

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0023078 (43) 공개일자 2008년03월12일
(51) Int. Cl. <i>C12N 5/08</i> (2006.01) <i>C12N 5/06</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2006-0110269 (22) 출원일자 2006년11월09일 심사청구일자 2006년11월09일 (30) 우선권주장 60824907 2006년09월08일 미국(US)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 김종훈 서울시 용산구 이태원2동 이태원 주공아파트 108동 301호 김병각 서울시 송파구 석촌동 12-12 301호 (74) 대리인 이문섭, 양부현, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 11 항

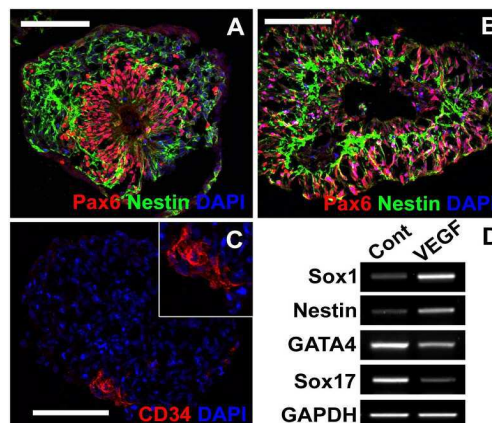
(54) 혈관내피 성장인자를 이용한 인간배아 줄기세포로부터도파민 신경세포로의 분화 촉진 방법

(57) 요약

본 발명은 인간배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (VEGF)로 처리하여 신경외배엽이 증가된 배아체로 유도함으로써 신경세포로의 분화를 촉진시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 인간배아 줄기세포를 혈관내피 성장인자를 이용하여 신경외배엽이 증가된 배아체로 유도함으로써, 중배엽, 내배엽으로부터 유래되는 심근세포, 근육세포, 간세포, 조혈세포 등 각종의 세포로 분화할 가능성을 원천적으로 봉쇄하여 세포치료를 위한 순도 높은 신경세포군으로의 분화효율을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

인간배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (VEGF)로 처리하여 신경외배엽이 증가된 배아체로 유도함으로써 신경세포로의 분화를 촉진시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 인간배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (VEGF)로 처리하여 신경외배엽이 증가된 배아체를 유도하는 1 단계, 신경외배엽이 증가된 배아체를 조직배양접시에 부착시켜 배양하여 신경전구세포로 유도하는 2 단계, 유도된 신경전구세포를 조직배양접시에서 떼어내고 재부착시켜 배양하여 순도를 높이고 그 밀도를 균일하게 유지하는 3 단계, 및 고순도의 신경전구세포를 도파민 신경세포로 최종분화하는 4 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 1 단계에서 배아체를 7 ~ 9일 동안 혈관내피 성장인자 (VEGF)로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 1 단계에서 혈관내피 성장인자 (VEGF)의 처리농도는 40 ~ 60 ng/ml인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 기간 동안 무혈청으로 배아체를 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 2 단계에서 신경외배엽이 증가된 배아체는 세포외 기질인 파이프록틴 (fibronectin)을 20 ~ 30 $\mu\text{g/ml}$ 첨가하여 접착력을 강화시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 2 단계에서 Nestin을 발현하는 세포를 증가시키기 위하여 ITS 배양액을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 2항에 있어서, 상기 3 단계에서 재부착하는 세포의 밀도를 $1 \times 10^4 \sim 10^6 \text{ cells/cm}^2$ 로 유지하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 2항에 있어서, 상기 3 단계에서 재부착하는 조직배양접시를 poly-l-ornithine로 코팅하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 2항에 있어서, 상기 3 단계에서 재부착된 세포를 10 ~ 30 ng/ml 기질섬유아세포 성장인자 (bFGF)가 첨가된 N2 배양액에서 5 ~ 7일간 증식시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 2항에 있어서, 상기 4 단계에서 신경세포로의 최종분화는 신경전구세포를 bFGF 제거된 N2 배양액에서 5 ~ 7일간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 인간배아 줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 촉진 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 인간 배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)로 처리하여 신경외배엽이 증가된 배아체로 유도함으로써 도파민 신경세포로의 분화를 촉진시키는 방법에 관한 것이다.
- <7> 본 발명은 배아줄기세포를 높은 효율로 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것으로, 전분화능을 가진 배아 줄기세포로 배아체를 형성하여 초기분화를 유도하는 과정에서 신경보호와 신경형성에 관련이 있는 혈관내피세포를 처리하여 신경세포로 분화할 운명을 가진 외배엽성 세포를 증가시킴으로써 최종적으로 신경세포분화 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- <8> 줄기세포란 무제한적으로 분열하며 미분화 상태를 유지하고 알맞은 조건과 신호를 받으면 유기체를 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 즉 줄기세포는 심근세포 표피세포 신경세포의 형태학적인 특성을 가지며 특화된 기능을 수행하는 성체세포로 분화가 가능한 세포를 칭한다. 줄기세포는 이러한 자가 재생 능력과 분화능에 힘입어 세포치료와 발생생물학적 연구의 차세대 주자로 간주된다. 종래의 세포이식에 의한 치료는 사실상 치료용 세포의 확보가 용이하지 않고 확보 후에도 이를 유지 증식하여 치료에 필요한 물량을 제공하기에는 역부족이었던 발명 줄기세포는 무한 증식한다는 점에서 각광받고 있다. 같은 맥락에서 좋은 생물학 연구 자료로써 그 분화과정이 실제 인체 내의 발생학적 과정을 그대로 반영하고 있다.
- <9> 파킨슨씨병, 알츠하이머병 및 척추 손상질환은 신경계내의 특정 신경세포의 퇴화 혹은 손상에 의해 야기되는 장애로써 한 번 손상된 신경조직은 자발적으로 재건되지 못한다는 점에서 현재로서는 근본적인 치료가 불가능하고 약물에 의존한 치료법이 주를 이루고 있다. 이에 줄기세포를 신경으로 분화하여 이식하는 기법은 퇴화된 조직을 대체하고 본래 존재하는 신경조직과 새로운 시냅스를 형성하여 신경신호를 전달하는 기능을 수행하도록 하여 각종 신경퇴행성질환의 근간이 되는 치료 대책을 제시한다.
- <10> 본 발명은 무한증식과 적절한 자극하에서 특정세포로 분화할 수 있는 장점을 가진 줄기세포를 통하여 세포대체 치료에 필요한 신경세포를 분화하는 기술로써 세포대체치료를 위한 세포의 원활한 공급이라는 측면에서 신경퇴행성질환의 치료에 새로운 패러다임을 형성케 할 기술 분야이다.
- <11> 이미 신경퇴행성질환을 치료하기위한 세포대체치료는 행해진 바 있다. 그 예로 사산한 인간 태아의 중뇌 조직을 환자에 이식하였을 때 증상에 호전을 보였으나 이러한 기술은 윤리적으로 많은 논란을 야기하고 사산한 인간 태아의 중뇌조직의 확보와 세포치료에 필요한 물량의 수준까지 증식하는 것이 거의 불가능하기 때문에 현실적으로 많은 신경퇴행성질환 환자를 치료하기는 불가능하다고 할 수 있다. 이에 원하는 만큼 in vitro에서 증식하여 세포를 공급할 수 있는 줄기세포 유래 신경세포는 세포대체치료에 근간이 되는 기술이라 할 수 있다. 이러한 맥락에서 이미 여러 줄기세포를 신경세포로 분화하는 기술이 제시되었지만 그 분화효율이 낮고 세포이식에서 불순물이라 할 수 있는 신경세포이외의 다른 세포로의 분화도 증진이 됨으로 선행 연구의 대안이 되지 못했다. 본 발명은 혈관내피성장인자를 통해 외배엽이 증가된 배아체를 유도함으로써 심근세포, 근육세포, 간세포, 조혈세포 등 각종의 중배엽, 내배엽으로부터 유래되는 세포로 분화할 가능성을 원천적으로 봉쇄함으로써, 분화효율을 높여 세포치료를 위한 순도 높은 신경세포군을 분화하는데 그 특징이 있다.
- <12> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 인간배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)로 처리할 경우, 신경외배엽이 증가된 배아체로 유도하고 그에 따라 도파민 신경세포로의 최종분화를 촉진시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <13> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 퇴행성 신경질환에 대한 세포치료를 위한 안정된 신경세포의 공급을 위하여 인간배아 줄기세포를 높은 효율로 신경세포로 분화시킬 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <14> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인간배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (VEGF)로 처리하여 신경외배엽이 증가된 배아체로 유도함으로써 신경세포로의 분화를 촉진시키는 방법을 제공한다.
- <15> 본 발명에 있어서, 상기 분화 촉진 방법은 인간배아 줄기세포로부터 형성된 배아체를 혈관내피 성장인자 (VEGF)로 처리하여 신경외배엽이 증가된 배아체를 유도하는 1 단계, 신경외배엽이 증가된 배아체를 조직배양접시에 부착시켜 배양하여 신경전구세포로 유도하는 2 단계, 유도된 신경전구세포를 조직배양접시에서 떼어내고 재부착시켜 배양하여 순도를 높이고 그 밀도를 균일하게 유지하는 3 단계, 및 고순도의 신경전구세포를 도파민 신경세포로 최종분화하는 4 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <16> 본 발명에 있어서, 상기 1 단계에서 배아체를 6 ~ 10일 동안 혈관내피 성장인자 VEGF로 처리하는 것이 좋으나, 바람직하게는 7 ~ 9일 동안 VEGF로 처리하는 것을 특징으로 한다.
- <17> 본 발명에 있어서, 상기 1 단계에서 혈관내피 성장인자의 처리농도 (VEGF)는 10 ~ 100 ng/ml인 것이 좋으나, 바람직하게는 40 ~ 60 ng/ml의 VEGF를 사용하여 처리하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서 사용된 VEGF 50 ng/ml은 PBS와 0.1 % BSA를 섞은 혼합용액에 혈관내피 성장인자를 녹여 배양액속의 최종 존재농도가 50 ng/ml로 되도록 한 것이다.
- <18> 본 발명에 있어서, 상기 VEGF 처리기간 동안 무혈청으로 배아체를 배양하는 것이 바람직하다. 최근의 연구에서 혈청내에 배아줄기세포를 혈관세포 혹은 조혈세포로 분화할 주요한 요소가 들어있다는 보고가 있었기 때문에, 본 발명에서는 무혈청 배양법을 이용하여 VEGF의 혈관신생의 효과를 줄이고 신경형성의 효과를 극대화시켰다.
- <19> 본 발명에 있어서, 상기 2 단계에서 신경외배엽이 증가된 배아체는 세포외 기질인 파이버넥틴 (fibronectin)을 5 ~ 50 μ g/ml 첨가하여 접착력을 강화시키는 것이 좋으나, 바람직하게는 20 ~ 30 μ g/ml의 파이버넥틴을 첨가하는 것을 특징으로 한다. 상기 배아체는 부착하여 배양할 시에는 Falcon 3002 tissue culture dish를 사용하는데, tissue culture dish에 세포를 배양할 시에는 별도의 코팅을 하지 않고도 세포를 부착하여 배양할 수 있다. 다만 지지기반을 확실히 하기 위하여 fibronectin을 첨가한다.
- <20> 본 발명에 있어서, 상기 2 단계에서 Nestin을 발현하는 세포를 증가시키기 위하여 ITS 배양액을 사용하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다. 여기서, ITS 배양액은 insulin, transferrin, selenium을 포함하는 것으로 Nestin을 발현하는 세포 즉, 신경전구세포를 증식시키기 위해서 사용되는 배양액을 말한다.
- <21> 본 발명에 있어서, 상기 3 단계에서 재부착하는 세포의 밀도를 $1 \times 10^4 \sim 10^6$ cells/cm²로 유지하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다. 상기 세포밀도 범위는 여러 밀도로 실험을 하였을 때 가장 신경세포의 분화가 활발한 농도이며, 이들 범위외에서는 분화가 안되거나 사멸하는 경우가 발생한다. 세포를 배양접시에 부착하여 증식시킬 때 세포의 포화정도에 따라 세포간 신호전달에 의하여 원하지 않는 방향으로 분화가 일어나거나 사멸할 수 있기 때문에 본 발명에서는 이러한 점들을 고려하여 적절한 세포 밀도를 찾아낸 것이다.
- <22> 본 발명에 있어서, 상기 3 단계에서 재부착하는 조직배양접시를 poly-l-ornithine로 코팅하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다. 본 발명의 Poly-l-ornithine은 extracellular matrix로써 세포가 붙어서 신경세포로 분화되는데 있어 영향을 주는 신호를 유발하는 역할을 한다.
- <23> 본 발명에 있어서, 상기 3 단계에서 재부착된 세포를 5 ~ 50 ng/ml 기질섬유아세포 성장인자 (bFGF)가 첨가된 N2 배양액에서 증식시키는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 재부착된 세포를 10 ~ 30 ng/ml bFGF 첨가된 N2 배양액에서 5 ~ 7일간 증식시키는 것을 특징으로 한다.
- <24> 본 발명에 있어서, 상기 4 단계에서 신경세포로의 최종분화는 신경전구세포를 bFGF 제거된 N2 배양액에서 5 ~ 7일간 배양하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다. bFGF가 첨가된 N2 배양액에서 배아체는 신경전구세포로 분화되고 증식되며, 이러한 신경전구세포를 본 발명의 최종 목적인 신경세포로 분화하기 위해서는 bFGF를 제거한 상태로 N2 배양액에서 5 ~ 7일간 배양하여야 한다.
- <25> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 혈관내피 성장인자 (VEGF)를 유효성분으로 함유하는 신경세포 분화촉진용 조성물을 제공한다.
- <26> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<27> 실시예 1. 인간 배아 줄기세포의 배양

<28> 신경세포분화를 위한 배아줄기세포의 안정적인 공급을 위하여 인간 배아 줄기세포주 Miz-hES4와 Miz-hES를 배양하였다. 배양을 위한 배지에는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 20 % knockout serum replacement와 0.1 mM nonessential amino acid, 0.1 mM mercaptoethanol, 0.5 U/ml penicillin-streptomycin, 0.1 mM β -mercaptoethanol에 배아줄기세포의 미분화유지에 중요한 역할을 하는 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF)가 첨가되었다. 배양액은 하루에 한번 교체 되었고 약 5~7일에 한번 collagenase type IV (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용한 계대배양을 통하여 새로운 feeder layer를 제공하고 배아줄기세포의 colony 크기를 일정하게 유지하여 배양 접시 내 배아줄기세포의 밀도를 일정수준으로 유지하도록 하였다. collagenase type IV가 미분화유지에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 가능성을 감안하여 배아줄기세포의 일부는 micro-dissecting 기법을 이용한 계대 배양으로 미분화 상태를 유지하도록 하였다.

<29> 이렇게 배양된 줄기세포는 여러 계대를 거친 후에도 미분화 상태를 유지함을 확인하였다. 우선 형태학적 측면에서 물리적, 영양적으로 줄기세포를 지지하는 feeder layer에 의하여 둥근 원형의 colony를 형성하고 feeder layer와 colony가 만나는 margin 부분이 선명하게 구분됨을 보임으로써 미분화 상태의 배아줄기세포 colony의 형태학적 특성을 잘 나타내었다. 또 개개의 줄기세포는 상대적으로 핵이 크고 둥근 전형적인 줄기세포의 형태학적 특성을 잘 나타내고 있다 (도 1의 A). 또, 전분화능의 표지 인자가 되는 전사인자 (transcription factor) 인 SSEA4, Nanog, Oct4가 배아줄기세포 colony내 모든 세포의 핵부분에서 잘 발현됨을 확인 할 수 있다 (도 1의 C). 이러한 배아줄기세포의 전능성 검증에 이용되는 또 다른 표지인자인 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 결과 거의 모든 배아줄기세포에서 활성이 나타난 것을 볼 수 있다 (도 1의 B).

<30> 실시예 2. 내,외,중배엽을 모두 소유하는 삼배엽성 배아체로의 분화능력 조사

<31> 배아줄기세포의 전능성을 확인하기 위하여 배아체가 삼배엽성으로 분화할 수 있는지를 조사하였다. 성체의 모든 조직은 배아형성과정의 한 단계인 낭배(gastrulation) 형성 단계에서 생성되는 외배엽, 중배엽, 내배엽으로부터 유래됨으로 배아줄기세포가 분화의 초기단계에 삼배엽을 가진 배아체로 분화 한다는 것은 전분화능을 확인하는 동시에 특정세포로의 분화를 유도함에 있어서 첫 단계가 된다.

<32> 본 발명에서는 전능성과 자가 증식의 능력이 확인된 배아줄기세포로부터 배아체를 형성하기 위하여 적절한 크기로 자란 배아줄기세포 colony를 collagenase type IV (2mg/ml)(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 feeder layer로부터 분리한다. 이렇게 분리된 colony를 다시 pipette를 이용하여 약 50 ~ 100개의 세포로 구성된 세포 집합체(cell aggregate)로 부수어 준다. 적절한 크기로 부수어진 세포 집합체는 섬유아세포 성장인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF)(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 제외한 배아줄기세포 배양액으로 suspension culture dish내에서 부유 상태로 약 8일간 배양하며 배아체를 형성한다. 형성된 배아체는 4% Paraformaldehyde 용액으로 고정되고, 이를 냉동 절편화하여 그 초기 분화 양상을 분석하였다.

<33> 8일간 배양된 세포 집합체는 배아체의 전형적인 형태학적 특성을 지닌 구형의 배아체를 형성하였다. 형성된 배아체를 절편화하여 면역형광염색으로 분석한 결과 외배엽, 중배엽, 내배엽의 성질을 나타내는 각각의 세포로 초기분화 하였음을 확인하였고 이를 통해 본 연구에서 사용하고 있는 배아줄기세포가 전능성을 가지고 있다는 점을 재차 확인하고, 나아가 특정한 한 종류의 세포로 분화를 유도함에 있어서 배아체를 통한 초기분화유도가 다양한 가능성을 가진다는 점을 확인하였다. 내배엽을 대표하는 표지인자인 GATA4는 배아체 내부의 일부지역에 집중하여 분포한다 (도 2의 B, C). 또 다른 내배엽의 표지인자인 AFP와 Sox17 역시 비슷한 양상을 보이며 발현하고 있다 (도 2의 B, C). 중배엽의 표지인자인 brachyury 역시 배아체내에서 발현함을 볼 수 있다 (도 2의 D). 분화가 진행됨에 따라 신경세포로 분화될 외배엽성 세포들은 Pax6, nestin 등의 신경외배엽의 표지인자로 확인할 수 있다. 이들 외배엽성 세포는 배아체의 표면 바로 아래에서 주로 분포하며 배아체 전반에서 신경 로제트의 형태학적 특성을 보이며 분포함을 확인할 수 있다 (도 2의 E ~ I).

<34> 실시예 3. 혈관내피성장인자에 의해 외배엽성 세포가 증가된 배아체의 형성과 그에 따른 신경전구세포 분화효율의 증대

<35> 기관형성의 단계에서 신경계와 혈관계는 배엽조직으로부터 제일 먼저 발달하는 기관이고 이 기관들은 배발생의 과정중 서로의 분화에 상호적으로 참여하는 것으로 알려져 있다. 신경형성과 혈관형성의 상호연관성으로 부터 혈관신생에 관련된 혈관내피성장인자가 배아줄기세포의 배아체 형성단계에서 신경세포로의 분화에 영향을 줄 것을 가정 본 발명에 착수하였다. 인간배아줄기세포로부터 형성된 배아체는 8일 동안 혈관내피성장인자의 존재 하에 배양되었다. 그 결과 혈관내피 성장인자를 처리 하지 않은 대조군에 비해 신경외배엽의 표지인자인 Pax6와

Nestin의 발현 면적이 증가하였음을 확인하였다 (도 3의 A, B). 그러나 조혈모전구세포의 표지인자인 CD34는 증가하지 않고 소량 존재함을 확인하여 배아체 형성시 혈관내피성장인자의 처리는 혈관신생이 아닌 신경형성에 관련 있음을 확인하였다 (도 3의 C). 이와 같은 결과는 RT-PCR 분석으로 다시 한 번 확인되었다. 혈관내피성장인자에 의하여 또 다른 신경외배엽의 표지인자인 Sox1은 증가하였으며 중, 내배엽의 표지인자는 감소함을 알 수 있다 (도 3의 D).

<36> 혈관내피인자를 처리한 배아체가 계속적으로 어떻게 분화하는 지를 확인하기위해 8일간 배양된 배아체를 조직배양접시에 부착시켜 fibronectin (Sigma, St. Louis, MO)이 첨가된 ITS배지 내에서 배양하였다. 배양 시작 8일 후 혈관내피인자를 처리하지 않은 대조군 배아체로부터 이동하여 나온 세포들에 비하여 혈관내피인자를 처리한 배아체로부터 이동하여 나온 세포들은 훨씬 많은 수의 신경 로제트를 형성하였고 (도 4의 C), 형성된 로제트는 Pax6와 nestin을 잘 발현하며 형태학적으로 확연히 구분되었다 (도 4의 A, B, D). 또 midbrain과 hindbrain의 형성에 관련되는 전사인자인 Pax2가 신경 로제트 내에서 잘 발현됨을 보임으로써 배아체로부터 이동하여 나온 신경전구세포의 대부분이 중뇌의 도파민 신경세포로 분화 될 것임을 암시한다 (도 4의 E).

<37> 좀 더 순도 높은 신경전구세포를 얻기 위하여 트립신을 이용하여 신경 로제트를 해체하여 Poly-l-ornithine (PLO)(15 μ g/Sigma)이 코팅된 배양접시에 부착하고 N2 배양액에 bFGF (20 ng/ml)을 첨가하여 배양하였다. 배양 시작 후 약 6일 동안 부착된 세포들은 빠르게 번식하여 결국 대부분의 세포가 신경전구세포의 표지인자인 Nestin을 발현하게 되었다 (도 4의 F).

<38> 실시예 4. 신경세포로의 최종분화

<39> 증가된 신경전구세포를 신경세포로 최종적으로 분화하기 위하여 신경전구세포는 N2 배양액내에서 bFGF를 제거한 상태로 약 6일간 배양되었다 (도 5의 A). 분화가 종결된 후 신경세포의 표지인자인 TuJ1으로 확인한 결과 대조군 보다 ($43.9 \pm 5.2 \%$, n=5)(도 5의 B), 혈관내피성장인자로 외배엽이 유도된 배아체로부터 분화한 신경세포의 양이 증가함을 볼 수 있다 ($64.9 \pm 3.4 \%$, n=5)(도 5의 C). 반면에 신경세포가 아닌 신경 교세포나 내피 세포 등은 극소량 발현되는 것이 확인되었다(도 5의 D, E). 특히 최근의 연구에서 혈청내에 배아줄기세포를 혈관 세포 혹은 조혈세포로 분화할 중배엽성 세포로 유도하는 중요한 요소가 들어있다는 보고가 있었기 때문에 본 발명에서는 무혈청 배양법을 이용하여 혈관내피성장인자의 혈관신생성 효과를 줄이고 신경형성의 효과를 극대화시켰다.

<40> 혈관내피 성장인자에 의해 유도된 배아체로부터 분화된 신경세포를 규정짓기 위하여 분석한 결과 분화된 전체 신경세포의 약 $57.14 \pm 3.0 \%$ 가 도파민 신경세포임이 밝혀졌고 다른 종류의 신경세포들은 1 %미만으로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이에 따른 RT-PCR분석 결과 역시 분화된 신경세포에서 중뇌의 도파민 신경세포 형성에 관련되는 여러 유전자들이 발현됨을 알 수 있다.

발명의 효과

<41> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 혈관내피 성장인자를 이용하여 인간배아 줄기세포로부터 신경 외배엽성 세포가 증가된 배아체를 형성할 수 있고, 또한 이러한 배아체로부터 신경세포로의 분화효율을 높임으로써, 중뇌 (midbrain) 도파민성신경세포의 파괴로 발생하는 파킨슨씨병 (Parkinson's disease) 등의 신경퇴행성 질환의 세포치료를 위한 세포공급을 원활히 할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 여러 계대를 거쳐서도 미분화상태를 유지하고 Oct4, Nanog, SSEA4, Alkaline phosphatase 등의 대표적인 미분화 배아줄기세포의 표지인자를 발현하며, 군락을 형성하고 있는 전형적인 배아줄기세포의 사진이다. Scale bar는 100 μ m이다.

<2> 도 2는 본 발명에 사용된 미분화 배아줄기세포는 배아체를 형성하고 초기분화를 유도하여 배엽성세포로 분화될 때 외배엽, 중배엽, 내배엽으로 모두 분화될 수 있음을 증명하는 면역염색사진과 중합효소연쇄반응에 대한 결과이다. Scale bar는 100 μ m이다.

<3> 도 3은 배아체의 형성 단계에서 혈관내피성장인자를 처리함으로써, 분화의 최종 목적세포인 신경세포로 분화될 수 있는 신경외배엽성 세포의 표지인자 Pax6와 Nestin의 발현이 배아체 내에서 증가함을 보여주는 면역염색사진과 중합효소연쇄반응에 대한 결과이다. Scale bar는 100 μ m이다.

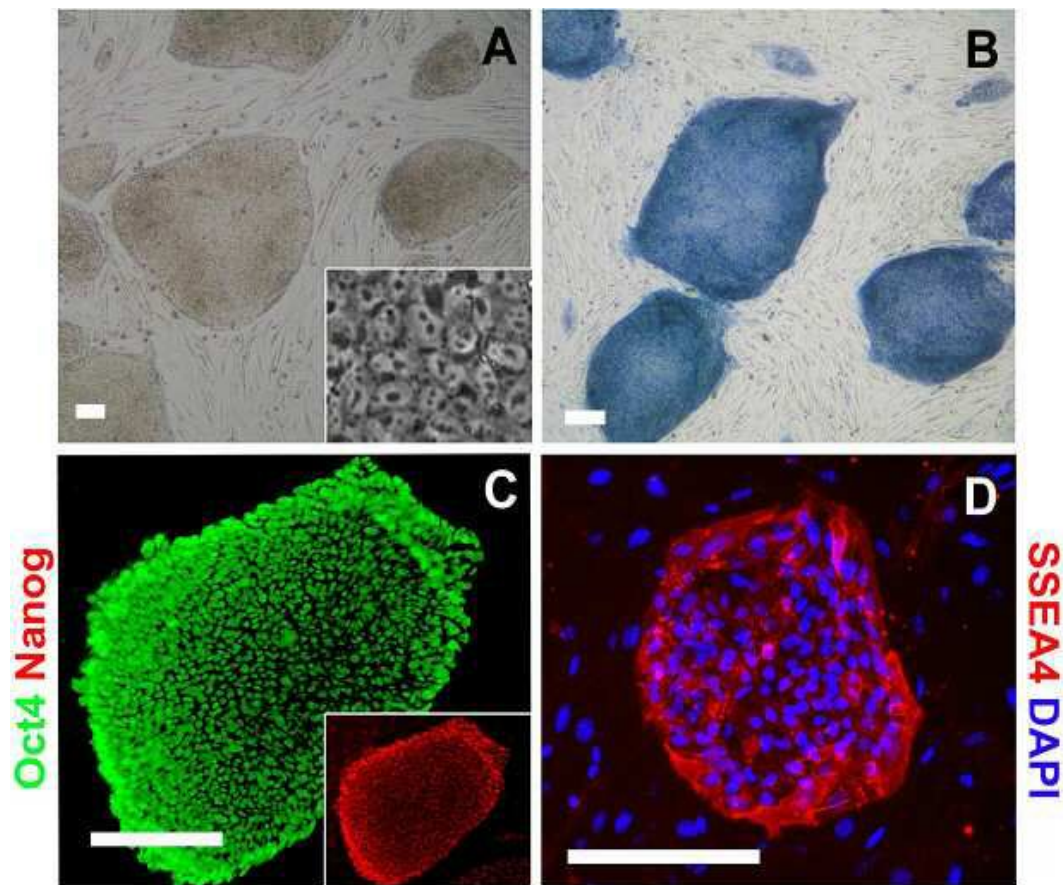
<4> 도 4는 배아체를 해체하여 배양할시 신경외피세포 (neuroepithelial cell)의 전형적인 형태학적 특성인 신경 로

제트를 형성하고 형성된 신경 로제트는 신경외피세포의 표지인자인 Pax6와 Nestin이 잘 발현되며 혈관내피성장인자를 배아체 상태에서 처리하였을 때 그 수가 더 증가함을 보이는 사진이다. Scale bar는 100 μm (A, B, C, D), 50 μm (F)이다.

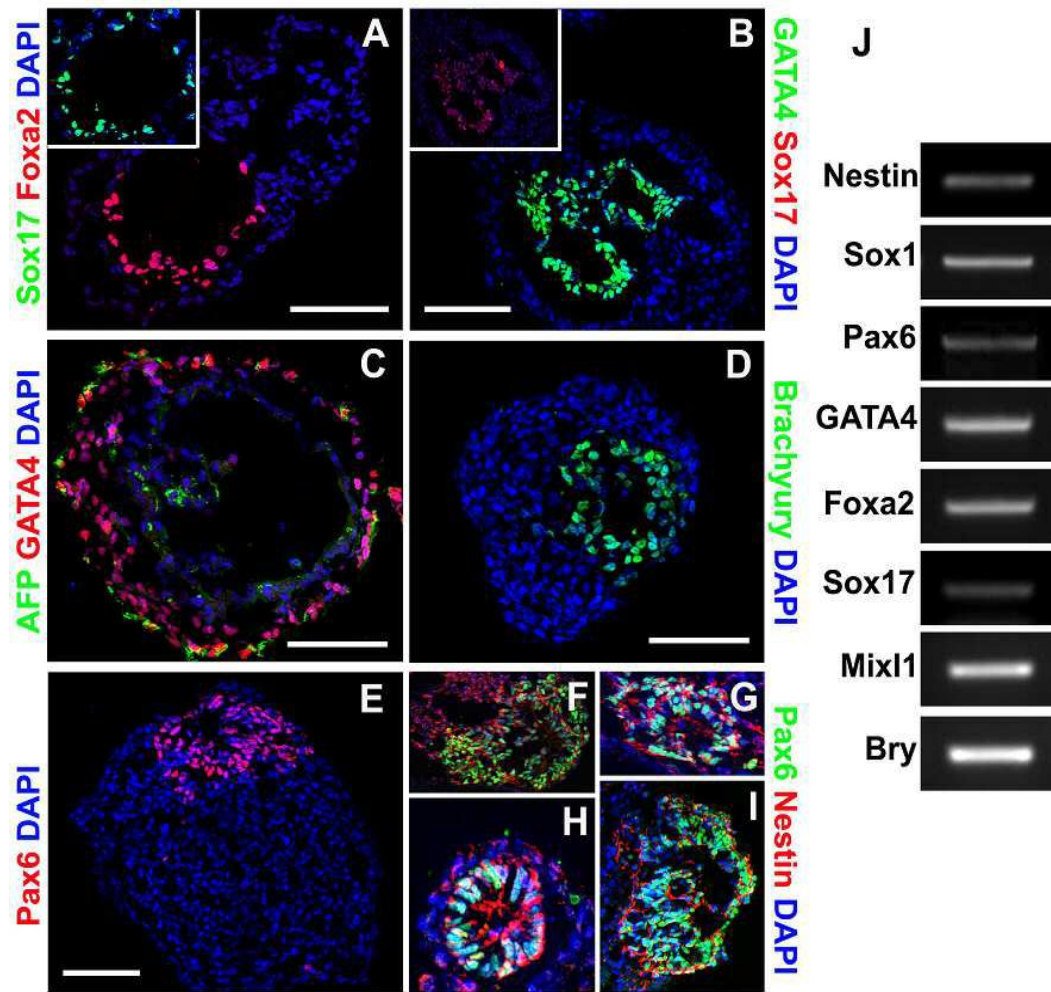
<5> 도 5는 전체적인 분화의 과정과 그에 따라 분화된 신경세포의 수가 배아체 단계에서 혈관내피성장인자를 처리함으로써 증가하였음을 보이고 그 대부분이 중뇌의 도파민 신경세포이며 그 이외의 가바 (GABA) 신경세포나 성상세포, 또 내피세포와 같은 신경세포가 아닌 세포들은 거의 발현되지 않았음을 보여주는 사진이다. Scale bar는 50 μm 이다.

도면

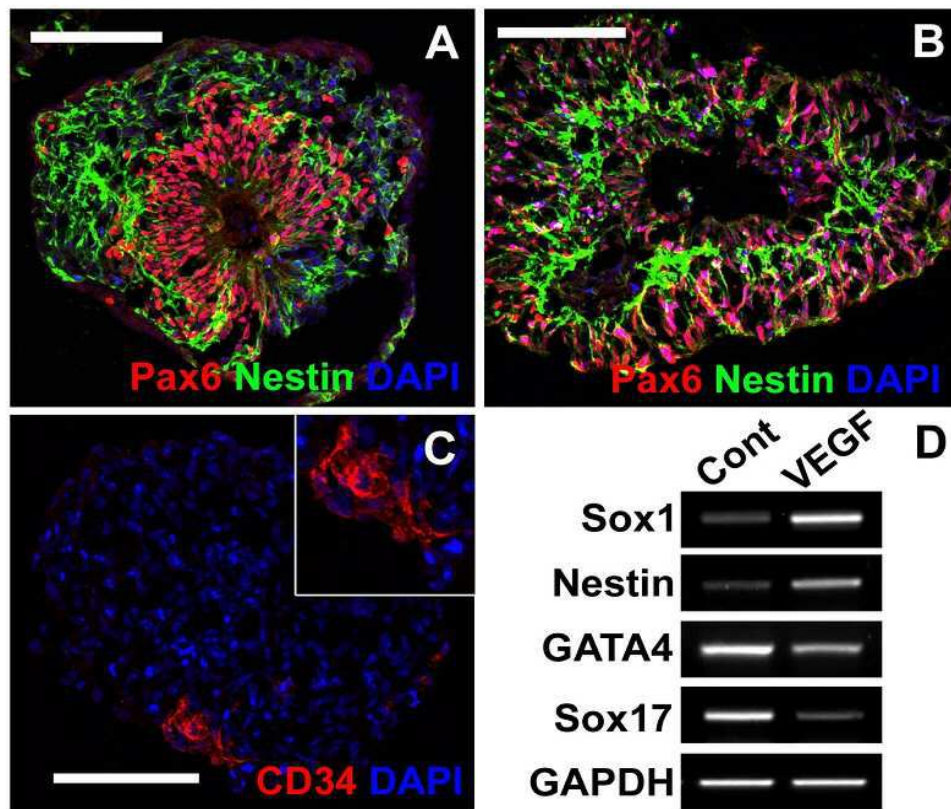
도면1



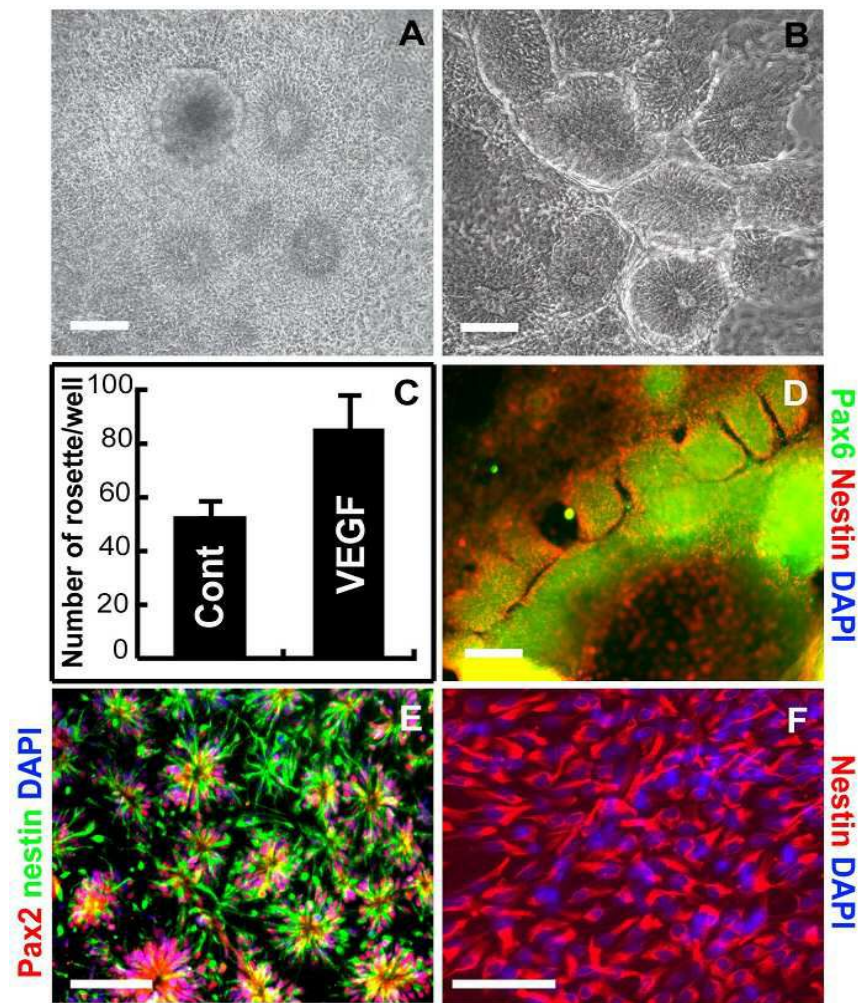
도면2



도면3



도면4



도면5

