

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0088342 (43) 공개일자 2010년08월09일
	(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0007501 (22) 출원일자 2009년01월30일 심사청구일자 2009년01월30일	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 (72) 발명자 박국인 서울특별시 서초구 잠원동52 한신18차 아파트 336-803 김미영 서울특별시 서대문구 연희3동 313-2 새터하우스 203호 (74) 대리인 특허법인다나

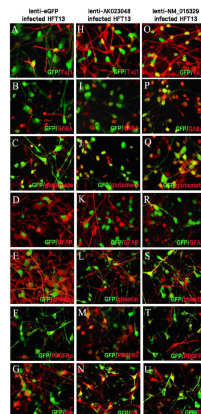
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포의 분화를 촉진하는 미지 유전자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 미지 유전자 AK023048 은 인간신경줄기세포의 뉴런 또는 희소돌기아교세포로의 분화를 촉진한다. 따라서 상기 유전자 및 이의 활성화제를 포함하는 조성물은 신경줄기세포의 뉴런 또는 희소돌기아교세포로의 분화를 촉진함으로써 궁극적으로 뇌질환 또는 신경퇴행성 질환 등의 치료제 개발에 효과적으로 응용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SC-4130

부처명 교육과학기술부

연구사업명 세포응용연구사업

연구과제명 신경줄기세포를 이용한 치료기술 및 분화기전 연구

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31 일

특허청구의 범위

청구항 1

유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포의 분화는 뉴런 또는 희소돌기아교세포로의 분화인 분화 촉진용 조성물.

청구항 3

유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질에 대한 활성화제를 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 활성화제는 화합물 또는 펩타이드인 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물.

청구항 5

유전자 AK023048, 이로부터 발현된 단백질 또는 이들에 대한 활성화제를 포함하는 신경계질환 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 신경계질환은 알츠하이머병, 허혈성 뇌질환, 파킨슨씨병, 다발성 경화증, 간질, 중풍, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴병, 피크병, 뇌졸중, 외상성 중추신경계 질환 또는 뇌척수 손상인 신경계질환 치료용 조성물.

청구항 7

유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는, 신경줄기세포의 분화촉진제 또는 분화억제제 스크리닝용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경줄기세포란 신경축의 모든 부위에서 모든 분화된 신경세포 타입으로 발생할 수 있는 가능성을 지닌 자가 재생하는 원시 미성숙 세포이다. 신경줄기세포는 발생 중의 뇌 뿐만 아니라 성인 뇌의 다양한 부위에 다양한 구조로 존재하며, 일생을 통하여 뇌의 특정 부위에서 계속 증식하면서 새로운 신경세포를 생성한다. 따라서 이러한

신경줄기세포의 증식 및 분화능을 이용한 신경퇴행성 질환의 세포 및 유전자 치료에 대한 관심이 증대하고 있다.

- [0003] 최근 신경줄기세포를 이용한 세포의 증식과 분화 기전 및 신경계 발달에 관한 기초 연구가 많이 행해지고 있지만, 신경줄기세포의 증식과 분화의 기초가 되는 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다. 특히 인간신경줄기세포의 분화 중에 차별적으로 발현되는 유전자들(DEGs) 중에서 소수의 유전자들만이 인간신경줄기세포의 증식과 분화에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌으며, 아직까지 많은 유전자들의 기능이 여전히 밝혀지지 않은 상태이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0004] 따라서 본 발명은 신경줄기세포의 분화 중에 차별적으로 발현되는 미지 유전자들 중에서, 신경줄기세포의 분화를 촉진하는 유전자를 밝히는 것을 목적으로 한다.
- [0005] 본 발명은 또한 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물의 제조를 위한 상기 유전자의 용도를 제공함을 목적으로 한다.
- [0006] 또한 본 발명은 신경줄기세포의 분화 촉진제의 스크리닝을 위한 상기 유전자의 용도를 제공함을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0007] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질, 또는 이들의 활성화제를 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공한다. 또한 상기 유전자 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 신경줄기세포의 분화촉진제 또는 분화억제제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

효 과

- [0008] 본 발명에 따르면 유전자 AK023048 의 과발현은 신경줄기세포의 분화를 촉진함이 밝혀졌다. 따라서 상기 유전자들은 신경줄기세포의 분화를 이용한 신경계질환의 치료제 개발을 위한 유력한 타겟이 될 수 있으며, 상기 유전자 또는 이로부터 발현된 단백질 또는 이들의 활성화제를 포함하는 조성물도 신경줄기세포의 분화 촉진을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0009] 본 발명은 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0010] 유전자 AK023048 는 "호모 사피엔스 cDNA FLJ12986 fis"로 일컬어진다. 인간의 16번 염색체상에 존재하며 2430 bp의 리니어 mRNA 및 알려지지 않은 추정 단백질 FLJ12986을 코딩하는 것으로 알려져 있으나, 그간 유전자 AK023048 의 구체적인 기능에 대해서는 밝혀진 바가 없었다.
- [0011] 본 발명자들은 하기 실시예를 통해 유전자 AK023048의 과발현이 신경줄기세포의 분화를 촉진함을 밝혔다. 그러므로 상기 유전자 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 조성물을 이용하여 신경줄기세포의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0012] 따라서 본 발명은 신경줄기세포의 분화를 촉진시키는 조성물의 제조를 위한 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질의 용도, 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물, 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 신경줄기세포 내에 투여하는 것을 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명에 있어서 유전자 AK023048는 이로부터 코딩되는 mRNA를 포함하는 개념이다. 또한 유전자 AK023048는 유전자 자체로서 뿐만 아니라 상기 유전자를 포함하는 벡터의 형태로도 신경줄기세포 내로 투여 가능하며, 이를 통해 유전자의 과발현을 유도할 수 있다. 상기 "벡터"란 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 내로 삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 예를 들어 DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 박테리오파지, 코스미드 벡터 또는 효모 벡터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0014] 따라서 본 발명에 따른 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물은, 유전자 AK023048 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현된 단백질 등을 포함하는 조성물일 수 있다.

- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 AK023048는 서열번호 1의 핵산서열을 가질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 실질적으로 동일한 활성을 갖는 이들의 변이체 또는 단편이 포함되는 것으로 해석할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 신경줄기세포의 분화는 뉴런 또는 희소돌기아교세포로의 분화일 수 있다. 하기 실시예에 따르면, 유전자 AK023048을 렌티 바이러스 벡터로 삽입하고, 렌티-감염된 HFT13 세포를 분화시켜 면역 세포화학법에 의해 단백질 발현 레벨을 조사한 결과, AK023048-감염된 HFT13 세포에서 신경줄기세포의 뉴런과 희소돌기아교세포로의 분화능력이 크게 향상되었음을 발견하였다. 다만 이는 발명의 내용을 예시하는 것일뿐 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 유전자 AK023048의 과발현을 위해 유전자 AK023048 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현된 단백질을 사용하는 대신 이들의 활성화제를 사용하는 것도 가능하다.
- [0018] 따라서 본 발명은 신경줄기세포의 분화를 촉진시키는 조성물의 제조를 위한 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질에 대한 활성화제의 용도, 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질에 대한 활성화제를 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물, 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질에 대한 활성화제를 신경 줄기세포에 처리하는 것을 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진 방법을 제공한다.
- [0019] 상기 활성화제는 유전자 AK023048 의 발현을 촉진하는 물질 및 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 기능을 활성화시키는 물질 등을 모두 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 활성화제는 이에 제한되는 것은 아니나, 화합물 또는 펩타이드일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 신경줄기세포 분화 촉진용 조성물은 신경계질환 치료를 위한 의약 조성물로 이용할 수 있다. 따라서 본 발명은 신경계질환 치료용 의약 제조를 위한 유전자 AK023048, 이로부터 발현된 단백질 또는 이들에 대한 활성화제의 용도, 유전자 AK023048, 이로부터 발현된 단백질 또는 이들에 대한 활성화제를 포함하는 신경계질환 치료용 조성물, 치료상 유효량의 유전자 AK023048 , 이로부터 발현된 단백질 또는 이들에 대한 활성화제를 대상 체에 투여하는 것을 포함하는 신경계질환 치료 방법을 제공한다.
- [0022] 알츠하이머병, 파킨슨병을 비롯한 각종 뇌질환은 신경세포가 각종 외부 독성이나 독성 물질에 의해 세포사하여 그로 인한 뇌신경 기능 손상이 발병 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 환자의 뇌에 외부에서 대량으로 도입한 신경세포를 투여하여 손실된 신경세포를 보충하고 대체함으로써 이러한 뇌신경 기능 손상에 의해 발생하는 질병을 치료할 수 있다. 본 발명은 신경줄기세포의 분화를 촉진하여 대량의 신경세포 생성을 가능하게 함으로써 궁극적으로 신경계질환 등의 치료에 효과적으로 응용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 신경계질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 알츠하이머병, 허혈성 뇌 질환, 파킨슨씨병, 다발성 경화증, 간질, 중풍, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅턴병, 피크병, 뇌졸중, 외상성 중추 신경계 질환 또는 뇌척수 손상 등의 질환일 수 있다. 다만 본 명세서에서 예시한 뇌질환 외에도, 신경 세포의 기능 손상에 의해 나타나는 질환에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명에서 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질이 신경줄기세포의 분화를 촉진한다는 사실을 밝힌 이상 당업자는 신경 세포의 기능 손상과 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위해 상기 유전자와 단백질 또는 이들에 대한 활성화제를 이용할 수 있을 것이다.
- [0024] 본 발명의 신경줄기세포 분화 촉진용 조성물은 생체 내 또는 생체 외에서 모두 사용 가능하다. 예를 들어, 생체 내에서 사용하는 경우, 신경줄기세포의 분화를 촉진하여 손상된 신경 세포를 보충하고 대체함으로써 신경계질환 치료용 의약 조성물로 이용 가능하다. 생체 외에서 사용하는 경우, 예를 들어 신경줄기세포의 분화 메커니즘 또는 분화 조절 인자 등을 밝히기 위한 연구용 목적으로 이용하거나, 생체 외에서 신경줄기세포를 분화시킨 후 생체 내로 이식 가능하다.
- [0025] 본 발명을 생체 내에서 의약 조성물로 사용할 경우, 신경줄기세포의 분화를 촉진하는 것으로 공지된 추가의 유효 성분을 또한 포함할 수 있다. 공지된 유효 성분의 예로써 베이직 섬유 아세포 성장인자(bFGF), 뉴로지닌(neurogenin), 텍사메타손, 아스코빈산 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료, 또는 뼈 성장 유도 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류

및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 예컨대, 성인의 경우, 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 신경줄기세포의 분화 촉진용 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, AK023048 단백질의 경우 0.1ng/kg~10g/kg, AK023048 유전자의 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, AK023048의 활성화제는 1일 1회 내지 수회 투여시 0.1ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있고, 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, AK023048에 대한 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, '대상체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명의 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0030] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0031] 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0032] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0033] 또한 본 발명은 신경줄기세포의 분화촉진제 또는 분화억제제의 스크리닝을 위한 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 용도, 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 포함하는 신경줄기세포의 분화촉진제 또는 분화억제제 스크리닝용 조성물, 시험대상 물질과 유전자 AK023048 또는 이로부터 발현된 단백질을 접촉시키고 상기 시험대상 물질이 상기 유전자의 발현 또는 상기 단백질의 활성을 촉진하는지 억제하는지를 판단하는 것을 포함하는 신경줄기세포의 분화촉진제 또는 분화억제제의 스크리닝 방법을 제공한다. 예를 들어, 유전자 AK023048이 도입된 재조합 벡터와 시험대상물질을 접촉시킨 후 상기 유전자의 발현 정도를 확인함으로써, 시험대상물질이 신경줄기세포의 분화촉진제인지 분화억제제인지 여부를 스크리닝할 수 있다.

실시예

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0035] <실시예1> 인간 신경줄기세포의 배양 (HFT13 세포)

[0036] 치료 목적으로 유산된 회태 13주의 인간 태아 조직은 모든 환자의 동의와 대한민국 서울 연세대학교 의과대학의 연구윤리위원회의 승인을 받았다. 획득 방법은 미국국립보건원(NIH)과 대한민국정부의 가이드라인을 따랐다. 인간 태아 종뇌(human fetal telencephalon, HFT)를 회태기간 13주의 태아의 중추신경계 종뇌로부터 분리하였고, 부동성의 뉴로스피어로 증식을 유도하였다. 뉴로스피어는 Dulbecco's modified Eagle's medium과 Ham's F12를 1:1로 혼합한 (DMEM/F12; Gibco Invitrogen, Carsbad, CA, 미국) 무혈청 배지에서 배양하였고 페니실린/스

트립토마이신 (1% vol/vol; Gibco)과 N2 formulation (1% vol/vol; Gibco)를 첨가하였다. 증식 상태를 유지하기 위하여 성장인자를 첨가하는데, FGF-2를 안정시키고 최초 성장물을 증가시키기 위해 20 ng/ml 기초 섬유아세포 성장 인자(bFGF; R&D, Minneapolis, MN, 미국)와 8 µg/ml 헤파린(Sigma, St. Louis, MO, 미국)을, 장기 자가 재생 신경줄기세포의 성장을 허용하기 위하여 10 ng/ml 백혈병 억제인자(LIF; Sigma)를 첨가했다. 분화 상태를 유지하기 위하여 세포들을 PLL(폴리-L-라이신)로 덮인 플레이트에서 성장인자 없이 배양하였다. 모든 배양은 습한 인큐베이터(37 °C, 대기 중 5% CO₂)에서 유지시켰고 절반의 배양 배지는 3~4일마다 다시 채웠다. 뉴로스피어들은 0.05% 트립신/0.53mM EDTA (T/E)로 세포를 처리하여 7~9일마다 옮겼다.

[0037] 도 1은 증식과 분화 상태에서 HFT13 세포의 전형적인 형태를 보여준다. HFT13 세포들의 증식은 상이 밝은 외양(phase-bright appearance), 통상의 세포막 및 회절링에 의해 확인 가능한 부동성 스피어 또는 세포 클러스터를 만들었다(도 1-A). HFT13 세포의 분화를 유도하기 위하여 HFT13 세포의 전체 뉴로스피어들을 T/E에서 단일 세포 부유물로 해리시켜, N2 부가물을 포함하지만 미토겐을 포함하지 않는 무혈청 배지(DMEM/F-12)에서 PLL (10 µg/ml; Sigma) 코팅된 100mm 디쉬(corning)로 직접 평판배양 하였다. 7일 이상의 배양 기간이 지난 후, 세포들은 인간 신경줄기세포의 형태학적인 변화와 관련되어 분화를 나타냈다(도1-B).

[0038] <실시예 2> RNA 추출 및 ACP-based RT-PCR

[0039] RNA 추출

[0040] 전체 RNA는 각각 RNeasy 미니 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)를 사용하여 인간 신경줄기세포의 증식과 분화 상태에서부터 각각 추출하였다. 세포를 채취해 용해하기 위하여 버퍼 RLT를 사용하였다. 70퍼센트 에탄올이 균질한 용해물에 가한 후, 샘플을 RNeasy 미니 컬럼에 적용하였다. 버퍼 RW1을 컬럼에 가하고, 버퍼 RPE로 씻었다. RNA는 RNA 분해효소가 없는 물로 컬럼으로부터 용리시켰다. HFT13세포의 mRNA는 DNA 분해 효소 처리하였다. HFT13 세포의 증식과 분화 상태에서부터 얻은 각각 20 µg의 전체 RNA 는 어닐링 조절 프라이머(annealing Control Primers, ACPs)로 RT-PCR 분석하기 위해 사용하였다.

[0041] ACP-기반 RT-PCR

[0042] 인간 신경줄기세포의 증식과 분화 상태에서 특정하게 또는 차별적으로 발현되는 유전자들을 확인하기 위하여 본 발명자들은 어닐링 조절 프라이머(ACPs) (Seegene, 서울, 대한민국) 를 사용했다. 인간 신경줄기세포의 증식과 분화 단계로부터 분리된 mRNA는 110 개의 임의 프라이머와 두 개의 부착된 올리고 프라이머 조합(dT-ACP 1 , dT-ACP 2)을 사용하여 ACP RT-PCR 분석하였다. 상세한 내용은 아래와 같다.

[0043] 샘플로부터 추출한 RNAs는 역전사효소에 의해 첫번째 가닥 cDNA를 합성하는 데에 사용하였다. 역전사는 최종 반응 부피 20µl로 42°C에서 1시간 반 동안 수행하였고, 다음을 포함하였다: 정제된 RNA 3µg, 5' 반응 버퍼 (Promega, Madison, WI, 미국) 4µl, dNTPs (각각 2mM) 5µl, 10 µM dT-ACP1 (5' -CGTGAATGCTGCGACTACGATTIIIT(18)-3') 5µl, RNasin RNase 억제제 (40 U/µl; Promega) 5µl, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 역전사 효소 (200 U/µl; Promega) 5µl. 첫번째 가닥 cDNA는 GeneFishingTM PCR을 위해 초정제수 180µl 로 희석하여, 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

[0044] 차별적으로 발현된 유전자들이 GeneFishingTM DEG 키트(Seegene, 서울, 대한민국)를 사용하여 ACPs-기반 PCR 방법에 의해 스크리닝되었다. 간단히 말해 두번째 가닥 cDNA 합성은 첫 번째 단계 PCR의 한 사이클 동안 50°C에서 최종 반응 부피 20µl로 수행하였으며, 3-5µl (약 50 ng)의 희석된 첫번째 가닥 cDNA, 1µl의 10 µM dT-ACP2 (5' -CGTGAATGCTGCGACTACGATTIIIT(18)-3'), 1µl의 10 µM 임의의 ACP, 10µl의 2' 마스터 믹스 (Seegene, 서울, 대한민국)를 포함하였다. 두번째 가닥 합성을 위한 PCR 프로토콜은 94°C에서 1분, 후에 50°C에서 3분, 이후 72°C에서 1분의 한 사이클이다. 두번째 가닥 DNA 합성이 완료된 후에 두 번째 단계의 PCR 증폭 프로토콜은 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초로 40 사이클이다. 증폭된 PCR 산물들은 에티디움 브로마이드로 염색하여 2% 아가로스 젤에서 분리하였다. 이러한 분석으로 약 500개의 앰플리콘을 생성하였다.

[0045] 도 2는 인간 신경줄기세포의 증식과 분화 상태에서 발견된 34개의 차별적으로 발현된 앰플리콘 밴딩의 패턴을 보여준다. 4 개의 앰플리콘은 증식 상태에서 매우 증가하였고 30 개의 앰플리콘은 분화 상태에서 증가하는 것으로 나타났다.

[0046] <실시예 3> DEGs 분석

[0047] DEGs 서열 분석

[0048] 34 개의 DEGs를 겔로부터 전부 추출하여 TOPO TA 벡터로 복제하고 서열분석 하였다. GENCLEAN σ II 키트 (Q-BIO 유전자, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 차별적으로 발현된 밴드들을 겔로부터 추출하였고, 제조사의 지침에 따라 TOPO TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, Karlsruhe, 독일)로 복제하였다. 복제된 플라스미드는 ABI 프리즘 7700 분석기 (Applied Biosystems, Foster City, CA, 미국)로 서열분석 하였다. 완성된 서열은 NCBI(유전자 은행 웹사이트 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)) 에서 BLASTX와 BLASTN 검색 프로그램을 사용하여 서열 유사성을 찾아 분석하였다.

[0049] 서열 분석 결과, DEGs가 알려진 유전자들, 미지 유전자들 또는 EST(Expressed Sequence Tags)와 상당한 유사성이 있음을 밝혀냈다. 4 개의 유전자들은 증식 중에 차별적으로 많이 발현됨을 발견하였고, 30 개의 유전자들은 인간 신경줄기세포의 분화 중에 차별적으로 많이 발현됨을 발견하였다. 본 발명에서 동정되고 특성화된 모든 유전자들과 EST는 이미 유전자 은행에 제출되어 접근 번호를 부여받았다. 인간 신경줄기세포의 증식 상태에서, 2 개의 DEGs는 알려진 유전자들이고 다른 2 개의 DEGs는 미지 유전자들이다. 인간 신경줄기세포의 분화 상태에서, 27 개의 DEGs는 알려진 유전자들이고 다른 3 개의 DEGs는 미지 유전자들이다. 이러한 DEGs의 정체와 상동성은 하기 표 1에 요약되어 있다.

표 1

[0050] quantitative real-time PCR에 의해 결정된, 알려진 DEGs와 미지 DEGs의 정체와 발현 레벨

접근 번호	정체	상동성 (인간)	E값	폴드 변화
증식 중에 많이 발현된 공지 유전자들				
NM_198427	brevican isoform 2 (BCAN)	254/254(100%)	8e-140	1.43±0.29
M77774	Human HLA-B*5401	750/750(100%)	0	2.35±0.08
분화 중에 많이 발현된 공지 유전자들				
BC018036	Tetraspanin 7 (TSPAN7)	428/439(97%)	0.0	1.79±0.11
BC021174	Small EDRK-rich factor 1A (SERF1A)	635/650 (97%)	0.0	2.30±0.28
AL121980	CUB and Sushi multiple domains 2 (CSMD2)	144/145 (99%)	e-72	2.27±0.08
BC046114	microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	410/488 (84%)	0.0	3.44±0.04
BC032565	LAG1 longevity assurance homolog 5 (LASS5)	948/962 (98%)	0.0	3.55±0.09
AY337516	glutamate decarboxylase 1 (GAD1)	133/138(96%)	8e-59	6.80±0.08
AL353648	high-mobility group box1(HMGB1)	117/119(98%)	e-54	2.35±0.08
BC042486	Kinesin family member 3C (KIF3C)	1055/1073 (98%)	0.0	5.49±0.30
NM_002489	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1alpha subcomplex,4 (NDUFA4)	273/273(100%)	4e-151	1.90±0.10
NM_080820	histidyl-tRNA synthetase 2 (HARS2)	959/960(99%)	0.0	2.59±0.22
NM_001604	Paired box gene 6 (Pax6)	318/319(99%)	1e-163	1.67±0.14
BC040436	splicing factor, arginine/serine-rich 11 (SRS11)	130/153 (84%)	3e-79	2.73±0.17
BC025296	ornithine decarboxylase 1 (ODC1)	512/513 (99%)	0.0	7.78±0.04
BC003385	speckle-type POZ protein (SPOP)	554/562 (98%)	0.0	3.81±0.04
BC028311	dopachrome tautomerase (DCT)	667/667(100%)	0.0	1.65±0.07
NM_006227	phospholipid transfer protein isoform a precursor (PLTP)	843/845(99%)	0.0	2.20±0.01
NM_006317	brain abundant, membrane attached signal 1 (BASP1)	212/212(100%)	1e-114	9.92±0.17
AY339566	cytochrome c oxidase subunit I (COX1)	662/664 (99%)	0.0	3.05±0.05

BC017265	RAB9A, member RAS oncogene family	472/474(99%)	0.0	2.91±0.14
BC065711	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptides (POLR2J)	588/591(99%)	0.0	3.27±0.17
BC024240	cytochrome c oxidase subunit Va, precursor (COX5A)	498/498(100%)	0.0	2.23±0.08
BC053630	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7 (GNG7)	461/462(99%)	0.0	2.10±0.12
AK223612	Pinin(PNN)	280/304 (92%)	e-169	4.23±0.05
BC050637	tubulin, alpha 3	527/530 (99%)	0.0	2.06±0.02
AK025512	highly similar to AF190901 Homo sapiens CIDE-B apoptosis protein	312/312(100%)	1e-161	2.10±0.12
BC051802	ribonuclease, RNase K	213/213(100%)	8e-107	1.69±0.12
AL160251	chromosome 13 open reading frame 17 (C13orf17)	529/550 (96%)	0.0	3.70±0.11
증식 중에 많이 발현된 미지 유전자들				
AL136721	hypothetical protein	670/687(97%)	0.0	2.46±0.09
BX649038	uncharacterized	280/280 (100%)	e-155	1.40±0.07
분화 중에 많이 발현된 미지 유전자들				
XM_379510	hypothetical protein	257/265 (96%)	e-131	3.90±0.06
NM_015329	hypothetical protein LOC23383	641/659 (97%)	0.0	9.70±0.24
AK023048	unnamed protein product	489/491(99%)	0.0	11.31±0.21

[0051] RT-PCR 과 real time quantitative RT-PCR

[0052] 또한 ACP 차별 디스플레이 결과를 확인하고 목표 서열의 상대적인 발현 비율을 측정하기 위하여 DEGs에 대하여 RT-PCR과 real time quantitative RT-PCR을 수행하였다.

[0053] 먼저 RT-PCR 실험을 설명한다. 추출된 RNA를 사용하여 역전사를 통해 첫번째 가닥 cDNA를 합성하였다. 역전사는 최종 반응 부피 20 μ l로 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 수행하였고, 4 μ g의 정제된 RNA, 4 μ l의 5 X 첫번째 가닥 버퍼 (Invitrogen) , 1 μ l의 dNTPs (각각 10 mM), 1 μ l의 올리고 dT (500 ng / μ l), 0.5 μ l의 리보뉴클레아제 억제제 (40 U/ μ l; Takara), 2 μ l의 0.1 M DTT (Invitrogen), 1 μ l의 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 역전사효소 (200 U/ μ l; Invitrogen)를 포함하였다. 첫번째 가닥 cDNA는 80 μ l의 초정제수로 희석하였고, 사용 시까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 동일한 발현 유전자들도 RT-PCR로 확인하였다. cDNA는 역전사효소 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 mRNA로부터 합성하였다. ProbeWiz Server (H. B. Nielsen et al., 2002)를 사용하여 특정한 프라이머를 디자인하였다. 프라이머 서열은 나타나 있지 않다. 최적의 정량을 위하여, 파라미터는 용융온도(Tm) 55-65 $^{\circ}$ C 를 갖는 프라이머 서열을 디자인하고 3' 말단 상보성을 피하도록 설정하였고(프라이머 다이머 형성을 막기 위함), 150-300bps 크기의 산물을 얻도록 설정하였다.

[0054] 도 3은 RT-PCR에 의한 인간 신경줄기세포의 증식(P), 분화(D) 중의 DEGs 발현 패턴의 비교 분석 결과를 보여준다. 이를 통해 모든 DEGs 가 인간 신경줄기세포에서 차별적으로 발현된다는 것을 밝혀냈으며, 이는 ACP 차별 디스플레이 분석의 결과를 확증해준다.

[0055] 증식과 분화 상태에서 34 개의 DEGs의 발현 패턴을 추가적으로 분석하기 위하여 real time PCR을 수행하였다. ABI 프리즘 7700(Applied Biosystems)에서 수행하였고, SYBR premix Ex Taq (TAKARA)에 포함된 두 가닥 DNA-특이적 형광 염료인 SYBR Green으로 검출하였다. 결과를 정량하기 위해 앞서 프라이머 다이머와 특정 생산물의 녹는 점을 조사하기 위하여, 정제된 템플레이트와 함께 또는 정제된 템플레이트 없이 PCR을 가동함으로써 최적화 절차를 실행하였다. 표준곡선을 위해 GAPDH 플라스미드 DNA (10²-10⁹ 분자들)의 연속적인 희석을 이용하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 10초, 이후 94 $^{\circ}$ C에서 5초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초인 사이클 50회였다. 데이터는 SYBR Green 반응의 확장 단계 동안 수집하였다.

[0056] Ct 값은 리포터 염료에 의해 발생된 형광이 기준선을 넘어 고정 레벨을 초과하는 지점의 사이클 수이다. 선택된 유전자의 신호는 GAPDH의 상대적인 양에 대비하여 표준화하였고 각 cDNA의 상대적인 양은 ΔC_T value; $\Delta C_T = C_{T, target} - C_{T, GAPDH}$ 값을 결정함으로써 계산하였다. GAPDH 내부 조절 유전자와 관련된 목표 유전자와의 폴드 차이는 $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ 방법(12)에 의해 결정하였다. $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ 방법은 real time PCR로부터 유전자 발현에 있어 상대적인

변화를 분석할 수 있는 편리한 방법이다; $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_{T, \text{sample}} - \Delta C_{T, \text{control}}$. 변이의 조사 후에는 이 연구 결과들을 분석하기 위하여 비모수적(nonparametric) t-테스트와 윌콕슨 순위 합계 테스트(Wilcoxon rank sum test)를 하였으며(13), P 값 < 0.001 인 것이 중요하게 여겨진다.

[0057] real time PCR 결과, 증식 상태에서 발현이 증가된 유전자들은 큰 폴드 변화 격차를 보이지 않았다. 증식 상태 동안 가장 많이 발현된 유전자는 AL136721였으며 폴드 변화가 2.46 이었다. 뉴로스피어 분화 상태 중에는 AK023048 유전자가 폴드 변화 11.31로 가장 많이 발현되었다. 분화 중 발현에 있어서 높은 폴드 변화를 갖는 다른 유전자들은 뇌에 풍부한 막 부착 신호 단백질 1(BASP1) (9.92-fold), NM_015329 (9.70-fold), 오르니틴 데카르복실라아제 1 (ODC1) (7.78-fold) 였다.

[0058] <실시예 4> 미지 유전자의 발현 측정

[0059] 본 발명의 연구자들은 미지 DEGs 의 기능을 알아내기 위해 인간 신경줄기세포의 분화 중에 많이 발현되는 두 개의 미지 DEGs, NM_015329 와 AK023048 를 선택하여 각각 렌티 바이러스를 이용하여 과발현시키고, 렌티 감염된 HFT13 세포를 분화시켜 면역세포화학법에 의해 단백질 발현 레벨을 조사하였다. 이하, 보다 상세하게 실시예를 설명한다.

[0060] 실시예 4-1: 재조합 렌티 바이러스 벡터의 구축

[0061] 미지 유전자 NM_015329 와 AK023048 을 지닌 렌티 바이러스 벡터를 만들었다. NM_015329 와 AK023048 유전자는 HFT13 cDNA로부터 복제하였다. 렌티바이러스 벡터는 트로노 랩 (<http://tronolab.epfl.ch/>)으로부터 얻은 벡터를 사용하여 칼슘-침전-트랜스펙션 (과도 트랜스펙션) 방법에 의해 생산하였으며, 트로노 랩이 제공한 방법에 따라 수행하였다. 트랜스퍼 벡터의 백본은 pWPI 이다. 패키징 플라스미드와 엔벨로프 플라스미드는 psPAX2와 pMD2G였고, eGFP는 리포터 유전자였다. 미지 유전자 발현 유닛을 pWPI 플라스미드로 삽입하였다(렌티-AK023048 와 렌티-NM_015329 라고 명명함). 293FT 세포로 트랜스펙션 하였고, 트랜스펙션한지 48시간, 72 시간 후에 바이러스 상청액을 얻어 0.45 μ m 필터(Millipore, Bedford, MA)를 통과시켰다. 생산된 바이러스 벡터는 수크로즈 쿠션에서 초원심분리에 의해 모았다. 바이러스 적정농도는 트로노 랩에서 제공한 형광 활성화된 세포 정렬(Fluorescent activated cell sorting, FACS) 분석 방법에 의해 형질도입 단위(TU)로 확인하였다. HFT13은 10MOI로 감염되었다.

[0062] 실시예 4-2 : 미지 유전자를 포함한 인간신경줄기세포의 증식률 관찰

[0063] 본 발명자들은 미지 유전자 NM_015329 와 AK023048 을 지닌 렌티 바이러스에 감염된 HFT13 세포의 증식률을 50 일 동안 관찰하였다. 먼저, 세포 신장을 측정하기 위해 조직 배양 처리된 60mm 플레이트에서 2×10^6 세포들을 배양하였다. 컨트롤은 렌티-dGFP 감염된 HFT13이다.

[0064] 도 4는 렌티 감염된 HFT13으로부터 생성된 뉴로스피어의 세포수를 시간 경과에 따라 나타낸 그래프이다. HFT13 과 렌티-eGFP 감염된 HFT13의 증식률은 차이가 없으며, 이들의 배가 시간은 4일이었다. 하지만 렌티-AK023048 감염된 HFT13의 배가 시간은 6.2일이고 렌티-NM015329 감염된 HFT13 은 4.5일로, 미지 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 감염된 세포의 배가 시간이 약간 느렸다. 이는 미지 유전자들이 분화 상태에서 보통 과발현되어, 증식률에는 약하게 영향을 미침을 의미한다.

[0065] 실시예 4-3 : 인간 신경줄기세포의 분화 중 미지 유전자의 발현 레벨 조사

[0066] 본 발명자들은 또한 렌티 바이러스 감염된 HFT13의 세포 조성을 분석하기 위하여 단백질 발현 레벨을 조사하였다. 해리된 렌티 바이러스 감염된 HFT13을 폴리-L-라이신 코팅된 배양 접시에 7일 이내로 배양한 결과 뉴런, 별아교세포, 희소돌기아교세포로 분화하였다. 세포들의 잠재력을 평가하기 위해, 시험관에서 7일간 자란 후에 분화된 세포들을 미성숙 세포(immature cell), 뉴런(neuronal), 신경교세포(glial), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 별아교세포(astrocyte) 마커를 사용하여 면역세포화학적으로 염색하였다. 상세한 실험 방법은 아래와 같다.

[0067] 면역세포화학법

[0068] 렌티 바이러스 감염 세포들을 T/E에서 단일 세포 부유물로 해리시켜, N2 부가물을 포함하지만 미토겐을 포함하지 않는 무혈청 배지(DMEM/F-12)에서 PLL (10 μ g/ml; Sigma) 코팅된 8-well chamber 슬라이드 (Nunc)로 직접 평판배양 하였다. 7일 이상의 배양 기간이 지난 후, 세포들은 분화하는 뉴런과 신경교 단일층을 형성하였다. 7 일째에, 세포들을 PIPES 버퍼(Sigma)에서 4% 파라포름알데히드로 10분간 고정시켰고, PBS로 3번 씻었고, 이하의 설명과 같이 처리하였다. 고정된 세포들은 5% 보바인 세럼 알부민(BSA)과 0.2% Triton X-100 을 포함하는 3% 홀스 세럼으로 차단시켰고, GFAP(1:1500; DAKO), 휴먼네스틴 (1:200; Chemicon), 베타-튜블린 isoype III (=Tuj1)(1:500; Covance), PDGFR α (1:100; Santa Cruz), O4(1:200; Chemicon), 글루타메이트(1:500; Sigma), GABA(1:500; Sigma), GFP(1:200; Invitrogen)에 대한 일차 항체들과 함께 배양하였다. PBS로 씻어낸 뒤에는 플루오레세인(1:180; Vector), 텍사스 레드(1:180; 벡터) 이차 항체와 접합된 중특이적인 이차 항체들과 함께 배양하였고, DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole; 벡터)를 핵 염료로 사용하였다. 면역 형광 염색 후에, DAPI-양성 핵과 GFP-양성 세포 수를 세어 면역 반응성 세포의 비율을 산정하였다. 통계학적 조사는 ANOVA로 수행하였다.

[0069] 베타-튜블린 III 는 새롭게 생성된 뉴런을 표지하는 데에 널리 사용되어 왔으며, GABA는 GABAnergic 뉴런을 표지하는데 사용되며, 글루타메이트는 glutamatergic 뉴런을 표지하기 위해 사용된다. 따라서 베타-튜블린 III, GABA, 글루타메이트는 뉴런과 신경교 계통 세포의 마커로 사용하였다. GFAP는 별아교세포를 탐지하는 마커로 사용하였다. 휴먼네스틴은 전구세포와 뉴런 아집단에서 뿐만 아니라 전구체 단계에서 신경교세포 분화로의 변이 중에도 뉴런과는 달리 일시적인 패턴으로 탐지되는바, 이들의 마커로 사용하였다. PDGFR α 와 O4는 희소돌기아교세포의 마커로 쓰였다.

[0070] 실험 결과는 하기 표 2 및 도 5에 나타나 있다.

[0071]

표 2

[0072] 렌티-eGFP, 렌티-AK023048, 렌티-NM_015329 감염된 HFT13에서 단백질 마커의 발현 변화

마커	렌티-eGFP 감염된 HFT13(%)	렌티-AK023048 감염된 HFT13 (%)	렌티-NM_015329 감염된 HFT13 (%)
TUJ1	22 \pm 1	42 \pm 1 [*]	62 \pm 2 ^{#, †}
GABA	5 \pm 1	4 \pm 1	15 \pm 1 ^{##, ††}
글루타메이트	5 \pm 1	8 \pm 2 ^{***}	23 \pm 1 ^{#, †}
GFAP	50 \pm 2	15 \pm 1 [*]	4 \pm 3 ^{#, †††}
휴먼네스틴	74 \pm 1	34 \pm 1 [*]	20 \pm 1 ^{#, ††}
PDGFR α	11 \pm 2	23 \pm 2 ^{**}	4 \pm 1 ^{###, ††}
O4	41 \pm 1	52 \pm 2 ^{**}	22 \pm 1 ^{#, †}

[0073] 상기 표 2는 베타-튜블린III-, GABA-, 글루타메이트-, PDGFR α -, GFAP-, 휴먼네스틴-, O4- 양성 세포의 비율을 4-5 회의 독립적인 실험의 평균값 \pm SEM(평균 표준 오차) 으로 나타냈다.

[0074] 렌티-AK023048 과 렌티-NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 베타-튜블린 III-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(*P<0.0001, [#]P<0.0001)에 비해 증가하였다. 그리고 렌티-NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 베타-튜블린 III-양성 세포의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13([†]P<0.0001)보다 훨씬 높았다.

[0075] AK023048 감염된 HFT13으로부터 얻은 GABA-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(##P<0.001)와 비슷했다. 그러나 NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 GABA-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(###P<0.001) 와 AK023048 감염된 HFT13(^{††}P<0.001) 보다 훨씬 높았다.

- [0076] AK023048 감염된 HFT13($***P<0.05$)와 NM_015329 감염된 HFT13($^{\#}P<0.0001$)로부터 얻은 글루타메이트-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13에 비해 증가하였다. 그리고 NM_015329 감염된 HFT13로부터 얻은 글루타메이트-양성 세포의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13($^{\dagger}P<0.0001$) 보다 훨씬 높았다.
- [0077] 렌티-AK023048 감염된 HFT13($*P<0.0001$) 와 렌티- NM_015329 감염된 HFT13($^{\#}P<0.0001$)의 GFAP-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13에 비해 감소하였고, 렌티-NM_015329 감염된 HFT13의 GFAP-양성 세포 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13($^{\dagger\dagger\dagger}P<0.01$)보다 낮았다.
- [0078] 렌티-AK023048 감염된 HFT13($*P<0.0001$) 와 렌티- NM_015329 감염된 HFT13($^{\#}P<0.0001$)의 휴먼네스틴-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13에 비해 감소하였고, 렌티- NM_015329 감염된 HFT13의 휴먼네스틴-양성 세포의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13($^{\dagger\dagger}P<0.001$) 보다 낮았다.
- [0079] AK023048 감염된 HFT13으로부터 얻은 PDGFR α -양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13($***P<0.001$)에 비해 증가하였으나, 렌티- NM_015329 감염된 HFT13은 렌티-eGFP 감염된 HFT13($###P<0.01$)에 비해 감소하였다. 그리고 렌티- NM_015329 감염된 HFT13로부터 얻은 PDGFR α -양성 세포의 비율은 AK023048 감염된 HFT13($^{\dagger\dagger}P<0.001$) 보다 낮았다.
- [0080] AK023048 감염된 HFT13으로부터 얻은 O4-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13($***P<0.001$)에 비해 증가하였으나, 렌티- NM_015329 감염된 HFT13은 렌티-eGFP 감염된 HFT13($^{\#}P<0.0001$)에 비해 감소하였다. 그리고 렌티- NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 O4-양성 세포의 비율은 렌티- AK023048 감염된 HFT13($^{\dagger}P<0.0001$) 보다 낮았다.
- [0081] $***P<0.05$, $**P<0.001$, $*P<0.0001$ 렌티-AK023048 감염된 HFT13 vs 렌티-eGFP 감염된 HFT13
- [0082] $###P<0.01$, $##P<0.001$, $\#P<0.0001$ 렌티-NM_015329 감염된 HFT13 vs 렌티-eGFP 감염된 HFT13
- [0083] $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.01$, $^{\dagger\dagger}P<0.001$, $^{\dagger}P<0.0001$ 렌티-AK023048 감염된 HFT13 vs 렌티-NM_015329 감염된 HFT13
- [0084] 도 5는 인간 신경줄기세포의 분화 후, 렌티-eGFP(A~G), 렌티-AK023048(H~N), 렌티-NM_015329(O~U) 감염된 HFT13에서 단백질 마커의 발현 변화를 보여준다.
- [0085] 렌티-AK023048과 렌티-NM_015329 감염된 HFT13로부터 얻은 베타-튜블린 III-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13에 비해 증가하였다. ($*P<0.0001$, $^{\#}P<0.0001$)(표 2, 도 5-A,H,O) 그리고 렌티-NM_015329 감염된 HFT13에서, 베타-튜블린 III 양성 세포의 비율이 최대로 나타났다($^{\dagger}P<0.0001$)(표 2, 도 5-A,H,O) .
- [0086] 렌티-AK023048 감염된 HFT13으로부터 얻은 GABA-양성 세포의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13과 유사했다.(표 2, 도 5-B,I,P) 하지만 렌티-NM_015329 감염된 HFT13은 렌티-eGFP 감염된 HFT13에 비해 증가했다. ($###P<0.001$) NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 GABA-양성 세포들의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13보다 높았다. ($^{\dagger\dagger}P<0.001$)(표 2, 도 5-B,I,P)
- [0087] 렌티-AK023048 감염된 HFT13($***P<0.05$)과 렌티 NM_015329 ($^{\#}P<0.0001$) 감염된 HFT13로부터 얻은 글루타메이트-양성 세포들의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13에 비해 증가하였다. 렌티-NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 글루타메이트-양성 세포들의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13($^{\dagger}P<0.0001$)에 비해 높았다.(표 2, 도 5-C,J,Q)
- [0088] 렌티-AK023048 감염된 HFT13($*P<0.0001$) 과 렌티-NM_015329 감염된 HFT13($^{\#}P<0.0001$)의 GFAP-양성 세포들의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13의 GFAP-양성 세포의 비율에 비해 감소했다.(표 2, 도 5-D,K,R)
- [0089] 렌티-AK023048 감염된 HFT13($*P<0.0001$) 과 렌티-NM_015329 감염된 HFT13($^{\#}P<0.0001$)의 휴먼네스틴-양성 세포들의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13의 휴먼네스틴-양성 세포의 비율에 비해 감소했다. 또한 렌티-NM_015329 감염된 HFT13의 휴먼네스틴-양성 세포 비율이 렌티-AK023048 감염된 HFT13보다 감소하였다.(L,S) 결과적으로 본 실험 데이터는 렌티-eGFP 감염 HFT13에서 휴먼네스틴-양성 세포들이 다른 것들보다 훨씬 많음을 보여준다.(표 2, 도 5-E,L,S)

[0090] 렌티-AK023048 감염된 HFT13으로부터 얻은 PDGFR α-양성 세포들의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(**P<0.001)에 비해 증가했으나,(표 2, 도 5-F,M) 렌티-NM_015329 감염된 HFT13은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(###P<0.01)에 비해 감소했다.(표 2, 도 5-F,T) 그리고 렌티-NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 PDGFR α-양성 세포들의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13(††P<0.001)보다 낮았다.(표 2, 도 5-M,T)

[0091] 렌티-AK023048 감염된 HFT13으로부터 얻은 O4-양성 세포들의 비율은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(**P<0.001)에 비해 증가하였으나(표 2, 도 5-G,N), 렌티-NM_015329 감염된 HFT13은 렌티-eGFP 감염된 HFT13(#P<0.0001)에 비해 감소하였다(표 2, 도 5-G,U). 그리고 렌티-NM_015329 감염된 HFT13으로부터 얻은 O4-양성 세포들의 비율은 렌티-AK023048 감염된 HFT13(†P<0.0001)보다 낮았다(표 2, 도 5-N,U).

[0092] ***P<0.05, **P<0.001, *P<0.0001 렌티-AK023048 감염된 HFT13 vs 렌티-eGFP 감염된 HFT13. ###P<0.01, ##P<0.001, #P<0.0001 렌티-NM_015329 감염된 HFT13 vs Lenti-eGFP 감염된 HFT13. †††P<0.01, ††P<0.001, †P<0.0001 렌티-AK023048 감염된 HFT13 vs 렌티-NM_015329 감염된 HFT13

[0093] 도 6은 베타-튜블린 III-, GABA-, 글루타메이트, PDGFR α-, GFAP-, 휴먼네스틴-, O4 - 양성 세포들의 비율을 4-5 회의 독립적인 실험의 평균값 ± SEM(평균 표준 오차) 으로 나타낸 그래프이다.

[0094] [semi-quantitative RT-PCR]

[0095] semi-quantitative RT-PCR을 이용한 mRNA 레벨의 분석은 면역세포화학의 단백질 레벨에서 입증된 것과 같은 발현 패턴을 밝혀냈다. Tuj1과 HuD는 뉴런 마커이고, GFAP와 AQP4는 별아교세포 마커이고, PDGFR α와 PLP는 올리고 마커이고, 베타-액틴과 GAPDH는 대조군으로 사용되었다. 하기 표 3에 나타나듯이 각각의 마커에 특이적인 프라이머를 만들어 실험을 수행하였으며, 인간 GAPDH와 베타-액틴 mRNA를 내부 기준으로 사용하였다. 증폭은 94℃에서 30초; 58~60℃에서 30초; 72℃에서 30초로 이루어진 사이클 조건에서 25~28 사이클로 수행하였다. RT-PCR 산물은 에티디움 브로마이드로 염색하여 2% 아가로스겔에서 분리하였다.

표 3

[0096] 각각의 단백질 마커에 특이적인 프라이머

단백질 마커	Forward Primer	Reverse Primer
GFAP	5' -ACATCGAGATCGCCACCTAC-3' (서열번호 2)	5' -ACATCACATCCTTGCTGCTCC-3' (서열번호 3)
AQP4	5' -AGTTACTTCCTTCCATT TATATC-3' (서열번호 4)	5' -GTTTGATACCCGAATACA-3' (서열번호 5)
베타-튜블린 III	5' -AGAGCCATCTAGCTACTG ACACTG-3' (서열번호 6)	5' -CCGAATATAAACACAACCC AGTAAA-3' (서열번호 7)
HuD	5' -CTTAATATGGCCTATGGC GTAAAG-3' (서열번호 8)	5' -GAATCACCTTTACGTGT TCACTG-3' (서열번호 9)
PDGFR α	5' -GCCTGGACAATATAAAAAG AGTTATGA-3' (서열번호 10)	5' -CTCTCTCTTGATGAAGGT GGAAC-3' (서열번호 11)
PLP	5' -GTGTACATTTACTTCAACA CCTGGAC-3' (서열번호 12)	5' -AGTTTAAGGACGGCAAAGT TGTAAGT-3' (서열번호 13)
GAPDH	5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (서열번호 14)	5' -TCCACCACCTGTTG CTGTA-3' (서열번호 15)
베타-액틴	5' -AAGAGAGGCATCCTCACCT-3' (서열번호 16)	5' -TACATGGCTGGGGTG TTGAA-3' (서열번호 17)

[0097] 도 7은 semi-quantitative RT-PCR을 이용한 mRNA 분석 결과를 보여준다.

[0098] 베타-튜블린 III는 뉴런과 신경교 계통에서 탐지되며, anti-Hu는 초기 뉴런에서 탐지된다. RT-PCR 결과, anti-

Hu와 베타-튜블린 III가 렌티-NM_015329 감염된 HFT13에서 최대로 발현하였고, 렌티-eGFP 감염 HFT13에서 최소로 발현하였다. 따라서 렌티-NM_015329 감염된 HFT13은 다른 것들보다 뉴런 분화를 촉진하는 것으로 보인다.

[0099] GFAP와 AQP4는 신경줄기세포의 별아교세포로의 분화 중에 발현된다. RT-PCR 결과, GFAP와 AQP4가 렌티-eGFP 감염 HFT13에서 최대로 발현하였고, 렌티- NM_015329 감염된 HFT13에서 최소로 발현하였음을 보여준다. 렌티-eGFP 감염 HFT13는 다른 것들에 비해 미성숙 단계인 것처럼 보인다.

[0100] PDGFR α 는 희소돌기아교세포에서 탐지되며, PLP는 희소돌기아교세포 성숙의 최종 단계에서 발현되지만 상응하는 트랜스크립트는 훨씬 이른 때 발생 중에 탐지된다. RT-PCR 결과, PLP와 PDGFR α 는 렌티- AK023048 감염된 HFT13에서 최대로 발현하였고, 렌티- NM_015329 감염된 HFT13에서 최소로 발현하였다. 따라서 렌티-AK023048 감염된 HFT13은 다른 것들보다 희소돌기아교세포 분화를 더 촉진하는 것으로 보인다.

[0101] 실시예 4에 의해 결과적으로, 렌티-AK023048 감염된 HFT13는 희소돌기아교세포의 분화 증가에 관련이 있으며 뉴런 분화에도 조금 관련이 있음을 알 수 있다. 그리고 렌티- NM_015329 감염된 HFT13은 뉴런의 분화 증가에 관련이 있음을 알 수 있다. 또한 렌티-eGFP 감염 HFT13은 별아교세포, 신경교 세포의 분화와 미성숙 뉴런의 증가와 관련이 있는 것으로 보인다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1은 인간 신경줄기세포와 전구체의 (A)증식, (B)분화 상태의 전형적인 형태를 보여주는 위상차 현미경 이미지이다.

[0103]

[0104] 도 2는 어닐링 조절 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해 생성된 인간 신경줄기세포의 증식(P), 분화(D) 중에 발현된 34 DEGs중 대표 밴딩 패턴을 나타낸다.

[0105] 도 3은 semi-quantitative RT-PCR에 의한 인간 신경줄기세포의 증식(P), 분화(D) 중의 34 DEGs의 발현 패턴을 나타낸다.

[0106] 도 4는 렌티 감염된 HFT13으로부터 생성된 뉴로스피어의 세포수를 시간 경과에 따라 나타낸 그래프이다. 렌티-eGFP-, 렌티-AK023048-, 렌티-NM_015329-감염된 HFT13과, 대조군으로서 HFT13을 각각 독립적으로 증식시킨 결과이다.

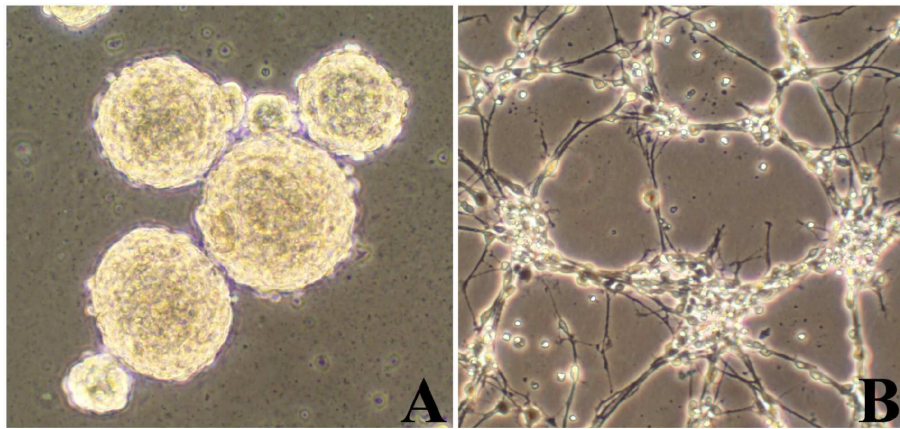
[0107] 도 5는 인간 신경줄기세포의 분화 후, 렌티-eGFP(A~G), 렌티-AK023048(H~N), 렌티-NM_015329(O~U) 감염된 HFT13에서 단백질 마커의 발현 변화를 보여준다. 단백질 마커로는 베타-튜블린 III, GABA, 글루타메이트, GFAP, 휴먼네스틴, PDGFR α , O4를 사용하였다.

[0108] 도 6은 베타-튜블린 III-, GABA-, 글루타메이트, PDGFR α -, GFAP-, 휴먼네스틴-, O4- 양성 세포들의 비율을 4-5 회의 독립적인 실험의 평균값 \pm SEM(평균 표준 오차)으로 나타낸 그래프이다.

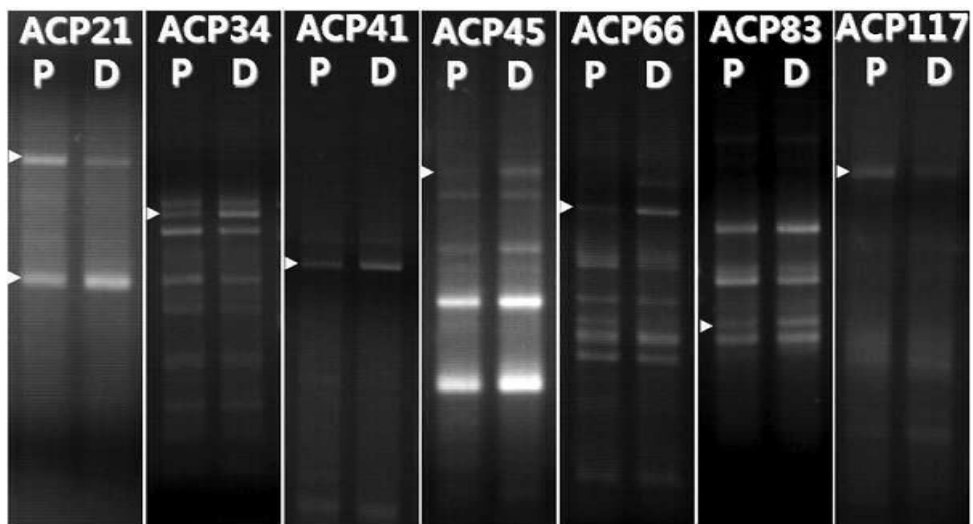
[0109] 도 7은 semi-quantitative RT-PCR을 이용한 mRNA 분석 결과를 보여준다. Tuj1과 HuD는 뉴런 마커, AQP4와 GFAP는 별아교세포 마커, PDGFR α 와 PLP는 올리고 마커이다. GAPDH와 베타-액틴은 대조군이다.

도면

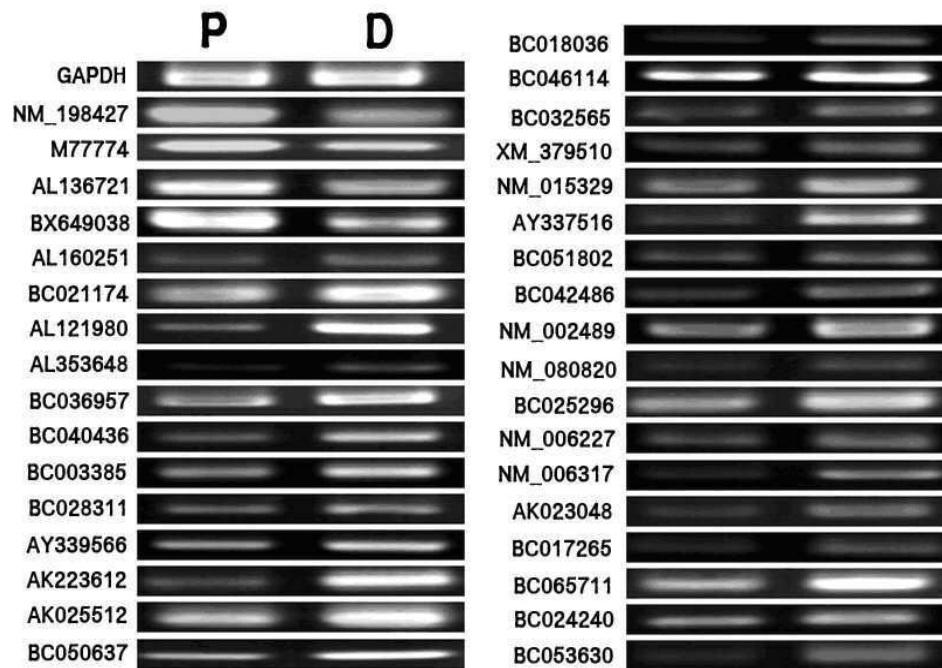
도면1



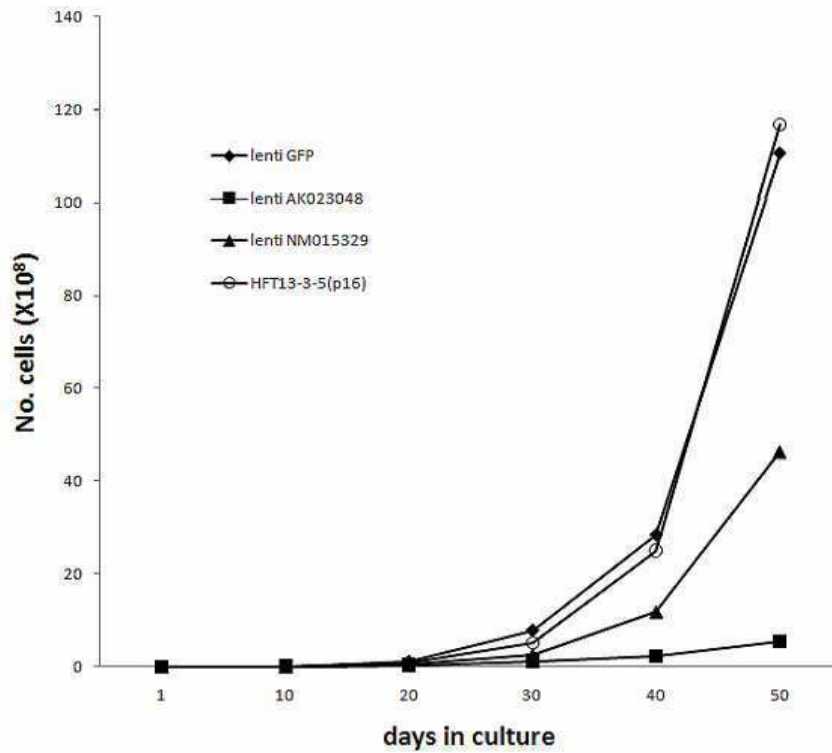
도면2



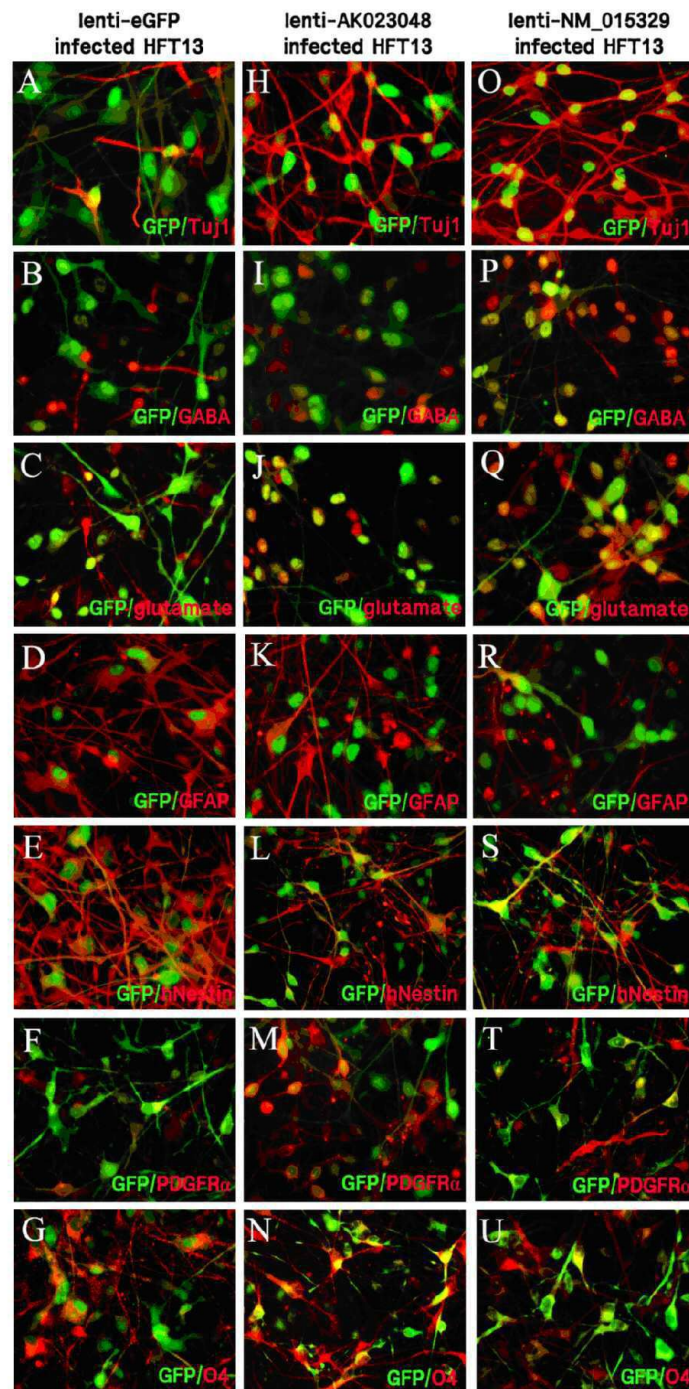
도면3



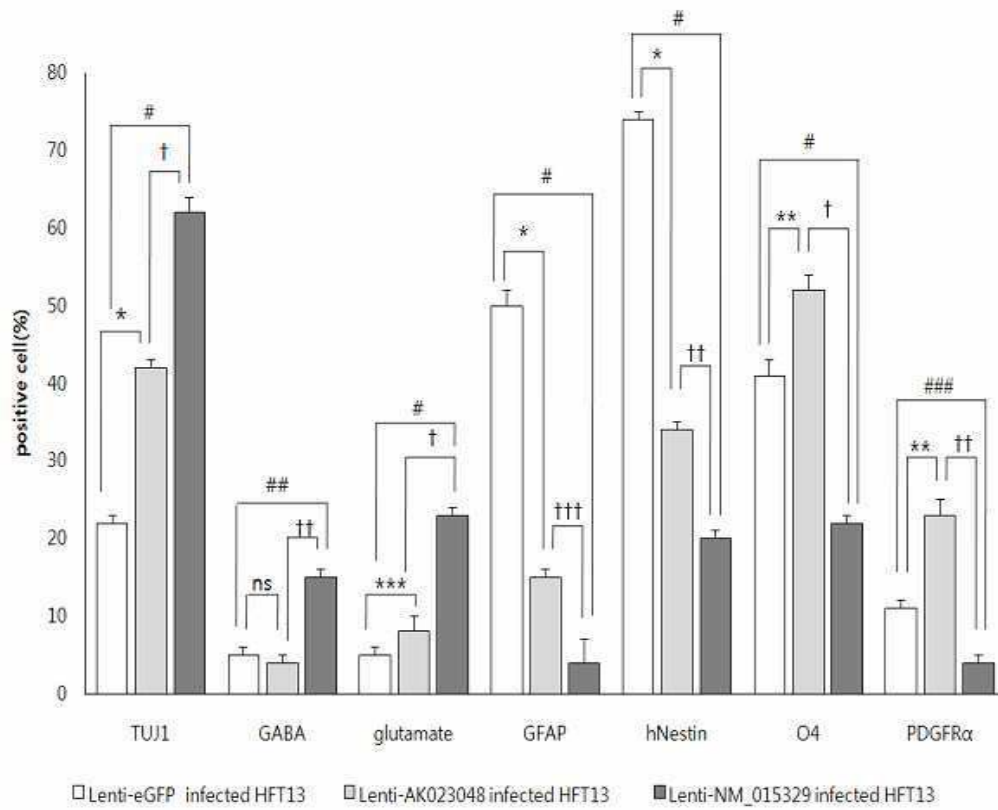
도면4



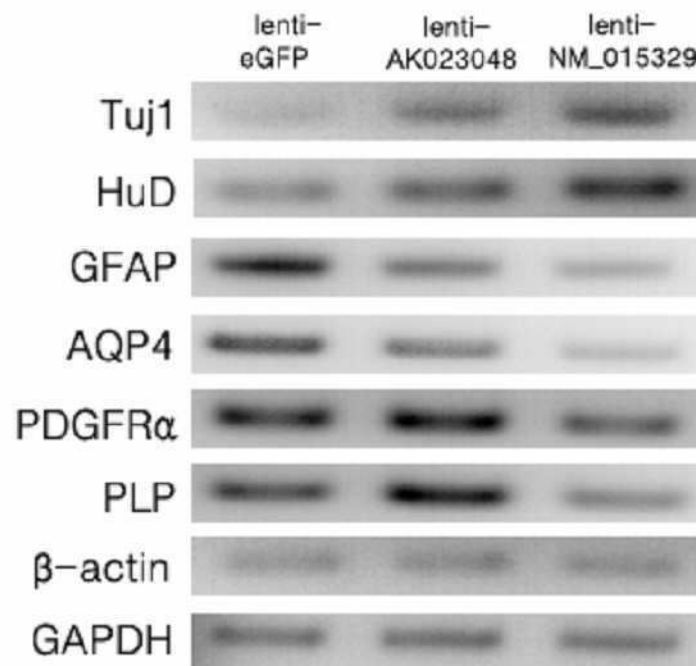
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
 <120> Composition for Stimulating Differentiation of Neural Stem Cell

<130> P09001

<160> 17

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 2430
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 tcagctcgca ctgcatatgc aacgcaactc aactcatgct gcgtatgcaa ctcaactcac 60
 actgtatgca actcagctcg ctctgcatat gcaattcaac tcgcactgcg tatgcaaac 120
 aacttactgc atatgcaact caactcactg cgtatgcaac tcaactcgca ctgcgtatgc 180
 aactcaactc gcaactgcgtg tgcaactcaa ctgcactgca gtagtcaact cagctcgca 240
 tgcgtatgca actcaactgt tgcaagtact tatttcgggc cacttccttt ttctaactac 300
 cacaccaagc cagtatttct cctccctgaa gtcagcccag gatgaggcac tagacagcag 360
 gacatgctgt atgcccttgg gcctgctgga agtatgcaga ctagccagcc ccagacttca 420
 tcttgccctg tcttgccctt cctgtgaaaa cctgtgggcc tctgcctccc ctggctctga 480
 ctctgcctc ctgcccagct ctgcagctcc ccttggggcc tgcctggagt gatgtgccgc 540
 ctctcttga cactgtgagt gataaacttt ccatgtcagg aacctgtgtg tgtcactcac 600
 tcaccttgac gagtccgctg ctaggccccca ccagtgtgtg gggtttcctc atagtctctc 660

tacctaagca catgtctgtg acaaggtctt acccagccca gggattcttg aactatctgt	720
aggaactgcc atgttgactc ctgggcagtt ttattctttc tctctactcg ttcaaccttc	780
ttagggagtg acgttttttc caaagtgggt gtgaaacagc atctccttgg ggtgttggtt	840
tgcacttctc ttcatctactg atagiatgaa catggttttg cttacgctgg ctattttcct	900
ttttggatga agtacctggt cttgtttttt cctggtttgt ttgatcttg ttctttttta	960
gaaatagtga ggctgttgtg aggtgagtca ccacttgtga cttagaagat tgcagtgggt	1020
tccacttcac ctgtttccac ttttgtgatg atgccttaag gaaaaagatt gtgccaggtg	1080
tggtggctca ggcctgtaat cccaacactt tgggaggccg aggtgggtgg atcacaaggt	1140
caggagatca agaccatcct ggccaacatg gtgaaacgcc atctctacta aaaatagaaa	1200
aattggctag atgtgggtgt gcacgcctgt aatcccagct ccttgggagg ctgaggcagg	1260
agaattgctt gaagatggga agcacagatt gcagtgaacc gagatcgcg cactgcactc	1320
cagcctggca acagagtgag actctgtctc aaaaaaaaaag gaaaaatatt tcttaatttt	1380
ggcatactca aatttataca acctttcctt tatcttcac agaaatttct ttctcctaa	1440
ggccttaaat atgtgttact attttggctt ccacagtctc tatgttttat cccaagttgc	1500
ttaatccatt tggagttgat tttgttgac cgtatctgta gagtgtaatg tcatttttcc	1560
cactatggac ataaaaattt ttgcaaggcc tctttttttt aatgaagaaa agaggtttat	1620
tttgttcaca attctgaagg cctggagggt ccagaagct tggcaccagc acccactagg	1680
ctccagatcg gggcctcatg ctgacttccg ttttcacaca acgagtggga aacaggtgtc	1740
ctaacactgt gagagaaaaa atcccaaagt ttagtttttc ccattcgctt gccctggcct	1800
ccaggcattc ctgcagcagc aaacacatca tcagccttag gagctggcct gtgaggttga	1860

ccactctgta ggtggacaag cctcgcccga gaagagacat gagcagttct gcgtaggctt	1920
taagacagaa tcaacatgga aagcacgacc cacatggttt caatagaact tgcctcctga	1980
acctgactag gtiactcgcc tgatgaacca gtatctccat caccgtggg actgacagac	2040
ccagagtgtc ataacctaaa attcagaagt gtagactata atcttaaatt attcagcata	2100
tgtgcaacag ccttggggag cagtgttatg ataccaaag gctaacattc atgacctcag	2160
tatcctggaa gaaaaggaga aagtgtgatg tagtaaaacc acttgaaaaa ataatgatga	2220
aacatttctc atatttggtg taagataaaa acttaagttt gaagaggttc catgagcccc	2280
agacaggata aacctaaaga aaaccaagcc caggccgggg gcggtggctc acacctgtaa	2340
tcccagcact ttgggaggcc gaggtgggcg gatcacaagg tcaggagatc atgaccatcc	2400
tggccaacac agtgaaacct cgtctctagt	2430

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward Primer for GFAP

<400> 2	
acatcgagat cgccacctac	20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse Primer for GFAP

<400> 3
acatcacatc cttgtgctcc 20

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward Primer for AQP4

<400> 4
agttacttcc ttccatttat atc 23

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Primer for AQP4

<400> 5
gtttgatacc cgaataca 18

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward Primer for beta-Tubulin III

<400> 6
agagccatct agctactgac actg 24

<210> 7

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse Primer for beta-Tubulin III

<400> 7
 ccgaatataa acacaaccca gtaaa 25

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward Primer for HuD

<400> 8
 cttaatatgg cctatggcgt aaag 24

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse Primer for HuD

<400> 9
 gaatcacctt tacgttggtc actg 24

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward Primer for PDGFR-alpha

<400> 10
gcctggacaa tataaaaaga gttatga 27

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Primer for PDGFR-alpha

<400> 11
ctctctcttg atgaaggtgg aact 24

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward Primer for PLP

<400> 12
gtgtacattt acttcaacac ctggac 26

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Primer for PLP

<400> 13
agtttaagga cggcaaagtt gtaagt 26

<210> 14
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward Primer for GAPDH

<400> 14
accacagtcc atgcatcac 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Primer for GAPDH

<400> 15
tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward Primer for beta-Actin

<400> 16
aagagaggca tcctcacct 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Primer for beta-Actin

<400> 17
tacatggctg ggggtgttgaa

20