

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2012년 4월 26일 (26.04.2012)

PCT

(10) 국제공개번호  
WO 2012/053719 A1

- (51) 국제특허분류:  
C12N 13/00 (2006.01) C12N 5/079 (2010.01)  
C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/004191
- (22) 국제출원일: 2011년 6월 8일 (08.06.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2010-0101652 2010년 10월 19일 (19.10.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 동국대학교 산학협력단 (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 서울시 중구 필동 3가 26, 100-715 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 박정극 (PARK, Jung Keug) [KR/KR]; 서울시 성동구 옥수동 100번지 옥수하이츠 아파트 102동 905호, 133-768 Seoul (KR). 윤문영 (YOON, Moon Young) [KR/KR]; 서울시 강북구 미아동 61-52, 205호, 142-100 Seoul (KR). 조현진 (CHO, Hyun Jin) [KR/KR]; 서울시 서초구 반포동 반

포주공아파트 97동 109호, 137-040 Seoul (KR). 서영권 (SEO, Young Kwon) [KR/KR]; 서울시 성동구 성수2가 3동, 133-123 Seoul (KR). 전송희 (JEON, Song Hee) [KR/KR]; 서울시 성동구 금호동 3가 두산아파트 111-201호, 133-751 Seoul (KR). 윤희훈 (YOON, Hee Hoon) [KR/KR]; 경기도 부천시 원미구 중동 1178 미리내마을아파트 901동 601호, 420-710 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 서울시 구로구 구로동 197-22번지 에이스테크노타워 5차 601호, 152-766 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.

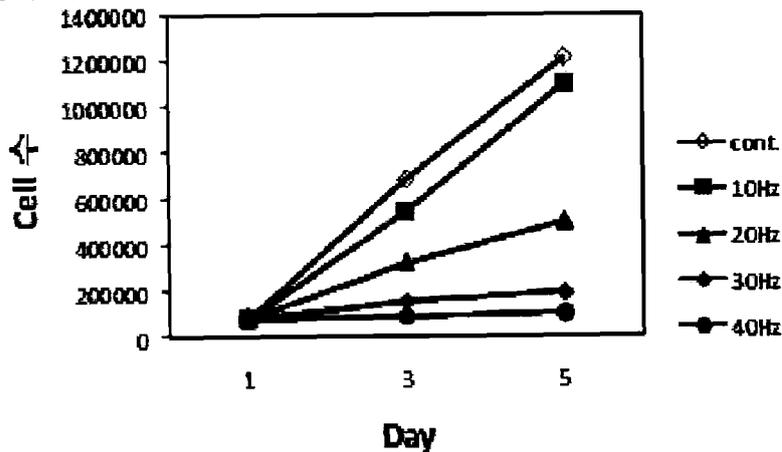
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS TO NERVE CELLS USING SONIC WAVES

(54) 발명의 명칭 : 음파를 이용한 중간엽 줄기세포의 신경세포 분화유도 방법

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for differentiation of mesenchymal stem cells. More specifically, the invention relates to a method for differentiating mesenchymal stem cells to nerve cells by treating the mesenchymal stem cells with low-frequency sonic waves. The differentiation method of the present invention can induce differentiation even with low-cost mediums rather than induced neural differentiation mediums which are expensive due to addition of growth factors, and the nerve cells differentiated according to the present invention may be useful for treatment of neurological brain diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 중간엽 줄기세포의 분화 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 저주파의 음파를 중간엽 줄기세포에 처리하여, 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의한 분화방법은 성장인자 추가에 따른 고비용의 신경분화유도 배지가 아닌 저가의 배지에서도 분화를 유도할 수 있으며, 본 발명에 의해 분화된 신경세포는 뇌신경질환 치료에 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2012/053719 A1



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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

## 명세서

# 발명의 명칭: 음파를 이용한 중간엽 줄기세포의 신경세포 분화유도 방법

### 기술분야

- [1] 본 발명은 중간엽 줄기세포의 분화 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 특정 주파수의 음파를 중간엽 줄기세포에 처리하여, 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈, 척수손상 등의 뇌신경질환치료에 신경세포가 치료 후보물질로 등장함에 따라 신경세포 관련한 연구가 최근 활발하게 이루어지고 있으며 다수의 논문 및 특허들이 발표되고 있는 실정이다. 그러나 신경세포 또는 신경줄기세포는 세포의 수득이 어려워 비교적 획득이 용이한 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화 유도하는 방법에 관한 연구들이 다수 수행되고 있다. Lauren의 리뷰논문 (*Plast. Reonstr. Surg.* 116:1453, 2005)에 의하면 지방유래 중간엽 줄기세포가 화학적인 방법으로 생체외에서 신경으로 분화되었다는 6건의 보고 중 기능적으로 전기 생리학적 특성을 가진다는 경우는 단 한건만이 보고되었다. Arshak (*Stem Cells and Development*, 17: 1123-30, 2008)의 연구에 의하면 골수유래 중간엽줄기세포를 화학적인 분화방법을 통해 신경세포로 분화 유도하였으며 그 특징관찰을 위해 면역조직화학법, 웨스턴 블롯법 (B3T, GFAP, MAP-2, NeuN), ELISA법 (신경성장인자 (NGF), 뇌유래신경세포인자 (BDNF))을 통해 분화된 신경표지인자들을 확인하였으나, 전기생리학적 특성을 나타내지는 않았다. 신경세포나 신경전구세포와의 혼합배양에 의해 중간엽 줄기세포를 신경치료에 사용하려는 연구(Croft AP, *Exp. Neurol.*, 216(2): 329-41(2009))가 진행 중이나 혼합배양에 사용할 충분한 양의 인체 신경세포나 신경전구세포 획득이 실제적으로 불가능하다. 또 다른 연구방향으로는 신경세포로의 분화수율을 높이기 위해 렌티바이러스를 이용하여 신경관련 유전자 과발현을 유도하는 연구 (Watson, D. J., *Journal of Neurotrauma*, 21:1723-36.(2004)) (Hofstetter, C., *Nature Neuroscience*, 8: 346-53.(2005)) 등이 진행중이나 바이러스에 대한 안전성이 확보되지 않아 세포치료법에 적용하기에는 어려움이 있다.
- [3] Kuh 등 (*Acta Neurochir* 147:985-992, 2005)에 따르면 인체 체대혈 세포를 척수손상 쥐에게 이식하고 8주차에 관찰한 결과, 배지만 넣어준 대조군과 Basso, Beattie, and Bresnahan score (BBB 점수; 생체내 실험에서 회복정도를 수치로 나타내는 점수)에서 비슷한 경향을 나타냈으며 뇌유래 신경영양인자 (brain derived neurotrophic factor; BDNF)를 혼합하여 세포를 이식한 경우 이식 5주후에 유사한 결과를 나타내는 것으로 보아 단순 줄기세포의 이식은 한계가 있음을 알

수 있다. Rooney 등 (*Tissue Engineering Part A*, Mar. 31, 2009)은 형광발현 쥐로부터 분리한 골수유래 중간엽 줄기세포에 아교세포주유래 신경영양인자 (GDNF) 유전자를 도입하여 각각 이식한 경우 아교세포주유래 신경영양인자 유전자를 도입한 경우는 6주차까지 생존하는 것이 관찰되었으나 단순 중간엽 줄기세포만 이식한 경우 이식 2주 이후엔 이식된 세포가 관찰되지 않아 중간엽 줄기세포의 이식만으로는 척수손상 치료연구로는 부족함이 언급되었다.

- [4] 기존에 알려진 파동을 이용한 신경치료 기술로는 뇌조직에 약 10 Hz 이하의 저주파 에너지를 적용시키기 위한 장치로 환자의 뇌안에 전극을 이식후 직접 전기자극을 부여하여 전기흐름에 의한 자기장을 야기하는 장치 (공개특허: US20060205993)가 있다. Zheng은 중추신경계에 자기자극을 주는 방법으로 고주파 또는 복수의 주파수 성분을 조합하여 뇌기능 개선에 사용하려는 기술 (JP 2008-543388)을 개발하였으며 Riken은 배아줄기세포에 전기펄스 처리하여 신경세포를 제조하는 기술 (US200740065941)을 개발하였다. Gliner 등은 세포에 전기펄스를 처리하여 신경세포를 제조하는 기술을 개발하였다 (US20050075679). 위의 기술들은 전극을 직접 이식하는 방식으로 전극을 이식하는 수술이 추가되어 환자에게 고통이 수반되며 배아줄기세포의 경우 종양형성의 가능성이 문제가 되어 임상에 적용하는데 한계가 있다.
- [5] 따라서 획득이 용이한 중간엽 줄기세포에서 신경전구세포로 분화시킬 수 있는 효율적인 방법이 절실히 필요한 상태이다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 상기의 문제점 및 필요성을 인식하고, 수득이 어려운 신경세포 또는 신경줄기세포를 얻기 위해 비교적 획득이 용이한 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화 유도하는 방법에 대해 예의 노력한 결과, 특정 주파수의 음파가 줄기세포를 분화할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [7] 따라서 본 발명의 목적은 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공하는데 있다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 신경질환 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

### 과제 해결 수단

- [9] 상기의 과제를 해결하기 위해 본 발명자는 음파를 중간엽 줄기세포에 처리하여, 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [10] 또한 상기 음파는 1 내지 500Hz의 주파수, 0.1 내지 5V의 강도로 처리되는 고, 특히 30 내지 300Hz, 0.5 내지 3.0V의 강도로 자극을 주는 것이 바람직하다.
- [11] 본 발명의 상기 중간엽 줄기세포는 골수유래, 지방유래, 제대혈 유래 또는 제대 유래일 수 있다.
- [12] 또한 본 발명은 상기 방법으로 분화된 신경세포를 포함하는 신경질환 치료용 조성물을 제공한다.

- [13] 상기 신경질환은 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈 또는 척수손상을 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 음파를 이용한 줄기세포 분화 방법 및 분화장치는 저주파수의 파동을 이용하여 성체줄기세포를 신경세포로 분화 유도함으로써, 세포획득이 어려운 신경세포나 신경줄기세포의 용이한 수득이 가능하게 되며, 신경분화유도용 배지에서도 가능하지만 성장인자 추가에 따른 고비용의 신경분화유도 배지가 아닌 저가의 일반배지 조건에서도 신경분화를 유도할 수 있기 때문에 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈, 척수손상 등의 뇌신경질환치료에 유용하게 활용 될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 성체줄기세포 분화용 음파발생장치의 구현을 보여주는 것이다.
- [16] 도 2는 음파에 노출시킨 후, 제대유래 중간엽 줄기세포의 형태적 변화를 광학 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다 (A는 대조군, B는 10Hz, C는 20Hz, D는 30Hz, E는 40Hz 처리한 경우).
- [17] 도 3은 음파 (10~40 Hz)에 노출시킨 후, 제대유래 중간엽 줄기세포의 세포수를 측정한 그림이다.
- [18] 도 4는 제대유래 중간엽 줄기세포의 신경분화유도에 대한 조건의 실험으로서, 중간엽 줄기세포 마커인 nestin의 발현을 mRNA 수준에서 확인한 것이다 (A는 RT-PCR, B는 real-time PCR).
- [19] 도 5는 제대유래 중간엽 줄기세포의 신경분화 유도 후 신경관련 mRNA발현 비교결과를 나타낸 것이다. 생체 외에서 음파부여 후 발현되는 신경세포 관련 인자들(MAP2, NeuroD1, Neurofilament)의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다 (A는 RT-PCR, B는 real-time PCR).
- [20] 도 6은 생체 외에서 음파부여 후 발현되는 신경세포 관련 단백질 (tau)의 발현을 확인한 것이다.
- [21] 도 7은 음파에 노출시킨 후, 골수유래 및 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태적 변화를 광학 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다 (A는 대조군, B는 10Hz, C는 20Hz, D는 30Hz, E는 40Hz를 처리한 경우).
- [22] 도 8은 음파 (10~40Hz)에 노출시킨 후, 골수유래 및 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수를 측정한 그림이다.
- [23] 도 9는 골수유래 및 지방유래 중간엽 줄기세포의 신경분화 유도 후 신경관련 mRNA발현 비교결과를 나타낸 것이다. 생체 외에서 음파부여 후 발현되는 신경세포 관련 인자들 (MAP2, NeuroD1, Neurofilament)의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다 (A는 골수유래, B는 지방유래 중간엽 줄기세포).
- [24] 도 10은 1 Volt(V) 강도의 30 ~ 500 Hz 음파자극에서 제대유래 줄기세포의

- 신경세포마커의 발현을 mRNA로 분석한 결과이며,
- [25] 도 11은 1 Volt(V) 강도의 30 ~ 500 Hz 음파자극에서 제대유래 줄기세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과이며,
- [26] 도 12는 2.5 Volt(V) 강도의 30 ~ 300 Hz 음파자극에서 제대유래 줄기세포의 신경세포마커의 발현을 mRNA로 분석한 결과이며,
- [27] 도 13은 2.5 Volt(V) 강도의 30 ~ 300 Hz 음파자극에서 제대유래 줄기세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과이며,
- [28] 도 14는 1 Volt(V) 강도의 30 ~ 500 Hz 음파자극에서 골수유래 줄기세포의 신경세포마커의 발현을 mRNA로 분석한 결과이다.

[29]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [30] 본 발명은 음파를 중간엽 줄기세포에 처리하여, 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.
- [31] 본 발명에서 사용된 “음파”는 물체의 진동이 균일하던 매질 (공기)에 부분적으로 압력 변화를 일으켜서 종파의 형태로 고막을 진동시키는 것을 의미한다. 본 발명에서는 20 kHz 미만의 주파수 영역대로 특정 음파 대역 주파수를 갖는 진동을 중간엽 줄기세포에 처리하여 신경세포로의 분화를 유도할 수 있다.
- [32] 본 명세서에서 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)는 배아 유래 또는 성체조직 유래일 수 있으며, 골수유래, 지방유래 또는 제대유래 일 수 있다.
- [33] 줄기세포란 미분화 세포로서, 오랜 기간 동안 분열을 하고 자기 갱신(self-renewal)을 할 수 있으며, 어떤 조건이 주어지면 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 줄기세포는 기원되는 조직에 따라 배아줄기세포와 성체줄기세포로 나뉘어지게 되는데, 잠재 능력은 배아줄기세포보다 한정적인 단점이 있으나 윤리적 문제가 없고 부작용이 없는 성체 줄기세포를 대상으로 많은 치료제가 연구되고 있다.
- [34] 구체적으로, 본 발명에서는 성체 줄기세포를 이용하고, 이는 시판되는 줄기세포나 생체조직으로부터 분리한 줄기세포를 이용할 수 있다.
- [35] 본원 발명에서는 특정 주파수의 음파를 이용하여 성체줄기세포를 신경세포로 분화 유도하는 방법에 관한 것으로 체외에서 음파를 이용한 성체줄기세포의 신경분화유도기술 확보하였다.
- [36] 본 발명의 일 실시예 (실시예 1)에서는 도 1에 있는 음파발생장치를 이용하여 음파 (1.0V, 10~40Hz)를 5일간 조사한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 비처리군 (A)에 비해 음파처리군 (B~E) 중에서 특히 30~40Hz에서 중간엽 줄기세포가 신경세포 유사 형태로 바뀌었으며, 도 3에서 세포수를 측정하였을 때, 특히 30~40Hz에서 세포의 증식이 더 이상 진행되지 않았다. 뿐만 아니라, 성장인자를 따로 넣지 않은 배지에서 음파의 효과만으로 Nestin의 발현이 감소되었으며(도

4), 음파 노출 후 중간엽 줄기세포의 형태가 변화되고, 신경줄기세포의 마커인 NeuroD1과 Neurofilament의 발현을 mRNA 수준에서 확인할 수 있었다 (도 5). 이러한 음파의 효과는 단백질 수준에서도 관찰되었는데, 음파를 5일 처리한 시료에서 신경관련 단백질인 tau 단백질의 발현이 증가하였다 (도 6).

[37] 또한 본 발명의 일 실시예에서는 골수 유래 및 지방유래 중간엽 줄기세포에 10~40Hz의 1.0V의 음파를 5일간 노출시킨 결과, 신경-유사 형태로 변화된 세포가 관찰되었고 그 세포의 증식이 현저히 저하된 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, mRNA 수준에서 신경세포마커의 발현을 확인한 결과 특히 30 혹은 40Hz에서 MAP-2, NeuroD1, NF-L 발현이 현저히 증가함을 확인하였다 (도 9).

[38] 음파의 주파수 범위를 넓혀 신경세포로의 분화여부를 관찰한 결과, 강도 1V의 30부터 200 Hz 범위의 음파자극에서 신경 세포로의 분화가 촉진되었음을 확인할 수 있었다.

[39] 아울러, 2.5V 강도의 음파를 이용하여 신경분화여부를 관찰한 결과, 1V 뿐만 아니라 2.5V의 강도에서도 30 ~ 300 Hz에서 제대유래 줄기세포가 신경세포로 분화가 촉진됨을 확인할 수 있었다.

[40]

[41] 상기 실험결과를 바탕으로 본 발명의 음파 주파수는 1 내지 500Hz의 주파수로 처리되는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는, 30 내지 300Hz의 주파수로 처리되는 것이다. 가장 바람직하게는 30 내지 70HZ로 처리되는 것이다. 또한 음파의 강도는 0.1 내지 5V의 강도로 처리되는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 0.5 내지 3V의 강도로 처리되는 것이며, 가장 바람직하게는 0.5 내지 1.5V의 강도로 처리되는 것이다.

[42]

[43] 본 발명의 중간엽 줄기세포는 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양될 수 있다.

[44] 본 발명의 중간엽 줄기세포 분화 장치는 바람직하게는 도 1에 예시된 형태일 수 있다. 또한, 도 1에 도시되지 않은 부분이더라도, 본 발명의 기술분야에 종사하는 자들에게 널리 공지된 기술을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 본 발명의 기술적 사상의 범주에 포함된다.

[45] 본 발명의 신경세포로의 분화방법은 성장용 배지 조건에서도 신경분화를 유도하는 장점이 있다.

[46]

[47] 또한 본 발명은 상기 방법으로 분화된 신경세포를 포함하는 신경질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

[48] 본 발명의 조성물은 중간엽 줄기세포에서 분화된 신경세포를 원료로 하므로, 독성이 없고 안전하다.

[49] 상기 신경질환 치료용 조성물은 본 발명의 신경세포 외에 발명의 기술분야에 종사하는 자들에게 널리 공지된 약학적 조성물을 포함할 수 있으며, 다양한 제형의 형태로 변경될 수 있고, 이는 본 발명의 기술적 사상의 범주에 포함됨이

자명하다.

- [50] 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 폐포를 발달시킬 수 있는 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 앰플과 같은 주사제 등이 바람직하다. 상기 주사용 앰플은 사용 직전에 주사액과 혼합 조제할 수 있으며, 주사액으로는 생리 식염수, 포도당, 만니톨, 링거액 등을 사용할 수 있다.
- [51] 상기 약학적 제제에는 상기 유효성분 외에 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소 투여용 제제의 경우에는 기재 (base), 부형제, 운활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [52] 이렇게 제조된 본 발명의 조성물 또는 약학적 제제는 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 기타 용도에 사용되는 다른 줄기세포와 함께 또는 그러한 줄기세포와의 혼합물의 형태로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 폐질환 부위에 직접 생착 또는 이식하거나 기도에 직접 이식 또는 주입하는 것이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 흉부 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하나 카테터를 이용한 비외과적 투여방법이 보다 바람직하다.
- [53] 본 발명의 신경질환은 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈, 척수손상 등을 포함하는 신경질환을 모두 의미하며, 본 발명에 따라 분화된 신경세포 또는 신경줄기세포는 신경질환에서 신경세포의 기능을 회복함으로써 신경질환 치료제로서 기능할 수 있다.
- [54] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[55]

[56] <참조예 1> 중간엽 줄기세포의 분리

- [57] 분만시 배출된 인간의 탯줄 (제대)을 인산완충용액으로 3회 세척하고 혈관주변 평활근 부위와 상피층을 제거한 후 남은 왓튼 젤리 (Wharton jelly) 층을 약 3 mm×3 mm로 작게 자른 다음, 배양 용기에 넣고 4시간 정도 37°C의 인큐베이터에 방치하여 조직을 용기 바닥에 잘 부착시켰다. 상기 배양용기에 우태아 혈청 (FBS)이 10% 포함된 DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) 배지를 넣어 1주간 배양하면 탯줄의 왓튼 젤리로부터 세포가 흘러나오기 시작하며, 세포가 배양용기 바닥에 80%이상 증식하면 계대배양을 실시하여 세포원으로 사용하였다.

[58]

- [59] <실시예 1> 1 Volt 강도의 음파 (10~40Hz)를 이용하여 제대유래 중간엽 줄기 세포로부터 신경세포로의 분화 유도능 확인
- [60] 음파를 이용하여 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화 유도하는 방법에 관한 것으로 본 방법은 성장용 배지 조건에서도 신경분화를 유도하는 장점이 있다. 실험에 사용한 골수 유래 중간엽 줄기세포는 Lonza사의 세포를 사용하였으며, 지방유래 중간엽 줄기세포는 Invitrogen사의 세포를 사용하였다. 성장용 배지로는 NH 배지 (Mylteni 사)를 이용하여 5일간 배양하였다. 일차 배양된 제대유래 줄기세포를 NH배지 (Mylteni 사)를 이용하여 계대배양 3회를 실시한 뒤 100mm 디쉬에  $8 \times 10^4$  cell씩 접종하였다. 실험에 사용한 중간엽 줄기세포들은 모두 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양되었다.
- [61] 상기 제대유래 중간엽 줄기세포에 10~40Hz의 1.0V의 음파를 5일간 노출시키고, 그 결과를 관찰하였다. 도 2에서 볼 수 있듯이, 세포가 신경-유사 형태로 변화되었고, 그 세포의 증식이 현저히 저하되었다 (도3). mRNA 수준에서 신경세포마커의 발현을 확인한 결과, 특히 30~40Hz에서 MAP-2, NeuroD1, NF-L 발현이 현저히 증가함을 확인하였으며 (도 5), 10~20Hz 에서는 그 발현이 매우 약했다. 단백질 수준에서 신경관련 단백질인 tau의 발현을 관찰한 결과, tau 단백질의 발현이 증가하였다 (도 6). 이는 주파수에 따라 발현 양상이 다른 것이며, 이것은 특정 주파수와 세기에서 신경세포로 분화되는 것으로 판단되었다.
- [62]
- [63] <실시예 2> 1 Volt 강도의 음파 (10~40Hz)를 이용하여 골수유래 및 지방유래 중간엽 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도능 확인
- [64] 성장용 배지로는 제대유래 중간엽 줄기세포 동일하게 NH 배지 (Mylteni 사)를 이용하여 5일간 배양하였다. 일차 배양된 제대유래 줄기세포를 NH배지 (Mylteni 사)를 이용하여 계대배양 3회를 실시한 뒤 100mm 디쉬에  $8 \times 10^4$  cell씩 접종하였다. 실험에 사용한 중간엽 줄기세포들은 모두 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양되었다.
- [65] 상기 골수 및 지방유래 중간엽 줄기세포에 10~40Hz, 1.0V의 음파를 5일간 노출시키고, 그 결과를 관찰하였다. 도 7에서 확인되는 바와 같이, 신경-유사 형태로 변화된 세포가 관찰되었고, 그 세포의 증식이 현저히 저하된 것을 확인하였다 (도8). mRNA 수준에서 신경세포마커의 발현을 확인한 결과, 특히 30 혹은 40Hz에서 MAP-2, NeuroD1, NF-L 발현이 현저히 증가되었고 (도 9), 10~20Hz 에서는 그 발현이 매우 약했다. 이는 주파수에 따라 발현 양상이 다른 것이며, 이것은 특정 주파수와 세기에서 신경세포로 분화되는 것으로 판단되었다.
- [66]
- [67] <실시예 3> 1 Volt 강도의 음파 (30Hz~500Hz)를 이용한 제대유래 줄기세포의 신경분화 유도 확인

[68] 일차 배양된 제대유래 줄기세포를 NH배지 (Mylteni 사)를 이용하여 계대배양 5회를 실시한 뒤 100mm 디쉬에  $1 \times 10^5$  cell씩 접종하였다. 정치배양군은 세포에 음파자극을 주지 않고, 나머지를 각각 30, 100, 200, 300, 500 Hz (1.0V 강도)의 음파자극을 주었으며, NH 배지에서 3일간, 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양하였다.

[69] mRNA 수준에서 신경세포마커의 발현을 확인한 결과 특히 30~200 Hz에서 MAP-2, NeuroD1, Tau 발현이 정치배양군에 비해 증가하였고, 특히 200 Hz에서 NF-L 발현이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다 (도 10). 이때 세포를 광학현미경으로 관찰한 결과, 정치배양군에 비해 30~200 Hz에서 신경돌기가 형성 (화살표)되어 신경-유사 형태로 변화된 것을 관찰할 수 있었다 (도 11).

[70] 즉, 제대유래 줄기세포는 강도 1V의 30부터 200 Hz 범위의 음파자극에서 신경 세포로의 분화가 촉진됨을 확인할 수 있었다.

[71]

[72] <실시예 4> 2.5 Volt 강도의 음파 (30 ~ 500Hz)를 이용한 제대유래 줄기세포의 신경분화 유도 확인

[73] 일차 배양된 제대유래 줄기세포를 NH배지 (Mylteni 사)를 이용하여 계대배양 6회를 실시한 뒤 100mm 디쉬에  $1 \times 10^5$  cell씩 접종하였다. 정치배양군은 세포에 음파자극을 주지 않고, 나머지를 각각 30, 100, 200, 300, 500 Hz (2.5V 강도)의 음파자극을 주었으며, NH 배지에서 3일간, 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양하였다.

[74] mRNA 수준에서 신경세포마커의 발현을 확인한 결과 특히 30 ~ 200 Hz에서 NeuroD1 발현이 정치배양군에 비해 증가하였고, 100 Hz와 300 Hz에서 DCX 발현이 정치배양군에 비해 증가하였다. 특히 모든 음파 자극군에서 Nestin의 발현이 줄어들어 따라 신경세포로의 분화가 진행되고 있음을 확인할 수 있었다 (도 12). 이때 세포를 광학현미경으로 관찰한 결과, 정치배양군에 비해 30 ~ 300 Hz에서 신경돌기가 형성 (화살표)되어 신경-유사 형태로 변화되었다 (도 13).

[75] 즉, 제대유래 줄기세포는 1V 뿐만 아니라 2.5V의 강도에서도 음파자극에서 신경 세포로의 분화가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

[76]

[77] <실시예 5> 1 Volt 강도의 음파 (30 ~ 500Hz)를 이용한 골수유래 줄기세포의 신경분화 유도 확인

[78] 일차 배양된 골수유래 줄기세포를 low glucose DMEM/10% FBS 배지 (Gibco 사)를 이용하여 계대배양 6회를 실시한 뒤 100mm 디쉬에  $1 \times 10^5$  cell씩 접종하였다. 정치배양군은 세포에 음파자극을 주지 않고, 나머지를 각각 30, 100, 200, 300, 500 Hz (1V 강도)의 음파자극을 주었으며, low glucose DMEM/10% FBS 배지에서 3일간, 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양하였다.

[79] mRNA 수준에서 신경세포마커의 발현을 확인한 결과 특히 100 Hz에서

NeuroD1와 NF-L 발현이 정치배양군에 비해 증가하였다. Nestin의 발현이 정치배양군에 비해 줄어듦에 따라 신경세포로의 분화가 진행되고 있음을 알 수 있었다 (도14).

- [80] 즉, 골수유래 줄기세포는 1V, 100Hz 강도의 음파자극에서도 신경 세포로의 분화가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

### 산업상 이용가능성

- [81] 본 발명에 따른 음파를 이용한 줄기세포 분화 방법 및 분화장치는 저주파수의 파동을 이용하여 성체줄기세포를 신경세포로 분화 유도함으로써, 세포획득이 어려운 신경세포나 신경줄기세포의 용이한 수득이 가능하게 되며, 성장인자 추가에 따른 고비용의 신경분화유도 배지가 아닌 저가의 일반배지 조건에서도 신경분화를 유도할 수 있기 때문에 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈, 척수손상 등의 뇌신경질환치료에 유용하게 활용 될 수 있다.

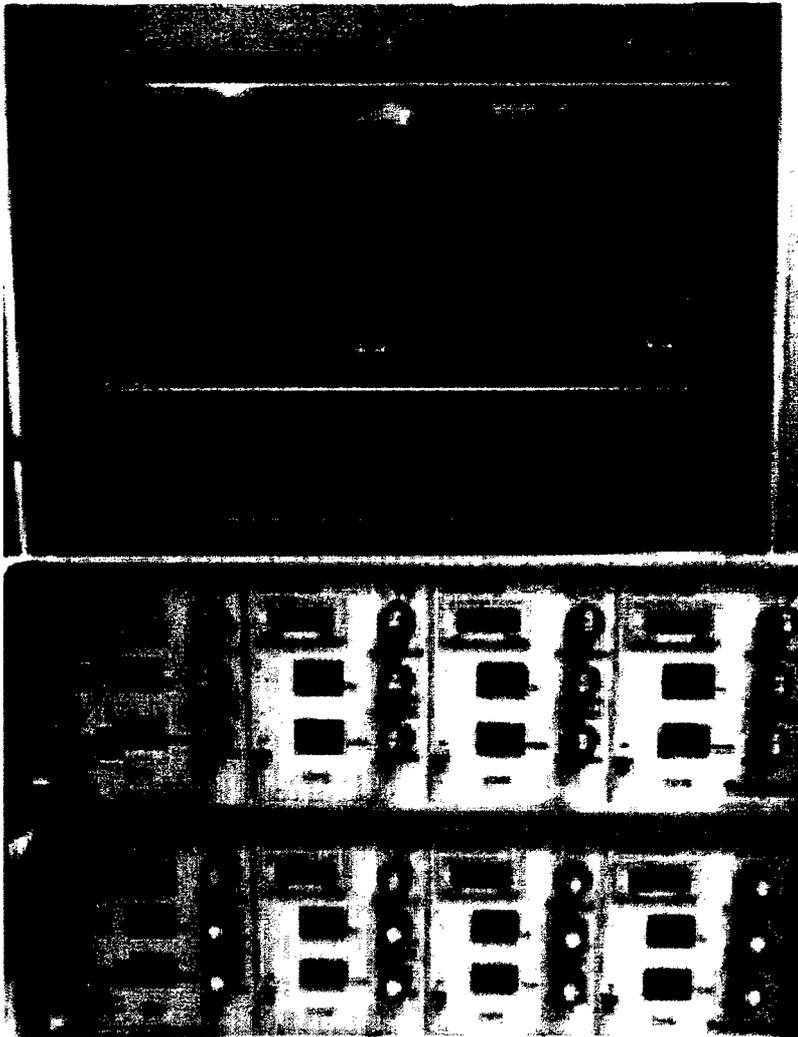
[82]

[83]

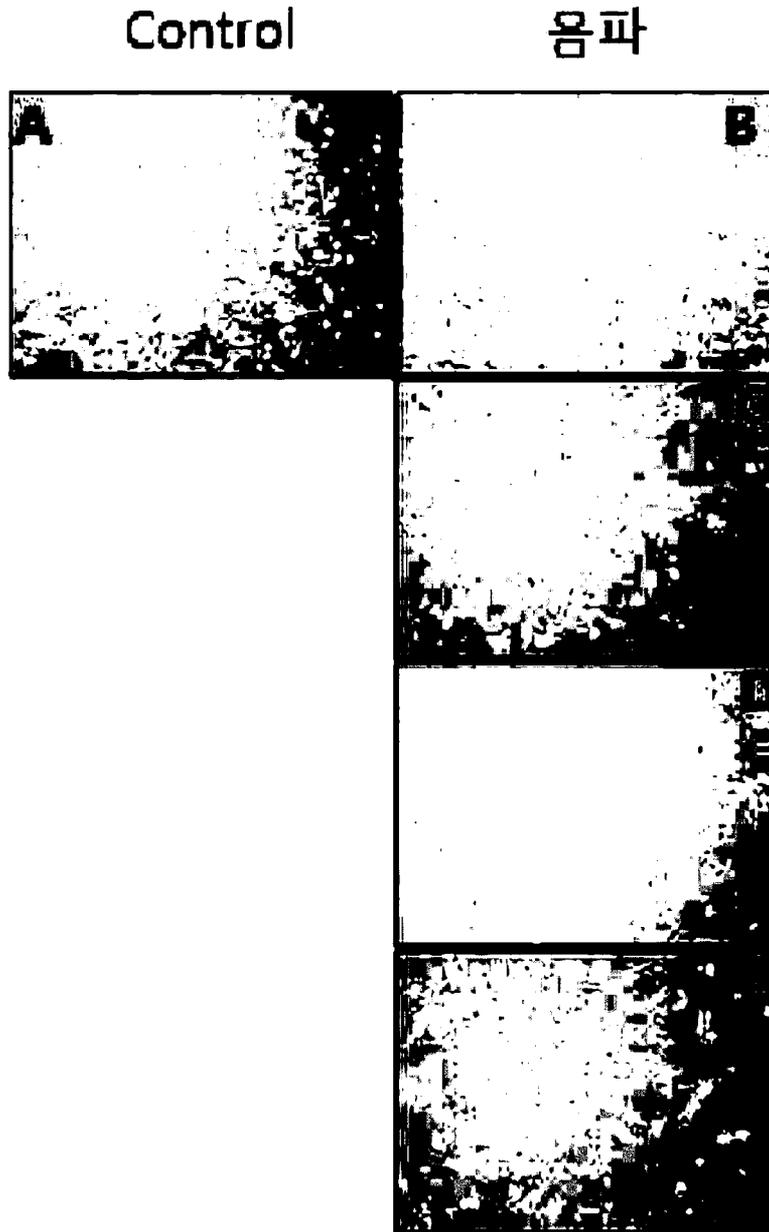
## 청구범위

- [청구항 1] 음파를 중간엽 줄기세포에 처리하여, 중간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 음파는 1 내지 500Hz의 주파수로 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 음파는 30 내지 300Hz의 주파수로 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 음파는 0.1 내지 5V의 강도로 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 음파는 0.5 내지 3V의 강도로 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 골수유래, 지방유래, 체대혈 유래 또는 체대 유래인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 분화된 신경세포를 포함하는 신경질환 치료용 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈 또는 척수손상인 것을 특징으로 하는 조성물.

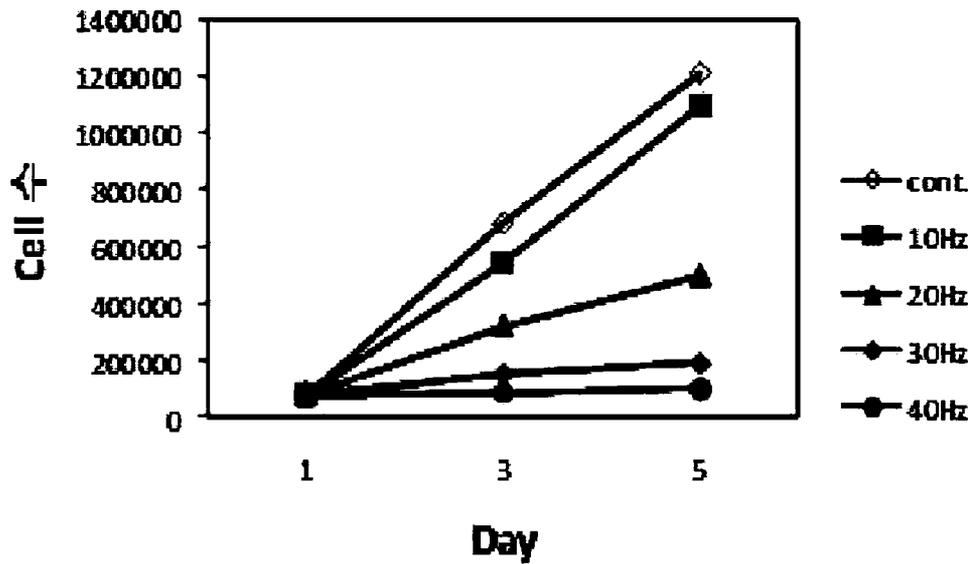
[Fig. 1]



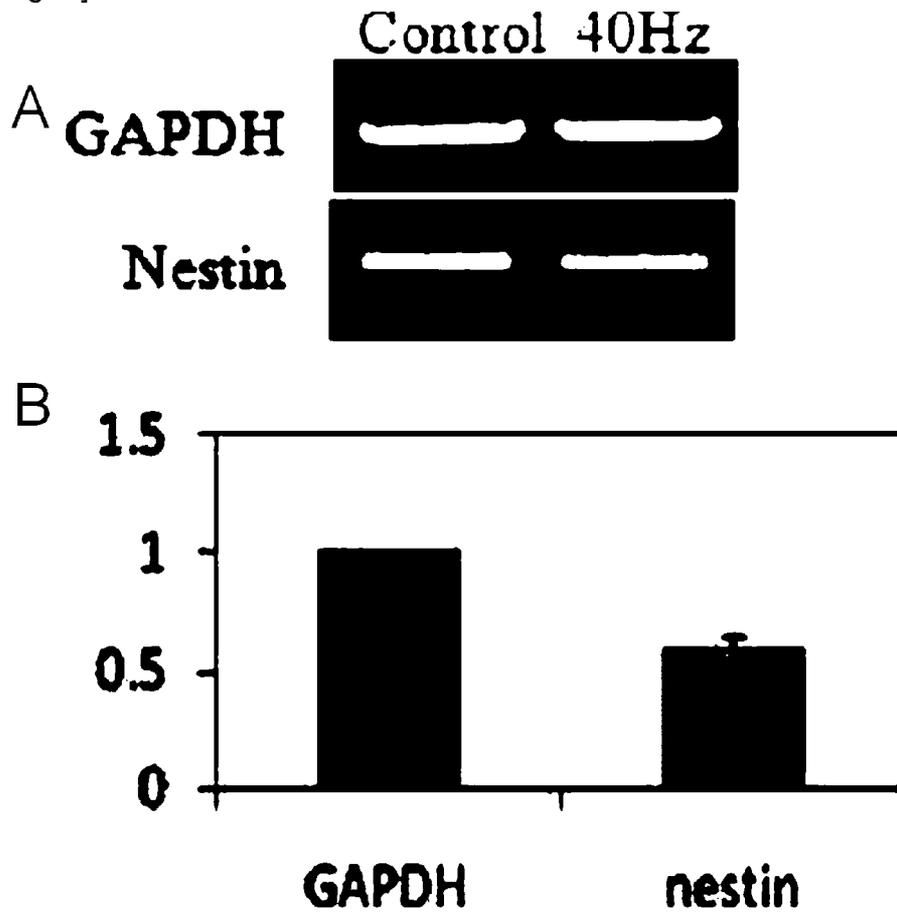
[Fig. 2]



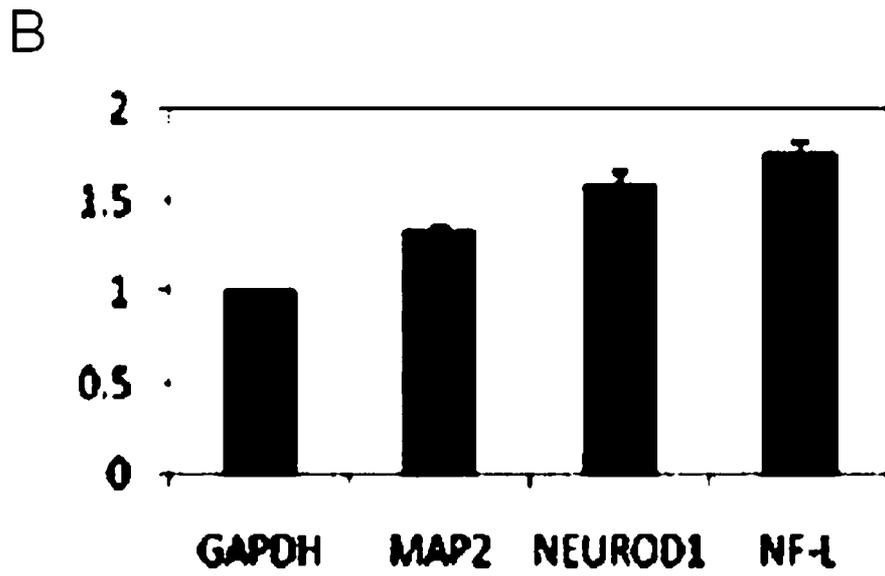
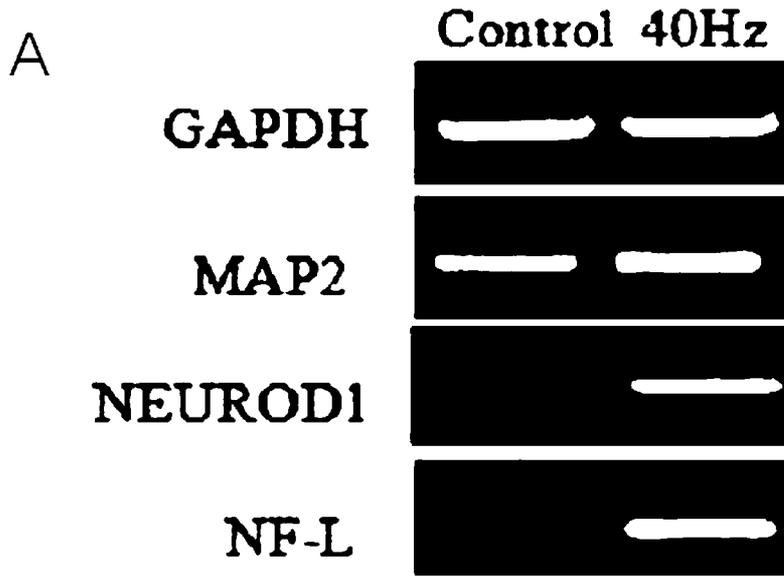
[Fig. 3]



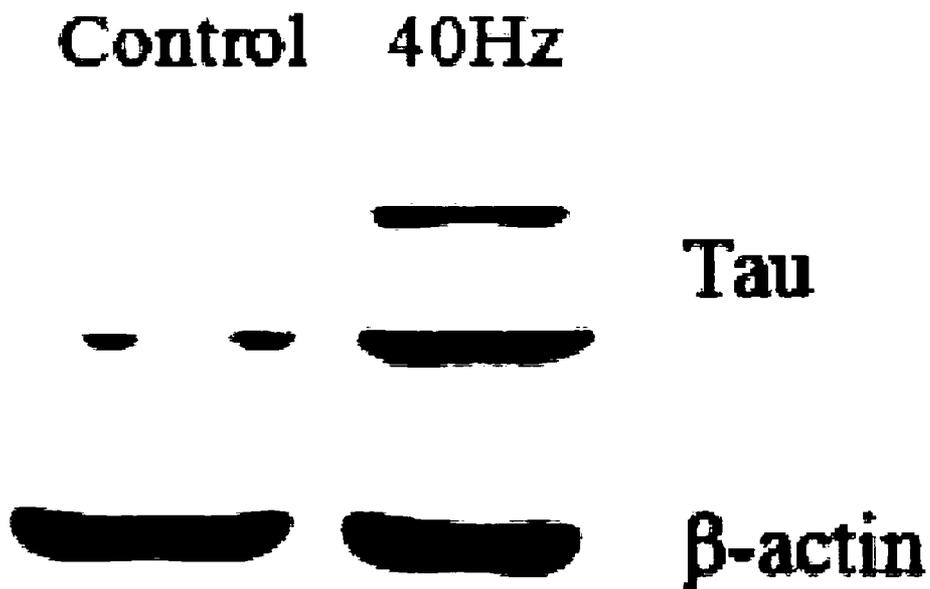
[Fig. 4]



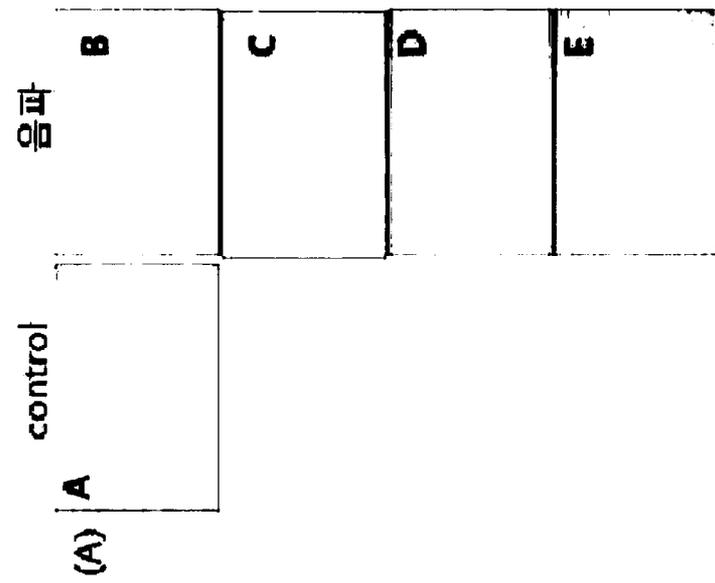
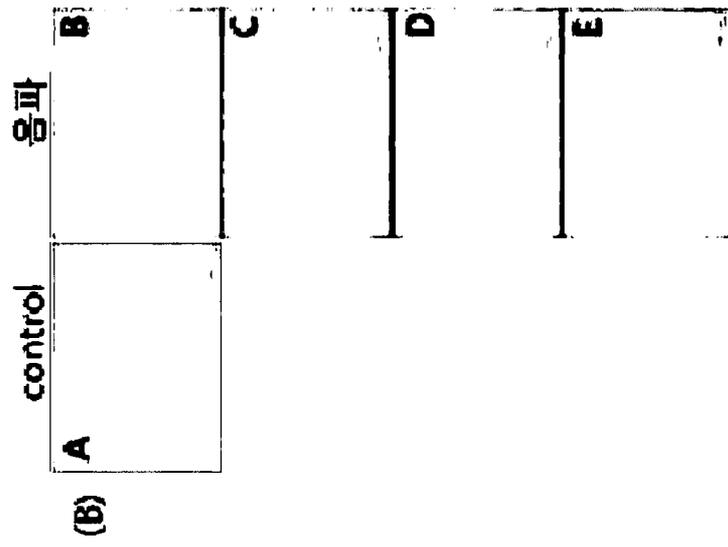
[Fig. 5]



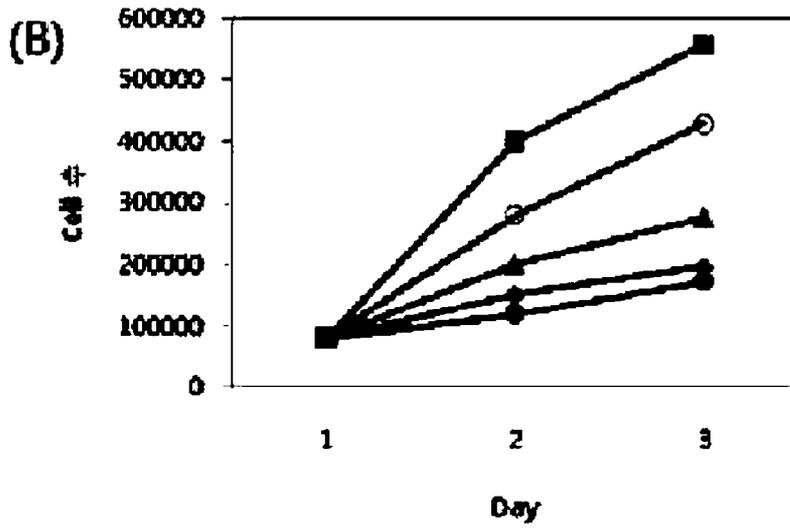
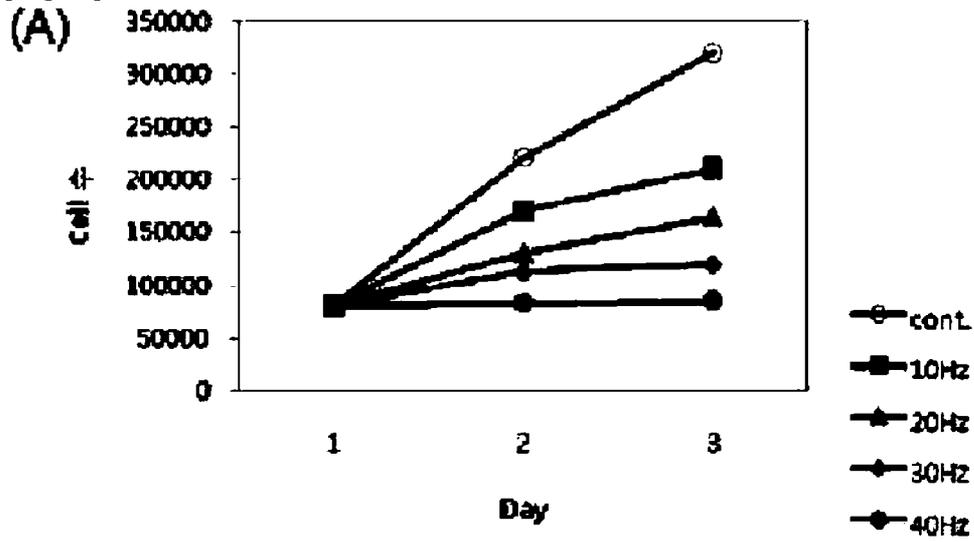
[Fig. 6]



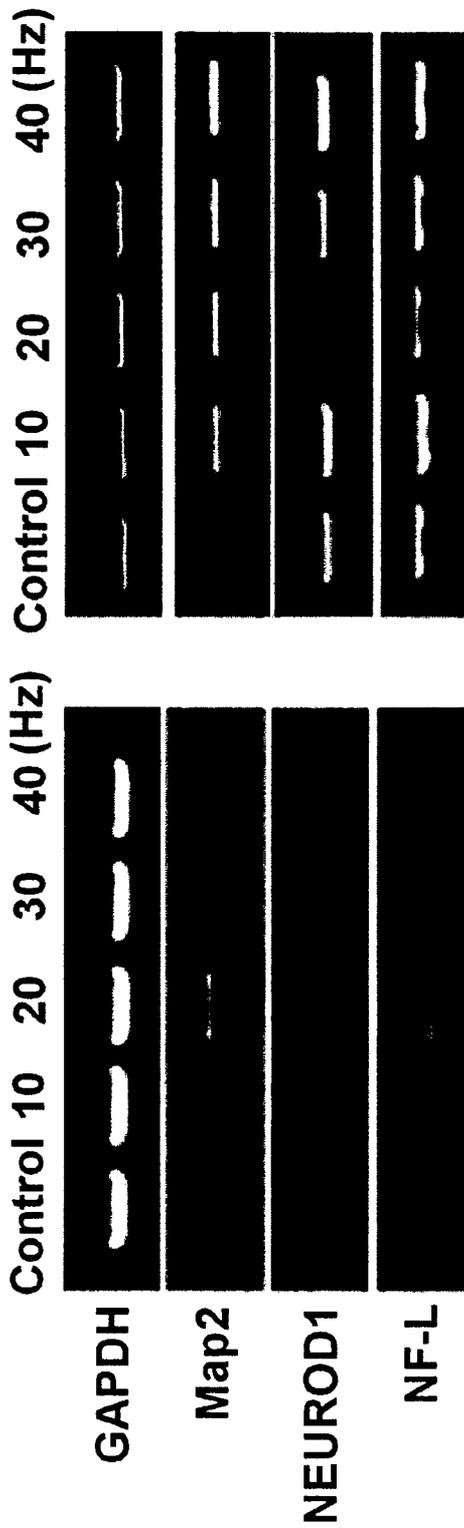
[Fig. 7]



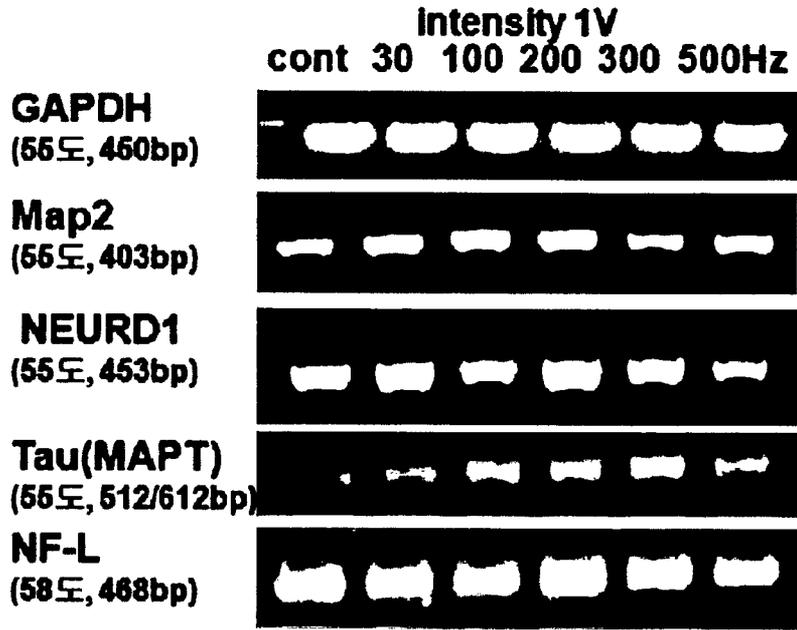
[Fig. 8]



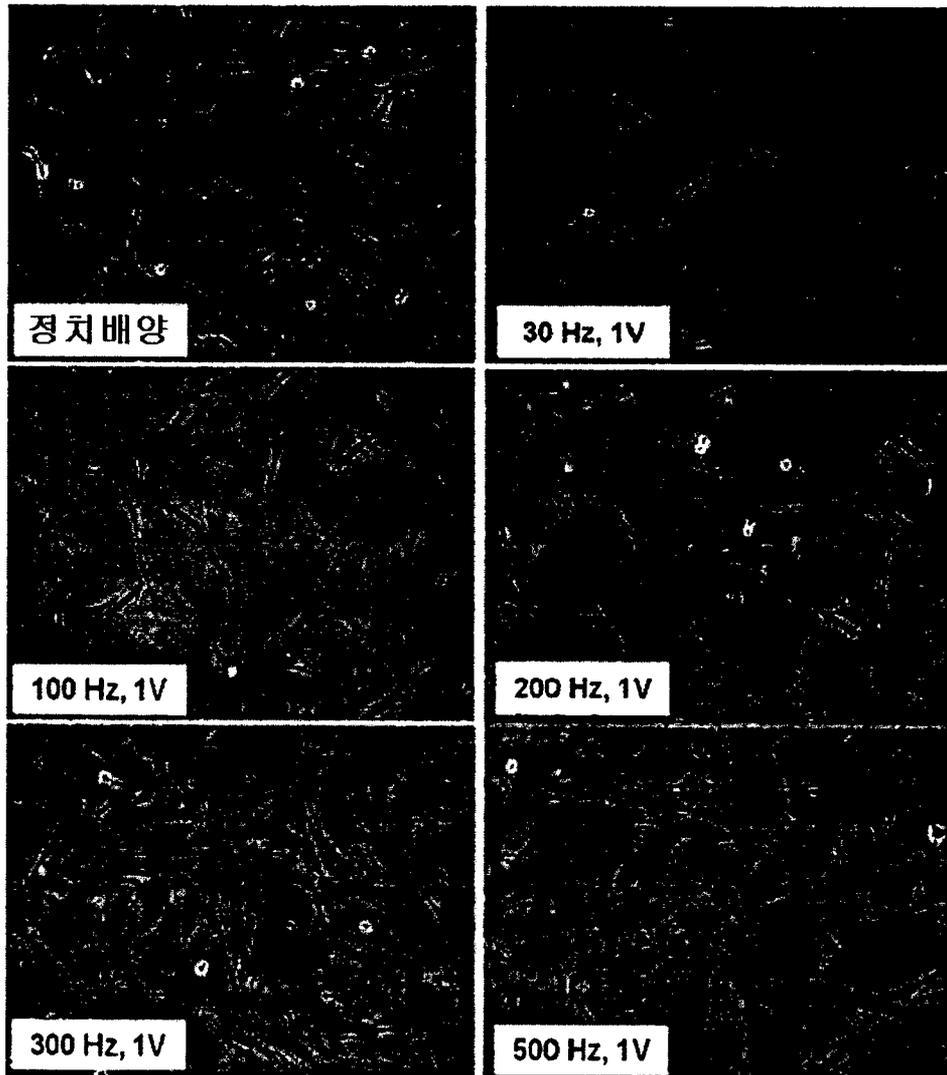
[Fig. 9]



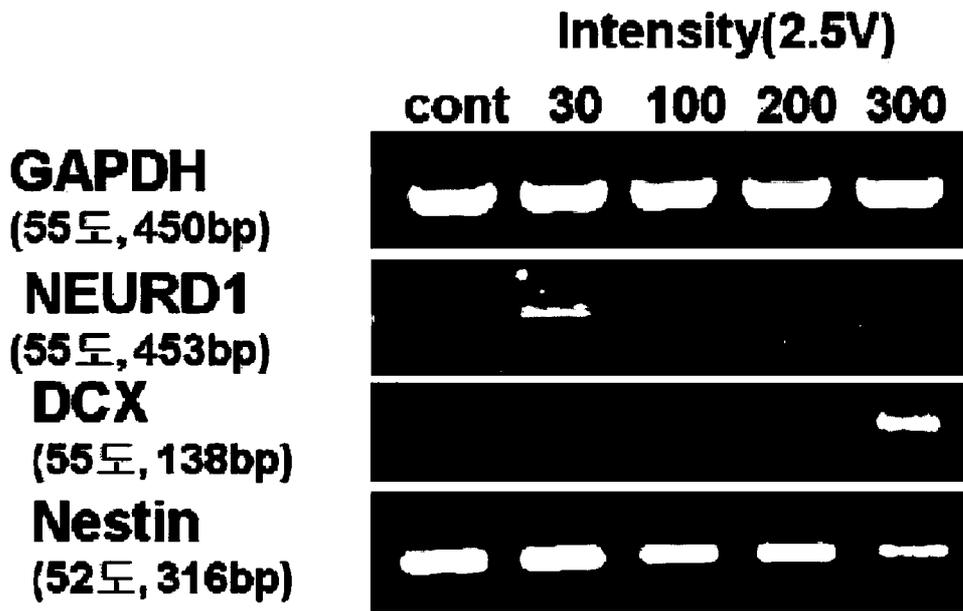
[Fig. 10]



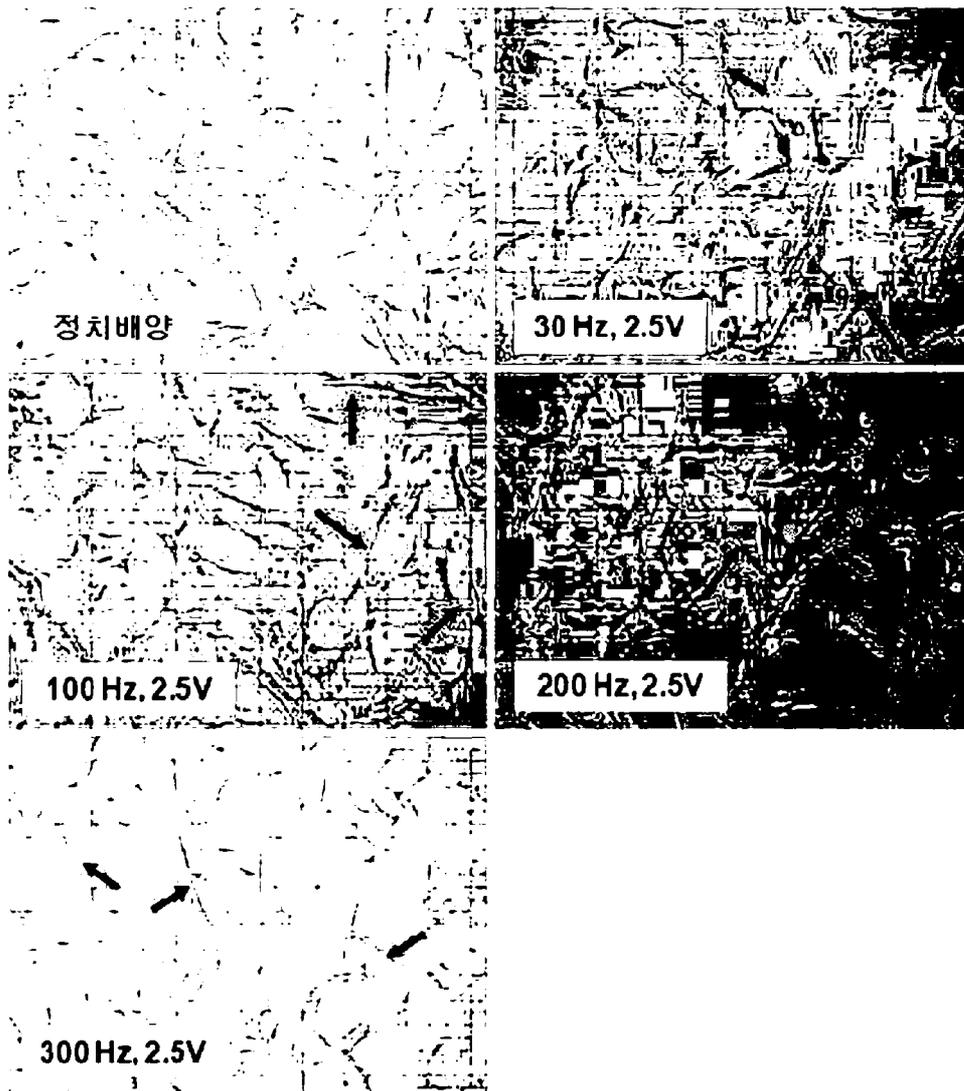
[Fig. 11]



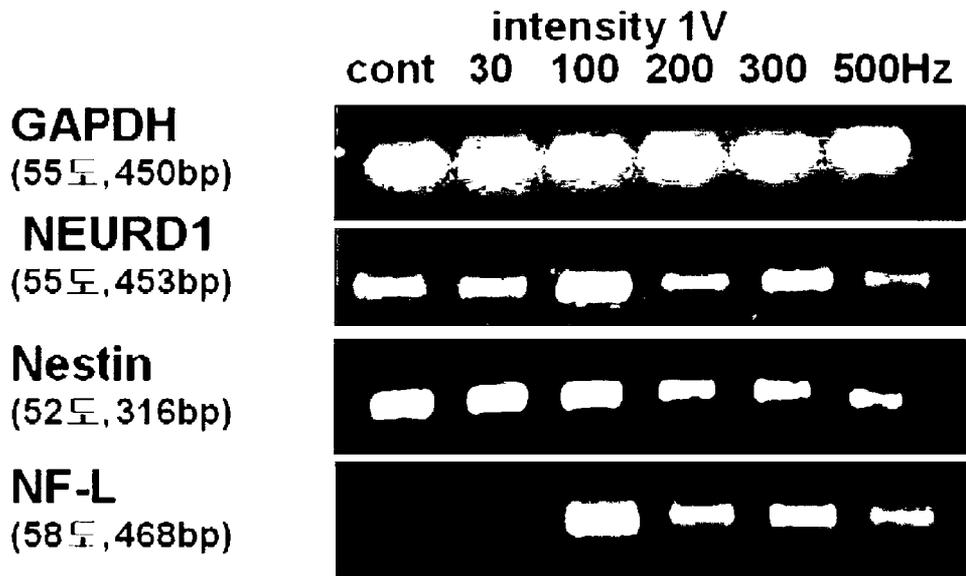
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2011/004191**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N 13/00(2006.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 5/079(2010.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 13/00; C12N 5/077; C12N 5/079; C12N 5/0775; C12N 5/0789

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above  
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: sound wave, mesenchyma, stem cell, nerve cell, differentiation, frequency, strength, nervous disorder, parkinson, ischemic stroke, spinal cord injury

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	ANGHILERI, E. et al., STEM CELLS AND DEVELOPMENT (2008) Vol.17, pages 909-916 See abstract and page 913.	7,8 1-6
X A	KR 10-0890992 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 27 March 2009 See abstract and paragraph [0019].	7,8 1-6
X A	KR 10-2009-0055691 A (MEDIPOST CO., LTD.) 03 June 2009 See abstract and claims 1-5.	7,8 1-6
A	KR 10-2005-0044849 A (INHA UNIVERSITY) 13 May 2005 See abstract and claims 1-11.	1-8
A	KR 10-0684932 B1 (REGENPRIME CO., LTD AND PARK, SO RA) 20 February 2007 See abstract and claims 1, 4, 6 and 10.	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 JANUARY 2012 (05.01.2012)

Date of mailing of the international search report

**06 JANUARY 2012 (06.01.2012)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2011/004191**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0890992 B1	27.03.2009	KR 10-2008-0068351 A	23.07.2008
KR 10-2009-0055691 A	03.06.2009	NONE	
KR 10-2005-0044849 A	13.05.2005	WO 2005-045008 A1	19.05.2005
KR 10-0684932 B1	20.02.2007	KR 10-2006-0108451 A	18.10.2006

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
  
**C12N 13/00(2006.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 5/079(2010.01)i**

**B. 조사된 분야**  
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12N 13/00; C12N 5/077; C12N 5/079; C12N 5/0775; C12N 5/0789

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌  
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 음파, 중간엽, 줄기세포, 신경세포, 분화, 주파수, 강도, 신경질환, 파킨슨, 뇌경색, 척수손상

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	ANGHILERI, E. 외 8명, STEM CELLS AND DEVELOPMENT (2008) Vol.17, pages 909-916 초록 및 913쪽 참조.	7,8 1-6
X A	KR 10-0890992 B1 (재단법인 서울대학교 산학협력재단) 2009.03.27 요약 및 식별번호 [0019] 참조.	7,8 1-6
X A	KR 10-2009-0055691 A (메디포스트(주)) 2009.06.03 요약 및 청구항 1-5 참조.	7,8 1-6
A	KR 10-2005-0044849 A (학교법인 인하학원) 2005.05.13 요약 및 청구항 1-11 참조.	1-8
A	KR 10-0684932 B1 ((주)필미아젠 및 박소라) 2007.02.20 요약 및 청구항 1, 4, 6 및 10 참조.	1-8

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌  
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌  
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌  
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2012년 01월 05일 (05.01.2012)	국제조사보고서 발송일 <b>2012년 01월 06일 (06.01.2012)</b>
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 정재철 전화번호 82-42-481-8403 
--	--

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0890992 B1	2009.03.27	KR 10-2008-0068351 A	2008.07.23
KR 10-2009-0055691 A	2009.06.03	없음	
KR 10-2005-0044849 A	2005.05.13	WO 2005-045008 A1	2005.05.19
KR 10-0684932 B1	2007.02.20	KR 10-2006-0108451 A	2006.10.18