(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월16일
(11) 등록번호 10-2056447
(24) 등록일자 2019년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/30 (2015.01) *A61K 8/98* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/30 (2013.01)
A61K 8/981 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0011224
(22) 출원일자 2019년01월29일
심사청구일자 2019년01월29일
(65) 공개번호 10-2019-0109233
(43) 공개일자 2019년09월25일
(30) 우선권주장
1020180031099 2018년03월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
HAO, L. 등., BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, 2014, 2014권, 아티클 ID 468748, 페이지 1-17.
GHOURICHAEE, S. S. 등., JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY B, 2016, 4권, 페이지 3509-3514.

(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 스위첸)
(74) 대리인
이명진

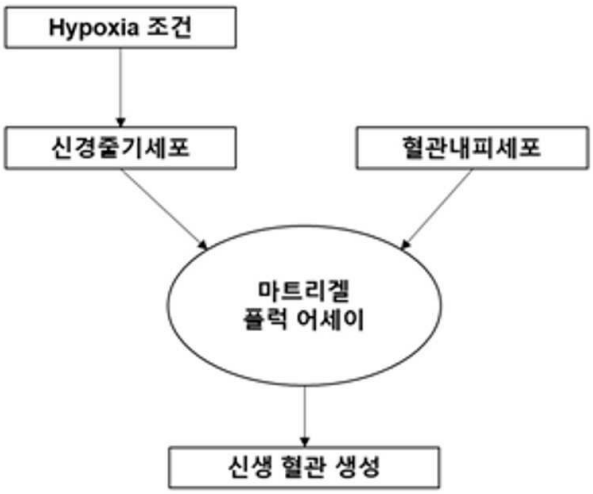
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포를 이용한 혈관형성 유도 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신경줄기세포를 이용한 혈관형성 유도 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 사람 뇌조직에서 유래된 신경줄기세포는 단핵세포 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 또는 Gro를 분비함으로써 혈관을 형성하는 효과를 가지며, 본 발명의 신경줄기세포에 $CoCl_2$를 주입할 경우 및 신경줄기세포를 hypoxia chamber에 배양할 경우 hypoxia 조건이 유도되어 MCP-1 및 Gro의 분비량이 증가하는 것을 확인하였는바, 본 발명의 사람 뇌조직 유래 신경줄기세포를 이용하여 혈관형성을 유도할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

신경줄기세포 및 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는, 혈관 형성 유도용 조성물로서,

상기 신경줄기세포는 코발트(Ⅱ) 클로라이드(Cobalt(II) chloride, $CoCl_2$)를 100 내지 500 μM의 농도로 처리하고 배양한 것이며,

상기 조성물은 단핵세포 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 또는 성장 관련 종양 유전자(growth related oncogene; Gro)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포는 사람 뇌 조직으로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배양은 12 내지 72 시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포를 이용한 혈관형성 유도 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 줄기세포(stem cell)는 자가증식이 가능하며 다양한 세포로 분화 가능하다. 줄기세포의 기원은 배아나 태아로부터 유래될 수 있으며 성체의 조직에서도 줄기세포가 존재하여 외부적 손상시에 조직을 재생한다고 알려져 있다. 성체 줄기세포로는 중간엽 줄기세포가 잘 알려져 있으며 전세계적으로 임상연구에서 가장 앞서 나가고 있다.

[0004] 신경줄기세포(neural stem cell)는 자가증식이 가능하며 신경세포(neuron), 별아교세포(astrocyte), 희소아돌기아교세포(oligodendrocyte)로 분화 가능하기 때문에 신경계질환(neurological disorders)의 치료에 있어서 중요한 의미가 있는 줄기세포이다. 설치류인 생쥐에서 처음으로 밝혀졌으며 뇌의 특정 부위에 존재한다고 알려져 왔다. 이후 사람의 뇌에서도 신경줄기세포가 존재한다고 알려졌으며 태아의 뇌조직을 사용하여 대량배양이 가능한 신경줄기세포가 임상시험에 사용되어 왔다. 최근에 성인의 뇌조직에서도 신경줄기세포가 존재한다고 보고 되었으며 구배양(sphere culture) 방법이 아닌 부착배양(adherent culture) 방법을 사용하여 대량배양이 가능하다

고 알려져 있다.

[0005] 혈관형성(angiogenesis)은 새로운 혈관의 성장으로서, 주로 모세혈관 내피세포에 의한 이동, 증식 및 관 형성에 의존하는 과정이다. 혈관형성은 상처 치유에서 암을 포괄하는 생리학적 및 병리학적 상태에서 혈관을 형성할 수 있다. 혈관형성 조절은 부위 및 자극 의존적이며, 각 경우에 조절 분자의 고유한 조합을 수반할 수 있다. 혈관형성 동안에 내피세포는 자신의 정지기 상태에서 벗어나서 빠르게 증식한다.

[0006] 한편, 마트리겔은 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스의 육종세포에서 추출된 단백질 복합체로서(BD Bioscience사의 제품명), 라미닌(lamonin), 콜라겐(collagen), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)과 같은 세포외 매트릭스(extracellular matrix, ECM)와 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 상피세포 성장인자(epiderma growth factor, EFG), 인슐린 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 형질전환 성장인자-베타(transforming growth factor-beta, TGF-β), 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)와 같은 성장인자를 함유한다. 마트리겔을 이루고 있는 복합체는 많은 조직에서 발견되는 복잡한 세포외 환경을 제공함으로써 세포 배양을 위한 기질로서 이용되고 있다.

[0007] 마트리겔은 허혈성 동물 모델(ischemic animal model)에서 이식된 심근세포(cardiomyocytes cell)와 내피세포(endothelial cells)의 생존을 강화하기 위해 사용된바 있고, 배아줄기세포는 자기재생능(selfrenewability)과 다분화능(pluripotency)이 있기 때문에 마우스와 인간의 배아줄기세포(embryoni stem cell, ESC)를 체외배양함에 있어서 마트리겔이 사용되어 왔다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 최근 다양한 기능을 가져 의약품 및 화장료 등의 상업적 이용가치가 상승하고 있는 줄기세포 중에서도 사람 뇌조직으로부터 유래한 신경줄기세포가 MCP-1 및 Gro를 분비하여 혈관형성 효과를 가지는 것을 마트리겔을 이용한 실험에서 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1269125호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 종래의 신경줄기세포의 기능으로 알려진 신경세포로의 분화 이외의 기능에 대하여 연구한 결과, 사람 뇌조직으로부터 유래된 신경줄기세포가 MCP-1 및 Gro를 분비함으로써 혈관형성 효과를 가지는 것을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0012] 이에, 본 발명의 목적은 (a) 신경줄기세포를 저산소(hypoxia) 조건에서 배양하는 단계;

[0013] (b) 상기 배양된 신경줄기세포를 대상체에 주입하는 단계;

[0014] 를 포함하는, 혈관형성을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 신경줄기세포를 저산소(hypoxia) 조건에서 배양하는 단계;

[0019] (b) 상기 배양된 신경줄기세포를 대상체에 주입하는 단계;

[0020] 를 포함하는, 혈관형성을 유도하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일구현예로, 상기 신경줄기세포는 사람 뇌 조직으로부터 유래된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 (a) 단계는 신경줄기세포에 코발트(Ⅱ)클로라이드(Cobalt(II) chloride, $CoCl_2$)를 처리하는 단계 또는 신경줄기세포를 저산소 챔버(hypoxia chamber)에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (b) 단계는 혈관내피세포를 상기 신경줄기세포와 함께 대상체에 주입하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 배양된 신경줄기세포는 단핵세포 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 또는 성장 관련 종양 유전자(growth related oncogene; Gro)를 분비할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 신경줄기세포를 저산소 챔버(hypoxia chamber)에서 배양하는 단계는 12 내지 72시간 동안 수행될 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 $CoCl_2$는 농도가 100 내지 500uM일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 사람 뇌조직에서 유래된 신경줄기세포는 단핵세포 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 또는 성장 관련 종양 유전자(growth related oncogene; Gro)를 분비함으로써 혈관을 형성하는 효과를 가지며, 본 발명의 신경줄기세포에 $CoCl_2$를 주입할 경우 및 신경줄기세포를 hypoxia chamber에 배양할 경우 hypoxia 조건이 유도되어 MCP-1 및 Gro의 분비량이 증가하는 것을 확인하였는바, 본 발명의 사람 뇌조직 유래 신경줄기세포를 hypoxia 조건에서 배양하여 혈관형성을 유도하는데 이용할 수 있으며, 상기 신경줄기세포에서 분비되는 단백질 또는 효소는 조건배지 정제, 엑소좀 개발 등과 같은 신생혈관형성과 관련된 개발에 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 신경줄기세포는 퇴행성 신경계 질환에서 혈관형성이 회복기전으로 알려진 뇌졸중, 척수손상, 알츠하이머병 등의 질환에 대해 신경줄기세포 치료제로 이용 가능할 뿐만 아니라, 퇴행성 신경계 질환 이외에도 혈관형성이 회복기전으로 알려진 다양한 질환에 대한 신경줄기세포 치료제 및 부산물을 활용한 치료제의 개발 등에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1a 내지 1c는 본 발명의 일구현예에 따른 마트리겔 플럭 어세이를 통한 신경줄기세포의 신생혈관형성 효과를 확인한 것으로, 도 1a는 마트리겔 플럭 어세이 실험의 개요를 나타낸 도면이고, 도 1b는 신경줄기세포 및 혈관내피세포를 혼합하여 이식 후 3일째에 신생혈관형성 유무를 적혈구 세포의 침투에 의한 색깔로 분별하여 나타낸 도면이며, 도 1c는 마트리겔 플럭을 H&E 염색으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2a 및 2b는 본 발명의 일구현예에 따른 싸이토카인 어레이(도 2a) 및 ELISA 방법(도 2b)을 사용한 신경줄기세포의 혈관형성 유효성 인자의 정성 및 정량 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일구현예에 따른 MCP-1 및 Gro 억제 항체에 의한 신생혈관형성 억제 효과를 확인하여 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일구현예에 따른 신경줄기세포에서 $CoCl_2$ 처리에 따른 Hypoxia 조건에 의해 분비되는 신생혈관재생효과와 관련된 MCP-1 및 Gro의 발현이 증가하는 신호전달체계를 나타낸 도면이다.

도 5는 $CoCl_2$를 농도별로 처리하여 Hypoxia 조건을 유도한 후 신경줄기세포에서 분비되는 MCP-1과 Groα의 발현을 확인하는 실험계획을 나타낸 도면이다.

도 6a는 $CoCl_2$를 농도별로 처리한 후 MCP-1의 농도를 ELISA 방법으로 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6b는 $CoCl_2$를 농도별로 처리한 후 Groα의 농도를 ELISA 방법으로 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 신경줄기세포를 Hypoxia chamber에서 배양하여 Hypoxia 조건을 유도한 후 신경줄기세포에서 분비되는 MCP-1과 Groα의 발현을 확인하는 실험계획을 나타낸 도면이다.

도 8은 신경줄기세포를 Hypoxia chamber에서 배양한 후 시간별 MCP-1 및 Groα의 농도를 ELISA 방법으로 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 (a) 신경줄기세포를 저산소(hypoxia) 조건에서 배양하는 단계;

[0032] (b) 상기 배양된 신경줄기세포를 대상체에 주입하는 단계;

[0033] 를 포함하는, 혈관형성을 유도하는 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 상기 신경줄기세포는 사람 뇌 조직으로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 대상체는 혈관형성 유도를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 저산소(hypoxia) 조건은 산소 분압이 1% 내지 5%인 세포 배양 조건일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 신경줄기세포에 코발트(Ⅱ)클로라이드(Cobalt(II) chloride, $CoCl_2$)를 처리하는 단계 또는 신경줄기세포를 저산소 챔버(hypoxia chamber)에서 배양하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 혈관내피세포를 상기 신경줄기세포와 함께 대상체에 주입하는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포를 저산소 챔버(hypoxia chamber)에서 배양할 경우 hypoxia 조건이 유도되어 MCP-1 및 Gro의 분비량이 증가할 수 있으며, 상기 배양은 12 내지 72시간 동안 수행될 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 48 내지 72시간 동안 배양할 때 MCP-1 및 Groα의 발현량이 높아 바람직할 수 있으나, 상기 배양 시간에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 또한, 상기 배양된 신경줄기세포는 단핵세포 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 또는 성장 관련 종양 유전자(growth related oncogene; Gro)를 분비하여 혈관을 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 이 때, 상기 "단핵세포 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1)"은 단구나 혈관내피, 신경교종세포주 등을 생산하는 단구주화성 인자로, 케모카인들의 β아과에 속하는 단백질이다. MCP-1은 단핵세포들에 대해 강력한 주화성 효과를 가지며 T 림프구들, 비만 세포들 및 호염기성 백혈구들에 대해서도 효과를 나타낸다. MCP-1은 다양한 형태의 세포들에 의해 만들어지며(백혈구들, 혈소판들, 섬유아세포들, 내피 세포들 및 평활근 세포들), 단핵세포들 및 대식세포들에 대해 가장 높은 특이성을 나타내고 주화성 인자뿐만 아니라 활성화 자극을 구성하고 그 결과 다수의 염증성 인자들(초과산화물들, 아라키돈산 및 유도체들, 사이토카인들/케모카인들)을 만드는 과정들을 유도하며 식세포 작용을 증폭시킨다.

[0042] 또한, 상기 "성장 관련 종양 유전자(growth related oncogene; Gro)"는 MGSA(melanoma growth stimulatory activity)라고도 하고, GROα(MGSAα, CXCL1)와 GROβ(MGSAβ, CXCL2)와 GROɣ(MGSAɣ, CXCL3)까지 3종류가 존재하며, CXC케모카인에 속한다. 최초인 두 개 시스테인잔기가 CXC구조를 하고, 또한 ELR(글루탐산-류신-아트기닌)모티프를 구비한다.

[0043] 상기 신경줄기세포에 $CoCl_2$를 주입할 경우 hypoxia 조건이 유도되어 MCP-1 및 Gro의 분비량이 증가할 수 있으며, 이 때 $CoCl_2$는 농도가 100 내지 500uM일 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 상기 신경줄기세포에 $CoCl_2$를 500uM 농도로 처리하고 24시간 배양, 또는 100uM 농도로 처리하고 24시간 배양하고 배지를 교체한 후 다시 24시간 배양할 경우 MCP-1 및 Gro의 분비량이 높아 바람직할 수 있으나, 상기 농도에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 일실시예에서는 마트리겔 플럭 어세이 및 H&E 염색을 이용한 조직학적 분석을 통해 신경줄기세포의 혈관형성 억제 효과를 확인하였다(실시예 1~2 참조).

[0045] 본 발명의 다른 실시예에서는 싸이토카인 어레이 및 ELISA를 이용하여 신경줄기세포에서 분비되는 MCP-1 및 Gro의 양을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 MCP-1 및 Gro 각각의 중화 항체(neutralization antibody)를 이용하여 MCP-1

및 Gro의 혈관형성 효과를 확인하였다(실시예 4 참조).

[0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 신경줄기세포에서 $CoCl_2$의 농도별 처리에 의한 MCP-1 및 Groα의 발현량을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 신경줄기세포를 hypoxia chamber에 배양한 후 MCP-1 및 Groα의 발현량을 확인하였다(실시예 6 참조).

[0050] **실시예 1. 마트리겔 플럭 어세이(Matrigel plug assay)**

[0051] 혈관형성 능력을 검증하고자 실험군을 마트리겔 단독군, 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC) 단독군, 성인다능성신경세포(adult human multipotent neural cell, ahMNC) 단독군, 태아신경줄기세포(fetal neural stem cell, fNSC)와 HUVEC혼합군, 및 ahMNC 와 HUVEC 혼합군으로 구성하여 실험하였다.

[0052] 검증하고자 하는 세포(ahMNC 및 음성대조군인 fNSC)와 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC)를 1:1의 비율로 총 $2X10^6$ 세포가 되도록 하여 200uL의 마트리겔과 혼합한 후 주사기로 면역결핍마우스의 피하에 이식하였다. 이식 후 3일째 이식된 마트리겔을 분리하여 혈관의 형성 유무를 적혈구 세포의 침투에 의한 색깔로 분별하였다. 그 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이, ahMNC와 HUVEC 혼합군에서 붉은색으로 나타났다.

[0053] 따라서, 상기 결과로부터 신경줄기세포와 혈관내피세포를 함께 이식하였을 때 혈관이 형성된다는 것을 알 수 있었다.

[0055] **실시예 2. 조직학적 분석**

[0056] 상기 실시예 1의 마트리겔 플럭을 4% PFA로 고정한 후 블록을 제작하였다. H&E 염색을 위해서 5um 두께로 조직절편을 만든 후 슬라이드에 올리고 디파라핀 과정을 거친 후에 H&E 염색을 실시하였다.

[0057] 그 결과, 도 1c에 나타낸 바와 같이 ahMNC와 HUVEC 혼합군에서 혈관이 형성되는 것을 확인하였다.

[0058] 따라서, 상기 결과로부터 신경줄기세포와 혈관내피세포를 함께 이식하였을 때 혈관이 형성된다는 것을 알 수 있었다.

[0060] **실시예 3. 싸이토카인 어레이(Cytokine array) 및 ELISA를 이용한 MCP-1 및 Gro의 정량**

[0061] 신경줄기세포의 신생혈관형성 효과를 확인하기 위해 신경줄기세포에서 분비되는 성장인자나 싸이토카인을 정성 및 정량적으로 분석하였다.

[0062] 서로 다른 세 개의 신경줄기세포 NS14-001TL, NS14-008TL, NS14-015TL을 100mm dish에 접종한 후 3~4일 배양하고 배양접시에 70% 정도 차도록 confluency로 채운 다음 배양한 후에, phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척 후 배양액을 DMEM/F12로 바꾸고 24시간 배양하였다. 그 후 상층액(조건배지(conditioned medium))을 회수하였다. 싸이토카인 어레이는 Human cytokine array(RayBio Human Cytokine Antibody Array C Series 1000, Raybiotech, Norcross, GA)를 사용하여 진행하였다.

[0063] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 MCP-1, Gro, IL-8 등 다양한 성장인자 또는 싸이토카인이 분비되는 것을 확인할 수 있었다.

[0064] 또한, 싸이토카인 어레이로 발굴된 MCP-1과 Gro의 정량을 위해서, 상기 싸이토카인 어레이에서 서로 다른 세 개의 신경줄기세포 NS14-001TL, NS14-008TL, NS14-015TL을 배양하여 회수한 조건배지를 사용하여 Quantikine ELISA kits(R&D Systems)로 ELISA 분석을 실시하였다.

[0065] 그 결과 도 2b에 나타낸 바와 같이, 대조군인 fhNSC에 비해 상기 세 개의 신경줄기세포는 모두 MCP-1 및 Groα의 발현이 증가하였다.

[0067] **실시예 4. MCP-1 및 Gro의 혈관형성 효과 확인**

[0068] MCP-1과 Gro의 혈관형성 효과를 확인하기 위해 각각에 대한 중화 항체(neutralization antibody)를 마트리겔과 함께 섞어서 이식하여 혈관형성 억제를 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 MCP-1 및 Gro의 기능을 막는 항체를 마트리겔 플럭에 함께 이식할 경우 혈관형성이 거의 되지 않았다. 따라서, MCP-1과 Gro의 기능을 막는 항체를 함께 섞을 경우 시너지한 혈관형성 억제 효과가 나타남을 확인하였다.

[0071] **실시예 5. 신경줄기세포에서 $CoCl_2$ 처리에 의한 MCP-1 및 Gro의 발현량 확인**

[0072] 도 4에 나타낸 바와 같이, Hypoxia 조건을 반영하기 위해서 $CoCl_2$를 100, 200, 300, 400, 500uM으로 농도별로 처리하고, 세포 내의 HIF-1alpha의 안정화를 통해 전사인자로 기능하게 하여 신호전달 하위 단계에 있는 MCP-1 및 Gro의 발현이 증가하도록 하였다.

[0074] **5-1. 신경줄기세포에의 $CoCl_2$ 처리**

[0075] 사람 성체신경줄기세포를 100mm 배양접시에 배양한 후 2~3일 후 70~80% 정도의 confluency에 도달하게 하였다. 이후, Hypoxia 조건을 반영하기 위해서 $CoCl_2$를 100, 200, 300, 400, 500uM으로 농도별로 처리한 후 24시간 뒤에 조건배지(conditioned medium)를 회수하고 DMEM/F12로만 교체한 후 다시 24시간 뒤에 조건배지를 회수하여 분석을 실시하였다. 상기 과정은 도 5에 도식화하여 나타내었다.

[0077] **5-2. ELISA를 이용한 MCP-1과 Groα의 정량**

[0078] 상기 실시예 5-1에서 회수한 상층액에서 MCP-1및 Groα의 정량을 위해서 Quantikine ELISA kits (R&D Systems)를 사용하여 ELISA 분석을 실시하였다.

[0079] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, $CoCl_2$ 처리 후 24시간 후의 MCP-1의 양은 처리한 $CoCl_2$의 농도에 비례하여 증가하였으나, 그 후 DMEM/F12로 배지를 바꾼 뒤 다시 24시간이 지난 후에는 100uM의 $CoCl_2$를 처리하였을 때 Mcp-1의 발현량이 가장 높았으며, $CoCl_2$의 농도가 300uM 이상일 때는 100, 200uM로 처리하였을 때 보다 MCP-1의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0080] 또한, 도 6b에 나타낸 바와 같이, $CoCl_2$ 처리 후 24시간 후의 Groα의 양은 처리한 $CoCl_2$의 농도가 300uM 이상일 때 농도에 비례하여 증가하여 500uM일 때 가장 높았으나, 그 후 DMEM/F12로 배지를 바꾼 뒤 다시 24시간이 지난 후에는 Groα의 양이 100uM 의 $CoCl_2$농도에서 가장 높았으며, $CoCl_2$의 농도가 200uM 이상일 때는 100uM로 처리하였을 때보다 Groα의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] **실시예 6. hypoxia chamber에 배양한 신경줄기세포에서 MCP-1 및 Groα의 발현량 확인**

[0083] **6-1. hypoxia chamber에서의 신경줄기세포 배양**

[0084] 신경줄기세포의 hypoxia 조건을 유도하기 위하여 hypoxia chamber에 12, 24, 48, 72시간 동안 신경줄기세포를 배양한 후 조건배지를 회수하고, 분비되는 MCP-1 및 Groα의 양을 측정하였다.

[0085] 구체적으로, 사람 성체신경줄기세포를 100mm 배양접시에 배양한 후 2~3일 후에 70~80% confluency에 도달하게 하였다. 이후 새로운 배양액으로 교체한 후 hypoxia chamber에서 12, 24, 48, 72시간 동안 배양한 후 조건배지를 회수하고 ELISA 분석방법을 실시하였다. 상기 과정은 도 7에 도식화하여 나타내었다.

[0087] **6-2. ELISA를 이용한 MCP-1과 Groα의 정량**

[0088] 상기 실시예 6-1에서 회수한 상층액에서 MCP-1및 Groα의 정량을 위해서 Quantikine ELISA kits (R&D Systems)를 사용하여 ELISA 분석을 실시하였다.

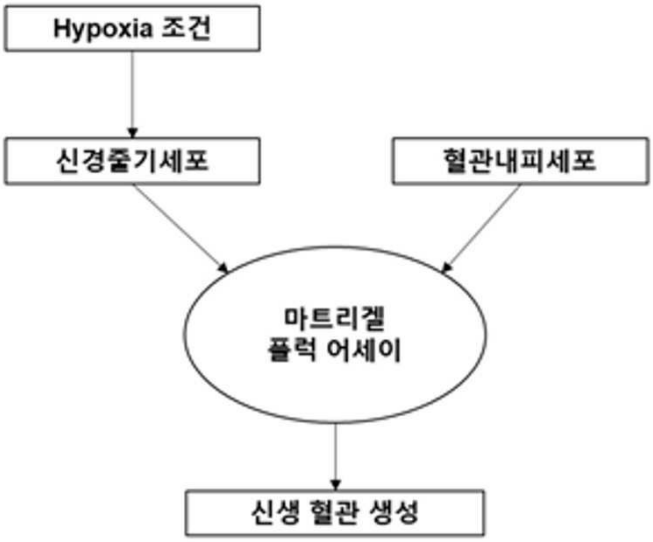
[0089] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 배양 시간이 지날수록 MCP-1의 발현량은 증가하였으나 Groα의 발현량은 대조군에 비해서는 증가하였으며 거의 일정하게 유지되는 것을 확인하였다.

[0091] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 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 이해해야 한다.

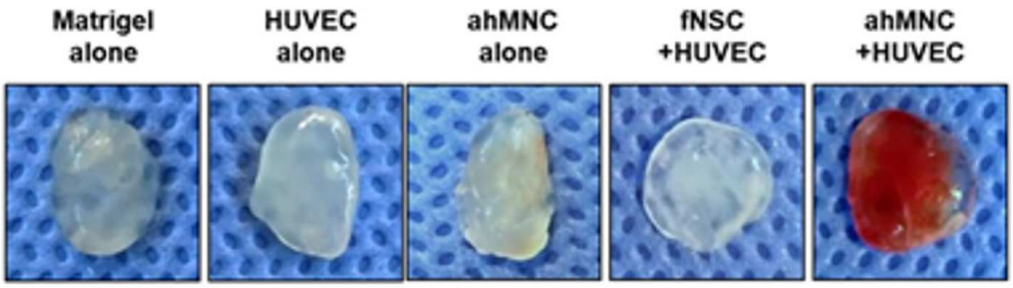
[0093] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

도면

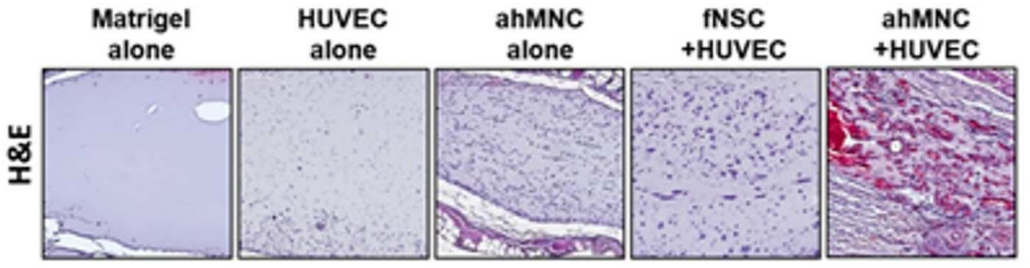
도면1a



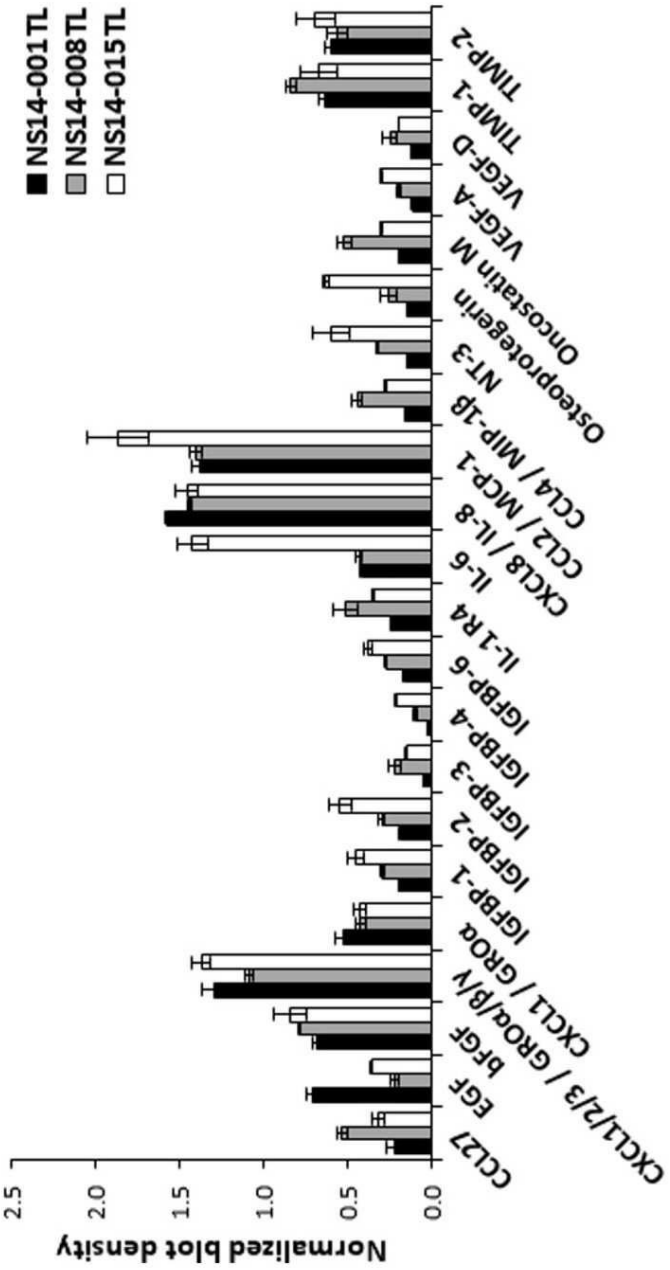
도면1b



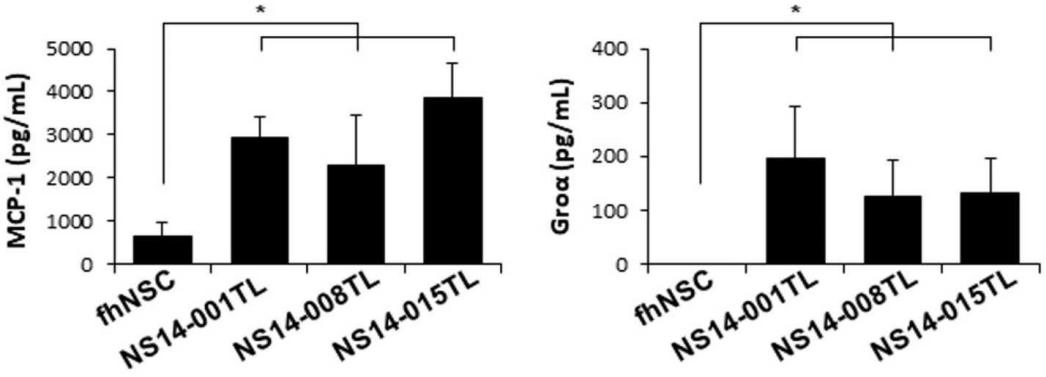
도면1c



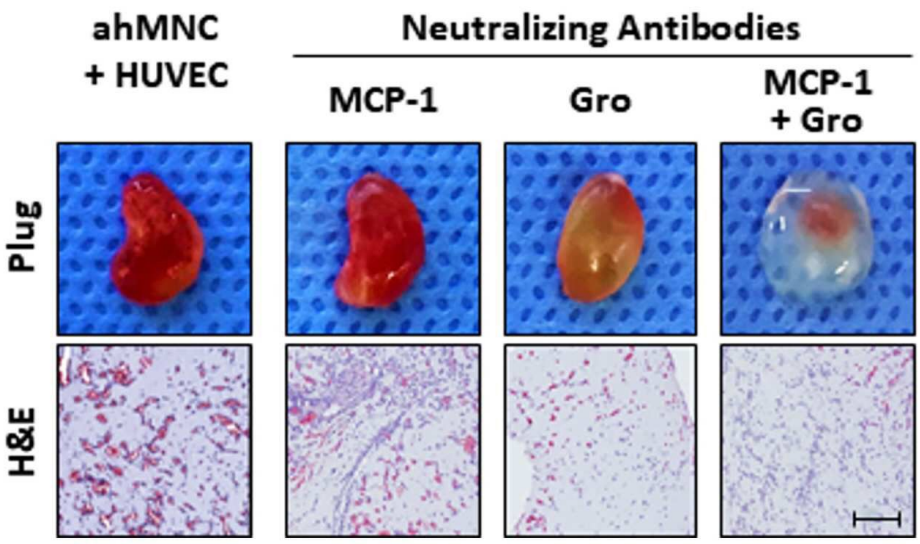
도면2a


NS14-001TL
NS14-008TL
NS14-015TL
CCL27
EGF
bFGF
CXCL1/2/3 / GROα/β/γ
CXCL1 / GROα
IGFBP-1
IGFBP-2
IGFBP-3
IGFBP-4
IGFBP-6
IL-1 Rα
IL-6
CXCL8 / IL-8
CCL2 / MCP-1
CCL4 / MIP-1β
NT-3
Osteoprotegerin
Oncostatin M
VEGF-A
VEGF-D
TIMP-1
TIMP-2
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Normalized blot density

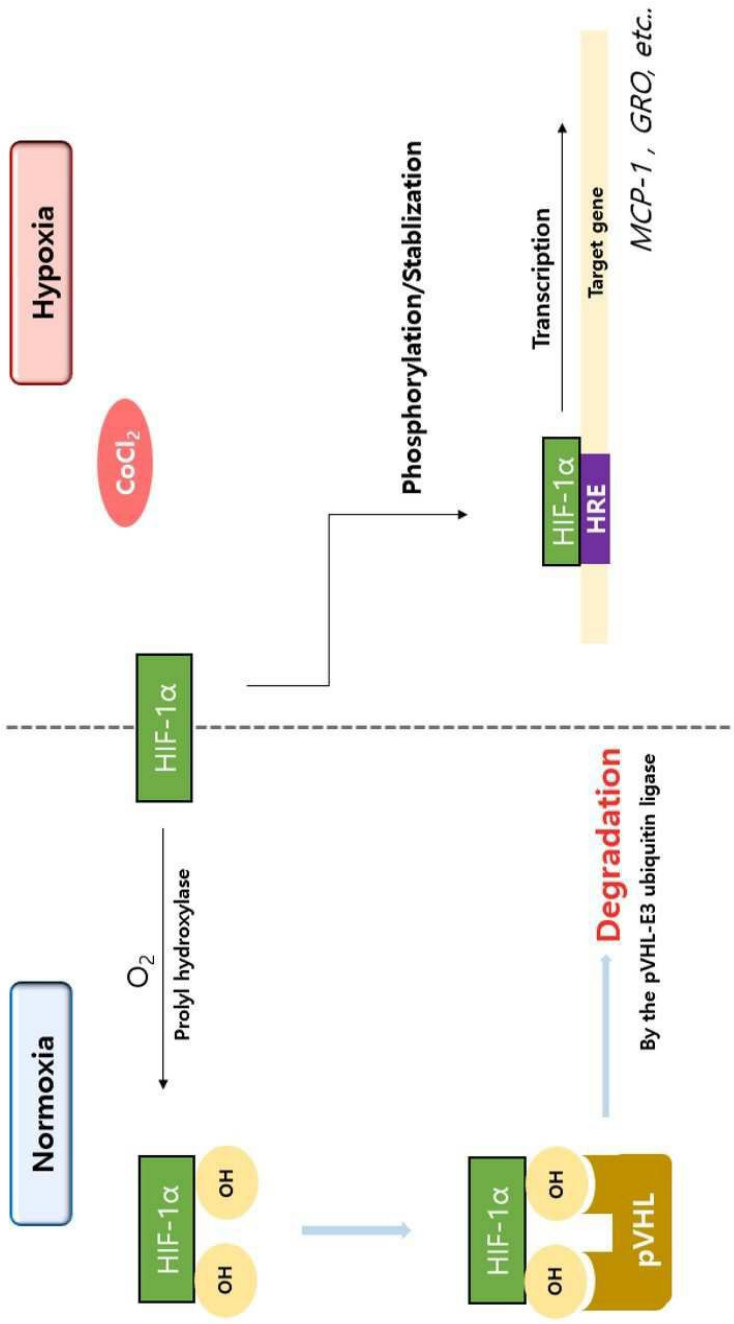
도면2b


MCP-1 (pg/mL)
0
1000
2000
3000
4000
5000
*
fhNSC
NS14-001TL
NS14-008TL
NS14-015TL
Groα (pg/mL)
0
100
200
300
400
*
fhNSC
NS14-001TL
NS14-008TL
NS14-015TL

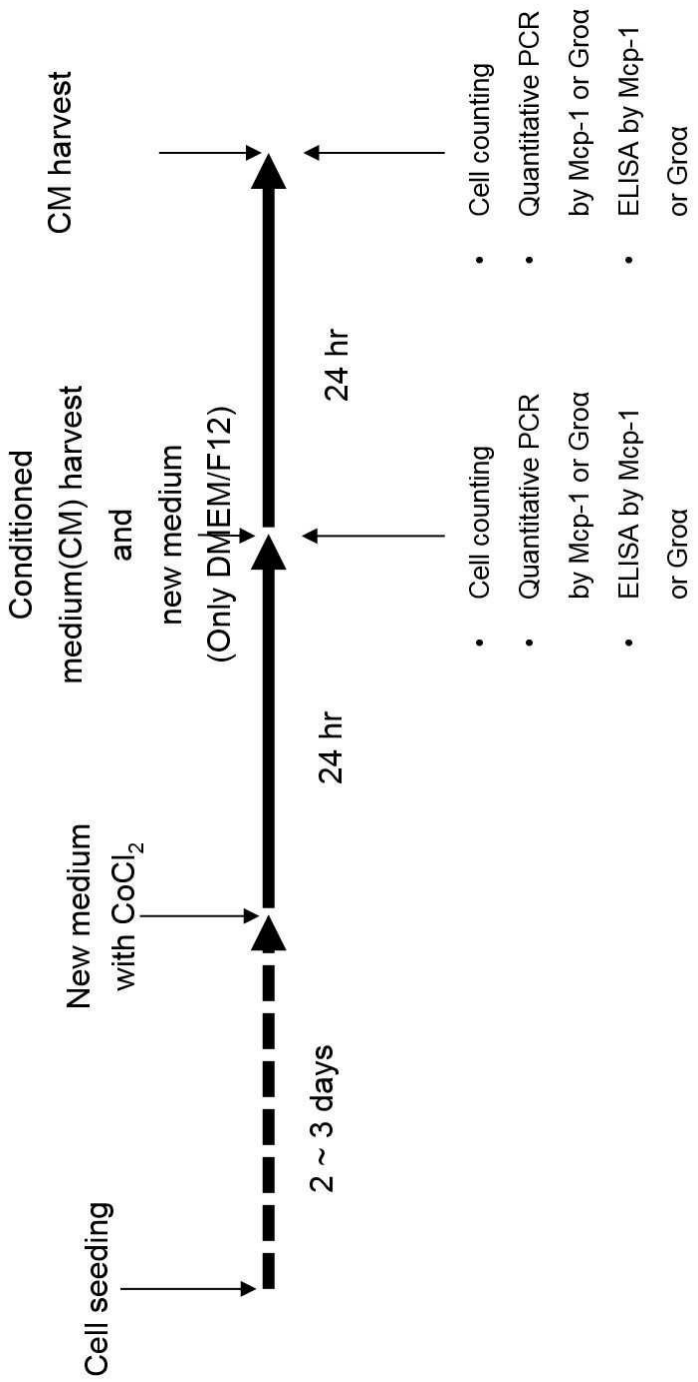
도면3


ahMNC
+ HUVEC
Neutralizing Antibodies
MCP-1
Gro
MCP-1
+ Gro
Plug
H&E

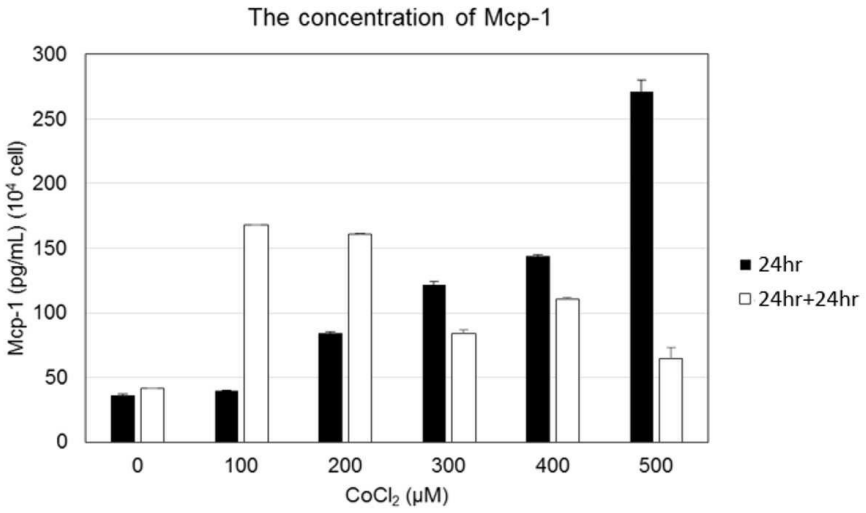
도면4


Hypoxia
$CoCl_2$
Phosphorylation/Stablization
Transcription
Target gene
MCP-1 , GRO, etc..
HIF-1α
HRE
HIF-1α
Normoxia
O_2
Prolyl hydroxylase
Degradation
By the pVHL-E3 ubiquitin ligase
HIF-1α
OH
OH
HIF-1α
OH
OH
pVHL

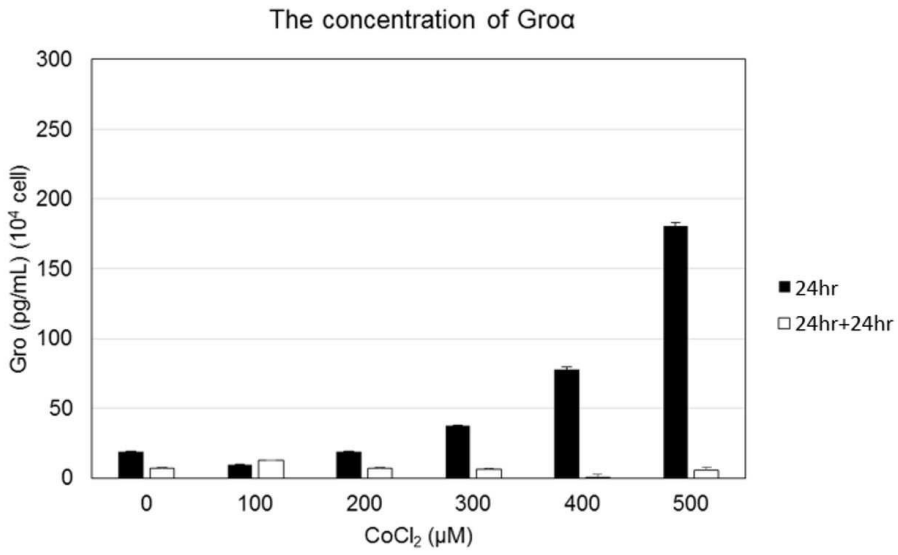
도면5


Cell seeding
2 ~ 3 days
New medium
with $CoCl_2$
24 hr
Conditioned
medium(CM) harvest
and
new medium
(Only DMEM/F12)
24 hr
CM harvest
• Cell counting
• Quantitative PCR
by Mcp-1 or Groα
• ELISA by Mcp-1
or Groα
• Cell counting
• Quantitative PCR
by Mcp-1 or Groα
• ELISA by Mcp-1
or Groα

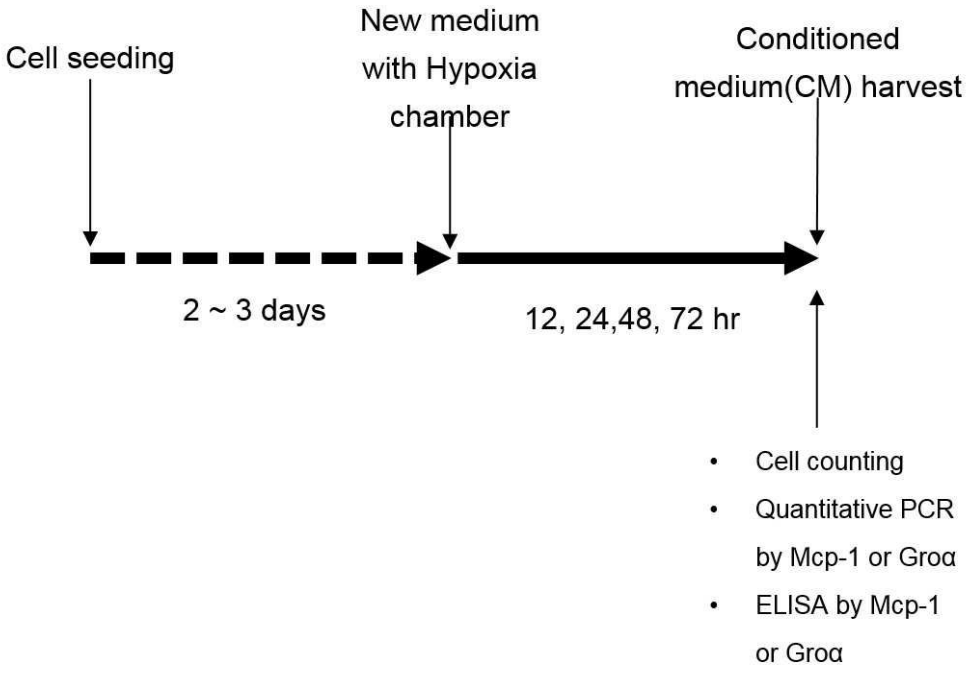
도면6a


The concentration of Mcp-1
Mcp-1 (pg/mL) (10⁴ cell)
300
250
200
150
100
50
0
0
100
200
300
400
500
CoCl₂ (μM)
24hr
24hr+24hr

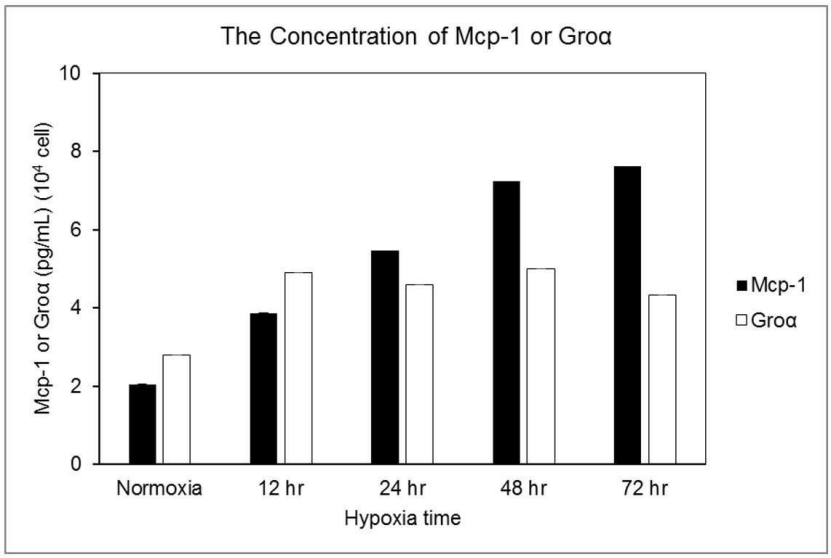
도면6b


The concentration of Groα
Gro (pg/mL) (10⁴ cell)
300
250
200
150
100
50
0
0
100
200
300
400
500
CoCl₂ (μM)
24hr
24hr+24hr

도면7


Cell seeding
New medium with Hypoxia chamber
Conditioned medium(CM) harvest
2 ~ 3 days
12, 24,48, 72 hr
• Cell counting
• Quantitative PCR by Mcp-1 or Groα
• ELISA by Mcp-1 or Groα

도면8


The Concentration of Mcp-1 or Groα
Mcp-1 or Groα (pg/mL) (10⁴ cell)
10
8
6
4
2
0
Normoxia
12 hr
24 hr
48 hr
72 hr
Hypoxia time
Mcp-1
Groα