

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 10월 3일 (03.10.2019) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2019/190175 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 5/0793 (2010.01) *A61P 21/00* (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/003520

(22) 국제출원일: 2019년 3월 26일 (26.03.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0034779 2018년 3월 26일 (26.03.2018) KR
10-2019-0034176 2019년 3월 26일 (26.03.2019) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]: 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박세영 (**PARK, Saeyoung**); 07005 서울시 동작구 사당로17길 52, 2동 1102호, Seoul (KR). 정성철 (**JUNG, Sung Chul**); 06712 서울시 서초구 명달로4길

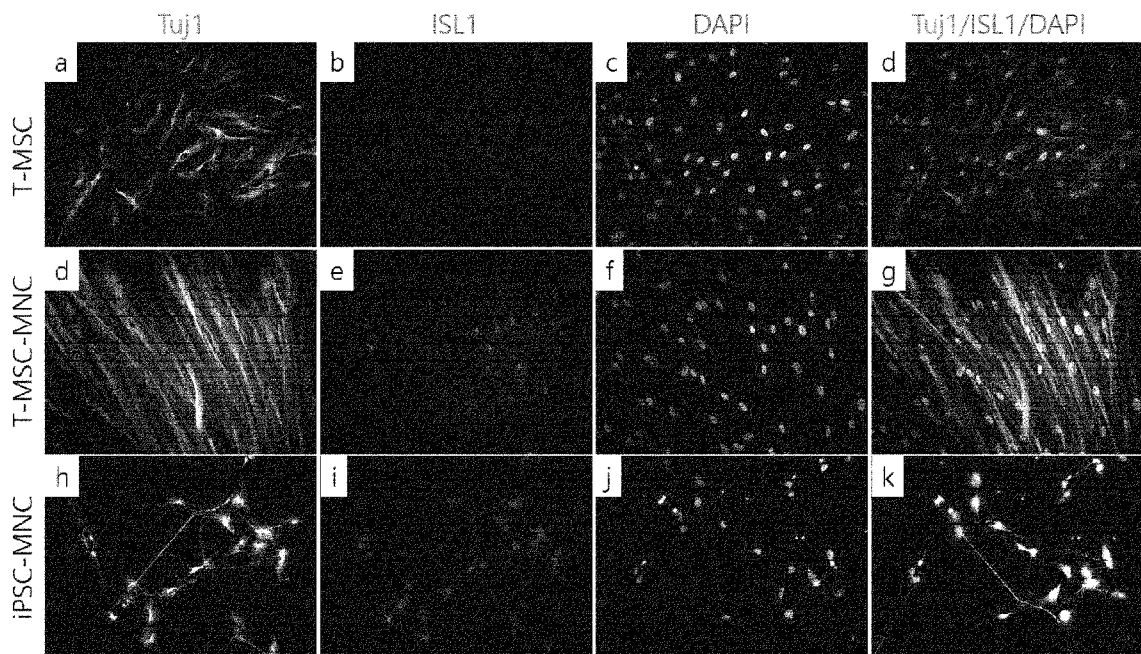
68, A동 502호, Seoul (KR). 명서하 (**MYUNG, Seo-ha**); 06347 서울시 강남구 광평로51길 27, 401동 311호, Seoul (KR). 정수연 (**JUNG, Soo Yeon**); 04205 서울시 마포구 만리재옛길 75, 302호, Seoul (KR). 김지연 (**KIM, Jiyeon**); 07792 서울시 강서구 강서로 429, A동 1022호, Seoul (KR). 정남희 (**JUNG, Namhee**); 07270 서울시 영등포구 양산로7길 3, 418호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (**CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM**); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: METHOD FOR DIFFERENTIATING MOTOR NEURONS FROM TONSIL-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 발명의 명칭: 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포의 분화방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for differentiating motor neurons from tonsil-derived mesenchymal stem cells, and a cell therapy agent using same. The differentiation method of the present invention exhibits high differentiation potency into motor neurons, and thus enables a large quantity of motor neurons to be secured. Since cells which are differentiated according to the present invention are obtained using discarded tonsillar tissues, there are fewer ethical issues in tissue collection, and quantitative acquisition is easy, thus applicability as a cell therapeutic agent is excellent.

[다음 쪽 계속]

WO 2019/190175 A2

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별
도 공개함 (규칙 48.2(g))

(57) 요약서: 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에
관한 것이다. 본 발명의 분화 방법은 운동신경세포로의 높은 분화능을 보여 다량의 운동신경세포의 확보가 가능하
며, 본 발명에 따라 분화된 세포는 버려지는 편도 조직을 사용함으로써 조직 수득에 윤리적인 문제가 적고 양적
확보도 용이하여 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

명세서

발명의 명칭: 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포의 분화방법

기술분야

- [1] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되고, 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있는 특성이 있으며, 분화 자극에 따라 상이한 세포로도 분화될 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.
- [3] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포이며, 일부 줄기세포는 다분화능 또는 단분화능의 잠재력을 지닌다.
- [4] 상기 줄기세포들이 가지는 분화능을 기초로 세포 치료제로 이용 가능성이 있어 이와 관련된 연구 개발이 활발히 진행중이다. 하지만, 배아 줄기세포를 이용한 세포 치료제의 경우 윤리적 문제나 조직 적합성 불일치 문제가 제기되고 있으며, 역분화 줄기세포를 세포 치료제로 사용할 경우 종양 발생 가능성의 문제가 있다.
- [5] 이에 따라, 분화능이 낮은 것으로 알려져 있지만 상대적으로 안전한 중간엽 줄기세포를 이용한 연구가 많이 진행되고 있다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)는 성체 골수 등에 있는 multi-potential non-hematopoietic progenitor cell로서 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 이러한 중간엽 줄기세포를 이용하여 다양한 조직 재생을 위한 임상 연구가 진행되고 있으며, 장기이식 분야에도 적용가능성을 보이고 있다.
- [6] 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이다. 하지만 가장 비침습적인 방법인 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이

원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다.

- [7] 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 증식능력이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다.
- [8] 한편, 선천적, 유전적으로 운동신경세포의 결손을 가지고 있거나, 후천적으로 신경조직이 손실된 운동신경과 관련된 질환에 대해서 줄기세포를 이용하여 관련 질환을 치료하려는 연구 개발이 진행되고 있다. 일 예로, 혈관내피성장인자가 과발현된 신경 줄기세포를 루게릭병 동물 모델에 이식한 결과, 루게릭병의 발병시기가 늦춰지고 운동기능이 크게 호전되었다는 연구 결과가 보고된 바 있다. 또한, 지방이나 골수에서 추출한 줄기세포를 혈관내피성장인자와 함께 이식하는 방법으로 루게릭병을 치료하려는 연구들이 이루어지고 있다. 다만, 혈관내피성장인자는 크기가 너무 커서 혈관의 관문을 통과하지 못하고, 반감기가 짧아 단기간에 소멸되어, 이를 이용한 줄기세포 치료제는 치료 효율 면에서 그 이용이 매우 제한적이다.
- [9] 이에 따라, 운동신경세포로의 높은 분화능을 보일 수 있는 특정 줄기세포로부터 최적의 분화 방법을 확인하여 인체 적용에 적합한 운동신경세포를 확보하는 방안에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.
- [10] [선행기술문헌]
- [11] [특허문헌]
- [12] (특허문헌 1) 국제공개특허 제WO2017/135753호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명은 DMEM, FBS, N_2 보충물, 레티노산, 뇌유래신경성장인자, 신경성장인자 및 소닉 헤지호그를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화한 전구세포로부터 운동신경세포로 분화시키기 위한 분화배양액 배지 조성물에 관한 것이다.
- [14] 본 발명은 또한 상기 분화 배지 조성물을 이용한 운동신경세포로의 분화 방법에 관한 것이다.
- [15] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 운동신경세포에 관한 것이다.
- [16] 본 발명은 또한 상기 운동신경세포를 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [17] 본 발명자들은 인체 적용에 적합한 운동신경세포의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 편도 유래 중간엽 줄기 세포로부터 운동신경세포를 단기간에 대량 생산하는 방법을 발명하여 본 발명을 완성하였다.

- [18] 본 발명의 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS, N₂ 보충물(supplement), 레티노산, 뇌유래신경성장인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 소닉 헤지호그 (sonic hedgehog, SHH)를 포함하는, 줄기세포 또는 전구세포로부터 운동신경세포(motor neuron)로 분화시키기 위한 분화배양액 배지 조성물을 제공한다.
- [19] 상기 운동신경세포를 유도하는데 사용되는 분화배양액 배지는 바람직하게는, 저농도 글루코스 DMEM, 0.25 내지 25%(w/v) FBS, 0.1 내지 10%(w/v) N₂ 보충물, 0.1 내지 10 μ M 레티노산, 1 내지 100 ng/ml 뇌유래신경영양인자, 1 내지 100 ng/ml 신경성장인자 및 0.01 내지 1 ng/ml 소닉 헤지호그를 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는, 저농도 글루코스 DMEM, 2.5%(w/v) FBS, 1%(w/v) N₂ 보충물, 1 μ M 레티노산, 10 ng/ml 뇌유래신경영양인자, 10 ng/ml 신경성장인자 및 0.1 ng/ml 소닉 헤지호그를 포함할 수 있다.
- [20] 상기 분화배양액 배지에 있어서, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)은 일반적으로 고농도 글루코스 DMEM을 사용하나, 본 발명과 같이 저농도의 글루코스 DMEM을 사용하면 세포의 증식(proliferation 또는 growth) 상태를 정지시키고, (분화를 개시시키기 위한) 세포에게 생존만을 위한 최소한의 환경을 만들어 주어 분화의 효율 및 방향성을 증가시킬 수 있다.
- [21] 상기 분화배양액 배지에 있어서, N₂ 보충물(N₂ supplement)은 B27 supplement이 포함하는 Biotin, l-carnitine, Corticosterone, Ethanolamine, d(+)-galactose, Glutathione (reduced), Linolenic acid, Linoleic acid, Retinyl acetate, Selenium, T3 (triiodo-L-thyronine), dl- α -tocopherol (vitamine E), dl- α -tocopherol acetate, Catalase 및 Superoxide dismutase 등을 함유하지 않아 운동신경세포로의 특이적인 분화의 개시를 유도할 수 있다.
- [22] 상기 분화배양액 배지에 있어서, 뇌유래신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)란 뇌신경세포의 발생, 성장, 기능의 유지 및 신경가소성 등에 관여하는, 주로 뇌에 존재하는 신경영양인자의 일종을 의미한다.
- [23] 상기 분화배양액 배지에 있어서, 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)는 신경조직의 분화 및 성장 활성화에 관여하는 사이토카인성 펩타이드 인자를 의미한다.
- [24] 본 발명의 분화배양액 배지는 통상적으로 줄기세포의 증식에 사용되는 배지와는 달리 낮은 농도의 글루코스 DMEM 및 FBS를 포함하고, 기존의 줄기세포 배양 배지와 비교하여 현저한 분화 효과를 가진다. 특히, 본 발명의 운동신경세포를 유도하는데 사용되는 분화배양액 배지는 구체적인 성분으로 저농도 글루코스 DMEM, FBS, N₂ 보충물(supplement), 레티노산, 뇌유래신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 소닉 헤지호그 (sonic hedgehog, SHH)를 모두

포함하는 구성을 가지는데, 상기 모든 성분들을 포함하는 분화배양액 배지는 일부 성분이 결여된 배지에 비해 현저한 운동신경세포 분화 효과를 가진다.

[25] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화한 전구세포를 상기 분화 배지 조성물에서 배양하여 운동신경세포를 유도하는 단계를 포함하는 운동신경세포로의 분화 방법을 제공한다.

[26] 본 발명의 분화 방법에 있어서, 상기 배양은 2 내지 4주 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[27] 본 발명에 있어서, 운동신경세포 (motor neuron)란 신경세포에 있어서 그 신경 돌기가 운동 신경이 되어 골격근을 지배하는 전세포질의 신경세포체로서, 운동뉴런이라고도 하며, 주로 대뇌 겉질의 운동야와 척수 전각에 존재한다. 구체적으로, 척수 전각 세포까지를 상위 운동신경세포(운동뉴런)이라고 하고, 척수 전각 세포 이하를 하위 운동신경세포(운동뉴런)이라고 한다.

[28] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.

[29] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 다른 조직 유래 중간엽 줄기세포와 비교하여 신경전구세포의 마커인 비멘틴(vimentin)의 발현율이 높은 것이다.

[30] 상기 다른 조직 유래의 중간엽 줄기세포는 제한되지 않으나, 바람직하게는 지방 유래 중간엽 줄기세포(AdMSC), 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC), 제대 유래 또는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(예를 들어, 와튼젤리 유래 중간엽 줄기세포(WJ-MSC))를 포함하며, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 다른 조직 유래의 중간엽 줄기세포와 비교하여 신경전구세포의 마커인 비멘틴(vimentin)의 발현율이 10% 이상, 바람직하게는 30% 이상 높은 것을 특징으로 한다.

[31] 본 발명에 있어서, 전구세포란 특정 세포의 형태 및 기능을 갖추기 전 단계의 세포로서, 구체적으로 신경전구세포(neural precursor)란 중추신경계를 구성하는 신경세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포 등의 신경세포로 분화할 수 있는 전구세포를 의미한다.

[32] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화한 전구세포는 다른 조직 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화한 전구세포와 비교하여 뉴런-특이 마커(Neuron-specific marker)인 Tuj1의 발현율이 높은 것이다.

[33] 상기 다른 조직 유래의 중간엽 줄기세포는 제한되지 않으나, 바람직하게는 지방 유래 중간엽 줄기세포(AdMSC), 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC), 제대 유래 또는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(예를 들어, 와튼젤리 유래 중간엽

줄기세포(WJ-MSC))를 포함하며, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화한 전구세포는 다른 조직 유래의 중간엽 줄기세포로부터 분화한 전구세포와 비교하여 뉴런-특이 마커(Neuron-specific marker)인 Tuj1의 발현율이 10% 이상, 바람직하게는 30% 이상 높은 것을 특징으로 한다.

- [34] 본 발명의 분화 방법은, 상기 운동신경세포를 유도하기 위한 전 단계로서, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [35] 상기 세포 응집체를 형성하는 단계에서의 증식배양액 배지는 FBS, 페니실린/스트렙토마이신, β -머캅토에탄올 및 비필수아미노산을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 증식배양액 배지는 5 내지 20%(w/v) FBS, 0.5 내지 2%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신, 0.05 내지 0.2 mM β -머캅토에탄올 및 0.5 내지 2%(w/v) 비필수아미노산을 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는, 10%(w/v) FBS, 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신, 0.1 mM β -머캅토에탄올 및 1%(w/v) 비필수아미노산을 포함할 수 있다.
- [36] 상기 증식배양액 배지에 포함되는 성분들 중 상기 비필수아미노산은 체내에서 대사적으로 합성되지 않는 아미노산으로, 구체적으로 글리신, L-알라닌, L-아스파르트산, L-아스파라진, L-글루탐산, L-프롤린 또는 L-세린 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 상기 단계에서 사용된 증식배양액 배지의 종류로는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640), MEM(Minimum Essential Media) 또는 Ham F10 으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 구체적으로 상기 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지이다.
- [38] 상기 단계에 있어서, 상기 세포 응집체 형성은 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine)이 코팅된 배양 접시에서 배양액 10 ml 당 5×10^6 내지 7×10^6 개의 세포를 부유 상태에서 1 내지 7일 동안 배양하여 수행될 수 있다. 세포 응집체의 유도는 줄기세포사이의 상호작용을 증대하고, 배아체(embryonic body)와 유사한 형태를 제조함으로써 이로부터 운동신경세포를 보다 더 적절하게 유도하기 위해 진행된다.
- [39] 본 발명의 분화 방법에 있어서, 상기 세포 응집체를 형성하는 단계 수행 후 운동신경세포를 유도하는 단계의 수행 전, 형성된 세포 응집체를 1 내지 3세대까지 계대배양하여 신경전구세포(neural precursor)로 분화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 계대배양이란 세포, 구체적으로 줄기세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 세포의 대를 계속 이어서 배양하는 방법으로서, 배양용기를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 의미한다. 한 차례 배양용기 교체 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1계대라고 한다. 본 발명에서 상기 계대는 세대와 혼용되어 사용될 수 있다.

- [41] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 운동신경세포 분화 방법에 따라 제조된 운동신경세포를 제공한다.
- [42] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 운동신경세포는 다른 줄기세포로부터 분화된 운동신경세포와는 발현하는 마커의 강도 및 분화된 운동신경세포의 모양에서 차이를 갖는다(도 5a 내지 5c).
- [43] 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포는 ISL1 (insulin gene enhancer protein), HB9 (homeobox protein) 또는 ChAT (choline acetyltransferase)의 발현이 증가하는 특성을 나타낸다.
- [44] 상기 ISL1 (insulin gene enhancer protein)이란 운동신경의 생성 및 분화에 작용하는 인자로서, 운동신경세포의 대표적인 마커이다.
- [45] 상기 HB9 (homeobox protein)는 발달 중인 척추동물의 중추신경계 운동신경세포에서 선택적으로 발현되며, 분열 후(post-mitotic) 모토뉴런의 정체성을 확립하는 데 필수적인 기능을 가지고 있다고 알려져 있다. 그러나 최근에는 중추신경계 혹은 말초신경계를 막론하고 줄기세포로부터 운동신경으로의 분화와 성숙을 확인하는 필수적인 마커이다.
- [46] 상기 ChAT (choline acetyltransferase)이란 아세틸 조효소 A (acetyl CoA)에 붙어 있는 아세트산 이온을 콜린과 결합시켜 아세틸콜린을 생성하는 효소로서, 운동신경세포의 대표적인 마커이다.
- [47] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포에 대해 PCR, 면역 형광분석 및 웨스턴블롯팅을 통해 ISL1, HB9 및 ChAT 발현을 분석한 결과, 2주 이상 분화된 운동신경세포는 운동신경세포의 대표적 마커인 ISL1, HB9 및 ChAT의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [48] 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포는 아세틸콜린의 분비가 증가하는 특성을 나타낸다. 추가적으로, 위와 같은 특성을 나타내는 운동신경세포는 골격근세포와 공배양하여 근신경접합부 (neuromuscular junction)의 형성이 가능한 특성을 나타낸다.
- [49] 상기 아세틸콜린은 시냅스 전 뉴런의 축삭돌기 말단에 있는 시냅스 소포에서 분비되어 시냅스 틈을 통과하고, 이후 시냅스 후 뉴런에 결합해 신경 신호를 전달하는, 신경말단에서 분비되는 근신경접합부의 신경전달물질로서, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포에서 아세틸콜린의 분비가 증가함을 확인하였다. 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포와 골격근세포를 공배양한 결과, 아세틸콜린 수용기가 발현됨을 확인하였다.
- [50] 상기 아세틸콜린 수용기는 본 발명의 운동신경세포에서 분비된 아세틸콜린을 수용하기 위해 발현된 것으로서, 본 발명의 운동신경세포는 골격근세포와 공배양하여 근신경접합부가 형성되어 아세틸콜린을 매개로 한 정상적인 신경 신호 전달 시스템을 구축할 수 있다.
- [51] 상기 근신경접합부는 운동신경과 근섬유의 접촉 시 화학적 시냅스를 형성한

것으로 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 운동신경세포는 골격근세포(SKMC)와 공배양시 아세틸콜린 클러스터가 형성되어(도 8 참조), 근신경접합부의 형성이 확인되었는바, 다른 중간엽 줄기세포로부터 분화시키는 경우와 비교하여 보다 기능성을 가진 운동신경세포로 분화시킬 수 있는 장점을 갖는다.

- [52] 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포는 1 내지 3세대까지 계대배양이 가능하고, 동결 후 용해하여 사용이 가능하다. 따라서, 본 발명의 운동신경세포는 계대배양하여도 재현성이 우수한 특성을 나타내고, 장시간 보관 후에도 정상적인 운동신경세포로서 사용이 가능한 특성을 나타낸다.
- [53] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 운동신경세포를 유효성분으로 포함하는 신경질환 (Neurological disorder)의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [54] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 운동신경세포를 포함하는 세포치료제를 제공한다.
- [55] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 신경질환을 예방 또는 치료하기 위한 상기 조성물의 약제학적 용도를 제공한다.
- [56] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 운동신경세포의 유효량을 개체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [57] 본 발명에 있어서, 예방이란 본 발명의 조성물의 투여로 신경질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [58] 본 발명에 있어서, 치료란 본 발명의 조성물의 투여로 신경질환이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [59] 본 발명에 있어서, 개체(subject)란 상기 조성물의 투여를 필요로 하는 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간, 또는 개, 고양이 등의 반려동물이나, 소, 돼지, 말, 양 등의 가축동물을 포함한다.
- [60] 본 발명에 있어서, 세포치료제란 포유동물로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)이며, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종 또는 이종 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다.
- [61] 본 발명의 조성물은 중추신경계 또는 말초신경계 손상, 퇴행성 뇌질환, 운동신경질환 등을 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있으며, 바람직하게는 운동신경질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.
- [62] 본 발명에 있어서, 운동신경질환이란 자율근육의 활동을 통제하는 운동신경의 퇴행적 진행을 일으키는 신경학적 질환과 유전성 감각신경병을 의미한다. 구체적으로, 상기 운동신경질환은 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral

sclerosis, ALS), 중증 근무력증(myasthenia gravis, MG)

사르코-마리-투스(Charcot-Marie-Tooth, CMT)병 또는 척수 근위축증(spinal muscular atrophy, SMA)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [63] 본 발명에 있어서, 유효량이란 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상의학에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효성분 또는 약학 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 해당 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효성분에 대한 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

- [64] 상기 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제, 분무제 등이 바람직하다. 또한, 상기 운동신경질환 치료용 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 1.0×10^5 내지 1.0×10^8 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^6 내지 1.0×10^7 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

- [65] 본 발명의 분화 방법은 운동신경세포로의 높은 분화능을 보여 다량의 운동신경세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 조직적합성이 높으며 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

도면의 간단한 설명

- [66] 도 1은 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC, A)를 신경전구세포(NP, B)로 유도하고, 운동신경세포(MN, C)로 분화하는 단계, 및 분화 단계별 배지의 성분 및 그 시기의 세포의 형태를 나타낸 모식도이다.
- [67] 도 2는 본 발명에 따른 방법으로 분화된 운동신경세포를 2세대 및 3세대 계대배양시 정상적인 증식이 가능함을 확인한 도이다.
- [68] MN 2.5w - 2.5주 분화된 운동신경세포;
- [69] p2 - 2세대 계대배양; 및
- [70] p3 - 3세대 계대배양, 이하 도 3 동일.

- [71] 도 3은 본 발명에 따른 방법으로 분화된 운동신경세포(MN)를 동결 후 용해 하더라도 운동신경세포로 사용이 가능함을 확인한 도이다.
- [72] 도 4는 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)를 운동신경세포(MN)로 분화시키면서 분화 기간별로 분화된 세포를 수득하여, Real-time PCR을 통하여 ISL1, HB9 및 ChAT의 발현이 증가함을 확인한 그래프이다.
- [73] MN2w - 2주 분화된 운동신경세포;
- [74] MN3w - 3주 분화된 운동신경세포; 및
- [75] MN4w - 4주 분화된 운동신경세포.
- [76] 도 5a는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 2주 동안 분화시킨 후, 수득한 세포를 면역형광염색법을 통하여 ISL1의 발현이 증가함을 확인한 도이다.
- [77] 도 5b는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 2주 동안 분화시킨 후, 수득한 세포를 면역형광염색법을 통하여 HB9의 발현이 증가함을 확인한 도이다.
- [78] 도 5c는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 2주 동안 분화시킨 후, 수득한 세포를 면역형광염색법을 통하여 ChAT의 발현이 증가함을 확인한 도이다.
- [79] 도 6a 내지 6d는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 4주 동안 분화시키면서 분화 기간별로 분화된 세포를 수득하여, 웨스턴블로팅을 통하여 운동신경세포에서 ISL1(도 6b), HB9(도 6c) 및 ChAT(도 6d)의 발현 증감을 확인한 도이다.
- [80] 도 7은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 분화시키면서 분화 기간별로 상층액을 여러 번 수득하여 분화배양액과 비교하여 아세틸콜린의 농도를 퍼센트로 계산하여 통계적으로 비교한 그래프이다.
- [81] NPC - 신경전구세포, neural precursor cell;
- [82] MNC2w - 2주 분화된 운동신경세포;
- [83] MNC3w - 3주 분화된 운동신경세포; 및
- [84] MNC4w - 4주 분화된 운동신경세포.
- [85] 도 8a는 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 분화 전 후의 세포형태와, 근육세포와의 공배양 중인 운동신경세포를 광학현미경으로 관찰한 사진이다.
- [86] 도 8b는 본 발명에 따라 2주 동안 분화된 운동신경으로 분화된 T-MSC와 사람 골격근세포를 공배양시킨 후, 형광면역염색법과 α -BTX 처리법을 통해, 근신경접합부의 형성이 가능함을 공배양 전 후로 염색하여 확인한 도이다(hSKMC : 사람골격근세포만 배양; T-MSC-MNC: 편도줄기세포유래 운동신경세포만 배양; hSKMC & T-MSC-MNC: 사람골격근세포와 편도줄기세포유래 운동신경세포를 공배양).
- [87] 도 8c는 도 8b와 마찬가지로 운동신경으로 분화된 T-MSC와 사람 골격근세포를

공배양시킨 후 근신경접합부의 형성과 더불어, 두 세포의 형태를 좀 더 확실하게 확인하기 위하여, 동일한 슬라이드에서 염색에 사용된 단백질 별로 촬영을 하였다. α -SMA(α -smooth muscle actin, 파란색)패널은 근육세포의 형태를 나타내고, Tuj1 (beta III Tubulin, 초록색)패널은 신경세포의 형태를 나타내며, α -BTX (빨강색, Bungarotoxin) 패널은 근신경 접합부인 아세틸콜린리셉터클러스터(acetylcholine receptor cluster)를 표시한다. 이 세가지를 겹쳐서 본 그림이 merge패널이다.

- [88] 도 9는 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)를 운동신경세포(MNC)로 분화시킨 후 세포를 수득하여, Real-time PCR을 통하여 네 종류의 neurotrophic factor의 발현이 증가함을 확인한 그래프이다.
- [89] 도 10은 T-MSC를 면역형광염색법을 통하여 vimentin의 발현을 확인한 도이다.
- [90] 도 11은 T-MSC 및 이로부터 유래된 신경전구세포(neural precursor cells, NPCs)를 면역형광염색법으로 Tuj1의 발현을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [91] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [92] 실시예 1: 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로의 분화
- [93] 실시예 1-1: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양
- [94] 편도유래중간엽줄기세포(tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC)는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)을 얻어, 줄기세포를 분리하여 10% FBS (Hyclone), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO), 0.1 mM β -머캅토에탄올(Sigma), 1% 비필수아미노산(GIBCO)이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)에서 배양하였다.
- [95] 실시예 1-2: 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포 분화
- [96] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포(motor neuron, MN)의 분화는 하기 단계를 거쳐 수행하였다.
- [97] 분화를 유도하기 위한 첫 번째 단계로 구형상체(sphere)를 형성하였다. 구형상체는 PEI가 코팅된 100 mm 페트리접시(petri dish)에 실시예 1의 증식배양액 10ml 당 5,000,000개 ~ 7,000,000개의 세포를 부유하여 1 내지 2일 동안 세포응집을 유도함으로써 제조하였다. 상기 형성된 구형상체를 배양접시에 재부착(replating)시키고, 증식배양액에서 1세대, 2세대 또는 3세대까지 계대배양하여 신경전구세포(neural precursor cell, NPC)로 분화를 유도하였다.
- [98] 상기 분화된 신경전구세포를 분화배양액 배지 [저농도 글루코스 DMEM, 2.5%

FBS, 1% N₂ 보충물(supplement), 1μM 레티노산, 10 ng/ml 뇌유래신경영양인자 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 10 ng/ml 신경성장인자 (Nerve growth factor, NGF), 0.1 ng/ml 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, SHH)]에서 2 내지 4주 동안 추가로 배양하였다. 이를 통해, 운동신경세포를 제조하였다 (도 1).

[99] 실시예 1-3: 분화된 운동신경세포의 계대배양

[100] 상기와 같은 방법으로 2.5주 동안 분화된 운동신경세포를 계대배양한 결과, 2세대 및 3세대 계대배양한 운동신경세포는 정상적인 증식능을 가짐을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따라 분화된 운동신경세포는 계대배양하더라도 정상적인 증식이 가능함을 확인하였다 (도 2).

[101] 실시예 1-4: 분화된 운동신경세포의 동결 용해 후 사용

[102] 상기와 같은 방법으로 2.5주 동안 분화된 운동신경세포를 배양 10일 쯤 동결한 뒤 14일 쯤 용해하여 세포의 형태를 관찰한 결과, 동결 용해 후에도 형태적으로 변화가 없음을 확인하였다.

[103] 따라서, 본 발명에 따라 분화된 운동신경세포는 동결 후 용해하더라도 정상적인 운동신경세포로 사용이 가능함을 확인하였다 (도 3).

[104] 실시예 3: PCR을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로의 분화능

[105] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로의 분화능을 알아보기 위하여, 운동신경세포의 대표적 마커인 ISL1 (Insulin gene enhancer protein), HB9과 ChAT (Choline acetyltransferase)의 발현 정도를 Real-time PCR을 통해 분석하였다.

[106] RNeasy mini kit (Qiagen Inc.)를 이용하여, 제조자의 지시서에 따라 총 RNA를 추출하였다. Superscript II (Invitrogen)와 oligo-d(T)20 프라이머를 이용하여 42°C에서 1시간, 72°C에서 15분 반응하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA에 대한 Quantitative real-time PCR은 SYBR Premix Ex Taq™ kits (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여, ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 수행하였다. ISL1, HB9 및 ChAT 유전자의 상대적 발현량은 comparative Ct method (2^{-ΔΔCt}) 방법으로 계산하였으며, 모든 측정값은 삼중(triplicate)으로 수행하였다.

[107] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로 분화시, 분화 후 2주 후부터 운동신경세포의 마커인 ISL1, HB9 및 ChAT의 발현이 증가하는 것을 확인하여, 운동신경세포로 분화되었음을 확인하였다.

[108] 구체적으로, 상기 ISL1은 운동신경세포로의 분화 초기에 발현이 증가하는 운동신경 특이적 마커이다. 도 4와 같이 분화 2주 후 ISL1의 발현이 가장 높은 것은 분화 2주째에 가장 높은 분화율을 나타냄을 의미하고, 분화 2주째에 비해 3주 후부터 ISL1의 발현이 상대적으로 감소하는 것은 초기 분화 단계를 지나 이미 운동신경세포로의 분화가 진행되었음을 의미한다. 미분화 세포인

T-MSC에 대한 통계적으로 유의한 ISL1의 발현 증가는 2주, 3주에 확인되었다. 또한, 상기 HB9도 운동신경세포로의 분화 초기에 발현이 증가하는 운동신경 특이적 마커이다. HB9은 분화 기간에 따라 점차 증가하는 경향이 보이나, 미분화 세포인 T-MSC에 대하여 통계적으로 유의한 발현 증가는 2주에만 확인되었다.

- [109] 또한, 상기 ChAT는 ISL1의 발현이 증가하는 분화 초기보다 분화가 진행되었을 때 발현이 증가하는 운동신경 마커로서, 아세틸콜린성 신경 마커라고도 한다. 특히, ChAT는 중추신경 및 말초신경에 존재하는 일반형 ChAT (common type ChAT, cChAT) 및 말초신경에서 우선적으로 발현되는 말초형 ChAT (peripheral type ChAT, pChAT)의 동형 단백질(isoform)이 존재한다. 도 4와 같이 분화 2주 후부터 4주까지 ChAT의 exon3의 발현이 유의적으로 증가하는 것은 중추신경 및 말초신경 모두의 특성을 나타냄을 의미한다. 분화 2주째에 exon6의 발현이 증가하였다가, 3주 후부터 상대적으로 감소하는 것은 전사과정 후 변형하는 동안 exon6이 exon9으로의 스킵핑(skipping)에 의한 것으로, 이는 분화가 진행될수록 말초신경의 특성을 더욱 나타냄을 의미한다. 따라서, 위 ChAT와 관련된 위 결과들을 종합하면 분화 2주 후부터 운동신경세포로의 분화가 시작되어 3주 및 4주 후 운동신경세포로 분화가 진행되었음을 의미한다.

- [110] 상기 실험 결과를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 세포는 운동신경세포의 특성이 있음을 확인하였으며, 따라서, 본 발명의 분화배양액 배지의 사용시 운동신경세포로 우수한 분화능을 나타냄을 확인하였다.

- [111] 실시예 4: 면역 형광분석을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로의 분화능

- [112] 면역형광염색을 통해 운동신경세포로의 분화능을 확인하였다. 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 분화 2주 후 운동신경세포는 커버 슬립(cover slip) 위에서 배양하여 제조하였으며, 분화를 마친 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액으로 15분간 실온에서 고정한 후 PBS로 세척되었다. 세척된 세포를 0.1% Tween-20 및 2% 소혈청알부민(Bovine serum albumin)을 첨가한 PBS 용액에서 1시간 처리하였고, 발현을 확인하고자 하는 항체는 생산자가 지시한 비율대로 희석하였으며, PBS에 첨가한 후 실온에서 1시간 또는 냉장 상태에서 밤새 반응이 이루어졌다. 뒤이어 다시 PBS 용액으로 세척한 뒤, 실온 또는 냉장 상태에서 TRITC (tetra-rhodamine isothiocyanate) 또는 FITC (fluorescein isothiocyanate) 접합체의 2차 항체를 1차 항체와 동일한 방법으로 처리하였다. 대조 염색으로 세포핵을 염색하기 위해 DAPI가 첨가된 마운팅용액(Vectashield)을 사용하였고 마운팅 후 형광현미경으로 관찰하였다.

- [113] 도 5a에서 확인되는 바와 같이, T-MSC의 경우 ISL1을 나타내는 붉은색 형광 신호가 전혀 나타나지 않은 반면, 분화 후의 운동신경세포 (T-MSC-MNC)는 ISL1을 나타내는 붉은색 형광 신호가 강하게 발현됨을 확인하였다(도 5a의 b 및 e). 이와 함께 신경세포 특이 단백질인 neuron-specific class III beta-Tubulin (Tuj1)의 발현도 함께 확인해 본 결과(도 5a의 a 및 d) 분화가 진행되면서 발현이

증가함을 확인하였다. 또한 면역형광 분석을 통한 운동신경세포로의 분화확인 방법이 적절함을 증명하기 위하여, 유도만능줄기세포 유래 운동신경세포를 구입(iXCell™ Human iPSC-Derived Motor Neurons, iPSC-MNC)하여 ISL1과 Tuj1 발현 여부를 관찰하였다. 그 결과 T-MSC-MNC와 iPSC-MNC의 세포모양은 좀 다르나 두 마커(ISL1과 Tuj1)의 발현 양상은 동일함을 확인하였다(도 5a의 h, i, j 및 k).

- [114] 도 5b에서는 T-MSC의 경우 HB9을 나타내는 붉은색 형광 신호가 전혀 나타나지 않은 반면, 분화 후의 운동신경세포(T-MSC-MNC)는 HB9을 나타내는 붉은색 형광 신호가 강하게 발현됨을 확인하였다(도 5b의 b 및 e). 이와 함께 Tuj1의 발현도 함께 확인해 본 결과(도 5b의 a 및 d), 분화가 진행되면서 발현이 증가함을 확인하였다. 또한 iPSC-MNC의 HB9과 Tuj1 발현 여부를 관찰하였다. 그 결과 T-MSC-MNC와 iPSC-MNC의 세포모양은 좀 다르나 두 마커(HB9 및 Tuj1)의 발현 양상은 동일함을 확인 하였다(도 5b의 h, i, j 및 k).
- [115] 도 5c에서는 T-MSC의 경우 ChAT을 나타내는 붉은색 형광 신호가 전혀 나타나지 않은 반면, 분화 후의 운동신경세포(T-MSC-MNC)는 ChAT을 나타내는 붉은색 형광 신호가 강하게 발현됨을 확인하였다(도 5c의 b 및 e). 이와 함께 Tuj1의 발현도 함께 확인해본 결과(도 5c의 a 및 d), 분화가 진행되면서 발현이 증가함을 확인 하였다. 또한 iPSC-MNC의 ChAT와 Tuj1 발현 여부를 관찰하였다. 그 결과 T-MSC-MNC와 iPSC-MNC의 세포모양은 좀 다르나 두 마커(ChAT 및 Tuj1)의 발현 양상은 동일함을 확인 하였다(도 5c의 h, i, j 및 k).
- [116] 상기 실험 결과를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 세포는 운동신경세포의 특성이 있음을 확인하였으며, 따라서, 본 발명의 분화배양액 배지의 사용시 운동신경세포로 우수한 분화능을 나타냄을 확인하였다.
- [117] 실시예 5: 웨스턴블롯팅을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로의 분화능
- [118] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 운동신경세포로의 분화를 웨스턴블롯팅을 통해 확인하였다.
- [119] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포와 분화 단계별 세포(미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포, 신경전구세포 및 분화 2주~4주 후 운동신경세포)를 취하여 단백질 분해효소 억제제(Roche)가 포함된 라이시스 완충액에 넣고 파쇄하였다. 전체 단백질을(10-30 µg)을 확인하고자 하는 1차 항체(ISL1, HB9, ChAT)로 면역블롯팅하고, GAPDH (Abcam)를 내부 대조군으로 사용하였다. LAS-3000 (Fuji film)를 이용하여 밴드의 세기를 정량화하고 GAPDH의 세기로 표준화하였다.
- [120] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6a의 band를 수치화하여 정리한 그래프가 도 6b (ISL1), 6c(HB9), 6d(ChAT)이다. 도 6에서 확인되는 바와 같이, ISL1단백질은 T-MSC에서도 약간 발현하나 신경전구세포(NPC)로의 분화 시부터 증가하여 분화 2주째에 가장 많이 증가하였다(도 6b). HB9 단백질은 T-MSC와 NPC에서는

거의 발현이 보이지 않다가 분화 2주째와 3주째에 발현증가를 나타냈다(도 6c). ChAT의 isotype 2 단백질은 분화 2주째와 3주째에 두 개의 밴드를 보여, 운동신경세포로의 분화를 확인하였다(도 6d).

[121] 상기 실시예 3과 유사하게, 분화 2주 후의 운동신경세포에서 isotype2의 발현량이 증가하는 것은 분화된 운동신경세포가 말초신경의 특성을 나타냄을 의미한다.

[122] 상기 실험 결과를 통해, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 세포는 운동신경세포의 특성이 있음을 확인하였으며, 따라서, 본 발명의 분화배양액 배지의 사용시 운동신경세포로 우수한 분화능을 나타냄을 확인하였다.

[123] **실시예 6: 아세틸콜린의 증가로부터 운동신경세포로의 분화능 확인**

[124] 운동신경세포로 4주 동안 분화 중이던 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양접시에서 채취한 상층액 (supernatant 또는 conditioned medium)과 분화배양액 배지를 Acetylcholine Assay Kit (Fluorometric; Cell Biolabs, INC. CA, USA)으로 분석하여, 분화배양액에 대한 아세틸콜린의 증가율을 퍼센트로 계산하였다.

[125] 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 확인되는 바와 같이, T-MSC로부터 T-MSC-MNC로 분화 시, 분화 1주 후부터 아세틸콜린 분비가 증가하여 분화 후 2주에서 가장 높은 증가율을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과는 세 번의 반복 실험으로 통계적으로도 유의성을 인정받았으며, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 운동신경세포로 분화 시, 분화 2주째에 분화율이 가장 높게 나타남을 의미한다.

[126] 아세틸콜린은 신경 말단에서 분비되는 근신경접합부의 신경전달물질로서, 본 발명에 따라 제조된 운동신경세포에서 아세틸콜린의 분비가 증가하였다는 것은 정상적인 운동신경세포로의 기능을 수행할 수 있음을 의미한다.

[127] 이를 통해, 본 발명의 분화배양액 배지 사용하여 편도 유래 중간엽 줄기세포를 배양시 운동신경세포로 분화됨을 확인하였다.

[128] **실시예 7: 분화된 운동신경세포의 근신경접합부 형성능**

[129] 본 발명에 따라 분화된 운동신경세포가 실제 운동신경세포의 특성을 나타내는지 알아보기 위하여, 근신경접합부(neuromuscular junction)를 형성하는지 확인하였다.

[130] 구체적으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 2주동안 분화된 운동신경세포를 사람골격근세포(human skeletal muscle cell, hSKMC)와 공배양(Co-culture)하여 4 내지 5일 후 고정하였다. 이 후, 형광면역염색법을 통해 Tui1 (녹색)으로 염색하여 신경세포인지 여부를 확인하였고, 근신경접합부의 확인을 위해 Alexa 555-conjugated α -BTX을 처리하여, 아세틸콜린 수용기의 유무를 붉은색의 발현으로 확인하였다.

[131] 그 결과를 도 8에 나타내었다. 우선 도 8a에서는 근신경접합부 형성 확인 전에 T-MSC-MNC의 형태적 변화를 먼저 관찰하였다. T-MSC-MNC는 T-MSC와 달리 multipolar의 형태를 나타내었고 운동신경세포의 일반적인 모양처럼 세포체(cell

body)의 확장이 증가하였다(도 8a, 화살표). 또한 공배양을 위하여 배양 중이던 hSKMC의 세포모양 뿐만 아니라, hSKMC와 T-MSC-MNC의 공배양 시에도 각각의 세포 특징을 관찰 할 수 있었다.

- [132] 도 8b에서는 T-MSC 또는 hSKMC 단독 배양 시에는 붉은색 형광이 전혀 나타나지 않고, Tuj1의 저조한 발현이 관찰되었으나, 본 발명에 따라 분화된 운동신경세포를 골격근세포와 공배양한 경우, 붉은색 형광이 나타났고 Tuj1의 발현도 증가함을 확인하였다. 도 8c에서는 근신경접합부 형성 확인을 좀 더 자세히 관찰하기 위하여, 근육 특이적 마커인 α -smooth muscle actin (α -SMA)과 신경 특이적 마커인 Tuj1 그리고 α -BTX를 가지고 triple staining을 실시하였다. 그 결과 두 세포를 공배양 했을 때 붉은색의 아세틸콜린 수용기의 존재(화살표)를 명확히 확인할 수 있었다.
- [133] 이러한 결과는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 2주동안 분화된 세포가 운동신경세포의 기능 중 가장 중요한 기능인 골격근세포와의 junction을 통한 신호전달의 가능성을 제시한다.
- [134] 따라서, 상기와 같은 붉은색 형광은 운동신경세포와 골격근세포의 공배양에 의해 아세틸콜린 수용기가 존재함을 나타내는 것으로, 이러한 실험 결과를 통해, 본 발명에 따라 분화된 운동신경세포는 근신경접합부 형성능을 가지고 있어, 아세틸콜린을 매개로 한 정상적인 신경 신호 전달 시스템을 구축할 수 있다.

[135]

[136] **실시예 8: PCR을 통한 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 운동신경세포의 neurotrophic factor 증가 확인**

- [137] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 운동신경세포의 특성을 알아보기 위하여, 중추신경과 말초신경의 발생과 형성을 도와주는 brain derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), and heregulin (HRG)와 같은 신경영양인자(neurotrophic factor)의 발현 변화를 Real-time PCR을 통해 분석하였다. RNeasy mini kit (Qiagen Inc.)를 이용하여, 제조자의 지시서에 따라 총 RNA를 추출하였다. Superscript II (Invitrogen)와 oligo-d(T)20 프라이머를 이용하여 42°C에서 1시간, 72°C에서 15분 반응하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA에 대한 Quantitative real-time PCR은 SYBR® Premix Ex Taq™ kits (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여, ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 수행하였다. BDNF, GDNF, NGF, HRG 유전자의 상대적 발현량은 comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 방법으로 계산하였으며, 모든 측정값은 삼중(triplicate)으로 수행하였다.
- [138] 그 결과, 도 9에서 T-MSC-MNC로의 분화 후 네 가지 신경영양인자의 발현이 모두 통계적으로 유의성있게 증가하였는데, 특히 분화배양액에 첨가되지 않았던 신경성장인자인 BDNF, GDNF 및 HRG의 발현이 유의적으로 증가한 점은 중요한 의미를 가진다고 볼 수 있다.

[139]

[140] 실시예 10: AdMSC, BMMSC 및 WJ-MSC와의 비교

[141] 도 10은 T-MSC를 면역형광염색법을 통하여 vimentin의 발현을 확인한 도이다. vimentin은 neural progenitor cell의 마커로써 사용되는 단백질이기도 하다. 도 10에서 보면 T-MSC의 발현율이 타 MSC (AdMAC, BM-MSC, WJ-MSC)와 비교하여 유의하게 높은 편 이어서 운동신경세포로의 분화잠재성이 월등함을 알 수 있다.

[142] 도 11은 T-MSC 및 이로부터 유래된 신경전구세포(neural precursor cells, NPCs)를 면역형광염색법으로 Tuj1의 발현을 확인한 도이다. 도 11을 통하여 신경전구세포로 분화시킨 경우에도 타 MSC (AdMSC 및 BM-MSC) 유래의 NPS와 비교하여 Neuron-specific marker인 Tuj1의 발현이 매우 높은 편이어서 운동신경세포를 포함한 신경세포로의 분화잠재성이 월등함을 예측 할 수 있다.

[143]

[144] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

[145]

[146] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업]

[147] [과제고유번호] 2017R1D1A1A02018634

[148] [부처명] 교육부

[149] [연구관리 전문기관] 한국연구재단

[150] [연구사업명]

기초연구사업(학술진흥)-이공분야기초연구사업-기본연구(SGER)

[151] [연구과제명] 말초신경병의 치료를 위한 편도유래중간엽줄기세포의 개발

[152] [기여율] 70/100

[153]

[154] [주관기관] 이화여자대학교 산학협력단

[155] [연구기간] 2017.06.01 ~ 2020.05.31

[156] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업]

[157] [과제고유번호] HI12C0135010017

[158] [부처명] 보건복지부

[159] [연구관리 전문기관] 한국보건산업진흥원

[160] [연구사업명] 보건의료기술연구개발사업-희귀질환사업

[161] [연구과제명] 샤르코-마리-투스병의 신규 바이오마커 및 맞춤형 치료기술개발

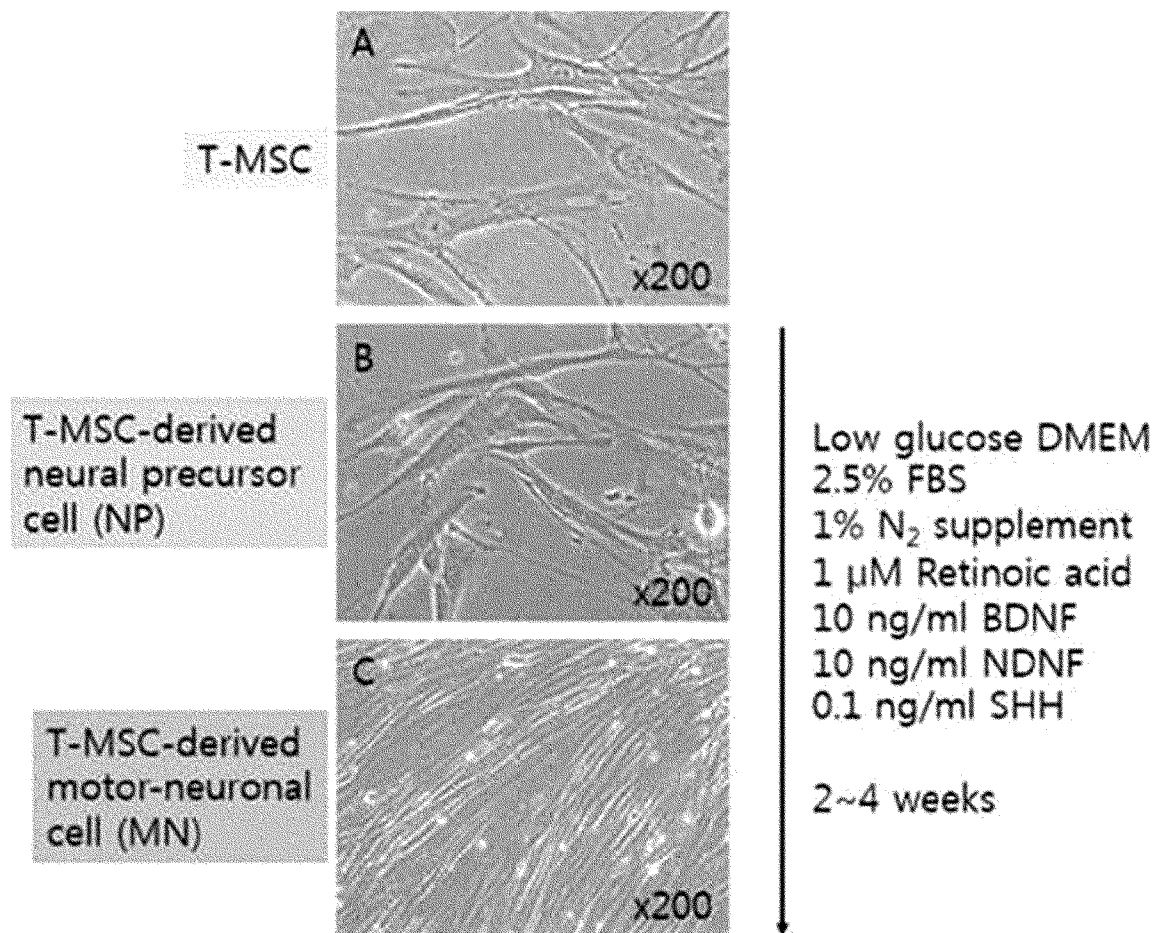
- [162] [기여율] 30/100
- [163] [주관기관] 이화여자대학교 산학협력단
- [164] [연구기간] 2017.04.01 ~ 2018.03.31
- [165]

청구범위

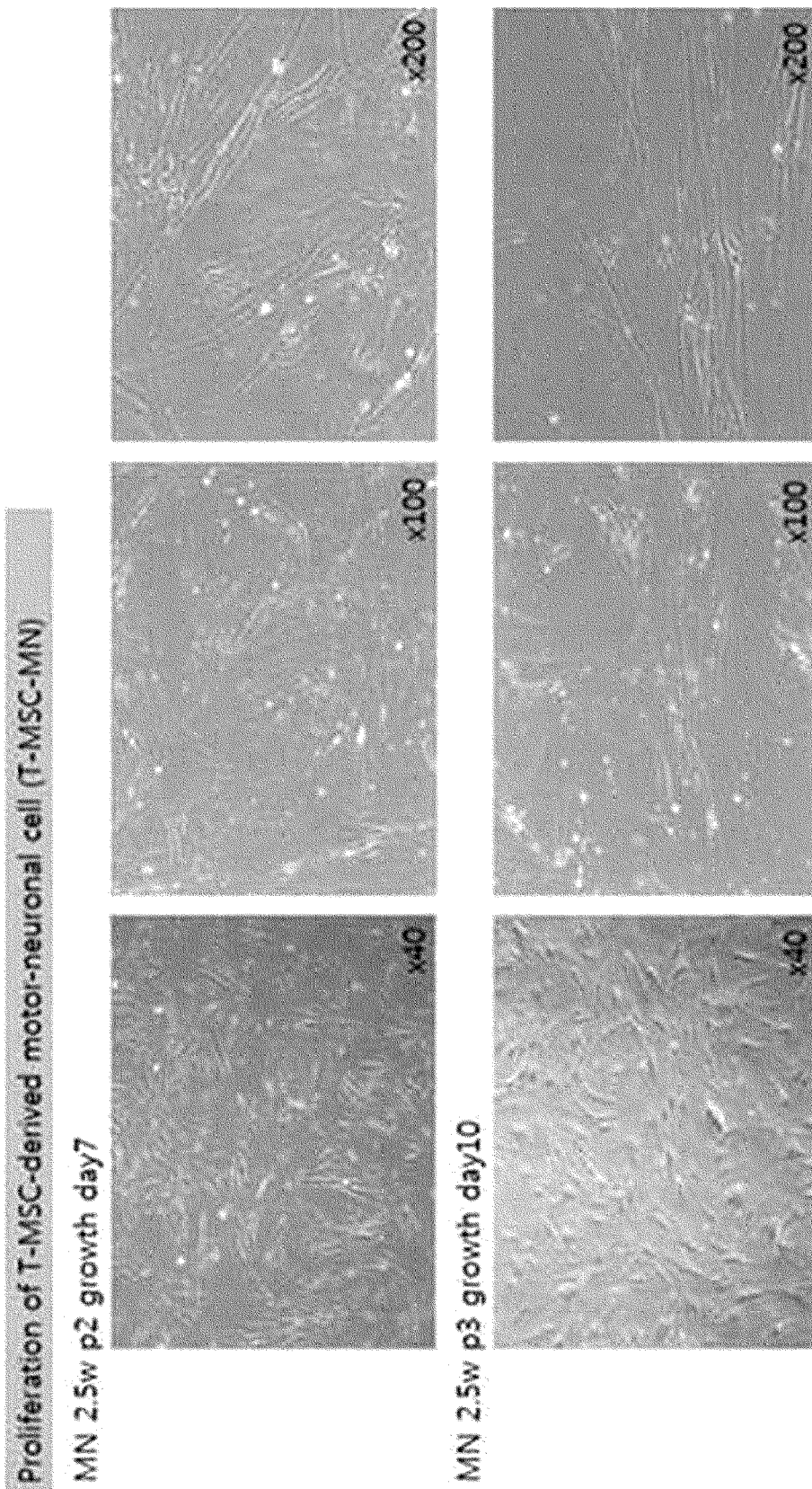
- [청구항 1] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS, N₂ 보충물(supplement), 레티노산, 뇌유래신경성장인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 소닉 헤지호그 (sonic hedgehog, SHH)를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화한 전구세포로부터 운동신경세포(motor neuron)로 분화시키기 위한 분화배양액 배지 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 분화배양액 배지는 저농도 글루코스 DMEM, 0.25 내지 25%(w/v) FBS, 0.1 내지 10%(w/v) N₂ 보충물 (supplement), 0.1 내지 10 μ M 레티노산, 1 내지 100 ng/ml 뇌유래신경성장인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 1 내지 100 ng/ml 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 0.01 내지 1 ng/ml 소닉 헤지호그 (sonic hedgehog, SHH)를 포함하는, 분화배양액 배지 조성물.
- [청구항 3] 편도 유래 중간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화한 전구세포를 제 1 항의 분화 배지 조성물에서 배양하여 운동신경세포를 유도하는 단계를 포함하는 운동신경세포로의 분화 방법.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 배양은 2 내지 4주간 수행하는, 분화 방법.
- [청구항 5] 제 3 항에 있어서, 상기 분화 방법은 운동신경세포를 유도하는 단계 전에 편도 유래 중간엽 줄기세포를 부유 상태에서 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계를 추가적으로 포함하는, 분화 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 세포 응집체를 형성하는 단계의 증식배양액 배지는 FBS, 페니실린/스트렙토마이신, β -머캅토에탄올 및 비필수아미노산을 포함하는, 분화 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 세포 응집체를 형성하는 단계의 증식배양액 배지는 5 내지 20%(w/v) FBS, 0.5 내지 2%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신, 0.05 내지 0.2 mM β -머캅토에탄올 및 0.5 내지 2%(w/v) 비필수아미노산을 포함하는 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle medium)인, 분화 방법.
- [청구항 8] 제 5 항에 있어서, 상기 세포 응집체 형성은 폴리에틸렌이민 (polyethyleneimine)이 코팅된 배양 접시에서 배양액 10 ml 당 5×10^6 내지 7×10^6 개의 세포를 부유 상태에서 1 내지 7일 동안 배양하는 것인, 분화 방법.
- [청구항 9] 제 5 항에 있어서, 상기 분화 방법은 세포 응집체를 1 내지 3세대까지 계대배양하여 신경전구세포 (neural precursor)로 분화하는 단계를 추가적으로 포함하는, 분화 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 전구세포는 신경전구세포(neural precursor cell)인, 분화 방법.
- [청구항 11] 제 3 항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 다른 조직 유래

- 중간엽 줄기세포와 비교하여 신경전구세포의 마커인 비멘틴(vimentin)의 발현율이 높은 것을 특징으로 하는, 분화 방법.
- [청구항 12] 제 3 항에 있어서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화한 전구세포는 다른 조직 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화한 전구세포와 비교하여 뉴런-특이 마커(Neuron-specific marker)인 Tuj1의 발현율이 높은 것을 특징으로 하는, 분화 방법.
- [청구항 13] 제 3 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 분화 방법에 따라 제조된 운동신경세포.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 운동신경세포는 ISL1 (insulin gene enhancer protein), HB9 (homeobox protein), 또는 ChAT (choline acetyltransferase)의 발현이 증가하는, 운동신경세포.
- [청구항 15] 제 13 항에 있어서, 상기 운동신경세포는 아세틸콜린의 분비가 증가하는, 운동신경세포.
- [청구항 16] 제 13 항에 있어서, 상기 운동신경세포는 근신경접합부 (neuromuscular junction)의 형성이 가능한, 운동신경세포.
- [청구항 17] 제 13 항에 있어서, 상기 운동신경세포는 1 내지 3세대까지 계대배양이 가능한, 운동신경세포.
- [청구항 18] 제 13 항에 있어서, 상기 운동신경세포는 동결 후 용해하여 사용이 가능한, 운동신경세포.
- [청구항 19] 제 13 항에 따른 운동신경세포를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 20] 제 19 항에 있어서, 상기 신경질환은 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 중증 근무력증(myasthenia gravis, MG), 척수 근위축증(spinal muscular atrophy, SMA) 또는 사르코-마리-투스(Charcot-Marie-Tooth, CMT)병인, 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 21] 제 13 항에 따른 운동신경세포를 포함하는 세포치료제.

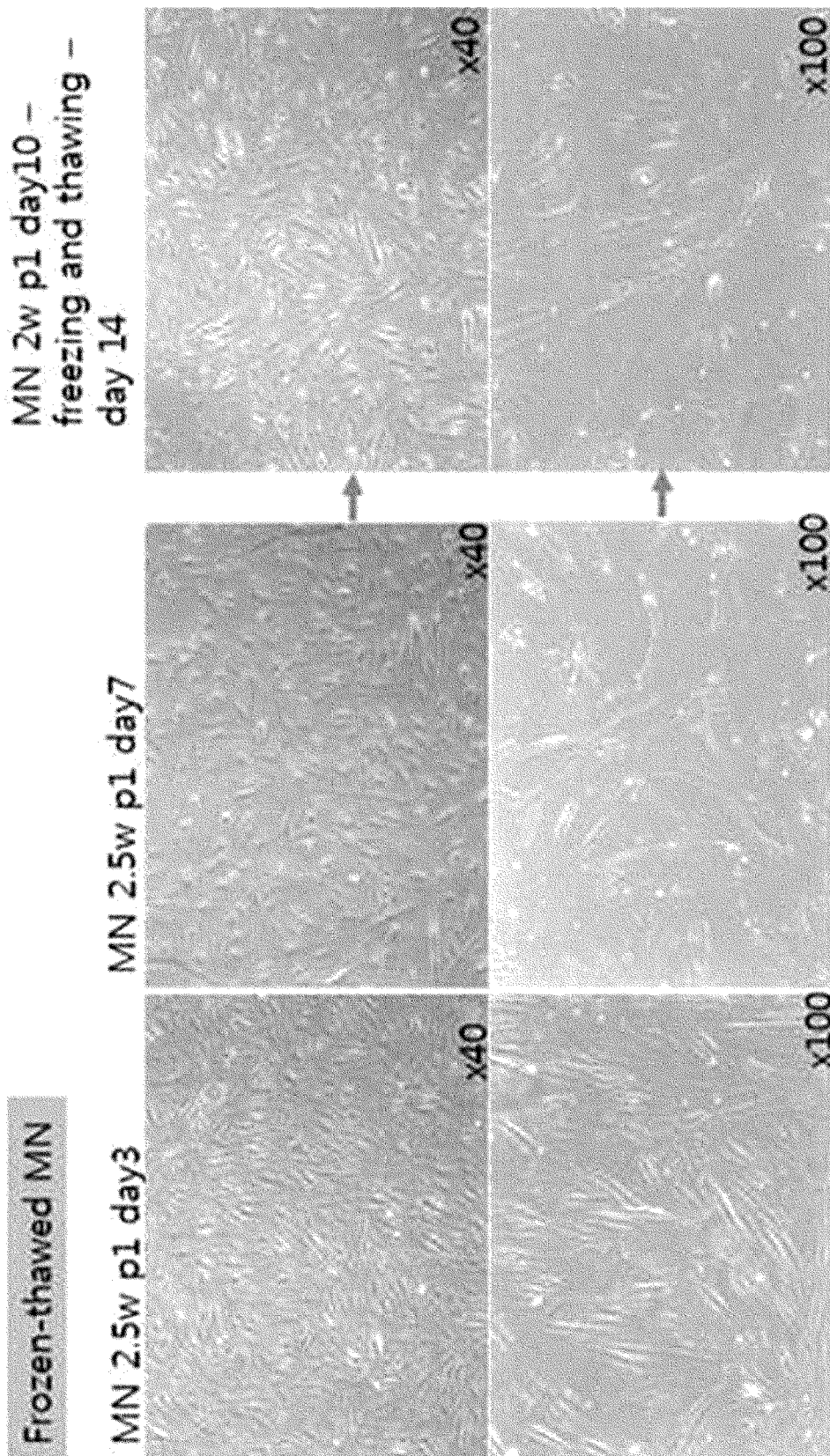
[도1]



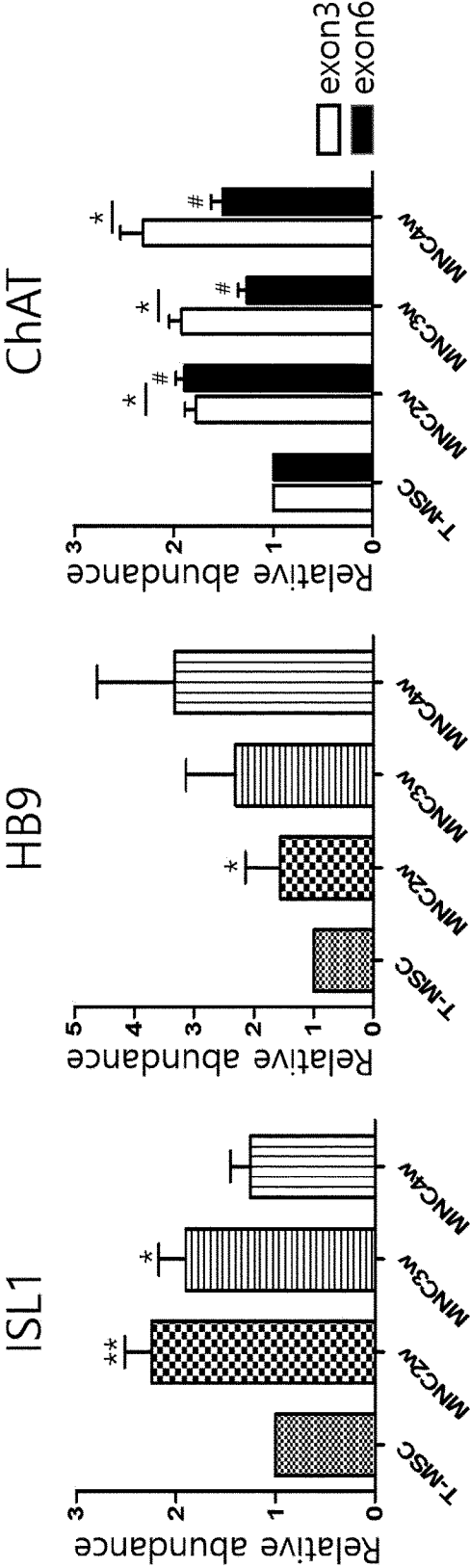
[도2]



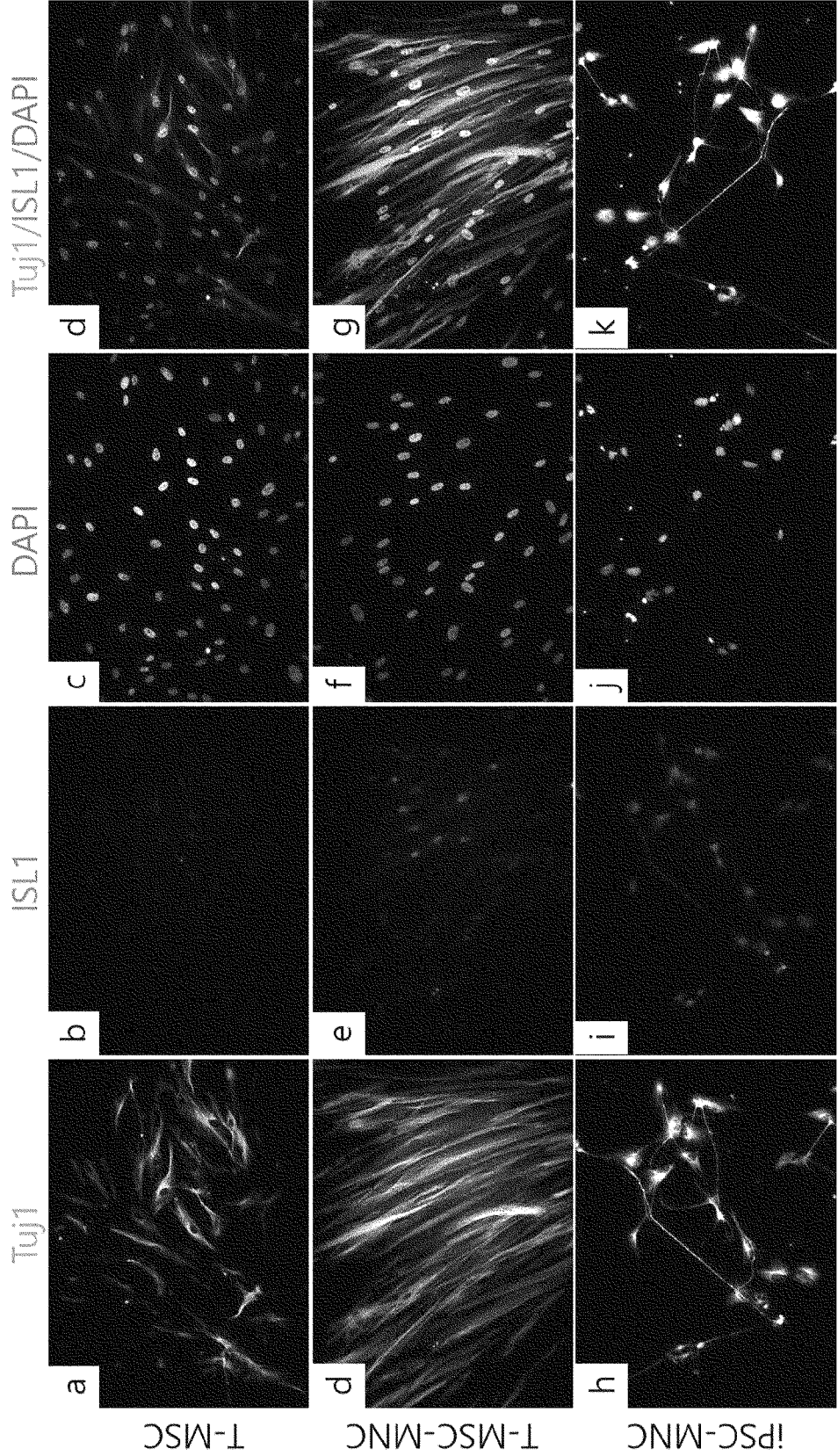
[도3]



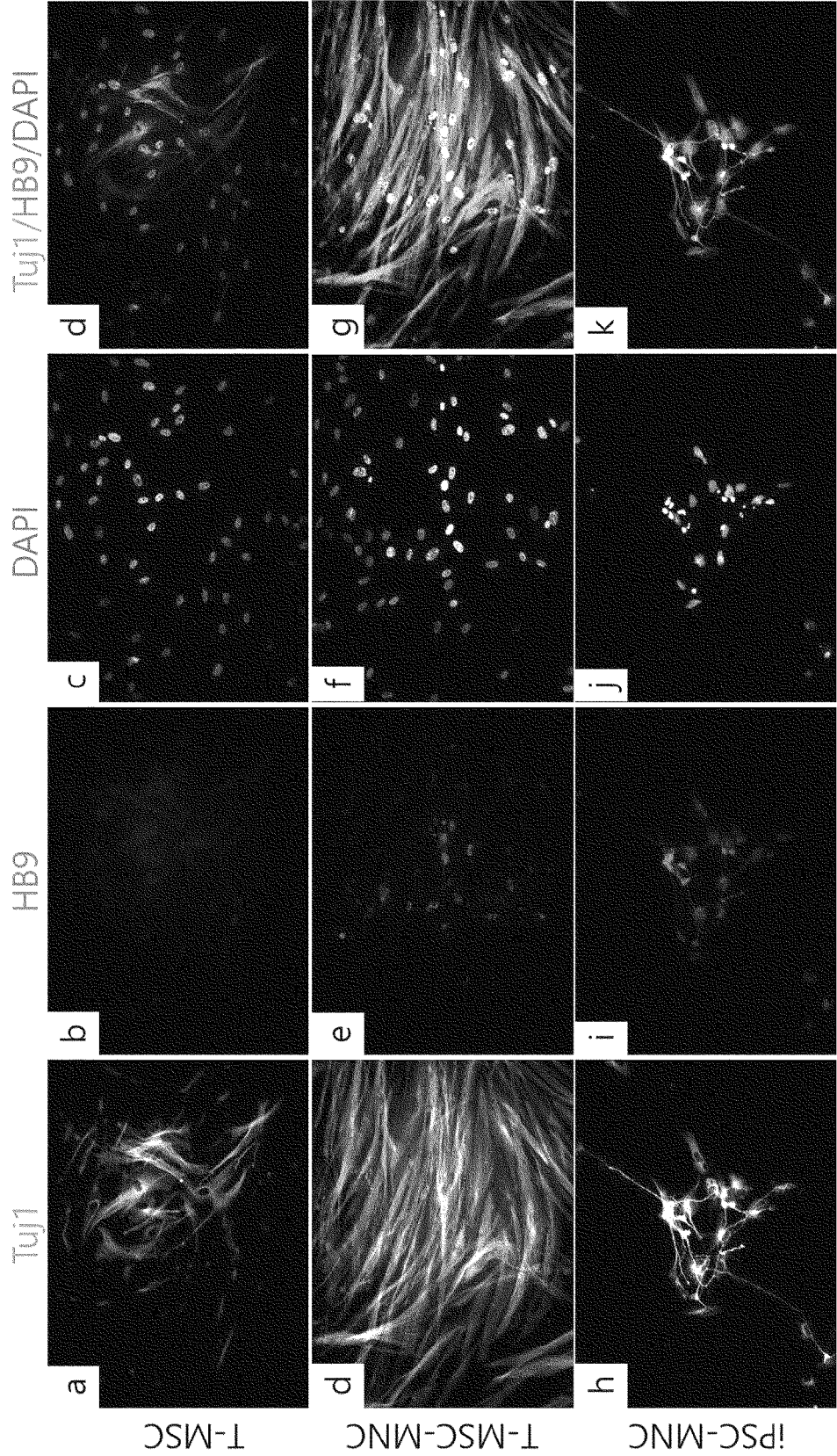
[도4]



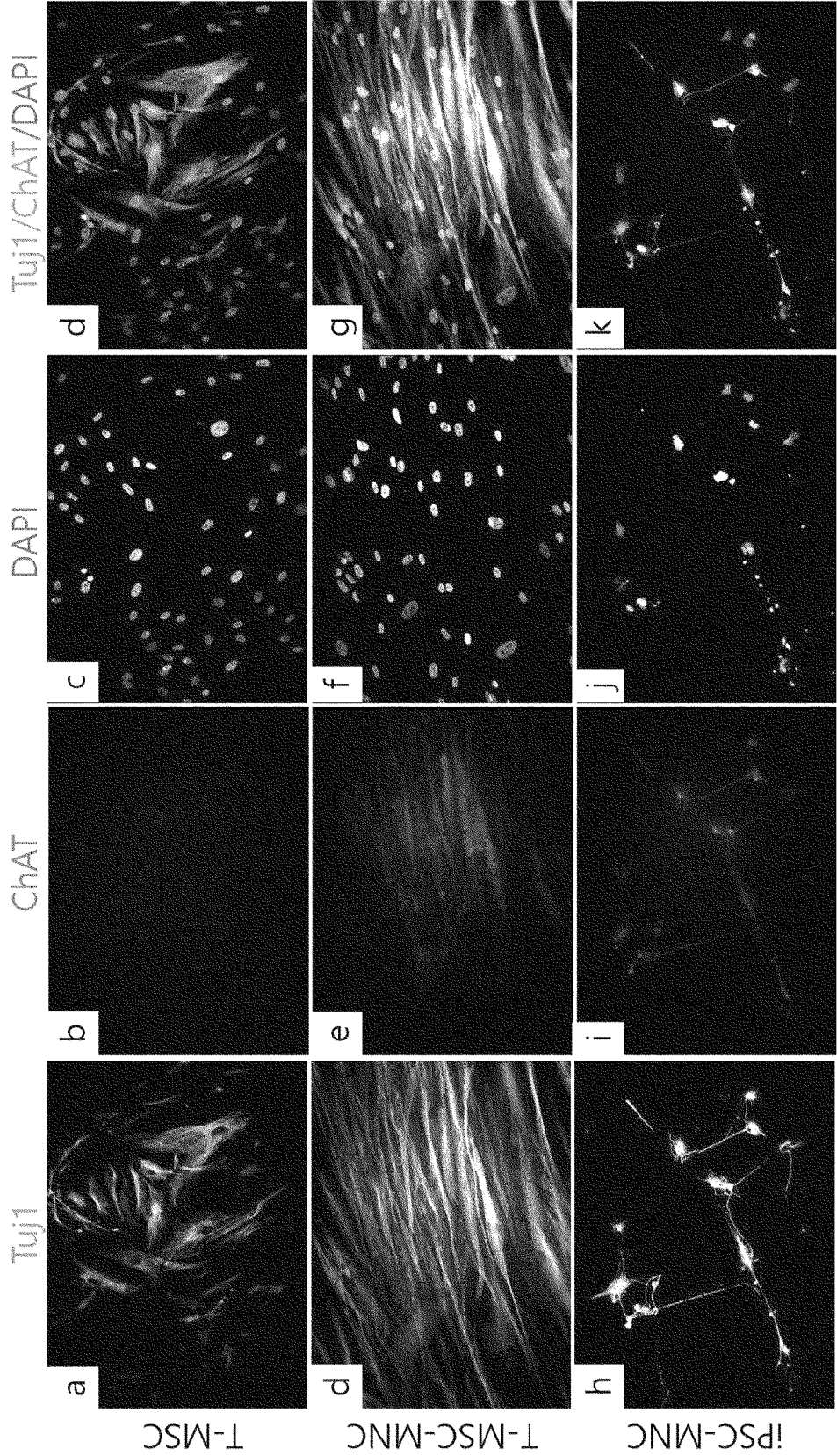
[도5a]



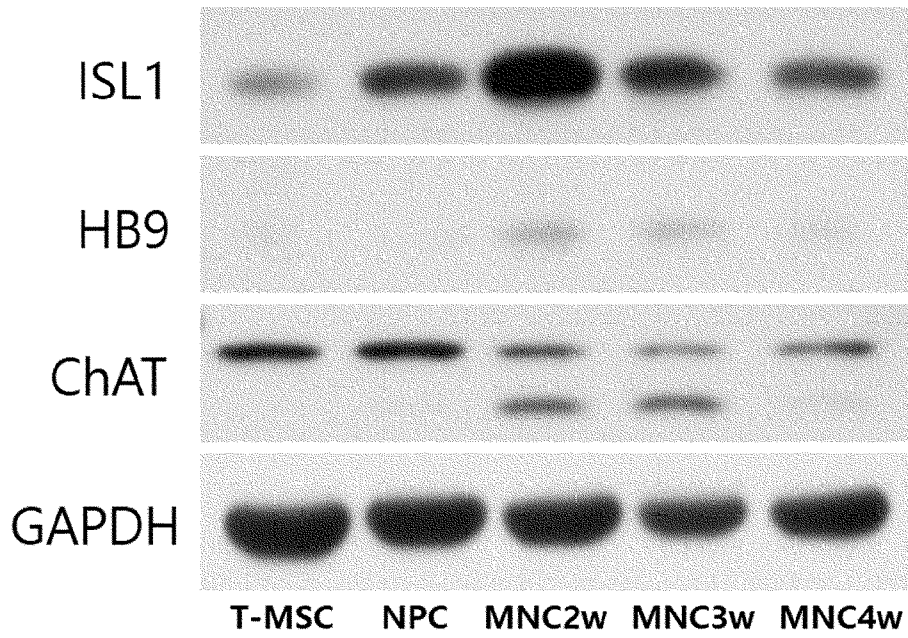
[도5]



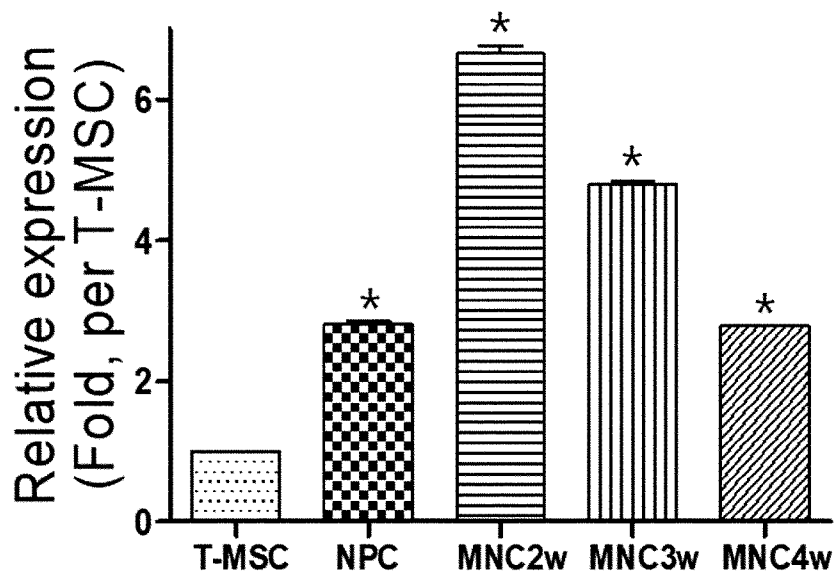
[도5c]



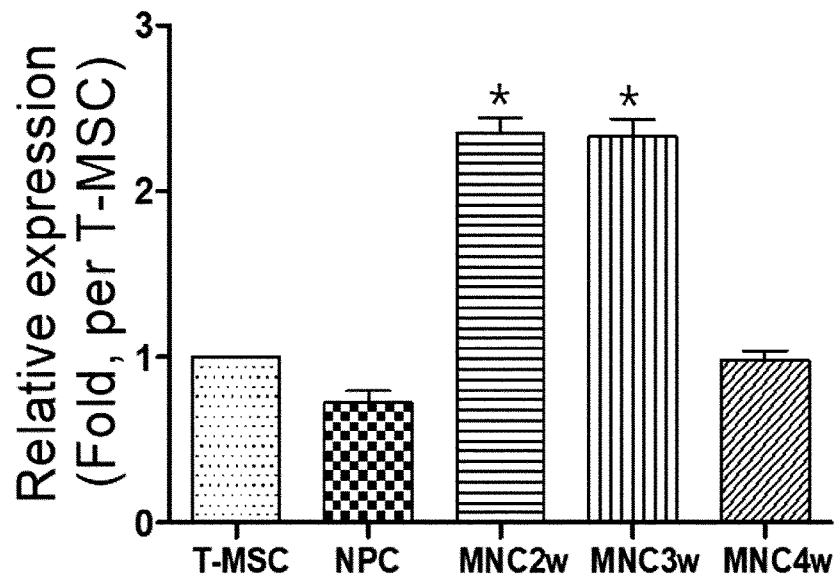
[도6a]



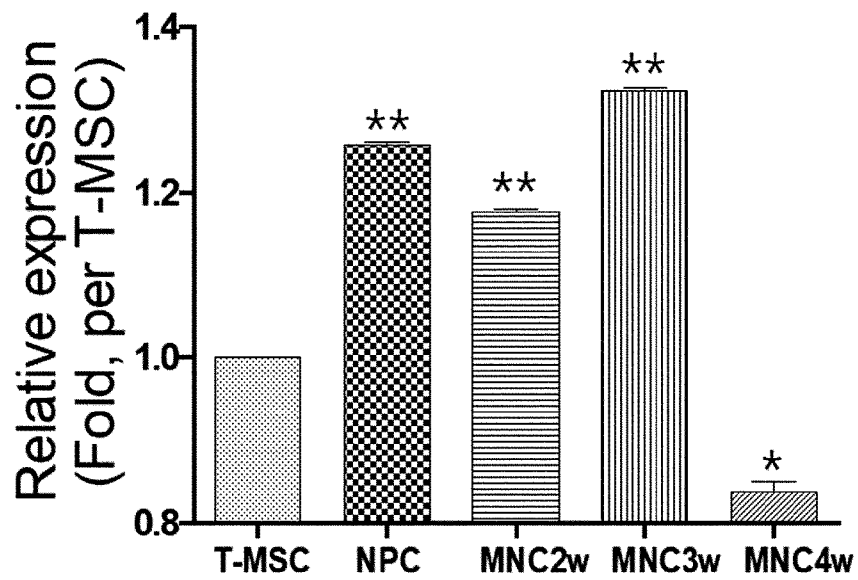
[도6b]



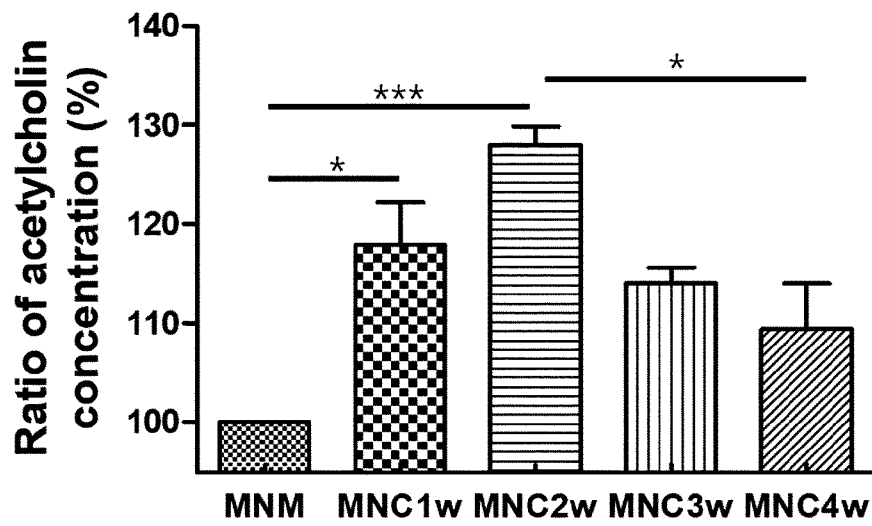
[도6c]



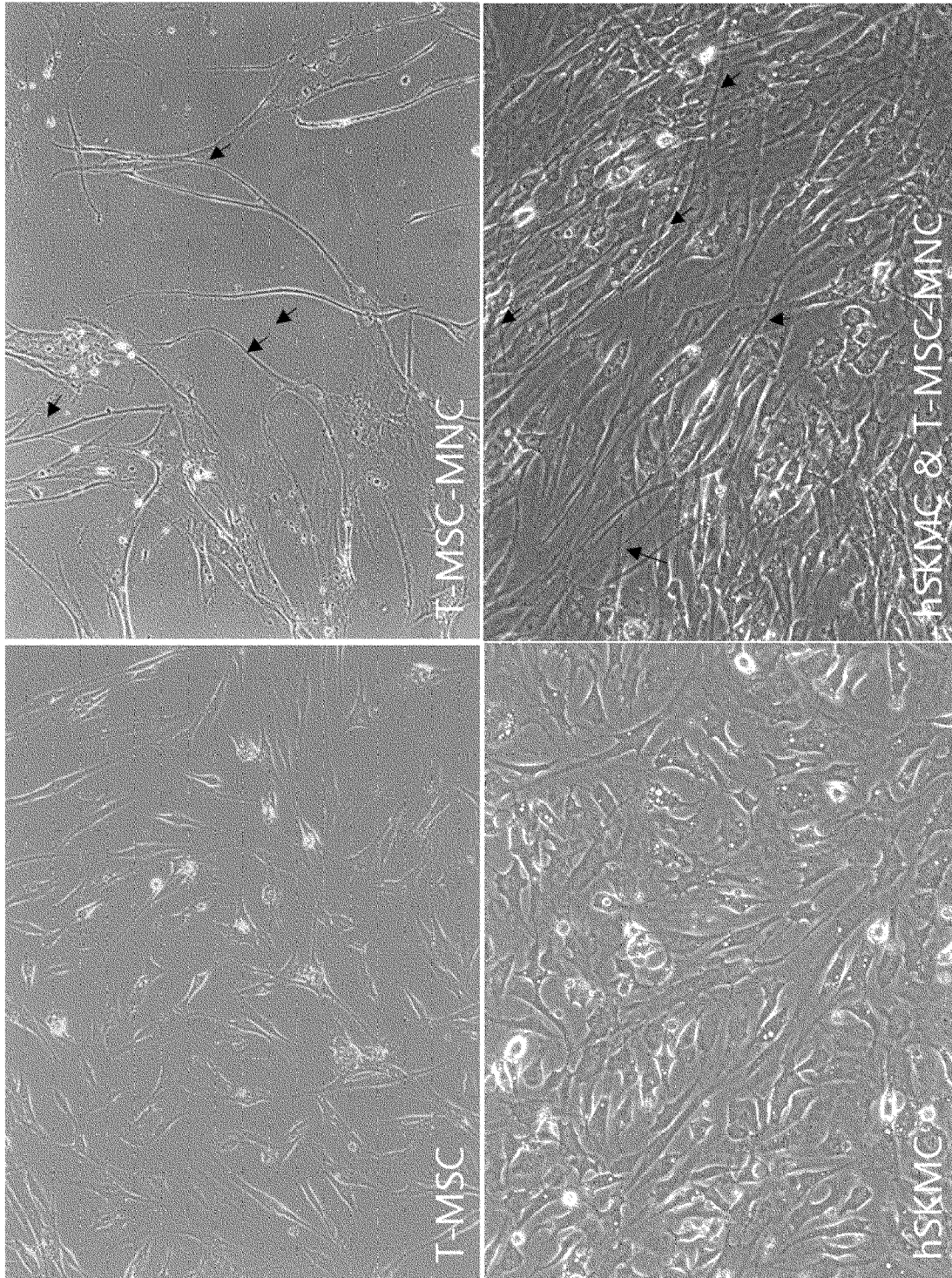
[도6d]



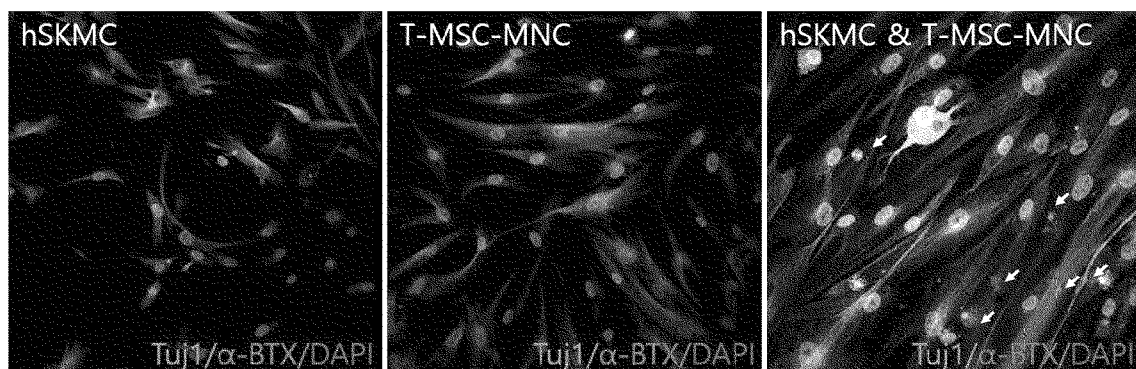
[도7]



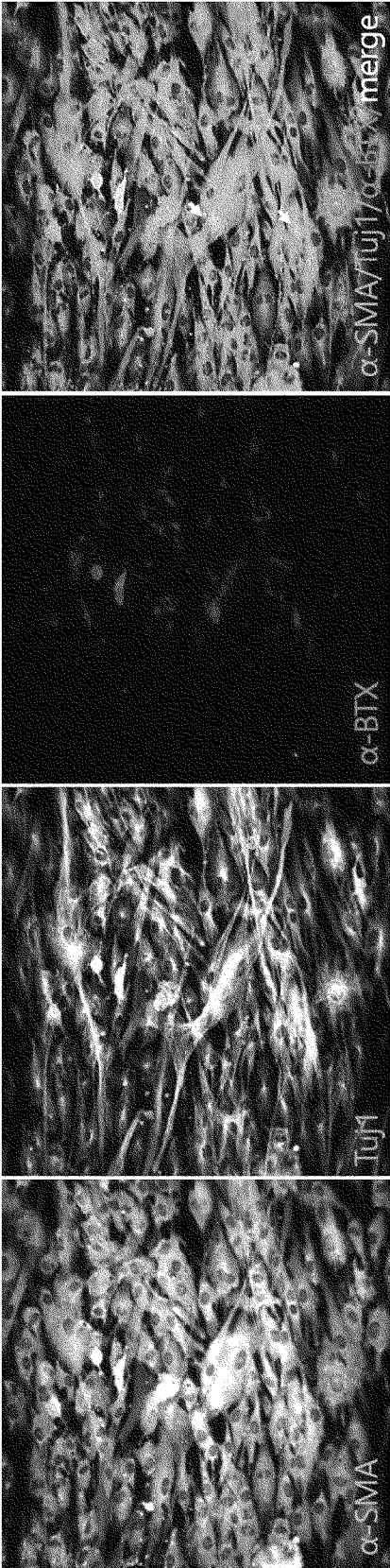
[도8a]



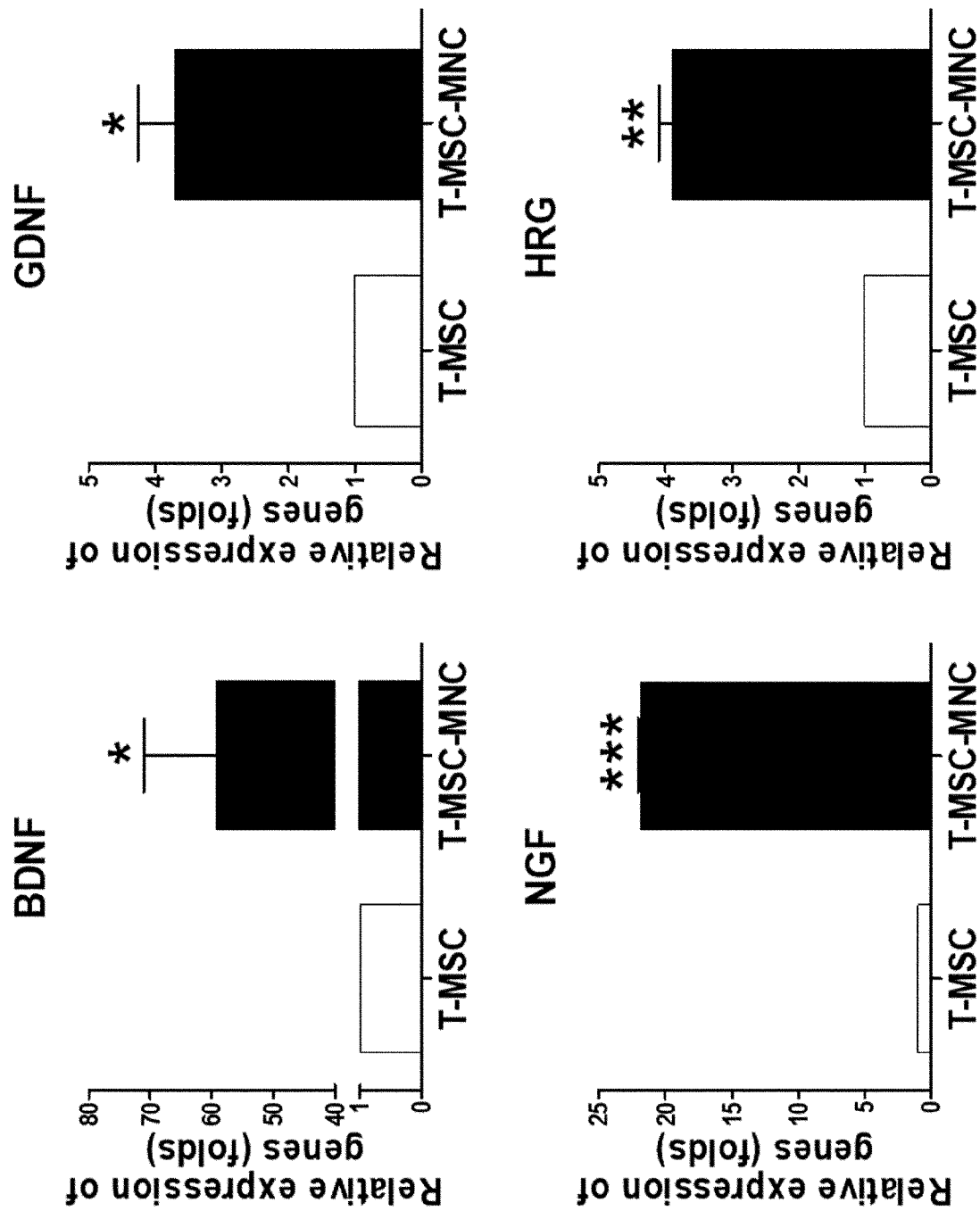
[도8b]



[도8c]



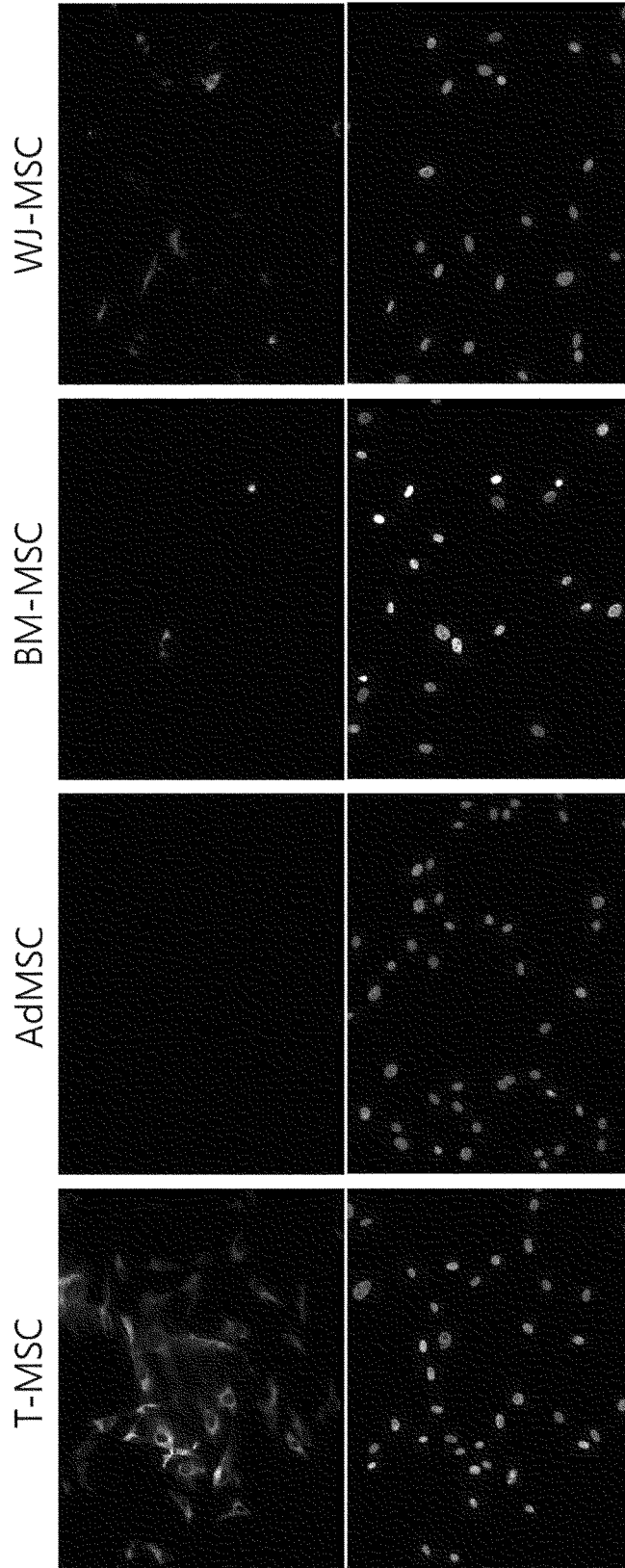
[도9]



[도10]

Vimentin

- Marker of neural stem cell



[도11]

Tuj1 (βIII-tubulin)
- Neuron-specific marker

