(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0020432
(43) 공개일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01) *C12N 5/073* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
C12N 5/0605 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0096145
(22) 출원일자 2018년08월17일
심사청구일자 2018년08월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김병수
서울특별시 강남구 압구정로 151, 201동 603호 (압구정동, 현대아파트)
이승진
서울특별시 은평구 연서로11길 32-9 (구산동, 공작타운)
(74) 대리인
특허법인 무한

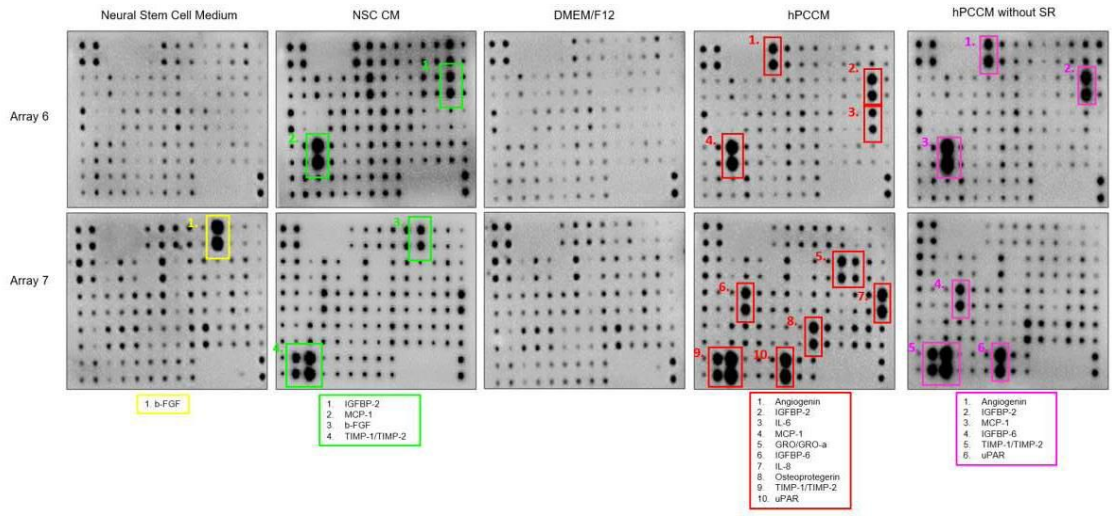
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **태반유래 세포 조건화 배지에서의 인간 신경 줄기세포 기능강화 및 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 및 이를 이용한 신경 줄기세포 유지 방법 및 생산방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2501/21 (2013.01)
C12N 2501/2308 (2013.01)
C12N 2501/734 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017M3A9C6027001
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발사업
연구과제명 직접교차분화 인간 신경줄기세포 배양생산 기술 최적화 및 안정성 연구
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지.

청구항 3

제1항에 있어서,

IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, GRO/GRO-a 및 IL8으로부터 선택되는 1종 이상의 인간 신경 줄기세포 배양 유효 성분을 포함하는, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지.

청구항 4

제1항에 있어서,

녹아웃 혈청 대체제(KnockOut Serum Replacement)를 더 포함하는, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지.

청구항 5

인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하는 단계; 및

상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 신경 줄기세포를 배양하는 단계; 를 포함하는, 신경 줄기세포 생산방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인, 신경 줄기세포 생산방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 태반유래 세포 조건화 배지는 IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, GRO/GRO-a 및 IL-8로부터 선택되는 1종 이상의 인간 신경 줄기세포 배양 유효 성분을 포함하는 것인, 신경 줄기세포 생산방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 배양액은 DMEM/F-12인, 신경 줄기세포 생산방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 태반유래 세포 조건화 배지는 녹아웃 혈청 대체제(KnockOut Serum Replacement)를 더 포함하는 것인, 신경 줄기세포 생산방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 및 이를 이용한 신경 줄기세포의 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 임상적용이 가능한 세포치료제 생산을 위해서는 공급원이 되는 줄기세포 혹은 전구세포의 고순도, 고효율 체외 배양이 필수적인데, 이때 체외 배양환경이 인체 환경과 유사한 상태에서 대량생산이 이루어져야 임상에서의 효율성 안정성을 보장할 가능성이 높아진다.

[0004] 최근까지 인간 신경 줄기세포 배양에 대하여 많은 연구들이 진행되어 왔으나, 대부분의 기술들이 동물유래 지지세포를 사용하거나 동물유래 산물을 포함하여 인간 생체환경과 상이한 배양환경을 제공한다. 이러한 동물유래 산물을 포함하는 배지를 이용하는 경우 인간 생체환경과 상이한 배양환경을 제공하기 때문에 임상적용을 위한 세포의 대량생산 시스템에 적합하지 않을 뿐만 아니라, 이종 단백 오염이 발생하는 등 임상적용 측면에서의 윤리성과 안전성을 담보하기가 곤란한 문제점이 있다.

[0005] 이에, 인간 생체 환경과 유사한 배양조건에서 표준화된 신경 줄기세포를 배양 생산할 수 있는 기술의 개발에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.

[0006] 한편, 태반유래 세포 조건화배지를 이용하는 경우, 무동물 무지지세포를 이용하여 전능성 줄기세포를 배양할 수 있고, 케모카인 수용체인 CXCR2의 기전에 의해 증식 및 분화가 가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 인간 태반 모사 환경을 제공함으로써 신경 줄기세포 배양 및 생산에 적용 가능한 태반유래 세포 조건화 배지를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 태반유래 세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비해 신경 줄기세포의 기능이 강화되고, 신경 줄기세포를 고순도, 고효율로 배양할 수 있음을 발견

하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 목적은 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 태반유래 세포 조건화 배지를 이용한 신경 줄기세포의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지가 제공된다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[0015] 일 측에 따르면, IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, GRO/GRO-a 및 IL-8으로부터 선택되는 1종 이상의 인간 신경 줄기세포 배양 유효 성분을 포함할 수 있다.

[0016] 일 측에 따르면, 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)를 더 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하는 단계; 및 상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 신경 줄기세포를 배양하는 단계; 를 포함하는, 신경 줄기세포 생산방법이 제공된다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 태반유래 세포 조건화 배지는 IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, GRO/GRO-a 및 IL-8로부터 선택되는 1종 이상의 인간 신경 줄기세포 배양 유효 성분을 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 배양액은 DMEM/F-12일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 태반유래 세포 조건화 배지는 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포가 제공된다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지를 이용하는 경우, 일반 배지를 이용하는 경우에 비하여 신경 줄기세포의 특성이 잘 유지되도록 기능을 강화할 수 있고, 신경 줄기세포를 고순도, 고효율로 생산할 수 있다.

[0025] 특히, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지는 더블 코팅(double coating)이나 추가의 보충물(supplement)이 필요 없기 때문에 신경 줄기세포의 생산 비용을 절감할 수 있으며, 신경 줄기세포의 대량생산이 가능하다.

[0026] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 신경세포를 배양한 배지, 태반유래 세포 조건화 배지 및 녹아웃 혈청대체제(KnockOut Serum Replacement)를 포함하지 않은 태반유래 세포 조건화 배지에서 분비되는 사이토카인을 비교하여 나타낸 것이다.

도 2는 사이토 카인 어레이(cytokine array)의 신호 강도를 측정하여 양성 대조군 농도에 따라 표준화 한 그래

프이다.

도 3은 사이토카인 어레이의 Heatmap을 나타낸다.

도 4는 기존 신경 줄기세포의 배양 배지와 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양한 신경 줄기세포를 형태학적으로 비교한 것이다.

도 5는 신경 줄기세포 특이적 표지인 Nestin의 발현을 면역 형광 염색법으로 검출한 것이다.

도 6은 신경 줄기세포의 특이적 표지인 Nestin, OTX2, PAX6, SOX1의 mRNA 발현 정도를 실시간 연쇄 중합효소 반응(Quantitative real-time PCR Analysis)으로 측정하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0030] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0031] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0032] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "태반"은 산모의 모체로부터 출산 후 분리되는 태반을 의미한다. 태반은 분리된 후 신속하게 멸균된 용기 및 얼음에 담아 보관될 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 용어 "조건화 배지(conditioned media)"는 세포에 의해 생산된 유효 성분 또는 세포의 유지 및 생존에 도움이 되는 인자들을 함유함으로써 기능이 변경된 배지를 의미한다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지가 제공된다.

[0036] 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지는 인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인 등의 인간 신경줄기세포 배양 유효 성분을 추출하는 단계를 통해 제조될 수 있다.

[0037] 또한, 태반유래 세포 조건화 배지의 제조에 사용되는 배양액은 우태혈청 등이 배제된 통상의 배양액일 수 있으며, 혈청대체제(Serum Replacement), 황산화제 및 항생제를 포함하는 DMEM/F-12인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는 20% Knockout Serum Replacer (GIBCO), 0.1 mM β및 1% penicillin-streptomycin (Sigma)가 보충된 DMEM/F-12을 이용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지에 포함되는 상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막판(chorionic plate)에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[0039] 보다 구체적으로, 상기 태반유래 섬유세포-유사세포는 다음의 과정으로부터 얻을 수 있다:

[0040] 1) 분리된 융모막판(chorionic plates)를 다지고, 37℃에서 30분간 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양한 후에 이 세포들을 20% fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc, Logan, UT, 100 U/ml penicillin, 및 100 μg/ml streptomycin을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에서 37℃5% CO_2, 및 95% 습도 조건에서 배양한다.

[0041] 2) 상기 배지를 세 계대(passage)까지 매 3-4일마다 교환하면서 배양 동안 배지에서 떠오르는 세포 찌꺼기를 제거하고, 그 판에 부착된 태반-유래 섬유세포-유사 세포를 얻는다.

[0042] 상기 태반유래 세포 조건화 배지는 인간 신경 줄기세포 배양 유효 성분을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 인간 신경 줄기세포 배양 유효성분은 b-FGF, IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, 안지오제닌(Angiogenin), IGFBP-2, IL-9, MCP-1, GRO/GRO-a, IGFBP-6, IL-8, 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin), uPAR 일 수 있으며, 바람직하게는 IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, GRO/GRO-a, IL-8이다. 본 발명의 조건화 배지는 이러한 신경 줄기세포 배양 유효 성분을 포함하기 때문에, 보다 효율적으로 신경 줄기세포의 생산을 촉진할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지는 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)를 더 포함할 수 있으며, 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)를 포함하는 배지에서 신경 줄기세포를 배양하는 경우, 이를 포함하지 않는 배지보다 줄기세포의 특성이 더 잘 나타나고 유지된다(도 5 및 도 6 참조).

[0044] 상술한 바와 같이, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지는 오직 인간 유래 산물로 구성되므로 신경 줄기세포를 고순도, 고효율로 생산할 수 있으며, 이종 단백 또는 세포에 의한 오염을 방지할 수 있으므로, 상기 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포를 이용하는 경우 임상에서의 안정성 및 효용성을 향상시킬 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하는 단계; 및 상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 신경 줄기세포를 배양하는 단계; 를 포함하는, 신경 줄기세포 생산방법이 제공된다.

[0046] 신경 줄기세포 생산방법에 사용되는 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지의 성분과 제조 방법은 전술한 바와 같다. 또한, 본 발명의 신경 줄기세포 생산방법은 인간의 줄기세포 생산에 한정되지 않으며, 개, 소, 양, 돼지 등 다양한 동물의 줄기세포 생산에도 활용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 신경 줄기세포 기능강화 또는 생산용 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포가 제공된다. 상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포는 다양한 신경학적 변성 질환, 예를 들어 알츠하이머 병, 파킨슨 병 등의 치료에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **<실시예 1: 태반유래 세포 조건화 배지의 제조>**

[0051] 태반세포를 임신한 지 7주에 치료적인 유산을 받은 건강한 임산부로부터 서면 동의를 받은 후, 제왕절개로의 외과적 수술에 의해 분리된 태반 조직으로부터 얻었다. 태반의 융모막 융모조직으로부터 세포를 분리하고, 분리된 태반세포를 20% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100 U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 포함하고 0.1% 젤라틴이 코팅된 플라스크에서 일주일 동안 배양하여 태반유래 세포를 얻었다. GIBCO에서 구입한 DMEM/F-12, 20% Knockout Serum replacement, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 및 1% penicillin streptomycin의 조성으로 구성된 배지에 태반유래 세포를 24시간동안 노출시켜 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하였다.

[0053] **<실시예 2: 신경 줄기세포 배양 유효성분의 탐색>**

[0054] 기존의 조건화 배지(Neural Stem Cell Conditioned Medium: NSC CM), 상기 실시예 1에서 제조한 태반유래 세포 조건화 배지(human PlaCenta derived Conditioned Medium: hPCCM), 및 KnockOut Serum Replacement (SR)를 포함하지 않은 태반유래 세포 조건화 배지에서 24시간 동안 Wicell에서 구입한 H9으로부터 유래된 신경 줄기세포를 배양하였다.

[0055] 상기 조건화 배지에서 기본으로 사용한 배지(Basal Medium: Neural Stem Cell Medium(NSC medium) 및 DMEM/F12)를 대조군으로 하고, 신경 줄기세포 배양 유효성분을 탐색하기 위해 Ray Biotech의 Human cytokine antibody array kit를 이용하여 배지에서 분비되는 사이토카인을 비교 분석하여 도 1에 나타냈다.

[0056] 도 1에 나타낸 바와 같이, dot signal을 이용하여 신경 줄기세포 배양에 필수적인 유효성분의 후보군을 정하였

다: b-FGF, IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, Angiogenin, MCP-1, GRO/GRO-a, IGFBP-6, IL-6, IL-8, Osteoprotegerin, uPAR.

[0057] 그 다음, 앞서 얻은 dot signal의 강도를 측정하여 양성 대조군의 농도에 따라 표준화하고(도 2), 그래프로 나타내어 신호 강도를 비교하였으며, Heatmap을 통해 사이토카인이 많이 발현되는 정도를 시각화 하였다(도 3). Heatmap에서 발현량이 많은 사이토카인은 붉은색, 적은 사이토카인은 초록색으로 나타냈다.

[0058] 도 2 및 도 3에 나타낸 결과를 통해, 최종적으로 신경 줄기세포 배양에 필수적인 유효성분을 IGFBP-2, MCP-1, TIMP-1/TIMP-2, GRO/GRO-a, IL-8로 정하였다.

[0060] **<실시예 3: 신경 줄기세포의 형태학적 특성 확인>**

[0061] 본 발명의 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포의 특성을 분석하기 위해 기본으로 사용한 배지(Neural basal media, b-FGF 및 B27 보충) 배지에서 배양된 신경 줄기세포를 대조군으로 하고, 그 형태를 관찰하여 도 4에 나타냈다.

[0062] 도 4에 나타낸 바와 같이, Knockout Serum Replacement가 첨가된 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포가 기존의 신경 줄기세포 배양 조건에서 배양된 것과 유사한 정도로 신경 줄기세포의 형태학적 특성을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0064] **<실시예 4: 신경 줄기세포 특성 유지 확인>**

[0065] 본 발명의 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포가 그 특성을 유지하는지 확인하기 위해, 면역 형광 염색법 및 실시간 연쇄 중합효소반응을 이용하여 신경 줄기세포에 특이적인 표지 인자들의 발현을 확인하였다. 대조군로 일반적으로 사용하고 있는 96% Neurobasal medium, 2% B27 Supplement, 1% GlutaMAX, 1% MEM NEAA, 20ng/ul basic FGF (GIBCO) 조성의 배지를 사용하였으며 matrigel이 코팅된 배양디쉬에서 배양하였다.

[0066] 먼저, 면역 형광 염색을 위해cover slip에 세포를 배양을 하고, 신경줄기세포 특이적 마커인 Nestin의 발현을 면역 형광 염색을 통해 측정하였다. 구체적으로, 70-80%의 세포가 성장하면10분 동안 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정시킨 후 10분 동안 0.1% 트라이톤 X100를 세포에 침투시키고 1차 항체인 Nestin (Abcam #ab22035)을 1:1000으로 희석하여 처리한 다음 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음 날 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 처리하고 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 처리하여 암조건에서 5분 동안 방치한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0067] 도 5에 나타낸 바와 같이, 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)가 첨가된 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포는 대조군 배지 및 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)를 포함하지 않은 배지에서 배양된 신경 줄기세포에 비해 신경 줄기세포 특이적인 인자인 Nestin을 더 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있다.

[0068] 그 다음, 실시간 연쇄 중합효소반응(Quantitative real-time PCR Analysis)을 이용하여 신경 줄기세포 특이적인 인자 Nestin, OTX2, PAX6, SOX1의 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 구체적으로, 키트(Qiagen RNeasy kit, Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 분화 유도된 세포로부터 RNA를 분리하고, 2 ug의 RNA, 올리고(dT) 및 역전사효소(Superscript II reverse transcriptase, Gibco)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA에 각각 Nestin, OTX2, PAX6 그리고SOX1유전자의 프라이머와 마스터믹스(iQ SYBR Green qPCR Master Mix)를 넣고 기기(Bio-Rad iCycler iQ system, Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석 값은 GAPDH 유전자를 이용하여 정상화(normalized)하였으며, Nestin, OTX2, PAX6 그리고SOX1유전자 발현 분석을 위한 프라이머는 아래 표 1에 나타냈다.

표 1

[0069]

명칭	정방향	역방향
Nestin	GCGTTGGAACAGAGGTTGGA	TGGGAGCAAAGATCCAAGAC
OTX2	CTGTTTGCCAAGACCCGGTA	AAACCATACCTGCACCCTGG
PAX6	CTGGCTAGCGAAAAGCAACAG	CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA
SOX1	CACAACTCGGAGATCAGCAA	GGTACTTGTAATCCGGGTGC

GAPDH	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	TTCACACCCATGACGAACAT

[0070] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 신경 줄기세포 특이적인 인자는 대조군 및 Knockout Serum Replacement가 첨가되지 않은 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포에 비해 Knockout Serum Replacement가 첨가된 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 신경 줄기세포에서 발현양이 상당히 증가하는 것을 확인할 수 있다.

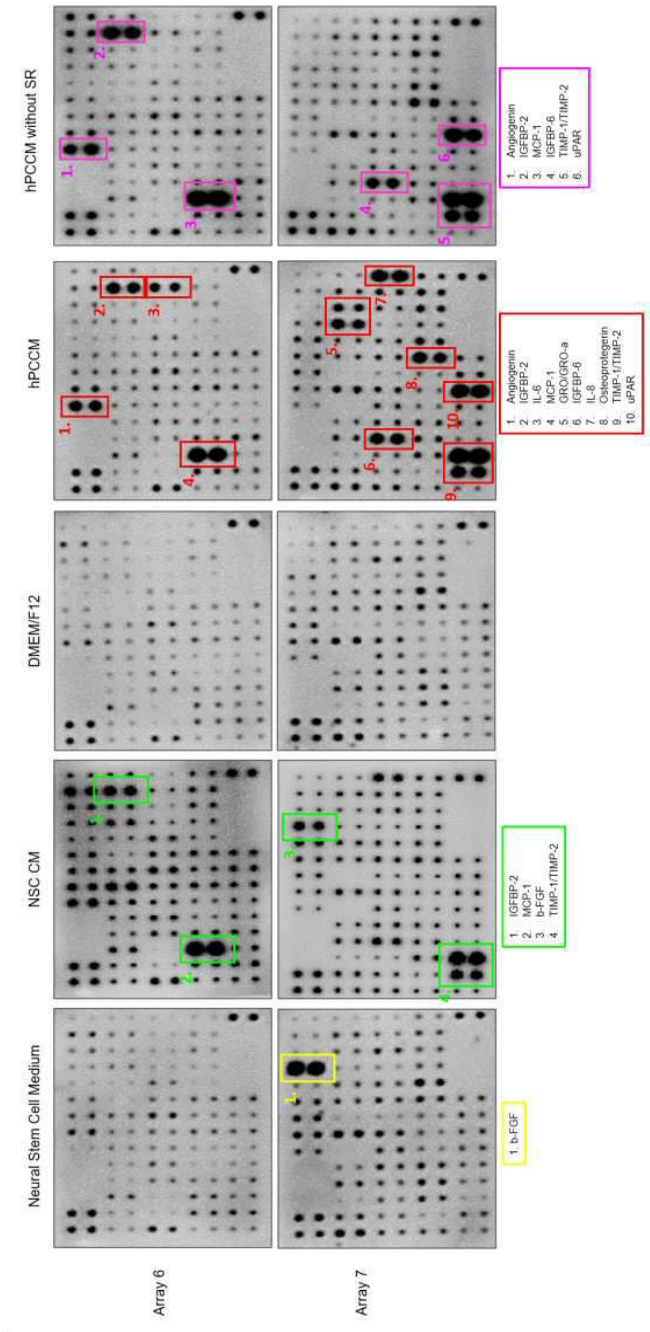
[0071] 상기의 실시예에서 나타난 결과는 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지에서 신경 줄기세포를 배양할 경우 신경 줄기세포의 형태 및 신경 줄기세포의 특성을 안정적으로 유지시키고, 경제적으로 신경 줄기세포를 제공할 수 있음을 시사한다.

[0072] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

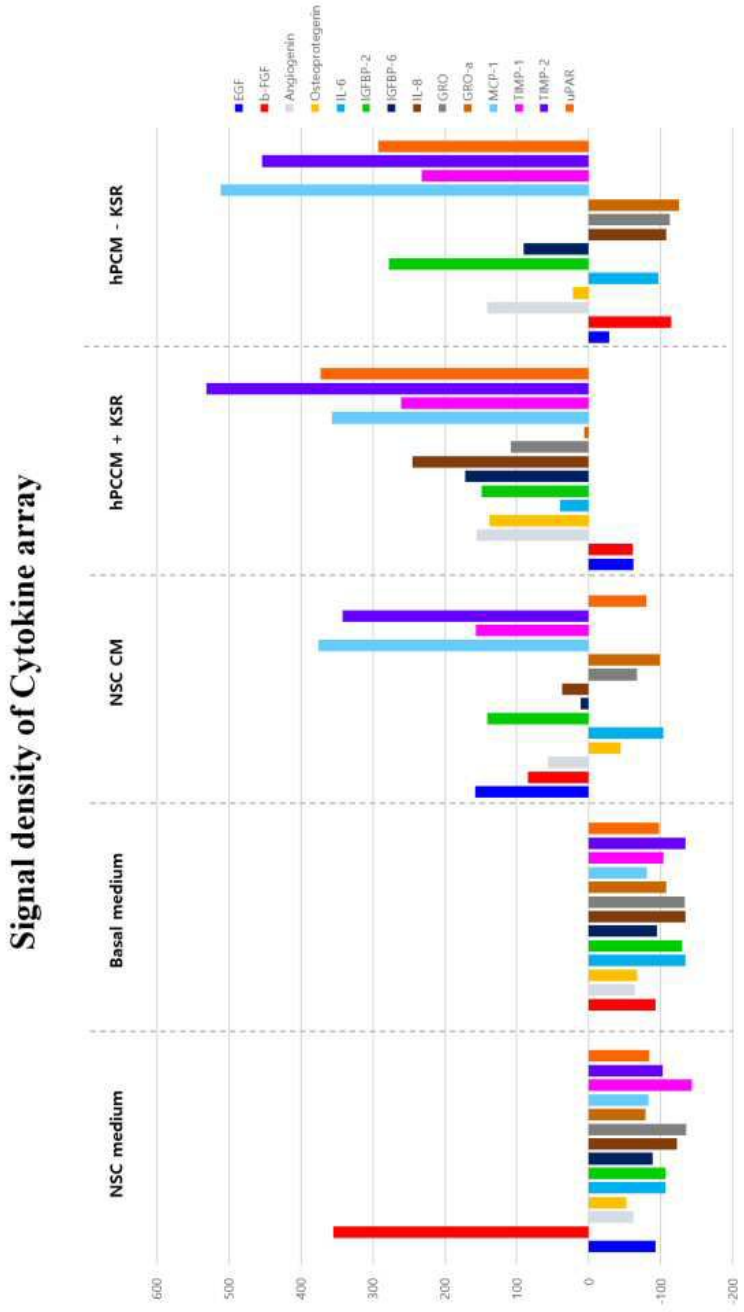
[0073] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

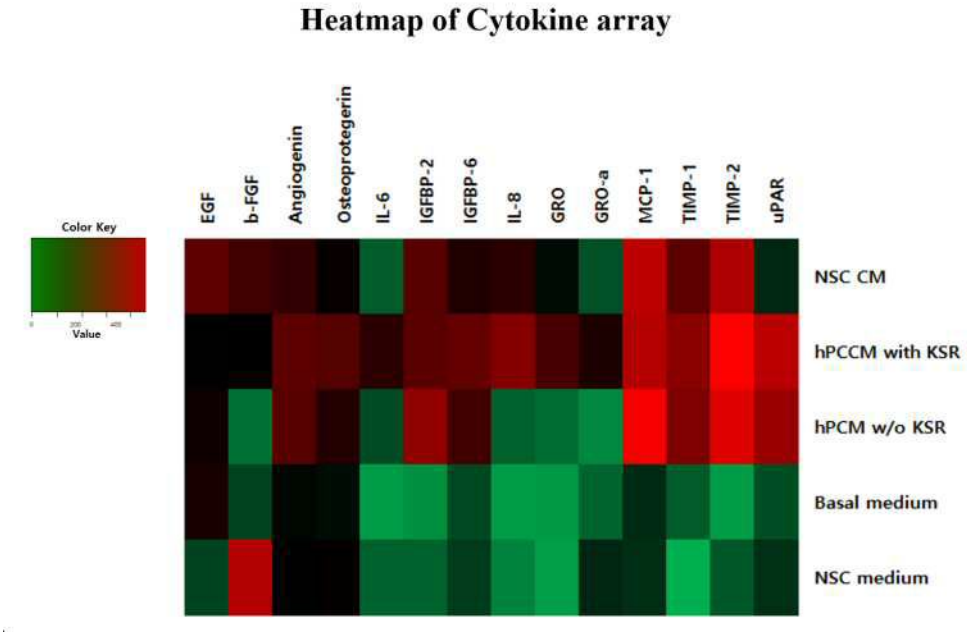
도면1


hPCCM without SR
hPCCM
DMEM/F12
NSC CM
Neural Stem Cell Medium
Array 6
Array 7
1. Angiogenin
2. IGFBP-2
3. MCP-1
4. IGFBP-6
5. TIMP-1/TIMP-2
6. uPAR
1. Angiogenin
2. IGFBP-2
3. IL-6
4. MCP-1
5. GRO/GRO-a
6. IGFBP-6
7. IL-8
8. Osteoprotegerin
9. TIMP-1/TIMP-2
10. uPAR
1. IGFBP-2
2. MCP-1
3. b-FGF
4. TIMP-1/TIMP-2
1. b-FGF

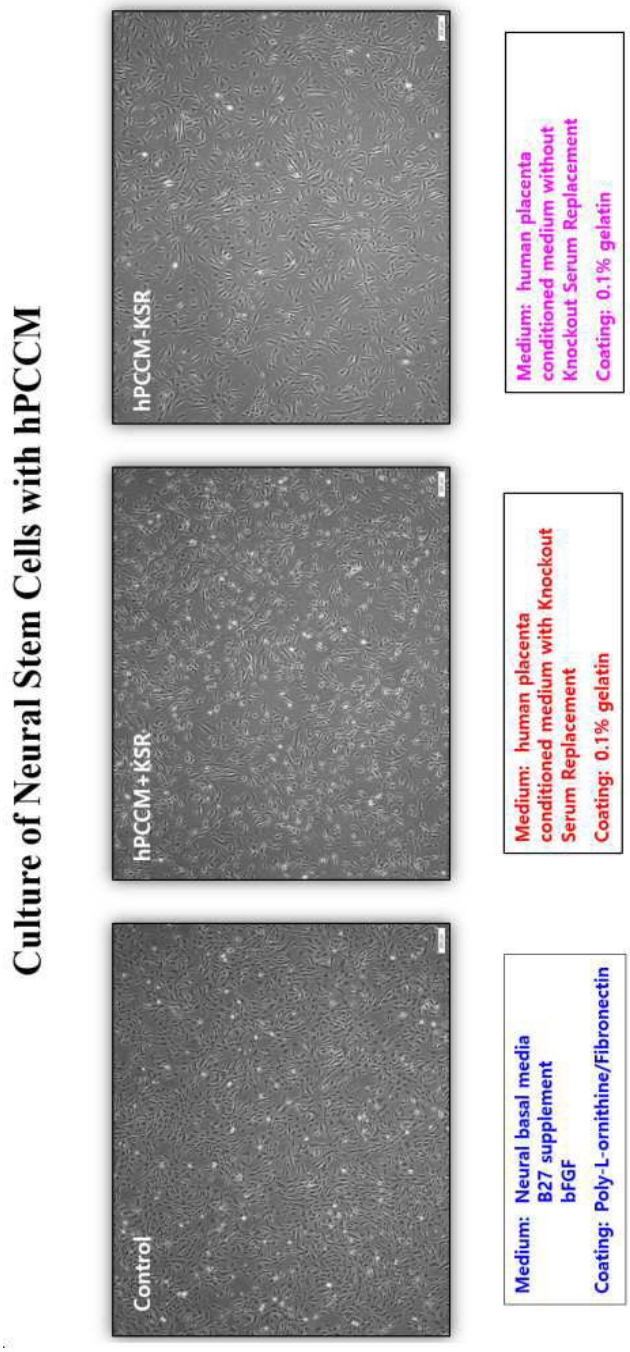
도면2


Signal density of Cytokine array
EGF
b-FGF
Angiogenin
Osteoprotegerin
IL-6
IGFBP-2
IGFBP-6
IL-8
GRO
GRO-a
MCP-1
TIMP-1
TIMP-2
uPAR
hPCM - KSR
hPCCM + KSR
NSC CM
Basal medium
NSC medium
600
500
400
300
200
100
0
-100
-200

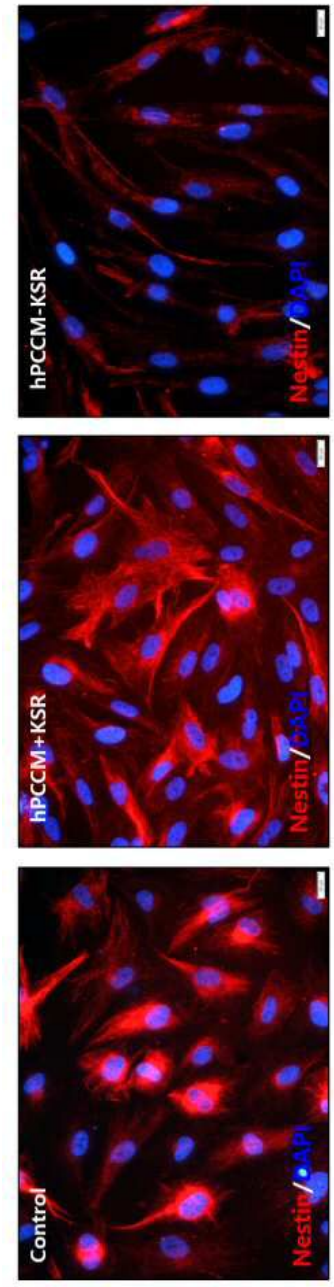
도면3


Heatmap of Cytokine array
Color Key
Value
EGF
b-FGF
Angiogenin
Osteoprotegerin
IL-6
IGFBP-2
IGFBP-6
IL-8
GRO
GRO-a
MCP-1
TIMP-1
TIMP-2
uPAR
NSC CM
hPCCM with KSR
hPCM w/o KSR
Basal medium
NSC medium

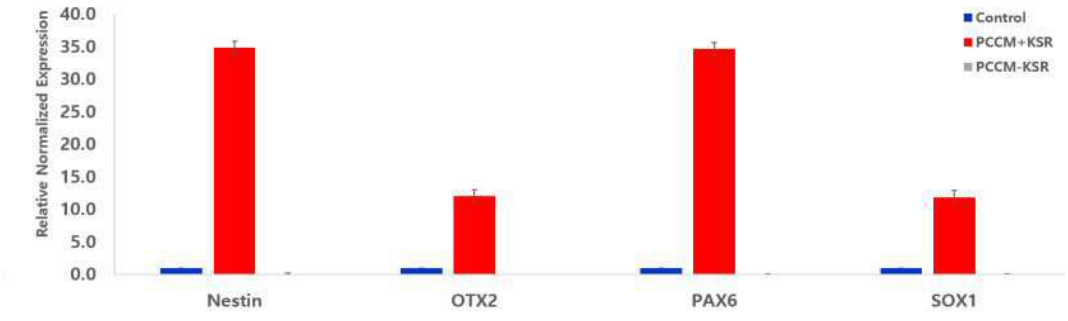
도면4


Culture of Neural Stem Cells with hPCCM
Control
hPCCM+KSR
hPCCM-KSR
Medium: Neural basal media
B27 supplement
bFGF
Coating: Poly-L-ornithine/Fibronectin
Medium: human placenta
conditioned medium with Knockout
Serum Replacement
Coating: 0.1% gelatin
Medium: human placenta
conditioned medium without
Knockout Serum Replacement
Coating: 0.1% gelatin

도면5


hPCCM-KSR
Nestin/DAPI
hPCCM+KSR
Nestin/DAPI
Control
Nestin/DAPI

도면6


Relative Normalized Expression
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Nestin
OTX2
PAX6
SOX1
Control
PCCM+KSR
PCCM-KSR