

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2017년 10월 19일 (19.10.2017)



(10) 국제공개번호  
WO 2017/179767 A1

- (51) 국제특허분류:  
C12N 5/0793 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01)  
C12N 5/0797 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007687
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 14일 (14.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2016-0044968 2016년 4월 12일 (12.04.2016) KR  
10-2016-0088435 2016년 7월 13일 (13.07.2016) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR];  
08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 장미숙 (CHANG, Mi-Sook); 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR). 박지혜 (PARK, Jihye);  
03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 두호특허법인 (DOOHO IP LAW FIRM);  
06628 서울시 서초구 강남대로 51길 1, 7층 (서초동, 대현블루타워), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

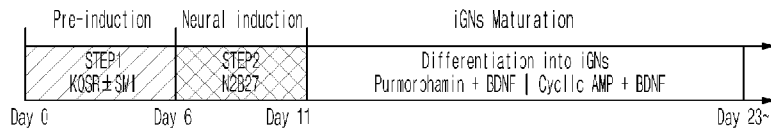
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF ADIPOSE STEM CELLS INTO NEURAL STEM CELLS, NEURONS AND GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID NEURONS, AND METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF HUMAN STEM CELLS THAT SECRETE LARGE AMOUNTS OF GROWTH FACTORS FROM HUMAN BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 발명의 명칭 : 지방줄기세포에서 신경줄기세포, 신경세포 및 가바성 신경세포로의 분화 유도 방법, 및 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포의 분화 유도 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method of differentiating adipocyte derived mesenchymal stem cells into neural stem cells, neurons and gamma-aminobutyric acid neurons. More specifically, the present invention has established a method which cultures adipocyte derived mesenchymal stem cells in a cell culture medium to which low molecular inhibitors SB431543, Noggin, and LDN193189 are added for 6 to 8 days (step 1: pre-induction step), then cultures the adipocyte derived mesenchymal stem cells in a medium to which B27, N2, and ascorbic acid are added for 5 days (step 2: neural induction step), further cultures the adipocyte derived mesenchymal stem cells in a medium to which bFGF and EGF are added for 5 to 7 days (step 3: proliferation step) to differentiate the same into neural stem cells, further differentiates the neural stem cells into neurons using a medium where purnorphamine and a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are added to the cell culture of step 3, and also differentiates the neurons into gamma-aminobutyric acid neurons using a medium where purnorphamine and BDNF and dbcAMP and BDNF are added to the cell culture of step 2. The present invention may be useful for identifying molecular mechanisms associated with the development of human neurons or GABAergic interneurons. Adult mesenchymal stem cell-derived neurons or induced GABAergic intervening interneurons having the properties of a particular disease in vitro using the differentiation method of the present invention can be effectively useful for identifying a neurological disease and for screening a drug.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/179767 A1



본 발명은 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포, 신경세포 및 가바성 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 세포 배양 배지에 저분자 억제제인 SB431543, Noggin, 및 LD-N193189를 첨가하여 6 내지 8일간 배양하고(단계 1: 전-처리 단계), 그런 다음, B27, N2, 및 ascorbic acid를 첨가한 배지에 5일간 배양하고(단계 2: 신경 유도 단계), bFGF 및 EGF를 첨가한 배지에서 5 내지 7일간 더 배양하여(단계 3: 증식 단계), 신경 줄기세포로 분화시키고, 상기 단계 3의 세포 배양액에 purmorphamine 및 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)를 첨가한 배지를 이용하여 추가적으로 신경세포로 분화시켰으며, 또한, 상기 단계 2의 세포 배양액에 purmorphamine 및 BDNF와 dbcAMP 및 BDNF을 첨가한 배지를 이용하여 상기 신경세포를 가바성 신경세포로 분화시키는 방법을 확립하여, 본 발명은 인간 신경세포 또는 GABA 분비 개재뉴런의 발달과 연관된 분자 기작을 확인하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 본 발명의 분화방법을 이용한 시험관상에서 특정 질병의 성질을 가진 성체중간엽줄기세포로부터 유도된 신경세포 또는 유도된 GABA 분비 개재신경세포는 신경학적 질병 규명과 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

## 명세서

# 발명의 명칭: 지방줄기세포에서 신경줄기세포, 신경세포 및 가바성 신경세포로의 분화 유도 방법, 및 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포의 분화 유도 방법

### 기술분야

- [1] 본 발명은 인간 지방줄기세포로부터 신경줄기세포, 신경세포 및 가바성(Gamma-aminobutyric acid; GABA) 신경세포로의 분화를 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [2] 아울러, 본 발명은 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로의 분화를 유도하는 방법에 관한 것이다.

[3]

### 배경기술

- [4] 신경손상과 퇴행성 신경질환은 아직까지 뚜렷한 치료법이 없어, 임상 의와 과학자들에게 주요한 문제로 남아있다. 줄기세포는 자가증식능과 여러 계통으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 세포치료의 효과적인 공급원으로 여겨지고 있다. 신경손상과 퇴행성 신경질환은 아직까지 뚜렷한 치료법이 없어, 임상 의와 과학자들에게 주요한 문제로 남아있다. 줄기세포는 자가증식능과 여러 계통으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 세포치료의 효과적인 공급원으로 여겨지고 있다. 배아줄기세포(ESCs)와 유도만능줄기세포(iPSCs)를 포함하는 인간만능줄기세포는 재생치료에 적용할 수 있는 강력한 후보들이며, 다양한 대사질환, 유전질환, 퇴행성질환 등의 생명분야와 임상연구 분야에서 줄기세포의 전분화능이 유용하지만, 아직까지 여러 잠재적인 문제와 제약이 존재한다. 배아줄기세포에 관련된 윤리적 문제 외에도, 유도만능줄기세포는 발암 경로를 활성화시킬 수도 있는 외래 세포 재프로그래밍 인자에 관련된 안전성 문제를 가지고 있으며, 느린 재프로그래밍 과정과 낮은 효율 등 기술적 문제를 가지고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해서 대안으로 화학물질, microRNA 분자, 직접 교차분화 방법이 이용되어왔다(Bao et al., 2013; Lin et al., 2009; Maroof et al., 2013).

[5]

- [6] 괄목할 만한 발전에도 불구하고 여전히 유도만능줄기세포의 임상 적용은 난관으로 남아있다. 배아줄기세포나 유도만능줄기세포와 비교해 볼 때, 자가 적합성, 높은 획득성, 강한 증식능을 이유로 성체중간엽줄기세포 중 하나인 인간 지방유래 줄기세포가 재생의학에 있어 더 적합한 세포 공급원이다(Anghileri et al., 2008).

- [7] 최근 보고에 따르면, 인간 지방유래줄기세포가 신경줄기세포와 테트로도톡신 감수성 나트륨이온 전류 또는 외향성 칼륨이온 전류를 만들 수 있는 신경세포유사세포로 분화할 수 있을 뿐만 아니라 시험관상에서 신경교세포 유사세포로도 분화할 수 있다는 것이 알려졌다(Feng et al., 2013; Jang et al., 2010). 이러한 결과는 성체중간엽줄기세포의 신경세포 분화능을 나타내지만, 이뿐만 아니라 활동전위와 같은 기능적인 특성도 평가되어야 한다. 성체 중간엽줄기세포를 신경세포 또는 특정한 신경세포로 분화시키기 위한 노력에도 불구하고, 기능적, 모양적으로 확인된 GABA 분비 개재뉴런으로의 분화 프로토콜에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다.
- [8]
- [9] 신경줄기세포로 분화 유도된 세포에서는 초기신경발달과정에서 발현되는 Pax6, Sox1, Nestin, Vimentin과 같은 신경줄기세포 표지의 발현을 확인할 수 있었다(Pankratz et al., 2007). SMAD 신호를 상승적으로 억제하는 방법으로 Lefty/Actin/TGF $\beta$  신호 억제제인 SB431542와 골격형성단백질 억제제인 Noggin, 그리고 LDN193189를 이용해 배아줄기세포와 유도만능줄기세포의 신경세포로의 교차분화능을 강화할 수 있다(Chambers et al., 2009). 저분자 억제제는 성체중간엽줄기세포의 신경세포으로의 교차분화도 진척시킨다(Madhu et al., 2015). 유도된 신경줄기세포는 유도만능줄기세포 GABA 분비 개재뉴런으로의 분화와 같이 신경성장인자(BDNF; brain-derived neurotrophic factor), 음파고슴도치단백질(SHH; sonic hedgehog), 퍼모프아민(purmorphamine), 사이클릭AMP(cAMP), 다이뷰티릴 사이클릭AMP(dbcAMP) 처리 시 신경세포, 성상교세포, 초기 희소돌기신경교세포, GABA분비 개재뉴런으로의 분화능을 갖는다(Liu et al., 2013).
- [10]
- [11] 골수 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)는 실험실내에서 생장을 유지함과 동시에 자기재생을 할 수 있다. 이 다분화성 세포는 다양한 중배엽 세포로 분화할 수 있다(Bianco et al., 2001; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). 게다가, MSC는 다양한 신경세포 표지와 기능적으로 신경세포의 활성을 가지는 유사 신경세포로 교차분화 할 수 있는 잠재성을 갖는다(Munoz-Elias et al., 2003; Sanchez-Ramos et al., 2000; Trzaska et al., 2007; Woodbury et al., 2000). 높은 가소성(plasticity)과 낮은 면역 거부 반응 때문에, 인간 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cells, hMSC)의 응용은 손상된 신경계에 세포 치료를 위한 가치 있는 요인으로서 여겨진다(Thuret et al., 2006). 이전에 본 연구실은 이식된 hMSC가 생체외(ex vivo) 척수손상 모델에서 손상된 신경섬유의 성장과 척수조직 세포의 생존을 증가시킨다는 것을 입증하였다(Cho et al., 2009). 그러나, 줄기세포 유래 성장인자 다량 분비 세포를 신경손상 치료에 이용한다는 보고는 없다.

[12]

[13] 이에, 본 발명자들은 성장인자 다량 분비 세포의 특성을 가지도록 hMSC를 분화유도시켰으며, 상기 분화유도된 hMSC(gfMSC)가 신경섬유 재생을 위해 영양인자를 공급할 수 있을 것이라는 가설을 평가하기 위해 연구를 진행하던 중, gfMSC가 HGF(hepatocyte growth factor) 및 VEGF(vascular endothelial growth factor)를 비롯한 여러 성장인자들을 다량 분비하는 것을 최초로 밝혔으며, 상기 HGF 및 VEGF의 분비를 통해 신경세포 및 손상된 척수조직 절편의 척수신경에서 직접적으로 신경성장인자로서의 역할을 수행하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[14]

[15] 아울러, 본 발명자들은 유전자 조작 없이 저분자 억제제와 성장인자만을 이용해 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포, 신경세포, 가바성 신경세포로의 최적의 분화 조건을 확립하는 프로토콜을 만들고자 노력하였고, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 세포 배양 배지에 저분자 억제제인 SB431543, Noggin 및 LDN193189를 첨가하여 6 내지 8일간 배양한 다음(단계 1: 전-처리 단계), B27, N2, 및 ascorbic acid를 첨가한 배지에 5일간 배양하고(단계 2: 신경 유도 단계), bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 EGF (epidermal growth factor)를 첨가한 배지에서 5 내지 7일간 더 배양하여(단계 3: 증식 단계), 신경줄기세포로 분화시키고, 상기 단계 3의 세포 배양액에 purmorphamine 및 BDNF를 첨가한 배지를 이용하여 추가적으로 신경세포로 분화시켰으며, 또한, 상기 단계 2의 세포 배양액에 purmorphamine 및 BDNF와 dbcAMP 및 BDNF를 첨가한 배지를 이용하여 상기 신경세포를 가바성 신경세포로 분화시키는 방법을 확립하였다. 상기 본 발명은 인간 신경세포 또는 GABA 분비 개재뉴런의 발달과 연관된 분자 기작을 확인하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 이에 본 발명의 분화방법을 이용한 시험관상에서 특정 질병의 성질을 가진 성체중간엽줄기세포로부터 유도된 신경세포 또는 유도된 GABA분비 개재신경세포는 신경학적 질병 규명과 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

[16]

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

[17] 본 발명의 목적은 유전자 조작 없이 저분자 억제제와 성장인자만을 이용해 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포, 신경세포, 가바성 신경세포로의 최적의 분화 조건을 확립하는 프로토콜을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 개체내 HGF 또는 VEGF 전달용 조성물 및 신경 손상 세포 치료용 조성물을 제공하는

것이다.

[19]

### 과제 해결 수단

[20] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[21] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[22] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

[23] 3) 상기 단계 2)의 세포를 표피성장인자(EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포(neural stem cell)로 분화시키는 방법을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은

[25] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[26] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[27] 3) 상기 단계 2)의 세포를 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF)를 첨가한 배지에서 배양하여 신경줄기세포로 분화시키는 단계; 및

[28] 4) 상기 단계 3)의 신경줄기세포를 purmorphamine 및 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포(neural cell)로 분화시키는 방법을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은

[30] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[31] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[32] 3) 상기 단계 2)의 세포를 purmorphamine 및 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)를 첨가한 배지에서 배양하여 신경세포로 분화시키는 단계; 및

[33] 4) 상기 단계 3)의 신경세포를 dbcAMP(dibutyryl cyclic AMP) 및 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포(GABAergic neural cells)로 분화시키는 방법을 제공한다.

[34] 또한, 본 발명은

- [35] 1) 사람 골수 유래 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cell; hMSC)를 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 베타-머캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol)을 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;
- [36] 2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 우태아혈청 및 레티노산(retinoic acid; RA)을 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계; 및
- [37] 3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 포스콜린(forskolin), 염기성 섬유모세포성장인자(basic-fibroblast growth factor; bFGF), 혈소판유래 성장인자-AA(platelet derived growth factor-AA; PDGF-AA) 및 헤레굴린-베타1(heregulin- $\beta$ 1; HRG- $\beta$ 1)을 첨가한 배지에서 3차 배양하는 단계를 포함하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 신경줄기세포, 신경세포, 가바성 신경세포, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포를 제공한다.
- [39] 아울러, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 신경줄기세포, 신경세포, 가바성 신경세포 및 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포를 포함하는 신경 손상 세포치료용 조성물, 신경 손상 세포치료제 스크리닝용 조성물, 뇌질환 치료제 스크리닝용 조성물, 시신경 손상 관련 질환 예방 및 치료용 조성물 및 인공 망막 제조용 조성물을 제공한다.

[40]

### 발명의 효과

- [41] 본 발명의 방법으로 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경 줄기세포로 분화시킨 결과, 저분자 억제제를 첨가한 실험군이 미처리 실험군보다 신경줄기세포의 분자표지인 Nestin, Sox1, Pax6, Musashi-1, Vimentin, Olig2, Nkx2.1, FoxG1, Tuj1, 및 Ascl1의 mRNA 발현이 증가함을 확인하였고, 형광 면역세포염색법분석을 통해 Nestin과 Sox2를 모두 발현하는 유도 신경줄기세포의 검출을 확인하였으며, 상기 신경줄기세포를 본 발명의 방법으로 추가적으로 신경세포로 분화시킨 결과, 성숙한 신경세포와 관련된 유전자들의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였고, 또한, 상기 신경세포를 본 발명의 방법으로 가바성 신경세포로 분화시킨 결과, 내측 신경절 용기 (MGE) 세포 분자표지인 NKX2.1, DLX2, LHX6와 신경세포 분자표지인 TuJ1, MAP2를 발현함을 확인하였으며, 상기 가바성 신경세포는 글루탐산 수용체 차단제가 함께 있을 때의 자발적 억제성 시냅스 후 전류 (IPSC)가 나타났다가 GABA<sub>A</sub> 수용체 차단제를 처리하면 사라짐을 확인함으로써, 기능을 가진 가바성 신경세포로 최종 분화됨을 확인하였으며, 따라서 상기 분화방법을 통한 신경세포 및 가바성 신경세포는 신경학적 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [42] 또한, 본 발명의 인간 중간엽 줄기세포로부터 분화된 성장인자를 다량

함유하는 인간 줄기세포는 HGF(hepatocyte growth factor) 및 VEGF(vascular endothelial growth factor)를 과발현하고, 상기 HGF 및 VEGF의 분비를 통해 신경세포 및 손상된 척수조직 절편의 척수신경에서 신경섬유 및 세포의 성장 증가 및, 세포 사멸의 억제 효과를 나타내어 직접적으로 신경성장인자로서의 역할을 수행하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 분화된 성장인자를 다량 함유하는 인간 줄기세포는 신경 손상 질환을 가지는 개체의 치료 또는 개선을 위해 개체 내 HGF 또는 VEGF 전달용 조성물 및 신경계 손상을 치료하기 위한 유전적 조작 없이 자가조직에서 유래한 세포 치료제로서 용이하게 이용할 수 있다.

[43]

### 도면의 간단한 설명

[44] 도 1은 저분자 억제제(small molecule inhibitor; SMI)를 이용한 신경줄기세포 교차분화 프로토콜의 최적화를 나타낸 도이다:

[45] A: 지방세포 유래 중간엽 줄기세포에서부터 신경줄기세포로의 유도에 대한 과정을 도식화한 것이다.

[46] B: Scale bar: 100  $\mu$ m.

[47] C: 유도신경줄기세포의 특성을 실시간 유전자 증폭 분석법 (Real time PCR)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다. 세로축은 상대적인 유전자 발현량을 나타낸다.

[48] \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 유의확률은 지방세포 유래 중간엽 줄기세포와 비교한 값이고 †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001 유의확률은 저분자 억제제를 처리하지 않은 그룹과 비교한 값이다.

[49] D: 형광 유세포 분석기기 (FACS Caliber)를 이용해 신경세포막 부착 단백질 (neural cell adhesion molecule; NCAM)을 유세포 분석함으로써 유도 신경줄기세포의 정량화를 나타낸 도이다.

[50] 도 2는 저분자 억제제를 처리하여 교차분화시킨 유도 신경줄기세포의 특성을 나타낸 도이다:

[51] A: 형광 면역세포염색법분석을 통해 Nestin과 Sox2를 모두 발현하는 유도 신경줄기세포의 검출을 나타낸 도이다.

[52] B: 실시간 유전자 증폭 분석을 이용하여, 신경줄기세포 교차분화과정을 따라 신경줄기세포와 초기 신경세포 분자표지 (Sox1, Sox2, Nestin, Musashi-1, FoxG1, Nkx2.1, Pax6, Gli3, Vimentin, Tuj1, Emx1)의 발현 변화를 나타낸 도이다. 세로축은 상대적인 유전자 발현량을 나타낸다.

[53] \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 유의확률은 지방세포 유래 중간엽 줄기세포와 비교한 값이다.

[54] †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001 유의확률은 단계1에서의 세포와 비교한 값이며 #P < 0.05 유의확률은 단계 2에서의 세포와 비교한 값이다.

- [55] 도 3은 유도 신경세포에 대한 실험개요와 그 형태를 나타낸 도이다:
- [56] A: 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 유도 신경세포로의 분화에 대한 실험의 도식화를 나타낸다.
- [57] B: 유도 신경세포가 성숙된 신경세포와 같은 형태를 보임을 나타낸다. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .
- [58] C: iNSC(induced neural stem cells), iN(induced neural cells)
- [59] \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  유의확률은 지방세포 유래 중간엽 줄기세포와 비교한 값이며 † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , ††† $P < 0.001$  유의확률은 유도 신경줄기세포와 비교한 값이다.
- [60] 도 4는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 유래한 유도 신경세포의 특징을 나타낸 도이다:
- [61] A: Scale Bar: 20  $\mu\text{m}$ .
- [62] B: 신경세포 전구세포, 신경세포, 신경교세포 분자표지를 발현하는 유도 신경세포의 수를 적어도 서로 다른 세 영역에서 계수하였다. 백분율은 전체 세포 수에 해당하는 DAPI를 발현하는 유도신경세포 중에서 해당 분자표지를 발현하는 유도신경세포의 수가 차지하는 비율을 나타낸다. (평균값  $\pm$  평균의 표준오차)
- [63] C: 전형적인 신경세포의 형태를 가지는 유도 신경세포로부터 측정된 전기생리학적 기록 표본을 나타내었다. 표본 이미지와 전류 주입에 의한 활동전위 유도를 나타내며, 전류 주입 프로토콜은 활동전위 기록 아래에 있다. 하단부 기록은 전압고정 클램프 방식(-60mV 고정)에서 유도 신경세포로부터 얻어진 대표적인 자발적 시냅스 활동이며, 확대한 단일 전류는 연속적으로 나타낸 기록 아래에 나타내었다.
- [64] 도 5는 가바성 신경세포로의 교차분화 프로토콜의 최적화를 나타낸 도이다:
- [65] B: Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .
- [66] C: 내측 신경절 용기(MGE) 세포와 신경세포 분자표지를 발현하는 유도 가바성 신경세포의 수는 적어도 서로 다른 세 영역에서 계수되었다. 백분율은 전체 세포 수에 해당하는 DAPI를 발현하는 유도신경세포 중에서 해당 분자표지를 발현하는 유도 가바성 신경세포의 수가 차지하는 비율을 나타내는 것이다. (평균값  $\pm$  평균의 표준오차)
- [67] D: Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .
- [68] 도 6은 유도 가바성 신경세포의 기능적 특성을 나타낸 도이다:
- [69] A, B: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  유의확률은 지방세포 유래 중간엽 줄기세포와 비교한 값이며 † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , ††† $P < 0.001$  유의확률은 시험관 배양 25일 차의 유도 가바성 신경세포와 비교한 값이다.
- [70] C: Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .
- [71] D: 가바성 신경세포 분자표지를 발현하는 유도 가바성 신경세포의 수를 적어도 서로 다른 세 영역에서 계수하였다. 백분율은 전체 세포 수에 해당하는 DAPI를

- 발현하는 유도 가바성 신경세포 중에서 해당 분자표지를 발현하는 유도 가바성 신경세포의 수가 차지하는 비율을 나타낸다(평균값±평균의 표준오차).
- [72] E: 상단 좌측 패널은 전류고정 클램프 방식으로 기록된 유도 가바성 신경세포의 활동전위 발화 기록을 나타낸 것이다. 활동전위 기록 아래에는 전류 주입 프로토콜을 나타내었다.
- [73] 상단 우측 패널에는 유도 가바성 신경세포에서 램프 프로토콜 적용이 빠른 전류유입을 유도하고 고정전압을 탈분극 시킴을 보여주고 있다. 전압은 1초 동안 점진적으로 -100 mV에서 0 mV까지 증가했으며, 점선으로 된 상자는 별표로 표시한 전류를 확대한 것이다.
- [74] 실험디자인의 모식도를 하단 좌측 패널에 나타냈다.
- [75] 도 7은 인간 중간엽 줄기세포의 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포 유도 후 세포 형태와 슈반세포 표지 유전자의 변화를 현미경 및 정량적 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다:
- [76] A: 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell; hMSC)를 슈반세포(Schwann cell)로 분화를 유도하는 과정에서 세포의 형태 변화를 관찰한 현미경 사진;
- [77] B: 분화시킨 hMSC에서 슈반세포 특이 유전자(GFAP, P0, S100, CNPase 및 p75NTR)의 PCR 산물의 gel 사진;
- [78] C: 슈반세포 특이 유전자의 PCR 결과에서 각 유전자의 mRNA 수준을 밀도계(densitometry)계로 정량한 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus uhMSC. † P<0.05 versus gfMSC).
- [79] 도 8은 gfMSC에서 슈반세포 표지 단백질의 발현을 세포면역화학분석을 통해 확인한 도이다:
- [80] A: 분화시킨 hMSC에서 슈반세포 표지 단백질(GFAP, P0, S100, CNPase 및 p75NTR)의 세포면역형광염색 현미경 사진;
- [81] B: 세포면역형광염색 현미경 사진에서 각 단백질의 형광 세기를 측정된 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus uhMSC. †P<0.001 versus gfMSC).
- [82] 도 9는 gfMSC에서 분화가 진행되어 세포 주기의 정지가 일어나는 것을 세포면역화학분석을 통해 확인한 도이다:
- [83] A: uhMSC, gfMSC 및 gfMSC+GM에서 세포면역형광염색법으로 p75NTR(빨간색) 및 브로모데옥시유리딘(Bromodeoxyuridine; BrdU)(녹색)을 염색한 현미경 사진;
- [84] B: 상기 A의 현미경 사진에서 BrdU 양성 세포의 비율을 나타낸 그래프;
- [85] C: 상기 A의 현미경 사진에서 p75NTR(+)/BrdU(-)세포의 비율을 나타낸 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus uhMSC. †P<0.001 versus gfMSC).
- [86] 도 10은 gfMSC로부터 다양한 성장 인자의 분비를 성장인자 분석 어레이를 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [87] A: 배지, uhMSC-CdM 및 gfMSC-CdM에서 성장인자 마이크로어레이 분석

결과;

- [88] B: 상기 A의 결과에서 각 성장인자의 상대적 발현수준을 양성대조군에 대한 상대값으로 나타낸 그래프;
- [89] C: 상기 A의 결과에서 각 성장인자의 상대적 발현을 배지에서 탐지된 양과 비교한 표(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus Media Alone. †P<0.05, ††P<0.001 versus uhMSC-CdM);
- [90] D: uhMSC, gfMSC 및 gfMSC+GM에서 HGF의 발현을 ELISA로 확인한 결과를 나타낸 그래프;
- [91] E: uhMSC, gfMSC 및 gfMSC+GM에서 VEGF의 발현을 ELISA로 확인한 결과를 나타낸 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus CdM).
- [92] F: gfMSC가 유도분화 배양액(SCIM) 및 일반 성장 배양액(GM)에서 HGF 생산을 확인한 ELISA 결과;
- [93] G: gfMSC가 유도분화 배양액(SCIM) 및 일반 성장 배양액(GM)에서 VEGF 생산을 확인한 ELISA 결과;
- [94] H: uhMSC, gfMSC, gfMSC+SCIM 및 gfMSC+GM에서 HGF 및 VEGF의 발현을 정량적 RT-PCR로 확인한 gel 사진;
- [95] I: 상기 H 결과에서 HGF의 발현량을 GAPDH에 대한 상대량으로 보정한 그래프;
- [96] J: 상기 H 결과에서 VEGF의 발현량을 GAPDH에 대한 상대량으로 보정한 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus uhMSC).
- [97] 도 11은 gfMSC가 동시배양된 Neuro2A 세포의 신경돌기(neurite)의 성장과 증식(proliferation)을 촉진시키는 것을 신경돌기의 정량분석 및 트립판 블루 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다:
- [98] A: Neuro2A 세포 및 인간 중간엽 줄기세포의 동시배양 모식도;
- [99] B: gfMSC가 동시배양된 Neuro2A 세포의 신경돌기를 관찰한 현미경 사진;
- [100] C: 상기 B의 결과에서 Neuro2A 세포에서 최소 한개 세포체 지름 길이 이상의 신경돌기를 가지는 세포의 비율을 나타낸 그래프;
- [101] D: 상기 B의 결과에서 Neuro2A 세포에서 세포당 신경돌기 길이의 총합을 나타낸 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus Media. †P<0.05, ††P<0.001 versus uhMSC. #P<0.05, ###P<0.001 versus gfMSC);
- [102] E: gfMSC가 동시배양된 Neuro2A 세포를 트립판 블루로 염색하여 각 그룹의 Neuro2A 세포의 평균 수를 나타낸 그래프;
- [103] F: gfMSC가 동시배양된 Neuro2A 세포를 트립판 블루로 염색하여 각 그룹의 사멸된 Neuro2A 세포의 비율을 나타낸 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus Media. †P<0.05, ††P<0.001 versus uhMSC. #P<0.05, ###P<0.001 versus gfMSC).
- [104] 도 12는 gfMSC의 이식이 손상 척수조직 절편 모델에서 척수 신경의 성장과 세포 생존을 증가시키는 것을 조직면역화학염색 및 TUNEL 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다:

- [105] A: gfMSC의 이식이 손상 척수조직 절편 모델에서 척수 신경의 성장을 조직면역화학염색한 현미경 사진;
- [106] B: 상기 A의 결과에서 통합 광학 밀도를 대조군 척수조직 절편에 의해 표준화시킨 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus Control. ††P<0.001 versus lysolecithin-treated slices(LPC). †††P<0.001 versus LPC+uhMSC. ††††P<0.001 versus LPC+gfMSC);
- [107] C: gfMSC의 이식이 손상 척수조직 절편 모델에서 세포 생존을 증가시키는 것을 TUNEL 분석을 통해 확인한 현미경 사진; 및
- [108] D: 상기 C의 결과에서 TUNEL-양성 세포를 정량 분석한 그래프(\*\* P<0.001, versus Control. ††P<0.001 versus LPC. #P<0.05, †††P<0.001 versus LPC+uhMSC).
- [109] 도 13은 Neuro2A 세포와 손상 척수조직 절편 모델에서 외인성 HGF 및 VEGF의 신경 영양 인자로서의 효과를 신경돌기의 정량분석, 트립판 블루 염색 및 조직면역화학염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다:
- [110] A: 재조합 HGF를 첨가하여 배양한 Neuro2A 세포에서 최소 한개 세포체 지름 길이 이상의 신경돌기를 가지는 세포의 비율을 나타낸 그래프;
- [111] B: 재조합 HGF를 첨가하여 배양한 Neuro2A 세포에서 세포당 신경돌기 길이의 총합을 나타낸 그래프;
- [112] C: 재조합 VEGF를 첨가하여 배양한 Neuro2A 세포에서 최소 한개 세포체 지름 길이 이상의 신경돌기를 가지는 세포의 비율을 나타낸 그래프;
- [113] D: 재조합 VEGF를 첨가하여 배양한 Neuro2A 세포에서 세포당 신경돌기 길이의 총합을 나타낸 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus 미처리 Neuro2A 세포. †P<0.05, ††P<0.001 versus HGF와 VEGF 동시 처리된 Neuro2A 세포);
- [114] E: 외인성 HGF 및/또는 VEGF 단백질이 손상된 척수조직 절편의 신경돌기 성장을 증가시키는 것을 확인한 현미경 사진;
- [115] F: 상기 E의 결과에서 HGF 및/또는 VEGF 단백질의 농도에 따라 NF-M 면역형광 염색된 신경섬유의 상대적인 통합 광학 밀도(IOD) 값을 대조군 척수조직 절편으로 표준화시킨 그래프(\*P<0.05, \*\*P<0.001 versus control. †P<0.05, ††P<0.001 versus 라이소레시틴 처리된 척수조직(LPC));
- [116] G: 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포가 손상척추신경에서 HGF 및 VEGF를 분비하여 신경 영양 인자로서 기능하는 메커니즘을 나타낸 도이다.

[117]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [118] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [119]
- [120] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [121] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell;

- ADMSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- [122] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- [123] 3) 상기 단계 2)의 세포를 표피성장인자(EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포(neural stem cell)로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [124]
- [125] 또한, 본 발명은
- [126] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- [127] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- [128] 3) 상기 단계 2)의 세포를 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF)를 첨가한 배지에서 배양하여 신경줄기세포로 분화시키는 단계; 및
- [129] 4) 상기 단계 3)의 신경줄기세포를 purmorphamine 및 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포(neural cell)로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [130]
- [131] 또한, 본 발명은
- [132] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- [133] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- [134] 3) 상기 단계 2)의 세포를 purmorphamine 및 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)를 첨가한 배지에서 배양하여 신경세포로 분화시키는 단계; 및
- [135] 4) 상기 단계 3)의 신경세포를 dbcAMP(dibutyryl cyclic AMP) 및 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포(GABAergic neural cells)로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [136] 상기 단계 1)의 BMP 억제제는 Noggin 및 LDN193189인 것이 바람직하고, TGF 베타 신호전달 저해제는 ALK(activin receptor-like kinase) 수용체 저해제인 SB431542인 것이 바람직하다.
- [137] 상기 단계 1)의 배지는 DMEM F-12 기본배지에 0.5 내지 30% KOSR, 0.5 내지 1.5% Penicillin/ Streptomycin, 0.1 내지 10% Glutamax, 0.1 내지 10% non-essential

amino acid 그리고 1 내지 500 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor), 1 내지 200  $\mu$ M SB431542, 0.01 내지 1  $\mu$ g/ml Noggin, 0.1 내지 20  $\mu$ M LDN193289을 첨가한 배지인 것이 바람직하고, 특히 5 내지 20  $\mu$ M SB431542, 0.05 내지 0.2  $\mu$ g/ml Noggin, 0.1 내지 1.0  $\mu$ M LDN193289을 첨가하는 것이 신경줄기세포로의 분화를 증가시키는데 더욱 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우에는 분화 효율이 감소될 수 있다.

- [138] 상기 단계 2)의 배지는 DMEM F-12:Neurobasal (1:1) 기본배지에 0.1 내지 10% Glutamax, 1 내지 20 mM D-glucose, 0.01 내지 2 mM ascorbic acid, 0.1 내지 10 mM sodium pyruvate, 0.1 내지 10% B27 및 0.1 내지 10% N2를 첨가한 배지인 것이 바람직하며, 단계 3)의 배지는 DMEM F-12:Neurobasal (1:1) 기본배지에 0.1 내지 10% Glutamax, 1 내지 20 mM D-glucose, 0.01 내지 2 mM ascorbic acid, 0.1 내지 10 mM sodium pyruvate, 0.1 내지 10% B27 및 0.1 내지 10% N2, 1 내지 500 ng/ml bFGF 및 1 내지 500 ng/ml EGF(epidermal growth factor)를 첨가한 배지인 것이 바람직하다.
- [139] 상기 단계 1)의 배양은 4 내지 12일, 상기 단계 2)의 배양은 3 내지 10일, 상기 단계 3)의 배양은 3 내지 10일 동안 실시하는 것이 바람직하고, 1)의 배양은 6 내지 8일, 2)의 배양은 5일, 3)의 배양은 5 내지 7일 동안 실시하는 것이 더욱 바람직하다.
- [140] 또한, 상기 단계 4)의 배지는 DMEM F-12:Neurobasal (1:1) 기본배지에 0.1 내지 10% Glutamax, 1 내지 20 mM D-glucose, 0.01 내지 2 mM ascorbic acid, 0.1 내지 10 mM sodium pyruvate, 0.1 내지 10% B27 및 0.1 내지 10% N2, 0.1 내지 50  $\mu$ M purmorphamine 및 1 내지 500 ng/ml BDNF를 첨가한 배지인 것이 바람직하고, 특히 0.8 내지 2.0  $\mu$ M purmorphamine 및 5 내지 30 ng/ml BDNF를 첨가하는 것이 신경세포로의 분화를 증가시키는데 더욱 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우에는 분화 효율이 감소될 수 있다.
- [141] 상기 배양은 7 내지 16일 동안 실시하는 것이 바람직하고, 12 내지 14일 동안 실시하는 것이 더욱 바람직하다.
- [142] 또한, 상기 단계 5)의 배지는 DMEM F-12:Neurobasal (1:1) 기본배지에 0.1 내지 10% Glutamax, 1 내지 20 mM D-glucose, 0.01 내지 2 mM ascorbic acid, 0.1 내지 10 mM sodium pyruvate, 0.1 내지 10% B27 및 0.1 내지 10% N2, 0.01 내지 1 mM dbcAMP 및 1 내지 500 ng/ml BDNF를 첨가한 배지인 것이 바람직하고, 특히 0.04 내지 0.1 mM dbcAMP 및 5 내지 30 ng/ml BDNF를 첨가하는 것이 가바성 신경세포로의 분화를 증가시키는데 더욱 바람직하며, 상기 범위를 벗어나는 경우에는 분화 효율이 감소될 수 있다.
- [143] 상기 배양은 10 내지 40일 동안 배양하는 것이 바람직하고, 13 내지 35일인 것이 더욱 바람직하며, 18일 내지 30일 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.
- [144]
- [145] 본 발명의 구체적인 실시 예에서, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 세포 배양

배지에 저분자 억제제인 SB431543, Noggin, 및 LDN193189를 첨가하여 6 내지 8일간 배양하고(단계 1: 전-처리 단계), 그런 다음, B27 및 N2를 첨가한 배지에 5일간 배양하고(단계 2: 신경 유도 단계), bFGF 및 EGF를 첨가한 배지에서 5 내지 7일간 더 배양하여(단계 3: 증식 단계), 신경 줄기세포로 분화시킨 결과, 저분자억제제를 첨가한 실험군이 미처리 실험군보다 신경줄기세포의 분자표지인 Nestin, Sox1, Pax6, Musashi-1, Vimentin, Olig2, Nkx2.1, FoxG1, Tuj1, 및 Ascl1의 mRNA 발현이 증가함을 확인하였고, 형광 면역세포염색법분석을 통해 Nestin과 Sox2를 모두 발현하는 유도 신경줄기세포의 검출을 확인하였으며(도 1 및 도 2 참조), 다음으로 상기 단계 3의 세포 배양액에 purmorphamine 및 BDNF를 첨가한 배지를 이용하여 상기 신경줄기세포를 추가적으로 신경세포로 분화시킨 결과, 성숙한 신경세포와 관련된 유전자들의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였고(도 3 및 도 4 참조), 또한, 상기 단계 2의 세포 배양액에 purmorphamine 및 BDNF와 dbcAMP 및 BDNF를 첨가한 배지를 이용하여 상기 신경세포를 가바성 신경세포로 분화시킨 결과, 내측 신경절 용기 (MGE) 세포 분자표지인 NKX2.1, DLX2, LHX6와 신경세포 분자표지인 TuJ1, MAP2를 발현함을 확인하였으며, 상기 가바성 신경세포는 글루탐산 수용체 차단제가 함께 있을 때의 자발적 억제성 시냅스 후 전류 (IPSC)가 나타났다가 GABAA 수용체 차단제를 처리하면 사라짐을 확인함으로써, 기능을 가진 가바성 신경세포로 최종 분화됨을 확인하였다(도 5 및 도 6 참조).

- [146] 따라서 본 발명의 분화방법을 통한 신경세포 및 가바성 신경세포는 신경학적 질환 치료방법의 개발을 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [147]
- [148] 본 발명의 지방세포 유래 중간엽 줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐 또는 토끼 등의 모든 유래일 수 있으며, 구체적으로 인간 유래일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [149] 본 발명에서 용어, "B27" 및 "N2"는 무혈청 보충제로써 본 발명의 방법에 사용되는 배지의 성분이다.
- [150] 본 발명에서 "bFGF"는 세포증식, 세포분화 등을 비롯해 분열 촉진 인자, 혈관 생성 인자, 뼈 형성 인자 및 신경성장인자로써 기능하는 FGF 패밀리에 속하는 단백질로써 FGF2라고도 불리며 주로 FGFR 1b, FGFR 1c, FGFR 2c, FGFR 3c, FGFR 4c를 포함하는 수용체 단백질을 활성화시키며, 특히 FGFR 1c, FGFR 3c를 강력히 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 상기 FGFR을 활성화시키는 FGF 패밀리 단백질을 포함하여 bFGF와 유사한 신호를 전달할 수 있는 물질은 제한 없이 사용할 수 있다.
- [151] 본 발명에서 용어, "TGF (Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제"는 TGF 베타 신호전달을 억제하는 물질을 의미한다. 상기 TGF 베타는 생체 내에서 세포의 증식, 분화, 세포사멸, 이동, 세포외기질(ECM)의 생산 혈관형성, 발생 등 다양한 생리적 과정을 조절하는 물질이다.

[152] 본 발명에서 상기 TGF 베타 신호전달 저해제는 TGF 신호전달을 억제시킬 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 ALK (activin receptor-like kinase) 수용체 저해제가 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 ALK 수용체 저해제인 SB431542를 사용하였다.

[153]

[154] 또한, 본 발명은

[155] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[156] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

[157] 3) 상기 단계 2)의 세포를 표피성장인자(EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[158] 또한, 본 발명은

[159] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[160] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[161] 3) 상기 단계 2)의 세포를 표피성장인자(EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF)를 첨가한 배지에서 배양하는 단계; 및

[162] 4) 상기 단계 3)의 신경줄기세포를 purmorphamine 및 BDNF를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경세포의 제조방법을 제공한다.

[163] 또한, 본 발명은

[164] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[165] 2) 상기 단계 1)의 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[166] 3) 상기 단계 2)의 세포를 purmorphamine 및 BDNF를 첨가한 배지에서 배양하여 신경세포로 분화시키는 단계; 및

[167] 4) 상기 신경세포를 dbcAMP 및 BDNF를 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 가바성 신경세포의 제조방법을 제공한다.

[168]

[169] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 신경줄기세포, 신경세포, 및 가바성

신경세포를 제공한다.

[170] 아울러, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 신경줄기세포, 신경세포 및 가바성 신경세포를 포함하는 신경 손상 세포치료용 조성물, 신경 손상 세포치료제 스크리닝용 조성물, 뇌질환 치료제 스크리닝용 조성물, 시신경 손상 관련 질환 예방 및 치료용 조성물 및 인공 망막 제조용 조성물을 제공한다.

[171]

[172] 본 발명의 지방세포유래 중간엽 줄기세포로부터 상기 단계별 조성물을 이용하면, 일차 신경세포 및 일차 가바성 신경세포와 기능적, 유전적으로 유사한 특성을 가진 신경세포 및 가바성 신경세포를 제조하는 데에 유용하게 사용될 수 있으며, 최종 순수 분리된 신경세포 및 가바성 신경세포는 신경학적 질환의 치료 약물을 개발하기 위한 약물 스크리닝, 및 약물 독성분석에 유용하게 사용될 수 있다.

[173]

[174] 본 발명은 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포(growth factor releasing human mesenchymal stem cell; gfMSC)를 유효성분으로 함유하는 개체내 HGF 또는 VEGF 전달용 조성물 및 신경 손상 세포 치료용 조성물을 제공한다.

[175]

[176] 상기 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포는 분화 단계(lineage) 중 미성숙(immature) 세포인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니며 유사 슈반세포(Schwann-like cell)일 수 있다.

[177] 상기 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포는 미분화 인간 중간엽 줄기세포(Untreated hMSC; uhMSC)로부터 하기 a) 내지 c)의 단계를 포함하는 방법으로 분화된 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니며, 미분화 포유동물 중간엽 줄기세포 또는 피부-유래 1차 세포(skin-derived primary cell)로부터 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포로의 분화에 사용되는 방법이라면 모두 사용가능하다:

[178] a) 1 내지 20% FBS 및 0.1 내지 10 mM  $\beta$ -머캅토에탄올(mercaptoethanol)을 함유하는 DMEM 배지로 24시간 동안 1차 배양하는 단계;

[179] b) 1 내지 20% FBS 및 0.05 내지 5  $\mu$ g/ml 레티노산(retinoic acid)을 함유하는 DMEM 배지로 72시간 동안 2차 배양하는 단계; 및,

[180] c) 1 내지 20% FBS, 1 내지 100  $\mu$ /ml 폴스콜린(forskolin), 1 내지 100 ng/ml 인간 bFGF, 1 내지 50 ng/ml PDGF-AA 및 20 내지 2  $\mu$ g/ml 인간 헤레굴린- $\beta$ 1(heregulin- $\beta$ 1)을 함유하는 DMEM 배지로 6 내지 12일 동안 3차 배양하는 단계.

[181] 상기 조성물은 신경 손상 질환을 가지는 개체의 치료 또는 개선을 위해 투여될 수 있다. 상기 신경 손상 질환은 뇌졸중 (stroke), 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 피크병 (Pick's disease), 헌팅톤병 (Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증

(Amyotrophic lateral sclerosis), 외상성 중추 신경계 질환 (traumatic central nervous system diseases) 및 척수 손상 질환 (spinal cord injury disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질병, 바람직하게는 척수 손상 질환이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[182]

[183] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 미분화된 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(uhMSC)를 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포(growth factor releasing human mesenchymal stem cell; gfMSC)로 분화를 유도하여 gfMSC 세포에서 분비되는 인간 성장인자를 분석한 결과, uhMSC보다 gfMSC에서 HGF(hepatocyte growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IGFBP-1(insulin-like growth factor binding protein-1), IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-6 및 SCF(stem cell factor)의 발현이 증가되어 있는 것을 확인하였으며(도 10a 내지 도 10c 참조), 특히, HGF 및 VEGF의 발현이 10배 이상 증가하였고(도 10d 및 도 10e 참조), gfMSC의 HGF 및 VEGF 분비는 일반 성장 배양액에서 배양하였을 때에도 11일 동안 높게 유지되며(도 10f 및 도 10g 참조), 이는 mRNA의 발현량이 증가하기 때문임을 확인하였다(도 10h 내지 도 10j 참조).

[184] 또한, 본 발명의 구체적 실시예에서 본 발명자들은 uhMSC로부터 분화된 성장인자를 과분비하는 gfMSC가 신경세포에 미치는 영향을 분석한 결과, gfMSC를 신경세포(Neuro2A)와 동시배양(co-culture)하였을 때, 신경돌기(neurite)의 성장 및 세포 성장 및 생존을 증가시키는 효과가 있음을 확인하였고, 상기 효과는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체에 의해 감소되는 것을 관찰하여, gfMSC의 신경세포에 대한 신경성장인자로서의 효과는 gfMSC에서 분비되는 HGF 및 VEGF에 의해 유도되는 것임을 알 수 있었다(도 11b 내지 도 11f 참조).

[185] 또한, 본 발명의 구체적 실시예에서 본 발명자들은 상기에서 확인한 gfMSC의 신경세포에 대한 신경성장인자로서의 효과가 ex vivo에서도 동일하게 작용하는지 국립서울대학교 실험동물운영위원회의 승인을 받아 실험한 결과, 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트로부터 채취한, 라이소레시틴을 처리하여 손상시킨 요추(lumbar) 척수조직절편(LPC)에서 gfMSC를 이식했을 경우, uhMSC를 이식한 경우보다 신경돌기 성장 및 세포사멸 억제 효과가 현저하게 높은 것을 확인하였다(도 12a 내지 도 12d 참조). 상기 gfMSC 이식에 의한 손상된 척수조직절편의 신경돌기 성장 증가는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체를 처리하였을 때 유의하게 감소하였으나, gfMSC의 척수조직 절편의 세포 사멸 억제 효과는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체 처리 여부에 유의한 차이를 보이지 않은 것으로부터 gfMSC의 척수조직 절편에 대한 신경성장인자로서의 효과는 gfMSC에서 분비되는 HGF 및 VEGF에 의해 유도되는 것이지만, 리소레시틴에 의한 척수조직 절편 세포의 세포사멸 보호 효과는 HGF 및 VEGF의 분비에 의한 효과와 독립적인 것을 알 수 있었다(도 12a 내지 도 12d 참조).

- [186] 아울러, 본 발명의 구체적 실시예에서 상기에서 확인한 gfMSC의 신경세포의 신경돌기 및 세포 성장 증가 및 손상 척수조직 절편의 신경돌기 성장 및 세포사멸 억제 효과가 gfMSC가 분비하는 성장인자에 의한 것인지 확인하기 위하여 신경세포 또는 척수조직절편에 재조합 HGF 또는 VEGF 단백질을 처리하여 분석한 결과, 외인성 HGF 및/또는 VEGF 단백질에 의해 신경세포 및 척수조직절편의 신경돌기 성장 및, 신경세포 생장이 증가되는 것을 확인하였다(도 13a 내지 도 13f 참조).
- [187] 상기 결과로부터 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포가 다양한 성장인자를 과분비하여 신경세포의 신경돌기 및 세포 성장을 증가시키는 효과를 가지는 것을 확인하였으며, 상기 효과를 이용하여 *in vitro*뿐만 아니라 *ex vivo*에서도 신경 재생을 유도할 수 있다는 것을 증명하였다(도 13g 참조). 또한, 본 발명에서 gfMSC에서 HGF 및 VEGF의 분비를 처음으로 확인하였으므로, 본 발명의 분화된 hMSC를 신경 손상 질환을 가지는 개체내로 HGF 및 VEGF를 운반용 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [188]
- [189] 본 발명의 세포 치료용 조성물은 바람직하게는 약학적 조성물이며, 당업자에게 공지的方法으로 제제화하는 것이 가능하다. 예를 들면, 필요에 따라 물 혹은 그의 약학적으로 허용가능한 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약리학상 허용되는 담체 혹은 매체, 구체적으로는 멸균수나 생리식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적절히 조합하여 일반적으로 인정된 제약 실시예 요구되는 단위 용량 형태로 혼화하는 것에 의해 제제화하는 것으로 여겨진다. 상기 제제에 있어서 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당 용량을 얻을 수 있도록 하는 것이다. 또, 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 비히클을 이용해 통상의 제제 실시예 따라 처방할 수 있다. 이때 주사용 수용액으로는 예를 들면, 생리 식염수, 포도당이나 그의 보조약을 포함한 등장용액, 예를 들면, D-소르비톨, D-만노스, 염화나트륨을 들 수 있어 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로 에탄올, 폴리알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다. 유성액으로서는 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다. 또, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면 염산 프로카인, 안정화제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상 적당한 앰플에 충전시킨다.
- [190] 환자의 체내에의 투여는 바람직하게는 비경구투여이며, 구체적으로는 손상부위에의 1회 투여가 기본이지만 여러차례 투여도 좋다. 또, 투여시간은 단시간이라도 장시간 지속 투여라도 좋다. 더욱 구체적으로는 주사제형, 경피투여형 등을 들 수 있다.

- [191] 본 발명의 약학적 조성물이 적용될 수 있는 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [192]
- [193] 또한, 본 발명은
- [194] 1) 미분화 인간 중간엽 줄기세포를 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포(growth factor releasing human mesenchymal stem cell; gfMSC)로 분화시키는 단계; 및,
- [195] 2) 상기 단계 1)에서 분화된 줄기세포를 신경 손상 질환을 가지는 개체내로 투여하는 단계를 포함하는 HGF 및/또는 VEGF의 개체내 운반 방법을 제공한다.
- [196] 상기 단계 1)의 분화는 하기 a) 내지 c)의 단계를 포함하는 분화 방법으로 이루어지는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니며, 미분화 포유동물 중간엽 줄기세포 또는 피부-유래 1차 세포로부터 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포(gfMSC)로의 분화에 사용되는 방법이라면 모두 사용가능하다:
- [197] a) 10% FBS 및 1 mM  $\beta$ -머캅토에탄올을 함유하는 DMEM 배지로 24시간 동안 1차 배양하는 단계;
- [198] b) 10% FBS 및 280 ng/ml 레티노산을 함유하는 DMEM 배지로 72시간 동안 2차 배양하는 단계; 및,
- [199] c) 10% FBS, 10  $\mu$ /ml 폴스쿨린, 10 ng/ml 인간 bFGF, 5 ng/ml PDGF-AA 및 200 ng/ml 인간 헤레쿨린- $\beta$ 1(heregulin- $\beta$ 1)을 함유하는 DMEM 배지로 8일 동안 3차 배양하는 단계.
- [200] 상기 단계 2)의 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포는 미성숙 세포인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니며 유사 슈반세포(Schwann cell-like cell)라면 모두 사용가능하다.
- [201] 상기 단계 2)의 신경 손상 질환은 뇌졸중, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅톤병, 근위축성 측면 경화증, 외상성 중추 신경계 질환 및 척수 손상 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 척수 손상 질환인 것이 더욱 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [202] 상기 단계 2)의 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포는 HGF 및 VEGF를 과분비하는 특성을 가지며, 본 발명의 방법은 신경 손상 질환을 가지는 개체의 치료 및 개선을 위해 본 발명의 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포를 개체 내로 운반하기 위해 사용된다.
- [203] 상기 단계 2)의 투여는 바람직하게는 비경구투여이며, 구체적으로는 손상부위의 1회 투여가 기본이지만 여러차례 투여도 좋다. 또, 투여시간은 단시간이라도 장시간 지속 투여라도 좋다. 더욱 구체적으로는 주사제형, 경피투여형 등을 들 수 있다.
- [204]
- [205] 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 개체는 척추동물이고 바람직하게는

포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[206] 본 발명의 방법은 과학자 또는 의사에 의해서 적절히 수정되어 본 발명의 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포를 개체로 투여하기 위해 사용될 수 있다.

[207]

[208] 아울러, 본 발명은 미분화 인간 중간엽 줄기세포(uhMSC)를 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포로 분화시키는 단계를 포함하는 HGF 또는 VEGF의 생산 방법을 제공한다.

[209] 상기 분화는 하기 a) 내지 c)의 단계를 포함하는 방법으로 이루어지는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니며, 미분화 포유동물 중간엽 줄기세포 또는 피부-유래 1차 세포로부터 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포로의 분화에 사용되는 방법이라면 모두 사용가능하다:

[210] a) 10% FBS 및 1 mM  $\beta$ -머캅토에탄올(mercaptoethanol)을 함유하는 DMEM 배지로 24시간 동안 1차 배양하는 단계;

[211] b) 10% FBS 및 280 ng/ml 레티노산(retinoic acid)을 함유하는 DMEM 배지로 72시간 동안 2차 배양하는 단계; 및,

[212] c) 10% FBS, 10  $\mu$ /ml 폴스콜린(forskolin), 10 ng/ml 인간 bFGF, 5 ng/ml PDGF-AA 및 200 ng/ml 인간 헤레굴린- $\beta$ 1(hegulin- $\beta$ 1)을 함유하는 DMEM 배지로 8일 동안 3차 배양하는 단계.

[213]

[214] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[215] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[216]

[217] <실시예 1> 지방세포 유래 중간엽 줄기세포 (hADSC) 배양

[218] 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 유지하기 위해 DMEM 기본 배지에 10% 우태아 혈청, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 배지에서 배양하며, 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator 에서 유지한다. 그런 다음, 0.25% trypsin-EDTA를 세포를 배양한 디쉬에 처리하여 세포를 떼어낸 후, 젤라틴 코팅이 된 10cm<sup>2</sup> 조직배양 디쉬에 8 X 10<sup>4</sup> 세포수로 넣어 4일 간격으로 계대배양하였다. 배지는 이틀에 한번씩 새로운 배지로 갈아주고, 세포는 계대배양하는 passage를 9 이상 넘지 않도록 하였다.

[219]

[220] <실험예 1> 지방유래 줄기세포에서 유래된 유사 신경줄기세포로의 교차분화방법 확립의 확인

[221] <1-1> 3단계 분화조건의 확립

[222] 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 교차분화하는 방법을 위해,

아무런 처리 없이 3% knock out serum replacement (KOSR)를 넣은 조건과, 저분자 억제제 처리와 함께 3% KOSR을 넣은 조건으로 나누어 초기 비교실험을 진행하여 분화조건을 확립하였다.

[223] 분화는 크게 3단계로 나누어지며, 1 단계는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포 2 X 10<sup>5</sup> 세포를 6cm<sup>2</sup>의 젤라틴 코팅된 디쉬에 넣어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 하루 정도 배양한다. 다음날 전처리 유도 배지(pre-induction medium)로 갈아주는데, 배지의 조성은 DMEM F-12 기본배지에 3% KOSR, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% Glutamax, 1% non-essential amino acid 그리고 4 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor)가 포함되어 있으며 8일 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 유지한다. 이 단계에서, 조건을 저분자 억제제인 10 μM SB431542, 0.1 μg/ml Noggin, 0.5 μM LDN193289을 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹으로 나누어 신경줄기세포로의 분화를 비교하였다.

[224] 그 다음, 두번째 단계에서, 배지조성을 신경유도 배지(Neural induction medium)로 바꾸어 주는데, 이는 DMEM F-12:Neurobasal (1:1) 기본배지에 1% Glutamax, 3 mM D-glucose, 0.2 mM ascorbic acid, 1 mM sodium pyruvate, 2% B27 그리고 1% N2이 포함되어 있으며 5일 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

[225] 마지막 세번째 단계는 신경줄기 유사세포 수를 불리기 위해 신경유도 배지에 성장인자인 20 ng/ml bFGF와 20 ng/ml EGF(epidermal growth factor)가 포함된 성장 배지로 교체하여 7일간 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 그런 다음, 신경줄기세포로 제대로 분화가 되었는지 확인하기 위해, 3단계가 끝난 세포들을 PBS로 씻은 후 1X TryPLE select를 3~4분간 37°C 배양기에서 처리하여 단일세포로 잘 부수어 준다. 그리고 미리 1 μg/ml Poly-L- ornithine (PLO)/ 10 μg/ml Fibronectin(FN)로 코팅시켜 준비한 6cm<sup>2</sup> 디쉬와 12mm<sup>2</sup>의 커버 글래스를 넣은 4well 디쉬에 붙여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2~3일간 배양시킨 후 세포의 분화를 분석하였다. 6cm<sup>2</sup> 디쉬는 real-time PCR 분석을 통해 타겟 유전자 발현을 비교하였고, 커버 글래스가 있는 4 well 디쉬는 면역형광염색법 분석을 통해 단백질 발현 및 발현 모양을 관찰하였다.

[226]

[227] <1-2> Real time PCR을 통한 유도된 신경줄기세포의 분화 관련 유전자 발현 정도 확인

[228] 상기 분화 유도된 신경줄기세포의 유전자 발현정도를 분석하기 위해, cell scraper를 이용하여 샘플링을 하고 Trizol reagent을 이용하여 매뉴얼 방법대로 Total RNA를 분리하였다. 분리한 Total RNA는 M-MLV 역전사 효소를 통해 42°C에서 1시간 반응으로 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 SYBR Green gene expression assays 분석을 통해 유전자 발현을 비교하였고, 비교하고자 하는 타겟 유전자 및 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 타겟 유전자의 발현량은 endogenous GAPDH에 의해 표준화 시키고, 유전자 레벨의 비교는 측정

유전자의 Ct 값 비교법을 이용하였다. Ct 값은 형광 레벨이 임계값에 도달하는 cycle 주기로  $\Delta Ct$  값은 표적 유전자 [ $\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{GAPDH})$ ]의 값으로부터 GAPDH의 값을 제거한, CT 값을 계산함으로써 결정하였고, 표준 발현 유전자를 타겟 유전자의 상대값  $\text{GAPDH} = 2^{\Delta Ct}$  의  $\Delta Ct$ 으로 나타내었다.

[229] [표1]

Gene name	Forward(F) & reverse(R) primer sequences	Gene Bank Accession	서열번호
CALB2	F: 5'-CTCCAGGAATACACCCAAA-3'	BC015484.2	1
	R: 5'-CAGCTCATGCTCGTCAATGT-3'		2
Dlx2	F: 5'-GCACATGGGTTCCTACCAGT-3'	BC032558.1	3
	R: 5'-TCCTTCTCAGGCTCGTTGTT-3'		4
Dlx5	F: 5'-CCAACCAGCCAGAGAAAGAA-3'	BC006226	5
	R: 5'-GCAAGGCGAGGTAAGTCTGAGTC-3'		6
Emx1	F: 5'-AAGCGCGGCTTTACCATAGAG-3'	NM_004097.2	7
	R: 5'-GCTGGGGTGAGGGTAGTTG-3'		8
FoxG1	F: 5'-AGAAGAACGGCAAGTACGAGA-3'	BC050072.1	9
	R: 5'-TGTTGAGGGACAGATTGTGGC-3'		10
GABRA1	F: 5'-GGATTGGGAGAGCGTGTAACC-3'	BC030696	11
	R: 5'-TGAAACGGGTCCGAAACTG-3'		12
GABRA2	F: 5'-GTTCAAGCTGAATGCCCAAT-3'	BC022488	13
	R: 5'-ACCTAGAGCCATCAGGAGCA-3'		14
GABRA5	F: 5'-ATCTTGGATGGGCTCTTGG-3'	BC111979	15
	R: 5'-TGTAAGCCATTTCCGTGTCG-3'		16

[230] [㉟2]

GAD65	F: 5'-GGTGGCTCCAGTGATTAAG-3'	M81882.1	17
	R: 5'-TGTCCAAGGCGTTCTATTTC-3'		18
GAD67	F: 5'-AGGCAATCCTCCAAGAACC-3'	M81883.1	19
	R: 5'-TGAAAGTCCAGCACCTTGG-3'		20
GFAP	F: 5'-CAACCTGCAGATTCGAGAAA-3'	AF419299.1	21
	R: 5'-GTCCTGCCTCACATCACATC-3'		22
Gli3	F: 5'-TGGTTACATGGAGCCCCACTA-3'	M57609.1	23
	R: 5'-GAATCGGAGATGGATCGTAATGG-3'		24
LHX6	F: 5'-GGGCGCGTCATAAAAAGCAC-3'	BC103936	25
	R: 5'-TGAACGGGGTGTAGTGGATG-3'		26
Map2	F: 5'-CGCTCAGACACCCTTCAGATAAC-3'	U01828.1	27
	R: 5'-AAATCATCCTCGATGGTCACAAC-3'		28
Mash1	F: 5'-TGCACTCCAATCATTACG-3'	NM_004316	29
	R: 5'-GTGCGTGTTAGAGGTGATGG-3'		30
Musashi	F: 5'-TTCGGGTTTGTACGTTTGAG-3'	AB012851.1	31
	R: 5'-GGCCTGTATAACTCCGGCTG-3'		32
Nestin	F: 5'-CACCTGTGCCAGCCTTTCTTA -3'	NM_006617	33
	R: 5'-TTTCCTCCCACCCTGTGTCT-3'		34

[231] [표3]

NKX2.1	F: 5'-GTGAGCAAGAACATGGCCC-3'	BC006221.2	35
	R: 5'-AACCAGATCTTGACCTGCGT-3'		36
Olig2	F: 5'-GCTGCGACGACTATCTTCCC-3'	NM_005806.3	37
	R: 5'-GCCCTCCTAGCTTGTCCCCA-3'		38
Pax6	F: 5'-AGGTATTACGAGACTGGCTCC-3'	AY047583	39
	R: 5'-TCCCGCTTATACTGGGCTATTT-3'		40
SCN5A	F: 5'-GGATCGAGACCATGTGGGAC-3'	BC144621	41
	R: 5'-GCTGTGAGGTTGTCTGCACT-3'		42
Sox1	F: 5'-AGATGCCACACTCGGAGATCA-3'	NM_005986	43
	R: 5'-GAGTACTTGTCTCCTTGAGCAGC-3'		44
Sox2	F: 5'-AGTCTCCAAGCGACGAAAAA-3'	NM_003106.3	45
	R: 5'-GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA-3'		46
TuJ1	F: 5'-GGCCTTTGGACATCTCTTCA -3'	BC000748.2	47
	R: 5'-ATACTCCTCACGCACCTTGC -3'		48
Vimentin	F: 5'-AGAACTTTGCCGTTGAAGCTG-3'	NM_003380.3	49
	R:5'-CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA-3'		50
GAPDH	F: 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	BC083511.1	51
	R: 5'-CACCACCCTGTTGCTGTAGC -3'		52

[232]

[233] <1-3> 면역형광염색법을 통한 유도된 신경줄기세포의 분화 관련 단백질 발현 확인

[234] 4 well 디쉬에 유지하던 유도된 신경줄기세포를 4%의 포르말데하이드를 이용하여 15분간 고정시킨 후 칼슘 이온과 마그네슘 이온이 포함된 PBS(phosphate buffered saline)로 두번 세척하였고, 항체의 투과를 위해 PBS에 계면활성제 종류인 Triton X-100을 0.1%로 희석하여 10분에 한번씩 두번 처리하였다.

[235] 그리고 비특이적 항체가 붙어 검출되는 것을 막기 위해 염소 혈청을 0.1% Triton X-100/PBS에 5%로 희석하여 넣어 시료에 1시간 반응시킨다. 1차 항체는 세포에 따라 붙이는 항체 종류가 다르며, 단백질에 따른 타겟 항체를 표 4에 나타내었다.

[236] [표4]

Antibody name	Company (Cat. No.)	Antibody name	Company (Cat. No.)
Anti-DLX2	Santa Cruz (sc-81960)	Anti-NKX2.1	Merck Millipore (MAB5460)
Anti-GABA	Sigma-Aldrich (A2052)	Anti-Olig2	From lab stocks (Gift of Harvard University)
Anti-GAD	Merck Millipore (AB1511)	Anti-PAX6	Merck Millipore (MAB5554)
Anti-GFAP	Merck Millipore (MAB3402)	Anti-PSD96	Merck Millipore (MABN68)
Anti-MAP2	Merck Millipore (MAB3418)	Anti-SIOO	Dako(Z0311)
	Merck Millipore (AB5622)		
Anti-NCAM	BD bioscience (562794)	Aanti-SOX2	Merck Millipore (AB5603)
Anti-Nestin	BD bioscience (611658)	Anti-SYP	Sigma-Aldrich (SAB4502906)
Anti-NeuN	Merck Millipore (MAB377)	Anti-TuJ1	Bio Legend (PRB-435P)
Anti-NFM	Merck Millipore (AB1987)		

[237]

[238] 1차 항체를 붙인 뒤 4°C shaker에서 16시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 1차 항체의 숙주(host)와 파장에 따라 선택하여 사용하였으며, goat anti-(mouse IgG)-conjugated Alexa Fluor® 555 (1:200 희석), goat anti-(mouse IgG)-conjugated Alexa Fluor® 488 (1:200 희석), goat anti-(rabbit IgG)-conjugated Alexa Fluor® 555 (1:200 희석) 그리고 goat anti-(rabbit IgG)-conjugated Alexa Fluor® 488 (1:200 희석)을 사용하였다. 또한 DAPI (1:1000 희석)를 이용하여 핵을 염색하였다.

[239] 염색이 완료된 시료는 공초점 현미경 (confocal laser-scanning microscope)인 Carl Zeiss LSM700을 이용하여 촬영 및 분석하였고, 상기의 과정은 도 1a에 도식화하였다.

[240] 그 결과, 도 1B 내지 1D에 나타난 바와 같이, 유도신경줄기세포는 신경줄기세포 교차분화 과정에서 저분자 억제제 처리군과 미처리군 모두에서

크기가 작아지고 균일한 형태를 보였다(도 1B). 그러나, 도 1c에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포의 분자표지인 Nestin, Sox1, Pax6, Musashi-1, Vimentin, Olig2, Nkx2.1, FoxG1, Tuj1, 및 Ascl1의 mRNA 발현이 저분자 억제제 처리 조건과 미처리 조건에서 모두 증가하였으나, 저분자억제제를 처리한 군이 미처리 군보다 신경줄기세포 분자표지 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다(도 1C). 또한, 형광 유세포 분석기기 (FACS Caliber)를 이용해 신경세포막 부착 단백질 (neural cell adhesion molecule; NCAM)을 유세포 분석하여 유도 신경줄기세포를 정량하였다(도 1D).

[241] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 형광 면역세포염색법분석을 통해 Nestin과 Sox2를 모두 발현하는 유도 신경줄기세포의 검출을 확인하였고(도 2A), 실시간 유전자 증폭 분석을 통해, 신경줄기세포 교차분화과정을 따라 신경줄기세포와 초기 신경세포 분자표지 (Sox1, Sox2, Nestin, Musashi-1, FoxG1, Nkx2.1, Pax6, Gli3, Vimentin, Tuj1, Emx1)의 발현 변화가 나타남을 확인하였다(도 2B).

[242]

[243] <실험예 2> 지방유래 줄기세포에서 성숙한 신경세포로의 분화방법 확립의 확인

[244] 상기 <실험예 1>의 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 분화하는 방법을 바탕으로 3단계의 분화방법으로 진행하여, 신경줄기세포와 유사한 특성을 가진 세포들이 불균질하게(heterogeneous) 존재하였고 이를 성숙한 신경세포로 분화시키기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[245] 구체적으로, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포  $2 \times 10^5$  개를  $6 \text{ cm}^2$ 의 젤라틴 코팅된 디쉬에 넣어  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에 하루 동안 배양하였다. 다음날 DMEM F-12 기본 배지에  $3\% \text{ KOSR}$ (knockout serum replacement),  $1\% \text{ Penicillin/Streptomycin}$ ,  $1\% \text{ Glutamax}$ ,  $1\% \text{ non-essential amino acid}$  그리고  $4 \text{ ng/ml bFGF}$ 를 첨가한 전처리 유도배지(pre-induction medium)에 저분자 억제제인  $10 \mu\text{M SB431542}$ ,  $0.1 \mu\text{g/ml Noggin}$ ,  $0.5 \mu\text{M LDN193289}$ 를 첨가한 배지로 갈아주고,  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에서 6일 동안 배양한다. 두 번째 단계에서,  $2\% \text{ B27}$ 과  $1\% \text{ N2}$ 가 포함된 신경유도 배지 (neural induction medium)로 바꾸어 주고 5일 동안  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배지에서 배양한다. 그런 다음, 마지막 세번째 단계로 신경줄기 유사세포 수를 불리기 위해 신경유도 배지에 성장인자인  $20 \text{ ng/ml bFGF}$ 와  $20 \text{ ng/ml EGF}$ 가 포함된 성장 배지로 교체하여 5일간  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에서 배양한다. 그 후, 성숙한 신경세포로 분화시키기 위해, 상기 3단계의 분화과정이 끝난 세포들을 PBS로 씻은 후  $1 \times \text{TryPLE select}$ 를 3~4분간  $37^\circ\text{C}$  배양기에서 처리하여 단일세포로 잘 부수어 준다. 그리고 미리 PLO/FN 코팅된  $35 \text{ mm}^2$  디쉬에  $1 \times 10^6$  세포수로,  $12 \text{ mm}^2$  커버 글래스가 들어있는 4 well 디쉬에는  $1 \times 10^5$  세포수/well로 넣고  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에서 배양기에서 하루동안 안정화시킨다. 다음날, 신경유도 배지에  $1 \mu\text{M purmorphamin}$ 과  $10 \text{ ng/ml BDNF}$ (brain-derived neurotrophic factor)를 포함한 배지로 갈아주고, 12~14일 동안  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에서 3일에

한번씩 새로운 배지로 갈아주면서 배양한다.

[246] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 유도 신경세포는 작은 세포체에서 나온 양극 또는 다극 신경돌기를 가지는 것과는 달리 성숙된 신경세포와 같은 형태를 나타내었다(도 3B).

[247] 또한, 실시간 유전자 증폭 분석법을 통해 정량분석을 수행하여, 신경세포의 분자표지인 *Tuj1*, *MAP2*와 발달과정 중 초기와 후기에 발현되는 내측 신경절 융기(medial ganglionic eminence; MGE) 관련 전사인자들 (*FoxG1*, *Nkx2.1*, *Pax6*, *Dlx2*, *Dlx5*, *Lhx6*), 그리고 초기 GABA 분자표지 (*GAD67*)와 나트륨이온채널 유전자(*SCN5A*)의 발현 변화를 확인한 결과, 유도 신경세포에서 성숙한 신경세포와 관련된 유전자들의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다(도 3C).

[248] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 유도 신경세포에서 신경세포 전구세포 분자표지들(*TuJ1*, *Pax6*), 성숙한 신경세포 분자표지들(*NeuN/MAP2*), 성상세포 분자표지들(*GFAP/S100*), 초기 희소돌기아교세포 분자표지(*Olig2*)과 같은 뇌 발달과 관련된 신경세포 분자표지들이 발현됨을 확인하였고(도 4A), 이러한 분자표지를 단독 또는 공통적으로 발현하는 유도 신경세포의 수의 비율을 정량적으로 확인하였다(도 4B). 또한, 도 4c에 전형적인 신경세포의 형태를 가지는 유도 신경세포로부터 측정된 전기생리학적 기록 표본을 나타내었으며, 표본 이미지와 전류 주입에 의한 활동전위 유도를 나타내었다. 전류 주입 프로토콜은 활동전위 기록 아래에 나타나있고, 하단부 기록은 전압고정 클램프 방식(-60mV 고정)에서 유도 신경세포로부터 얻어진 대표적인 자발적 시냅스 활동이다. 확대한 단일 전류는 연속적으로 나타난 기록 아래에 나타내었다(도 4C).

[249]

[250] <실험예 3> 지방유래 줄기세포에서 가바성 신경세포로의 분화방법 확립의 확인

[251] 마찬가지로, 상기 <실험예 1>에서 확립한 3 단계의 분화방법을 바탕으로 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포로 분화시키는 방법을 확립하였다. 신경성숙 배지에서 배양하는 일수를 늘이기 위해 신경줄기세포 교차분화 일수를 단축하였고 이어 *purmorphamine*, *BDNF*로 구성된 신경세포유도 배지와 *dbcAMP*와 *BDNF*로 구성된 신경세포성숙 배지를 이용하였다.

[252] 구체적으로, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포  $2 \times 10^5$  세포를  $6 \text{ cm}^2$ 의 젤라틴 코팅된 디쉬에 넣어  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에 하루 동안 배양하였다. 다음날, DMEM F-12 기본 배지,  $3\% \text{ KOSR}$ ,  $1\% \text{ Penicillin/ Streptomycin}$ ,  $1\% \text{ Glutamax}$ ,  $1\% \text{ nonessential amino acid}$  그리고  $4 \text{ ng/ml bFGF}$ 의 전처리 유도배지(Pre-induction medium)에 저분자 억제제인  $10 \mu\text{M SB431542}$ ,  $0.1 \mu\text{g/ml Noggin}$ ,  $0.5 \mu\text{M LDN193289}$ 를 첨가한 배지로 갈아주고,  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  배양기에서 6일 동안 배양하였다. 상기 단계 1의 배양이 끝난 후, 세포를 PBS로 씻은 후  $1\text{X TryPLE}$

select를 3~4분간 37°C 배양기에서 처리하여 단일세포로 잘 부수어 PLO/FN 코팅된 35 mm<sup>2</sup> 디쉬에 1 X 10<sup>6</sup> 세포수로, 12 mm<sup>2</sup> 커버 글래스가 들어있는 4 well 디쉬에는 1 X 10<sup>5</sup> 세포수/well로 나누어 넣고 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양기에서 하루 동안 안정화 시킨다. 두 번째 단계인 2% B27과 1% N2가 포함된 신경유도 배지 (neural induction medium)로 바꾸어 주고 5일 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 그런 다음, 가바성 신경세포로 분화시키기 위해, 신경세포 분화 조건인 신경유도 배지에 1 μM purmorphamine과 10 ng/ml BDNF를 포함한 배지로 갈아주고, 10 내지 14일 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하는데 동일하게 3일에 한번씩 새로운 배지로 갈아준다. 10 내지 14일 동안 신경세포로 분화시킨 후, 가바성 신경세포로 더 분화를 유도시키기 위해 신경유도 배지에 50 μM dbcAMP와 20 ng/ml BDNF를 첨가하여 13~20일 동안 분화를 더 시켰다.

[253] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 유도 가바성 신경세포는 신경구 유사 집단에서부터 뺏어 나오는 수 많은 방사형의 신경돌기를 나타내었고, 유도 가바성 신경세포 중 많은 수가 내측 신경절 용기 (MGE) 세포 분자표지인 NKX2.1, DLX2, LHX6와 신경세포 분자표지인 TuJ1, MAP2를 발현함을 확인하였고(도 5B), 이러한 분자표지를 단독 또는 공통적으로 발현하는 유도 가바성 신경세포의 수의 비율을 정량적으로 확인하였다(도 5C). 또한, 유도 가바성 신경세포는 신경구 유사 세포 집단에서부터 뺏어나오는 신경돌기를 나타내었고, 신경미세섬유 분자표지인 neurofilament-M (NF-M)을 발현함을 확인하였다(도 5D).

[254] 또한, 도 6에 나타낸 바와 같이, 실시간 유전자 증폭 분석법의 결과, 신경세포 (MAP2), 내측 신경절 용기(MGE) 전사인자(Dlx2, Dlx5), 성상세포 (GFAP), 칼슘결합단백질 (CALB2), GABA 수용체 (GABRA1, GABRA2, GABRA5) 그리고 GABA (GAD65, GAD67)의 유전자 발현의 변화를 확인하였다. 대부분의 시험관 배양 32일 차의 분화 일수가 높은 유도 가바성 신경세포는 시험관 배양 25일 차의 유도 가바성 신경세포 보다 성숙한 가바성 신경세포의 유전자 발현의 극적인 증가를 보인 반면, 상대적으로 초기 가바성 신경세포 유전자 발현의 감소를 보였다(도 6A 및 6B). 또한, 형광 면역세포염색법 분석을 통해 가바성 신경세포와 성숙한 신경세포의 분자표지(GABA/MAP2, GAD/MAP2, PSD95/MAP2, PSD95/SYP)를 모두 발현하고 있음을 확인하였고(도 6C), 이를 정량적으로 확인하였다(도 6D). 또한, 도 6E의 하단 오른쪽에 나타난 바와 같이, 글루탐산 수용체 차단제 (50 M APV and 20 M CNQX)가 함께 있을 때의 자발적 억제성 시냅스 후 전류 (IPSC)가 나타났다가 GABA<sub>A</sub> 수용체 차단제인 10 M bicuculline을 처리하면 사라짐을 확인하였다(도 6E).

[255]

[256] <실험예 4> 사람 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로(growth factor releasing human mesenchymal stem cell; gfMSC)의 분화 유도

- [257] 본 발명자들은 Cambrex(미국)에서 구입한 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell; hMSC)를 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포(growth factor releasing human mesenchymal stem cell; gfMSC)로 분화를 유도하였다.
- [258] 구체적으로, 미분화된 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(Untreated hMSC; uhMSC)는 DMEM-저포도당 배지, 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 혼합물로 구성된 기본 성장배지와 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 세포 배양기에서 배양하였다. 세포 배양기에서 2일 동안 배양한 후 기본 성장배지를 1차 분화배지[(DMEM-저포도당 배지, 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 혼합물, 1 mM β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol)]로 교체하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 중간엽 줄기세포를 PBS(인산완충용액)으로 세척 후 2차 분화배지(DMEM-저포도당 배지, 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 혼합물, 0.28 μg/ml all-trans-retinoic acid)로 교체하여 배양하였다. 3일 후, 상기 중간엽 줄기세포를 PBS로 세척한 후 3차 분화배지[DMEM-저포도당 배지, 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 혼합물, 10 mM forskolin, 10 ng/ml 인간 섬유아세포 성장인자(human basic-fibroblast growth factor), 5 ng/ml 인간 혈소판 유도성장인자-AA(human platelet derived growth factor-AA), 200 ng/ml 헤레굴린1-베타1(heregulin-β1)]로 교체하여 8일 동안 배양하였다. 이때, 상기 3차 분화배지는 이틀에 한번 교체하였다. 분화유도를 위해 배양중인 hMSC의 형태를 현미경으로 관찰하였다. 분화유도 과정동안의 세포 생존율은 트립판 블루 염색을 통해 확인하였으며, 트립판 블루 염색이 되지 않은 세포(살아있는 세포)의 퍼센트로 측정되었다.
- [259] 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이 uhMSC는 세포 분화 유도 과정을 통해 시간이 경과할수록 형태적 변화와 함께 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포의 형태(elongated bipolar shape)로 변화됨을 관찰하였다. 특히, 분화 8일째 54%까지, 분화 12일째 80% 이상 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포(gfMSC)로 변화되었고, 분화유도 과정 동안 대부분의 세포가 살아있음을 관찰하였다. 분화 유도 완료 후 3일 동안 일반 성장 배지에서 배양된 줄기세포의 약 50%가 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포의 형태를 유지하였다.
- [260]
- [261] <실험예 5>분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포의 성장인자 분비 확인
- [262] <5-1> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포의 성장인자 분비 분석
- [263] 본 발명자들은 상기 <실시예 4>에서 분화시킨 gfMSC 세포에서 분비되는 인간 성장인자를 하기와 같이 분석하였다.
- [264] 구체적으로, 조건 배지(CdM)를 준비하기 위해 uhMSC 및 gfMSC를 PBS로 4번 세척 후 혈청이 없는 Neurobasal 배지(Gibco-BRL)에 배양하였다. 배양한지 18시간 후, 각 배지를 수집한 뒤 1500g에서 5분 동안 원심분리하여 세포

잔여물을 제거하였다. 상기 원심분리 후 수득한 각 세포 배양액의 상층액(uhMSC-CdM 및 gfMSC-CdM)은 인간 성장인자 어레이(RayBiotech)을 사용하여 제조사의 지시법에 따라 분석하였다. 이때, 상기 세포 배양에 사용한 배지를 음성 대조군으로서 함께 측정하였다. 간단히 설명하면, 인간 성장인자 어레이 막을 블로킹 버퍼로 블로킹하고 4°C에서 하룻밤동안 1 ml의 조건 배지를 배양한 다음, 상기 막을 워싱버퍼I로 3번, 워싱버퍼II로 2번 각각 5분 동안 실온에서 세척하였다. 이후, 1 ml의 희석된 바이오틴 결합 항체를 첨가한 후 실온에서 2시간 동안 배양한 후 다시 막을 세척하고 마지막으로 희석된 HRP 결합 스트렙타비딘과 함께 실온에서 2시간 배양하였다. 상기 막은 Lumino 이미지 분석기인 LAS-3000(Fujifilm)을 사용하여 검출하였고, 신호의 세기는 밀도계(Bio-Rad)로 정량화하였다. 각 인간 성장인자의 상대적인 발현 수준은 같은 분석결과에 있는 양성 대조군(POS)의 염색 강도에 대한 각각의 슬롯의 염색 강도를 비교함으로써 분석되었다. 상기 분석 결과들도 10b에 양성 대조군에 대한 uhMSC-CdM 또는 gfMSC-CdM의 성장인자 분비율(%)을, 도 10c에 음성대조군에 대한 uhMSC-CdM 또는 gfMSC-CdM의 성장인자 분비량(배수)을 나타내었으며, 상기 실험은 독립적으로 최소 3번 반복되었으며 평균±표준오차로 표시되었다.

[265] 그 결과, 도 10a 내지 도 10c에 나타난 바와 같이 uhMSC-CdM보다 gfMSC-CdM에서 (HGFhepatocyte growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IGFBP-1(insulin-like growth factor binding protein-1), IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-6 및 SCF(stem cell factor)이 더 높게 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이를 직사각형으로 표시하였다.

[266]

[267] <5-2> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포의 HGF 및 VEGF 생산량 분석  
 [268] 본 발명자들은 상기 실시예 5-1에서 확인한 uhMSC 및 gfMSC의 성장인자 분비량 차이를 효소면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay)를 통해 확인하였다.

[269] 배지, uhMSC-CdM 또는 gfMSC-CdM에 항-HGF 항체[마우스 항-human HGF(MAB294), R&D Systems] 또는 항-VEGF 항체[마우스 항-human VEGF antibody(MAB293), R&D Systems]를 처리하거나 처리하지 않은 그룹에서 HGF 또는 VEGF에 대한 ELISA Kit(RayBiotech)를 사용하여 ELISA를 수행하였다. 상기 실험은 독립적으로 최소 3번 반복되었으며 평균±표준오차로 표시되었다.

[270] 그 결과, 도 10d 및 도 10e에 나타난 바와 같이 gfMSC에서 생산되는 HGF 및 VEGF의 양은 uhMSC 보다 각각 약 10배 및 약 11배 증가함을 확인하였다.

[271]

[272] <5-3> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포의 배지별 HGF 및 VEGF 생산량 분석

[273] 본 발명자들은 분화 유도완료 후 HGF 및 VEGF의 생산이 얼마동안 유지되는지

확인하기 위하여, gfMSC를 유도분화 배양액(SCIM) 및 일반 성장 배양액(GM)에서 각각 0, 1, 3 및 5일 동안 배양한 후 상기 실시예 5-2와 동일한 방법으로 ELISA 분석을 실시하였다.

[274] 그 결과, 도 10f 및 도 10g에 나타난 바와 같이 시간이 경과함에 따라 점점 HGF 및 VEGF의 분비량이 감소하지만, 5일째에도 여전히 uhMSC(Control)보다 분비량이 높게 유지되고 있음을 확인하였으며, 일반 성장 배양액보다 유도분화 배양액에서 더 분비량이 많음을 확인하다.

[275]

[276] <5-4> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포의 HGF 및 VEGF mRNA 발현량 분석

[277] 본 발명자들은 상기 실시예 5-2 및 5-3에서 확인한 uhMSC의 분화에 따른 성장인자의 발현이 mRNA 단계부터 조절되는 것인지 정량적 RT-PCR을 통해 확인하였다. 구체적으로, 물, uhMSC, gfMSC 또는, gfMSC를 SCIM 또는 GM에서 1, 3 및 5일 동안 각각 배양한 군에서 서열번호 53으로 기재되는 센스 프라이머(5'-atgctcatggaccctgtt-3') 및 서열번호 54로 기재되는 안티센스 프라이머(5'-gcctggcaagcttcatta-3')의 HGF에 대한 프라이머 쌍 및, 서열번호 55(5'-gccttgctgctctacctcca-3')로 기재되는 센스 프라이머 및 서열번호 56(5'-caagccacagggatttt-3')으로 기재되는 안티센스 프라이머의 VEGF에 대한 프라이머 쌍을 사용하여 상기 실시예 4-2와 동일한 방법을 사용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다.

[278] 그 결과, 도 10h 내지 도 10j에 나타난 바와 같이 uhMSC과 비교하였을 때 배지의 종류에 상관없이 gfMSC의 HGF 및 VEGF의 mRNA 발현량이 5일까지 높게 유지되는 것을 확인하였다.

[279]

[280] <실험예 6> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포가 신경세포에 미치는 영향

[281] 본 발명자들은 uhMSC로부터 분화된 성장인자를 과분비하는 gfMSC가 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[282] <6-1> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포에 의한 신경돌기 성장 증가 확인

[283] 신경 모세포종(neuroblastoma)인 Neuro2A 세포(ATCC # CCL-131)를 2 µg/ml 피브로넥틴(fibronectin)이 코팅된 6-웰 플레이트에 웰당 1.3×10<sup>5</sup>개의 세포를 깔고 성장배지에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그리고 Neuro2A 세포는 항-HGF 항체 또는 항-VEGF 항체를 처리하거나 처리하지 않은 Neurobasal 배지(0.5% FBS)로 배양하였다. Neuro2A 세포를 깔기 24시간 전에 uhMSC 및 gfMSC를 1.0-µm 지름 크기 세포 배양 삽입체에 삽입체당 5×10<sup>4</sup> 개의 세포 밀도로 각각 깔았으며, 각각의 배지에 배양되었다. 48시간 후, 배양 삽입체는 PBS로 3번 세척한 뒤, Neuro2A 세포가 담겨있는 6-웰 플레이트로 옮겼다(도 11a). 세포가 없는 음성

대조군 웰의 경우는 단지 0.5% FBS가 포함된 Neurobasal 배지만이 담겨있는 배양 삽입체만 포함하고 있으며 실험군과 동일한 조건아래 배양되었다. Neuro2A 세포가 담겨있는 6-웰 플레이트로 옮긴 uhMSC 또는 gfMSC를 48시간 동안 배양한 다음, Neuro2A 세포를 위상차 현미경을 사용하여 분석하였다. 또한, 상기 분석 결과 Neuro2A 세포에서 최소 한개 세포체 지름 길이 이상의 신경돌기를 가지는 세포의 비율 및 세포당 신경돌기 길이의 총합을 도 11c 및 도 11d에 각각 나타내었다.

[284] 그 결과, 도 11b 내지 도 11d에 나타난 바와 같이 uhMSC와 비교하였을 때 gfMSC와 동시배양(co-culture)된 Neuro2A 세포에서 신경돌기(neurite)의 길이가 더 길었으며, 상기와 같은 효과는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체에 의해 감소되는 것을 확인하였다.

[285]

[286] <6-2> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포에 의한 신경세포의 성장 및 생존 증가 확인

[287] 상기 실시예 6-1과 동일한 조건에서 gfMSC가 신경세포에 성장 및 생존에 미치는 영향을 트립판 블루 염색법을 통해 확인하였다. 각 그룹별로 Neuro2A 세포의 평균 수 및 사멸된 Neuro2A 세포의 비율을 도 11e 및 도 11f에 각각 나타내었다. 세포 사멸은 트립판 블루 염색이 된 세포(사멸 세포)의 퍼센트로 나타내었다. 각 그룹별로 최소 700개 세포를 임의의 영역에서 선택하여 분석하였고, 상기 실험은 독립적으로 최소 3번 반복되었으며 평균±표준오차으로 표시되었다.

[288] 그 결과, 도 11e 및 도 11f에 나타난 바와 같이 uhMSC와 비교하였을 때 gfMSC와 동시배양(co-culture)된 Neuro2A 세포의 성장 증가 및 세포사 감소 효과를 확인하였으며, 상기와 같은 효과는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체에 의해 감소되는 것을 확인하였다.

[289]

[290] <실험예 7> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포가 손상 척수조직 절편에 미치는 영향

[291] <7-1> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포에 의한 손상 척수조직의 신경돌기 성장 증가 확인

[292] 본 발명자들은 상기 실시예 3-1 및 실시예 6-2에서 확인한 gfMSC의 신경세포의 신경돌기 성장 증가 효과가 ex vivo에서도 동일하게 작용하는지 확인하기 위하여 국립서울대학교 실험동물운영위원회의 승인 하에서 하기 실험을 수행하였다.

[293] 구체적으로, 척수조직 절편은 16일령 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트를 애버틴(avertin)으로 마취하였고, 래트의 요추(lumbar) 척수를 멸균 조건에서 채취하였다. 상기 척수에서 신경근(nerve root) 및 결합조직을 차가운 6.4 mg/ml 포도당이 함유된 Hank's balanced salt solution(Gibco-BRL)를 사용하여 제거한 후,

척수를 McIlwain tissue chopper(Mickle Laboratory Engineering)를 이용하여 400 $\mu$ m 두께의 절편으로 절단한 후 탈수초화된 신경조직 절편(LPC)을 제조하였다. 4개 절편을 한 개 막 삽입체(Millicell-CM; Millipore)에 조심스럽게 놓고, 50% Eagle's minimum essential medium(Gibco-BRL), 25% Hank's balanced salt solution, 25% horse serum(Gibco-BRL), 6.4 mg/ml 포도당 및 20 mM HEPES(Sigma-Aldrich)을 포함하는 배지 1 ml이 담긴 6 웰 플레이트에 막 삽입체를 놓았다. 상기 조직절편은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었고 배양배지는 1주일에 2번 교체하였다. 배양 7일에, 척수조직절편을 0.5 mg/ml 라이소레시틴(lysophosphatidyl choline, lysolecithin)으로 17시간 동안 처리하였다. 그리고 항-HGF 항체 또는 항-VEGF 항체를 처리하거나 처리하지 않은 새 배지로 교체하였다. 중간엽 줄기세포를 이식하기 위해서, uhMSC 또는 gfMSC는 트립신 처리 후 2,000 g에서 3분간 원심분리를 시행하였고, 침전된 세포를 PBS에서 현탁한 후 세포(1.5  $\mu$ l 당 3 $\times$ 10<sup>4</sup>개 세포)를 미세모세관 피펫이 연결된 흡입관 부품(aspirator tube assembly)을 이용하여 각 척수조직절편의 하부(ventral) 부분으로 직접 각각의 세포를 이식하였다. 조직 면역형광염색 분석을 하기 위해, 척수조직절편을 4% 파라포름알데하이드로 4°C에서 하룻밤동안 고정하였고, 0.5% Triton X-100, 1% 소혈정알부민(BSA)이 함유된 PBS를 실온에서 10분 처리하여 투과 가능하게 하였다. 0.1% Triton X-100, 3% 소혈정알부민(BSA)이 포함된 PBS로 1시간 동안 조직절편을 배양하여 블로킹한 후, 토끼 항-신경미세섬유(neurofilament, NF)-M(1:500, 척수조직 절편의 신경섬유(Axon) 염색, Chemicon) 및 마우스 항-인간 핵 항체(1:500, 이식된 인간 중간엽 줄기세포 염색, Chemicon)를 각각 사용하여 4°C에서 하룻밤동안 배양하여 이를 염색하였다. 항-NF-M 항체에 대한 2차 항체는 Alexa 546 항체(빨간색)를, 항-인간 핵 항체에 대한 2차 항체는 Alexa 488 항체(녹색)를 사용하여 상기와 동일하게 시행되었다. z-Stack 이미지는 3-4  $\mu$ m 간격으로 레이저 주사 공초점 현미경을 사용하여 얻었다. 신경미세섬유-M 면역형광은 z-Stack 레이저 주사 공초점 현미경을 통해 관찰되었고, Image J 소프트웨어(National Institutes of Health)를 사용하여 morphometric image analysis(integrated optical density, IOD)로 정량화하였다. 현미경으로 관찰한 결과를 도 6a의 A에 나타내었고, 척수조직 절편에서 NF-M이 염색된 신경섬유의 상대적인 통합 광학 밀도(integrated optical density, IOD)를 도 6a의 B에 나타내었다. 도 6a의 A에서 척수조직 절편(SC) 및 이식된 중간엽 줄기세포는 경계선으로 표시되었다. 상기 통합 광학 밀도는 대조군 척수조직 절편에 의해 표준화되었으며, 막대 그래프는 최소 7개 조직 절편의 평균 $\pm$ 표준오차를 나타낸다.

- [294] 그 결과, 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이 LPC만 있는 경우와 비교하여 LPC에 uhMSC를 이식한 경우 3.5배, LPC에 gfMSC를 이식한 경우 5.5배 신경돌기 성장이 각각 증가하였으며, 상기 gfMSC 이식에 의한 LPC의 신경돌기 성장 증가는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체를 처리하였을 때 유의하게

감소하는 것을 확인하였다.

[295]

[296] <7-2> 분화된 성장인자 다량 분비 인간 줄기세포에 의한 손상 척수조직의 세포사멸 억제 확인

[297] 본 발명자들은 상기 실시예 6-1 및 실시예 6-2에서 확인한 gfMSC의 세포 사멸 억제 효과가 ex vivo에서도 동일하게 작용하는지 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[298] 구체적으로, 상기 실시예 7-1과 동일한 방법으로 탈수초화된 신경조직 절편(LPC)을 제조하였다. 4개 절편을 한 개 막 삽입체에 조심스럽게 놓고, 50% Eagle's minimum essential medium(Gibco-BRL), 25% Hank's balanced salt solution, 25% horse serum(Gibco-BRL), 6.4 mg/ml 포도당 및 20 mM HEPES(Sigma-Aldrich)을 포함하는 배지 1 ml이 담긴 6 웰 플레이트에 막 삽입체를 놓았다. 상기 조직절편은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었고 배양배지는 1주일에 2번 교체하였다. 배양 7일에, 척수조직절편을 0.5 mg/ml 라이소레시틴(lysolecithin)으로 17시간 동안 처리하였다. 그리고 항-HGF 항체 또는 항-VEGF 항체를 처리하거나 처리하지 않은 새 배지로 교체하였다. 중간엽 줄기세포를 이식하기 위해서, uhMSC 또는 gfMSC는 트립신 처리 후 2,000 g에서 3분간 원심분리를 시행하였고, 침전된 세포를 PBS에서 현탁한 후 세포(1.5 µl 당 3×10<sup>4</sup>개 세포)를 미세모세관 피펫이 연결된 흡입관 부품(aspirator tube assembly)을 이용하여 각 척수조직절편의 하부(ventral) 부분으로 직접 각각의 세포를 이식하였다. 각 그룹에서 라이소레시틴(lysolecithin)에 의해 매개된 세포 사멸을 In Situ Cell Death Detection Kit(Roche Diagnostics)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) 염색(빨간색)을 수행하였다. 이때, DAPI 염색(파란색)으로 핵을 관찰하였다. 상기 결과를 현미경 사진으로 관찰하여 도 6b의 C에 나타내었으며(화살표 머리: TUNEL-양성 세포), 상기 100배 확대의 현미경 사진으로부터 척수조직절편의 하부 부분의 TUNEL-양성 세포의 수를 측정하여 세포사멸 정도를 그래프로 도 6b의 D에 나타내었다. 막대그래프는 최소 5개 조직 절편의 평균±표준오차를 나타낸다.

[299] 그 결과, 도 12c 및 도 12d에 나타난 바와 같이 LPC에 uhMSC를 이식한 경우와 비교하였을 때 gfMSC를 이식한 경우에서 라이소레시틴 처리에 의해 증가된 척수조직 절편의 세포 사멸이 더욱 감소되는 것을 확인하였다. 그러나 상기 gfMSC의 척수조직 절편의 세포 사멸 억제 효과는 HGF 및/또는 VEGF에 대한 항체 처리 여부에 유의한 차이를 보이지 않았다.

[300]

[301] <실험예 8> HGF 및 VEGF가 신경세포 및 손상 척수조직에 미치는 영향

[302] 본 발명자들은 상기 실시예 6-1 내지 7-2에서 확인한 gfMSC의 신경세포의 신경돌기 및 세포 성장 증가 및 손상 척수조직 절편의 신경돌기 성장 및

세포사멸 억제 효과가 gfMSC가 분비하는 성장인자에 의한 것인지 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

- [303] <8-1> HGF 및 VEGF에 의한 신경세포의 신경돌기 성장 증가 확인
- [304] 본 발명자들은 0, 12.5, 25, 50 및 100 ng/ml의 재조합 HGF 또는 VEGF 단백질(R&D Systems)을 각각 배지에 첨가하여 48시간 동안 배양한 Neuro2A 세포에서 위상차 현미경을 사용하여 최소 한개 세포체 지름 길이 이상의 신경돌기를 가지는 세포의 비율 및 세포당 신경돌기 길이의 총합을 도 13a 및 도 13b에 각각 나타내었다.
- [305] 그 결과, 도 13a 및 도 13b에 나타난 바와 같이 100 ng/ml HGF 및 50 ng/ml VEGF를 처리한 Neuro2A 세포에서 신경돌기 길이의 성장이 가장 높았다.
- [306]
- [307] <8-2> HGF 및 VEGF에 의한 신경세포의 성장 및 생존 증가 확인
- [308] 본 발명자들은 0, 12.5, 25, 50 및 100 ng/ml의 재조합 HGF 및/또는 VEGF 단백질(R&D Systems)을 각각 배지에 첨가하여 48시간 동안 배양한 Neuro2A 세포를 트립판 블루로 염색하여 상기 단백질이 세포의 성장 및 생존에 미치는 영향을 확인하였다. 전체 세포수 및 생존세포의 비율을 각각 도 13c 및 도 13d에 나타내었다. 세포 생존률은 트립판 블루 염색이 되지 않은 세포(살아있는 세포)의 퍼센트로 측정되었다. 실험은 독립적으로 최소 3번 반복되었으며 평균±표준오차로 표시되었다.
- [309] 그 결과, 도 13c 및 도 13d에 나타난 바와 같이 외인성 HGF 및/또는 VEGF 단백질은 Neuro2A 세포의 신경돌기 성장 및 세포 성장을 증가시키는 것을 확인하였다.
- [310]
- [311] <8-3> HGF 및 VEGF에 의한 손상 척수 조직의 신경돌기 성장 증가 확인
- [312] 상기 실시예 7-1과 동일한 방법으로 척수조직 절편의 신경섬유를 NF-M 항체 및 Alexa 546 항체(빨간색)로 염색하였다. 배양 7일째의 척수조직 절편을 0.5 mg/ml 라이소레시틴(lysolecithin)으로 17시간 동안 처리한 다음, 0, 12.5, 25, 50 및 100 ng/ml의 재조합 HGF 및/또는 VEGF 단백질을 각각 포함하는 배지에서 1주일간 배양하였다. 이후, 척수조직 절편에서 NF-M 면역형광 염색된 신경섬유의 상대적인 상대적인 통합 광학 밀도(IOD) 값을 상기 실시예 7-1과 동일한 방법으로 측정하였고, 상기 통합 광학 밀도는 대조군 척수조직 절편으로 표준화되었다. 그래프 가로축의 농도 단위(ng/ml)는 HGF 단독, VEGF 단독, 또는 HGF+VEGF의 혼합 농도를 지칭한다. 막대그래프는 최소 5개 조직 절편의 평균±표준오차를 나타낸다.
- [313] 그 결과, 도 13e 및 도 13f에서 나타난 바와 같이 외인성 HGF 및/또는 VEGF 단백질이 손상된 척수조직 절편의 신경돌기 성장을 증가시키는 것을 확인하였다.
- [314]

### 서열목록 Free Text

- [315] <110> Seoul National University Industry Foundation  
 [316]  
 [317] <120> Differentiation method of adipose-derived mesenchymal stem cells into neural stem cells, neural cells, and GABAergic neural cells  
 [318]  
 [319] <130> 2016FPO-06-002\_PCT  
 [320]  
 [321] <150> KR 10-2016-0044968  
 [322] <151> 2016-04-12  
 [323]  
 [324] <150> KR 10-2016-0088435  
 [325] <151> 2016-07-13  
 [326]  
 [327] <160> 56  
 [328]  
 [329] <170> KopatentIn 2.0  
 [330]  
 [331] <210> 1  
 [332] <211> 19  
 [333] <212> DNA  
 [334] <213> Artificial Sequence  
 [335]  
 [336] <220>  
 [337] <223> CALB2 F  
 [338]  
 [339]  
 [340] <400> 1  
 [341] ctccaggaat acacccaaa 19  
 [342]  
 [343]  
 [344] <210> 2  
 [345] <211> 20  
 [346] <212> DNA  
 [347] <213> Artificial Sequence  
 [348]  
 [349] <220>

[350] <223> CALB2 R  
[351]  
[352]  
[353] <400> 2  
[354] cagctcatgc tcgtcaatgt 20  
[355]  
[356]  
[357] <210> 3  
[358] <211> 20  
[359] <212> DNA  
[360] <213> Artificial Sequence  
[361]  
[362] <220>  
[363] <223> Dlx2 F  
[364]  
[365]  
[366] <400> 3  
[367] gcacatgggt tctaccagt 20  
[368]  
[369]  
[370] <210> 4  
[371] <211> 20  
[372] <212> DNA  
[373] <213> Artificial Sequence  
[374]  
[375] <220>  
[376] <223> Dlx2 R  
[377]  
[378]  
[379] <400> 4  
[380] tccttctcag gctcgttgtt 20  
[381]  
[382]  
[383] <210> 5  
[384] <211> 20  
[385] <212> DNA  
[386] <213> Artificial Sequence  
[387]

[388] <220>  
[389] <223> Dlx5 F  
[390]  
[391]  
[392] <400> 5  
[393] ccaaccagcc agagaaagaa 20  
[394]  
[395]  
[396] <210> 6  
[397] <211> 20  
[398] <212> DNA  
[399] <213> Artificial Sequence  
[400]  
[401] <220>  
[402] <223> Dlx5 R  
[403]  
[404]  
[405] <400> 6  
[406] gcaaggcgag gtactgagtc 20  
[407]  
[408]  
[409] <210> 7  
[410] <211> 21  
[411] <212> DNA  
[412] <213> Artificial Sequence  
[413]  
[414] <220>  
[415] <223> Emx1 F  
[416]  
[417]  
[418] <400> 7  
[419] aagcgcggct ttacataga g 21  
[420]  
[421]  
[422] <210> 8  
[423] <211> 19  
[424] <212> DNA  
[425] <213> Artificial Sequence

[426]  
[427] <220>  
[428] <223> Emx1 R  
[429]  
[430]  
[431] <400> 8  
[432] gctggggtga gggtagttg 19  
[433]  
[434]  
[435] <210> 9  
[436] <211> 21  
[437] <212> DNA  
[438] <213> Artificial Sequence  
[439]  
[440] <220>  
[441] <223> FoxG1 F  
[442]  
[443]  
[444] <400> 9  
[445] agaagaacgg caagtacgag a 21  
[446]  
[447]  
[448] <210> 10  
[449] <211> 21  
[450] <212> DNA  
[451] <213> Artificial Sequence  
[452]  
[453] <220>  
[454] <223> FoxG1 R  
[455]  
[456]  
[457] <400> 10  
[458] tggtgaggga cagattgtgg c 21  
[459]  
[460]  
[461] <210> 11  
[462] <211> 21  
[463] <212> DNA

[464] <213> Artificial Sequence  
[465]  
[466] <220>  
[467] <223> GABRA1 F  
[468]  
[469]  
[470] <400> 11  
[471] ggattgggag agcgtgtaac c 21  
[472]  
[473]  
[474] <210> 12  
[475] <211> 19  
[476] <212> DNA  
[477] <213> Artificial Sequence  
[478]  
[479] <220>  
[480] <223> GABRA1 R  
[481]  
[482]  
[483] <400> 12  
[484] tgaaacgggt ccgaaactg 19  
[485]  
[486]  
[487] <210> 13  
[488] <211> 20  
[489] <212> DNA  
[490] <213> Artificial Sequence  
[491]  
[492] <220>  
[493] <223> GABRA2 F  
[494]  
[495]  
[496] <400> 13  
[497] gttcaagctg aatgcccaat 20  
[498]  
[499]  
[500] <210> 14  
[501] <211> 20

[502] <212> DNA  
[503] <213> Artificial Sequence  
[504]  
[505] <220>  
[506] <223> GABRA2 R  
[507]  
[508]  
[509] <400> 14  
[510] acctagagcc atcaggagca 20  
[511]  
[512]  
[513] <210> 15  
[514] <211> 19  
[515] <212> DNA  
[516] <213> Artificial Sequence  
[517]  
[518] <220>  
[519] <223> GABRA5 F  
[520]  
[521]  
[522] <400> 15  
[523] atcttgatg ggctcttg 19  
[524]  
[525]  
[526] <210> 16  
[527] <211> 20  
[528] <212> DNA  
[529] <213> Artificial Sequence  
[530]  
[531] <220>  
[532] <223> GABRA5 R  
[533]  
[534]  
[535] <400> 16  
[536] tgtactccat ttccgtgctg 20  
[537]  
[538]  
[539] <210> 17

[540] <211> 20  
[541] <212> DNA  
[542] <213> Artificial Sequence  
[543]  
[544] <220>  
[545] <223> GAD65 F  
[546]  
[547]  
[548] <400> 17  
[549] ggtggctcca gtgattaaag 20  
[550]  
[551]  
[552] <210> 18  
[553] <211> 20  
[554] <212> DNA  
[555] <213> Artificial Sequence  
[556]  
[557] <220>  
[558] <223> GAD65 R  
[559]  
[560]  
[561] <400> 18  
[562] tgtccaaggc gttctatttc 20  
[563]  
[564]  
[565] <210> 19  
[566] <211> 19  
[567] <212> DNA  
[568] <213> Artificial Sequence  
[569]  
[570] <220>  
[571] <223> GAD67 F  
[572]  
[573]  
[574] <400> 19  
[575] aggcaatcct ccaagaacc 19  
[576]  
[577]

[578] <210> 20  
[579] <211> 19  
[580] <212> DNA  
[581] <213> Artificial Sequence  
[582]  
[583] <220>  
[584] <223> GAD67 R  
[585]  
[586]  
[587] <400> 20  
[588] tgaaagtcca gcaccttg 19  
[589]  
[590]  
[591] <210> 21  
[592] <211> 20  
[593] <212> DNA  
[594] <213> Artificial Sequence  
[595]  
[596] <220>  
[597] <223> GFAP F  
[598]  
[599]  
[600] <400> 21  
[601] caacctgcag attcgagaaa 20  
[602]  
[603]  
[604] <210> 22  
[605] <211> 20  
[606] <212> DNA  
[607] <213> Artificial Sequence  
[608]  
[609] <220>  
[610] <223> GFAP R  
[611]  
[612]  
[613] <400> 22  
[614] gtctgcctc acatcacatc 20  
[615]

- [616]
- [617] <210> 23
- [618] <211> 21
- [619] <212> DNA
- [620] <213> Artificial Sequence
- [621]
- [622] <220>
- [623] <223> Gli3 F
- [624]
- [625]
- [626] <400> 23
- [627] tggttacatg gagccccact a 21
- [628]
- [629]
- [630] <210> 24
- [631] <211> 23
- [632] <212> DNA
- [633] <213> Artificial Sequence
- [634]
- [635] <220>
- [636] <223> Gli3 R
- [637]
- [638]
- [639] <400> 24
- [640] gaatcggaga tggatcgtaa tgg 23
- [641]
- [642]
- [643] <210> 25
- [644] <211> 20
- [645] <212> DNA
- [646] <213> Artificial Sequence
- [647]
- [648] <220>
- [649] <223> LHX6 F
- [650]
- [651]
- [652] <400> 25
- [653] gggcgcgtca taaaagcac 20

[654]  
[655]  
[656] <210> 26  
[657] <211> 20  
[658] <212> DNA  
[659] <213> Artificial Sequence  
[660]  
[661] <220>  
[662] <223> LHX6 R  
[663]  
[664]  
[665] <400> 26  
[666] tgaacggggt gtagtgatg 20  
[667]  
[668]  
[669] <210> 27  
[670] <211> 23  
[671] <212> DNA  
[672] <213> Artificial Sequence  
[673]  
[674] <220>  
[675] <223> Map2 F  
[676]  
[677]  
[678] <400> 27  
[679] cgctcagaca ccctcagat aac 23  
[680]  
[681]  
[682] <210> 28  
[683] <211> 23  
[684] <212> DNA  
[685] <213> Artificial Sequence  
[686]  
[687] <220>  
[688] <223> Map2 R  
[689]  
[690]  
[691] <400> 28

[692]     aaatcatcct cgatggcac aac 23  
[693]  
[694]  
[695]     <210> 29  
[696]     <211> 19  
[697]     <212> DNA  
[698]     <213> Artificial Sequence  
[699]  
[700]     <220>  
[701]     <223> Mash1 F  
[702]  
[703]  
[704]     <400> 29  
[705]     tgcactccaa tcattcacg 19  
[706]  
[707]  
[708]     <210> 30  
[709]     <211> 20  
[710]     <212> DNA  
[711]     <213> Artificial Sequence  
[712]  
[713]     <220>  
[714]     <223> Mash1 R  
[715]  
[716]  
[717]     <400> 30  
[718]     gtgcgtgta gaggtgatgg 20  
[719]  
[720]  
[721]     <210> 31  
[722]     <211> 21  
[723]     <212> DNA  
[724]     <213> Artificial Sequence  
[725]  
[726]     <220>  
[727]     <223> Musashi F  
[728]  
[729]

[730] <400> 31  
[731] ttcgggttg tcacgttga g 21  
[732]  
[733]  
[734] <210> 32  
[735] <211> 20  
[736] <212> DNA  
[737] <213> Artificial Sequence  
[738]  
[739] <220>  
[740] <223> Musashi R  
[741]  
[742]  
[743] <400> 32  
[744] ggcctgtata actccggctg 20  
[745]  
[746]  
[747] <210> 33  
[748] <211> 21  
[749] <212> DNA  
[750] <213> Artificial Sequence  
[751]  
[752] <220>  
[753] <223> Nestin F  
[754]  
[755]  
[756] <400> 33  
[757] cacctgtgcc agcctttctt a 21  
[758]  
[759]  
[760] <210> 34  
[761] <211> 20  
[762] <212> DNA  
[763] <213> Artificial Sequence  
[764]  
[765] <220>  
[766] <223> Nestin R  
[767]

[768]  
[769] <400> 34  
[770] tttcctccca ccctgtgtct 20  
[771]  
[772]  
[773] <210> 35  
[774] <211> 19  
[775] <212> DNA  
[776] <213> Artificial Sequence  
[777]  
[778] <220>  
[779] <223> NKX2.1 F  
[780]  
[781]  
[782] <400> 35  
[783] gtgagcaaga acatggccc 19  
[784]  
[785]  
[786] <210> 36  
[787] <211> 20  
[788] <212> DNA  
[789] <213> Artificial Sequence  
[790]  
[791] <220>  
[792] <223> NKX2.1 R  
[793]  
[794]  
[795] <400> 36  
[796] aaccagatct tgacctgctg 20  
[797]  
[798]  
[799] <210> 37  
[800] <211> 20  
[801] <212> DNA  
[802] <213> Artificial Sequence  
[803]  
[804] <220>  
[805] <223> Olig2 F

[806]  
[807]  
[808] <400> 37  
[809] gctgcgacga ctatcttccc 20  
[810]  
[811]  
[812] <210> 38  
[813] <211> 19  
[814] <212> DNA  
[815] <213> Artificial Sequence  
[816]  
[817] <220>  
[818] <223> Olig2 R  
[819]  
[820]  
[821] <400> 38  
[822] gcctcctagc ttgtcccca 19  
[823]  
[824]  
[825] <210> 39  
[826] <211> 21  
[827] <212> DNA  
[828] <213> Artificial Sequence  
[829]  
[830] <220>  
[831] <223> Pax6 F  
[832]  
[833]  
[834] <400> 39  
[835] aggtattacg agactggctc c 21  
[836]  
[837]  
[838] <210> 40  
[839] <211> 22  
[840] <212> DNA  
[841] <213> Artificial Sequence  
[842]  
[843] <220>

[844] <223> Pax6 R  
[845]  
[846]  
[847] <400> 40  
[848] tcccgcttat actgggctat tt 22  
[849]  
[850]  
[851] <210> 41  
[852] <211> 20  
[853] <212> DNA  
[854] <213> Artificial Sequence  
[855]  
[856] <220>  
[857] <223> SCN5A F  
[858]  
[859]  
[860] <400> 41  
[861] ggatcgagac catgtgggac 20  
[862]  
[863]  
[864] <210> 42  
[865] <211> 20  
[866] <212> DNA  
[867] <213> Artificial Sequence  
[868]  
[869] <220>  
[870] <223> SCN5A R  
[871]  
[872]  
[873] <400> 42  
[874] gctgtgaggt tgtctgcact 20  
[875]  
[876]  
[877] <210> 43  
[878] <211> 21  
[879] <212> DNA  
[880] <213> Artificial Sequence  
[881]

- [882] <220>  
[883] <223> Sox1 F  
[884]  
[885]  
[886] <400> 43  
[887] agatgccaca ctcggagatc a 21  
[888]  
[889]  
[890] <210> 44  
[891] <211> 24  
[892] <212> DNA  
[893] <213> Artificial Sequence  
[894]  
[895] <220>  
[896] <223> Sox1 R  
[897]  
[898]  
[899] <400> 44  
[900] gagtacttgt cctccttgag cagc 24  
[901]  
[902]  
[903] <210> 45  
[904] <211> 20  
[905] <212> DNA  
[906] <213> Artificial Sequence  
[907]  
[908] <220>  
[909] <223> Sox2 F  
[910]  
[911]  
[912] <400> 45  
[913] agtctccaag cgacgaaaaa 20  
[914]  
[915]  
[916] <210> 46  
[917] <211> 20  
[918] <212> DNA  
[919] <213> Artificial Sequence

[920]  
[921] <220>  
[922] <223> Sox2 R  
[923]  
[924]  
[925] <400> 46  
[926] gcaagaagcc tctccttgaa 20  
[927]  
[928]  
[929] <210> 47  
[930] <211> 20  
[931] <212> DNA  
[932] <213> Artificial Sequence  
[933]  
[934] <220>  
[935] <223> TuJ1 F  
[936]  
[937]  
[938] <400> 47  
[939] ggcctttgga catctctca 20  
[940]  
[941]  
[942] <210> 48  
[943] <211> 20  
[944] <212> DNA  
[945] <213> Artificial Sequence  
[946]  
[947] <220>  
[948] <223> TuJ1 R  
[949]  
[950]  
[951] <400> 48  
[952] atactectca cgcaccttgc 20  
[953]  
[954]  
[955] <210> 49  
[956] <211> 21  
[957] <212> DNA

- [958] <213> Artificial Sequence  
[959]  
[960] <220>  
[961] <223> Vimentin F  
[962]  
[963]  
[964] <400> 49  
[965] agaactttgc cgttgaagct g 21  
[966]  
[967]  
[968] <210> 50  
[969] <211> 23  
[970] <212> DNA  
[971] <213> Artificial Sequence  
[972]  
[973] <220>  
[974] <223> Vimentin R  
[975]  
[976]  
[977] <400> 50  
[978] ccagagggag tgaatccaga tta 23  
[979]  
[980]  
[981] <210> 51  
[982] <211> 20  
[983] <212> DNA  
[984] <213> Artificial Sequence  
[985]  
[986] <220>  
[987] <223> GAPDH F  
[988]  
[989]  
[990] <400> 51  
[991] gtcagtgggtg gacctgacct 20  
[992]  
[993]  
[994] <210> 52  
[995] <211> 20

- [996] <212> DNA  
[997] <213> Artificial Sequence  
[998]  
[999] <220>  
[1000] <223> GAPDH R  
[1001]  
[1002]  
[1003] <400> 52  
[1004] caccaccctg ttgctgtagc 20  
[1005]  
[1006]  
[1007] <210> 53  
[1008] <211> 18  
[1009] <212> DNA  
[1010] <213> Artificial Sequence  
[1011]  
[1012] <220>  
[1013] <223> HGF F  
[1014]  
[1015]  
[1016] <400> 53  
[1017] atgctcatgg accctggt 18  
[1018]  
[1019]  
[1020] <210> 54  
[1021] <211> 18  
[1022] <212> DNA  
[1023] <213> Artificial Sequence  
[1024]  
[1025] <220>  
[1026] <223> HGF R  
[1027]  
[1028]  
[1029] <400> 54  
[1030] gcctggcaag cttcatta 18  
[1031]  
[1032]  
[1033] <210> 55

- [1034] <211> 20
- [1035] <212> DNA
- [1036] <213> Artificial Sequence
- [1037]
- [1038] <220>
- [1039] <223> VEGF F
- [1040]
- [1041]
- [1042] <400> 55
- [1043] gccttgctgc tctacctcca 20
- [1044]
- [1045]
- [1046] <210> 56
- [1047] <211> 19
- [1048] <212> DNA
- [1049] <213> Artificial Sequence
- [1050]
- [1051] <220>
- [1052] <223> VEGF R
- [1053]
- [1054]
- [1055] <400> 56
- [1056] caaggccac agggatttt 19
- [1057]
- [1058]

## 청구범위

- [청구항 1] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;  
2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계; 및  
3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF)를 첨가한 배지에서 3차 배양하는 단계;  
를 포함하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포(neural stem cell)로 분화시키는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 BMP 억제제는 Noggin 및 LDN193189인 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 Noggin은 0.01 내지 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가되고 LDN193189은 0.1 내지 20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 TGF 베타 신호전달 저해제는 ALK(activin receptor-like kinase) 수용체 저해제인 SB431542인 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 SB431542는 1 내지 200  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 1차 배양은 6 내지 10일, 상기 단계 2)의 2차 배양은 3 내지 7일, 및 상기 단계 3)의 3차 배양은 5 내지 9일 동안 실시하는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 7] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;  
2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계;  
3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor;

bFGF)를 첨가한 배지에서 3차 배양하여 신경줄기세포로 분화시키는 단계; 및

4) 상기 단계 3)의 신경줄기세포를 purmorphamine 및 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)를 첨가한 배지에서 4차 배양하는 단계;

를 포함하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포(neural cell)로 분화시키는 방법.

[청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 단계 4)의 purmorphamine은 0.1 내지 50  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가되고 BDNF은 1 내지 500 ng/ml의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.

[청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 단계 4)의 4차 배양은 10 내지 16일 동안 실시하는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.

[청구항 10] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cell; ADSC)를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;

2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계;

3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 purmorphamine 및 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)를 첨가한 배지에서 3차 배양하여 신경세포로 분화시키는 단계; 및

4) 상기 단계 3)을 통해 분화된 신경세포를 dbcAMP(dibutyl cyclic AMP) 및 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)를 첨가한 배지에서 4차 배양하는 단계;

를 포함하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포(GABAergic neural cells)로 분화시키는 방법.

[청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 단계 4)의 dbcAMP는 0.01 내지 1 mM의 농도로 첨가되고 BDNF은 1 내지 500 ng/ml의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포로 분화시키는 방법.

[청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 단계 4)의 4차 배양은 10 내지 22일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포로 분화시키는 방법.

[청구항 13] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;

2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를

포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계; 및  
 3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 표피성장인자(EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF)를 첨가한 배지에서 3차 배양하는 단계; 를 포함하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포의 제조방법.

[청구항 14] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;  
 2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계;  
 3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 표피성장인자(EGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(bFGF)를 첨가한 배지에서 3차 배양하여 신경줄기세포로 분화시키는 단계; 및  
 4) 상기 단계 3)의 신경줄기세포를 purmorphamine 및 BDNF를 첨가한 배지에서 4차 배양하는 단계; 를 포함하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경세포의 제조방법.

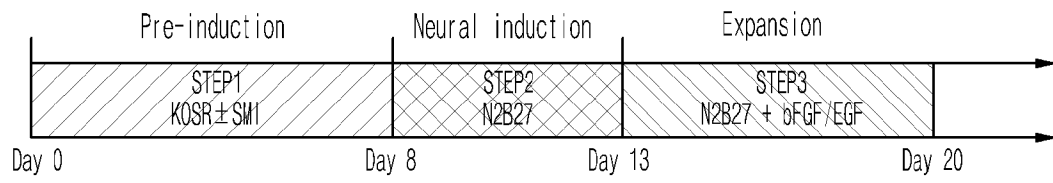
[청구항 15] 1) 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 BMP(Bone morphogenic protein) 억제제, TGF(Transforming growth factor) 베타 신호전달 저해제를 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;  
 2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 B27, N2, 및 ascorbic acid를 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계;  
 3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 purmorphamine 및 BDNF를 첨가한 배지에서 3차 배양하여 신경세포로 분화시키는 단계; 및  
 4) 상기 단계 3)에서 분화된 신경세포를 dbcAMP 및 BDNF를 첨가한 배지에서 4차 배양하는 단계; 를 포함하는, 지방세포 유래 중간엽 줄기세포로부터 가바성 신경세포의 제조방법.

[청구항 16] 1) 사람 골수 유래 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cell; hMSC)를 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 베타-머캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol)을 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;  
 2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 우태아혈청 및 레티노산(retinoic acid; RA)을 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계; 및  
 3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 포스콜린(forskolin), 염기성 섬유모세포성장인자(basic-fibroblast growth factor; bFGF), 혈소판유래 성장인자-AA(platelet derived growth factor-AA; PDGF-AA) 및 헤레굴린-베타1(heregulin- $\beta$ 1; HRG- $\beta$ 1)을 첨가한 배지에서 3차 배양하는

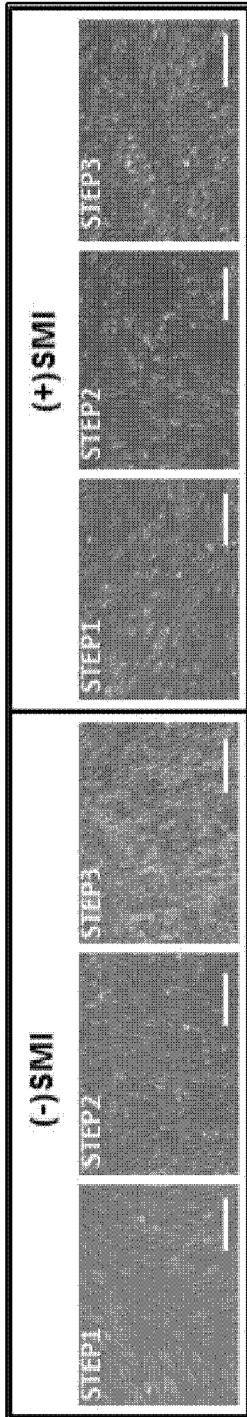
- 단계;  
 를 포함하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포(growth factor releasing human mesenchymal stem cell)로 분화시키는 방법.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 단계 1)의 우태아혈청은 1 내지 20% 및 베타-머캅토에탄올은 0.1 내지 10 mM의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 18] 제 16항에 있어서, 상기 단계 2)의 우태아혈청은 1 내지 20% 및 레티노산은 0.05 내지 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 19] 제 16항에 있어서, 상기 단계 3)의 포스콜린은 1 내지 100  $\mu\text{M}$ , 염기성 섬유세포성장인자는 1 내지 100 ng/ml, 혈소판유래 성장인자는 1 내지 50 ng/ml 및 헤레굴린-베타는 20 내지 2  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 20] 제 16항에 있어서, 상기 단계 1)의 1차 배양은 12 내지 48시간, 단계 2)의 2차 배양은 1일 내지 5일, 상기 단계 3)의 3차 배양은 5일 내지 10일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 21] 제 16항에 있어서, 상기 성장인자는 VEGF(vescular endothelial growth factor) 또는 HGF(hepatocyte growth factor)인 것을 특징으로 하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 22] 1) 사람 골수 유래 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cell; hMSC)를 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 베타-머캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol)을 포함하는 배지에서 1차 배양하는 단계;  
 2) 상기 단계 1)을 통해 배양된 세포를 우태아혈청 및 레티노산(retinoic acid; RA)을 포함하는 배지에서 2차 배양하는 단계; 및  
 3) 상기 단계 2)를 통해 배양된 세포를 포스콜린(forskolin), 염기성 섬유모세포성장인자(basic-fibroblast growth factor; bFGF), 혈소판유래 성장인자-AA(platelet derived growth factor-AA; PDGF-AA) 및 헤레굴린-베타1(heregulin- $\beta$ 1; HRG- $\beta$ 1)을 첨가한 배지에서 3차 배양하는 단계;  
 를 포함하는, 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 23] 제 13항의 방법으로부터 제조된 신경줄기세포.
- [청구항 24] 제 14항의 방법으로부터 제조된 신경세포.
- [청구항 25] 제 15항의 방법으로부터 제조된 가바성 신경세포.
- [청구항 26] 제 22항의 방법으로부터 제조된 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포.

- [청구항 27] 제 23항, 제 24항, 제 25항 또는 제 26항의 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 신경 손상 세포 치료용 조성물.
- [청구항 28] 제 27항에 있어서, 상기 신경 손상은 뇌졸중 (stroke), 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 피크병 (Pick's disease), 헌팅톤병 (Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis), 외상성 중추 신경계 질환 (traumatic central nervous system diseases) 및 척수 손상 질환 (spinal cord injury disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 치료용 조성물.
- [청구항 29] 제 23항, 제 24항, 제 25항 또는 제 26항의 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 신경 손상 세포치료제 스크리닝용 조성물.
- [청구항 30] 제 23항, 제 24항, 제 25항 또는 제 26항의 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 시신경 손상 관련 질환 예방 및 치료용 조성물.
- [청구항 31] 제 30항에 있어서, 상기 시신경 손상 관련 질환은 망막 황반 변성, 녹내장, 시신경염(optic neuritis), 허혈시신경병증(ischemic optic neuropathy), 외상시신경병증(traumatic optic neuropathy), 영양시신경병증(nutritional optic neuropathy), 중독시신경병증(toxic optic neuropathy), 유전시신경병증(hereditary optic neuropathy), 시신경유두결손(optic disc coloboma), 시신경위축(optic atropy), 시신경병증 및 시신경 세포 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 시신경 손상 관련 질환 예방 및 치료용 조성물.
- [청구항 32] 제 23항, 제 24항, 제 25항 또는 제 26항의 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 인공 망막 제조용 조성물.
- [청구항 33] 제 26항의 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 개체내 HGF 또는 VEGF 전달용 조성물.
- [청구항 34] 1) 미분화 인간 중간엽 줄기세포(uhMSC)를 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 단계; 및,  
2) 상기 단계 1)에서 분화된 줄기세포를 신경 손상 질환을 가지는 개체내로 투여하는 단계를 포함하는 HGF 또는 VEGF의 개체내 운반 방법.
- [청구항 35] 미분화 인간 중간엽 줄기세포(uhMSC)를 성장인자를 다량 분비하는 인간 줄기세포로 분화시키는 단계를 포함하는 HGF 또는 VEGF의 생산 방법.

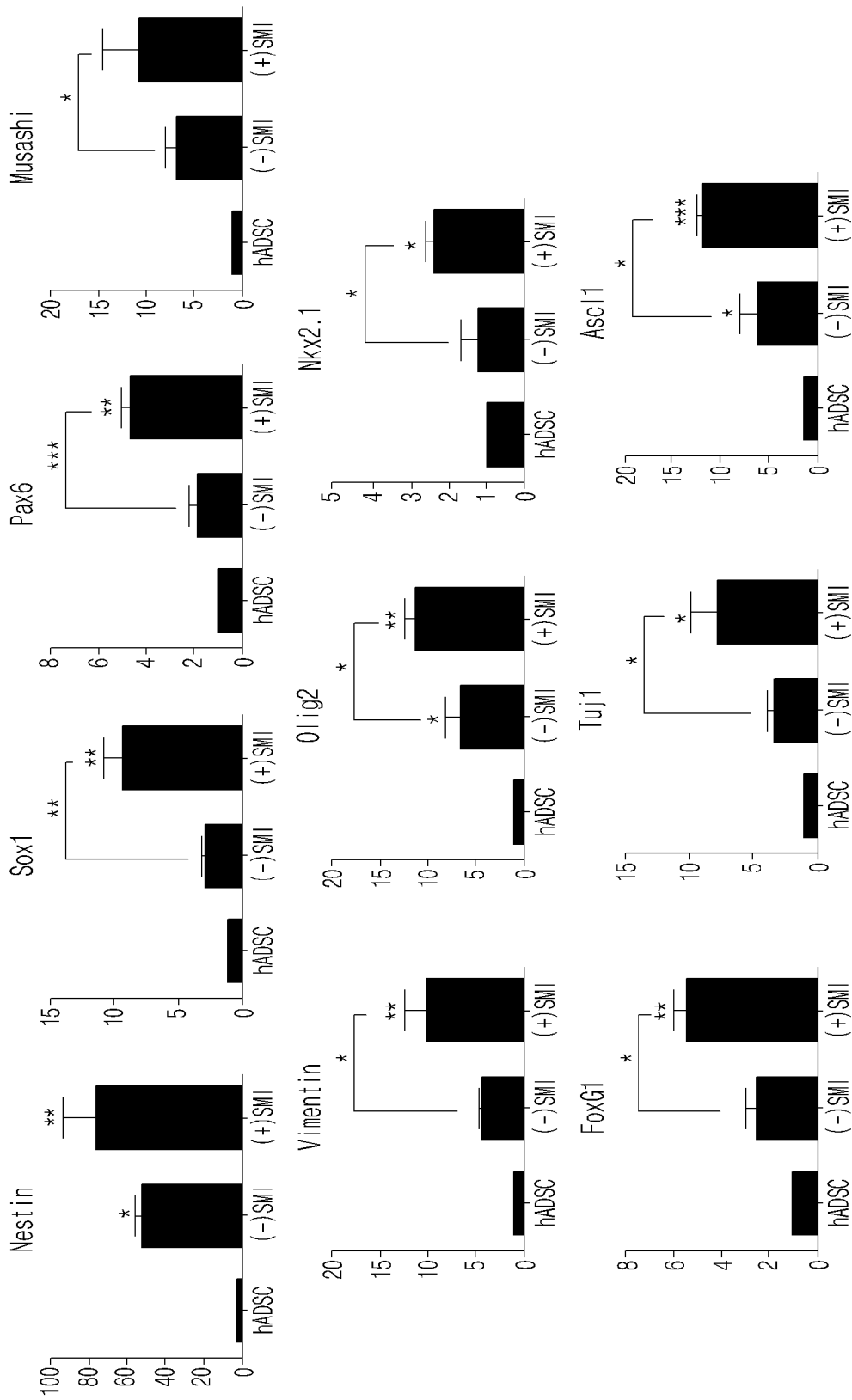
[도 1a]



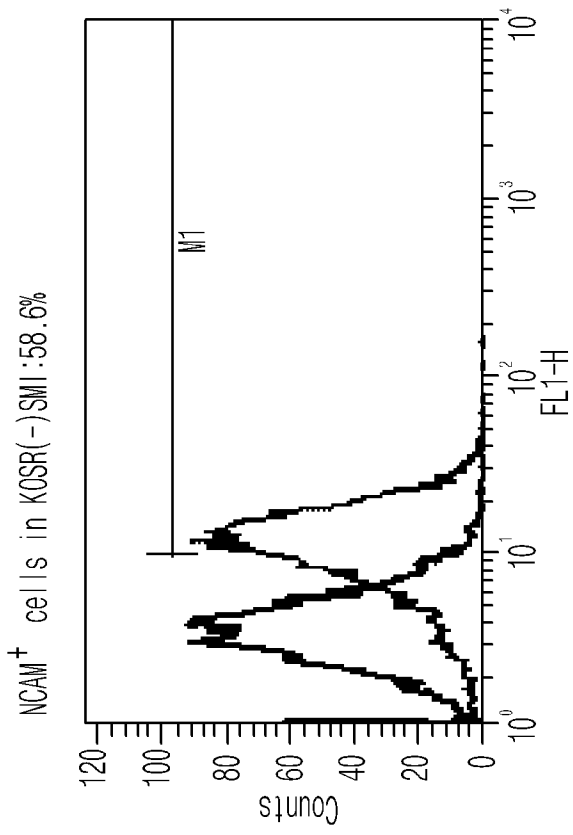
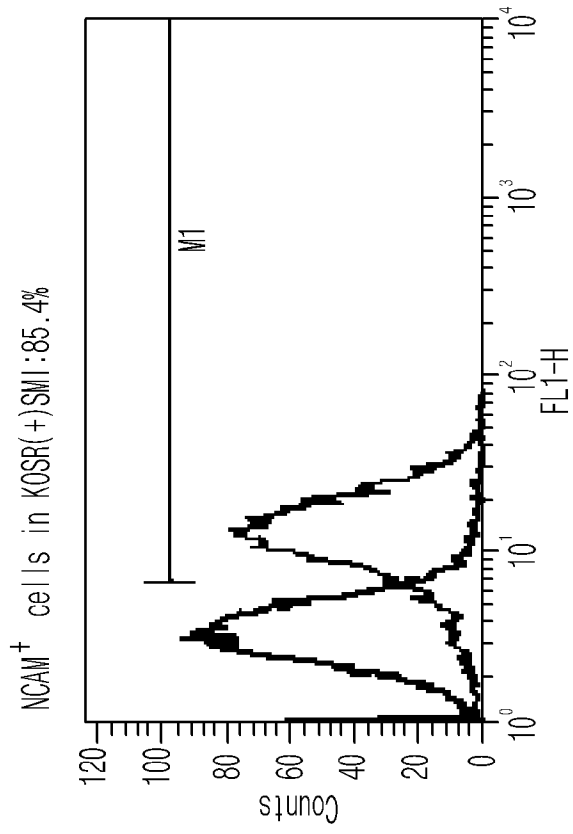
[도 1b]



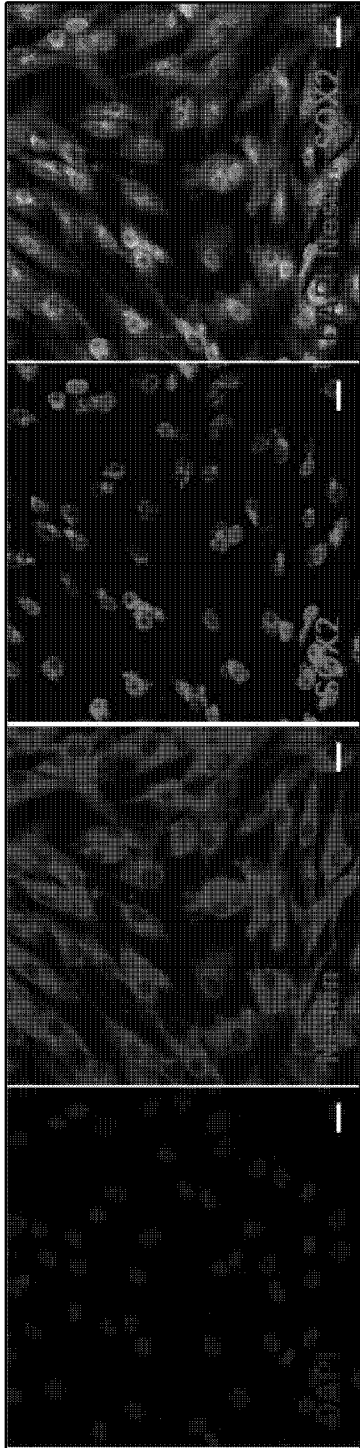
[Fig 1c]



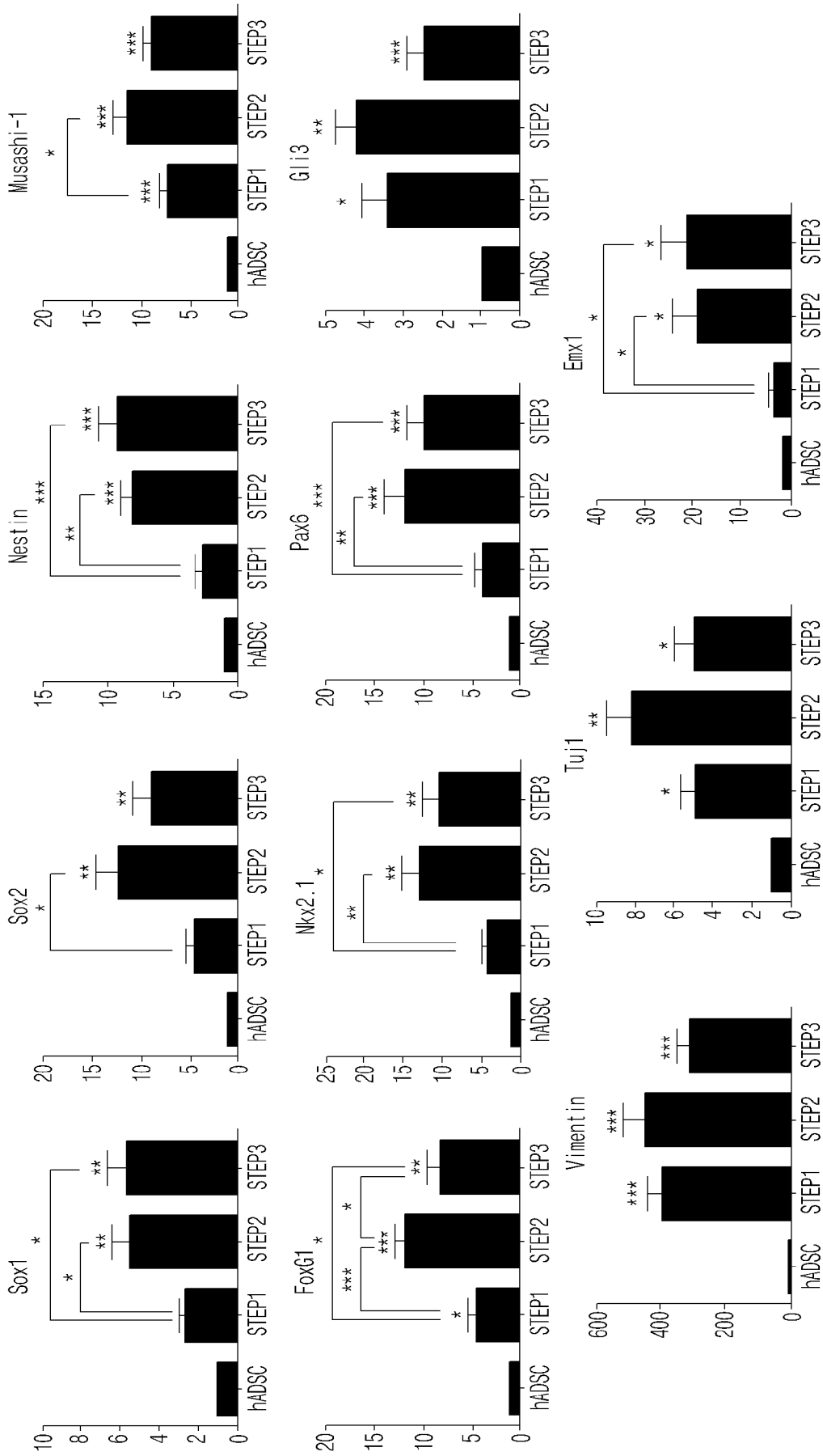
[도1d]



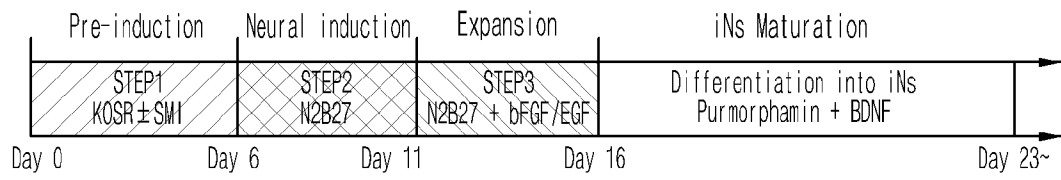
[도2a]



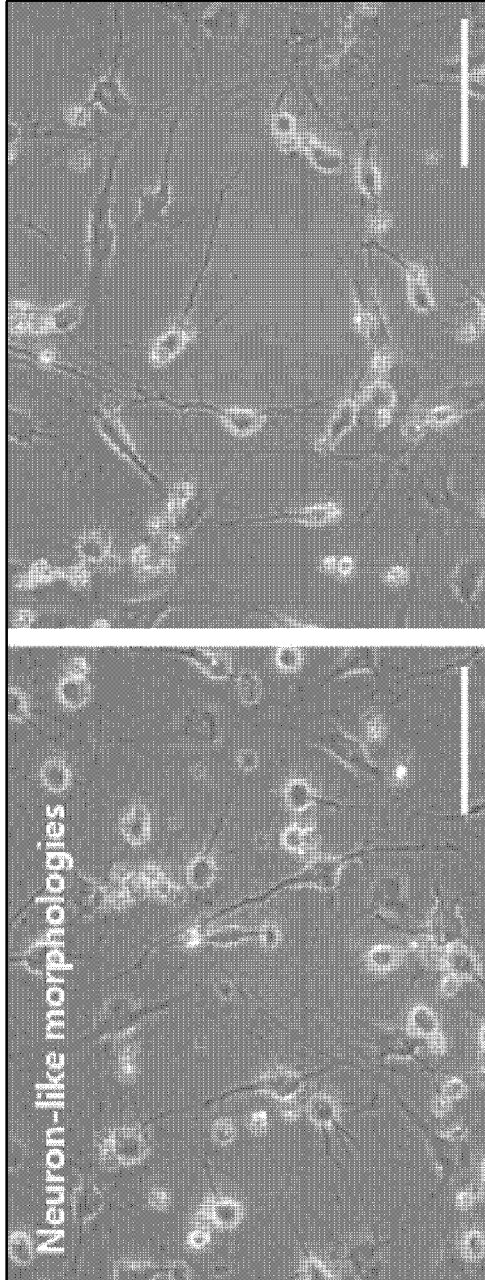
[도2b]



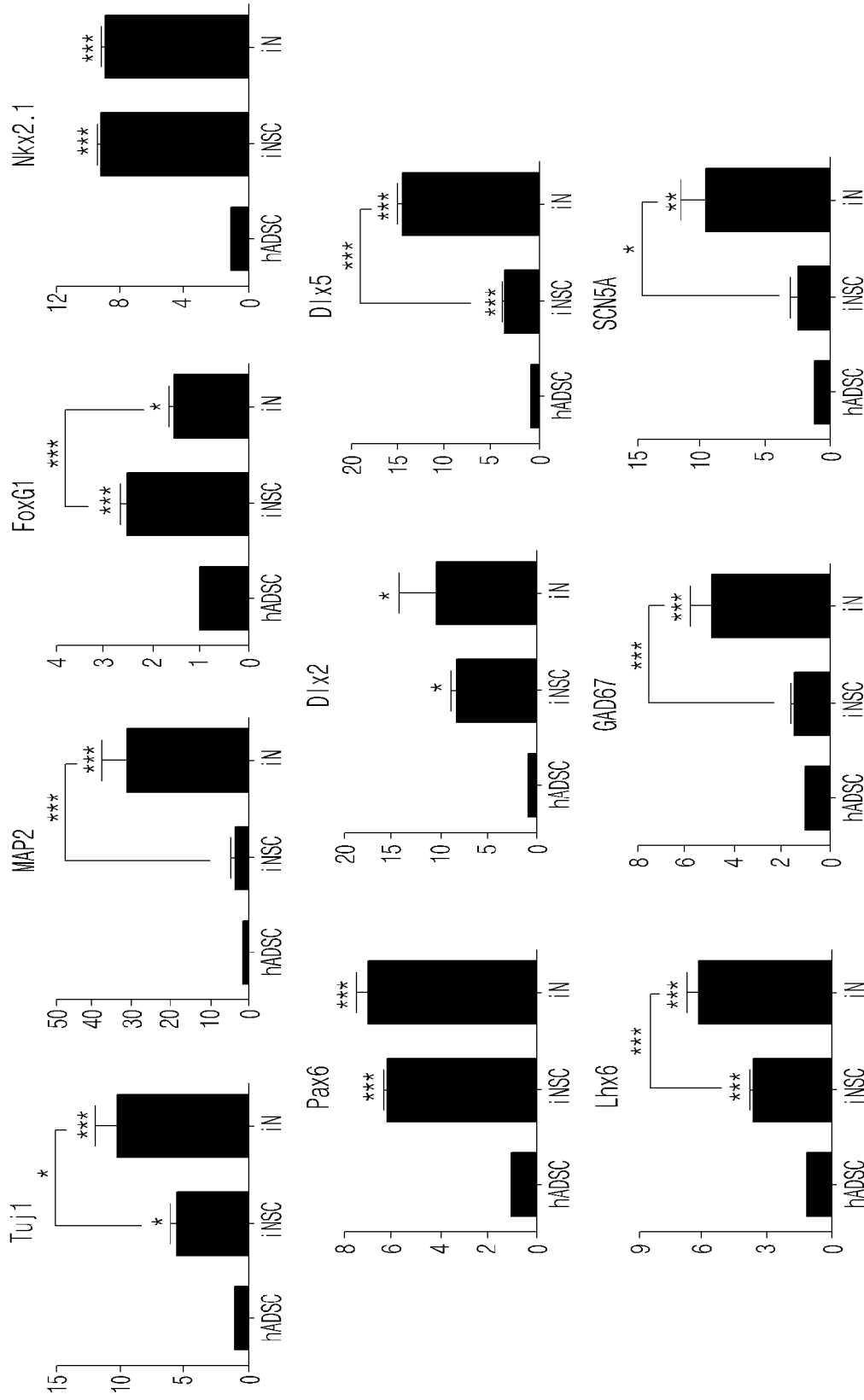
[도3a]



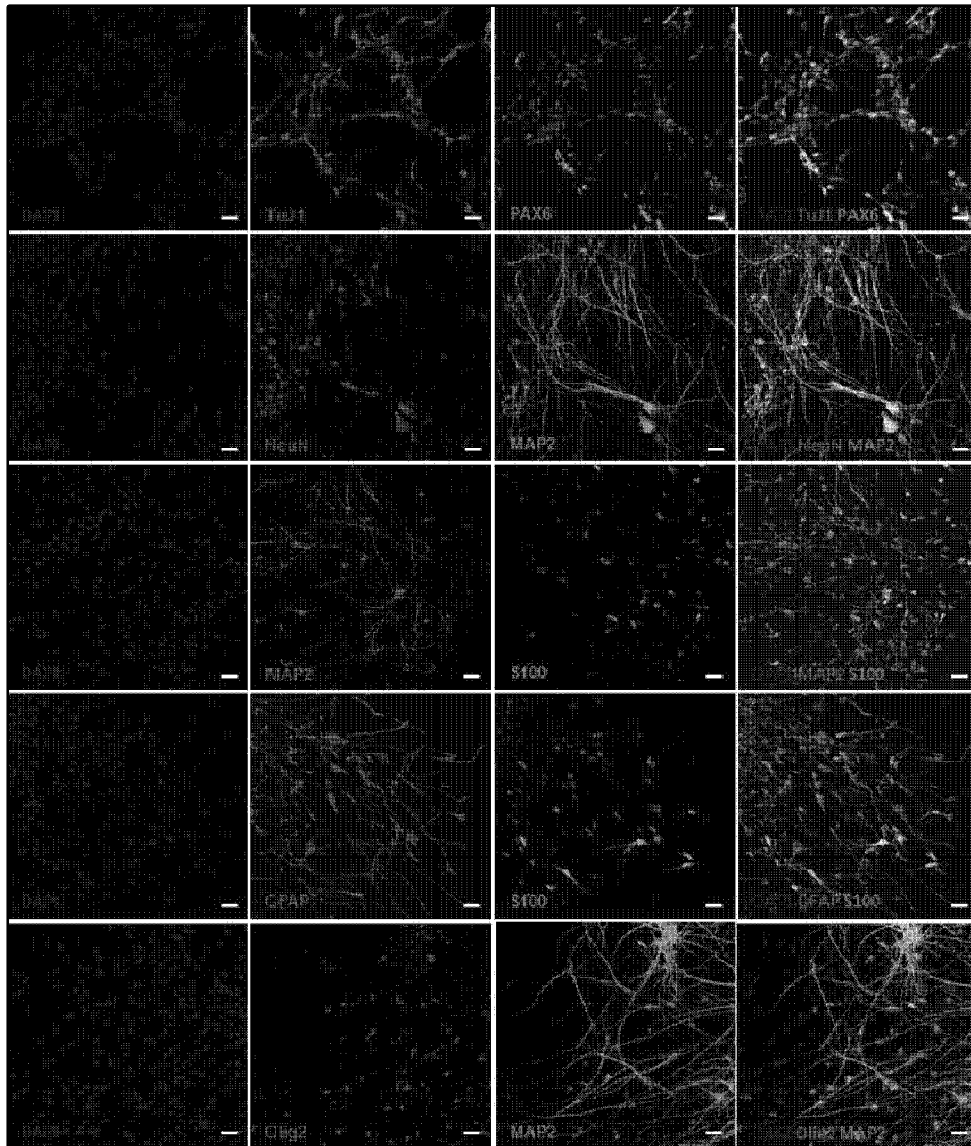
[도3b]



[Fig. 3c]



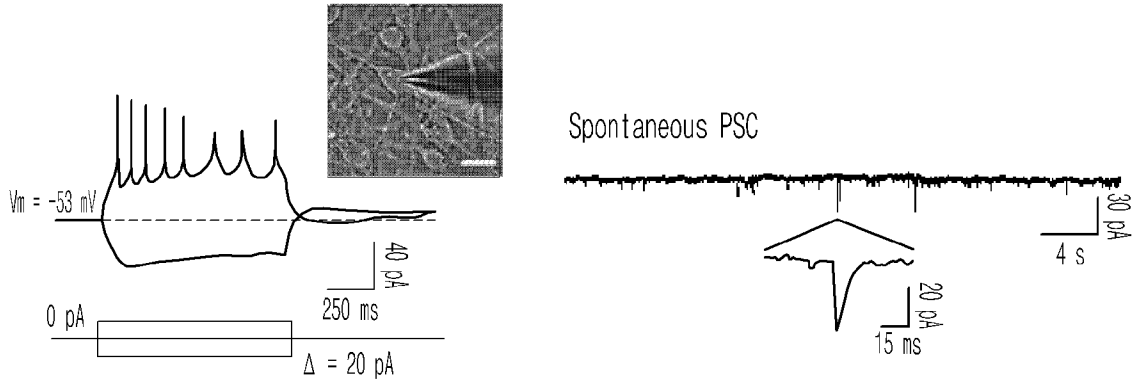
[도4a]



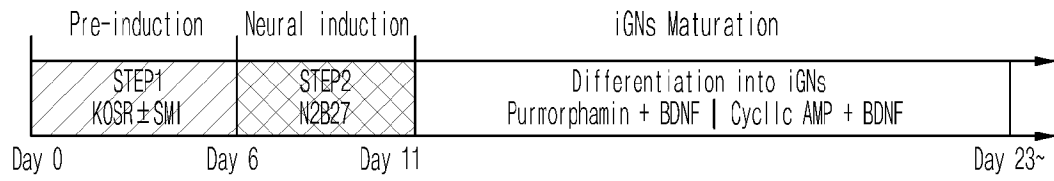
[도4b]

	Markers	Percentage
TuJ1 & PAX6	TuJ1 <sup>+</sup>	90.37 ± 4.81
	PAX6 <sup>+</sup>	79.17 ± 3.45
	PAX6 <sup>+</sup> /TuJ1 <sup>+</sup>	75.16 ± 4.78
NeuN & MAP2	NeuN <sup>+</sup>	92.93 ± 1.35
	MAP2 <sup>+</sup>	93.45 ± 1.38
	MAP2 <sup>+</sup> /NeuN <sup>+</sup>	87.85 ± 1.14
MAP2 & S100	MAP2 <sup>+</sup>	75.07 ± 14.34
	S100 <sup>+</sup>	28.02 ± 4.71
	MAP2 <sup>+</sup> /S100 <sup>+</sup>	21.92 ± 6.01
GFAP & S100	GFAP <sup>+</sup>	82.11 ± 5.63
	S100 <sup>+</sup>	27.55 ± 3.28
	GFAP <sup>+</sup> /S100 <sup>+</sup>	25.45 ± 3.69
Olig2 & MAP2	Olig2 <sup>+</sup>	12.05 ± 0.66
	MAP2 <sup>+</sup>	28.13 ± 2.28
	Olig2 <sup>+</sup> /MAP2 <sup>+</sup>	5.50 ± 0.51

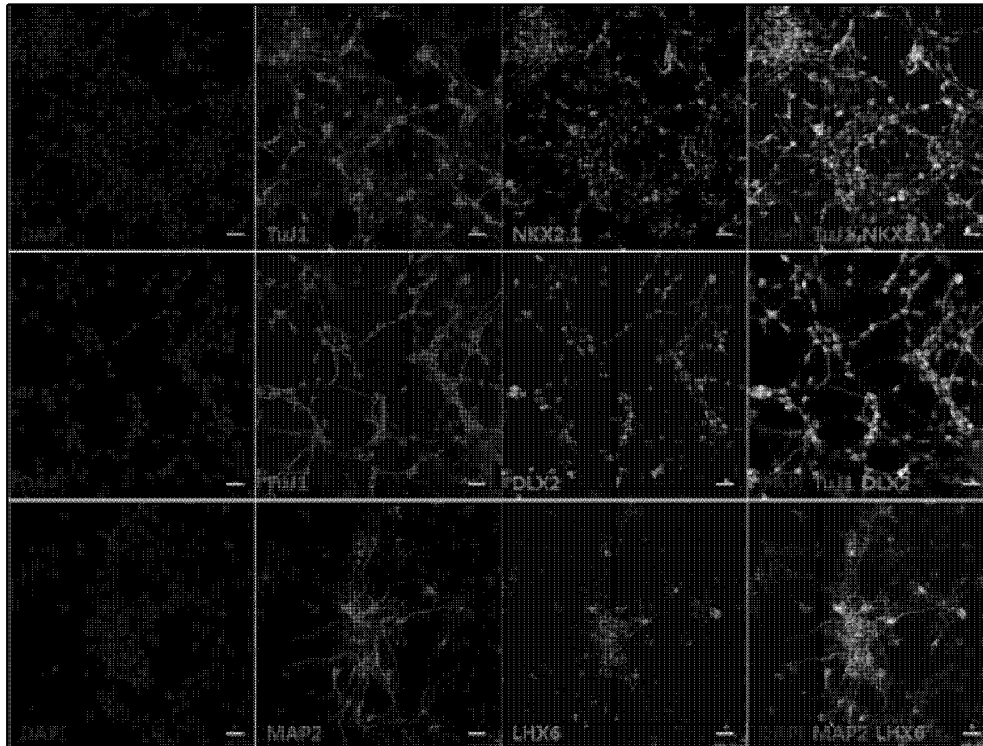
[도4c]



[도5a]



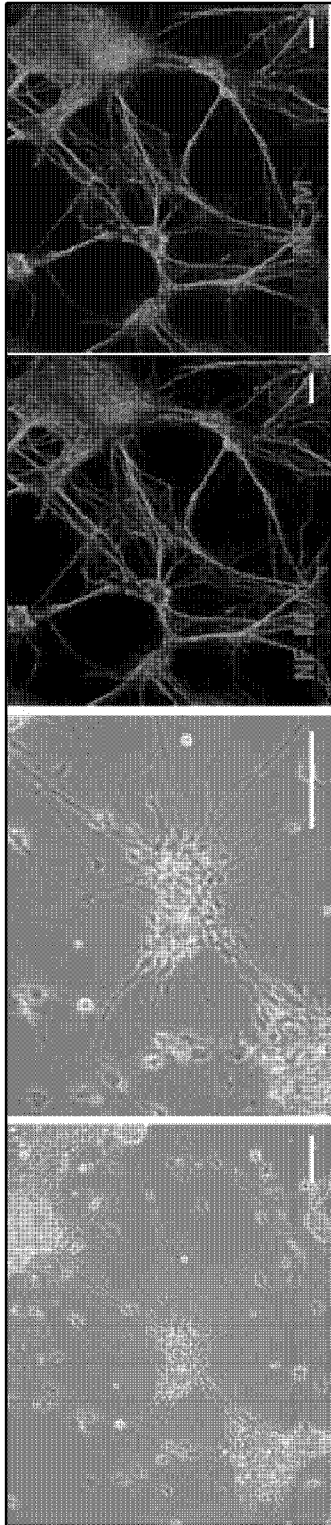
[도5b]



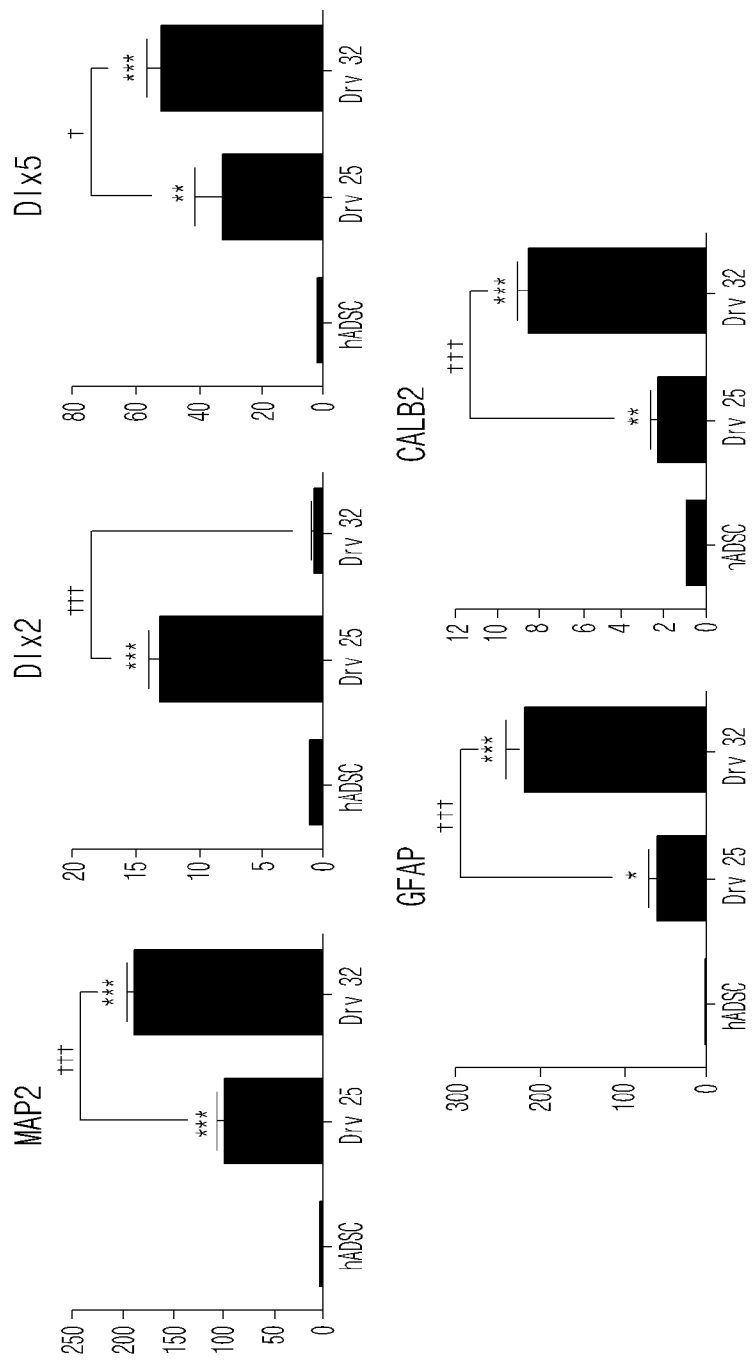
[도5c]

	Markers	Percentage
	Tuj1*	90.88 ± 1.72
Tuj1 & NKX2.1	NKX2.1*	84.29 ± 3.84
	NKX2.1*/Tuj1*	78.15 ± 5.35
	Tuj1*	95.20 ± 3.86
Tuj1 & DLX2	DLX2*	86.02 ± 1.27
	DLX2*/Tuj1*	84.43 ± 2.00
	MAP2*	91.54 ± 3.27
MAP2 & LHX6	LHX6*	70.84 ± 5.54
	LHX6*/MAP2*	69.35 ± 5.53

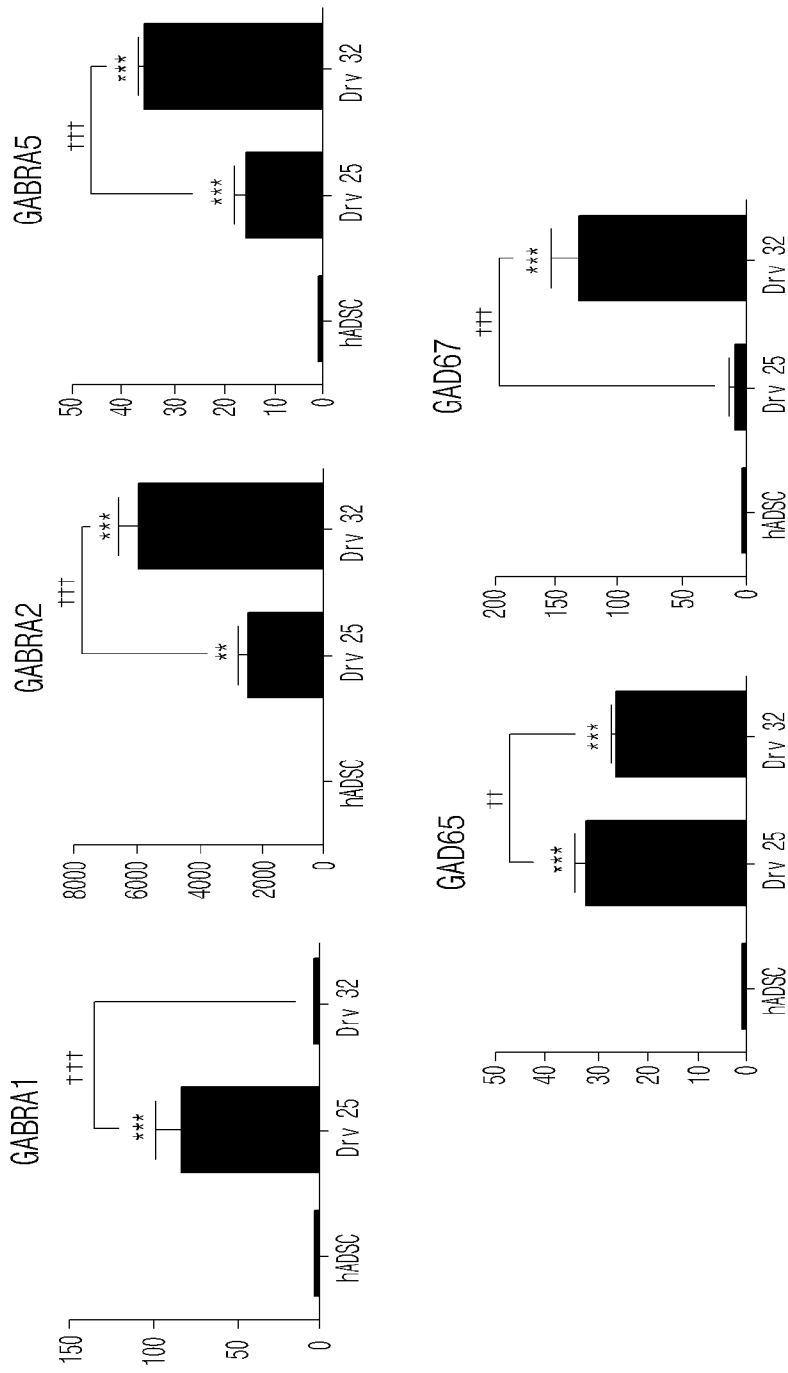
[도5d]



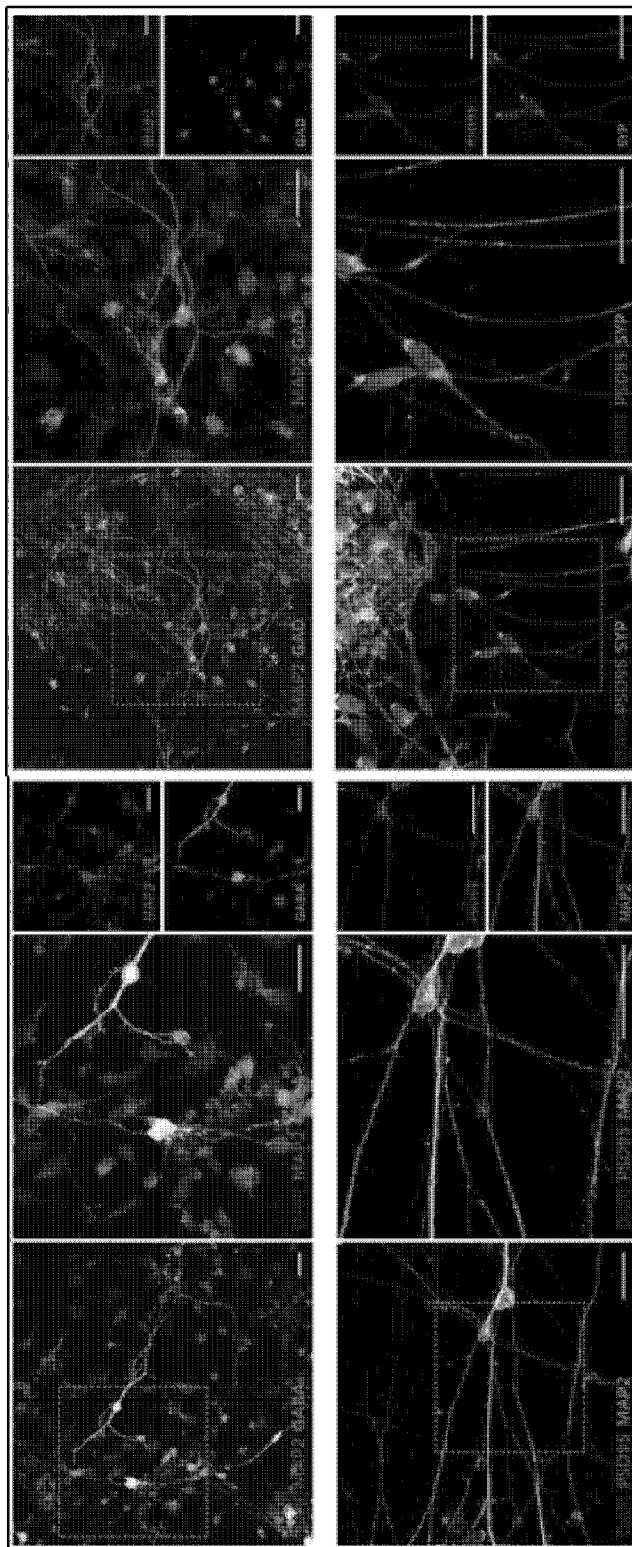
[도 6a]



[도6b]



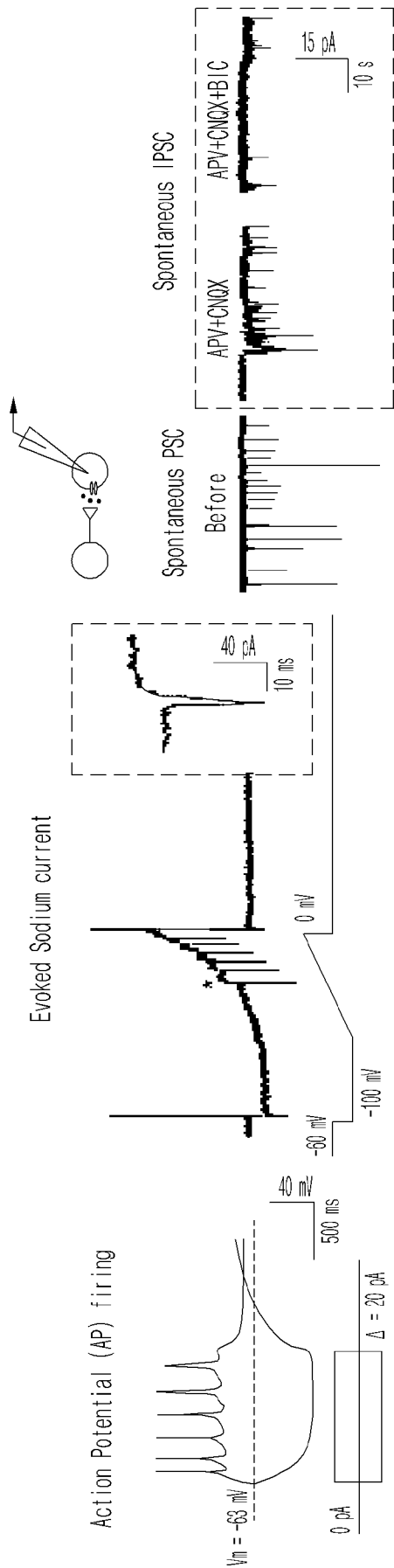
[도6c]



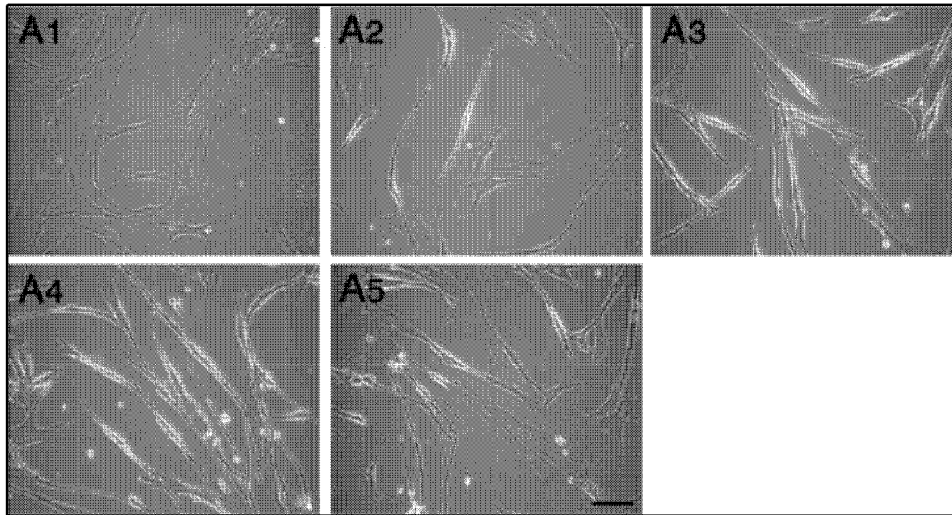
[도6d]

	Markers	Percentage
	MAP2 <sup>+</sup>	97.41 ± 1.22
MAP2 & GABA	GABA <sup>+</sup>	20.36 ± 6.67
	GABA <sup>+</sup> /MAP2 <sup>+</sup>	20.36 ± 6.67
	MAP2 <sup>+</sup>	93.71 ± 1.95
MAP2 & GAD	GAD <sup>+</sup>	68.69 ± 9.70
	GAD <sup>+</sup> /MAP2 <sup>+</sup>	67.30 ± 10.59

[도6e]

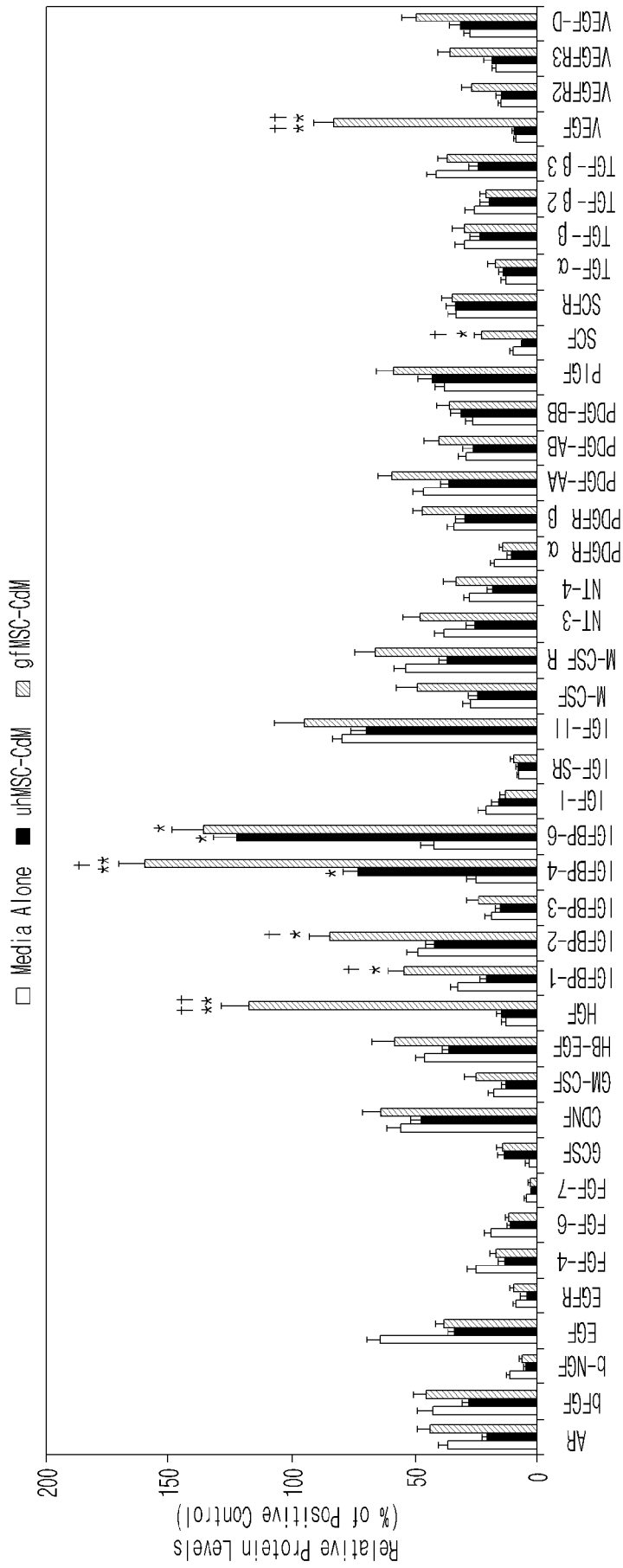


[도7]





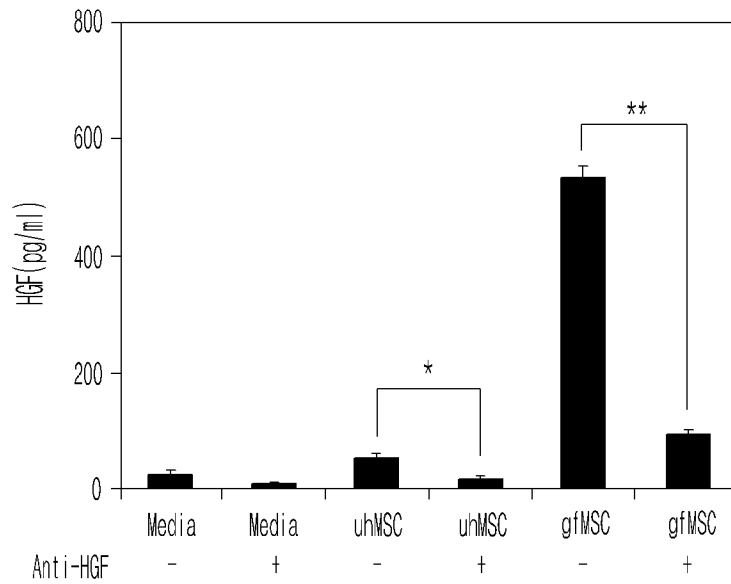
[도8b]



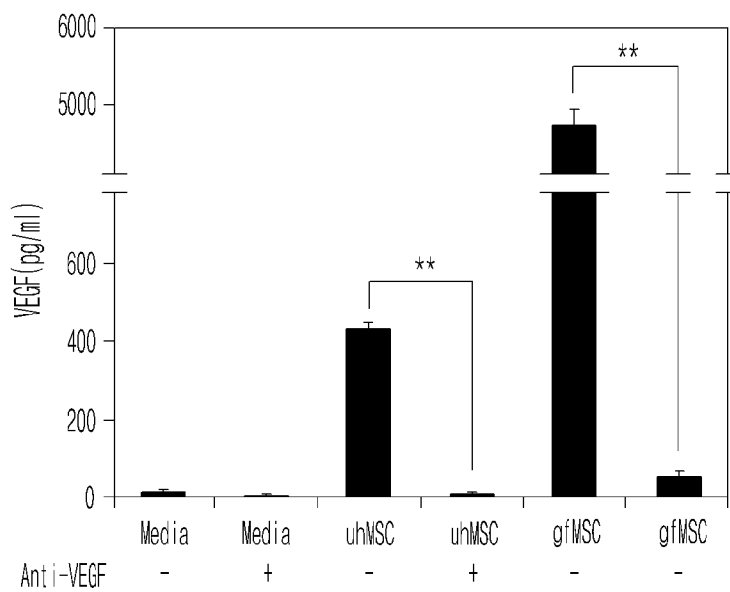
[도8c]

	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4	IGFBP-6	SCF	VEGF
Media Alone	1	1	1	1	1	1	1
uhMSC-CdM	1.12	0.65	0.86	2.83	2.88	0.56	1.05
gfMSC-CdM	8.54	1.69	1.72	6.21	3.20	2.14	9.02

[도8d]

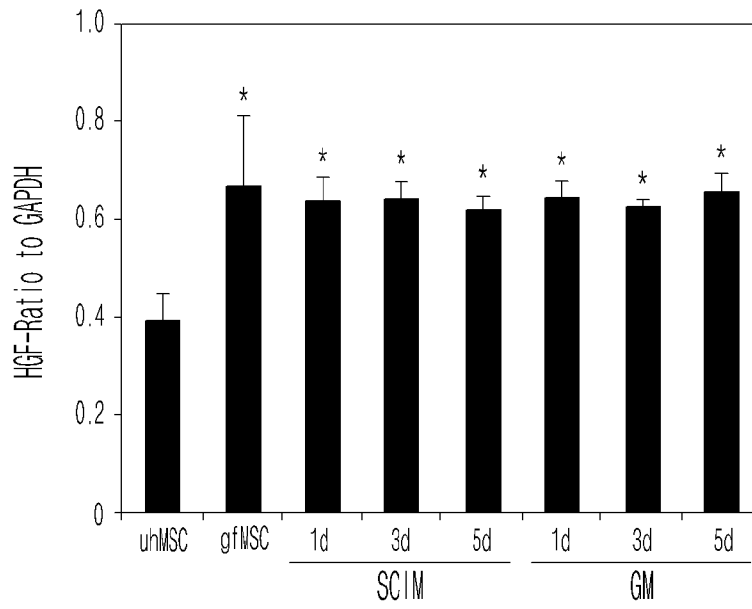


[도8e]

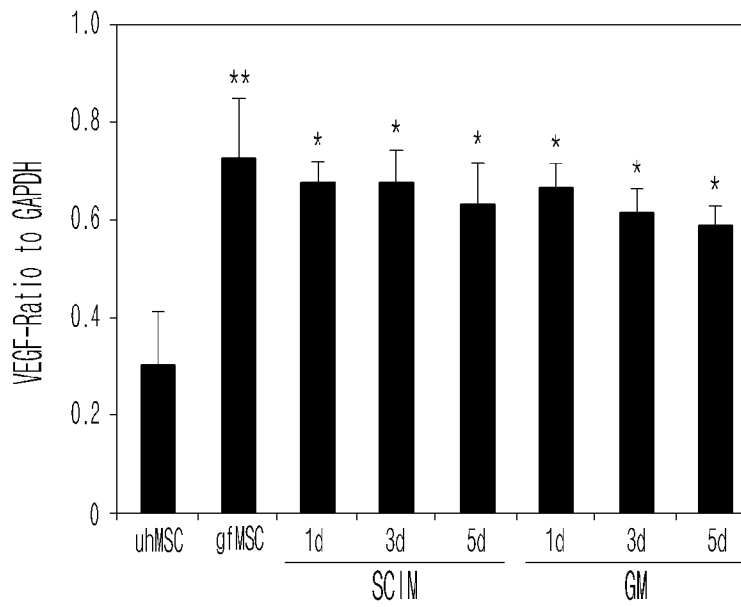




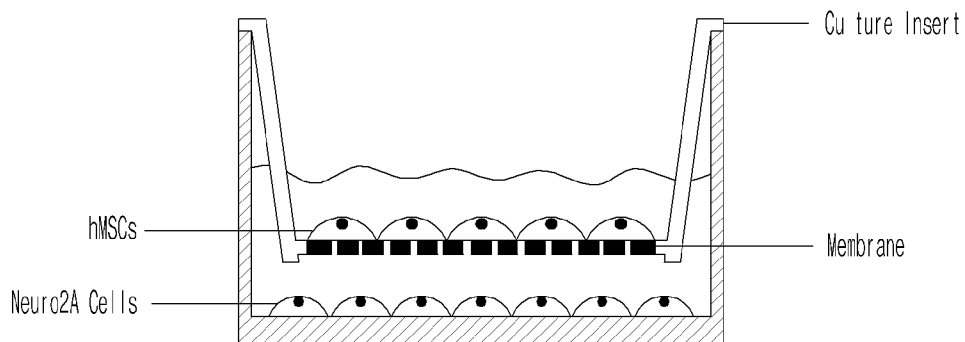
[도8i]



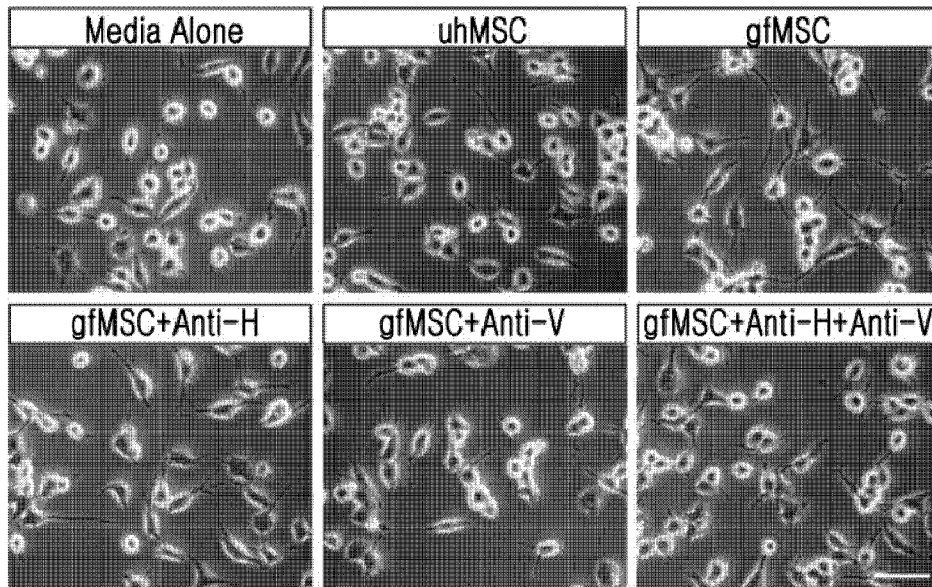
[도8j]



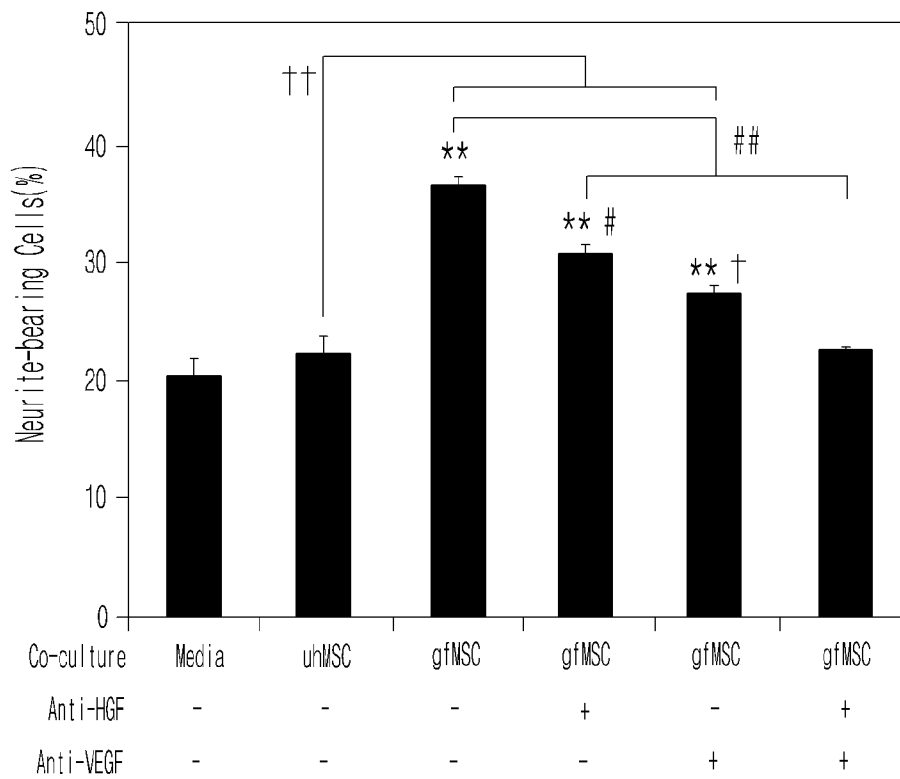
[도9a]



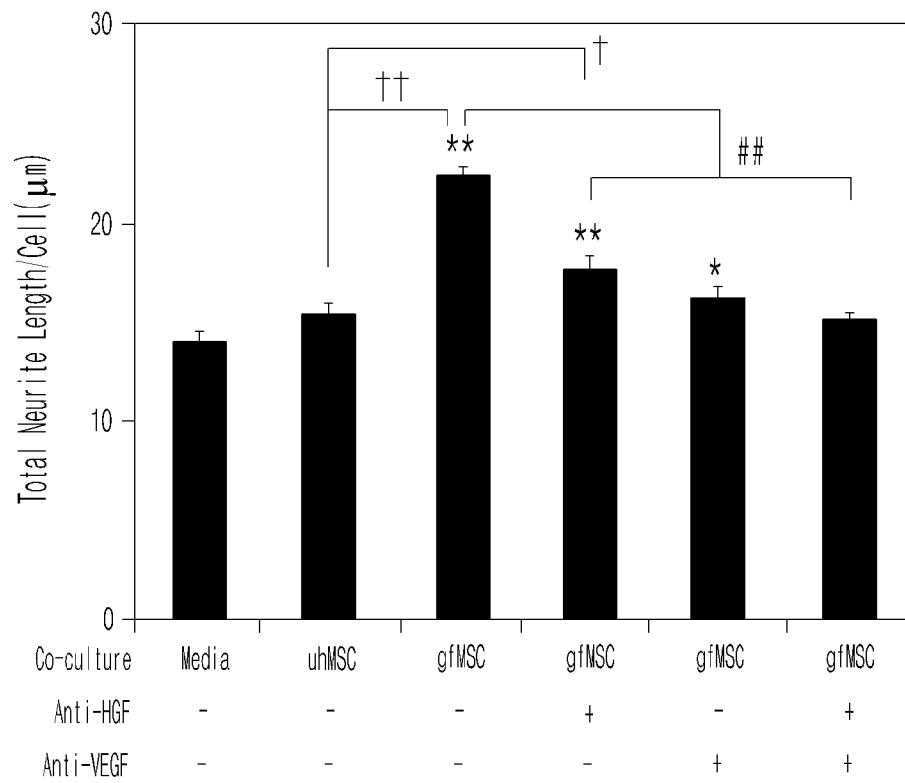
[도9b]



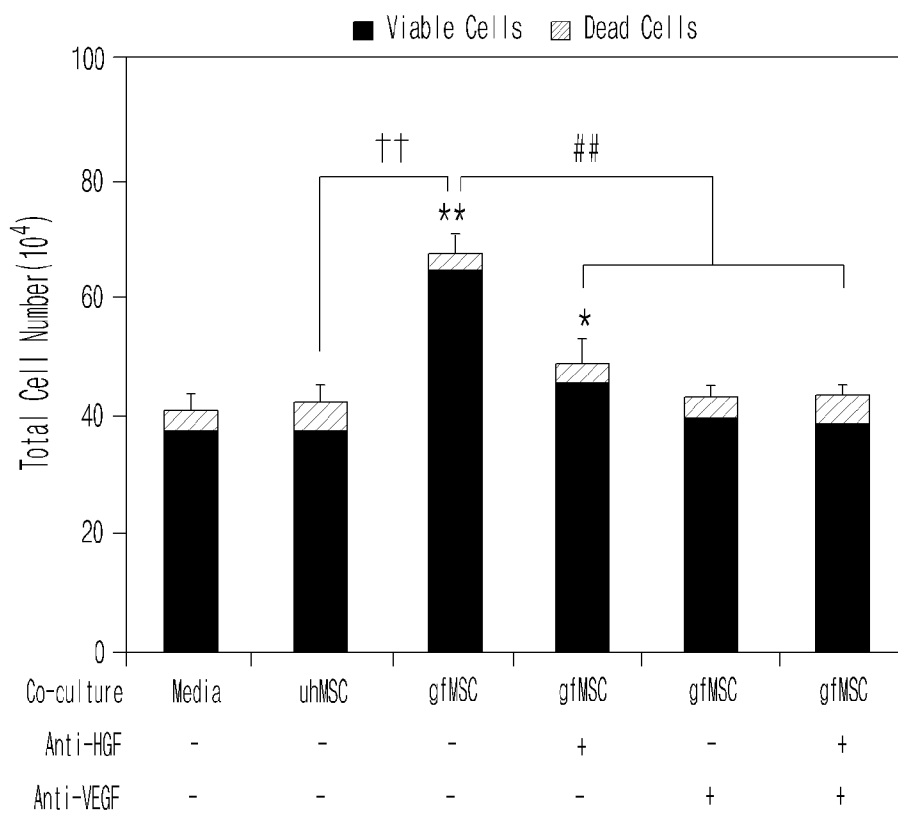
[도9c]



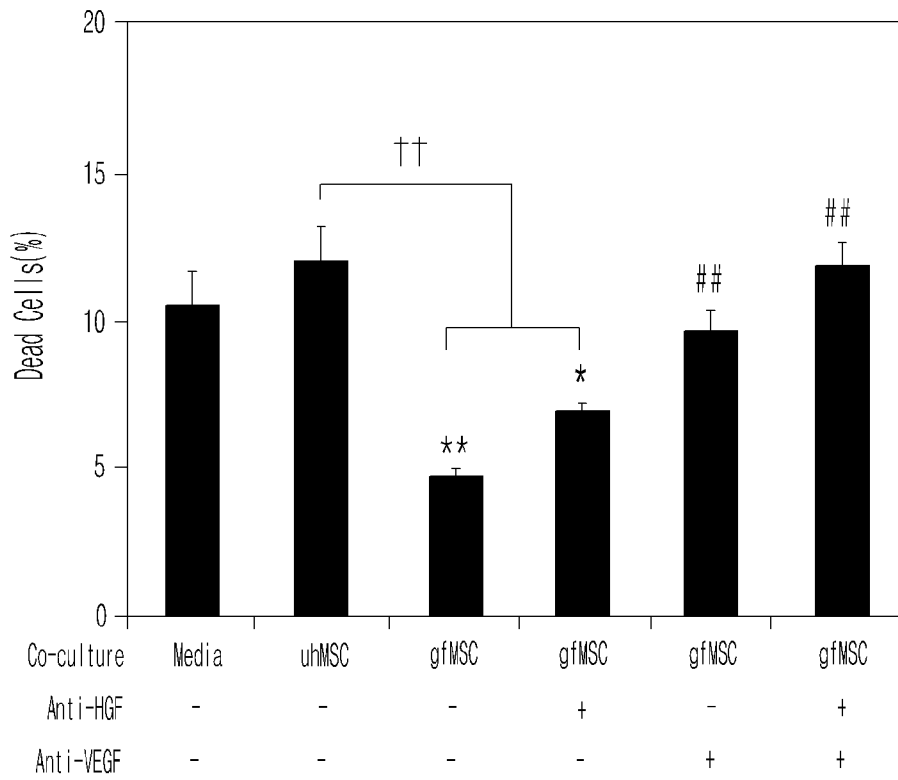
[도9d]



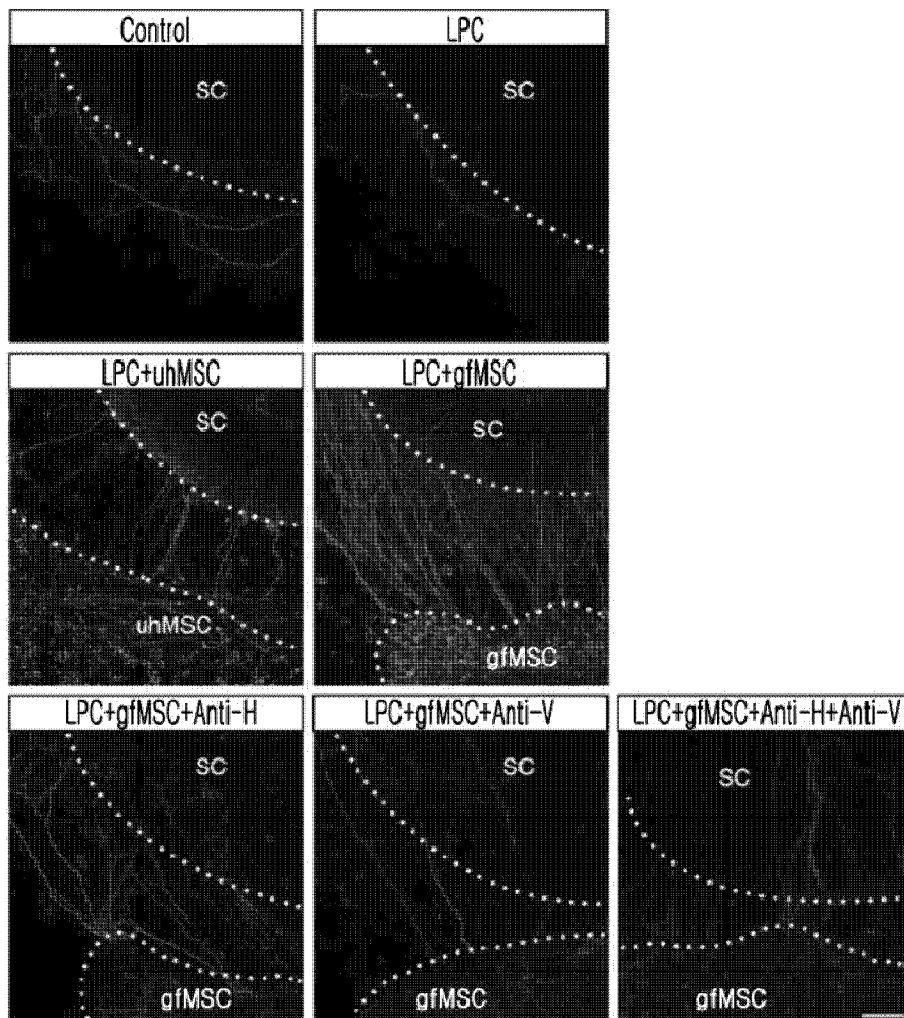
[도9e]



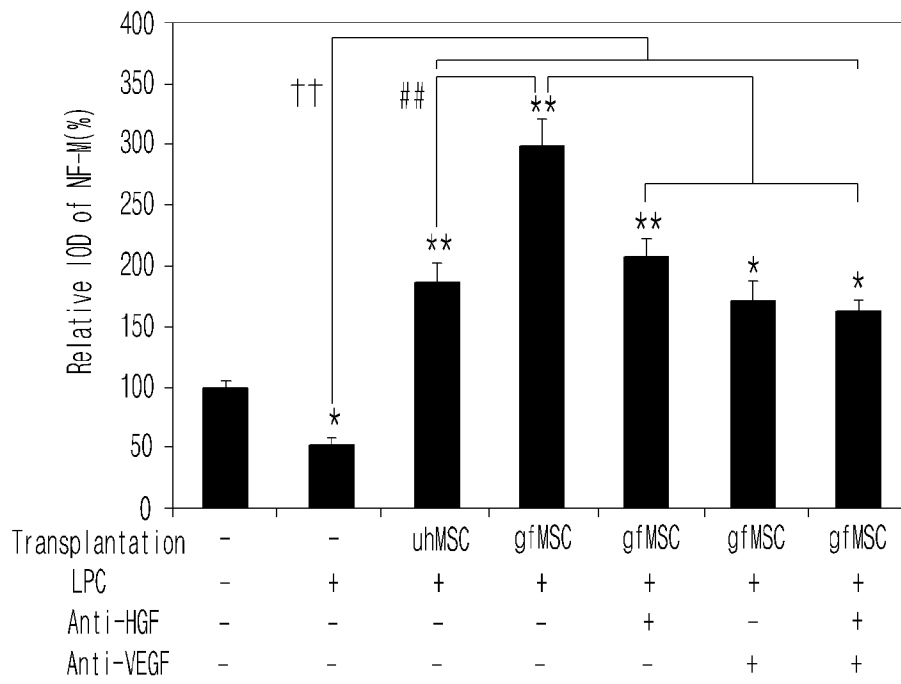
[도9f]



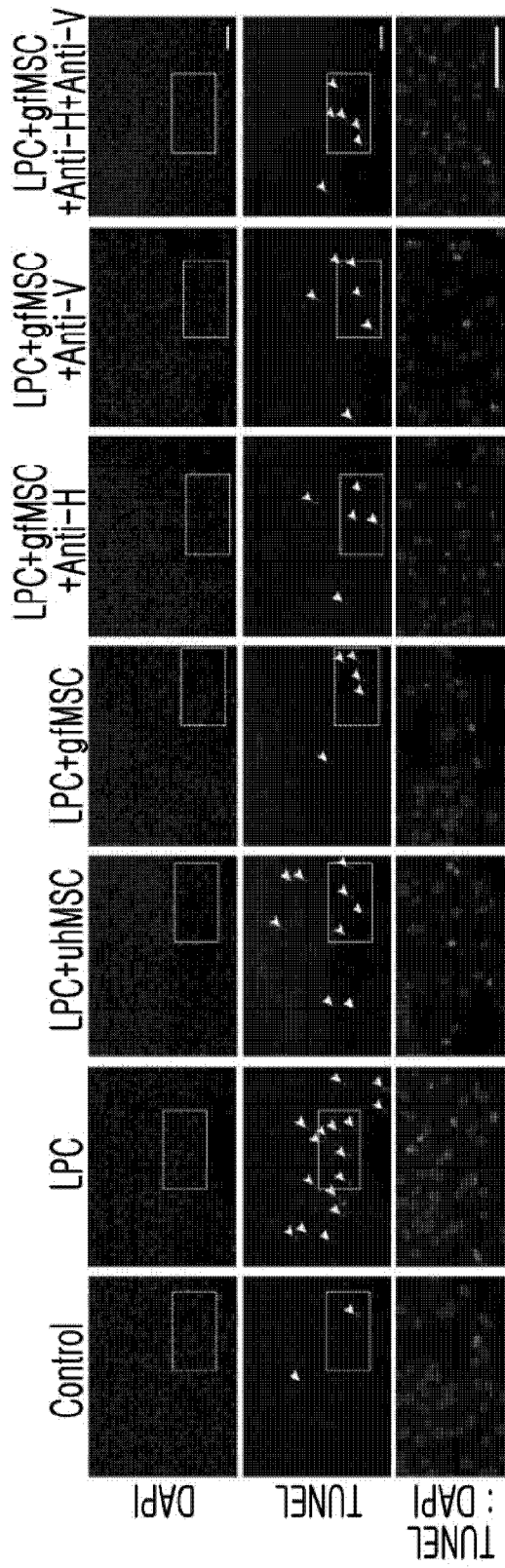
[도10a]



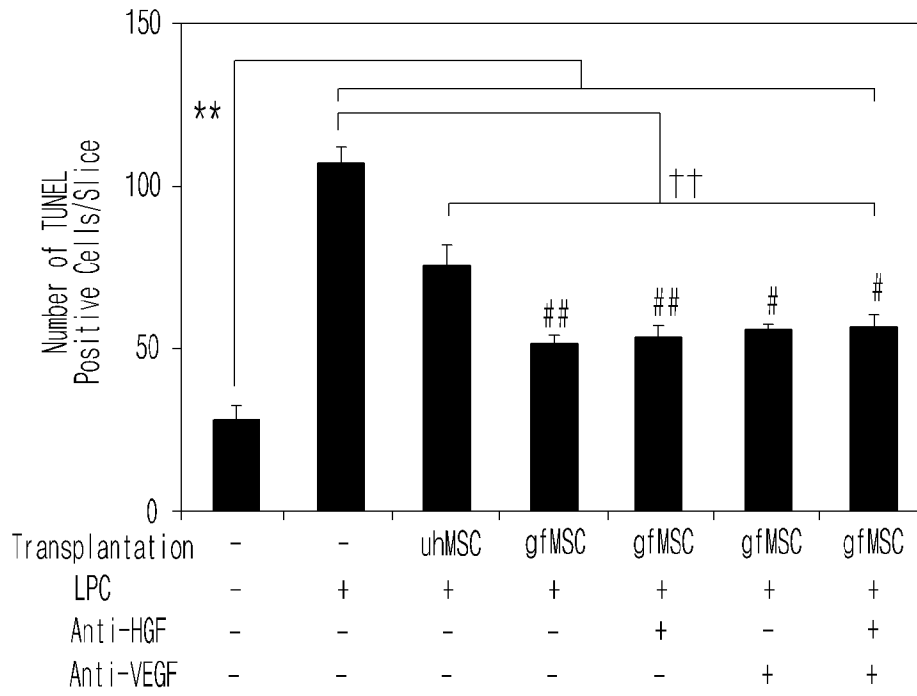
[도 10b]



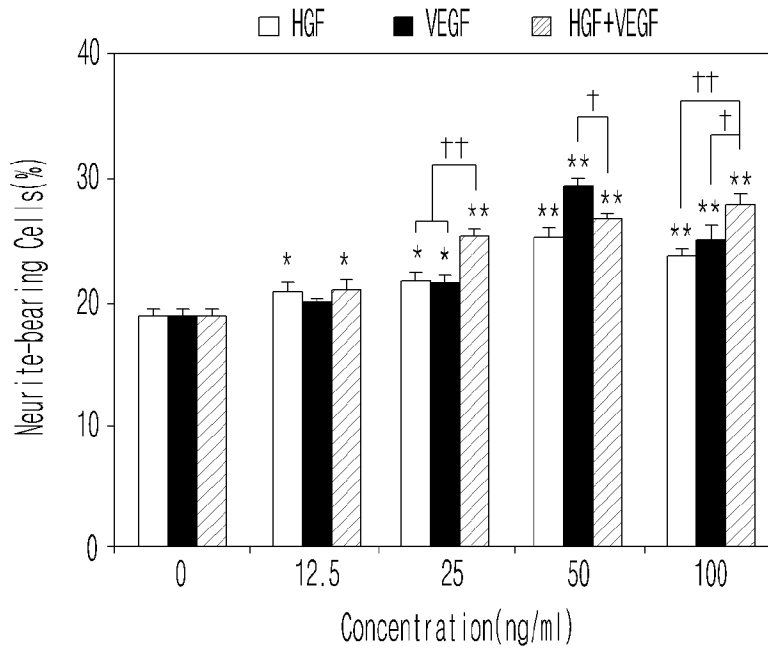
[도 10c]



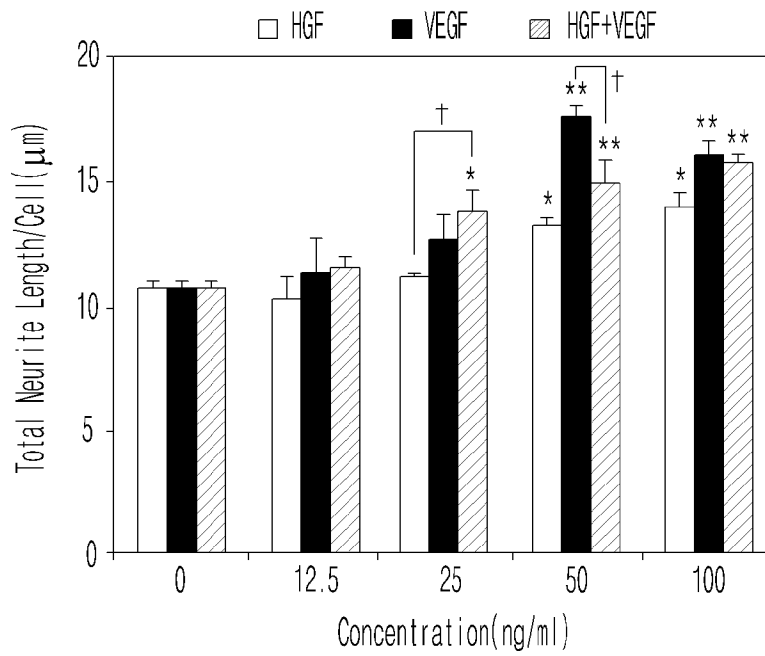
[도10d]



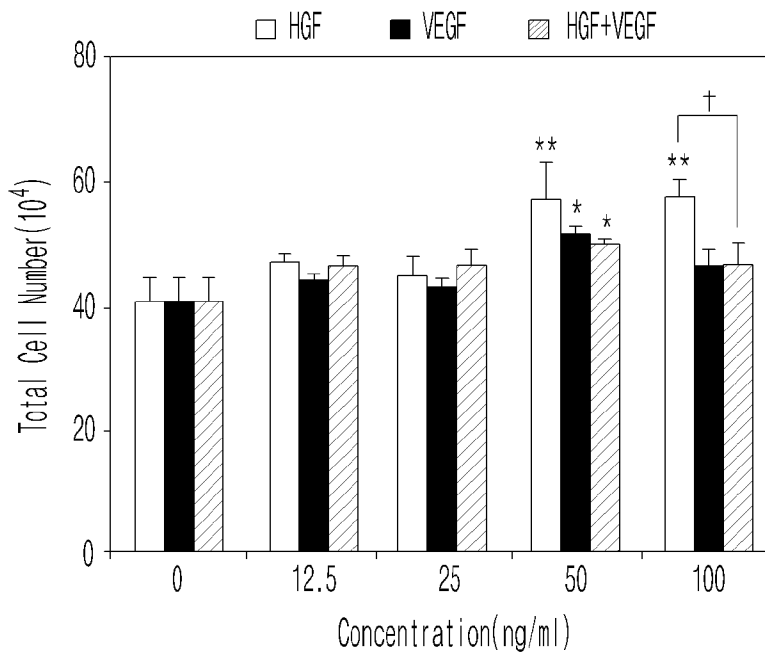
[도11a]



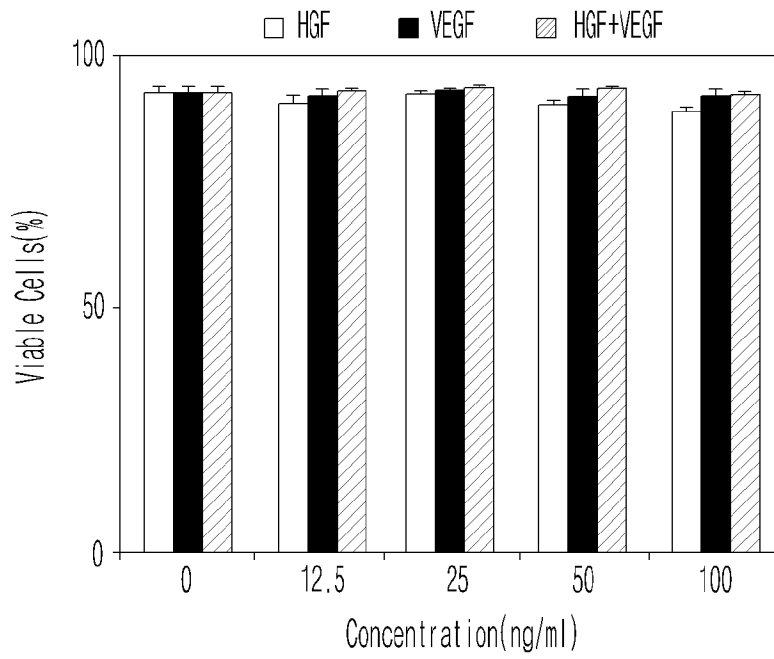
[도11b]



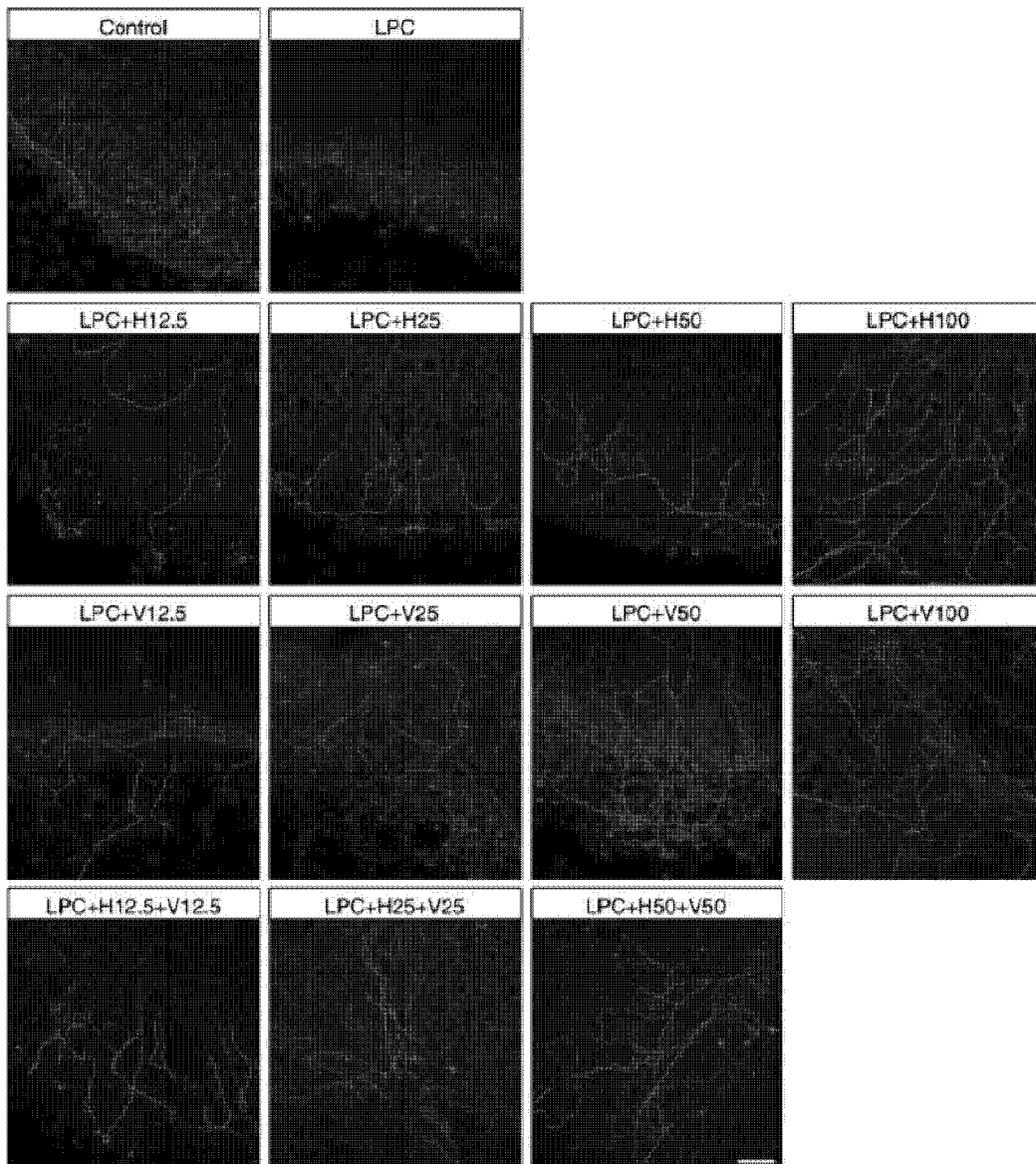
[도11c]



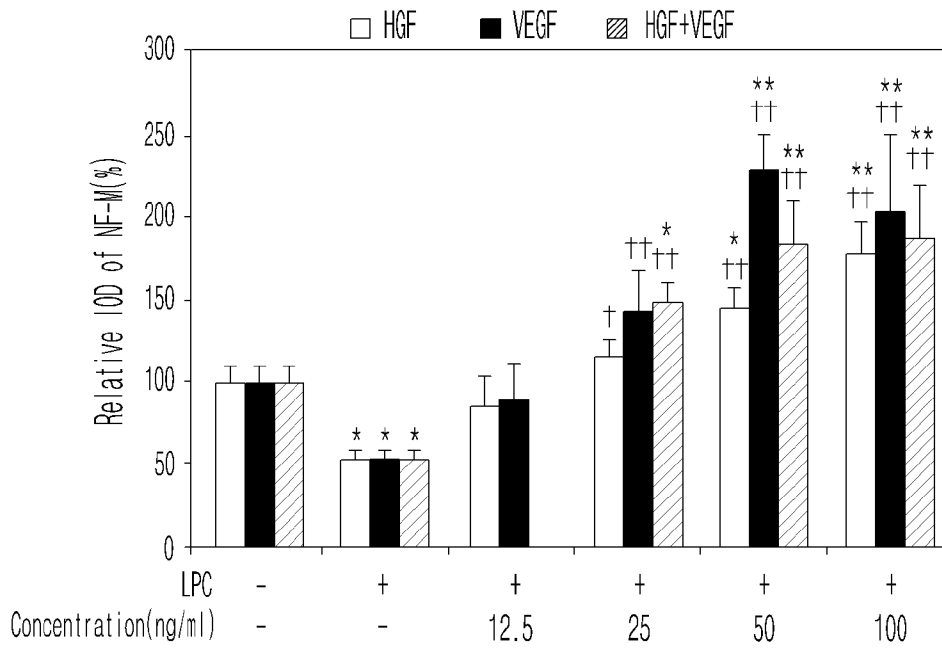
[도11d]



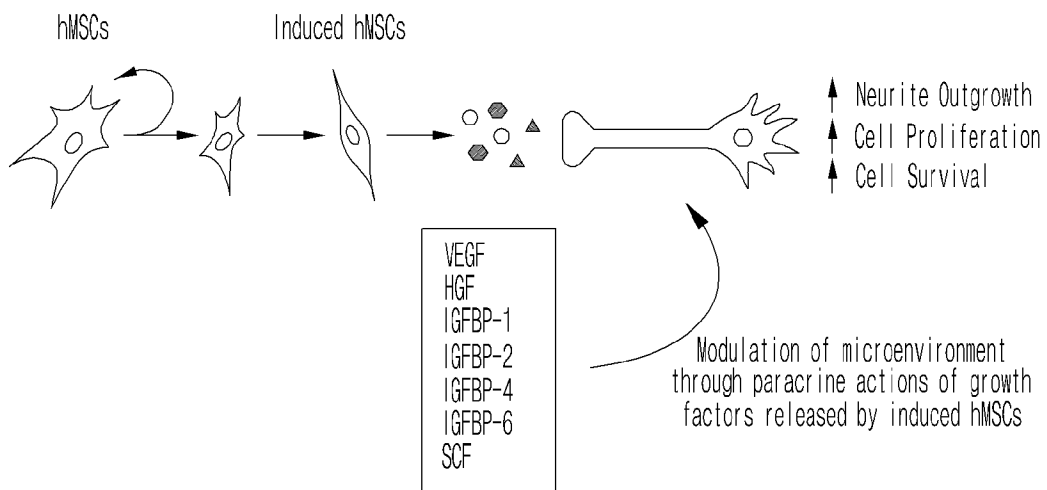
[도11e]



[도 11f]



[도 11g]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007687

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0793(2010.01)i, C12N 5/0797(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/0793; C12N 5/079; C12N 5/08; C12N 5/0735; C12N 5/0797; G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: adipose-derived mesenchymal stem cell, BMP inhibitor, TGF  $\beta$  signal transduction inhibitor, B27, N2, ascorbic acid, EGF, bFGF, FBS,  $\beta$ -mercaptoethanol, retinoic acid, forskolin, PDGF-AA, HRG- $\beta$ 1

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016-032152 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 03 March 2016 See abstract; claims 1-3; paragraph [66].	1-15,23-25
A		16-22,26-33,35
Y	SCHWARTZ, Philip H. et al., "Differentiation of Neural Lineage Cells from Human Pluripotent Stem Cells", Methods, 2008, vol. 45, pages 142-158 See abstract; page 151, right column-page 153, left column, paragraph [1]; page 154, left column, paragraphs [1] and [4]-[5]; table 1.	1-15,23-25
Y	US 2003-0036195 A1 (STUDER, Lorenz et al.) 20 February 2003 See abstract; claims 1 and 7.	10-12,15,25
X	KR 10-2011-0104684 A (SNU R&DB FOUNDATION) 23 September 2011 See abstract; claims 1-4, 6 and 12-13.	16-22,26-33,35
A	KR 10-2012-0039025 A (KYOTO UNIVERSITY) 24 April 2012 See abstract; claims 1-2 and 7-10; paragraphs [0060]-[0062].	1-33,35
A	FARAVELLI, Irene et al., "Motor Neuron Derivation from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Experimental Approaches and Clinical Perspectives", Stem Cell Research & Therapy, 2014, vol. 5, pages 1-13 See the entire document.	1-33,35



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 JANUARY 2017 (11.01.2017)

Date of mailing of the international search report

11 JANUARY 2017 (11.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2016/007687**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANGHILERI, Elena et al., "Neuronal Differentiation Potential of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells", Stem Cells and Development, 2008, vol. 17, pages 909-916 See the entire document.	1-33,35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007687

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 34  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 34 pertains to a method for treatment of the human body by a drug or surgery, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1 : claims 1-15, 23-25 and 27-32(part) pertain to: a method for differentiating adipose-derived mesenchymal stem cells into neural cells; stem cells differentiated thereby; and a composition for treatment.

The invention of group 2 : claims 16-22, 26, 27-32(part), 33 and 35 pertain to: a method for differentiating mesenchymal stem cells into stem cells releasing larger amounts of growth factor; human mesenchymal stem cell differentiated thereby; and a composition for treatment.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/007687**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2016-032152 A1	03/03/2016	KR 10-2016-0024126 A	04/03/2016
US 2003-0036195 A1	20/02/2003	AU 2002-307455 A1	05/11/2002
		WO 02-086073 A2	31/10/2002
		WO 02-086073 A3	12/09/2003
KR 10-2011-0104684 A	23/09/2011	KR 10-1147412 B1	22/05/2012
KR 10-2012-0039025 A	24/04/2012	AU 2010-283229 A1	17/02/2011
		AU 2010-283229 B2	02/04/2015
		CA 2770753 A1	17/02/2011
		CN 102597218 A	18/07/2012
		EP 2464723 A1	20/06/2012
		EP 2464723 B1	22/06/2016
		JP 2013-501502 A	17/01/2013
		JP 5761816 B2	12/08/2015
		US 2012-0142093 A1	07/06/2012
		WO 2011-019092 A1	17/02/2011

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> C12N 5/0793(2010.01)i, C12N 5/0797(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0793; C12N 5/079; C12N 5/08; C12N 5/0735; C12N 5/0797; G01N 33/50 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지방세포 유래 중간엽 줄기세포, BMP 억제제, TGF 베타 신호전달 저해제, B27, N2, ascorbic acid, EGF, bFGF, FBS, 베타-머캅토에탄올, 레티노산, 포스폴린, PDGF-AA, HRG-β1		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 2016-032152 A1 (한국생명공학연구원) 2016.03.03 요약; 청구항 1-3; 단락 [66] 참조.	1-15, 23-25
A		16-22, 26-33, 35
Y	SCHWARTZ, PHILIP H. 등, 'Differentiation of neural lineage cells from human pluripotent stem cells', Methods, 2008, 제45권, 142-158 페이지 요약; 페이지 151, 우컬럼-페이지 153, 좌컬럼, 단락 1; 페이지 154, 좌컬럼, 단락 1 및 4-5; 표 1 참조.	1-15, 23-25
Y	US 2003-0036195 A1 (STUDER, LORENZ 등) 2003.02.20 요약; 청구항 1 및 7 참조.	10-12, 15, 25
X	KR 10-2011-0104684 A (서울대학교산학협력단) 2011.09.23 요약; 청구항 1-4, 6 및 12-13 참조.	16-22, 26-33, 35
A	KR 10-2012-0039025 A (고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠) 2012.04.24 요약; 청구항 1-2 및 7-10; 단락 [0060]-[0063] 참조.	1-33, 35
A	FARAVELLI, IRENE 등, 'Motor neuron derivation from human embryonic and induced pluripotent stem cells: experimental approaches and clinical perspectives', Stem cell Research & Therapy, 2014, 제5권, 1-13 페이지 전체 문헌 참조.	1-33, 35
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 01월 11일 (11.01.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 01월 11일 (11.01.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	<p>ANGHILERI, ELENA 등, 'Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells' , Stem Cells and Development, 2008, 제17권, 909-916 페이지                      전체 문헌 참조.</p>	1-33,35

**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1.  청구항: 34  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 34는 약물 또는 수술에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2.  청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3.  청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명: 청구항 1-15, 23-25 및 27-32(일부)는 지방세포 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법, 이에 의하여 분화된 줄기세포 및 치료용 조성물에 관한 것입니다.

제2군 발명: 청구항 16-22, 26, 27-32(일부), 33 및 35는 중간엽 줄기세포를 성장인자를 다량 분비하는 줄기세포로 분화시키는 방법, 이에 의하여 분화된 인간줄기세포 및 치료용 조성물에 관한 것입니다.

1.  출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2.  추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3.  출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4.  출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2016-032152 A1	2016/03/03	KR 10-2016-0024126 A	2016/03/04
US 2003-0036195 A1	2003/02/20	AU 2002-307455 A1 WO 02-086073 A2 WO 02-086073 A3	2002/11/05 2002/10/31 2003/09/12
KR 10-2011-0104684 A	2011/09/23	KR 10-1147412 B1	2012/05/22
KR 10-2012-0039025 A	2012/04/24	AU 2010-283229 A1 AU 2010-283229 B2 CA 2770753 A1 CN 102597218 A EP 2464723 A1 EP 2464723 B1 JP 2013-501502 A JP 5761816 B2 US 2012-0142093 A1 WO 2011-019092 A1	2011/02/17 2015/04/02 2011/02/17 2012/07/18 2012/06/20 2016/06/22 2013/01/17 2015/08/12 2012/06/07 2011/02/17