



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0033853
(43) 공개일자 2010년03월31일

(51) Int. Cl.

A61K 38/19 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0092917

(22) 출원일자 2008년09월22일

심사청구일자 2008년09월22일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

박소라

경기도 안양시 동안구 귀인동 꿈마을 우성 아파트
201-1405

최병현

서울특별시 관악구 신림10동 삼성산아파트 302동
311호

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

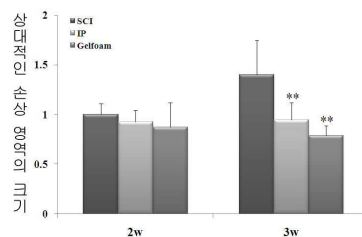
(54) 손상된 조직의 상흔 형성 억제제

(57) 요약

본 발명의 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로 포함한다. 특히, 본 발명의 상흔 형성 억제제는 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질의 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔 형성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 GM-CSF를 유효성분으로서 포함하는 신경아교성 상흔 형성 억제제는 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔 형성을 억제하여 궁극적으로는 손상된 신경조직을 재생하고 그 기능을 회복시킨다. 추가로, 본 발명은 신경손상 후 신경아교성 상흔의 형성을 억제하여 장기간의 신경조직의 회복을 도와주고 축색돌기 구조 보전성을 향상시킨다.

대표도 - 도1b



(72) 발명자

하윤

서울특별시 영등포구 당산3동 동부센트레빌
102-102

황헌

인천광역시 남구 용현4동 95-38번지 다가구주택
101호

특허청구의 범위

청구항 1

과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 신경아교성 상흔 억제제로서, 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함하는 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 GM-CSF는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 손상된 신경조직은 척수조직이나 뇌조직과 같은 중추신경계 조직인 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 손상된 신경조직은 말초신경계 조직인 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

유효성분인 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)와, 유효성분의 전달을 위한 담체, 또는 지지체, 또는 전달체를 포함하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 담체의 형태는 막형(membrane), 스폰지형(sponge), 분말형(powder), 또는 젤형(gel)인 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 담체는 PGA(polyglycolic acid), PLGA[poly(lactic co-glycolic acid)], 콜라겐(collagen), 젤라틴(gellatin) 및 피브린(fibrin)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 성분으로 구성되는 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

전신투여되거나 손상된 조직에 국소투여되는 것을 특징으로 하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제.

청구항 10

과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함하는 GFAP 발현 저해제.

청구항 11

제10항에 있어서,

손상된 신경조직에서 발생하는 신경아교성 상흔(Scar)의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 GFAP 발현 저해제.

청구항 12

과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함하는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해제.

청구항 13

제12항에 있어서,

손상된 신경조직에서 발생하는 신경아교성 상흔(Scar)의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 손상된 조직의 상흔 형성을 억제하는 물질에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 척추 손상이나 뇌 손상과 같은 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 신경아교성 상흔(Scar)의 형성을 억제하는 물질에 관한 것이다.
- [0002] 구체적으로, 본 발명은 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 상흔(Scar)의 형성에 관여하는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현을 저해하는 물질에 관한 것이다.
- [0003] 또한, 본 발명은 이러한 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해제를 포함하는 중추신경계 손상 부위 상흔 형성 억제제, 그리고 추가적으로 이러한 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해제를 포함하는 중추신경계 손상 치료제 조성물도 포함한다.

배경 기술

- [0004] 중추신경계에 있어서 분화되어 성장된 조직은 재생 능력이 제한적이고 외상성 손상(Traumatic injury) 후에 기능적으로 완전히 회복하는 것이 불가능하다.
- [0005] 면역학적 매개자들과 억제 인자들을 포함하는 수 많은 연관된 물질들이 중추신경계의 손상 영역에서 손상된 뉴런의 재생을 방해하여 신경결손현상(cavitation) 및 아교성 상흔 형성(glial scar formation)을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 2004;46:225-251). 특히, 중추신경계의 외상성 손상은 심각한 신경결손을 일으키고, 손상 후 신경 조직의 중심부괴사와 출혈이 발생하고, 이후 발생하는 이차 손상으로 손상 부위가 넓어지는 병리적 소견을 가진다.
- [0006] 이러한 중추신경계의 외상성 손상과 관련하여 GFAP(glial fibrillary acidic protein)를 발현하는 성상(星狀) 세포가 비대해 지고 증식되는데, 성상 세포는 GFAP의 발현 수준을 증가시켜 밀집된 망상(網狀)의 신경아교성 상흔과 공동(空洞; 신경결실 부분)을 형성한다.
- [0007] 또한, 중추신경계의 외상성 손상시 NG2, 뉴로칸(neurocan) 및 포스파칸(phosphacan)과 같은 CSPGs(Chondroitin sulfate proteoglycans)가 높은 전사 수준으로 발현조절되어 신경아교성 상흔(glial scar)을 구성하게 된다 (Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary

injury after CNS trauma. J Neurosci 1999;19:8182-8198; Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. Exp Neurol 2003;182:399-411).

- [0008] 이러한 신경아교성 상흔(Glial scars)은 신경조직의 재생 및 기능의 회복을 방해하는 주요 요인으로 인식되고 있다. 이와 관련하여 신경아교성 상흔은 손상된 신경조직과 인접 신경조직 간의 저분자 물질, 예를 들어 싸이토 카인 및 신경영양인자(neurotrophic factors)의 교환을 방해하는 것으로 알려져 있다. 또한, CSPGs는 손상되지 않은 신경원주위 망(Perineuronal nets; PNNs)에서 시냅스 가소성(synaptic plasticity)을 방해하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 따라서, 전술한 바와 같은 신경아교성 상흔 형성 억제 및 CSPGs의 생성 억제는 축색돌기 재생(axonal regeneration)에 적합한 환경을 제공하는 것으로 생각되고 있다. 예를 들어, 이를 위해 CSPGs의 코어 단백질로부터 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 사슬을 선택적으로 잘라내는 효소인 콘드로이티나아제 ABC (chondroitinase ABC; ChABC)를 투여하여 CSPGs 및 신경아교성 상흔의 형성을 방해하고 제거하는 것이 시도된 바가 있다(Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci 2004;5:146-156).
- [0010] 한편, CSPGs 이외에 퇴행성 미엘린 조직 파편(degenerating myelin debris)이 중추신경계 손상 이후 세포 및 축색돌기 수복을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Raisman G. Myelin inhibitors: does NO mean GO? Nat Rev Neurosci 2004;5:157-161). 따라서, 신경아교성 상흔 형성과 퇴행성 미엘린 조직 파편은 손상된 중추신경계 축 색돌기의 재생에서 조절대상이 되는 잠재적인 타겟이 될 수 있다.
- [0011] 최근에는 분자 수준에서 신경아교성 상흔 형성에 관여하는 CSPGs 등의 표적 단백질을 찾아 내고, 이러한 표적 단백질의 발현을 조절하거나 발현된 표적 단백질의 활성화 수준을 조절하는 신경아교성 상흔 형성 억제 후보물 질을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0012] 이와 관련하여 본 발명자는 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 상흔(scar)의 형성에 관여하는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현을 저해 하는 물질에 대해 탐색하였다
- [0013] 그 결과, 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; 이하, "GM-CSF"라 함)가 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현을 저해한다는 것을 확인하였다. 또한, 이러한 GM-CSF는 CSPGs 등의 발현을 억제하고, 이로써 전술한 바와 같은 손상된 신경의 재생을 방해하는 신경아교성 상흔의 형성을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0014] GM-CSF는 일반적으로 조혈 사이토카인(hematopoietic cytokine)으로 알려져 있고, 정상 상태나 질병 상태에서 다양한 신경관련 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Blood 1998;92:4491-4508; Franzen R, Bouhy D, Schoenen J. Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor'. Neurosci Lett 2004;361:76-78). 또한, GM-CSF는 신경영양인자(neurotrophic factor)로 서 기능하며, 시험관내에서 신경전구세포(neural progenitor cells; NPCs)의 증식을 유도한다.
- [0015] 치료적인 측면에서, GM-CSF는 말초신경계 손상에 효과가 있는 것으로 이미 알려져 있는데, 대식세포 및 Schwann 세포를 활성화하여 미엘린 조직 파편을 제거한다[Saada A, Reichert F, Rotshenker S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. J Cell Biol 1996;133:159-167; Ousman SS, David S. MIP-1a, MCP-1, GM-CSF, and TNF- α control the immune cell response that mediate rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. J Neurosci 2001;21:4649-4656; Hughes PM, Perry VH. The role of macrophages in degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: Degeneration and regeneration in the nervous system (Saunders NR, Dziegielewska KM, eds) 2000;pp 263-283. Chichester, UK: Harwood Academic].
- [0016] 또한, GM-CSF는 미세아교세포(microglia)를 활성화하여 축색돌기 재생을 유도하고, 미엘린 조직단편의 식작용 또는 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 분비를 통해 손상된 중추신경계를 기능적으로 회복시키는 것으 로 알려져 있다(David S, Ousman SS. Recruiting the immune response to promote axon regeneration in the injured spinal cord. Neuroscientist 2002;8:33-41; Schermer C, Humpel C. Granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor activates microglia in rat cortex organotypic brain slices. Neurosci Lett 2002;328:180-184; Bouhy D, Malgrange B, Multon S, Poirrier AL, Scholtes F, Schoenen J, Franzen R. Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages. FASEB J 2006;20:493-502).

[0017] 최근에는 래트의 척수손상(SCI) 모델에서 GM-CSF의 복강주사시(intraperitoneal injection; IP) 장기간 기능적 회복이 유도되고(Ha Y, Kim YS, Cho JM, Yoon SH, Park SR, Yoon DH, Kim EY, Park HC. Role of granulocyte macrophage colony stimulating factor in preventing apoptosis and improving functional outcome in experimental spinal cord contusion injury. J Neurosurg Spine 2004;2:55-61), 자가 골수 이식과 연관된 임상실험에서도 척수손상이 회복되는 것이 관찰되었다(Park HC, Shim YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, Park HS. Treatment of spinal cord injury patients with bone marrow cell transplantation and GM-CSF treatment. Tissue Eng 2005;11:913-922; Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, Choi BH, Park H, Ha Y. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. Stem Cells 2007;25:2066-2073).

[0018] 추가로, 래트의 척수손상 후 담체로서 겔폼(Gelfoam)을 이용하여 GM-CSF를 척수 내로 투여하면, 척수손상 치료 효능이 관찰되고, GM-CSF의 조기 투여는 래트의 척수손상 후 3일 이내에 신경보호 및 항-세포사멸 활성을 나타내며 장기적으로는 2-3주 후에 행동학적 기능회복을 보이는 것이 보고된 바가 있다(Huang X, Choi JK, Park SR, Ha Y, Park H, Yoon SH, Park HC, Park JO, Choi BH. GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins. Neurosci Res 2007;58:50-57).

[0019] 이와 관련하여 대한민국 등록특허 제10-0740972호에는 GM-CSF를 유효성분으로 함유하는 신경손상질환 치료제가 개시되어 있으나, 이는 신경세포의 세포사멸을 억제하여 신경손상을 치료하는 것을 개시하고 있을 뿐 신경아교성 상흔 형성과 이로 인한 신경조직의 재생 및 기능회복의 방해문제 등에 대해서는 주목하고 있지 않다. 더욱이 상기 대한민국 등록특허 제10-0740972호는 GM-CSF에 의한 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해와 신경아교성 상흔 형성의 억제에 대해서는 전혀 개시하고 있지 않다.

[0020] 또한, 미국공개특허공보 제2004/0120925A1호에는 수지상 세포 분비물인 IL-12, GM-CSF 등을 처리하여 신경계 손상을 치료하는 방법에 대해 개시하고 있으나, 이 역시 수지상 세포의 유도, 증식, 활성화와 신경영양인자의 분비 유도에 관한 것만 개시하고 있을 뿐이다.

[0021] 즉, 종래에는 GM-CSF가 신경세포의 세포사멸 억제나 BDNF(brain derived neurotrophic factor) 등의 분비를 촉진하는 기능과 관련된 것을 개시하고 있으나, GM-CSF에 의한 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해와 신경아교성 상흔 형성의 억제 효과에 대해서는 개시하거나 암시하는 바가 없다.

[0022] 따라서, 본 발명이 속하는 기술분야에서는 GM-CSF가 신경손상 회복과 관련하여 정확하게 어떠한 기능을 담당하는지를 추가로 알아내고, 이를 통해 새롭고 유효한 약리기전을 밝혀냄으로써 신경손상 치료를 위한 새로운 치료방법 및 치료를 위한 신약후보물질의 개발이 절실히 요구되고 있다고 할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0023] 본 발명은 전술한 바와 같은 기술적 요구에 부응하여 안출된 것으로서, 손상된 조직의 상흔 형성을 억제하는 물질, 특히 척추 손상이나 뇌 손상과 같은 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 상흔(Scar)의 형성을 억제하는 물질을 규명하는데 그 목적이 있다.

[0024] 보다 상세하게는 본 발명은 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 신경아교성 상흔(Scar)의 형성에 관여하는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현 저해제를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 GM-CSF를 유효성분으로 함유하는 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현 저해제, 이를 포함하는 신경아교성 상흔 형성 억제제, 그리고 나아가서는 이를 포함하는 중추신경계 손상 치료제 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

- [0026] 본 발명의 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함한다. 구체적으로, 상기 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 신경아교성 상흔 형성 억제제로서, 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함한다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 GM-CSF는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔의 형성을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 손상된 신경조직은 척수조직이나 뇌조직과 같은 중추신경계 조직인 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 다른 일실시예에 있어서, 상기 손상된 신경조직은 말초신경계 조직일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 유효성분인 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)와, 유효성분의 전달을 위한 담체, 또는 지지체, 또는 전달체를 포함한다.
- [0031] 한편, 상기 담체의 형태는 막형(membrane), 스폰지형(sponge), 분말형(powder), 또는 겔형(gel)일 수 있다. 또한, 상기 담체는 PGA(polyglycolic acid), PLGA[poly(lactic co-glycolic acid)], 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin) 및 피브린(fibrin)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 성분으로 구성될 수 있다. 바람직하기로는 상기 담체는 정제된 젤라틴으로서 겔폼(Gelfoam)인 것이 바람직하다.
- [0032] 더욱 바람직하기로는, 상기 상흔 형성 억제제는 전신투여되거나 손상된 조직에 국소투여되는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 또한, 본 발명의 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질 발현 저해제는 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함한다.
- [0034] 본 발명의 다른 일실시예에 있어서, 상기 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질은 손상된 신경조직에서 발생하는 신경아교성 상흔(Scar)의 형성에 관여하는 것을 특징으로 한다.

효과

- [0035] 상기에 설명한 바와 같이, 본 발명의 GM-CSF를 유효성분으로서 포함하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 손상된 조직의 상흔 형성을 억제한다. 특히, 본 발명의 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 신경아교성 상흔 형성 억제제로서, 척추 손상이나 뇌 손상과 같은 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 상흔(Scar)의 형성을 억제한다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명의 GM-CSF를 유효성분으로서 포함하는 신경아교성 상흔 형성 억제제는 중추신경계 손상시 손상부위에 발생하는 신경아교성 상흔(Scar)의 형성에 관여하는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 및/또는 CSPGs(chondroitin sulfate proteoglycans) 코어 단백질의 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔 형성을 억제할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 GM-CSF를 유효성분으로서 포함하는 신경아교성 상흔 형성 억제제는 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔 형성을 억제하여 궁극적으로는 손상된 신경조직을 재생하고 그 기능을 회복시킨다.
- [0038] 추가로, 본 발명의 GM-CSF를 유효성분으로서 포함하는 신경아교성 상흔 형성 억제제는 신경손상 후 신경아교성 상흔의 형성을 억제하여 장기간의 신경조직의 회복을 도와주고 축색돌기 구조 보존성을 향상시킨다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌은 본 발명에 참고로서 통합된다.

[0040] **실시예 1-1. 척수손상 래트 모델의 준비**

[0041] 동물실험은 인하대학교 의과대학 실험동물관리위원회에 의해 허가되고 승인된 동물관리시설에서 수행되었다. 체중이 280-300g인 8주령된 수컷 스프라그 돌리 래트(Sprague-Dawley rats; SD 래트)를 케타민(ketamine) 복강주사로 마취시키고, 척추궁절제술(laminectomy)을 T8 위치-T10 위치에서 수행하였다.

[0042] 혈관 협자(vascular clip)(Biemer-Clip, Aesculap, Tuttlingen, Germany)로 15분간 척수의 T9 위치를 압박하여 (0.2~0.25N의 폐색 압력) 척수에 좌상성 손상을 입혔다. sham 대조군(sham group)은 혈관 협자의 압박처리를 하지 않았다.

[0043] **실시예 1-2. 척수손상된 래트에 GM-CSF의 투여**

[0044] GM-CSF (대한민국 전라북도 익산시 소재 LG 생활과학으로부터 구입)를 실시예 1-1에서 준비된 척수손상 처리된 래트에 투여하였다.

[0045] 즉, 제조한 GM-CSF를 20 μ g/mL의 농도로 래트에 복강주사(IP)하거나, 20 μ g/50 μ l의 농도로 담체인 겔폼(Gelfoam) (정제된 젤라틴; Pfizer, inc., NY, USA)을 이용하여 손상된 척수에 직접 주입하였다. 척수손상군(GM-CSF가 처리되지 않는 래트)은 손상이 가해진 후 PBS(phosphate buffered saline)를 복강주사하였다. 사용된 실험군은 sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI), GM-CSF 처리군-복강주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)으로 나누어 구분하였다.

[0046] 하기 표 1에는 각 실험군에 대한 래트의 숫자가 기재되어 있는데, 전체 래트의 수는 72마리이다. 그리고, sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI+PBS), GM-CSF 처리군-복강주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)은 각각 3개의 세트로 나누어, H/E(Hematoxylin/eosin) 염색(=헤마톡실린/에오신 염색) 및 GFAP IHC(immunohistochemistry) 분석, 다른 모든 IHC(immunohistochemistry) 분석, 그리고 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0047] **표 1**

	H/E 염색 및 GFAP IHC (3d, 1, 2, 3, & 4 wk)	다른 모든 IHC (3d, 1 & 4wk)	웨스턴 블롯 (3d, 1 & 4wk)
Sham	3	3	3
SCI+PBS	15	9	9
SCI+ GM-CSF/IP	15	9	9
SCI+ GM-CSF/Gelfoam	15	9	9
전체 (n=72)	48	12	12

[0048] **실시예 1-3. 헤마톡실린/에오신 염색(Hematoxylin/eosin 염색)**

[0049] 실시예 1-2에서와 같이 처리된 SD 래트를 우레탄 마취로 희생시키고, PBS로 희석한 4% 파라포름알데히드를 이용하여 심장 혈류를 통해 관류-고정(perfusion-fix)을 수행하였다. 척수 조직은 척수손상 위치 주변에서 2cm 길이로 제거하고 파라핀 왁스에 침지시켰다.

[0050] 두께 4 mm의 기다란 파라핀 섹션들을 준비하고, 상기 섹션들은 크실렌과 에탄올에서 순차적인 인큐베이션을 통해 파라핀을 제거한 후 수화시켰다. 상기 섹션들을 증류수에서 5분간 세척한 후 2분간 헤마톡실린으로 그리고 나서 15초간 에오신으로 염색하였다. 상기 염색한 섹션들은 탈수처리되고 현미경에 옮겨져 관찰되었다. 염색된 이미지는 이미지 J 프로그램(Image J program) (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)을 이용한 손상 부위의 크기 측정을 위해 사용되었다. 참고로, 손상된 면적은 회색질(gray matters)의 포낭 가장자리와 근방의 백색질(white matters)의 파괴된 영역에 의해 결정되었다.

[0052] **실시예 1-4. 면역조직화학적(Immunohistochemical) 분석**

- [0053] 실시예 1-3에서와 같이 준비된 척수 조직의 섹션들은 각각 독자적으로 신경섬유(M&H)에 대한 마우스 단일클론 항체(1:200; Chemicon Inc., Temecula, CA, USA), GAP43에 대한 마우스 단일클론 항체(1:200; Chemicon Int.), GFAP에 대한 마우스 단일클론 항체(1:1000; Chemicon Inc.), NG2에 대한 마우스 단일클론 항체(1:1000; Upstate, New York, USA), 뉴로칸에 대한 마우스 단일클론 항체(1:1000; Chemicon Inc.) 및 포스포칸에 대한 마우스 단일클론 항체(1:1000; Chemicon Inc.)로 처리하여 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0054] 그런 다음, 상기 섹션들을 텍사스 레드(Texas Red)와 컨주게이션된 말의 항-마우스 항체로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 형광이미지가 레이저 스캔 공초점 현미경(MRC 1024; Bio-Rad, CA, USA)하에서 조사되었다. 이미지의 형광강도는 이미지 J 1.36 프로그램(Image J 1.36 program)을 이용하여 손상 부위의 주변 영역으로부터 측정되었다.
- [0055] **실시예 1-5. 웨스턴 블롯팅 분석**
- [0056] 실시예 1-2에서와 같이 처리된 SD 래트를 우레탄 마취로 희생시키고, 생리적 식염수를 이용하여 심장 혈류를 통해 관류(perfusion)를 수행하였다. 그리고, 척수손상 부위에서 5mm 길이로 척수조직을 제거하였다. 그런 다음, 단백질 추출물을 준비하고 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- [0057] GFAP에 대한 마우스 1차 항체(1:1000; Chemicon Inc.), NG2에 대한 마우스 1차 항체(1:1000; Upstate, New York, USA), 뉴로칸에 대한 마우스 1차 항체(1:1000; Chemicon Inc.), 포스포칸에 대한 마우스 1차 항체(1:1000; Chemicon Inc.) 및 베타-액틴에 대한 마우스 1차 항체(1:2000, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 웨스턴 블롯팅을 위한 1차 항체로서 사용하였다. 양고추냉이-퍼옥시다아제(Horseradish peroxidase)가 접합된 항-마우스 또는 항-토끼 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 2차 항체로서 사용하였다.
- [0058] 결합 반응을 하는 경우, ECL 시스템(enhanced chemiluminescence system) Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 결합반응의 신호를 가시화하였다.
- [0059] **실시예 1-6. 룩솔 패스트 블루 염색 분석(Luxol fast blue staining)**
- [0060] 실시예 1-3에서와 같이 준비된 척수조직 섹션들에서 파라핀을 제거한 후, 척수조직 섹션들을 룩솔 패스트 블루 용액(ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA)으로 56℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 95% 에틸 알콜로 세척한 후, 상기 척수조직 섹션들은 리튬 카르보네이트 용액으로 30초 동안, 70% 에틸 알콜로 30초 동안 순차적으로 인큐베이션하였다. 그런 다음, 상기 척수조직 섹션들은 크레실 바이오파렛(cresyl violet) 용액으로 40초 간 대비염색을 하였고, 95% 에틸 알콜로 5분간 인큐베이션한 후 100% 알콜로 5분간 탈수시켰다. 최종적으로, 상기 섹션들을 5분간 크실렌으로 염색한 후 수지성 매질에 마운트하여 현미경으로 관찰하였다.
- [0061] **실시예 2-1. GM-CSF의 초기 처리에 의한 척수손상 면적의 감소 확인**
- [0062] 실시예 1-2에서 설명된 바와 같이 준비된 sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI), GM-CSF 처리군-복강주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)에 대한 헤마톡실린/에오신 염색을 척수손상 후 1주째, 2주째 및 3주째에 수행하였다. sham 대조군(Sham)의 헤마톡실린/에오신 염색이 대조군으로서 사용되었다.
- [0063] 실시예 1-3에서 설명된 바와 같은 헤마톡실린/에오신 염색 후 관찰한 결과, GM-CSF를 조기에 처리하면 척수손상 후 수주 후에 손상 면적이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 척수손상 후 즉시 GM-CSF를 SD 래트에 복강주사(IP)하거나, 겔폼을 이용하여 손상된 척수에 직접 국소적으로 투여한 후 1주, 2주, 3주째에 척수조직 섹션들에 대한 헤마톡실린/에오신 염색 결과를 관찰하면, 척수손상 후 1주째에는 척수조직의 파괴가 관찰되고, 척수손상 후 2주째에는 신경아교성 상흔 형성(gliotic scar formation)과 신경결실이 관찰되었다(도 1a 참조).
- [0064] 척수 손상 후 3주째에는 손상 면적이 확대되었고, 손상 부위에 인접한 주변 백색질이 심각하게 손상을 받은 것이 확인되었다(도 1a의 화살표 부분 참조). 척수 손상 후 2주째까지는 GM-CSF가 처리된 군과 처리되지 않은 군 사이에서의 조직학적 차이는 발견되지 않았으나, 척수 손상 후 3주째에서는 손상부위 주변 백색질이 GM-CSF가 처리된 군에서 보다 손상 전의 원형에 가까운 것으로 관찰되었다. 또한, GM-CSF를 겔폼으로 국소 투여한 군에서는 척수손상 부위 주변의 상흔 조직이 깨끗하게 제거된 것이 확인되었다.
- [0065] 한편, 손상 영역의 크기는 각 척수조직 샘플에서 촬영된 5개의 현미경 사진으로부터 측정되었고, 척수 손상 후 염색이 수행된 시기별로 3개의 척수조직 샘플로부터 얻은 평균값이 비교분석을 위해 사용되었다. 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용한 손상 면적의 측정 결과에 있어서 GM-CSF가 처리된 군이 처리되지 않은 군 보다 손상 면적이 작은 것으로 확인되었다(도 1b 참조). 도 1b의 ** 표시는 통계학적 유의수준이 $p < 0.01$ 인 것을 의미

한다.

[0066] 이와 같은 사실들을 종합할 때, GM-CSF는 척수 손상 후 신경아교성 상흔의 형성을 방해하고, 척수 손상 후 3주 정도에 추가적인 조직 손상을 방지하는 것으로 보인다.

[0067] **실시예 2-2. GM-CSF에 의한 GFAP 발현 억제**

[0068] 척수손상 후 CSPGs의 과발현과 신경아교성 상흔 형성은 축색돌기의 연결 및 손상된 척수의 재생을 방해한다. GM-CSF가 신경아교성 상흔 형성을 억제하는지 여부를 확실하게 확인하기 위해, 신경아교성 상흔 형성과 관련된 GFAP 단백질의 발현 양상을 면역조직화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 조사하였다.

[0069] 실시예 1-2에서 설명된 바와 같이 준비된 sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI), GM-CSF 처리군-복강주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)에 대한 면역조직화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다. sham 대조군(Sham)의 면역조직화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석 결과가 대조군으로서 사용되었다.

[0070] 우선, 척수손상 후 3일째, 1주째, 2주째, 3주째 및 4주째에 GFAP 발현 양상이 면역조직화학적 분석을 통해 조사되었는데, GFAP는 2주째에 약간 그 발현이 감소하였으나 대체로 3일째부터 4주째까지 점진적으로 발현이 증가하였다(도 2a 참조). 특히, 척수 손상 후 4주째에 신경결실 주위 영역에서 주목할 만한 GFAP의 강한 발현이 관찰되었다.

[0071] GM-CSF의 투여는 척수 손상 후 3일째의 초기 GFAP 발현 증가를 억제하지는 못했으나, 척수 손상 후 1주째, 3주째 및 4주째에서의 점진적인 GFAP 발현 증가를 억제하였다. 특히, 척수 손상 후 4주째에 관찰되는 GFAP의 강한 발현이 GM-CSF 처리군에서는 관찰되지 않았다(도 2a 참조).

[0072] 한편, sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI), GM-CSF 처리군-복강주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)에 대해 손상 영역 주변에서 얻은 5개의 현미경 사진으로부터 적색 형광강도가 측정되었고, 그 측정값은 동일한 샘플 내의 손상되지 않은 부위의 형광강도로 표준화되었다. 그리고, 척수 손상 후 염색이 수행된 시기별로 3개의 척수조직 샘플로부터 얻은 평균값이 비교분석을 위해 사용되었다.

[0073] 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용한 형광의 정량분석 결과에 따르면, GM-CSF는 척수 손상 후 1주째, 3주째 및 4주째에 척수 손상에 의한 GFAP 발현 증가를 억제하는 것으로 확인되었다(도 2b 참조). 도 1b의 ** 표시는 통계학적 유의수준이 $p < 0.01$ 인 것을 의미한다. 도 2b에 도시된 바와 같이, 척수 손상 후 3주째 및 4주째에 GFAP 발현은 sham 대조군에 비해 각각 6.2배 및 7배 증가되지만 GM-CSF 처리는 GFAP 발현량의 약 60%를 감소시키는 효과가 있다.

[0074] 다음으로, 척수손상 후 3일째, 1주째 및 4주째의 GFAP 발현 양상이 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 조사되었는데, 척수손상 후 시간경과에 따른 GFAP의 발현 증가가 GM-CSF 처리에 의해 억제되는 것이 관찰되었다(도 2c 참조).

[0075] 이러한 결과들을 종합할 때, GM-CSF는 척수 손상 후 1주일 이내에 나타나는 초기 정상교세포증(astrogliosis)을 억제시키고, 척수 손상 후 3주 이후에 나타나는 신경아교성 상흔 형성을 억제하는 것으로 보인다.

[0076] **실시예 2-3. GM-CSF에 의한 CSPGs 발현 억제**

[0077] GM-CSF가 신경아교성 상흔 형성을 억제하는지 여부를 확실하게 확인하기 위해, 신경아교성 상흔 형성에 관여하는 CSPGs 단백질의 발현 양상을 면역조직화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 조사하였다.

[0078] 실시예 1-2에서 설명된 바와 같이 준비된 sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI), GM-CSF 처리군-복강주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)에 대한 면역조직화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다. sham 대조군(Sham)의 면역조직화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석 결과가 대조군으로서 사용되었다.

[0079] 우선, 척수손상 후 3일째, 1주째 및 4주째에 뉴로칸, NG2 및 포스파칸과 같은 CSPGs의 발현 양상이 면역조직화학적 분석을 통해 조사되었다. 뉴로칸은 척수 손상 후 3일째에 약 4배의 발현 증가를 보였고, 1주째 및 4주째에는 약간의 발현 감소를 보였다(도 3a 및 도 3b 참조).

[0080] 도 3a 및 도 3b에서 확인되는 바와 같이, GM-CSF의 투여는 대략 30-50%의 뉴로칸 발현 억제 효과가 있고, 특히 척수 손상 후 4주째에 신경결실 주변에서의 뉴로칸의 강한 발현을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0081] NG2는 척수 손상 후 3일째에 약 9배 이상의 상당한 발현 증가를 보였고, 1주째 및 4주째에는 각각 6.2배 및 2.3배의 발현증가를 보여 급격히 발현 증가량이 떨어졌음을 알 수 있다(도 3c 및 도 3d 참조). 도 3c 및 도 3d에서 확인되는 바와 같이, GM-CSF의 투여는 척수 손상 후 3일째 및 1주일째에 각각 대략 40% 및 30%의 NG2 발현 억제

효과가 있음을 알 수 있다. 척수 손상 후 4주째에는 GM-CSF의 투여에 의한 추가적인 NG2 발현 감소가 관찰되지 않았다.

[0082] 포스파칸은 척수 손상 후 시간 경과에 따라 점진적으로 대략 1.8배 내지 3.5배 정도로 발현이 증가되었으나, GM-CSF의 투여에 의한 유의적인 포스파칸 발현 감소는 관찰되지 않았다(도 3e 및 도 3f 참조).

[0083] 한편, 전술한 면역조직화학적 분석에 있어서 사용된 적색 형광강도 측정 방법, 형광의 정량분석 및 비교분석 방법은 실시예 2-2에서 수행한 방법과 실질적으로 동일하므로 그 상세한 설명을 생략한다. 도 3b, 도 3d 및 도 3f에 있어서 *표시는 통계학적 유의수준이 $p < 0.05$ 인 것을 의미하고, **표시는 통계학적 유의수준이 $p < 0.01$ 인 것을 의미한다.

[0084] 다음으로, 척수손상 후 3일째, 1주째 및 4주째에 뉴로칸, NG2 및 포스파칸과 같은 CSPGs 발현 양상이 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 조사되었는데, 척수손상 후 시간경과에 따른 CSPGs의 발현 증가가 GM-CSF 처리에 의해 전반적으로 억제되는 것이 관찰되었다(도 3g 참조).

[0085] 실시예 2-4. 척수손상 후 GM-CSF에 의한 축색돌기 구조 보전

[0086] GM-CSF 투여가 손상된 척수조직에 있어서 축색돌기 구조 보전과 신경아교성 상흔 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 축색돌기 섬유를 염색하였고, 재생 뉴런의 마커인 GAP-43의 발현 양상을 조사하였다.

[0087] 실시예 1-2에서 설명된 바와 같이 준비된 sham 대조군(Sham), 척수손상군(SCI), GM-CSF 처리군-복합주사(SCI+GM-CSF/IP) 및 GM-CSF 처리군-겔폼(SCI+GM-CSF/Gelfoam)에 대한 면역학적 염색 및 록솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(LFB) 염색을 수행하였다. sham 대조군(Sham)의 면역학적 염색 분석 및 록솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(LFB) 염색 분석 결과가 대조군으로서 사용되었다.

[0088] 우선, 척수 손상 후 3주째에 축색돌기 섬유를 관찰하기 위해, 손상 부위의 주변 백색질 부분의 척수조직 섹션들에 대해 염색을 수행하였는데, 신경섬유에 대해서는 면역학적 염색을 수행하였고 미엘린에 대해서는 록솔 패스트 블루 염색을 수행하였다. 신경섬유에 대한 마우스 1차 항체로 1차적으로 척수조직에 대한 면역학적인 염색을 수행한 후, 시각적인 관찰을 위해 텍사스 레드와 컨주게이션된 말의 항-마우스 항체로 상기 1차 항체를 표지하였다. 그 결과가 도 4의 (a)에 도시되어 있다. 도 4의 (b)에는 미엘린에 대한 록솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(LFB) 염색 결과가 도시되어 있다.

[0089] 도 4에 도시된 바와 같이, 척수손상된 래트의 척수조직에서 축색돌기의 섬유들이 구조적으로 손상되어 있었고 미엘린 수초가 파괴된 것이 관찰되었다. 반면에, GM-CSF가 처리된 군에서는 축색돌기 섬유들의 배열 구조가 보전되어 있었고 미엘린 수초도 손상 전의 원형에 가까운 것으로 관찰되었다. 즉, 신경섬유에 대한 면역학적 염색(도 4의 (a) 참조) 및 미엘린에 대한 록솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(LFB) 염색(도 4의 (b) 참조)의 분석 결과에 따르면, GM-CSF는 척수손상 후 축색돌기 및 미엘린 구조를 보호하는 것으로 나타났다.

[0090] 다음으로, 척수 손상 후 3주째에 재생 뉴런의 마커인 GAP-43의 발현 양상을 관찰하기 위해, 척수조직 섹션들에 대해 면역학적 염색을 수행하였다.

[0091] 도 5a에 도시된 바와 같이, GM-CSF가 처리된 군에서는 재생 뉴런의 마커인 GAP-43의 발현 강도가 높게 나타나 재생 뉴런의 수가 많은 것이 확인되었고, 특히 겔폼으로 GM-CSF를 척수에 국소 투여한 군에서 축색돌기 섬유의 보전성이 우수한 것으로 확인되었다.

[0092] 도 5b는 12mm²의 면적을 갖는 형광 현미경 시야에서 GAP-43이 양성인 세포수를 계수한 그래프로서, GM-CSF가 처리된 군의 경우 GAP-43이 양성인 세포수가 많은 것을 확인할 수 있어 GM-CSF는 재생 뉴런의 마커인 GAP-43의 발현을 증대시킴을 알 수 있다.

[0093] 정리하면, 8주령된 수컷의 스프라그-돌리 래트(male Sprague-Dawley rats)의 척수손상 후 4주까지 조직학적 분석 및 면역조직화화학적 분석을 통해 형태적인 변화, 조직의 보전성 및 신경아교성 상흔 형성을 관찰한 결과, GM-CSF는 척수손상된 래트에 있어서 척수손상 후 3-4주가 지난 시점에서 신경결실 및 신경아교성 상흔 형성을 현저히 감소시켰음을 확인할 수 있었다.

[0094] 또한, 면역조직화화학적 분석 및 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 단백질 발현 양상을 관찰한 결과, GM-CSF는 신경아교성 상흔 형성에 관여하는 뉴로칸 및 NG2와 같은 CSPGs의 코어 단백질의 발현을 감소시키고, 신경손상 후 신경결실 주위에서 나타나는 GFAP의 증대된 발현을 억제함을 확인할 수 있었다. 그리고, 신경섬유에 대한 면역학적 염색 및 록솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(LFB) 염색 결과에 따르면, GM-CSF는 척수손상 후 축색돌기 및 미엘

린 구조를 보호하는 것으로 나타났고, GM-CSF의 처리에 의해 재생 뉴런의 마커인 GAP-43의 발현이 증가하는 것으로 확인되었다.

[0095] 따라서, 본 발명의 GM-CSF를 유효성분으로서 포함하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제는 손상된 조직의 상흔 형성을 억제하되, 특히 GFAP 및/또는 CSPGs 코어 단백질 발현을 저해함으로써 손상된 신경조직에서 신경아교성 상흔 형성을 억제하여 궁극적으로는 손상된 신경조직을 재생하고, 그 기능을 회복시키며, 또한 신경손상 후 장기간의 신경조직의 회복을 도와주고 축색돌기의 구조 보전성을 향상시키는 것을 알 수 있다.

[0096] 이상 본 발명을 전술한 실시예에 따라 설명하였으나, 본 발명은 개시된 실시예에 제한되는 것은 아니다. 당업자라면, 본 발명의 취지에 따라 수정 변경이 가능하며, 이러한 수정 변경 또한 본 발명의 범위에 속한다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0097] 도 1a는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 척수 손상 면적의 감소를 보여주는 척수조직 색선들의 헤마톡실린/에오신 염색사진으로서, 점선은 손상 영역의 경계를 나타내고 GM은 회색질 그리고 WM은 백색질을 각각 나타낸다.

[0098] 도 1b는 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용한 손상 면적의 상대적 측정 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1b에서는 척수 손상 후 3주째에 척수손상군과 GM-CSF 처리군 사이에서 통계학적으로 의미를 갖는 손상 면적의 감소를 나타내고 있다.

[0099] 도 2a는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 GFAP 발현이 감소되는 것을 보여주는 면역조직화학적 형광염색사진으로서, GFAP 염색 부분은 적색으로 나타난다. 도 2a에서 점선은 손상 영역의 경계를 나타낸다.

[0100] 도 2b는 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용하여 손상 영역 주변에서 GFAP의 상대적 발현 강도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0101] 도 2c는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 GFAP 발현이 감소되는 것을 보여주는 웨스턴 블롯팅 전기영동 사진이다.

[0102] 도 3a는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 뉴로칸 발현이 감소되는 것을 보여주는 면역조직화학적 형광염색사진으로서, 뉴로칸 염색 부분은 적색으로 나타난다. 도 3a에서 점선은 손상 영역의 경계를 나타낸다.

[0103] 도 3b는 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용하여 손상 영역 주변에서 뉴로칸의 상대적 발현 강도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0104] 도 3c는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 NG2 발현이 감소되는 것을 보여주는 면역조직화학적 형광염색사진으로서, NG2 염색 부분은 적색으로 나타난다. 도 3c에서 점선은 손상 영역의 경계를 나타낸다.

[0105] 도 3d는 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용하여 손상 영역 주변에서 NG2의 상대적 발현 강도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0106] 도 3e는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 포스파칸의 발현 양상을 보여주는 면역조직화학적 형광염색사진으로서, 포스파칸 염색 부분은 적색으로 나타난다. 도 3e에서 점선은 손상 영역의 경계를 나타낸다.

[0107] 도 3f는 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용하여 손상 영역 주변에서 포스파칸의 상대적 발현 강도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0108] 도 3g는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 CSPGs 발현이 감소되는 것을 보여주는 웨스턴 블롯팅 전기영동 사진이다.

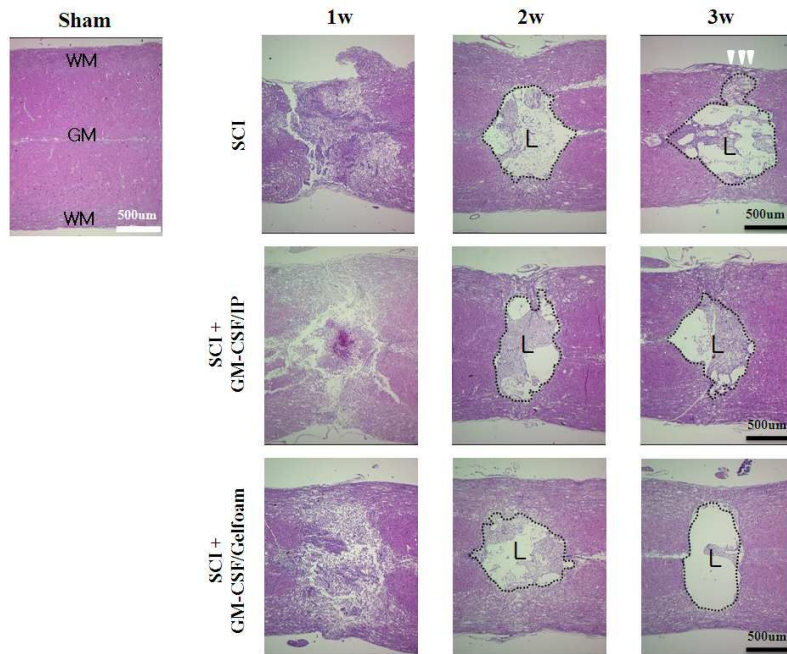
[0109] 도 4는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우 GM-CSF가 척수손상 후 축색돌기 및 미엘린 구조를 보호하는 것을 보여주는 사진들로서, 도 4의 (a)는 신경섬유에 대한 면역조직화학적 형광염색 사진이고, 도 4의 (b)는 미엘린에 대한 룩솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(LFB) 염색 사진이다. 도 4에서 점선은 손상 영역의 경계를 나타낸다.

[0110] 도 5a는 척수손상된 래트에 GM-CSF를 처리한 경우, 재생 뉴런의 마커인 GAP-43의 발현이 증가하는 것을 보여주는 면역조직화학적 형광염색사진으로서, GAP-43 염색 부분은 녹색으로 나타난다. 도 5a에서 점선은 손상 영역의 경계를 나타낸다.

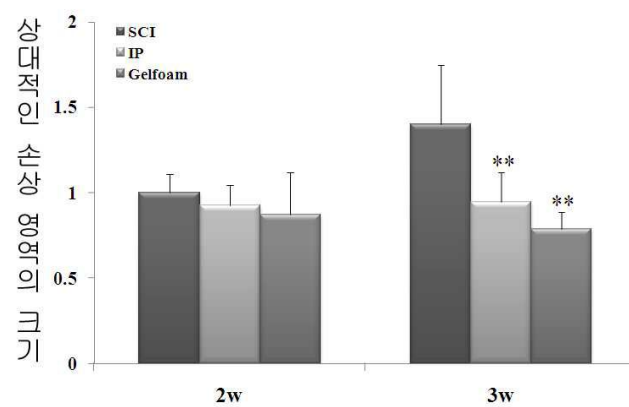
[0111] 도 5b는 도 5a에 도시된 바와 같은 형광 현미경 시야에서 GAP-43가 양성인 세포수를 계수한 그래프이다.

도면

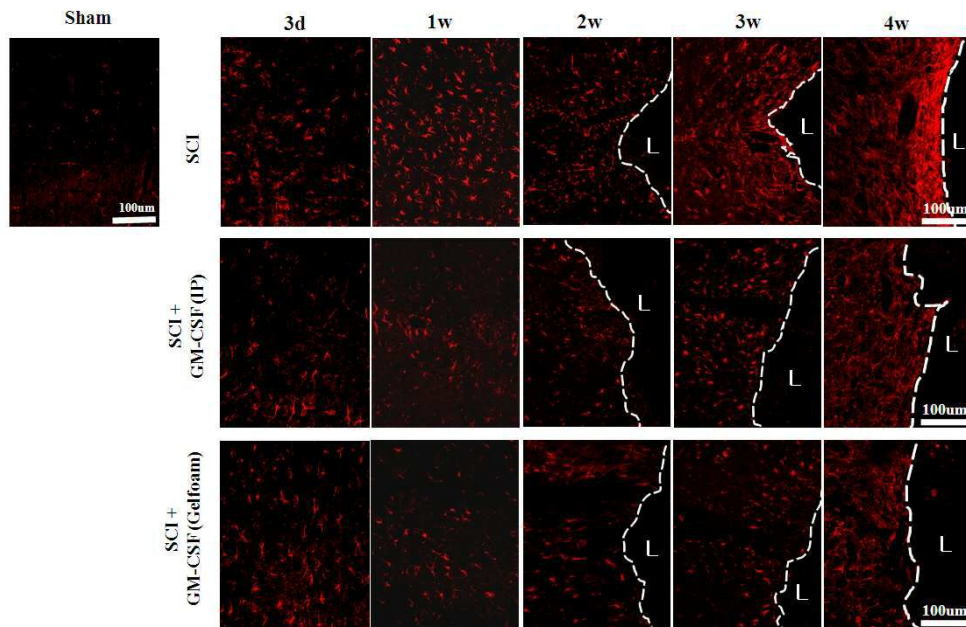
도면1a



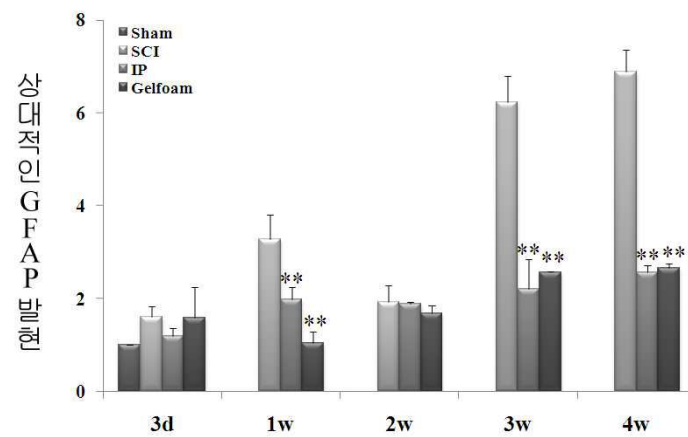
도면1b



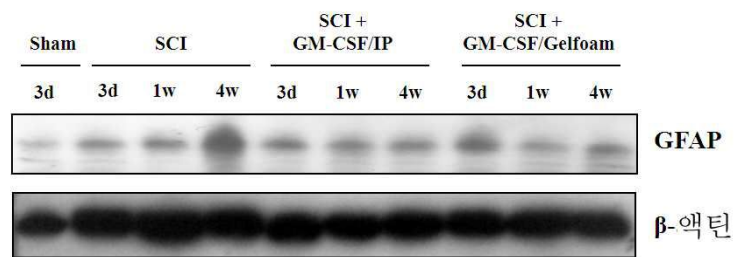
도면2a



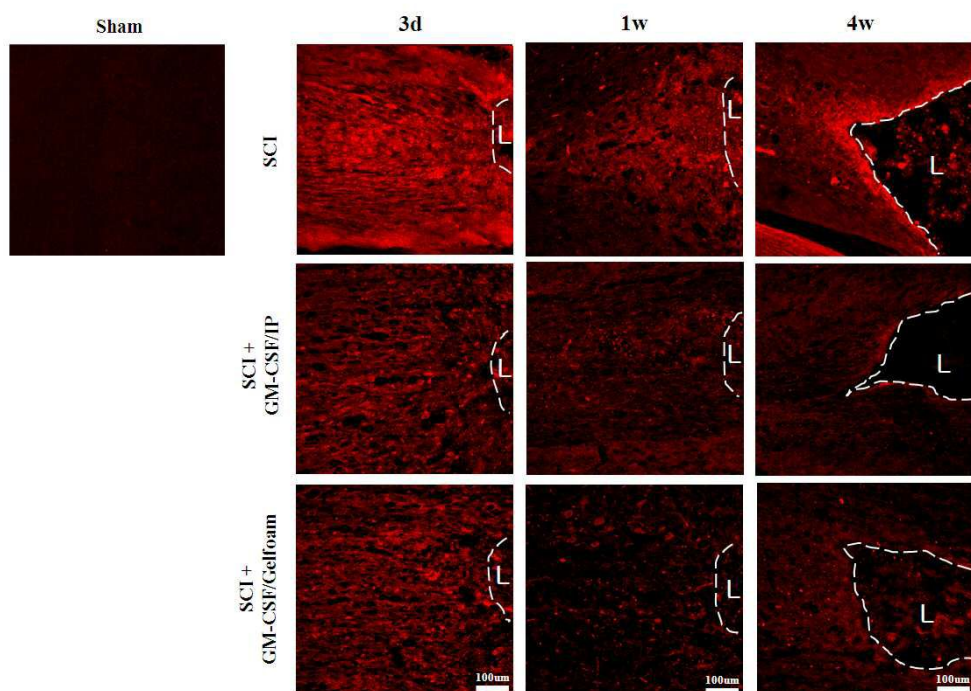
도면2b



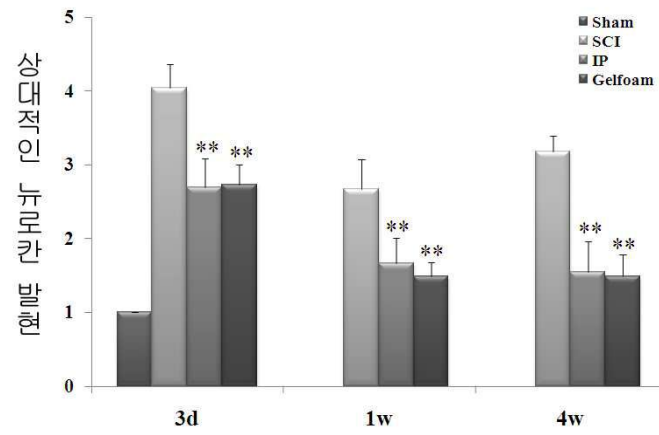
도면2c



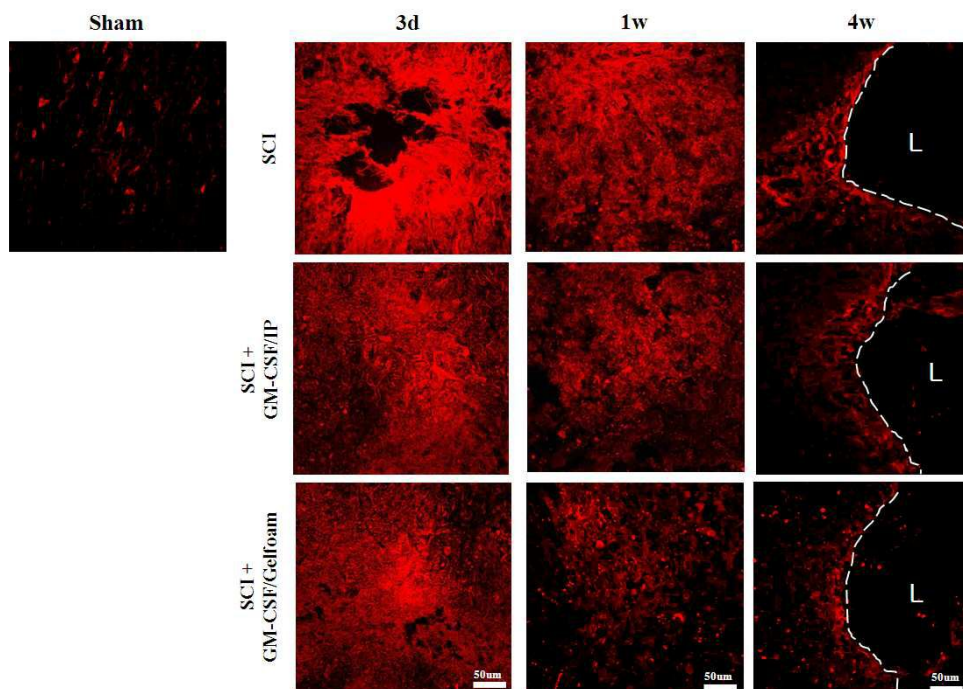
도면3a



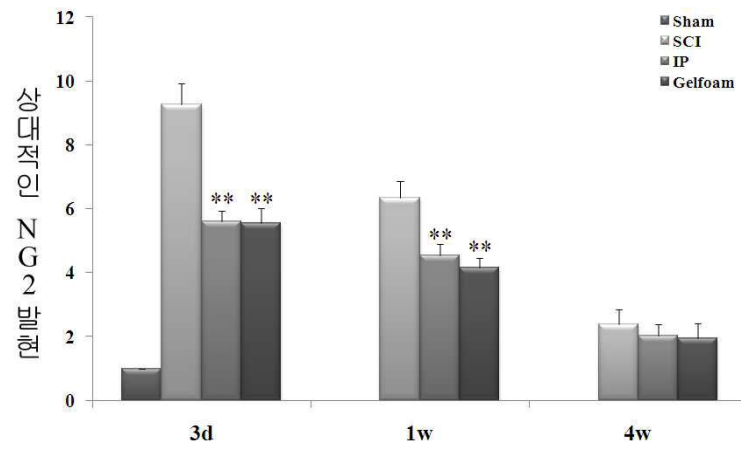
도면3b



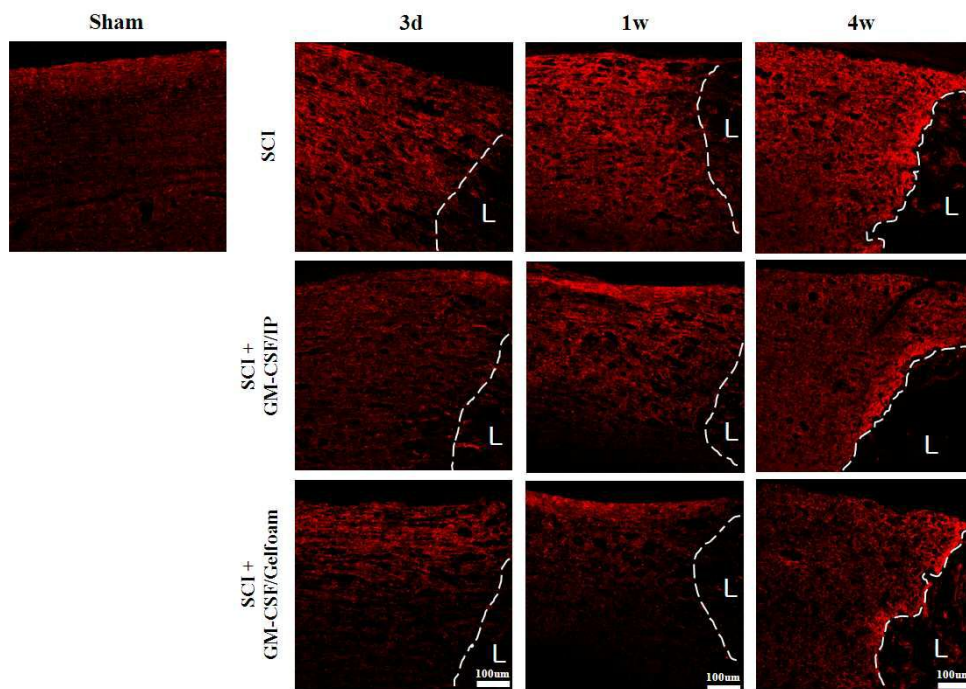
도면3c



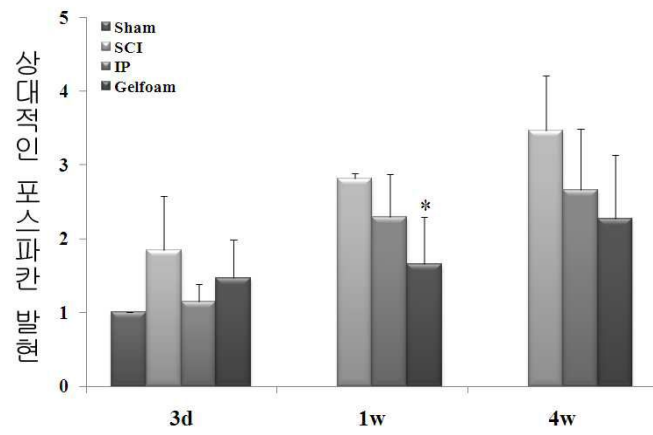
도면3d



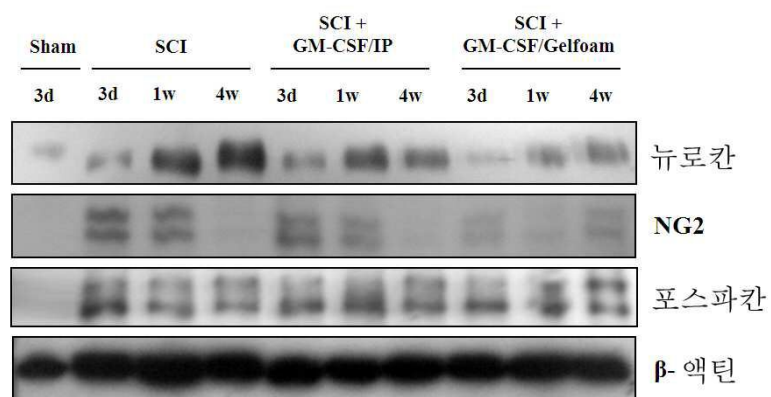
도면3e



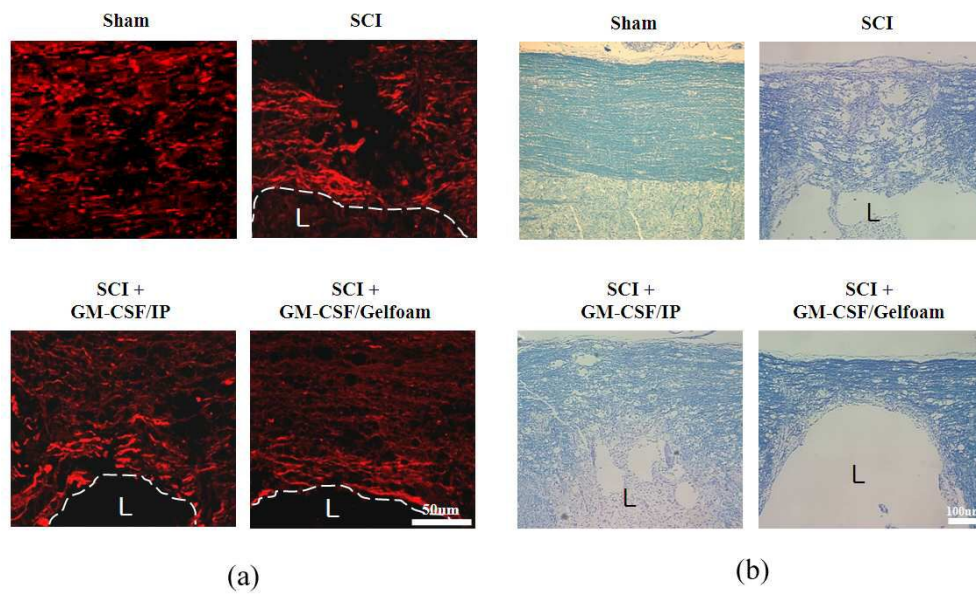
도면3f



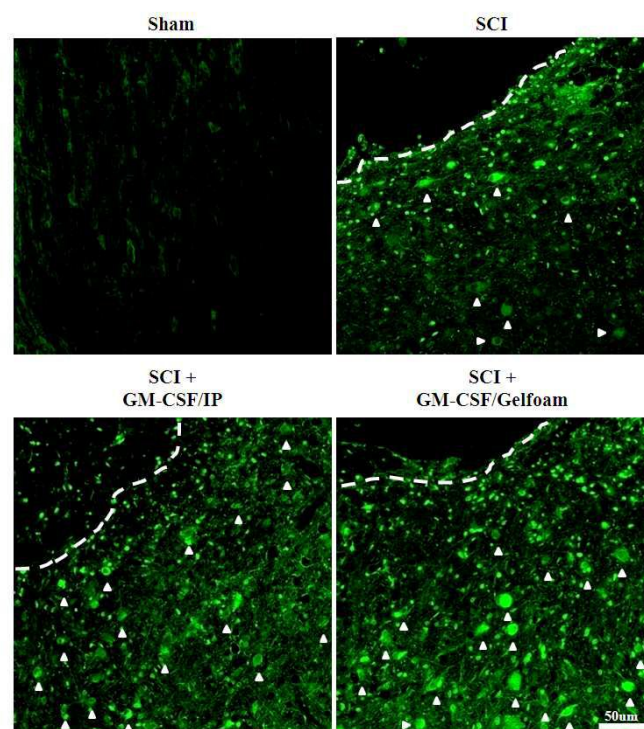
도면3g



도면4



도면5a



도면5b

