

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0126463 (43) 공개일자 2012년11월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0797 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호	10-2011-0044267	(72) 발명자 홍성희 서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)
(22) 출원일자	2011년05월11일	오승익 서울특별시 구로구 신도림로 87, 동아1차 아파트 107동 2502호 (신도림동)
심사청구일자	2011년05월11일	(74) 대리인 김선애

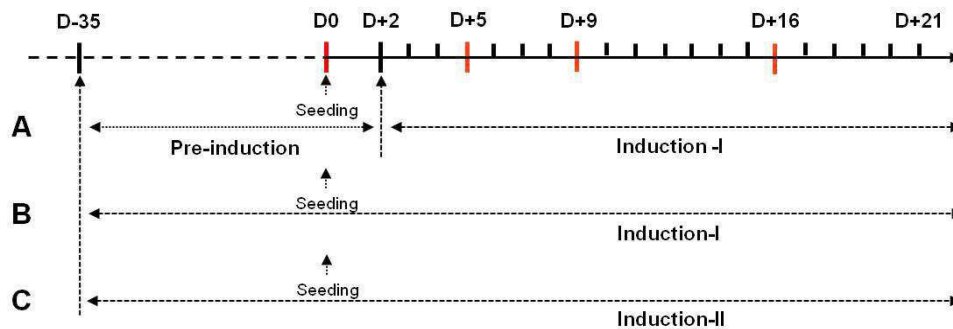
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 외부유전자의 도입 없이 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포를 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지를 포함하는 전-유도배양액(Pre-induction media)에서 배양하는 단계; 및 DMEM/F-12 배지를 포함하는 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)에서 배양하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법 및 상기 방법에 의한 신경줄기세포에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의하면, 본 발명은 외래유전자의 도입 없이 배양액만을 이용하여 중간엽 줄기세포(bone marrow derived stem cells)에서 자가이식(Autograft)이 가능한 신경줄기세포(Neural stem cells)를 높은 효율로 유도, 생산할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100020349

부처명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 생체분해 나노파티클을 이용한 안전한 유도만능 줄기세포주 개발과 조직-특이 세포 분화 이식 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.30 ~ 2011.06.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100023160

부처명 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자지원-기본연구

연구과제명 체세포의 신경세포 유도 및 세포치료제 개발연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.30

특허청구의 범위

청구항 1

중간엽 줄기세포를 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지를 포함하는 전-유도배양액(Pre-induction media)에서 배양하는 단계; 및

DMEM/F-12 배지를 포함하는 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)에서 배양하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전-유도배양액은 상기 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지의 글루코스 농도가 20~30 mM인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전-유도배양액은 글루타민 (L-glutamin) 및 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)이 더 포함되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 전-유도배양액(Pre-induction media)에서 배양하는 단계는 중간엽 줄기세포를 전-유도배양액에서 3~5주 동안 유지하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)은 17.5 mM의 글루코스를 함유하는 DMEM/F-12와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin), 1% ITS (Insulin/Transerrin/Selenite) 그리고 0.2 mM 아스코빅 엑시드 (L-Ascorbic acid)를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법

- (1) 신경줄기세포 마커인 NCAM, Nestin, Tuj1 및 Sox2에 대하여 양성 면역학적 특성을 나타냄
- (2) 유도된 신경줄기세포에서 Nestin과 NCAM의 발현이 골수유래 중간엽 줄기세포 보다 증가하는 특성을 나타냄
- (3) 신경줄기세포 유전자인 Sox1, Sox2, Musashi-1 및 NCAM 유전자 발현이 증가하는 특성을 나타냄

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 생산되는 신경줄기세포.

청구항 8

20~30 mM의 글루코스를 함유하는 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지에 8~10% FBS, 1~3 mM 글루타민 (L-glutamin) 및 3~5 mM 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)을 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 유도하기 위한 전-유도배양액 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 외부유전자의 도입 없이 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 외래유전자의 도입 없이 배양액만을 이용하여 중간엽 줄기세포(bone marrow derived stem

[0001]

cells)에서 자가이식(Autograft)이 가능한 신경줄기세포(Neural stem cells)를 높은 효율로 유도, 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 신경줄기세포를 이용한 난치성 뇌질환 치료는 약물치료와 외과적 수술로 치료하는 일반적인 방법외에 새로이 시도되고 있는 세포대체 요법이다. 신경줄기세포는 다양한 종류의 신경 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 다능성(multipotent) 상태에서 증식이 가능하며 특정 환경하에서 특정 신경 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 가진 세포를 말한다. 하지만 신경줄기세포를 확보하기에는 정상인의 척수, 뇌 이외에서 얻어낼 수 있는 방법은 거의 없기 때문에 현재는 다음과 같은 방법들이 사용되고 있다.
- [0003] 첫째, 인간의 배아줄기세포를 이용하여 신경 전구체 세포를 유도하여 사용하는 방법, 둘째, 유도만능줄기세포를 이용하여 신경 전구체 세포를 유도하여 사용하는 방법, 셋째, 피부세포에 신경세포분화에 관련된 특정 전사인자를 발현시켜 신경세포로 유도하는 방법, 넷째, 인간의 태아유래 신경줄기세포에 특정유전자를 도입하여 불멸화한 후 신경줄기 세포주를 이용하는 방법, 다섯째, 성체줄기세포를 이용한 방법으로 골수, 제대혈 또는 지방조직 유래의 줄기세포들을 이용한 신경줄기세포로 유도시켜 다능성 상태에서 증식시키는 방법이 있다.
- [0004] 상기에 기술한 방법들 중 몇몇 방법들은 임상실험 승인을 받는 등 현재 국내외 연구진들에 의해서 활발히 연구되고 있다. 그런데, 배아줄기세포를 이용하는 방법은 수정된 배아를 파괴해야 하므로 윤리적인 문제점을 가지고 있으며 배아줄기에서 분화된 세포를 환자에 이식했을 경우 면역 거부반응이 일어난다는 문제점이 있다. 또한, 유전자를 도입하는 유도 만능줄기세포를 이용하는 경우 역분화 유도를 위해 사용된 유전자의 수가 너무 많아 자세한 기작을 규명하기 어렵고 세포의 유전적 변이가 발생하거나 종양 형성을 일으킬 수 있는 문제점이 있다.
- [0005] 한편, 골수, 제대혈 또는 지방조직 유래의 줄기세포들을 이용한 신경줄기세포의 유도 방법은 상기 문제점들을 극복할 수 있으나, 그 효율이 낮은 문제점이 있다. 현재까지 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 신경줄기세포로 분화를 유도하는 방법들은 특정 항산화 물질(beta-Mercaptoethanol, Dimethylsulfoxide, Butylated Hydroxyanisol)을 포함한 전유도배지를 통해 신경 줄기세포로 유도시킨 후 성장인자(Brain-Derived Neurotrophic Factor, Platelet-Derived Growth Factor, Epidermal Growth Factor, Fibroblast Growth Factor-2)를 포함한 다양한 신경세포로 분화 시키는 유도배지방법이 사용되고 있으나 그 결과는 아직까지 미흡한 수준이다(Panagiota A Sotiropoulou *et al.*, Stem Cells, 2006, 24, 462-471), (Andreas Hermann *et al.*, Journal of Neuroscience Research, 2006, 83,1502-1514).
- [0006] 따라서, 윤리적인 문제, 면역거부반응, 외래 유전자 도입에 따른 종양형성문제 등을 회피할 수 있으며 유도 효율성도 높은 신경줄기세포의 유도, 생산방법에 대한 요구가 계속적으로 있어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기 종래기술을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 윤리적 문제, 면역거부반응, 외래 유전자 도입에 따른 종양형성 문제 등을 해결할 수 있는 성체줄기세포를 이용하여 신경줄기세포를 유도, 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 생산된 신경줄기세포를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 유도하기 위한 전-유도배양액 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지를 포함하는 전-유도배양액(Pre-induction media)에서 배양하는 단계; 및 DMEM/F-12 배지를 포함하는 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)에서 배양하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경

줄기세포를 유도하는 방법을 제공한다.

- [0012] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 생산되는 신경줄기세포를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 20~30 mM의 글루코스를 함유하는 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지에 8~10% FBS, 1~3 mM 글루타민 (L-glutamin) 및 3~5 mM 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)을 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 유도하기 위한 전-유도배양액 조성물을 제공한다.
- [0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0015] 본 발명자는 동물세포 배양시 사용되는 글루코스와 글루타민을 이용한 전-유도배지를 이용함으로써 세포면역형 광화학법(Immunofluorescence cytochemistry)을 통해서 신경줄기세포 특이적인 마커 (Tuj1, NCAM, Nestin 그리고 Sox2)의 발현이 높은 신경줄기세포를 유도할 수 있었다.
- [0016] 동물세포 배양시 이용되는 글루코스(Glucose)와 글루타민(Glutamine)은 세포증식에 필요한 주요 탄소원 및 에너지원으로 사용된다. 증식이 활발한 세포는 해당과정(Glycolysis)을 통해서 글루코스를 피루브산(Pyruvate)과 젖산(Lactate)으로 분해함으로써 ATP를 생성하고 생합성반응에 필요한 탄소분자들을 제공한다.
- [0017] 글루타민은 글루타민분해효소(Glutaminase)에 의한 글루타메이트(Glutamate)와 암모니아(Ammonia)로 분해되며, TCA (Tricarboxylic acid)회로로 들어가 다른 아미노산(Amino acid)합성을 위한 탄소골격(Carbon skeleton)에 이용된다(Christian M. Metallo *et al.*, Genes & Development, 2010, 24, 2717-2722).
- [0018] 최근 생쥐(Mice)의 경골(Tibia)과 대퇴골(Femurs)에서 분리된 골수세포(Bone marrow cell)를 배양시 세포배양액의 글루코스 농도가 높을수록 세포는 글루타민 흡수량 또한 증가시킨다는 사실을 보여주었다(Kathryn E. Wellen *et al.*, Genes & Development, 2011, 24, 2784-2799).
- [0019] 그리고 들쥐(Rat)의 뇌에서 분리한 신경전구세포(Neural precursor cell)를 고농도 (5~40 mM)의 글루코스가 포함된 배양액에서 배양시 신경세포 (Neurons)의 생존력 저하는 나타나지 않았으며, 또한 신경전구세포는 글루코스가 없는 고농도(10~20 mM)의 젖산을 포함한 배양액에서도 생존할 수 있다고 보고하고 있다(Sascha Wohnsland *et al.*, Neurochemical Research, 2010, 35,1635-1642).
- [0020] 그러므로 골수유래 중간엽 줄기세포를 이용한 신경줄기세포 유도시 사용되는 전-유도배양액에 글루코스와 글루타민의 양을 증가시킴으로써 신경줄기세포 특이적인 마커들의 발현이 높은 신경줄기세포를 유도할 수 있었다.
- [0021] 따라서 본 발명은 중간엽 줄기세포를 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지를 포함하는 전-유도배양액(Pre-induction media)에서 배양하는 단계; 및 DMEM/F-12 배지를 포함하는 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)에서 배양하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0022] 상기 전-유도배양액은 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 상기 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지의 글루코스 농도가 20~30 mM이고, 더욱 바람직하게는 25 mM이다. 본 발명의 전-유도배양액은 DMEM (둘베코 변형 이글 배지, Life Technologies社)에 포도당의 양만을 선택적으로 증가시킨 조성물을 기본 배지로 한다.
- [0023] 본 발명의 상기 전-유도배양액에는 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지에 성장에 필수적인 혈청, 성장인자, 및/또는 항생제 등이 포함될 수 있다. 바람직하게 상기 전-유도배양액에 글루타민 (L-glutamin) 및 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)이 포함된다. 이에 한정되는 것은 아니나, 보다 구체적인 실시예에 의하면 상기 전-유도배양액은 상기 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지에 10% FBS와 2mM 글루타민 (L-glutamin) 및 4mM 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine) 그리고 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin) 용액을 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0024] 상기 전-유도배양액에 배양하는 단계에서, 바람직하게 전-유도배양액에서 3~5주 동안, 더욱 바람직하게는 4주 동안 유지한다.
- [0025] 본 발명에서 '중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)'는 뼈(bone), 연골(cartilage), 지방(fat), 힘줄(腱), 신경 조직(nerve tissue), 섬유아세포(fibroblast) 및 근육 세포(muscle cell) 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 만능 전구 세포(pluripotent progenitors)를 말한다. 이 중간엽 줄기세포는 골수(bone marrow), 말초신경 혈액, 제대혈, 골막(periosteum), 진피(dermis) 및 중배엽 기원의 조직 등으로부터 분리되고

정제될 수 있다.

- [0026] 상기 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 인간의 골수로부터 분리하여 사용할 수 있는데, 골수에서 단핵세포를 분리한 후 이들을 1 내지 2주간 배양하면 분화되기 쉬운 조혈 줄기세포는 모두 분화되어 성숙한 혈구 세포들을 만들기 때문에 남아 있는 무한 증식 세포인 줄기세포만을 분리하는 방법에 의해서 손쉽게 중간엽 줄기세포만을 얻을 수 있다. 아울러, 골수에서 분리한 단핵세포에서 중간엽 줄기세포를 분리해내지 않고, 중간엽 줄기세포를 포함하는 단핵세포들 전체를 본 발명의 방법에 따라 배양하여도 신경줄기세포의 대량 생산이라는 동일한 효과를 얻을 수 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)은 구체적으로는 DMEM (둘베코 변형 이글 배지, Life Technologies)과 F12 (영양 혼합물 배지, Life Technologies)를 동일 비율로 첨가한 혼합 배지 조성(DMEM/F12)에 포도당의 양만을 선택적으로 증가시킨 조성물을 기본 배지로 한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 신경줄기세포 유도배양액(Induction media)은 17.5 mM의 글루코스를 함유하는 DMEM/F-12와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-streptomycin), 1% ITS (Insulin/Transerrin/Selenite) 그리고 0.2 mM 아스코빅 엑시드 (L-Ascorbic acid)를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0028] 본 발명에 의해 생산된 신경줄기세포는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 한다(도 4 ~ 도 7 참조)
- [0029] (1) 신경줄기세포 마커인 NCAM, Nestin, Tuj1 및 Sox2에 대하여 양성 면역학적 특성을 나타냄
- [0030] (2) 유도된 신경줄기세포에서 Nestin과 NCAM의 발현이 골수유래 중간엽 줄기세포 보다 증가하는 특성을 나타냄
- [0031] (3) 신경줄기세포 유전자인 Sox1, Sox2, Musashi-1 및 NCAM 유전자 발현이 증가하는 특성을 나타냄
- [0032] (4) 세포 배양 접시에 부착되어 증식하고, 핵이 전체세포에 비해서 상대적으로 크고 약간 검은색을 나타내는 둥글고 유선형의 형태학적 특성을 나타냄.
- [0033] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 생산되는 신경줄기세포를 제공한다.
- [0034] 상술한 바와 같이, 본 발명의 방법으로 생산되는 신경줄기세포는 다양한 신경줄기세포의 마커 및 유전자 발현이 나타나고 Nestin과 NCAM의 발현이 골수유래 중간엽 줄기세포보다 큰 폭으로 증가하는 특성이 있다. 따라서 본 발명에 의한 신경줄기세포는 면역거부반응 또는 종양형성 문제 등이 없으며 안정적이고 특정환경하에서 특정 신경세포로 분화될 수 있는 가능성이 있다.
- [0035] 본 발명은 20~30 mM의 글루코스를 함유하는 하이 글루코스 (high glucose) DMEM 배지에 8~10% FBS, 1~3 mM 글루타민 (L-glutamin) 및 3~5 mM 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)을 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포로부터 신경줄기세포를 유도하기 위한 전-유도배양액 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 전-유도배양액 조성물은 DMEM (둘베코 변형 이글 배지, Life Technologies社)에 포도당의 양만을 선택적으로 증가시킨 조성물을 기본 배지로 한다. 상기 글루타민 (L-glutamin) 및 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine)은 독성물질을 없애주는 역할을 하여 중간엽 줄기세포에서 신경줄기세포로의 유도를 촉진한다.
- [0037] 이에 한정되는 것은 아니나, 보다 구체적인 실시예에 의하면 상기 전-유도배양액 조성물은 25 mM의 글루코스를 함유하는 DMEM 배지에 10% FBS, 2 mM 글루타민 (L-glutamin), 4 mM 알라닐-글루타민 (L-alanyl-glutamine) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액을 더 포함하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0038] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 윤리적 문제, 면역거부반응, 외래 유전자 도입에 따른 종양형성 문제 등이 없는 성체줄기세포를 이용하여 신경줄기세포를 유도, 생산할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명에 의해 유도된 신경줄기세포는 다양한 희귀 난치성 뇌질환 및 척추손상환자의 치료를 위한 자가 이식이 가능한 신경세포 치료제로 이용될 수 있다.

[0040] 따라서, 본 발명에 따라 외래유전자의 도입이 없이 골수유래 중간엽 줄기세포로부터 유도된 신경줄기세포는 다양한 희귀 난치성 뇌질환 환자에게 자가 치료의 기회가 줄 수 있을 것이고, 국내 세포치료를 준비하고 있는 병원에서 임상연구를 위한 세포치료제로 활용될 수 있으며, 바이오 벤처 및 제약회사에 맞춤형 신약개발에 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a ~ 도 1c는 인간의 골수유래 중간엽 줄기세포의 특성을 확인한 도면이다.

도 1a는 골수유래 중간엽 줄기세포 (Early passage, P4)가 섬유아세포 (Fibroblast)의 모양을 하고 있는 것을 보여주는 도면이다(100배로 관찰한 결과).

도 1b는 줄기세포 특이적으로 발현되는 세포 표면마커 (Positive markers; CD29, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC와 Negative markers; CD14, CD34, CD45)들을 이용한 FACS분석을 통해서 실험에 사용된 세포들(98% 이상)이 중간엽 줄기세포임을 확인한 결과를 나타낸다.

도 1c는 골수유래 중간엽 줄기세포의 분화 특성을 중간엽성으로 분화유도 한 결과로, 각각 지방세포, 연골세포, 골세포를 나타낸다.

도 2는 인간의 골수유래 중간엽 줄기세포를 신경줄기세포로 유도하기 위한 유도조건(유도조건 A, B, C)을 나타내는 모식도이다.

도 3은 골수유래 중간엽 줄기세포가 각각의 유도조건 A, B, C에 의해 신경줄기세포로 유도된 지 5일, 9일 그리고 16일 후 현미경 관찰(200배)한 결과를 나타낸다. 오직 유도조건 A에서만 신경줄기세포가 관찰되었다.

도 4는 유도된 신경줄기세포의 신경줄기세포 마커 (Tuj1, NCAM, Nestin 그리고 Sox2)를 이용한 세포면역형광화학법(Immunofluorescence cytochemistry) 결과이며, 각각의 마커들이 모두 발현됨이 관찰되었다(200배).

도 5는 RT-PCR을 수행함으로써 줄기세포 특이적 마커 (Oct4, Sox2)와 신경줄기세포 마커 (Tuj1, NCAM, Nestin, Sox1와 Musasshi-1)의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명에 의해 유도된 신경줄기세포의 특성과 관련하여 면역형광화학 염색법으로 유도 효율을 확인한 도면으로, 신경줄기세포 마커인 Nestin과 NCAM 양성인 세포는 골수유래 중간엽 줄기세포에서는 거의 관찰되지 않고 있으며, 유도된 신경줄기세포에서만 관찰되었다(200배).

도 7은 신경줄기세포 마커 (Nestin 과 NCAM)를 이용한 유도 효율을 FACS를 통해서 재확인한 결과를 나타내고, 유도된 신경줄기세포(iNSC)에서는 신경줄기세포 마커인 Nestin과 NCAM 양성을 나타내는 세포의 수는 각각 60.82%와 78.47%로 나타났으며, 중간엽 줄기세포에서는 각각 0.57%와 0.03%로 나타났고, Nestin과 NCAM 양성인 세포의 수는 유도된 신경줄기세포에서 높은 효율로 증가됨이 확인되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0043] 실시예 1: 골수유래 중간엽 줄기세포 (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell) 증식

[0044] 본 발명에 사용된 골수유래 중간엽 줄기세포 (BM-MSC)는 미국 세포주 은행인 LOZA (LONZA Walkersville Inc.) 사로부터 구입한 것으로, 나이는 18세, 흑인 남성의 골수유래 중간엽 줄기세포 (PT-2501)이다. 구입한 세포는 1.6×10^7 cells (Passage number 2)로써 37°C CO2 incubator에서 2시간 동안 미리 코팅(CELLstart™ CTS™, Gibco, USA)을 해둔 10 cm plate에 99% confluency가 될 때까지 LONZA MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium)에 10% MCGS supplement+2% L-glutamine+0.1% GA-1000이 포함된 배양액으로 증식시켰다. 증식은 발명에 필요한 세포의 수를 확보하기 위해서 동일한 증식배양액으로 Passage number 4까지 계대배양을 실시하였다. 도 1a는 Passage number 4에서의 골수유래 중간엽 줄기세포의 현미경 사진(100배)이다.

[0045] 실시예 2: FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) 분석을 통한 골수유래 중간엽 줄기세포의 특성 확인

[0046] 골수유래 중간엽 줄기세포 (P4)에서 중간엽 줄기세포 특이적인 Cell surface markers (Positive: CD29, CD73, CD90, CD105, HLA Class I-ABC와 Negative: CD14, CD34, CD45)를 이용하여 발명에 사용된 중간엽 줄기세포의 대부분 (98% 이상)이 중간엽성 특성을 가지고 있다는 사실을 FACS분석을 통해서 확인하였다. 도 1b는 FACS 분석의 결과를 나타낸다.

[0047] 실시예 3: 골수유래 중간엽 줄기세포의 중간엽성 분화능력 확인

[0048] 골수유래 중간엽 줄기세포 (P4)는 중간엽성 (지방세포, 연골세포 그리고 골세포)으로 분화 능력을 확인하고자 성장인자가 포함된 각각의 분화배양액으로 유도시킨 후 세포들의 특성을 세포특이적인 염색액을 이용하여 그 분화 능력을 확인하였다. 도 1c는 분화 유도된 사진과 염색 후 사진을 나타낸다(지방세포: Oil red-O, 연골세포: Alcian Blue 8GX, 골세포: Alizarin Red S; 100배).

[0049] 실시예 4: 골수유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)를 신경줄기세포 (Neural Stem Cell)로 유도(Induction)하기 위한 조건 확립

[0050] 도 2에서처럼 유도된 신경줄기세포 (induced Neural Stem Cells; iNSC)는 실시예 1에서 기술한 BM-MSC 증식에 필요한 배양액과 iNSC로 유도시키기 위한 iNSC로 유도시키기 위한 세 종류(A, B 그리고 C)의 유도배양조건으로 유도되었다.

[0051] A는 BM-MSC (P3~P4)는 전-유도배양액 (Pre-induction media)으로 3~5주 유도하고 2x Trypsin-EDTA를 이용하여 Passage number 5로 계대배양 한 후 신경줄기세포 유도배양액 I (Induction media I)를 이용해서 신경줄기세포로 유도되었다.

[0052] B는 BM-MSC (P3~P5)는 유도배양액 I (Induction media I)를 이용해서 신경줄기세포로 유도되었다.

[0053] C는 BM-MSC (P3~P5)는 유도배양액 II (Induction media II)를 이용해서 신경줄기세포로 유도되었다.

[0054] 도 3은 각각의 유도조건 A, B, C에 의해 BM-MSC로부터 iNSC로 유도되고 있는 현미경 사진(200배)을 나타낸다.

[0055] 표 1은 iNSC로 유도하기 위한 세 가지 유도조건을 표시한 내용이며, 배양액의 조성은 아래와 같다.

표 1

Media	Induction conditions		
	A	B	C
Maintenance media	0	0	0
Pre-induction media	0	X	X
Induction media I	0	0	X
Induction media II	X	X	0

[0057] 1) Maintenance media : LONZA MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium) + 10% MCGS supplement + 2% L-glutamine+0.1% GA-1000

[0058] 2) Pre-induction media : DMEM (high glucose, 25 mM) + 8~10% FBS + 2 mM L-glutamine + 4 mM L-alanyl-L-glutamine + 1% Penicillin-streptomycin

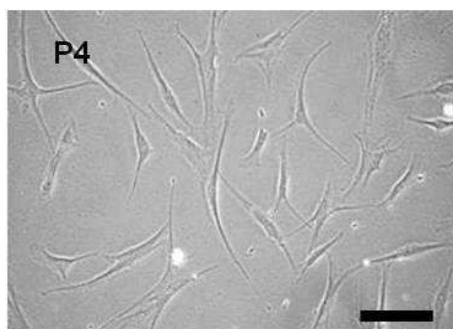
[0059] 3) Induction media I : DMEM (glucose, 17.5 mM)/F-12 + 1% ITS(Insulin/Transerrin/Selenite) + 0.2 mM L-Ascorbic acid + 1% Penicillin-streptomycin

[0060] 4) Induction media II : Neurobasal media + 2% B27(serum replacement) + 0.5 mM L-glutamine + bFGF(20 ng/ml) + EGF(20 ng/ml) + 0.2 mM L-Ascorbic acid + 1% Penicillin-streptomycin

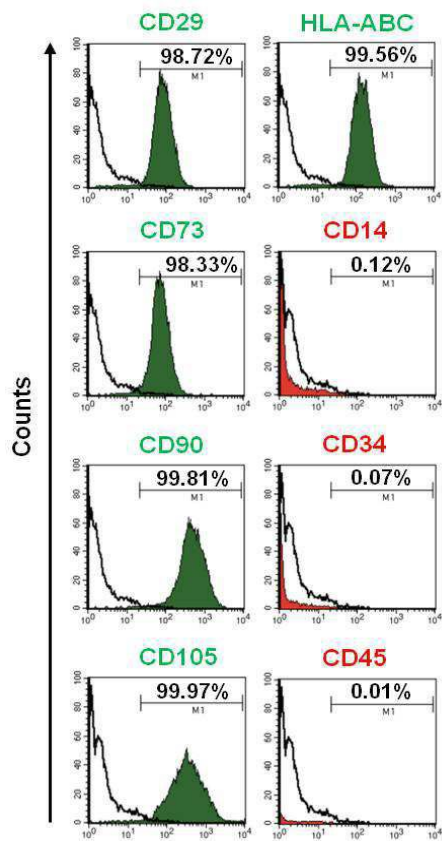
- [0061] 실시예 5: 세포면역형광화학법(Immunofluorescence cytochemistry)을 통한 본 발명에 의한 iNSC의 특성 확인
- [0062] 본 발명에 의한 iNSC(도 3의 A의 iNSC)는 다양한 신경줄기세포 마커 (Tuj1, NCAM, Nestin 그리고 Sox2)를 이용한 세포면역형광화학법(Immunofluorescence cytochemistry)을 통해서, 각각의 마커들이 모두 발현됨이 관찰되었다(도 4).
- [0063] 실시예 6: RT-PCR을 통한 본 발명에 의한 iNSC의 특성 확인
- [0064] 본 발명에 의한 iNSC(도 3의 A의 iNSC)는 줄기세포 특이적 마커 (Oct4, Sox2)와 신경줄기세포 마커 (Tuj1, NCAM, Nestin, Sox1와 Musasshi-1)의 발현양상을 RT-PCR을 수행함으로써 확인하였다(도 5).
- [0065] 실시예 7: 세포면역형광화학법을 이용한 본 발명에 의한 iNSC의 유도 효율 확인
- [0066] 신경줄기세포 마커인 Nestin과 NCAM의 양성 세포의 수는 대조구인 골수유래 중간엽 줄기세포에서는 거의 없으며, 유도된 신경줄기세포에서만 많은 수의 신경세포가 Nestin과 NCAM 양성을 나타낸다(도 6).
- [0067] 실시예 8: FACS 분석을 이용한 본 발명에 의한 iNSC의 유도 효율 확인
- [0068] 유도 효율을 FACS를 통해서 확인한 결과, 유도된 신경줄기세포(iNSC)에서는 신경줄기세포 마커인 Nestin과 NCAM 양성을 나타내는 세포의 수는 각각 60.85%와 78.47%로 나타났으며, 중간엽 줄기세포에서는 각각 0.57%와 0.03%로 나타났다. Nestin과 NCAM 양성인 세포의 수는 유도된 신경줄기세포에서 높은 효율로 증가됨이 확인되었다(도 7).
- [0069] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 도면에 의해 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

도면

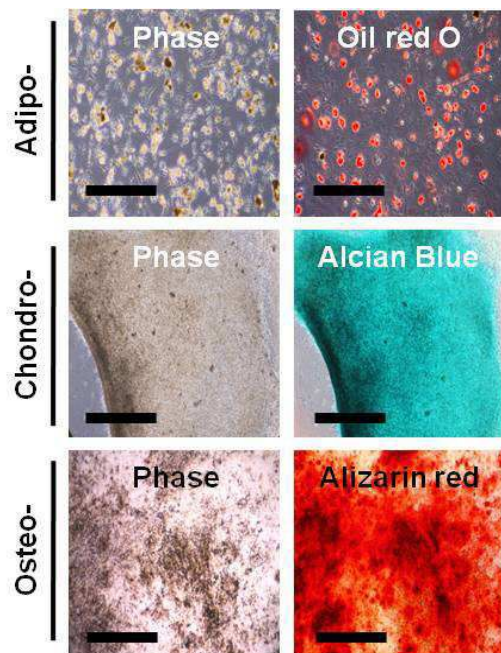
도면1a



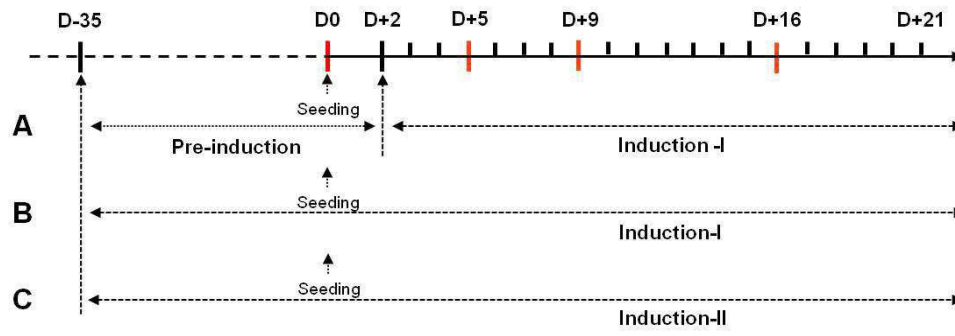
도면1b



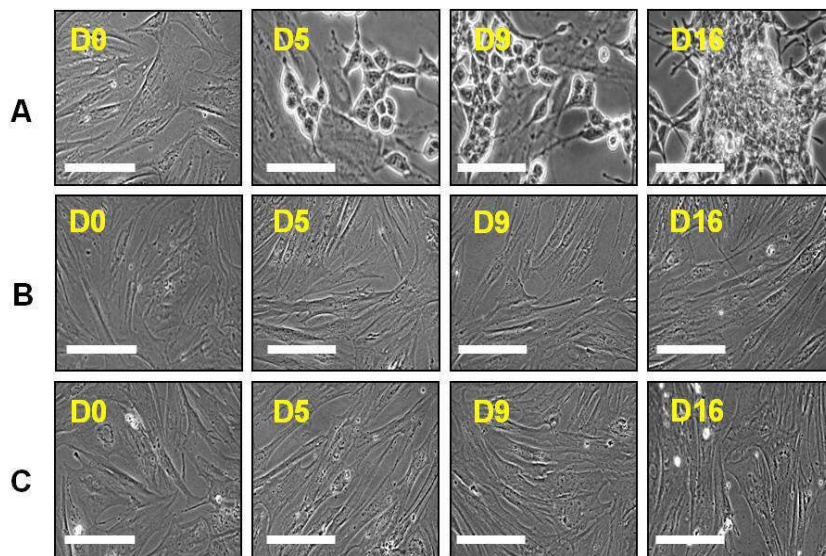
도면1c



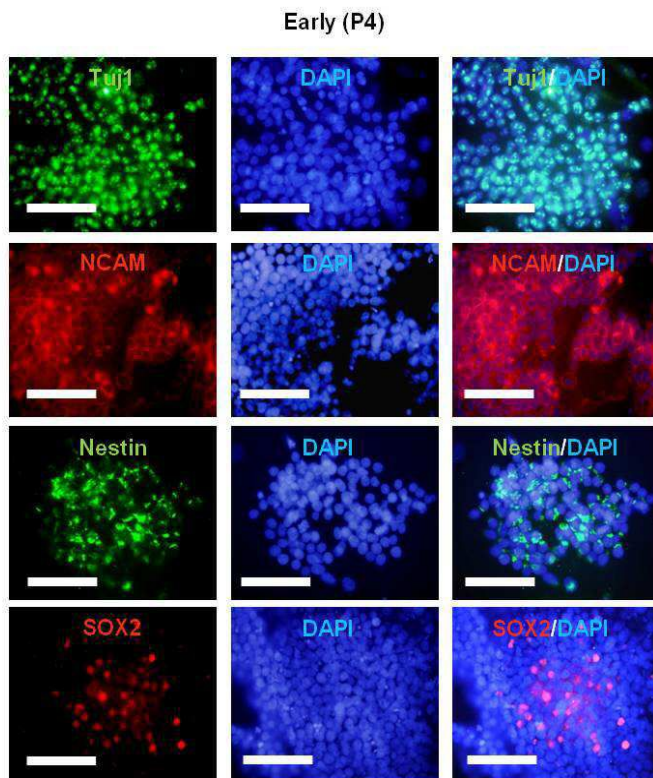
도면2



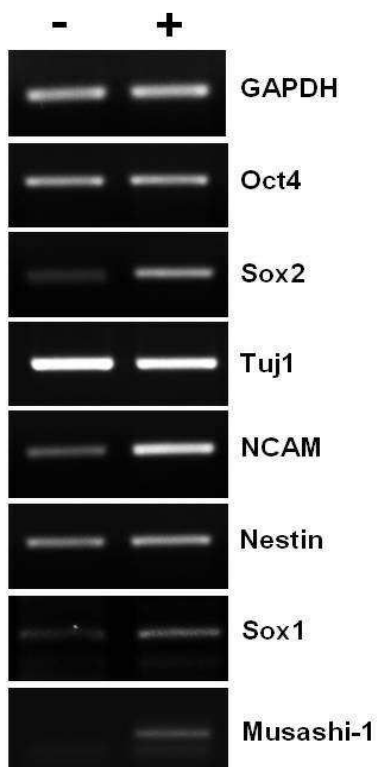
도면3



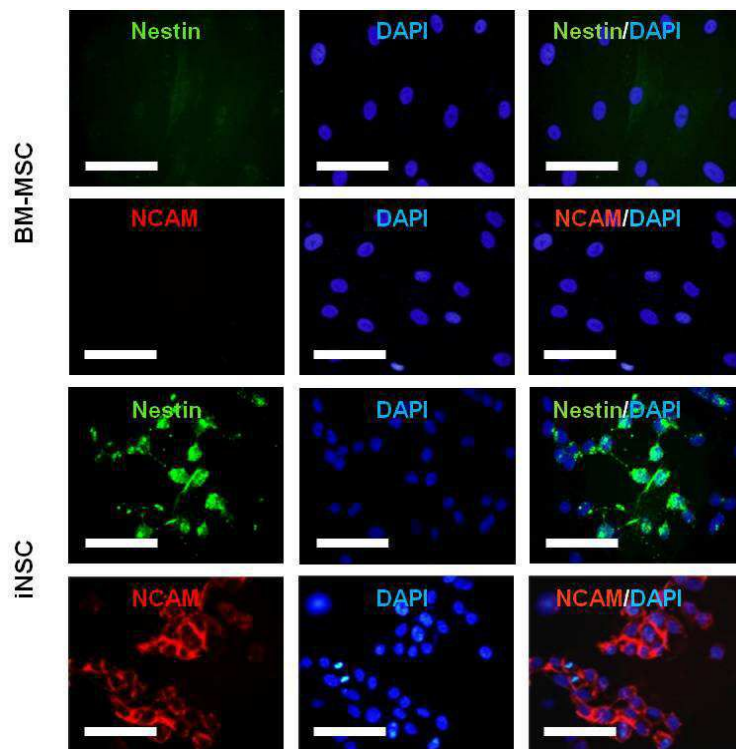
도면4



도면5



도면6



도면7

