



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년02월15일
(11) 등록번호 10-0683198
(24) 등록일자 2007년02월08일

(21) 출원번호 10-2006-0002353
(22) 출원일자 2006년01월09일
심사청구일자 2006년01월09일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 주식회사 휴림바이오셀
서울 강남구 논현동 98-6 402

(72) 발명자 김해권
서울 노원구 중계동 435-1 현대아파트 201-1002

강성구
부산 북구 만덕2동 대성아파트 104-1803

도병록
서울 양천구 목동 709-2 목동2차 성원아파트 101-604

김주란
경남 김해시 어방동 화인아파트 205-1603

강희경
경남 거제시 신현읍 장평리 대한아파트 205-1303

(74) 대리인 오국진

(56) 선행기술조사문헌
WO2004081172A2 *
US20050095707 A1
1020050001480

KR1020010099203 A
US6833269 B2
2004081172

* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 안규정

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법 및그에 사용되는 배지

(57) 요약

본 발명은 (a) 신경전구세포(neural progenitor cell)를 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8); 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH); 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 및 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived

neurotrophic factor, BDNF)를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(1차 배양), 및 (b) 단계 (a)에서 얻어진 배양물을 AA; BDNF; 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF); 및 디부티릴 시클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyl cyclic adenosine monophosphate, dcAMP)를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(2차 배양)를 포함하는, 신경전구세포를 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell)로 분화시키는 방법 및 그에 사용되는 배지를 제공한다.

본 발명에 따른 신경전구세포를 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell)로 분화시키는 방법은 높은 분화율로 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시킬 수 있다.

대표도

도 10

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) 신경전구세포(neural progenitor cell)를 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8); 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH); 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 및 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(1차 배양), 및

(b) 단계 (a)에서 얻어진 배양물을 AA; BDNF; 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF); 및 디부티릴 시클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyl cyclic adenosine monophosphate, dcAMP)를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(2차 배양)를 포함하는,

신경전구세포를 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell)로 분화시키는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, (a) 신경전구세포를 20~100 ng/ml의 FGF 8; 200~500 ng/ml의 SHH; 100~300 uM 의 AA; 및 10~20 ng/ml의 BDNF를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(1차 배양), 및

(b) 단계 (a)에서 얻어진 배양물을 100~300 uM 의 AA; 10~20 ng/ml의 BDNF; 2~20 ng/ml의 GDNF; 및 0.5~2 mM 의 dcAMP 를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(2차 배양)를 포함하는,

신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 1차 배양용 N2 배지가 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 uM 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 2차 배양용 N2 배지가 200 uM 의 AA; 20 ng/ml의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM 의 dcAMP를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 1차 배양용 N2 배지가 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 uM 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하고, 상기 2차 배양용 N2 배지가 200 uM 의 AA; 20 ng/ml의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM의 dcAMP를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경전구세포가 바르톤 젤리(wharton's jelly) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 얻어진 세포임을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 신경전구세포가

(a') 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 β -머캅토에탄올; 비필수 아미노산(nonessential amino acid); 글루타민; 및 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 탈분화배지에서 배양하는 단계, 및

(b') 단계 (a')에서 얻어진 배양물을 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF); 염기성 섬유아세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF); 및 N2 보조제(N2 supplement)를 포함하는 N2 배지에서 배양하여 얻어진 세포임을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 탈분화배지가 0.001%의 β -머캅토에탄올; 1X의 비필수 아미노산(nonessential amino acid); 2mM의 글루타민; 및 20%의 FBS를 포함하는 DMEM 배지인 것을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 9.

제7항에 있어서, 단계 (b')에서 사용되는 N2 배지가 20 ng/ml의 EGF; 20 ng/ml의 bFGF; 및 1X의 N2 보조제(N2 supplement)를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법.

청구항 10.

20~100 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8); 200~500 ng/ml의 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH); 100~300 uM 의 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 및 10~20 ng/ml의 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)를 포함하는 N2 배지(A), 및

100~300 uM 의 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 10~20 ng/ml의 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF); 2~20 ng/ml의 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF); 및 0.5~2 mM 의 디부티릴 시클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, dcAMP)를 포함하는 N2 배지(B)

로 이루어진 군으로부터 1 또는 2개 선택된, 신경전구세포(neural progenitor cell)의 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell) 분화용 배지.

청구항 11.

삭제

청구항 12.

제10항에 있어서, 상기 N2 배지(A)가 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 uM 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하는 것을 특징으로 하는 배지.

청구항 13.

삭제

청구항 14.

제10항에 있어서, 상기 N2 배지(B)가 200 uM 의 AA; 20 ng/ml의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM 의 dcAMP 를 포함하는 것을 특징으로 하는 배지.

청구항 15.

제10항에 있어서, 상기 N2 배지(A)가 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 uM 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하고, 상기 N2 배지(B)가 200 uM 의 AA; 20 ng/ml의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM 의 dcAMP 를 포함하는 것을 특징으로 하는 배지.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신경전구세포(neural progenitor cell)를 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell)로 분화시키는 방법 및 그에 사용되는 배지에 관한 것이다.

도파민성 신경(dopaminergic neurons, DA)은 운동 조절(motor control)과 보상 경로(reward pathway)를 포함한 다양한 뇌 조직의 기능을 담당하는 중요한 역할을 한다. 도파민성 신경은 뇌의 여러 곳에 존재하며, 가장 중요한 경로는 중뇌의 흑색질(substantia nigra)과 배측 피개구역(ventral tegmental area)에서 전뇌로 뻗어나가는 경로이다. 도파민성 신경의 발생에는 신경전달물질 특유의 형질의 획득과 유지를 조절하기 위한 여러 가지 전사 인자와 신호들의 복잡한 조합들이 관여한다. 초기에는 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH)와 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8)가 관여하며, Lmx1b 및 nurr1 전사인자도 도파민성 신경의 분화에 중요한 역할을 한다. Pitx3 전사인자와 레티노드(retinod) 합성 효소인 Aldh1도 발생중인 도파민성 신경세포의 중요한 표지 인자이나 그 역할은 자세히 밝혀져 있지 않다.

적절한 배양 조건하에서 다양한 세포들이 도파민성 신경세포로 분화함은 여러 연구를 통해 알려져 있다. 사람의 배아줄기 세포는 스트로말 휘더 셀(stromal feeder cell)과 분화에 관련된 인자들을 순차적으로 처리하여 도파민성 신경세포로 분화 가능성이 밝혀졌다(Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101: 12543-8). 쥐의 중뇌 중간엽 줄기 세포로부터 도파민성 신경세포로 분화시키는 몇 가지 방법이 보고되었다. 이들의 배양배지에는 FGF-2와 글리아 세포계 배지(glial cell conditioned media)를 기본으로 하여 10 % 소태아혈청(fetal calf serum, FCF), 인터루킨-1 (IL-1), IL-11, LIF, 그리고 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)을 첨가하여 저산소 환경에서 배양하였다(Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis L, Wold B, McKay R. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. J Neurosci. 2000 Oct 1;20(19):7377-83). 비슷한 방법을 이용하여, 사람의 중뇌 줄기세포가 도파민성 신경세포로 분화됨이 보고되었다

(Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 2001 Aug;170(2):317-25).

한편, Fu 등은 제대로부터 분리한 바르톤 젤리로부터 중간엽 줄기세포를 얻고, 이를 단계별 배지에서 분화시켜 도파민성 신경 세포로 분화시키는 방법을 개시한 바 있다 (Stem Cells, 2005 Aug 11, Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons in Vitro Potential Therapeutic Application for Parkinsonism). Fu 등에 따른 도파민성 신경 세포로 분화시키는 방법은 중간엽 줄기세포를 10% FBS-DMEM 배지에서 3~6일 배양하고(단계 1), NCM 배지에서만 6~9일간 배양한 후(단계 2), NCM 배지 혹은 10%-FBS-DMEM 배지를 기본으로 SHH(500ng/ml)과 FGF8(100ng/ml) 첨가하여 배양하는 단계(단계 3)를 포함한다. 여기서, NCM 배지(Neuronal Conditioned Medium)는 생후 7일된 스프라그-도울리(Sprague-Dawley) 흰쥐의 뇌를 적출하고, 10% FBS-DMEM을 첨가하여 15번 정도 마쇄 (single cell 이 될 때까지)한 후, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 5일 배양 후 배지를 회수하여 제조한다. 그러나, Fu 등의 방법은 동물세포를 이용한 NCM 배지를 필수적으로 사용함으로써 흰쥐의 병원균에 의해 줄기세포가 감염될 수 있을 뿐 아니라, 도파민성 신경분화율이 12.7%에 불과해 분화율이 너무 낮다는 문제점이 있다.

따라서, 성체 중간엽 줄기세포의 일종인 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)를 도파민성 신경세포로 높은 분화율로 분화시키는 방법이 당업계에 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명자들은 중간엽 줄기세포를 도파민성 신경세포로 분화시키기 위한 방법을 개발하고자 연구를 거듭한 결과, 바르톤 젤리(wharton's jelly) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 신경전구세포(neural progenitor cell)를 얻고, 이를 특정 배지에서 배양할 경우, 높은 분화율로 도파민성 신경세포로 분화한다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 도파민성 신경세포로의 분화를 유도하기 위한 배지를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

본 발명의 일 태양에 따라, (a) 신경전구세포(neural progenitor cell)를 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8); 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH); 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 및 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(1차 배양), 및 (b) 단계 (a)에서 얻어진 배양물을 AA; BDNF; 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF); 및 디부틸릴 시클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, dcAMP)를 포함하는 N2 배지에서 배양하는 단계(2차 배양)를 포함하는, 신경전구세포를 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell)로 분화시키는 방법이 제공된다.

본 발명에 따른 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법에 있어서, 상기 1차 배양용 N2 배지는 20~100 ng/ml의 FGF 8; 200~500 ng/ml의 SHH; 100~300 uM 의 AA; 및 10~20 ng/ml의 BDNF를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 2차 배양용 N2 배지는 100~300 uM 의 AA; 10~20 ng/ml의 BDNF; 2~20 ng/ml의 GDNF; 및 0.5~2 mM 의 dcAMP 를 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 더욱 바람직하게는, 상기 1차 배양용 N2 배지는 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 uM 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하고, 상기 2차 배양용 N2 배지는 200 uM 의 AA; 20 ng/ml 의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM 의 dcAMP를 포함한다.

본 발명에서 도파민성 신경세포로 분화를 유도시키기 위해 기본 배지로 사용되는 N2 배지는 DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle's medium//F-12)로서, 넓은 범위의 동물 세포주의 성장을 보조하는 특성을 갖는다. 따라서, 본 명세서에서는 N2 배지로 기재하고 있으나, N2 배지와 동등한 특성을 갖는 배지를 기본 배지로 사용하는 것도 본 발명의 범위내에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

본 발명에 따른 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시키는 방법에 있어서, 상기 신경전구세포로는 공지된 제조방법으로 얻어진 세포를 사용할 수 있다. 그러나, 생명윤리 문제를 야기하지 않은 성체 줄기세포 즉, 중간엽 줄기세포로부터 얻

어진 신경전구세포가 바람직하게 사용될 수 있으며, 특히 상기 중간엽 줄기세포가 제대로부터 분리할 수 있는 바르톤 젤리(wharton's jelly)로부터 얻어진 것이 바람직하게 사용될 수 있다. 즉, 본 발명에 사용될 수 있는 신경전구세포로는 바르톤 젤리(wharton's jelly) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 얻어진 세포가 바람직하게 사용될 수 있다.

바르톤 젤리(wharton's jelly)라 함은 제대의 혈관을 둘러 싸고 있는 보호 조직을 말하며, 점액질의 연결조직으로 이루어져 있고, 중간엽 줄기세포가 풍부히 존재한다고 알려져 있다(Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003, 21: 50-60).

상기 바르톤 젤리로부터 중간엽 줄기세포를 얻고 이를 신경전구세포로 제조하기 위해서는, 미국특허공개 제2004/0136967호 및 제2005/0148074호에 개시된 방법을 사용하거나, Stem Cells, 2005 Aug 11(Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons in Vitro Potential Therapeutic Application for Parkinsonism)에 개시된 방법을 사용할 수 있다.

본 발명에 사용되는 신경전구세포는 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포로부터 얻어지는 것이 바람직하다. 즉, 상기 신경전구세포는 (a') 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 β -머캅토에탄올; 비필수 아미노산(nonessential amino acid)(예를 들어, L-알라닌; L-아스파라긴; L-아스파틱산; L-글루타민산; 글라이신; L-프롤린; 및 L-세린); 글루타민; 및 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 탈분화배지에서 배양하는 단계, 및 (b') 단계 (a')에서 얻어진 배양물을 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF); 염기성 섬유아세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF); 및 N2 보조제(N2 supplement)(예를 들어, 인슐린; 휴먼 트랜스페린; 프로게스테론; 푸트라신(Putrescine); 및 셀레나이트(Selenite))를 포함하는 N2 배지에서 배양하여 얻어지는 것이 바람직하다.

상기에서, 탈분화배지는 0.001%의 β -머캅토에탄올; 1X의 비필수 아미노산(nonessential amino acid); 2mM의 글루타민; 및 20%의 FBS를 포함하는 DMEM 배지가 바람직하고, 단계 (b')에서 사용되는 N2 배지는 20 ng/ml의 EGF; 20 ng/ml의 bFGF; 및 1X의 N2 보조제(N2 supplement)를 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 다른 태양에 따라, 신경전구세포(neural progenitor cell)의 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell) 분화용 배지가 제공된다.

즉, 본 발명은 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8); 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH); 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 및 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)를 포함하는 N2 배지(A), 및 아스코빈산(ascorbic acid, AA); 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF); 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF); 및 디부티릴 시클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, dcAMP)를 포함하는 N2 배지(B)로 이루어진 균으로부터 1 또는 2개 선택된, 신경전구세포(neural progenitor cell)의 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell) 분화용 배지를 제공한다.

상기 N2 배지(A)는 20~100 ng/ml의 FGF 8; 200~500 ng/ml의 SHH; 100~300 μ M 의 AA; 및 10~20 ng/ml의 BDNF를 포함하는 것이 바람직하며, 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 μ M 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 상기 N2 배지(B)는 100~300 μ M 의 AA; 10~20 ng/ml의 BDNF; 2~20 ng/ml의 GDNF; 및 0.5~2 mM 의 dcAMP 를 포함하는 것이 바람직하며, 200 μ M 의 AA; 20 ng/ml의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM 의 dcAMP 를 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명에 따른 신경전구세포의 도파민성 신경세포 분화용 배지로는 상기 N2 배지(A)가 100 ng/ml의 FGF 8; 200 ng/ml의 SHH; 200 μ M 의 AA; 및 20 ng/ml의 BDNF를 포함하고, 상기 N2 배지(B)가 200 μ M 의 AA; 20 ng/ml의 BDNF; 20 ng/ml의 GDNF; 및 1 mM 의 dcAMP 를 포함하는 것이 특히 바람직하다.

본 발명에 따라, 신경전구세포 특히 바르톤 젤리에서 유래된 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 신경전구세포를 체외에서 높은 분화율로 도파민성 신경세포로 분화시킬 수 있으며, 따라서, 도파민성 신경세포로 분화시켜 이식할 경우 도파민성 신경세포 변성에 의한 질환(예를 들어, 파킨슨 증후군)에 대한 치료제로 이용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

참조예 1. RT-PCR

하기 실시예에서 RT-PCR은 다음과 같이 수행하였다 총 RNA 는 Tri-reagent (MRC사)를 이용하여 각 실험군에서 추출 하였으며, 올리고-dT-프라이머(oligo-dT primer, Promega사)를 이용하여 5 µg의 총 RNA를 cDNA로 합성하였다. 역 전사는 M-MLV 역전사 효소 (Promega사)를 이용하여 42℃에서 1시간, 99℃에서 5분 반응하였다. cDNA는 태그 폴리머 라제(Taq polymerase, Promega사)를 이용하여 35 사이클(cycle)로 증폭시켰다. 증폭된 cDNA는 1% 아가로즈 겔 (agarose gel)에서 분리하였으며 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr) 염색을 통하여 확인하였다. 프라이머의 서열과 그 크기는 표 1과 같다.

[표 1]

유전자	순방향 (5'-3')	역방향 (5'-3')	크기 (bp)
STEM CELL MARKER (줄기세포 마커)			
SCF	ttacaaggcagtgaaaat	ttccaactgaatcatcc	263
C-kit	gtgagccaadgtctatgg	gctctgcagatctctcg	289
Stat-3	tctcctactctgctatcttgag	atgggtctcagagaacacatc	117
NEURAL PROGENITOR CELL MARKER (신경전구세포 마커)			
Nestin	ccagaactcaagcaccac	ttttcactccagccatcc	398
Glypican	tgggaaggcaaaagcag	cagaagacagtgaggagtag	582
ECTODERM CELL MARKER (외배엽 세포 마커)			
Wnt-1	atggggctctgggcgctgttc	cccactcacgctgtgcaggatc	252
Pax-6	agattcagatgaggtcaaa	aattgggtgtagactactgg	313
NEURAL CELL MARKER (신경세포 마커)			
Beta tubulin III	cctgacaattcatctttgg	cagttaggttcatccgtgtt	344
NeuroD1	agtccgccttacggtaccatg	gacagtcactgtaagcacag	448
GFAP	tcatcgctcaggaggtcctt	ctgttccagagatggaggt	383
MBP	acaaggcctcctgactccatcgg	tccggaaccaggtggfctcagcg	263
NEUROTROPHIC FACTOR MARKER (신경영양 인자 마커)			
GDNF	tgggctatgaaccaaggag	atcatccacaccttttagcg	238
BDNF	caccagataaacaatggcagtc	cgacaggtcatcatcaaggcg	335
NGF	atacaggcggaaaccacacgcag	gtccacagtaagtgtcgggtc	174
NT-3	gtatctcatggaggattactgtgg	tgttctctgaagtcagtgctcga	344
GAP-43	aggcaggaagaaggcaaggacgag	tttaccgaaagtgtaggggtggga	781
CNTF	tacaagatcccccgcaatgag	agaagaaatgaaacgaaggtc	150
GAPDH	acaactgtatcgtggaa	aaattcgtgtcataccagg	456

참조예 2. 면역세포화학염색(immunocytochemistry)

하기 실시예에서 면역세포화학적 염색은 다음과 같이 시행하였다. 성체줄기세포가 배양된 커버 슬립(cover slip) 을 0.2% 트리톤 X-100 (Triton X-100)이 포함된 PBS에 10% 정상 염소 혈청(normal goat serum, Sigma사, U.S.A.)를 첨가한 용액에 1시간 동안 실온 처리하여 항체가 특정 단백질에만 결합할 수 있도록 블럭킹하였다. 그 다음 신경세포에 대한 항체인 β-튜블린 III(1:400, Sigma, USA), 별아교세포에 대한 항체인 GFAP(glial fibrillary acidic protein, 1:500, DakoCytomation사, 덴마크), 희돌기아교세포에 대한 항체인 Gal-C(galactocerebroside, 1:50, Chemicon International 사, U.S.A.), 도파민성 신경세포에 대한 항체인 TH(1:250, Vector Lab.사), 콜린성 신경세포에 대한 항체인 ChAT (1:100, Chemicon사)를 일차 항체로 처리하여 4 ℃ 에서 24시간 동안 반응시켰다. 각 조직들을 인산 완충 생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)로 15분씩 3회 세척한 후에 형광이 붙어있는 이차 항체(Cy3-컨쥬게이트드 항-토끼 IgG(Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG) 1:1000, Amersham사), FITC-컨쥬게이트드 항 토끼 IgG(FITC-conjugated goat anti rabbit IgG) (1:128, Sigma) 로 4 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 음성 대조군은 각 군의 절편을 일차 항체를 제외하여 같은 과정을 수행하였다. 형광 표지된 세포들은 형광 현미경(Carl Zeiss Axioskop2+, Germany) 하

에서 관찰하였으며, 도파민성 신경세포의 분화 정도는 β -튜블린 III+ 세포와 TH+ 세포를 표지하여 이중 형광표지된 세포만을 측정하여 분화 정도를 확인하였으며, 콜린성 신경세포의 분화 정도는 β -튜블린 III+ 세포와 ChAT+ 세포를 표지하여 이중 형광 표지된 세포만을 측정하여 분화 정도를 확인하였다.

실시에 1. 사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포의 분리와 배양

바르톤 젤리는 제대에서 분리하였으며 제대의 수집은 미즈 산부인과(김해)에서 이루어졌다. 제대는 멸균된 통에 담긴 PBS에 넣어 분만 후 2시간 이내에 실험실로 운반하여 바로 실험에 사용하였다. 수집된 제대는 멸균된 PBS에서 3회 세척한 후 정맥과 동맥을 제거하고, 남은 결합조직을 항생제(페니실린 100 μ g/ml, 스트렙토마이신 10 μ g/ml, 및 암포테리신 B 250 μ g/ml, Sigma사)가 든 Dulbecco's modified essential media (DMEM, Gibco사)로 옮겨 작은 조각으로 절제하였다. 작은 조각들을 20% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco사)이 포함된 DMEM에 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서

7~10일간 배양하였다. 분리된 바르톤 젤리 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM(low glucose)에서 1×10^5 cells/cm²의 농도로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고, 최초배양 3일 후 배양접시의 바닥에 붙은 세포를 분리하여 일주일 간격으로 계대 배양하였다. 얻어진 바르톤 젤리에서 분리된 세포 모양은 방추상이나 방사선 모양을 가진 중간엽 세포와 각 둥근 세포가 포함되어 있었다(도 1).

실시에 2. 이뮤노피노타이핑(immunophenotyping)

실시에 1에서 분리한 바르톤 젤리가 중간엽 줄기세포임을 확인하기 위하여 이뮤노피노타이핑(immunophenotyping)을 수행하였다. 배양된 세포를 4% 파라포름알데히드로 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 고정하였다. PBS로 세척 후, 3% 과산화수소에서 반응시킨 후 2% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)으로 블럭킹(blocking) 하였다. 준비된 세포는 다음 중 한 가지 항체를 2% BSA가 포함된 PBS용액에 희석배수에 맞춰 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다: 피프로넥틴(1:100), ICAM-1(1:200), 타입 I 콜라겐 (1:50), TRA-1-60 (1:150), 비벤팀(1:200). 반응이 끝난 세포는 바이오틴레이티드 고투트 항-마우스 IgG(biotinylated goat anti-mouse IgG) 혹은 항-토끼 IgG(anti-rabbit IgG) 항체와 반응시켰다. 반응 후, 세포들을 디아미노벤지딘(diaminobenzidine)으로 염색시키고, 캐나다 발삼(Canada balsam)에 임베딩(embedding) 시켰다. 음성 대조군은 1차 항체 대신 PBS로 반응시키고 같은 과정을 수행하였다.

이뮤노피노타이핑(immunophenotyping) 결과, 바르톤 젤리 세포는 중간엽 줄기세포에 특이적인 항원들에 대해 양성반응을 나타냈다(도 2). 바르톤 젤리 세포는 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF) 및 염기성 섬유아세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)를 첨가하여 낮은 농도(약 1X10/ml)로 배양하면 콜로니가 형성됨을 관찰하였다(도 3).

실시에 3. 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포의 신경분화 유도

바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포가 신경세포로 분화하는지를 확인하기 위하여 3단계의 배지(탈분화배지, 전분화배지, 신경분화배지)를 통해 바르톤 젤리 세포를 신경세포로 분화시켰다. 분리 배양한 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 트립신 처리하여 수집한 뒤 폴리-D-오르니틴/라미닌(poly-D-ornithine/laminin)이 코팅된 배양 접시(culture dish)에 1×10^4 cells/cm²의 밀도로 분주하여 배양하여, 0.001% β -머캅토에탄올, 1X 비필수 아미노산(nonessential amino acid, 조성(mg/L): L-알라닌 890.00; L-아스파라긴 1,320.00; L-아스파틱산 1,330.00; L-글루타민산 1,470.00; 글라이신 750.00; L-프롤린 1,150.00; 및 L-세린 1,050.00), 2mM 글루타민(glutamine), 20% FBS가 첨가된 DMEM 배지(low glucose)에서 1~3일 동안 탈분화시켰다(탈분화배지). 탈분화된 줄기세포를 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 1X N2 보조제(N2 supplement, Gibco사 (조성(ug/ml): 인슐린 500; 휴먼 트랜스페린 10,000; 프로그스테론 0.63; 푸트라신(Putrescine) 1,611; 및 셀레나이트(Selenite) 0.52))가 첨가된 N2 배지에서 24시간 배양하여 신경전구세포로 분화시킨 후(전분화배지), 1X N2 보조제, 2% DMSO, 200 μ M BHA가 첨가된 N2 배지에서 5시간 분화시킨 후, 1X N2 supplement, 2% DMSO, 200 μ M BHA, 25mM KCl, 2mM 발프로산(valproic acid), 1 μ M 히드록시코르티손(hydroxycortison)을 첨가한 N2 배지(신경분화배지)에서 3~7일간 추가 배양하였다.

상기와 같이 처리함으로써, 사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포는 신경세포와 유사한 모양의 형태적 변화를 일으켰다(도 4). 형태적으로 변화한 세포가 신경세포임을 확인하기 위해, 면역세포화학적 염색(참조예 2)을 실시하였다. 신경세포 특이적 항체인 β -튜블린 III, 별아교세포의 특이적 항체인 GFAP, 희돌기아교세포에 대한 항체인 Gal-C가 양성반응을 나타내었다.(도 5). 사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포의 분화율은 신경세포가 약 40%, 별아교세포가 약 15%, 희돌기아교세포가 약 12%(도 6)로 나타났다.

사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포의 신경 분화를 확인하기 위해 참조예 1에 따라 RT-PCR을 수행한 결과(도 7), 줄기세포 표지인자인 SCF와 Stat-3는 탈분화 배지에서만 발현이 되었으며, 신경 전구 세포 특이 표지인자로 사용된 네스틴(nestin)은 전분화 배지에서 강하게 발현되고 분화배지에서 발현이 줄어드는 양상을 나타내었다. 신경세포의 표지 인자인 NeuroD1, GFAP, MBP의 발현은 분화배지에서 강하게 발현되었다. 이러한 결과는 바르톤 젤리 세포는 탈분화배지에서 배양 후 줄기세포의 특성을 가지게 되었으며 전분화배지에서 배양되면서 신경전구세포의 특성을 가지게 되고, 다시 신경분화배지에서 배양되면서 신경세포로 분화 하였음을 나타낸다.

실시에 4. 도파민성 신경세포 분화 유도

분리 배양한 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 폴리-D-오르니틴/라미닌(poly-D-ornithine/laminin)이 코팅된 배양 접시(culture dish)에 1×10^4 cells/cm²의 밀도로 분주하여 배양하고, 0.001% β-머캅토에탄올, 1X 비필수 아미노산(nonessential amino acid), 2mM 글루타민(glutamine), 20% FBS가 첨가된 DMEM 배지(low glucose)에서 1~3일 동안 탈분화시켰다(탈분화배지). 탈분화된 줄기세포를 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 1X N2 보조제(N2 supplement, Gibco사(조성(ug/ml): 인슐린 500; 휴먼 트랜스페린 10,000; 프로그스테론 0.63; 푸트라신(Putrescine) 1,611; 및 셀레나이트(Selenite) 0.52))가 첨가된 N2 배지(전분화배지)에서 24시간 배양하여 신경전구세포로 분화시켰다. 100 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 8(fibroblast growth factor 8, FGF 8, R&D사), 200 ng/ml 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH, R&D사), 200 μM 아스코빈산(ascorbic acid, AA, Sigma 사), 20 ng/ml 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF, Gibco사)를 첨가한 N2 배지에서 7~9일간 배양한 후, 200μM AA, 20 ng/ml BDNF, 20 ng/ml의 글리아 세포계 유래 신경영양 인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF, Gibco사), 1 mM 디부티릴 시클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, dcAMP, Sigma사)가 첨가된 N2 배지에서 도파민성 신경세포로 분화를 유도하였다.

사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 신경분화배지에서 신경 분화를 유도한 뒤 도파민성 신경에 특이적 항체인 TH와 콜린성 신경에 특이적인 항체인 ChAT를 이용하여 면역세포화학적 염색을 수행하였다(참조예 2). 이들 항체에 양성 반응을 보인 세포들은 각각 $6.3 \pm 1\%$, $4.2 \pm 0.8\%$ 였다(도 8). 이들 세포를 도파민성 신경분화 배지에서 분화를 유도한 뒤에는 전체의 세포 중 49 ± 4.9 가 β-tubulin 항체에 양성 반응을 나타냈고 이 양성반응을 나타낸 세포 중 $75.2 \pm 5.4\%$ 가 TH에 양성반응을 나타냈다(도 9). 이를 통해 일반 신경분화 배지에서보다 도파민성 신경 분화배지에서의 도파민성 신경 분화율이 유의하게 높음을 알 수 있다(도 10).

실시에 5. 뇌 조직 체외배양

생후 5일된 흰쥐를 경추 탈골로 희생시켜 곧 바로 뇌조직을 적출하여 생체미세절단기(1500, The Vibratome Company)를 이용하여 400 μm의 두께로 절단하였다. 각 조직을 0.4 μm Millicell culture insert (Millipore, MA, USA)에 얹어 1ml의 배양배지가 담긴 6-웰 배양접시에 넣어 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 세포를 이식하기 전 3일간 배양하였다. 배양배지의 조성은 100 ml basal Eagle medium (with Earle's salts), 50 ml Earle's balanced salt solution (Gibco사), 50 ml heat-inactivated horse serum (Gibco사), 1 ml 200 mM L-글루타민, and 2 ml 50 % 글루코오즈 (Sigma사)이다.

흰쥐의 뇌절편에 이식할 중간엽 줄기세포를 표지 하기 위해 PKH26을 사용하였다. 냉동 보관된 세포를 녹인 뒤 세척하여 DMSO를 제거한 후 0.4% 트리판 블루(trypan blue) 용액으로 생존률을 검사한 뒤 1×10^7 cells/ml이 되도록 1ml의 희석 용액(diluent solution, Sigma사, U.S.A.)에 희석하였다. 세포막에 결합하여 붉은색의 형광을 띄는 4μM의 PKH26 (Sigma사, U.S.A.) 2μl와 잘 혼합한 뒤 5분간 상온에서 배양하고 PBS로 3회 세척하였다. 표지된 세포는 로다민(rhodamine) 필터를 통해 관찰이 가능하다.

형광 표지한 세포를 DMEM 배지에 1×10^4 cells/5μl가 되도록 준비한 다음 뇌 절편에 이식하였다. 세포를 이식한 뇌 절편은 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 10일간 배양하였으며 이때 도파민성 신경 분화 배지를 사용하여 이식된 세포가 도파민성 신경세포로 분화하도록 유도하였다. 10일 후 도파민성 신경세포에 대한 항체(TH)로 면역세포화학염색(참조예 2)을 시행하였다. 형광 표지된 세포들은 형광 현미경(Carl Zeiss Axioskop2+, Germany) 하에서 관찰하였으며, 도파민성 신경세포로의 분화 정도는 PKH26과 TH가 이중 형광 표지된 세포만을 측정하여 분화를 확인하였다.

상기와 같이 처리한 결과(도 11), 이식된 중간엽 줄기세포는 뇌 조직 내에서 생존해 있었으며, 그 중 일부는 신경세포로 분화하였음을 면역세포화학염색법을 통해 확인할 수 있다.

발명의 효과

본 발명에 따른 신경전구세포를 도파민성 신경세포(dopaminergic neural cell)로 분화시키는 방법은 높은 분화율로 신경전구세포를 도파민성 신경세포로 분화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 헤마톡실린과 에오신으로 염색한 사진이다(A 와 C는 40 배율이고 B와 D는 100 배율이다).

도 2는 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포의 형태와 이뮤노피노타이핑(immunophenotyping) 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 바르톤 젤리 유래 제대혈 중간엽 줄기세포의 콜로니 형성사진이다.

도 4는 신경 세포로 분화하는 동안 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포의 형태를 관찰한 사진이다. A는 분화 시키기 전 세포의 모양이고, B는 세포를 20 ng/ml bFGF 및 EGF 를 첨가시킨 배양액에서 24시간 배양했을 때의 세포의 형태이고, C는 신경분화배지에 1.5일 키운 사진이다.

도 5는 뉴론, 별아교세포, 희돌기아교세포에 특이적인 항체를 이용하여 면역세포화학염색을 수행한 사진이다. (A) 뉴론의 특이적 항체인 β -튜블린 III 에 양성 반응을 나타내고 축색돌기와 수상돌기가 뻗은 뉴론 같은 형태를 가지고 있다. (B) 별아교세포의 특이적 항체인 GFAP에 양성반응을 나타낸 세포들이다. (C) 희돌기아교세포에 특이적 항체인 Gal-C에 양성반응을 보이며 희돌기아교세포의 특징적인 형태를 나타낸다.

도 6은 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포에서 유도된 신경적 세포 분화의 분화율을 나타낸 그래프이다. 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 1.5일 동안 신경분화배지에서 키운 뒤 신경세포, 별아교세포, 희돌기아교세포의 분화율을 측정하였다. 사선무늬의 막대: 신경세포 분화율, 굵은 사선 무늬 막대: 별아교세포 분화율, 점선 무늬 막대: 희돌기아교세포 분화율.

도 7은 중간엽 줄기세포의 신경 분화 단계에서 다양한 신경적 유전자의 발현양상을 나타낸 그림이다.

도 8은 신경분화 배지에서 키운 세포에서 도파민성 뉴론과 콜린성 뉴론의 특이적인 항체를 이용한 면역세포화학염색을 수행한 사진이다. 녹색 형광은 신경세포 특이적 항체인 β -튜블린 III (A, D)를 나타내고 붉은색 형광은 도파민성 뉴론에 특이적 항체인 TH (B)와 콜린성 뉴론의 특이적 항체인 ChAT (E)를 나타낸다. C와 F는 앞의 두 사진을 각각 겹친 사진이다.

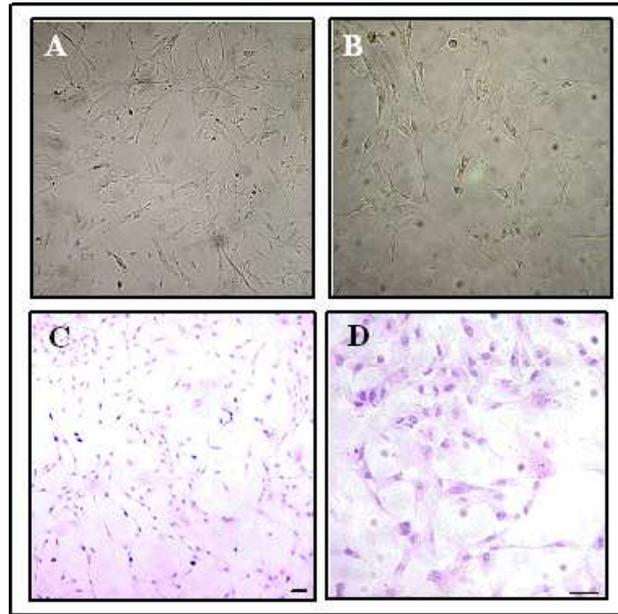
도 9은 도파민성 신경 유도 배지에서 20일 배양한 뒤 도파민성 뉴론의 특이적인 항체를 이용한 면역세포화학염색을 수행한 사진이다. 위상차 현미경 사진은 (A, E, I) 로 세포가 둥근 세포체를 가지고 매우 가는 축색돌기와 수상돌기가 뻗어 나감을 나타낸다. 녹색 형광은 신경세포 특이적 항체인 β -튜블린 III (B, F, J)를 나타내고 붉은색 형광은 도파민성 뉴론에 특이적 항체인 TH (C, G, F) 를 나타낸다. D, H, L 은 앞의 두 사진을 각각 겹친 사진이다.

도 10은 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 20일간 도파민성 뉴론으로 유도시킨 뒤 분화율을 측정한 그래프이다. 도파민성 신경 유도배지에서 키운 세포(B)의 도파민성 뉴론 분화율이 (A)의 신경분화 유도배지에서 유도된 도파민성 뉴론 분화율 보다 9배 정도 높게 나타났다. 반면 신경분화 유도배지에서 배양한 경우 콜린성 뉴론의 분화율은 감소하였다.

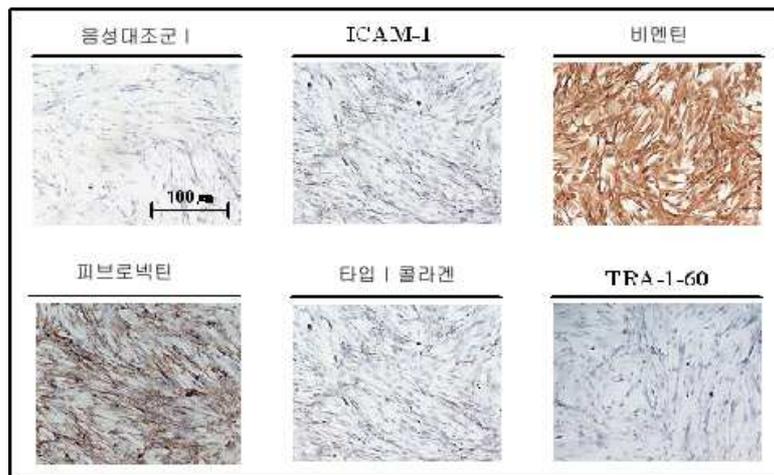
도 11은 생후 5일째의 흰쥐의 뇌 절편에 사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포를 이식하여 도파민성 뉴론으로 분화를 시킨 면역조직화학 염색 사진이다. (A) PKH26이 표지된 사람의 바르톤 젤리 유래 중간엽 줄기세포, (B) 도파민성 뉴론에 특이적 항체인 TH, (C) 앞의 두 사진을 겹친 사진이다.

도면

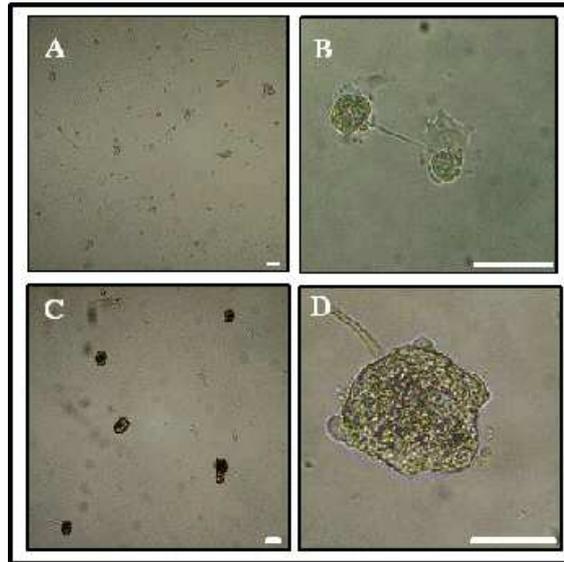
도면1



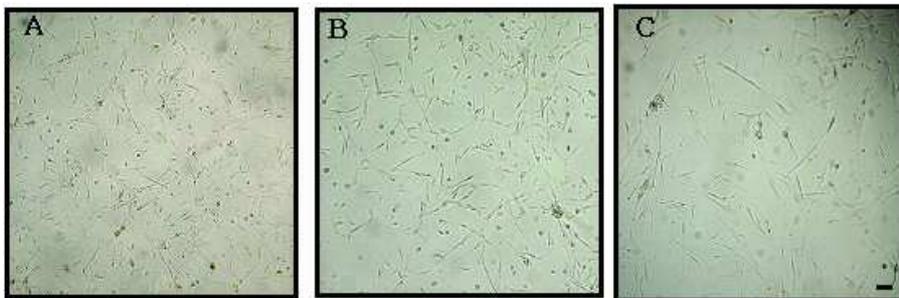
도면2



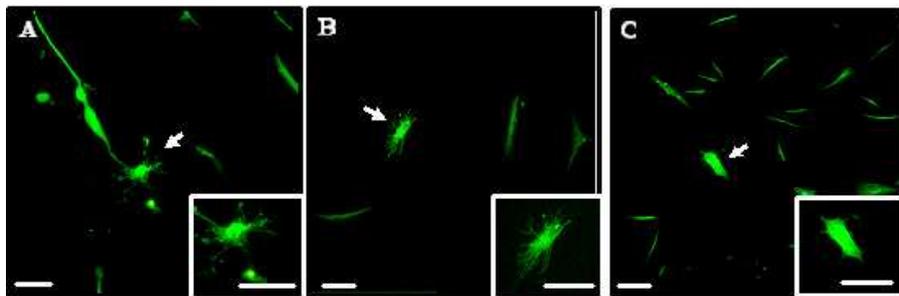
도면3



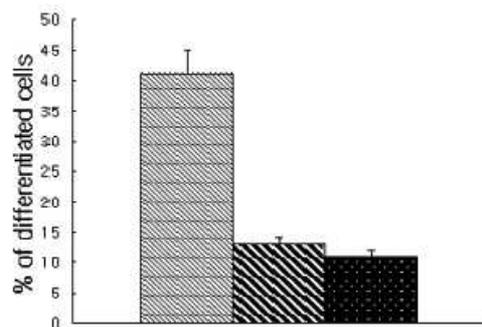
도면4



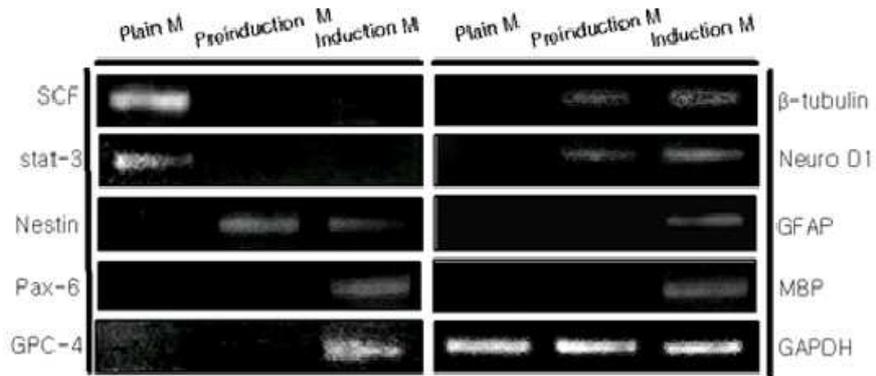
도면5



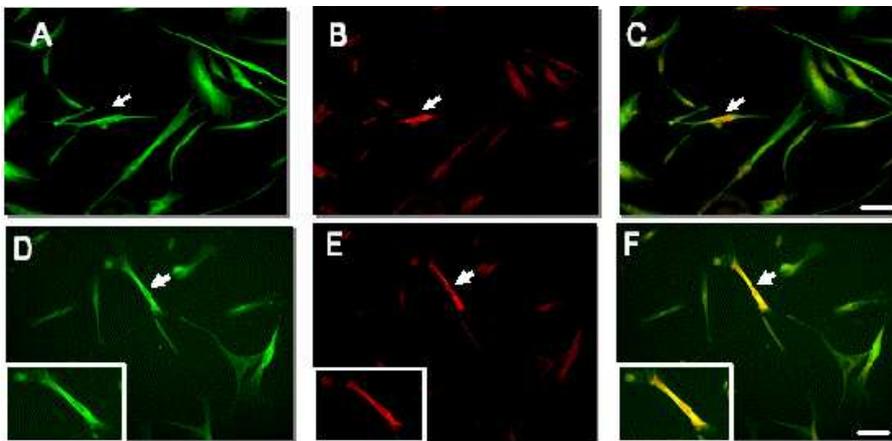
도면6



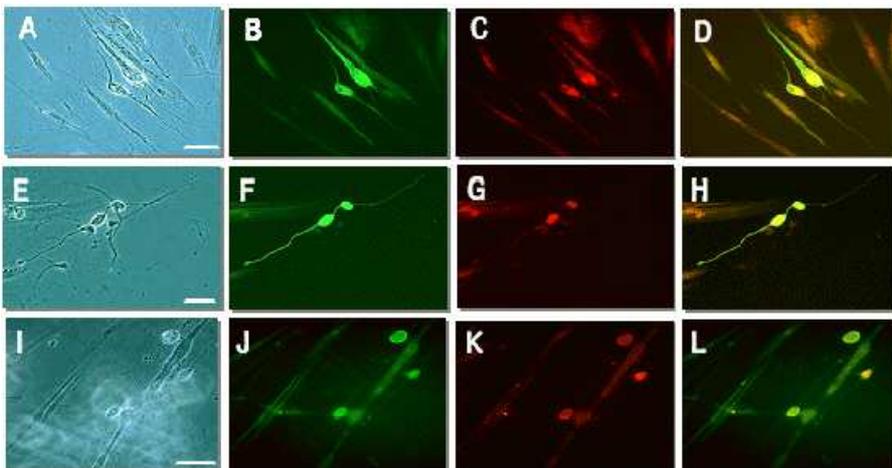
도면7



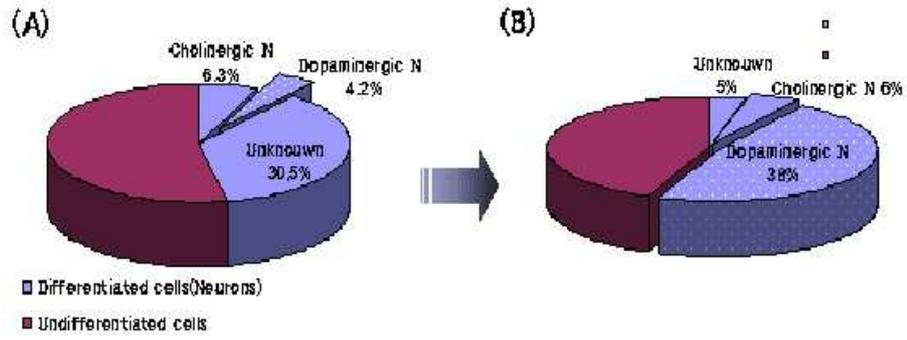
도면8



도면9



도면10



도면11

