



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월19일
 (11) 등록번호 10-1910269
 (24) 등록일자 2018년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01) *A61L 27/38* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
A61L 27/383 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-0024657
 (22) 출원일자 2017년02월24일
 심사청구일자 2017년02월24일
 (65) 공개번호 10-2018-0105278
 (43) 공개일자 2018년09월28일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110090810 A*
 Doctorial Thesis, 2013, Amellia McCormack,
 School of Medicine, Faculty of Health
 Sciences, Flinders University*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
성균관대학교산학협력단
 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
 (72) 발명자
주경민
 서울특별시 영등포구 국제금융로 109, 에이동 1107호 (여의도동, 삼익아파트)
남현
 경기도 김포시 김포한강11로 276, 705동 402호(운양동, 김포 한강신도시 반도유보라 2차)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 2 항

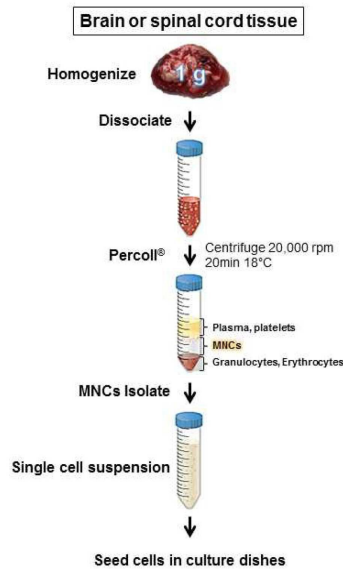
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **인간 뇌 조직 유래 신경줄기세포의 고효율 분리 방법**

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포를 신속하게 대량으로 증식시키고 고효율로 분리할 수 있는 신경줄기세포 배양 및 분리 방법 및 이에 의해 배양되고 분리된 뇌졸중 환자로부터 유래된 이식용 인간 성체 신경줄기세포에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2509/00 (2013.01)

연제영

서울특별시 강남구 일원로 81 삼성의료원 신경외과

(72) 발명자

남도현

서울특별시 강남구 일원로 81 삼성의료원 신경외과

홍승철

서울특별시 강남구 일원로 81 삼성의료원 신경외과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A3A11930396

부처명 교육부

연구관리전문기관 성균관대학교 산학협력단

연구사업명 이공분야기초연구사업 리서치펠로우

연구과제명 뇌졸중 환자 자가신경줄기세포의 특성분석 및 뇌졸중 치료메커니즘 연구

기여율 1/1

주관기관 한국연구재단

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

뇌졸중 환자로부터 분리된 뇌조직으로부터 세포를 수득하는 단계;
 상기 세포에 콜라게나아제 및 DNase I, 또는 파파인, 시스테인 및 DNase I를 처리하여 단일 세포를 분리하는 단계;
 상기 단일 세포를 두 개의 튜브에 나누어 넣고 각각 퍼콜과 혼합한 후 원심분리하여 세포를 회수하는 단계;
 회수된 상기 세포를 일차 배양하는 단계; 및
 상기 일차 배양된 세포를 1회 내지 3회로 계대 배양하는 단계를 포함하는, 생체 외 신경줄기세포 배양 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 일차 배양 또는 계대 배양은 부착 배양(adherent culture) 방법으로 실시되는 것인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포의 배양 및 고효율 분리 방법 및 이에 의해 배양되고 분리된 이식용 인간 성체 신경줄기 세포에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌졸중은 뇌 조직으로 통하는 혈류의 장애로 정의된다. 이것은 뇌의 특정부위의 장애이거나, 예를 들어, 심장에 의한 펌프질이 완전히 손상되었을 때의 모든 흐름의 실질적인 감소일 수도 있다. 좀 더 빈번하게, 뇌로 통하는 혈관의 막힘이나 파열에 의해 뇌의 특정부위로의 흐름이 방해되었을 때 뇌졸중이 일어난다. 혈관의 막힘은, 예를 들어, 색전증(embolism)이나 혈전(thrombus)의 형성을 통해, 일반적으로 뇌로 혈액을 공급하는 동맥에서 생기고, 이는 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)으로 알려져 있다.

[0003] 뇌졸중은 선진국에서 사망의 세 번째 주요원인이다. 미국에서, 뇌졸중 사망의 결과로 인한 치료비용과 생산성 손실은 약 40조 달러에 이른다고 추산되고 있다. 한편, 유일하게 효과적인 뇌졸중 치료 방법으로는, 혈전을 생성하게 하는 단백질을 효소학적으로 절단하여 혈전을 없애는 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator; t-PA)와 같은 혈전용해제의 투여이다. 그러나, t-PA의 투여는 너무 늦으면 출혈과 같은 부작용을 일으킬 수 있으므로 t-PA는 첫 번째 증상이 나타난 이후 오직 3시간 이내에만 투여될 수 있다. 더욱이, t-PA는 허혈성 뇌졸중에만 사용될 수 있고, 출혈성 뇌졸중에 투여시에는 일반적으로 사망과 같은 부작용이 발생할 수 있다. 이러한 뇌졸중의 치료 방법은 응급 치료에 그치거나 병의 진행을 늦추는 것에 불과할 뿐 근본적인 치료 대

책이 없는 상태이다.

[0004] 줄기세포는 여러 종류의 신체 조직으로 분화할 수 있는 세포, 즉 미분화 세포로서, 적절한 조건 하에서 다양한 조직 세포로 분화할 수 있으므로 손상된 조직을 재생하는 등의 치료에 응용할 수 있다. 줄기세포치료제는 손상된 신경의 재생을 가능하게 할 것으로 기대되고 있으며, 직접적인 재생 이외에도 손상된 환경을 개선하는 다양한 물질을 분비하여 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 현재 중간엽줄기세포에 대한 연구가 임상적으로 가장 앞서 나가고 있으나, 아직까지 뇌졸중이나 그 외 퇴행성 신경계 질환의 치료에 대한 유효성에 대해 의견이 분분한 상태이다. 태아 유래의 신경줄기세포가 뇌졸중 및 척추 손상 환자 대상으로 임상연구가 진행 중이지만 윤리적인 문제뿐만 아니라 여러 기술적인 문제가 발생하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1269125호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 응급 뇌졸중 환자의 수술 중 적출되는 뇌 조직으로부터 분리된 신경줄기세포를 특정된 조건 하에서 배양함으로써 신속하게 대량으로 증식시키고 고효율로 분리시킬 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 뇌 조직으로부터 세포를 수득하는 단계; 상기 세포에 콜라게나아제 및 DNase I, 또는 파파인, 시스테인 및 DNase I를 처리하여 단일 세포를 분리하는 단계; 단일 세포를 두 개 이상의 튜브에 나누어 넣고 각각 퍼콜과 혼합한 후 원심분리하여 세포를 회수하는 단계; 회수된 상기 세포를 일차 배양하는 단계; 및 상기 일차 배양된 세포를 계대 배양하는 단계를 포함하는, 신경줄기세포 배양 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 뇌 조직은 응급 뇌졸중 환자의 수술 중 적출된 뇌 조직일 수 있으며, 예를 들어, 뇌 또는 척수로부터 적출된 조직일 수 있다. 예를 들어, 상기 뇌 조직은 temporal lobe epilepsy, stroke surgical sample(temporal lobe 포함), trauma 조직(temporal lobe 포함) 등을 포함할 수 있다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌졸중 환자로부터 유래된 이식용 인간 성체 신경줄기세포일 수 있다. 상기 이식용 인간 성체 신경줄기세포는 자가이식 또는 타가이식이 가능하다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 일차 배양 및/또는 계대 배양은 부착 배양(adherent culture) 방법으로 실시될 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 계대 배양은 3회 이하로 실시될 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 신경줄기세포 배양 방법에 의해 배양된 뇌 조직으로부터 유래된 이식용 인간 성체 신경줄기세포를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 뇌졸중 환자 자체의 뇌 조직으로부터 신경줄기세포를 분리, 배양함으로써 윤리적인 문제를 해결함과 동시에, 이식이 가능한 인간 성체 신경줄기세포를 용이하게 제공할 수 있다.

[0014] 본 발명은 신경줄기세포의 분리 및 배양 조건을 특정화함으로써 신속하게 대량 증식시킬 수 있다. 구체적으로, 뇌 조직으로부터 분리된 단일 세포를 두 개의 튜브에 나누어 넣고 각각 퍼콜과 혼합하여 세포를 회수함으로써 신경줄기세포의 수율을 약 2배 증가시킬 수 있다. 또한, 일차 배양 또는 계대 배양 시 부착 배양(adherent culture) 방법으로 배양함으로써 기존의 구 배양(sphere culture) 방법에 비해 안정적으로 배양 효율을 증대시키고 순도를 높일 수 있다. 또한, 3회 이하의 계대배양으로 환자에게 이식가능한 수의 세포로 배양시킬 수

있어, 신속한 증식 배양이 가능하여, 특히 응급 뇌졸중 환자에게 빠른 이식이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 신경줄기세포의 배양 단계를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서 퍼콜 처리에 따른 세포 수를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 신경줄기세포의 분화 방법을 도시한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서 분화 조건에 따른 신경줄기세포의 신경세포 및 별아교세포의 분화능을 확인한 결과를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 본 발명은 뇌 조직으로부터 세포를 수득하는 단계; 상기 세포에 콜라게나아제 및 DNase I, 또는 파파인, 시스테인 및 DNase I를 처리하여 단일 세포를 분리하는 단계; 단일 세포를 두 개 이상의 튜브에 나누어 넣고 각각 퍼콜과 혼합한 후 원심분리하여 세포를 회수하는 단계; 회수된 상기 세포를 일차 배양하는 단계; 및 상기 일차 배양된 세포를 계대 배양하는 단계를 포함하는, 신경줄기세포 배양 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 신경줄기세포는 뇌졸중 환자의 수술 중 적출된 뇌 조직으로부터 분리 및 배양된 것으로, 다시 뇌졸중 환자에게 자가 이식될 수 있으며, 타인에게 타がい식하는 것도 가능하다.
- [0018] 일반적으로 생체 조직으로부터 분리된 단일 세포는 퍼콜(percoll)을 사용하여 불순물을 제거하는 공정을 거치는데, 본 발명의 방법에서는 단일 세포를 두 개의 튜브에 나누어 넣고 각각 퍼콜과 혼합한 후 원심분리하여 세포를 회수함으로써, 종래 단일 튜브 내에서 퍼콜과 혼합하는 경우에 비해 2배 정도 증가된 세포 수율을 나타낼 수 있다(도 2 참조).
- [0019] 본 발명의 일차 배양 또는 계대 배양을 위해 사용되는 배지로는 줄기세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 예를 들어, 혈청(예컨대, 우태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지를 사용할 수 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 예를 들어, RPMI 시리즈, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지(Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물(Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈(Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978))을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배지에는, 다른 성분, 예를 들어, 항생제 또는 항진균제(예컨대, 페니실린, 스트렙토마이신) 및 글루타민 등이 포함될 수 있다.
- [0020] 일반적으로 줄기세포의 계대 배양은 7회 또는 9회 이상 실시되나, 본 발명의 방법은 두 개 튜브에서의 퍼콜 혼합, 부착 배양 방법의 사용으로 인해 3회 이하로 계대 배양을 실시할 경우에도 자가 이식에 충분한 양의 신경줄기세포를 획득할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] **실시예 1. 신경줄기세포의 획득**
- [0024] **인간 신경줄기세포의 분리 및 배양**
- [0025] 뇌졸중 환자의 외과적 수술을 통해(삼성 서울병원 신경외과) 제거되는 뇌 조직(측뇌실 외측 천장 부위의 뇌조직(출혈제거나 뇌실천자를 위해 접근하는 경로의 뇌조직))을 수득하고, 도 1에 도시된 바와 같은 공정에 따라 배양하였다.
- [0026] 우선, 수득된 뇌 조직을 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS, Wellgene) 용액에 3% antibiotics

antimycotic(Gibco) 또는 3% Penicillin/Streptomycin (Gibco)이 첨가된 용액에 담아서 보관하였으며 수술 후 최대 12시간 이내에 세포를 분리하였다. 세포 분리를 바로 진행하기 어려울 경우 4℃ 냉장에 보관 후 세포 분리를 실시하였다.

[0027] 수득한 뇌 조직은 무게를 측정된 후 2-3차례 멸균된 PBS 용액으로 씻어낸 후 가위나 면도칼로 기계적으로 분쇄하고 Collagenase(0.4 mg/ml, Gibco)와 DNaseI(0.01-1 mg/ml, Roche)을 혼합하거나 Papain(10 unit/ml, Sigma), D-L-Cystein(400 ng/ml, Sigma)과 DNaseI(0.01-1 mg/ml, Roche)를 혼합하여 제조한 효소액에 1 시간 동안 37℃ CO₂ 인큐베이터에 보관하였다. 그런 다음, 효소 용액과 동량 이상의 DMEM:F12(Gibco)와 1% FBS 용액을 처리하여 효소를 불활성화시킨 후, 파이펫으로 파이펫팅을 하여 분쇄 후 70 μM 나일론 메쉬를 통과시켜 단일 세포를 수득하였다.

[0028] 퍼콜(Percoll)(Sigma)을 37℃ 수조에서 5분 정도 데운 후 멸균된 50 mL ultracentrifuge tube에 퍼콜 9 mL과 10X PBS 1mL을 첨가하여 1X 농도로 맞추었다. 수득된 단일 세포 현탁액을 총 40 mL이 되도록 1X PBS로 희석 후 20mL 씩 2개의 50 mL conical 튜브에 나누어 담은 후 퍼콜을 추가하여 각 튜브의 총 볼륨을 30 mL로 맞추었다. 그런 다음, 20,000 rpm으로 20 분간 18℃로 원심분리하여 적혈구 및 기타 조직과 세포들을 제거하였다. 원심분리 후 생기는 백색 층을 파이펫을 사용하여 분리한 후 DMEM:F12(Gibco) 용액을 사용하여 2차례 세척하였다.

[0029] 최종 세포들은 DMEM:F12(Gibco) 용액을 기반으로 0.5-1% FBS, 1x B27 supplement(Gibco), bFGF(R&D), EGF(R&D)를 포함하는 배양액에 현탁한 후 세포수를 확인하고, 100 파이 디쉬는 세포 배양 전에 Poly-L-Ornithine(Sigma)로 전처리한 후 디쉬 당 4×10^5 세포가 되도록 배양하였다. 이때 배양액은 3-4일 간격으로 절반만 교환하며, 일반적으로 일차 계대배양까지 10-14일이 소요되었다.

[0031] 비교예로서 단일 세포를 단일 튜브 내에서 퍼콜과 혼합하는 것을 제외하고 상기 실시예의 공정과 동일하게 진행하여 신경줄기세포를 배양하였으며, 그 결과를 두 개 튜브에서 퍼콜과 혼합한 상기 실시예 결과와 비교하였다. 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 단일 튜브 내에서 퍼콜과 혼합한 경우 5×10^5 세포수를 나타내는 반면, 본 실시예에 따라 두 개 튜브에 나누어 퍼콜과 혼합한 경우 1×10^6 세포수를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0033] **계대 배양**

[0034] 상기 배양에서 세포가 디쉬 전체 면적의 70-80% 정도로 차게 될 때 계대배양을 실시하였다.

[0035] 우선, 기존 세포 배양액을 제거한 후 DPBS로 1회 세척하였다. 그런 다음 0.05% Trypsin/EDTA(T/E, Gibco)이나 Accutase를 세포가 잠길 정도로 처리하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2-3 분간 보관한 후 DMEM:F12(Gibco)와 1% FBS가 들어간 용액을 처리하여 효소를 불활성화시켰다. 원심분리기를 사용하여 세포를 펠렛으로 만든 후 상층액을 제거하고 세포배양액으로 현탁하였다.

[0036] 세포를 계수한 후에 100 파이 디쉬에 4×10^5 세포를 넣어 배양하였다. 1회 계대배양시에 평균 10배의 세포수가 증가하게 되며 3회 계대배양으로 10³배의 세포를 얻을 수 있었다.

[0037] 1회 평균 계대배양 시간은 3-4일이며 계대배양 3번까지 2주 이내에 가능하여 1달 이내에 1×10^8 의 세포수를 얻을 수 있었다.

[0038] 계대배양이 7 이상에서는 세포의 성장이 느려지게 되며 세포 모양이 길어지는 등 노화와 유사한 형태를 갖게 되는 경우가 많으며, 이에 따라 줄기세포의 특성을 점차 잃어버리게 된다. 또한 장기간 배양은 유전적 변이(mutation)의 증가를 발생시키게 된다.

[0039] 본 발명의 방법에 따라 배양시 계대배양 3번 이내에 다회 투여 및 자가 이식을 위한 충분한 수의 세포를 얻을 수 있다.

[0041] **실시예 2. 신경줄기세포의 분화**

[0042] 실시예 1에서와 같이 수득한 신경줄기세포의 분화능을 확인하기 위해 도 3에 도시된 바와 같이 신경줄기세포를 분화시켰다.

[0043] 우선, PLO(poly-L-ornithine)가 코팅된 배양접시에 신경줄기세포를 3일간 배양하여 세포가 디쉬 전체 면적의 70-80%가 되었을 때 분화 배지(DMEM/F12, 1% P/S, 1 x B27, 0.5% FBS, 100 ng/mL bFGF, 100 ng/mL EGF, 0.5mM

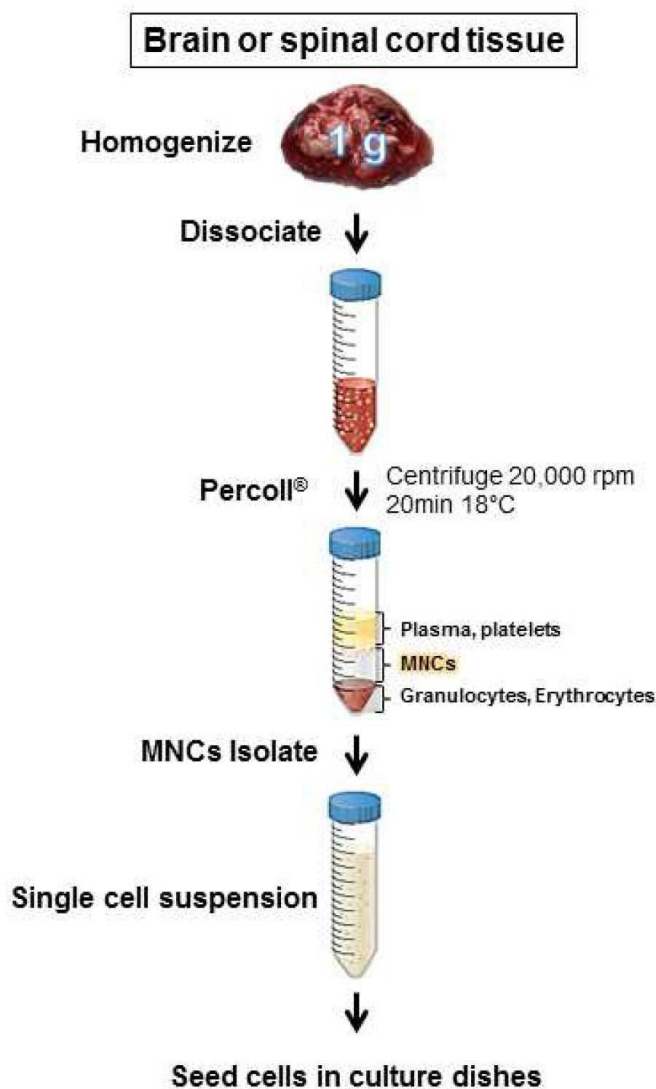
IBMX)로 교체하였다. 분화 후 2일째와 4일째 세포를 고정하고 미분화 마커인 Nestin, 신경세포 마커인 MAP2, 별아교세포 마커인 GFAP로 면역형광염색을 실시한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

[0044] 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 신경줄기세포가 신경세포 및 별아교세포로 분화하였음을 확인할 수 있었다. 분화조건에서 분화 전 (0 DIV)와 분화 후(2, 5, 9 DIV)에 신경세포 (MAP2+) 및 별아교세포(GFAP+)로의 분화능을 확인하였으며, 또한 미분화 마커인 Nestin의 발현이 분화가 진행됨에 따라 감소하는 것을 확인하였다.

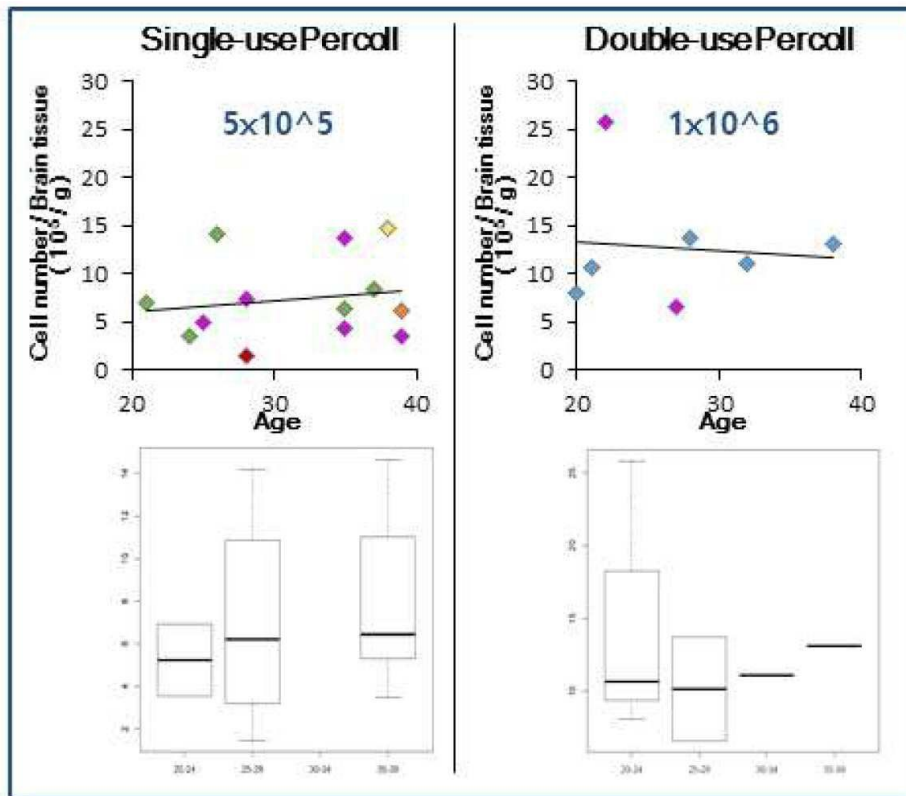
[0046] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

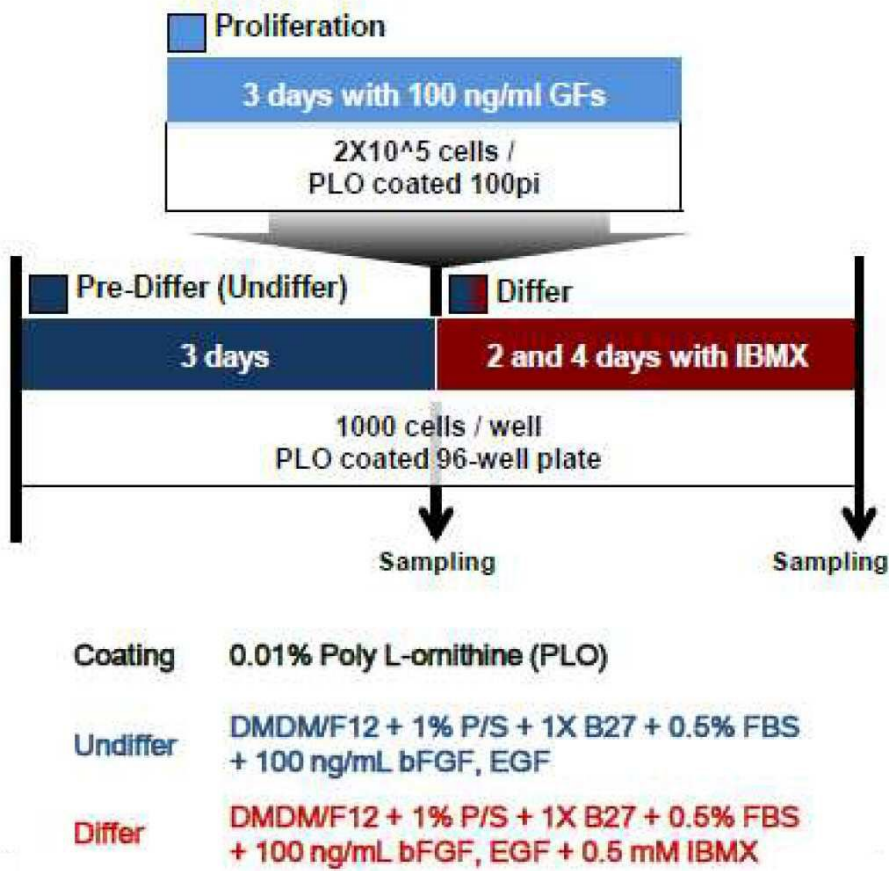


도면2



P0 P1 P2 P3
4x10⁵ → 4x10⁶ → 2x10⁷ → 1x10⁸
(100mm dish)

도면3



도면4

