

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0122078 (43) 공개일자 2016년10월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0797 (2010.01) A61K 35/30 (2015.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 C12N 5/0623 (2013.01) A61K 35/30 (2013.01)	(72) 발명자 홍성희 서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)	
(21) 출원번호 10-2016-0044187	최경아 강원도 철원군 동송읍 금학로62번길 29 (이평리)	
(22) 출원일자 2016년04월11일 심사청구일자 2016년04월11일	황인식 서울특별시 성동구 왕십리로33길 12-1 (하왕십리동)	
(30) 우선권주장 1020150051993 2015년04월13일 대한민국(KR)	(74) 대리인 이처영, 장제환	

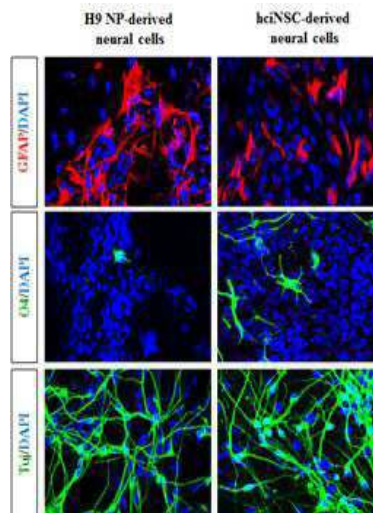
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 소분자 화합물을 이용한 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 전환하는 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 전환하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 외부 유전자의 도입 없이 소분자 화합물의 조합만을 이용하여 인간 섬유아세포로부터 신경줄기세포로 직접 전환시키는 방법 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유전자 도입없이 소분자 물질만을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 전환하는 방법은 유전적으로 안정한 신경줄기세포의 유도를 통해 세포치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포 확보 및 다양한 종류의 기능성 신경세포로 분화가 가능하고, 종양을 발생시키지 않으므로 뇌질환 세포치료제로 활용에 유용하다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12N 2500/00 (2013.01)
 C12N 2500/30 (2013.01)
 C12N 2501/00 (2013.01)
 C12N 2501/11 (2013.01)
 C12N 2501/115 (2013.01)
 C12N 2506/1307 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012050131
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전연구
기 여 율	45/100
주관기관	고려대학교
연구기간	2014.10.01 ~ 2015.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A12039212010000300
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발
연구과제명	다양한 세포근원 유래 신경 줄기세포의 임상적용 가능성 검증 연구
기 여 율	45/100
주관기관	고려대학교
연구기간	2014.08.01 ~ 2015.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20120007758
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자-기본(유형II)
연구과제명	체세포의 신경세포 유도 및 세포치료제 개발 연구
기 여 율	10/100
주관기관	고려대학교
연구기간	2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, DZNep (Deazaneplanocin A) 또는 5-AZA를 추가로 포함하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, PD0325901, 아스코브산 (Ascorbic acid), PS48, 포스콜린 (Forskolin) 및 트라닐시프로민 (Tranylcypromine)으로 구성되는 군에서 선택된 1종 이상의 소분자 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 배지는 N2, B27, bFGF 및 EGF가 포함된 DMEM/F12인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배양은 10~15일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포를 계대배양한 후 부유 배양하여 스피어를 형성하는 단계; 및 상기 형성된 스피어를 부착 배양한 후 다시 부유 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 부유 배양 및 부착 배양은 각각 7~10일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 형성된 스피어를 부착 배양한 후 다시 부유 배양하는 단계는 2~4회 반복하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 nestin, sox1 또는 musashi1을 발현하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세

포의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte), 뉴런 (neuron), 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포 및 콜린 신경세포로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상으로 분화되는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 염색체 안정성을 유지시키는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 10계대 이상 미분화 상태를 유지하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 신경줄기세포를 함유하는 뇌질환 치료용 세포치료제.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 뇌일혈, 뇌경색, 알츠하이머, 치매, 헌팅톤병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 다발성 신경위축, 간질, 피크병 및 크로이츠펔트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 전환하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 외부 유전자의 도입 없이 소분자 화합물의 조합만을 이용하여 인간 섬유아세포로부터 신경줄기세포로 직접 전환시키는 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 섬유아세포를 역분화 만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell)로 유도시킨 연구가 2007년 진행됨에 따라 세포의 리프로그래밍 (reprogramming)에 대한 관심이 급증하기 시작하였다. 이전의 줄기세포 연구에 이용된 인간 배아줄기세포의 경우 인간의 배아 사용으로 인한 윤리적 문제와, 면역거부반응 문제 그리고 분화되지 않은 배아줄기세포가 이식될 경우 테라토마 (teratoma) 형성의 문제가 있으며, 성체 줄기세포의 경우에는 세포의 확보가 어렵고 분화능에 제한이 있다는 문제점을 가지고 있다. 그러나 역분화줄기세포는 윤리적 문제로부터 회피되고 면역거부반응 문제는 없지만, 분화되지 않은 줄기세포가 이식될 경우 테라토마 형성의 문제를 일으킬 수 있다. 역분화 줄기세포는 배아줄기세포와 유사한 성질을 가지고 있으나, 역분화 만능줄기세포를 형성하는데 주로 이용되는 방법인 바이러스 시스템은 유전자의 무작위적인 삽입에 의해 돌연변이를 형성시킬 수 있다. 바이러스의 문제점을 해결하고자 플라스미드, 단백질, RNA 등을 이용하고 있으나, 효율성이 낮고 암유전자를 이용한다는 점에서 확인되지 않은 새로운 문제가 발생할 수 있다.

[0003] 이러한 역분화 만능줄기세포의 문제점을 해결하는 방안으로 직접교차분화 방법을 이용한 인간 섬유아세포를 원

하는 세포로 직접 분화 (direct conversion)시키는 연구가 보고되었다. 그 중에서도 난치성 뇌질환의 치료를 목적으로 하는 섬유아세포를 이용한 신경세포로의 직접분화 연구가 활발하게 진행되어, 인간의 섬유아세포에 다양한 조합의 신경세포 관련 전사인자를 도입하고, 이를 통해 신경세포를 형성하는 연구를 성공시켰다. 이는 난치성 뇌질환의 세포치료제로써 사용 가능성을 보여 주었으나, 신경세포로는 이미 분화된 세포이기 때문에 세포치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포를 확보하는 어려움이 있다.

[0004] 이와 같은 문제로 인해 최근에는 섬유아세포를 이용하여 신경줄기세포로 직접 분화시키는 방법들이 연구되고 있고, 바이러스 시스템을 이용한 여러 가지 전사인자들을 도입하여 섬유아세포에서부터 신경줄기세포를 유도하는 방법이지만, 최근에는 단 한 가지 전사인자만을 이용하여 신경줄기세포를 유도 할 수 있는 수준에까지 이르렀다. 신경줄기세포는 자가 재생 (self-renew)이 가능하기 때문에 원하는 만큼의 세포를 얻을 수 있고, 신경세포로 분화가 가능하다. 또한, 직접교차분화 방법으로 각 개인의 섬유아세포에서부터 유도된 신경줄기세포는 윤리적인 문제와 면역거부반응 그리고 이식 후 종양형성의 문제가 없기 때문에 난치성 뇌질환의 세포치료제로 이용하기에 매우 유용한 세포이다.

[0005] 세포치료는 인체 내 손상된 세포 및 조직을 대체하기 위해 실험적으로 유도한 건강한 세포를 이식하여 치료하는 방법이다. 유전적 요인으로 인한 질병을 가지는 환자의 경우에는 피부세포를 이용하여 원하는 세포로 직접 전환하고, 유전자 조작으로 정상 유전자를 대체한 후 이식에 이용할 수 있다. 그러나, 이전부터 연구되어 온 직접교차분화 방법들은 외부 유전자를 도입하는 방식이기 때문에 실질적인 세포치료제로 사용하기는 어렵다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 외부 유전자 도입 없이 소분자 화합물만을 이용하여 섬유아세포를 신경줄기세포로 유도하고자 예의 노력한 결과, 이식에 필요한 충분한 양으로 증식이 가능하고 종양형성 없이 유전적으로도 안정한 (genomic DNA stability) 신경줄기세포를 제조할 수 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 소분자 화합물 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하여 신경줄기세포를 제조하는 방법 및 상기 제조된 신경줄기세포를 유효성분으로 함유하는 뇌질환 치료용 세포치료제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 신경줄기세포를 함유하는 뇌질환 치료용 세포치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 유전자 도입없이 소분자 물질만을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 전환하는 방법은 유전적으로 안정한 신경줄기세포의 유도를 통하여 세포치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포 확보 및 다양한 종류의 기능성 신경세포로 분화가 가능하고, 종양을 발생시키지 않으므로 뇌질환 세포치료제로 활용에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 13종 소분자 물질의 첨가에 따른 세포의 형태학적 변화를 확인한 결과이다.

도 2는 13종 소분자 물질의 첨가에 따른 유전자 발현을 확인한 결과이다.

도 3은 소분자 화합물 4종, 6종, 8종의 사용에 따른 세포의 형태학적 변화를 확인한 결과이다.

도 4는 유도된 신경줄기세포의 형태학적 확인, 마커 유전자 및 단백질의 발현을 확인한 결과이다.

도 5는 유도된 신경줄기세포의 초기단계와 후기단계의 형태학적 확인, 마커 유전자 및 단백질의 발현을 확인한 결과이다.

도 6은 유도된 신경줄기세포의 염색체 분석을 통한 염색체를 확인한 결과이다.

도 7은 유도된 신경줄기세포의 시기별 세포 증식률을 분석한 결과이다.

도 8은 바이설파이트(bisulfite) PCR 분석을 이용한 유도된 신경줄기세포의 후성 유전적 변화를 확인한 결과이다.

도 9는 유도된 신경줄기세포의 삼신경계 세포로의 분화를 확인한 결과이다.

도 10은 유도된 신경줄기세포의 다양한 종류의 신경세포로의 분화를 확인한 결과이다.

도 11은 유도된 신경줄기세포가 이식된 마우스의 뇌를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0013] 본 발명에서는 소분자 물질을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 유도하기 위한 최적의 소분자 물질의 조합을 구축하고, 다양한 소분자 물질들 각각의 기능을 확인하였다. 이로써 소분자 물질의 조합으로 이루어진 배양액으로 인간 신경줄기세포를 유도하고, 염색체 이상 없는 유전적 안정성을 확보하였고, 유도된 신경줄기세포를 장기간 증식 및 유지하기 위한 최적화된 배양조건을 확립하였다. 이후, 인간 신경줄기세포의 기본적 특성 확인 및 삼신경계 세포와 다양한 종류의 신경세포로의 분화능을 확인하고, 유도된 인간 신경줄기세포는 이식후 종양형성 없이 삼신경계 세포로 분화됨을 확인하였다. 또한, 소분자 물질 일부가 내배엽 및 중배엽 관련 유전자의 발현을 조절함에 따라, 내배엽과 중배엽 관련 세포의 유도가능성을 확인하였다.

[0014] 따라서, 본 발명은 일관점에서 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542 및 CHIR99021를 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서 "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 티아조비빈(Thiazovivin)은 ROCK 억제제 (inhibitor of Rho-associated kinase: ROCK)로 ROCK(Rho-associated kinase)을 선택적으로 억제하는 역할을 하는 물질로 티아조비빈 외에 Y-27632 등을 사용할 수 있다. 상기 티아조비빈을 배지에 처리하여 유효 농도로 포함되도록 하며, 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다.

[0016] 본 발명에서 "VPA (valproic acid, 2-프로필펜타노익산)"은 히스톤 디아세틸라아제 억제제 (histone deacetylase inhibitor)로 히스톤 디아세틸라아제를 억제하는 물질들을 의미하며, 크로마틴을 고아세틸화 상태로 만들어 세포증식억제인자 및 분화유도에 필수적인 유전자들의 발현을 촉진하여 세포 (암세포)의 분화를 유도하고 혈관신생 (angiogenesis)을 억제하며, 세포주기를 G1상태로 고정시켜 암세포 (cancer cell)의 아포토시스 (apoptosis)를 유발하여 강한 세포증식억제 (cytostatic) 항암활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 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. 특히, 상기 VPA는 이노시톨 감소를 유발하고, GSK-3 β 를 저해하고 ERK pathway를 활성화시키고, PPAR 활성을 자극하는 것으로 알려져 있다.

[0017] 상기 히스톤 디아세틸라아제 억제제 (HDAC inhibitor) VPA (valproic acid, 2-프로필펜타노익산) 외에도 트라코스타틴 (trichostatin, TSA) 또는 그 유도체 등을 사용할 수 있으며, 상기 유도체는 약제학적으로 허용가능한 각종 무기염 또는 유기염을 포함한다. 처리 농도는 너무 낮으면 효과를 보기 어렵고, 농도가 너무 높으면 독성을 가지게 되므로 세포의 종류에 따라 적절한 농도를 확인해야 한다.

[0018] 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 유도

체가 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 인간 섬유아세포로부터 신경줄기세포를 제조하기 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.

[0019] 본 발명에서 "A-8301"은 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제(TGF- β type I receptor inhibitor)로 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). 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 억제제 A-8301 외에도 SB432542을 포함한 모든 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제가 사용될 수 있으며, 상기 저분자성 물질 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제 A-8301은 시중에서 구입하여 사용하거나 제조하여 사용할 수 있으며 상기 억제제 처리에 의해 신경줄기세포증식이 촉진된다. 상기 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제 A-8301은 배지에 처리하여 유효 농도로 포함되도록 한다. 배지의 종류 및 배양방법 등 당분야에서 잘 알려진 요소에 따라 유효농도는 영향을 받을 수 있다.

[0020] 본 발명에서 "SB431542"는 ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제로 신속한 역분화를 유도하여 염색체 안정성을 향상시키는 역할을 한다.

[0021] 본 발명에서 "CHIR99021"은 GSK (glycogen synthase kinase) 억제제로 GSK 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림(upstream) 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질이다. 상기 CHIR99021은 아미노피리미딘(aminopyrimidine)으로 표시되며, CHIR99021 외에도 모든 GSK 억제제가 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, DZNep (Deazaneplanocin A) 또는 5-AZA를 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, PD0325901, 아스코브산 (Ascorbic acid), PS48, 포스콜린 (Forskolin) 및 트라닐시프로민 (Tranilcyproline)으로 구성되는 군에서 선택된 1종 이상의 소분자 화합물을 추가로 더 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서, "5-아자싸이티딘(5-Azacytidine, 5-AZA)"은 4-아미노-1- β -D-리보푸라노실-1,3,5-트리아진-2(1H)-온(4-amino-1- β -D-ribofuranosyl-1,3,5-triazin-2(1H)-one)로 명명되며, DNA 탈메틸화 작용을 가지는 것으로 알려진 화합물이다. 또한, 5-아자싸이티딘은, 백혈병, 림프종 및 다양한 고형 종양에 대해 활성을 나타내는 항신생물성 약물로도 알려져 있다. 상기 5-아자싸이티딘은 당업계에서 알려진 일반적인 화학적 합성 방법에 의하여 합성하여 수득하거나, 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다 (예, Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, USA)).

[0024] 본 발명에서 PD0325901은 MEK/ERK 신호전달 경로 저해제 중 하나이며, 아스코브산은 수용성 비타민의 하나로 강한 항산화성을 가진다.

[0025] 본 발명에서 포스콜린은 다테닐산고리화효소의 촉매소단위를 직접 활성화하여 세포내 cAMP의 농도를 상승시키는 작용을 하며, 트라닐시프로민은 신경말단에서 정상적으로 노르에피네프린을 분해하는 효소인 모노아민산화효소(MAO)를 억제하는 작용을 한다.

[0026] 본 발명에 있어서, 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, B27, bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명의 유도된 줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에서 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 DMEM 배지일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 배양시켰다.

- [0028] 본 발명에 있어서, 배양 기간은 10~15일인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 세포를 계대배양한 후 부유 배양하여 스피어를 형성하는 단계; 및 상기 형성된 스피어를 부착 배양한 후 다시 부유 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 부유 배양 및 부착 배양은 각각 7~10일 동안 배양하는 것이 바람직하며, 상기 형성된 스피어를 부착 배양한 후 다시 부유 배양하는 단계는 2~4회 반복하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서, "신경줄기세포"는 자기복제능력을 가지고 있으며 뉴론(neuron) 및/또는 글리아(glia), 예를 들면, 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및/또는 슈반세포(Schwann cell) 등으로 분화하는 다분화 능력을 가진 미분화세포이다. 신경 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포나 글리아 전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포(neural cell), 예를 들면 뉴론이나 글리아로 분화하게 된다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포는 nestin, sox1 또는 musashil을 발현하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 별아교세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 뉴런(neuron), 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포 및 콜린 신경세포로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상으로 분화되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포는 염색체 안정성을 유지시키는 것을 특징으로 할 수 있으며, 10계대 이상 미분화 상태를 유지하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 인간 섬유아세포(Fibroblast)를 직접전환(Direct conversion) 방법을 이용하여 신경줄기세포로 유도하는 대부분의 방법은 신경줄기세포의 형성에 관련된 외부 유전자를 도입하는 방식으로 이루어지고 있다. 이때 다양한 방법을 통해 외부 유전자를 도입하게 되는데, 주로 이용되는 방법은 lentiviral 또는 retroviral 벡터 시스템을 이용하는 것이다. 바이러스를 이용하여 유전자를 도입하는 것은 외부 유전자의 무작위적인 인테그레이션(integration)으로 인한 유전적 불안정성(genomic instability)을 야기하여, 향후 환자에 임상적용 시 암이 발생할 가능성이 있다. 이러한 이유로 인해 점차적으로 외부 유전자를 주입하지 않고 소분자 물질(small molecule)을 이용하는 방법들이 제시되고 있는 실정이다. 그러나 최근 다양한 소분자 화합물들을 이용하여 직접전환을 유도하는 연구가 활발하게 진행되고 있음에도 불구하고 최소한 하나의 유전자는 이용되고 있으며, 유전자 도입 없이는 여전히 인간 체세포로부터 원하는 신경줄기세포로 전환할 수 없는 상태이다.
- [0034] 그러나, 본 발명 기술은 외부 유전자의 도입 없이 인간 섬유아세포에서부터 신경줄기세포를 유도하는 유전적 안정성이 확보된 방법으로써, 기존의 유전자를 이용한 유전적 결손을 유도하는 방법을 해결하고자 고안된 것이다.
- [0035] 본 발명에서는 소분자 물질의 조합만을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접전환 하였다. 이에, 기존의 기술이 가진 많은 문제점들, 예를 들면, 배아줄세포와 관련된 윤리적인 문제와 면역거부문제, 배아줄세포와 역분화 줄기세포가 가지고 있는 종양형성 문제 등을 극복함으로써, 환자를 위한 세포치료제로 활용 가능성이 매우 높다. 뿐만 아니라, 뇌질환 환자 체세포를 이용한 직접적으로 신경줄기세포로의 제작은 신경세포의 손상 또는 사멸로 인한 뇌질환의 발병기전 연구를 위한 새로운 세포 모델로 활용될 수 있다. 이러한 방법으로 제작된 신경줄기세포는 역분화 줄기세포와 비교시 매우 빠르고, 경제적이다. 역분화 줄기세포는 역분화 줄기세포로 제작하는 과정과 이를 다시 신경세포로의 분화시키는데 소요되는 시간과 비용이 2배 이상 많다.
- [0036] 또한, 성체 신경줄기세포와 본 발명에 따른 교차분화 신경줄기세포를 비교하면, 교차분화 신경줄기세포는 태아 또는 성체 뇌로부터 신경줄기세포를 확보할 필요가 없기 때문에 윤리적인 문제가 없고, 성체 줄기세포는 자가 재생능력이 제한되어 있지만, 교차분화 신경줄기세포는 자가 재생능력에 한계가 없어 원하는 만큼의 충분한 세포를 생산할 수 있다는 장점이 있다. 뿐만 아니라, 교차분화 신경줄기세포는 환자 본인의 세포를 이용하여 제작 가능하기 때문에 면역거부 반응이 없으며, 질병연구를 위한 환자 맞춤형 세포모델링이 가능하고, 개발된 약물의 환자 맞춤형 독성 평가 및 신약개발에 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 교차분화 신경줄기세포는 외부 유전자를 사용하지 않기 때문에 외부 유전자의 무분별한 삽입으로 인해 발생하는 종양형성의 가능성이 없어, 세포치료제로 활용 가능성이 높다고 할 것이다.
- [0037] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 소분자 화합물을 포함하는 배지에서 인간섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 신경줄기세포를 함유하는 뇌질환 치료용 세포치료제에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 뇌일혈, 뇌경색, 알츠하이머, 치매, 헌팅톤병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 다발성 신경위축, 간질, 피크병 및 크로이츠펔트-야콥병인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0039] 본 발명은 뇌질환 치료를 위한 임상적용 가능한 신경줄기세포로 활용이 가능하며, 유전성 뇌 경질환 환자 유래 질병신경줄기세포를 제작할 경우 발병기전 연구에 직접적으로 활용될 수 있는 뇌질환 세포모델로 사용될 수 있고, 유전자 조작을 이용한 돌연변이 유전자를 정상 유전자로 대체 하게 되면 유전성 뇌질환 환자 치료를 위한 세포치료제로 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 용어 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0041] 본 발명에서 용어, "치료"는 상기 세포치료제의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0042] 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0043] 상기 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0044] 또한, 상기 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다.
- [0045] 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다.
- [0046] 용어 치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상예 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다.
- [0047] 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 줄기세포의 1일 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0048] 또한, 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 세포치료제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 직장, 정맥내(intravenous therapy, i.v), 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0049] 본 발명은 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 상기 세포치료제 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료방법을 제공한다. 여기에서 사용된 용어 포유동물은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0050] [실시예]
- [0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] 실시예 1: 소분자 화합물의 기능 확인 및 조합

[0053] 1-1: 소분자 화합물의 기능 확인

[0054] 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 유도하기 위해 리프로그래밍(Reprogramming)에 관련된 다양한 소분자 화합물 중 13종을 선택적으로 선별하여 사용하였다 (표 1).

표 1

#	Name	Formal Name
1	PD0325901	N-[(2R)-2,3-dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide
2	SB431542	4-[4-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-5-(2-pyridyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide
3	Thiazovivin	N-(phenylmethyl)-2-(4-pyrimidinylamino)-4-thiazolecarboxamide
4	Ascorbic acid	R)-5-((S)-1,2-dihydroxyethyl)-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one
5	PS48	5-(4-chlorophenyl)-3-phenyl-2Z-pentenoic acid
6	CHIR99021	6-[[2-[[4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile
7	DZNep (3-Deazaneplanocin A)	5R-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-(hydroxymethyl)-3-cyclopentene-1S,2R-diol
8	Valproic acid	2-propyl-pentanoic acid
9	Forskolin	5-(acetyloxy)-3-ethenyldodecahydro-6,10,10b-trihydroxy-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-(3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-1H-Naphtho[2,1-b]pyran-1-one
10	Tranlycypromine	(1R,2S)--2-phenyl-cyclopropanamine, monohydrochloride
11	A8301	3-(6-Methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide
12	5-AZA	
13	Purmorphamine	9-cyclohexyl-N-[4-(morpholinyl)phenyl]-2-(1-naphthalenyloxy)-9H-purin-6-amine

[0055]

[0056] 소분자 물질 각각의 기능을 확인하고 최적의 조합을 찾기 위해, 인간 섬유아세포 1×10^5 개를 60mm dish에 준비하고 다음날 DMEM/F12, N2, B27, bFGF, EGF로 구성된 neurobasal medium에 소분자 물질 13개 (PD0325901, SB431542, Thiazovivin, Ascorbic acid, PS48, CHIR99021, Deazaneplanocin A, Valproic acid, Forskolin, Tranlycypromine, A8301, 5-AZA, Purmorphamine)를 하나씩 각각 첨가하여 처리하였다. 이후 2~3일마다 배양액을 바꿔주면서 세포의 형태학적 변화를 확인하였다 (도 1). 5일마다 계대배양을 진행하고 이 단계에서 유전자 발현 패턴을 확인하기 위해 일부 세포를 확보하였다. 이처럼 시기별로 얻어진 세포에서 섬유아세포 마커(Thy1), 신경줄기세포 마커 (nestin, sox1, sox2, pax6), MET 또는 EMT 마커 (snail, N-cadherin, E-cadherin), 내배엽과 중배엽 형성에 관련된 마커 (AFP, GATA4), 염색체 안정성 유지와 관련된 마커 (Zsacn4)의 유전자 발현 패턴을 quantitative PCR을 이용하여 확인하였다 (도 2).

[0057] 그 결과, 8종의 소분자 물질 (Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301, SB431542, CHIR99021, Deazaneplanocin A, 5-AZA)이 신경줄기세포 마커 유전자의 발현을 뚜렷하게 증가시킨 것이 확인되었다.

[0058] 1-2: 소분자 화합물의 조합

[0059] 가장 효율적인 신경줄기세포 제작조건을 위하여, 실시예 1-1에서 확인 한 8개의 소분자 물질을 한꺼번에 첨가한 조건에서부터 소분자 물질 1개씩을 뺀 다양한 조건의 배양액을 이용하여 섬유아세포가 신경줄기세포로 변화되는지를 확인하였다. 인간 섬유아세포 1×10^5 개를 60mm dish에 준비하고 다음날부터 하기 표 2의 다양한 조건의 배

양액을 2~3일마다 바꿔주면서 세포의 형태학적 변화를 확인하였다. 또한, 계대배양을 하면서 얻어진 세포를 통해 다양한 유전자의 발현 패턴의 변화를 관찰하였다.

표 2

DMEM/F12 + N2, B27, bFGF, EGF (NSC basal medium)	
	Chemicals
Condition 1	Without chemicals
Condition 2	VPA, Purnor, A8301, SB, CHIR, DZNep, 5-AZA
Condition 3	TV, Purnor, A8301, SB, CHIR, DZNep, 5-AZA
Condition 4	TV, VPA, A8301, SB, CHIR, DZNep, 5-AZA
Condition 5	TV, VPA, Purnor, SB, CHIR, DZNep, 5-AZA
Condition 6	TV, VPA, Purnor, A8301, CHIR, DZNep, 5-AZA
Condition 7	TV, VPA, Purnor, A8301, SB, DZNep, 5-AZA
Condition 8	TV, VPA, Purnor, A8301, SB, CHIR, 5-AZA
Condition 9	TV, VPA, Purnor, A8301, SB, CHIR, DZNep
Condition 10	TV, VPA, Purnor, A8301, SB, CHIR, DZNep, 5-AZA

[0060]

[0061]

그 결과, 신경줄기세포 마커의 유전자 발현을 증가시키는 6개(Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301, SB431542, CHIR99021)에서 8개(Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301, SB431542, CHIR99021, Deazaneplanocin A, 5-AZA)의 소분자 물질의 조합을 선정하였다. 이를 통하여 6~8개의 소분자 물질만을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 유도할 수 있음을 확인하였다. 또한, 동일한 인간 섬유아세포임에도 불구하고 세포가 유래한 근원의 종류에 따라서 신경줄기세포와 유사한 형태를 가지는 세포가 발견되는 시기가 다른 것을 확인하였다.

[0062]

실시예 2: 인간 섬유아세포로부터 신경줄기세포의 유도 및 배양

[0063]

인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 변환하는데 필요로 하는 소분자 물질의 조합이 정해짐에 따라, 안정적으로 유도하고 배양하는 조건을 확립 하고자 하였다. 더불어 신경줄기세포로 유도되는 효율을 확인하기 위해 최소 4개의 소분자 화합물이 첨가된 배양액을 이용하여 비교하였다. 먼저, 1×10^5 개의 섬유아세포를 준비한 뒤, DMEM/F12, N2, B27, bFGF, EGF로 구성된 neurobasal medium에 4종(Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301), 6종(Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301, SB431542, CHIR99021), 8종(Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301, SB431542, CHIR99021, Deazaneplanocin A, 5-AZA)의 소분자 화합물이 각각 첨가되어 있는 세 가지 조건의 배양액을 처리하였다.

[0064]

그 결과, 유도를 시작한지 3일쯤부터 세포의 형태가 서서히 변하기 시작하였다. 7~10일쯤 4개의 소분자 화합물이 첨가된 배양액 조건의 경우 세포의 형태가 섬유아세포 일때와 크게 변하지 않았으나, 6개와 8개의 소분자 화합물이 첨가된 배양액 조건에서는 신경줄기세포와 유사한 형태의 세포가 형성되었다.

[0065]

이후, 계대배양을 진행하여 줄기세포의 성질을 증가시키기 위한 목적으로 petri-dish를 이용하여 suspension으로 배양하였다. Suspension 방법으로 배양한 뒤 7~10일이 지나면 6개와 8개의 소분자 화합물이 첨가된 배양액 조건에서는 대부분의 세포들이 작은 sphere를 형성하게 된다. 반면, 4개의 소분자 화합물이 첨가된 조건에서는 sphere가 제대로 형성되지 않는 것을 확인하였다. 이렇게 형성된 작은 sphere는 PLO/FN이 코팅되어 있는 dish에 부착시키고 또 다시 7~10일 정도를 배양한다. 이 단계의 세포의 형태는 보다 신경줄기세포의 형태와 흡사해지는 것을 확인할 수 있었다 (도 3). Suspension 배양과 부착 배양을 2~4차례 반복하여 진행하자 6개와 8개의 소분자 화합물이 첨가된 배양액 조건에서 세포의 형태가 보다 명확하게 바뀌는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 4개의 소분자 화합물이 첨가된 배양액에서는 지속적인 배양에도 불구하고 세포의 형태가 바뀌지 않는 것을 확인하였다. 이렇게 6개 또는 8개의 소분자 화합물을 첨가한 배양액을 통해 유도된 신경줄기세포는 지속적인 계대배양과 함께 오랜 시간동안 배양하여도 신경줄기세포의 형태를 유지하였다.

[0066]

실시예 3: 소분자 화합물로 유도된 인간 신경줄기세포의 특성 확인

[0067]

DMEM/F12 + N2B27에 6개의 소분자 화합물로 유도 및 유지한 인간 신경줄기세포가 신경줄기세포의 일반적인 특성

을 나타내는지 확인하였다. 먼저, 신경줄기세포가 신경줄기세포의 마커를 발현하는지 확인하고자 PCR과 immunocytochemistry (ICC)를 진행하였다. 그 결과, 면역세포화학 (ICC) 염색을 통해 신경줄기세포가 nestin을 발현하는 것을 확인하였으며, PCR을 통해 신경줄기세포 마커 nestin, sox1, musash1의 유전자 발현이 인간 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포와 유사한 발현정도를 나타내는 것을 확인하였다 (도 4).

[0068] 장기배양 동안에 신경줄기세포의 성질이 유지되는지 확인하고자 유도된 신경줄기세포의 초기단계 및 후기단계 각각에서 세포의 형태를 관찰하였다. 또한, 면역세포화학 (ICC) 염색을 통한 nestin의 발현 확인과 PCR을 이용한 신경줄기세포 마커 nestin, sox1, musash1의 유전자 발현을 확인하였다 (도 5). 더불어 염색체 분석을 통하여 유도된 신경줄기세포의 초기단계 및 후기단계에 염색체 이상 유무를 확인하였으며 (도 6), 인간 배아줄기세포에서 유래한 신경줄기세포와 증식 및 유지배양 동안에 세포의 성장 속도를 비교하였다 (도 7). 그 결과, 유도된 신경줄기세포는 장기간 배양 동안에도 신경줄기세포의 형태와 성질을 유지하는 동시에 염색체 이상 없이 계속적인 배양이 가능함을 확인하였다.

[0069] 이후, 후성 유전적 변화를 확인하기 위하여 신경줄기세포 마커인 nestin의 promoter 지역의 methylation/acetylation 유무를 bisulfite PCR로 진행한 결과, 섬유아세포의 특성이 신경줄기세포의 특성으로 완전히 바뀌었음을 확인할 수 있었다 (도 8).

[0070] 실시예 4: 유도된 인간 신경줄기세포의 in vitro 분화능력 확인

[0071] 실시예 1 내지 3을 통하여 소분자 물질을 이용하여 인간 섬유아세포에서부터 신경줄기세포를 유도하는 것이 성공적으로 수행되었다는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로 신경줄기세포의 특성 및 이용가능성을 확인하기 위하여 in vitro 상에서의 분화 능력을 확인하였다. 먼저, 삼 신경세포인 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte) 및 뉴런 (neuron)으로 분화를 진행하였다.

[0072] 그 결과, 소분자 화합물에 의해 유도된 신경줄기세포는 성공적으로 삼 신경세포로 분화가 되는 것을 확인하였다 (도 9). 이후, 다양한 종류의 신경세포로 분화가 되는지 확인해 본 결과, 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포, 콜린 신경세포 및 글루타메이트 신경세포로 분화가 되는 것을 확인하였다 (도 10). 이를 통하여 본 발명으로 유도된 인간 신경줄기세포는 다양한 신경세포로의 분화가 가능함을 확인하였다.

[0073] 이러한 인간 섬유아세포를 이용한 인간 신경줄기세포로의 유도, 증식 및 다양한 종류의 기능성 신경세포로의 분화능력은 인간의 뇌질환 치료를 위한 세포치료제로써의 활용 가능성이 매우 높다는 보여 주었으며, 또한 이러한 유도 신경줄기세포는 신경세포의 발생학적 연구 및 뇌질환 발병 기전을 연구하기 위한 최적의 모델 세포로 활용가능성을 제시한다.

[0074] 실시예 5: 유도된 인간 신경줄기세포의 in vivo 분화능력 확인

[0075] 실시예 3 및 4에서는 소분자 물질을 이용하여 인간 섬유아세포에서부터 유도된 신경줄기세포가 성공적으로 삼신경세포로 분화가 가능하다는 것을 in vitro상으로 확인하였다.

[0076] 이에, 소분자 물질을 이용하여 인간 섬유아세포에서부터 유도된 신경줄기세포의 in vivo에서의 분화 능력과 종양형성 유무를 관찰하기 위하여, 마우스 (오리엔트바이오, Balb/c)의 뇌에 유도된 인간 신경줄기세포를 이식하였다. 이후, 3개월 내지 7개월 동안 유도된 인간 신경줄기세포가 이식된 생쥐를 지속 관찰하였다.

[0077] 그 결과, 소분자 화합물에 의해 유도된 신경줄기세포가 이식된 생쥐의 뇌는 3개월 내지 7개월 동안 외형적으로 종양형성이 관찰되지 않았고 (도 11A), H&E (Haematoxylin and Eosin) 염색법으로 뇌 조직을 확인하였을 때도 종양형성이 관찰되지 않음을 확인하였다 (도 11B). 또한, 유도된 신경줄기세포는 신경줄기세포 마커발현을 통해 성공적으로 이식된 것을 확인하였으며 (도 11C), 이식 3개월 내지 7개월 후 유도된 신경줄기세포는 인간세포-특이 마커 및 신경세포-특이 마커의 발현을 통해 이식된 세포가 신경세포로 분화되었음을 확인하였다 (도 11D). 이는 소분자 화합물에 의해 유도된 인간 신경줄기세포가 이식 후 종양형성 없이 신경세포로 분화가 가능하다는 것을 나타낸다.

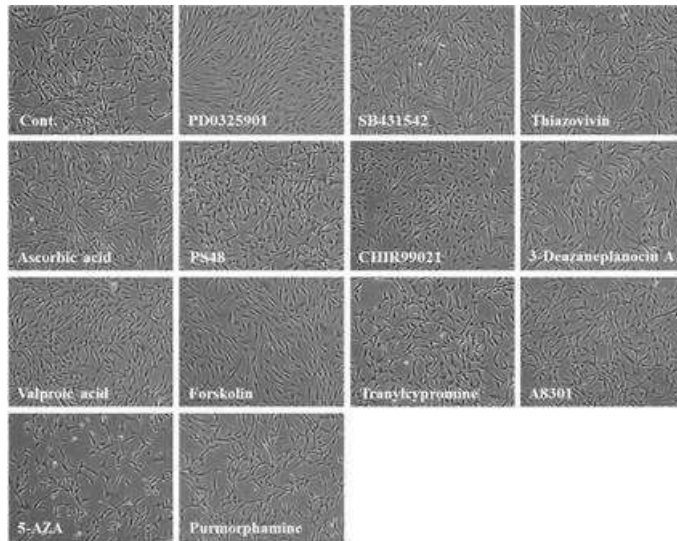
[0078] 이러한 유도 신경줄기세포는 신경세포의 발생학적 연구 및 뇌질환 발병 기전을 연구하기 위한 최적의 모델 세포로 활용이 가능하며, 종양을 발생시키지 않는 장점에 의해 인간의 뇌질환 치료를 위한 세포치료제로써의 활용가능성이 매우 높다.

[0079] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고

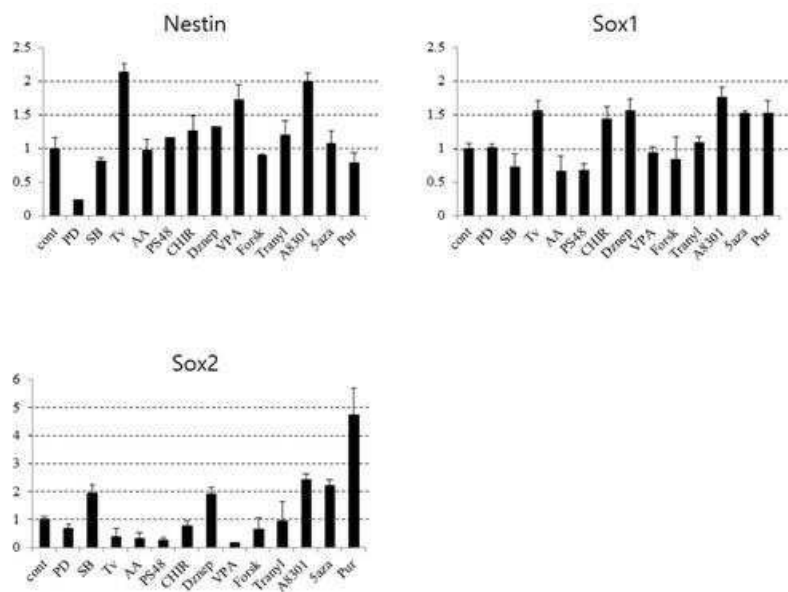
할 것이다.

도면

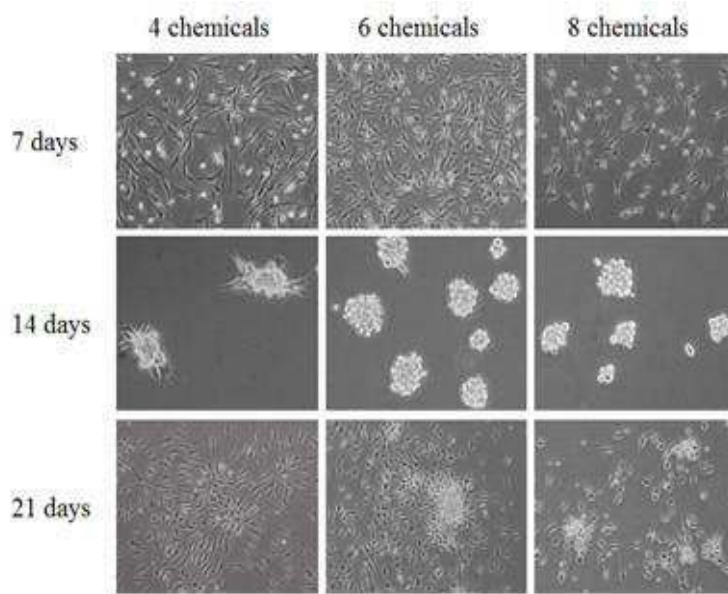
도면1



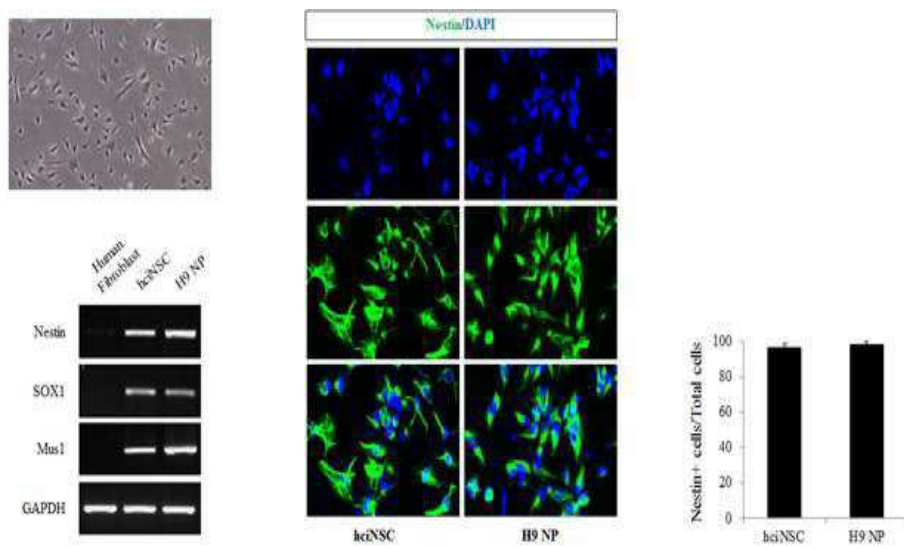
도면2



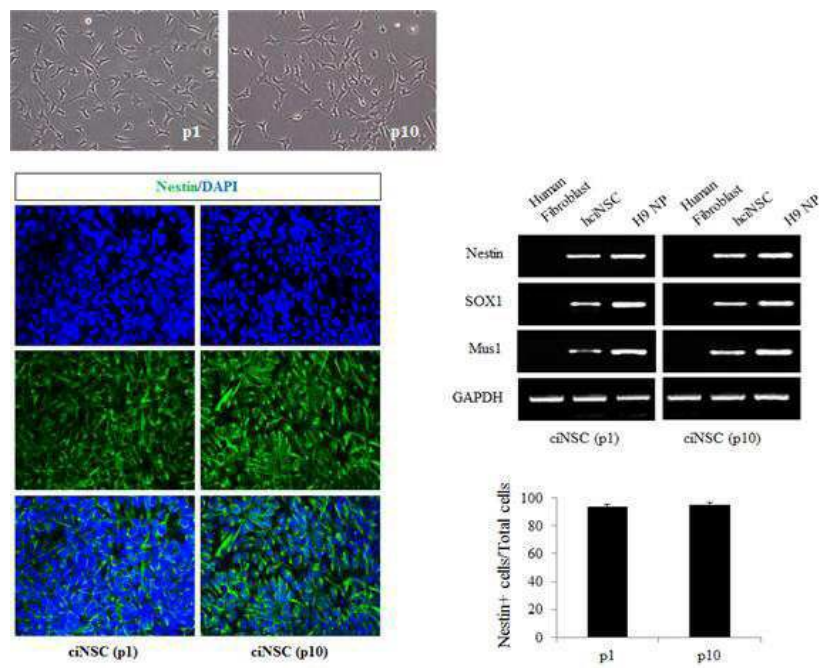
도면3



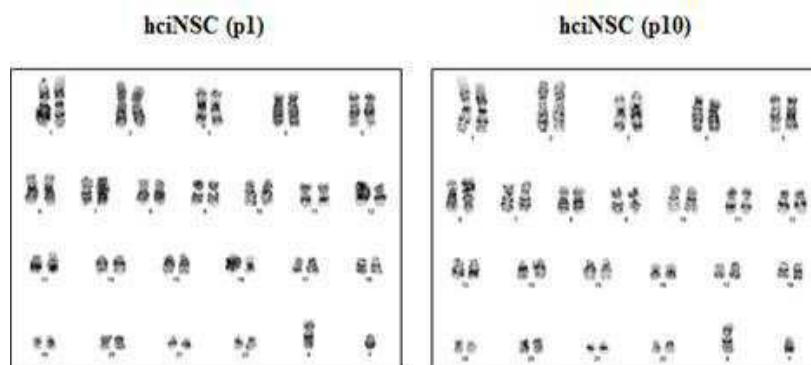
도면4



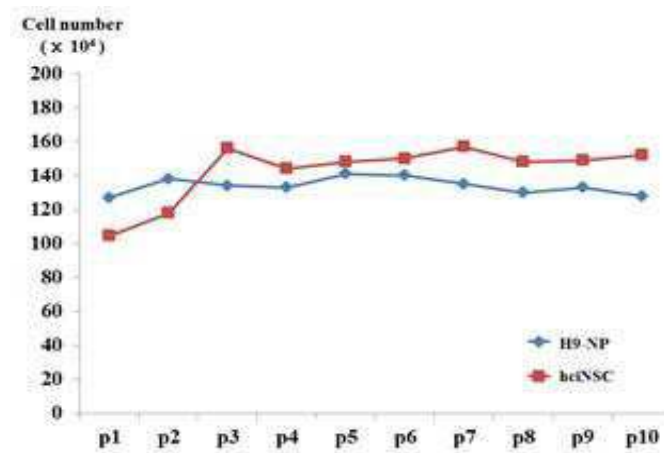
도면5



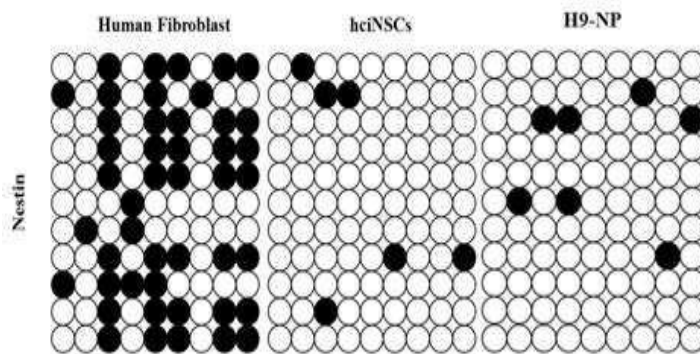
도면6



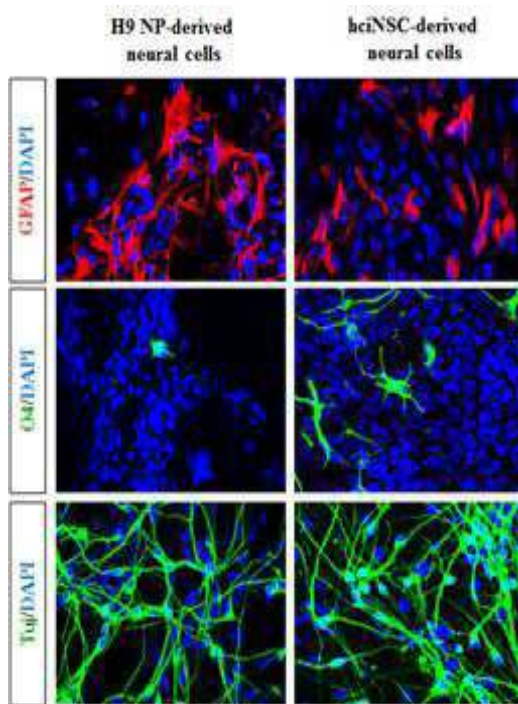
도면7



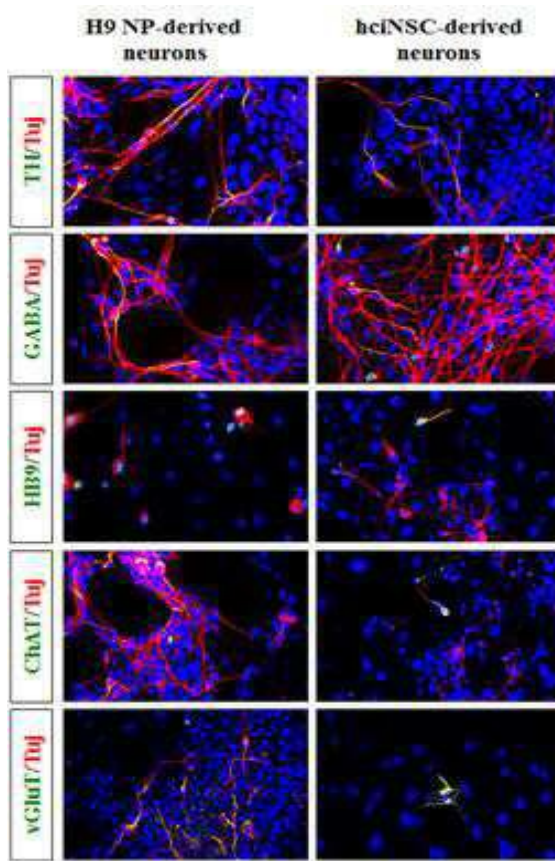
도면8



도면9



도면10



도면11

