(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0085767
(43) 공개일자 2013년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) *C12N 5/0797* (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0006815
(22) 출원일자 2012년01월20일
심사청구일자 2012년01월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
주식회사 스템폰즈
서울특별시 영등포구 여의도동 15-24 익스콘빌딩 606
(72) 발명자
유승권
경기도 용인시 처인구 양지면 평창리 13-4
권수현
경기도 부천시 원미구 중동 중동팰리스카운티아파트 119동 304호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김선애

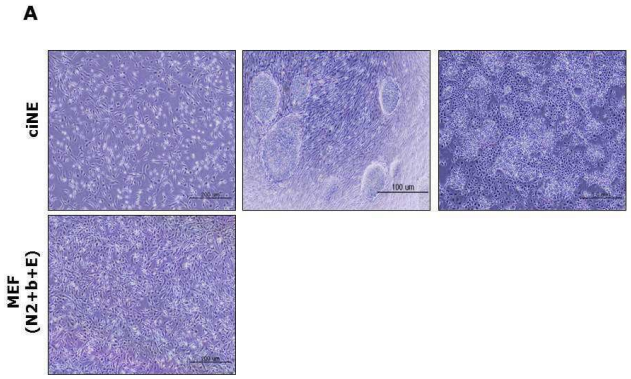
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 도입 없이 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 배양 배지에 퍼모파민(Purmorphamine), TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor) 및 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)를 첨가하여 체세포를 배양하여 체세포를 신경상피세포로 유도하는 단계를 포함하는, 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법 및 이에 이용되는 역분화 유도용 배지 조성물에 관한 것이다. 상기 구성의 본 발명은 유전자 도입 없이 저분자성 물질만을 이용하여 안전하고 높은 효율로 체세포로부터 화학적 유도 신경상피세포(Chemically Induced Neuroepithelial cell; ciNE) 및 유도 신경줄기세포 (Chemically Induced Neural Stem Cell; ciNSC)로 직접적 역분화하는 방법을 제시하여, 유전자 조작 없는 자가세포를 이용한 신경질환계 세포치료제 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(72) 발명자

윤병선

서울특별시 광진구 구의동 248-85

박규만

경기도 성남시 분당구 야탑동 장미마을동부아파트 108-1501

황지혜

경기도 부천시 원미구 중2동 그린우성아파트 1328동 901호

김지현

서울특별시 강동구 암사동 433-58 102호

전은경

경기도 성남시 중원구 중동 3587 번지 2층

현솔지

서울특별시 동대문구 회기동 60-140번지

강필준

경기도 과천시 중앙동 주공연립 1026동 303호

윤원진

경기도 용인시 기흥구 서천동 예현마을 현대홈타운 105동 1001호

박지용

대구광역시 수성구 범물1동 1315-11번지

장소연

경기도 고양시 덕양구 성사2동 신원당1단지아파트 102-604

김은정

경기도 고양시 일산서구 대화동 장성마을 건영 307-603

임형택

경기도 김포시 고촌읍 신곡리 한화아파트 102동 1104호

특허청구의 범위

청구항 1

배양 배지에 퍼모파민(Purmorphamine), TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor) 및 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)를 첨가하여 체세포를 배양하여 체세포를 신경상피세포로 유도하는 단계를 포함하는, 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배양 배지에는 ROCK의 선택적 억제제(selective inhibitor of Rho-associated kinase (ROCK))가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 배양 배지는 DMEM/F12, N2 서플리먼트(N2 supplement), B27(serum supplement), bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 신경상피세포의 콜로니가 형성되면 세포분리용액(cell detachment solution)을 처리하고 계대배양하여 신경줄기세포를 유도하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법.

청구항 5

퍼모파민(Purmorphamine), TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor) 및 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)를 포함하는 것을 특징으로 하는 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 신경상피세포 및 신경줄기세포 역분화 유도용 배지 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물에는 ROCK의 선택적 억제제(selective inhibitor of Rho-associated kinase (ROCK))가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 신경상피세포 및 신경줄기세포 역분화 유도용 배지 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 배지는 DMEM/F12, N2 서플리먼트(N2 supplement), B27(serum supplement), bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 신경상피세포 및 신경줄기세포 역분화 유도용 배지 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자 도입 없이 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포 유사 세포를 유도하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 유전자 도입 없이 저분자성 물질만을 이용하여 안전하고 높은 효율로 체세포로부터 화학적 유도 신경상피세포 (Chemically Induced Neuroepithelial cell; ciNE) 및 유도 신경줄기세포 (Chemically Induced Neural Stem Cell; ciNSC)로 직접적 역분화(이하, 직접적 리프로그래밍과 혼용하여 사용함)를 하는 방법 및 이에 이용되는 역분화 유도용 배지 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 줄기세포는 정상적인 체세포와 다르게 무한히 분열할 수 있는 능력을 가지며 적합한 환경 조건 아래에서 특정 세포로 분화하는 능력을 가진다. 그 분화 능력은 줄기세포의 특성에 따라 전분화능(pluripotency), 다분화능(multipotency), 또는 단일분화능(unipotency)으로 정의되어진다. 이러한 줄기세포를 이용한 치료법은 현재 많은 난치병 치료를 위한 획기적인 치료법으로 대두되고 있다.

[0003] 조혈모줄기세포(hematopoietic stem cell), 골수줄기세포(bone marrow stem cell), 신경 줄기세포(neural stem cell) 등의 줄기세포는 성체에서도 존재하므로 환자 본인에게서부터 추출할 수 있어 질병 치료 시 면역 거부반응이라는 문제점을 극복할 수 있는 장점이 있어 기존의 장기이식을 통한 치료방법에서 장기 제공자 확보의 어려움을 극복할 수 있다. 하지만 이론상으로는 무한히 증식 가능한 성체줄기세포임에도 불구하고 현재까지의 보고로는 성체줄기세포를 *in vitro* 상에서 증식시키는 데에는 어려움이 있으며 실제 환자로부터 많은 양의 세포를 분리해 내는 것 또한 어렵다고 알려져 있다.

[0004] 또 다른 세포치료제의 소스로써, 전분화능 줄기세포인 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화가 가능하고 *in vitro* 상에서 무한히 증식이 가능하기 때문에 배아줄기세포를 이용한 연구결과를 통해 특정 세포들로의 분화 방법 및 동물질병 모델 기능성 검증과 임상 이용 시 다양한 질병치료 가능성을 보여주었다.

[0005] 하지만 배아줄기세포를 얻는 과정에서 수정된 배아를 파괴해야 하므로 윤리적인 문제를 가지고 있으며 타인의 배아줄기세포로부터 치료에 필요로 하는 세포로 분화시킨 후 환자에게 이식했을 때 생기는 면역 거부반응과 분화가 완전히 이뤄지지 못한 세포를 이식했을 때 종양 형성의 위험이 존재한다는 문제점들을 가지고 있다.

[0006] 이러한 문제점을 극복하기 위해 1) 핵치환 (nuclear transfer), 2) 핵융합 (cell fusion), 3) 세포추출물 처리 (cell extract treatment), 그리고 4) 유전자 도입을 통한 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS cell) (Cell 132, 567-582, 2008) 기술을 이용하여 분화된 세포에서 역분화(reprogramming) 과정을 통해 배아줄기세포와 유사한 역분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell)를 형성하였다. 유도만능줄기세포 형성 기술은 현재까지 연구되어 오던 어떤 기술보다 배아줄기세포에 가까운 세포를 만들어 내는 데 성공했으며 이러한 결과와 기작을 증명하기 위해 처음 기술이 발표되었던 2006년 이후 현재까지 수많은 연구 논문들이 쏟아져 나오고 있는 실정이다. 그렇지만 이러한 역분화 줄기세포 또한 임상실험에 적용하는데에는 여전히 종양 형성의 위험이 존재하며 유전자 조작에 의한 안전성에 대한 검증 등 해결해야 할 문제들이 남아있다.

[0007] 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 방법으로 직접적 리프로그래밍(Direct reprogramming)이 제시되고 있는데, 이 방법은 만능세포 단계 (pluripotent stage)를 거치지 않고 원하는 세포로 직접적으로 유도하는 기술로 iPS 세포 (iPS cell)을 치료에 필요한 세포로 다시 분화시켜야 하는 과정 필요 없이 효율적으로 이용가능하며 종양 형성의 위험이 현저히 감소한다는 장점을 가지고 있다. 본 발명은 이러한 직접적 리프로그래밍 방법에 관한 발명으로, 본 발명의 배경이 되는 기술은 다음과 같다.

[0008] 최근 다양한 세포로 직접적 리프로그래밍 시키는 논문들이 발표되고 있는데, 마우스 섬유아세포와 꼬리 유래 섬유아세포 (tail tip fibroblast)에 신경세포 관련 유전자인 Ascl1, Brn2, Myt1l의 도입을 통해서 신경세포 마커 유전자인 NeuN, MAP2, Tuj1 등을 발현하는 신경세포(neuron)로 형성시킬 수 있었다는 논문과 (NATURE 463, 1035-1041, 2010) 뒤이어 사람 체세포에 Ascl1, Brn2, Myt1l, NeuroD1 4가지 유전자 도입을 통해서 신경세포를 만드는 데 성공하였다고 보고되었다(Nature 476, 220-223, 2011).

[0009] 또한, 마우스 섬유아세포와 사람 체세포(IMR90 fetal fibroblasts)에 Ascl1, Nurr1, Lmx1a 유전자 도입에 의한 직접적 리프로그래밍 과정 통해서 도파민을 분비하고 기능성을 갖는 도파민 뉴런을 형성시킬 수 있다고 보고된 바 있으며(Nature 476, 224-227, 2011), 사람 체세포에 microRNA (miR-124)와 Myt1L, Brn2 2가지 유전자를 이용해 신경세포로 형성시키는 데 성공하였다는 논문이 발표 되었다(Cell Stem Cell 9, 16, 2011).

[0010] 마우스 섬유아세포에 Gata4, Mef2c, Tbx5 유전자 도입을 통해서 심근세포 형성에 성공하였으며(Cell 142, 375-386, 2010), $p19^{ARF}$유전자가 결여된 마우스의 꼬리 유래 섬유아세포에 간세포 관련 유전자인 Gata4, Hnf1α, Faxa3를 도입하여 간세포 유도에 성공하였고 (Nature 475, 386-389, 2011) 마우스 섬유아세포에 Hnf4α, Foxa1, Foxa2 또는 Foxa3 도입을 통해 간세포 유도에도 성공하였다고 보고되었다(Nature 475, 390-391, 2011). 뿐만 아니라, 사람 체세포에 Oct4 유전자 하나만으로 CD45가 발현하는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)로

유도됨이 보고되었다(Nature 468, 521-526, 2010).

[0011] 최근 실험 결과에 따르면 마우스 섬유아세포와 꼬리 유래 섬유아세포 (tail tip fibroblast)에 주요 리프로그래밍 인자인 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 유전자의 도입을 통해 완전히 전분화능을 획득하기 전 '중간단계(intermediate stage)'에서 신경줄기세포 배양조건에서 배양함으로써 만능줄기세포를 거치지 않고 신경줄기세포와 유사한 특성을 갖는 세포를 유도하는 데 성공하였다고 보고되었다(PNAS 108, 7838-7843, 2011).

[0012] 또한, 마우스 세르톨리 세포(sertoli cells)에 신경세포의 자가분열(self-renewal)과 발달과정상 신경세포로의 운명(fate)을 결정하는데 관여하는 유전자인 Ascl1, Neurog2, Hes1, Id1 과 신경상피세포(neuroepithelium)에서 높게 발현하고 Yamanaka factors 중에 하나인 Sox2와, Pax6, Brn2와 크로마틴 리모델링 (chromatin remodeling) 과정에 관여하는 c-Myc과 Klf4 총 9개의 유전자를 이용하여 정상적인 기능을 하는 신경줄기세포 형성에 성공하였다는 보고가 있다(Cell Research 1-11, 2011).

[0013] 하지만, 이러한 방법을 통한 신경줄기세포 형성에도 많은 유전자들의 도입을 필요로 함으로 세포치료에 이용하기에는 유전자 조작에 관한 안전성 문제가 여전히 존재한다. 따라서 실제 치료 적용을 위해서는 유전자 조작에 의한 안전성 문제를 해결하고, 기술적으로도 간편하고 효율이 높은 방법을 계속해서 개발해야만 하고 이렇게 개발된 기술들 모두 효율과 안전성 측면에서 평가되어야 한다.

[0014] 따라서, 본 발명자들은 기존연구에서 마우스의 성상세포(astrocyte)에 신경줄기세포의 자가재생에 관여하고 있는 유전자 Bmi1을 선별하여 과발현(overexpression) 시켜 신경줄기세포(neural stem cell)로의 역분화에 성공하였고 (Biochem Biophys Res Commun. 371, 267-272, 2008), 마우스 섬유아세포에 Bmi1을 과발현시켜 신경줄기세포와 유사한 세포 형성에도 성공하였으며 Bmi1을 대체 할 수 있는 저분자성 물질인 퍼모파민(purmorphamine)과 옥시스테롤(oxysterol)을 처리하였을 때도 신경줄기세포와 유사한 세포가 형성됨을 보였다(Cell Research 21, 1305-1315). 관련된 본 발명자들의 특허 출원에는 대한민국 공개특허 10-2011-0078234 (2011.07.07), 대한민국 공개특허 10-2011-0124672 (2011.11.17) 및 대한민국 공개특허 10-2011-0124103 (2011.11.16) 등이 있다. 그러나, 퍼모파민과 옥시스테롤을 처리했을 경우에는 신경줄기세포와 유사한 세포인 신경구의 형성효율이 낮았을 뿐만 아니라 계대배양의 어려움과 불완전한 분화능을 보였다. 나아가 직접적 리프로그래밍 과정을 통해 체세포로부터 저분자성 물질만으로 높은 효율로 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 것에 대해서는 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2011-0078234 (2011.07.07)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2011-0124672 (2011.11.17)

(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허 10-2011-0124103 (2011.11.16)

비특허문헌

[0016] (비특허문헌 0001) Janghwan Kim et al., PNAS 108, 7838-7843 (2011.05.10)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 저분자성 물질을 처리하는 방법을 이용하여 직접적 리프로그래밍 과정을 통해 체세포를 신경상피세포 및 신경줄기세포와 유사한 특성을 지니는 세포로 유전자 조작 없이 안전하고 효율적으로 유도하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 체세포로부터 유도 신경상피세포 및 신경줄기세포와 유사한 특성이 있는 세포로의 역분

화를 유도하는 역분화 유도용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 배양 배지에 퍼모파민(Purmorphamine), TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor) 및 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)를 첨가하여 체세포를 배양하여 체세포를 신경상피세포로 유도하는 단계를 포함하는, 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 퍼모파민(Purmorphamine), TGF-β타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor) 및 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)를 포함하는 것을 특징으로 하는 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 신경상피세포 및 신경줄기세포 역분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대해 더욱 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 배양 배지에 퍼모파민(Purmorphamine), TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor) 및 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)를 첨가하여 체세포를 배양하여 체세포를 신경상피세포로 유도하는 단계를 포함하는, 직접적 역분화를 통해 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 방법을 제공한다. 상기 저분자성 물질들이 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 역할을 하는 필수적 신경상피세포 유도 물질이라는 것은 본 발명자들에 의해 최초로 밝혀졌다 (도 1a ~ 도 1c)

[0024] 본 발명에서, "퍼모파민 (purmorphamine)"은 퓨린화합물 (purine compound)로서, Shh 신호체계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 상기 퍼모파민은 Shh 시그널을 유도할 수 있다면 특별한 제한이 있는 것은 아니며 다양한 유도체가 사용될 수 있다. 예를 들어 2-(1-Naphthoxy)-6-(4-morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurin) 등을 시중에서 구입하여 사용할 수 있다. 상기 퍼모파민은 신경줄기세포 유사세포로 역분화를 유도하기 위하여 통상적으로 사용되는 배지에 처리하면 된다. 이렇게 Shh 유사체인 퍼모파민을 처리하면 용이하게 Bmi1을 유도할 수 있어, 역분화를 유도하기 위해 유전자를 도입할 필요가 없는 이점이 있다. 상기 퍼모파민은 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류와 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 퍼모파민의 유효 농도는 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 0.5μM ~ 1μM의 양으로 처리하였다.

[0025] 본 발명에서, "TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor)"는 TGF-β 타입 I 리셉터에 결합하여 TGF-β 타입 I의 정상적인 신호전달 과정을 방해하는 물질을 의미한다(Tojo M et al., Cancer Sci. 96, 791-800 (2005. 11)). TGF-β 타입 I (Transforming growth factor-β type I)은 세포증식, 분화 및 다양한 종류의 세포에 다양한 작용을 하는 다기능성 펩타이드로서, 이러한 다기능성은 지방세포형성, 근세포형성, 골세포형성, 상피세포 분화 등 여러 조직의 성장 및 분화에서 중추적인 역할을 하며, 신경줄기세포의 증식을 억제한다고 알려져 있다. 상기 TGF-β 타입 I 리셉터 억제제는 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 A-8301이다. 그러나 상기 화합물 외에도 SB432542을 포함한 모든 TGF-β 타입 I 리셉터 억제제가 본 발명의 범주에 속할 수 있음은 당업자에게 있어서 자명하다. 상기 저분자성 물질 TGF-β 타입 I 리셉터 억제제는 시중에서 구입(Stemolecule™)하여 사용하거나 제조하여 사용할 수 있으며 상기 억제제 처리에 의해 신경줄기세포증식이 촉진된다. 상기 TGF-β 타입 I 리셉터 억제제는 배지에 처리하면 된다. 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 A-8301 0.5μM의 양으로 처리하였다.

[0026] 본 발명에서, "히스톤 디아세틸라아제 억제제 (histone deacetylase inhibitor)"는 히스톤 디아세틸라아제를 억제하는 물질들을 의미하며, 크로마틴을 고아세틸화 상태로 만들어 세포증식억제인자 및 분화유도에 필수적인 유

전자들의 발현을 촉진하여 세포 (암세포)의 분화를 유도하고 혈관신생 (angiogenesis)을 억제하며, 세포주기를 G1상태로 고정시켜 암세포 (cancer cell)의 아폽토시스 (apoptosis)를 유발하여 강한 세포증식억제 (cytostatic) 항암활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0027] 히스톤 디아세틸라아제 (HDAC)는 pRB/E2F를 매개로 유전자 전사 (gene transcription)을 억제하며, 히스톤 아세틸레이션 (histone acetylation)의 파괴가 여러 가지 암 발생과 관련되어 있고, HDAC는 저산소증, 저당 (低糖), 세포암화 등 열악한 환경조건에서 고발현되어 세포증식억제인자의 발현을 저해하여 세포증식을 촉진시키는 역할을 하여, HDAC는 세포암화 및 분화조절에 중요조절인자로 인식되고 있다고 알려져 있다.

[0028] 본 발명에서 히스톤 디아세틸라아제 억제제 (HDAC inhibitor)는 VPA (valproic acid, 2-프로필펜타노익산) 및 트라코스타틴 (trichostatin, TSA) 또는 그 유도체 등을 의미하고, 바람직하게는 VPA를 의미한다. 상기 VPA는 이노시톨 감소를 유발하고, GSK-3β를 저해하고 ERK pathway를 활성화시키고, PPAR 활성을 자극하는 것으로 알려져 있다. 상기 트라코스타틴은 스트렙토마이세스(Streptomyces.)에서 분리된 히스톤디아세틸라제 억제제이다. 본 발명은 이러한 트라코스타틴 뿐만 아니라 생체 또는 시험관내에서 HDAC 억제효능을 나타내는 그 유도체를 포함한다. 상기 유도체는 약제학적으로 허용가능한 각종 무기염 또는 유기염을 포함한다. 본 발명의 조성물에 있어서, 바람직하게는 상기 트라코스타틴 또는 그 유도체는 300-900 μM 농도로, 더 바람직하게는 500-800 μM 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 한다. 농도가 너무 낮으면 효과를 보기 어렵고, 농도가 너무 높으면 독성을 가지게 되므로 세포의 종류에 따라 적정한 농도를 확인해야 한다. 그러나, 상기 화합물 외에도 모든 히스톤 디아세틸라아제 억제제가 본 발명의 범주에 속하게 됨은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0029] 상기 저분자성 물질 히스톤 디아세틸라아제 억제제는 시중에서 구입(Stemolecule™)하여 사용하거나 제조하여 사용할 수 있으며 상기 억제제 처리에 의해 역분화 효율이 증가된다 (Cell Stem Cell, 4, 301-312, 2009). 상기 히스톤 디아세틸라아제 억제제는 배지에 처리하면 된다. 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 VPA 0.5μM의 양으로 처리하였다.

[0030] 본 발명의 상기 배양 배지에는 ROCK의 선택적 억제제 (selective inhibitor of Rho-associated kinase (ROCK)이 더 포함되는 것이 바람직하다. 상기 물질을 추가하면 유도효율이 증가한다(도 2b 참조).

[0031] 상기 ROCK의 선택적 억제제는 ROCK(Rho-associated kinase)을 선택적으로 억제하는 역할을 하는 물질로 Y-27632, 티아조비빈(Thiazovivin) 등을 의미한다(Masaomi Koyanagi et al., Journal of Neuroscience Research 86:270-280 (2008)). 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 ROCK의 선택적 억제제는 티아조비빈(thiazovivin)이다. 상기 물질을 추가하면 유도효율이 증가한다 (도 2b 참조). 상기 티아조비빈(thiazovivin, N-benzyl-2-(pyrimidin-4-ylamino)thiazole-4-carboxamide)은 신경세포와 신경줄기세포의 세포사멸을 유도하는 Rho/ROCK 신호를 막고 신경줄기세포의 증식을 억제하는 PTEN 신호를 막는다고 알려져 있어, 신경줄기세포의 세포사멸 억제와 자가재생능력과 자가증식능력을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다(Matthias Groszer, et al. Science 294, 2186 (2001)). 상기 티아조비빈을 배지에 처리하면 된다. 상기 배지에 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 티아조비빈을 0.5μM의 양으로 처리하였다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 배양 배지는 신경줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 배지는 DMEM/F12, N2 서플리먼트(N2 supplement), B27(serum supplement), bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)로 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 배양 배지 조건에서 신경상피세포 및 신경줄기세포로의 유도 효율을 최대화할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM/F12 + N2 supplement + B27(serum supplement) + 20ng/μl bFGF+ 20ng/μl EGF에서 배양하였다.

[0033] 본 발명이 있어서, 상기 신경상피세포의 콜로니가 형성되면 세포분리용액(cell detachment solution)을 처리하고 계대배양하여 신경줄기세포를 유도하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 상기 세포분리용액은 줄기세포 배양에 통상 사용되는 세포분리용액으로 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 프로테오리틱 및 콜라게노리틱 엔자임(proteolytic and collagenolytic enzymes)을 포함하는 것이 바람직하다. 세포의 생존율을 높이면서 신경줄

기세포 유도 효율을 높일 수 있는 이점이 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 아큐타제(accutase)를 이용하였다.

[0034] 본 발명에서는 상기 체세포를 배양하는 단계는 신경상피세포로 역분화시킬 수 있는 기간이라면 제한이 없이 이루어질 수 있으며, 바람직하게 5일 이상 배양한다. 상기 5일 이상 배양하여야 신경상피세포 콜로니가 생성되고 충분한 역분화 유도가 이루어진다.

[0035] 본 발명의 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도함에 있어서, 출발 체세포 (모세포)의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 임의의 체세포를 이용할 수 있다. 예를 들어, 태아기(embryonic period)의 체세포 이외에 성숙한(matured) 체세포를 이용해도 된다. 유도 신경줄기세포를 질병의 치료에 이용하는 경우에는 환자로부터 분리된 체세포를 이용하는 것이 바람직하며, 예를 들어, 질병에 관여하는 체세포나 질병치료에 관여하는 체세포 등을 이용할 수 있다. 바람직하게는 상기 체세포는 섬유아세포이며, 본 발명에서 섬유아세포는 인간과 마우스, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 섬유아세포를 포함한다.

[0036] 본 발명에서, "신경상피세포"는 감각기관에 맞도록 분화된 상피세포를 말하며, 신경계가 될 외배엽 부분을 의미한다. 신경상피세포는 태아 뇌 발달과정 중에 신경관 또는 신경판 발달 과정 중에 형성되며 가장 초기의 신경줄기세포(primitive neural stem cell)로 뉴런(neuron)과 글리아(glia)세포로 분화가 가능한 다분화성을 갖고 있다.

[0037] 본 발명에서, "신경줄기세포"는 신경줄기세포-유사세포(neural stem cell-like cells)를 포함하는 개념이다. 일반적으로 "신경줄기세포"는 자기복제능력을 가지고 있으며 뉴론(neuron) 및/또는 글리아(glia), 예를 들면, 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및/또는 슈반세포(Schwann cell) 등으로 분화하는 다분화능력을 가진 미분화세포이다. 신경 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포나 글리아 전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포(neural cell), 예를 들면 뉴론이나 글리아로 분화하게 된다. 또한, "신경줄기세포-유사세포(neural stem cell-like cells)"란 뉴런, 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 등의 세포로 분화될 수 있는 다분화능을 가지는 줄기세포 (multipotent stem cell)로, 체세포의 역분화에 의하여 기원한 신경줄기세포이다.

[0038] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 퍼모파민(Purmorphamine), 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor) 및 TGF-β 타입 I 리셉터 억제제(TGF-β type I receptor inhibitor)을 포함하는 것을 특징으로 하는 체세포로부터 신경상피세포 및 신경줄기세포를 유도하는 신경상피세포 및 신경줄기세포 역분화 유도용 배지 조성물을 제공한다. 상기 물질들이 신경상피세포 및 신경줄기를 유도하는 역할을 하는 신경상피세포 및 신경줄기세포 유도 물질이라는 것은 상술한 바와 같다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 조성물에는 ROCK의 선택적 억제제 (selective inhibitor of Rho-associated kinase (ROCK))가 더 포함되는 것이 바람직하고, 티아조비빈(thiazovivin)이 포함되는 것이 더 바람직하며, 상기 물질을 추가하면 유도효율이 더욱 증가한다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 배지는 DMEM/F12, N2 서플리먼트(N2 supplement), B27(serum supplement), bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)로 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 배양 배지 조건에서 신경상피세포 및 신경줄기세포로의 유도 효율을 최대화할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따르면 다양한 저분자성 물질들 중에 선별된 퍼모파민을 포함한 다른 저분자성 물질들을 체세포에 처리함으로써 직접적 역분화에 의해 신경줄기세포로의 유도가 가능한지를 확인한 결과, 콜로니 형태로 신경상피세포와 유사한 세포가 형성이 되고 계대배양 하였을 때 신경줄기세포와 같은 세포가 형성되며, 신경상피세포와 신경줄기세포의 대표적인 마커인 Pax6, Sox1, Nestin, Sox2가 발현되었다. 또한, 신경세포, 성상세포, 희돌기교세포로의 분화가 유도되는 것을 각각의 대표적인 마커들의 염색을 통해 확인할 수 있었다.

[0042] 이러한 결과를 통해 저분자성 물질처리만으로 신경줄기세포와 같은 세포로 직접적 리프로그래밍 과정을 통한 유

도가 가능하며, 이렇게 확립된 세포군은 유전자발현(gene expression), *in vitro*상에서 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte)로의 분화 능력이 신경줄기세포와 유사하다. 이렇게 자가 증식 능력을 가지고 있으며 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte)와 희돌기교세포(oligodendrocyte)로 분화할 수 있는 다분화능(multipotency)을 갖는 역분화된 신경줄기세포는 파킨슨병이나 뇌졸중, 운동신경 이상에 의한 척수근위축증과 같은 신경계질환 치료에 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0043] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따라 유전자 도입 없이 저분자성 물질들만을 이용하여 체세포로부터 유도 신경상피세포(chemically induced neuroepithelial cell; ciNE) 및 유도 신경줄기세포(chemically induced neural stem cell; ciNSC)로의 직접적 리프로그래밍(direct reprogramming)이 가능하였다. 이전까지의 바이러스 벡터를 이용해 유전자 도입을 통한 신경줄기세포로의 유도방법의 문제점이였던 안전성을 극복할 수 있는 새로운 방안을 제시하였다는 데 의의가 크다. 이와 같은 방법에 의해 형성된 신경상피세포 및 신경줄기세포는 마우스 신경줄기세포와 유사한 특성을 지니고 있어 유전자 조작 없는 자가세포를 이용한 세포치료제를 제공할 수 있게 되었다.

[0044] 따라서 본 발명은 저분자성 물질 처리에 의한 신경줄기세포로의 유도 기법 확립을 통해 유전자 조작이 필요 없어 안전하고, 역분화 줄기세포를 거치지 않음으로써 배양시간을 단축할 수 있고, 효율적으로 신경상피세포 및 신경줄기세포 형성을 유도하는 직접적 리프로그래밍 방법을 제시하여 세포치료제 분야에 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1a는 마우스 섬유아세포에 저분자성 물질 퍼모파민(Purmophamin), A-8301, VPA, 및 파네이트(Parnate)를 신경줄기세포 배양 조건으로 처리하였을 때 10일 만에 신경상피세포 콜로니가 형성되는 것을 보여주고 있다.

도 1b는 신경상피세포 특이적 마커인 Sox1, Sox2, Nestin의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과, 저분자성 물질 처리를 통해 형성된 세포에서 상기 마커들이 신경줄기세포와 같이 발현하고 있음을 나타내고 있다.

도 1c는 면역화학염색법을 통하여 신경상피세포의 특이적 마커인 Nestin, Sox2, Sox1이 발현되는 것과 신경줄기세포와 같이 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte)로 분화된 세포의 마커인 Tuj1과 GFAP의 발현을 확인한 결과를 나타내고 있다.

도 2a는 퍼모파민(Purmophamin), A-8301, VPA, 및 파네이트(Parnate)(4 Factors; 4F)를 처리하였을 때와 종류별로 하나씩 제거하고 처리하였을 때를 비교하여 신경상피세포의 콜로니 형성 수를 비교한 결과 파네이트(Parnate)를 제거하였을 때(3 Factors; 3F)의 형성효율이 크게 증가함을 확인할 수 있다.

도 2b에서는 도 2a의 결과를 바탕으로 파네이트(Parnate)를 제거한 조건에 티아조비빈(Thiazovivin)을 추가로 처리하였을 때(3 Factors + Thiazovivin; 3F+T), 면역화학염색법을 통해 Sox2 유전자가 발현하는 콜로니 수를 세어 효율을 비교한 결과 신경상피세포 형성 효율이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그리고 퍼모파민(Purmophamin), A-8301, VPA, 및 티아조비빈(Thiazovivin) 조합에서 하나씩 저분자성 물질들을 제거하고 처리하였을 때 퍼모파민(Purmophamin), A-8301, VPA가 빠졌을 경우에 콜로니 형성 수가 현저히 떨어지는 결과를 확인할 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 최적의 저분자성 물질을 퍼모파민(Purmophamin), A-8301, VPA, 티아조비빈(Thiazovivin)으로 선정하였다.

도 3a는 본 발명에 의해 선정된 저분자성 물질인 퍼모파민(Purmophamine) 0.5μM, A8301 0.5μM, VPA 0.5mM, 및 티아조비빈(Thiazovivin) 0.5μM을 신경줄기세포 배양조건으로 마우스 섬유아세포에 처리하였을 때 형성된 신경상피세포 콜로니 형성을 확인한 결과이며, 마우스 섬유아세포에 저분자성 물질들의 처리 없이 신경줄기세포 배양조건으로만 배양하였을 때 신경상피세포 콜로니가 형성되지 않음을 관찰함으로써 마우스 섬유아세포에 신경상피세포가 존재하고 있지 않음을 확인한 결과이다.

도 3b는 화학면역염색법을 통해 본 발명에 의한 저분자성 물질 처리에 의해 형성된 콜로니에서 신경상피세포의 마커인 Pax6와 신경줄기세포에서 대표적으로 발현이 되는 마커인 Nestin과 Sox2, 로제트 타입(rosette type)의 신경줄기세포에서 발현하는 PLZF가 발현하고 있음을 관찰한 결과이며 마우스 섬유아세포에서는 발현하고 있지

않음을 확인할 수 있는 결과이다.

도 3c는 본 발명에 의해 형성된 세포에서 신경상피세포와 신경줄기세포 특이적인 유전자인 Pax6, Sox1, Sox2, Nestin, CD133과 로제트 타입(rosette type) 신경줄기세포에서 대표적으로 발현되는 Dach1, PLZF 유전자가 발현하고 있음을 RT-PCR을 통해 확인할 수 있는 결과이다.

도 3d는 Real-time PCR을 통해서 상기 마커들을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것으로 마우스 섬유아세포에서는 이러한 마커 유전자들이 발현하고 있지 않음을 나타내는 결과이다.

도 3e는 콜로니 형태의 신경상피세포를 계대배양 하였을 때 나타나는 로제트 타입(rosette type)의 신경줄기세포 모양이며, 로제트 타입(rosette type) 신경줄기세포 유전자인 Sox1, Sox2, Nestin, PLZF가 발현하는 것을 면역화학염색법을 통해 확인한 결과이다.

도 3f는 본 발명에 의한 저분자성 물질 처리를 통해 형성된 세포와 신경줄기세포와 비교하여 Nestin, Sox2의 발현이 유사함을 FACS를 통해서 확인한 결과이다.

도 4a는 본 발명에 의하면 마우스 섬유아세포가 역분화 만능줄기세포를 거쳐 신경상피세포로 분화된 것이 아니라 직접적 리프로그래밍 과정을 거쳐서 바로 신경상피세포로 형성된 것임을 확인하기 위해 Oct4-GFP 마우스 섬유아세포에 저분자성 물질을 처리하였을 때, 신경상피세포 콜로니가 형성되는 과정에서 배아줄기세포와 역분화 만능 줄기세포에서 발현하는 Oct4 유전자가 발현하지 않음을 형광현미경을 통해서 GFP의 발현이 보이지 않고 있음을 통해 확인한 결과이며 콜로니에서 Pax6, PLZF가 발현되고 있음을 면역화학염색법을 통해 확인한 결과이다.

도 4b는 콜로니가 형성되는 과정에서도 Oct4와 Nanog의 발현은 되지 않고 신경상피세포 유전자인 Pax6, Nestin, DACH1가 발현함을 real-time PCR을 통해서 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1. 마우스 섬유아세포로부터 저분자성 물질들만을 이용하여 신경상피세포 유도**

[0048] 본 발명자들의 기존 연구에서, 신경줄기세포형성에 사용되었던 저분자성 물질인 퍼모파민(purmorphamine)과 신경줄기세포의 증식을 억제한다고 알려진 TGF-β 신호를 막는 A-8301, 역분화 줄기세포형성과정에서 리프로그래밍 효율 증가, GSK-3β 신호 억제제로써 작용하여 Wnt 신호를 촉진하여 신경줄기세포의 증식능력을 증가 시킬 것으로 예상되는 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histon deacetylase inhibitor)인 발프로산(valproic acid; VPA)와 파네이트(parnate) 4가지 저분자성 물질들을 신경줄기세포 배양조건인 DMEM/F12 + N2 supplement + B27 + 20ng/μl bFGF+ 20ng/μl EGF 에 넣어 100μg/ml 피브로넥틴(fibronectin)으로 코팅한 플레이트에 마우스 섬유 아세포를 깔고 처리하였을 때 10일 만에 신경상피세포의 콜로니와 같은 모양으로 세포 모양이 변하는 것을 확인할 수 있었다(도 1a).

[0049] 이때, 신경상피세포 특이적 마커인 Sox2, Sox1, Nestin 유전자의 발현이 증가하는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였으며(도 1b) Sox2, Sox1, Nestin이 발현되는 것을 면역화학염색법을 통해 확인할 수 있었고(도 1c) 신경상피세포와 같이 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte)로 분화시킨 세포 또한 각각의 해당하는 마커인 Tuj1과 GFAP의 발현을 면역화학염색법을 통해 확인하였다(도 1c). 도 1a ~ 도 1c를 통해서 저분자성 물질 처리를 통해서 마우스 섬유아세포가 신경상피세포로 유도될 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0050] **실시예 2. 다양한 저분자성 물질들의 조합을 통해 최적의 저분자성 물질 조합 선정**

[0051] 마우스 섬유아세포에 4가지 저분자성 물질(4 Factors; 4F)을 처리하였을 때 신경상피세포와 유사한 세포로 형성되는 것을 위의 도 1a ~ 도 1c에서 확인할 수 있었다. 신경상피세포 유도에 사용된 저분자성 물질들 중에서 중요한 물질의 선별을 위해, 저분자성 물질들을 종류별로 하나씩 뺀 조합으로 마우스 섬유아세포에 처리하였을 때, 퍼모파민(Purmorphamine), VPA, A-8301이 빠졌을 경우에는 신경상피세포 콜로니의 형성이 현저히 줄어드는 것으로 보아 신경상피세포 형성에 중요한 저분자성 물질임을 확인할 수 있었다(도 2a). 그러나 파네이트(Parnate)를 뺀 조건으로 마우스 섬유아세포에 처리하였을 경우에는 4가지 저분자성 물질을 처리하였을 때보다

더 많은 콜로니가 형성됨을 확인함으로써 (도 2a), 파네이트(Parnate)는 신경상피세포 유도를 억제하는 것을 확인하였다.

[0052] 그리고 파네이트(Parnate)를 뺀 조건(3 Factors; 3F)에 신경줄기세포의 세포사멸 억제와 자가재생능력과 자가증식능력을 증가시킨다고 알려진 티아조비빈(Thiazovivin)을 첨가하였을 때 (3F+T), Sox2를 발현하는 신경상피세포 콜로니 형성이 티아조비빈(Thiazovivin) 넣기 전보다 훨씬 증가하는 것을 볼 수 있었다(도 2b). 파네이트(Parnate)를 뺀 조건인 퍼모파민 (Purmorphamine), A-8301, VPA (3F)에 티아조비빈(Thiazovivin)을 첨가한 조건(3F+T)으로 마우스 섬유아세포에 처리하였을 때와 이 조합에서 하나씩 저분자성 물질을 뺀 조건으로 처리했을 때와 비교하였을 때, 퍼모파민(Purmorphamine), VPA, A-8301이 빠졌을 경우에 Nestin을 발현하는 신경상피세포 콜로니의 형성이 현저히 줄어드는 것으로 보아, 퍼모파민(Purmorphamine), VPA, A-8301이 중요한 저분자성 물질임을 확인하였다(도 2b).

[0053] 이러한 결과를 통해서, 최종적으로 신경상피세포 형성을 위한 저분자성 물질을 퍼모파민(Purmorphamine), A-8301, VPA, 및 티아조비빈(Thiazovivin) (3F+T)으로 선정하였다. 도 2a 및 도 2b를 통해 신경상피세포 형성의 효율을 높일 수 있는 최적의 저분자성 물질들의 조합을 선정할 수 있었다.

[0054] **실시예 3. 선정된 저분자성 물질들의 처리를 통해 신경상피세포 및 신경줄기세포의 유도와 특성 규명**

[0055] 마우스 섬유아세포를 100㎍/ml 피브로넥틴(fibronectin)으로 코팅한 플레이트에 깔고 3시간정도 후에 세포가 플레이트에 붙으면 퍼모파민(purmophamine) 0.5㎛M, A8301 0.5㎛M, VPA 0.5mM, 및 티아조비빈(Thiazovivin) 0.5㎛M의 저분자성 물질을 신경줄기세포 배양 조건인 DMEM/F12 + N2 supplement + B27 + 20ng/㎕ bFGF+ 20ng/㎕ EGF 에 넣어 2일에 한 번씩 배지(medium)는 갈아주며 배양한 결과, 5-7일 안에 신경상피세포 콜로니가 형성되는 것을 확인할 수 있었다(도 3a). 이렇게 형성된 콜로니를 Accutase(sigma) 처리를 통해서 계대배양하면 신경-로제트 타입(neural-rosette type)의 신경줄기세포가 형성됨을 확인하였다(도 3a).

[0056] 마우스 섬유아세포를 저분자성 물질들이 첨가되지 않은 신경줄기세포 배양 조건에서 배양하였을 때에는 신경줄기세포가 형성되지 않으며(도 3a), RT-PCR 결과를 통해 확인한 결과, 신경줄기세포 특이적 마커 유전자인 Sox1, Pax6, Sox2, Nestin, CD133이 발현하지 않고(도 3c) 면역화학염색법을 통해서도 발현하지 않음을 확인함으로써 마우스 섬유아세포 상에는 신경줄기세포가 없다는 것을 확인하였다(도 3b).

[0057] 저분자성 물질 처리를 통해 형성된 콜로니에서 신경상피세포의 마커 유전자인 Pax6와 신경줄기세포에서 대표적으로 발현이 되는 마커인 Nestin과 Sox2, 로제트 타입(rosette type)의 신경줄기세포에서 발현되는 PLZF의 발현을 면역화학염색법을 통해서 확인하였다(도 3b). RT-PCR을 통해서 신경상피세포와 신경줄기세포 특이적인 마커 유전자인 Pax6, Sox1, Sox2, Nestin, CD133, 로제트 타입(rosett type) 신경줄기세포에서 대표적으로 발현되는 Dach1, PLZF 유전자의 발현을 확인할 수 있었고 real-time PCR을 통해서도 확인할 수 있었다(도 3c 및 도 3d).

[0058] 계대배양을 하였을 때 형성된 로제트 타입(rosette type)의 신경줄기세포에서 Sox1, Sox2, Nestin, PLZF의 발현을 면역화학염색법을 통해서도 확인하였으며(도 3e), FACS를 통해 Nestin, Sox2의 발현이 신경줄기세포와 비교하여 유사하게 발현하고 있음을 확인하였다(도 3f).

[0059] 도 3a ~ 도 3f를 통하여 4가지 저분자성 물질을(3F+T) 처리하였을 때, 도 1a 및 도 1b에서 퍼모파민(Purmorphamine), VPA, A8301, 및 파네이트(Parnate)를 처리하여 10일만 신경상피세포 콜로니가 형성되는 것과 비교하여 더 빠른 시점에 신경상피세포 콜로니 형성이 유도되며, 형성된 콜로니에서 신경상피세포 마커 유전자들이 발현하고 로제트 타입(rosette type)의 신경줄기세포에서도 특이적 유전자들의 발현을 확인함으로써, 저분자성 물질에 의해 형성된 신경상피세포와 신경줄기세포의 특성을 증명하였다.

[0060] **실시예 4. 마우스 섬유아세포에서 역분화 만능성 줄기세포를 거치지 않고 직접적 리프로그래밍 과정을 통한 신경상피세포 유도 확인**

[0061] 마우스 배아줄기세포에서 특이적으로 발현하는 Oct4 유전자 발현이 일어나면 녹색형광단백질(Green fluorescent protein; GFP)의 발현을 관찰할 수 있는 Oct4-GFP 마우스 시스템을 이용하여, Oct4-GFP 마우스 섬유아세포에 저분자성 물질조합을 처리하였을 때, 7일째에 콜로니가 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며 형광현미경으로 관찰하였을 때 GFP의 발현을 확인할 수 없었고(도 4a), real-time PCR을 통해서도 배아줄기세포와 역분화 만능줄기세포에서 발현하는 주요유전자인 Oct4, Nanog의 발현이 없음을 확인함으로써 역분화 만능줄기세포를 거친 것이 아

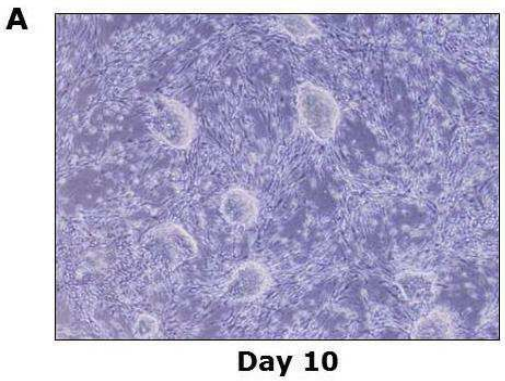
니라 직접적 리프로그래밍을 통해 신경상피세포로 형성되었음을 증명할 수 있었다(도 4b). 이렇게 형성된 콜로니에서는 신경상피세포에서 특이적으로 발현하는 유전자인 Pax6와 PLZF의 발현을 면역화학염색법을 통해 확인할 수 있었고(도 4a), real-time PCR을 통해서도 Pax6, Nestin, DACH1의 발현을 확인할 수 있었다(도 4b).

[0062] 도 4a ~ 도 4b를 통해 Oct4-GFP 마우스 섬유아세포를 이용하여 선별된 저분자성 물질들을 처리하였을 때 배아줄기세포와 역분화 만능줄기세포에서 특이적으로 발현되는 Oct4 유전자가 발현하지 않음을 확인하고 Nanog의 발현 또한 되지 않음을 통해 역분화 만능줄기세포를 거쳐 간 것이 아니라 직접적 리프로그래밍을 통해 신경상피세포와 신경줄기세포의 형성이 유도된 것임을 증명하였다.

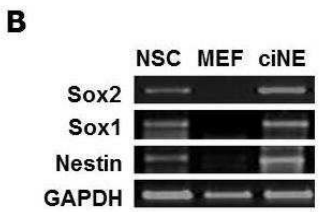
[0063] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1a

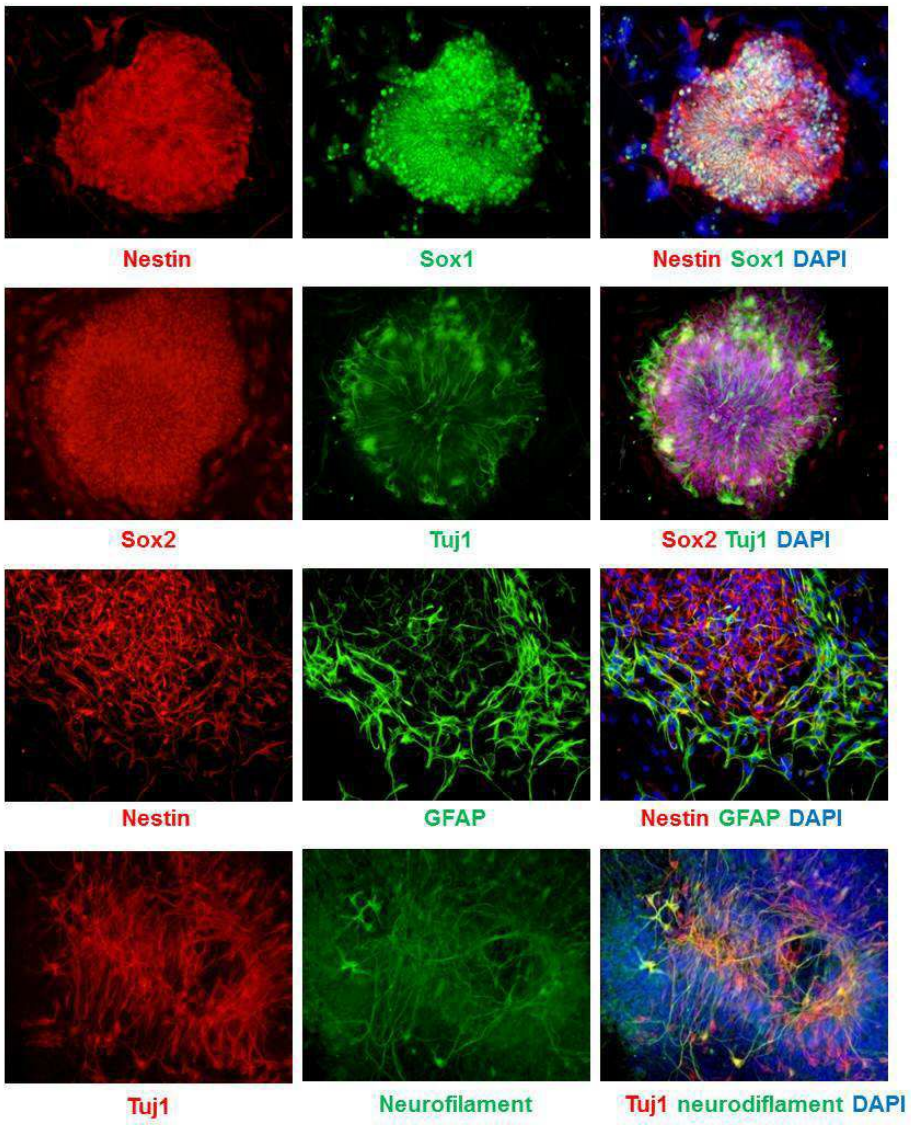


도면1b

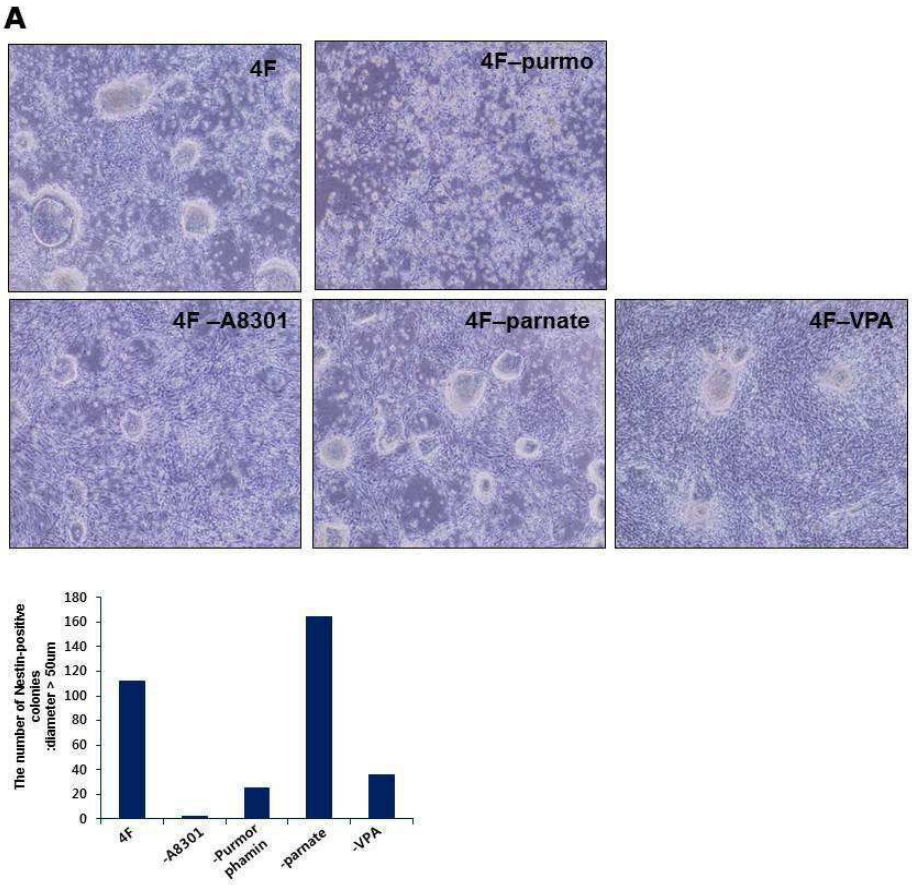


도면1c

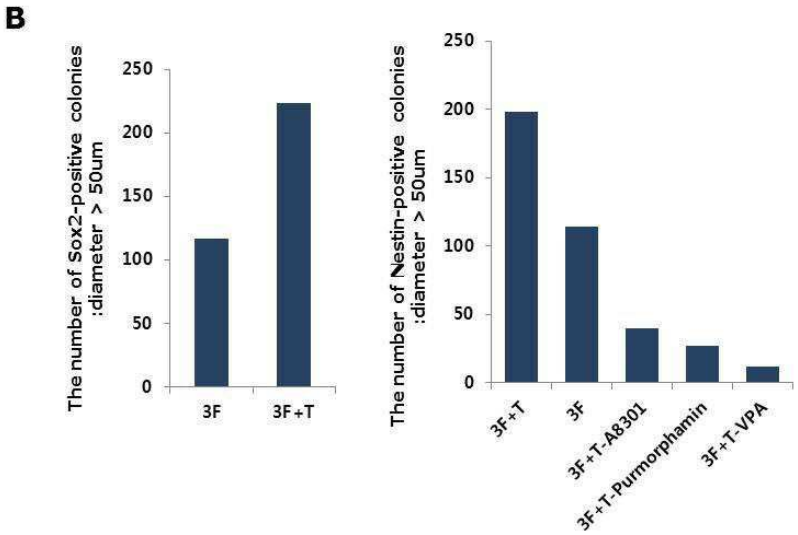
C


Nestin
Sox1
Nestin Sox1 DAPI
Sox2
Tuj1
Sox2 Tuj1 DAPI
Nestin
GFAP
Nestin GFAP DAPI
Tuj1
Neurofilament
Tuj1 neurodiflament DAPI

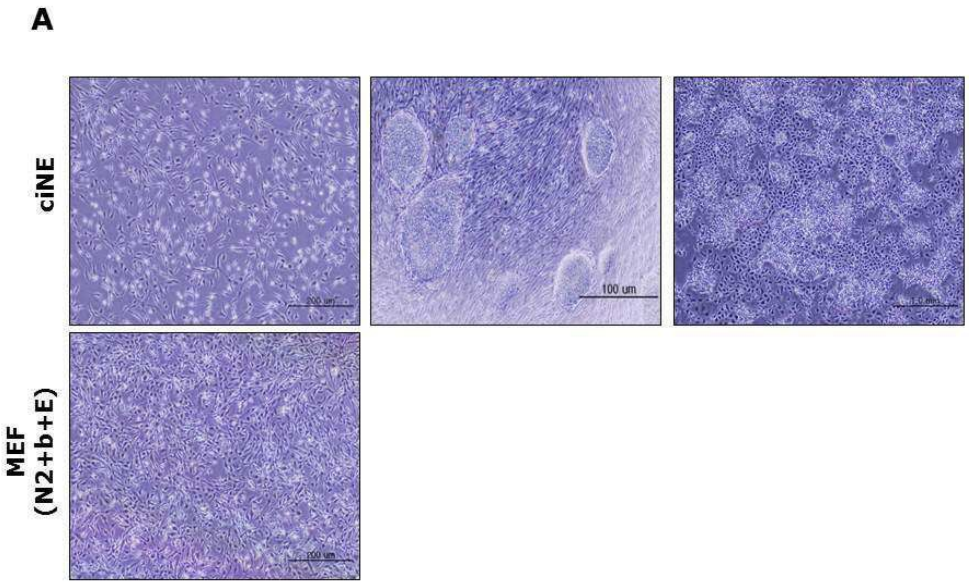
도면2a


A
4F
4F–purmo
4F –A8301
4F–parnate
4F–VPA
The number of Nestin-positive colonies :diameter > 50um
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
4F
-A8301
-Purmor phamin
-parnate
-VPA

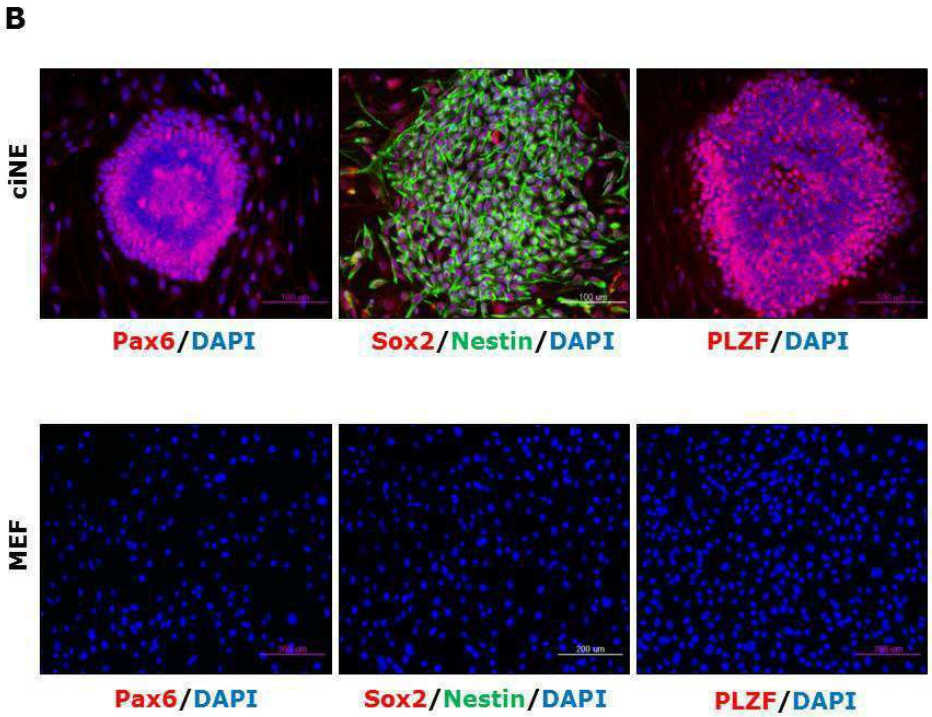
도면2b


B
The number of Sox2-positive colonies :diameter > 50um
250
200
150
100
50
0
3F
3F+T
The number of Nestin-positive colonies :diameter > 50um
250
200
150
100
50
0
3F+T
3F
3F+T-A8301
3F+T-Purmorphamin
3F+T-VPA

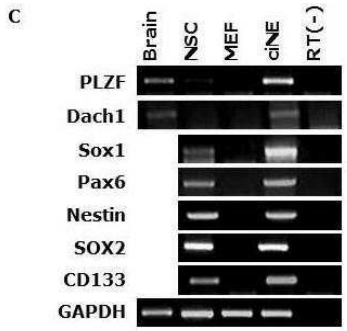
도면3a


A
ciNE
MEF
(N2+b+E)
100 um

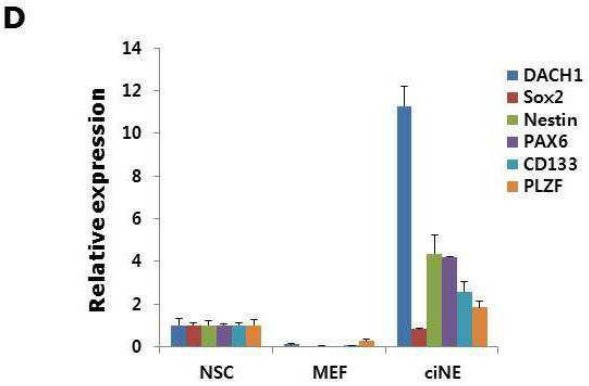
도면3b


B
ciNE
MEF
Pax6/DAPI
Sox2/Nestin/DAPI
PLZF/DAPI
Pax6/DAPI
Sox2/Nestin/DAPI
PLZF/DAPI

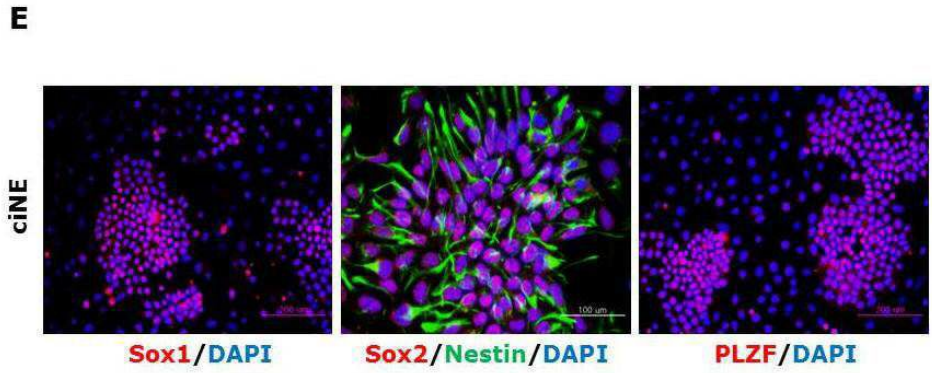
도면3c



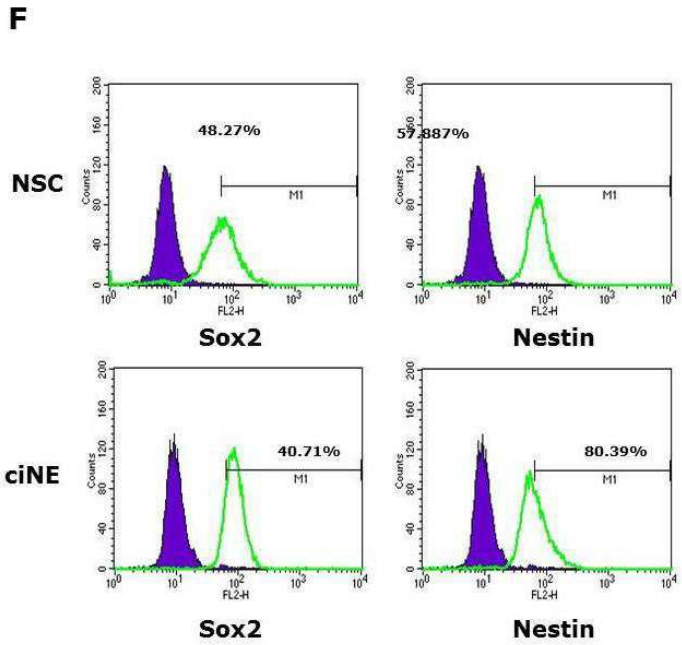
도면3d



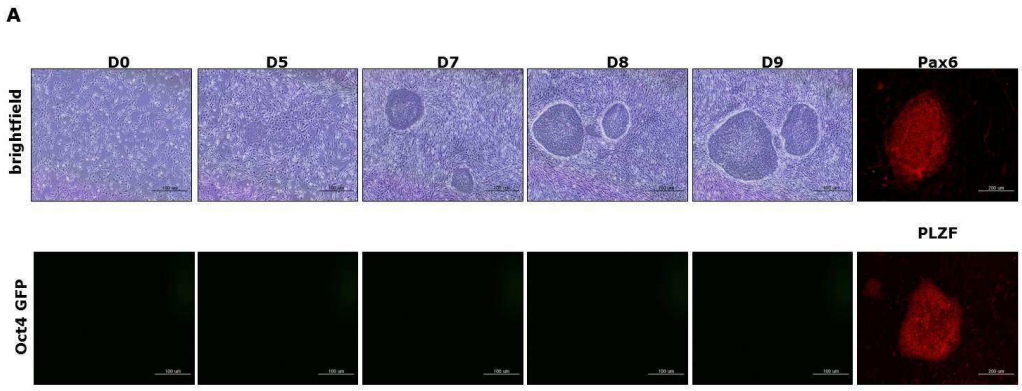
도면3e



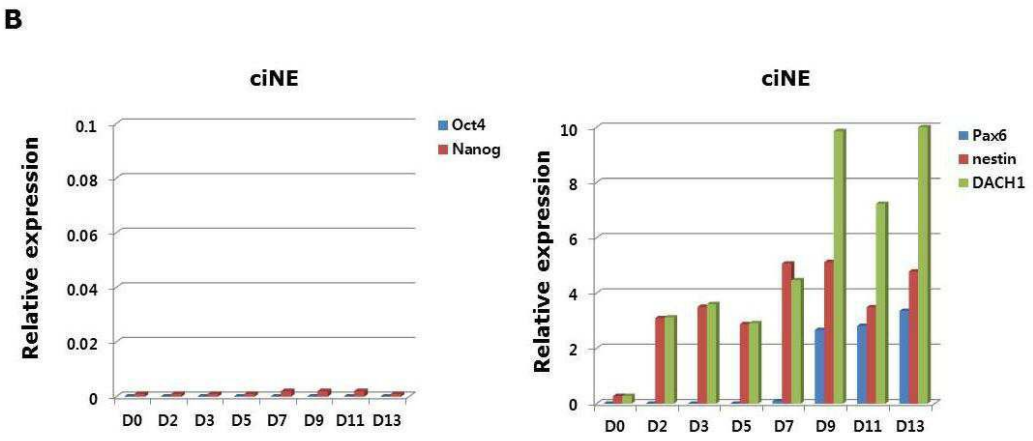
도면3f


F
NSC
48.27%
57.887%
M1
Counts
FL2-H
Sox2
Nestin
ciNE
40.71%
80.39%
Sox2
Nestin

도면4a


A
D0
D5
D7
D8
D9
Pax6
brightfield
PLZF
Oct4 GFP

도면4b


B
ciNE
Relative expression
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
D0 D2 D3 D5 D7 D9 D11 D13
Oct4
Nanog
ciNE
Relative expression
10
8
6
4
2
0
D0 D2 D3 D5 D7 D9 D11 D13
Pax6
nestin
DACH1