

인간 배아 줄기세포 유래 신경세포로의 분화: BDNF와 PDGF-bb가 기능성 신경세포 생성에 미치는 영향

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소¹, 마리아 병원²

조현정¹ · 김은영¹ · 이영재¹ · 최경희¹ · 안소연¹ · 박세필¹ · 임진호²

In Vitro Neural Cell Differentiation Derived from Human Embryonic Stem Cells: Effects of PDGF-bb and BDNF on the Generation of Functional Neurons

Hyun Jung Cho¹, Eun Young Kim¹, Young Jae Lee¹, Kyoung Hee Choi¹,
So Yeon Ahn¹, Sepill Park¹, Jin Ho Lim²

*Maria Infertility Medical Institute/Maria Biotech¹, Seoul 130-110,
Maria Hospital², Seoul 130-110*

Objective: This study was to investigate the generation of the functional neuron derived from human embryonic stem (hES, MB03) cells on *in vitro* neural cell differentiation system.

Methods: For neural progenitor cell formation derived from hES cells, we produced embryoid bodies (EB: for 5 days, without mitogen) from hES cells and then neurospheres (for 7~10 days, 20 ng/ml of bFGF added N2 medium) from EB. And then finally for the differentiation into mature neuron, neural progenitor cells were cultured in i) N2 medium only (without bFGF), ii) N2 supplemented with 20 ng/ml platelet derived growth factor-bb (PDGF-bb) or iii) N2 supplemented with 5 ng/ml brain derived neurotrophic factor (BDNF) for 2 weeks. Identification of neural cell differentiation was carried out by immunocytochemistry using β_{III} -tubulin (1:250), MAP-2 (1:100) and GFAP (1:500). Also, generation of functional neuron was identified using anti-glutamate (Sigma, 1:1000), anti-GABA (Sigma, 1:1000), anti-serotonin (Sigma, 1:1000) and anti-tyrosine hydroxylase (Sigma, 1:1000).

Results: *In vitro* neural cell differentiation, neurotrophic factors (PDGF and BDNF) treated cell groups were high expressed MAP-2 and GFAP than non-treated cell group. The highest expression pattern of MAP-2 and β_{III} -tubulin was indicated in BDNF treated group. Also, in the presence of PDGF-bb or BDNF, most of the neural cells derived from hES cells were differentiated into glutamate and GABA neuron *in vitro*. Furthermore, we confirmed that there were a few serotonin and tyrosine hydroxylase positive neuron in the same culture environment.

Conclusion: This results suggested that the generation of functional neuron derived from hES cells was increased by addition of neurotrophic factors such as PDGF-bb or BDNF in b-FGF induced neural

주관책임자: 박세필, 우) 130-110 서울특별시 동대문구 신설동 103-11, 마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소
Tel: (02) 2250-5653, Fax: (02) 2250-5669, e-mail: sppark@mariababy.com

본 연구는 보건복지부 바이오보건기술개발사업 우수 핵심사업연구비 (01-PJ10-PG8-01EC01-0010)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

This study was supported by a grant (01-PJ10-PG8-01EC01-0010) of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea.

cell differentiation system and especially glutamate and GABA neurons were mainly produced in the system.

Key Words: Human embryonic stem cell, Neural progenitor cell, BDNF, PDGF-bb, Functional neuron

배아 줄기세포 (embryonic stem cell)는 수정란이 착상되기 전 포배기 배아 (blastocyst)의 내부 세포괴 세포 (inner cell mass)에 존재하는 것으로 모든 조직을 만들어 내는 기본적인 구성요소로 뼈, 뇌, 근육, 피부 등 모든 신체기관으로 전환할 수 있는 만능 세포 (pluripotent cell)이다. 이 세포의 특징은 체외에서 분화를 인위적으로 억제하는 조건에서 무한하게 증식이 가능하며 정상적인 핵형을 유지하게 되고, 특정 분화 조건을 통해 200개 이상의 장기를 구성하는 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가지게 된다. 1981년 Evans와 Martin 등이 생쥐 배반포기배를 이용하여 배아 줄기세포를 만드는데 최초로 성공한 이후,^{1,2} 1998년 미국 위스콘신 대학의 Thomson 등은 생쥐의 경우와 유사한 방법으로 사람의 배아 줄기세포를 만드는데 성공하였다.³ 2000년에는 Reubinoff 등이 이와 동일한 방법으로 인간 배아 줄기세포를 생산해 냈으므로서 위의 실험 방법을 일반화하였다.⁴ Shuldiner 등은 인간 배아 줄기세포가 다양한 성장 인자에 의해 여러 세포로 분화가 이루어지는 것을 보고하였으며 이를 통해 특정 신호인자에 대한 연구 뿐만 아니라 특정세포로의 분화의 가능성을 제시한 바 있다.⁵

중추신경계는 외부나 내부적인 원인에 의해 세포 손상이 발생되었을 때, 이것을 다시 회복할 수 있는 능력이 매우 제한적인 것으로 알려져 있다. 이러한 내부적 원인에 의한 손상의 대표적인 예는 퇴행성 뇌질환 (Neurodegenerative disorders)으로 중추신경계를 구성하는 세포의 파괴 또는 기능 장애에 의해 초래되는 질병을 의미하며, 파킨슨병 (Parkinson's disease), 치매 (Alzheimer's disease), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 다계통 위축증 (Multiple system atrophy), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 및 척추 손상 (Spinal cord injury) 등이 여기에 속한다. 신경세포의 재생능력의 제한성에 의해 퇴행성 뇌질환의 근본적인 치료법은 아직 개발되지 않은 상태이다. 최근 이러한 제한적 능력을 극복하기 위한 방법으로 세포대체요법 (cell replacement therapy)⁶

미래 의학의 핵심분야로 대두되고 있다. 한 예로 파킨슨병에 걸린 환자에게 태아의 중뇌조직을 손상된 부위에 이식하여 질병이 회복되는 결과를 얻었으나 태아 뇌조직을 사용한다는 윤리적인 면이 문제시되고 있다. 이를 해결해 줄 수 있는 또 다른 세포대체요법으로 배아 줄기세포를 이용하여 각 질병에 맞는 기능성 신경세포를 분화시켜 이용하는 방법이 등장했다. 2001년에는 Thomson 등과 Reubinoff 등이 인간 배아 줄기세포로부터 체외에서 신경성장인자들을 통해 신경세포로 분화하였을 뿐만 아니라, 한편 신경 전구세포를 쥐에 이식함으로서 기능성 신경세포로의 분화를 생산하는데 성공하여 줄기세포의 뇌질환 치료에 이용 가능성을 시사하였다.^{6,7}

본 연구소는 인간의 불임시술 과정에서 사용되고 남은 잉여 배아를 5년 이상 동결 보존한 뒤, 환자의 동의를 받고 사용하여 인간 배아 줄기세포를 만드는 방법을 확립하였으며,⁸ 최근에는 생쥐 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast, STO) 없이 배아 줄기세포를 순수하게 배양할 수 있는 feeder-free 배양 시스템을 통하여 MB (Maria Biotech) 02와 MB03 세포주를 제작하는데 성공하였다. 본 연구소가 보유한 MB01, 02, 03은 현재 미국 NIH에 등록되어 있는 상태이다.

본 연구는 feeder-free 배양환경에서 증식된 배아 줄기세포주인 MB03을 이용하여 체외에서 신경 전구 세포로의 형성을 유도하였으며, 신경세포로의 분화를 돋기 위해 신경성장 촉진인자로 알려져 있는 PDGF-bb와 BDNF를 처리하여 특정한 기능성 세포로의 분화가 가능한지의 여부를 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험에 사용된 MB03은 STO cell (ATCC, CRL 1503) feeder 위에서 배양되어 10회 계대 (약 2달, 40 population doublings)가 이루어진 다음, Matrigel (Collaborative Biomedical Productive)에 코팅된 배양접시

에서 STO cell conditioned medium으로 20회 이상 계대 배양된 세포주이다. MB03 특성 조사에서 alkaline phosphatase 존재 (Sigma)가 확인되었으며 세포 표면 특이인자인 SSEA-4 (stage-specific mouse embryonic antigen-4, DSHB)가 SSEA-3보다 높게 발현되고, SSEA-1은 발현되지 않은 것을 관찰하였다. 그리고 TRA-1-60 (tumor rejection antigen-1-60, gift of Dr. P.W. Andrews)은 TRA-1-81 (gift of Dr. P.W. Andrews) 보다 활성도가 높은 것을 확인하였다. 또한 RT-PCR을 통해 미분화 상태에서만 발현되는 Oct-4 (octamer-binding transcription factor-4)⁸ 유전자와 telomerase activity (Intergen)를 확인하였다. 또한 줄기 세포가 정상적인 핵형임을 G-banding으로 조사하였고 karyotyping (46, XX)을 확인하였다.

2. 인간 배아 줄기세포의 신경세포로의 분화

인간 배아 줄기세포가 최종적으로 신경세포로 분화되는 과정은 각기 다른 배양환경에 의해, 줄기세포 단계, embryoid body 형성 단계, 신경 전구세포 (neural progenitor cell) 단계, 기능성 신경세포 (functional neuron, mature neuron) 단계와 같은 4가지의 형태학적 큰 변화를 겪는다.

1) Embryoid body (EB)의 형성

EB는 분화의 원시 형태인 3 배엽성의 특성을 갖고 있는 세포로 분화 자극에 관여된 물질과 농도에 따라 다양한 세포로의 분화가 가능하다. 배아 줄기세포의 분화 유도는 MB03 세포를 0.1% collagenase로 처리한 다음 2회 이상 세척한 후, bacteriological dish (Falcon, # 1007)에 4~5×10⁶개의 세포를 넣고 10% FBS (Hyclone), 1 mM L-glutamine과 1% non-essential amino acid가 들어 있는 DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12, Gibco) 배양액에서 5일간 부유 배양함으로서 EB 형성을 유도하였다 (Figure 1A).

2) 신경 전구세포 (neural progenitor cell)의 형성

신경 전구세포로의 형성은 EB를 0.1% gelatin으로 코팅된 배양접시 (Falcon, cat #3002)에서 20 ng/ml의 basic-FGF (KOMA)가 첨가된 N2 배양액으로 7~10 일간 배양함으로서 유도하였다. N2 배양액은 DMEM/F12에 N2 supplement, 즉 insulin (Sigma, 5 mg/L),

putrescine (Sigma, 100 μM), sodium selenite (Sigma, 30 nM), apo-transferrin (Sigma, 100 μg/ml), progesterone (Sigma, 20 nM) 등이 첨가된 신경분화용 배양액이다. 신경 전구세포 단계에서는 EB가 자리잡아 자라면, 주변으로는 뻗어 나간 분화 형태를 보이며 중심부는 밀집 형태를 나타낸다 (Figure 1B, C).

3) 기능성 신경세포 (functional neuron)로의 분화

신경세포로 분화하기 위해서는 분화된 EB 콜로니 (신경 전구세포 단계)를 0.1% Trypsin-EDTA로 처리하여 100 μg/ml의 poly-D-lysine (Sigma)으로 코팅된 배양접시 위에서, i) N2 배양액 혹은 ii) N2 배양액에 신경성장 촉진인자로 알려져 있는 20 ng/ml PDGF-bb (platelet derived growth factor-bb; Biosource)나 iii) N2 배양액에 5 ng/ml BDNF (brain derived neurotrophic factor; Chemicon)를 7~14일 동안 첨가 배양하여 기능성 신경세포로 생성시켰다.

3. 면역세포화학적 염색

형태학적으로 보여지는 신경세포가 실제로 신경세포의 특성을 보유하고 있는지의 여부를 조사하고자 신경세포에서 발현되는 것으로 알려진 단백질에 대한 항체를 사용한 세포 특성 규명을 위한 면역세포화학적 염색은 일반적으로 사용되는 방법과 동일하게 수행되었다. 세포 형태의 고정은 4% paraformaldehyde (Sigma)로 10분간 상온에서 처리하였고, 항체의 세포막 투과를 높이기 위해 0.02% Triton X-100 (Sigma)을 10분간 처리하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 5% normal goat serum (Vector)으로 1시간 동안 상온에서 반응시켰고 1차 항체의 처리는 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 1차 항체로는 신경 전구세포의 표지 항체로서 anti-human nestin (rabbit IgG, Chemicon, 1:100)이 사용되었고, 신경세포의 대표적인 표지 항체로서 anti-MAP2 (mouse IgG, Sigma, 1:1000)와 anti-β tubulin isotype III (mouse IgG, Sigma, 1:250)가 사용되었다. 신경세포에서 미성숙 단계에서 발현하는 물질에 대한 항체로서 anti-NF160 (mouse IgG, Sigma, 1:40)과 mature 상태에서 발현되는 물질에 대한 항체로서 anti-NF200 (mouse IgG, Sigma, 1:40)를 사용하였다. 신경 보조세포로 알려져 있는 성상교세포 (astrocyte)에 대한 표지 항체로서

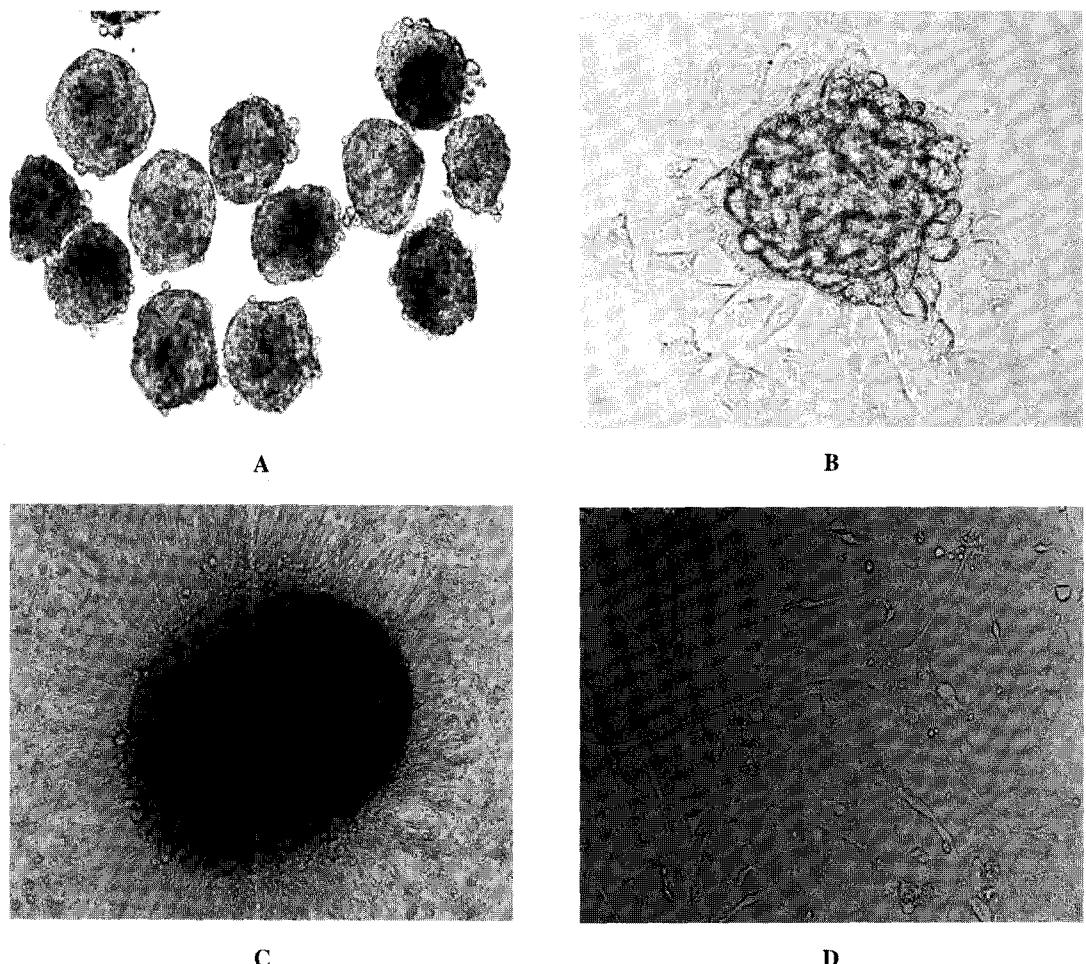


Figure 1. Neural cell differentiation from embryoid body (EB) derived human embryonic stem MB03. (A) Floating human EBs. $\times 150$. (B) Attached EB on 0.1% gelatin. $\times 300$. (C) Neural progenitor cell formation from EB induced by bFGF. $\times 40$. (D) Neural cell differentiation from neural progenitor cells. $\times 100$.

anti-GFAP (rabbit IgG, DAKO, 1:200)^{a)} 쓰였다. 한편 기능성 신경세포에 대한 표지 항체로서 anti-glutamate (mouse IgG, Sigma, 1:1000), anti-tyrosine hydroxylase (mouse IgG, Sigma, 1:100), anti-serotonin (rabbit IgG, Sigma, 1:1000), anti-GABA (rabbit IgG, Sigma, 1:1000) 등이 사용되었다. 형광 2차 항체로는 TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate) conjugated goat anti-mouse or rabbit IgG (Jackson Immunoresearch, 1:200)와 FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated goat anti-mouse or rabbit IgG (Jackson Immunoresearch, 1:100)^{a)} 1시간 동안 상온에서 처리하였다. 마지막으로 각각의 sample들을 mounting (Biomedica) 한

후, 그 결과는 FITC의 경우 520 nm, TRITC의 경우 630 nm 발광필터를 장착한 형광 현미경으로 분석하였다. 또한 sample의 장기 보관을 위한 방법으로 ABC (Avidin-biotin peroxidase complex, DAB staining, Vector) 염색 키트를 이용하여 일반적인 경향을 살펴보았다. ABC 염색 방법은 앞서 말한 1차 항체 처리 외에, 2차 항체로 biotin labelled goat anti-mouse or rabbit IgG를 1시간 동안 반응시켰다. 다음 avidin과 효소로 streptavidin peroxidase가 혼합된 용액을 30분간 처리하여 다시 2차 항체에 결합시켰다. 마지막으로 H₂O₂가 들어간 기질로서 DAB (3,3'-diaminobenzidine)을 사용하여 5~10분간 반응시킨 후 효소가

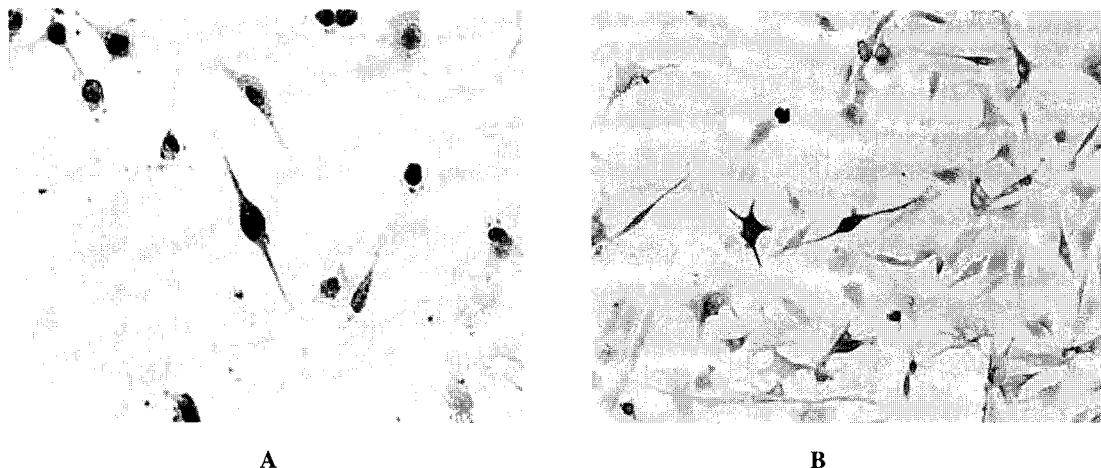


Figure 2. Nestin/β-tubulin stained neural progenitor cells with DAB staining. (A) A number of neural progenitor cells were stained with anti-nestin. ×200. (B) A few neural cells stained with β-tubulin were presented in neural progenitor cell stage. ×100.

발색되는 것을 중지시켜 일반 광학 현미경하에서 관찰하였다.

결 과

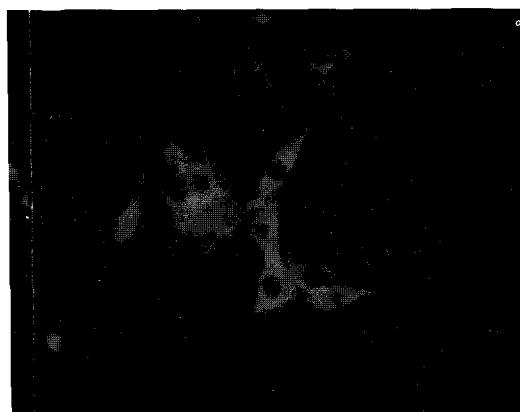
1. 인간 배아 줄기세포로부터 신경 전구세포 생성

인간 배아 줄기세포 (hES, MB03)로부터 EB가 생성된 후, 0.1% gelatin 위에서 bFGF를 7~10일 동안 첨가하여 배양하였다. 신경관련물질이 발현되는 것의 확인은 면역세포화학적 염색 방법 중에 ABC 염색을 통해 확인하였다. 음성 대조군 (negative control)은 일차적으로는 2차 항체만 처리한 군에서 비 특이적인 결합이 없음을 확인하였고, 또한 신경조직과 관련 없는 소의 귀 세포에 신경관련 표지인 nestin을 반응시킨 뒤 2차 항체로 처리하여 거의 검출되지 않는 것을 확인하였다. 염색 확인 결과 EB가 생성되기 전에는 신경세포 표지인자들이 검출되지 않았다. 그러나 EB에 10 ng/ml bFGF를 처리하여 신경 전구세포로 분화 유도하였을 때, 세포 골격 중 중간 미세 섬유 (intermediate filament)의 일부인 nestin 즉, 표지인자가 50% 이상 강하게 다량으로 검출되는 것을 확인하였다 (Figure 2A). 또한, 동일 시점인 신경 전구세포 분화 단계에서는 신경세포로의 분화 표지인자인 β-tubulin isotype III가 소량 발현되는 것을 확인하였다 (Figure 2B).

2. 신경 전구세포에서 신경세포로의 분화

이러한 신경 전구세포는 10~14일 장기간 동안 분화시켰을 때, 신경세포 관련 표지 물질이 다량으로 생성되어 신경세포로의 분화가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 형광 2차 항체를 이용한 면역세포화학적 염색을 실시한 결과 신경 전구세포의 표지 물질인 nestin은 10% 미만으로 감소하는 반면 (Figure 3A), 신경세포의 골격의 일부 물질인 MAP2 (microtubule associated protein 2)와 β-tubulin isotype III가 거의 비슷한 경향으로 60% 이상 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3E, F). 또한 신경세포로의 분화에서 발달 단계에 따라 다르게 발현되는 물질이 있는데, 그 중 성숙 단계에서 다량 발현되어 나타나는 세포 골격의 중간 미세 섬유중 일부인 Neurofilament (NF) 200 물질이 미성숙된 신경세포 성장 단계에 존재하는 NF160보다 다량 존재하였음을 확인하였다 (Figure 3C, D). 신경 보조세포의 발현 정도를 확인하기 위해 성상교세포 (astrocyte)에만 특이적으로 발현하는 중간 미세 섬유인 GFAP (glial fibrillary acidic protein)도 10% 이상 발현되는 경향을 알 수 있었다 (Figure 3B).

또한, 신경성장 촉진인자인 BDNF와 PDGF-bb의 첨가가 신경세포와 신경 보조세포 형성에 미치는 영향을 동시에 비교하기 위해 double staining 방법을



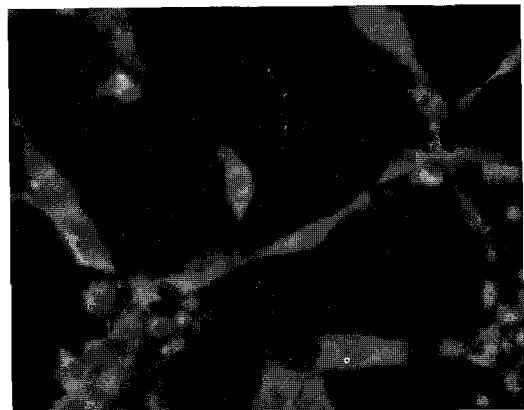
A



B



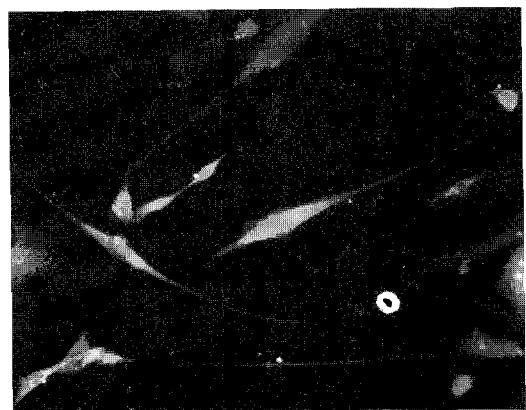
C



D



E



F

Figure 3. *In vitro* differentiated neural cells after 2 weeks from neural progenitor cells derived human embryonic stem cells. (A) Neural progenitors with anti-nestin. $\times 200$. (B) Astrocyte with anti-GFAP. $\times 400$. (C) Immature neural cell with anti-NF160. $\times 200$. (D) Mature neural cell with anti-NF200. $\times 200$. (E) Neural cell with anti-MAP2. $\times 200$. (F) Neural cell with anti- β tubulin. $\times 200$.

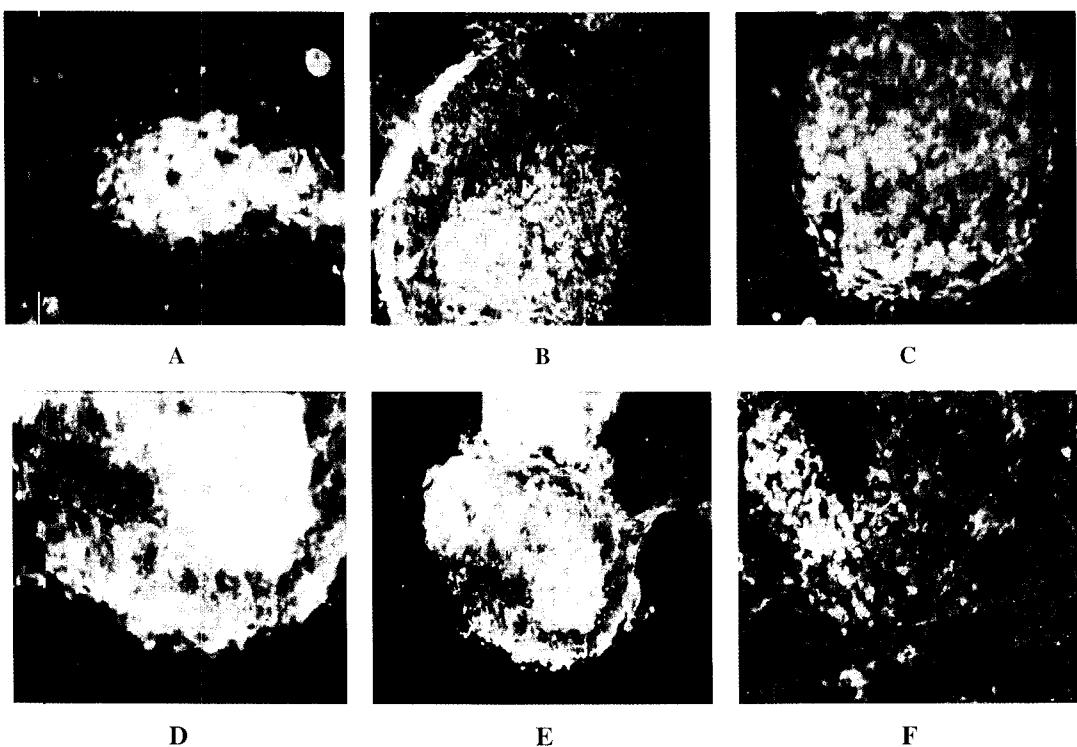


Figure 4. Double staining of MAP2 (green, monoclonal antibody) and GFAP (red, polyclonal antibody) examined in mature neuron stage according to the treatment groups. MAP2 and GFAP staining represented as indicators the neuron and glial cells, respectively. Green color is the more, neuron formation is the more. Each group was treated with no addition of growth factor (**A** and **D**), PDGF-bb (**B** and **E**) and BDNF (**C** and **F**) in the neural cell differentiation stage for 14 days. (**A**, **E** and **F**) $\times 100$. (**B**, **C** and **D**) $\times 300$.

사용하였다. 그 결과 BDNF와 PDGF-bb 처리군 모두 다 신경세포로의 분화가 성장인자를 처리하지 않은 대조군에 비해 훨씬 더 증가하고 있음을 알 수 있었다. 또한 위에 언급한 두 신경성장 촉진인자 사이에 신경세포로의 분화 경향을 살펴보면, BDNF 처리군이 PDGF-bb 처리군 보다 좀 더 신경세포 표지 물질인 MAP2의 발현 정도가 높았다. 한편 성상교 세포의 표지 물질인 GFAP는 오히려 BDNF 처리군 보다 PDGF-bb 처리군에서 약간 증가하고 있으며, PDGF-bb보다 성장인자를 처리하지 않은 대조군에서 강하게 발현하고 있음을 확인하였다 (Figure 4).

3. 배아 줄기세포의 최종적인 기능성 신경세포로 분화

본 실험에 사용된 신경분화 시스템에서 최종적으로 획득된 신경세포는 본 실험의 목적인 퇴행성 뇌

질환의 세포차원의 치료에 좀 더 접근해 보고자 면역 세포화학적 염색 방법을 이용해 기능적으로 어떠한 세포로 분화를 이루고 있는지 살펴보고자 하였다. 그 결과 BDNF나 PDGF-bb를 처리하지 않은 대조군에서는 glutamate와 GABA 신경세포로의 분화가 미비한 반면, BDNF를 처리한 세포는 약 20% 이상 glutamate와 GABA 신경세포가 각각 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 BDNF를 처리하여 분화시킨 세포가 PDGF-bb를 처리하여 분화시킨 세포에 비해 choline계열에 속하는 glutamate와 GABA (γ -amino butric acid) 신경전달물질에 대한 양성 세포의 발현이 5% 이상 높게 나타났다 (Figure 5). 또한, serotonin 신경전달물질에 대한 양성 세포와 catecholamines계열의 도파민 생성과 중요하게 관련되는 효소인 TH (tyrosine hydroxylase) 양성 신경세포로의 분화가 일부 이루어진 것을 확인할 수 있었으나 대조

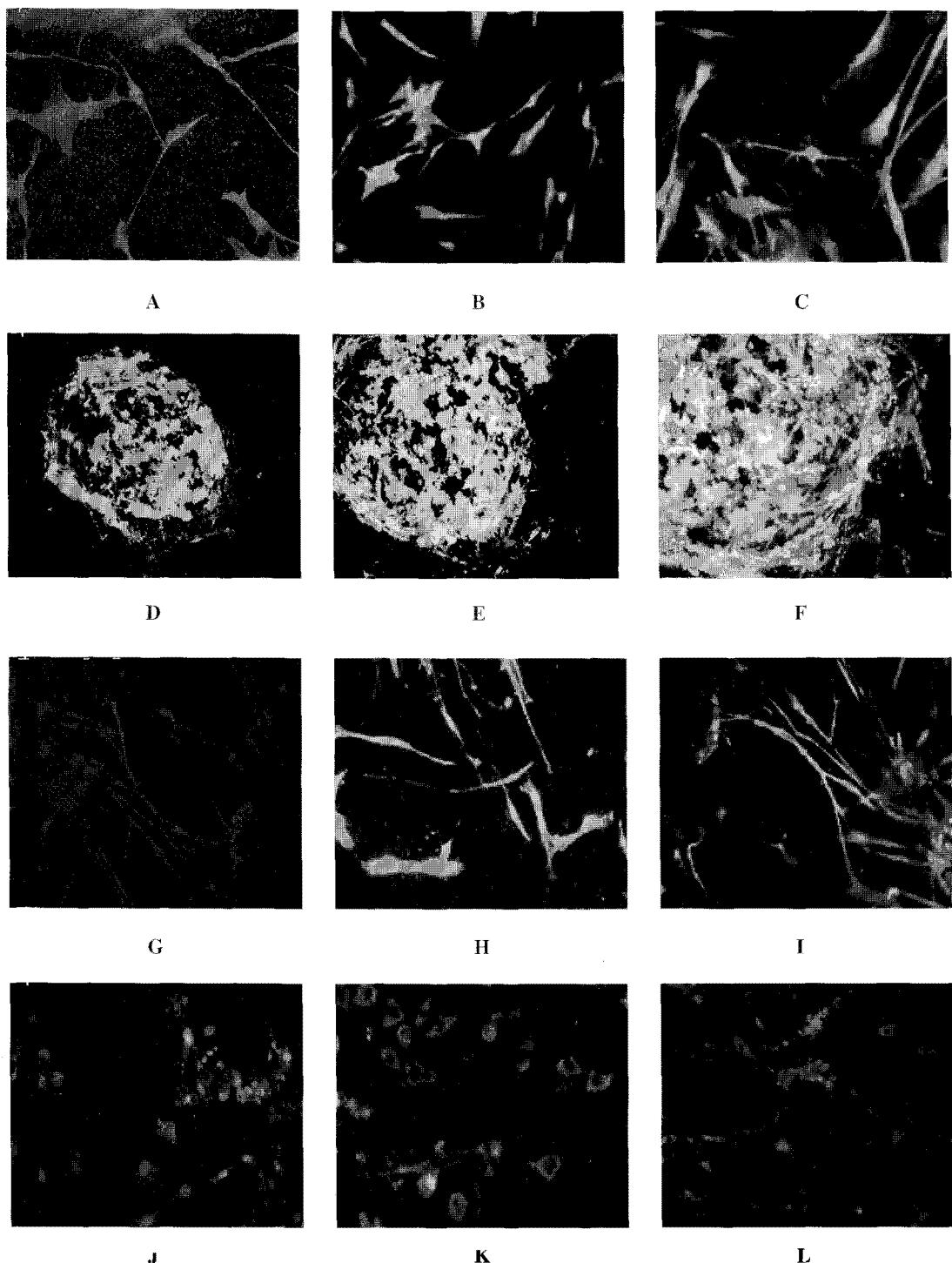


Figure 5. Generation of functional neurons from neural progenitor cells treated with BDNF or PDGF; no addition of growth factor (control; **A, D, G** and **J**), PDGF treated group (**B, E, H** and **K**) and BDNF treated group (**C, F, I** and **L**). Indirect immunostaining of GABA (**A-C**), Glutamate (**D-F**), Serotonin (**G-I**) and dopamine (**J-L**) secreting neural cells. (**A-L**, $\times 200$).

Table 1. Effect of neurotrophic factors on the generation of functional neuron

	GABA	Glutamate	Serotonin	TH
BDNF	+++*	+++	++	+
PDGF	++	++	++	+
W/O	+	+	+	+

*(+): Tendency of generation to specific neural cell derived from human embryonic stem cells

군과 비교하였을 때, PDGF-bb와 BDNF를 처리한 군에서 별다른 차이점은 나타나지 않았다 (Figure 5 와 Table 1).

고 칠

본 연구는 인간 배아 줄기세포를 이용하여 체외에서 신경세포로의 분화가 가능함을 나타내며, 특히 기능성 신경세포로의 분화에 PDGF-bb나 BDNF와 같은 신경성장 촉진인자가 유효하게 작용됨을 나타낸다. 우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로 치매나 파킨슨병, 간질 등을 포함하는 퇴행성 뇌질환을 앓고 있는 환자들은 10% 미만이나 고령화되고 있는 선진 국가의 경우, 노인 인구의 증가에 따른 심각성이 대두되고 있으며, 그에 따른 치료제 개발뿐만 아니라 치료 방법 및 원인을 밝혀내기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 따라서 배아 줄기세포를 이용하여 특정 뇌질환을 치료하는데 중요한 역할을 담당할 것으로 예상되는 기능성 신경세포로의 분화가 재현성 있게 이루어질 수 있다면 퇴행성 뇌질환 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

본 실험은 최근에 발표한 Zhang 등의 실험 과정과 유사하게 진행되었다.⁷ 일반적으로 사용되는 신경성장 촉진인자로서 GDNF, bFGF, Retinoic acid (RA), BDNF, PDGF, NT3, EGF, NGF 등이 신경 조직이나 세포의 발생 과정에서 생존 및 분화, 재생 등에 관련되는 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 인자들이 신경세포의 성장 및 분화에 있어 적절하고도 효과적으로 작용하는 단계는 각기 다른 것으로 보여지며, 그러한 결과는 종 특이성에서도 나타난다.^{7,8,13} GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)는 1993년 흰쥐 신경교세포의 종

세포주인 B49의 조건 배양액에서 처음 분리되었으며, 흰쥐의 중뇌 흑질의 도파민성 신경세포의 배양 중에서의 생존을 증진시킨다는 보고를 하였다.⁹ 그 밖에 GDNF가 또 다른 교감신경절신경세포,¹⁰ 후뇌의 노르아드레날린성 신경세포의 생존과 재생을 촉진시킨다고 보고되었다.¹¹ 1995년에는 생쥐 배아 줄기세포에 RA를 첨가하는 4+4 protocol을 정립하여 신경세포로의 분화를 유도하였으며,¹³ 이를 적용 GABA 신경세포와 도파민성 신경세포를 생성하는데 성공하였다.¹⁴ 이에 RA가 첨가된 생쥐 배아 줄기세포를 손상된 쥐의 척수에 이식하여 이식된 줄기세포의 분화 양상뿐만 아니라 행동학적으로 회복됨을 확인하였다.¹⁵

특히 인간의 배아 줄기세포로부터 신경세포 분화에 주된 유도인자로 사용된^{7,8} bFGF는 처음에는 중추신경계에서 발견되었으나, 이후의 연구 결과에 따르면 일반적인 세포 종식과 많은 연관성이 있는 것으로 알려지게 되었다. 배아 줄기세포를 유지하는 동안에는 적은 양 (4 ng/ml)으로서 세포 종식에 관여하지만,⁷ 다량으로 첨가되었을 때에는 (20 ng/ml) 신경 전구세포 형성에 관여하는 것으로 확인되었다.^{7,12} 혈소판에서 처음 발견된 PDGF는 상처 부위를 치유하는 물질로 알려졌으나 1995년 이후 연구 결과에 따르면, PDGF-aa는 중추신경계 내의 줄기세포에 존재하여 신경 전구세포의 분열을 유도하거나 신경 보조세포로의 분화를 유도하고, PDGF-bb는 신경세포로의 분화와 생존시키는 중요한 인자로 밝혔다.¹⁷⁻²⁰ 장기 기억에 관여하는 BDNF는 신경세포의 생존뿐만 아니라 다양한 신경세포로의 분화를 유도하는데, 분비되면 TrkB 수용체에 결합하여 신경말단의 시냅스 (synapses)의 발달에 관여한다는 결과 이후 최근 배아 줄기세포의 신경의 분화 유도 실험에 사용되고 있다.^{7,16} 이중에 bFGF는 처음 중추신경계에서 발견되어, 신경 전구세포의 생존 및 분열에 관여하는 것을 밝혀진 근거 하에 MB03 배아 줄기세포의 EB 상태에서 신경 전구세포 생산에 사용되었다.⁷ 또한 신경세포의 분화와 생존에 직접적으로 관련이 있는 PDGF-bb와 BDNF를 가지고 전구세포 단계에서 기능성 신경세포의 생산 및 특성을 밝혀내는데 사용하게 되었다.

그 결과 본 실험에서 PDGF-bb나 BDNF는 기능성

신경세포 형성에 있어서 Choline계 아미노산 그룹인 glutamate와 GABA 신경세포로의 분화를 유도하였고, 이는 Zhang 등 및 Reubinoff 등의 실험 결과와 유사하다.^{7,8} 본 실험 결과는 뇌의 선조체 (corpus striatum)에 존재하는 GABA와 glutamate 신경세포들이 주로 사멸하여 운동 장애를 유발하는 헌팅턴 질환의 치료하는데 도움이 될 것으로 예상된다. 현재 위의 실험 결과를 토대로 헌팅턴 질환동물 모델에 인간 배아 줄기세포 유래의 신경 전구세포를 이식하여 *in vivo* 상태에서의 조직상의 변화뿐만 아니라 운동 효과를 행동학적으로 연구하는 중이다. 그러나 bFGF 가 배아 줄기세포로부터 신경 전구세포로의 분화를 유도하는 중요한 역할을 하지만 또 다른 체세포로의 분화가 일어나고 있음을 배제할 수는 없다. 그러므로 배아 줄기세포로부터 특정 질환 치료에 알맞는 순도 높은 기능성 세포로의 분화 시스템 개발이 계속적으로 이루어져야 할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 97: 7634-8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell line from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. Nat Biotech 2000; 18: 399-404.
- Shuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 11307-12.
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhardt E, Itzik A, Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. Nat Biotech 2001; 19: 1134-40.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotech 2001; 19: 1129-33.
- Kim EY, Nam HK, Lee KS, Park SY, Park EM, Yoon JY, Heo YT, Cho HJ, Park S, Choung KS, Lim JH. Establishment of human embryonic stem cells Derived from frozen-thawed blastocysts. Korea Journal of fertility and sterility, 2001; 24: 33-40.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 1994; 5187: 970-2.
- Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. Neuron 1995; 15: 821-8.
- Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. Nature 1995; 373: 289-90.
- Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. Neuron 1997; 18: 81-93.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. Dev Biol 1995; 168: 342-57.
- Dinsmore J, Ratliff J, Jacoby D, Wunderlich M, Lindberg C. Embryonic stem cells as a model for studying regulation of cellular differentiation. Theirogenology 1998; 49: 145-51.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med 1999; 5: 1410-2.

16. Lohof AM, Ip NY, Poo MM. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 1993; 363: 350-3.
 17. Erlandsson A, Enarsson M, Forsberg-Nilsson K. Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor. *J Neurosci* 2001; 1: 3483-91.
 18. John KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 1996; 10: 3129-40.
 19. Williams B, Park J, Alberta J, Muhlebach S, Hwang G, Roberts T, Stiles C. A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells. *Neuron* 1997; 18: 553-62.
 20. Hutchins J, Jefferson V. Developmental distribution of platelet-derived growth factor in the mouse central nervous system. *Dev Brain Res* 1992; 67: 121-35.
-