



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0145891
(43) 공개일자 2015년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/30 (2015.01) A61K 35/12 (2015.01)
(21) 출원번호 10-2014-0075211
(22) 출원일자 2014년06월19일
심사청구일자 2014년06월19일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
홍성희
서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)
박한결
서울특별시 도봉구 해동로 195, 103동 1104호 (쌍문동, 삼익세라믹아파트)
정혜선
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 304동 1101호 (신천동, 파크리오)
(74) 대리인
이처영, 장제환

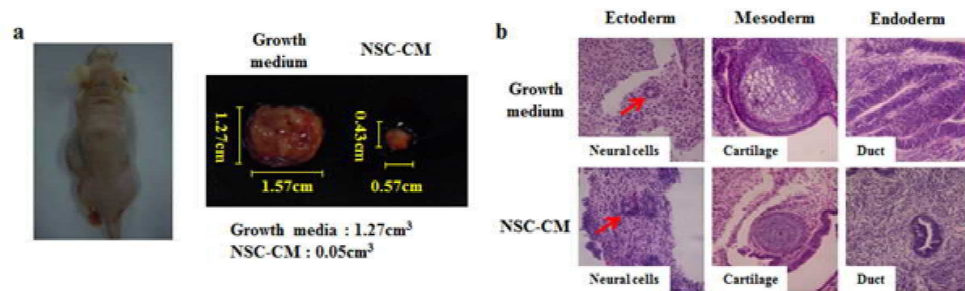
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인간 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포 배양액의 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 이식 후 문제가 되는 기형종 형성 및 성장 억제 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물은 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 분화능에는 영향을 미치지 않으며 증식을 억제하는 효과가 있으므로, 기형종 형성 및 성장 억제를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도17



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013071592

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0337030013

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 다양한 세포근원 유래 신경 줄기세포의 임상적용 가능성 검증 연구

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.08.01 ~ 2014.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 것임을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 하기 특성 중 하나 이상을 가지는 것을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물:

- 1) Ki-67의 발현 억제;
- 2) 사이클린-D1(cyclin-D1)의 발현 억제;
- 3) 카스파제-3(caspase-3) 활성화를 촉진; 및
- 4) Oct4 및 Sox2의 발현 억제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 분화능에 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 기형종은 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 이식에 의해 형성되는 것임을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물.

청구항 7

- (a) 신경줄기세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양된 신경줄기세포를 분리제거하여 신경줄기세포 배양액을 수득하는 단계를 포함하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 것임을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계는 N-2 첨가제, 헤파린, 섬유아세포 성장인자(bFGF), 표피성장인자(EGF), 및 백혈병 억제인자(LIF)가 포함된 인간 신경구 배양 배지(human neurosphere culture media)에서 배양한 다음, 불멸화시킨 세포를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS(fetal bovine serum), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 비유도성 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인간 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포 배양액의 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 이식 후 문제가 되는 기형종 형성 및 성장 억제 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 배아줄기세포는 지속적인 자기재생(self-renewal)으로 무한증식이 가능하고, 인체에 존재하는 모든 세포로 분화할 수 있는 전능성(pluripotency)을 가지고 있다. 따라서, 파킨슨병, 당뇨병, 심장병 등의 난치성 질환의 세포 치료제로 이용될 수 있다. 하지만, 이러한 배아줄기세포가 분화과정에서 완전히 분화되지 못하고 남아있을 경우, 환자에게 이식되었을 때 조직 내에서 기형종(teratoma)을 형성할 수 있다는 점이 임상 적용의 한계점으로 지적되고 있다.

[0003] 배아줄기세포에 의한 기형종 형성 억제를 위한 노력으로, 현재까지의 연구들은 다양한 방법으로 분화되지 못하고 남아있는 세포들을 선택적으로 제거하는 방식으로 이루어져 왔다. 전능성 표면 마커(pluripotent stem cell surface marker)인 SSEA-3와 TRA-1-60에 특이성을 나타내는 두 종류의 항체를 이용하여 미분화 전능성 줄기세포를 MACS로 분리 및 제거하는 방법(대한민국 특허 10-1323650), 배아줄기세포의 미분화세포에서 특이적으로 나타나는 세포사멸인자를 활성화시킬 수 있는 quercetin과 YM155와 같은 소분자를 처리해 미분화된 세포만 선택적으로 제거하는 방법(Lee *et al.*, *PNAS* 110:E3281-3290, 2013) 및 자살 유전자(HSV-tk)가 도입된 배아줄기세포에 의해 형성된 기형종에 프로드러그(Ganciclovir)를 처리하여 기형종을 제거하는 방법(Schuldiner *et al.*, *Stem Cells* 21:257-265, 2003) 등이 그것이다.

[0004] 또한, 최근 여러 종류의 세포에서 얻은 배양액(conditioned medium, CM)이 종양 세포의 증식을 억제할 수 있다는 증거들이 밝혀지고 있다. 지방 줄기세포의 배양액이 췌장암 세포 사멸을 일으키며(미국 특허 2009-0186007), 중간엽 줄기세포 배양액이 담낭암 및 간암 세포 사멸을 일으킨다는 것(Liu *et al.*, *PLoS One* 8:e62844, Hou *et al.*, *Tumor Biology*, 35:1239-50)이 밝혀졌다.

[0005] 하지만, 신경줄기세포 배양액이 암세포, 특히 기형종 형성 및 성장을 억제하는 것에 관하여는 알려진 바가 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 인간 뇌의 뇌실영역에서 추출한 신경줄기세포의 배양액이 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 이식에 의한 기형종 형성 및 성장을 억제하는 효과를 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 신경줄기세포 배양액을 이용한 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 신경줄기세포를 배양액을 이용한 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 신경줄기세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양된 신경줄기세포를 분리제거하여 신경줄기세포 배양액을 수득하는 단계를 포함하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물은 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 분화능에는 영향을 미치지 않으며 증식을 억제하는 효과가 있으므로, 기형종 형성 및 성장 억제를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 신경줄기세포 배양액 처리 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2A는 신경줄기세포 배양액 처리에 의한 배아줄기세포의 모양변화를 나타낸 결과이며, 도 2B는 분열시간 증가를 나타낸 결과이다.
- 도 3은 신경줄기세포 배양액 처리 시간에 따른 배아줄기세포의 총 세포수 감소를 나타낸 결과이다.
- 도 4A 및 도 4B는 신경줄기세포 배양액 처리에 의한 세포증식마커 Ki67을 발현하는 배아줄기세포의 감소를 확인한 것이다.
- 도 5A 및 도 5B는 신경줄기세포 배양액 처리에 의한 세포사멸마커 Caspase3의 활성화 형태를 발현하는 배아줄기세포의 증가를 확인한 것이다.
- 도 6A 및 도 6B는 배아줄기세포에 신경줄기세포 배양액 처리 후 세포주기 주요인자인 cyclin D1 유전자의 발현이 감소된 것을 분석한 결과이다.
- 도 7A 및 도 7B는 배아줄기세포에 신경줄기세포 배양액 처리 후 전능성마커 및 분화마커 유전자들의 발현 변화를 분석한 결과이다.
- 도 8은 레트로바이러스를 이용하여 전능성마커 유전자를 도입한 마우스 섬유아세포의 분열시간 차이를 확인한 결과이다.
- 도 9는 배아줄기세포로부터 신경전구세포로의 분화 모식도이다.
- 도 10A는 신경줄기세포 배양액 처리에 의한 신경전구세포의 모양변화를 나타낸 결과이며, 도 10B는 신경줄기세포 배양액 처리 시간에 따른 신경전구세포의 총 세포수 감소를 나타낸 결과이다.
- 도 11A 및 도 11B는 신경줄기세포 배양액 처리에 의한 세포증식마커 Ki67을 발현하는 신경전구세포의 감소를 확인한 것이다.
- 도 12A 및 도 12B는 신경전구세포에 신경줄기세포 배양액 처리 후, 세포주기 주요인자인 cyclin D1 유전자의 발

현이 감소된 것을 분석한 결과이다.

도 13은 신경줄기세포 배양액 처리 후, 신경전구세포의 분화능 변화를 분석하기 위한 모식도이다.

도 14A, 14B 및 14C는 신경전구세포에 신경줄기세포 배양액 처리 후, 신경전구세포마커(Sox1, Nestin) 및 분화된 신경세포마커(Tuj1)의 유전자 및 단백질 발현을 분석한 결과이다.

도 15A, 15B 및 15C는 신경전구세포를 7일간 분화시킨 후, 신경줄기세포 배양액을 처리하여 신경전구세포마커(Sox1, Nestin) 및 분화된 신경세포마커(Tuj1)의 유전자 및 단백질 발현을 분석한 결과이다.

도 16은 신경줄기세포 배양액 처리시 배아줄기세포에 의한 기형종 형성 억제 분석의 모식도이다.

도 17A는 신경줄기세포 배양액 처리시 배아줄기세포에 의한 기형종 크기의 차이를 비교한 결과이며, 도 17B는 배아줄기세포 유래 기형종 3배엽을 확인한 결과이다.

도 18은 신경줄기세포 배양액 처리시 배아줄기세포에 의한 기형종 성장 억제 분석의 모식도이다.

도 19A는 배아줄기세포에 의한 기형종 형성 후, 신경줄기세포 배양액의 처리에 의한 기형종 크기의 차이 및 크기 증가 수준을 비교한 결과이며, 도 19B는 배아줄기세포 유래 기형종 3배엽을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 본 발명은 일 관점에서, 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 신경줄기세포는 그 종류에 제한을 받지 않는바, 바람직하게는 태아에서 유래한 성체줄기세포이며, 더욱 바람직하게는 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 것을 신경줄기세포인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명에서, "신경줄기세포 배양액(Neural Stem Cell Culture Solution)"이란 외배엽 줄기세포의 일종인 신경줄기세포를 계대배양하여 수득한 배지 내에 포함된 구성 성분을 포함하는 물질이다.
- [0017] 본 발명의 신경줄기세포 배양액은 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 배아줄기세포와 신경전구세포의 증식 억제 기능을 수행하며, 세포 증식 수준을 결정하는 세포주기(cell cycle)에서의 주요 인자인 cyclin D1의 발현을 감소시킴으로써, 배아줄기세포 유래 기형종의 형성 및 성장을 억제한다.
- [0018] 본 발명의 신경줄기세포 배양액은 하기 특성 중 하나 이상을 갖는다.
- [0019] 1) Ki-67의 발현 억제;
- [0020] 2) 사이클린-D1(cyclin-D1)의 발현 억제;
- [0021] 3) 카스파제-3(caspase-3) 활성화를 촉진; 및
- [0022] 4) Oct4 및 Sox2의 발현 억제.
- [0023] 본 발명의 신경줄기세포 배양액은 배아줄기세포 또는 배아줄기세포 유래 신경전구세포의 증식을 억제하며, 분화능에는 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명에서, "기형종 형성 및 성장 억제용 조성물(억제제)"는 상기 신경줄기세포 배양액을 포함하는 억제제로서 그 제형은 어떠한 형태라도 가능하다.
- [0025] 본 발명은 다른 관점에서, (a)신경줄기세포를 배양하는 단계; 및 (b)상기 배양된 신경줄기세포를 분리제거하여 신경줄기세포 배양액을 수득하는 단계를 포함하는 기형종 형성 및 성장 억제용 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 상기 기형종 형성 억제제의 제조는 통상적으로 사용되는 어떠한 방법으로도 제조될 수 있으며, 신경줄기세포를 단리하고 배양하고 분리하는 과정은 본 발명의 방법에 한정되지 않고 당업계에서 통상적으로 수행되는 방법으로 실시가능하다.
- [0026] 본 발명에서, 상기 (a) 단계는 N-2 첨가제, 헤파린, 섬유아세포 성장인자(bFGF), 표피성장인자(EGF), 및 백혈병

억제인자(LIF)가 포함된 인간 신경구 배양 배지(human neurosphere culture media)에서 배양한 다음, 불멸화시킨 세포를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS(fetal bovine serum), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 비유도성 배지에서 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027]

본 발명의 신경줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에서 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 아니며 DMEM 배지일 수 있다. 또한, 상기 기본 배지에는 0.01 ~ 15%(v/v)의 FBS를 포함하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 배양시켰으며, 10% FBS를 사용하여 기형종 형성 억제 효과를 측정하였다.

[0028]

본 발명의 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액은 줄기세포 이식 치료 시, 기형종 형성과 성장을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 개발의 원료로 유용하게 사용될 수 있다. 상기에서는 줄기세포이식 치료 시 기형종 형성 억제제를 중심으로 설명하였으나, 본 발명은 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 기형종 형성 억제 효과가 있는 의약품 및 의약품 조성물로서 공지의 기술을 이용하여 활용할 수 있다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[0029]

[실시예]

[0030]

이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명 할 것이다.

[0031]

실시예 1: 신경줄기세포 배양액 생산

[0032]

태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 불멸화시켜 세포를 얻었다. 14주된 태아 신경세포조직을 0.1% collagenase와 0.1% hyaluronidase 용액을 37°C에서 1시간동안 처리하고 0.05% Trypsin-EDTA를 2-3분 처리하여 단일 세포로 분리한 후, 마커(CD45-/CD133+/CD34-)를 이용하여 FACS로 분리하였다. 이를 N-2 supplements, 0.2mg/ml heparin, 20ng/ml bFGF(basic Fibroblast Growth Factors), 20ng/ml EGF(Epidermal Growth Factor) 및 10ng/ml LIF가 첨가된 human neurosphere culture media에서 10-14일 배양한 후, 형성된 neurospheres에 collagenase를 처리하여 single cells로 분리하였다. 레트로바이러스 매개체(retroviral vector)를 이용하여 v-myc 유전자를 형질도입(transduction)하고 선별(selection)과정을 통해서 얻은 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS(fetal bovine serum), 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하였다(Flax *et al.*, *Nature Biotechnology* vol.16, 1998; Lim *et al.*, *Neuroscience Letters* 435:175-180, 2008). 150mm 배양 접시(culture dish)에 상기 세포 5×10^5 을 분주하고, 배양배지(culture medium) 15ml 첨가 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 80% confluence시에 배양액을 수득하였다. 이때, 배양배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS(fetal bovine serum), 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지를 사용하였고, 배양 후 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 여과하였으며, 신경줄기세포 추출물은 PBS로 두 번 세척한 후 Trypsin-EDTA 과정으로 얻은 세포를 3차 증류수 100ml을 넣고 호모게나이저(homogenizer)로 6,000RPM에서 5분 동안 균질화(homogenization)하고 이를 원심분리(1500rpm, 5분)하여 상등액을 수득하였다.

[0033]

실시예 2: 신경줄기세포 배양액의 배아줄기세포 증식 억제 확인

[0034]

설치류 J1, B6의 배아줄기세포를 6-웰플레이트(6-well plate)에 웰(well)당 1×10^5 개의 세포를 접종하고, 그 다음날 비접착성 세포를 제거하고 신경줄기세포 배양액을 1일, 2일, 3일 동안 각각 처리하였다. 그 후 인산화 완충용액(PBS)으로 씻어준 후, 트립신으로 세포의 분열시간(doubling time)을 측정하였다.

- [0035] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리하지 않은 경우 20시간 정도의 정상적인 분열시간을 보인 반면, 신경줄기세포 배양액을 처리한 경우 분열시간이 증가한 것을 확인하였다(도 2B). 또한 이러한 증식 억제효과는 면역형광염색(Immunofluorescence, IF)를 통해 세포 증식 마커(cell proliferation marker)인 Ki67의 발현은 감소하고 세포사멸마커(cell death marker)인 Caspase 3 활성화 형태의 발현은 증가하는 것으로 다시 한 번 확인하였다(도 4 및 도 5).
- [0036] 2일 동안 8시간 간격으로 신경줄기세포 배양액을 배아줄기세포에 처리한 경우 16~24시간 사이에서 세포의 총 수가 크게 감소한 것을 확인하였고(도 3), 그에 따라 세포 주기(cell cycle) 관련 유전자들의 발현양 변화를 RT-PCR을 통해 확인해본 결과 세포주기의 주요인자인 cyclin D1의 발현량이 차이남을 확인했다(도 6). 이로써, 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액이 cyclin D1의 발현 억제를 통해 배아줄기세포의 증식을 억제시킴을 확인하였다.
- [0037] **실시예 3: 신경줄기세포 배양액이 배아줄기세포 전능성 및 분화에 미치는 영향 분석**
- [0038] 신경줄기세포 배양액을 배아줄기세포에 처리했을 때 세포의 모양이 변화하는 것을 확인하고(도 2A), 배아줄기세포의 전능성과 분화에 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 관련 유전자들의 변화량으로 확인하였다.
- [0039] 그 결과 전능성 마커인 Oct4와 Sox2는 감소했으나, 분화 마커들은 크게 변화하지 않음을 확인하였다(도 7).
- [0040] Oct4는 전능성 마커로 잘 알려져 있지만, 배아줄기세포의 세포주기의 조절인자로도 알려져 있으며(Lee *et al.*, *Biochemical Journal* 426:171-181, 2010), 이를 확인하기 위해 마우스 섬유아세포에 레트로바이러스를 이용해 GFP, Oct4, Sox2를 주입하고 세포 증식 수준의 변화를 확인하였다. Oct4의 유전자를 전달할 수 있는 레트로바이러스를 제작하기 위해, Addgene사의 pMXs 벡터 플라스미드를 사용하였으며, 레트로바이러스 제작용 세포주인 293GPG 세포를 10cm 세포배양 접시에 80%정도의 밀도로 자라도록 배양하고 invitrogen사의 Lipofectamin 2000을 이용하여 293GPG 세포에 해당 플라스미드를 도입하였다. 48시간 이후부터 매일 5ml씩 세포 배양액의 상등액으로 분비된 레트로바이러스를 2주간 모아서 -80℃에서 보관하며 사용하였다. 레트로 바이러스는 2-4μg/ml의 polybrene이 함유된 배지와 혼합하여 4~5시간 세포와 배양하는 것으로 세포를 감염시키고 해당 유전자를 세포 내로 전달하였다.
- [0041] 그 결과, GFP를 주입한 대조군과 비교하여 Oct4를 주입한 세포의 증식이 더 빨리 일어남을 확인했다(도 8). 따라서 실시예 2에서 확인한, 본 발명의 신경줄기세포 배양액이 배아줄기세포의 증식을 억제시키는 효과는 cyclin D1과 Oct4의 발현 감소 때문임을 알 수 있다.
- [0042] **실시예 4: 신경줄기세포 배양액의 신경전구세포 증식 억제 확인**
- [0043] 신경줄기세포 배양액이 신경전구세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 배아줄기세포를 신경전구세포로 분화시켰다. 배아줄기세포에 트립신을 처리하여 단일세포로 분리한 후 embryonic body(EB) 형성을 유도하였다. 이 과정에서 배아줄기세포의 분화를 억제시켜주는 LIF가 없는 배양조건에서 부유상태로 배양시키는 방법을 이용하였다. 구체적으로는 배양중인 배아줄기세포를 PBS를 이용하여 세척한 뒤 0.05% Trypsin-EDTA를 2~3분 처리하여 single cell로 분리한 후 GIBCO사의 DMEM high glucose에 2mM L-글루타민, 10mM 베타-머캅토에탄올, 0.1mM MEM NEAA, 10% FBS, 항생제인 Pen/strep을 첨가한 배지로 세포가 부착되지 않는 박테리아 배양용 배양접시를 이용하여 부유상태로 4일간 배양하여 부유상태의 EB를 확보하였다. 이렇게 확보된 EB를 다시 세포배양용 배양접시에 옮겨서 부착상태로 GIBCO사의 DMEM-F12에 Insulin-Transferrin-Selenium-A(ITSa)를 첨가한 배지에서 10일간 배양하여 신경전구세포로 유도했다. 그 후 새로운 세포배양용 배양접시에 유도된 신경전구세포를 옮겨 DMEM-F12에 N2와 10ng/ml bFGF를 첨가하여 신경전구세포를 확보했다(도 9).
- [0044] 확보된 신경전구세포를 6-웰플레이트(6-well plate)에 웰(well)당 4×10^5 개의 세포를 접종하고, 그 다음날 비접착성 세포를 제거하고 신경줄기세포 배양액을 처리하였다.
- [0045] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 세포의 총 수가 적은 것을 확인하였다(도 10). 또한 실시예 2의 결과와 마찬가지로 Ki67과 cyclin D1의 발현량이 감소했으며, 그 효과는 2일 동안 신경줄기세포 배양액을 처리했을 때 가장 높은 것을 확인했다(도 11 및 12).

[0046]

실시에 5: 신경줄기세포 배양액이 신경전구세포 전능성 및 분화에 미치는 영향 분석

[0047]

신경줄기세포 배양액이 신경전구세포의 분화능력을 감소시키지 않음을 확인하기 위하여, 실시예 4에서 확보된 신경전구세포에 신경줄기세포 배양액을 처리한 후, 신경전구세포를 분화시켰다. 이 과정에서 신경전구세포의 분화를 억제시켜 주는 bFGF가 없는 배양조건에서 7일 동안 배양시키는 방법을 이용하였다(도 13). 면역형광염색(Immunofluorescence, IF)과 RT-PCR를 통하여, 신경전구세포 마커인 Sox1, Nestin과 분화된 신경세포의 마커인 Tuj1의 발현량을 분석하였다.

[0048]

그 결과, 신경전구세포(도 14)와 분화된 신경세포(도 15) 모두에서 신경줄기세포 배양액 처리 유무 사이에 Sox1, Nestin, Tuj1 발현량에는 큰 차이가 없음을 확인하였다. 따라서 신경줄기세포 배양액이 신경전구세포의 분화능력에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0049]

실시에 6: 신경줄기세포 배양액의 배아줄기세포에 의한 기형종 형성 및 성장 억제 효과 확인

[0050]

5주령 BALB/C-nu 암컷 마우스(female mice)를 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 7일 동안 순유 과정을 거친 후 기형종을 형성시키기 위해 배아줄기세포를 피하에 넣어주었다(subcutaneous injection).

[0051]

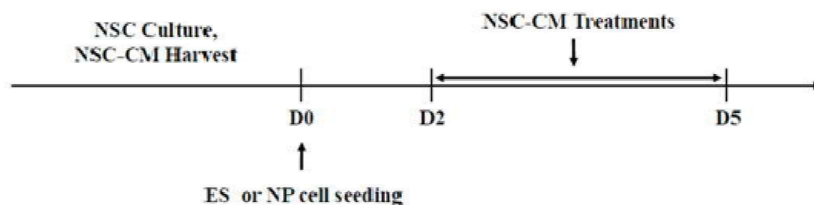
신경줄기세포 배양액이 기형종 형성과 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 배아줄기세포를 주입한 다음 날부터 신경줄기세포 배양액을 처리한 그룹(도 16)과 기형종을 형성시킨 후 신경줄기세포 배양액을 처리한 그룹(도 18)으로 각 8마리씩 나누었다. 대조군으로는 complete culture media(DMEM +10% FBS)를 사용하였으며, 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액은 1일 1회 처리하였다. 배아줄기세포를 넣고 21일 후 마우스를 희생(sacrifice)시키고 기형종을 분리하여 4% 포르말린에 고정하고, 조직의 파라핀을 제작 후 3 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙이고 파라핀 제거 및 재수화 과정(deparaffinize and rehydrate)을 실시하였다. 그 후 Haematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 통해 3개의 배양을 모두 가지는 배아줄기세포에서 형성된 기형종임을 확인했다(도 17B 및 19B).

[0052]

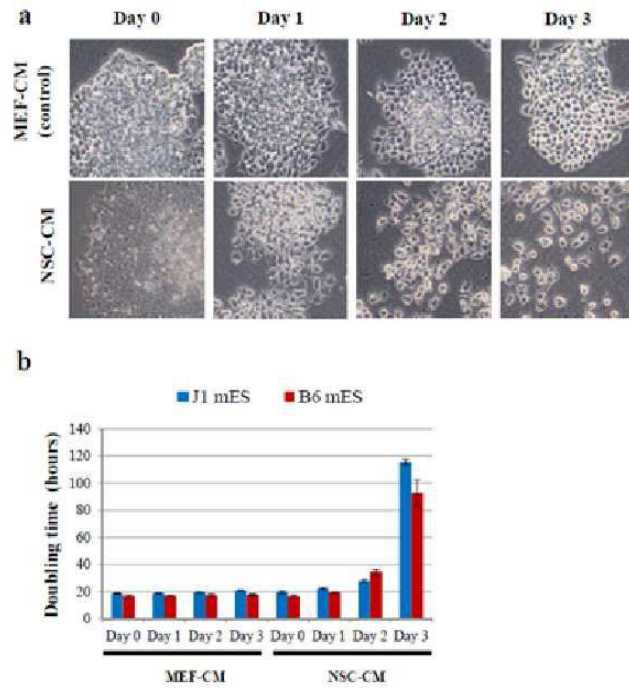
기형종의 크기를 확인한 결과, 배아줄기세포 주입 다음 날부터 신경줄기세포 배양액을 넣어준 그룹에서 6마리, 기형종 형성시킨 후 신경줄기세포 배양액을 넣어준 그룹에서 4마리가 신경줄기세포 배양액을 처리한 경우, 기형종 크기가 더 작은 것을 확인했다(도 17A 및 19A). 특히 전자 그룹 2마리에서 신경줄기세포 배양액을 처리하였을 때 기형종이 형성되지 않은 것을 확인하였다. 따라서, 신경줄기세포 배양액이 배아줄기세포에 의한 기형종 형성 및 성장을 억제함을 알 수 있다.

도면

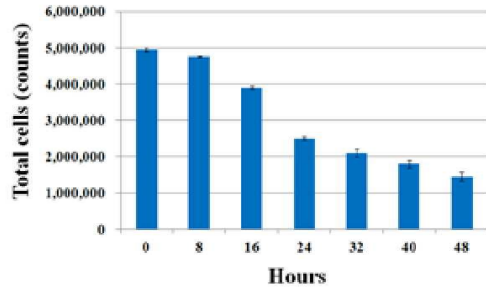
도면1



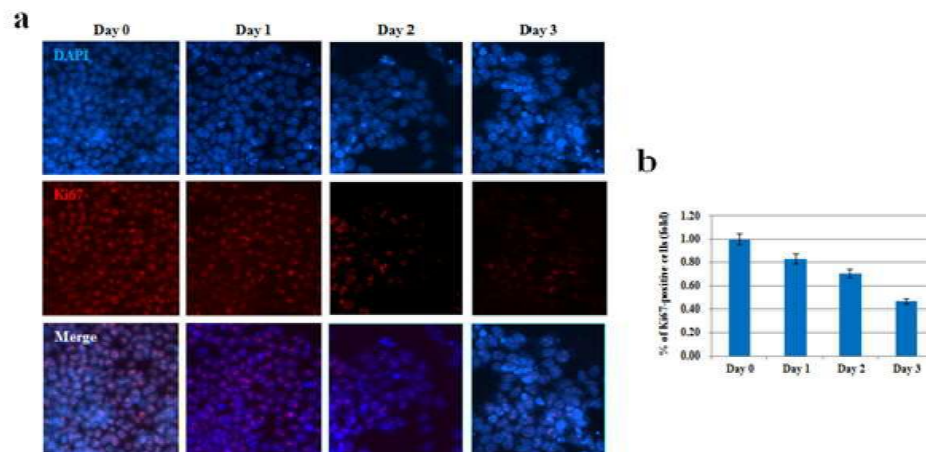
도면2



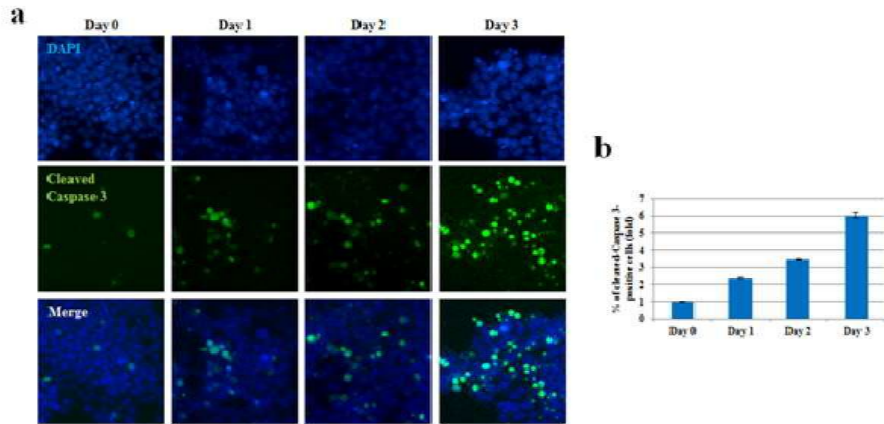
도면3



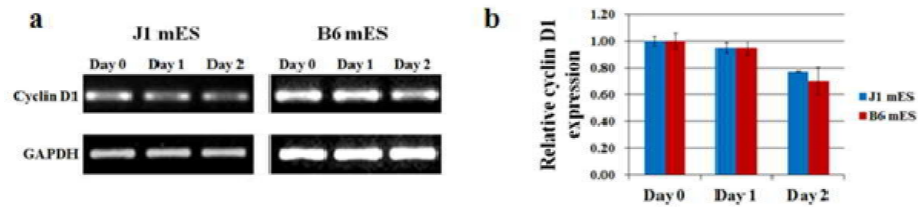
도면4



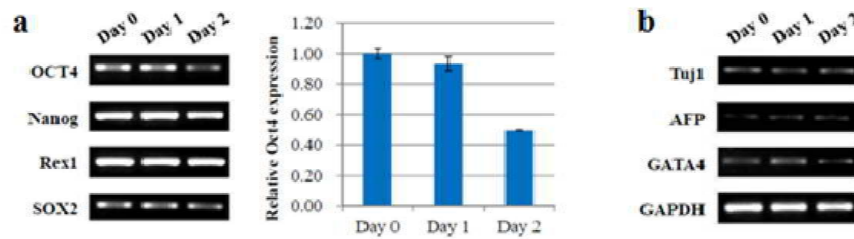
도면5



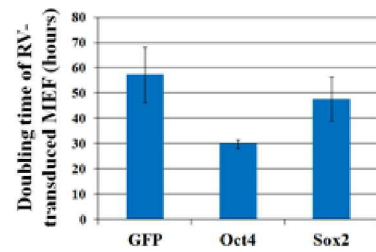
도면6



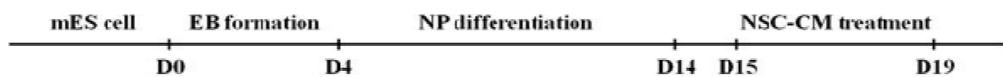
도면7



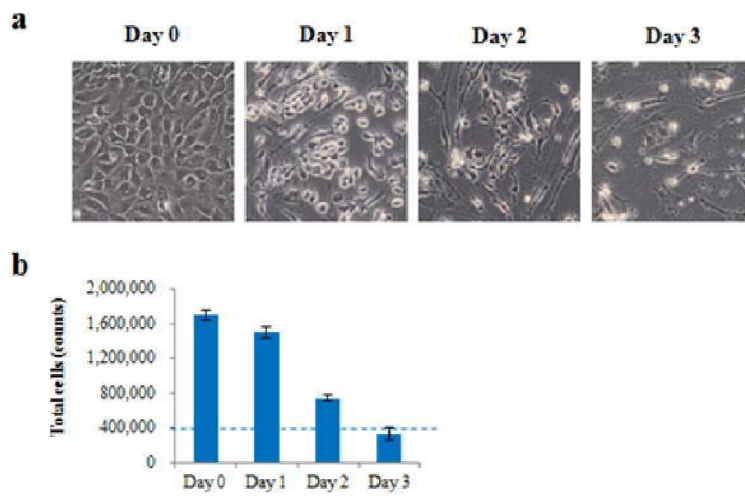
도면8



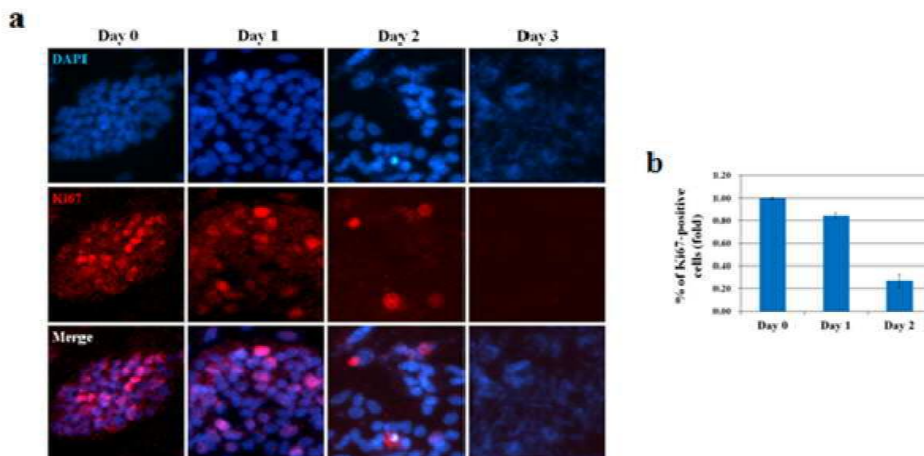
도면9



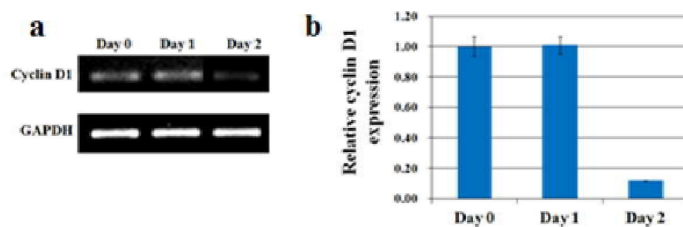
도면10



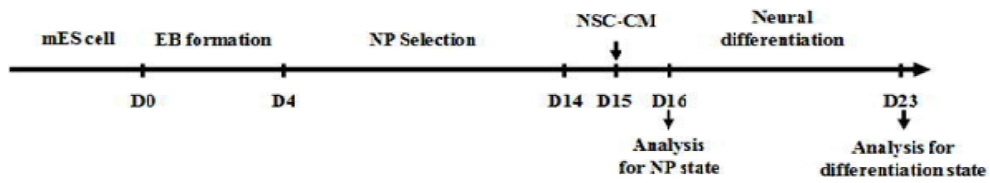
도면11



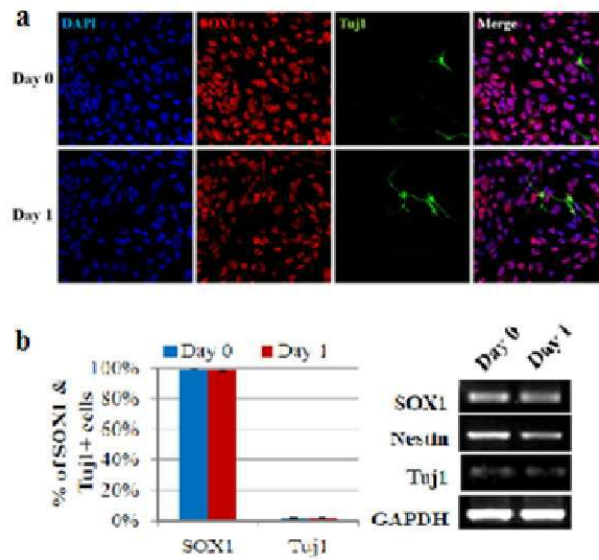
도면12



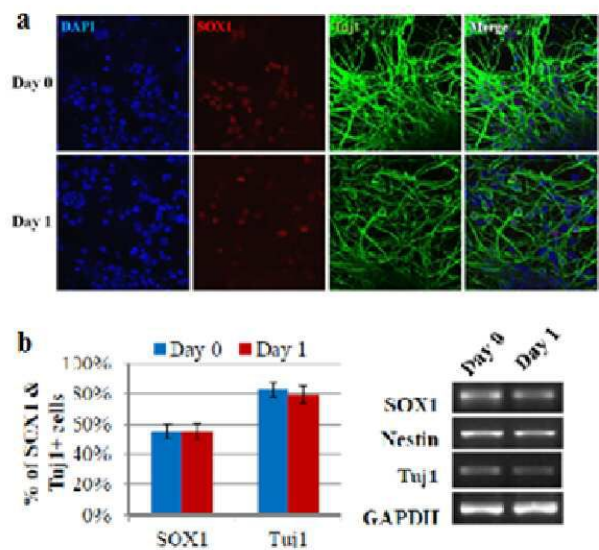
도면13



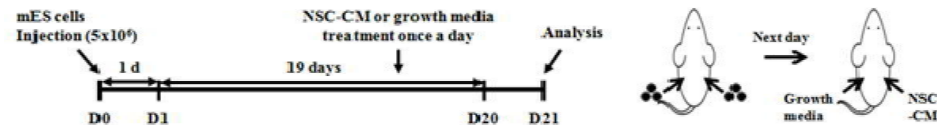
도면14



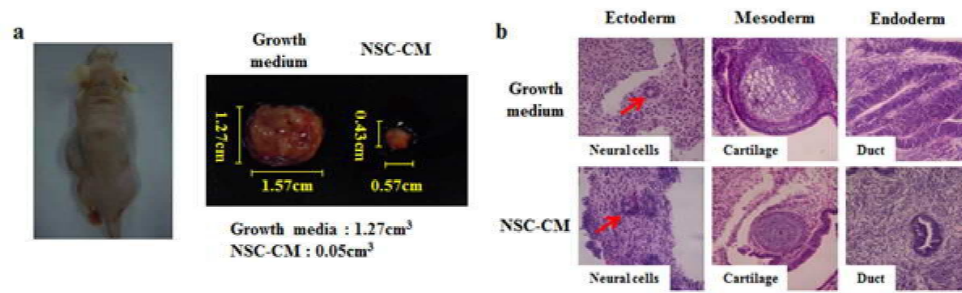
도면15



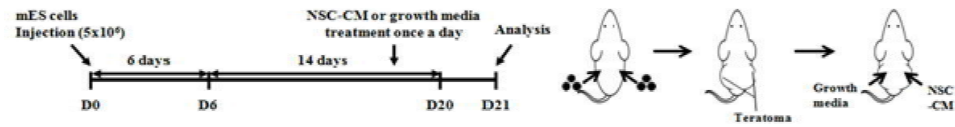
도면16



도면17



도면18



도면19

