2-3. 뇌졸중 모델에서 뇌경색 부위의 회복 및 세포 사멸 개선 효과**

- [0061] MCAO 뇌졸중 모델링 후 28일째에 마우스를 희생시킨 뒤, 뇌경색 부위의 손상된 면적을 측정하였다. 그 결과, 정맥 투여군과 척수강 투여군 모두에서 신경줄기세포를 이식했을 때 대조군에 비해 경색 부피가 유의하게 감소하는 것을 확인했다. 정량적으로 면적을 계산한 결과, 경색 면적의 크기가 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 허혈성 뇌졸중으로 인한 뇌경색 병변 부위가 신경줄기세포의 이식에 의해 회복되었음을 보여주는 것이다. (도 10)
- [0062] 또한 신경줄기세포 투여에 의해 병변 부위의 세포 사멸의 변화를 확인하였다. TUNEL 염색을 통해 세포 사멸이 일어나는 세포의 양을 확인하였다. 그 결과, 정맥 및 척수강으로 신경줄기세포를 투여한 군에서 모두 TUNEL 양성 세포가 통계적으로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 신경 줄기세포의 이식을 통해 쥐 뇌의 세포 사멸을 개선하는 효과를 가짐을 알 수 있었고, 이와 같은 변화는 뇌졸중 회복에 중요한 영향을 미칠 수 있다. (도 11)
- [0063] 또한 조직 내 염증 반응의 변화를 조사하기 위하여 사이토카인 분비량을 mRNA 수준에서 확인하였다. 뇌 조직에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 전 염증성 사이토카인과 TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13과 같은 항염증성 사이토카인의 mRNA 수치 변화를 확인한 결과, 정맥 투여 그룹의 경우 전 염증성 사이토카인은 감소하고 항 염증성 사이토카인은 증가하였으며, 이는 염증 반응이 감소했음을 시사하는 결과이다. (도 12)
- [0065] <실시예 3> 알츠하이머 모델에 대한 신경 줄기세포 투여 효과
- [0066] 3-1. 알츠하이머 모델에서 신경줄기세포 투여 시 치매 원인 물질 생성에 대한 효과
- [0067] 알츠하이머 병 (Alzheimer's disease) 모델 마우스인 5xFAD에 신경 줄기세포를 이식하여 그 효과를 확인하였다. 5xFAD 마우스는 3개월부터 치매 원인 물질인 베타 아밀로이드가 생성되며 6개월 됐을 때 뇌 전체적으로 아밀로이드가 축적되므로 뉴런 소실이 시작되어 인지능력이 저하되기 때문에 이때부터 신경줄기세포를 이식하였다. 마우스 뇌의 양 쪽 해마(hippocampus)에 각각 1×10^6 개씩 이식하였다. 이식 후 1개월 후 동물 행동검사인 Morris water maze, T-maze, Open field test, Novel Object Recognition을 진행하여 행동 및 인지 기능이 개선되었는지 확인하였다. 이후 10개월 때, 5xFAD 뇌를 적출하여 치매 원인 물질인 베타 아밀로이드가 감소 및 신경줄기세포 이식으로 인해 면역 억제 및 신경재생 유무를 확인하였다. (도 13)
- [0068] 5xFAD 마우스 뇌 내 해마에 이식한 신경줄기세포가 잘 정착되었는지 확인하기 위하여 면역조직화학 (Immunohistochemistry, IHC) 실험을 진행했다. 마우스 세포의 핵을 염색하는 Hoechst antibody와 인간 신경줄기세포를 염색하는 hNU antibody를 이용한 결과, 도 14와 같이 5xFAD 뇌 내 해마에 신경줄기세포가 정착되었음을 확인하였다.
- [0069] 또한 마우스 뇌에서 베타아밀로이드의 침착 개수를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 도 15는 마우스 뇌의 대뇌피질(Cortex)에, 도 16은 해마(Hippocampus)에 치매 원인 물질인 베타 아밀로이드 침착 개수를 신경줄기세포 (iNSC)를 이식한 그룹과 HBSS를 이식한 그룹을 비교하는 실험 결과이다. 세포의 핵을 염색하는 Hoechst antibody와 베타 아밀로이드를 염색하는 6E10 antibody를 이용하여 IHC 실험을 진행했다. 대뇌 피질 부분에 베타아밀로이드가 뭉쳐 생긴 플라크(plaque)의 비율을 분석해본 결과, 대뇌 피질 및 해마 모두에서 HBSS 그룹에 비해 iNSC 그룹에서 유의성있게 플라크가 줄어들었음을 확인했으며 면적 당 플라크 개수 또한 iNSC 그룹에서 유의성있게 줄어들었음을 확인하였다.
- [0070] 또한 대뇌 피질 및 해마의 단백질을 추출하여 웨스턴블롯을 수행하였다. 알츠하이머의 원인으로 알려진 베타 아밀로이드 단백질의 생성을 차단하는 BACE1 (Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme1) 항체를 사용하여 줄기세포투여군, HBSS투여군, 그리고 대조군간의 단백질량을 분석한 결과, 신경줄기세포 투여군의 대뇌 피질에서는 BACE1 양의 유의한 차이가 없었으나, 해마에서는 줄기세포투여군, HBSS투여군간의 유의성 있는 BACE1 양의 차이를 보여줌을 확인하였다. (도 17) 또한, 베타 아밀로이드의 모체가 되는 단백질인 Amyloid Precursor Protein (APP), 베타 아밀로이드 생성 원인 물질인 β 효소에 의해 APP가 잘려 생긴 말단인 C-terminal fragment β (CTF β), 그리고 일반적으로 생성되는 α 효소에 의해 APP가 잘려 생긴 C-terminal fragment α (CTF α)의 발현량을 확인한 결과, 전체 APP 양에는 유의한 변화가 없었으나, 베타 아밀로이드 생성 원인 말단물질인 CTF β 는 HBSS 투여군보다 신경줄기세포 투여군에서 유의하게 감소된 점을 확인하였다. (도 18)
- [0071] 또한 베타 아밀로이드의 독성에 의해 증가하는 성상교세포(Astrocyte)와 미세아교세포(Micoglia cell)가 주입

한 신경줄기세포에 의해 정상적인 분포도를 이루는지 알아보기 위해 IHC실험을 진행했다. 5xFAD 마우스와 HBSS 투여 마우스의 피질(Cortex)과 해마(Hippocampus)에서의 분포도를 확인한 결과 HBSS 투여군보다 신경줄기세포 투여군에서 성상교세포와 미세아교세포 분포가 현저히 감소된 것을 확인했다. (도 19)

[0073] 3-2. 알츠하이머 모델에서 신경줄기세포 투여 시 행동 분석 및 인지력에 대한 효과

[0074] 5xFAD에 대한 신경 줄기세포 투여 시, 행동 분석 및 인지력에 미치는 영향을 확인하기 위하여 동물행동분석 실험 중 공간학습 및 인지력을 평가하는 Morris Water Maze 실험을 진행했다. 신경줄기세포 이식 1개월 후, 5일 동안 platform에 5xFAD 및 대조군 마우스가 1분 안에 얼마나 빨리 도착하는지 분석한 결과, HBSS 투여군 대비 신경줄기세포 투여군이 인지 기능이 개선되었음을 확인할 수 있었다. 또한 이식 3개월 후에도 신경줄기세포 투여군이 HBSS 투여군보다 인지 기능이 개선되었으며 대조군 만큼 정상적으로 돌아왔음을 확인하였다. (도 20)

[0075] 또한 상기 실험의 마지막 6일차 때, 플랫폼을 제거하고 1분간 어느 Zone에 오래 머물러 있는지 실험을 진행하였다. 인지기능이 개선 되었다면 플랫폼이 위치했던 Zone3에 오래 머무를 것이다. 분석 결과, 이식 1개월 그리고 3개월 후에, 신경줄기세포 투여군이 Zone3에 HBSS 투여군보다 더 오래 머무른 것을 알 수 있다. Morris Water Maze 실험 결과, 신경줄기세포 투여군이 Zone3에 HBSS 투여군보다 그룹보다 인지기능이 개선되었으며 WT그룹과 비슷함을 알 수 있다. (도 21)

[0076] 또한, 주의 집중력 평가를 위한 Novel Object Recognition 실험을 진행하였다. 총 3일 동안 진행하며 첫 날은 5분 동안 habituation을 진행하며 두번째 날에는 10분 동안 똑같은 물체를 놓고 탐색하게 한다. 마지막 날에는 2개의 동일한 물체 중 하나만 다른 물체를 교체하여 10분 동안 탐색하게 했을 때, 다른 물체를 얼마나 탐색하는지 기록한다. 모든 물체를 탐색하는 총 시간은 모든 실험군에서 유사하였다. 하지만 discrimination ratio 값을 보면 신경줄기세포 투여군과 대조군은 0 보다 높은 양수 값을 가진다. Discrimination ratio 값이 양수 값이면 다른 물체를 더 오래 탐색했다는 뜻이며, 음의 값은 다른 물체를 인식하지 못하고 같은 물체를 더 오래 탐색했다는 뜻이다. 실험 결과 신경 줄기세포를 이식한 그룹이 주의 집중력이 높아졌다는 결과를 확인하였다.

[0077] 또한 공간 인지력을 평가하기 위하여 T-maze 실험을 진행하였다. 양쪽에 먹이를 두고 양쪽 중 한 곳에 탐색하면 60초 동안 그 곳을 탐색하게 한다. 이후 다시 출발점에 위치시켰을 때 어느 쪽으로 탐색하려 하는지 관찰한다. 마우스는 새로운 곳을 탐색하려는 본능을 가지고 있기 때문에 처음 탐색했던 곳과는 반대로 가려고 한다. 하지만 알츠하이머 치매 마우스는 기억력이 소실되기 때문에 같은 곳을 가는 확률이 높다. 실험 결과 HBSS 투여군보다 신경줄기세포 투여군에서 새로운 곳을 탐색하는 비율이 유의성 있게 높게 나왔음을 확인했고 이 결과 신경줄기세포의 투여군에서 공간인지력이 개선되었음을 확인하였다.(도 23)

[0078] 또한 자발적 운동성 평가를 보기 위한 Open Field Test 실험을 진행했다. 치매 마우스는 움직임이 덜하고 활동적이지 않으며 신경줄기세포 투여군 및 대조군에서는 운동성이 증가됨을 확인했다. 그룹당 이동거리 및 가장자리 대비 가운데 이동 거리가 HBSS 투여군 대비 신경줄기세포 투여군에서 유의성있게 증가됨을 확인했다. (도 24)

[0080] 3-3. 알츠하이머 모델에서 신경줄기세포 투여 시 사이토카인 분비량 및 신경영양인자 발현량에 대한 효과

[0081] 사이토카인 및 케모카인의 양을 RNA 측면에서 분석하기 위해 RT-qPCR 실험을 진행했다. 신경줄기세포를 이식한 해마에서는 IL1 β , CCL2, 그리고 CXCL10 유전자 발현이 유의적으로 감소됨을 확인했으며 대뇌 피질에서는 CCL2 유전자가 유의성있게 감소하였다. (도 25)

[0082] 또한 면역(염증)인자 및 신경영양인자(neurotrophic factor) 양을 RNA 측면에서 분석하기 위해 RT-qPCR 실험을 진행했다. 면역과 관련된 유전자인 IBA-1, GFAP 유전자의 경우, 대뇌 피질 및 해마에서 모두 유의적으로 발현되었으며, 신경줄기세포에서 분비되는 신경영양인자 유전자인 GAP43, TUJ1, 그리고 MAP2 에서는 신경줄기세포를 이식한 해마에서 HBSS 투여군에 비해 증가함을 알 수 있다. (도 26)

[0083] 또한 노화(Anti-aging) 및 희소돌기아교세포 생성 (Oligodendrogenesis) 양을 RNA 측면에서 분석하기 위해 RT-qPCR 실험을 진행했다. 노화 관련 유전자 (COL1A1, COL4A1)는 COL1A1의 경우, 피질 및 해마에서 유의성 있게 감소했으며, 희소돌기아교세포 생성과 관련된 유전자 (FGF17, OLIG2, PDGFR α , NG2)의 발현량은 해마 부분에서 유의성있게 증가했다. (도 27)

[0084] **3-4. 알츠하이머 모델의 RNA 시퀀싱**

[0085] 상기 알츠하이머 모델의 신경줄기세포 투여군, HBSS투여군 및 대조군에서 각각 반구(hemi-sphere)를 적출하여 RNA-sequencing 실험을 진행했다. 분석 결과 전체 23183 유전자가 분석되었으며 이 중 유의성있는 유전자를 도출하기 위해 Fold change=1.5, Normalized Data=2.0, P-value=0.5 조건을 적용하였다. 결과 737개 유전자가 나왔지만 신경줄기세포 투여군, HBSS투여군의 발현량에 유의한 차이가 확인되지 않았다.

[0086] 이후 737개 유전자에서도 신경줄기세포 투여군 및 대조군의 유전자 발현이 동일하고, HBSS 투여군에서는 반대인 유전자를 따로 선정하여 119개의 유전자를 도출하였으며 이 유전자에 대한 히트맵을 작성했다. (도 28)

[0087] 상기 유전자들 대하여, 다양한 데이터 베이스를 기반으로 유전자의 상관관계를 통계적으로 분석하여 상기 119개 유전자의 주요 기능을 예측하기 위한 DAVID 분석을 진행했다. P 값은 0.05 이하로 분석한 결과, 다음과 같은 유전자 기능들이 나왔다. 신경줄기세포를 주입한 그룹들에서 HBSS 투여군보다 세포 활성화 및 전사 (RNA splicing, mRNA processing)활성이 증가했으며, 치매 원인 중 하나인 과인산화 반응이 억제되는 것을 알 수 있다. (도 29)

[0088] 또한 신경재생(Neurogenesis)과 관련 있는 유전자 13개의 히트맵 작성 결과 신경줄기세포 투여군, 대조군간의 유전자 발현 정도가 비슷한 것을 알 수 있다 (도 30).

[0089] 상기 신경재생(Neurogenesis)과 관련 있는 유전자 13개의 상관관계를 분석하기 위해 DAVID를 진행했다. 결과, 신경계 발달과 신경 발달과 관련된 유전자가 가장 많이 관련 있음을 알 수 있다. 세포 주입으로 인해 파괴된 신경세포들을 재생시킴으로써 기억력 증진의 효과를 보인 것을 알 수 있다. (도 31)

[0090] **<실시예 4> EAE(다발성 경화증) 모델에 대한 신경 줄기세포 투여 효과**

[0091] EAE(experimental autoimmune encephalomyelitis, 다발성 경화증) 모델을 만들어 8주간 신경줄기세포 투여에 따른 운동능력 회복, 중추신경계 내 염증 감소 탈 수초화의 감소를 확인했다.

[0092] EAE clinical scoring은 EAE 모델 동물의 운동능력의 상실 및 마비가 단계적으로 나타나는 것을 기반으로 이러한 단계별 증상에 점수를 부여함으로써 질병의 정도를 수치화한 것이다. 신경줄기세포를 투여한 그룹에서 운동능력의 개선효과를 보였고 4주차에 효과가 가장 뚜렷하게 나타났다. (도 32)

[0093] 또한, EAE 마우스 모델에서 신경줄기세포 투여로 인한 면역반응의 감소로 반응성 별아교세포의 변화를 확인하기 위하여, EAE 마우스 모델 척수를 반응성 별아교세포의 마커인 GFAP를 이용해 염색하여 확인하였다. 그 결과, 신경줄기세포 투여군에서 더 적은 반응성 별아교세포가 관찰되었고 척수 내 mRNA 발현에서도 GFAP의 발현양이 감소된 것을 알 수 있었다. (도 33)

[0094] 또한, 미세아교세포의 변화를 분석하기 위한 실험을 진행하였다. 미세아교세포는 중추신경계에서 면역세포의 역할을 담당하고 있으며, 면역반응이 유도되면 증식하고 세포가 두껍게 부풀어 오르는 특징을 보인다. 미세아교세포 마커인 Iba1을 이용해 EAE 마우스 모델 척수를 염색하였으며, 신경줄기세포 투여군에서 더 적은 미세아교세포가 관찰되었고 척수 내 mRNA 발현에서도 Iba1의 발현양이 감소된 것을 알 수 있었다. (도 34)

[0095] EAE 마우스 모델에서 다양한 염색 및 mRNA 발현분석을 통해 척수 내에서 면역반응의 강도와 희소돌기아교세포 소실 정도를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. H&E 염색 결과 신경줄기세포 투여군에서는 더 낮은 수준의 면역반응이 관찰되었으며, Luxol fast blue(LFB) 염색 결과에서는 신경줄기세포 투여군에서 미엘린수초가 더 보존되어 있음을 확인했다. (도 35)

[0096] 아울러, 도 36은 신경줄기세포 투여군의 뇌에서 더 적은 반응성 별아교세포와 미세아교세포가 관찰되었고, 더 많은 미엘린수초가 보존되어 있다는 것을 보여주는 결과로서, 미엘린수초 마커인 MBP와 미세아교세포의 마커인 Iba1을 이용해 EAE 마우스 모델 뇌를 분석한 경우, 신경줄기세포 투여군에서 더 낮은 수의 미세아교세포가 관찰되었으며, 미엘린수초가 더 많이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[0097] **<실시예 5> 뇌전증 모델에 대한 신경 줄기세포 투여 효과**

[0098] **5-1. 뇌전증 마우스모델의 제작 및 실험 설계**

[0099] 도 37은, 뇌전증(Epilepsy) 모델을 유도 후 신경줄기세포를 주입하고 동물행동실험을 통해 뇌전증 개선 여부를 분석하기 위한 전체 실험 계획이다.

[0100] 뇌전증 모델 유도는 필로카르핀을 복강내 주사로 진행했으며 Racine scale로 뇌전증 점수를 측정해 상태를 파악했다. 세포 이식은 해마에 1×10^6 개를 이식했으며, 동물행동분석은 인지기능을 검사할 수 있는 T-maze, Novel

object recognition 실험을 진행했다. 이후 조직 분석을 통해 뇌전증 개선 유무를 파악하였다. (도 38)

[0101] 도 39는 뇌전증 모델을 유도하기 위해 사용한 제품들이다. N-메틸스코폴라민은 필로카르핀을 주입하기 30분 전에 주입하여 말초 부작용을 최소화하였고, 필로카르핀을 주입하여 뇌전증 유도를 시작하였다. 뇌전증 유도 후 행동 분석을 통해 뇌전증 점수를 racine scale 토대로 측정 하였다.

[0103] 5-2. 뇌전증 마우스모델의 신경 유도세포 투여에 의한 개선 효과

[0104] 뇌전증 마우스모델에 본 발명의 신경유도세포를 투여하고, 공간 인지력을 평가하는 T-maze 실험을 진행했다. 그 결과, 대조군과 비교했을 때 뇌전증을 유발한 군에서 단기 기억 인지 기능이 소실되었다. 하지만 신경줄기세포를 이식한 군에서는 단기기억이 개선되어 대조군과 비슷함을 보였다. (도 40)

[0105] 또한 집중력 평가를 위한 Novel Objection Recognition 실험을 진행하였다. 뇌전증 유발 모델에서 대조군과 비교했을 때 새로운 물체를 탐색하는 능력이 현저히 떨어짐을 알 수 있다. 하지만 신경줄기세포를 이식한 군에서는 세포를 이식함으로써 대조군과 비교했을 때 새로운 물체를 탐색하는 능력이 향상되었음을 알 수 있다. (도 41)

[0106] 도 42 내지 도 45는 뇌전증에 의해 소실된 세포의 재생 효과를 확인한 결과들이다. 뇌전증 유발 마우스모델에서, 신경줄기세포를 이식한 위치에 파라크린 효과에 의해 소실된 세포의 재생효과가 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과, 뇌전증 모델은 신경줄기세포를 투여한 군에 비하여 상기 세포가 미성숙 초기 뉴런으로 분화되었음을 TUJ1 antibod를 이용하여 확인하였다. 이는 정량적 분석을 통해서도 확인할 수 있었다. (도 42)

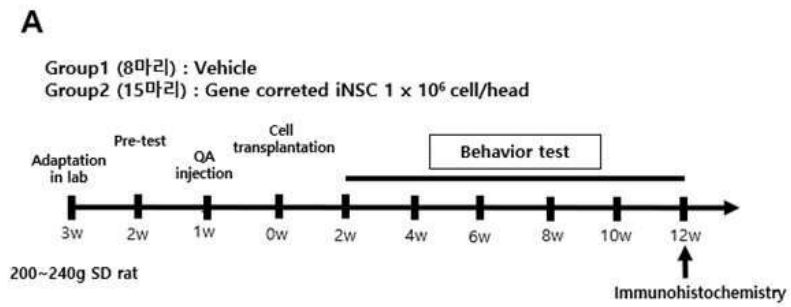
[0107] 또한 뇌전증으로 인해 발생된 세포 소실이 신경줄기세포의 이식으로 인해 재생되었음을 확인하는 실험을 진행하였다(도 43). 해마의 CA1 부분을 제외하고 CA3와 DG 위치를 대조군과 비교했을 때 세포 개수가 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 또한, 뇌전증으로 인해 세포 소실이 발생하여 비정상적으로 성상교세포(astrocyte) 개수가 증가하게 되는 astrogliosis가 세포 주입으로 인해 정상적인 개수로 줄어드는지 실험을 진행하였으며, 뇌전증 유발 시 성상교세포의 개수가 증가되었지만, 신경줄기세포의 투여군에서는 성상교세포의 수가 유의 성있게 감소하였음을 확인하였다. (도 44) 또한 뇌전증으로 인한 면역세포 증가 여부를 소교세포(microglia) 세포의 수를 측정하여 확인하였다. 뇌전증 그룹과 대조군을 비교하면 소교세포의 차이가 많지만, 신경줄기세포를 주입한 그룹에서는 그 차이가 크지 않음을 확인하였다.

[0108] 또한 뇌전증 유발 시 사이토카인의 분비량을 RNA 측면에서 분석하기 위해 RT-qPCR 실험을 진행했다. Pro-inflammation인 IL-1 β 에서 mRNA 변화를 분석할 결과 iNSC 그룹이 HBSS 그룹에 비해 감소됨을 확인했고 anti-inflammatory인 IL-6에서는 증가함을 확인했다.

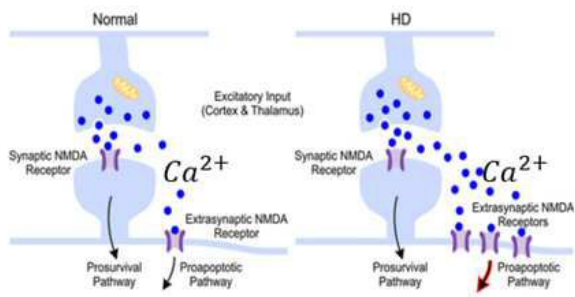
[0110] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

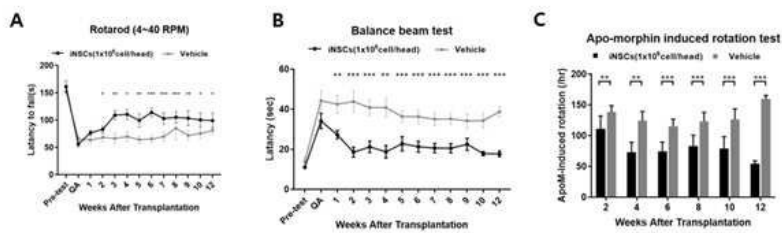
도면1



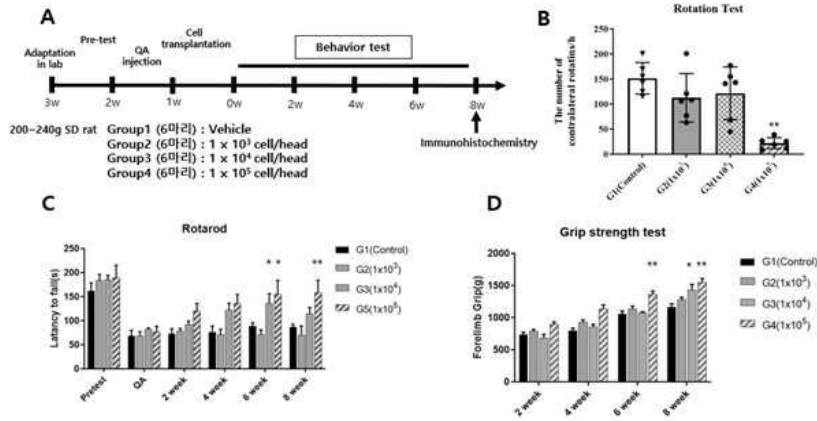
B. QA 모델 유도



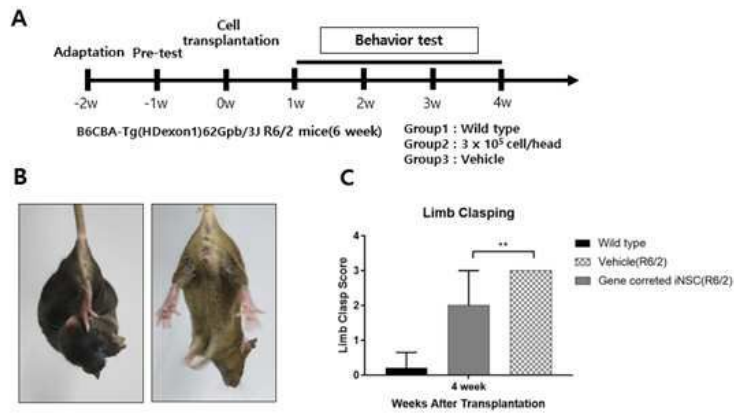
도면2



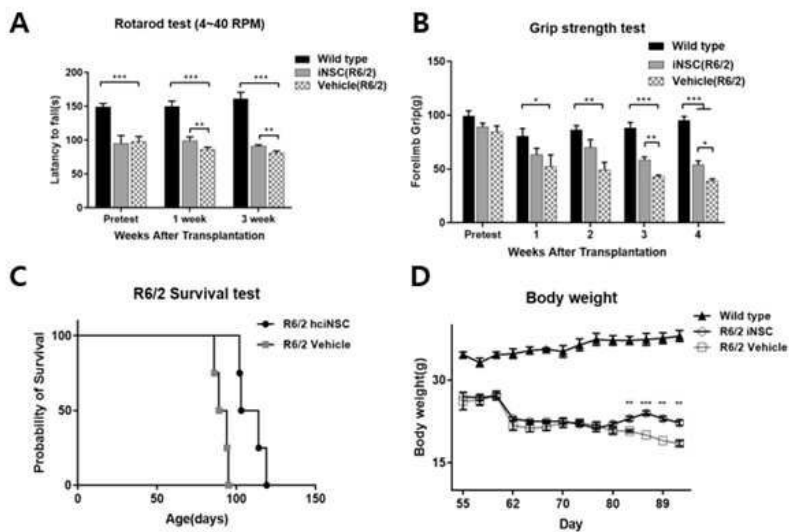
도면3



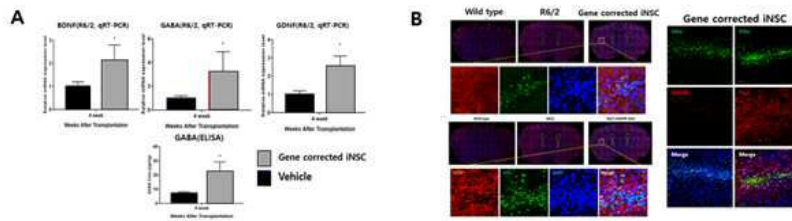
도면4



도면5



도면6



도면7

단회 투여 독성시험(13주)

종양형성시험(26주)

Major histopathological changes
(G1 ~ G4)

Group	G1	G2	G3	G4
Dose (cells/head)	0	3x10 ⁵	7x10 ⁵	1x10 ⁶
No. Animals examined	20	20	20	20
Brain	개체수			
Dilation, ventricle	(Minimal)			
	(Mid)			
Cell mass formation	(Minimal)			
	(Mid)			
Metaplasia	(Minimal)			
	(Mid)			

→ 뇌실확장, 염종(화생) 등 이 소수에서 발견되었지만, 임상학적 행동증상에는 모두 영향을 주지 않았음.

종양형성 개체(%)

G1: HBSS(N.C) 0 %

G2: U87-MGP(C) 100%

G3: INSC 0%

Death rate

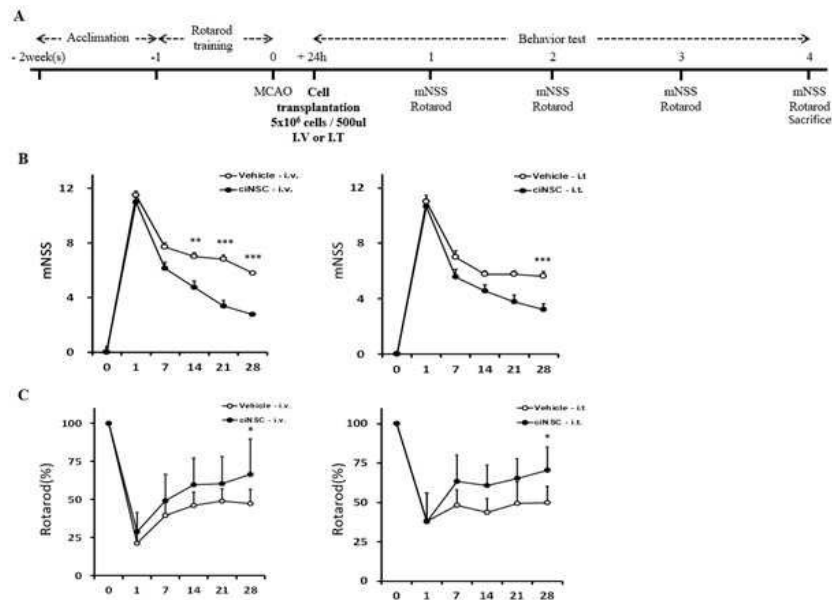
Sex	Male	Female	Death rate
G1(N.C) (HBSS)	0/10	0/10	0/20 (0 %)
G2(P.C) (Tumor cells)	10/10	10/10	20/20 (100 %)
G3(실혈군) (NSCs)	0/10	0/10	0/20 (0 %)

→ INSC 투여군에서 종양이 형성된 개체 및 사망한 개체는 없었음.
→ 독성을 나타내는 개체도 대부분 사라짐.

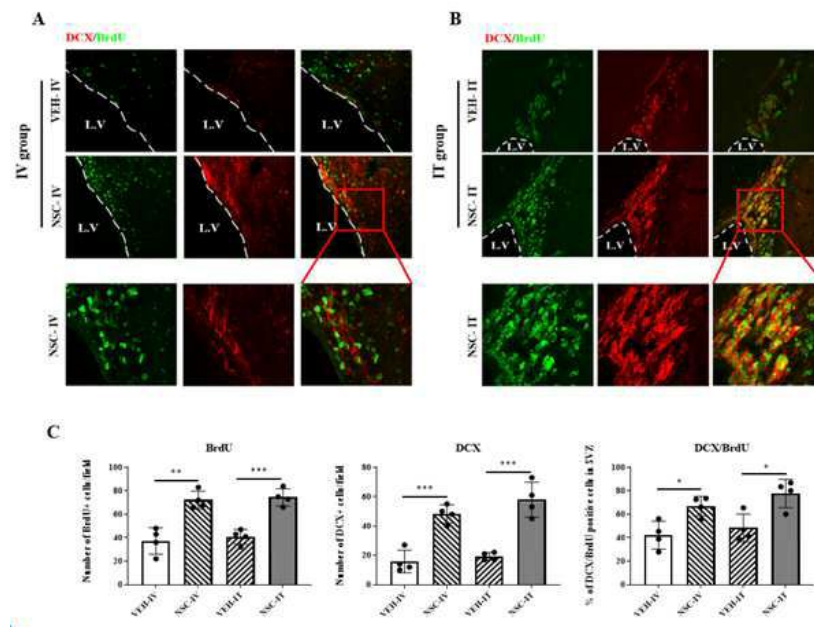
분포시험

7x10⁵ cell/head로 마우스 뇌내에 신경줄기세포 투여 후, 6시간~8주 까지 투여된 신경줄기세포가 마우스 뇌 내에만 존재함을 확인 함.
(뇌 내에만 존재하므로 유전독성 및 타 장기에서의 종양형성 등의 위험이 없음.)

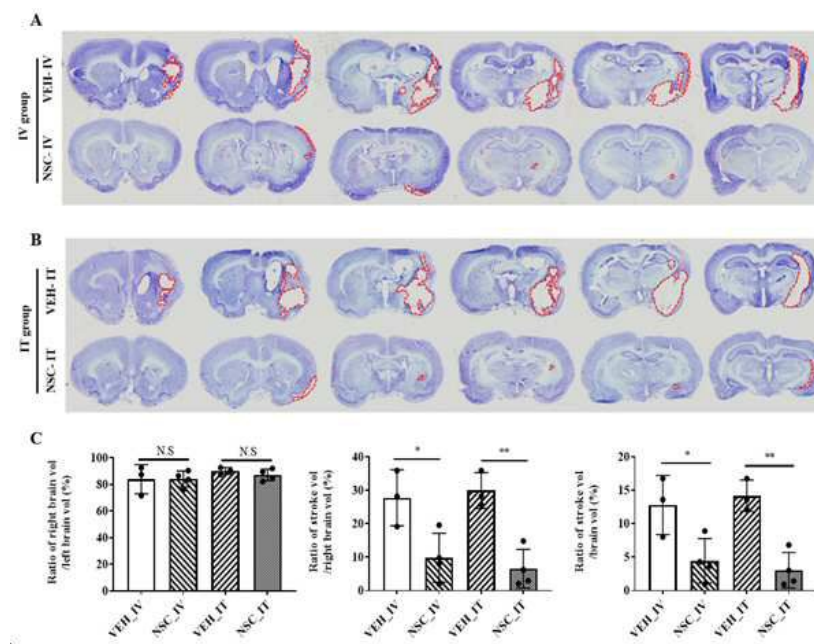
도면8



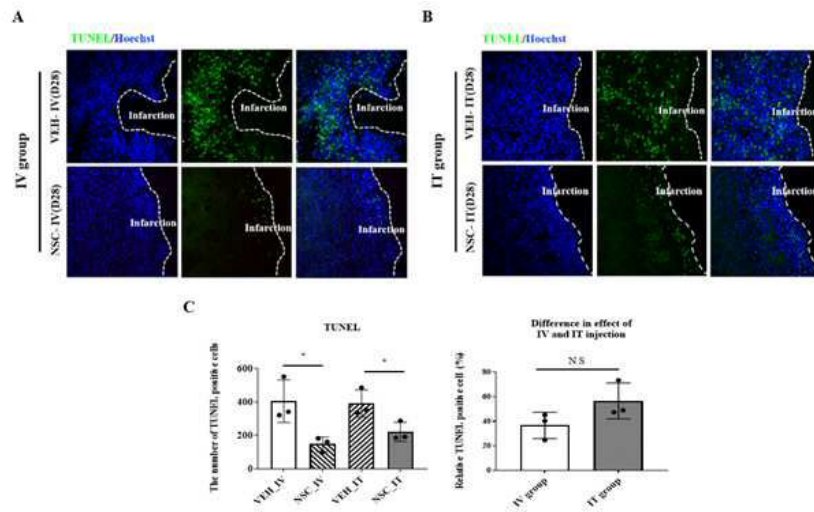
도면9



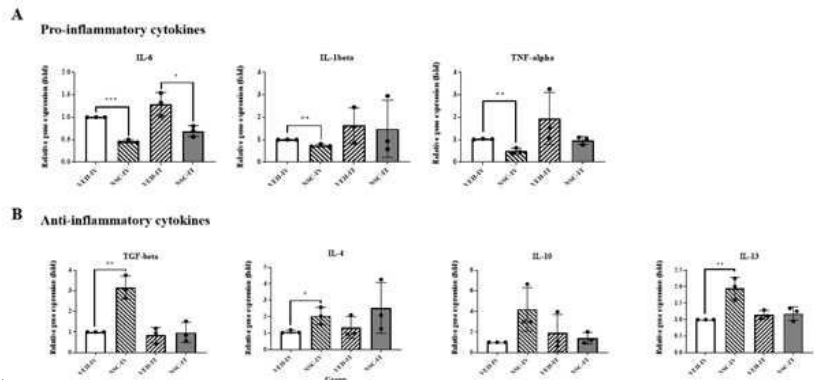
도면10



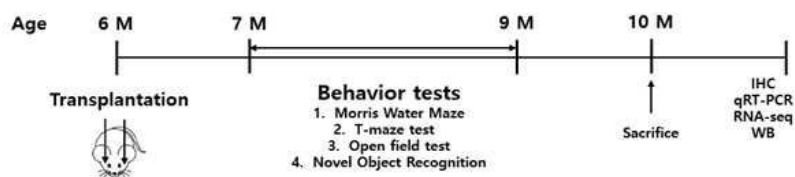
도면11



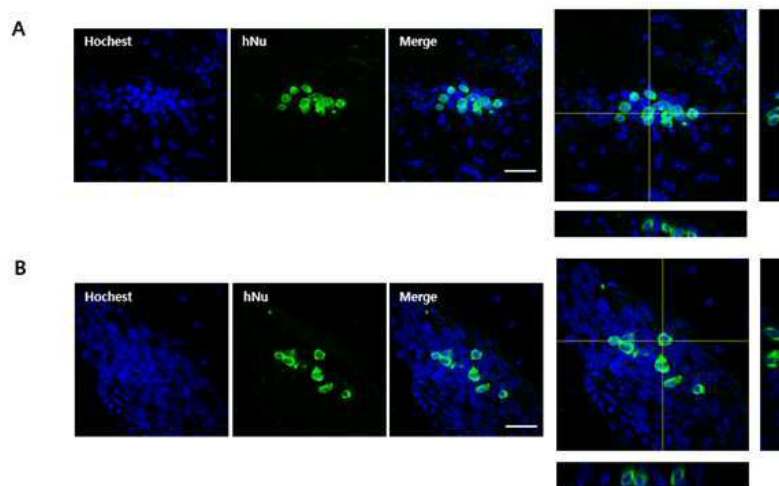
도면12



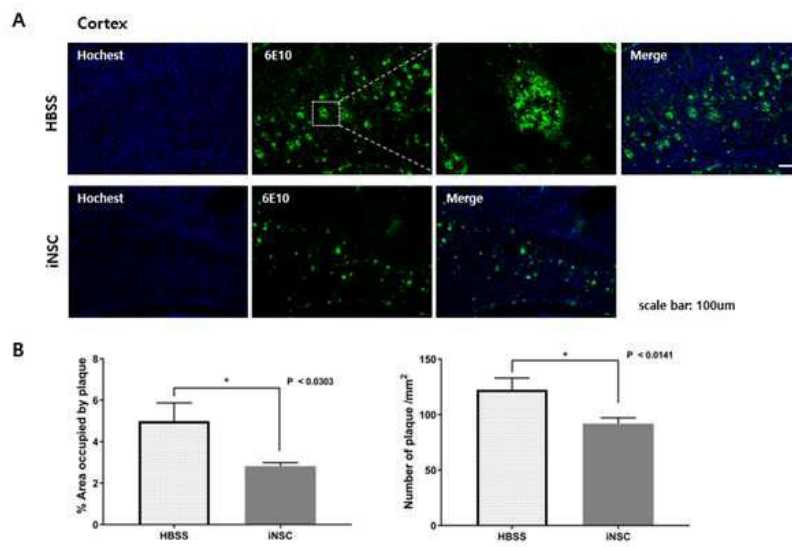
도면13



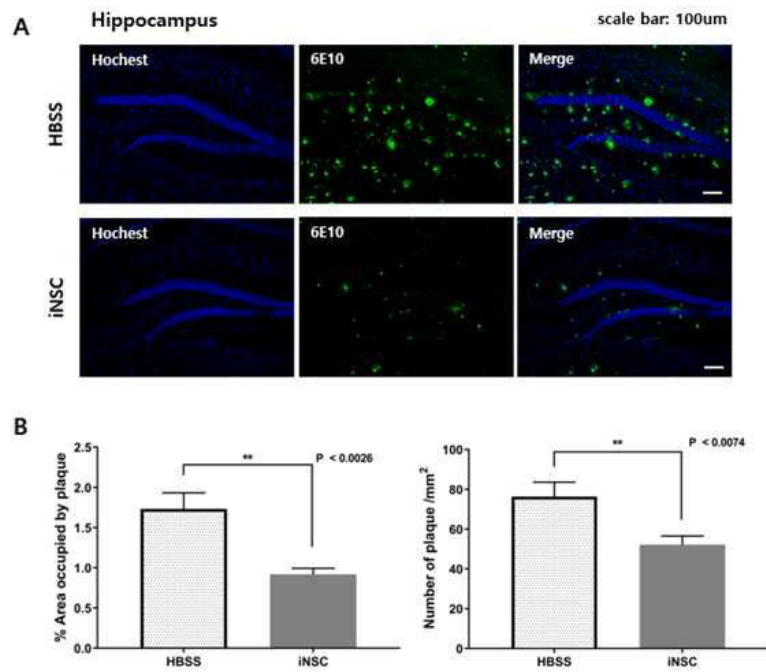
도면14



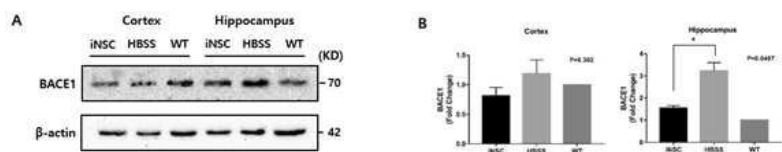
도면15



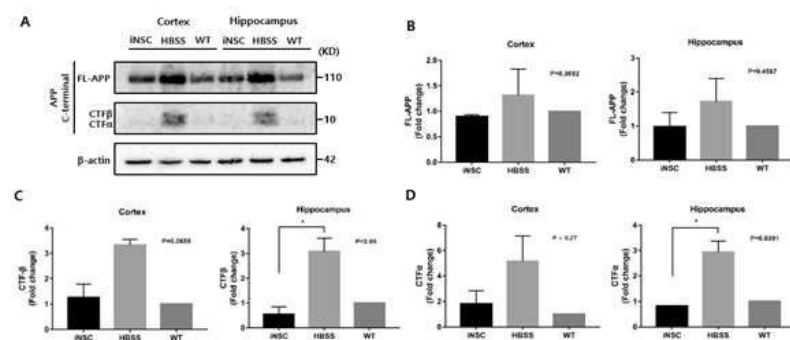
도면16



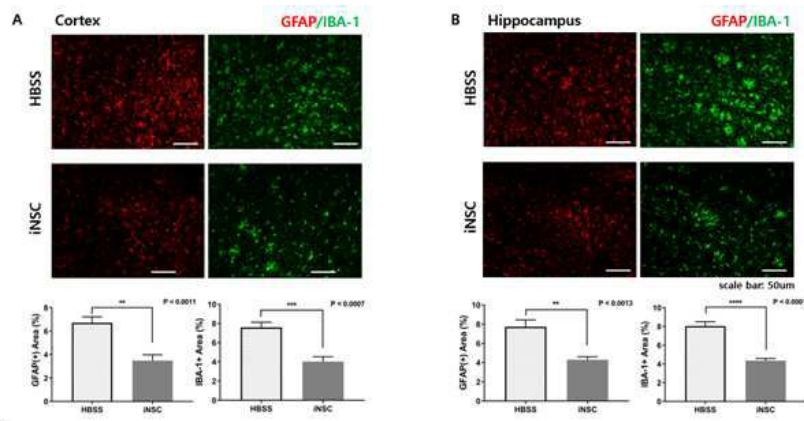
도면17



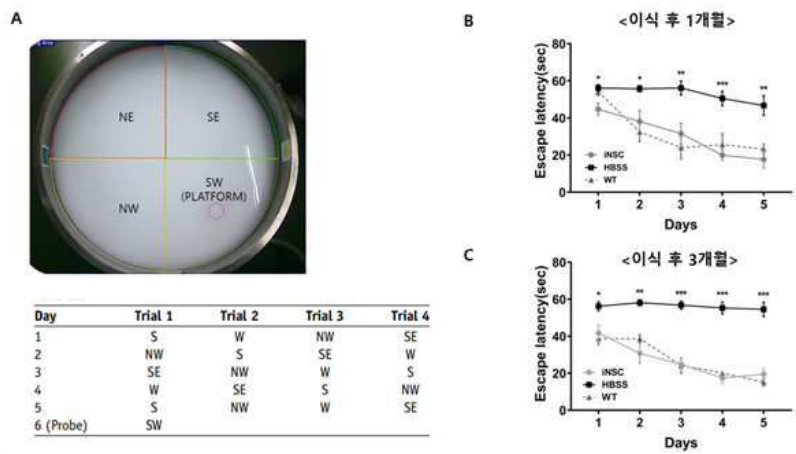
도면18



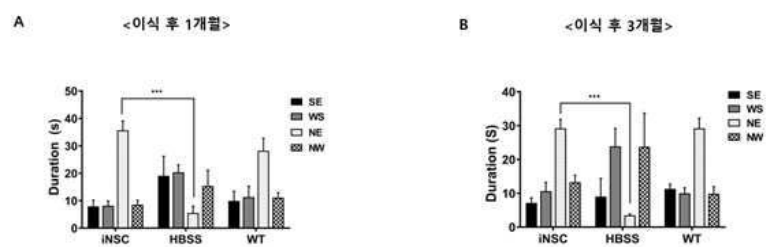
도면19



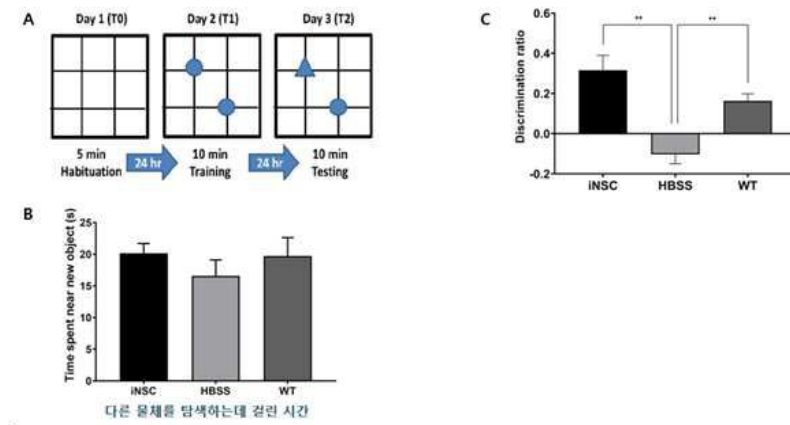
도면20



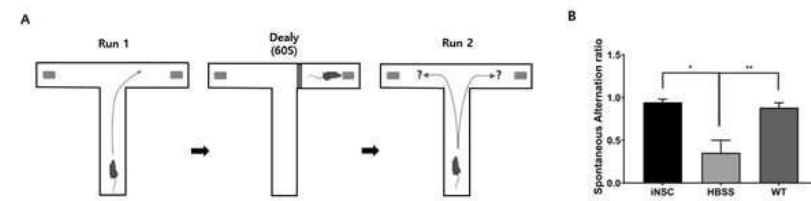
도면21



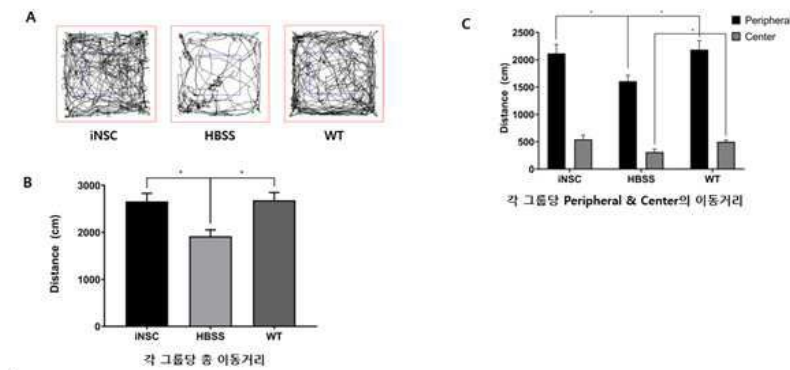
도면22



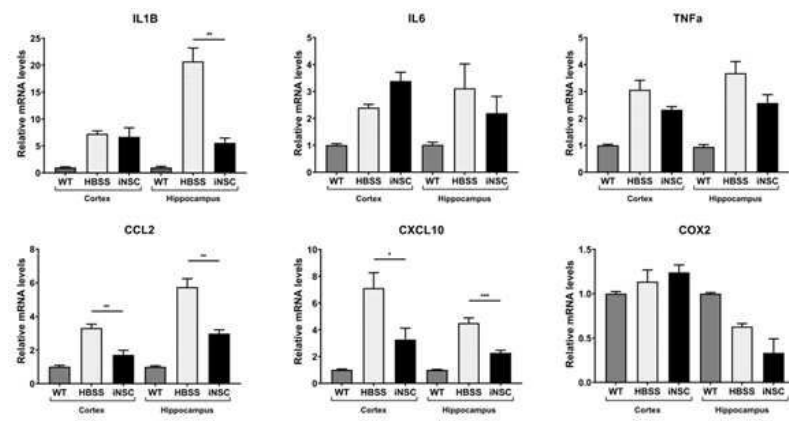
도면23



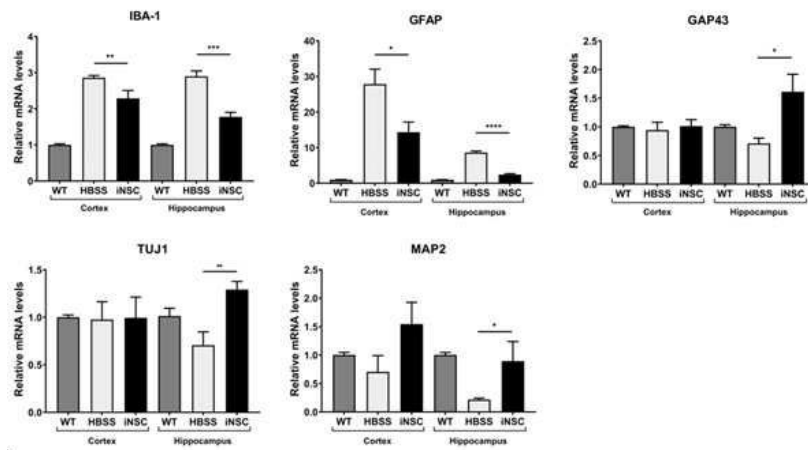
도면24



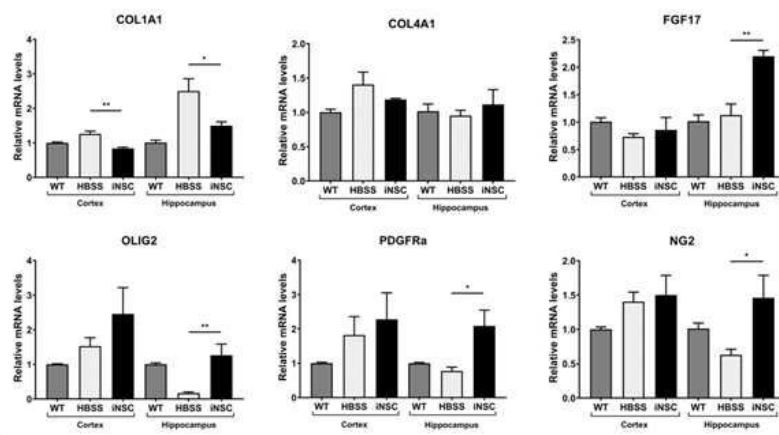
도면25



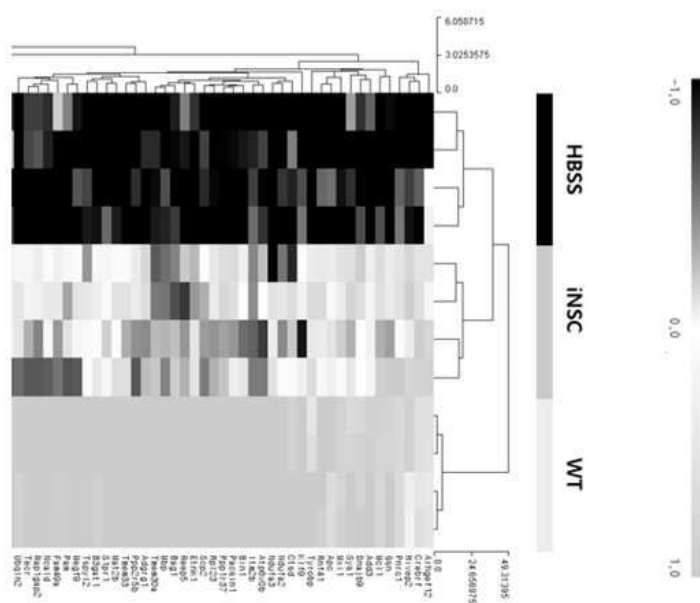
도면26



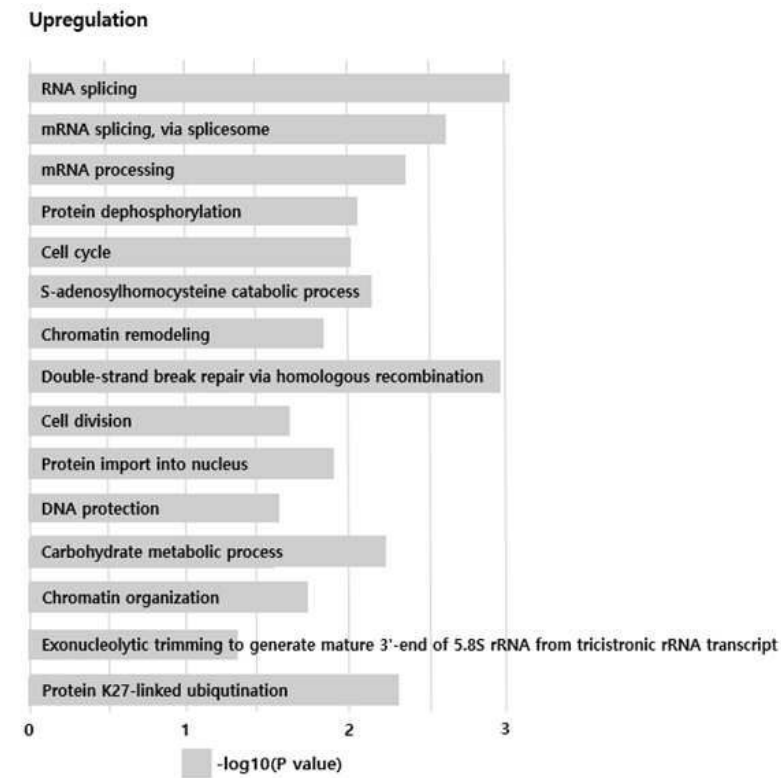
도면27



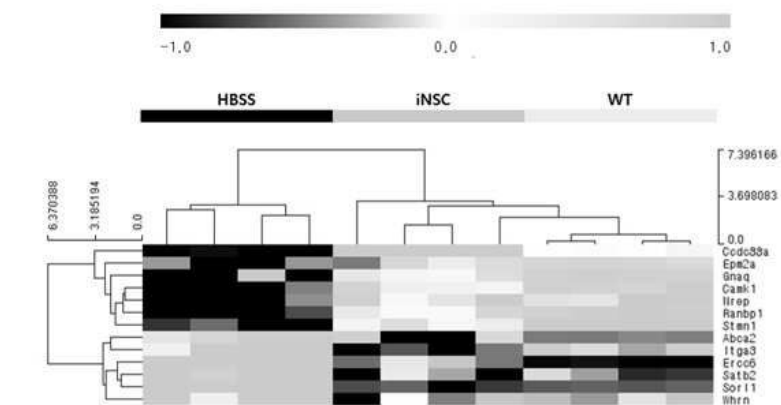
도면28



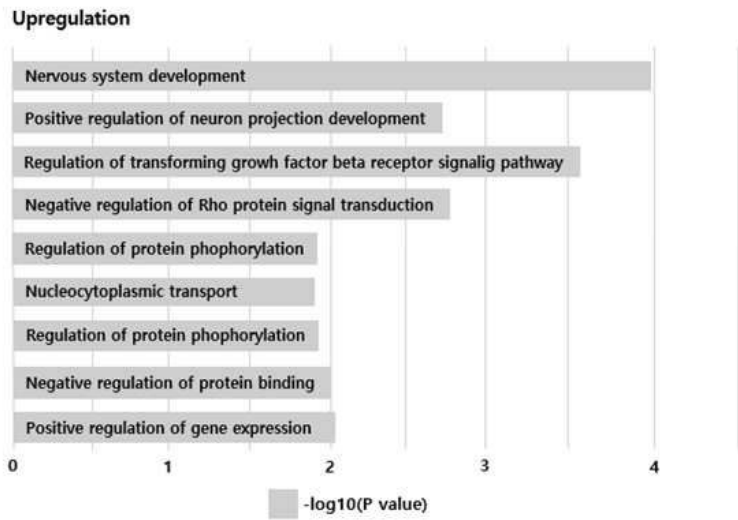
도면29



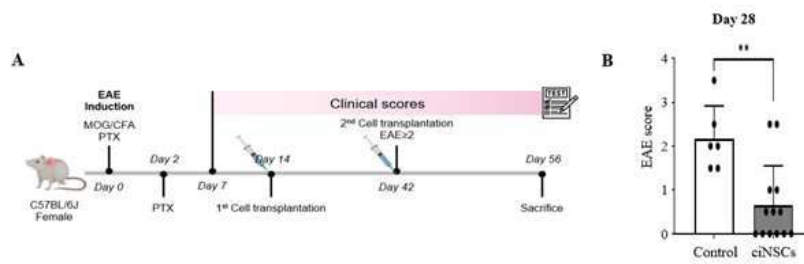
도면30



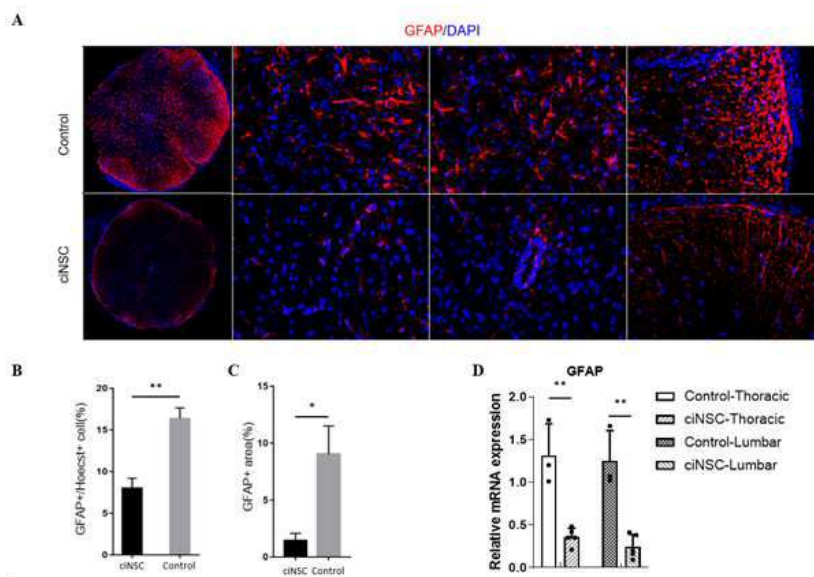
도면31



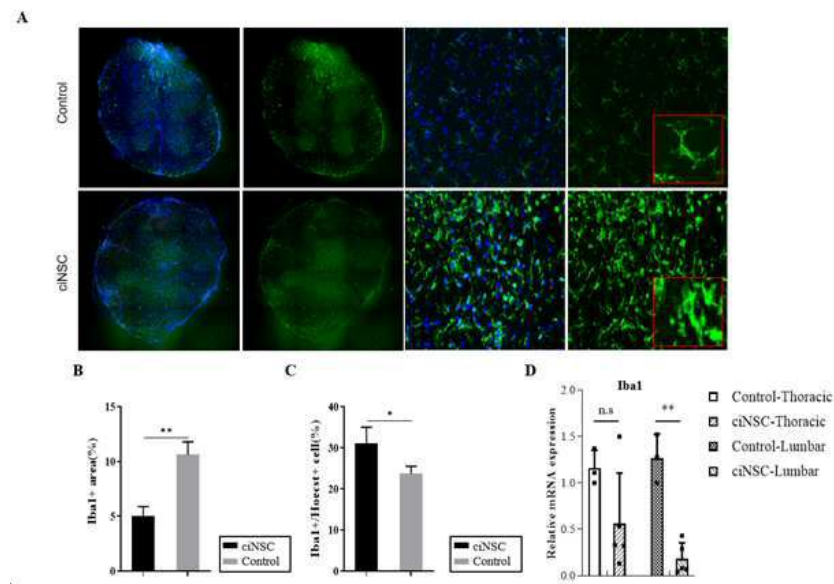
도면32



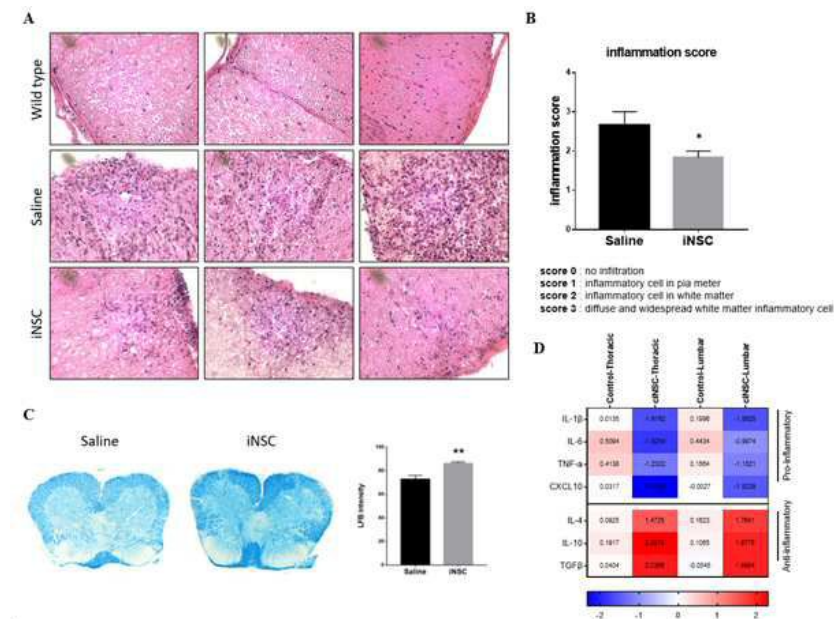
도면33



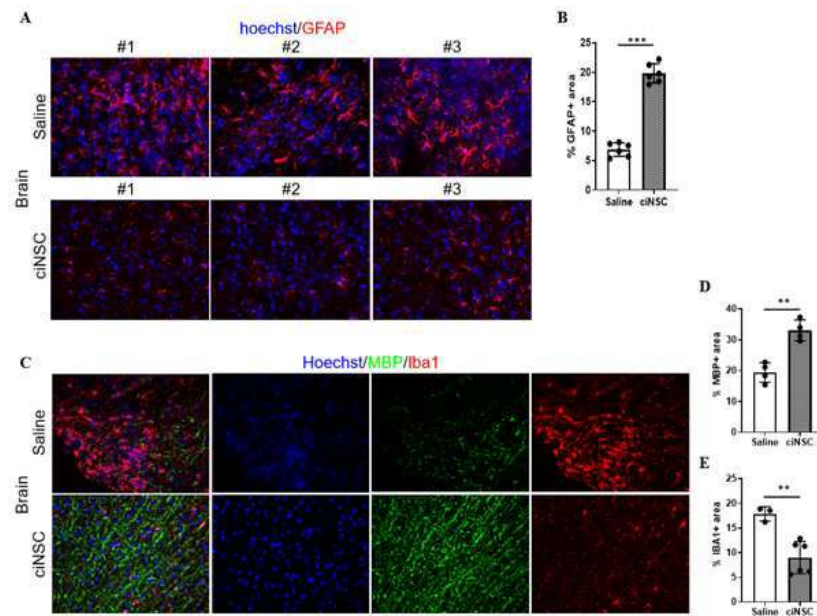
도면34



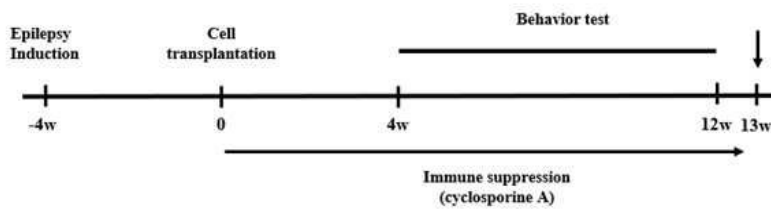
도면35



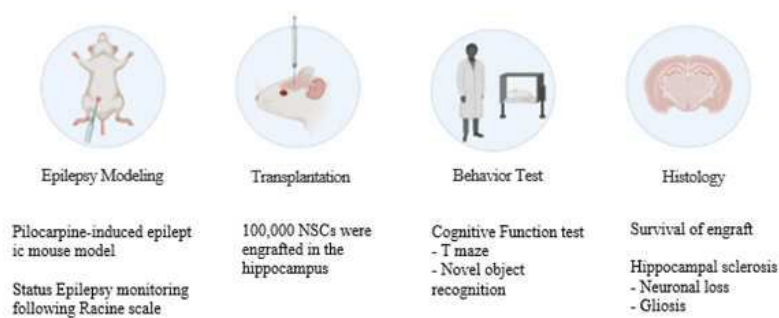
도면36



도면37



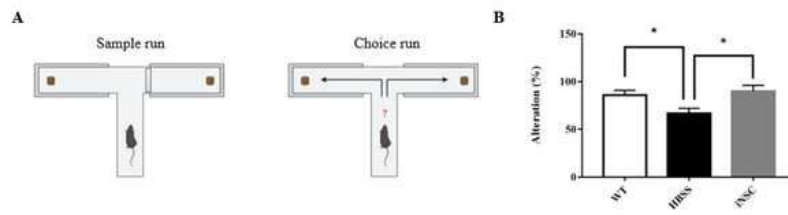
도면38



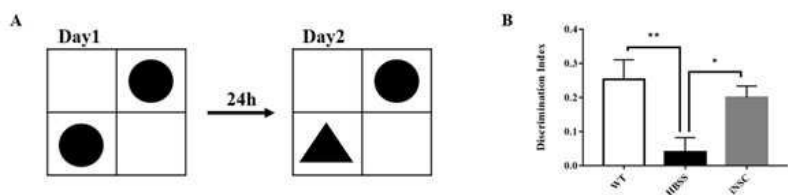
도면39

Induction of Epilepsy model			Racine Scale	
N-methylscopolamine	Pilocarpine	Diazepam	Behavioral stage	Classified
1mg/kg, i.p. injection	200-400mg/kg, i.p. injection	2mg/kg, i.p. injection	Sudden behavioral arrest	I
			Motionless staring	
			Mouth and facial movement	
To minimize peripheral side effects	Acetylcholine agonist	Anticonvulsant	Head nodding	II
Administered 10min before pilocarpine injection	Induced epileptic seizures	To terminate SE and extent of damage in the hippocampus	Forelimb clonus with lordotic posture	III
			Forelimb clonus with rearing	IV
	To study TLE involve hippocampal sclerosis	Injected 2 hours after seizure induction	Generalized tonic-clonic activity with loss of postural tone	V
			Rearing and wild jumping	

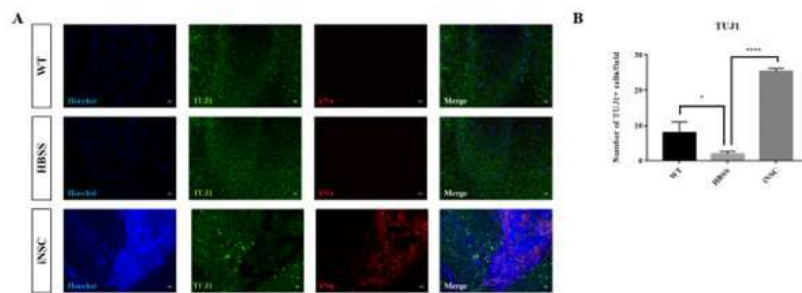
도면40



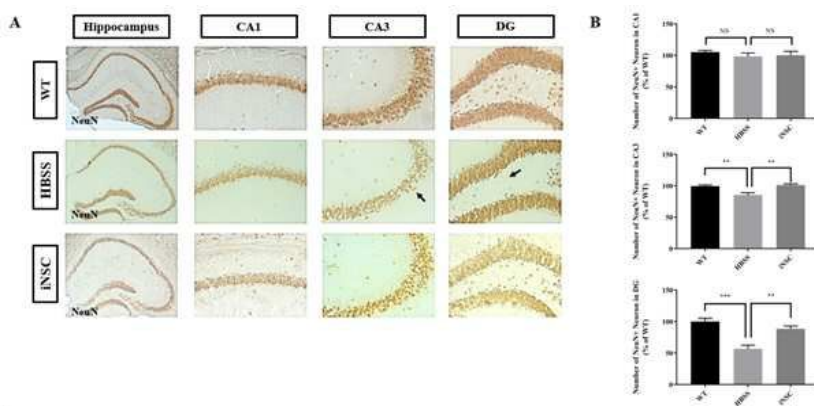
도면41



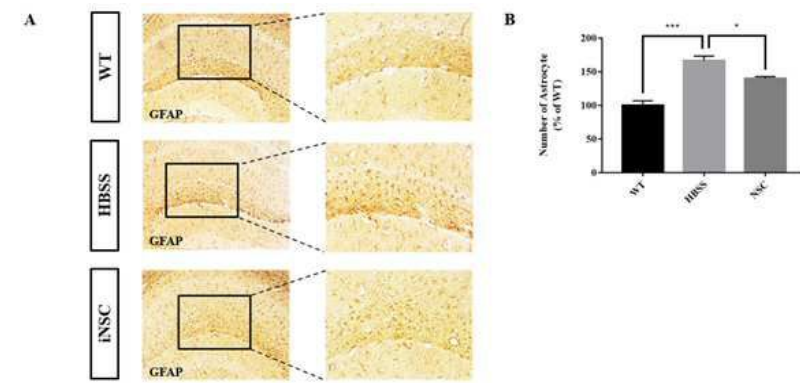
도면42



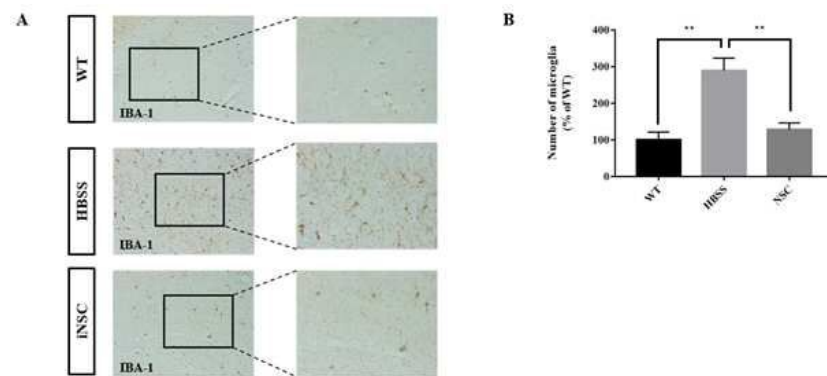
도면43



도면44



도면45



도면46

