



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월27일

(11) 등록번호 10-2026156

(24) 등록일자 2019년09월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) *C12Q 1/6881* (2018.01)
G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0618 (2013.01)
C12Q 1/6881 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2019-0011225
- (22) 출원일자 2019년01월29일
 심사청구일자 2019년01월29일
- (65) 공개번호 10-2019-0109234
- (43) 공개일자 2019년09월25일
- (30) 우선권주장
 1020180031100 2018년03월16일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2010195841 A*
 PLoS One. 5(2):e9398 (2010.02.24.)*
 Int J Mol Cell Med. 5(3): 167-177 (2016.)*
 *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 5 항

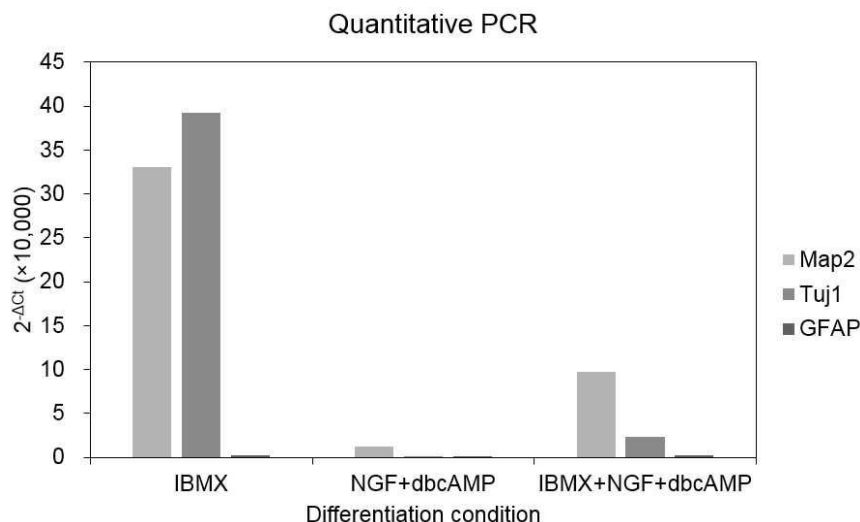
심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포의 신경분화 방법**

(57) 요약

본 발명은 신경분화를 신속하게 유도하여 신경분화 시간을 단축하고 효율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 신경분화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 측면에 따르면, 신경줄기세포를 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)로 배양하는 단계; 및 상기 배양된 신경줄기세포에 IBMX(isobutylmethylxanthine)를 포함하는 신경줄기세포의 분화조건 배양액을 처리하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 신경분화 방법이 제공된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 33/56966 (2013.01)

C12N 2501/73 (2013.01)

C12N 2506/08 (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

명세서

청구범위

청구항 1

신경줄기세포를 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)로 1차 배양하는 단계; 및

상기 1차 배양된 신경줄기세포에 신경줄기세포의 분화조건 배양액을 처리하고 2차 배양하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 신경분화 방법으로서,

상기 신경줄기세포의 분화조건 배양액은 분화유도제로서 IBMX(isobutylmethylxanthine)를 단독으로 포함하는 것을 특징으로 하며,

상기 신경줄기세포의 신경분화 방법은 분화 조건 배양액을 처리한 후 12시간 이내에 분화가 유도되는 것을 특징으로 하는, 신경줄기세포의 신경분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포의 분화조건 배양액은 DMEM/F12, FBS, B27, 및 penicillin/streptomycin(P/S)를 포함하는 신경줄기세포의 신경분화 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 IBMX(isobutylmethylxanthine)는 0.2 내지 0.5 mM 인 신경줄기세포의 신경분화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포는 성인의 뇌조직에서 유래된 것인 신경줄기세포의 신경분화 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배양액 처리 단계 이후 분화된 신경세포를 고정 후 면역염색과 qPCR 분석을 진행하는 단계를 더 포함하는 신경줄기세포의 신경분화 방법.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 신경줄기세포의 신경분화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신경분화를 신속하게 유도하여 신경분화 시간을 단축하고 효율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 신경분화 방법에 관한 것이다.

[0001]

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 근본적으로 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] 한편, 신경줄기세포는 신경세포(neuron), 별아교세포(astrocyte), 희소아돌기아교세포(oligodendrocyte)로 분화 가능한 줄기세포의 한 종류이다. 설치류인 생쥐에서 처음으로 밝혀졌으며 사람 뇌의 특정 부위에도 존재한다고 알려져 왔다. 사람의 신경줄기세포는 태아의 뇌로부터 유래된 신경줄기세포가 잘 알려져 있으며 임상시험에서 사용되어 왔다.
- [0005] 특히, 이러한 신경줄기세포는 상기 3가지 구성세포로 분화하는 다분화능력을 가지고 있어 이러한 신경줄기세포를 이용한 줄기세포의 증식과 분화기전 및 신경계 발달에 관한 기초연구뿐만 아니라, 한번 손상되면 재생되지 않는다고 알려져 있는 신경계질환에서 신경줄기세포의 생물학적 특성을 이용하여 새로운 세포 및 유전자 치료의 가능성에 대한 관심이 증대하고 있다.
- [0006] 최근에는 직접전환분화(direct conversion) 기술의 발달로 체세포로부터 신경줄기세포를 직접 획득할 수도 있고, 또한 성인의 뇌조직에서도 신경줄기세포가 존재한다고 보고되었으며 신경세포, 별아교세포, 희소아돌기아교세포로 분화 가능하며 대량배양도 가능하다고 알려져 있어 퇴행성 신경계 질환의 치료에 사용될 수 있을 것으로 예상되고 있다.
- [0007] 한편, 미국특허공개공보 2002-0192817는, 신경줄기세포를 FGF-1, 단백질 키나아제 A 활성화제, 단백질 키나아제 C 활성화제 및 도파민/L-DOPA에 처리함으로써 효소 티로신 하이드록실라제(TH)를 발현하는 뉴런을 생산하는 방법에 관한 것으로, 신경줄기세포를 배양 후 FGF-1, IBMX(isobutylmethylxanthine), forskolin, PMA, dopamine을 포함하는 분화조건 배양액에서 처리하는 것을 개시하고 있다.
- [0008] 다만, 기존에 알려진 신경줄기세포를 분화하기 위한 분화 조건은 다양한 성장인자가 포함되었으며 분화 기간도 2주가량 소요된다는 문제점이 있었다. 이에 따라, 신경줄기세포의 분화 시간을 단축시키고 효율을 증대시킬 수 있는 분화방법에 대한 연구가 필요한 실정이었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 미국특허공개공보 2002-0192817

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 신경분화를 신속하게 유도하여 신경분화 시간을 단축하고 효율을 증대시킬 수 있는 신경줄기세포의 신경분화 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, 신경줄기세포를 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)로 배양하는 단계; 및 상기 배양된 신경줄기세포에 IBMX(isobutylmethylxanthine)를 포함하는 신경줄기세포의 분화조건 배양액을 처리하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 신경분화 방법이 제공된다.
- [0013] 그리고, 상기 신경줄기세포의 분화조건 배양액은 DMEM/F12, FBS, B27, 및 penicillin/streptomycin(P/S)를 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 상기 신경줄기세포의 분화조건 배양액은 IBMX만을 포함할 수 있다.
- [0015] 그리고, 상기 IBMX는 0.2 내지 0.5 mM 일 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 신경줄기세포는 성인의 뇌조직에서 유래된 신경줄기세포 일 수 있다.
- [0017] 그리고, 상기 배양액 처리 단계 이후 분화된 신경세포를 고정 후 면역염색과 qPCR(quantitative Polymerase Chain Reaction) 분석을 진행하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 신경줄기세포의 신경분화 방법은, 2일 이내에 신경분화를 유도하여 신경분화 시간을 단축하고 효율을 증대시킬 수 있다.
- [0019] 또한, 신경줄기세포치료제의 품질 평가 시 확인/순도/역가 시험법으로 사용할 수 있어 환자에게 투여하기 전에 줄기세포의 품질에 대한 자료를 얻을 수 있고, 또한 미분화 단계의 신경줄기세포보다 분화된 신경세포가 필요한 환자의 치료에도 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은, 기존 신경줄기세포의 분화방법과 본 발명에 따른 신경줄기세포의 분화방법을 비교한 모식도이다.
- 도 2a는, 본 발명의 일 측면에 따른 방법에 의해 배양한 신경줄기세포의 모양을 나타낸 것이다.
- 도 2b는, 본 발명의 일 측면에 따른 방법에 의해 배양한 신경줄기세포 수의 성장을 나타낸 것으로, 계대배양 9 번 이상까지 리니어(linear)한 성장을 나타내는 것을 보여주는 그래프이다.
- 도 2c는, 본 발명의 일 측면에 따른 방법에 의해 분화된 신경줄기세포의 면역염색결과이다.
- 도 3a는, 본 발명의 일 측면에 따른 방법에 의해 6, 12, 24 및 48시간 후에 신경분화 정도를 관찰하기 위한 실험 모델을 표시한 것이다.
- 도 3b는, 본 발명의 일 측면에 따른 방법에 의한 분화 유도 6시간째부터 세포의 모양이 변하기 시작하였으며 24 시간째에는 대부분의 세포들이 신경세포와 유사한 덴드라이트(dendrite)를 뻗고 있었으며 세포들끼리 덴드라이트가 서로 연결되는 것을 보여주는 사진이다.
- 도 3c는, 본 발명의 일 측면에 따른 방법에 의해 신경분화 마커의 발현 정도를 qPCR로 정량화한 결과로, qPCR 결과 분화 후에 Nestin, Sox2의 발현이 급격히 감소하였으며 MAP2와 GFAP의 발현이 증가하였으며 24시간 및 48 시간에서 가장 높은 발현을 보임을 보여주는 그래프이다.
- 도 4a 및 도 4b는 신경줄기세포의 신속분화 조건을 확인하기 위해서 세가지 신경분화 조건(IBMX, NGF+dbcAMP, 또는 IBMX+NGF+dbcAMP)을 처리시 신경줄기세포의 분화 정도를 비교한 것으로, 도 4a는 현미경으로 세포의 분화 정도를 관찰한 결과이고 도 4b는 각 조건에서 세포수를 비교한 것이다.
- 도 5는 신경줄기세포의 신속분화 조건을 확인하기 위해서 세가지 신경분화 조건(IBMX, NGF+dbcAMP, 또는 IBMX+NGF+dbcAMP)에서 신경줄기세포 분화 후 신경세포(Map2, TuJ1)와 별아교세포(GFAP)의 유전자 발현을 qPCR 방법을 사용하여 분석한 결과이다.
- 도 6a 및 도 6b는 신경줄기세포의 신속신경분화를 위한 최적의 컨플루언시를 찾기 위해 IBMX 단독처리 시에 세포의 분화를 관찰한 것으로, 도 6a는 컨플루언시에 따른 48시간 후 세포수를 비교한 것이고 도 6b는 컨플루언시에 따른 48시간 후 세포의 분화 정도를 현미경으로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 기존에 알려진 신경줄기세포를 분화하기 위한 분화 조건은 다양한 성장인자가 포함되었으며 분화 기간도 2주 가

량 소요된다는 문제점이 있었다. 이에 따라, 신경줄기세포의 분화 시간을 단축시키고 효율을 증대시킬 수 있는 분화방법에 대한 연구가 필요한 실정이었다고, 본 발명자는 신경줄기세포를 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)로 배양하고, 상기 배양된 신경줄기세포에 IBMX를 포함하는 신경줄기세포의 분화조건 배양액을 처리하는 경우, 신속히 신경분화를 유도하여 신경분화 시간을 단축하고 효율을 증대시킬 수 있다는 점을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

- [0022] 본 발명의 일 실시예에서는, 신경줄기세포를 계대배양한 결과 세포의 형태가 잘 유지되며 9번 이상의 계대배양까지 리니어(linear)한 성장을 나타냄을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0023] 본 발명의 다른 실시예에서는, 본 발명에 따른 신속신경분화 방법에 의한 경우에도 신경분화가 정상적으로 일어난을 확인하였다(실시예 2 및 3 참조).
- [0024] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명에 따른 신속신경분화 방법에 의한 경우 분화 유도 후 6시간째부터 세포의 형태가 변하기 시작하였으며, 24시간째에는 대부분의 세포들이 신경세포와 유사한 덴드라이트(dendrite)를 뻗고 있었고 세포들끼리 덴드라이트가 서로 연결됨을 확인하였으며, 분화 유도 후 24시간 및 48시간에서 관련 인자들이 가장 높은 수치를 보임을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0025] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 신경줄기세포의 신경분화에 있어서 IBMX 단독처리 조건에서 가장 급격하게 신경세포 네트워크가 형성되고, 가장 높은 Map2 및 Tuj1의 발현이 있음을 확인하였다(실시예 5 및 6 참조).
- [0026] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, IBMX 단독처리 시에 최적의 세포 컨플루언시는 70-80% 인 것을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은, 신경줄기세포를 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)로 배양하는 단계; 및 상기 배양된 신경줄기세포에 IBMX(isobutylmethylxanthine)를 포함하는 신경줄기세포의 분화조건 배양액을 처리하는 단계를 포함하는 신경줄기세포의 신경분화 방법을 제공한다.
- [0029] 기존의 신경줄기세포 분화방법은 다양한 첨부 물질을 포함하는 분화 조건을 가지고 있으며, 분화에 오랜 시간이 걸리는 문제점이 있었으나, 본 발명은 신경줄기세포를 70 내지 80% 컨플루언시(confluency)까지만 배양하는 것을 일 특징으로 한다. 신경줄기세포를 70-80% 까지만 배양한 후, 분화조건 배양액을 처리하는 경우 매우 빠른 분화속도를 가지게 된다.
- [0030] 한편, 상기 신경줄기세포의 분화조건 배양액은 DMEM/F12, FBS, B27, 및 penicillin/streptomycin(P/S)를 포함할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 신경줄기세포의 분화조건 배양액은 IBMX만을 포함할 수 있다. 다양한 물질을 포함하는 분화조건 배양액에 비해 IBMX 만을 포함하는 배양액을 사용하는 경우 매우 빠른 분화속도를 가지게 된다.
- [0032] 그리고, 상기 IBMX는 0.2 내지 0.5 mM 일 수 있다. IBMX 의 농도가 0.2 mM 미만인 경우 세포 모양이나 분화 마커 발현이 분화가 없다는 문제가 있으며, 0.5 mM 초과일 경우에는 세포독성이 있다는 문제점이 있기 때문에 상기 범위가 바람직할 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 신경줄기세포는 성인의 뇌조직에서 유래된 신경줄기세포 일 수 있다.
- [0034] 그리고, 상기 배양액 처리 단계 이후 분화된 신경세포를 고정 후 면역염색과 qPCR 분석을 진행하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 이하에서는, 본 발명의 일 측면에 따른 분화방법의 단계에 대하여 상술한다.
- [0036] 일차배양된 신경줄기세포는 PLO가 코팅된 DMEM/F12, 0.5% FBS, 100ng/mL EGF, 100ng/mL bFGF, B27, penicillin/streptomycin(P/S) 조건에서 배양할 수 있다. 특히, Poly-L-Ornithine(PLO)를 코팅한 디쉬에서 배양할 수 있다. 70 내지 80% 컨플루언시에 도달하면 Accutase를 사용하여 세포를 떼어낸 후 계대배양을 진행하게 되며, 트리판 블루(Tryphan blue) 용액을 사용하여 세포의 수와 생존률을 계산, 및 Population doubling length(PDL)을 측정하여 세포성장곡선을 그릴 수 있다.
- [0037] 상기와 같이 신경줄기세포를 70 내지 80% 가량 배양한 후 PBS로 2회 워싱한다. DMEM/F12, 0.5% FBS, B27, 0.5mM IBMX, P/S를 처리한 후 6, 12, 24 및 48시간 후에 세포를 고정한 후 면역염색이나 mRNA를 분리하여 qPCR을 진행할 수 있다.

- [0038] 신경줄기세포들은 PLO 가 코팅된 8 well chamber slide(thermo)에 배양한 후, 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)에 5분간 고정시키고, 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 하룻밤동안(overnight) 반응 시킬 수 있다. 그 후, PBS로 2차례 워싱 후 Alexa488 또는 Alexa594가 결합된 2차 항체를 1시간 동안 처리하고, DAPI로 카운터 스테이닝(counter staining)을 시행한 뒤 마운팅 할 수 있다.
- [0039] Total RNA는 QIAGEN의 Easy RNA isolation kit을 사용하여 분리하게 되며 추출한 총(total) RNA중 1ug을 oligo-dT 프라이머(primer), AMV 리버스 트랜스크립타아제(reverse transcriptase)와 각 프라이머를 사용하여 cDNA로 합성하고 PCR로 증폭시킨다. 이 때, SYBR-Green I 형광을 함께 사용하여 Ct value를 구하고(Roche. Light Cycler LC480) delta-delta Ct method로 컨트롤 유전자(control gene)인 GAPDH에 비교해 상대적인 양을 계산할 수 있다.
- [0041] 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.
- [0043] **[실시예]**
- [0044] **실시예 1. 신경줄기세포의 배양**
- [0045] 일차배양된 신경줄기세포는 PLO가 코팅된 DMEM/F12, 0.5% FBS, 100ng/mL EGF, 100ng/mL bFGF, B27, penicillin/streptomycin(P/S) 조건에서 배양하였고, Poly-L-Ornithine(PLO)를 코팅한 디쉬에서 배양하였다. 70 내지 80% 컨플루언시에 도달하면 Accutase를 사용하여 세포를 떼어낸 후 계대배양을 진행하였다. 트리판 블루(Tryphan blue) 용액을 사용하여 세포의 수와 생존률을 계산하였고, Population doubling length(PDL)을 측정하여 세포성장곡선을 그렸으며 계대배양된 신경줄기세포의 형태를 현미경으로 관찰하였다.
- [0046] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 세포 형태가 잘 유지되어 계대배양이 정상적으로 진행됨을 확인하였으며, 도 2b에 나타난 바와 같이 9번 이상의 계대배양까지 리니어(linear)한 성장을 나타냄을 확인하였다.
- [0048] **실시예 2. 신속 신경분화조건에서 분화 유도**
- [0049] 신경줄기세포를 70 내지 80% 가량의 컨플루언시로 배양한 후 PBS로 2회 워싱하였다. 신속 신경분화조건인 DMEM/F12, 0.5% FBS, B27, 0.5mM IBMX, P/S를 처리한 후 6, 12, 24, 48시간 후에 세포를 고정한 후 하기와 같이 면역염색이나 mRNA를 분리하여 qPCR을 진행하였다.
- [0051] **실시예 3. 면역염색**
- [0052] 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 하룻밤동안(overnight) 반응시켰고, 다음날 PBS로 2차례 워싱 후 Alexa488 또는 Alexa594가 결합된 2차 항체를 1시간 동안 처리하였고, DAPI로 카운터 스테이닝(counter staining)을 시행한 뒤 마운팅 후 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0053] 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이. 분화 전에는 Nestin만 발현을 확인할 수 있었으나 분화 후에는 Nestin의 발현은 거의 관찰되지 않았으며 신경세포(Tuj1, MAP2), 별아교세포(GFAP)를 관찰할 수 있었다.
- [0055] **실시예 4. 신경분화 관찰 및 총 RNA에 대한 qPCR 분석**
- [0056] 우선, 분화 유도 후 시간에 따른 신경분화 정도를 관찰하기 위한 실험을 설계한 다음(도 3a 참조), 상기 설계에 따라 분화 유도 6, 12, 24 및 48시간 후에 신경분화 정도를 현미경으로 관찰하였다.
- [0057] 또한, 신속 신경분화조건에서 분화 정도를 정량화 하기 위하여 총 RNA는 QIAGEN의 Easy RNA isolation kit을 사용하여 분리하고 추출한 총 RNA중 1ug을 oligo-dT 프라이머(primer), AMV 리버스 트랜스크립타아제(reverse transcriptase)와 각 프라이머를 사용하여 cDNA로 합성하고 PCR로 증폭시켰다. 이때, SYBR-Green I 형광을 함께 사용하여 Ct value를 구하고(Roche. Light Cycler LC480) delta-delta Ct method로 컨트롤 유전자(control gene)인 GAPDH에 비교해 상대적인 양을 계산하였다.
- [0058] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이 분화 유도 후 6시간째부터 세포의 형태가 변하기 시작하였으며, 24시간째에

는 대부분의 세포들이 신경세포와 유사한 덴드라이트(dendrite)를 뻗고 있었고 세포들끼리 덴드라이트가 서로 연결됨을 확인하였다.

[0059] 또한, 도 3c에 나타난 바와 같이 qPCR 결과, 분화 후에 Nestin 및 Sox2의 발현이 급격히 감소하였으나, MAP2 및 GFAP의 발현은 증가하였으며 24 및 48시간에서 가장 높은 발현을 보임을 확인하였다.

[0061] **실시예 5. IBMX 단독, NGF+dbcAMP 또는 IBMX+NGF+dbcAMP 조건에서 신경분화 및 세포수 비교**

[0062] 신경줄기세포를 70 내지 80% 가량의 컨플루언시로 배양한 후 PBS로 2회 워싱하였다. 신경분화를 위해 DMEM/F12, 0.5% FBS에 세가지 신경분화 조건에 해당하는 IBMX(0.5mM) 단독, NGF(25ng/mL)+dbcAMP(0.5mM) 또는 IBMX+NGF+dbcAMP를 첨가하여 신경분화를 유도한 뒤 48시간째에 신경줄기세포의 분화 양상을 도립현미경(inverted microscope)을 사용하여 관찰하였다.

[0063] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이 세포의 모양은 IBMX 단독처리 조건에서 가장 급격하게 신경세포 네트워크가 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, 도 4b에 나타난 바와 같이 세포수는 NGF+dbcAMP가 들어간 조건에서 가장 높았고 다음으로 IBMX, IBMX+NGF+dbcAMP 순으로 높게 나타남을 확인하였다.

[0065] **실시예 6. IBMX 단독, NGF+dbcAMP 또는 IBMX+NGF+dbcAMP 조건에서 신경세포(Map2, Tuj1)와 별아교세포(GFAP)의 유전자 발현 비교**

[0066] 신경줄기세포의 신속분화 조건을 확인하기 위해서, 세가지 신경분화 조건(IBMX, NGF+dbcAMP 또는 IBMX+NGF+dbcAMP)에서 신경줄기세포의 분화 후 신경세포(Map2, Tuj1)와 별아교세포(GFAP)의 유전자 발현 정도를 실시예 4에 기재된 qPCR 방법을 사용하여 분석하였다.

[0067] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 IBMX 단독 처리군에서 가장 높은 Map2 및 Tuj1의 발현을 확인할 수 있었으며 이는 신속하고 효율적인 신경분화는 IBMX 단독처리로 충분하다는 것을 의미한다.

[0069] **실시예 7. IBMX 단독처리 시에 최적의 세포 컨플루언시를 확인**

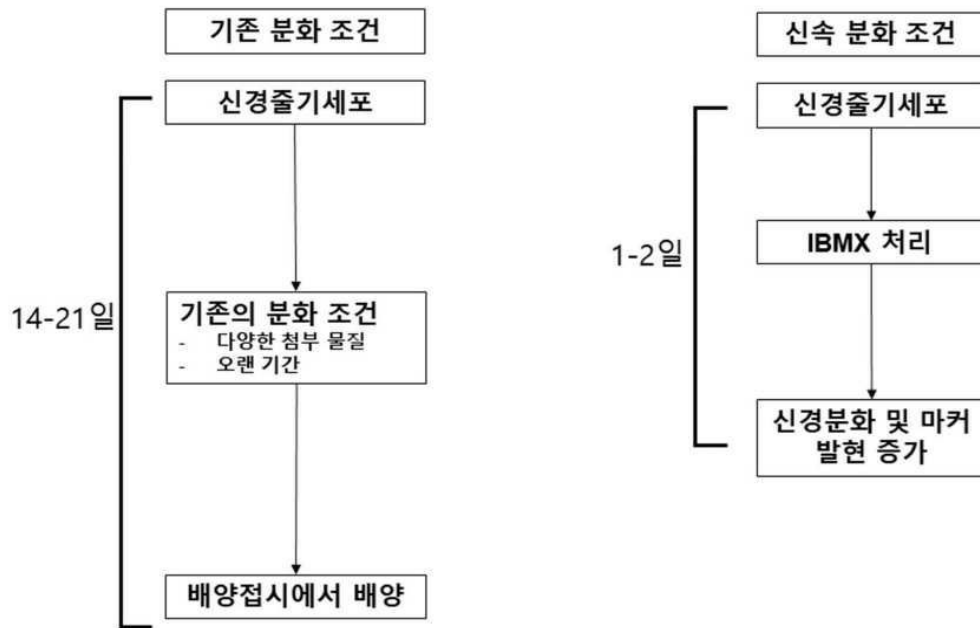
[0070] 신경줄기세포를 40-50%, 70-80%, 및 90-100% 컨플루언시로 배양한 후 PBS로 2회 워싱하였다. 신경분화를 위해 DMEM/F12, 0.5% FBS에 IBMX를 단독으로 첨가하여 신경분화를 유도한 뒤 48시간째에 신경줄기세포의 분화 양상을 도립현미경(inverted microscope)을 사용하여 관찰하였다.

[0071] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 IBMX 단독처리 후 48시간째 70-80% 컨플루언시에서 가장 살아있는 세포가 많았으며, 도 6b에 나타난 바와 같이 70-80% 컨플루언시에서 신경세포의 모양을 유지함을 확인하였다.

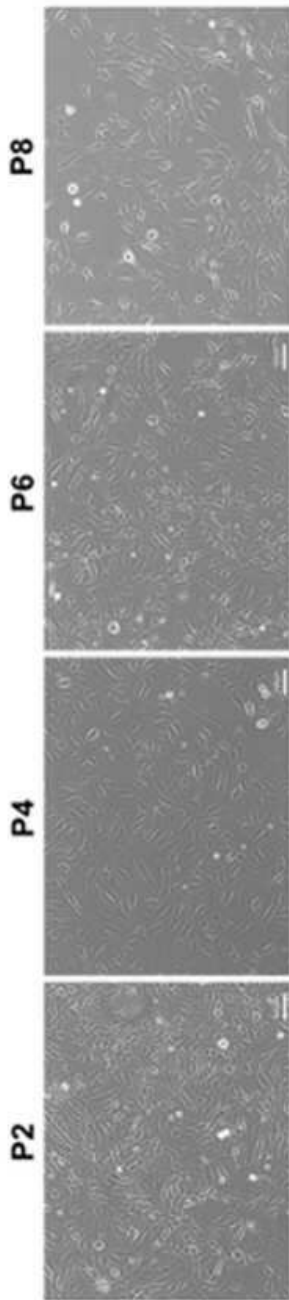
[0073] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

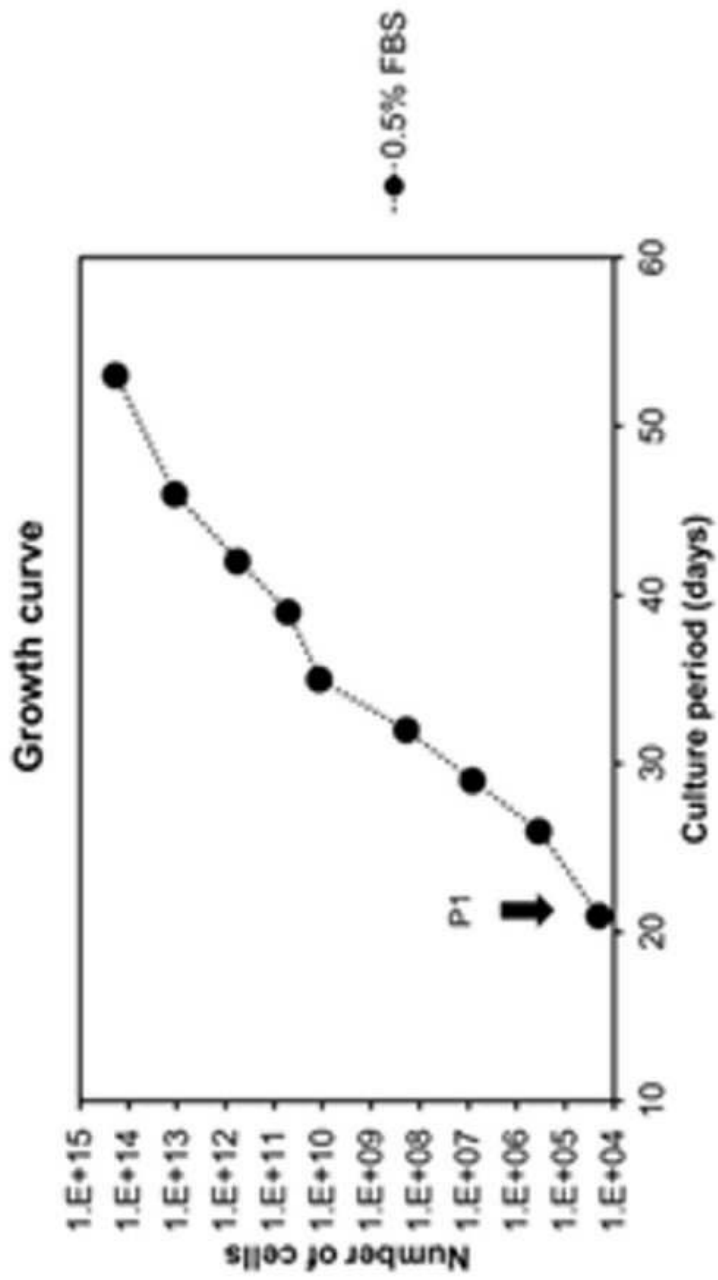
도면1



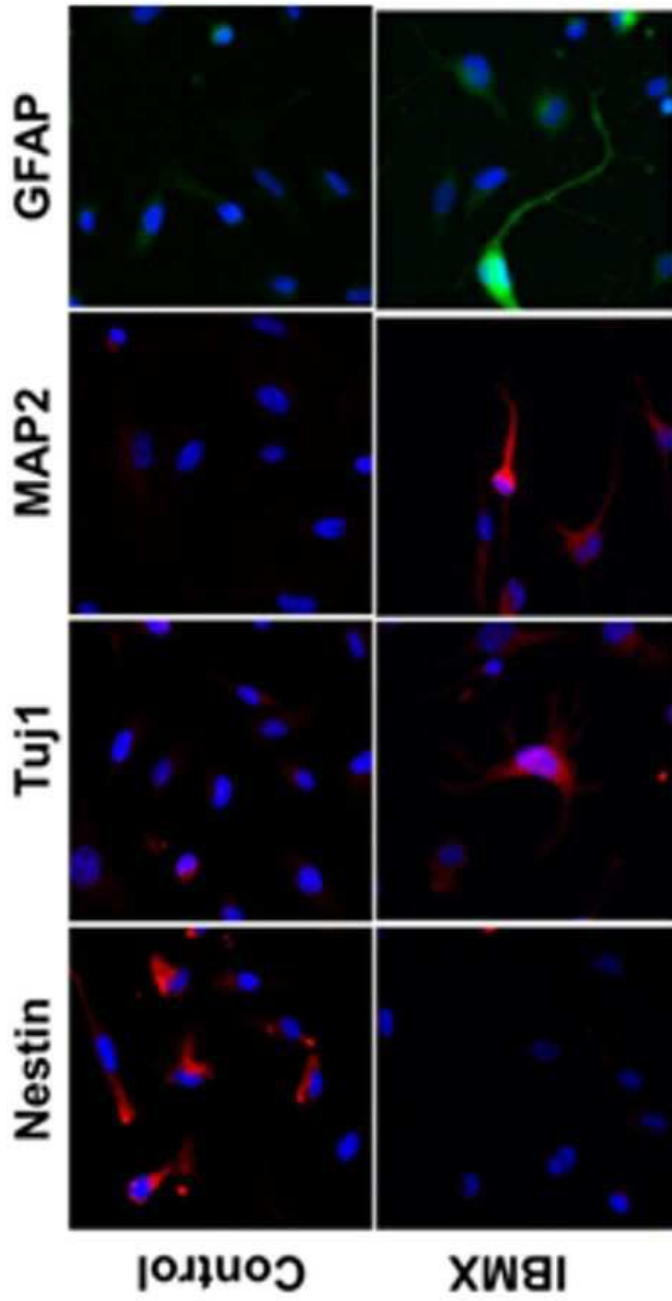
도면2a



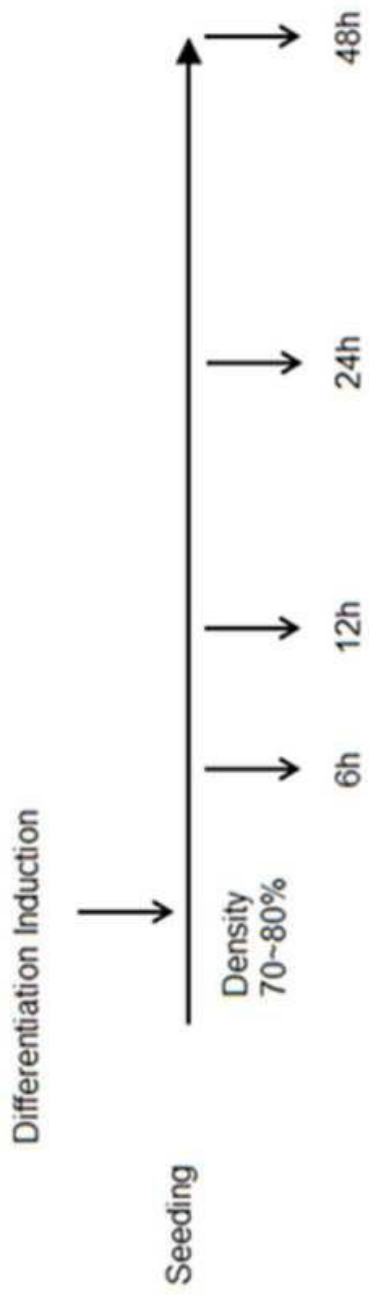
도면2b



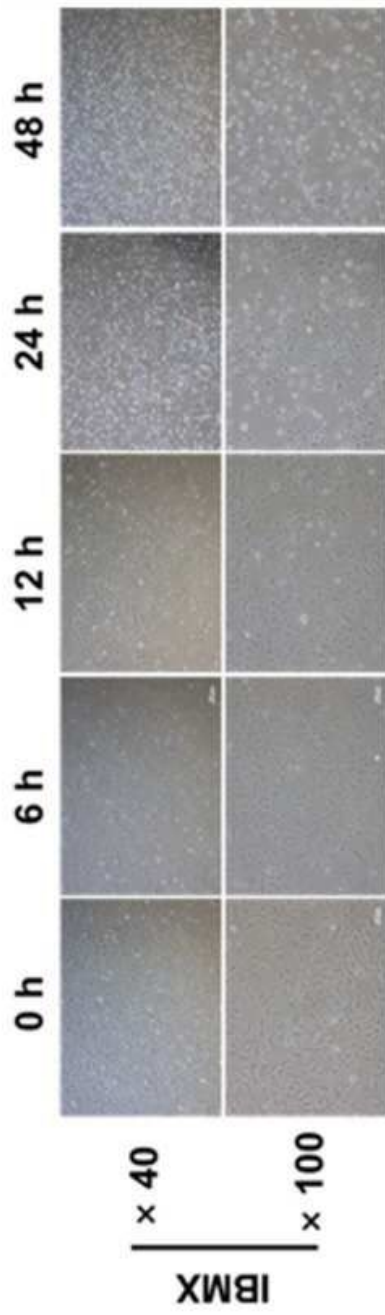
도면2c



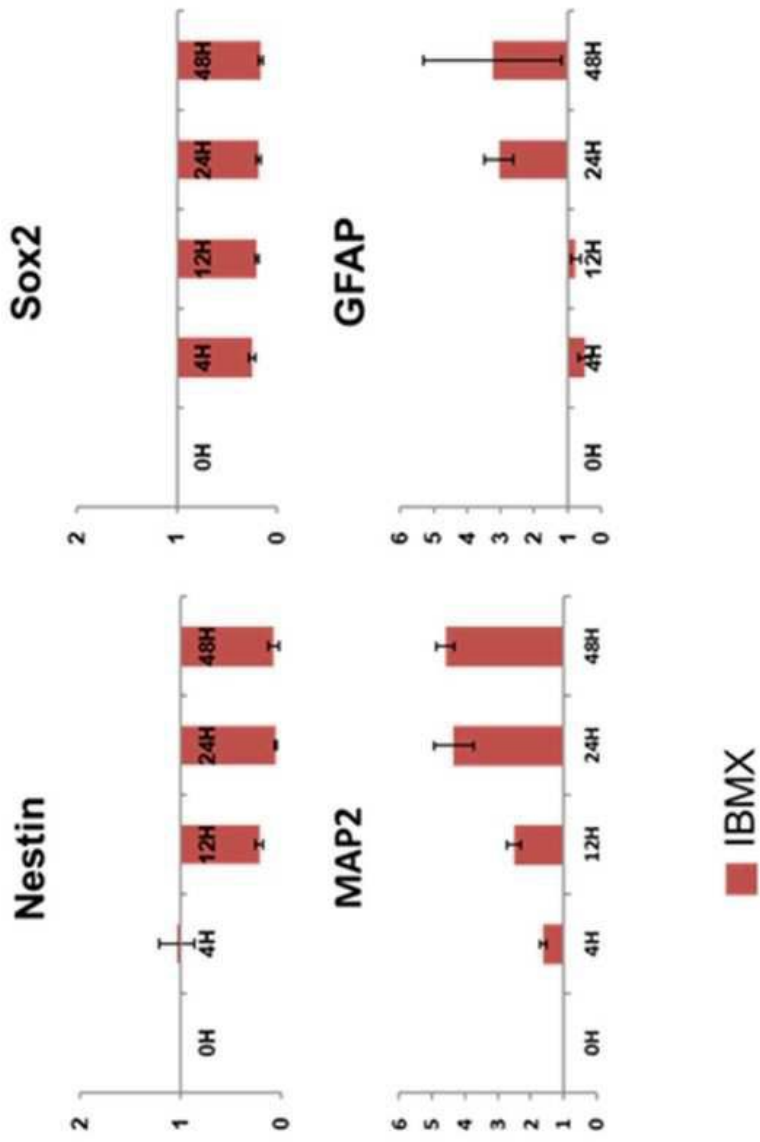
도면3a



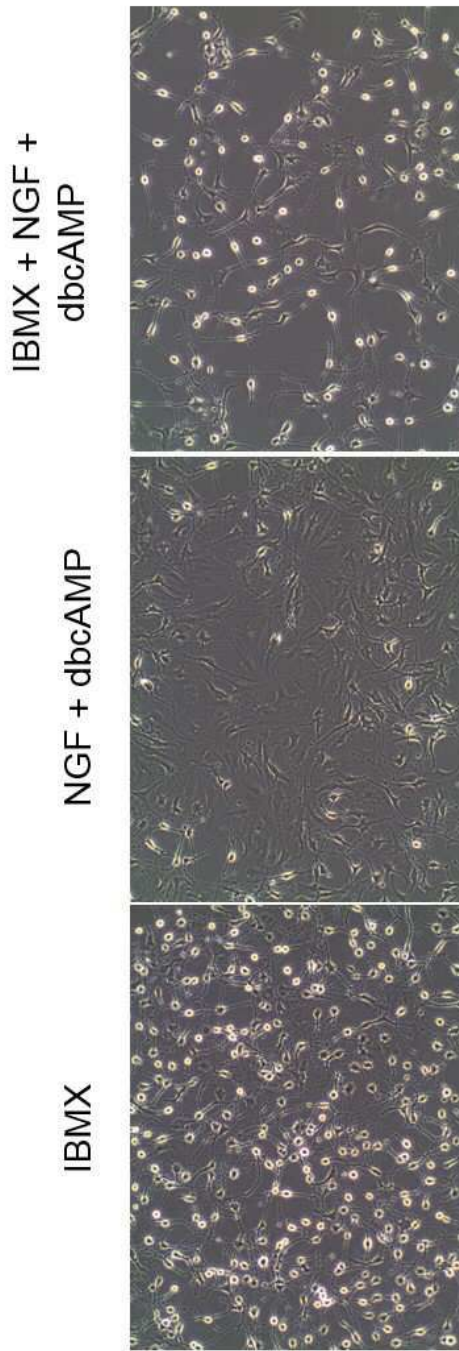
도면3b



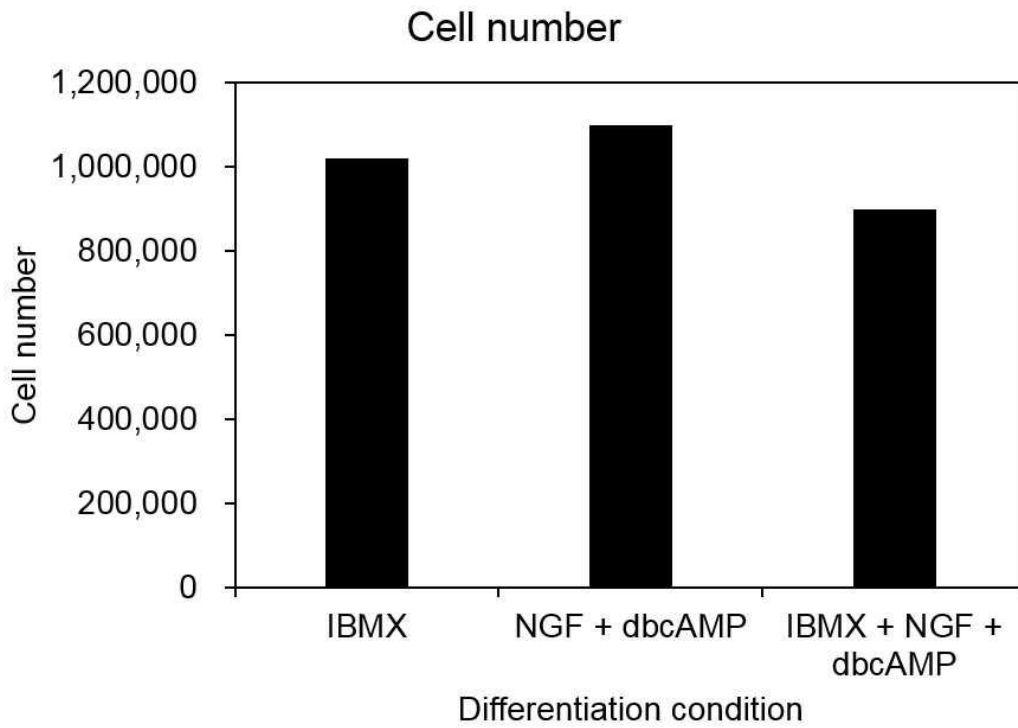
도면3c



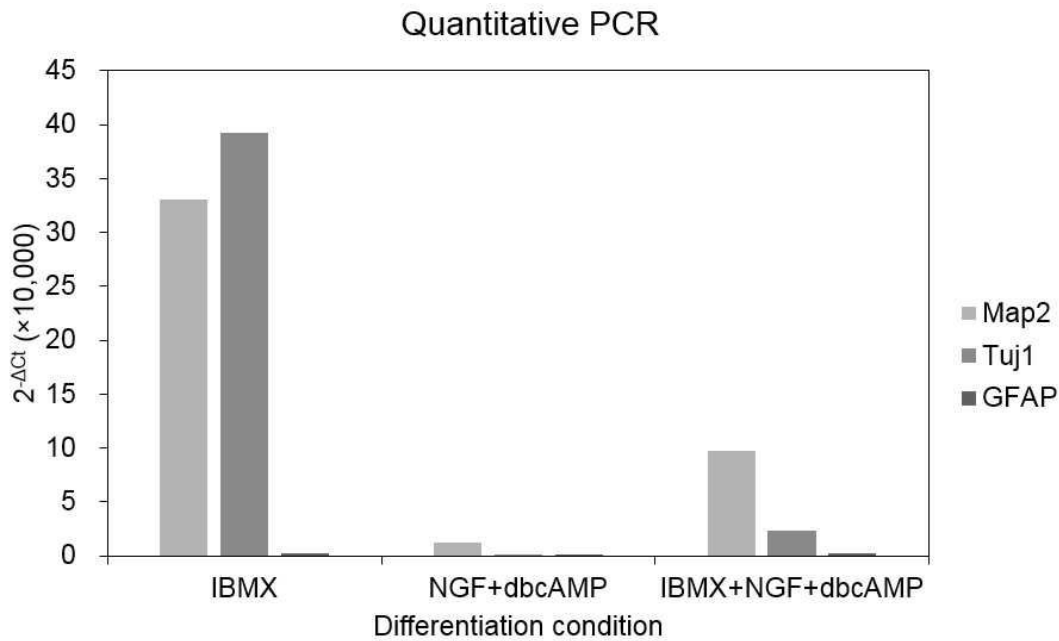
도면4a



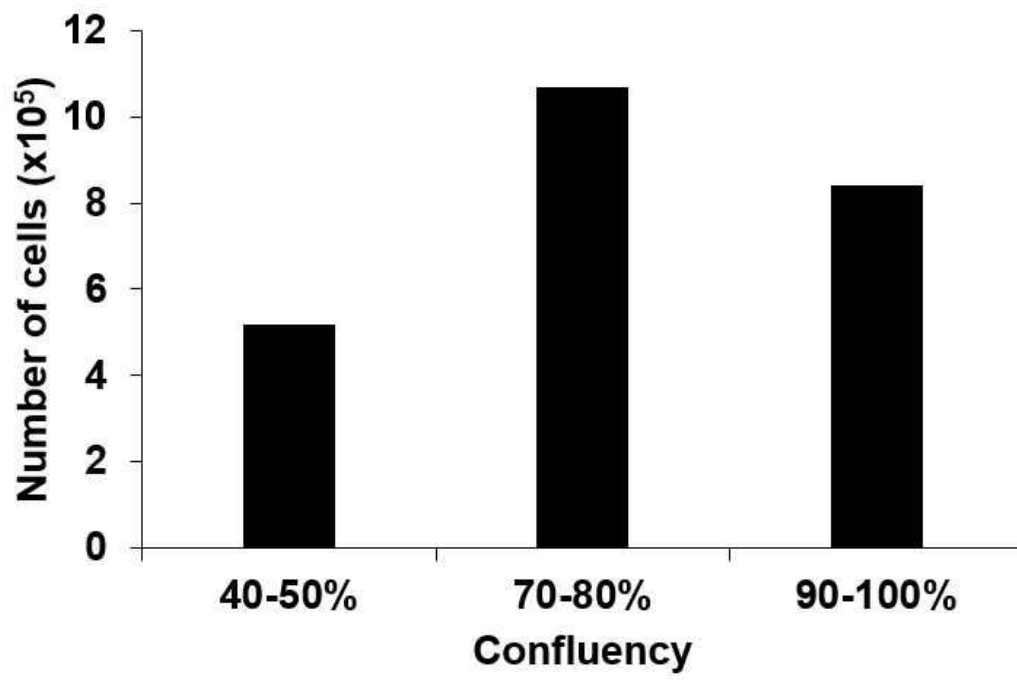
도면4b



도면5



도면6a



도면6b

