

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0149646

(43) 공개일자 2023년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0797 (2010.01) A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0623 (2013.01)

A61K 35/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0049115

(22) 출원일자 2022년04월20일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍성희

서울특별시 광진구 아차산로70길 62 광장현대3단지아파트 305동 1401호

남궁용

서울특별시 성북구 고려대로13길 18-23 (안암동2가) 101호

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

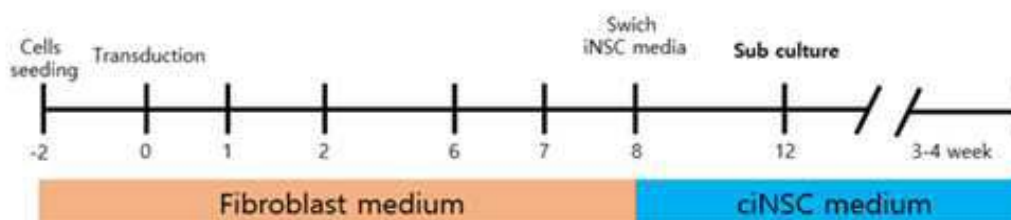
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 인간 체세포를 증식 가능한 신경줄기세포로 전환하는 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 전환하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 센다이 바이러스(Sendai virus), 줄기세포 관련 인자의 mRNA 또는 miRNA 및 소분자 화합물의 조합을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 교차 분화를 통해 전환시키는 방법 및 이의 용도에 대한 것이다. 본 발명에 따르면, 인간 섬유아세포로부터 직접 교차 분화를 통해 고품질의 신경줄기세포를 짧은 기간 안에 유도할 수 있어, 세포 치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포 확보가 가능하고, 종양 발생의 부작용이 없으므로 뇌질환에 대한 세포치료제로 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2506/1307 (2013.01)

C12N 2760/18831 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711153758
과제번호	2019M3E5D5065399
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	환자세포-유래 유도신경줄기세포의 안전성과 유효성 검증을 통한 실용화 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2023.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465037260
과제번호	00060247
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명	범부처재생의료기술개발사업
연구과제명	난치성 시신경척수염범주질환의 신경재생 및 재발억제를 위한 유도신경줄기세포 치
료제 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이바이러스를 포함하는 섬유아세포로부터 신경줄기세포의 직접 전환을 유도하기 위한 직접 교차 분화 유도 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포 배양을 위한 배양 배지를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 센다이바이러스는 Yamanaka 팩터를 포함하고 있는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 섬유아세포는 인간으로부터 유래된 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포는 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte), 뉴런(neuron), 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포 및 콜린 신경세포로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상으로 분화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이바이러스를 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조 방법

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 센다이바이러스는 Yamanaka 팩터를 포함하고 있는 것인 신경줄기세포의 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 배지는 N2, B27, bFGF 및 EGF가 포함된 DMEM/F12인 것을 특징으로 하는 신경 줄기세포의 제조 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 배양은 10 내지 20일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 신경 줄기세포의 제조 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 신경줄기세포는 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte), 뉴런(neuron), 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포 및 콜린 신경세포로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상으로 분화되는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 배양액 조성물; 또는

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조 방법으로 제조된 신경 줄기세포를 포함하는 세포 치료제.

청구항 12

제11항의 상기 세포 치료제를 포함하는 뇌질환 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 뇌일혈, 뇌경색, 알츠하이머, 치매, 헌팅톤병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 다발성 신경위축, 간질, 피크병 및 크로이츠펔트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 것인 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 전환하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 센다이 바이러스 (Sendai virus) 또는 mRNA 또는 miRNA와 소분자 화합물의 조합을 각각 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 교차 분화를 통해 전환시키는 방법 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간 섬유아세포를 유도 만능 역분화 줄기세포 (induced pluripotent stem cell)로 유도시킨 연구가 2007년 진행됨에 따라 세포의 리프로그래밍 (reprogramming)에 대한 연구가 시작하였다. 이전의 줄기세포 연구에 이용된 인간 배아줄기세포 유래 신경줄기세포의 경우, 인간의 배아 사용으로 인한 윤리적 문제와, 면역거부반응, 그리고 분화되지 않은 배아줄기세포가 이식될 경우 종양 형성 등의 가능성에 대한 문제가 있으며, 성체 줄기세포의 경우에는 세포의 확보가 어렵고 분화능에 제한이 있다는 문제점을 가지고 있다. 그러나 역분화 줄기세포는 윤리적 문제로부터 회피되고 면역거부반응 문제는 없지만, 분화되지 않은 줄기세포가 이식될 경우 테라토마 형성의 문제를 일으킬 수 있다. 또한 최근 발표되고 있는 직접 교차 분화한 신경줄기세포의 경우, 역분화 줄기세포 및 배아줄기세포 유래 신경줄기세포와 유사한 성질을 가지고 있으나, 신경줄기세포를 형성하는데 주로 이용되는 방법인 바이러스 시스템은 유전자의 무작위적 삽입에 의해 돌연변이 형성의 가능성이 있으며, 인체 내에 이식 시, 바이러스에 의한 문제점을 해결하고자 플라스미드, 단백질, RNA 등을 이용하고 있으나, 이를 이용할 경우 신경 줄기세포로의 분화 효율성이 낮고 암유전자를 이용한다는 점에서 확인되지 않은 새로운 문제가 발생할 수 있다.

[0004] 이러한 역분화 만능줄기세포의 문제점을 해결하는 방안으로 직접 교차분화 방법을 이용한 인간 섬유아세포를 원하는 세포로 직접 분화 (direct conversion)시키는 연구가 보고되었다. 그 중에서도 난치성 뇌질환의 치료를 목적으로 하는 섬유아세포를 이용한 신경세포로의 직접분화 연구가 활발하게 진행되었으며, 인간의 섬유아세포에 다양한 조합의 신경세포 관련 전사인자를 도입하고, 이를 통해 신경세포를 형성하는 연구를 성공시켰다. 이는 난치성 뇌질환의 세포치료제로써 사용 가능성을 보여주었으나, 신경세포로는 이미 분화된 세포이기 때문에 세포 치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포를 확보하는 어려움이 있었다.

[0005] 이와 같은 문제로 인해 최근에는 섬유아세포를 이용하여 신경줄기세포로 직접 분화시키는 방법들이 연구되고 있

다. 그 예로서, 바이러스 시스템을 이용한 여러가지 전사 인자들을 도입하여 섬유아세포에서부터 신경줄기세포를 유도하는 방법 등이 있다. 본 발명자들의 이전 발명인 ‘소분자화합물을 이용한 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 전환하는 방법 (PCT/KR2016/003819)’에서는 8가지 소분자화합물을 이용하여, 섬유아세포가 신경 줄기세포로 직접 변환하는 과정을 유도(직접 교차 분화)하는 방법을 제안하였으며, 이와 같은 직접 교차분화에 있어, 분화 기간을 더욱 단축시키고 효율성을 높여 치료제로서 사용하도록 충분한 양의 신경줄기세포로 증식할 수 있는 방법에 대한 연구가 더욱 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 직접 교차 분화 기간을 단축시키고, 고효율, 고품질의 신경 줄기세포를 만드는 방법을 연구하던 중, 외부 유전자의 삽입 없는 센다이 바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 어느 하나 이상; 및 소분자 화합물을 이용하여 이식에 필요한 충분한 양으로 증식이 가능하고 종양형성 없이 유전적으로도 안정한(genomic DNA stability) 신경줄기세포를 유도하는 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 어느 하나 이상을 포함하는 섬유아세포로부터 신경줄기세포의 직접 변환을 유도하기 위한 직접 교차 분화 유도 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 어느 하나 이상을 포함하는 배양액에서 체세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조 방법에 의해 제조된 신경 줄기세포를 포함하는 뇌질환 치료용 세포치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 어느 하나 이상을 포함하는 섬유아세포로부터 신경줄기세포의 직접 변환을 유도하기 위한 직접 교차 분화 유도 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 어느 하나 이상을 포함하는 배양액에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 신경 줄기세포를 포함하는 뇌질환 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명은 인간 섬유아세포로부터 신경 줄기세포를 유도하기 위하여, 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 및 최적의 소분자 화합물 조합을 이용하여 섬유아세포로부터 신경줄기세포를 제조하는 방법에 대한 기술이다.
- [0018] 섬유아세포로부터 별도의 유전자의 도입 과정 없이 신경 줄기세포로 분화하기 위하여, 본 발명은 직접교차분화 방법을 선택하였으며, 이를 위해 분화를 위한 소분자 화합물을 조합한 배양액을 사용하면서, 교차 분화 효율을 높이기 위해 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA를 추가로 사용하여, 분화 기간을 단축하고 효율성을 높일 수 있다. 본 발명과 같이 소분자 물질 및 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA를 이용한 교차 분화를 통해, 배아줄기세포

포 사용시 야기되는 다양한 문제점을 극복할 수 있으며, 역분화 줄기세포를 사용한 세포 치료제의 부작용(종양 형성 등)을 감소시켜 안전성이 향상된 세포 치료제로 활용될 수 있다.

[0019] 본 발명에서, "신경줄기세포"는 자기복제능력을 가지고 있으며 뉴론(neuron) 및/또는 글리아(glia), 예를 들면, 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및/또는 슈만세포(Schwann cell) 등으로 분화하는 다분화 능력을 가진 미분화세포이다. 신경 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포나 글리아 전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포(neural cell), 예를 들면 뉴론이나 글리아로 분화하게 된다. 상기 신경줄기세포는 이후 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte), 뉴런 (neuron), 도파민 신경세포, 가바 신경세포, 운동 신경세포 및 콜린 신경세포로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상으로 분화되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] "직접교차분화"란, 세포 리프로그래밍 기술 중 하나로, 이미 성숙한 분화 세포를 직접 리프로그래밍하여 줄기세포로 되돌리는 기술을 말한다. 본 발명은 인간 체세포인 섬유아세포를 직접교차분화를 통해 리프로그래밍하여, 신경줄기세포로 바로 분화시킬 수 있는 기술에 대한 것이며, 이는 특히 유도만능줄기세포로의 역분화 과정을 거치지 않고, 직접 신경세포로 분화하는 것이기 때문에 유도만능줄기세포의 분화시 나타나는 수많은 단점을 극복하고, 세포 분화 효율을 높일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 인간 섬유아세포를 리프로그래밍하여 직접 교차분화를 통해 신경줄기세포로 분화하기 위한 것으로, 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB43154, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep 중 어느 하나 이상의 소분자 화합물 및 센다이 바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 어느 하나 이상을 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 제조 방법에 대한 것이다.

[0022] 본 발명에서 "티아조비빈(Thiazovivin)"은 신경세포와 신경줄기세포의 세포사멸을 유도하는 Rho/ROCK 신호를 막고 신경줄기세포의 증식을 억제하는 PTEN 신호를 막는다고 알려져 있어, 신경줄기세포의 세포사멸 억제와 자가 재생능력과 자가증식능력을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다(Matthias Groszer, et al., Science 294: 2186, 2001). 상기 티아조비빈(Thiazovivin)은 ROCK 억제제 (inhibitor of Rho-associated kinase: ROCK)로 ROCK(Rho-associated kinase)을 선택적으로 억제하는 역할을 하는 물질이며, 티아조비빈 외에 Y-27632 등을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 "VPA (valproic acid, 2-프로필펜타노익산)"은 히스톤 디아세틸라아제 억제제 (histone deacetylase inhibitor)로 히스톤 디아세틸라아제를 억제하는 물질들을 의미하며, 크로마틴을 고아세틸화 상태로 만들어 세포증식억제인자 및 분화유도에 필수적인 유전자들의 발현을 촉진하여 세포 (암세포)의 분화를 유도하고 혈관신생 (angiogenesis)을 억제하며, 세포주기를 G1상태로 고정시켜 암세포 (cancer cell)의 아포토시스 (apoptosis)를 유발하여 강한 세포증식억제 (cytostatic) 항암활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 히스톤 디아세틸라아제 (HDAC)는 pRB/E2F를 매개로 유전자 전사 (gene transcription)을 억제하며, 히스톤 아세틸레이션 (histone acetylation)의 파괴가 여러 가지 암 발생과 관련되어 있고, HDAC는 저산소증, 저당 (低糖), 세포암화 등 열악한 환경조건에서 고발현되어 세포증식억제인자의 발현을 저해하여 세포증식을 촉진시키는 역할을 하여, HDAC는 세포암화 및 분화조절에 중요조절인자로 인식되고 있다고 알려져 있다. 히스톤 디아세틸라아제로서, VPA 외에 트리코스타틴(trichostatin, TSA) 또는 이의 유도체를 사용할 수도 있다.

[0024] 본 발명에서 "퍼모파민(purmorphamine)"은 퓨린 화합물로서, Shh 신호체계에 관여하는 것으로 알려져 있는 물질로 알려져 있다. 상기 퍼모파민은 Shh 시그널을 유도할 수 있다면 특별한 제한이 있는 것은 아니며 다양한 유도체가 사용될 수 있다. 예를 들어 2-(1-Naphthoxy)-6-(4-morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurin 등을 시중에서 구입하여 사용할 수 있다. 상기 퍼모파민은 신경줄기세포 유사세포로 역분화를 유도하기 위하여 통상적으로 사용되는 배지에 처리하면 된다. 이렇게 Shh 유사체인 퍼모파민을 처리하면 인간 섬유아세포로부터 신경줄기세포를 제조하기 위해 유전자를 도입할 필요가 없는 이점이 있다.

[0025] 본 발명에서 "A-8301"은 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제(TGF- β type I receptor inhibitor)로 TGF- β 타입 I 리셉터에 결합하여 TGF- β 타입 I의 정상적인 신호전달 과정을 방해하는 물질을 의미한다(Tojo M et al., CancerSci. 96: 791-800, 2005). TGF- β 타입 I (Transforming growth factor- β type I)은 세포증식, 분화 및 다양한 종류의 세포에 다양한 작용을 하는 다기능성 펩타이드로서, 이러한 다기능성은 지방세포형성, 근세포형성, 골세포형성, 상피세포 분화 등 여러 조직의 성장 및 분화에서 중추적인 역할을 하고, 신경 줄기세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. 상기 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제 A-8301 외에도 SB432542을 포함한 모든 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제가 사용될 수 있으며, 상기 저분자성 물질 TGF- β 타입 I 리셉터 억제제 A-8301은

시중에서 구입하여 사용하거나 제조하여 사용할 수 있으며 상기 억제제 처리에 의해 신경줄기세포증식이 촉진된다.

- [0026] 본 발명에서 "SB431542"는 ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제로 신속한 역분화를 유도하여 염색체 안정성을 향상시키는 역할을 한다.
- [0027] 본 발명에서 "CHIR99021"은 GSK (glycogen synthase kinase) 억제제로 GSK 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림(upstream) 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질이다. 상기 CHIR99021은 아미노피리미딘(aminopyrimidine)으로 표시되며, CHIR99021 외에도 모든 GSK 억제제가 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 "5-Aza-2'-deoxycytidine"은 데시타빈(decitabine)이라고도 부르며, 시티딘 유사체로서, DNA 탈메틸화제(DNA demethylating agent)로서 작용한다. DNA 탈메틸화제는 DNA의 복제 과정에 참여하고, DNA 상에 존재하는 메틸기(-CH₃)를 제거하여 유전자의 발현을 조절한다. 데시타빈과 같은 시티딘 유사체로서, 5-아자시티딘(5-azacytidine)이 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 "DZNep(3-Deazaneplanocin A)"은 S-아테노실호모시스테인 가수분해효소 억제제 및 히스톤 메틸트랜스퍼라제 EZH2 억제제로서, 억제된 종양 억제 유전자를 켜고 EZH2의 발현을 억제하여 세포 사멸을 유도하고, 시험관 내에서 히스톤 H3에 대한 라이신 27의 EZH2 활성화 및 트리메틸화를 차단한다. 암세포에서 세포 사멸을 유도하고 s-아테노실호모시스테인(SAH) 가수분해효소를 억제하며, 전체 DNA 메틸화를 감소시키고 화학적으로 유도된 다능성 줄기 세포(CiPSC)에서 Oct 4 발현을 향상시키는 역할을 수행한다.
- [0030] 본 발명에서 상기 각각의 소분자들은 섬유아세포의 신경줄기세포로의 분화를 위하여, 배지에 유효 농도로 포함되도록 하며, 배지의 종류 및 배양 방법 등 당해 기술 분야에서 공지된 요소에 따라 유효 농도를 조절하여 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 직접 교차 분화를 위한 배양액에 포함되는 센다이바이러스는 체세포인 섬유아세포의 리프로그래밍을 위한 것으로, Yamanaka 팩터를 포함하고 있어, 다분화능을 가지는 세포로 유도될 수 있는 특징을 가진다. 본 발명의 일 실시예에서는 CytoTune-ips 2.0 센다이 리프로그래밍 키트를 사용하였으며, 이는 Oct4, Sox2, Klf4, C-myc를 포함하는 센다이바이러스를 포함하는 것이다. 본 발명에서는 상기 CytoTune-ips 2.0 센다이 리프로그래밍 키트를 인간 섬유아세포에 처리하여, 신경줄기세포로 교차분화하기 위한 리프로그래밍을 진행하였다.
- [0032] 또한 본 발명에서 신경줄기세포의 분화를 위한 배지는 OCT4 및/또는 SOX4 발현을 위한 mRNA 및 소분자 화합물을 포함하여 직접 교차분화를 유도한 경우와 비교한 경우에도, 교차분화 효율이 높은 것을 확인하였다. OCT4는 줄기세포의 만능성을 유지하는데 필요한 전사 인자이며, SOX2는 신경줄기세포의 대표적인 마커이자 체세포를 유도 만능줄기세포로 전환할 때 필요한 인자 중 하나로 알려져 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 태아 인간 섬유아세포에 OCT4 mRNA 및 SOX2 mRNA를 형질감염시켜 유전자 발현을 조절한 다음, 기존 iNSC 미디어를 사용하여 신경줄기세포로 직접교차분화를 유도한 결과를 본 발명의 배지에서 직접 교차분화를 유도한 것과 비교하는 실험을 진행하였다.
- [0033] 또한, miRNA302/367를 이용하여 직접교차분화를 유도할 수 있으며, 상기 miRNA302/367은 줄기세포의 만능성을 유지시켜주는 유전자인 OCT4를 억제하는 NR2F2 유전자의 발현을 억제하는 역할을 한다. miRNA302/367은 NR2F2를 억제하여 OCT4의 발현을 유도하며 줄기세포로의 직접교차분화를 유도시킬 수 있는 중요한 클러스터이다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에서는, 인간 헌팅턴 피부 섬유아세포에 miRNA302/307 클러스터를 형질감염시켜 유전자를 조절한 다음, 기존 iNSC 미디어를 사용하여 신경 줄기세포로 직접교차분화를 유도하는 실험을 통해 본 발명의 배지에서 직접 교차분화를 유도한 것과 분화 효율을 비교하였다.
- [0034] 또한, 본 발명에 있어서, 배양 배지는 신경줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 배지는 DMEM/F12, N2, B27, bFGF(basic fibroblast growth factor), 및 EGF(epidermal growth factor)를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 유도된 줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α-MEM(α-Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니

다.

- [0036] 본 발명에 있어서, 직접교차분화를 위한 섬유아세포의 배양 기간은 10~20일인 것이 바람직하며, 15일 이내에 섬유아세포가 신경줄기세포로 분화되는 것을 확인할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 배양 후 13일 경과 후부터 신경줄기세포가 관찰되었으며, 15일 내지 19일 사이에 신경줄기세포의 콜로니를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 면역 염색을 통하여, 신경줄기세포 마커인 Sox1, Sox2, MSH1, Nestin의 발현을 통해 신경줄기세포로 분화되었음을 확인하였다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포는 염색체 안정성을 유지시키는 것을 특징으로 할 수 있으며, 10계대 이상 미분화 상태를 유지하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기의 방법을 통해 배양된 신경줄기세포를 포함하는 세포치료제에 대한 것이다.
- [0039] 상기 세포치료제는 인간으로부터 분리, 배양 및 재조합을 통해 제조된 세포 및 조직으로, 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 유전적으로 변형되거나, 생물학적 특성을 변화시킴으로써 세포가 질병의 진단, 예방 또는 치료 목적으로 사용되는 것을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 상기 세포 치료제는 뇌질환에 대한 예방 또는 치료용 약학 조성물일 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관 석회화를 억제시키거나 발병을 지연시킬 수 있는 모든 행위를 의미한다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0043] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 제형화에 필요한 담체 혹은 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 유효 성분에 추가로 포함될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 포함된다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0044] 예를 들어, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물 또는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0045] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 또는 비경구 투여(정맥주사, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도 및 약물 형태, 투여 경로 및 시간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절한 형태로 선택될 수 있다. 특히 본 발명의 약학적 조성물은 세포 치료제를 포함하므로, 상기 세포 치료제가 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 양으로, 질병을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 그 기준은 환자의 질환, 중증도, 약물 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 병용되는 성분 및 기타 사항에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 개별 치료제 혹은 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용을 최소화할 수 있는 수준으로 투여량을 결정할 수 있고, 이는 당업자에 의해 용이한 수준으로 결정될 수

있다.

[0048] 구체적으로 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중, 중증도, 성별 등에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 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 하며, 상기 투여량은 필요에 달리 설정할 수 있고 상기 기재된 용량에 의해 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0050] 본 발명은 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 전환하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 센다이 바이러스(Sendai virus), mRNA 또는 miRNA 와 소분자 화합물의 조합을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 교차 분화를 통해 전환시키는 방법 및 이의 용도에 대한 것으로, 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 와 소분자 화합물 조합을 이용하여 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 직접 전환하는 경우, 유전자의 삽입이 없기 때문에 고품질의 신경줄기세포를 유도할 수 있고, 세포치료에 이용할 만큼 충분한 양의 세포 확보가 가능하고, 종양 발생의 부작용이 없으므로 뇌질환에 대한 세포치료제로 활용하기 바람직한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 인간 태아 섬유아세포를 cytotune-ips 2.0 센다이 바이러스를 이용하여 별도의 삽입 없이 Oct4, Sox2, Klf4, C-myc(또는 L-myc) 유전자를 발현시키고, 소분자 화합물을 이용하여 신경줄기세포로 분화시킨 실험의 개요도이다.

도 2는 센다이 바이러스(SeV) 및 8종의 소분자 화합물(8SMs)를 포함하여 19일간 배양하면서 인간 섬유아세포가 신경 줄기세포로 분화 유도되는 과정을 관찰한 결과이다.

도 3은 인간 태아 섬유아세포를 이용하여 신경줄기세포로 직접 교차분화를 유도하기 위한 소분자 화합물 및 센다이 바이러스를 포함하는 배양액의 다양한 조합에 대하여 진행한 실험 결과이다.

도 4는 인간 태아 섬유아세포에서 직접 교차 분화된 신경 줄기 세포의 줄기세포 마커에 대한 qRT-PCR 결과이다.

도 5는 인간 태아 섬유아세포에서 직접 교차 분화된 신경 줄기 세포의 신경 줄기세포 마커를 확인하기 위한 면역형광염색 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 유도된 신경 줄기세포의 유전적 안정성을 확인하기 위하여 계대배양을 진행하고 2회차 및 10회차 배양 시, 염색체 안정성을 각각 확인한 결과이다.

도 7은 성인 인간 섬유아세포로부터 직접 교차 분화를 유도한 신경 줄기세포의 배양 결과(콜로니)를 확인한 것이다.

도 8은 성인 인간 섬유아세포에서 직접 교차분화를 유도한 신경 줄기세포의 줄기세포 마커를 확인하기 위한 면역형광염색 결과이다.

도 9는 성인 인간 섬유아세포에서 직접 교차 분화된 신경 줄기 세포의 신경 줄기세포 마커에 대한 qRT-PCR 결과이다.

도 10은 헌팅턴병 환자의 인간 섬유아세포로부터 직접 교차 분화를 유도한 신경 줄기세포의 배양 결과(콜로니)를 확인한 것이다.

도 11은 헌팅턴병 환자의 인간 섬유아세포에서 직접 교차분화를 유도한 신경 줄기세포의 줄기세포 마커를 확인하기 위한 면역형광염색 결과이다.

도 12는 헌팅턴병 환자의 인간 섬유아세포에서 직접 교차 분화된 신경 줄기 세포의 신경 줄기세포 마커에 대한 qRT-PCR 결과이다.

도 13은 인간섬유아세포(태아 섬유아세포, 성인 섬유아세포, 헌팅턴병 환자 인간 섬유아세포)에서 확인된 신경 줄기세포 변환 효율을 각각 비교한 도이다.

도 14는 본 발명에서 유도된 신경 줄기세포의 분화 능력을 확인하기 위해, GABAergic 신경세포로 분화를 진행한

결과를 나타낸 것이다.

도 15는 분화된 GABAergic 신경 세포에 대하여 세포 면역 염색을 실시한 결과, 신경세포 초기마커인 Tuj1과 GABAergic 신경세포를 나타내는 GABA마커가 발현된 것을 확인한 도이다.

도 16은 OCT4 mRNA 375ng 및 SOX2 mRNA 125ng을 주입하여 신경 줄기세포로 직접 교차분화를 유도한 결과를 도시한 것이다.

도 17은 OCT4 및 SOX2 mRNA를 형질도입하여 분화를 유도한 신경 줄기세포의 줄기세포 유전자의 발현 여부를 확인한 도이다.

도 18은 miRNA302/367을 형질감염하여 분화를 유도한 신경 줄기세포의 배양 과정 및 그 결과를 확인한 도이다.

도 19는 miRNA302/367을 형질감염하여 분화를 유도한 신경 줄기세포의 줄기세포 유전자의 발현 여부를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0054] 실시예 1. 인간 태아 섬유아세포로부터 신경줄기세포로의 직접 교차분화 유도

[0055] 인간 섬유아세포를 신경줄기세포로 유도하기 위해, 인간 태아 섬유아세포 1×10^5 개를 60mm dish에 준비하고, 리프로그래밍과 관련된 8종의 소분자 화합물(티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep) 및 센다이바이러스(OSKM, cytotune-ips 2.0 sendai reprogramming kit)를 DMEM/F12, N2 supplement, B27 supplement, bFGF 및 EGF로 구성된 neurobasal medium에 첨가하여 준비된 세포를 배양하였다. 상기 8종 소분자 화합물 각각의 특성에 대해서는 선행 특허(PCT/KR2016/003819)에 기재된 바와 같다.

[0056] 19일 동안 상기 배지에서 분화를 유도하였으며 이후 2~3일 마다 배양액을 바꿔주면서 섬유아세포가 신경줄기세포로 분화하는 과정을 도 2와 같이 확인하였다. 도 2에서 보듯이 배양 후 13일차에서 작은 신경 줄기세포 모양의 세포들이 관찰되었으며, 15일차에 신경 줄기세포의 콜로니를 확인하였고, 19일차에는 신경 줄기세포의 단일 콜로니를 확보할 수 있을 만큼 콜로니가 확인되었다.

[0057] 이전의 연구에서, 센다이 바이러스가 첨가되지 않은 경우, 섬유아세포가 신경줄기세포로 직접 교차분화하는데 걸리는 기간은 약 60일이었으나, 센다이바이러스를 함께 처리한 경우 기간이 크게 단축된 것을 알 수 있다.

[0059] 실시예 2. 소분자 화합물 및 센다이바이러스의 직접 교차 분화 효율 비교

[0060] 소분자 화합물만을 이용한 기존의 연구 결과와 본원 발명의 센다이 바이러스 및 소분자 화합물을 포함하는 배양액 구성에 따른 직접 교차 분화 효율을 비교하기 위하여, 아래 표 1과 같은 조합으로 비교 실험을 수행하였다.

표 1

[0061]	1	Only SeV	SeV(OSKM)만을 이용하여 신경줄기세포로의 직접변환
	2	3SMs	SB431542, CHIR99021, hLIF 만을 이용한 신경줄기세포로의 직접변환
	3	4SMs	A8301, Purmorphamine, Valproic acid 만을 이용한 신경줄기세포로의 직접변환
	4	8SMs	Thiazovivin, Valproic acid, Purmorphamine, A8301, SB431542, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep 만을 이용한 신경줄기세포로의 직접변환
	5	SeV+3SMs	'2)'의 조건 배양액에 SeV(OSKM)를 처리한 배양액을 이용한 신경줄기세포로의 직접변환
	6	SeV+4SMs	'3)'의 조건 배양액에 SeV(OSKM)를 처리한 배양액을 이용한 신경줄기세포로의 직접변환

7	SeV+8SMs	‘4)’의 조건 배양액에 SeV(OSKM)를 처리한 배양액을 이용한 신경줄기세포로의 직접변환
---	----------	---

[0062] 상기 7가지 조건의 소분자 화합물을 포함하는 배양액 조건에서 인간 태아 섬유아세포의 직접 교차분화를 15일간 유도한 결과, 도 3과 같이 다른 조건에서는 신경줄기세포 모양의 콜로니가 관찰되지 않았으나, 7)번과 같은 배양액의 조건에서는 13일차에 신경줄기세포 모양의 세포가 나타나기 시작하였으며, 15일차에 작은 신경줄기세포 콜로니를 확인할 수 있었다.

[0064] 실시예 3. 직접 교차 분화된 신경줄기세포의 마커 발현 확인

[0065] 센다이바이러스와 8종의 소분자 화합물로 유도한 인간 신경줄기세포가 일반적인 신경줄기세포의 특징을 나타내는 지 확인하기 위하여, qRT-PCR을 통해 신경줄기세포 마커의 발현 여부를 확인하였다.

[0066] 먼저, 인간 태아 섬유아세포에 센다이바이러스를 처리한 후 DMEM F12, N2 supplement, B27 supplement, bFGF 및 EGF로 구성된 neurobasal medium에 19일간 배양하여 신경줄기세포를 유도하였고(Only SeV iNSC), 인간 섬유아세포에 센다이바이러스 처리 후, DMEM F12, N2 supplement, B27 supplement, bFGF 및 EGF로 구성된 neurobasal medium에 티아조바이빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep 8가지 소분자 화합물을 첨가하고, 19일간 배양하여 신경줄기세포를 유도하였다 (SeV + 8SMs iNSC).

[0067] 또한, 센다이바이러스의 처리 과정 없이, 인간 섬유아세포를 DMEM F12, N2 supplement, B27 supplement, bFGF 및 EGF로 구성된 neurobasal medium에 티아조바이빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, CHIR99021, 5-Aza-2'-deoxycytidine 및 DZNep 8가지 소분자 화합물을 첨가한 배양액으로 60일 동안 배양하여 신경줄기세포를 유도하였다(Only 8SMs iNSC).

[0068] 상기 방법으로 유도된 각각의 신경 줄기세포(Only SeV iNSC/ SeV + 8SMs iNSC / Only 8SMs iNSC)에 대하여, 신경줄기세포 마커인 Sox2, Nestin 및 MSH1의 발현량을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 4에서 보듯이, 대조군인 Neonatal fibroblast과 비교하여, 상기 유도된 신경 줄기세포에서 신경줄기세포 마커가 200 내지 600 배 가량 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, SeV + 8SMs iNSC 및 Only 8SMs iNSC의 경우, Only SeV iNSC 보다 Sox2, MSH1가 3배 이상 높은 발현량을 나타내었다. 다만, 분화가 유도되는 기간에 있어, SeV + 8SMs iNSC의 경우에는 19일 경과 후 다량의 신경 줄기세포를 확보할 수 있었으며(실시예 1), 이는 선행 발명(PCT/KR2016/003819)에 기재된 것과 같이, 8종 소분자 화합물만을 이용한 경우보다 40일 가량 빠르게 신경줄기세포가 유도된 것임을 확인하였다.

[0069] 또한, 상기와 같이 인간 태아 섬유아세포로부터 유도된 신경 줄기세포 마커에 대하여, 신경줄기세포 마커인 Sox1, Sox2, MSH1, Nestin을 이용한 세포 면역 염색 (immunocytochemistry (ICC))을 진행한 결과, 선별된 신경 줄기세포에서 모두 신경 줄기세포 마커가 확인되었으며, 분화된 세포는 신경 줄기세포임을 확인할 수 있었다. (도 5)

[0071] 실시예 4. 계대 배양을 통한 염색체 안정성 확인

[0072] 인간 태아 섬유아세포로부터 유도된 신경줄기세포의 줄기세포 성질을 증가시키기 위한 목적으로 계대배양을 진행하였다. 유전적 안정성을 확인하기 위하여 총 10회 계대배양을 진행하여, 2번째 계대배양 및 10번째 계대배양한 신경 줄기세포의 염색체 안정성을 확인하였다. 그 결과, 도 6에서 보듯이 모두 정상적인 염색체 안정성을 가지는 것으로 확인하였다.

[0074] 실시예 5. 성인 섬유아세포를 이용한 신경줄기세포 유도

[0075] 상기 실시예 1 내지 4는 태아 섬유아세포를 이용하여 신경줄기세포를 유도하였으나, 성인의 섬유아세포로부터 동일하게 신경줄기세포가 유도되는지 여부를 확인하기 위하여, 성인 섬유아세포를 이용하여 상기 실시예 1 내지 4와 동일한 방법으로 신경줄기세포를 유도하고 그 특징을 확인하였다.

[0076] 그 결과, 도 7에서 보듯이, 상기 실시예 1과 같이 19일동안 분화를 유도하며 관찰한 결과, 13일차에 신경 줄기

세포의 모양이 관찰되기 시작하였으며, 19일차에는 신경 줄기세포의 콜로니를 확인할 수 있었다.

[0077] 또한, 유도된 신경줄기세포의 세포 면역 염색 결과, 신경 줄기세포 마커인 Sox1, Sox2, MSH1 및 Nestin을 확인할 수 있었으며(도 8), qRT-PCR을 수행하여 관찰한 결과, 성인의 섬유아세포와 비교하여 Sox2, Nestin 및 MSH1의 발현이 높은 수준으로 확인되어(도 9), 성인의 섬유아세포를 이용하여 신경 줄기세포를 성공적으로 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0079] 실시예 6. 헌팅턴병 환자의 섬유아세포를 이용한 신경줄기세포 유도

[0080] 실제 뇌 질환 환자의 섬유아세포를 이용하여 직접 교차분화를 통해 신경줄기세포를 유도할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 상기 실시예 1 내지 4와 동일한 방법으로 신경줄기세포를 유도하고 그 특징을 확인하였다.

[0081] 그 결과, 도 10에서 보듯이, 실시예 1과 같이 19일동안 분화를 유도하며 관찰한 결과, 13일차에 신경 줄기세포의 모양이 관찰되기 시작하였으며, 19일차에는 신경 줄기세포의 콜로니를 확인할 수 있었다.

[0082] 또한, 유도된 신경줄기세포의 세포 면역 염색 결과, 신경 줄기세포 마커인 Sox1, Sox2, MSH1 및 Nestin을 확인할 수 있었으며(도 11), qRT-PCR을 수행하여 관찰한 결과, 성인의 섬유아세포와 비교하여 Sox2, Nestin 및 MSH1의 발현이 높은 수준으로 확인되어(도 12), 성인의 섬유아세포를 이용하여 신경 줄기세포를 성공적으로 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0083] 결과적으로, 인간 태아 섬유아세포, 성인 섬유아세포 및 헌팅턴병 환자의 섬유아세포 모두에서 본원 발명의 센다이 바이러스 및 8종의 소분자 화합물을 포함하는 배양액을 이용하여 성공적으로 신경 줄기세포가 유도됨을 확인하였으며, 또한 각각의 섬유아세포 별 변환 효율을 비교해본 결과 도 13에서 보듯이, 인간 태아 섬유아세포의 경우에는 약 1.2%, 성인 및 헌팅턴병 환자의 섬유아세포의 경우에는 약 0.4%의 변환 효율을 보였다.

[0085] 실시예 7. 유도된 신경줄기세포의 분화능력 확인

[0086] 상기 실시예로부터 유도된 신경 줄기세포의 분화 능력을 확인하기 위하여, in vitro 상에서 GABAergic 신경세포로 분화를 유도하였다. GABAergic 신경세포는 뇌내에서 GABA를 분비하며, GABA(γ -aminobutyric acid)는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산으로 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 알려져 있다.

[0087] 본 발명의 실시예를 통해 유도된 신경 줄기세포를 poly-L-ornithine/fibronectin(PLO/FN)이 coating 된 24 well plate에 -Day1에 5×10^4 cell/well이 되도록 seeding하고, 0-7일 까지 DMEM F12, Neurobasal media가 1:1로 섞인 media에 0.5X N2 supplement, 0.5X B27 supplement, 1X MEM-NEAA, 100ug/ml Penicillin and streptomycin, 10uM Valproic acid, 0.65uM Purmorphamine, 2uM SB431542, 0.1uM Retinoic acid 0.1uM, 1uM CHIR99021, 200nM Dosormorphin, 100nM LDN193189, 200uM Ascorbic acid를 첨가하여 배양한 후, 7-21일차에는 DMEM F12, Neurobasal media가 1:1로 섞인 media에 0.5X N2 supplement, 0.5X B27 supplement, 1X MEM-NEAA, 100ug/ml Penicillin and streptomycin, 200uM Ascorbic acid 넣은 media로 배양하면서 분화 21일차 까지 뉴런 모양을 띄는 신경 세포(GABA neuron)로 분화됨을 확인하였다. (도 14)

[0088] 또한, 상기 분화된 GABAergic 신경세포를 이용하여, 세포 면역 염색을 실시한 결과, 신경 세포 초기 마커인 Tuji 및 GABAergic 신경 세포를 나타내는 GABA 마커가 발현됨을 확인하였다(도 15). 즉, 본 발명의 센다이 바이러스 및 8종의 소분자 화합물을 포함하는 배양액을 통해 직접 교차 분화를 유도하여 생산된 신경 줄기세포는 신경세포로 성공적으로 분화할 수 있음을 확인하였다.

[0090] 실시예 8. mRNA를 이용한 유전자 도입을 통한 신경 줄기세포 유도

[0091] 인간 태아 섬유아세포를 이용한 신경줄기세포 직접 교차분화 유도에 있어서, 줄기세포 만능성을 유지하기 위한 전사 인자인 OCT4 및 체세포를 유도만능세포로 전환할 때 필요한 인자인 SOX2의 영향을 확인하기 위하여, 인간 태아 섬유아세포에 줄기세포 유전자인 OCT4 mRNA, SOX2 mRNA를 직접 형질 감염하여 유전자를 도입한 후, 본원 발명의 iNSC media를 이용하여 신경 줄기 세포로 직접 교차 분화를 유도하였다.

[0092] 인간 태아 섬유아세포를 24 well plate에 각 well마다 5×10^4 개씩 seeding 하고, DMEM+10%FBS medium에서 하룻

밤 동안 배양하였다. 다음날 각 조건에 맞는 Lipofectamine messengerMAX reagent와 OptiMEM medium(25ul)를 vortex하여 10분간 상온에서 incubate 시켜주었다(혼합물1). OCT4 mRNA 및 SOX2 mRNA는 Opti-MEM media(50ul)에 필요한 양을 희석하고(혼합물2), 혼합물1과 혼합물2를 모두 섞어 5분간 상온에서 incubate 한다. 이후 각 24 well plate에 넣어 6시간 또는 24시간 동안 transfection 시켜준다. 이후, iNSC medium으로 교체하고, 직접 교차 분화를 유도하였다.

[0093] 상기 iNSC에 DMEM F12, N2 supplement, B27 supplement, 티아조바이빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542 및 CHIR99021 를 추가하고, 14일 간 더 배양 한 결과, 도16 과 같이 세포는 형질 감염 3일차까지 크기가 작아지다가 이후 길쭉하게 늘어나는 것을 보였으나, 14일 이후에도 신경 줄기세포로 모양이 변하지는 않았다.

[0094] 상기 SOX2+OCT+8SMs조건으로 분화를 유도한 인간 태아 섬유아세포에 대하여 7일차, 14일차에 qRT-PCR을 이용하여 강하게 발현되는 RNA를 확인하고 이의 발현량을 비교하였다.

[0095] 인간 태아 섬유아세포(NEOhDF D0)를 대조군으로 사용하였으며, NEOhDF D7 SOX2+OCT4, NEOhDF D14 SOX2+OCT4조건에서 SOX2 발현량이 100배 이상 증가한 것을 확인하였다. (도 17)

[0097] 실시예 9. miRNA를 이용한 신경 줄기세포 유도

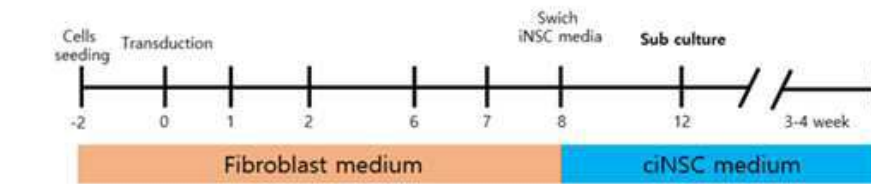
[0098] miRNA302/367의 발현을 통해 OCT4 유전자를 억제시키는 NR2F2 유전자를 억제하여 신경 줄기세포의 직접 교차분화 유도 실험을 진행하였다. human Huntington Dermal Fibroblast에 miRNA302/307 cluster를 형질감염시켜 유전자를 조절한 다음, 기존 iNSC 미디어를 사용하여 neural stem cell로 직접 교차분화를 유도하여, 유도 효율을 확인하였다. 6 well plate에 human Huntington Dermal Fibroblast를 2×10^5 개씩 seeding하고, Lipofectamin RNAiMAX 5ul, miRNA302/307 5nM을 넣어준 뒤, 5분간 상온에서 incubate 하였다. 이후, Opti-MEM media(1ml)과 같이 섞어 5시간 동안 transfection 시켜주었다. 이후, DMEM+ media로 교체하여 1일 (T1), 2일 (T2), 3일 (T3) 동안 배양하고, 8SMs 을 포함하고 있는 배지로 교체하여 16일간 배양하여 분화 유도여부를 관찰하였다. 7일 제 subculture 한 후, 세포를 관찰한 결과, 세포 모양은 작고, 둥근 모양으로 변화되었지만, 세포 양이 줄었으며, 증식이 되지 않았다. (도 18)

[0099] 또한, 상기 배양된 세포의 신경 줄기세포 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 발현 7일차, 14일차에 OCT4, SOX1, SOX2, NESTIN, Musashi-1을 사용하여 RT-PCR 실험을 진행하였다. 그 결과, 줄기세포 관련 마커 발현이 control 대비 3일차에서 가장 높다는 것을 확인했다. 관련 마커 발현이 증가하여 miRNA302/367 cluster가 줄기세포로의 직접 교차분화를 도와주는 것이 확인되었다 (도 19)

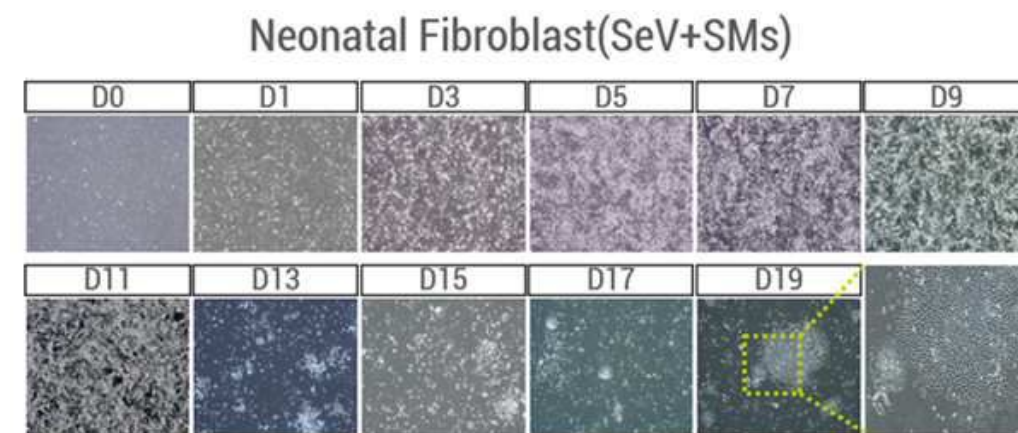
[0101] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

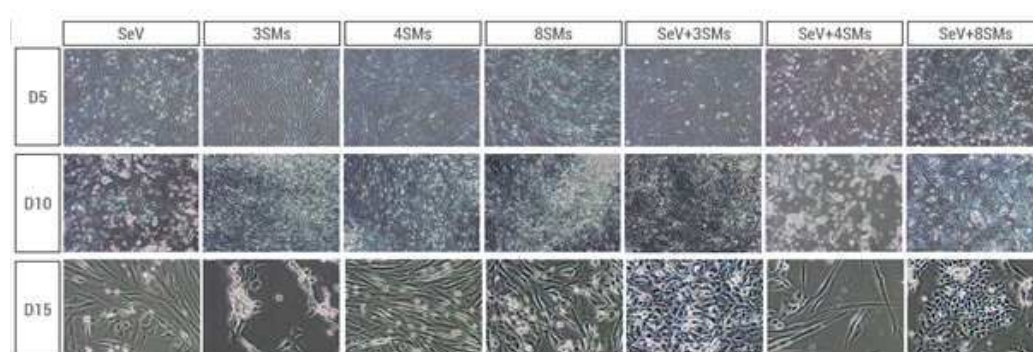
도면1



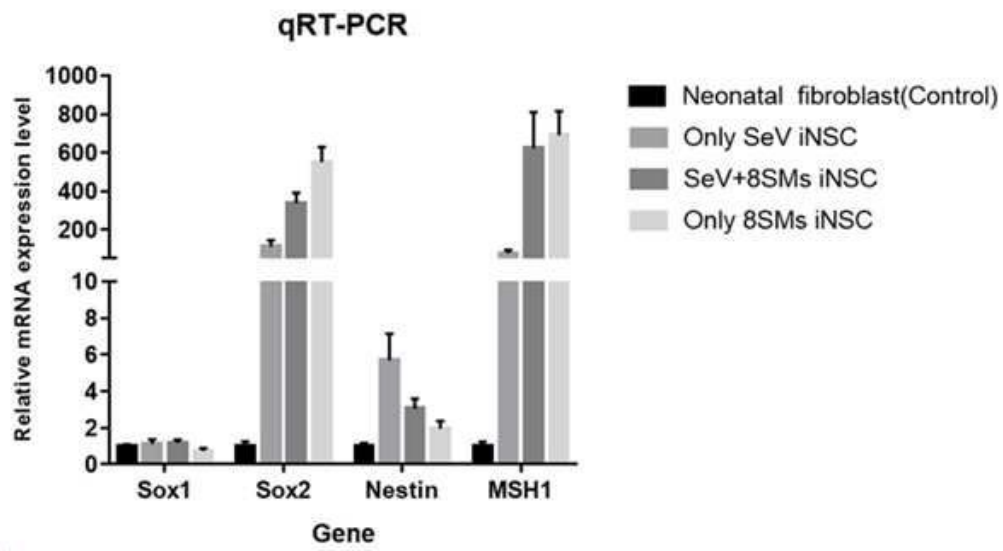
도면2



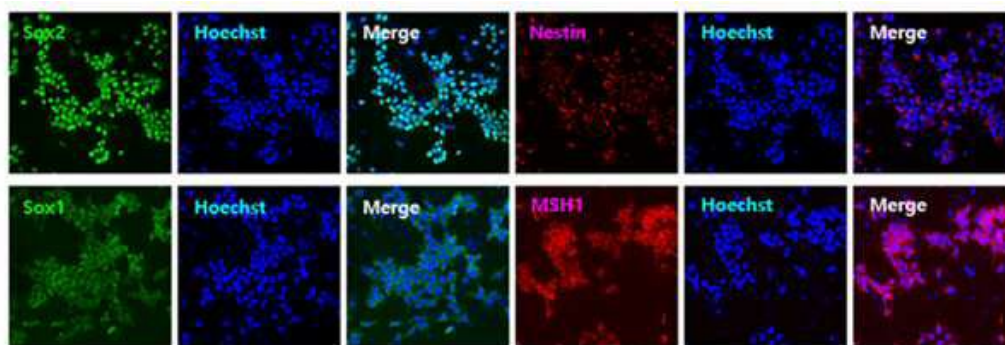
도면3



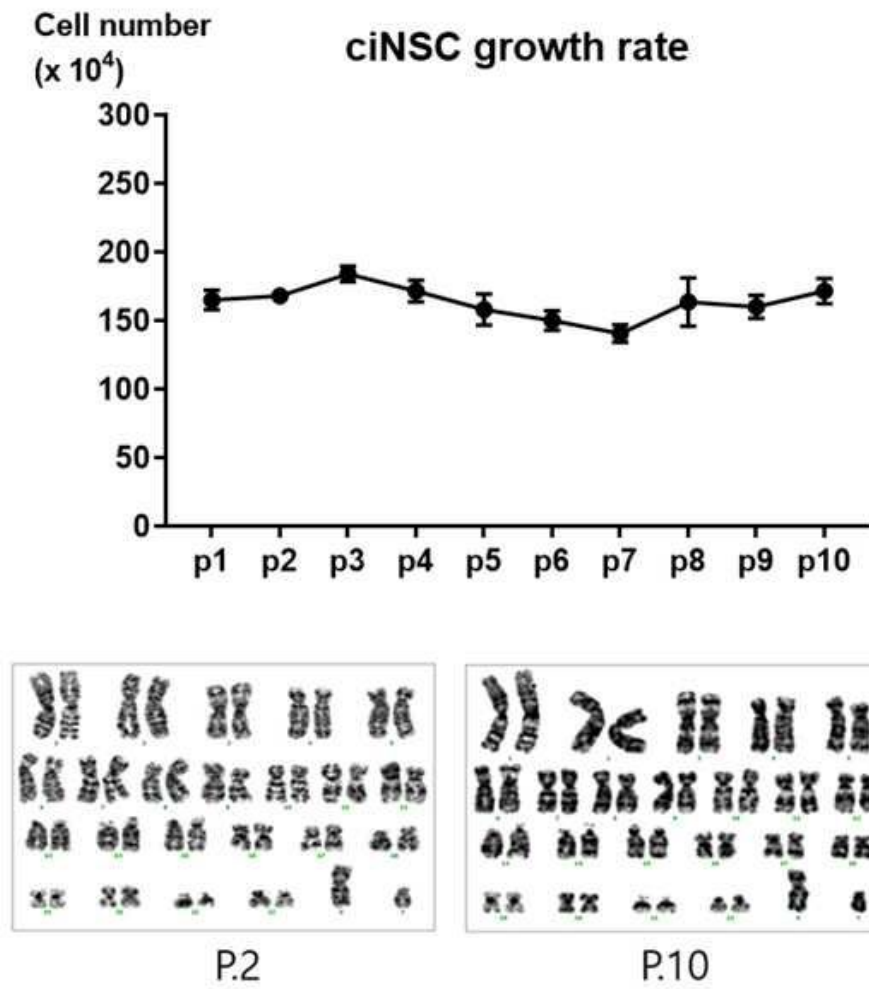
도면4



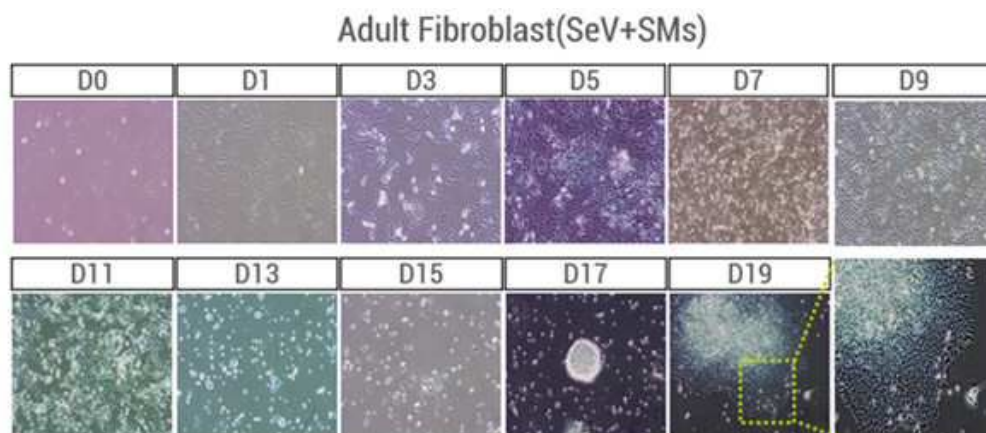
도면5



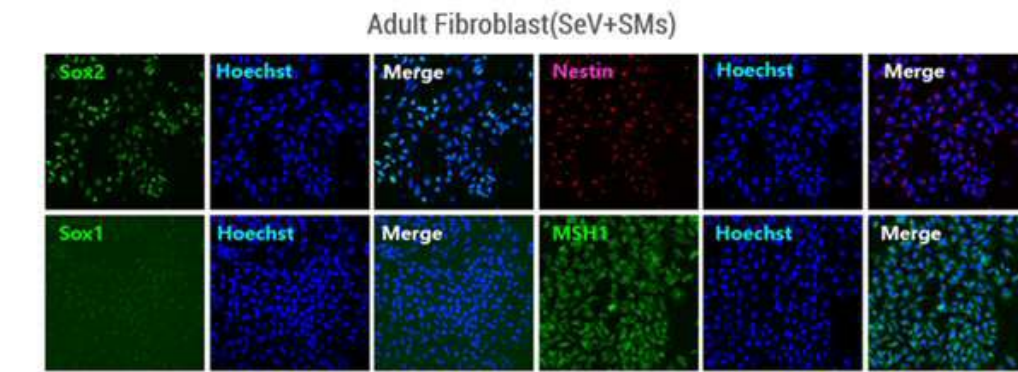
도면6



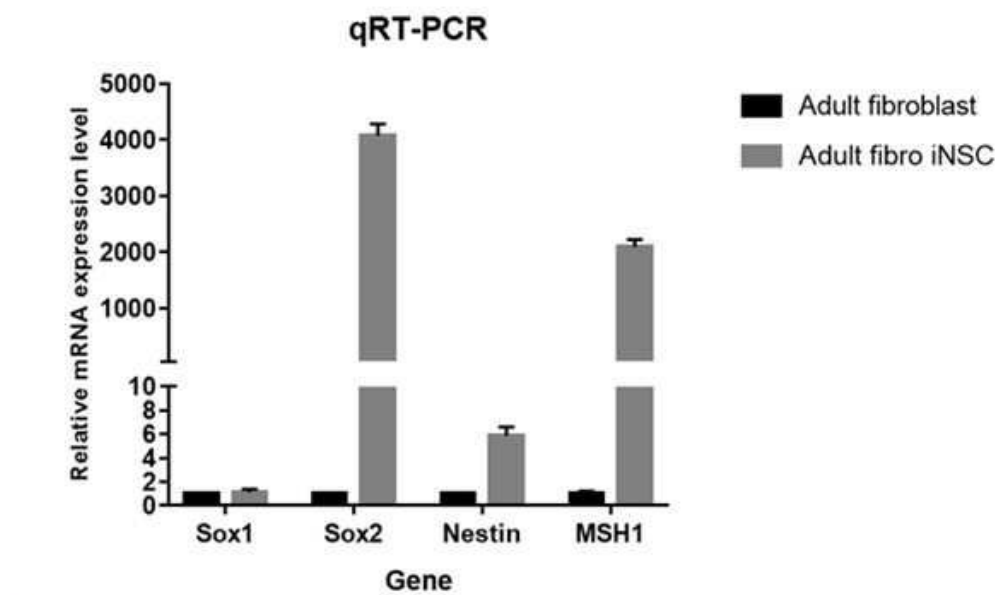
도면7



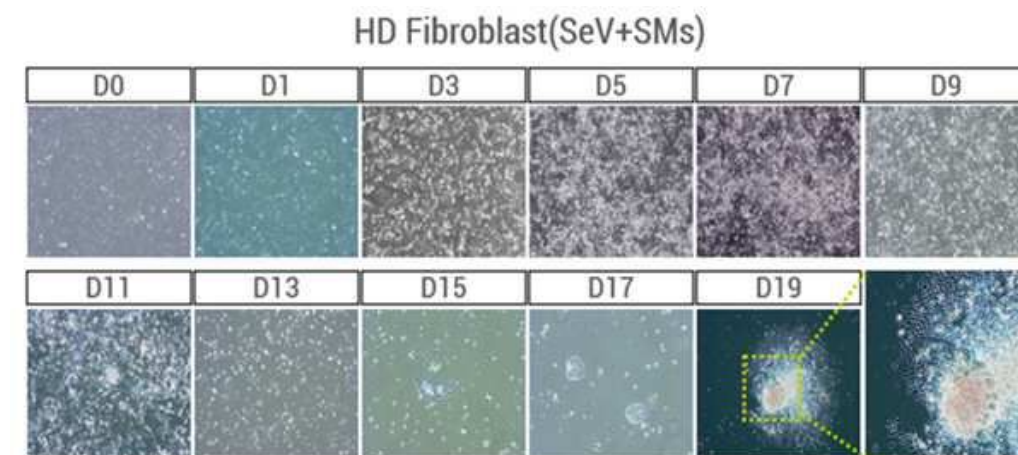
도면8



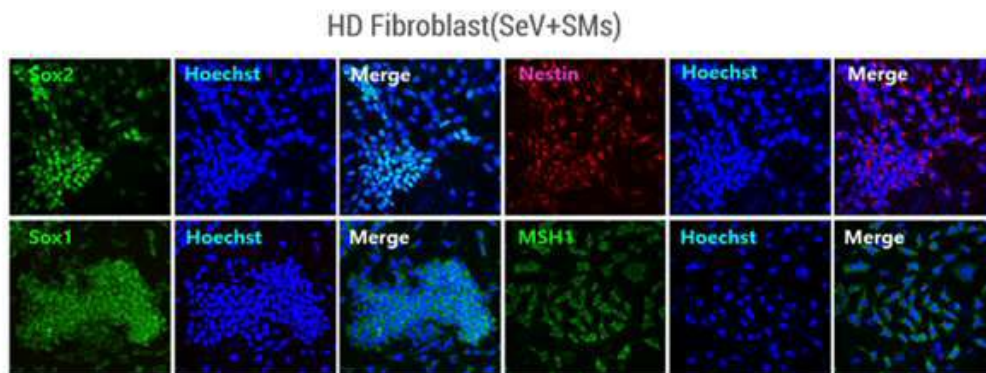
도면9



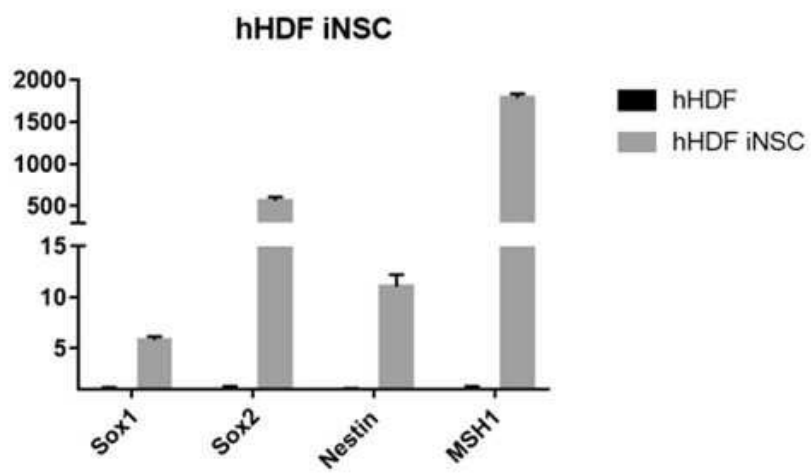
도면10



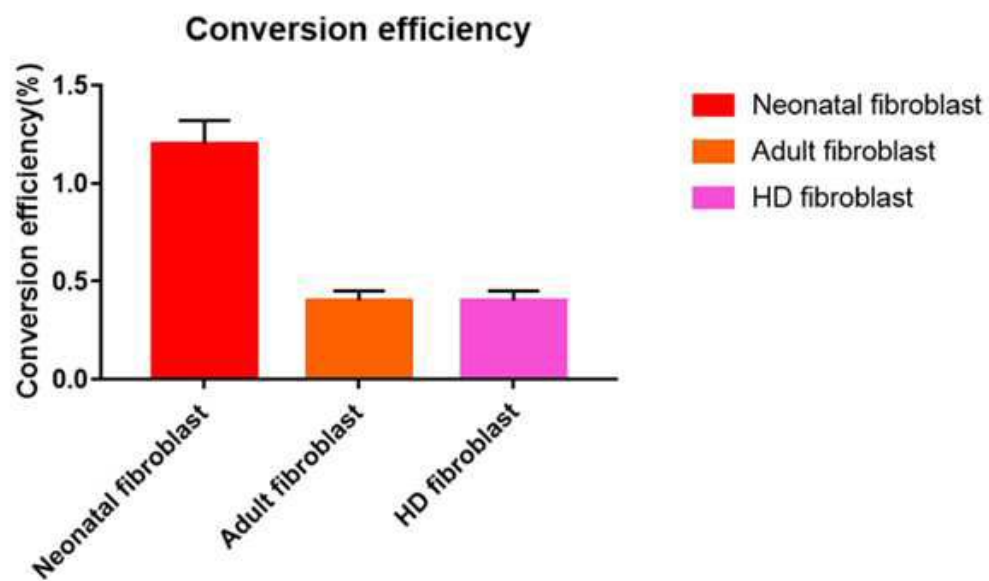
도면11



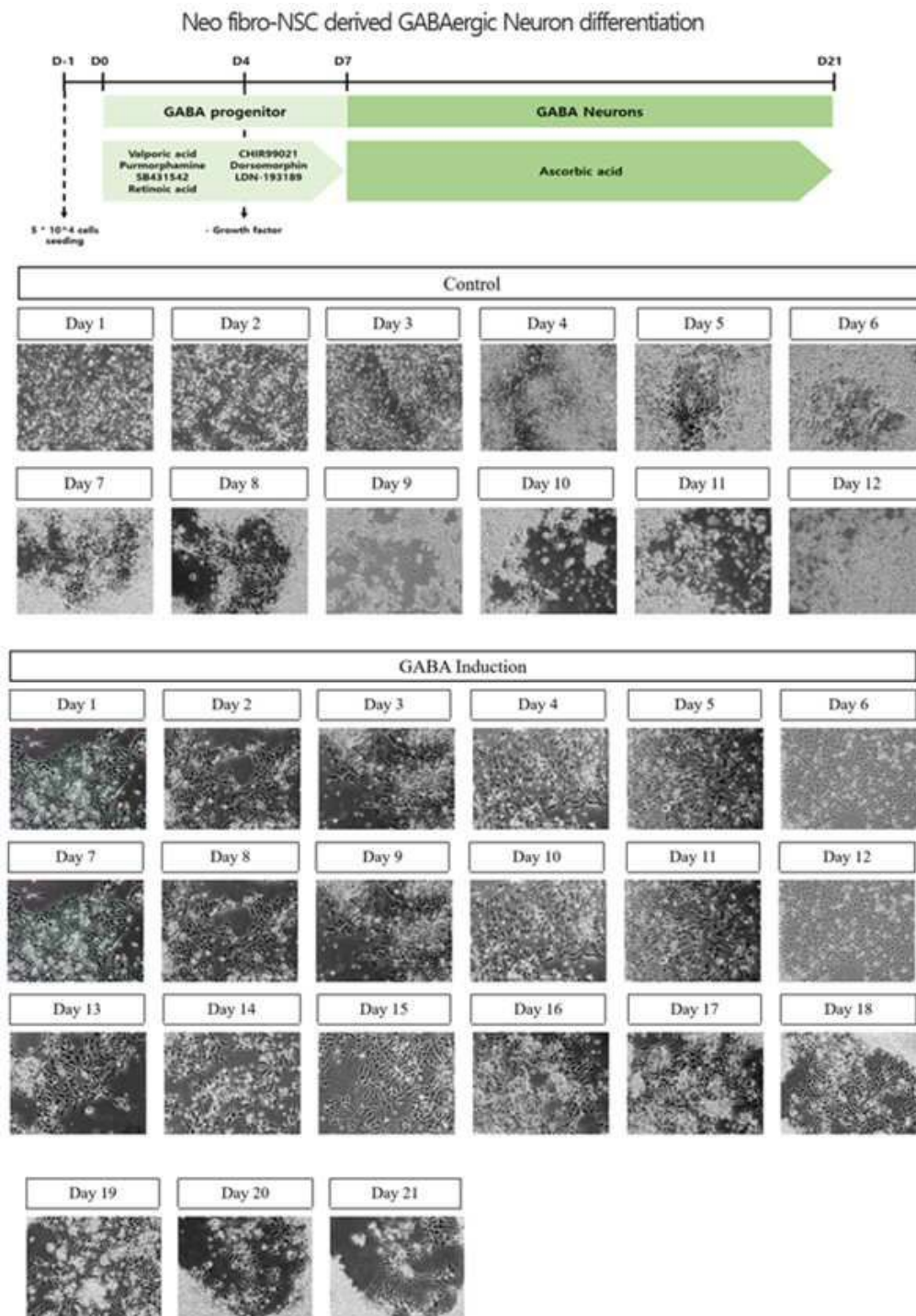
도면12



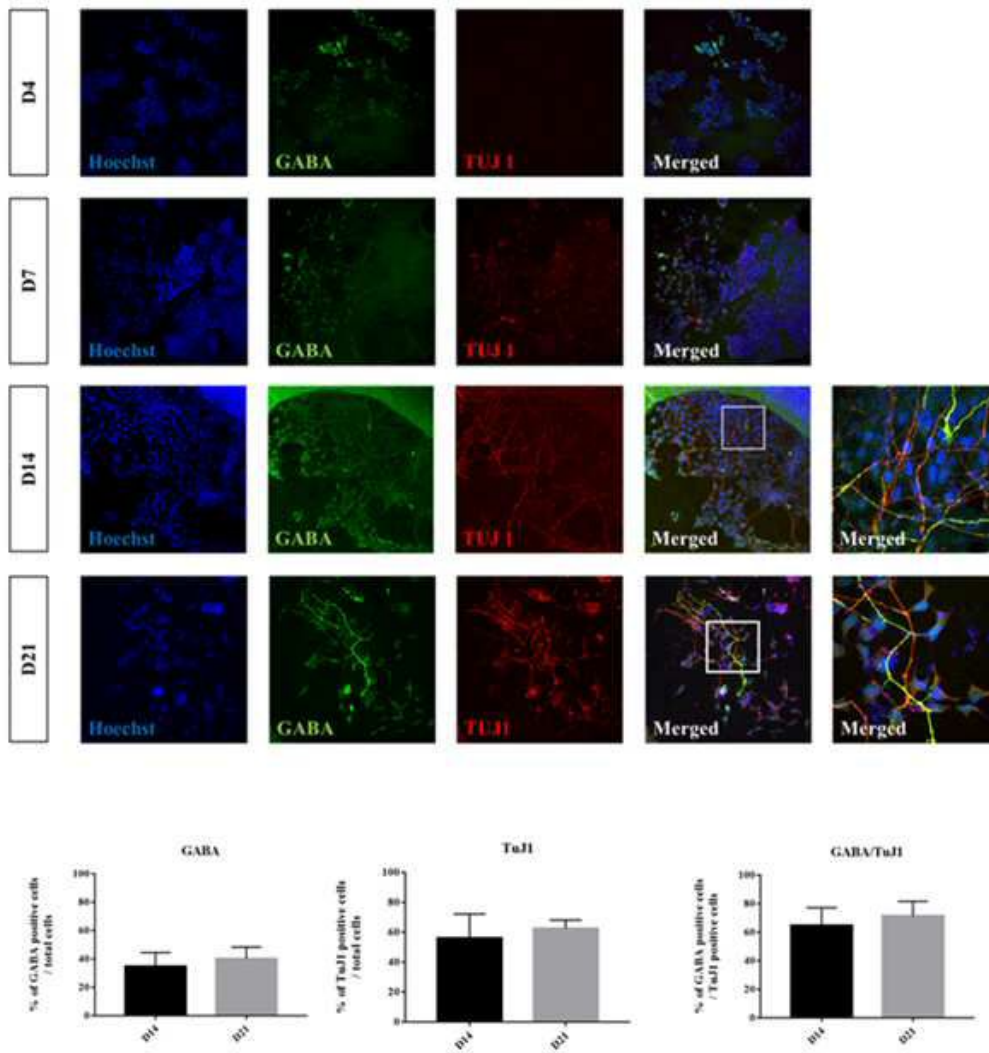
도면13



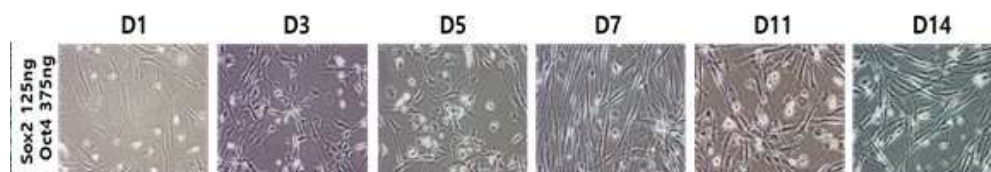
도면14



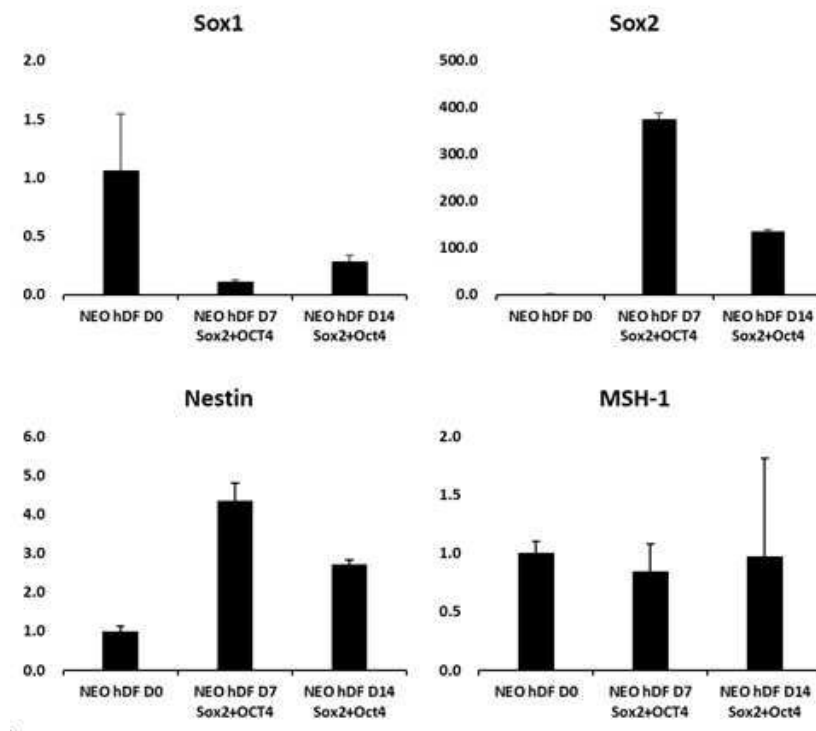
도면15



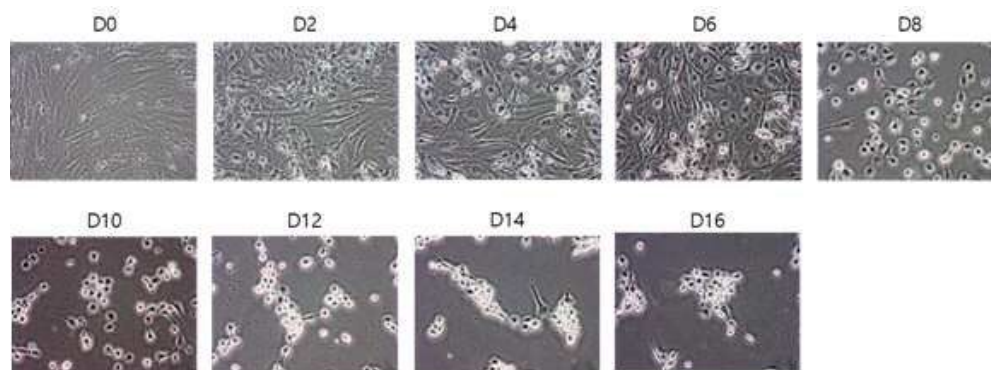
도면16



도면17



도면18



도면19

