



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0087403
(43) 공개일자 2011년08월03일

(51) Int. Cl.

C12N 5/0793 (2010.01) C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0006805

(22) 출원일자 2010년01월26일

심사청구일자 2010년01월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

신화성

인천광역시 남구 학익동 동아풍림아파트 108-103

(74) 대리인

김원식

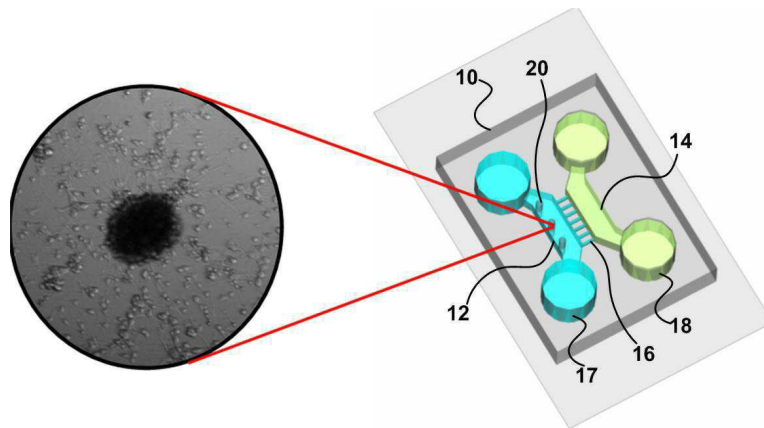
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법

(57) 요약

본 발명은, 배아 줄기 세포에서 배양된 배아체를 구분 배양기에서 초기 뉴런으로 분화시킴으로써, 초기 뉴런의 신경세포체와 축삭돌기를 각각 다른 챔버에서 독립적으로 배양시킬 수 있게 하여, 초기 뉴런의 각 부분에 대한 독립적인 연구가 가능하게 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

배아 줄기 세포에서 분화되는 초기 뉴런에서 신경세포체와 축색돌기를 구분하여 배양하기 위한 방법에 있어서,
배양 디쉬에서 배아 줄기 세포를 배양하여 배아체를 형성하는 제1단계;

배아체를 구분 배양기의 제1챔버에 투입하는 제2단계;

제1챔버에 뉴런 분화를 유도하기 위한 신경분화 배지를 주입하여 배아체를 초기 뉴런으로 분화시키는 제3단계;

분화된 초기 뉴런의 축색돌기가 마이크로채널을 통해 제2챔버로 이동하는 제4단계;

를 포함하여 구성되고,

상기 구분 배양기는, 세포의 배양을 위한 한 쌍의 챔버와, 상기 한 쌍의 챔버를 상호 연통시키는 다수의 마이크로채널을 포함하되, 상기 각 마이크로채널은 각 챔버에 주입되는 배지와 초기 뉴런의 신경세포체 부분이 통과될 수 없고, 초기 뉴런의 축색돌기만 통과할 수 있도록 구성되는 것을 특징으로 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

배양 디쉬에서 배양된 배아체에 뉴런 분화를 유도하기 위한 신경분화 배지를 주입하는 제1-1단계;

를 더 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2단계는,

제1챔버의 상면에 핀홀을 뚫고, 핀홀을 통해 배아체를 투입하도록 구성되는 것을 특징으로 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제2단계에서,

배양 디쉬에서 5 ~ 7일 동안 배양된 배아체가 구분 배양기의 제1챔버에 투입되도록 구성되는 것을 특징으로 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 배아 줄기 세포에서 배양된 배아체를 구분 배양기에서 초기 뉴런으로 분화시킴으로써, 초기 뉴런의 신경세포체와 축색돌기를 각각 다른 챔버에서 독립적으로 배양시킬 수 있게 하여, 초기 뉴런의 각 부분에 대한 독립적인 연구가 가능하게 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뉴런은 크게 세가지 부분으로 나눌 수 있는데, 핵이 있는 세포 부분이 신경세포체(soma), 다른 세포에서 신호를 받는 부분이 수상돌기(dendrite), 그리고 다른 세포에 신호를 주는 부분이 축색돌기(axon)이다.

[0003] 이러한 뉴런에 대해 많은 연구가 이루어지고 있고, 최근에는 중추 신경계의 부상과 뉴런이 생성되지 않는 장애를 더 잘 이해하기 위한 방법으로 축색돌기(axon)에 관한 연구가 중점적으로 이루어지고 있다. 축색돌기의 손상은 뉴런 기능 부전의 결정적인 면으로서 폭넓은 분자 연구를 이끌고, 또한 축색돌기의 가소성과 부상에 대한

응답을 향상시키는 세포 메커니즘으로 인식되어 왔다.

[0004] 이처럼 뉴런의 특정 부분에 관한 연구를 수행하기 위해서는, 축색돌기와 신경세포체가 독립적으로 구분되어 유동적으로 고립되어 있는 구획된 뉴런 배양 장치가 요구된다.

[0005] 또한 뉴런 연구를 위한 대부분의 가치 있는 뉴런들은 초기 뉴런(primary neurons)이다. 그러나 그러한 초기 뉴런의 획득에는 시간과 장소에 한계가 있다. 이러한 이유로 PC12 또는 N1E-115 같은 세포주들이 뉴런 연구를 위해 폭넓게 사용되고 있다. 그러나 불행하게도 이러한 세포주들의 생리학적이고 생화학적인 특성이 초기 뉴런과 동일하다고 보증할 수 없다. 따라서 초기 뉴런을 보다 용이하게 획득하여 해당 뉴런의 신경세포체와 축색돌기를 독립적으로 배양시킬 수 있게 하는 방법의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 초기 뉴런의 신경세포체와 축색돌기를 별도의 챔버에서 각각 독립적으로 구분 배양할 수 있게 하는 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법을 제공하는 것을 본 발명의 주요한 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 해결하기 위한 본 발명에 따른 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법은, 배아 줄기 세포에서 분화되는 초기 뉴런에서 신경세포체와 축색돌기를 구분하여 배양하기 위한 방법에 있어서, 배양 디쉬에서 배아 줄기 세포를 배양하여 배아체를 형성하는 제1단계; 배아체를 구분 배양기의 제1챔버에 투입하는 제2단계; 제1챔버에 뉴런 분화를 유도하기 위한 신경분화 배지를 주입하여 배아체를 초기 뉴런으로 분화시키는 제3단계; 분화된 초기 뉴런의 축색돌기가 마이크로채널을 통해 제2챔버로 이동하는 제4단계;를 포함하여 구성되고,

[0008] 여기서 상기 구분 배양기는, 세포의 배양을 위한 한 쌍의 챔버와, 상기 한 쌍의 챔버를 상호 연통시키는 다수의 마이크로채널을 포함하되, 상기 각 마이크로채널은 각 챔버에 주입되는 배지와 초기 뉴런의 신경세포체 부분이 통과될 수 없고, 초기 뉴런의 축색돌기만 통과할 수 있도록 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0009] 또한 본 발명은, 배양 디쉬에서 배양된 배아체에 뉴런 분화를 유도하기 위한 신경분화 배지를 주입하는 제1-1단계;를 더 포함하여 구성되는 것이 바람직하다.

[0010] 그리고 상기 제2단계는, 제1챔버의 상면에 핀홀을 뚫고, 핀홀을 통해 배아체를 투입하도록 구성되는 것이 바람직하다.

[0011] 또한 상기 제2단계에서, 배양 디쉬에서 5 ~ 7일 동안 배양된 배아체가 구분 배양기의 제1챔버에 투입되도록 구성되는 것이 더욱 바람직하다.

발명의 효과

[0012] 상기와 같은 구성을 가지는 본 발명에 따른 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법에 의하면, 마이크로채널로 연결된 독립적인 2개의 챔버를 구비한 구분 배양기에서 배아체를 초기 뉴런으로 분화시킴으로써, 분화되는 과정에서 초기 뉴런의 신경세포체와 축색돌기가 각각 서로 다른 챔버에서 독립적으로 배양될 수 있게 되어, 초기 뉴런의 각 부분에 대해 개별적인 연구 실험이 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 따른 구분 배양기를 나타내는 개략도.

도 2는 본 발명에 따른 배양 디쉬의 배아 줄기 세포에서 배양된 배아체를 나타내는 사진.

도 3은 구분 배양기에서 배아체로부터 분화된 초기 뉴런을 나타내는 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하에서는 본 발명에 따른 배아 줄기 세포를 이용한 초기 뉴런의 구분 배양 방법에 대한 바람직한 실시예를 상

세하게 설명한다.

- [0015] 본 발명에서는 배아 줄기 세포(embryonic stem cell)를 배아체(embryoid bodies)로 배양한 후, 초기 뉴런(primary neurons)으로 분화시키는 과정을 순차적으로 거치게 된다.
- [0016] 배아 줄기 세포는 신체 내 모든 조직을 만들어 낼 수 있는 기원세포로서, 각 조직에서 얻을 수 있는 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 상기 줄기세포는 분화 자극에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산할 수 있는 특성이 있고, 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있는 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있다.
- [0017] 본 발명에서는 이러한 배아 줄기 세포를 배양하여 배아체를 형성하게 된다. 그리고 이처럼 형성된 배아체를 하기에 설명하는 구분 배양기에 주입한 후, 구분 배양기 내에서 초기 뉴런으로 분화시키게 된다.
- [0018] 도 1에는 배아체가 주입되어 초기 뉴런으로 분화되기 위한 본 발명에 따른 구분 배양기의 구조가 도시되어 있다.
- [0019] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 구분 배양기(10)는, 세포의 배양을 위한 한 쌍의 챔버(12, 14)와, 각 챔버(12, 14)에 주입되는 배지가 저장되는 리저버어(17, 18), 그리고 상기 한 쌍의 챔버(12, 14)를 상호 연통시키는 다수의 마이크로채널(16)을 포함하는 구조로 이루어진다. 여기서, 상기 각 마이크로채널(16)은 각 챔버(12, 14)에 주입되는 배지(16)가 통과될 수 없고, 초기 뉴런을 구성하는 신경세포체(soma) 부분도 통과될 수 없으며, 오로지 초기 뉴런의 축색돌기(axon)만 통과할 수 있을 정도로 매우 미세하게 형성된다.
- [0020] 여기서, 상기 구분 배양기(10)는 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 신속 조형(rapid prototyping) 및 소프트 리소그래피(soft lithography)하는 방식으로 만들어진다. 그리고 패터닝 마스터(master)를 만들기 위해 SU-8 네거티브 포토레지스트(negative photoresist)가 사용된다.
- [0021] 이처럼 한 쌍의 챔버(12, 14)를 구비하는 구분 배양기(10)에서 제1챔버(12)에만 배아체를 주입하고, 그 배아체가 주입된 제1챔버(12)에 초기 뉴런으로 분화시키기 위한 성분을 포함하는 신경분화 배지를 주입함으로써, 상기 배아체를 구분 배양기(10)의 제1챔버(12) 내에서 초기 뉴런으로 분화시키게 된다.
- [0022] 따라서 구분 배양기(10)의 제1챔버(12)에서 생성된 초기 뉴런은, 그 초기 뉴런으로의 분화 과정에서 마이크로채널(16)을 통과하지 못하는 신경세포체 부분은 최초에 배아체가 배양되던 제1챔버(12)에 그대로 남게 되고, 반면에 축색돌기 부분은 마이크로채널(16)을 통과하여 배아체가 주입되지 않은 제2챔버(14)로 이동하게 된다.
- [0023] 이와 같이, 구분 배양기(10)에서 생성된 초기 뉴런의 신경세포체와 축색돌기는 마이크로채널(16)을 사이에 두고 각각 제1챔버(12)와 제2챔버(14)에서 배양되는 상태가 되고, 이때 상기 마이크로채널(16)을 통해서 배지 역시 통과할 수 없게 된다.
- [0024] 따라서 신경세포체가 배양되는 제1챔버(12)에 특정한 배지를 주입하더라도, 상기 배지는 마이크로채널(16)을 통해 제2챔버(14)로 이동할 수 없기 때문에 신경세포체에 대해서만 반응하고 축색돌기에 대해서는 반응할 수 없게 된다. 마찬가지로 축색돌기가 배양되는 제2챔버(14)에 특정 배지가 주입되더라도, 상기 배지는 축색돌기에 대해서만 반응하고 신경세포체에 대해서는 반응할 수 없게 된다.
- [0025] 이와 같이 구성되는 본 발명에 의하면, 배아 줄기 세포를 이용하여 신경세포체와 축색돌기 부분으로 구분 배양되는 초기 뉴런을 용이하게 생성할 수 있게 되고, 초기 뉴런의 각 부분에 대한 개별적인 연구 역시 용이하게 수행할 수 있게 된다.
- [0026] 이하에서는 상기와 같이 구성되는 본 발명에 따른 초기 뉴런의 구분 배양 방법에 대한 실험예를 살펴본다.

[0027] 1. 배아 줄기 세포를 배아체로 배양

[0028] 우선 배아 줄기 세포를 다음과 같은 과정을 통해 배아체로 배양한다.

[0029] 예열된 E14 complete medium를 함유하는 0.1% 젤라틴 코팅 디쉬(dish)에 배아 줄기 세포를 주입하고, 이를 37℃에서 5% CO₂의 인큐베이터에 넣는다. 상기 배양 디쉬의 배지는, 500ml Glasgow Minimum Essential Medium (G-MEM, Sigma), 57ml ES-cell certified FBS (HyClone), 5.7ml 200 mM L-glutamine, 5.7ml 100mM sodium pyruvate (Invitrogen), 5.7ml MEM Non-Essential Amino Acids Soln (Invitrogen), 0.57ml, 1000x β-ME Soln, 그리고 0.06l murine leukemia inhibitor factor (LIF) (Chemicon International)로 이루어진다.

- [0030] 그리고 세포가 70-80% 분포됐을 때, 부유액을 제거하고 E14 complete medium로 씻은 후, E14 medium를 주입한다. 세포가 90% 이상으로 분포되면 세포를 계대배양 한다. 이후, 세포를 D-PBS로 씻은 후, 0.5% 트립신을 넣고, 37℃ 5% CO₂ 인큐베이터에서 7-15분 동안 배양하고, 트립신의 활성을 억제하기 위해 동일한 부피의 E14 complete를 디쉬에 넣는다.
- [0031] 위와 같은 과정을 통해 배아 줄기 세포가 배아체로 배양된 후, 상기 배아체를 초기 뉴런으로 분화시키기 위한 신경분화 배지(neuronal differentiation medium)를 배양 디쉬에 주입한다.
- [0032] 이러한 신경분화 배지는, ES-CultTM Basal Medium-A(1.55g/L D-glucose, 0.5mM L-glutamine, 그리고 2.4g/L sodium bicarbonate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)/Ham's Nutrient Mixture F-12), N2 Supplement B(2.5 mg/mL insulin, 10mg/mL human transferrin (iron-poor), 0.52µg/mL sodium selenite, 1.61mg/mL putrescine, 0.63µg/mL progesterone in phosphate buffered saline), 그리고 B27(stem cell technologies)의 성분으로 이루어진다.
- [0033] 이때, 상기 신경분화 배지를 구성하는 세가지 성분의 부피 비율은 각각 49.4, 0.4, 그리고 0.2mL의 비율로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0034] 상기 신경분화 배지가 주입된 배양 디쉬에서 5 ~ 7일 동안 상기 배아체를 배양한 결과, 도 2에 도시된 바와 같이 축색돌기가 세포의 중심에서 방사형으로 자라면서 많은 초기 뉴런이 생성됐다.
- [0035] 즉, 상기 과정을 종합하면, 배양 디쉬에서 배아 줄기 세포를 배아체로 배양하고, 이후 상기 배아체에 신경분화 배지를 주입하여 초기 뉴런이 형성되도록 하였다. 결국, 배양 디쉬에는 아직 초기 뉴런으로 분화되지 않은 배아체와, 분화되었지만 주위로 퍼져나가지 않고 배아체에 결집되어 있는 초기 뉴런들이 남아있게 된다.
- [0036] 다만, 상기의 실험 과정에서는 배아체를 구분 배양기에 투입하기 전에 배양 디쉬 단계에서 뉴런 분화를 유도하기 위한 신경분화 배지를 주입하였지만, 배양 디쉬 단계에서는 신경분화 배지를 주입하지 않고 배아체를 구분 배양기에 투입한 이후에 비로소 신경분화 배지가 주입되도록 구성될 수도 있다.
- [0037] 2. 배아체를 구분 배양기에 투입
- [0038] 위와 같은 과정을 통해 배아 줄기 세포에서 배양된 배아체는 본 발명에 따른 구분 배양기(10)의 제1챔버(12)에 투입된다. 이때, 배아체를 배지와 함께 제1챔버(12)에 주입하는 경우, 배아체에 의해 마이크로채널(16)이 막힐 염려가 있으므로, 이를 방지하기 위해 도 1에 도시된 바와 같이 제1챔버(12)의 상면에 다수의 핀홀(20)을 뚫고, 그 핀홀(20)을 통해 배아체를 투입하는 것이 바람직하다.
- [0039] 제1챔버(12)에 투입되는 배아체에는, 아직 초기 뉴런으로 분화되지 않은 배아체 이외에도, 분화는 되었지만 주위로 퍼져나가지 않고 배아체에 결집되어 있는 초기 뉴런들도 포함된다. 이후, 상기 제1챔버(12)에 배아체를 초기 뉴런으로 분화시키기 위한 신경분화 배지(neuronal differentiation medium)를 주입한다.
- [0040] 상기 배아체는 제1챔버(12)에서 초기 뉴런으로 분화되면서 점차 방사상으로 퍼져나가게 되고, 이때 초기 뉴런의 신경세포체 부분은 제1챔버(12)에 그대로 남아 있지만, 축색돌기는 점차 성장하면서 마이크로채널(16)을 통해 제2챔버(14)로 이동하게 된다. 즉, 도 3에 도시된 바와 같이 마이크로채널(16)을 사이에 두고 좌측의 제1챔버(12)에는 신경세포체가 위치하고, 우측의 제2챔버(14)에는 축색돌기가 위치하게 된다.
- [0041] 이처럼 본 발명에 따른 방식에 의하면, 구분 배양기(10)에서 배아체가 초기 뉴런으로 분화되면서 자연스럽게 축색돌기 부분이 다른 챔버(14)로 이동하게 되어, 하나의 초기 뉴런에 대해 신경세포체와 축색돌기 부분을 선택적으로 노출시킬 수 있게 된다.
- [0042] 이러한 본 발명에 의하면, 축색돌기가 마이크로채널(16)을 가로 질러 신경세포체와는 다른 챔버(14)에서 배양되므로, 각 챔버(12, 14)별로 신경분화 배지를 갈아 주기 편리하다는 이점이 있다.
- [0043] 또한 본 발명은 뉴런의 연구에만 국한 되어 있는 것이 아니라, 어떤 두 가지 것의 비교를 위해서도 사용이 가능하다.
- [0044] 이상의 설명에서 본 발명은 특정의 실시 예와 관련하여 도시 및 설명하였지만, 특허청구범위에 의해 나타난 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 한도 내에서 다양한 개조 및 변화가 가능하다는 것을 당 업계에서 통

상의 지식을 가진 자라면 누구나 쉽게 알 수 있을 것이다.

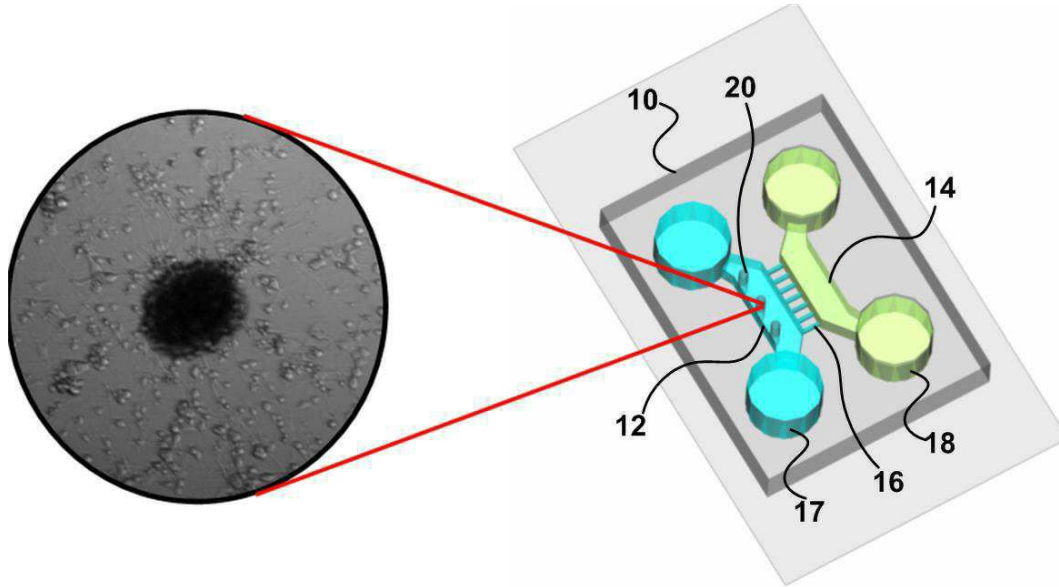
부호의 설명

[0045]

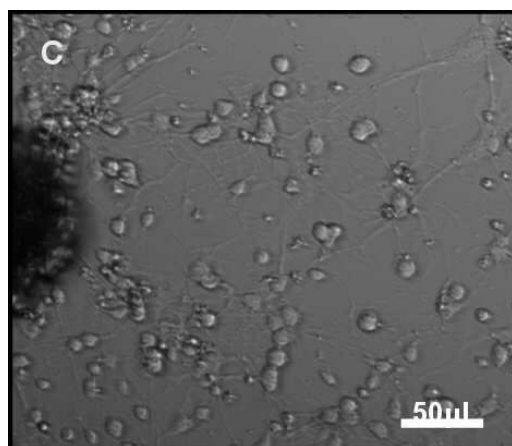
- | | |
|--------------|------------|
| 10; 구분 배양기 | 12; 제1챔버 |
| 14; 제2챔버 | 16; 마이크로채널 |
| 17, 18; 리저비어 | 20; 핀홀 |

도면

도면1



도면2



도면3

