



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0124076

(43) 공개일자

2013년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 11/04 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0047702

(22) 출원일자

2012년05월04일

심사청구일자

2012년05월04일

(71) 출원인

인제대학교 산학협력단

경상남도 김해시 어방동 607 인제대학교 내

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

양영일

부산광역시 해운대구 우1동 경동아파트 102동 1003호

이승진

서울특별시 영등포구 여의도동 롯데캐슬아이비 102동 2804호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

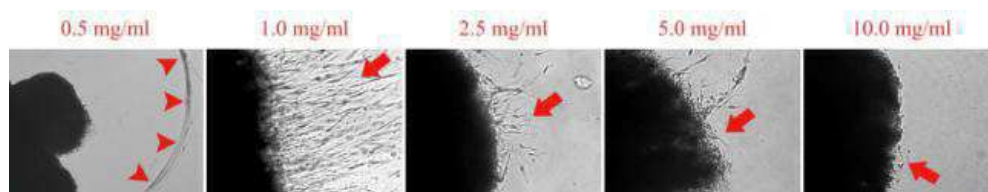
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **신경능선줄기세포의 배양방법 및 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 말초신경 절편을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계 및 하이드로젤만을 분해하여 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포를 회수하는 단계를 포함하는 말초신경 유래 신경능선 줄기세포의 배양방법, 이의 의해 배양된 신경능선줄기세포, 이의 분화방법 및 이를 포함한 세포치료제, 신경계 질환 치료제에 관한 것으로, 상기 배양방법에 의해 배양된 신경능선줄기세포는 체외 증식능력이 뛰어나며, 말초신경계 내지 중추 신경계를 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 나타내기에, 이를 세포치료제 및 조직공학적 치료제 등의 바이오 신약 생산에 적용 가능하며 세포생물학적, 분자생물학적 기초 연구 및 신약개발 연구에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자		정순호
김중태		부산광역시 남구 용호동 LG 메트로시티 108동 190
부산광역시 사상구 주례동 럭키아파트 11동 907호		2호
이 발명을 지원한 국가연구개발사업		
과제고유번호	20100000254	
부처명	교육과학기술부	
연구사업명	기초연구사업	
연구과제명	세포모방 세포외기질과 niche 보존 배양시스템을 기반으로 한 줄기세포 융합치료제의 개발	
연구		
기 여 율	1/2	
주관기관	인제대학교 산학협력단	
연구기간	2008.05.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	20110007745	
부처명	교육과학기술부	
연구사업명	원천기술개발사업	
연구과제명	기관조직 재생유도 연구개발	
기 여 율	1/2	
주관기관	이화여자대학교 산학협력단	
연구기간	2008.04.01 ~ 2012.05.31	

특허청구의 범위

청구항 1

말초신경 절편을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 말초신경은 성체로부터 얻어진 말초신경인, 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 말초신경 유래 신경능선줄기세포는 (i) 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF (neurofilament), S-100, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지니는, 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 하이드로젤은 콜라겐 하이드로젤이며, 상기 하이드로젤은 0.5 내지 5.0 mg/ml 콜라겐을 포함하는, 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 콜라겐 하이드로젤의 분해는 콜라지네이즈 (collagenase)를 처리함으로 분해되어 지는, 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

- 1) 말초신경 절편을 콜라겐 하이드로젤 내에 함입시키는 제 1단계;
- 2) 성장배양액을 첨가하여 5 내지 30 rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양(organ culture)하는 제 2단계;
- 3) 콜라지네이즈 (collagenase)를 처리하여 콜라겐 하이드로젤만을 분해함으로, 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포 및 말초신경 절편을 회수하는 제 3단계; 및
- 4) 상기 회수한 신경능선줄기세포를 단층배양법으로 증폭하는 제 4 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제 3단계에서 회수된 말초신경 절편을 다시 제 1단계의 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는, 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 배양방법에 의해 배양된 말초신경 유래 신경능선줄기세포이며,

상기 신경능선줄기세포는 (i) 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의

신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34, 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF (neurofilament), S-100, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지니는 말초신경 유래 신경능선줄기세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 신경능선줄기세포는 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 연골세포, 지방세포 또는 골격근세포로의 분화력을 지닌, 말초신경 유래 신경능선줄기세포.

청구항 10

제8항 또는 제9항의 신경능선줄기세포를 마이크로매스(micromass) 배양법을 통하여 배양하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 신경계 세포로의 분화방법.

청구항 11

제8항 또는 제9항의 신경능선줄기세포, 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포치료제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 세포치료제는 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 지방세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포의 치료제인, 세포치료제.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 세포치료제는 항염증제제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는, 세포치료제.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 신경능선줄기세포는 하이드로젤과 혼합된, 세포치료제.

청구항 15

제8항 또는 제9항의 신경능선줄기세포, 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 신경계 질환은 퇴행성 신경질환, 탈수초 신경질환, 근위축성 측색경화증, 외상성 척수질환 또는 말초신경질환인, 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 성인 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

과거 발생기 초기인 태아에서만 존재하는 것으로 알려져 있었던 신경줄기세포는 최근 태생 후 그리고 성숙한 포유동물에서도 존재하고 있음이 밝혀졌다. 지난 100년 동안 태생 후의 포유동물에서 신경세포는 새롭게 생성되지 않는다는 것이 정설이었으나, 최근 성인의 중추신경계의 해마(hippocampus) 또는 뇌실하층(subventricular zone)에서 신경줄기세포가 존재하는 것이 밝혀졌고, 이들 성체 신경줄기세포는 손상된 신경세포 또는 회돌기교

세포 등으로 분화하여 소실 혹은 손상된 신경세포 또는 희돌기교세포를 대체하는 것으로 밝혀졌다.

- [0003] 그러나 성인에 있어 신경줄기세포를 분리 배양하기 위해서는 뇌 혹은 척수와 같은 중추신경계에서 조직원의 채취가 요구된다. 성인에 있어 신경줄기세포가 존재한다고 밝혀진 해마 또는 뇌실하층은 인간의 뇌 깊은 곳에 위치하고 있어, 조직을 채취하는 과정에 있어서 생명을 위협할 수 있는 치명적인 부작용을 초래할 수 있다. 그 결과 파킨슨병, 뇌졸중, 근위축성 척수측색화증, 척수 손상, 운동신경손상 또는 외상에 의한 중추신경계 또는 말초신경계 질환의 치료하기 위한 자가 신경줄기세포제로 적용하기란 현실적으로 어렵다는 한계점이 부각되었다.
- [0004] 신경줄기세포가 갖는 조직 수급상의 문제를 극복하기 위하여 비 신경계 조직 기원의 조혈모세포(hematopoietic stem cells), 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells), 제대혈줄기세포(umbilical blood cell) 등을 신경계 질환의 세포치료제로 적용하고자 하는 연구가 진행되었다. 그러나 상기 비 신경계 기원 줄기세포는 일부 신경세포로 분화하는 실험실적 연구결과가 제시되었으나, 그 분화능력이 극히 제한적이라 이상적인 신경계 질환의 치료제로서 적용하기란 한계가 있다고 보고되었다.
- [0005] 신경능선줄기세포(neural crest stem cells)는 발생기의 이주기(migratory stage) 동안에 신경주름(neural fold) 후방부에서부터 이주하며, 신경능선줄기세포는 신체 내 광범위한 조직과 장기로 이주하여 분포하게 된다. 이주기 이후 신경능선줄기세포는 말초신경계의 신경세포, 신경아교세포(glial cells), 피부의 멜라닌세포(melanocytes), 내분비계 세포, 그리고 다양한 중간엽세포(mesenchymal cells)로 분화하여 성인의 비 신경계 조직과 장기에 분포하는 것으로 알려졌다[Dev Dyn 2007;236:3242].
- [0006] 최근 신경능선줄기세포(neural crest stem cells)는 태생이후에도 말초신경, 후근절(dorsal root ganglia), 창자(gut), 모낭(hair follicle), 진피유두(dermal papillae), 각막(cornea), 말초신경, 치아속질(dental pulp)에 존재하는 것이 밝혀졌다. 이들 중 모낭, 진피유두, 치아속질에서만 성인 인간의 신경능선줄기세포가 분리되었다[J Cell Biochem 2009;107:1046].
- [0007] 종래에 인간 성인에서는 진피유두 혹은 모낭에서부터 분리한 신경능선줄기세포가 보고되었다. 그러나 진피유두 혹은 모낭은 표피세포 유래의 여러 부속 기관이 많이 존재하므로, 해당 조직으로부터 신경구를 형성하는 세포는 신경능선줄기세포 외에 피부 부속기관으로부터 유래한 이질적 세포들이 혼합될 가능성이 높아 세포치료제로 적용하기란 문제점이 따른다[PNAS 2005;102:5530].
- [0008] 또한, 종래의 연구결과는 신경능선줄기세포가 성인 인간에서도 존재한다는 사실을 입증하였으나, 종래의 기술은 신경능선줄기세포의 분리 배양을 위하여 3개월이라는 장기간의 세포 배양을 요하고 또한 장기간의 배양에 의해 형질전환, 탈분화 등의 다양한 세포 변형이 일어났을 가능성을 배제할 수 없다는 문제점이 있었다. 또한 종래의 기술은 신경능선줄기세포를 분리하기 위하여 특정 표지자를 사용하였으나, 현재까지 신경능선줄기세포를 특이하게 대변할 수 있는 표지자가 없다는 문제점이 대두되었다.
- [0009] 종래의 성인 인간에서부터 신경능선줄기세포를 분리하기 위하여 아래에 기술한 세 가지 방법이 널리 적용되고 있다. 첫째, 성인의 진피유두, 모낭, 혹은 치아속질을 콜라제네이즈(collagenase), 디스페이즈(disypase), 혹은 트립신(trypsin) 등과 같은 조직분해효소를 처리하여 고형성 조직으로부터 해리된 단일세포군을 분리하는 조직해리과정(tissue dissociation step)을 거쳐 단일세포를 단층배양법으로 증폭시켰다. 이후 신경구(neurosphere)를 형성시키는 단계를 거쳐 신경구를 형성하는 세포만을 분리시키고, 신경구 형성 세포만을 배양하는 과정을 거쳐서 신경능선줄기세포를 분리 배양하는 방법이 제시되었다[Cell Tissue Res 2010;340:549]. 둘째 방법은 첫 번째 방법과 동일하게 고형성 조직의 조직해리과정을 거친 후 얻어진 단일해리세포(single dissociated cells)를 기분리한 후 p75 혹은 CD140a와 같은 표지자를 이용하여, 해당 표지자가 발현되는 세포만을 면역학적 방법을 이용하여 정제하고, 이후 단층배양법으로 증폭시키는 방법이 제시되었다. 셋째 방법은 진피유두, 모낭, 혹은 치아속질 절편을 외식배양법(explant culture)이 배양용기에 파종한 후 조직절편에서부터 배양용기로 이동 성장하는 세포를 배양하고, 이차적으로 면역학적 방법 혹은 신경구 형성 세포를 정제하는 방법이 제시되었다.
- [0010] 그러나 상기에 기술한 종래의 신경능선줄기세포의 분리배양 방법은 몇 가지 문제점이 제시되었다. 첫째, 신경능선 기원 조직으로부터 단일해리세포를 분리하기 위하여 조직해리과정은 필수적이다. 조직해리과정은 사용한 조직분해효소의 종류, 역가, 반응시간, 반응온도, 사용한 조직의 상태에 따라 얻어지는 단일세포 수는 큰 편차를 나타내며, 또한 조직해리과정 중 세포의 손상은 피할 수 없다는 단점이 널리 제시되었다. 그 결과 조직해리과정은 표준화하기 어려우며 또한 분리수율이 낮다는 비효율성의 단점이 제시되었다. 둘째, 조직해리과정 후 얻어

진 단일해리세포는 신경능선 조직을 구성하는 다양하고 이질적 특성을 지닌 세포를 모두 함유하고 있다. 상기 조직에서부터 분리된 단일해리세포는 신경능선줄기세포 외에도 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 지방세포, 혈구세포, 섬유모세포를 모두 포함하고 있다. 상기 이질적 단일해리세포에서부터 신경능선줄기세포를 선택적으로 분리하기 위하여 신경능선줄기세포에서만 특징적으로 발현되는 표지자를 이용한 면역학적 정제방법이 요구된다. 그러나 신경능선줄기세포에서만 특이적으로 발현되는 표지자는 현재 밝혀져 있지 않다는 근본적인 문제점이 대두되었다. 셋째, 신경구는 신경능선줄기세포에서만 나타나는 특징적인 현상이 아니다. 종래의 연구결과에서 신경구와 같은 구조는 지방줄기세포, 중간엽줄기세포, 혈관내피전구세포, 조혈모세포에서도 나타나는 현상으로, 신경능선줄기세포만을 정제하는 방법으로는 적합하지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 말초신경 절편을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 본 발명은 상기 배양방법에 의해 배양된 것으로, (i) 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34, 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF (neurofilament), S-100, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지니는 말초신경 유래 신경능선줄기세포를 제공하고자 한다.
- [0013] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포를 마이크로매스(micromass) 배양법을 통하여 배양하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 말초신경세포로의 분화방법을 제공하고자 한다.
- [0014] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포, 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포치료제, 및 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 말초신경 절편을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법을 제공한다.
- [0016] 상기 말초신경은 성체로부터 얻어진 말초신경일 수 있다.
- [0017] 상기 말초신경 유래 신경능선줄기세포는 (i) 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF (neurofilament), S-100, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지닐 수 있다.
- [0018] 상기 하이드로젤은 콜라겐 하이드로젤이며, 상기 하이드로젤은 0.5 내지 5.0 mg/ml 콜라겐을 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 콜라겐 하이드로젤의 분해는 콜라지네이즈 (collagenase)를 처리함으로 분해되어질 수 있다.
- [0020] 본 발명의 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법의 일례로, 1) 말초신경 절편을 콜라겐 하이드로젤 내에 함입시키는 제 1단계; 2) 성장배양액을 첨가하여 5 내지 30 rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양(organ

culture)하는 제 2단계; 3) 콜라지네이즈 (collagenase)를 처리하여 콜라겐 하이드로젤만을 분해함으로, 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포 및 말초신경 절편을 회수하는 제 3단계; 및 4) 상기 회수한 신경능선줄기세포를 단층배양법으로 증폭하는 제 4 단계;를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 제 3단계에서 회수된 말초신경 절편을 다시 제 1단계의 하이드로젤 내에 함입시켜 배양할 수 있다.

[0022] 본 발명은 상기 배양방법에 의해 배양된 말초신경 유래 신경능선줄기세포이며, 상기 신경능선줄기세포는 (i) 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34, 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF (neurofilament), S-100, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지니는 말초신경 유래 신경능선줄기세포를 제공한다.

[0023] 상기 신경능선줄기세포는 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 연골세포, 지방세포 또는 골격근세포로의 분화력을 지닐 수 있다.

[0024] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포를 마이크로매스(micromass) 배양법을 통하여 배양하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 신경계 세포로의 분화방법을 제공한다.

[0025] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포, 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포치료제를 제공한다.

[0026] 상기 세포치료제는 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 지방세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포의 치료제일 수 있다.

[0027] 상기 세포치료제는 항염증제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0028] 상기 신경능선줄기세포는 하이드로젤과 혼합될 수 있다.

[0029] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포, 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 신경계 질환은 퇴행성 신경질환, 탈수초 신경질환, 근위축성 측색경화증, 외상성 척수질환 또는 말초신경 질환일 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 인간 성인의 말초신경 유래 신경능선줄기세포는 체외 증식능력이 뛰어나며, 말초신경계 내지 중추 신경계를 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 나타내기에, 이를 세포치료제 및 조직공학적인 치료제 등의 바이오 신약 생산에 적용 가능하여 산업적 이용가능성이 높을뿐 아니라, 상기 줄기세포의 동원, 이동, 성장, 그리고 신경계 세포로의 분화에 관계하는 세포생물학적, 분자생물학적 기초 연구 및 신약개발 연구에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 콜라겐 하이드로젤 제조시 콜라겐 농도에 따른 말초신경에서 신경능선줄기세포의 이동 및 성장을 나타낸 도이다.

도 2는 콜라겐 하이드로젤 제조시 콜라겐 농도에 따른 신경능선줄기세포의 이동 및 성장의 형태계측학적 분석도를 나타낸 것이다. (*, 5.0 및 10.0 mg/ml 군과 비교하여 $p < 0.01$; #, 2.6, 5.0 및 10.0 mg/ml 군과 비교하여 $p < 0.05$).

도 3은 콜라겐 하이드로젤-지지 말초신경 절편의 3차원 장기배양의 저배율 위상차 현미경사진 (x 40배)을 나타낸 도이다.

도 4는 콜라겐 하이드로젤-지지 말초신경 절편의 3차원 장기배양의 고배율 위상차 현미경 사진을 나타낸

도이다.

도 5는 콜라겐 하이드로젤-지지 3차원 말초신경 절편의 배양환경에 따른 신경능선줄기세포의 이동 및 성장을 나타낸 도이다. (Dynamic, 15 rpm에서의 역동적 배양환경; Static, 정지된 상태에서의 배양환경. *, Static 군과 비교하여 $p < 0.01$).

도 6은 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 위상차 현미경 사진을 나타낸 도이다.

도 7은 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 콜로니형성을 나타낸 도이다.

도 8은 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 콜로니형성 빈도를 나타낸 도이다.

도 9는 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 군집배가시간(PDTs)을 나타낸 도이다.

도 10은 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 유세포분석기를 통하여 분석한 면역표면학적 특성을 나타낸 도이다.

도 11은 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 면역형광염색을 분석한 면역표면학적 특성을 나타낸 도이다.

도 12는 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 mRNA 발현 특성을 나타낸 도이다.

도 13은 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 조골세포(A), 지방세포(B), 성상세포(D), 신경세포(E)로의 분화능력을 나타낸 도이다.

도 14는 콜라겐 하이드로젤로부터 분리한 후 단층배양 환경에서의 신경능선줄기세포의 슈만세포로의 분화능력을 나타낸 도이다.

도 15는 슈만세포로 분화 유도한 신경능선줄기세포의 면역형광염색 사진을 나타낸 도이다.

도 16은 슈만세포로 분화 유도한 신경능선줄기세포의 mRNA 발현특성을 나타낸 도이다.

도 17은 좌골신경 손상 동물모델에서 신경능선줄기세포의 말초신경 재생능력을 나타낸 염색 사진을 나타낸 도이다.

도 18은 좌골신경 손상 동물모델에서 신경능선줄기세포의 신경기능 회복을 나타낸 신경전도검사 상의 진폭결과를 나타낸 도이다.

도 19는 좌골신경 손상 동물모델에서 신경능선줄기세포의 신경기능 회복을 나타낸 신경전도검사 상의 반응도결과를 나타낸 도이다.

도 20은 좌골신경 손상 동물모델에서 신경능선줄기세포의 슈만세포로의 분화를 나타내는 면역형광염색 사진을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명은 말초신경 유래 신경능선줄기세포 및 이의 배양방법, 이의 분화방법 및 이를 포함한 세포치료제, 신경계 질환 치료용 조성물을 제공한다.

[0034] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0035] 종래에 난치성 말초신경질환의 치료제로 조혈모세포 혹은 중간엽줄기세포가 통상적으로 사용되고 있는데, 조혈모세포는 체외에서 증폭 배양이 어려우며, 유효한 용량의 조혈모세포를 분리, 정제하기 위해서는 10 L의 골수가 요구되었다. 종래의 중간엽줄기세포의 수득은 고품성 장기인 경우 조직분해과정과 이차적인 중간엽줄기세포의 정제과정이 요구되었으며, 이렇게 얻어진 중간엽줄기세포는 골수 혹은 지방조직 내 유핵세포 백만 개 중 하나의 빈도로 존재하는 것으로 알려져 있으며, 골수 혹은 지방조직 유래 중간엽줄기세포는 1% 미만에서 콜로니를 형성

하고, 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하는 시간은 60 시간 이상으로 유효한 세포치료제 용량만큼 체외에서 증폭 능력이 어려운 한계점이 대두되었고, 또한 상기 조혈계 기원 줄기세포는 신경계 세포로의 직접적인 분화능력은 없는 것으로 밝혀져, 상기 유형의 줄기세포는 신경계 질환의 세포치료제로 적합하지 않았다. 이에 본 발명자는 상기 문제점을 해결하고자 노력하던 중 본 발명의 배양방법에 의할 때 성인 말초신경에서도 신경능선줄기세포가 존재하는 것을 확인하였으며, 상기 신경능선줄기세포를 말초신경의 조직분해과정과 이차적인 신경능선줄기세포의 정제과정 없이도 말초신경 절편에서부터 체외증식능력이 뛰어나며, 신경계 세포로 분화능력을 지닌 신경능선줄기세포를 높은 수율로 얻을 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [0036] 본 발명은 말초신경 절편을 하이드로젤 내에 함입시켜 배양하는 단계; 및 하이드로젤만을 분해하여 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포를 회수하는 단계;를 포함하는 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법의 일례로, 1) 말초신경 절편을 콜라겐 하이드로젤 내에 함입시키는 제 1단계; 2) 성장배양액을 첨가하여 5 내지 30 rpm 속도의 셰이커에서 3차원 장기배양(organ culture)하는 제 2단계; 3) 콜라지네이즈(collagenase)를 처리하여 콜라겐 하이드로젤만을 분해함으로, 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포 및 말초신경 절편을 회수하는 제 3단계; 및 4) 상기 회수한 신경능선줄기세포를 단층배양법으로 증폭하는 제 4 단계;를 포함할 수 있다.
- [0038] 말초신경은 대표적인 신경능선 기원의 장기로서 인체에서 매우 넓게 분포되어 있어 접근이 용이하고, 최소한의 침습적 수술을 통하여 소량의 조직을 부작용없이 성인 환자로부터 채취할 수 있어 세포치료제를 분리, 배양하기 위한 조직 수급상의 문제점이 없으며, 타 장기와는 달리 장기를 구성하는 세포 대부분이 신경능선 기원 세포이어서, 이질적 세포로부터 오염될 가능성이 낮아 신경계 질환의 세포치료제로 분리, 배양하기 위한 이점이 있다.
- [0039] 상기 말초신경은 그 기원에 있어서 특별히 한정된 것은 아니며, 일례로 인간을 포함한 포유류의 것을 포함할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 말초신경의 채취 연령은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 성체의 말초신경일 수 있다. 종래 기술은 태아 내지 신생아의 말초신경에서부터 신경능선줄기세포를 분리할 수 있었으나, 성인의 말초신경에서부터 신경능선줄기세포를 분리할 수 없었는데 반하여, 본 발명의 배양방법은 인간 성인의 말초신경 유래 신경능선줄기세포를 분리, 배양할 수 있다.
- [0041] 상기 말초신경 절편은 말초신경을 잘게 자른 절편일 수 있으며, 일례로 말초신경은 가위로 주위의 연부조직과 신경외막을 제거한 후 이용하여 1 내지 3 mm³ 크기의 절편으로 잘게 절단한 것일 수 있다.
- [0042] 하이드로젤은 친수성 고분자가 공유 또는 비공유 결합으로 가교되어져 형성되는 3차원 망상구조물로서, 상전이가 가능하여 용액상태에서 말초신경 절편과 골고루 혼합이 가능하며, 혼합 후 고형성 젤로 상전이가 되어 말초신경 절편에 안정적인 3차원적 물리적 지지를 제공할 수 있으며, 동시에 말초신경 절편 내 존재하는 신경능선줄기세포가 부착하고, 이동 및 성장할 수 있는 3차원적 세포부착 기질을 제공할 수 있다.
- [0043] 상기와 같이 하이드로젤을 통하여 3차원적 세포부착 기질을 제공한 경우에서 말초신경 절편에서부터 신경능선줄기세포의 이동과 성장에 필요한 인테그린-β1(integrin-β1) 결합 수용체를 제공하여, 하이드로젤 내로 신경능선줄기세포가 지속적으로 이동, 성장할 수 있는 3차원적 기질을 제공함을 확인할 수 있다.
- [0044] 세포는 세포외기질과 인테그린-베타1(integrin-β1)와 결합한 후 FAK가 인산화되어 세포신호전달체계가 활성화되어 세포분열이 개시된다. 즉, 말초신경 절편은 부착할 수 있는 세포외기질과의 면적이 넓을수록 세포신호전달체계의 활성도는 증가되어 그 결과 세포분열은 증가 되는데, 상기 하이드로젤은 단층배양법의 제한적인 2차원적 세포부착 기질보다 넓은 3차원적인 세포부착 기질을 제공함으로 신경능선줄기세포가 이동 성장할 수 있는 충분한 공간을 제공할 수 있어, 세포분열이 증가되며, 세포 간 접촉저해(contact inhibition)을 억제하며 장기간 배양이 가능할 수 있다.
- [0045] 상기 하이드로젤의 종류는 특별히 한정된 것은 아니며, 천연고분자, 합성고분자, 및 다양한 고분자를 혼합한 공중합고분자(copolymer)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 제조된 것을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 피브린(fibrin), 콘드로이틴(chondroitin), 하알루로닉산(hyaluronic acid), 알지닌(alginic acid), 매트릭젤(MatrigelTM), 키토산(chitosan) 및 펩티드(peptide)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 하이드로젤일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 콜라겐 하이드로젤일 수 있다.

- [0046] 합성고분자 혹은 공중합고분자로 구성된 하이드로젤은 장시간 분해되지 않아 물리적 기능이 우수하지만 세포의 이동과 성장이 저하되는 취약한 생물학적 기능을 나타내는 반면, 피브린 등과 같은 천연고분자로 구성된 하이드로젤은 세포의 이동 및 성장이 우수한 생체적합성을 나타내지만 합성고분자 혹은 공중합고분자로 구성된 하이드로젤보다 빨리 분해되는 물리적 취약성을 나타낼 수 있다는 단점이 있다.
- [0047] 그러나, 본 발명의 콜라겐 하이드로젤은 세포의 이동 및 성장이 우수한 생체적합성을 나타내는 천연고분자로 구성된 하이드로젤임에도 불구하고, 신경절편에서부터 유리되는 세포외기질분해효소(matrix metalloproteinase) 또는 섬유소용해효소(fibrinolytic enzyme) 작용에 저항성을 지녀, 배양기간 동안 분해되지 않고 안정적으로 세포부착기질을 제공할 수 있는 특성을 지닌다. 즉, 피브린과 같은 다른 천연고분자 하이드로젤은 섬유소용해효소에 의해 쉽게 용해되어 하이드로젤의 지지기능을 수행하지 못하는데 반하여, 콜라겐 하이드로젤은 섬유소용해효소에 저항성을 나타내기 때문에 말초신경 유래 신경능선줄기세포를 배양하는데 가장 적절한 하이드로젤일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 말초신경 절편을 콜라겐 하이드로젤에 배양시의 콜라겐 농도는 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 0.5 내지 5.0mg/ml일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1.0 내지 3.5 mg/ml일 수 있다.
- [0049] 일례로, 상기 콜라겐 하이드로젤은 콜라겐은 0.5 내지 5.0 mg/ml 콜라겐과 5 내지 50 mM 중탄산나트륨으로 제조될 수 있다.
- [0050] 콜라겐 농도가 상기보다 높으면 제조된 콜라겐 하이드로젤은 그 미세구조는 치밀하고, 구조 내 공극은 감소하며 분해속도는 늦어지나, 세포의 이동과 성장은 심각히 저해되는 결과를 초래하는 반면, 상기 농도보다 낮은 콜라겐으로 제조된 하이드로젤은 배양 과정 중 세포 및 말초신경 절편에서 분비되는 세포외기질 분해효소에 의하여 분해되어 세포의 이동과 성장에 필요한 3차원적 세포부착 기질로서의 기능이 소실될 수 있다.
- [0051] 상기 성장배양액은 생체 외에서 신경능선줄기세포의 동원, 이동, 성장을 유도할 수 있는 배지를 의미할 수 있고, 포유동물 세포배양에 사용되는 통상의 배지를 모두 포함할 수 있다. 본 발명의 일례로 상업적으로 제조된 세포배양액인 Dulbeccos Minimum Essential Medium(DMEM), RPMI, Hams F-10, Hams F-12, a-Minimal Essential Medium(a-MEM), Glasgow's Minimal Essential Medium, Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등을 사용할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 성장배양액 내에는 신경능선줄기세포의 동원, 이동, 성장을 촉진시킬 수 있는 성장인자를 추가로 포함할 수 있으며, 이들 성장인자는 혈청, 즉 인간을 포함한 동물의 혈청, basic fibroblastic growth factor(bFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), 인슐린(Insulin), epidermal growth gactor(EGF), leukemia inhibitory factor(LIF), insulin-like growth factor(IGF), platelet-derived growth factor(PDGF), stem cell factor(SCF) 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 성장배양액은 페니실린, 스트렙토마이신, 겐타마이신 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일례로, 성장배양액은 DMEM:HamsF12 (1:1) 배양액, 우태아혈청, EGF, bFGF, IGF, 겐타마이신으로 구성될 수 있으며, 보다 구체적으로 70 내지 95 (vol/vol) % DMEM:Hams F12 (1:1) 배양액, 5 내지 15 (vol/vol)% 우태아혈청, 5 내지 50 ng/ml EGF, 0.5 내지 10 ng/ml bFGF, 5 내지 50 ng/ml IGF, 5 내지 50 mg/ml 겐타마이신으로 구성될 수 있다.
- [0054] 종래에 장기(organ)절편의 3차원 배양은 산소 및 영양분 교환을 증진하기 위하여 공기 중에 장기절편을 노출시켜 배양하는 방법과 오비탈 셰이커(orbital shaker)에서 역동적(dynamic)으로 배양하는 방법이 존재하였는데, 장기절편을 공기 중에 노출시켜 배양하는 방법은 영양분 공급이 제한적이기에 장기간 배양에는 적합하지 않으며, 또한 역동적 배양은 배양액의 와류에 의하여 배양액으로 노출된 장기절편이 shearing 손상을 받게 되는 문제점이 존재하였다.
- [0055] 그러나 본 발명의 하이드로젤에 함입된 상태로 셰이커에 장기(organ) 배양 시, 말초신경 절편이 하이드로젤 내로 함입되어 있어 shearing 손상을 받지 않을 수 있고 셰이킹(shaking)을 통해 충분한 산소와 영양분을 공급받아 신경능선줄기세포의 성장을 촉진시킬 수 있다.
- [0056] 상기 셰이킹(shaking) 속도는 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 5 내지 30 rpm 속도일 수 있다. 셰이킹 속도가 상기보다 낮을 때는 산소와 영양분의 공급이 충분히 이루어지지 않을 수 있으며, 상기보다 높을 때는 말초신경 절편의 shearing 손상이 일어날 수 있고 하이드로젤 내의 신경능선줄기세포 배양의 안정성이 손상될 수 있다.

- [0057] 상기 하이드로젤만의 선택적 분해는 하이드로젤 구성 고분자만을 선택적으로 분해할 수 있는 고분자-특이 분해 효소를 배양액 내에 첨가하여 이루어질 수 있다. 상기 고분자-특이 분해효소는 특별히 한정된 것은 아니나, 콜라지네이즈(collagenase), 젤라티네이즈(gelatinase), 유로카이네이즈(urokinase), 스트렙토카이네이즈(streptokinase), 프라지민(plasmin) 및 히알루노니데이즈(hyaluronidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 일례로, 콜라겐 하이드로젤, 젤라틴 하이드로젤, 혹은 매트릭젤 하이드로젤을 사용하여 본 발명의 말초신경 절편을 3차원 장기배양(organ culture)한 경우는 콜라지네이즈 혹은 젤라티네이즈를 배양액 내로 첨가하여 상기 하이드로젤을 선택적으로 분해시킬 수 있으며, 피브린으로 구성된 하이드로젤을 사용한 경우는 유로카이네이즈, 스트렙토카이네이즈 혹은 프라지민 군에서 하나 이상을 선택하여 배양액 내로 첨가하여 피브린으로 구성된 하이드로젤을 선택적으로 분해시킬 수 있으며, 히아루닌산 하이드로젤은 히알루노니데이즈를 사용하여 하이드로젤만을 선택적으로 분해시킬 수 있다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 하이드로젤 구성 고분자-특이 분해효소를 배양액에 첨가하는 것은 신경능선줄기세포 및 말초신경절편에 어떠한 구조적 파괴 혹은 세포독성을 나타내지 않았고, 회수된 세포의 95% 이상이 생존할 수 있다.
- [0060] 일례로, 콜라겐 혹은 젤라틴 하이드로젤의 선택적 분해를 위하여 콜라겐 혹은 젤라틴 하이드로젤 1 ml 당 0.1 내지 5 mg의 콜라게네이즈 중량을 배양액 내로 첨가할 수 있다. 상기 콜라게네이즈 농도는 신경능선줄기세포 혹은 말초신경 절편의 구조를 분해하지 못하며 콜라겐 하이드로젤만을 선택적으로 분해할 수 있는 농도일 수 있다.
- [0061] 일 실시예로, 콜라게네이즈의 하이드로젤 분해효과를 증진시키기 위하여 30 내지 37℃에서 30분 내지 3시간 동안 반응시킬 수 있다.
- [0062] 상기 분해효소를 처리하여 하이드로젤만을 선택적으로 분해한 후, 하이드로젤내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포와 어떠한 구조적 손상이 없는 말초신경절편을 회수할 수 있다.
- [0063] 상기 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포를 증폭시킬 수 있는데, 상기 증폭방법은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 단층배양법에 의할 수 있다. 본 발명의 일례로, 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포를 배양용기에 파종 후, 배양용기 표면적의 60 내지 90%를 차지하면, 이들 세포를 트립신(trypsin)-EDTA로 처리하여 배양용기에서부터 떼어내고, 다시 새로운 배양용기에 파종하는 계대배양(subculture)을 통하여 치료용량에 필요한 세포 수만큼 증폭 배양할 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 하이드로젤만을 선택적으로 분해하여 회수한 말초신경 절편을 다시 하이드로젤 내로 함입시켜 반복적으로 3차원 장기배양(organ culture)을 시행하여 지속적으로 신경능선줄기세포의 분리, 배양할 수 있으며, 배양이 끝나고 회수시 하이드로젤만을 선택적으로 분해하기에 말초신경절편의 구조가 온전히 보존된 상태를 유지할 수 있다.
- [0065] 상기에서 기술한 바와 같이, 본 발명의 하이드로젤을 이용한 신경능선줄기세포의 배양방법은 신경계 질환의 환자로부터 소량의 말초신경을 단 한 번 생검한 후에는 이를 무한 반복하여 배양할 수 있으므로, 반복적 말초신경의 채취 없이 말초신경 혹은 중추신경계 질환의 치료에 필요한 양의 신경능선줄기세포를 분리할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 말초신경 절편의 3차원 장기배양(organ culture)기간은 특별히 한정된 것은 아니나, 1 내지 28일간 배양될 수 있으며, 바람직하게는 7 내지 20일간 배양될 수 있다. 상기 하이드로젤-지지 3차원 말초신경 절편의 장기배양(organ culture)은 배양 12시간째부터 신경능선줄기세포가 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 이동, 성장을 유도할 수 있다.
- [0067] 상기 말초신경 유래 신경능선줄기세포의 배양방법에 의해 수득된 신경능선줄기세포는 신경능선줄기세포는 (i) 네스틴(nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34, 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF(neurofilament), S-100, GFAP(glial fibrillary acid protein), MBP(myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이

상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지닐 수 있다.

[0068] 종래의 통상적인 방법은 조직분해효소를 처리하여 말초신경을 구성하는 세포를 단일 세포로 분리하고, 면역학적 방법을 이용하여 신경능선줄기세포를 이질적인 세포군으로부터 정제하는 단계를 필연적으로 요구되었는데, 조직해리과정은 표준화하기 어렵고 사용한 조직분해효소의 종류, 역가, 반응시간, 반응온도, 사용한 조직의 상태에 따라 얻어지는 단일세포 수는 큰 편차를 나타내며, 또한 조직해리과정 중 세포의 손상은 피할 수 없어 분리수율이 낮다 단점이 있는데 반해, 본 발명의 상기 신경능선줄기세포 배양방법은 단순하고 조직해리과정을 거치지 않아 세포 손상이 일어나지 않으며 회수된 세포의 95% 이상이 생존율을 보이고 100 mg의 말초신경절편을 14일간 배양 시 1.7×10^6 의 수율을 나타내어, 종래의 배양방법에 비해 신경능선줄기세포를 대량으로 분리, 배양할 수 있다.

[0069] 본 발명은 상기 배양방법에 의해 배양된 말초신경 유래 신경능선줄기세포를 제공하며, 상기 신경능선줄기세포는 (i) 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (ii) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중간엽줄기세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iii) CD140b, CD146, 및 SMA (α -smooth muscle actin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관주위세포 표지자 군에 양성인 면역학적 특성; (iv) CD34, 및 CD45로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조혈계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; (v) CD31 및 CD34로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈관내피세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성; 및 (vi) NF (neurofilament), S-100, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경계 세포 표지자 군에 음성인 면역학적 특성;으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 면역학적 특성을 지닐 수 있다.

[0070] 상기 신경능선줄기세포의 배양방법에서 하이드로젤 내로 이동, 성장한 세포는 네스틴 (nestin), p75, sox-10 및 CD56으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경능선줄기세포 표지자를 발현할 수 있으며, 상기 표지자는 태아 내지 신생아의 95% 이상에서 양성으로 발현되어질 수 있다.

[0071] 또한, 상기 신경능선줄기세포는 중간엽줄기세포의 표지자인 CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표지자와 혈관주위세포 표지자인 CD140b, CD146, 및 SMA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표지자를 발현하는데 반하여, 혈관내피세포, 조혈계 세포, 평활근세포와 같은 말초신경을 구성하는 체세포의 오염은 1% 미만일 수 있고 성숙한 신경세포 표지자인 s-100, MBP, GFAP, NF는 발현되지 않을 수 있고, 조혈계 세포 표지자인 Lin, CD34, CD45 등은 음성일 수 있고, 혈관내피세포 표지자인 CD31 및 CD34은 발현하지 않을 수 있다.

[0072] 상기 신경능선줄기세포는 중간엽계 세포로의 분화력을 보유할 수 있으며, 일례로 신경세포, 희돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 연골세포, 지방세포 또는 골격근세포 등으로의 분화력을 지닐 수 있다.

[0073] 상기 신경능선줄기세포는 신경세포로 직접 분화할 수 있는 능력을 지닌데 반하여, 조혈모세포 및 중간엽줄기세포는 말초신경세포로 직접 분화할 수 있는 능력은 입증되지 않았다.

[0074] 또한, 종래 기술은 태아 내지 신생아의 말초신경에서부터 신경능선줄기세포를 분리할 수 있었으나, 성인 인간의 말초신경에서부터 신경능선줄기세포를 분리할 수 없었다. 그러나, 본 발명은 인간 성인으로부터 말초신경 유래 신경능선줄기세포를 분리 배양할 수 있었으며, 분리 배양한 신경능선줄기세포는 모두 신경세포, 희돌기교세포, 성상세포, 슈반세포로 분화할 수 있는 능력을 보일 수 있다.

[0075] 본 발명의 배양방법에 의해 배양, 분리된 신경능선줄기세포의 35 내지 47%에서 콜로니를 형성할 수 있으며, 100 번 가량 세포분열을 할 수 능력을 보였고, 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하는 배가시간이 30 내지 60시간으로 체외 성장능력이 뛰어날 수 있다. 이는 종래의 배양방법에 의해 수득한 골수 혹은 지방조직 유래 중간엽줄기세포는 1% 미만에서 콜로니를 형성하고, 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하는 시간은 60 시간 이상 요구되었던 점에 비해 체외 성장능력이 뛰어나 단시간 내에 장기 질환 치료에 필요한 유효한 용량의 신경능선줄기세포를 확보할 수 있다는 장점이 있다.

[0076] 상기 신경능선줄기세포는 중간엽줄기세포일 수 있으며, 중추신경계에서 기원한 신경줄기세포(neural stem cells)와 동등한 분화특성을 지닌 세포일 수 있으며, 상기 신경능선줄기세포는 특별히 한정된 것은 아니나, 일

레로 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 연골세포, 지방세포 또는 골격근세포로 분화될 수 있다.

- [0077] 상기 신경능선줄기세포가 자발적으로 분화 가능한 세포는 그 종류에 있어서 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 말초 및 중추 신경계를 구성하는 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포로 분화할 수 있다.
- [0078] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포를 마이크로매스(micromass) 배양법을 통하여 배양하는 단계;를 포함하는 말초 신경조직 유래 신경능선줄기세포의 신경계 세포로의 분화방법을 제공한다.
- [0079] 상기 분화되는 신경계 세포는 그 종류에 있어서 특별히 한정되지 않으며, 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포 및 슈반세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 슈반세포일 수 있다.
- [0080] 종래에는 신경능선줄기세포의 말초신경세포로의 분화는 단층배양환경에서 BMP4, Nrg1, Delta-Fc를 이용하여 슈반세포로 분화를 유도하는 방법들이 적용되었으나 [Development 2004;131:5599], 이는 말초신경세포로의 분화유도 효능이 제한적이며, 특정 줄기세포의 말초신경세포로의 분화능력을 검증하기 위한 효과적인 방법이 아니었다. 생체 내 모든 세포 및 조직은 3차원적 구조로 존재하며, 세포-세포 간 그리고 세포-세포외기질 간 상호작용에 의하여 그 기능을 유지하는데, 종래의 2차원적 단층배양 환경은 생체 내 환경과 상이하며, 세포-세포 간 그리고 세포-세포외기질 간 상호작용을 지지할 수 없으며, 그 결과 말초신경세포로의 분화를 유도하는데 한계가 있었다.
- [0081] 그러나, 본 발명의 상기 마이크로매스 배양법은 세포-세포 간 그리고 세포-세포외기질 상호작용을 통하여 세포가 3차원적 미세구조를 취하도록 유도할 수 있다. 일례로, 십만 개의 신경능선줄기세포를 세포배양액 10 ml에 현탁한 후 배양용기에 파종한 후 신경능선줄기세포가 3차원적 구조로 배열하도록 유도할 수 있다. 상기 방법으로 세포가 3차원 구조를 취하도록 유도한 후 1일에서 4주간, 바람직하게는 3일에서 2주간 배양하여 말초신경세포로 분화를 유도할 수 있으며, 상기 마이크로매스 배양법은 3차원 구조를 통하여 파종된 세포와 세포 간 그리고 세포와 세포외기질 간 상호작용을 지지할 수 있다.
- [0082] 이외에도 상기 마이크로매스 배양법은 슈반세포로의 분화할 수 있는 체세포, 배아줄기세포, 혹은 역분화만능줄기세포의 슈반세포로의 분화능력을 검증하기 위한 평가시스템으로 활용할 수 있으며, 슈반세포로의 분화를 유도하는 물질 혹은 인자의 분화유도 능력을 규명할 수 있는 평가시스템으로도 활용될 수 있다.
- [0083] 상기 마이크로매스배양법을 통해 분화된 슈반세포는 myelin basic protein(MBP) 및 S100, glial fibrillary acid protein(GFAP)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표지자 군에 양성인 면역학적 특성을 지닐 수 있다.
- [0084] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 세포치료제를 제공한다.
- [0085] 상기 세포치료제는 신경능선줄기세포를 특별한 분화과정을 거치지 않고 바로 이용할 수 있으며, 또는 세포치료를 하고자 목적하는 세포로 분화하여 이용할 수 있다.
- [0086] 상기 세포치료제에서의 세포는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 신경세포, 회돌기교세포, 성상세포, 슈반세포, 조골세포, 지방세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.
- [0087] 상기 세포치료제의 신경능선줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 세포치료제로 이용하는 방법은 특별히 한정하는 것은 아니나, 종래의 당업계에 공지된 방법에 의할 수 있으나, 바람직하게는 상기 신경능선줄기세포를 생분해성 지지체 혹은 운반체에 담아 제공될 수 있다.
- [0088] 상기 생분해성 지지체 혹은 운반체는 숙주에 실질적인 해로운 반응을 유발하지 않으며 생물학적으로 분해될 수 있는 것으로, 생물학적 시스템으로부터 자연적으로 제거될 수 있고/있거나 생물학적 시스템에 화학적으로 혼입될 수 있는 것일 수 있다.
- [0089] 상기 생분해성 지지체 혹은 운반체는 그 종류에 있어 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 하이드로젤일 수 있다.
- [0090] 상기 신경능선줄기세포는 하이드로젤과 혼합되어 세포치료제로 사용될 수 있다. 상기 사용가능한 하이드로젤은 특별히 한정된 것은 아니나, 천연고분자로 구성된 하이드로젤일 수 있으며, 바람직하게는 콜라겐 하이드로젤일 수 있다. 일례로, 콜라겐 하이드로젤을 사용시 콜라겐 농도를 조절하여 생체 내에서 분해속도를 조절할 수 있다. 상기 하이드로젤은 세포주입 시 혈액 내로 소실되는 단점을 방지할 수 있으며, 또한 손상부위 내 염증세

포 및 효소에 의한 세포손상을 감소시킬 수 있다.

- [0091] 상기 세포치료제는 추가적으로 항염증제제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0092] 상기 항염증제제는 하이드로젤이 이식된 신경능선줄기세포를 과도한 염증반응으로부터 보호하기 위하여 사용될 수 있고, 줄기세포 동원인자 또는 혈관성장 유도인자를 포함하여 말초신경 내 줄기세포의 동원 및 혈관성장을 유도함으로써 세포재생 효과를 증대시킬 수 있다.
- [0093] 상기 항염증제제는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 COX 억제제, ACE 억제제, 살리실산염(salicylate) 및 덱사메타손(dexamethasone)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0094] 상기 줄기세포 동원 인자는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 IGF, bFGF, PDGF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0095] 상기 혈관성장 유도인자는 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 EGF, PDGF, VEGF, ECGF 및 엔지오제닌(angiogenin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0096] 본 발명은 상기 신경능선줄기세포, 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0097] 상기 신경계 질환에는 중추신경계 및 말초신경계 질환을 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 퇴행성 신경질환, 탈수초 신경질환, 근위축성 측색경화증, 외상성 척수질환 또는 말초신경질환일 수 있다.
- [0098] 난치성 신경계 질환의 치료제로 조혈모세포 혹은 중간엽줄기세포가 통상적으로 사용되고 있다. 신경계 질환, 일례로 퇴행성 신경질환, 탈수초 신경질환, 근위축성 측색경화증, 외상성 척수질환, 말초신경질환 환자에 적용될 수 있는 세포치료제로 유효한 용량은 천만 개 내지 일억 개의 세포가 요구된다. 조혈모세포는 체외에서 증폭 배양이 어려우며, 유효한 용량의 조혈모세포를 분리, 정제하기 위해서는 10 L의 골수가 요구된다. 중간엽줄기세포는 골수 혹은 지방조직 내 유핵세포 백만 개 중 하나의 빈도로 존재하는 것으로 알려져 있고, 골수 혹은 지방조직 유래 중간엽줄기세포는 1% 미만에서 콜로니를 형성하고, 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하는 시간은 60 시간 이상으로 유효한 세포치료제 용량만큼 체외에서 증폭 능력이 어려운 한계점이 대두되었다. 또한 조혈모세포 및 중간엽줄기세포는 말초신경세포로 직접 분화할 수 있는 능력은 입증되지 않았다.
- [0099] 본 발명의 배양방법에 의할 때 100 mg의 말초신경에서부터 14일 이내에 이백만 개 이상의 신경능선줄기세포를 배양할 수 있으며, 2주간 단층배양법을 통하여 천만 개 이상의 신경능선줄기세포를 증폭 배양할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 배양된 신경능선줄기세포는 30%에서 콜로니를 형성할 수 있으며 100번 이상 세포분열을 할 수 있는 능력을 보였고 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하는 시간이 30 내지 60시간으로 체외 성장능력이 뛰어나 단시간 내에 세포치료제로 사용할 수 있는 유효량을 획득할 수 있다.
- [0100] 상기 약학 조성물에서 상기 신경능선줄기세포는 특별히 한정된 것은 아니나, 하이드로젤과 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 말초신경유래 신경능선줄기세포는 체외 증식능력, 자발적인 신경계 세포로의 분화능력을 지녀 중추신경계 및 말초신경계 질환 예방 또는 치료용 조성물로 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0102] 일 실시예에서 나타난 바와 같이, 손상된 말초신경 내로 주입한 신경능선줄기세포는 슈반세포로 직접 신경계 조직으로 재생하는 기능을 확인할 수 있다.
- [0103] 상기 신경능선줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 방법(예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA]을 참조할 수 있다.
- [0104] 상기 약학조성물의 투여방법은 특별히 한정되는 것은 아니며, 일례로 신경내 투여 등 비경구적으로 투여할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0105] 상기 약학조성물에 추가적으로 항염증제제, 줄기세포 동원인자 및 혈관성장 유도인자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0106] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시한 것으로 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0107] <실시예>

[0108] 실시예 1. 콜라겐 농도에 따른 말초신경으로부터 신경능선줄기세포의 이동 및 성장

[0109] 소 피부에서 추출한 콜라겐(바이오랜드, 오송, 대한민국)은 0.1 % (wt./vol.) 아세트산 (acetic acid)에 녹여 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/ml 등 5가지 농도의 콜라겐 용액을 제조하였다. 콜라겐 하이드로젤 구성완충액 (reconstitution buffer)은 50 mM NaHCO₃, 40 mM HEPES, 0.01 N NaOH로 제조하였다. 뇌사자로부터 기증받은 말초신경을 본 실시예에 사용하였다. 말초신경은 가위로 주위의 연부조직과 신경외막을 제거한 후 이용하여 1 내지 3 mm³ 크기의 절편으로 잘게 절단한 후 DMEM 용액으로 3차례 세척하였다. 이후 말초신경 절편은 하이드로젤 구성완충액 0.5 ml 당 10개의 절편이 포함되도록 말초신경 절편을 첨가하였다. 이후 5가지 농도의 콜라겐 용액과 말초신경 절편을 함유한 구성완충액을 1:1(용량) 비율로 혼합한 후 1 ml 혼합액을 6-multiwell tissue culture plate에 옮긴 후 습식챔버(humidified chamber)에서 37℃에서 2시간 동안 가교반응을 거쳤다. 콜라겐 하이드로젤이 완전히 형성된 후 2 ml의 세포배양액을 첨가한 후 골격근절편을 3차원 하이드로젤 내에서 7일간 장기(organ)배양하였다. 배양이 끝난 후 3% 포르말린 용액으로 고정한 후 위상차 현미경으로 촬영하여 말초신경 절편에서 콜라겐 하이드로젤 내로의 신경능선줄기세포의 이동거리를 Image J(NIH, Bethesda, MA)를 이용하여 측정하였다.

[0110] 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 콜라겐 농도가 0.5 mg/ml 이하인 경우 콜라겐 하이드로젤은 말초신경에서 분리되는 세포외기질 분해효소에 의하여 분해되어 3차원적 세포의 부착과 이동에 필요한 기질이 소실되는 것을 확인할 수 있었다(도 1, 화살촉). 콜라겐 농도가 높아질수록 하이드로젤 내로의 신경능선줄기세포의 이동과 성장은 현저하게 감소되었다(도1 및 도2). 1.0 mg/ml 콜라겐으로 제조한 모방 하이드로젤 내로 말초신경 절편에서 신경능선줄기세포의 이동과 성장은 배양 1일부터 관찰되기 시작하였으나, 5 mg/ml 농도 이상의 콜라겐으로 제조한 하이드로젤 내로의 신경능선줄기세포의 이동은 배양 2일 이후부터 관찰되었다. 형태계측학적 분석에서도 하이드로젤 제조시 사용한 콜라겐 농도가 증가할수록 신경능선줄기세포의 이동과 성장은 유의하게 감소되었다(p < 0.01)(도2).

[0111] 실시예 2. 콜라겐 하이드로젤-지지 말초신경 절편의 3차원 장기배양(organ culture)

[0112] 실시예 1과 같은 방법으로 뇌사자로부터 기증받은 말초신경을 사용하였다. 신경외막과 신경주위 연부조직이 제거된 1 내지 3 mm³ 크기의 말초신경 절편은 하이드로젤 구성완충액 7.5 ml와 혼합하였다. 이후 동량의 2 mg/ml 콜라겐 용액과 혼합한 후 15 ml 혼합액을 150-mm 배양용기에 옮긴 후 습식챔버에서 37℃에서 2시간 동안 가교반응을 거쳤다. 콜라겐 하이드로젤이 완전히 형성된 후 20 ml의 세포배양액을 첨가한 후 장기(organ)배양하였다. 세포배양액은 90% (vol/vol) DMEM, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS; Invitrogen), 20 ng/ml EGF, 5 ng/ml bFGF, 10 ng/ml IGF, 10 mg/ml 젠타마이신(gentamicin, Invitrogen)로 구성하였다. 세포배양액을 첨가한 후 배양용기는 오비탈 셰이커 (orbital shaker)위에서 15 내지 30 rpm 속도로 천천히 교반하면서 14일간 배양하였다. 2일마다 신선한 세포배양액으로 교체하였다. 하이드로젤 내로 이동, 성장한 신경능선줄기세포 및 말초신경 절편은 콜라지네이즈를 처리하여 콜라겐 하이드로젤을 선택적으로 분해시켜 회수하였다. 회수한 신경능선줄기세포는 통상적인 방법으로 2차원 단층배양법으로 증폭 배양하였고, 회수한 말초신경 절편은 콜라겐 하이드로젤 내로 다시 함입시킨 후 동일한 방법으로 하이드로젤-지지 3차원 장기(organ)배양을 반복하였다.

[0113] 도 3 및 도 4에서 나타난 바와같이, 장기(organ)배양 1일부터 말초신경 절편으로부터 하이드로젤 내로 신경능선줄기세포의 이동과 성장이 관찰되기 시작하였으며, 배양 14일째까지 콜라겐 하이드로젤 내로 신경능선줄기세포의 이동과 성장이 지속적으로 증가하였다. 하이드로젤 내로 이동 성장한 세포는 전형적인 섬유모세포와 유사한

방추상 모양을 보였다 (도4).

[0114] 도 5는 역동적 환경에서 콜라겐 하이드로젤-지지 3차원 장기(organ)배양은 산소 및 영양분 공급을 촉진시킬 수 있었으며, 그 결과 말초신경 절편에서부터 하이드로젤 내로 신경능선줄기세포의 이동과 성장은 정적인 환경에서 장기(organ)배양한 경우와 비교하여 30% 이상 유의하게 증가되었다($p < 0.01$)(도5).

[0115] 실시예 3. 콜라겐 하이드로젤 내로 이동 성장한 신경능선줄기세포의 회수 및 증폭배양

[0116] 실시예 2에서 기술한 방법으로 2주간 말초신경 절편을 배양하였다. 배양용기는 인산완충액 (phosphate-buffered saline, PBS)로 3차례 10분간 실온에서 세척하였고, 이후 1 % 송아지혈청이 포함된 DMEM로 1차례 수세하였다. 콜라겐 하이드로젤 10 ml 당 20 ml의 1 % 송아지혈청 및 I형 콜라게네이즈(Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ)이 포함된 DMEM을 배양용기에 첨가하였다. 배양용기는 오비탈 셰이커 (orbital shaker) 위에 놓고 37°C, 15 rpm 속도로 30분간 교반하였다. 콜라겐 하이드로젤이 느슨해지고 분해된 후 트랜스퍼 피펫 (transfer pipette)을 이용하여 배양용기로부터 신경능선줄기세포 및 말초신경 절편을 50 ml 코니칼 튜브에 옮겼다. 이후 200 x g에서 10분간 원심분리한 후 상층액은 제거하였다. 10 ml의 세포배양액을 첨가한 후 트랜스퍼 피펫 (transfer pipette)을 이용하여 분산시켰다. 100 mm 구경을 가진 세포 스트레이너 (cell strainer)(BD Bioscience, 서울, 대한민국)을 이용하여 신경능선줄기세포와 말초신경 절편을 분리하였다. 회수한 세포 수는 PicoGreen dsDNA Quantitation Kit를 이용하여 분석하였고, 장기(organ)배양한 말초신경 중량으로 보정하였다. 신경능선줄기세포는 다시 200 x g에서 10분간 원심분리한 후 상층액은 제거하고, 세포층은 세포배양액으로 분산시켰다. 신경능선줄기세포는 cm^2 당 만개의 밀도로 배양용기에 파종하여 통상적인 단층배양법을 통하여 증폭 배양하였다.

[0117] 콜라게네이즈 처리 30분 후 콜라겐 섬유는 분해되었으며, 신경능선줄기세포는 세포질이 수축되어 둥근 형태를 취하며, 개개로 흩어져 분포하였다. 이들 세포는 하이드로젤이 분해된 후 용액상태로 분산되어 있어 원심분리를 통하여 용이하게 회수할 수 있었다. 회수 후 세포배양 용기에 파종하면 신경능선줄기세포는 30분 이내에 단층으로 배양용기 표면에 부착하여 성장하였다(도6). 말초신경 절편 100 mg에서부터 14일간 콜라겐 하이드로젤-지지 3차원 장기(organ)배양 후 얻어지는 신경능선줄기세포 수는 1.7×10^6 으로 높은 수율을 보였다.

[0118] 실시예 4. 콜라겐 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포의 성장 특성

[0119] 콜로니 형성단위-섬유아세포 (colony forming unit-fibroblast, CFU-F)의 형성능력 측정을 위해 하이드로젤로부터 회수한 세포를 5 cells/cm^2 밀도의 60-mm 배양 접시에 파종한 후 성장배양배지를 첨가한 후 10일간 배양하였다. 이후 배양용기는 2% 완충 포르말린으로 고정하고 5분간 10% 크리스탈 바이올렛(LabChem Inc., Pittsburgh, PA)으로 염색하였다. 염색용기는 디지털 CCD 카메라로 이미지를 획득하였고, 형성된 CFU-F 수는 영상분석 프로그램(Image J)을 이용하여 산정하였다. 또한 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포의 군집배가 시간(population doubling time, PDT)를 측정하기 위해, 2×10^3 세포들을 48-멀티웰(multiwell) 배양용기에 파종한 후 배양하였다. 배양 1일째와 5일째 세포는 CellLytic™ 용액(Sigma)으로 용해하였고, 용해된 샘플 내 DNA 함량은 PicoGreen dsDNA Quantitation Kit을 사용하여 측정하였다. 형광 마이크로플레이트 리더기 (fluorescent microplate reader, Synergy™ HT; Bio-Tek Instruments, Neufahrn, Germany)를 사용하여 발광 (emission) 485nm, 여기(excitation) 540nm의 파장에서 형광강도를 측정하였다. 측정된 형광강도는 세포수로 전환하기 위해 섬유아세포를 이용하여 표준곡선을 구하였고, 이 표준곡선을 이용하여 샘플 내 형광강도를 세포수로 변환하였다. PDT는 다음 공식에 따라 산정하였다. $PDT = [(\text{days in exponential phase}) / ((\log N_2 - \log N_1) / \log 2)]$ 이때, N_1 은 지수성장기의 초기의 세포수이며, N_2 는 지수성장기의 말기에서의 세포수이다.

[0120] 도 7, 도 8, 도 9는 콜라겐 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포의 단층배양 환경에서 성장특성을 나타낸 도이다. 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포는 35 % 내지 47 %에서 CFU-F를 형성할 수 있었다(도7 및 도 8). 신경능선줄기세포는 16회 이상 계대배양이 가능하였고 96번 이상 세포 분열할 수 있는 능력을 지는 것을 확인할 수 있었다(도9). 또한 신경능선줄기세포의 군집배가시간은 30시간 내지 60시간 이내로 단층배양 환경에서

뛰어난 세포분열 능력을 확인할 수 있었다(도9).

[0121] 실시예 5. 콜라겐 하이드로젤로부터 회수한 신경능선줄기세포의 표현학적 특성

[0122] 1) 유세포분석 방법을 이용한 골격근줄기세포의 면역표면학적 특성

[0123] 십만 개 세포는 일차항체 혹은 아이소타입 대조항체(isotype-matched control antibodies)와 30분 동안 반응시켰다. 일차항체는 피코에리트린(phycoerythrin, PE) 또는 플루오레세인이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)와 결합된 항-인간 항체들로 CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD133을 사용하였다. 형광물질과 결합된 모든 일차항체 및 대조항체는 BD Bioscience(San Jose, CA)에서부터 구입하였다. 형광표지자와 결합되지 않은 비접합된 항체(unconjugated antibodies)들인 CD105(R&D Systems), PDGFR- β (CD140b; Abcam, Cambridge, MA), CD56(Abcam), major histocompatibility complex-I 및 II(MHC-I 및 II, Abcam), α -smooth muscle actin(DAKO, SMA), S-100(Sigma)은 10만개 세포와 30분간 반응시킨 후 FITC와 결합된 2차 항체와 30분간 반응하였다. 반응이 종료된 후 세포는 PBS로 3차례 세척한 후 2% 파라포름알데히드에서 5분간 고정하였다. 각 항체에 대한 양성률은 FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, CA) 유세포분석기를 사용하여 분석하였으며, 최소 만개 이상의 세포에서 발현율을 분석하였다.

[0124] 도 10에 나타난 바와 같이, 신경능선줄기세포는 신경능선줄기세포 표지자인 nestin, p75 및 CD56에는 양성이었다. 그러나 조혈계 줄기세포 표지자인 CD34 및 CD133은 검출되지 않았다. 또한 계대배양을 통하여 증폭한 골격근줄기세포는 CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105과 같은 중간엽줄기세포 표지자에 90% 세포가 양성이었으나, 조혈계 세포 표지자인 CD34 및 CD45, 혈관내피세포 표지자인 CD31 및 CD34는 모두 음성이었다. 상기 신경능선줄기세포는 MHC-II 표지자는 95% 이상에서 양성으로 발현되었으나, MHC-I 표지자는 음성이었다. 신경능선줄기세포는 타인에게 이식할 수 있는 면역학적 조건은 충족하였다. CD140b 및 SMA 등의 혈관주위세포 표지자는 신경능선줄기세포에서 모두 발현되었으나, 발현빈도는 표지자마다 다소 차이를 보였다. 그러나 성숙한 희돌기교세포 혹은 슈반세포 표지자인 S-100은 전혀 발현되지 않았다.

[0125] 2) 면역형광염색 방법을 이용한 신경능선줄기세포의 면역표면학적 특성

[0126] 신경능선줄기세포 10만 개를 세포원심분리기(cytocentrifuge, Cyto-Tek, Sakura, Tokyo, Japan)를 이용하여 유리슬라이드에 부착시켰다. 신경능선줄기세포 표지자인 nestin, p75, Sox10, CD56 등의 발현여부를 세포형광염색을 실시하여 평가하였다. 슬라이드는 상기 항체와 반응시킨 후 isotype-matched Alexa Fluor 488-conjugated 이차항체와 반응시켰다. 이후 슬라이드는 DAPI(Invitrogen)으로 핵을 염색한 후 공초점현미경(confocal microscope)로 관찰하였다. 총 1000개의 세포를 산정하여 신경능선줄기세포의 해당 표지자의 발현율을 평가하였다.

[0127] 도 11은 콜라겐 하이드로젤 내로 이동 성장한 신경능선줄기세포의 면역형광염색 사진이다. 단층배양법으로 증폭한 세포는 신경능선줄기세포 표지자인 네스틴(nestin), p75, Sox10 및 CD56이 90% 이상 발현되었다.

[0128] 3) 역전사 중합효소반응을 이용한 신경능선줄기세포의 mRNA 발현 특성

[0129] 신경능선줄기세포 100만 개를 TRI Reagent(Invitrogen)을 이용하여 통상적인 방법으로 총 RNA를 추출하였다. 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성한 후 nestin, p75, Sox10 특이 시발체를 이용하여 중합효소반응 과정을 거쳤다. 1% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 mRNA 발현 여부를 평가하였다.

[0130] 도 12은 콜라겐 하이드로젤 내로 이동 성장한 신경능선줄기세포의 mRNA 발현을 평가한 전기영동 사진이다. 단층배양법으로 증폭한 세포는 신경능선줄기세포 표지자인 네스틴(nestin), p75, Sox10 및 CD56 등의 mRNA가 모두 발현되었으며, 상기 결과는 하이드로젤로 내로 이동 성장한 세포는 신경능선줄기세포와 동일한 mRNA 발현특성을 보였다.

[0131] 실시예 6. 단층배양법으로 증폭 배양한 신경능선줄기세포의 다분화능력

[0132] 1) 조골세포로의 분화능력

[0133] 신경능선줄기세포의 조골세포로의 분화능력을 평가하기 위해서 이만 개의 세포를 24-멀티웰 조직배양플레이트 (24-multiwell tissue culture plate)에 파종한 뒤 1 μ M 텍사메타손 (dexamethasone), 50 μ M 아스코르브산 (ascorbic acid), 10 mM β -글리세롤 인산 (glycerol phosphate), 10% 송아지혈청을 함유한 α -MEM에서 2주간 배양하여 분화를 유도하였다. 조골세포로의 분화여부는 분화 유도 2주 후에 2% 포르말린으로 실온에서 10분간 고정시킨 다음 Alizarin Red(Sigma) 염색을 통하여 미네랄의 침착여부를 검사하였다.

[0134] 도 13A에서 제시하듯이 신경능선줄기세포는 분화유도 후 광범위한 미네랄의 침착이 관찰되어 조골세포로의 분화능력을 지닌 것을 확인할 수 있었다.

[0135] 2) 지방세포로의 분화능력

[0136] 신경능선줄기세포의 지방세포로 분화능력을 평가하기 위해서 이만 개의 세포를 24-멀티웰 조직배양플레이트 (24-multiwell tissue culture plate)에 파종한 뒤 90% DMEM에 10% 송아지혈청, 0.5 mM 3-아이소부틸-1-메틸잔틴 (3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma), 80 μ M 인도메타신 (indomethacin, Sigma), 1 μ M 텍사메타손 (dexamethasone, Sigma), 5 μ g/ml 인슐린 (insulin, Sigma)이 첨가된 배지에서 14일 동안 배양하였다. 지방세포로의 분화여부는 분화 유도 2주 후에 2% 포르말린으로 실온에서 10분간 고정시킨 다음 세포내 지방축적의 지표인 0.5% Oil Red O(Sigma)용액을 상온에서 1시간 염색하여 세포질 내 지방질의 축적여부로 판정하였다.

[0137] 도 13B에서 제시하듯이 신경능선줄기세포는 지방세포로의 분화를 유도한 후 3일째부터 세포질 내로 지방질의 축적이 관찰되기 시작하였으며, 분화유도 14일째 90% 이상의 세포에서 세포질 내로 지방질의 축적을 Oil Red O 염색을 통하여 확인할 수 있었다.

[0138] 3) 신경계 세포로의 분화능력

[0139] 신경계 세포로의 분화를 유도하기 위하여 이만 개의 신경능선줄기세포를 2.5 mg/ml 피브리노젠 및 0.5 U/ml 트롬빈으로 구성된 300 μ l 피브린 하이드로젤 내로 함유시킨 후 3차원 배양하였다. 신경세포로의 분화는 98.5% DMEM, 1% 송아지혈청, 0.5% DMSO, 10 ng/ml BMP-2(R&D systems), 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF로 구성된 신경세포 분화배지를 첨가하여 7일간 배양하였다. 신경교세포로의 분화는 98.5% DMEM, 1% 송아지혈청, 0.5%DMSO, 10 ng/ml NRG-1(R&D systems)으로 신경교세포 분화배지를 첨가하여 7일간 배양하였다. 신경세포 및 신경교세포로의 분화여부는 면역형광염색을 통하여 확인하였다. 항체의 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 0.4% 트리톤-X 100 용액이 포함된 5% 염소혈청 (goat serum)으로 40분간 blocking한 후 신경세포 표지자인 신경미세섬유 (neurofilament)(abcam, NF) 혹은 신경교세포 표지자인 GFAP(DAKO) 항체를 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 세척 후 Dylight 488-conjugated 이차항체를 상온에서 50분간 반응시키고 10 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen)용액으로 핵을 염색하였다. 이후 ProLongGold antifade reagent(Molecular Probe)로 마운팅 하여 공초점 레이저주사현미경으로 표지자의 발현여부를 평가하였다.

[0140] 도 13에서 제시하듯이 신경계 세포로의 분화 유도 후 신경능선줄기세포는 가느다란 세포질의 성장이 관찰되었으며(도 13C), 별모양(도 13D) 혹은 양극단(도 13E) 모양의 세포로 변환되었다. 신경능선줄기세포는 분화과정 중 네스틴 (nestin)은 지속적으로 발현되었으며, 신경교세포 표지자인 GFAP(도 13D) 혹은 신경세포 표지자인 신경미세섬유 (neurofilament)(도 13E)가 발현되었다.

[0141] 4) 마이크로매스 배양법을 이용한 슈반세포로의 분화능력

[0142] 슈반세포로의 분화를 유도하기 위하여 십만 개의 신경능선줄기세포를 10 ml 배양액에 현탁한 후 24-multiwell

배양용기에 파종하였다. 2시간 동안 세포배양기 내에서 반응시킨 후 98.5% DMEM, 1% 송아지혈청, 0.5%DMSO, 10 ng/ml TGF- β 2(R&D systems)로 구성된 슈반세포 분화배지를 첨가하여 7일간 배양하였다. 슈반세포로의 분화여부는 통상적인 방법으로 파라핀 블록을 제조한 후, 파라핀 절편을 취하여 헤마톡실린 에오신 (hematoxylin eosin) 염색 및 면역형광염색을 통하여 확인하였다. 파라핀 절편은 항체의 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 0.4% 트리톤-X 100용액이 포함된 5% α 염소 혈청 (goat serum)으로 40분간 blocking한 후 p75, 네스틴 (nestin), S-100, myelin basic protein(MBP) 및 GFAP 등의 항체를 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 세척 후 Dylight 488-conjugated 이차항체를 상온에서 50분간 반응시키고 10 μ g/ml DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen)용액으로 핵을 염색하였다. 이후 ProLongGold antifade reagent(Molecular Probe)로 마운팅 하여 공초점 레이저주사현미경으로 표지자의 발현여부를 평가하였다. 슈반세포로의 분화 유도 후 형성된 마이크로매스로부터 TRI Reagent(Invitrogen)을 이용하여 통상적인 방법으로 총 RNA를 추출하였다. 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성한 후 특이 시발체를 이용하여 중합효소반응 과정을 거쳐 S-100, MBP, Sox-10, GFAP 특이 mRNA 발현여부를 평가하였다.

[0143] 도 14에서 제시하듯이 슈반세포로의 분화 유도 후 신경능선줄기세포는 미성숙 말초신경과 같은 다발성 구조를 나타내었다. 신경능선줄기세포는 슈반세포와 유사하게 양극성의 가느다란 세포질을 보였다. 도 15에서 제시하듯이 미성숙 말초신경 내 신경능선줄기세포는 p75 및 네스틴 (nestin) 등의 표지자는 지속적으로 발현되었다. 또한 분화 전 신경능선줄기세포에서 발현되지 않았던 S-100, MBP 및 GFAP 표지자가 발현되었으며, 이는 분화 후 신경능선줄기세포는 슈반세포와 동일한 면역학적 특성을 보였다. 도 16에서 제시하듯이 분화 전과 비교하여 분화유도 후 신경능선줄기세포는 슈반세포 특이 mRNA인 S-100, MBP, Sox10의 발현이 유의하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

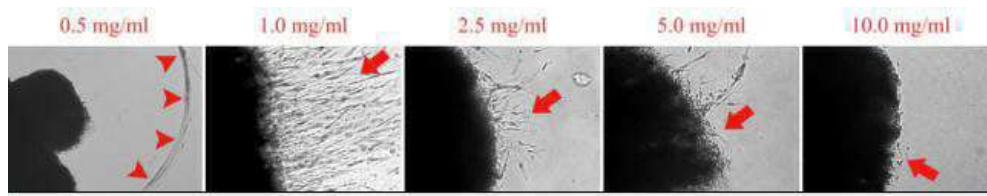
[0144] 실시예 7. 체외증폭 배양한 신경능선줄기세포의 신경재생 능력

[0145] 신경능선줄기세포의 생체 내 말초신경 재생능력을 규명하기 위하여 9주령의 수컷 BALB/c nu/nu 누드마우스의 좌골신경을 겹자를 이용하여 짓이겨 손상을 유도하였다. 좌골신경 손상 3일 후 좌골신경 내로 이백만개의 신경능선줄기세포를 주사기를 통하여 주입하였다. 신경능선줄기세포 대신 PBS만 주입한 마우스를 대조군으로 이용하였다. 또한 신경능선줄기세포 주입 4주 후에 마우스를 도살한 후 좌골신경을 수거하였고 2% 포르말린 용액으로 고정하였다. 좌골신경 내로 주입한 신경능선줄기세포의 말초신경 재생능력과 생체 내 슈반세포로의 분화여부는 헤마톡실린 에오신 (hematoxylin eosin) 염색과 면역형광염색을 통하여 분석하였다. 면역형광염색은 파라핀 절편을 isotype matched serum으로 실온에서 40분간 blocking한 후 인간-특이 미토콘드리아 항체(human-specific mitochondria antigen, hMT, Abcam) 항체와 37 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS를 이용하여 3회 세척 후 isotype matched Dylight 488-conjugated 이차항체를 실온에서 40분간 반응시켰다. 이후 슬라이드는 S-100 혹은 MBP와 다시 반응시킨 후 isotype matched Dylight 594-conjugated 이차항체를 실온에서 40분간 반응시켰다. 이후 10 mg/ml DAPI으로 핵을 대조염색한 후 ProLongGold antifade reagent를 이용하여 마운팅하였으며, 공초점 주사현미경으로 이미지를 획득하였다. 주입한 신경능선줄기세포에 의한 말초신경의 기능성 회복은 신경전도 시험을 통하여 평가하였다.

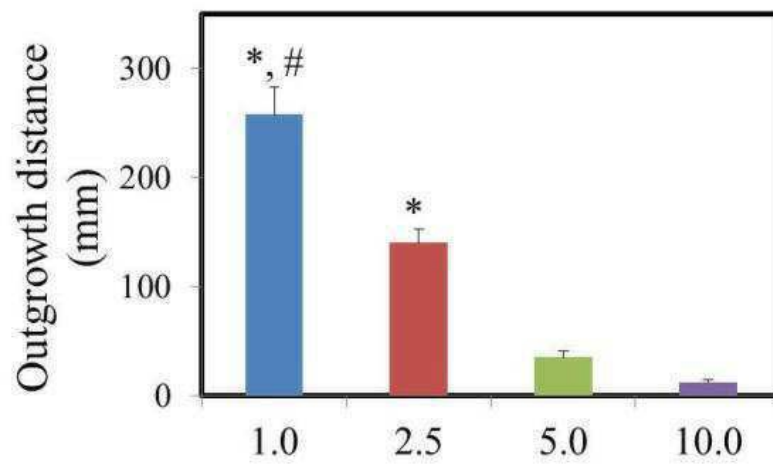
[0146] 도 17에서 제시하듯이 PBS만을 주입한 좌골신경은 신경섬유 사이로 섬유화가 진행되어 있었으며, 신경섬유가 파괴되어 형성되는 myelin digestion chamber(화살)가 빈번히 관찰되었다. 반면 신경능선줄기세포(NCSCs)가 주입된 좌골신경은 신경섬유 사이로 섬유화 및 미엘린 소화방 (myelin digestion chamber)이 유의하게 감소되어 있었다. 도 18 및 도 19에서 제시하듯이 대조군(PBS)과 비교하여 신경능선줄기세포(NCSCs)이 주입된 좌골신경은 손상 4주 후 신경전도 진폭(amplitude)이 유의하게 증가되었다($p<0.05$)(도 18). 또한 신경능선줄기세포(NCSCs)이 주입된 좌골신경은 신경자극 후 반응도(Latency)가 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(도 19). 도 20에서 제시하듯이 주입한 인간 신경능선줄기세포는 길쭉한 신경섬유를 덮고 있었으며, 상기 세포는 hMT에 양성으로 주입한 인간세포임을 확인할 수 있었으며, hMT 양성인 인간 세포가 슈반세포 특이 표지자인 S-100 및 MBP가 발현되어 슈반세포로 분화하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

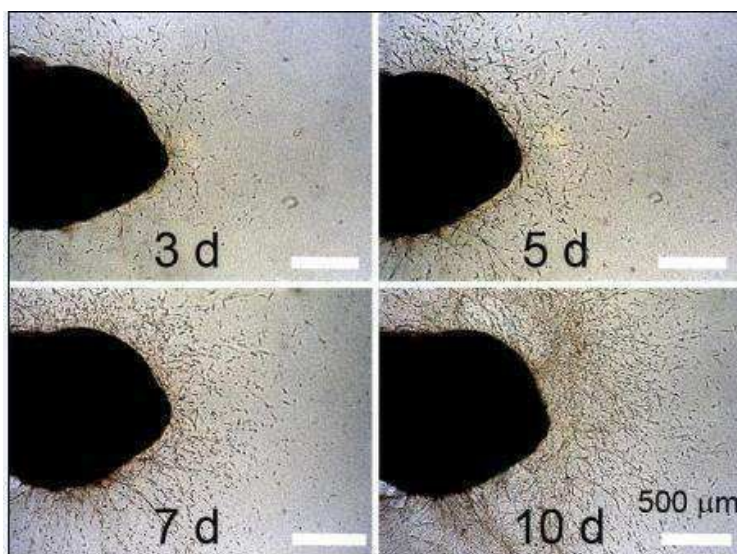
도면1



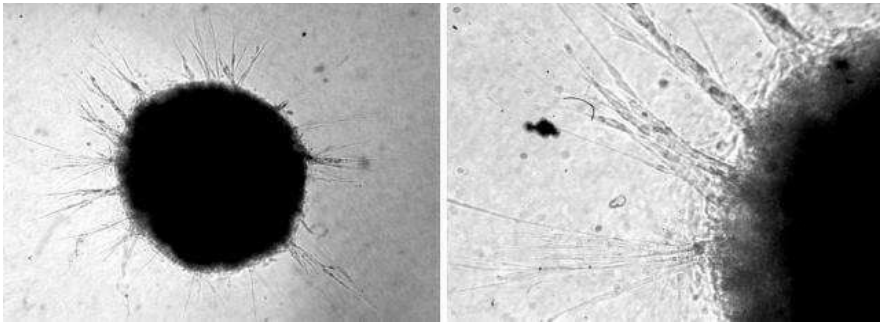
도면2



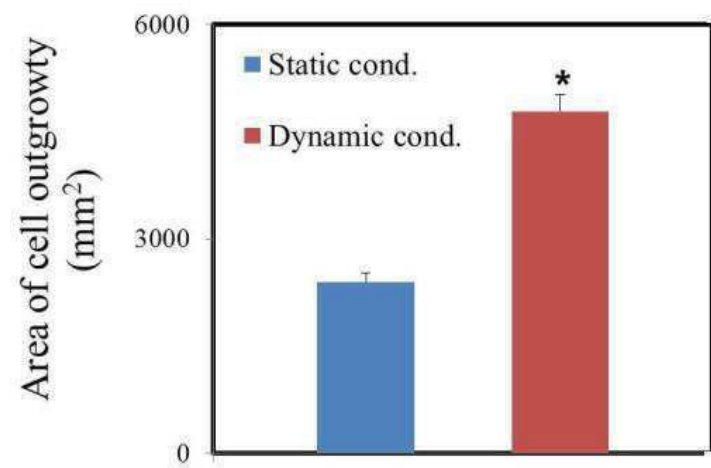
도면3



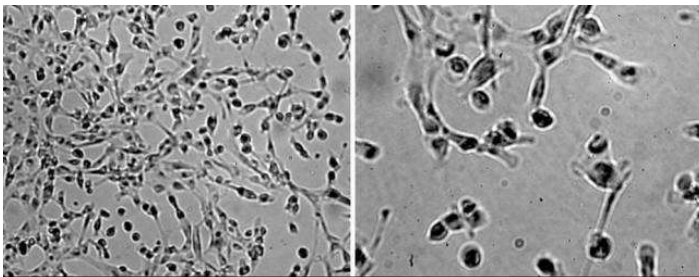
도면4



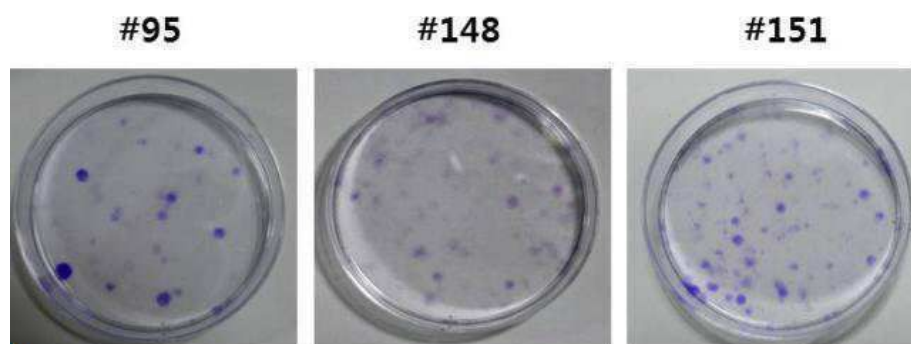
도면5



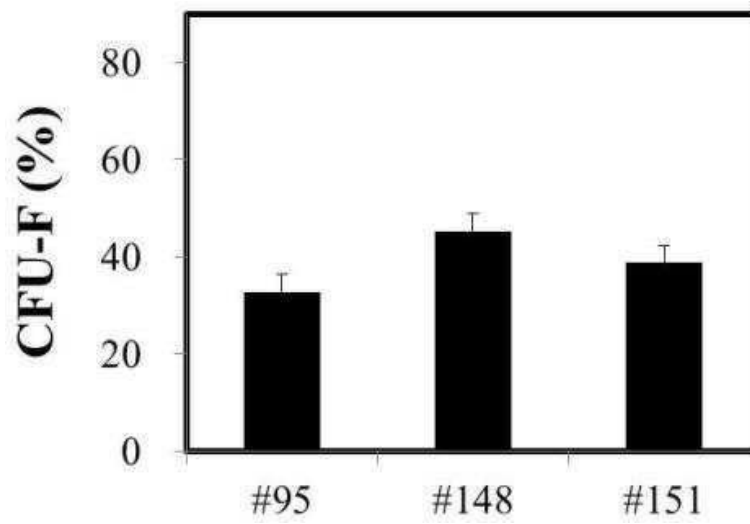
도면6



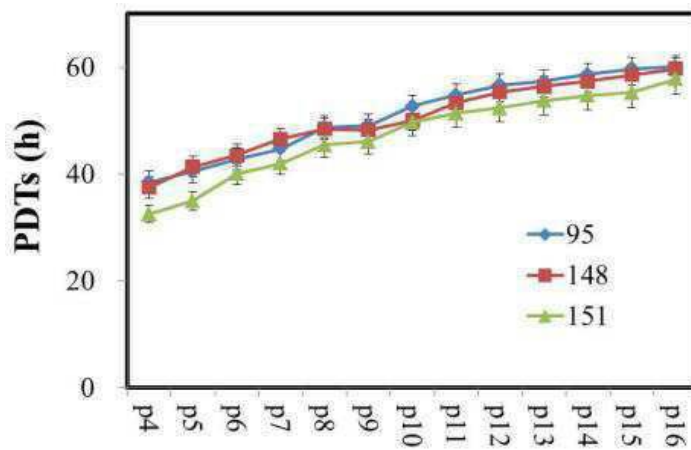
도면7



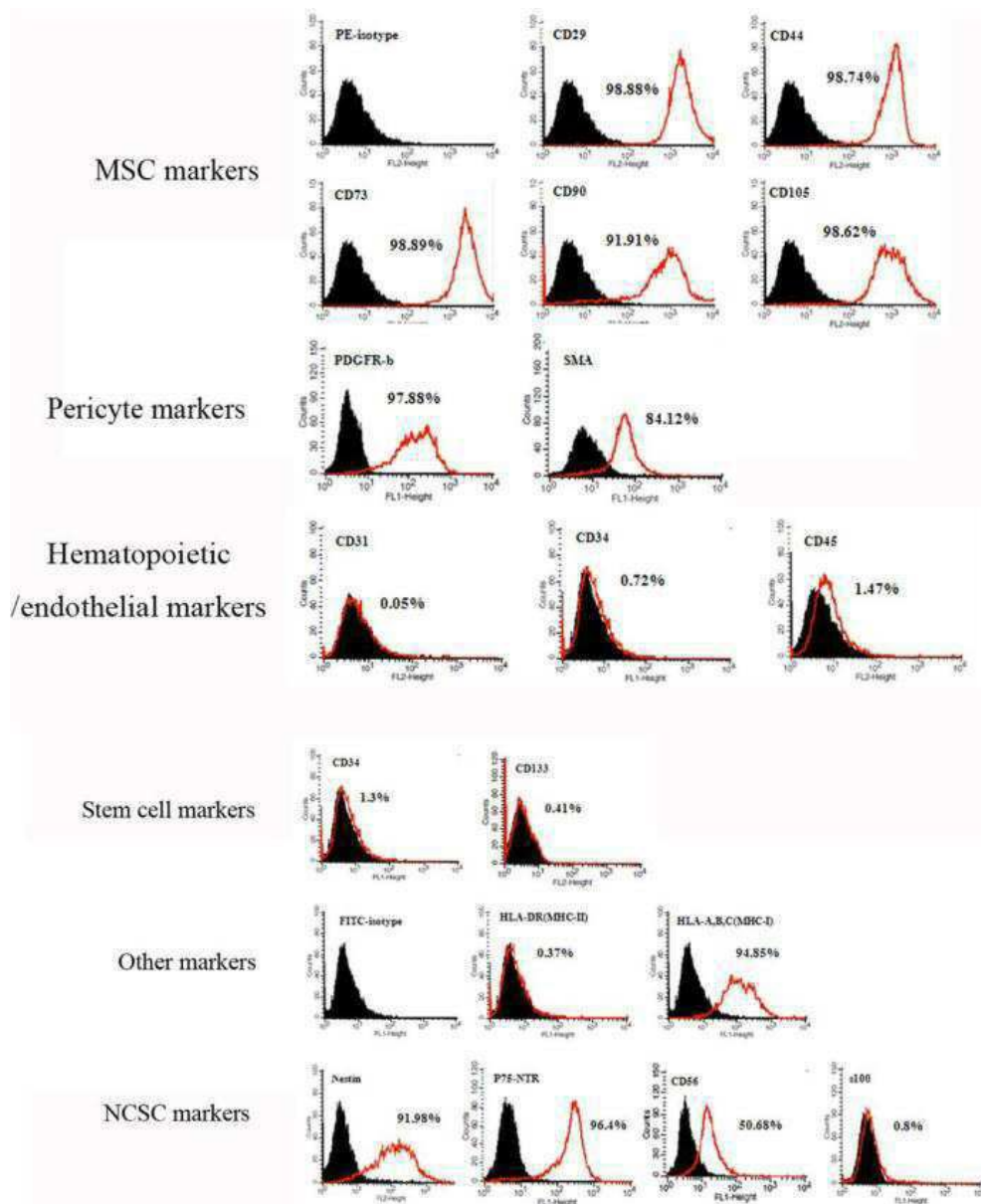
도면8



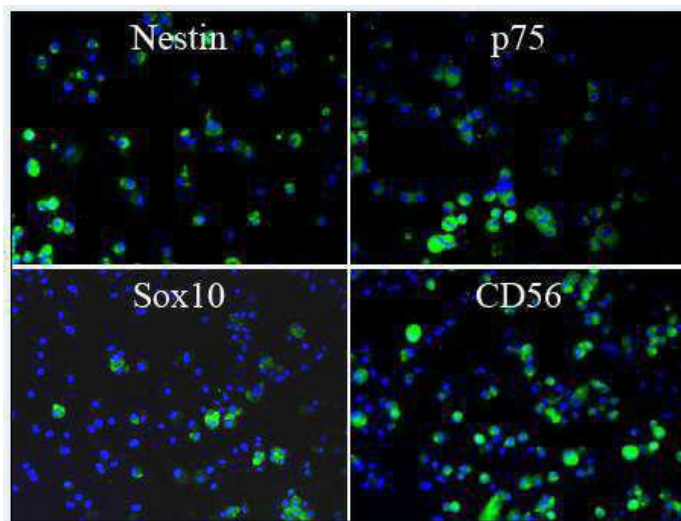
도면9



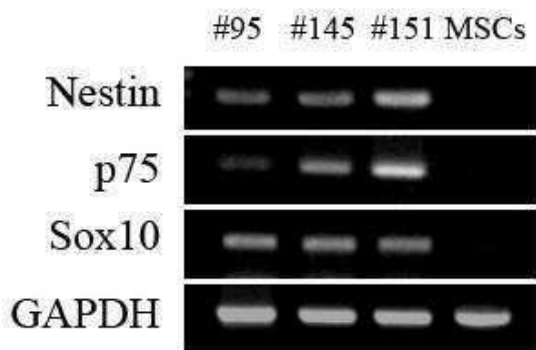
도면10



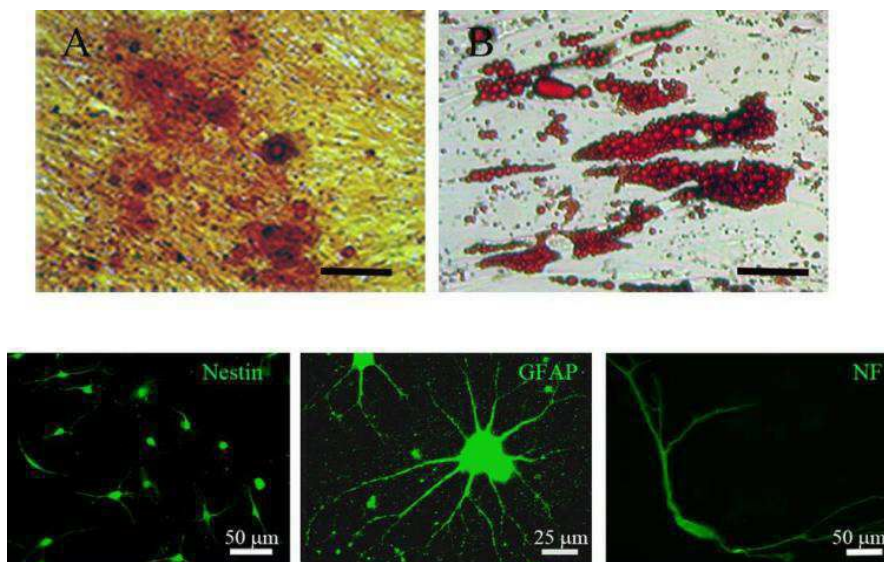
도면11



도면12



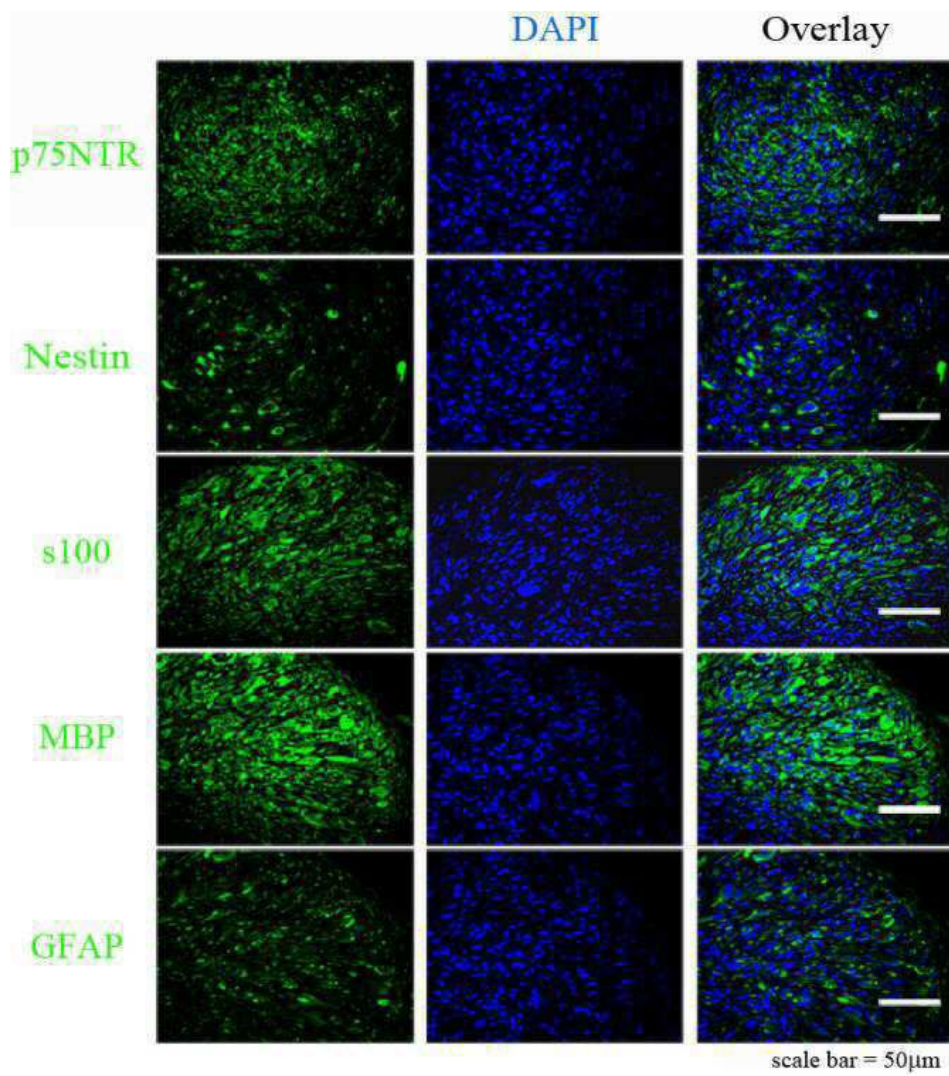
도면13



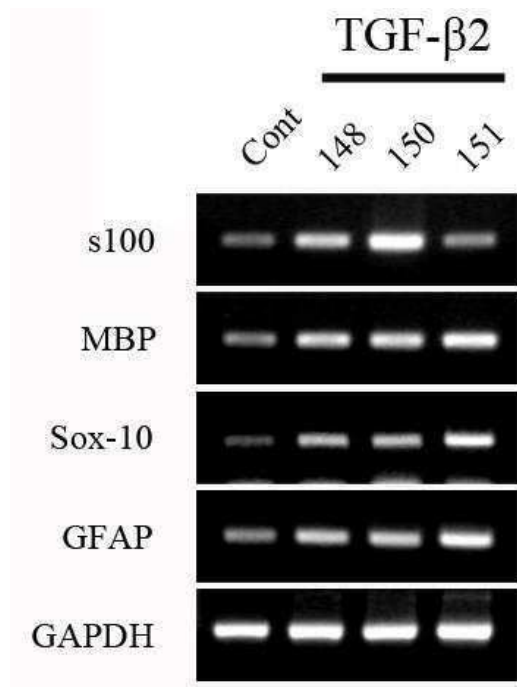
도면14



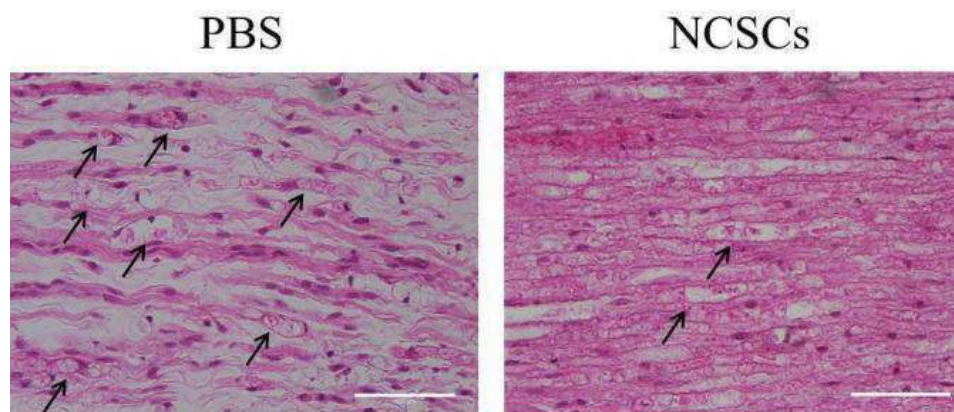
도면15



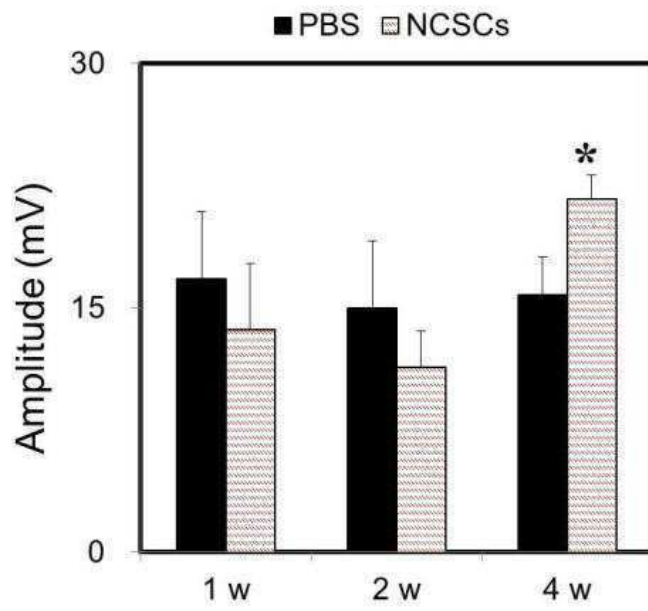
도면16



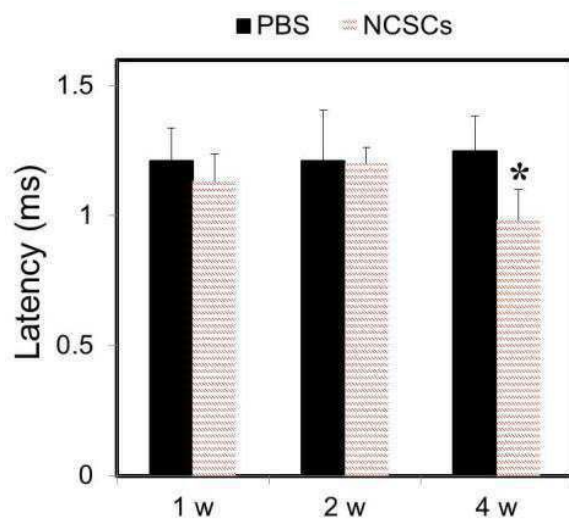
도면17



도면18



도면19



도면20

