



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월10일
(11) 등록번호 10-1471785
(24) 등록일자 2014년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0094813
(22) 출원일자 2013년08월09일
심사청구일자 2013년08월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100021792 A
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
조광원
광주광역시 광산구 풍영로170번길 39-26, 505동
1502호(장덕동, 대방노블랜드)
정신구
전라남도 나주시 내동길 4-1(송월동)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 5 항

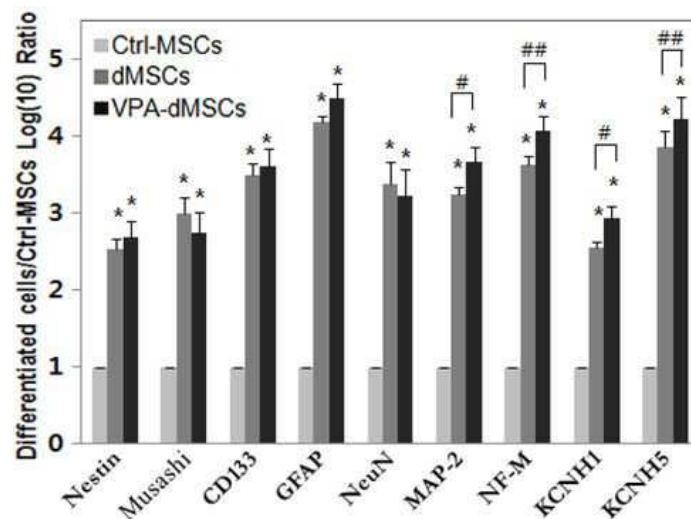
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 발프로산 전처리를 통한 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전에, 줄기세포에 발프로산(valproic acid)을 최적의 농도와 시간 동안 전처리함으로써 신경세포로 분화를 더욱 효과적으로 이끌어낼 수 있는 유도 증진/촉진 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전, 발프로산(valproic acid)을 200 µg/ml 농도로 12시간 동안 전처리(pre-treatment) 하는 과정을 통해 중간엽 줄기세포를 신경세포로 더욱 효과적으로 분화시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 신경계 질환의 치료를 위한 세포치료(cell therapy) 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120203

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 루게릭병 환자에서 추출한 줄기세포의 등급화 기준 확립

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.01 ~ 2014.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 중간엽 줄기세포에 발프로산을 전처리하는 단계;
- (b) 상기 발프로산 전처리된 중간엽 줄기세포를 소태아혈청, 섬유아세포 증식인자 및 β -머캅토에탄올을 포함하는 전-유도 배지에서 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 전-유도된 중간엽 줄기세포를 부틸 하이드록시아니솔과 디메틸설폭사이드가 포함된 신경유도 배지로 교체하여 배양하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 발프로산은 200 μ g/ml 농도로 12시간 동안 전처리하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 전-유도 배지는 10% 소태아혈청, 10ng/ml 섬유아세포 증식인자 및 500 μ M β -머캅토에탄올을 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 신경유도 배지는 100 μ M 농도의 부틸 하이드록시아니솔 및 2% 디메틸설폭사이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (b) 단계는 전-유도 배지에서 20 내지 30시간 동안 배양하며, 상기 (c) 단계는 신경유도 배지에서 5 내지 10시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전에, 줄기세포에 발프로산(valproic acid)을 최적의 농도와 시간 동안 전처리함으로써 신경세포로 분화를 더욱 효과적으로 이끌어낼 수 있는 유도 증진/촉진 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포(stem cell)란 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 미분화 상태에서 무한 증식이 가능한 자가증식능과 특정 분화 자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재적 가능성인 다분화능을 가진 세포를 말한다. 즉, 배양을 계속하여도 자가증식 능력이 떨어지지 않고 유지되며, 여러 종류의 세포로 분화가 가능해야 한다.

[0003] 줄기세포는 분화 가능성에 따라 크게 배아 줄기세포(embryonic stem cell; ES cell)와 성체 줄기세포(adult stem cells)로 나뉜다. 정자와 난자가 만나 수정된 후 발생과정이 일어나고 형태형성을 하게 되는데 이때 세포는 증식, 이동, 분화 과정을 겪게 된다. 배아 줄기세포는 수정란이 형성된 후 자궁내막에 착상하기 전의 매우 초기 단계인 포배기(blastocyst) 배아 중 태아로 발생할 세포괴(inner cell mass; ICM)로부터 분리해낸 줄기세

포로서, 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 3개의 배엽(embryonic germ layer)에 의해 생성되는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력이 있는(pluripotent) 세포이다.

[0004] 반면, 성체 줄기세포는 발생과정이 끝난 성인 또는 배아 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계에 태반에서 얻어지는, 각 장기에 특이적인 줄기세포로서, 그 분화능이 일반적으로 그 조직을 구성하는 세포로만 한정되게(multipotent) 된다. 이러한 성체 줄기세포는 성인이 된 후에도 대부분의 장기에 남아 정상적으로 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하는 역할을 한다. 대표적인 성체 줄기세포로는 골수(bone marrow)에 존재하는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell)와 혈구 세포 이외의 결합조직(connective tissue) 세포로 분화되는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)가 있다. 조혈 줄기세포는 적혈구, 백혈구 등 각종 혈구 세포로 분화되고, 중간엽 줄기세포는 골아세포(osteoblast), 연골아세포(chondroblast), 지방 세포(adipocyte) 및 근아세포(myoblast) 등으로 분화된다.

[0005] 최근에는 인간으로부터의 배아 줄기세포 분리가 성공한 이후, 그 임상적 적용에 관심이 고조되고 있다. 줄기세포의 적용분야로서 가장 주목받고 있는 것은 세포 대체 요법(cell replacement therapy)을 위한 완벽한 세포 공급원으로서의 이용이다. 난치병으로 알려진 파킨슨씨병, 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환, 척추 손상에 의한 사지마비, 백혈병, 중풍, 소아당뇨병, 심근경색, 간경화 등의 질환은 조직을 구성하는 세포의 파괴 및 영구적 기능 장애에 의해 초래되는데, 이들 질환에 의해 파괴되어 부족한 세포를 외부로부터 공급해주는 세포 대체 요법이 효과적인 치료법으로 제시되고 있다.

[0006] 그러나 배아줄기세포의 의학적 이용은 윤리적 문제, 면역 부적합성 및 제어되지 않는 종양 또는 기형종의 생성을 유발할 수 있고, 성체줄기세포는 윤리적 문제 및 면역 거부반응을 피할 수 있지만, 분화능이 제한적이라는 단점이 있다(Florian et al., 2007).

[0007] 이에 비해, 성체 줄기세포는 생체 내 이식 후에 특정 조직 및 장기 특이적으로 분화할 수 있고, 본래 세포의 특성과는 다른 타 조직의 세포로 전이 분화할 수 있는 분화 유연성을 가지는 세포로서, 윤리적인 제한 없어 조직 공학에 널리 사용되고 있다. 특히 골수세포는 쉽게 접근할 수 있고 2종류의 줄기세포를 갖고 있기 때문에 줄기세포의 이상적인 공급처로 여겨지고 있다.

[0008] 따라서 골수에 존재하는 중간엽 줄기세포로부터 신경세포를 분화시켜 사용할 수 있다면 세포 공급 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 자가 골수를 이용하므로 면역 거부 반응을 포함한 치료상의 문제점도 해결할 수 있는 이점을 갖는다.

[0009] 한편, 발프로산(valproic acid)은 클래스 I 및 클래스 IIa 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC: histone deacetylase)를 억제하는 HDAC 억제제로 널리 알려져 있다. 이러한 발프로산 화합물은 뇌전증, 조울증, 편두통 및 조현병을 포함하는 신경계질환을 위해서 약제학적으로 사용되어져 왔다.

[0010] 이에 본 발명자들은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도를 효과적으로 촉진 또는 증진시킬 수 있는 방법을 모색하던 중, 발프로산(valproic acid) 화합물에 주목하여 이의 처리시점, 처리농도, 처리시간을 최적화하여 실험한 결과, 본 발명의 발프로산을 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전에 200 µg/ml 농도로 12시간 동안 전처리하는 경우 신경세포로 분화를 더욱 효과적으로 이끌어낼 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2009-0053344호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 중간엽 줄기세포에서 신경세포로의 분화를 더욱 효과적으로 이끌어낼 수 있는 분화유도 증진 또는 촉진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,
- [0014] 본 발명은 (a) 중간엽 줄기세포에 발프로산을 전처리하는 단계; (b) 상기 발프로산 전처리된 중간엽 줄기세포를 소태아혈청, 섬유아세포 증식인자 및 β -머캅토에탄올을 포함하는 전-유도 배지에서 배양하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 전-유도된 중간엽 줄기세포를 부틸 하이드록시아니솔과 디메틸설폭사이드가 포함된 신경유도 배지로 교체하여 배양하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (a) 단계에서 발프로산은 200 μ g/ml 농도로 12시간 동안 전처리할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계에서 전-유도 배지는 10% 소태아혈청, 10ng/ml 섬유아세포 증식인자 및 500 μ M β -머캅토에탄올을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (c) 단계에서 신경유도 배지는 100 μ M 농도의 부틸 하이드록시아니솔 및 2% 디메틸설폭사이드를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계는 전-유도 배지에서 20 내지 30시간 동안 배양하며, 상기 (c) 단계는 신경유도 배지에서 5 내지 10시간 동안 배양할 수 있다.

발명의 효과

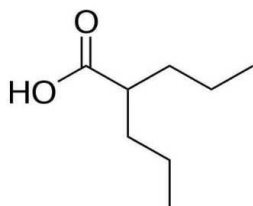
- [0019] 본 발명의 방법은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전, 발프로산(valproic acid)을 200 μ g/ml 농도로 12시간 동안 전처리(pre-treatment) 하는 과정을 통해 중간엽 줄기세포를 신경세포로 더욱 효과적으로 분화시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 신경계 질환의 치료를 위한 세포치료(cell therapy) 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1a는 발프로산 처리된 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에서 신경 전구세포 마커 유전자들의 mRNA 발현량을 real-time PCR로 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 1b는 발프로산 처리된 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에서 신경 전구세포 마커 유전자들의 단백질 발현량을 면역블랏 분석을 통해 측정한 결과이다.
- 도 2a는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경분화 유도 배지에서 배양에 따른 세포들의 형태적인 변화를 현미경(Olympus IX71, Japan) 및 디지털 카메라(Olympus U-LS30-3, Japan)를 이용 이미지화한 사진이다. 사진에서 노란 화살촉은 분화되지 않은 중간엽 줄기세포를 가리키며, 기준자는 100 μ m를 가리킨다.
- 도 2b는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경분화 유도 배지에서 배양에 따른 세포들의 신경 분화율을 계산하여 그래프로 나타낸 것이다(t-test, # $p < 0.01$, mean $\pm$ SD, n=4).
- 도 2c는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경분화 유도 배지에서 배양에 따른 세포들의 신경돌기의 길이를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다(t-test, * $p < 0.05$ mean $\pm$ SD, n=4).
- 도 2d는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경분화 유도 배지에서 배양에 따른 세포들의 신경돌기 수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다(t-test, * $p < 0.05$ mean $\pm$ SD, n=4).
- 도 3은 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경분화 유도 배지에서 배양에 따른 세포들의 다양한 뉴런 특이 마커 유전자들(Nestin-1, Musashi, NeuN, MAP-2, NF-M, KCNH5)의 mRNA 발현량을 RT-PCR 및 real-time PCR을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다(3a: RT-PCR, 3b: real-time PCR).
- 도 4는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경분화 유도 배지에서 배양에 따른 세포들의 다양한 뉴런 특이 마커인 NF-M 및 Nestin의 단백질 발현 수준을 면역세포화학적 염색 및 면역블랏 분석을 통해 측정한 결과이다(4a: 면역세포화학적 염색, 4b: 면역블랏 분석).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법에 관한 것으로, 자세하게는 중간엽 줄기세포에 발프로산을 전처리(pre-treatment)하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0022] 발프로산(valproic acid)은 클래스 I 및 클래스 IIa 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC: histone deacetylase)를 억제하는 HDAC 억제제로 널리 알려져 있으며, 종래 뇌전증, 조울증, 편두통 및 조현병을 포함하는 신경계질환을 위한 약제학적 용도로 사용되어져 왔다.
- [0023] 본 발명자들은 상기와 같은 특징으로 갖는 발프로산을 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전, 최적의 농도와 시간에 따라 전처리하는 경우 신경세포로 분화를 더욱 효과적으로 이끌어낼 수 있다는 사실을 확인하였다.
- [0024] 즉, 본 발명의 실시예에서는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포를 200 µg/ml 농도의 발프로산 존재 하에서 12시간 동안 반응시킨 후, 신경세포로의 분화를 유도하는 경우, 발프로산 전처리 없이 신경세포로의 분화를 유도하는 것과 비교하여 분화의 정도가 효과적으로 증진/촉진되는 것을 실험을 통해 증명하였다.
- [0025] 본 발명의 하기 실시예 3에서는, 발프로산의 전처리가 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있는지를 평가하기 위하여, 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경 분화 유도 배지에서 배양함으로써 세포 자체의 형태변화를 관찰하였다. 그 결과 발프로산으로 전처리된 후 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포(VPA-dMSCs)의 경우, 전처리 없이 분화시킨 실험군(dMSCs)과 비교하여 뉴런 유사 세포의 분화가 두드러지게 형성되는 것으로 나타났으며(도 2b 참조), 또한 전처리 없이 분화시킨 실험군에 비해 발프로산 전처리 후 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포에서 평균 신경돌기의 길이가 두드러지게 신장되는 것을 확인할 수 있었다(도 2c 참조).
- [0026] 본 발명의 하기 실시예 4에서는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경 분화에 있어서 발프로산(valproic acid) 전처리에 따른 다양한 신경 전구세포 마커 유전자들의 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 신경 분화 유도 배지를 통해 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs, dMSCs)에서 뉴런 특이적 마커 유전자들의 발현이 모두 증대되는 것으로 나타났으며, 특히 발프로산을 전처리하여 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs)은 전처리 없이 분화시킨 실험군(dMSCs)에 비해 mRNA 발현양이 더욱 두드러지게 증대되는 것을 확인할 수 있었다(도 3a 및 도 3b 참조).
- [0027] 본 발명의 하기 실시예 5에서는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경 분화에 있어서 발프로산의 전처리에 따른 다양한 신경세포 특이적 단백질들의 수준 변화를 면역세포화학적 염색(Immunocytochemical staining) 및 면역블랏 분석(Immunoblot analysis)을 통해 살펴보았다. 그 결과 분화되지 않은 중간엽 줄기세포(Ctrl-MSCs)와 비교하여 신경 분화 유도 배지를 통해 분화를 유도한 실험군(VPA-dMSCs, dMSCs)에서 신경세포 특이적 단백질인 NF-M(neurofilament 150kDa) 및 Nestin의 단백질 발현이 증가한 것을 볼 수 있을 뿐만 아니라, 세포의 형태가 뉴런-유사 세포(neuron-like cell)로 분화된 것을 더욱 확실하게 관찰할 수 있었다. 특히 발프로산을 전처리하여 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs)은 전처리 없이 분화시킨 실험군(dMSCs)에 비해 단백질 발현이 더욱 두드러진 것을 확인할 수 있었다(도 4a 및 도 4b 참조).
- [0028] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 전, 발프로산(valproic acid)을 200 µg/ml 농도로 12시간 동안 전처리(pre-treatment)하는 과정을 통해 중간엽 줄기세포를 신경세포로 더욱 효과적으로 분화시킬 수 있음을 실험적으로 입증하였다.
- [0029] 본 발명에 따른 상기 발프로산(valproic acid)은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.
- [0030] <화학식 1>



- [0031]
- [0032] 본 발명에 따른 발프로산(valproic acid) 화합물은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로

부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법은 자세하게는 하기와 같다.

[0034] (a) 중간엽 줄기세포에 발프로산을 전처리하는 단계;

[0035] (b) 상기 발프로산 전처리된 중간엽 줄기세포를 소태아혈청, 섬유아세포 증식인자 및 β -머캅토에탄올을 포함하는 전-유도 배지에서 배양하는 단계; 및

[0036] (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 전-유도된 중간엽 줄기세포를 부틸 하이드록시아니솔과 디메틸설폭사이드가 포함된 신경유도 배지로 교체하여 배양하는 단계를 포함하는, 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 촉진방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 상기 (a) 단계는 중간엽 줄기세포에 발프로산을 전처리하는 단계로서, 상기 발프로산은 200 μ g/ml 농도인 것이 바람직하며, 상기 전처리는 12시간 반응시키는 것이 좋다.

[0038] 본 발명의 상기 (b) 단계는 발프로산 전처리된 중간엽 줄기세포를 전-유도 배지에서 배양하는 단계로서, 상기 전-유도 배지는 소태아혈청, 섬유아세포 증식인자 및 β -머캅토에탄올을 포함하는 구성이라면, 특별히 이들 조성의 성분비 또는 농도를 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 10% 소태아혈청, 10ng/ml 섬유아세포 증식인자 및 500 μ M β -머캅토에탄올을 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 상기 (c) 단계는 전-유도된 중간엽 줄기세포를 신경유도 배지로 교체하여 배양하는 단계로서, 상기 신경유도 배지는 부틸 하이드록시아니솔과 디메틸설폭사이드를 포함하는 구성이라면, 특별히 이들 조성의 성분비 또는 농도를 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 100 μ M 농도의 부틸 하이드록시아니솔 및 2% 디메틸설폭사이드를 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계는 전-유도 배지에서 20 내지 30시간 동안 배양하며, 상기 (c) 단계는 신경유도 배지에서 5 내지 10시간 동안 배양할 수 있으며, 바람직하게는 전-유도 배지에서 24시간 배양 및 신경유도 배지에서 6시간 배양하는 것이 좋다.

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1>

[0043] 인간 골수유래 중간엽 줄기세포(human bone-marrow mesenchymal stromal cell; hBM-MSC)의 배양 및 이들의 신경분화 유도

[0044] <1-1> 인간 골수유래 중간엽 줄기세포 배양

[0045] 본 발명에 사용한 인간 골수유래 중간엽 줄기세포는 CEFO(Cell Engineering For Origin, Korea)에서 구입하였으며, 공급자의 지시에 따라 T75 flasks(Becton Dickinson, USA)에서 배양하였다. 상기 중간엽 줄기세포는 다른 자극 보조제 또는 비타민의 공급 없이 성장 보충제, L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 인간 골수유래 중간엽 줄기세포 배지(Gibco, USA)에서 배양하였다. 상기 중간엽 줄기세포는 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하면서, 7번 계대배양한 후 하기 실험에 사용하였다.

[0046] <1-2> 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도

[0047] 상기 실시예 <1-1>을 통해 준비된 중간엽 줄기세포를 200 μ g/ml 농도의 발프로산 존재 및 미존재 하에서 12시간 동안 반응시킨 후, 10% FBS, 10 ng/ml bFGF 및 500 μ M β -머캅토에탄올(β -mercaptoethanol)를 함유하는 전-유도 배지에서 24시간 노출시킨 다음, 상기 배지를 100 μ M 농도의 부틸 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA) 및 2%(v/v) DMSO가 함유된 FBS-free media 유도 배지로 교체하여 6시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 세포들은 하기 실험에서 사용되었다.

[0048] <실시예 2>

[0049] 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에서 발프로산(valproic acid) 처리에 따른 신경 전구세포 마커 유전자들의 발현 유도

[0050] 본 실험에서는 발프로산의 중간엽 줄기세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 일정 농도의 발프로산 처리에 따른 신경 전구세포 유전자 마커 발현량 변화를 측정하였다. 신경 전구세포 유전자 마커는 Nestin-1, Musashi, CD133 및 GFAP를 이용하였으며, 이들의 유전자 발현 여부를 real-time PCR을 통한 mRNA 수준 및 면역블랏 분석을 통한 단백질 수준에서 평가하였다.

[0051] <2-1> real-time PCR을 통한 신경분화 표지의 확인

[0052] 상기 실시예 <1-1>을 통해 준비된 중간엽 줄기세포를 200 µg/ml 농도의 발프로산 존재 및 미존재 하에서 12시간 동안 반응시킨 다음 수확하였다. 이후 수확한 세포의 총 RNAs를 제조사의 지시에 따라 RNAiso reagent (TAKARA, Japan)를 이용하여 추출하였다. 추출된 3-5 µg의 총 RNA는 0.2 µg의 랜덤 프라이머(TAKARA, Japan), 1mM dNTPs 및 공급 펌버를 이용한 Primescript II 1st strand cDNA synthesis kit(TAKARA, Japan)를 가지고 역전사 반응으로 cDNA를 합성하였다.

[0053] 역전사 반응 시 최초의 cDNA 가닥은 Taq DNA 중합효소(MBI Fermentas, USA)와 인간 Nestin-1, Musashi, NeuN, MAP-2, NF-M, KCNH5 또는 β-actin에 대한 특이 프라이머를 사용하여 증폭시켰고, 이때 PCR 조건은 94℃에서 2분간 초기 변성시키고, 94℃에서 30초간 변성, 55℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 30초간 연장 반응시켰고, 이 과정을 30사이클 반복 수행한 후, 최종 연장 반응을 72℃에서 10분간 수행하였다.

[0054] 또한, 역전사 반응을 통해 증폭된 각 유전자들의 cDNAs는 Real-time PCR을 통해 증폭시켰는데, 이를 위하여, first strand cDNAs는 Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 인간 Nestin-1, Musashi, CD133, GFAP, Nanog, SDF-1α, NeuN, MAP-2, NF-M, KCNH1, KCNH5 또는 β-actin에 대한 특이 프라이머 세트에 증폭시켰다. 반응조건은 95℃에서 10분간 반응시킨 후, 95℃에서 15초간, 58℃에서 1분간을 총 40회 반응시켰다. 본 발명에서 사용한 프라이머들은 IDT(Integrated DNA Technologies Inc., USA)에서 합성되었으며 하기 표 1에서 나타내었다. 한편, SDF-1α을 위한 프라이머 세트는 SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA)에서 구입하였다.

표 1

[0055] Real-time PCR 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열(5' →3')		Acc. No.
Nanog	포워드	GTCCCAAAGGCAACAACCC	NM_024865
	리버스	GCTGGGTGGAAGAGAACACA	
Nestin	포워드	AGCCCTGACCACTCCAGTTT	NM_006617
	리버스	GCTGCTTACCACTTTGCCCT	
Musashi	포워드	ATAAAGTGCTGGCGCAATCG	NM_002442
	리버스	TCGTTCGAGTCACCATCTTGG	
CD133	포워드	CCTGGGGCTGCTGTTATTAT	NM_006017
	리버스	ATTTTCCTTCTGTCGCTGGT	
GFAP	포워드	TGGGAGCTTGATTCTCAGCA	NM_002055
	리버스	CCTGGGCTTGACCTCTCTGTA	
NeuN	포워드	TGGCATGACCTGTACACAC	NM_001082575
	리버스	TGCTTCTCTGTAGGGTCGGA	
MAP-2	포워드	TTGGTGCCGAGTGAGAAGAA	NM_002374
	리버스	GGTCTGGCAGTGGTTGGTTAA	
NF-M	포워드	GTGAACCACGAGAAGGCTCA	NM_005382
	리버스	AGGTAGTCTTTGCGCTCCAC	
KCNH1	포워드	TTGGAGATGTGTTCTGGAAGGAA	NM_172362.2
	리버스	AGGCATCCCGCTTGATC	

KCNH5	포워드	GACGAAATTTGCCCGATTGA	NM_139318
	리버스	TGAATGTTTATGGACCACCTCTGT	
β -actin	포워드	ATCCGCAAAGACCTGTACGC	NM_001101
	리버스	TCTTCATTGTGCTGGGTGCC	

[0056] Acc. No. indicates gene access number.

[0057] 그 결과 도 1a에서 나타낸 바와 같이, 중간엽 줄기세포에 발프로산이 처리된 실험군에서 신경 전구세포의 대표적 마커 유전자인 Nestin-1, Musashi, CD133 및 GFAP의 mRNA 발현양이 두드러지게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, NANOG 및 SDF-1 α 수준은 발프로산의 처리 유무와 상관없이 mRNA 발현양이 일정한 것을 확인할 수 있었다(ctrl-MSCs; t-test, *p<0.05, **p<0.005, mean $\pm$ SD, n=6).

[0058] <2-1> 면역블랏 분석을 통한 신경분화 표지의 확인

[0059] 상기 실시예 <1-1>을 통해 준비된 중간엽 줄기세포를 200 μ g/ml 농도의 발프로산 존재 및 미존재 하에서 12시간 동안 반응시킨 다음 수확한 세포를 프로테아제 및 디포스파테이즈 저해제 혼합물(Santa Cruz Biotechnology, USA) 함유하는 RIPA 버퍼 400 μ l를 이용 4℃에서 30분 동안 용해시킨 후, 상청액으로서 용해물을 모으기 위해 16,000 $\times$ g 20분간 원심분리하였다. 이렇게 수득한 총 단백질을 이용 Nestin (1:1000), Musashi (1:1000), CD133 (1:1000), GFAP (1:500), NF-M (1:500) 또는 GAPDH (1:5000)에 대한 항체를 1차 처리하고, 적절한 HRP (horseradish peroxidase)-컨쥬게이트드 2차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)를 처리하여 면역블랏팅을 수행하였다. 웨스턴 블랏은 Image J program으로 정량화하였다.

[0060] 그 결과 도 1b에서 나타낸 바와 같이, 신경 전구세포의 대표적 마커 유전자인 Nestin-1, Musashi, CD133 및 GFAP의 단백질양이 두드러지게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 상기 실시예<2-1>의 결과와 일치하는 결과이다.

[0061] <실시예 3>

[0062] **발프로산(valproic acid)으로 전처리된 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경 유도 배지에서 뉴런의 출현**

[0063] 본 발명자들은 상기 실시예 2를 통해 인간 골수유래 중간엽 줄기세포에 발프로산을 처리하는 경우 신경 전구세포의 마커 유전자들이 두드러지게 증대되는 것을 확인하였는바, 이러한 결과를 통해 발프로산이 신경 전구세포의 유전자들을 자극하여 신경 세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있다고 판단(가정)하였다.

[0064] 이에 본 실험에서는 실제로 발프로산의 처리가 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있는지를 평가하기 위하여, 중간엽 줄기세포에 발프로산의 처리 또는 미처리 후, 이들 세포를 신경 분화 유도 배지에서 배양함으로써 세포 자체의 형태변화를 관찰하였다.

[0065] 자세하게는, 상기 실시예 1을 통해 준비된 세포들의 형태적인 변화를 관찰하기 위하여 현미경(Olympus IX71, Japan) 및 디지털 카메라(Olympus U-LS30-3, Japan)를 이용 이미지화하였다. 참고로, 실험에서는 크게 4가지 군을 나누어 살펴보았다(하기 표 2 참조).

표 2

약칭	그룹
ctrl-MSCs	무처리 중배엽 줄기세포
VPA-MSCs	발프로산 처리된 중배엽 줄기세포
dMSCs	전처리 없이 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포
VPA-dMSCs	발프로산 전처리 후 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포

[0067] 그 결과 도 2a에서 나타낸 바와 같이, 신경 유도 배지에서 신경 분화된 실험군(dMSCs 및 VPA-dMSCs)에서는 뉴런

의 형태가 존재하는 것을 확인할 수 있었으나, 신경 유도 배지에서 신경 분화가 이루어지지 않은 실험군(ctrl-MSCs 및 VPA-MSCs)에서는 평평하고 방추 형태의 외관을 가진 세포의 형태를 보여주었다.

[0068] 한편, 발프로산으로 전처리 또는 미처리된 후 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포(VPA-dMSCs, dMSCs)들의 신경 분화율(differentiation rate)을 평가하였으며, 그 결과 도 2b에서 나타난 바와 같이 발프로산으로 전처리된 후 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포의 경우, 전처리 없이 분화시킨 실험군과 비교하여 뉴런 유사 세포가 분화가 두드러지게 이루어지는 것을 확인할 수 있었다(t-test, *p<0.01, mean±SD, n=4).

[0069] 또한, 전처리 없이 분화시킨 실험군에 비해 발프로산 전처리 후 신경 분화 배지에서 분화된 중배엽 줄기세포에서 평균 신경돌기의 길이가 두드러지게 신장되는 것으로 나타났다(도 2c 참조). 다만, 신경돌기의 수에 있어서는 크게 차이가 나지 않았다(도 2d 참조).

[0070] <실시예 4>

[0071] 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경 분화에 있어서 발프로산(valproic acid) 전처리에 따른 다양한 신경 전구세포 마커 유전자들의 발현에 미치는 영향

[0072] 상기 실시예 3을 통해 중간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화에 있어서, 발프로산을 전처리하는 경우 세포의 형태적 외관 관찰을 통해 신경 분화 속도가 빠르게 진행되며, 신경돌기의 길이도 신장되는 것으로 나타난바, 본 실험에서는 실제로 다양한 뉴런 특이 마커들의 유전자 발현이 증대되었는지 여부를 살펴보기 위하여 RT-PCR 및 real-time PCR을 통해 이를 평가하였다.

[0073] <4-1> RT-PCR을 통한 신경분화 표지의 확인

[0074] 상기 실시예 <1-2>를 통해 준비된 세포를 수확한 다음 세포의 총 RNAs를 제조자의 지시에 따라 RNAiso reagent (TAKARA, Japan)를 이용하여 추출하였다. 추출된 3-5 µg의 총 RNA는 0.2 µg의 랜덤 프라이머(TAKARA, Japan), 1 mM dNTPs 및 공급 퍼버를 이용 Primescript II 1st strand cDNA synthesis kit(TAKARA, Japan)를 통해 cDNA를 합성하였다. 그 후 cDNA의 first strand는 Taq DNA polymerase (MBI Fermentas, USA)와 인간 Nestin-1, Musashi, NeuN, MAP-2, NF-M, KCNH5 또는 β-actin을 위한 유전자 특이 프라이머(상기 표 1 참조)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 사이클 조건은 하기와 같다. 주형 DNA는 94℃에서 2 분간 변성해주고; 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 총 30회전을 돌린 후, 72℃에서 10분 동안 신장시켜준 뒤 4℃에서 쿨링(cooling)의 순서로 순행하였다. 상기의 반응 완료 후 생성된 PCR 산물은 아가로오스 겔 전기영동하고, 트랜스일루미네이터를 이용하여 밴드의 크기를 확인하였다.

[0075] 그 결과 도 3a에서 나타난 바와 같이, 신경 분화 유도 배지를 통해 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs, dMSCs)에서 뉴런 특이적 마커 유전자들의 발현이 증대되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 발프로산을 전처리하여 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs)은 전처리 없이 분화시킨 실험군(dMSCs)에 비해 mRNA 발현양이 더욱 두드러지게 증대되는 것을 알 수 있었다(도 3a: t-test, * p<0.001, mean±SD, n=7).

[0076] <4-2> real-time PCR을 통한 신경분화 표지의 확인

[0077] Real-time PCR 과정은 상기 실시예<2-1>과 동일한 방법으로 진행되었다.

[0078] 그 결과 도 3b에서 나타난 바와 같이, 신경 분화 유도 배지를 통해 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs, dMSCs)에서 뉴런 특이적 마커 유전자들의 발현이 증대되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 발프로산을 전처리하여 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs)은 전처리 없이 분화시킨 실험군(dMSCs)에 비해 mRNA 발현양이 더욱 두드러지게 증대되는 것을 알 수 있었다(도 3b: t-test, # p<0.02, ## p<0.01, mean±SD, n=7).

[0079] <실시예 5>

[0080] 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경 분화에 있어서 발프로산(valproic acid) 전처리에 따른 다양한 신경세포 특이적 단백질들의 상향조절

[0081] 본 실험에서는 인간 골수유래 중간엽 줄기세포의 신경 분화에 있어서 발프로산의 전처리에 따른 다양한 신경세포 특이적 단백질들의 수준 변화를 면역세포화학적 염색(Immunocytochemical staining) 및 면역블랏 분석(Immunoblot analysis)을 통해 측정하였다.

[0082] <5-1> 면역세포화학적 염색

[0083] 상기 실시예 <1-1>을 통해 준비된 중간엽 줄기세포를 200 µg/ml 농도의 발프로산 존재 및 미존재 하에서 12시간 동안 반응시킨 후, poly-L-lysine으로 코팅된 커버슬립(Fisher Scientific, USA) 상에서 성장시키고 뉴런 유사 세포로 분화를 유도하였다. 이후 상기 세포들을 4%(v/v) 파라포름알데하이드가 포함된 PBS 고정 용액으로 실온에서 15분 동안 고정시킨 다음 500 µl의 PBS로 3번 세척하였다. 이어서, 실온에서 5분 동안 ice-cold 메탄올을 처리하여 투과하고 PBS로 3번 세척하였다. 그리고 비특이 결합을 막기 위해, 차단 완충용액(5% horse serum in PBS containing 0.02% sodium azide)을 1시간 동안 실온에서 처리하였다. 다음으로 4℃에서 차단 완충용액으로 희석한(1:200) NF-M 또는 Nestin (Santa Cruz biotechnology, USA)에 대한 항체와 상기 세포들을 밤새도록 불려주었고, 500 µl의 PBS-A로 3번 세척한 후, Hoechst 33342 (Molecular Probes Inc., USA)에 1:500으로 희석한 Hoechst Alexa 488-conjugated donkey anti-goat IgG antibodies(Molecular Probes Inc., USA)를 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, PBS로 3번 세척하였다. 마지막으로 마운팅 용액(mounting solution; ProLong Gold antifade reagent, Molecular Probes Inc., USA)을 첨가하여 세포들을 고정시키고, Nikon Eclipse 80Ti microscope (Nikon, Japan)을 갖는 형광현미경으로 사진을 찍어서 조직학적 분석을 수행하였다. 세포 이미지는 DS-RI1 디지털 카메라(Nikon, Japan)를 이용하여 가시화되었다.

[0084] 그 결과 도 4a에서 나타낸 바와 같이, 분화되지 않은 중간엽 줄기세포(Ctrl-MSCs)와 비교하여 신경 분화 유도 배지를 통해 분화를 유도한 실험군(VPA-dMSCs, dMSCs)에서 신경세포 특이적 단백질인 NF-M(neurofilament 150kDa) 및 Nestin의 단백질 발현이 증가한 것을 볼 수 있을 뿐만 아니라, 세포의 형태가 뉴런-유사 세포(neuron-like cell)로 분화된 것을 더욱 확실하게 관찰할 수 있었다. 특히 발프로산을 전처리하여 분화시킨 실험군(VPA-dMSCs)은 전처리 없이 분화시킨 실험군(dMSCs)에 비해 단백질 발현이 더욱 두드러진 것을 확인할 수 있었다.

[0085] <5-2> 면역블랏 분석

[0086] 프로테아제 및 디포스파테이즈 저해제 혼합물들(Santa Cruz Biotechnology, USA) 함유하는 RIPA 버퍼 400 µl를 이용 4℃에서 30분 동안 세포들(Ctrl-MSCs, VPA-dMSCs, dMSCs)을 각각 용해시킨 후, 상청액으로서 용해물을 모으기 위해 16,000×g 20분간 원심분리하였다. 이렇게 수득한 총 단백질을 이용 Nestin (1:1000), NF-M (1:500) 또는 GAPDH (1:5000)에 대한 항체를 1차 처리하고, 적절한 HRP (horseradish peroxidase)-컨쥬게이트드 2차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)를 처리하여 면역블랏팅을 수행하였다. 웨스턴 블랏은 Image J program으로 정량화하였다.

[0087] 그 결과 도 4b에서 나타낸 바와 같이, 분화되지 않은 중간엽 줄기세포(Ctrl-MSCs)와 비교하여 신경 분화 유도 배지를 통해 분화를 유도한 실험군(VPA-dMSCs, dMSCs)에서 신경세포 특이적 단백질인 NF-M(neurofilament 150kDa) 및 Nestin의 단백질 발현이 상향조절된 것을 확인할 수 있었다. 이는 상기 실시예 <5-1>과 일치하는 결과이다.

[0088] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

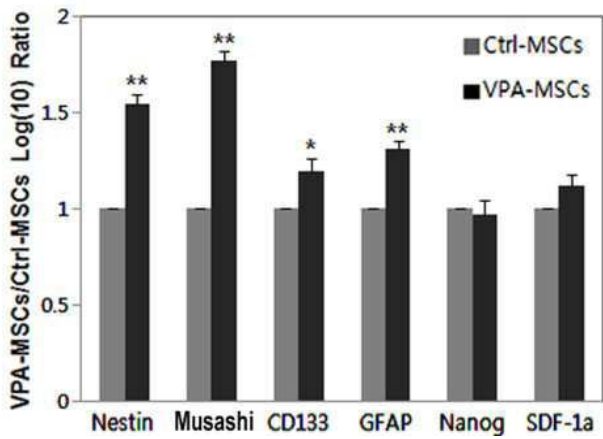
[0089] VPA: valproic acid

BHA: butylated hydroxyanisole

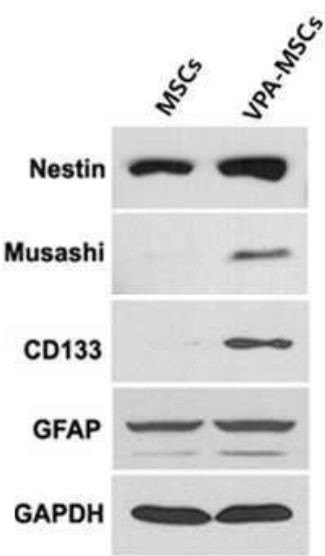
FBS: Fatal Bovine Serum
bFGF: Basic fibroblast growth factor
DMSO: Dimethyl sulfoxide

도면

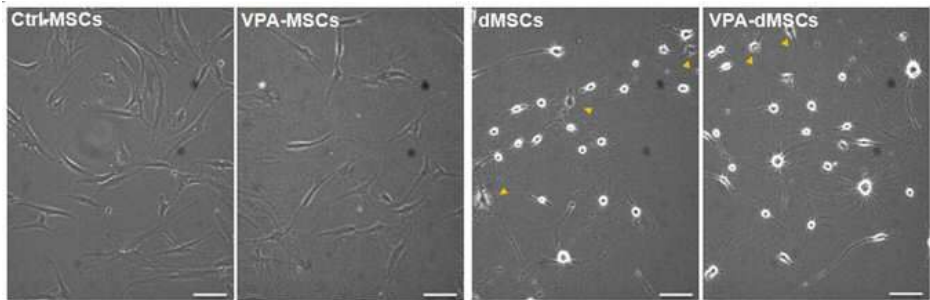
도면1a



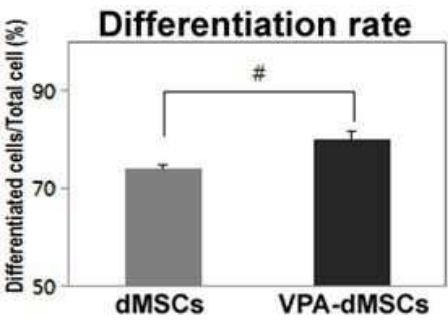
도면1b



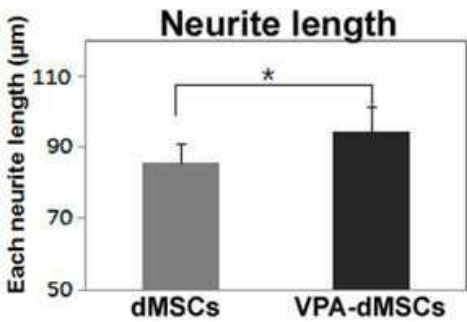
도면2a



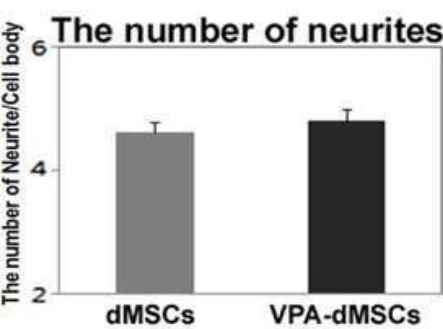
도면2b



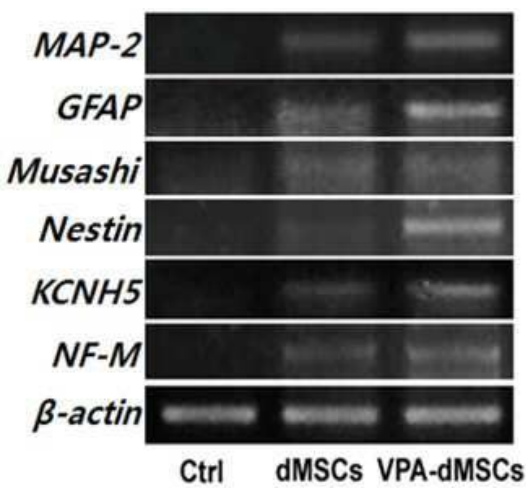
도면2c



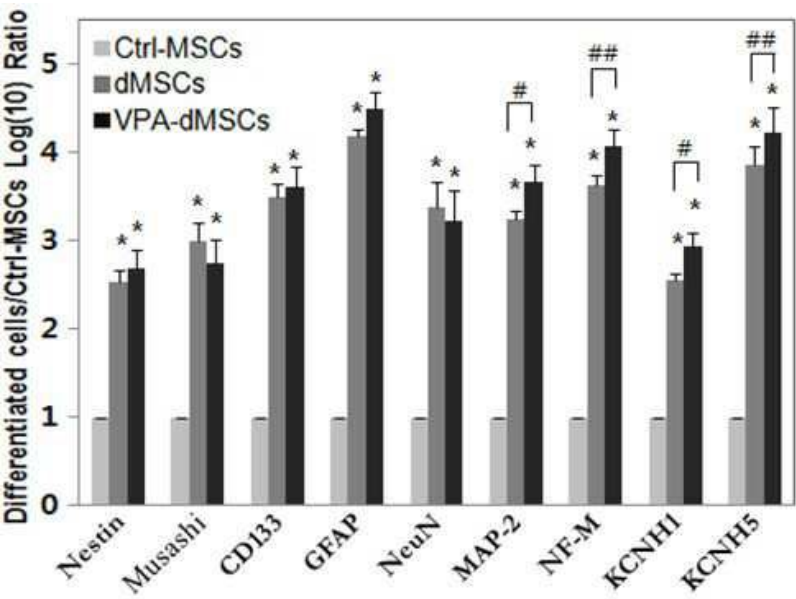
도면2d



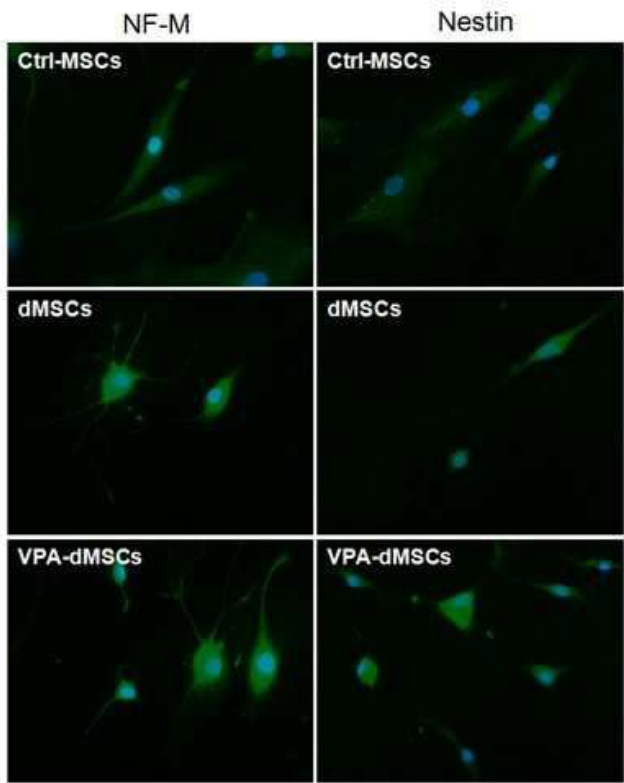
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

