

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2011년 5월 12일 (12.05.2011)

PCT

(10) 국제공개번호  
WO 2011/055899 A2

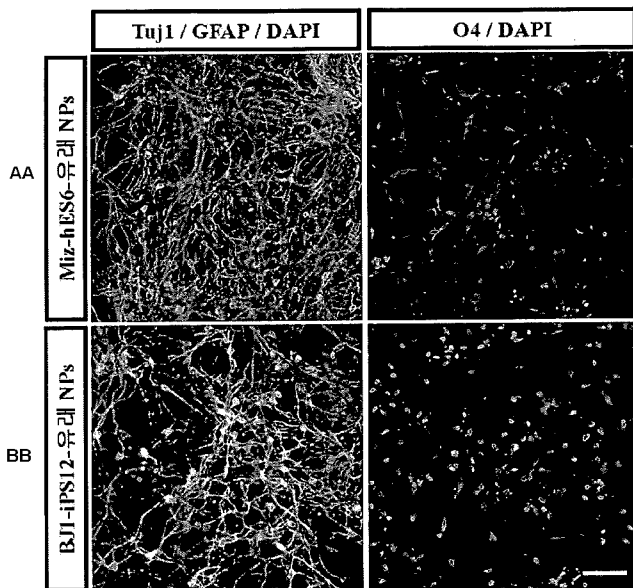
- (51) 국제특허분류: C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)  
C12N 5/07 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/005892
- (22) 국제출원일: 2010년 8월 31일 (31.08.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2009-0107235 2009년 11월 6일 (06.11.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교, 120-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김동욱 (KIM, Dong-Wook) [KR/KR]; 서울특별시 마포구 신수동 450 신촌삼익아파트 102 동 702 호, 121-766 Seoul (KR). 김대성
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: EFFICIENT AND UNIVERSAL METHOD FOR INDUCING THE DIFFERENTIATION OF NERVE CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 발명의 명칭 : 효율적이고 보편적인 전분화능 줄기세포의 신경세포 분화 유도방법

도 8



AA ... Miz-hES6-derived NPs  
BB ... BJ1-iPS12-derived NPs

(57) Abstract: The present invention relates to a method for inducing the differentiation of nerve cells from stem cells. More particularly, the present invention relates to a method for inducing the differentiation of nerve cells from stem cells by suppressing the bone morphogenetic protein signaling pathway and the Activin/Nodal signaling pathway of stem cells. Unrelated to the floating culture and attachment culture methods and others used in the prior art for stem cell differentiation, the method of the present invention is advantageous in that it can efficiently differentiate all stem cells into nerve cells. Also, nerve cells that have been induced to differentiate according to the present invention may be differentiated according to the present invention into specific cells (for example, dopamine nerve cells) or oligodendrocytes, etc., so that the method may be applied in the future to intractable nervous system disorders (such as Parkinson's disease and spinal cord injuries) and provide material forming the basis for the development of novel drugs.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2011/055899 A2



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

본 발명은 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 줄기세포의 골형성 단백질(bone morphogenetic protein) 신호 경로 및 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제하여 줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 유도하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 종래 줄기세포 분화에 사용되었던 부유배양(floating culture) 및 부착배양(attachment culture) 등 방법에 관계없이 모든 줄기세포를 효율적으로 신경전구세포로 분화시킬 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명에 의하여 분화 유도된 신경전구세포는 특정세포(예를 들면, 도파민 신경세포) 또는 올리고덴드로사이트 등으로 고효율로 분화할 수 있으므로, 차후 난치성 신경계 질환(예를 들면, 파킨슨 병이나 척수손상)에 적용할 수 있으며 신약개발에 있어서 기초적인 자료를 제공한다.

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

효율적이고 보편적인 전분화능 줄기세포의 신경세포 분화 유도방법

## 5 【기술 분야】

본 발명은 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 줄기세포의 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein) 신호 경로 및 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제하여 줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 유도하는 방법에  
10 관한 것이다.

## 【배경 기술】

BMP (bone morphogenetic protein)들은 TGF-beta (transforming growth factor-beta) superfamily에 속하는 subfamily이다. TGF-beta  
15 pathway는 척추동물과 무척추동물에서 성장과 분화를 조절하는 다양한 신호전달들에서 중심적인 위치를 차지 한다. TGF-beta family는 크게 두 개의 group으로 나뉜다 하나는 BMP group이며, 다른 하나는 TGF-beta/Activin group이다, BMP는 처음 생체에서 뼈와 연골 형성을 유도하는 단백질로 분리되었으나 곧 이들 BMP들이 척추동물과 무척추동물의 발생  
20 과정 중 형태형성(morphogenesis)의 다양한 조절 역할들을 하는 것이 발견되었다 지금까지 초파리나 C elegans 또는 개구리를 포함한 여러 종에서 30개 이상의 BMP들이 발견되었다(Ducy P *et al*, The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.*;57(6):2207-14(2000)).

BMP들은 뼈와 연골 형성을 유도하는 단백질로 처음 발견되었으나  
25 다양한 BMP들은 신경세포를 포함한 다양한 종류의 세포들에서 생물학적인 활성을 조절하는 역할을 한다. 예를 들면, BMP들은 세포증식과 분화, 세포사멸, 신경외배엽의 형성, 중배엽의 형성, 신경계의 분화, 여러 기관의 발달 (정소, 신장, 소화기관, 폐, 치아), 오른쪽-왼쪽 비대칭성 등에 관여한다(Wozney JM *et al*. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci.*, 106:160-6(1998)).  
30

액티빈/노달(Activin/Nodal; TGF-β superfamily member) 신호 경로는 인간 배아줄기세포 및 마우스 낭배외피(epiblast) 줄기세포에서 전분화능을 유지하는데 필수적이다. 또한, 액티빈/노달 신호 경로는 척추동물 중간엽 발생에 중요한 역할을 한다.

5 줄기세포 (stem cell)란 조직을 구성하는 각 세포로 분화 (differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 특정 분화 자극 (환경)에 의해 특정 세포로 분화가 진행된다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산 (self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation; 10 expansion)하는 특성이 있으며, 또한 분화 자극이 가해지면 특정 세포로 분화되는데 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성 (plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

현재 줄기세포는 세포치료제로서 각광을 받고 있는데, 신경세포의 손상에 의해 유발되는 다양한 신경 질환(neurological diseases)의 15 세포치료제로서도 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 뇌신경계 질환은 다른 어느 질병보다 세포 이식치료에 가장 합당한 대상이라 여겨지는데, 이는 뇌신경계 조직이 다른 조직과는 달리 면역거부 반응이 거의 없어, 외부로부터 세포를 이식하였을 때 이식된 세포의 장기간 생존을 기대할 수 있기 때문이다.

20 이에, 뇌졸중, 알쯔하이머병, 파킨슨병, 탈수초질환 (demyelinating disease) 및 척추손상 (spinal cord injury) 등의 질환 치료에 줄기세포를 적용하려는 시도가 현재 진행 중이다 (Isacon O, Deacon T, *Trends. Neurosci.*, 10:477-482(1997); Studer *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 1:290-295(1998)).

25 한편, 세포 치료제로서의 줄기세포의 유용성을 높이기 위해서는 줄기세포를 효율적으로 특정세포로 분화시키는 기술이 필요하다.

WO 2005/003320은 줄기세포를 신경세포로 분화 유도하는 방법을 개시하고 있으며, 보다 상세하게는 (a) 줄기세포를 염기성 섬유아세포 성장인자로 배양하는 단계; (b) 단계 (a)의 세포를 섬유아세포 성장인자 30 8과 Sonic Hedgehog로 배양하는 단계; (c) 단계 (b)의 세포를 뇌-유래 신경영양 인자로 배양하는 단계; 및 (d) 단계 (c)의 세포를 신경교

성상세포와 공동배양하는 단계를 포함하는 방법을 개시하고 있다. WO 2004/093812는 특정 화학구조식을 갖는 화합물이 배아줄기세포가 신경세포로 분화하는 데 유도제로 작용할 수 있다는 것을 개시하고 있다.

WO 2004/05308은 줄기세포에서 TGF-β 시그널링을 방해하여 도파민성 (dopaminergic) 신경세포를 제조하는 방법을 개시하고 있다.

그러나, 현재까지 모든 줄기세포를 고수율로 특정세포 (특히, 신경세포)로 분화하는 기술은 개발되어 있지 않은 상황이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**【발명의 상세한 설명】**

본 발명자들은 다양한 분화특성을 가진 줄기세포를 고수율로 신경전구세포로 분화 유도시킬 수 있는 효율적인 방법을 발명하고자 노력하였다. 그 결과, 줄기세포로부터 분화된 세포들에서 다른 계열의 세포 및 미분화세포 혼재가능성을 최소화시키고, 이식 시 유발될 수 있는 기형종(teratoma)의 가능성을 줄일 수 있는 신경전구세포로의 분화 유도를 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 줄기세포의 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein: BMP) 신호 경로 및 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제하는 단계; 및 (b) 상기

줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도방법을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 BMP 신호 경로 억제제 및 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로 억제제를 포함하는 줄기세포로부터 5 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

본 발명자들은 줄기세포, 바람직하게는 전분화능 줄기세포를 효율적으로 신경세포로 분화 유도시킬 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였으며, 그 결과, 줄기세포로부터 분화된 세포들에서 다른 계열의 10 세포 및 미분화세포 혼재가능성을 최소화시키고, 이식 시 유발될 수 있는 기형종(teratoma)의 가능성을 줄일 수 있는 신경세포로의 분화 유도를 규명하였다.

본 명세서에서, 용어 “줄기세포 분화 유도”는 줄기세포에서 특정세포로 완전히 분화가 유도된 경우뿐만 아니라 줄기세포에서 15 특정세포로의 완전 분화되기 전 중간 단계에서 형성되는 신경전구체(neural precursor)의 형성도 포함하는 것이다. 즉, 본 발명의 줄기세포 분화 유도 방법은 줄기세포가 특정세포로 완전 분화되는 것을 효과적으로 달성되도록 할 뿐만 아니라 줄기세포에서 신경전구체를 형성시키는 데에도 매우 큰 효율성을 나타낸다. 특히 BMP 신호 경로 억제제 및 20 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제하여 분화시킬 경우 신경전구체를 형성시키기 위한 기술적인 방법의 제한이 없으며 기존의 어떠한 신경전구체 분화법과도 혼용가능하고 또한 그 효율을 높일 수 있다.

본 발명에 의해 분화될 수 있는 줄기세포는 제한이 없으며, 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 갖는 25 세포는 본 발명이 적용될 수 있는 세포이다. 줄기세포는 배아줄기세포, 성체줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포 및 배아중양세포를 포함하며, 바람직하게는 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포이다. 용어 “유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell)”는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 특정 유전자를 삽입하여 인공적으로 유래된 30 전분화능 줄기세포의 하나이다. 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성,

테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일한 것으로 당업계에서 판단되고 있다.

본 발명의 장점 중 하나는 하기의 실시 예에서 입증한 바와 같이, 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포 등 모든 줄기세포에 적용 가능한 만능 분화 프로토콜을 제공한다는 것이다.

본 발명에 따르면, 줄기세포에서 신경세포의 분화를 위하여 BMP 신호 경로 및 액티빈/노달 신호 경로를 억제한다.

BMP 신호 경로를 억제하는 물질은 당업계에 공지되어 있는 다양한 BMP 신호 경로 억제제를 포함한다. 본 명세서 용어 “BMP 신호 경로 억제제”는 바람직하게는, BMP 자체를 억제하거나 또는 BMP가 BMP 수용체에 결합하는 것을 억제하는 물질을 의미한다. 본 발명에서 이용되는 BMP 신호 경로 억제제는, 바람직하게는 도소모르핀(dorsomorphin), Smad6, Smad7, 노긴(Noggin), 코르딘(Chordin), 그렘린(Gremlin), Sog (short gastrulation), 폴리스타틴(Follistatin), DAN(differential screening-selected gene aberrant in neuroblastoma), 세프베루스(Cerberus), 단테(Dante) 및 PRDC(Protein Related to DAN and Cerberus)를 포함한다. 보다 바람직하게는 상기 BMP 신호 경로 억제제는 도소모르핀, 노긴, 코르딘 또는 그렘린이며, 보다 더 바람직하게는 도소모르핀 또는 노긴이고, 가장 바람직하게는 도소모르핀이다.

본 발명에서 줄기세포에서의 골 형성 단백질 신호 경로를 억제하기 위하여 첨가되는 도소모르핀의 농도는 1-20  $\mu\text{M}$ 이 바람직하며, 보다 바람직하게는 3-10  $\mu\text{M}$ 이고, 가장 바람직하게는 4-6  $\mu\text{M}$ 이다.

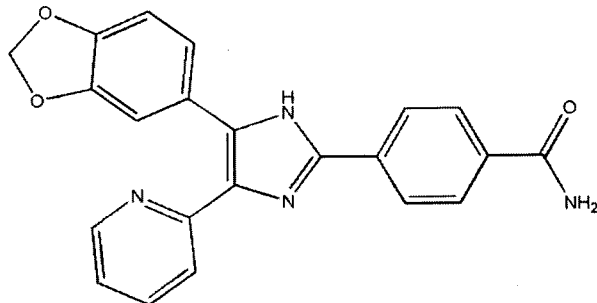
액티빈/노달 신호 경로를 억제하는 물질은 당업계에 공지되어 있는 다양한 액티빈/노달 신호 경로 억제제를 포함한다. 본 명세서 용어 “액티빈/노달 신호 경로”는 액티빈 신호 경로 및/또는 노달 신호 경로를 의미한다. 본 명세서 용어 “액티빈/노달 신호 경로 억제제”는 바람직하게는, 액티빈/노달 자체를 억제하거나 또는 액티빈/노달이 그의 수용체에 결합하는 것을 억제하는 물질을 의미한다. 본 발명에서 이용되는 액티빈/노달 신호 경로 억제제는, 바람직하게는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2-일)-벤즈아미드[4-(5-

Benzo[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide), Smad6, Smad7 및 폴리스타틴(Follistatin)에서 선택되는 억제제를 이용하여 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제한다. 보다 바람직하게는 상기 억제제는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드 또는 Smad7이며, 가장 바람직하게는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드와 같은 단백질이 아닌 저분자 화합물이며, 이 물질은 당업계에서 SB431542로 알려져 있다. 단백질 처리 보다는 상기의 저분자 화합물의 처리가 더 효과적이다.

10 본 발명에서 줄기세포의 액티빈/노달 신호 경로를 억제하기 위하여 첨가되는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드의 농도는 1-50 μM이 바람직하며, 보다 바람직하게는 5-30 μM이고, 보다 더 바람직하게는 8-20 μM이며, 가장 바람직하게는 9-11 μM이다.

15 상기 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드는 다음과 같은 화학식 1로 표시할 수 있다:

화학식 1



20 본 발명의 상세한 설명에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 SB431542과 혼용하여 사용된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 줄기세포의 BMP 신호 경로 및 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제시키는 단계는 줄기세포를 배양하여 배아체를 형성하는 과정 또는 형성된 배아체를 배양하는 과정에서 실시되며 상기 단계 (a)에 의해 신경외배엽이 증가된 배아체가 형성되는 단계를 추가적으로 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 줄기세포를 배양하는 단계는 (b-1) 신경외배엽이 증가된 배아체를 bFGF(basic fibroblast growth factor)의 존재 하에서 배양하여 신경전구세포를 증식시키는 단계; (b-2) 상기 신경전구세포를 소닉 헤지혹(Shh) 및 FGF8(Fibroblast growth factor 8)의 존재 하에서 배양하여 도파민 전구세포로 유도시키는 단계; 및 (b-3) 상기 도파민 전구세포를 신경아교세포 유래 신경영양인자(glial derived neurotrophic growth factor: GDNF), 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor: BDNF) 및 아스코르빈산(ascorbic acid; Sigma)의 존재 하에서 배양하여 도파민 신경세포를 형성시키는 단계를 추가적으로 포함한다.

상기 신경전구세포를 증식시키는 단계에서 첨가하는 bFGF의 농도는 5-100 ng/ml이 바람직하며, 보다 바람직하게는 10-50 ng/ml이고, 보다 더 바람직하게는 15-30 ng/ml이며, 가장 바람직하게는 19-21 ng/ml이다.

상기 도파민 전구세포를 증식시키는 단계에서 첨가하는 소닉 헤지혹의 농도는 50-500 ng/ml이 바람직하며, 보다 바람직하게는 100-300 ng/ml이고, 보다 더 바람직하게는 150-250 ng/ml이며, 가장 바람직하게는 190-210 ng/ml이다.

상기 도파민 전구세포를 증식시키는 단계에서 첨가하는 FGF8의 농도는 10-300 ng/ml이 바람직하며, 보다 바람직하게는 50-100 ng/ml이고, 보다 더 바람직하게는 80-150 ng/ml이며, 가장 바람직하게는 90-110 ng/ml이다.

상기 도파민 신경세포를 형성시키는 단계에서 첨가하는 BDNF의 농도는 5-100 ng/ml이 바람직하며, 보다 바람직하게는 10-80 ng/ml이고, 보다 더 바람직하게는 15-50 ng/ml이며, 가장 바람직하게는 19-21 ng/ml이다.

상기 도파민 신경세포를 형성시키는 단계에서 첨가하는 GDNF의 농도는 5-100 ng/ml이 바람직하며, 보다 바람직하게는 10-80 ng/ml이고, 보다 더 바람직하게는 15-50 ng/ml이며, 가장 바람직하게는 19-21 ng/ml이다.

또한, 상기 도파민 신경세포를 형성시키는 단계에서 첨가하는 아스코르빈산의 농도는 50-500  $\mu$ M이 바람직하며, 보다 바람직하게는 100-

300  $\mu$ M이고, 보다 더 바람직하게는 150-250  $\mu$ M이며, 가장 바람직하게는 190-210  $\mu$ M이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명을 이용하여 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 경우에는 도소모르핀 및 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드를 처리 하지 아니한 줄기세포보다 SoX1, Pax6 및 Nestin이 고발현 된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법을 이용하여 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 경우에는 도소모르핀 및 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드를 처리하지 아니한 줄기세포보다 Id1, Id3, GCM1 및 GATA2가 저발현 된다.

본 발명에 따르면, 다양한 줄기세포(예컨대, 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포)를 비슷한 수준의 도파민 신경세포까지 분화시켜 얻을 수 있다.

본 발명에 의해 수득한 신경세포는 특히 신경 퇴행성 질환, 예컨대 알츠하이머병, 헌팅톤 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증에 적용되어 이들 질환을 치료할 수 있다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도방법 및 분화 유도용 조성물을 제공한다.

(ii) 본 발명은 종래 줄기세포 분화에 사용되었던 부유배양(floating culture) 및 부착배양(attachment culture)등 방법에 관계없이 모든 줄기세포를 효율적으로 신경전구세포로 분화시킬 수 있는 장점이 있다.

(iii) 또한, 본 발명에 의하여 분화 유도된 신경전구세포는 특정세포(예를 들면, 도파민 신경세포) 또는 올리고덴드로사이트등으로 고효율로 분화할 수 있으므로, 차후 난치성 신경계 질환(예를 들면, 파킨슨 병이나 척수손상)에 적용할 수 있으며 신약개발에 있어서 기초적인 자료를 제공한다.

30 **【도면의 간단한 설명】**

도 1a-1d는 자발적 분화 과정을 거친 후 10일째에 6개의 hESC

세포주(H9, Miz-hES4, Miz-hES6, SNU-hES3, SNU-hES16, CHA-hES3)와 3개의 인간 iPSC 세포주(BJ1-iPS12, MSC-iPS2-3, dh1f-iPS2-2)의 분화 경향을 pRT-PCR을 이용하여 조사한 결과이다. 도 1a는 신경외배엽의 Sox1과 Pax6의 발현수준을 나타낸 것이며, 도 1b는 중배엽의 Brachyury와 Cerberus의 발현수준을 나타낸 것이고, 도 1c는 내배엽의 AFP와 GATA4의 발현 수준을 나타낸 것이며, 도 1d는 미분화 마커인 Oct4와 Nanog의 발현을 나타낸 것이다. y축은 테스트한 세포주에서 각 유전자의 상대적 발현을 평균± 표준오차로 나타낸 것이다(기준을 임의적으로 1로 지정). 상기 세포주들을 One-Way ANOVA(변화 분석)으로 다중 비교하여 통계적 유의성을 평가하였다. 타입 I 오차율을 줄이기 위하여 사후 분석(Post Hoc)으로 본페로니 보정법(Bonferroni correction)을 적용하였다(Miz6, Miz-hES6; Miz4, Miz-hES4; SNU3, SNU-hES3; SNU16, SNU-hES16; CHA3, CHA-hES3; BJ1-12, BJ1-iPS12; MSC2-3, MSC-iPS2-3; dh1f2-2, dh1f-iPS2-2).

도 2a-2b는 내재성 BMP 신호 흐름을 효과적으로 억제시키는 DM을 줄기세포에 처리하여 신경세포로의 분화를 감소시킨 결과이다. DM 존재 또는 부존재 하에서 자발적인 EB 분화 후 4일째에 각 마커의 mRNA 를 pRT-PCR을 이용하여 정량화하였다. 도 2a는 용량-의존 방식으로 DM을 처리에 의하여 BMP 신호 활성의 표시자인 Id1과 Id3 유전자의 발현이 감소된 것을 나타낸 결과이다(0.1-5  $\mu$ M). 양성대조군은 Noggin 1  $\mu$ g/ml을 사용하였다. 도 2b는 용량-의존 방식으로 DM을 처리에 의하여 신경외배엽 마커인 Pax6와 Nestin의 발현이 증가한 것을 나타낸 결과이다. 그래프에서 y축은 DMSO(dimethyl sulfoxide) 처리와 비교하여 DM 또는 Noggin을 처리한 후의 각 유전자의 상대적인 발현을 나타낸 것이다. DM은 도소모르핀을 의미하고, NOG는 노긴(noggin)을 의미한다(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ANOVA 테스트).

도 3은 hESCs의 BMP와 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 이중으로 억제시켜 hESCs가 영양포(trophoblast)로 분화하는 것을 억제시킨 결과이다. EBs을 DM (5  $\mu$ M)과 SB431542(5-10  $\mu$ M)로 처리 또는 비처리 한 후 10일 동안 배양하였으며, 2개의 대표적인 영양포 마커인 GATA2와 GCM1의 발현을 qRT-PCR을 이용하여 검출하였다.

도 4a-4c는 BMP와 액티빈/노달 신호의 이중 억제가 유도 신경세포

분화 공정과 함께 신경 계통으로의 분화를 더욱 촉진시킨 결과를 나타낸 것이다. DM과 SB431542으로 처리 또는 미처리 한 후 4일간 배양된 EBs는 배양 디쉬에 접착이 되었으며 추가적으로 6일간 신경 유도 배지(20 ng/ml bFGF가 첨가된 N2 배지)에서 성장시켰다. H9와 Miz-hES6는 약 90%의 신경 로제트 구조(화살표 머리부분)를 가진 많은 콜로니로 발달하였다(도 1a-1b). 반면, Miz-hES4, BJ1-iPS12 및 MSC-iPS2-3 세포들로부터 발생한 2.6-25.5%의 콜로니들은 다양한 비-신경세포 형태 이지만 신경 로제트 구조를 나타내었다. 이러한 결과들은 자발적 분화뿐 만 아니라 유도 분화 프로토콜을 사용한 후에도 hPSCs들의 분화 경향이 여전히 존재한다는 것을 의미한다(도 4a의 상위 대조군). 그러나, 놀랍게도, 4일간 EBs에 처리하였던 DM과 SB431542는 실험에 이용된 세포로부터 대부분의 콜로니에 효율적 및 동일한 신경 로제트 형성을 유도하였다(도 4a의 하위 패널). 항-Nestin(그린)과 항-Sox1 (레드) 항체로 신경 로제트 구조를 염색하였다(도 4a에 삽입). 도 4b는 DM와 SB431542의 처리 또는 비처리하에서 5개의 hPSC 세포주의 신경 분화 후 신경 로제트 구조를 가진 콜로니의 퍼센트를 나타낸 결과이다. 도 4c는 DMSO를 처리한 세포와 비교하여 유도 분화 공정시 DM와 SB431542로 처리한 Miz-hES4, BJ1-iPS12와 MSC-iPS2-3에서 신경외배엽 마커인 Sox1, Pax6 및 Nestin가 유의적으로 증가한 것을 qRT-PCR를 이용하여 나타낸 결과이다. 이와 반대로, 내배엽, 중배엽, 영양포 및 미분화 마커들의 발현은 DMSO를 처리한 세포들과 비교하여 감소되었다. DMSO로 처리한 그룹에 DM와 SB431542를 처리한 그룹에서 발현된 유전자의 상대적인 배율 증가를 로그지표상에 나타내었다. 적어도 3번 이상 모든 실험을 반복하였다(Scale bar: 20  $\mu$ m).

도 5a-5c는 BMP와 액티빈/노달 경로의 억제에 의하여 생산된 NPs로부터 DA 뉴런의 효과적인 분화를 나타낸 결과이다. 도 5a는 본 연구에서 이용한 도파민성 신경 분화 프로토콜의 대략도를 나타낸 것이다. 도 5b는 대조군과 비교한 경우, DM과 SB431542의 처리에 의하여 Tuj1- 및 TH-양성 뉴런(도파민을 합성하는 효소인 티로신 하이드록실라아제를 발현하는 뉴런)이 상당히 증가된 양상을 면역세포화학 분석을 통하여 나타낸 이미지이다. 도 5c는 DMSO를 처리한 세포(3번의 실험으로부터 계산된 총 9,233개의 세포의  $2.6 \pm 0.5\%$ )와 비교하여 DM과 SB431542로

5 처리한 MSC-Y2-3-iPS 세포(3번의 독립적인 실험으로부터 계산된 총 17,711개의 세포 중  $50.7 \pm 2.2\%$ )로부터 뉴런(Tuj1 발현) 수의 증가를 나타낸 결과이다. Tuj1-양성 세포들의 상당한 부분( $49.5 \pm 6.8\%$ )은 TH<sup>+</sup> 뉴런이다. TH<sup>+</sup> 신경세포들은 DMSO로 처리된 대조군 그룹에서 거의  
5 검출되지 않았다(\*\*  $p < 0.01$ , Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ).

도 6a-6d는 BMP과 액티빈/노달 신호 경로의 조절에 의하여 hESCs (H9)의 신경외배엽 계통으로의 분화 하는 것을 나타낸 결과이다. 도 6a는 EB 배지에 DM을 첨가한 후 10일간 배양한 경우 신경외배엽 마커(Sox1과 nestin)의 발현은 증가한 반면, 중배엽(Brachyury과 Cerberus),  
10 내배엽(GATA4와 AFP) 및 미분화 마커(Oct4와 Nanog)들은 억제된 결과를 나타낸 것이다. 도 6b는 미분화된 세포(Oct4-과 SSEA4-의 이중 양성) 및 내배엽 세포(AFP-양성; 레드 화살표 머리)가 10일간 5  $\mu\text{M}$  DM을 처리한 EBs의 부분에서 검출된 결과를 면역세포화학 분석을 통하여 나타낸 것이다. 도 6c는 동시에 DM과 SB431542를 10일간 처리한 경우 신경 마커의 발현이  
15 더욱 촉진되는 것을 나타낸 결과이다. 이와 반대로, 다른 계통 및 미분화 마커들의 발현은 현저히 감소되었다. 도 6d는 DMSO로 처리한 EBs와 비교하여 DM과 SB431542로 처리한 EBs에서 Pax6과 Nestin의 발현이 증가되는 것을 확인한 면역세포화학 분석 결과이다. 도 6a와 도 6c의 그래프에서 y축은 각각의 3번 실험에서 화학처리 및 대조군 샘플에서  
20 유전자 발현에 있어 증가 배율(fold change)을 나타낸 것이다. DM은 dorsomorphin을 의미하며 SB는 SB431542를 의미한다. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

도 7a-7b는 유도 분화 경향을 가진 다양한 hPSC 세포주에 BMP와 액티빈/노달 신호 경로를 동시에 억제하여 신경세포 분화를 유도시킨 결과를 나타낸 것이다. 도 7a는 hPSC 세포주에 DM과 SB431542를 처리한  
25 경우 신경외배엽 마커의 발현이 매우 증가된 반면, 중배엽/내배엽 및 미분화 마커의 발현은 유의적으로 감소된 결과를 나타낸 것이다. 로그 지표에서 y축은 작은 분자로 처리한 세포 및 DMSO를 처리한 세포에서 유전자 발현의 상대적 증가 배율을 평균  $\pm$  표준오차로 나타낸 것이다(기준을 1로 임의적으로 지정). 도 7b는 4개의 hPSC 세포주(H9,  
30 Miz-hES4, BJ1-iPS12, MSCiPS2-3)로부터 EB 구획을 항-Nestin 항체로 면역 염색하여 나타낸 것이다. DM은 dorsomorphin을 의미하며 SB는 SB431542를

의미한다. Scale bar: 100  $\mu$ m.

도 8은 인간배아줄기세포 (Miz-hES6)와 인간 역분화줄기세포 (BJ1-iPS12)로부터 각각 BMP 및 액티빈(Activin/Nodal) 신호조절을 통하여 신경전구세포를 수득하고 이로부터 신경세포(Tuj1), 신경교세포 (GFAP) 및 회소돌기아교세포(올리고덴드로사이트, 04)가 분화되었음을 확인한 결과이다(Scale bar : 25  $\mu$ m).

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

**【실시예】**

15 **재료 및 방법**

*인간 줄기세포(hESC) 및 인간 유도만능세포(iPSC) 배양*

총 6개의 인간 줄기 세포주 H9 (P31-45, WiCell Inc, Madison, Wisconsin, 미국), Miz-hES4 (P67-75), Miz-hES6 (P34-45) (미즈메디 병원, 대한민국), CHA-hES3 (P88-93, 차 병원, 대한민국) 및 SNU-hES3 (P30-36) 및 SNU-hES16 (P71-76)(서울대학교 병원, 대한민국)을 20% KSR (Knockout Serum Replacement; Invitrogen, Carlsbad, 미국), 1 x 비필수 아미노산(Invitrogen, 미국), 0.1 mM 베타-머캅토에탄올(Sigma, St. Louis, MO, 미국) 및 4 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor; Invitrogen, 미국)가 첨가된 DMEM-F12 배지에서 배양하였다. STO (ATCC, Manassas, VA, 미국) 피더 세포층에서 배양시킨 SNU-hES3 (P30-36)와 SNU-hES16 세포주를 제외하고, 대부분의 hESC주들을 유사분열적으로 정지된 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts: MEFs, MCTT사, 서울, 한국)층에서 성장시켰다. 5-7일 동안 매일 공지된 계대배양 방법<sup>1</sup>에 의하여 hESC 콜로니들은 신선한 피더 층에 옮겼다. 또한, 3개의 인간 유도만능세포주(iPSCs), 즉 dh1f-iPS2-2, MSC-iPS2-3 및 BJ1-iPS12<sup>2</sup> 세포주를 상기 hESC와 동일한 배지 구성을 가진 배지에서 배양하였다(위

3종의 인간 유도만능세포주는 하버드대학의 George Q. Daley박사에 의해 분양받았으며 그에 대한 참고문헌은 다음과 같음; *Nature*. 2008 Jan 10;451(7175):141-6, *Nat Protoc*. 2008;3(7):1180-6).

5 *인간 전분화능 줄기세포의 자발적 분화*

30분 동안 IV형 콜라게나아제(Invitrogen, 미국)를 2 mg/ml로 처리한 후 피더 세포층으로부터 hESCs 및 인간 iPSCs 콜로니를 분리시켜 배아체(embryoid bodies: EB) 형성을 하도록 하였으며, 당업계에서 통상적으로 사용하는 bFGF가 없는 ESC 배양 배지가 포함된 페트리 디쉬로 이동시켰다. EB를 형성시키는 동안, DM(dorsomorphin; Sigma, 미국) 및 SB431542 (Calbiochem, San Diego, CA, 미국)의 다양한 농도를 배지에 첨가하였으며, 약 10일 동안 2일에 한번 배지를 교환하였다. qRT-PCT 및 면역세포화학을 통하여 마커들의 발현을 분석하였다.

15 *인간 전분화능 줄기세포의 DA(Dopaminergic) 뉴런으로의 분화*

10일 간의 자발적인 분화 후, NPs (neural precursors)로의 진행을 위하여 8-10일 동안 bFGF 20 ng/ml이 첨가된 N2 배지((DMEM-F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 및 1 x N2 (Invitrogen))에서 EBs를 추가적으로 배양하였으며, 진행 과정 동안 2일에 한번 배지를 교환하였다. 파이펫으로 부드럽게 파이펫팅하여 NPs를 날개로 분리시켰으며, 그 다음  $0.5-2 \times 10^6$  세포수/cm<sup>2</sup>의 밀도로 매트리지젤(Matrigel)로 코팅된 플레이트에 씨딩하였다. 200-500 ng/ml 소닉 헤지혹(Shh; R&D Systems, Minneapolis, MN, 미국) 및 100 ng/ml FGF8(Fibroblast growth factor 8; R&D Systems)이 보충된 N2 배지에서 8일간 DA(dopamine) 전구세포를 발생시켰다. 완전히 성숙된 DA 뉴런을 발생시키기 위하여 1 x N2, 20 ng/ml 신경아교세포 유래 신경영양인자(glial derived neurotrophic growth factor: GDNF; R&D Systems), 20 ng/ml 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor: BDNF; R&D Systems), 및 200  $\mu$ M 아스코르빈산(ascorbic acid; Sigma)이 보충된 DMEM-F12 배지 또는 뉴로바살 배지(Neurobasal media; Invitrogen)에서 DA 전구세포를 배양하였다.

### 인간 전분화능 줄기세포의 신경 세포 분화 유도

공지된 방법<sup>3</sup>을 부분 수정하여 인간 전분화능 줄기세포의 신경세포로의 분화시켰다. 즉, 5  $\mu$ M DM과 10  $\mu$ M SB431542의 존재 또는 부재하에서 EBs를 4일간 배양하였으며, 그 다음 20 ng/ml bFGF가 보충된 N2 배지가 들어 있는 매트릭젤-코팅 디쉬 상에서 6일간 추가적으로 배양하였다. 그 다음, 콜로니 카운팅, 면역세포화학 및 qRT-PCR을 이용하여 샘플을 분석하였다.

### 10 면역염색 및 정량 분석

10분간 4% 파라-포름알데히드-PBS를 이용하여 세포들을 고정시켰다. 또한, EBs를 같은 고정액으로 고정시켰고, 20% 수크로오스(sucrose)를 첨가하여 동결을 방지하였으며, O.C.T. 콤파운드(Tissue Tek, Torrance, CA, 미국)에서 동결한 후, 크리오스타트(cryostat)를 이용하여 10  $\mu$ m 두께로 구획하였다. 1구획 당 0.01% 트리톤 X-100/PBS(세포내 마커)으로 처리하고, 실온에서 1시간 동안 5% 당나귀 혈청(Calbiochem, CA, 미국)으로 블로킹 후 4°C에서 일차 항체로 하룻밤 반응시켰다. 본 연구에서 이용한 일차항체는 다음과 같다: Oct4 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, 미국); SSEA4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology); Sox1 (1:200, Millipore, Billerica, MA, 미국); Pax6 (1:200, DSHB, Iowa, IA, 미국), Nestin (1:1000, Millipore);  $\alpha$ -페토프로틴( $\alpha$ -fetoprotein: AFP) (1:100, Santa Cruz Biotechnology); Tuj1 (1:1000, Covance, Berkeley, CA, 미국); GFAP (1:300, Millipore), O4 (1:200, R&D systems), 및 티로신 하이드록실라아제(tyrosine hydroxylase: TH) (1:500, Millipore or 1:300, Pelfreez, Rogers, AR, 미국). 일차 항체 인큐베이션 후, 결합시킨 일차 항체를 검출하기 위하여 형광(Alexa-Fluor 또는 594)-결합 2차 항체(Molecular Probes, Eugene, OR, 미국)를 이용하였다. 핵을 검출하기 위하여 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector, Burlingame, CA, 미국)를 가해 주었다. 올림푸스 IX71 현미경과 DP71 디지털 카메라로 세포이미지를 관찰하였으며, 이미지-프로 플러스 ver 5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, 미국)로 분석하였다. 면역표지된 세포

또는 서로 다른 3개의 실험에서의 콜로니를 카운팅하여 정량적 평가를 실시하였다. 평균± 표준오차로 값을 표현하였다. 통계적 유의성은 스튜던트 *t*-테스트 또는 SPSS 소프트웨어 버전 12.0을 이용하는 One-Way ANOVA 테스트를 이용하였다.

5

*qRT-PCR(Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)*  
 및 데이터 분석

제조사에 따라 이지-스핀 토탈 RNA 정제 키트 (iNtRON Biotechnology, Seoul, 대한민국)을 이용하여 세포내 존재하는 총 RNAs를  
 10 추출한 후, 파워 cDNA 합성 키트(iNtRON Biotechnology)를 이용하여 1 µg RNAs를 역전사시켰다. SYBR Premix Ex Taq TM (Takara Bio Inc, Shiga, 일본)를 이용하여 qRT-PCR를 실시하였으며 MyiQ 또는 CFX96 리얼-타임 시스템 (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)를 이용하여 반응시켰다. qRT-PCR의 조건은 다음과 같다: 95°C 1분(1 단계), 95°C 20초, 63°C 20초 및  
 15 72°C 20초를 1사이클로 하여 총 40 사이클(cycles)(2단계), 72°C 1분 최종 익스텐션(3단계). 특이적 마커 유전자들의 발현 값(Ct values)을 구하였고 β-액틴 값으로 표준화하였다. 그 다음 ΔΔCt 방법<sup>4</sup>으로 표준화된 마커들의 발현 수준을 화학적-처리된 샘플 및 로딩 대조군 샘플과 비교하였다. 적어도 3회 이상의 독립적인 실험을 하여 모든 데이터를  
 20 최종 확인하였으며, 프라이서 서열은 표 1에 나타내었다.

**【표 1】**

| 유전자                 | 프라이머 염기서열 |                                     |
|---------------------|-----------|-------------------------------------|
| Id-1 <sup>20</sup>  | 정방향       | ggtgctgtctgtctgag(서열번호 1)           |
|                     | 역방향       | ctgatctgccgttgagg(서열번호 2)           |
| Id-3 <sup>20</sup>  | 정방향       | ctggacgacatgaaccactg(서열번호 3)        |
|                     | 역방향       | gtagtcgatgacgcgctgta(서열번호 4)        |
| Sox1                | 정방향       | gagattcatctcaggattgagattcta(서열번호 5) |
|                     | 역방향       | ggcctactgtaatcttttctccac(서열번호 6)    |
| Pax6                | 정방향       | gcggaagctgcaaagaaata(서열번호 7)        |
|                     | 역방향       | tttgctgctagtctttctcg(서열번호 8)        |
| Nestin              | 정방향       | tgcgggctactgaaaagttc(서열번호 9)        |
|                     | 역방향       | aggctgaggacatcttgag(서열번호 10)        |
| Brachyury           | 정방향       | aggtaccaaccctgagga(서열번호 11)         |
|                     | 역방향       | gcaggtgagttgtcagaataggt(서열번호 12)    |
| Cerberus            | 정방향       | acagtgcccttcagccagact(서열번호 13)      |
|                     | 역방향       | acaactacttttcacagccttcgt(서열번호 14)   |
| AFP <sup>21</sup>   | 정방향       | tgcaaacgatgaagcaagag(서열번호 15)       |
|                     | 역방향       | aacaggcctgagaaatctgc(서열번호 16)       |
| GATA4               | 정방향       | gtcatctcactacgggcaca(서열번호 17)       |
|                     | 역방향       | cttcagggccgagaggac(서열번호 18)         |
| Sox17               | 정방향       | ggcgagcagaatccaga(서열번호 19)          |
|                     | 역방향       | ccacgacttgcccagcat(서열번호 20)         |
| GCM1 <sup>22</sup>  | 정방향       | ctctgagctcatcccttgcc(서열번호 21)       |
|                     | 역방향       | tggacgccttcctggaaagac(서열번호 22)      |
| GATA2 <sup>22</sup> | 정방향       | agaacggaccactcatcaagcc(서열번호 23)     |
|                     | 역방향       | tgctcttcttgacttggtgac(서열번호 24)      |
| Oct4                | 정방향       | tggctcgagaagatgtg(서열번호 25)          |
|                     | 역방향       | gcatagtcgctgcttgatcg(서열번호 26)       |
| Nanog               | 정방향       | ccaacatcctgaacctcagc(서열번호 27)       |
|                     | 역방향       | gctattcttcggccagttgt(서열번호 28)       |
| β-actin             | 정방향       | gctctttccagccttcctt(서열번호 29)        |
|                     | 역방향       | cttctgcatcctgtcagcaa(서열번호 30)       |

상기 위첨자는 본 실시예에 포함된 참조문헌을 의미한다.

## 결과

인간 전분화능 줄기세포(예를 들면, hESCs와 인간 iPSCs)가 특정 세포 타입으로 효율적으로 분화할 수 있는 능력이 줄기세포를 치료에 응용하기 위한 전제 조건이다. 최근 보고서에서는 인간배아줄기 세포주가 특정한 세포 계통으로 분화하는 경향을 가지고 있다고 보고하였다<sup>5</sup>. 또한, 본 연구자들은 4개의 기관으로부터 수립된 6개의 hESC에서 분화 경향의 유의적인 차이점을 발견할 수 있었으며, 다른 종류의 체세포로부터 유래된 3개 인간 유도만능세포가 특정 세포 계통으로 분화할 수 있는 잠재성을 유지하고 있다는 것을 추가적으로 알 수 있었다(도 1). 이러한 분화 내재적 경향성이 존재한다는 것은 원하는 세포 계통으로 분화시키는데 있어 음성적으로 영향을 미치므로, 세포치료법으로의 응용에 있어 적합한 세포주를 선택하기 위하여 모든 hESC와 iPSC들의 분화 경향에 대한 조사가 필요하였다. 이를 위한 스크린 공정은 노력, 시간 및 비용이 많이 소요되므로, 원래 가지고 있던 분화 경향과 상관없이 모든 hPSC들을 특정 세포 계통으로 분화 유도할 수 있는 방법이 있다면 매우 큰 도움이 될 것이다. 예비 연구 실험으로, 본 연구자들은 다양한 분화 경향을 가지고 있는 모든 hPSC들을 신경 계통(예를 들면, 신경 전구세포(NPs)의 형성)으로 분화시키는 보편적인 프로토콜을 확립하고자 하였다. 본 연구자들은 신경 분화를 시키는데 있어 폭 넓게 적용할 수 있는 프로토콜을 제작하기 위하여 저분자 화합물들을 이용해 배아발생 과정 중 신경 유도가 밀접하게 관련되어 있는 신경 경로들(signaling pathways)을 조작하는 것을 계획하였다.

우선, 신경 분화를 유도시키기 위하여 H9 hESC 콜로니를 효소처리법에 의해 배아체(EBs)를 형성시켜 부유 배양하였다. 일반적으로, 분화 효율성 변화가 각각의 hESC들의 분화 경향에 따라 좌우된다 하더라도, 어떠한 계통-유도 성장 인자도 포함되어 있지 않은 자발적인 분화 조건하에서 배양된 EBs는 낮은 신경 분화 효율성을 갖는다. 다른 세포 계통으로의 분화가 아닌 신경 세포로만의 분화를 촉진시키기 위하여, 초기 EB 형성기간 동안 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein: BMP) 신호 경로를 억제하였다. BMP 신호 억제는 초기 배아 발달기간 동안 신경 유도에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>6,7</sup> BMP 신호 억제를 위해

기존의 연구자들은 폴리펩타이드 BMP 억제자인 노긴(noggin)을 주로 사용하였는데, 본 연구자들은 이 물질 대신에 저분자 화합물들이 EBs<sup>9</sup> 안으로 보다 쉽게 접근할 수 있고 세포 신호전달을 효과적으로 조절할 수 있다는 점에 착안해 저분자 화합물 형태의 선택적 BMP 길항제<sup>8</sup> DM(dorsomorphin: 도소모르핀)을 사용하였다. 우선 용량-의존 방식으로 DM (0.1-5  $\mu$ M)을 4일 투여된 EBs에서 BMP 신호 활성 표시자인 Id1과 Id3 유전자의 발현 수준이 감소되는 것을 통하여 DM의 효과를 검증하였다(도 2a). 그 다음, DM-처리가 용량-의존적으로 분화하는 EBs에서 Pax6과 Nestin과 같은 신경 마커의 발현을 증가시키고, DM 처리에 의한 BMP 신호 경로 억제가 H9 hESCs의 신경 계통으로의 분화를 촉진시킨다는 것을 확인하였다(도 2b).

BMP 경로 억제가 신경세포 분화를 충분히 유도시킴과 동시에 다른 계통으로의 분화를 감소시키는지 조사하기 위하여, hESCs의 분화 운명의 변화에 있어서 DM 효과를 보다 면밀히 검증하였다. 10일 동안 DM(1 및 5  $\mu$ M)이 포함된 자발적 분화 배지에서 EBs를 배양하였으며, 미분화된 hESCs 뿐만 아니라 3배엽층의 대표적인 마커들의 발현을 정량적 qRT-PCR(quantitative RT-PCR: qRT-PCR) 및 면역세포화학 방법을 이용하여 확인하였다(도 1a-1b). EB 형성시 DM을 처리하는 경우 용량-의존적으로 신경세포 마커(Sox1 및 Nestin)의 발현을 유의적으로 증가시킨 반면, 중배엽(Brachyury 및 Cerberus), 내배엽(alpha-fetoprotein (AFP) 및 GATA4) 및 미분화된 hESCs (Oct4 and Nanog) 마커들의 발현은 감소되었다(도 1a). 그러나, 내배엽(예를 들면, AFP)과 미분화세포 마커들(예를 들면, Oct4 및 SSEA4)은 여전히 검출되었다(도 1b). 이러한 결과들은 BMP 경로의 억제만으로는 내배엽, 중간엽 및 잔여 미분화된 세포가 최소로 포함된 순수(pure) 신경 세포군을 높게 생산할 수 없다는 것을 의미한다. 이를 토대로 하여, 본 연구자들은 hESCs의 신경 계통으로의 분화를 보다 촉진시킬 수 있는 추가적인 신호 경로 억제방법에 대하여 연구하였다. 액티빈/노달(Activin/Nodal) 경로는 내배엽 및 중간엽 분화 유도에 의한 초기 배아 발달 과정에서 중추적인 역할을 하며<sup>10</sup>, 반면 신경외배엽 계통으로의 분화는 억제시키는 것으로 알려져 있다.<sup>11,12</sup> 또한, 최근에 액티빈/노달 신호가 hESC의 줄기성(stemness)을 유지시키는데

중요한 역할을 한다고 보고되었다.<sup>13,14</sup> 그러므로, 본 연구자들은 액티빈/노달 신호의 억제가 다른 계통 및 미분화된 세포로 분화시키는 것을 감소시키면서 hESCs을 신경외배엽으로 분화시키는데 보다 유리하게 작용할 것이라고 추정하였다.

5 이러한 메커니즘을 기초로 하여, BMP 경로의 억제뿐 만 아니라 액티빈/노달 신호의 억제를 동반하는 것이 원하지 않은 세포로 분화하는 것을 최소화 시키면서 신경 세포로 분화 유도 할 수 있는지를 테스트 하였다. 액티빈/노달 신호 전달의 특이적 억제자인 SB431542(5 또는 10  $\mu$ M)와 DM (5  $\mu$ M)을 포함하는 자발적 분화 배지에 EBs를 배양하는 경우,  
 10 신경세포 마커(Sox1, Pax6 및 Nestin)의 발현이 유의적으로 증가한 반면, 내배엽(AFP and GATA4)과 중배엽(Brachyury 및 Cerberus) 마커들은 주목할 만큼 감소되었다(도 1c). 무엇보다 중요한 것은, 미분화된 전분화능 세포에 대한 마커들(Oct4 및 Nanog)이 매우 감소되었다는 것이다(도 1c). 또한, 본 실험에서는 신경세포의 증가를 면역세포화학으로 동정하였다(도  
 15 1d).

BMP 경로를 억제(DM 처리) 또는 BMP 및 액티빈/노달 경로를 억제(DM+SM431542 처리)시킴으로써 영양포(trophoblast) 마커들(GATA2와 GCM1)의 발현이 감소되었다(도 3). 이러한 결과는 BMP 경로가 활성화일  
 20 때만 액티빈/노달 경로가 hESCs가 영양포로 분화를 이끈다고 보고된 선행 문헌과 같은 맥락에 있다.<sup>15</sup>

게다가, 본 연구는 hPSCs로부터 효율적이고 배타적인 신경세포로의 유도에 있어 BMP 및 액티빈/노달 신호 경로의 억제가 요구된다는 데이터를 제시하였다. 이러한 결과들은 BMP 및 액티빈/노달 신호 경로의 동시적 및  
 25 연속적인 억제가 *Xenopus* 배아 발달에 있어서 신경 유도를 위하여 요구된다고 보고된 최근 연구와 일치한다.<sup>16</sup>

그 다음 의문점은 내재적 분화 경향(*innate differentiation propensity*)과 관계없이 DM과 SB431542의 동시 처리가 모든 hESC와 iPSC를 신경 계통으로의 분화를 유도시키는 것인지에 대한 것이다. 이러한  
 30 의문점을 해결하기 위하여 9개의 hPSC(6개 hESC 및 3개의 인간 iPSC)들로부터 만들어진 EBs를 자발적 분화조건에서 배양을 하면서 DM(5  $\mu$ M)와 SB431542 (10  $\mu$ M)으로 처리하였다. qRT-PCR 분석에서는 DM과

SB431542을 처리한 것이 다른 계통 세포로의 분화를 감소시키면서 신경세포로의 유도를 유의적으로 향상시킨 것으로 나타났다(도 2a). 흥미롭게도, 대조군(dimethyl sulfoxide: DMSO)로 처리된 세포)과 DM 및 SM431542로 처리된 세포주 사이의 신경세포 마커 발현의 증가 폭은

5 Miz-hES4, SNU-hES3, SNU-hES16, CHA-hES3 및 BJ1-iPS12 세포들과 같은 신경세포로 분화되지 않는 내재적 분화 경향을 가진 세포주들에서의 발현 증가 폭이 높게 나타났다(도 1a 및 도 2a). 면역세포화학 분석에서는 BMP와 액티빈/노달 신호 경로가 억제되었을 때, 보다 많은 세포들이 신경

10 전구세포 마커 Nestin을 발현한 것으로 나타내었다(도 2b). DM과 SB를 처리한 후에는 어떠한 미분화된 세포들도 면역세포화학에 의하여 검출되지 않았다 (데이터에 표시하지 않음).

자발적 분화 과정에서의 이러한 효과들 뿐 만 아니라, hESCs로부터 신경세포 분화를 유도시키도록 디자인된 신경 유도 분화 프로토콜을 사용하는 경우에서도, DM과 SB431542은 신경세포 발생을 증가시켰다(도

15 4).<sup>17</sup> 본 실험에서 발생된 신경 전구세포들은 뉴런, 성상세포 및 희소돌기아교세포가 될 수 있는 다능성(multipotency)을 가지고 있는 것으로 나타났다(도 8).

실험결과를 종합하면, hESC와 iPSC의 상당히 차이 있는 분화 경향은, 분화과정이 자발적 또는 정향적(directed)이든 관계없이, BMP와

20 액티빈/노달 신호 경로의 동시 조절을 통하여 극복이 가능하였다. 즉, 두 조건하에서 모든 hPSCs들은 효율적으로 신경세포 계통으로 분화되었다.

BMP와 액티빈/노달 신호 경로를 동시에 억제하여 발생된 NPs가 특정 신경세포 하부-타입으로 될 수 있는 능력을 유지하고 있는지를 조사하기 위하여, 추가적으로 본 연구자들은 종래 프로토콜에 따라 도파민(dopamine:

25 DA) 뉴런으로의 분화를 시도하였다(도 5).<sup>18,19</sup> 면역세포화학 분석에서는 DMSO로 처리된 세포(총 세포수의  $2.6 \pm 0.5\%$ )과 비교하여 DM 및 SB431542로 처리된 인간 iPSC (MSC-iPS2-3)(총 세포수의  $50.7 \pm 2.2\%$ )에서 Tuj1-양성 신경 세포의 수가 주목할 만큼 증가하였다(도 5b-5h). Tuj1-양성 세포의 상당한 부분( $49.5 \pm 6.8\%$ )은 TH<sup>+</sup> 뉴런(도파민을 합성하는 효소인 티로신

30 하이드록실라아제를 발현하는 뉴런)이었다. 또한, 이러한 결과는 BMP와 액티빈/노달 신호 경로의 조작에 의해서 발생된 신경세포들이 DA 뉴런과

같은 특이적 신경 타입으로의 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것을 의미한다.

요약하면, 본 연구는 다양한 분화 경향을 가지는 hPSCs가 BMP와 액티빈/노달 신호 경로의 조작에 의하여 신경 계통으로 효과적으로 분화할 수 있다는 것과 신호 경로 조작을 통하여 hESC와 인간 iPSCs의 내재적 분화 잠재성을 극복할 수 있다는 것을 제시한다. 이것은 세포 대체요법을 필요로 하는 환자로부터 복잡하고 독립적인 iPSC 세포주를 다량 생산하는 필요성을 단순화시킬 것이다.

#### 10 참조 문헌

1. Oh, S. K. et al. *Stem Cells* 23, 605-609(2005).
2. Park, I. H. et al. *Nature* 451, 141-146(2007).
3. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Br, O. & Thomson, J. A. *Nat. Biotechnol* 19, 1129-1133(2001).
- 15 4. Pfaffl, M. W. *Nucleic Acids Res* 29, e45(2001).
5. Osafune, K. et al. *Nat. Biotechnol.* 26, 313-315(2008).
6. Wilson, S. I & Edlund, T. *Nat. Neurosci. Suppl*:1161-1168(2001).
7. Mu, I. & Brivanlou, A. H. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 271-280(2002).
8. Yu, P. B. et al. *Nat. Chem. Biol.* 4, 33-41(2008).
- 20 9. Ding, S. & Schultz, P. *Nat. Biotechnol.* 22, 833-840(2004).
10. Schier, A. F. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 589-611(2003).
11. Vallier, L., Reynolds, D. & Pedersen, R. A. *Dev Biol.* 275, 403-421(2004).
12. Camus, A., Perea-Gomez, A., Moreau, A. & Collignon, J. *Dev Biol.*
- 25 295, 743-755(2006).
13. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. *J. Cell. Sci.* 118, 4495-4509(2005).
14. Xiao, L., Yuan, X. and Sharkis, S. *J. Stem Cells* 24, 1476-1486(2006).
- 30 15. Wu, J. et al. *J. Biol. Chem.* 283, 24991-25002 (2008).
16. Chang, C. & Harland, R. M. *Development* 134, 3861-3872 (2007).

17. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Br, O. & Thomson, J. A. *Nat. Biotechnol.* 19, 1129-1133.
18. Cho, M. S. et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 3392-3397 (2008).
19. Yan, Y. et al. *Stem Cells* 23;781-790 (2005)
- 5 20. Xu, R-.H. et al. *Nat Methods* 2, 185-190 (2005).
21. Kroon, E. et al. *Nat Biotech* 26, 443-452 (2008).
22. Xiao, L., Yuan, X. and Sharkis, S. *J. Stem Cells* 24, 1476486 (2006).

10           이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**【특허청구범위】**

**【청구항 1】**

(a) 줄기세포의 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein) 신호  
5 경로 및 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로를 억제하는 단계; 및 (b)  
상기 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포로부터 신경세포로의  
분화 유도방법.

**【청구항 2】**

10 제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는  
유도만능줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 3】**

15 제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포의 골 형성 단백질 신호 경로를  
억제하는 것은 도소모르핀(dorsomorphin), Smad6, Smad7, 노긴(Noggin),  
코르딘(Chordin), 그렘린(Gremlin), Sog (short gastrulation),  
폴리스타틴(Follistatin), DAN(differential screening-selected gene  
aberrant in neuroblastoma), 썬베루스(Cerberus), 단테(Dante) 및  
PRDC(Protein Related to DAN and Cerberus)에서 선택되는 억제제를  
20 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 4】**

25 제 3 항에 있어서, 상기 억제제는 도소모르핀인 것을 특징으로 하는  
방법.

**【청구항 5】**

30 제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포의 액티빈/노달(Activin/Nodal)  
신호 경로를 억제하는 것은 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-  
1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드, Smad6, Smad7 및 폴리스타틴으로 선택되는  
억제제를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 억제제는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드를 이용하여 실시하는 것을  
5 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 줄기세포를 배양하여 배아체의 형성 과정 또는 형성된 배아체를 배양하는 과정에서 실시되며 상기 단계  
10 (a)에 의해 신경외배엽이 증가된 배아체가 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 (b-1) 신경외배엽이 증가된  
15 배아체를 bFGF(basic fibroblast growth factor)의 존재 하에서 배양하여 신경전구세포를 증식시키는 단계; (b-2) 상기 신경전구세포를 소닉 헤지혹(Shh) 및 FGF 8(Fibroblast growth factor 8)의 존재 하에서 배양하여 도파민 전구세포로 유도시키는 단계; 및 (b-3) 상기 도파민 전구세포를 신경아교세포 유래 신경영양인자(glial derived neurotrophic  
20 growth factor: GDNF), 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor: BDNF) 및 아스코르빈산(ascorbic acid)의 존재 하에서 배양하여 도파민 신경세포를 형성시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 줄기세포는 DM 및 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드를  
25 처리 하지 아니한 줄기세포보다 Sox1, Pax6 및 네스틴이 고발현 되는 것을 특징으로 하는 방법.

30 【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 줄기세포는 DM 및 4-(5-

벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드을  
처리하지 아니한 줄기세포보다 Id1, Id3, GCM1 및 GATA2가 저발현 되는  
것을 특징으로 하는 방법.

5     **【청구항 11】**

골 형성 단백질(bone morphogenetic protein) 신호 경로 억제제 및  
액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로 억제제를 포함하는 줄기세포로부터  
신경세포로의 분화 유도용 조성물.

10    **【청구항 12】**

제 11 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는  
유도만능줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 13】**

15    제 11 항에 있어서, 상기 골 형성 단백질 신호 경로 억제제는  
도소모르핀, smad6, smad7, 노긴, 코르딘, 그램린, Sog (short  
gastrulation), 플리스타틴, DAN(differential screening-selected gene  
aberrant in neuroblastoma), 씨베루스, 단테 및 PRDC(Protein Related to  
DAN and Cerberus)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

20

**【청구항 14】**

제 13 항에 있어서, 상기 억제제는 도소모르핀인 것을 특징으로 하는  
조성물.

25    **【청구항 15】**

제 11 항에 있어서, 상기 액티빈/노달(Activin/Nodal) 신호 경로  
억제제는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-  
벤즈아미드, Smad6, Smad7 및 플리스타틴으로 선택되는 억제제인 것을  
특징으로 하는 조성물.

30

**【청구항 16】**

제 15 항에 있어서, 상기 억제제는 4-(5-벤조[1,3]다이옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2일)-벤즈아미드인 것을 특징으로 하는 조성물.

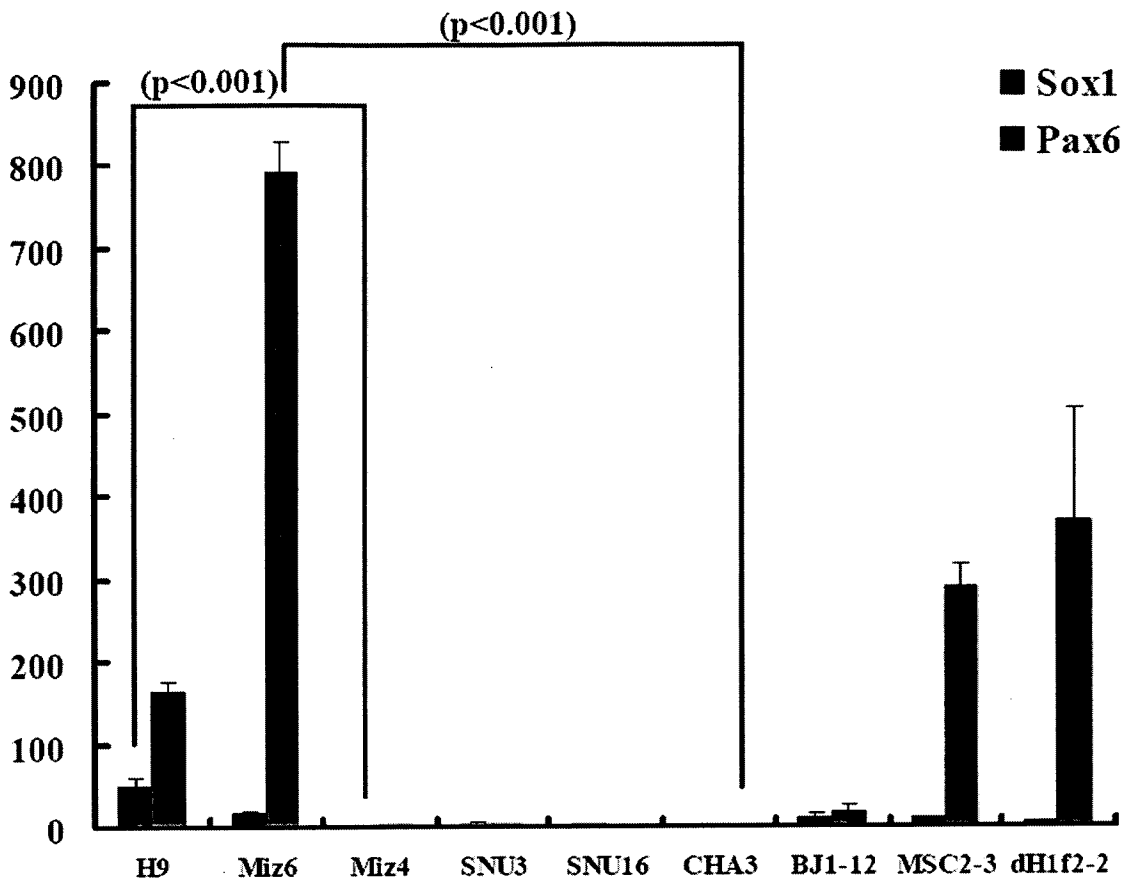
**【청구항 17】**

5 제 11 항에 있어서, 상기 조성물은 줄기세포에서 Sox1, Pax6 및 네스틴(Nestin)을 고발현시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 18】**

10 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 줄기세포에서 Id1, Id3, GCM1 및 GATA2를 저발현 시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

Figure 1a



도 1b

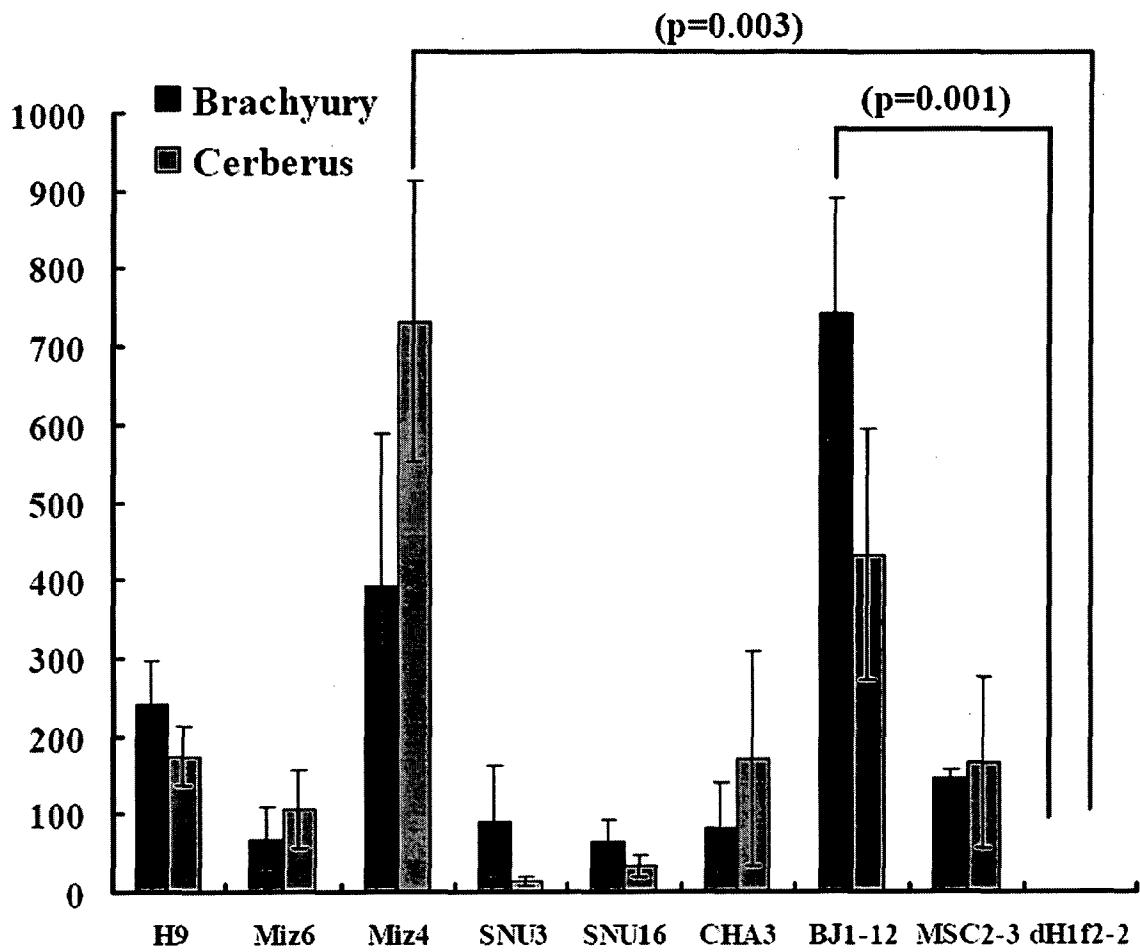
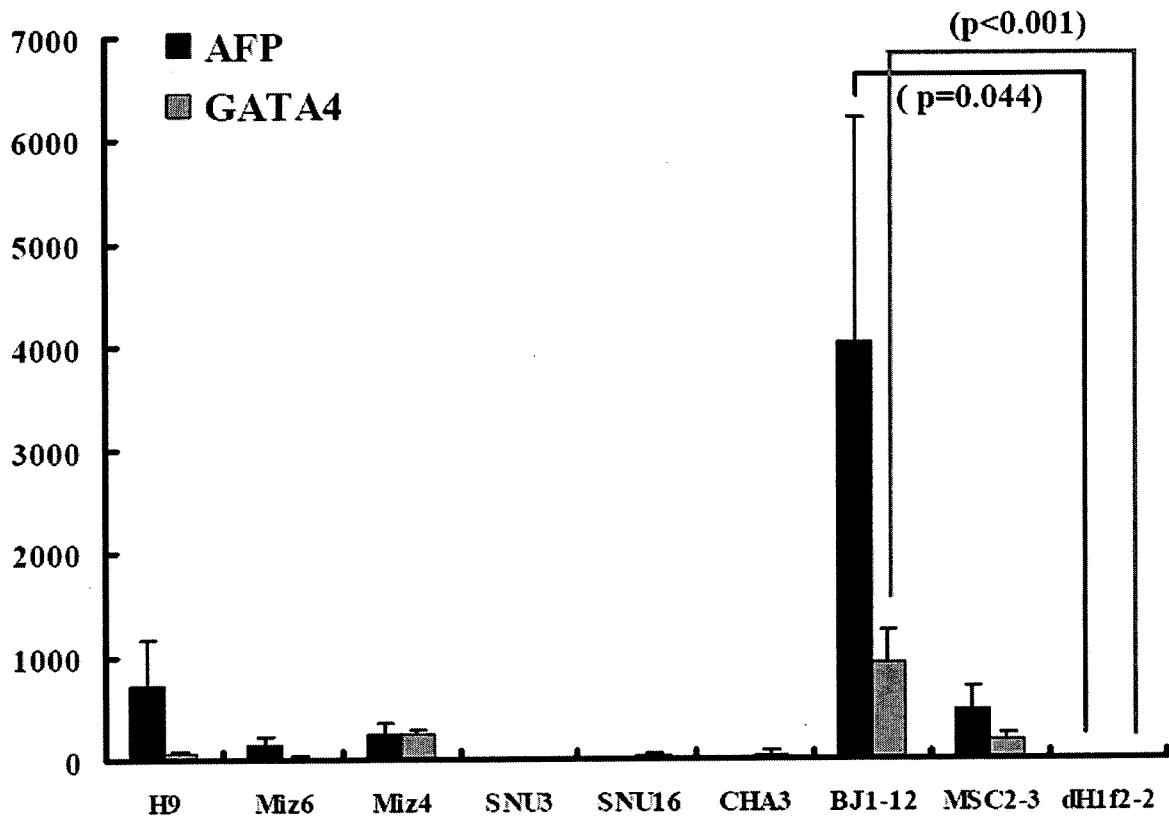
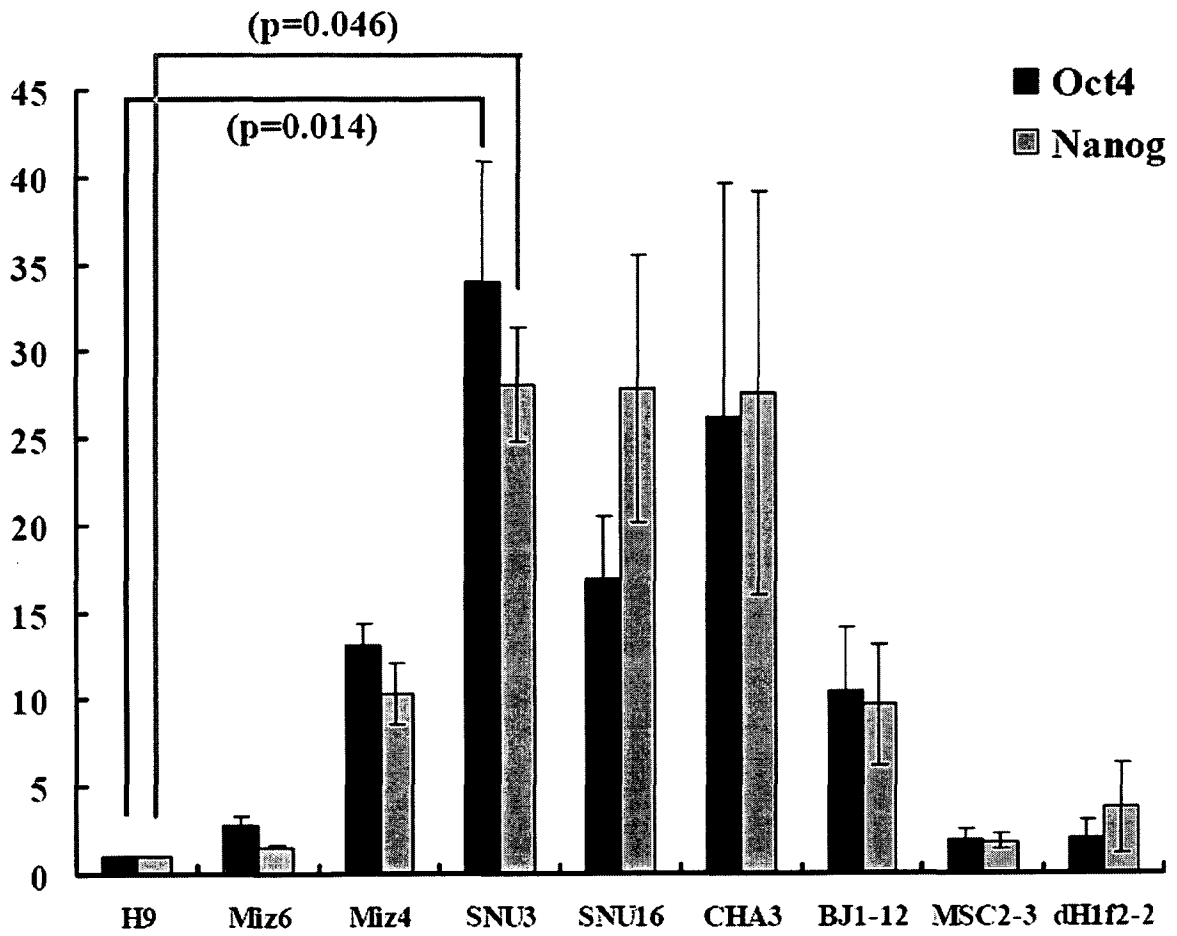


Figure 1c



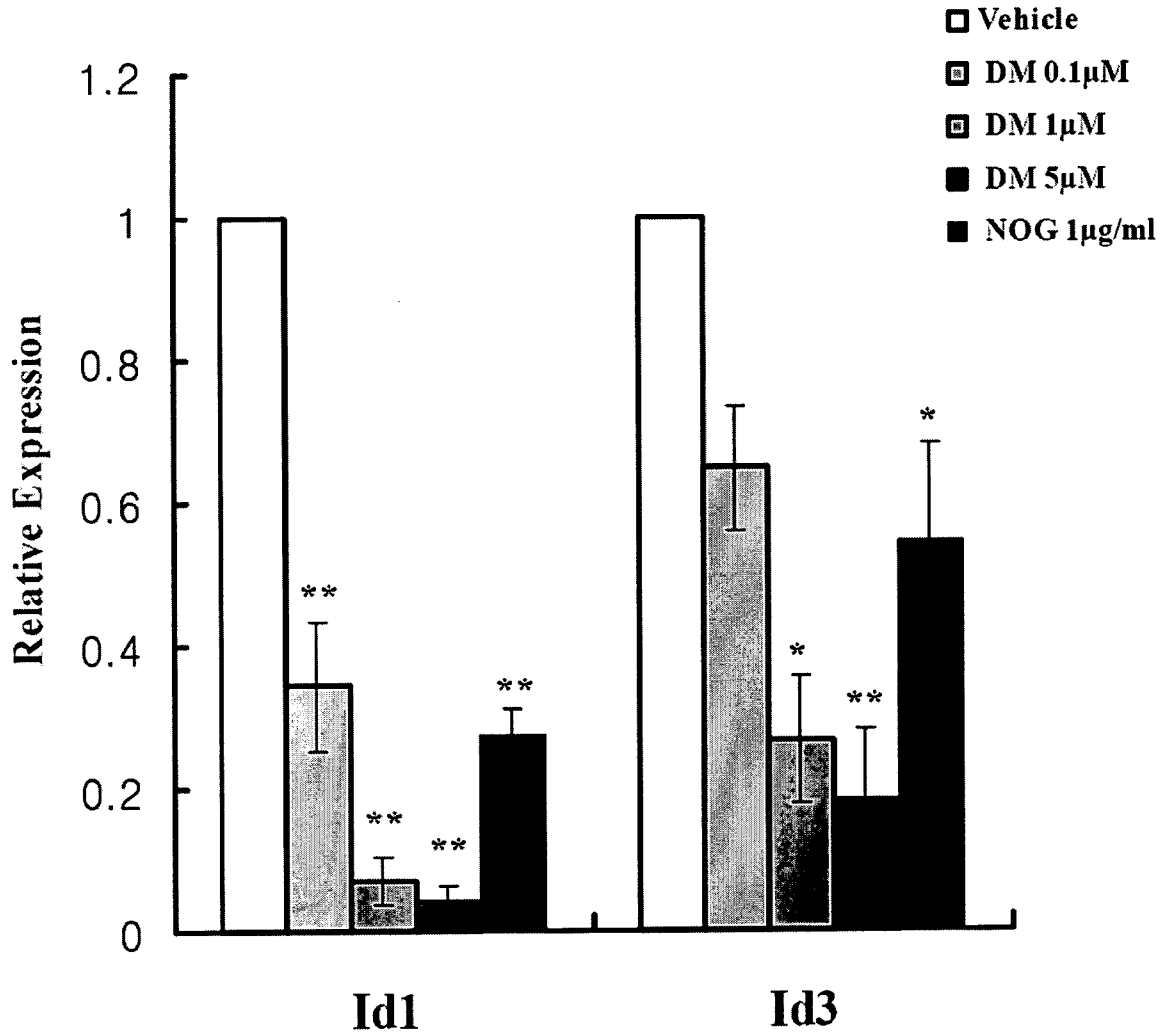
4/20

㉔ 1d



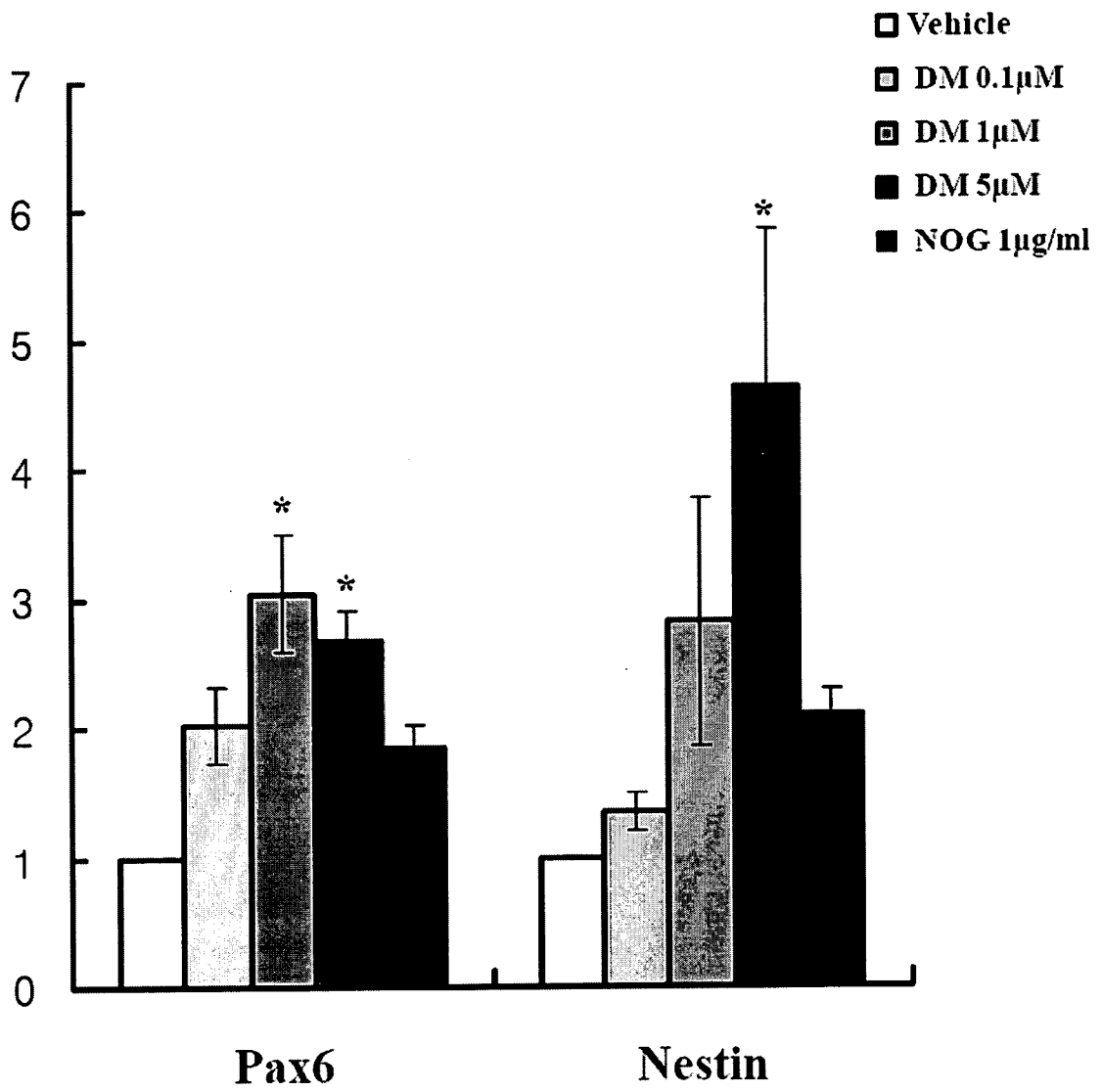
5/20

# Figure 2a



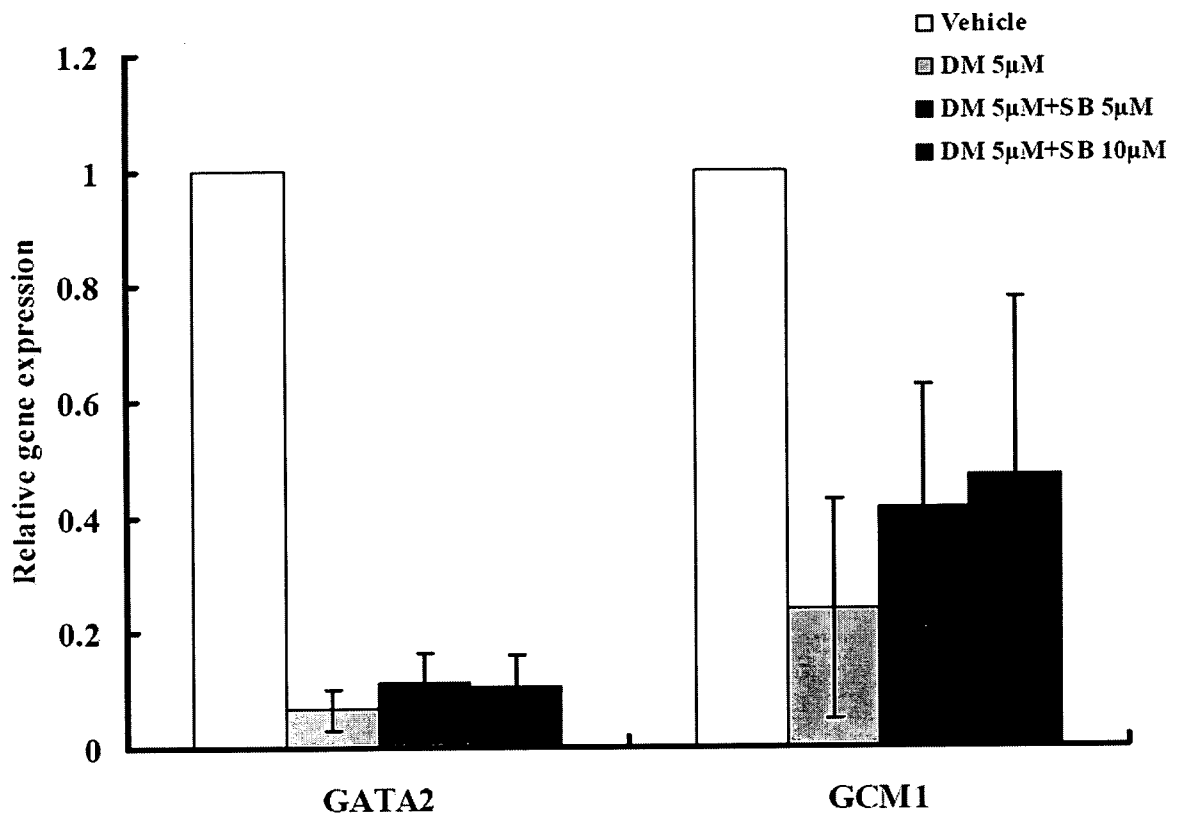
6/20

# 도 2b

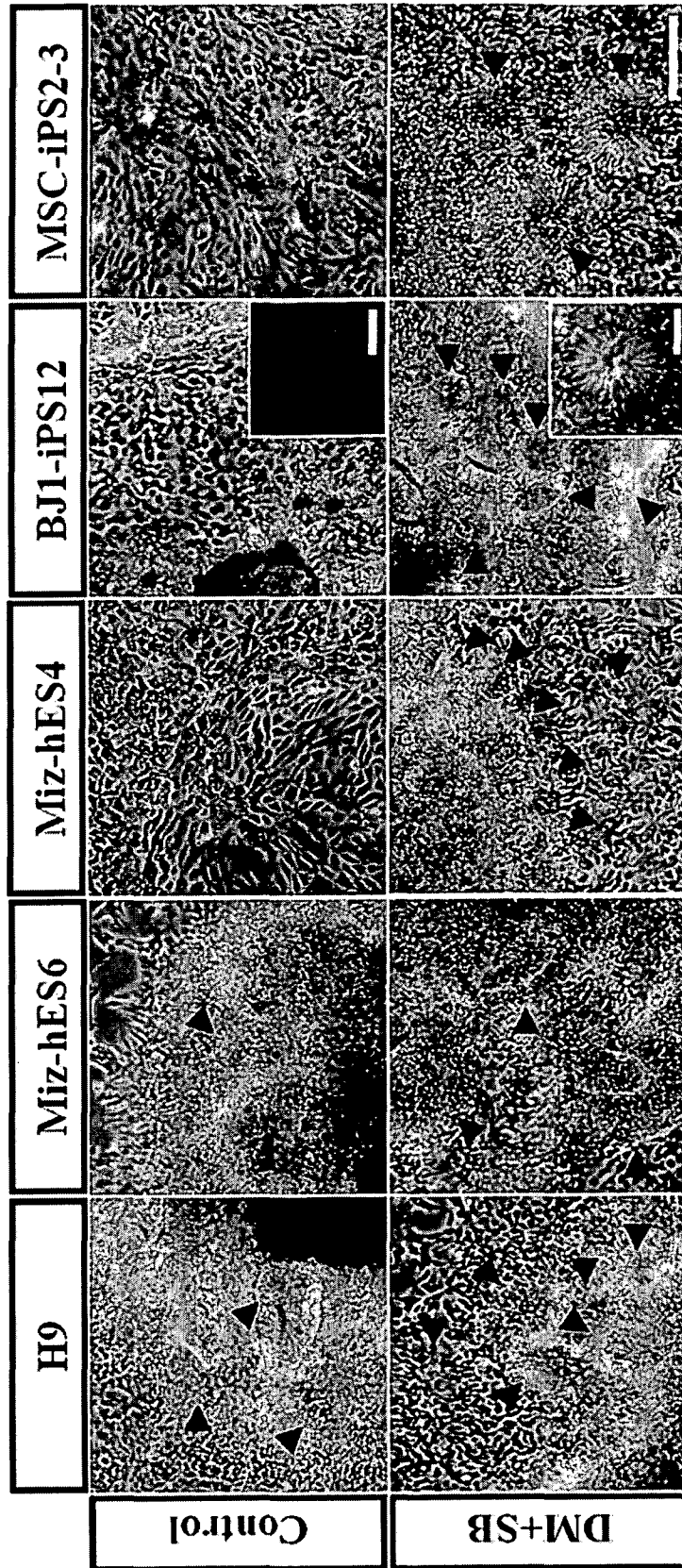


7/20

### 도 3

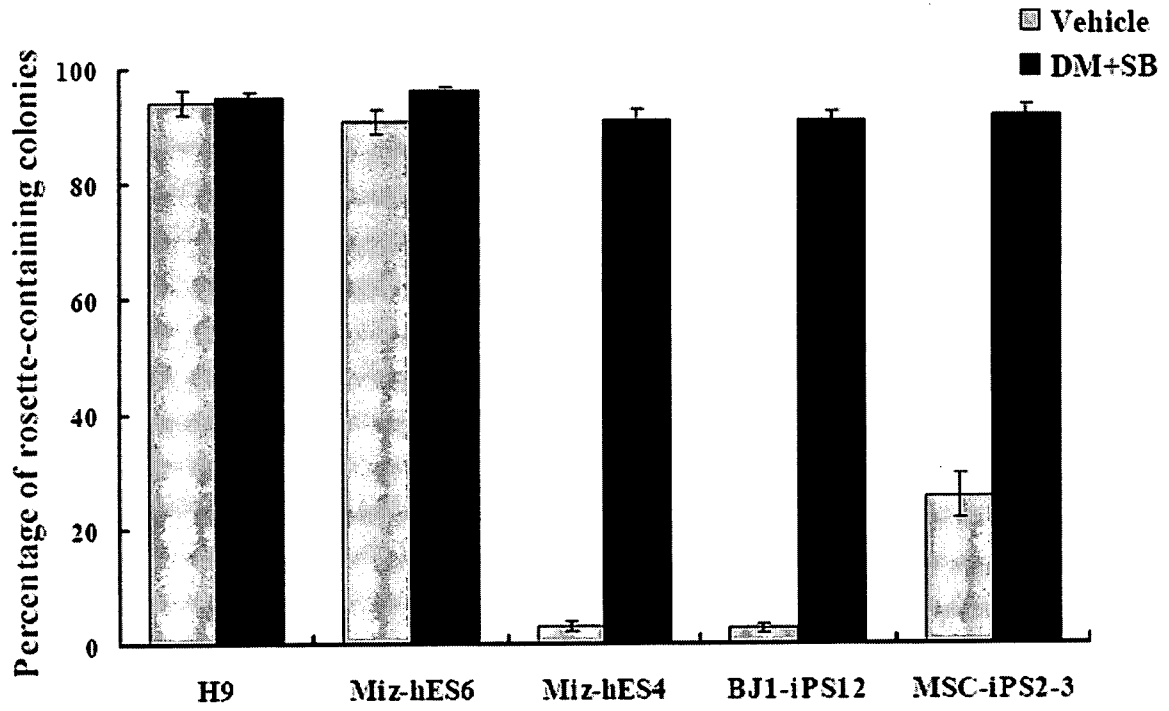


도 4a



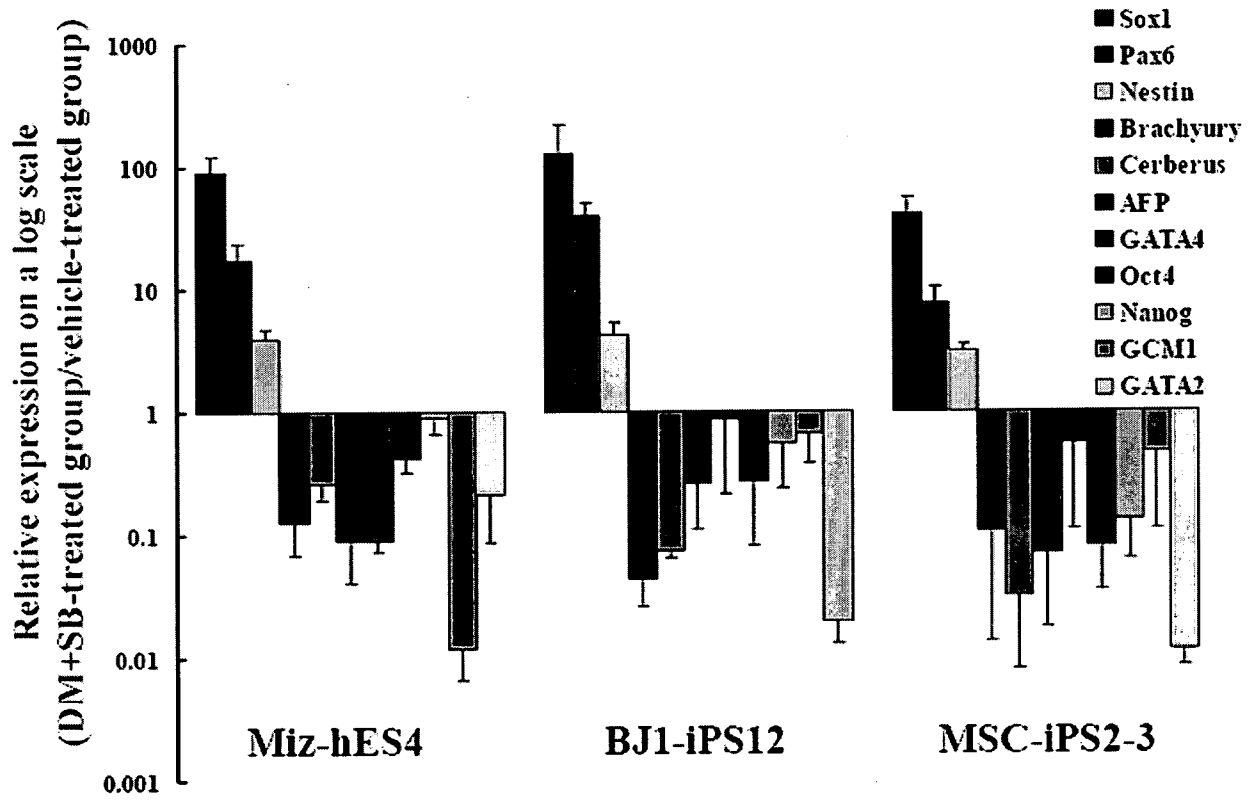
9/20

# Figure 4b

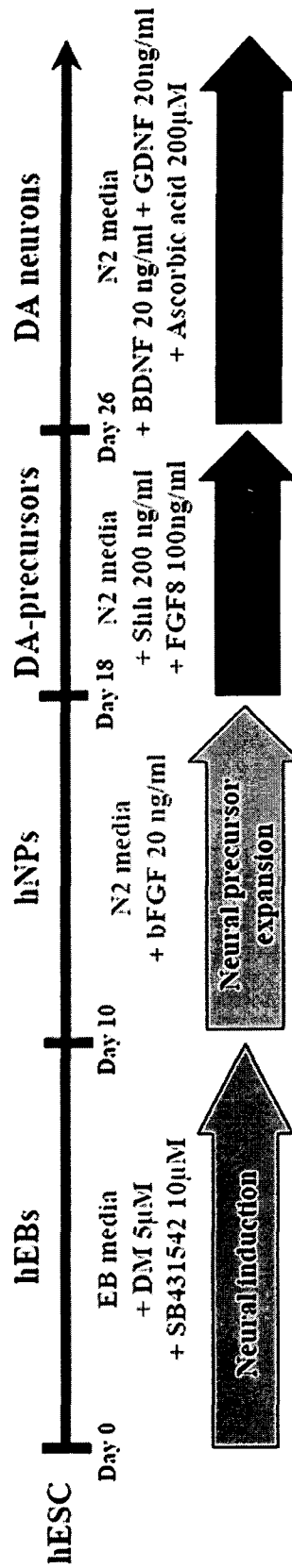


10/20

4c

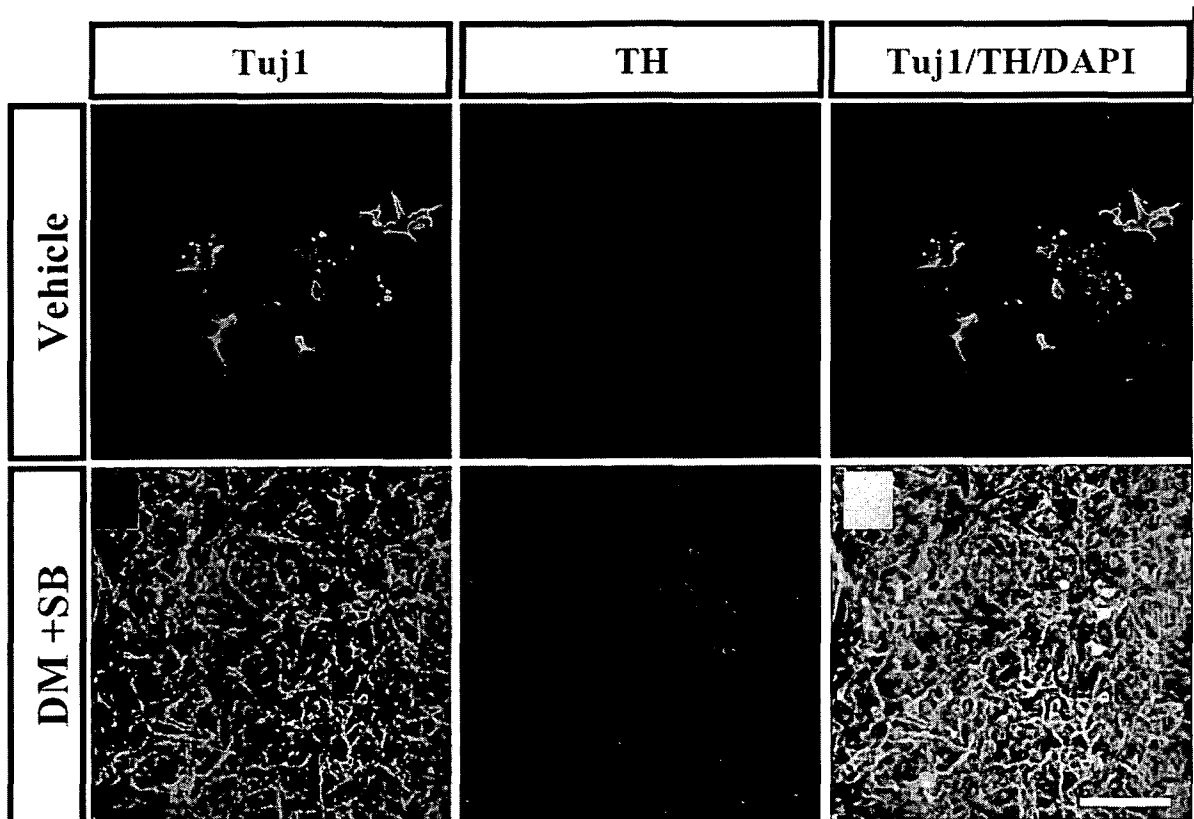


# Figure 5a



12/20

도 5b



13/20

Figure 5c

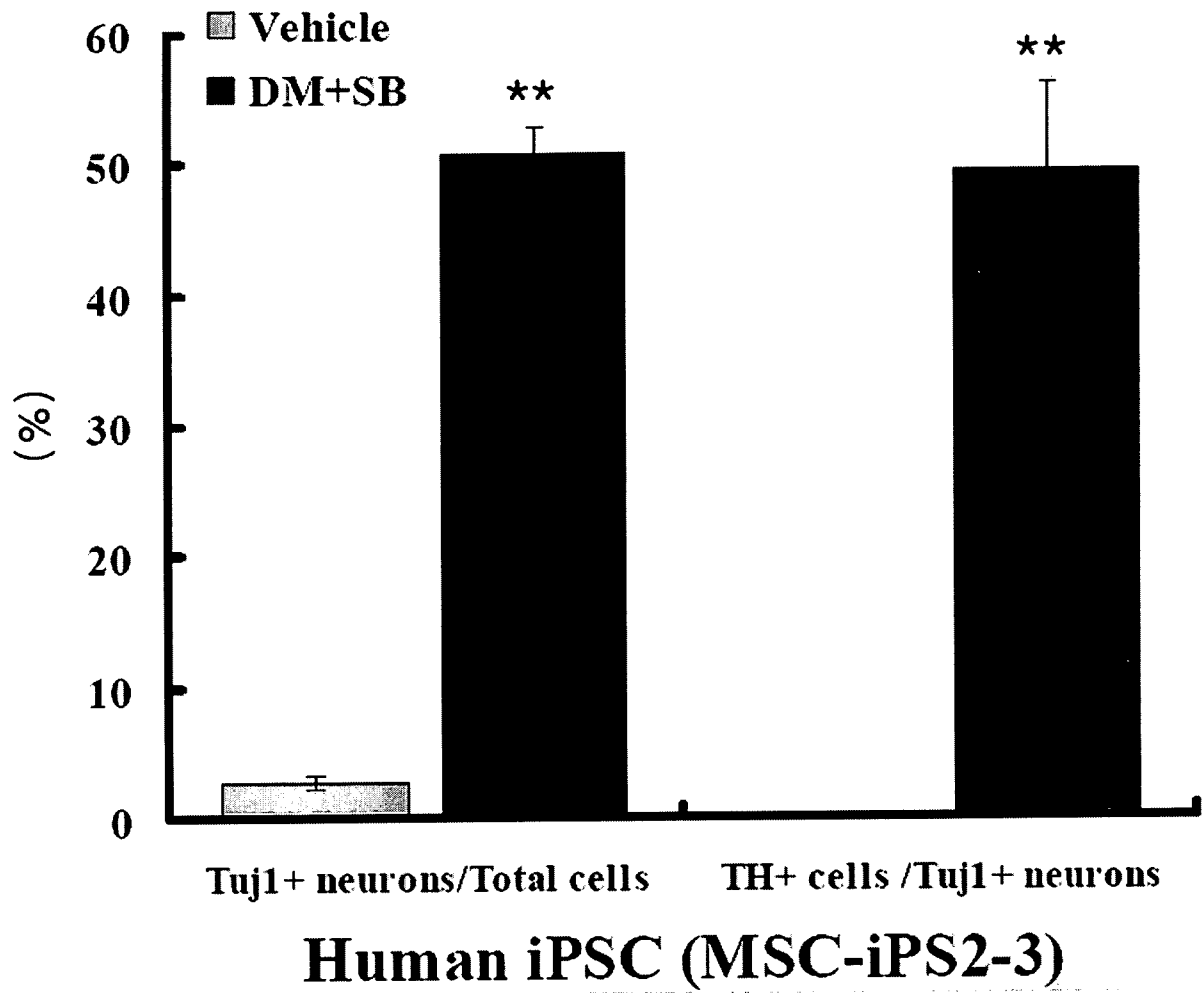
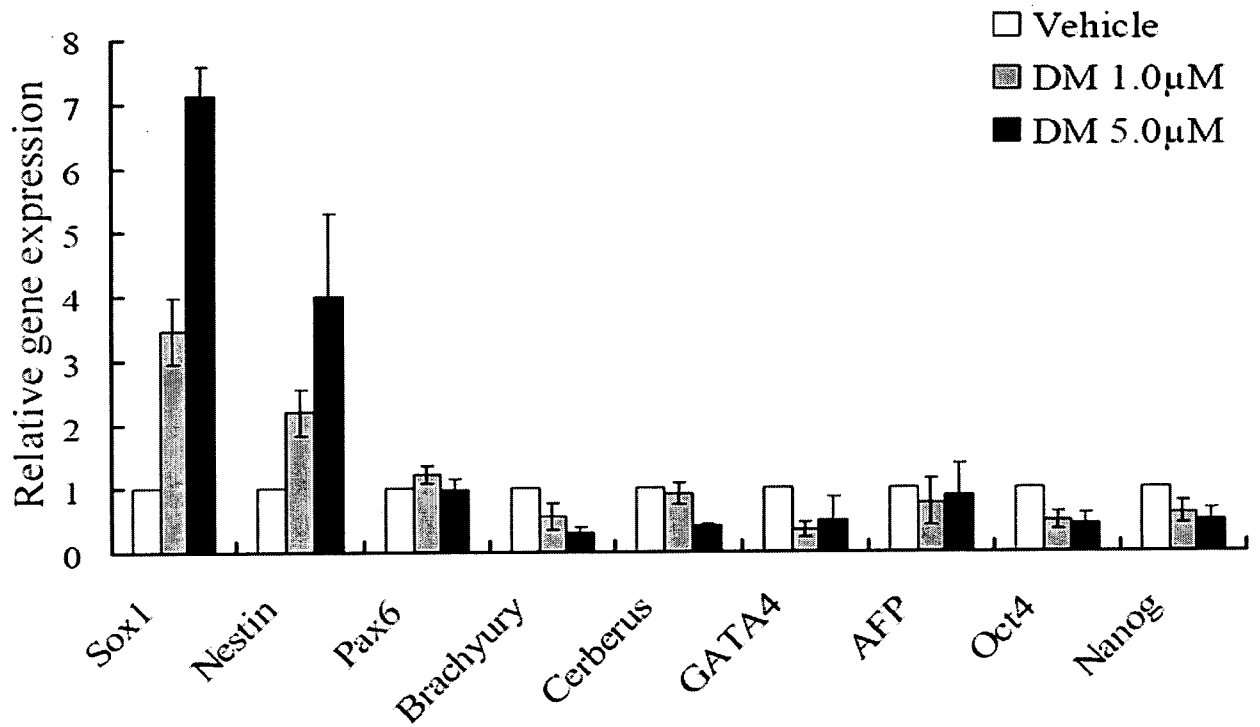


Figure 6a



도 6b

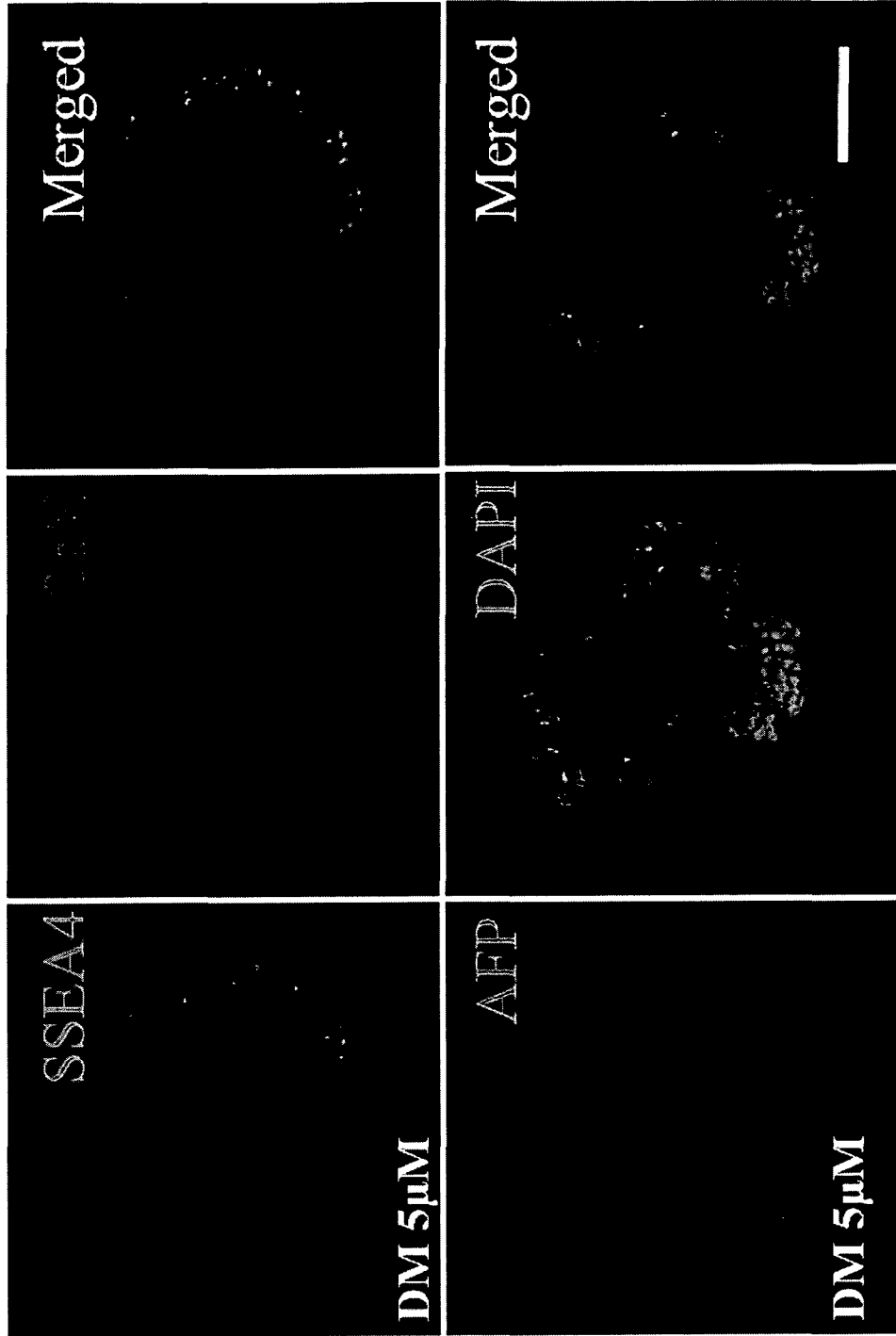


Figure 6c

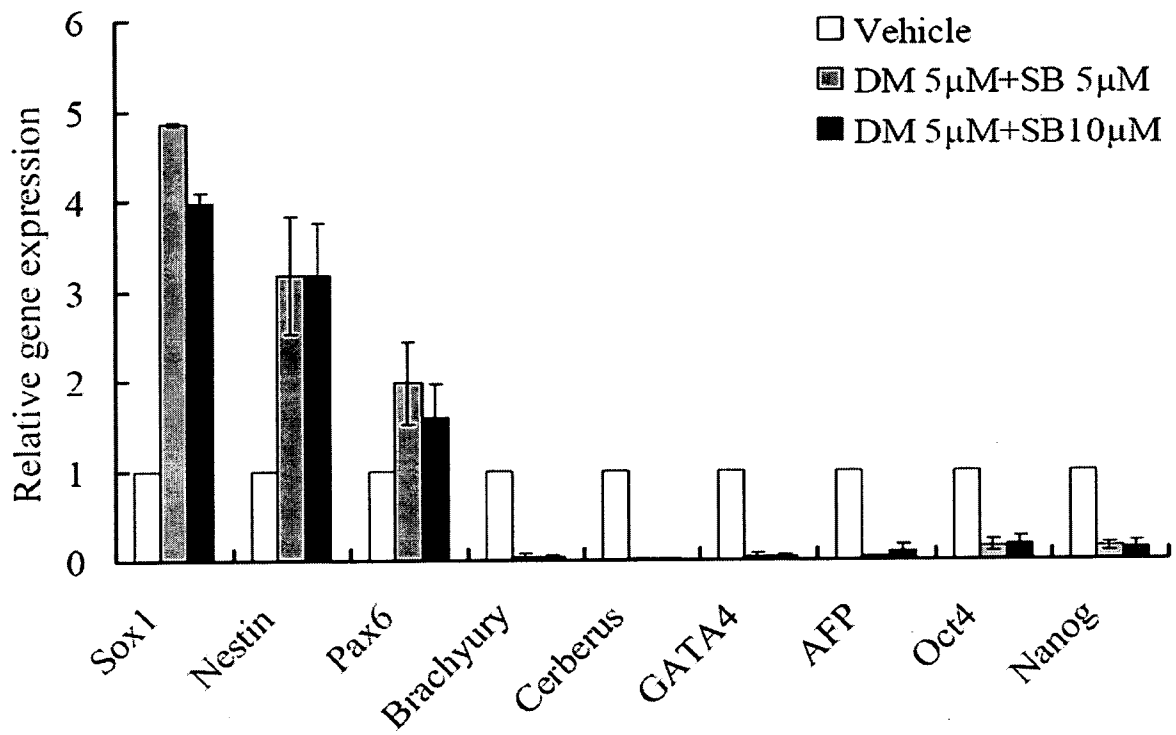

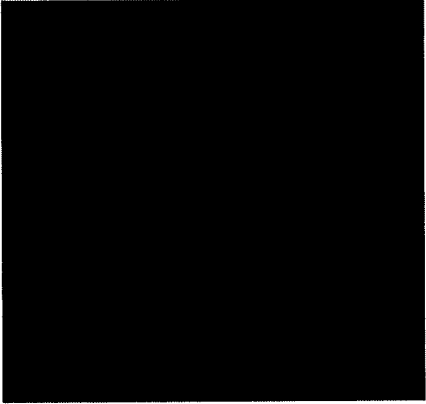
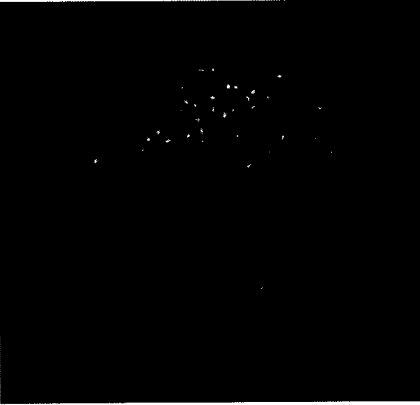
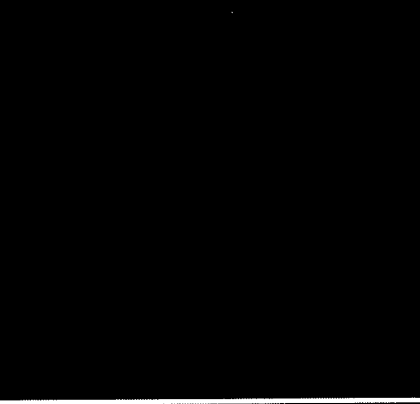
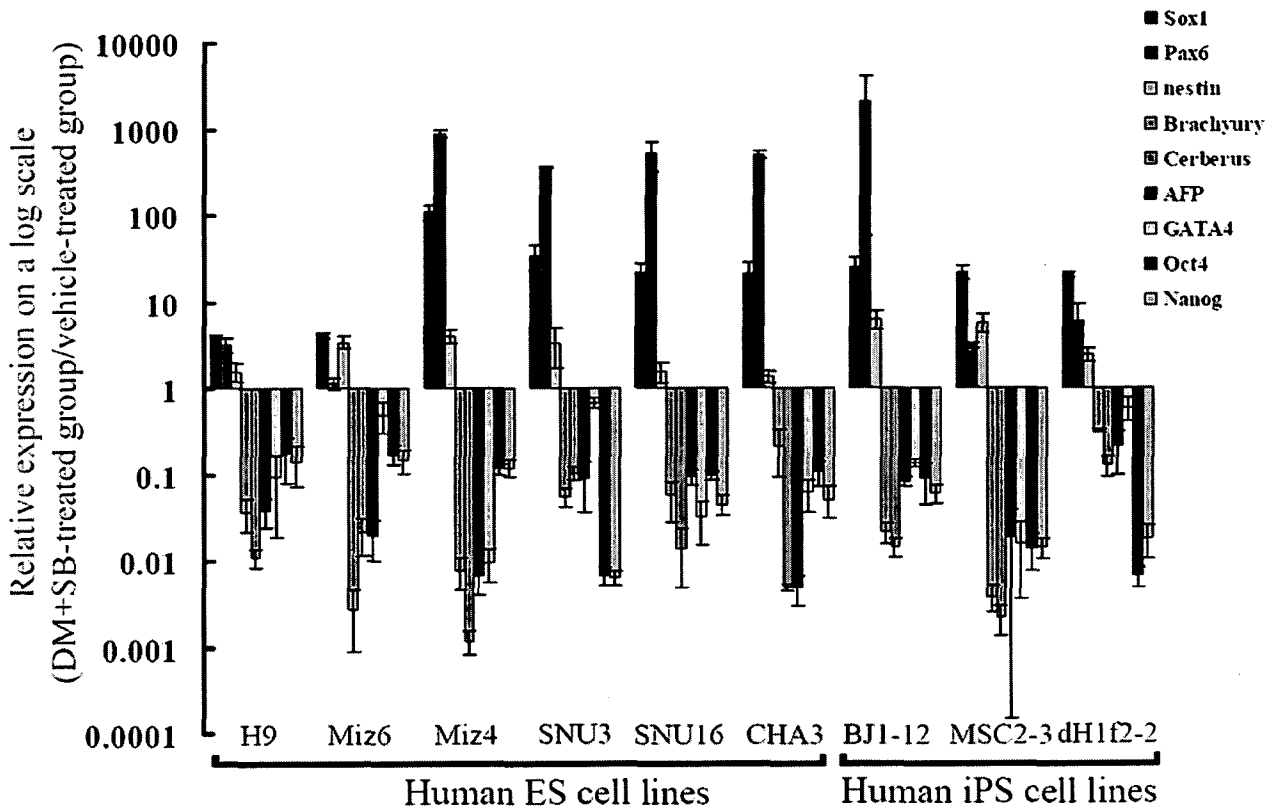


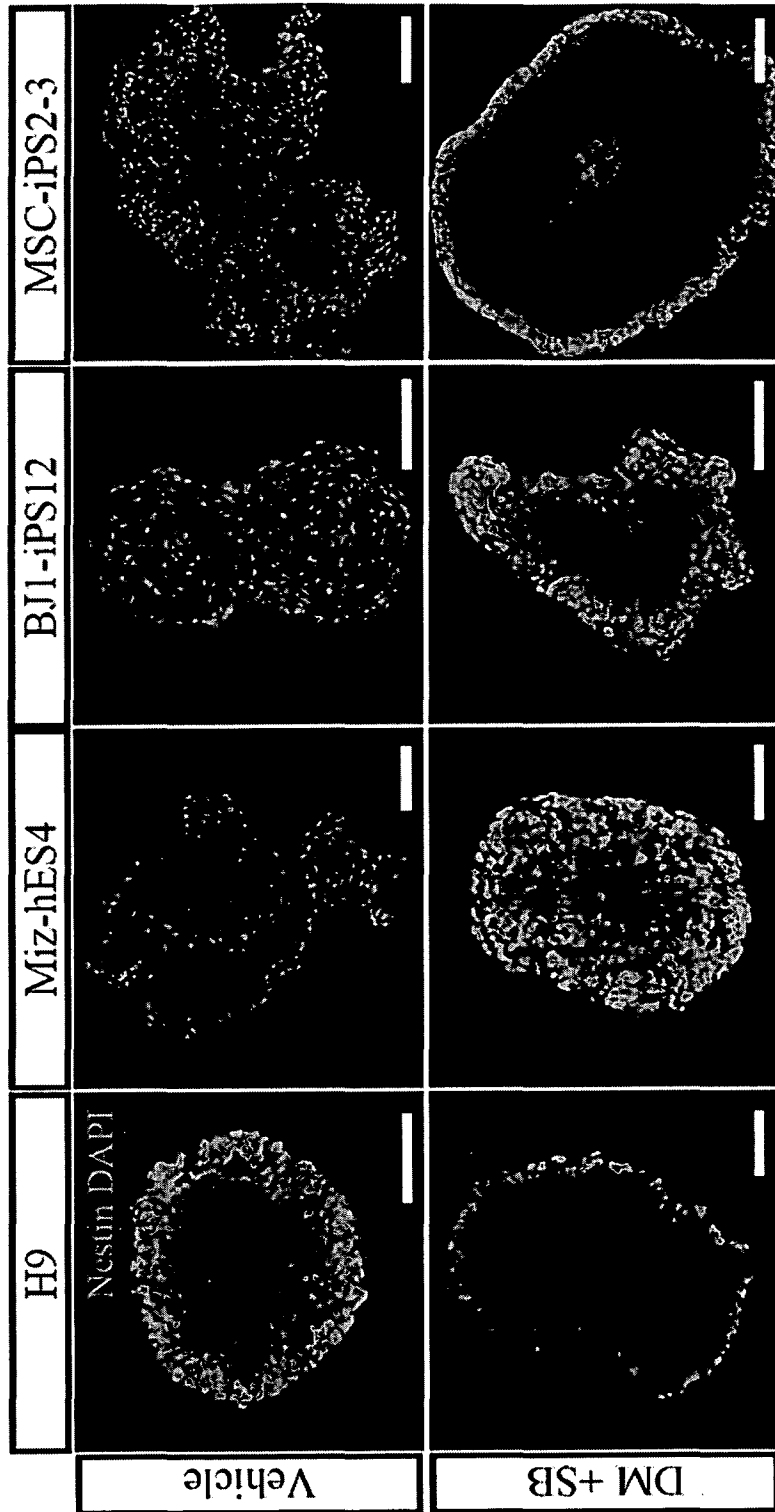
Figure 6d

| Pax6    | Nestin   | Merged  |
|---------|--|---|
| Vehicle |   |   |
| DM + SB |  |  |

도 7a



도 7b



도 8

