(19) **(KR)**
(12) **(B1)**

(51) Int. Cl.⁷		(45)	2004 09 21
C12N 5/08		(11)	10- 0449141
		(24)	2004 09 10

(21)	10- 2001- 0021064	(65)	10- 2002- 0082239
(22)	2001 04 19	(43)	2002 10 31

(73)　　　　　　　　( )

　　　　　　　　　　　　708- 33　　　　　　　　　　　　1,2

　　　　　　　　　　　　313- 1003

(72)

　　　　　　　　　　　　313- 1003

　　　　　　　　2　408

(74)

(54)

　　　　　　　　(mesenchymal stem cell)

　　　　　(epidermal growth factor; EGF)　　　　　　　　　(hepatocyte growth factor; HGF)

　80%

　3a

　　　　(mesenchymal stem cell),　　　　,　　,　　　　　　,

1 　　　　　　　　　　　10 ng/ml 　　　　　　20 ng/ml 　　　　　　　　4
　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　(×100, 　　　　　),

2 　　　　　　　　10 ng/ml 　　　　　20 ng/ml 　　　　　　　　8
　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　',

3 　　2 　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　, (a) 　　　　, (b)
　　'

4 　　2 　　　　　　　　　　　　　　　　　　　, (a) NSE 　　　　　　, (
b) NeuN 　　　　　　, (c) GFAP 　　　　　　　　　　',

5
　　　　　　　(a), 　　　　　(b) 　　　　(c)
　　'

6 　　　　　　10 ng/ml 　　　　20 ng/ml
　　　　'

7 　　　　　10 ng/ml 　　　　20 ng/ml 　　　　　　　　　　8
　　　　　　　'

8 　6 　　　　　　　　　　　　　　　　　　　, (a) NSE
, (b) NeuN 　　　, (c) GFAP 　　　　　　　.

　　　　　　　　　　　.

( ) 　　(stem cell) 　　　　　　　　　　　　',
　　　　　　　　　　　　　　.

　　　　　　　(embryonic stem cell; ES cell) 　　　　　(tissue-spec
ific stem cell) 　. 　　　　　　　　　　　　　　(bl
astocyst) 　　　　(inner cell mass; ICM) 　　　　　', 　,
　3 　　(embryonic germ layer) 　(pluripotent) 　.

　' 　　　　　　　　　　　　　　　　　　　',
　　　' 　　　　　　(multipotent) 　.

　　　. 　　　　(bone marrow) 　　(hematopoietic s
tem cell) 　　(connective tissue) 　　(mesenchymal stem cell
) 　. 　, 　(adipocyte) 　　(myoblast)' 　.(osteoblast),
　(chondroblast), 　　(cell replacement therapy)

　. 　　　', 　　', 　',
　' ', '
, 　.

　', 　. ',
　.

　', '
　.

　(myelin) 　　(oligodendrocyte)
　. , 　　(Brustle et al., Science 285:754-756, 1999),
　　(Soria et al., Diabetes
49:157-162, 2000),

8

8

8

1   2

80%   70%   ,   30%

(neuron),   (astrocyte)   (microglial cell)

(Pick's disease),   (Huntington's disease),
(amyotriophic lateral sclerosis)   (ischemic brain disease; stroke)

(Douglas Kondziolka, Pittsburgh, 1998)
1cm   , HBSS (Hank's balanced s
alt solution)   3   .
(stereotactic frame)

1   1×10^{6} 1×10^{7}

(ne
ural stem cell)
(Melissa *et al., Exp. Neurology* 158: 265- 278, 1999).
4   (kringle)   -
(heterodimer)   , c- Met   (Jung W *et al., J. Cell Biol* . 126: 485- 494, 199
4).   (neocortical explant)   (ne
urite)   (Hamanoue M *et al., J. Neurosci. Res* . 43: 554- 564, 1996).
(Ebens A *et al., Neuron* 17: 1157- 1172, 1996),
(Fleur Davey *et al., Mol. Cell Neurosci* . 15:
79- 87, 2000).

DMSO

4   8

8

NSE   NeuN   GFAP

OX- 42

, 8 80%

, 70%, 30% . 8

.

, 1 2

. 20 ,

. , , ,

. ,

, ,

, . , .

< 1> (mononuclear cells)

(pelvis) 10 ml
. 10 ml 30 ml (phosphate buffered saline; PBS)
, 20 ml 10 ml Ficoll-Paque TM plus (1.077 g/ml, Amersham Pharmacia Biotech)
2000 rpm 20 (density gradient centrifugation) .
Ficoll-Paque TM plus 1800 rpm 5
.

< 2>

1 1×10 6 cells/cm 2 , 4
. 3.5μM (hydrocortisone, Sigma),
(fatty acid free bovine serum albumin, Gibco BRL) 50 ng
/ml (linoleic acid, Sigma Co.), CuSO 4· 5H 2 O (0.1μM, Sigma), ZnSO 4· 7H 2 O (50 pM, Sigm
a), H 2 SeO 3 (3 ng/ml, Sigma), NaHCO 3 (1.05 mg/ml, Sigma Co.), HEPES(1.19 mg/ml, Sigma), (10
0 U/ml, Gibco BRL), (10 mg/ml, Gibco BRL), (25μg/ml, Gibco BRL)
E (Williams' E medium, Gibco BRL) .

< 3>

(Gibco BRL) 10 ng/ml (hepatocyte growth factor, Ramp;D S
ystems) 20 ng/ml 2 .
.
4 (neural cell colonies)
(1, 1). 8 , (axon)
(dendrite) (neuron) (astroc
yte) (2 3a, 3b). , 8
.

, EGF HGF , EGF
, HGF .

[1]

EGF HGF 8 (/ml)

		HGF	EGF	EGF HGF
7.5×10 7			1×10 5	2×10 5

[2]

8 EGF HGF 4 8 (
1×10 5)

		HGF	EGF	EGF HGF

| 4 | | | 2×10^5 | 2×10^5 |
| 8 | | | 5×10^5 | 1×10^5 |

<   4>   (immunocytochemstry)
          3   1cm^2 1×10^4 cells/cm^2 .   0.1M
        (phosphate buffer)   5   4%   0.1M   15
       , 0.1M   (phosphate buffered saline; PBS)   5   .   1% BSA   0.2
% Triton X- 100   0.1M PBS   5   16   .
             -      NSE (neuron- specific enolase; Chemicon Inc.),   -   NeuN (Chemicon Inc.),   -
-        (Sigma Co.)   -   GFAP (glial fibrillary acidic protein; Sigma Co.)   .
                                                 0.5% BSA   0.1M PBS   15
            .   30   0.5% BSA   0.1M PBS   5   .
           -           (avidin- biotin)   (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratory Inc.)
    30   . 0.1M   5   DAB (3,3'- diamino
benzidine tetrahydrochloride dehydrate, Sigma Co.)   5   . 0.1M   5
                               5   .   5
.   , 70, 80, 95   100%   ,   .
                   ,   4a, 4b   4c   ,   EGF   HGF
                 NeuN, NSE   -   GFAP

              .   (microglia marker)   OX- 42
                                                        .
            EGF   ,   EGF   HGF   8   NSE   NeuN
                  (neuron)   GFAP
3   .

<center>[3]</center>

	NSE	NeuN	GFAP	
EGF	0.9%	0.8%	1.2%	89%
EGF + HGF	56%	75%	24%	20%

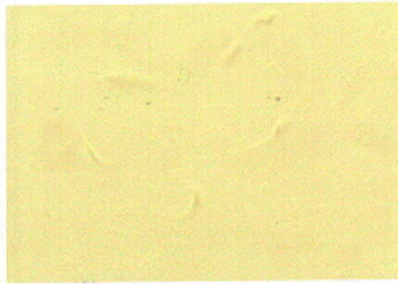   3   , EGF   HGF   8   80%
        ,   70%   ,   30%   .
<   5>   (mesenchymal stem cell)
                            ,   .
       ,
    , 10% FBS (fetal bovine serum)   ,   DMEM (Gibco BRL)
          2   1×10^6 cells/cm^2 .   CO$_2$
37   ,   1   2   , 20
                 .
                                      ,   ,   ,   ,   ,   ,
            ( )   ,   .   ,   ,
            ,   .

            ,   '
     ,   (osteoblasts),   (chondroblasts)   (fat cells)
                                      .
         ,   100mM   (dexamethasone), 10mM   -   (- glycero
l phosphate)   50nM   - 2-   (ascorbate- 2- phosphate)   10%   .
     ,   '
         100nM   10ng/ml TGF-   3   .   ,   1-   - 3-
        (1- methyl- 3- isobutylxanthine) 0.5mM,   1mM,   10g/ml   (indomethacine) 1
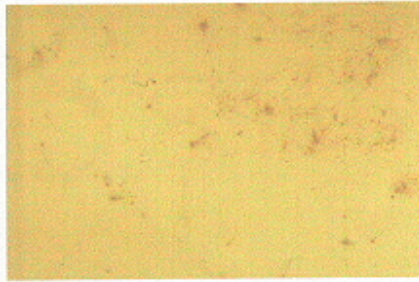00nM,   10%   (FBS)   (Pittenger *et al., Science* 284:143- 147, 1999).

(alkaline phosphatase staning;
Jaiswal *et al., J. Cell Biochem.* 64(2):295-312, 1997)   2
          (type   collagen RT-PCR; Mackay *et al., Tissue Eng.* 4(4):415-428, 1998)
          (toluidine blue)   ,   O   (oil red O staining)   .
      ,   5a , 5b   5c   ,

                                         .

<   6>
          5   , 10% F
BS (fetal bovine serum)   DMEM   (*ex vivo*)   .
              3   EGF (Gibco BRL) 10 ng/ml   HGF (Ramp;D Systems) 20 ng/ml
          8   .
      ,   4   ,
      8   ,   (7). 8   EGF
                                         .
      ,   4   ,
                                                                      NeuN, NSE,   -
            GFAP   (8a, 8b, 8c).   ,   (neuron)
      (astrocyte)   .

                              ,   ,

                    .   ,
                ,   .   ,
                                                          ,   .

(57)

          1.
                      (epidermal growth factor)   (hepatocyte growth factor)
                              .

          2.
    1   ,   5   50 ng/ml   10   100 ng/ml
        4   .
          3.
    2   , 4   8   .
          4.
    2   ,   8
                                                          .
          5.

          6.

          7.
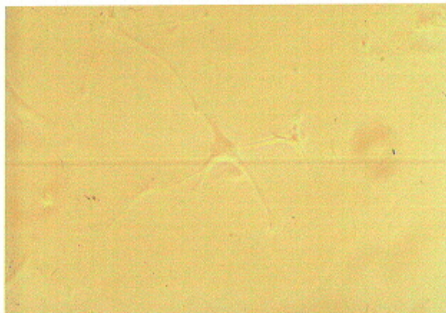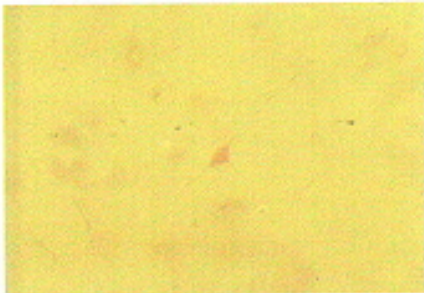   1   ,   (neuron)   (astrocyte)   .
          8.

          9.

          10.
                                                            ,   .
          11.
    10   ,   ,   ,   (Pick's disease),   (Huntington's disease),
                        (amyotriophic lateral sclerosis)   (stroke)
                                                            ,   .

1

2

3a
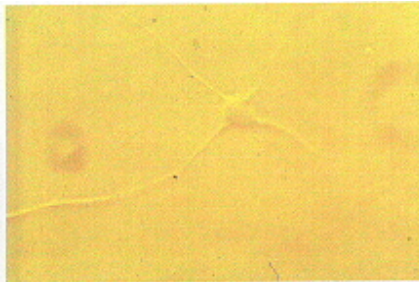
3b

4a

4b

4c

5a

5b

5c

6

7

8a

8b

8c