



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월02일
(11) 등록번호 10-1994640
(24) 등록일자 2019년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
C12N 2509/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0011226
(22) 출원일자 2019년01월29일
심사청구일자 2019년01월29일
(30) 우선권주장
1020180031101 2018년03월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
JP2007504808 A
KR1020110090810 A*
Nat Protoc. 6(12):1981-9 (2011.11.17.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)메디노
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 ,3107호, 성균관대학교의과대학 (천천동)
(72) 발명자
주경민
서울특별시 양천구 목동동로 250, 201-410 (목동, 진도아파트)
남현
경기도 김포시 김포한강11로 37, 111동 1202호(운양동, 김포한강신도시 2차 스위트)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 4 항

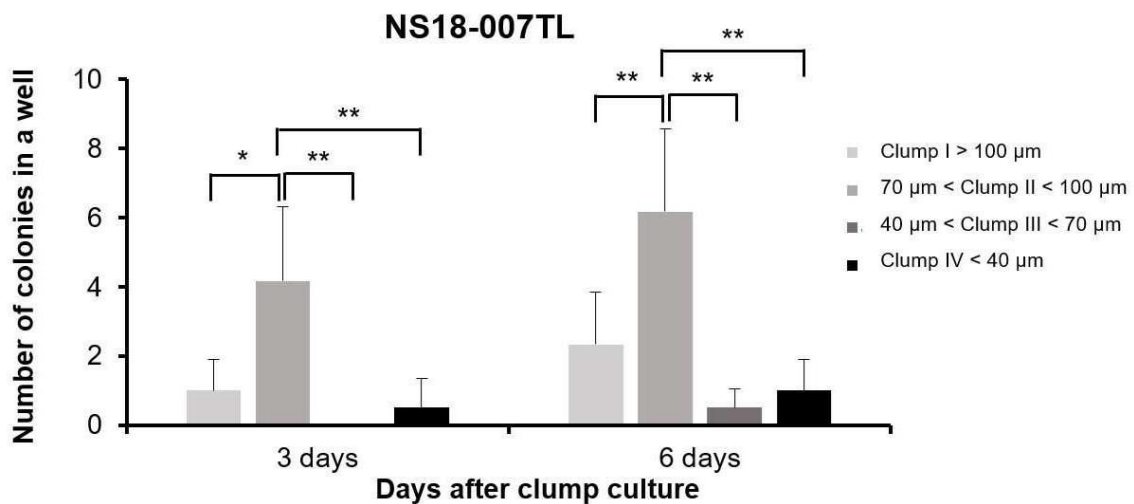
심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포를 분리배양하는 방법을 단순화하여 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 뇌조직을 효소 용액에 넣어 효소 처리하는 단계; 효소 처리된 뇌조직에서 물리적으로 세포 클럼프(clump)를 분리하는 단계; 상기 세포 클럼프를 크기에 따라 분리하고, 불순물을 제거하는 단계; 및 상기 세포 클럼프를 배양접시에 접종하여 계대배양 하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법이 제공된다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345269045

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 학문후속세대양성사업(리서치펠로우)(2/3)

연구과제명 뇌졸중 환자 자가신경줄기세포의 특성분석 및 뇌졸중 치료메커니즘 연구

기 여 율 1/1

주관기관 성균관대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

뇌조직을 효소 용액에 넣어 효소 처리하는 단계;

상기 효소 처리된 뇌조직에서 물리적으로 세포 클럼프(clump)를 분리하는 단계;

상기 분리된 세포 클럼프 중 70 내지 100 μm 크기의 세포 클럼프를 분리하고, 불순물을 제거하는 단계; 및

상기 70 내지 100 μm 크기의 세포 클럼프를 배양접시에 접종하여 계대배양 하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 효소 용액은 파파인(papain); DNase I; 및 D, L-시스테인(cysteine)을 포함하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 뇌조직은 성인의 뇌조직인 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포의 분리배양 방법은 퍼콜(percoll)을 이용한 단일세포 분리단계를 포함하지 아니하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포를 분리배양하는 방법을 단순화하여 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 21세기의 생명공학은 인간복지를 최종목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 최근에 줄기세포의 이용기술은 난치병 치료의 새로운 장으로 떠오르고 있다. 이전까지는 인간의 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역거부와 공급 장기 부족, 백터 개발이나 질환 유전자에 대한 지식 부족으로 효율적인 실용화가 미진하였다.

[0003] 이에 줄기세포연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근원적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 줄기세포(stem

cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 많은 과학자가 인체의 거의 모든 장기 재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상 등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해 왔다.

[0004] 신경줄기세포는 신경세포(neuron), 별아교세포(astrocyte), 희소아돌기아교세포(oligodendrocyte)로 분화 가능한 줄기세포로 설치류인 생쥐에서 처음으로 발견되었다. 이후 사람의 뇌에도 신경줄기세포가 존재하며 평생동안 뇌세포 재생에 관여한다고 알려져 있다. 따라서, 최근 퇴행성 신경계질환의 치료를 위해서 신경줄기세포를 활용한 치료제 개발이 주목 받고 있다.

[0005] 사람 유래의 신경줄기세포 연구 초기에는 태아의 뇌로부터 신경줄기세포를 분리배양 하였다. 이러한 연구를 기반으로 최근 뇌졸중이나 척수손상 치료를 위한 임상연구가 진행되어 왔다. 또한, 배아줄기세포로부터 신경줄기세포를 분리배양하는 연구가 진행되어 왔다. 배아줄기세포는 자연적으로 외배엽으로 분화한다고 알려져 있으며 신경줄기세포로 분화하는 방법이 밝혀졌다. 최근에는 역분화줄기세포로부터 신경줄기세포로 분화하는 방법이 연구되어 자가 이식이 가능한 신경줄기세포 배양에 대한 기대가 높아지고 있다.

[0006] 그러나, 태아나 배아줄기세포로부터 유래된 신경줄기세포는 윤리적인 문제점과 종양원성 안전성에 대한 우려가 있었다. 또한, 역분화줄기세포에서 유래된 신경줄기세포도 종양원성 안전성에 대한 문제점을 가지고 있기 때문에 이러한 줄기세포들의 임상적용을 위해서는 생물학적 안전성에 대한 검증과 근본적인 해결책이 필요한 실정이었다.

[0007] 기존 연구에서는, 신경줄기세포 분리배양에 대하여 뇌조직에서 단일세포로 분리배양하는 방법이 보편적으로 사용되어 왔다.

[0008] 그러나, 퍼콜(Percoll)을 사용하는 단일세포 분리 단계를 거치는 신경줄기세포 분리배양방법은 시간이 오래 걸리고 신경줄기세포 획득 수율에 문제가 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국특허공개공보 10-2014-0071512

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 신경줄기세포를 분리배양하는 방법을 단순화하여 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, 뇌조직을 효소 용액에 넣어 효소 처리하는 단계; 효소 처리된 뇌조직에서 물리적으로 세포 클럼프(clump)를 분리하는 단계; 상기 세포 클럼프를 크기에 따라 분리하고, 불순물을 제거하는 단계; 및 상기 세포 클럼프를 배양접시에 접종하여 계대배양 하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법이 제공된다.

[0013] 그리고, 상기 효소 용액은 파파인(papain); DNase I; 및 D, L-시스테인(cysteine)을 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 상기 세포 클럼프는 40 내지 70 μm 크기, 또는 70 초과 내지 100 μm 이하 크기일 수 있다.

[0015] 그리고, 상기 뇌조직은 성인의 뇌조직일 수 있고, 상기 신경줄기세포의 분리배양 방법은 퍼콜(percoll)을 이용한 단일세포 분리단계를 포함하지 아니할 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법은, 신경줄기세포를 분리 배양하는 방법을 단순화하여 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 분리배양 시간 단축에 따라 세포의 생존율을 높일 수 있으며 단시간에 많은 세포 수를 획득하여 신경줄기세포의 배양 성공률을 높일 수 있다는 장점이 있으므로 신경줄기세포를 사용하여 직, 간접적인 신경재생 효과를 보고자 하는 중추신경계 질환 치료에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 이에 더하여, 본 발명은 신경줄기세포에서 분비되는 단백질 또는 효소에 의한 직, 간접적인 신경재생 관련 분야(조건배지 정제, 엑소좀 개발 등)에도 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은, 퍼콜을 사용하는 신경줄기세포의 기존의 분리배양 방법과, 본 발명에 따른 분리배양 방법인 클럼프 배양(Clump culture)에 대한 모식도이다.

도 2a는, 기존 분리배양 방법(Percoll)과 본 발명의 일 측면에 따른 분리배양 방법(Clump culture)에 따른 뇌조직 무게당(g)당 세포의 수득율을 비교한 그래프이다.

도 2b는, 기존 분리배양 방법(Percoll)과 본 발명의 일 측면에 따른 분리배양 방법(Clump)에 따라 획득한 신경줄기세포의 계대배양에 따른 세포성장을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3a는, 기존 분리배양 방법(Percoll)과 본 발명의 일 측면에 따른 분리배양 방법(Clump culture)에 따라 분리배양된 신경줄기세포의 형태를 나타낸 것이다.

도 3b는, 기존 분리배양 방법(Percoll)과 본 발명의 일 측면에 따른 분리배양 방법(Clump)에 따라 분리배양된 신경줄기세포의 분화조건에서 분화양상을 나타낸 것이다.

도 4a는 클럼프 배양방법에서 클럼프의 최적 크기 조건을 찾기 위한 클럼프의 분리방법을 간략히 나타낸 것이다.

도 4b는 4가지 타입의 클럼프(클럼프 I 내지 IV)의 모양을 현미경으로 관찰한 것이다.

도 5a 및 5b는 두 환자(NS18-007TL, NS18-008TL)로부터 유래한 클럼프 타입 I 내지 IV를 배양한 후 3일 및 6일이 지난 후 배양접시의 바닥에서 관찰되는 콜로니의 숫자를 측정한 결과이다.

도 5c는 클럼프 타입 I 내지 IV를 배양 후 3일 및 6일째에 배양접시에서 관찰되는 콜로니의 모양을 확인한 결과이다.

도 6a는 클럼프 타입 II를 사용하여 배양된 세포의 성장곡선을 기존의 퍼콜(Percoll)을 사용한 단일세포 배양 성장곡선과 비교한 그래프이다.

도 6b는 클럼프 타입 II를 이용한 계대배양에서 세포 형태를 관찰한 것이다.

도 6c는 클럼프 타입 II를 이용하여 배양된 신경줄기세포가 신경분화능력을 유지하고 있는지 확인하기 위해 분화 후 면역형광염색을 실시한 결과이다.

도 7a는 클럼프 타입 II 신경줄기세포의 신생혈관형성능력에 대해 실험한 결과이다.

도 7b는 이식된 신경줄기세포의 위치를 확인하기 위하여 α -SMA 및 CD31을 면역형광염색을 통해 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 신경줄기세포를 분리배양하는 방법을 단순화하여 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한 것이다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 방법(Clump culture)에 따라 신경줄기세포를 배양한 결과, 종래의 퍼콜을 이용한 경우보다 동일 뇌조직 무게 당 더 많은 신경줄기세포를 획득할 수 있음을 확인하였다(실시예 1 참조).

[0020] 본 발명의 다른 실시예에서는, 본 발명의 방법(Clump culture)에 따라 배양된 신경줄기세포의 경우도 신경분화

능력이 유지됨을 확인하였다(실시예 3 참조).

- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 클럼프의 크기에 따라 분리하여 배양한 결과 클럼프 타입 II(70 μ m 내지 100 μ m)의 경우 가장 우수한 효율을 보임을 확인하였다(실시예 4 및 5 참조).
- [0022] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 방법(Clump culture)에 따라 클럼프 타입 II를 배양시 처음 계대배양까지 소요되는 시간이 단축되고 세포의 형태도 정상적이었으며 신경분화능 역시 정상적으로, 줄기세포 특성을 잘 유지하는 것을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [0023] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 클럼프 타입 II에서 유래한 신경줄기세포가 신생혈관형성능력이 있음을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0025] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은, 뇌조직을 효소 용액에 넣어 효소 처리하는 단계; 효소 처리된 뇌조직에서 물리적으로 세포 클럼프(clump)를 분리하는 단계; 상기 세포 클럼프를 크기에 따라 분리하고, 불순물을 제거하는 단계; 및 상기 세포 클럼프를 배양접시에 접종하여 계대배양 하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법을 제공한다.
- [0028] 종래 퍼콜을 사용하는 단일세포 분리 단계를 거치는 신경줄기세포 분리배양방법은 시간이 오래 걸리고 신경줄기세포 획득 수율에 문제점이 있었다. 이에 본 발명자들은 퍼콜을 사용하여 단일세포 분리하는 단계를 포함하지 않고, 클럼프로 분리하는 단계를 도입하는 경우, 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있다는 점을 실험을 통하여 확인하고 발명을 완성하였다.
- [0029] 본 발명의 일 측면에 따르면, 뇌조직을 효소 용액에 넣어 효소 처리하는 단계; 효소 처리된 뇌조직에서 물리적으로 세포 클럼프(clump)를 분리하는 단계; 상기 세포 클럼프를 크기에 따라 분리하고, 불순물을 제거하는 단계; 및 상기 세포 클럼프를 배양접시에 접종하여 계대배양 하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법이 제공된다.
- [0030] 상기 효소 용액은 특별히 제한되지는 아니하나, 파파인(papain); DNase I; 및 D, L-시스테인(cysteine)을 포함할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 세포 클럼프는 뇌조직에서 분리된 후, 메쉬를 이용해 크기별로 분리하는 단계를 더 거칠 수 있다. 세포 클럼프는 40 내지 70 μ m 크기, 또는 70 초과 내지 100 μ m 이하 크기일 수 있다.
- [0032] 그리고, 상기 뇌조직은 바람직하게는 성인의 뇌조직일 수 있다.
- [0033] 한편, 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 신경줄기세포의 분리배양 방법은 퍼콜(percoll)을 이용한 단일세포 분리단계를 포함하지 아니하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 신경줄기세포의 고효율 분리배양 방법은, 퍼콜을 이용한 단일세포 분리 단계를 생략하여 신경줄기세포를 분리배양하는 방법을 단순화하여 분리배양 시간을 단축하고, 신경줄기세포 획득 수율을 증대시킬 수 있고, 분리배양 시간 단축에 따라 세포의 생존률을 높일 수 있으며 단시간에 많은 세포 수를 획득하여 신경줄기세포의 배양 성공률을 높일 수 있다는 장점이 있다.
- [0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0037] **[실시예]**
- [0038] **실시예 1. 신경줄기세포의 일차배양**
- [0039] 사람의 뇌조직의 무게를 측정 후 2-3회 PBS를 사용하여 위생을 실시하였다. 조직을 적당한 크기로 잘라낸 후 엔자임 용액(10 units/ml of papain, 0.1 mg/ml of DNase I, 4 mg/ml of D, L-cysteine)에 넣은 후 블레이드와 수술용 가위를 사용하여 물리적으로 작은 조각으로 잘라냈다. 37° C에서 30분간 처리 후 일회용 피펫(disposable pipette)를 사용하여 조직을 잘게 부순 후, 70 μ M 메쉬를 사용하여 걸러낸 후 PBS(Phosphate Buffered Saline)를 사용하여 위생을 실시하였다.
- [0040] 퍼콜을 사용하는 경우, 10배 농축 PBS와 퍼콜을 1:9의 비율로 섞어 퍼콜 용액을 준비하고 20mL의 세포 현탁액과 10mL의 퍼콜을 섞은 후에 20,000rpm에서 18° C로 원심분리하고, 세포층에서 세포를 분리한 후 다시 PBS를 사용하여 2회 위생을 실시한 후에 poly-L-Ornithine(PLO)를 코팅한 디쉬에서 배양하였다.
- [0041] 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)에 도달하면 Accutase를 사용하여 세포를 떼어낸 후 계대배양을

진행하였다. 트리판 블루(Tryphan blue) 용액을 사용하여 세포의 수와 생존률을 계산하고, Population doubling length(PDL)을 측정하여 세포성장곡선을 그렸으며, 분리배양된 신경줄기세포의 형태를 현미경으로 관찰하였다.

[0042] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 분리배양 방법(Clump culture)의 경우 퍼콜을 이용한 방법보다 동일 뇌조직 무게당 더 많은 신경줄기세포를 획득할 수 있다는 것을 확인하였으며, 도 2b에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 분리배양 방법(Clump culture)을 이용한 경우 퍼콜을 이용한 종래의 방법보다 경우보다 세포성장 효과가 전반적으로 뛰어난 것을 확인하였다.

[0043] 또한, 도 3a에 나타난 바와 같이 배양된 세포를 관찰한 결과 본 발명에 따른 분리배양 방법(Clump culture)을 사용한 경우에도 퍼콜을 이용한 종래의 방법을 이용한 경우와 세포 형태가 유사함을 확인하였다.

[0045] **실시예 2. 신경분화조건에서 분화 유도**

[0046] 신경줄기세포를 70-80% 가량의 컨플루언스로 배양한 후 PBS로 2회 워싱하였다. 신경분화조건인 DMEM/F12, 0.5% FBS, B27, 0.5mM IBMX, P/S를 처리한 후 48시간 후에 세포를 고정한 후 면역염색을 진행하였다.

[0048] **실시예 3. 면역염색**

[0049] 신경줄기세포들은 PLO 가 코팅된 8 well chamber slide(thermo)에 배양한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 5분간 고정시켰다. 0.1% Triton-X 100이 희석되어 있는 PBS(0.1% PBST)에 수세한 후, 블로킹(blocking) 용액(5% normal goat serum, 5% normal donkey serum)에서 1시간 가량 처리한 후 1차 항체를 처리하여 하룻밤 동안(overnight) 반응시키고, 다음날 PBS로 2차례 워싱 후 Alexa488 또는 Alexa594가 결합된 2차 항체를 1시간 동안 처리하였다. DAPI로 카운터 스테이닝(counter staining)을 시행한 뒤 마운팅 후 형광현미경으로 관찰하였다.

[0050] 그 결과 도 3b에 나타난 바와 같이 신경줄기세포의 분화 후에는 Nestin의 발현이 감소하고 신경세포(Tuj1, MAP2), 별아교세포(GFAP)의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] **실시예 4. 클럼프의 크기별 분리 및 형태 관찰**

[0053] 클럼프 배양방법의 최적조건을 찾기 위해 사람 뇌조직에 엔자임 용액을 처리하고 물리적으로 잘게 나눈 다음 다양한 크기의 메쉬(mesh)에 내려 크기별로 클럼프를 획득하였다(도 4a 참조). 클럼프를 크기별로 하기와 같이 타입 I 내지 타입 IV로 정하여 그 형태를 현미경으로 관찰하였다.

[0054] 클럼프 타입 I > 100 μ m

[0055] 70 μ m < 클럼프 타입 II < 100 μ m

[0056] 40 μ m < 클럼프 타입 III < 70 μ m

[0057] 클럼프 타입 IV < 40 μ m

[0058] 그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이 각 타입에 맞게 균일한 크기의 클럼프로 분리되었음을 확인할 수 있었다.

[0060] **실시예 5. 클럼프 타입 I 내지 IV의 분리배양시 효과 비교**

[0061] 클럼프의 크기별 분리배양 효과를 비교하기 위하여 상기 실시예 1의 방법에 따라 두 환자로부터 유래된 클럼프 타입 I 내지 IV를 배양하여 콜로니의 숫자를 확인하고 현미경으로 콜로니의 모양 등을 관찰하였다.

[0062] 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이 분리배양 3일 및 6일째 모두 클럼프 타입 II에서 가장 많은 수의 콜로니를 관찰하여 클럼프 타입 II가 가장 배양 효율이 우수함을 확인하였다.

[0064] **실시예 6. 클럼프 타입 II의 계대배양 및 신경분화능력 확인**

[0065] 본 발명에 따른 방법으로 클럼프 타입 II를 배양한 경우와 퍼콜을 이용한 단일세포 배양시 효과를 비교하기 위해 상기 실시예 1의 방법에 따라 세포를 배양하고 배양 성장곡선을 작성하였으며, 클럼프 타입 II의 계대배양에 따른 세포의 형태를 현미경을 통해 관찰하였다.

[0066] 또한, 클럼프 타입 II의 방법으로 배양된 신경줄기세포가 신경분화능력을 유지하고 있는지 확인하기 위해 신경분화 후, 상기 실시예 3의 방법에 따라 면역형광염색법을 이용하였다.

[0067] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 클럼프 타입 II를 배양할 경우 처음 계대배양까지 소요되는 시간이 단축되었으며 10^9 개 세포까지 도달하는 시간 역시 단축되었고, 도 6b에 나타난 바와 같이 클럼프 타입 II의 계대배양시

세포 모양이 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0068] 또한, 면역형광염색 결과 도 6c에 나타난 바와 같이 신경으로 분화 전에는 미분화 마커인 Nestin이 강하게 발현되지만 분화 후에는 거의 관찰되지 않았으며 신경세포 마커인 Tuj1과 Map2의 발현도 분화 전에는 관찰되지 않았지만 분화 후에는 관찰되었으며, 별아교세포 마커인 GFAP도 분화 전에는 거의 관찰되지 않았지만 분화 후에는 관찰되었다.

[0069] 상기 결과는, 클럼프 타입 II로 배양된 신경줄기세포는 줄기세포 특성을 잘 유지하는 것을 의미한다.

[0071] **실시예 7. 클럼프 타입 II에서 유래한 신경줄기세포의 신생혈관형성능력 확인**

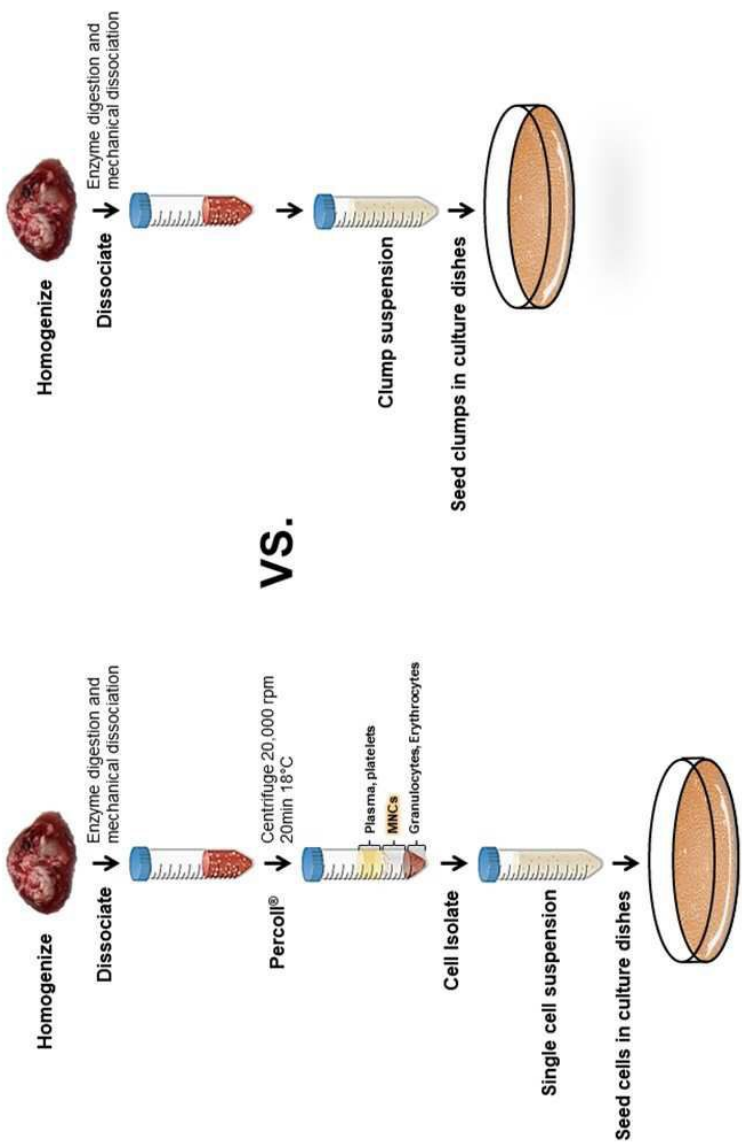
[0072] 팻줄유래 혈관내피세포는 Promocell에서 구매하였으며 공급자의 전용배지를 사용하였다. 200 μ L의 Phenol red-free Matrigel(BD)에 1×10^6 혈관내피세포와 1×10^6 신경줄기세포를 섞은 후 4-6주령의 Balbc-nu 마우스의 피하에 이식했다. 3-4일 뒤에 Matrigel 제거한 후 4% PFA로 24시간 동안 고정한 후 블록을 제작하였다. 조직학적 분석을 위해 헤마톡실린&에오진(H&E) 염색을 실시하였으며 Matrigel 내에 생성된 신생혈관을 염색하기 위해 혈관내피세포와 신경줄기세포를 구분하기 위하여 CD31과 alpha-smooth muscle actin(α -SMA)으로 면역형광염색을 실시하였다.

[0073] 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이 신경줄기세포 단독으로는 혈관을 거의 형성하지 못하였지만 혈관내피세포와 신경줄기세포를 함께 섞어서 이식한 경우에는 혈관형성을 확인할 수 있었다. 또한, 도 7b에 나타난 바와 같이 혈관 주변으로 신경줄기세포가 위치하여 혈관 형성에 기여한 것을 확인하였다.

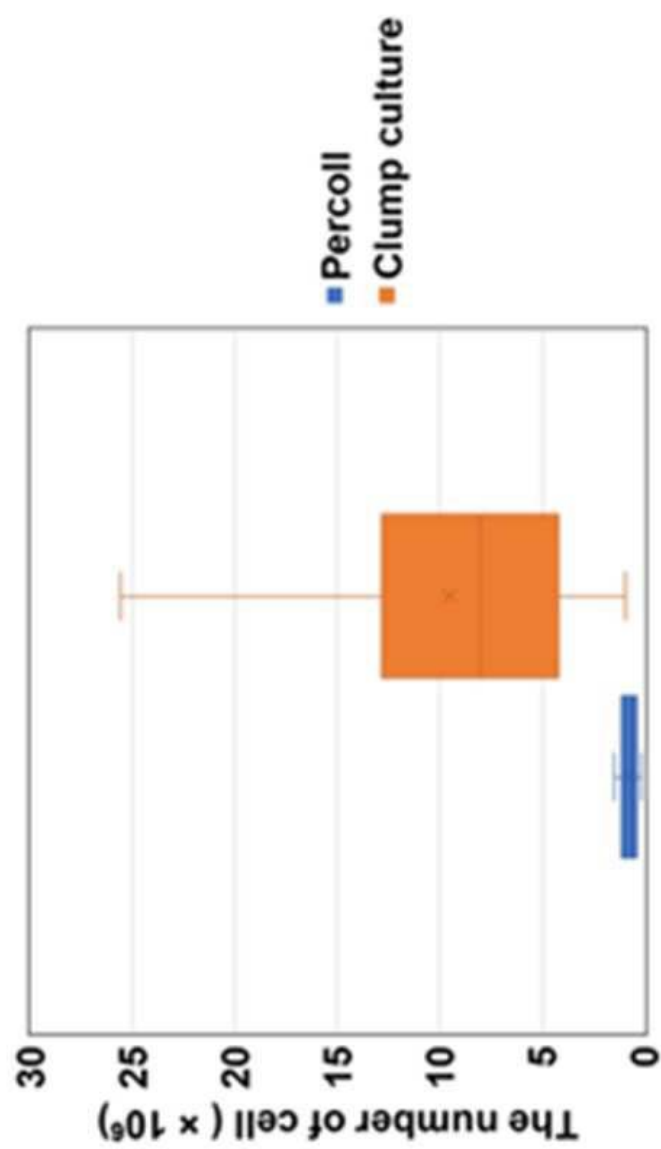
[0075] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

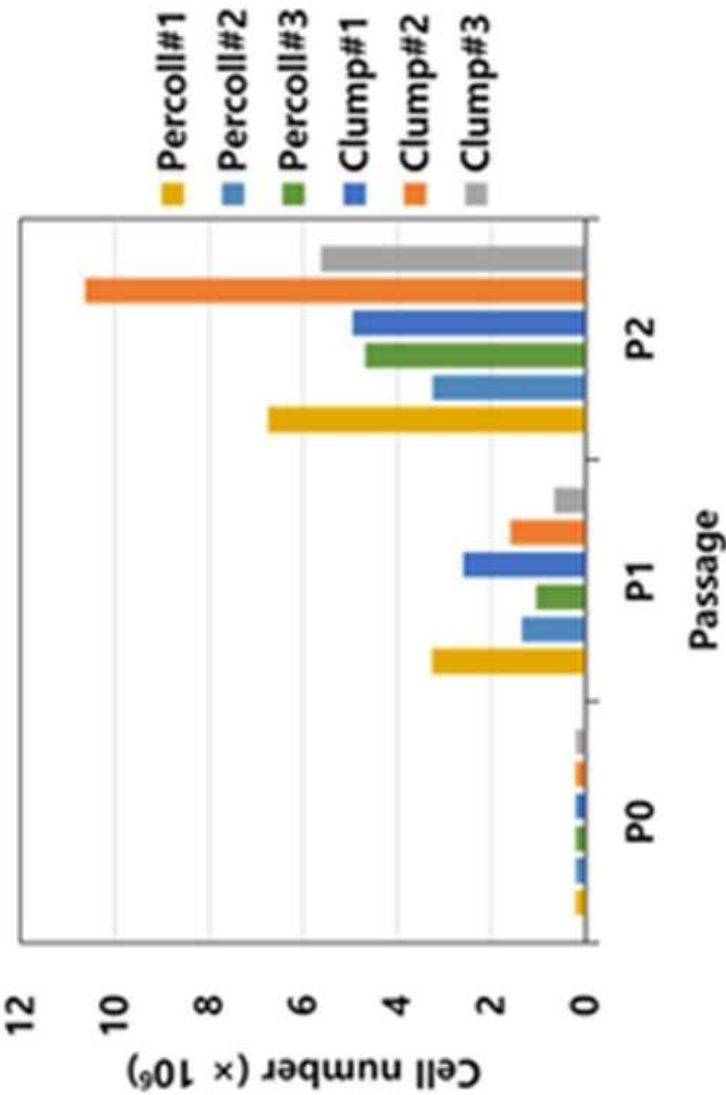
도면1



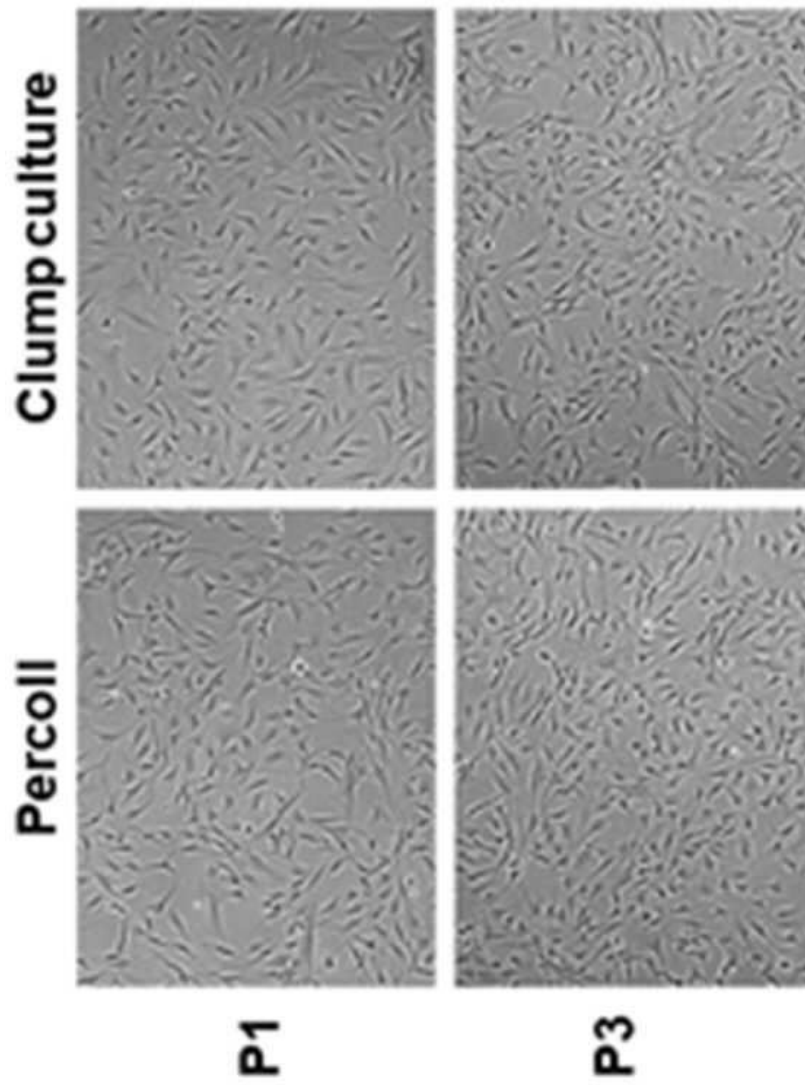
도면2a



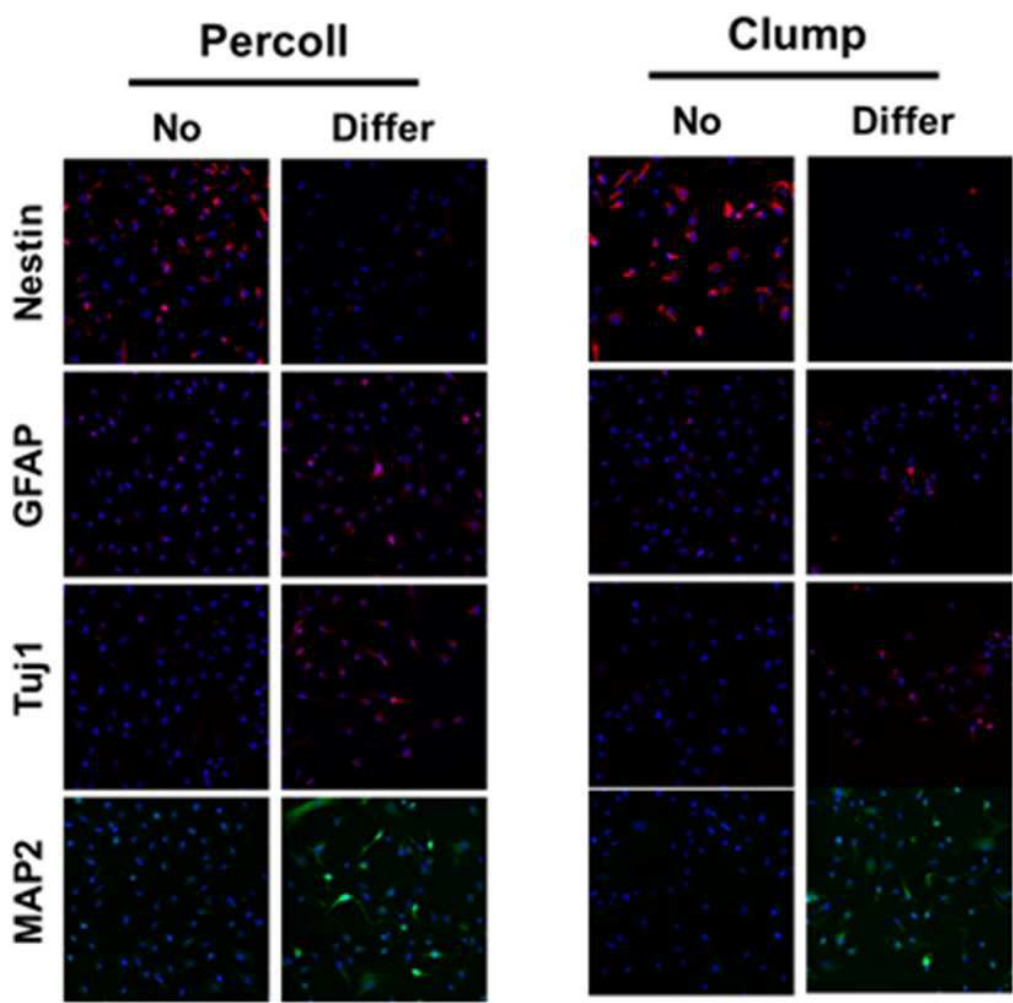
도면2b



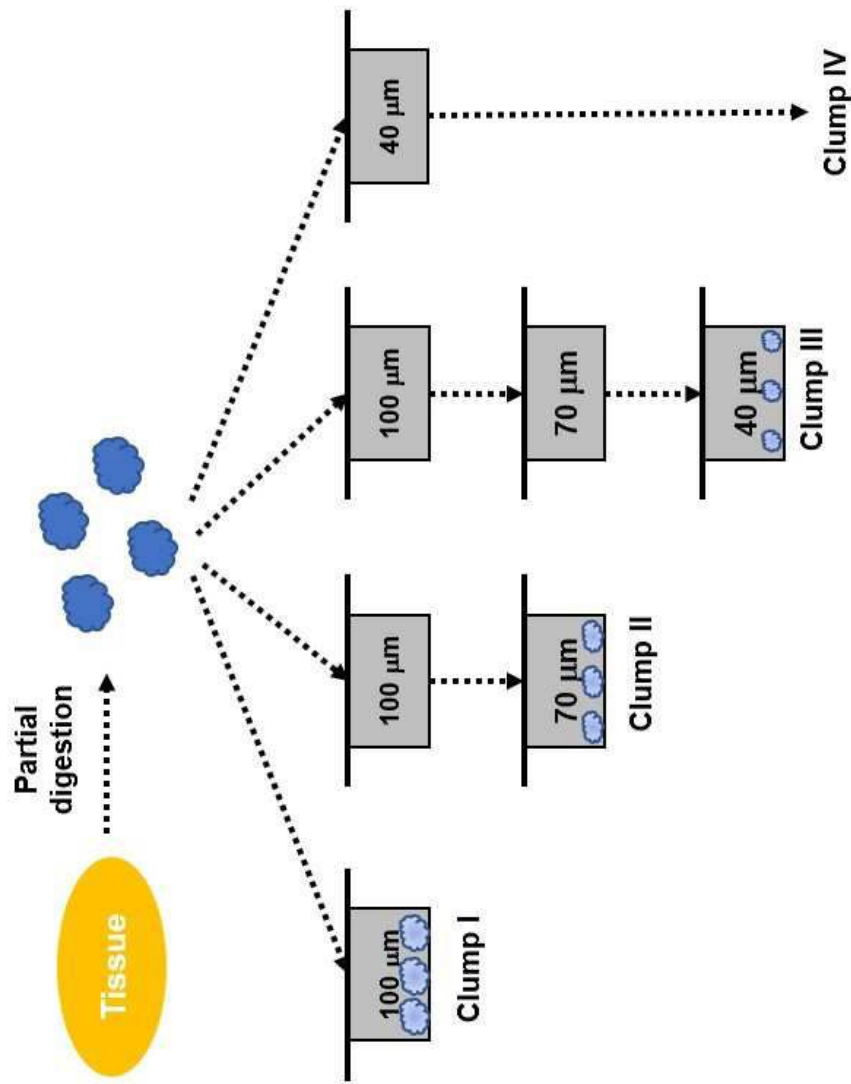
도면3a



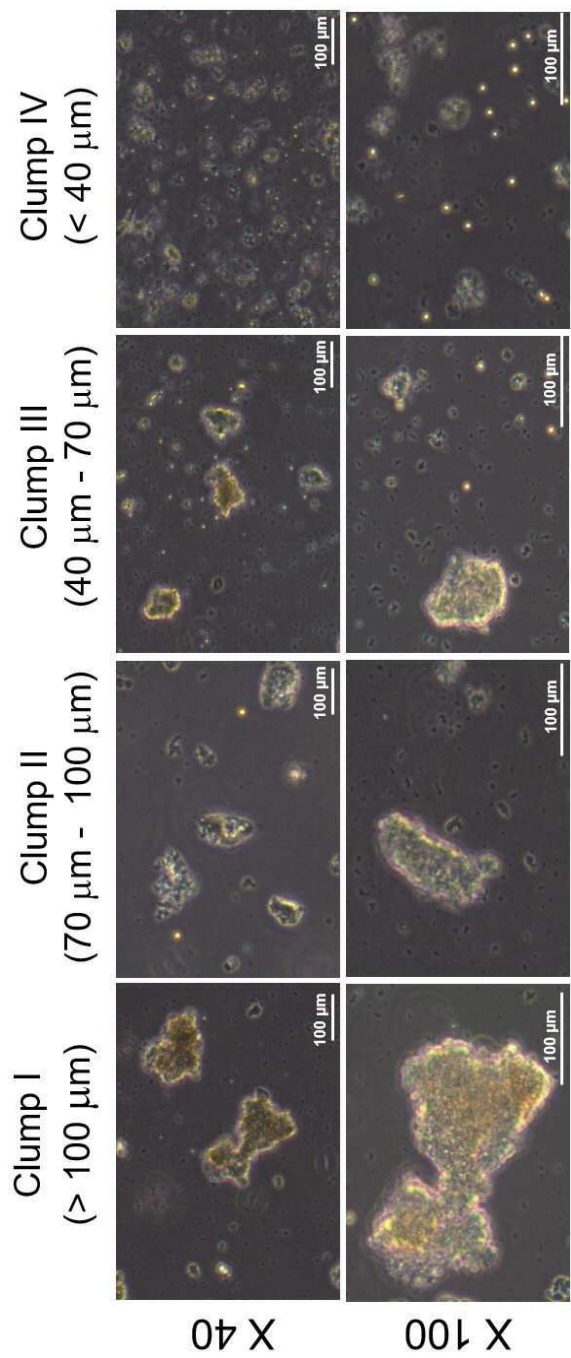
도면3b



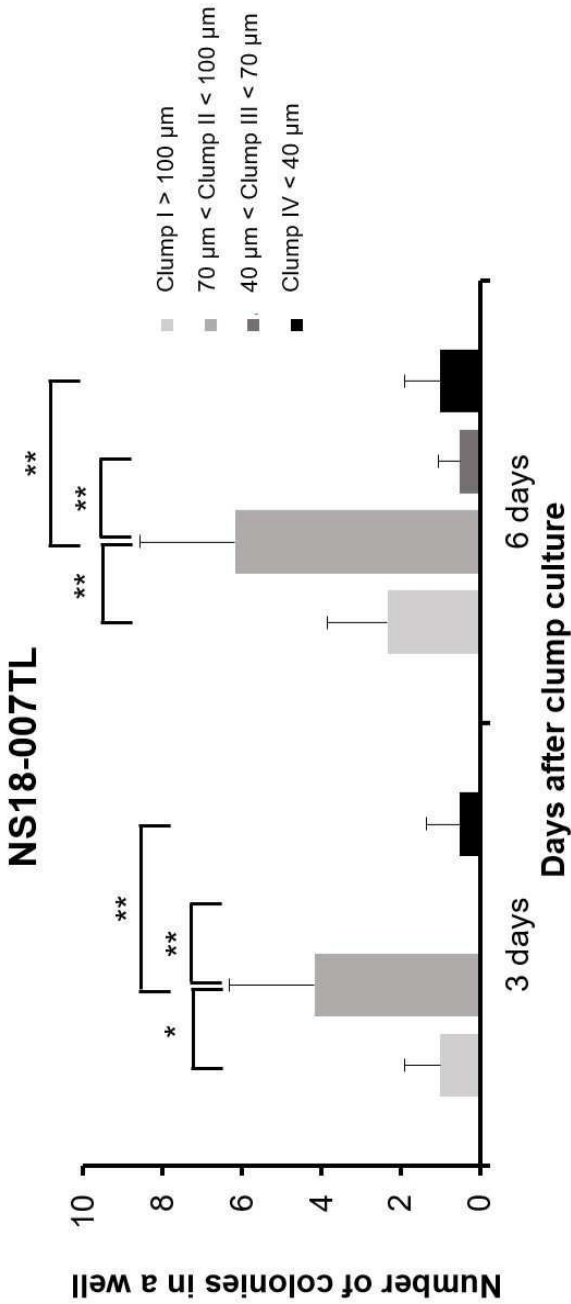
도면4a



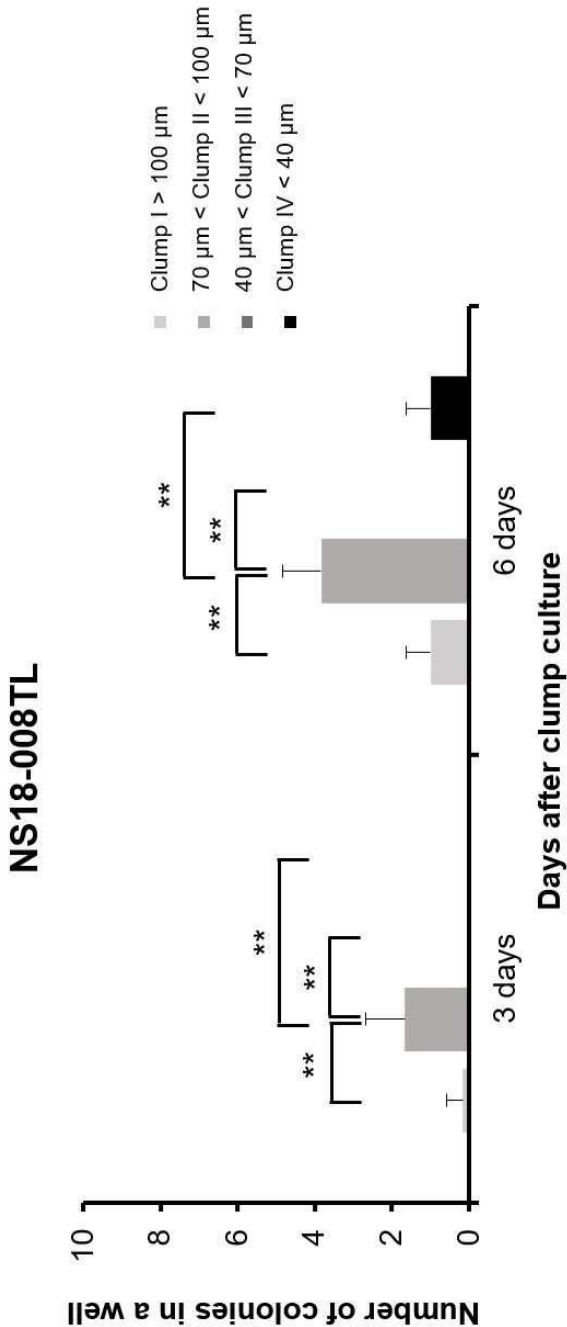
도면4b



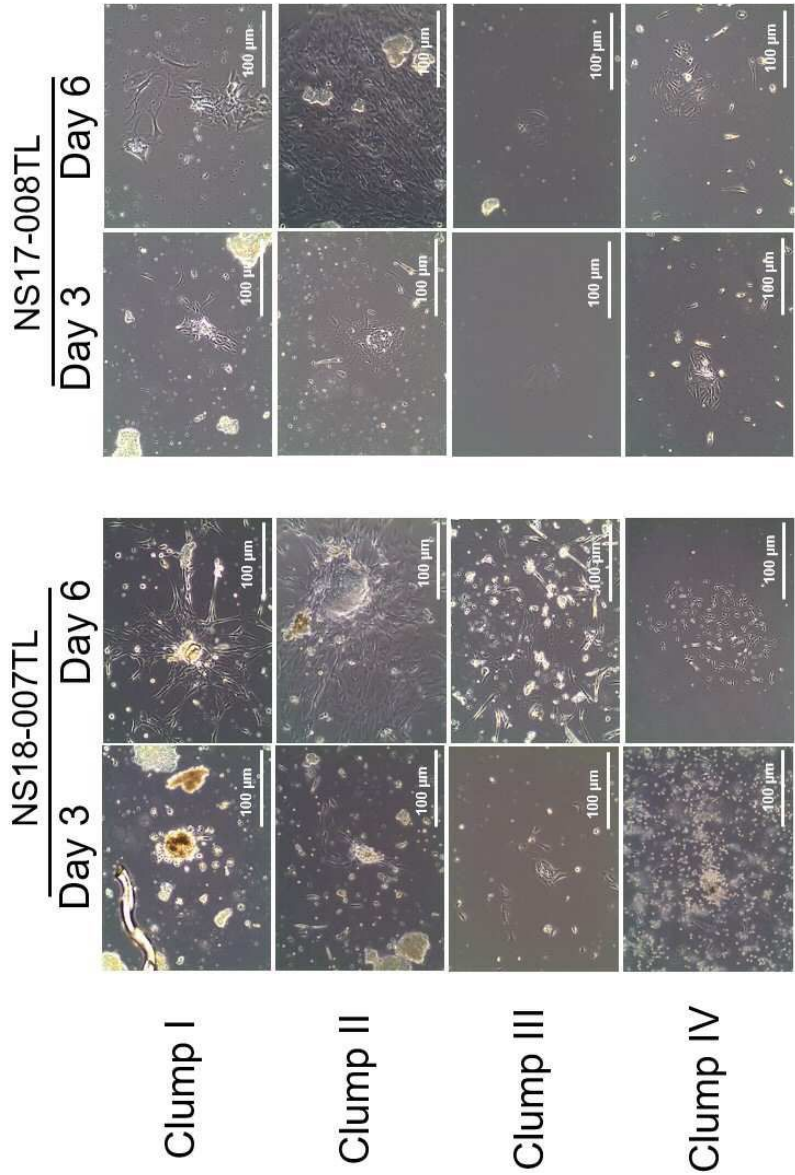
도면5a



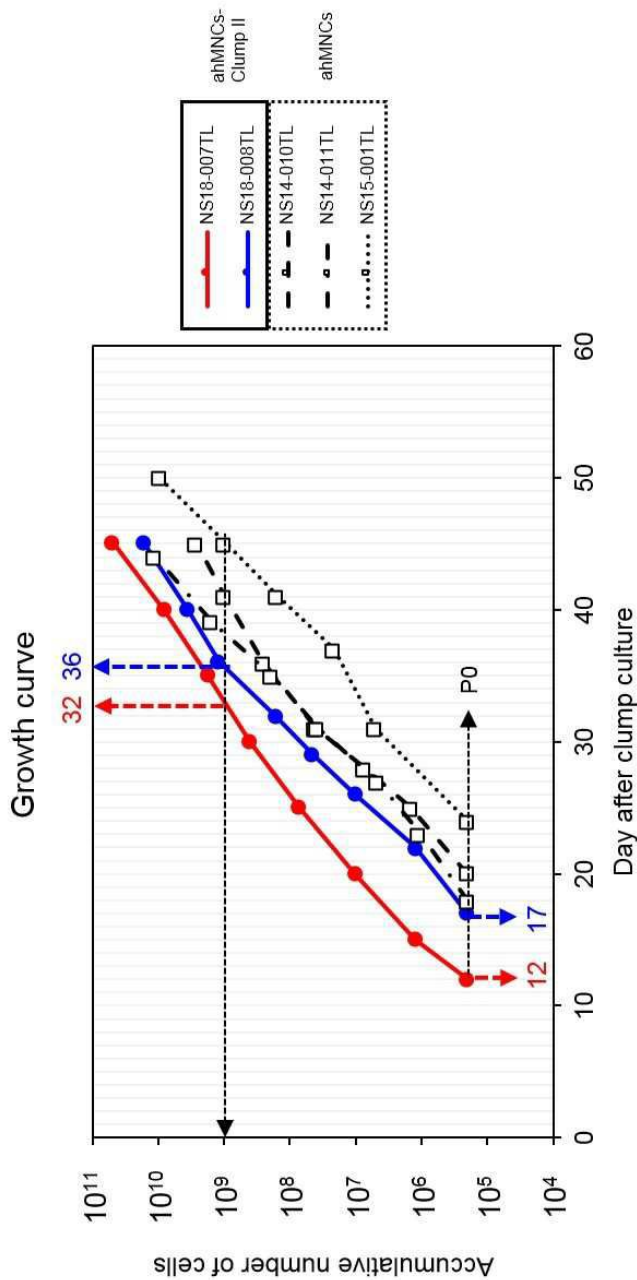
도면5b



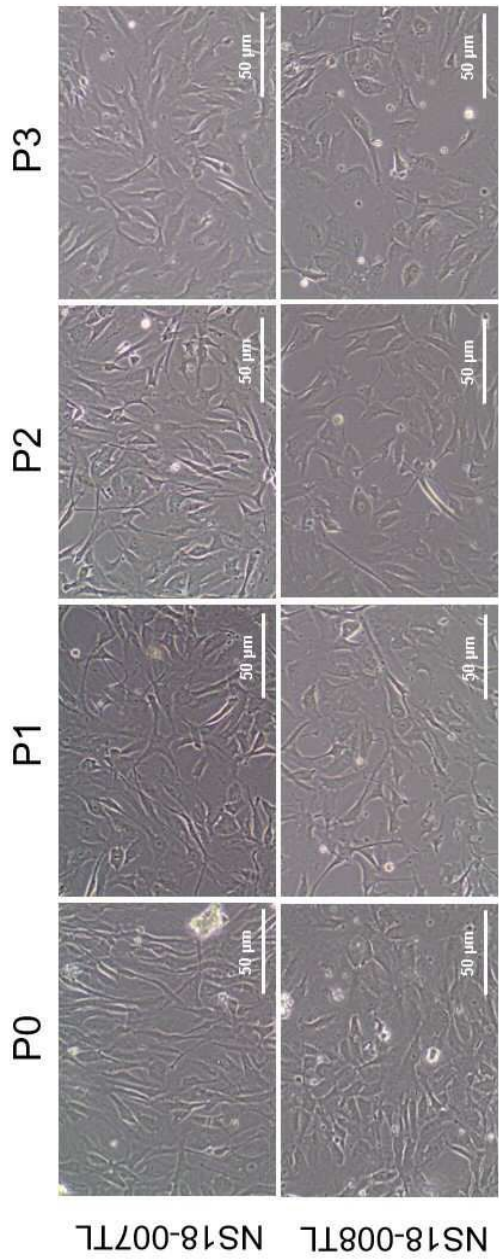
도면5c



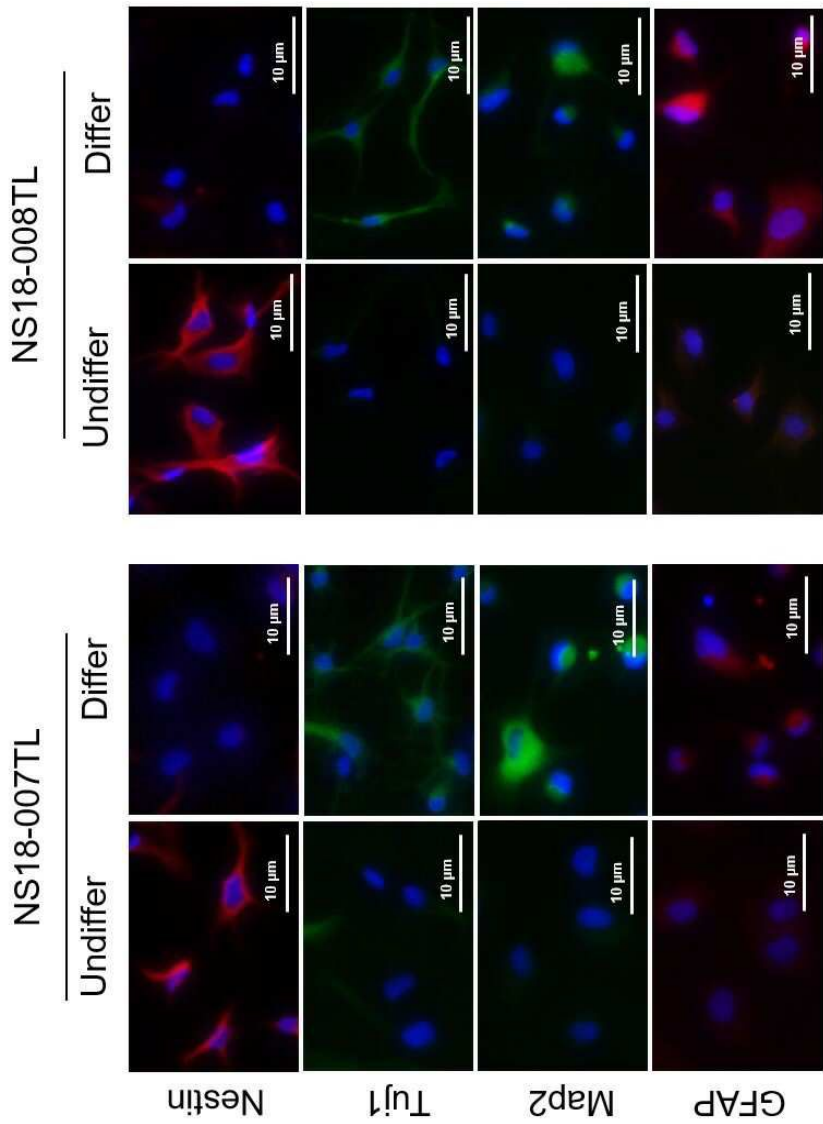
도면6a



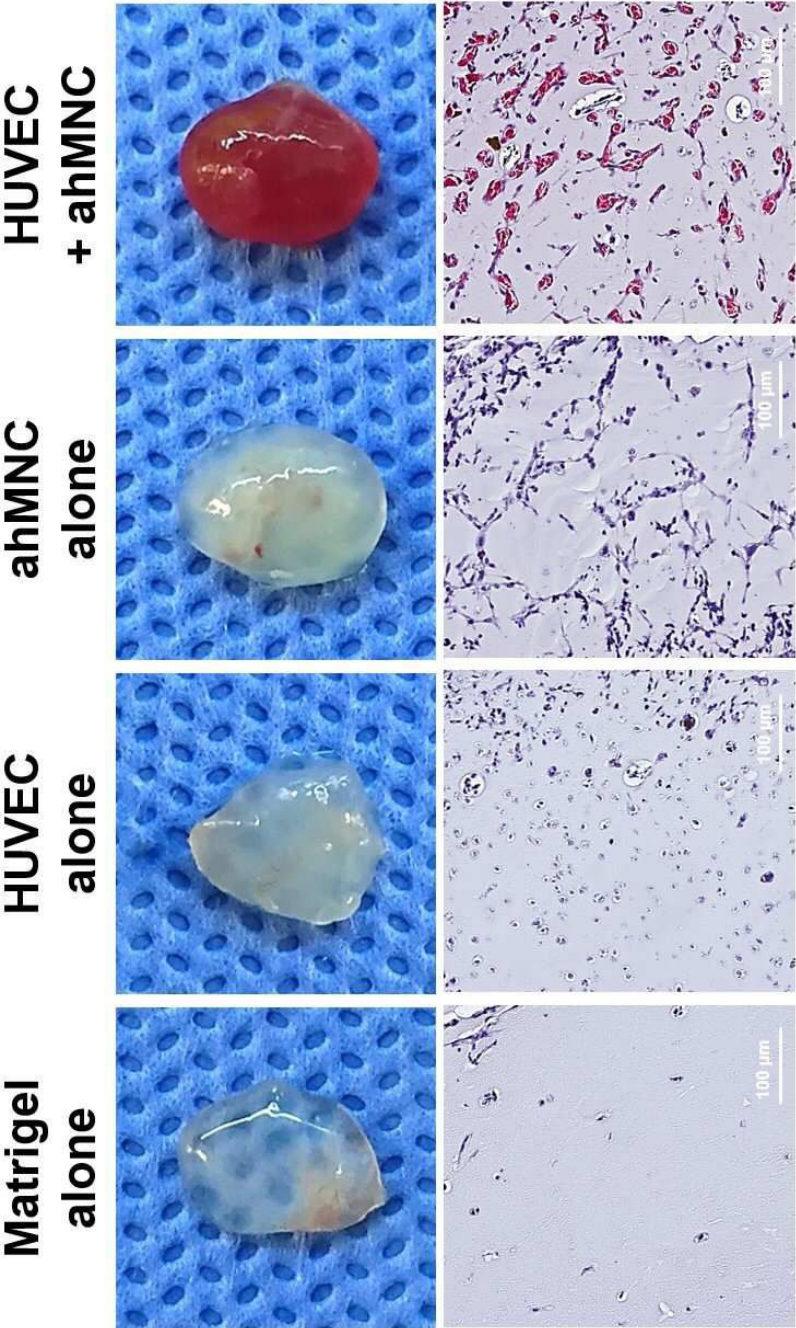
도면6b



도면6c



도면7a



도면7b

