



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0086170
(43) 공개일자 2016년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01) A61K 35/30 (2015.01)
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/079 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0003572
(22) 출원일자 2015년01월09일
심사청구일자 2015년01월09일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
정성철
서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아)
정남희
서울특별시 마포구 대흥로24다길 15-5 (염리동)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포의 분화 방법

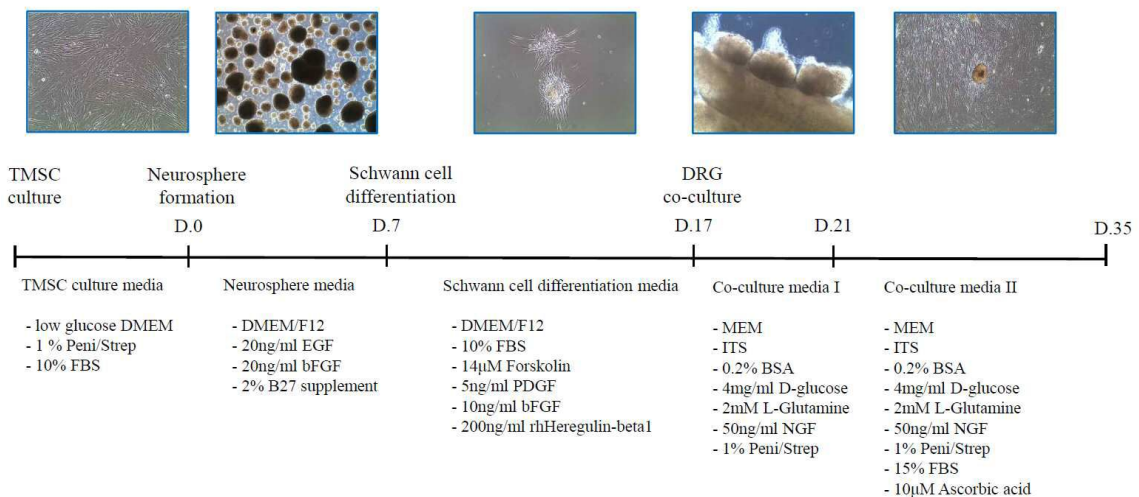
(57) 요약

본 발명은 편도 유래 줄기세포로부터 슈반 세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

본 발명의 분화 방법은 슈반 세포의 높은 분화능을 보여 다량의 슈반 세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 슈반 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 세포 공여부의 신경 손상 없이 제조될 수 있으며, 신경 세포를 지지하고 신경을 재생하여 신경 관련 질환의 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

대표도 - 도1

Protocol of Schwann cell differentiation



(52) CPC특허분류

C12N 5/0622 (2013.01)

C12N 5/0669 (2013.01)

C12N 2501/11 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

(72) 발명자

유경하

서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호
(삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)

최병욱

서울특별시 강남구 삼성로 151, 7동 1001호 (대치동, 선경아파트)

박세영

서울특별시 도봉구 시루봉로 71, 110동 201호 (방학동, 청구아파트)

김한수

서울특별시 영등포구 의사당대로 110, E동 503호
(여의도동, 미성아파트)

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동
2001호 (두정동, 이안더센트럴)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0135010014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-희귀질환사업

연구과제명 샤르코-마리-투스병의 신규 바이오마커 및 맞춤형 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유 아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배양은 6일 내지 15일 동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 10 ng/ml 내지 50 ng/ml의 표피 성장인자, 5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자 및 0.5% 내지 5%의 B27 첨가제가 첨가된 배지에서 배양하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 배지는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법.

청구항 5

(a) 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 신경구(Neurosphere)를 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 포스콜린 (Forskolin) 하에서 배양하여 슈만 세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈만 세포 분화 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 6일 내지 15일 동안 수행되며, 상기 (b) 단계의 배양은 8 내지 15일 동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈만 세포 분화 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 10 ng/ml 내지 50 ng/ml의 표피 성장인자, 5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자 및 0.5% 내지 5%의 B27 첨가제가 첨가된 배지에서 배양하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈만 세포 분화 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 1 ng/ml 내지 10 ng/ml의 혈소판 유래 성장인자, 1 ng/ml 내지 20 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자, 10 ng/ml 내지 400 ng/ml의 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 2 μ M 내지 25 μ M의 포스콜린이 첨가된 배지에서 배양하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈만 세포 분화 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 배양 배지는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈만 세포 분화 방법.

청구항 10

(a) 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 신경구(Neurosphere)를 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 포스콜린 (Forskolin) 하에서 배양하여 슈반 세포를 분화시키는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계에서 분화된 슈반 세포를 배양하여 슈반세포로부터 분비된 신경 영양인자를 포함하는 배양 배지를 얻는 단계를 포함하는, 신경 영양인자 조성물의 제조방법.

청구항 11

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 제조된 슈반 세포.

청구항 12

제10항의 제조방법에 따라 제조된 신경 영양인자 조성물.

청구항 13

제11항에 따른 슈반 세포를 유효 성분으로 포함하는 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 신경 손상 질환은 유전성 신경병증으로 샤르코 마리 투스 병 (Charot-Marie-Tooth disease) 또는 유전성 신경 편향 압박마비증세 (Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies) 인 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 신경 손상 질환은 말초 신경퇴화 (Peripheral nerve degeneration) 또는 말초 신경 절단에 의한 외상성 신경 손상 질환인 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 신경 손상 질환은 대사성 신경병증으로 당뇨병성 말초 신경병증 (diabetes neuropathy) 인 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되고, 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있는 특성이 있으며, 분화 자극에 따라 상이한 세포로도 분화될 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0003] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포이며, 일부 줄기세포는 다분화능 또는 단분화능의 잠재력을 지닌다.

[0004] 상기 줄기세포들이 가지는 분화능을 기초로 세포 치료제로 이용 가능성이 있어 이와 관련된 연구 개발이 활발히 진행 중이다. 하지만, 배아 줄기세포를 이용한 세포 치료제의 경우 윤리적 문제나 조직 적합성 불일치 문제가 제

기되고 있으며, 역분화 줄기세포를 세포 치료제로 사용할 경우 종양 발생 가능성의 문제가 있다.

[0005] 이에 따라, 분화능이 낮은 것으로 알려져 있지만 상대적으로 안전한 중간엽줄기세포를 이용한 연구가 많이 진행되고 있다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)는 성체 골수 등에 있는 multi-potential non-hematopoietic progenitor cell로서 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 이러한 중간엽 줄기세포를 이용하여 다양한 조직 재생을 위한 임상 연구가 진행되고 있으며, 장기 이식 분야에도 적용가능성을 보이고 있다.

[0006] 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수 채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다.

[0007] 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 증식능력이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0008] 한편, 신경병증과 관련된 다양한 질환에서 줄기세포로부터 분화된 세포 치료제와 관련된 연구 개발이 요구되고 있다. 예컨대, 유전성 신경병증으로 샤르코 마리 투스 병(Charcot-Marie-Tooth disease) 또는 유전성 신경 편향 압박마비증세(Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies); 말초신경 퇴화(Peripheral nerve degeneration) 또는 말초신경 절단에 의한 외상성 신경 질환; 또는 대사성 신경병증으로 당뇨병의 합병증으로 발생한 신경병변, 예컨대 당뇨병성 말초 신경병증(diabetes neuropathy) 등의 질환에서 손상 부위의 기능적 재생을 위한 세포 치료제에 대한 연구 개발이 지속적으로 요구되고 있다. 이를 위해서는 신경계를 구성하는 여러 세포들 중, 특히 신경의 축삭을 감싸고 있는 슈반세포가 중요한 역할을 담당하는바, 세포 치료제로써 슈반 세포에 대한 다량 확보가 필요하다.

[0009] 그런데, 슈반 세포는 그 공급이 원활하지 않고 생체 외 배양이 쉽지 않은 문제점이 있다. 예를 들어, 슈반세포(Schwann cell)를 얻기 위해서는 세포 공여부의 신경 손상이 불가피하고 세포의 양적확보가 어렵다는 단점이 있기 때문에 관련 연구 개발이 쉽지 않다. 또한, 슈반 세포 분화용 배지를 이용하여 성체 줄기세포로부터 슈반 세포로 분화를 유도하는 연구들이 일부 있지만, 분화 효율 면에서 그 이용이 매우 제한적이다. 또한, 상이한 유전적 기원, 유래 및/또는 배경을 가지는 중간엽 줄기세포들의 경우 중간엽 줄기세포를 규정하는 일부 기준들에 대해서는 서로 유의적 차이를 나타내지 아니하지만 통상적으로 각각의 생체 내 활성화에 있어서는 매우 큰 차이를 나타내는바, 특정 유래의 줄기세포로부터 분화 방법 및 분화된 세포 특성에 대한 확인 역시 필요하다.

[0010] 이에 따라, 슈반 세포로의 높은 분화능을 보일 수 있는 특정 줄기세포로부터 최적의 분화 방법을 확인하여 인체 적용에 적합한 슈반 세포를 확보하는 방안에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0135263호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0143363호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 표피 성장 인자(Epidermal growth factor), 섬유 아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래

중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법에 관한 것이다.

- [0013] 본 발명은 또한 (a) 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계; 및
- [0014] (b) 상기 (a) 단계의 신경구(Neurosphere)를 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 포스콜린 (Forskolin) 하에서 배양하여 슈반세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포 분화 방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명은 또한 (a) 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계;
- [0016] (b) 상기 (a) 단계의 신경구(Neurosphere)를 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 포스콜린 (Forskolin) 하에서 배양하여 슈반 세포를 분화시키는 단계; 및
- [0017] (c) 상기 (b) 단계에서 분화된 슈반 세포를 배양하여 슈반세포로부터 분비된 신경 영양인자를 포함하는 배양 배지를 얻는 단계를 포함하는, 신경 영양인자 조성물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 또한 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포 분화 방법에 따라 제조된 슈반 세포에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명은 또한 상기 신경 영양인자 조성물의 제조방법에 따라 제조된 신경 영양인자 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0020] 본 발명자들은 인체 적용에 적합한 슈반 세포의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 편도 유래 중배엽 줄기 세포로부터 슈반 세포를 단기간에 대량 생산하는 방법을 발명하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 신경구(Neurosphere)란 신경 줄기세포의 free-floating cluster로 태어나 성인의 중추신경계로부터 유래한 신경 줄기세포와 형태학적 측면 및 분화 가능성의 측면에서 유사한 성격을 띠는 세포로, 슈반 세포, 신경세포 (neuron), 신경교세포, 성상교세포(astrocyte), 또는 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)등의 신경 관련 세포로 분화가 가능한 세포를 의미한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 슈반 세포란 말초 신경계의 신경교세포로 신경의 발생, 분화에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 신경이 손상된 경우 축삭의 재생과 재수초화(remyelination)에 필수적인 역할을 하는 세포를 의미한다. 특히, 축삭이 모여 다발을 이룬 것을 신경 섬유라고 부르는데, 슈반세포는 축삭을 둘러싸는 가장 바깥쪽의 막인 신경 섬유초를 형성하며, 슈반세포에 의해 수초화를 이룬 유수신경섬유는 수초의 절연체 역할에 의해 빠른 신경전도 속도를 가질 수 있는 반면 수초에 손상이 있을 경우 전도 속도가 느려지고 비수초화에 의한 축삭의 이차적 손상을 야기시킬 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 신경 영양인자 조성물은 본 발명의 분화 방법에 따라 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포의 배양에 따라 제조되는 슈반세포로부터 분비된 신경 영양인자를 포함하는 조성물로 축삭, 신경극 등의 신경 세포의 성장 및 회복을 유도하는 신경 영양 인자를 포함하는 조성물을 의미한다. 상기 신경 영양인자 조성물은 Desert Hedgehog (DHH), Neurotrophin-3 (NT-3), Nerve growth factor (NGF), Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), F-Spondin, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)등의 신경 영양인자를 포함하며, 슈반 세포로부터 분비 가능한 신경 영양 인자라면 이에 제한되지 않고 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 올트랜스레티놀산 (all trans-retinoic acid, ATRA), B27 첨가제, N2 첨가제, 인슐린 유사 성장 인자 (Insulin-like growth factor, IGF), 신경 성장 인자 (Nerve growth factor, NGF), 헤파린 (heparin), 섬유

아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 또는 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor, EGF)로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법을 제공한다.

- [0026] 바람직하게, 본 발명은 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유 아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor)는 표피 증식, 케라틴화 및 사람 섬유아세포 증식 등을 촉진하는 폴리펩티드성 인자를 의미한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 섬유 아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor)는 섬유아세포를 자극하여 강한 증식성을 유도하는 성장 인자로 신경세포의 성장을 촉진하는 성장인자를 의미한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, B-27 첨가제는 줄기세포로부터 신경구 유도에 사용되는 첨가제로 상업적으로 구입가능(Gibco 등)하며, serum-free 첨가제로 해마와 중추신경계의 신경 세포를 키우는데 생존과 성장을 돕는 기능을 가진 첨가제를 의미한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 6일 내지 15일 동안 수행되는 것이 바람직하다. 또한, 신경구 유도 배양액 5 ml 당 2.5×10^6 개~ 4×10^6 개의 세포를 부유 상태에서 배양하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 배지는 alpha MEM(alpha Minimum Essential Medium Eagle), Neurobasal medium, 또는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)으로부터 선택되는 어느 하나가 바람직하며, 보다 바람직하게 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)를 사용한다. 또한, 상기 표피 성장인자는 10 ng/ml 내지 50 ng/ml, 섬유 아세포 성장 인자는 5 ng/ml 내지 50 ng/ml 및 B27은 0.5% 내지 5%의 농도(상업적으로 이용가능한 B27 첨가제를 이용하였을 때, 배지 총 중량에 대한 중량 %)로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 신경구 분화 방법은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 사용하여, 타 성체 줄기세포를 사용한 방법과 대비하여 현저한 분화능을 보이며, 세포구의 형성 속도 및 부피 성장의 속도가 빠르다는 장점을 가진다. 또한, 신경구 역시 계대 배양이 가능한데, 10-40 gauge needle을 이용하여 분쇄함으로 쉽고 안정적으로 이루어진다는 장점을 가진다. 또한, 본 발명의 분화 방법에 따라 분화된 신경구는 슈반 세포, 신경세포, 성상교세포, 희소돌기아교세포 등의 신경 관련 세포로 분화 가능하여, 신경구로부터 분화된 이러한 세포는 여러 신경 손상 질병의 세포 치료제나 혹은 약물 약효 검사의 대상으로 이용 가능하다. 뿐만 아니라 신경세포의 전구체인 신경구를 분화 전 상태로 이식하여 신경구 자체를 세포치료제로서 이용도 가능하다.
- [0032] 본 발명은 또한, 올트랜스레티놀산 (all trans-retinoic acid, ATRA), B27 첨가제, N2 첨가제, 인슐린 유사 성장 인자 (Insulin-like growth factor, IGF), 신경 성장 인자 (Nerve growth factor, NGF), 헤파린 (heparin), 섬유 아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 또는 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor, EGF)로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계; 및 상기 (a) 단계의 신경구를 헤파린(heparin), 라미닌 (laminin), Nerve growth factor (NGF), 아스코빅 엑시드 (ascorbic acid), glial growth factor-2 (GGF-2), N2 supplement, 글루타민 glutamine, 헤레굴린(heregulin), 포스콜린 (forskolin), 혈소판 유래 성장인자(PDGF) 또는 섬유 아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor)으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 배지 하에서 배양하여 슈반 세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포 분화 방법을 제공한다.
- [0033] 바람직하게, 본 발명은 (a) 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 신경구(Neurosphere)를 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 포스콜린 (Forskolin) 하에서 배양하여 슈반 세포를 유도하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포 분화 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계는 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere) 분화 방법과 같이 적용될 수 있다.
- [0035] 상기 (b) 단계는 신경구 (Neurosphere)로부터 슈반세포를 유도함으로써 슈반 세포를 분화한다.

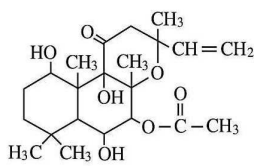
[0036] 본 발명에 있어서, 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor)는 혈소판 과립에 존재하는 당단백질로 간엽계 세포의 증식을 촉진하는 인자를 말한다.

[0037] 본 발명에 있어서, 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor)는 앞서 정의한 바와 같다.

[0038] 본 발명에 있어서, 헤레굴린-β(Heregulin-β)는 Neuregulin 1이 alternative splicing에 의해 생성되는 isotype 중 하나로 리셉터 타이로신 카이나제 (receptor tyrosine kinase)인 ERBB2와 반응한다. 다양한 신호 전달을 통해 신경세포의 성장과 분화를 촉진 시키는 역할을 하는데 특히 슈반 세포와 관련해서는 축삭으로부터 분비되는 헤레굴린-β가 슈반세포의 이동을 유도하여 수초화를 시키고, 또한 슈반세포가 자가 사멸에 들어가는 것을 억제하는 기능을 한다.

[0039] 본 발명에 있어서, 포스콜린 (Forskolin)은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물로, 아데닐릴 싸이클레이즈 (adenylyl cyclase)의 직접적인 활성화인자로서 헤레굴린-β와 함께 슈반세포의 증식을 높이는 시너지 효과를 보이는 단백질을 의미한다.

[0040] [화학식 1]



[0041]

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 바람직하게 8 내지 15일 동안 수행되어 신경구로부터 슈반 세포를 분화한다. 또한, 상기 (b) 단계의 배양 배지는 alpha MEM(alpha Minimum Essential Medium Eagle), Neurobasal medium, 또는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)으로부터 선택되는 어느 하나이며, 바람직하게 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지이다. 또한, 상기 (b) 단계에서 바람직하게 상기 혈소판 유래 성장인자는 1 ng/ml 내지 10 ng/ml, 상기 섬유아세포 성장 인자는 1 ng/ml 내지 20 ng/ml, 상기 헤레굴린-β(Heregulin-β)는 10 ng/ml 내지 400 ng/ml, 및 상기 포스콜린은 2 μM 내지 25 μM의 농도로 첨가된다. 또한, 상기 신경구는 배양 전 분쇄되어 동결있는 세포가 분쇄될 수 있으며, 예컨대, 10-40 gauge needle을 이용하여 분쇄할 수 있다. 또한, 상기 배양은 poly-L-lysine, collagen 또는 laminin으로부터 선택된 물질로 코팅된 배양접시, 바람직하게 laminin이 1 μg/ml 내지 10 μg/ml 코팅된 배양접시 내에서 배양된다. 또한, 상기 (b) 단계에서 배양 배지는 FBS(Fetal bovine serum)를 더 포함할 수 있으며, 바람직하게 5 내지 12%(상업적으로 이용가능한 FBS를 이용하였을 때, 배지 총 중량에 대한 중량 %)로 포함한다.

[0043] 또한, 본 발명에 따른 분화 방법에 있어서, 추가로 glutamine, insuline 등을 첨가제로 추가할 수 있다.

[0044] 본 발명의 슈반 세포 분화 방법은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 사용하여, 타 유래의 성체 줄기세포를 사용한 방법과 대비하여 현저한 분화능 및 증식능을 보이며, 특히 Schwann cell 분화에 전반적으로 발현되어지는 발현 인자들의 높은 발현효과를 볼 때, 타 유래 줄기세포로부터의 분화능 및 증식능과 대비하여 현저한 분화능 및 증식능을 가진다.

[0045] 본 발명은 또한, 상기 슈반 세포 분화 방법에 따라 제조된 슈반 세포를 제공한다. 본원 발명에 따라 제조된 슈반 세포는 편도 유래 줄기세포와 대비하여 증가된 GFAP(Glial fibrillary acidic protein), NGFR(nerve growth factor receptor)의 발현을 보인다. 또한, 편도 유래 줄기세포와 대비하여 CAD19(cadherin 19)의 감소를 보이며, KROX20(early growth response 2), S100B (S100 calcium binding protein B)의 증가를 보인다. 특히, Schwann cell 분화 전반적으로 발현되어지는 GFAP, NGFR, KROX20 또는 S100B가 타 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 세포와 대비하여 전반적인 높은 발현을 보여, 슈반 세포로써 우수한 특성을 가짐을 알 수 있다. 본 발명에 따른 슈반 세포는 신경 영양인자 분비를 통한 축삭, 신경극 등의 신경 세포 재생 및 성장 유도 효과를 가지며, 후근 신경절과 공동 배양시 후근 신경절의 감각 신경 세포의 축삭의 성장을 유도하여 결합한 후 수초화 시키는 특성을 가진다.

[0046] 본 발명에 따른 슈반 세포 분화 방법에 따라 제조된 슈반 세포를 유효성분으로 포함하는 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 신경 손상 질환에 사용될 수 있다.

- [0047] 신경 손상 질환은 유전적, 대사적 또는 외상에 의해 신경 관련 조직에 손상이 발생하여 유발되는 질환을 말한다. 예를 들어, 상기 신경 손상 질환은 유전성 신경병증으로 샤르코 마리 투스 병 (Charot-Marie-Tooth disease) 또는 유전성 신경 편향 압박마비증 (Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies)로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 신경 손상 질환은 외상성 신경 질환으로 말초신경 퇴화 (Peripheral nerve degeneration) 또는 말초신경 절단에 의한 외상성 신경 질환일 수 있다. 또한, 상기 신경 손상 질환은 대사성 신경병증으로 당뇨병의 합병증으로 발생한 신경병변, 예컨대 당뇨병성 말초 신경병증 (diabetes neuropathy)일 수 있다.
- [0048] 상기 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제, 분무제 등이 바람직하다. 또한, 상기 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명은 또한, (a) 표피 성장 인자 (Epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor) 및 B27 첨가제를 포함하는 배지에서 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 신경구 (Neurosphere)를 혈소판 유래 성장인자 (Platelet-derived growth factor), 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 헤레굴린- β (Heregulin- β) 및 포스콜린 (Forskolin) 하에서 배양하여 슈반 세포를 분화시키는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분화된 슈반 세포를 배양하여 슈반세포로부터 분화된 신경 영양인자를 포함하는 배양 배지를 얻는 단계를 포함하는, 신경 영양인자 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 상기 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경구 (Neurosphere)를 유도하는 단계 및 (b) 슈반 세포를 분화시키는 단계는 앞서 살핀 바와 같다.
- [0051] 본 발명에 따라 상기 (c) 단계에서 분화된 슈반 세포를 배양하는 배지는 alpha MEM(alpha Minimum Essential Medium Eagle), Neurobasal medium, 또는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)으로부터 선택되는 어느 하나의 배지, 바람직하게 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 하에서 배양 할 수 있다. 배양은 1 내지 7 일간 진행될 수 있으며, 배양액은 당업계의 통상의 방법에 따라 분리하여 신경 영양인자 조성물의 제조한다. 예컨대, 원심분리방법을 통해 신경 영양인자 조성물만을 따로 분리할 수 있다. 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 상기 신경 영양인자 조성물은 Desert Hedgehog (DHH), Neurotrophin-3 (NT-3), Nerve growth factor (NGF), Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), F-Spondin, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)등의 신경 영양 인자를 포함하며, 슈반 세포로부터 분비 가능한 신경 영양 인자라면 이에 제한되지 않고 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 신경 영양인자 조성물은 축삭, 신경극 등의 성장을 유도하고 신경 재생 회복 등에 효과를 보인다.
- [0052] 본 발명은 또한 상기 신경 영양인자 조성물 제조방법에 따라 제조된 신경 영양인자 조성물을 제공하며, 신경 영양인자 조성물은 신경 영양 인자로 Desert Hedgehog (DHH), Neurotrophin-3 (NT-3), Nerve growth factor (NGF), Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), F-Spondin, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)등을 포함 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명의 분화 방법은 슈반 세포로의 높은 분화능을 보여 다량의 슈반 세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 슈반 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 세포 공여부의 신경 손상 없이 제조될 수 있으며, 신경 세포를 지지하고 신경을 재생하여 신경 관련 질환의 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반세포를 분화시키기 위한 분화 단계별 방법 및 시기별 세포 형태를 나타낸 도이다.
- 도 2는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반세포를 분화시킨 후 계대한 샘플이 슈반 세포의 특성을 가지는 것을 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반세포를 분화시킨 후 세포가 슈반세포의 특성을 가지는 것을 면역형광 염색을 통하여 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반세포를 분화시킨 조건 배양액(conditioned media)을 NSC34 세포에 처리하여 신경극 발아 유도를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반세포와 후근신경절을 공동배양에 따른 수초화(myelination) 현상을 면역형광염색을 통해 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 지방 조직 유래 줄기세포를 슈반세포로 분화시켜 CAD19, GFAP, NGFR, KROX20, 및 S100B의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0056] <실시예 1> 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 조직 유래 줄기세포의 배양
- [0057] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC) 는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻어, 10% FBS (Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco)이 보충된 low glucose DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, hyclone)하에 배양되었다.
- [0058] 한편, 지방 조직 유래 줄기세포(adipose-derived stem cell, ASC)는 ATCC로부터 구입하여, Mesenchymal Stem Cell Growth Kit (ATCC)가 보충된 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (ATCC)에서 배양하였다.
- [0059] <실시예 2> 슈반세포로의 분화 유도
- [0060] 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 조직 유래 줄기세포로부터 슈반 세포의 분화를 유도하기 위한 첫 번째 단계로 신경구(Neurosphere)를 형성하였다. 신경구는 60 mm 페트리접시(petri dish)에 20ng/ml EGF (PeproTech), 20ng/ml basic FGF (PeproTech) 및 2% B27 supplement (Gibco)가 첨가된 DMEM/F12 신경구 유도 배양액 5 ml당 2,500,000개~ 4,000,000개의 세포를 부유하여 7일 동안 세포 응집을 유도하여 제조하였으며, 신경구 유도 배양액은 3일마다 갈아주었다.
- [0061] 형성된 신경구를 슈반 세포로 분화시키기 위해 27 gauge needle로 분쇄시켜 2ug/ml laminin(Sigma)이 코팅된 배양접시 내 커버 슬립(cover slip) 위에 재부착(replating)을 시키고, 5ng/ml human Recombinant PDGF-AA(PeproTech), 10ng/ml basic FGF(PeproTech), 200ng/ml human Recombinant Heregulin β -1(PeproTech), 14 μ M Forskolin (Sigma) 및 10% FBS(Gibco)가 첨가된 DMEM/F12배양액 내에서 10일 동안 배양하였다. 슈반 세포로의 분화 과정 중, 배양액은 매 3일마다 갈아주었다.
- [0062] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 슈반 세포 분화 유도의 프로토콜 과정 중 일부를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 세포 형태학적으로 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMC)로부터 신경구(Neurosphere)가 유도되고 슈반 세포(Schwann cell)로 분화가 이루어졌음을 확인하였다.
- [0063] <실시예 3> 분화된 슈반세포와 후근신경절(Dorsal root ganglia)의 공동배양
- [0064] 분화된 슈반세포와 후근신경절 (Dorsal root ganglia, DRG)의 공동 배양을 통한 수초화를 확인하기 위하여, 분화된 슈반 세포와 후근신경절을 공동 배양하였다.
- [0065] 임신한 암컷 ICR 마우스로부터 13일째의 배아를 적출하여 배아의 후근신경절을 핀셋을 이용하여 분리하였다. 분리된 후근신경절을 분화된 슈반 세포 위에 올려주어 공동배양 시켜주었다. 공동배양을 위해 처음 4일간은 ITS supplement (Gibco), 0.2% BSA (Bovogen), 4mg/ml D-글루코즈 (Sigma), 2mM L-글루타민 (Sigma), 50ng/ml human Recombinant β -NGF (PeproTech) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO)이 첨가된 MEM (Gibco) 배지에

서 배양해 주었고, 이후의 14일은 동일한 배양액에 15%의 FBS (Hyclone)와 10 μ M Ascorbic acid (Sigma)를 첨가해 주었다. 배양액은 매 3일 마다 갈아주었다.

[0066] 상기 슈반 세포와 후근신경절 공동 배양 과정 프로토콜의 일부를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 세포 형태학적으로 슈반세포와 후근신경절 공동 배양에 따라 수초화가 이루어졌음을 확인하였다.

[0067] <실시예 4> 웨스턴 블랏을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 슈반세포로의 분화 확인

[0068] 상기 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포와 분화 단계별 세포를 취하여 분화에 따른 슈반 세포 분화 표지인자들의 발현 변화를 확인하였다.

[0069] 이를 위하여, 분화 단계별로 취한 세포를 단백질 분해효소 억제제(Roche)가 포함된 Lysis 완충액에 넣고 과쇄하였다. 전체 단백질(10-30 μ g)을 확인하고자하는 1차 항체로 면역블롯팅하였고, GAPDH (Abcam)는 내부 대조군으로 사용하였다. 슈반 세포 분화 표지인자로서 GFAP 및 NGFR가 사용되었다. GFAP은 슈반세포의 발달 과정 중 상대적으로 후기 단계에 발현하며 슈반세포가 수초화(myelination)를 이루기 전까지 슈반세포의 세포 골격을 형성하고 유지시켜주는 중간섬유로써 역할을 하는 단백질이며, NGFR은 리셉터 타이로신 카이네이즈(receptor tyrosine kinase)의 한 종류로 세포 내로의 신호 전달을 포함한 다양한 기능을 가지고 있고 신경 세포의 생존과 축삭(axon)의 성장, 신경극 발아(neurite outgrowth), 및 반세포의 이동(migration)에 중요한 역할을 하는 단백질이다. LAS-3000 (Fuji film)를 이용하여 밴드의 세기를 정량화하고 GAPDH의 세기로 표준화하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0070] 도 2의 1에 나타난 바와 같이, GFAP의 경우 미분화된 편도 유래 중간엽 줄기세포 (TMSC)에 비해 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포 (TMSC-SC)에서 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 도 2의 2에 나타난 바와 같이, NGFR 단백질의 발현은 미분화된 편도 유래 중간엽 줄기세포 (TMSC)에서는 발현되지 않다가 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포 (TMSC-SC)에서 발현량이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 도 2의 3에 나타난 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포 (TMSC-SC)의 계대 증가에 따라 웨스턴블랏팅을 하였을 때, GFAP, NGFR 단백질들의 발현을 유지되는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 종합하여 볼 때, 편도 유래 중간엽 줄기세포 (TMSC)로부터 분화된 슈반세포가 분화후에 계대가 증가함에도 슈반 세포로서 특성을 유지함을 확인하였다.

[0071] <실시예 5> 면역 형광 염색을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포의 슈반세포로의 분화 확인

[0072] 상기 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)와 분화 유도된 슈반 세포 (TMSC-SC)의 면역형광염색을 실시하여 분화를 확인하였다.

[0073] 상기 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포와 분화 유도된 슈반 세포 분화(TMSC-SC)는 커버 슬립(cover slip) 위에서 각 조건 하에 배양하였으며, 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde) 용액으로 15분간 실온에서 고정한 후 PBS로 세척하였다. 세척된 세포는 0.1% Tween-20 및 2% 소혈청알부민(Bovine serum albumin)을 첨가한 PBS 용액에서 1시간 처리하고, 발현을 확인하고자 하는 항체는 제조사의 매뉴얼에 따라 비율대로 희석하고 PBS에 첨가한 후 실온에서 1시간 또는 냉장 상태에서 밤새 반응시켰다. 뒤이어 다시 PBS 용액으로 세척한 후, 실온 또는 냉장 상태에서 TRITC (tetrahydroamine isothiocyanate) 또는 FITC (fluorescein isothiocyanate) 접합체의 2차 항체를 1차 항체와 동일 방법으로 처리하였다. 대조 염색으로 세포핵을 염색하기 위해 DAPI가 첨가된 마운팅 용액(Vectashield)을 사용하여 마운팅한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

[0074] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 미분화된 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)에서는 GFAP의 발현을 관찰하기 힘든데 반하여, 분화 유도된 슈반 세포 (TMSC-SC)에서는 GFAP의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, NGFR도 GFAP와 마찬가지로 미분화 상태의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)에서는 발현되지 않지만 분화 유도된 슈반 세포 (TMSC-SC)에서는 발현이 강한 것을 확인하였다.

[0075] <실시예 6> 조건 배양액 (Conditioned Media)을 이용한 NSC34세포 배양을 통한 분화된 슈반세포의 특성 및 분화능 확인

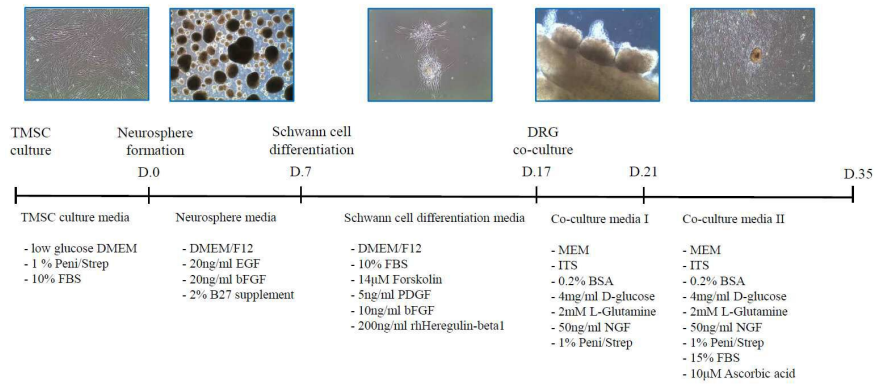
[0076] 슈반세포는 구조적, 기능적으로 말초 신경의 재생(peripheral nerve regeneration)에 중요한 역할을 하는 세포로 다양한 신경 영양 인자(neurotrophic factors)를 세포 외부로 분비하여 축삭(axon) 혹은 신경극(neurite)의 성장을 유도하고 안내하는 역할을 하는 것이 알려져 있다. 이에 따라 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포가 신경극 발아(neurite outgrowth)를 유도하는 영양 인자를 분비하는지 확인하기 위하여, 분화된 슈반세포로부터 조건 배양액 (conditioned media, CM)을 모아 마우스 운동 신경 세포인 NSC34 배양에 사용하였다.

- [0077] 배양 접시 내 80% 정도의 밀도로 분화된 슈반세포로부터 조건 배양액 (conditioned media)을 모으기 위해 PBS 워싱을 2회 해주었다. 2% FBS (Gibco)가 들어간 DMEM을 넣고 2일간 배양한 후 사용된 배양액을 모아 원심분리기로 1000g, 5분 처리하고 상층액을 분리하여 조건 배양액 (conditioned media, CM)을 준비하였다. 10% FBS (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)이 첨가된 DMEM 일반 배양액과 조건 배양액 (conditioned media)을 각각 NSC34 운동 신경 세포에 처리하여 세포가 자라나는 morphology 변화를 확인하였다.
- [0078] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 일반 배양액에 키운 대조군이 구형의 모양을 띄는 것에 비해 조건 배양액 (conditioned media)을 이용해 키운 경우 이틀째부터 세포의 신경극이 돌출이 일어나고, 시간 경과에 따라 신경극의 길이 역시 점점 길어지는 것을 확인하였다. 이를 통해 편도 유래 줄기세포로부터 분화된 슈반세포가 신경극 성장을 자극하는 영양 물질들을 세포 외부로 분비하는 것을 확인하였다.
- [0079] **<실시예 7> 후근신경절(Dorsal root ganglia)과 공동배양을 통한 분화된 슈반 세포의 특성과 분화능**
- [0080] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포가 축삭을 수초화시키는 기능을 수행하는지 확인하기 위해, 13일된 마우스 배아로부터 후근신경절(Dorsal root ganglia, DRG)을 분리하여 슈반세포와 상기 실시예 3의 방법과 동일하게 공동배양하였다. 총 18일의 공동배양 후 실시예 5의 방법과 동일하게 면역형광염색을 하여 수초화를 확인하였다. 면역형광염색에서 표지인자로 사용된 MBP는 슈반세포가 신경수초화(neural myelination)를 형성할 때에 발현되는 단백질로 슈반세포가 다중막(multi-layered sheath)을 형성할 때에 수초막에 있는 지질과 반응하여 수초막이 바른 구조를 형성할 수 있도록 하는 단백질이다. 상기 면역형광염색 분석 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 인간 미토콘드리아(human mitochondria, Human Mito)와 MBP가 이중염색(double staining)된 것이 확인되었고, 후근신경절에서 뺀어져 나온 신경세포를 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포가 감싸는 모양을 확인하였다.
- [0081] **<실시예 8> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 슈반 세포로의 높은 분화 효과 확인**
- [0082] Real-time PCR을 통해 본 발명 방법에 따른 편도 유래 중간엽 줄기 세포로부터의 슈반세포의 분화능 측면에 있어서 타 유래 줄기세포를 사용하는 것보다 높은 효과를 가짐을 확인하였다.
- [0083] Real-time PCR을 위하여 미분화 상태의 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC) 및 지방 조직 유래 줄기세포(ASC)와 슈반세포로 분화된 상태의 세포에서 총 RNA 추출을 위해 RNeasy mini kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 총 RNA를 추출하였다. Superscript II (Invitrogen)과 oligo-d(T)20 프라이머를 이용하여 42℃에서 1시간, 80℃에서 10분 반응하여 cDNA를 합성하였다. cDNA로부터의 표적 서열(primer)은 7500 Fast Real time PCR system(Applied Biosystem)를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 시키되 그 과정은 SYBR Premix Ex Taq (Takara)를 사용하여, 95℃에서 30초 동안 최초 변성(denaturation) 시키고, 95℃에서 3초간 변성시키고, 60℃에서 30초간 표적 유전자 증폭과정을 총 40회 반복 시킨 후, 멜팅 커브(Melting curve)를 그리기 위해 95℃에서 15초, 60℃에서 1분, 95℃에서 15초 과정을 진행하였다. GAPDH 발현량을 내부 대조군으로 사용하여 표준화시켰다.
- [0084] 표지인자로, Neural precursor 단계에만 제한적으로 발현되는 CAD19, 수초형성(myelination)이 일어나지 않은 immature Schwann cell 단계를 비롯하여 Schwann cell 분화에 전반적으로 발현되어지는 GFAP, NGFR, KROX20, S100B 및 수초형성(myelination)이 일어났을 때만 특이적으로 발현이 증가하는 MBP를 사용하였다.
- [0085] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0086] Neural precursor marker로 슈반세포 분화 후에 발현량이 감소될 것으로 예상되었던 CAD19의 발현이 TMSC-SC와 ASC-SC (ASC-derived Schwann cell) 두 경우 모두 미분화단계에 비해 분화 후에 감소하는 패턴을 보임을 확인하였다.
- [0087] 반면, 수초 형성이 일어나지 않은 단계에서 GFAP, NGFR, KROX20 및 S100B의 발현은 미분화 단계의 편도 유래 중간엽 줄기세포에 비해서 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 슈반 세포에서 모두 증가한 양상을 보임을 확인하였다. 그러나, 지방 조직 유래 줄기세포로부터 유래된 슈반 세포의 경우, GFAP, NGFR 및 S100B의 발현이 미분화 상태의 지방 조직 유래 줄기세포에 비해 오히려 줄어드는 양상을 보였다.
- [0088] 즉, 본원 발명의 방법에 따라 편도 유래 줄기세포로부터 슈반 세포로의 분화 유도시에 타 유래 세포와 대비하여 슈반 세포로의 분화능 측면에서 현저한 효과가 있음이 확인되었다. 상기 실험 결과들을 토대로, 본원 발명의 방법에 따른 슈반 세포로의 분화 방법은 사용되는 줄기세포와 분화 방법을 최적화하여 높은 효율로 슈반 세포를 다량 생산할 수 있음을 확인하였다.

도면

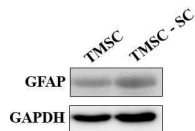
도면1

Protocol of Schwann cell differentiation

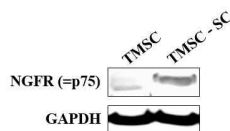


도면2

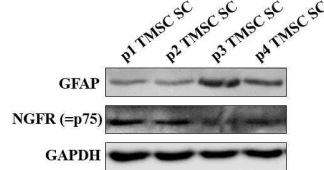
2-1) GFAP western blot



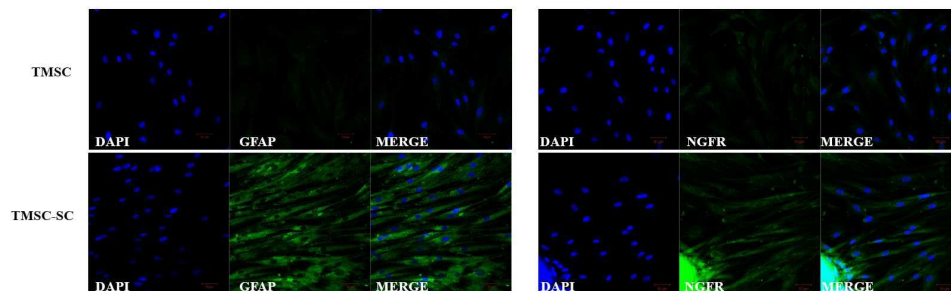
2-2) NGFR western blot



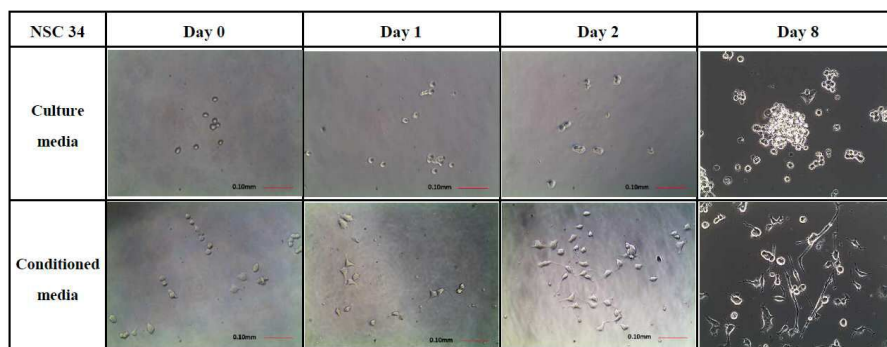
2-3) TMSC- SC passing and GFAP / NGFR western blot



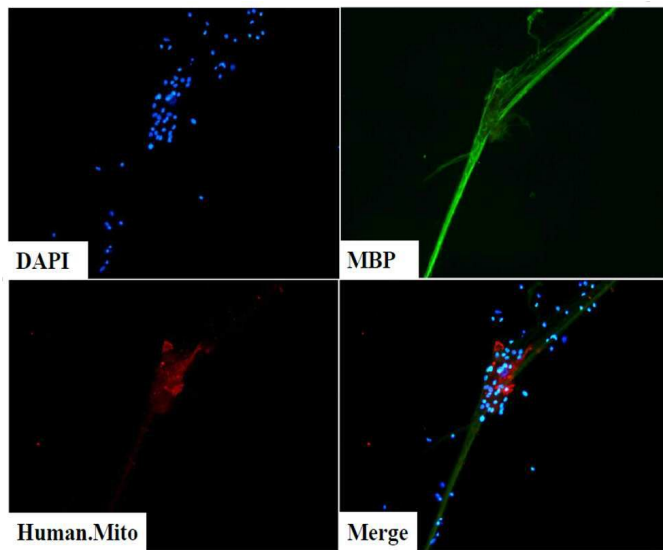
도면3



도면4

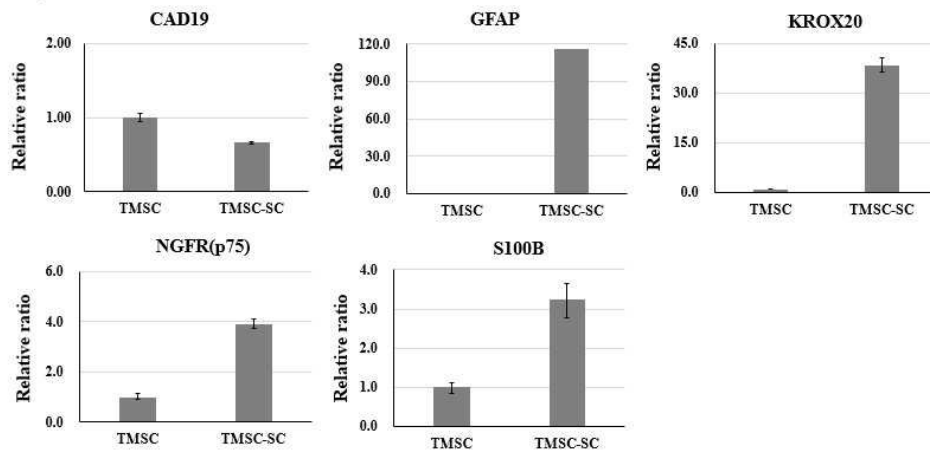


도면5



도면6

6-1) TMSC



6-2) ASC

