한국생물공학회지 제20권 제5호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 20, No. 5, 363-370(2005)

사람 신경 간세포에서 도파민 신경세포 분화유도에 대한 *Nurr* 1 유전자의 역할 규명

[1]김 한 집 · [1]이 학 섭 · [1]김 현 창 · [1]민 철 기 · [2]이 명 애 · [2]김 승 업 · [3]한 진 · [3]염 재 범
[3]김 나 리 · [3]박 원 선 · [3]김 태 호 · [3]김 의 용 · [4]한 일 용 · [5]최 인 순 · † [3]주 현
[1]아주대학교 자연과학대학 생명과학전공, [2]아주대학교 의과대학 뇌질환 연구소,
[3]인제대학교 의과대학 미토콘드리아 생체신호 연구실, 생리학 교실, [4]인제대학교 의과대학 부산백병원 흉부외과학교실,
[5]신라대학교 생물학과, 해양생물산업 RIS사업단
(접수 : 2005. 8. 26., 게재승인 : 2005. 10. 22.)

Induction of Midbrain Dopaminergic Phenotype in *Nurr* 1-Overexpressing Human Neural Stem Cells

Han Jip Kim[1], Haksup Lee[1], Hyon Chang Kim[1], Churl Ki Min[1], Myung Ae Lee[2], Seung Up Kim[2], Jin Han[3], Jae Boum Youm[3], Nari Kim[3], Won Sun Park[3], Taeho Kim[3], Euiyong Kim[3], Il Yong Han[4], In Soon Choi[5], and Hyun Joo[3]†
[1]Department of Biology, College of Natural Science, [2]Brain Disease Research Center, College of Medicine, Ajou University, Suwon 443-749, Korea
[3]Mitochondrial Signaling Laboratory, Department of Molecular Physiology & Biophysics, [4]Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Inje University, Busan 614-735, Korea
[5]Department of Biology, Marine-Bio Industry RIS, Silla University, Busan 617-736, Korea
(Received : 2005. 8. 26., Accepted : 2005. 10. 22.)

Neural stem cells (NSCs) of the central nervous system (CNS) have raised a great interest not only for their importance in basic neural development but also for their therapeutic potentials in neurologically degenerative diseases such as Parkinson's, Alzheimer and stroke. During the CNS development, two molecular cascades determine specification of midbrain dopamine system. In one pathway, FGF-8, sonic hedgehog and transcription factor *Nurr*1 specify dopamine neurotransmitter phenotype. In the other, transcription factors Lmx1b and Ptx3 are required for induction of dopaminergic neurons. In *Nurr*1 knockout mouse, tyrosine hydroxylase (TH) positive cells fail to appear in substantia nigra, indicating that *Nurr*1 is essential in specification of dopaminergic cell phenotype. In this study, we used the immortalized human NSCs retrovirally transduced with *Nurr*1 gene to probe the *Nurr*1-mediated mechanism to induce dopamine phenotype. While *Nurr*1 over-expression alone did not generate dopamine phenotype in NSCs, applications of retinoid and forskolin induced expression of TH and AADC mRNAs. In addition, co-cultures of *Nurr*1 expressing NSCs with human astrocytes induced a marked increase of TH expression. In this co-culture system, the addition of retinoid and forskolin dramatically increased expression of TH. These results indicate that the immortalized human NSCs with *Nurr*1 gene could have a clinical utility for cell replacement for the Parkinson patients.

Key Words : *Nurr*1, dopamine, Parkinson's disease, tyrosine hydroxylase, CNS, brain disease, neural stem cell

서 론

파킨슨병(Parkinson's disease)은 노년층에 다발하는 중추신경계 퇴행성 뇌 질환으로 전체인구 1,000명 중 1명, 60세 이상의 연령층에서는 100명 중 1명에 해당하는 발생률을 가지고 있다. 파킨슨병 환자의 뇌는 중뇌 흑색질(substantia nigra)의 도파민 신경세포의 변성과 사멸에 의해 그 목표부위인 선조체 (striatum)에서의 도파민 (dopamine) 함량이 현저하게 저하되어있다(1). 파킨슨병의 치료를 위해 현재까지 알려진 치료법 중의 하나로 L-DOPA를 환자에게

† Corresponding Author : Department of Physiology and Biophysics, Inje University, Busan 614-735, Korea
Tel : +82-51-890-6714, FAX : +82-51-894-5714
E-mail : phyjoo@inje.ac.kr

투여하는 방법이 있으나 수의운동장애 (dyskinesia) 등의 중대한 부작용을 초래하여 파킨슨병의 근본적인 치료법이 될 수 없다. 신경독성물질인 6-히드록시도파민 (6-OHDA, 6-Hydroxydopamine)이나 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 (MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)을 투여하여 얻은 파킨슨병 동물 모델의 뇌에 태아의 중뇌조직을 이식하였을 때 운동실조 증세가 호전되었으며, 흰쥐 태아의 뇌 조직이 이식 후 숙주의 뇌에서 도파민 신경세포로 분화하여 도파민 신경전달 물질을 활발하게 생산하고 있음이 실증되었다(2, 3).

최근 태아의 뇌조직을 대체하기 위한 수단으로, 세포증식이 가능하며 공급에 제한이 없고, 도파민 신경세포로 분화하는 능력을 지닌 신경간세포 (neural stem cell)를 사용하고자 하는 노력이 활발하다(4). 신경간세포는 미분화된 전구세포로서 신경세포 (neuron) 혹은 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte)를 포함하는 신경교세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는 세포이며, 발생중인 태아의 뇌조직에 많이 존재하나 최근에는 성숙 개체의 뇌에서도 발견된다고 알려져 있다(5). 따라서, 인간 태아의 뇌조직을 대체할 수 있는 또 다른 방법은 유전공학 기법을 사용하여 인위적으로 도파민 신경전달물질을 생산하는 세포를 만든 후, 이를 파킨슨병 환자의 뇌에 이식하는 것이라 하겠다.

도파민 신경세포는 카테콜아민 (catecholamine) 생합성에 관여하는 효소반응적 측면에서 보면 타이로신수산화효소 (tyrosine hydroxylase, TH), 방향성 L-아미노산 탈카르복시화효소만이 활성을 나타내어야만 한다. TH는 카테콜아민 (catecholamine) 신경전달 물질의 생합성 과정에서 필요한 첫 번째 효소이자 율속단계의 효소이기 때문에 TH의 발현은 여러 가지 조절 기작에 의해서 중요하게 발현되고 있어, 도파민 신경세포의 표현형 마커로 이용된다. 뇌에서 TH의 발현은 여러 종류의 세포에서 발견이 된다(6). 흑색질, 배쪽 피개부 (ventral tegmental area, VTA), 시상하부 (hypothalamus), 후구 (olfactory bulb)의 도파민 신경세포, 노르아드레날린성 신경세포 (noradrenergic neuron), 아드레날린성 신경세포 (adrenergic neuron)등에서 발현된다. 이렇게 발현분포가 넓은 것을 볼 때, 서로 다른 세포집단에서 TH 유전자의 발현은 다른 전사조절 기작에 의해 조절된다고 할 수 있다. TH 프로모터에는 편재하는 전사조절인자에 대한 결합부위가 존재한다고 보고되었다. 활성화 단백질-1 (Activating protein-1, AP1), SP1, 활성화 단백질 (activating protein-2, AP2), 환상-AMP 응답효소 (cyclic AMP-response elements, CRE), Oct/HEPT, E박스/다이어드 (E box/dyad) 부위들이 존재한다. 그러나, 이 부위들의 전사활성에 대한 기여는 세포에 따라 다르게 나타나고, 발생단계별로 다르게 사용될 수 있다. 면역조직화학에 의한 연구로 CRE 연관 인자가 중뇌 도파민성 세포에서 중요 조절자임을 제시되었다(7). 또한, TH의 전사조절에서의 향상된 활성은 전사조절인자인 Ptx3와 *Nurr*1이 조합이 되었을 때 발견되었다(8).

본 연구에서 수행하고자 하는 *Nurr*1은 발생중인 도파민 신경세포에서 발현되며 중추신경계에서 넓은 발현분포를 보이는 전사조절인자이며 리간드가 아직 밝혀져 있지 않은 핵 수용체이다. RNR-1, HZF-3, NOT이라고 불리우기도 하는 *Nurr*1은 NGFI-B와 매우 유사하다. 이 수용체들은 단량체로 DNA서열에 결합 할 수도 있고, 레티노이드 X (retinoid X) 수용체와 이합체를 이룬 후 DNA와 결합해서 전사를 활성화시킬 수도 있다. DNA결합부위에서는 90 %이상의 아미노산이 보존되어있다(9). *Nurr*1은 도파민 신경세포의 표현형발현 표지 (phenotypic marker)인 타이로신수산화효소가 발현되기 이전에 발생하는 도파민 신경세포에서 발현된다. *Nurr*1이 결핍된 생쥐에서는 타이로신 수산화효소 면역반응을 보이는 세포들을 발견할 수 없으며, 출생 후에 바로 죽는다. 따라서, *Nurr*1이 중뇌 도파민 신경세포의 분화에 중요하며, 가상의 *Nurr*1 리간드가 파킨슨병과 다른 중뇌 도파민회로의 파괴와 관련된 질병의 치료에 사용 될 수도 있는 가능성이 보고되어 있다(6, 8).

최근의 보고에 따르면, Sonic hedgehog (SHH)이 발현되는 장소와 FGF-8이 발현되는 장소가 교차하는 곳에서 중뇌 도파민 신경세포가 발견되었다는 보고가 있다(10, 11). 또한, 해마 (hippocampus)에서 유래한 쥐의 선조세포가 *in vitro*에서 레티노산 (retinoic acid, RA)와 폴스콜린 (forskolin, FK)에 의해 타이로신수산화효소 발현이 유도된다. 다분화 능력을 가지는 신경간세포를 중뇌 도파민 신경세포로 분화 유도하기 위해서는 전사조절인자 *Nurr*1과 별아교세포로부터의 인자가 필요하다는 보고도 있다(12). 이러한 사실들을 바탕으로, 본 연구에서는 *Nurr*1이 과발현되는 인간 신경간세포를 만든 후, 이를 도파민 신경세포로 분화유도하기 위하여 레티노산과 폴스콜린처리, 별아교세포 공동배양, SHH과 FGF-8에 의한 효과들을 조사하여 이에 대한 모델을 구성하였다.

재료 및 방법

재 료

제한효소와 그 밖의 반응 효소들은 모두 New England Biolab (Beverly, MA, USA) 제품을 이용하였고, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), 젠타마이신은 GIbco BRL (Grand Island, NY, USA)제품을 이용하였다. QIAEX II 젤 추출키트와 QIAGEN 플라스미드 미디키트는 QIAGEN (Valencia, CA, USA)사 제품이다. LIPOFECTAMINE™ Reagent는 GIbco BRL에서, 퓨로마이신은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), 0.22 마이크로미터 공극을 지니는 주사기 필터는 Millipore (Billerica, MA, USA)사에서 구입하였다. 레티노산과 폴스콜린은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 세포배양에 3차원적 환경을 제공하기 위하여 삽입된 Millicell-CM 세포배양판 입체삽입기는 Millipore사에서 구입하였다. RNAzol™ B는 Tel-Test (Friendswood, TX, USA)사에서 구입하였고, 역전사 효소와 DNA 증폭효소는 Gibco BRL에서 구입하였다. 타이로신수산화효소 (TH) 항체는 Pel-Freez Biologicals (Rogers, AR, USA)에서, VectaStain Elite ABC 키트는 Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)사에서 구매하였다. 그 밖의 언급되지 않는 시약류는 Sigma-Aldrich사에서 특급시약으로 구매하여 사용하였다.

재조합 레트로 바이러스 벡터 제작

레트로 바이러스 벡터 pBabe-puro는 제한효소 *SnaB* I 으로

절단하고, 인간 전장 *Nurr*1 cDNA (hc*Nurr*1)를 포함하는 pBluescript II SK(+)는 *Xba* I 과 *Xho* I 으로 자른 후 Klenow fragment로 둔단 말단 (blunt end)을 만들어 전기영동 후 QIAEX II 젤 추출키트 (Qiagen)로 용출시켜 순수 분리하였다. 최종 *Nurr*1의 세포내 감염을 위한 재조합 벡터 pBabe-puro/hc*Nurr*1은 pBabe-puro/*SnaB* I 단편과 hc*Nurr*1/*Xba* I, *Xho* I /Klenow 단편을 접합하여 제작하였다. 이 재조합 플라스미드를 lipofectamine™ reagent (GibcoBRL)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 바이러스벡터 포장세포주 PA317에 핵산전달감염 (transfection)시켰다. 세포주에 감염 (transfection) 후 20시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양 후 신선한 배지로 교체하고 이틀 후에 5 ㎍/ml의 퓨로마이신 (puromycin)이 함유된 선택배지에 10일동안 2번의 교체를 통해서 양성 세포주만을 선별하였다.

*Nurr*1 유전자 과발현 C4-*Nurr*1, A3-*Nurr*1 세포주 선별작업

앞서 선별된 PA317/pBabe-puro/hc*Nurr*1 세포주를 먼저 100 mm 배양접시에 40% 농도로 접종하고, 감염 하루 전 표적 세포주인 사람 신경간세포 C4와 A3를 30% 농도로 100 mm 배양접시에 접종하였다. 이들 세포로의 2차 감염을 위하여 먼저 C4와 A3 세포의 배지를 제거하고 DEAE-덱스트란 (DEAE-dextran)이 25 ㎍/ml의 농도로 함유된 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 한 시간 동안 배양하였다. PA317/pBabe-puro/hc*Nurr*1 세포주의 배지를 0.22 ㎛ 필터로 여과후 배지가 제거된 C4와 A3세포주와 혼합 첨가하였다. 감염 24시간 후에 신선한 배지로 다시 교체하고 48시간 경과 후 퓨로마이신이 5 ㎍/ml 농도로 함유된 배지에 10일 간격으로 2번의 교체작업을 통하여 C4-*Nurr*1, A3-*Nurr*1 세포주를 선별하였다.

인간 신경간세포의 분화유도

C4-*Nurr*1과 A3-*Nurr*1 인간 신경간세포를 0.25 × 10^5 cells/ml의 농도로 심은 후, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 세포가 바닥에 붙을 때까지 10% FBS가 포함된 DMEM에서 배양하였고, PBS로 두번 씻어주고 FBS 대신 insulin 1.2%, heparin 1%, bFGF 50 ㎍/㎖의 농도와 UBC1이 1% 포함된 DMEM (UBC1/DMEM) 배지로 교환하여 24 시간동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 세포를 증식시켰다. 24시간 후 UBC1/DMEM 배지에서 헤파린 (heparin)과 bFGF를 넣지 않고 레티노산과 폴스콜린를 각각 1 ㎛M과 5 ㎛M 농도가 되도록 첨가하였다. RA는 6일 동안 이틀마다 배지를 교환하였고, 이후 8일 동안 레티노산을 넣지 않고 2일에 한번씩 배지를 교환하였다. 폴스콜린은 14일 동안 2일에 한번씩 배지에 첨가하였다.

A3-*Nurr*1과 C4-*Nurr*1은 6 - well 마이크로플레이트에 0.25 × 10^5 cells/ml의 농도로 심었고, 1차 세포 배양한 별아교세포 (rat astrocyte)는 culture plate insert (Millipore) 에 두배의 농도로 접종 후, 7일 동안 공동배양 하였다. 레티노산과 폴스콜린은 위와 같은 농도로 첨가하였고, 레티노산은 6일 동안, 폴스콜린은 7일 동안 공동배양과 같은 시점에서 첨가하였다.

인간 SHH 아미노 말단 (amino terminal hShh-N)을 과발현하는 세포주를 확보하기 위하여, pcDNA3.1/myc-HisC/hShh-N construct를 제한효소 *Not* I 과 *BamH* I 처리 후 Klenow fragment로 점착성 말단을 만들고, 레트로 바이러스 벡터 pLPCX는 *Hpa* I 으로 자르고 hShh-N DNA 단편과 접합하였다. 이후의 실험방법은 *Nurr*1 과발현 인간 신경간세포를 만드는 방법과 같은 방법으로 C4 - hShh-N 세포주를 확보하였다. hShh-N을 FGF-8과 조합하여 C4-*Nurr*1 세포주에 다음과 같이 처리하였다. C4-hShh-N 세포주의 배지를 모아서 원심분리후 상층액만 조심스럽게 모아 새 배지와 7 : 3의 비율로 섞은 후 C4-*Nurr*1 세포의 배지를 제거하고 앞서 얻어진 혼합액을 이용하여 8일 동안 분화 유도하였다. FGF-8은 50 ㎍/㎖, 헤파린 (heparin)은 1%의 농도로 같이 처리하였다.

역전사 PCR 중합 반응

분화를 유도시킨 A3-*Nurr*1, C4-*Nurr*1 세포들을 RNAzol™ B (Tel-Test)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 분광기로 정량화한 후 2 ㎍의 전체 RNA, 1 ㎕의 Oligo-dT (500 ㎍/ml)를 넣고 DEPC 처리된 물로 11 ㎕로 맞춘 후 70℃에서 10분간 방치하였다. 10분 후 5 × First Strand Buffer 4 ㎕, 0.1 M DTT 2 ㎕, 10 mM dNTP Mix, RNasin 1 ㎕을 넣고 2분간 42℃에서 반응을 진행하였다. 역전사효소 (reverse Transcriptase, Gibco BRL) 1 ㎕를 넣은 후 50분 동안 42℃에서 cDNA를 합성하였다. 70℃에서 15분 동안 효소반응을 비활성화시킨 후 증류수 180 ㎕를 첨가하고 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다. GAPDH의 PCR은 25 ㎕ 부피로 template 5 ㎕, 10 × Buffer 2.5 ㎕, 50 mM MgCl2 0.75 ㎕, 10 mM dNTP Mix 0.5 ㎕, forward primer 25 pmole, reverse primer 25 pmole, Taq polymerase (5 U/㎕) 0.25 ㎕를 첨가하고 반응시켰다. TH, AADC, DBH의 PCR은 50 ㎕의 부피로 template 30 ㎕, 10 × Buffer 5 ㎕, 50 mM MgCl2 1.5 ㎕, 10 mM dNTP Mix 1 ㎕, forward primer 50 pmole, reverse primer 50 pmole, Taq polymerase (5 U/㎕) 1 ㎕를 첨가하였다. PCR반응은 94℃- 45초, 55℃- 45초, 72℃- 45초에서 GAPDH, AADC, DBH는 30 cycles 동안 반응시켰고, TH는 35 cycles 동안 반응시켰다. 1.2% agarose 겔에 전기영동해서 EtBr 염색으로 확인하였다.

면역침전화학반응

C4와 C4-*Nurr*1을 커버슬립에 0.25 × 105 cells/ml의 농도로 심고 SHH-N과 FGF-8으로 분화를 유도한 뒤 면역세포화학반응 (immunocytochemistry)을 수행하였다. 세포고정화는 4% paraformaldehyde 용액 (0.2 M phosphate buffer + 8% paraformaldehyde)에 45분 동안 넣어 진행시켰다. 이후 PBS (phosphate buffered saline)로 5분간 3번 씻어주고, PBS/ 1% BSA/ 0.2% Triton X-100에 5분간 넣어둔 후 다시 PBS로 5분간 3번 씻어주고, 5% normal horse 혈청 (serum)으로 상온에서 1시간 동안 반응시켜 blocking을 하였다. Anti-sheep 타이로신수산화효소 (TH) 항체는 1 : 400으로 anti-mouse β-tubulin 항체는 1 : 250으로 희석한 후 상온에서 하룻밤 반응시키고, PBS로 5분간 3번 씻어주었다. 이후 1 : 100으로 희석한 Biotinylated anti-goat IgG와 anti-mouse IgG를 각각 상온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBS로 5분간 3번 세척 후 Vectastain Elite ABC kit의 아비딘 (avidin)용액, 바이오틴 (biotin) 용액, PBS를 1 : 1 : 50으로 반응시키기 30분전에 준

비하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 미 반응물들은 PBS로 5분간 3번 씻어주고 AEC(AEC stock 25 μl + 0.05 M acetate Buffer (PH 5.0) + 30% H_2O_2 3 μl) 반응을 상온에서 10분 동안 진행 후, 증류수로 조심스럽게 세척하여 슬라이드 슬립에 올려 관찰하였다.

결과 및 고찰

*Nurr*1 유전자 과발현 인간 신경간세포 구성 및 분화유도

레트로 바이러스 벡터와 packaging 세포주를 사용하여 세포주를 확보하는 데에는 몇 가지 이점이 있다. 레트로 바이러스를 표적세포에 감염시키면 유전자 전달의 효율이 다른 방법보다 높다는 것이다. 또 하나는 대상 유전자를 표적세포 염색체 안으로의 통합 (integration)이 안정하다는 것이다(13). 본 연구에서는 감염된 A3와 C4 사람 신경간세포를 항생제 퓨로마이신 (puromycin)으로 선별 (selection)을 하여 *Nurr*1을 과발현하는 A3-*Nurr*1과 C4-*Nurr*1 세포주를 만들었다.

A3-*Nurr*1과 C4-*Nurr*1 인간 신경간세포의 세포 증식을 위하여 바닥에 잘 붙으면 혈청이 포함되어 있는 배지를 제거하고 혈청대신 UBC1을 넣은 배지를 사용해서 처음 24시간 동안은 헤파린과 bFGF를 첨가하였다. 헤파린과 bFGF대신 RA와 FK을 첨가해서 분화를 유도하였다. 레티노산 (RA)은 6일 동안 처리하였고, 폴스콜린 (FK)은 14일 동안 처리하였다. 이렇게 분화를 유도한 세포들을 카테콜라민 신경전달물질 생합성에 관여하는 3가지 효소들에 대한 특이적 프라이머(primer)를 사용해서 역전사효소 PCR (RT-PCR)을 수행하였다. 도파민 신경세포에서는 3가지 효소 중에서 TH와 AADC 두 종류의 효소만이 발현되어야 한다. 우선 TH 유전자의 발현은 C4와 A3 세포에서는 전혀 레티노산 과 폴스콜린에 대한 효과가 없으나, *Nurr*1 유전자가 과발현하는 C4-*Nurr*1은 폴스콜린을 처리하였을 때 TH 발현이 되었음을 알 수 있었다(Fig. 1). A3-*Nurr*1은 bFGF, 레티노산, 폴스콜린 모든 조건에서 TH가 발현되었으며, 상대적인 발현 비율을 보면 폴스콜린이 가장 높았고 가장 낮은 발현을 보인 RA보다 약 2 배 정도가 높게 발현함을 알 수 있었다(Fig. 1). AADC 유전자의 발현은 C4에서 bFGF 처리한 경우에만 나타났고, A3는 세 가지 경우에서 모두 발현되었으나, 레티노산과 폴스콜린을 처리하면 발현 수준이 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서, *Nurr*1 유전자가 과발현하지 않는 인간 신경간세포인 C4와 A3는 도파민 신경세포 형질을 보이고 있지 않음을 알 수 있다(Fig. 1). 그러나, *Nurr*1을 과발현시키면 A3-*Nurr*1에 bFGF를 처리한 경우에만 AADC 발현이 나타나지 않음을 확인 할 수 있었으며 DBH 유전자의 발현은 네 종류의 세포주 모두 발현되지 않음을 알 수 있었다. 따라서, 도파민 신경세포의 형질을 보이고 있는 경우는 C4-*Nurr*1에 폴스콜린을 처리한 두 경우인데, 레티노산에서는 TH 발현수준이 매우 낮기 때문에 폴스콜린을 처리한 경우가 확실한 도파민 신경세포의 형질을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). A3-*Nurr*1은 레티노산과 폴스콜린 두 경우가 모두 TH와 AADC 발현을 보이고 있으며 도파민 신경세포 형질을 나타내고 있음을 알 수 있다(Fig. 1).

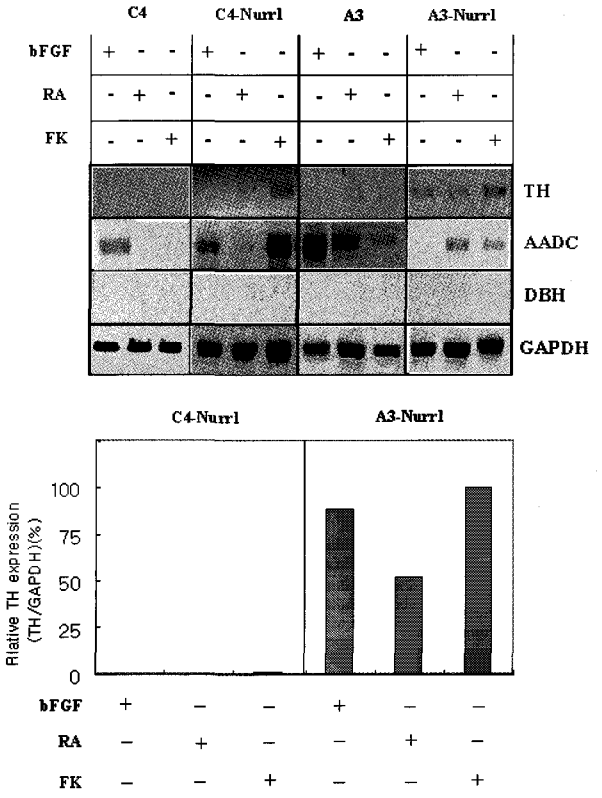

Figure 1. Expression of genes related to catecholamine-producing neurons in *Nurr*1-overexpressing human neural stem cells treated with 1mM RA or 5mM FK for 14 days.

즉, *Nurr*1 유전자가 과발현하고 있는 세포주에서 RA와 FK을 처리하였을 때 도파민 신경세포의 형질이 나타났으며 이 결과를 통해 *Nurr*1 유전자가 과발현하고 있는 인간 신경간세포주에 레티노산과 폴스콜린을 처리하면 도파민 신경세포로 분화 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

TH 및 AADC, DBH 발현에 대한 별아교세포의 영향을 RT-PCR을 이용하여 조사하기 위하여 처음 24시간 동안은 bFGF를 넣어주고 세포 증식을 시켰고, 24시간 후에 사람 별아교세포와 공동배양을 통해서 분화를 유도하였다.

C4와 A3 신경간세포주는 레티노산과 폴스콜린을 처리한 결과처럼 TH 유전자 발현을 유도하지 못하였으나, C4-*Nurr*1과 A3-*Nurr*1 신경간세포주는 레티노산과 폴스콜린을 처리한 경우보다 TH 발현정도가 매우 증가하였다. C4-*Nurr*1은 bFGF 경우와 별아교세포 공동배양에 레티노산과 폴스콜린을 같이 처리한 경우에만 TH 발현 양상을 보였으나, AADC 발현은 C4와 비교하면 별아교세포 공동배양에서는 현저히 줄어들었고 bFGF에서만 발현이 되었다. A3-*Nurr*1도 C4-*Nurr*1에서의 결과처럼 TH 발현정도가 매우 높았고, AADC는 전혀 발현되지 않았다(Fig. 2). DBH 유전자의 발현은 어떤 경우에도 나타나지 않았다. 따라서, 도파민 신경세포로 분화 유도는 C4와 A3는 일어나지 않음을 확인 할 수 있었으며, *Nurr*1 과발현된 신경간세포중에서 C4-*Nurr*1에 bFGF를 처리하였을 경우에만 분화가 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2).

TH 발현에 대한 별아교세포의 영향은 *Nurr*1 과발현 신경간세포에서 레티노산과 폴스콜린에 비해서 훨씬 높은 것으로

나타났으나 AADC의 발현이 완전히 사라져서 도파민 신경세포의 형질을 나타내지는 못하였다.

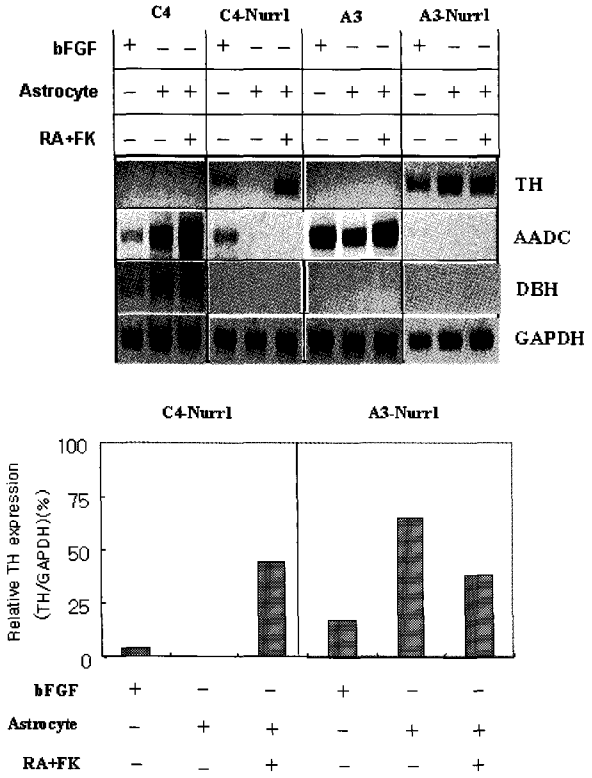

Figure 2. Induction of genes related to catecholamine -producing neurons in *Nurr*1-overexpressing human neural stem cells by insert co-culture with human astrocyte.

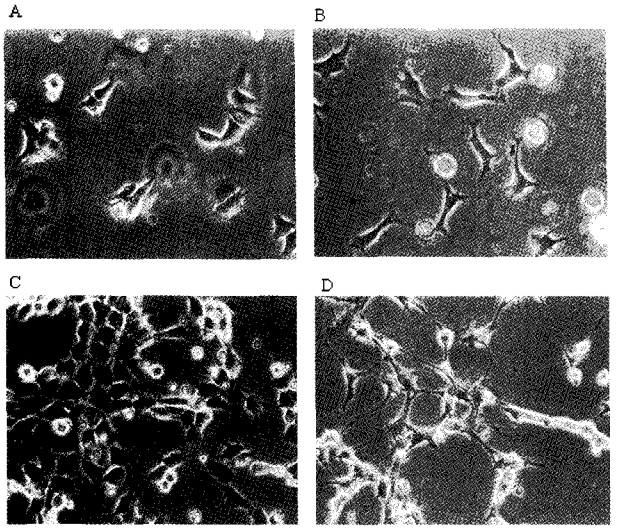

Figure 3. Morphological change of A3 by treating with FGF-8 and SHH-N (A; bFGF, B; FGF-8, C; SHH, D; SHH+FGF-8).

Sonic hedgehog 단백질과 분화조건

SHH은 분비 단백질로서 총 분자량은 45 kDa이며, 생물학적 활성을 갖는 부분은 아미노 말단 부위 (SHH-N)로서 이때의 분자량은 약 20 kDa이다. 이 20 kDa의 SHH-N을 얻기 위해서 먼저 SHH-N을 과발현하는 세포주를 확립하였다. SHH은 분비 단백질이므로 C4-hShh-N은 배양시 배지로 인간 SHH-N을 과다 분비한다. 이 배지를 인간 신경간세포주 배양시 배지에 첨가하였고, 광학 현미경에서 200배의 배율로 관찰하였다.

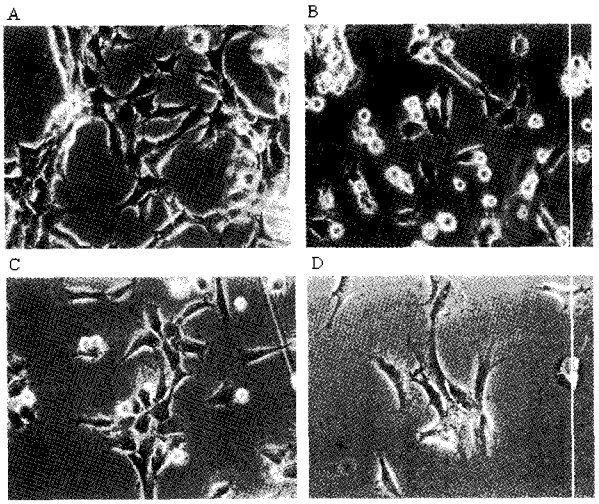

Figure 4. Morphological change of A3-*Nurr*1 by treating with FGF-8 and SHH-N (A: bFGF, B: FGF-8, C: SHH, D: SHH+FGF-8).

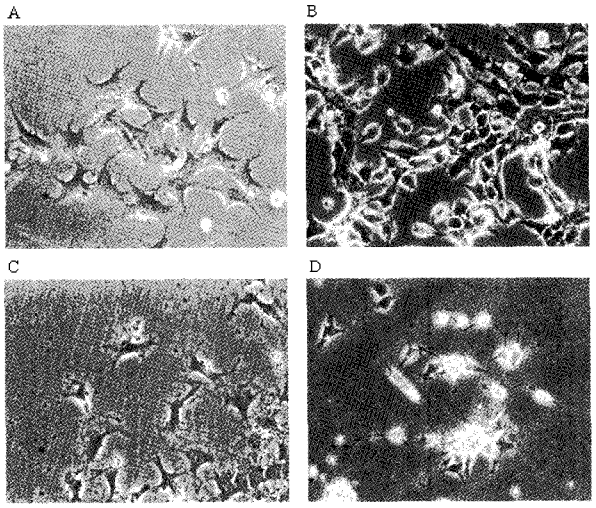

Figure 5. Morphological change of C4 by treating with FGF-8 and SHH-N (A; bFGF, B; FGF-8, C; SHH, D; SHH+FGF-8).

*Nurr*1 과발현 신경간세포의 형태를 *Nurr*1을 과발현시키지 않은 세포의 형태와 비교하면 *Nurr*1 과발현 세포주의 수상돌기의 뻗어감이 더 많은 것을 볼 수 있었다(Fig. 4, 6). 또한 *Nurr*1 과발현 유무에 관계없이 SHH과 FGF-8을 처리한 세포 역시 처리하지 않은 세포보다 많은 수상돌기의 뻗어감이 더 많이 관찰된 것으로 보아 SHH과 FGF-8이 분화에 커다란 역할을 할 것이라는 것을 예상할 수 있다. SHH과 FGF-8을 처리하면 세포들이 군집을 이루면서 일정한 형태를 이루는 경향을 보이고, 그물망 형태를 이루는 세포들도 관찰할 수 있었다(Fig. 3-6). 이러한 형태학적 관찰을 통하여, *Nurr*1 과발현 신경간세포주에 SHH과 FGF-8을 처리하면 분화가 일어난다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 분화가 도파민 신경세포로 유도되는지 확인하기 위해서 FGH-8로 8일 동안 처리된

인간 shh-N TH와 신경세포에 대한 표지 (marker)인 β-튜불린 (β-tubulin)으로 면역세포화학반응을 수행하였다.

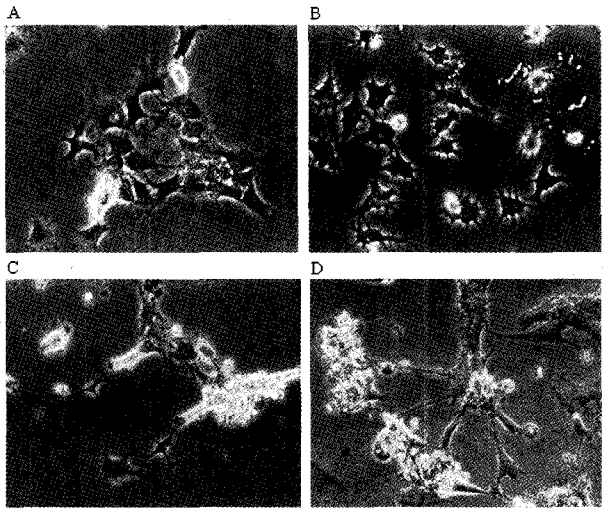

Figure 6. Morphological change of C4-*Nurr*1 by treating with FGF-8 and SHH-N (A; bFGF, B; FGF-8, C; SHH, D; SHH+FGF-8).

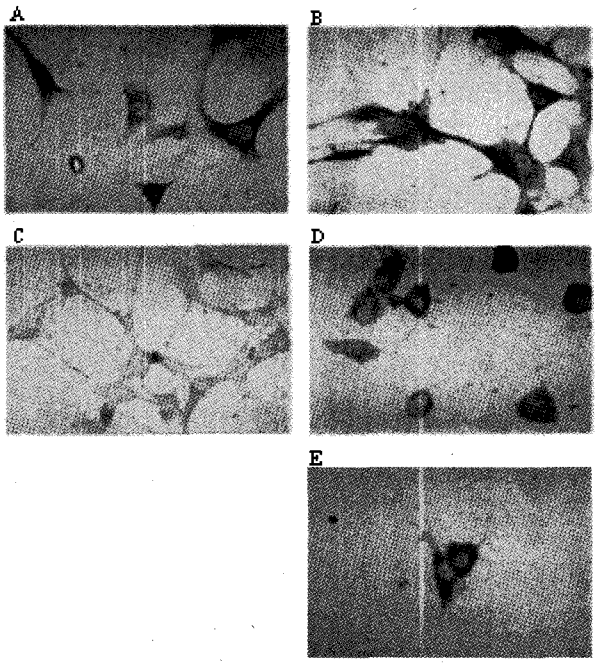

Figure 7. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity of C4-*Nurr*1 with the treatment of FGF-8 and SHH-N (A; C4 control cells were incubated with the treatment of FGF-8 and SHH-8. The β-tubuline was a neural cell marker and visible due to immunoreactions. B; C4-*Nurr*1 cells incubated with the treatment of both SHH and FGF-8. β-tubuline immunoreactions were shown. C; C4 control cells were incubated with the treatment of both SHH and FGF-8. The C4 cells were stained for tyrosine hydroxylase (TH). D; C4-*Nurr*1 cells treated with FGF-8, and stained for tyrosine hydroxylase (TH). E; C4-*Nurr*1 cells treated with both SHH and FGF-8, and stained for tyrosine hydroxylase (TH)).

먼저 신경간세포는 신경세포 및 신경교세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 미분화된 전구세포이기 때문에 신경세포로의 분화를 확인하기 위하여 신경세포의 표지 (marker)인 β-튜불린에 대한 면역세포화학반응을 수행하였다. C4와 C4-*Nurr*1 모두 β-튜불린에 면역 양성 반응을 보이고 있고, 이 사실로 *Nurr*1 과발현의 유무에 관계없이 신경세포로 분화가 이루어짐을 알 수 있다(Fig. 7 A, B). TH 항체로 면역세포화학반응을 수행한 결과 *Nurr*1을 과발현시키지 않은 C4는 양성 반응을 전혀 보이지 않았으며(Fig. 7 C), C4-*Nurr*1 세포주는 FGF-8을 처리한 경우와 SHH과 FGF-8을 동시에 처리한 두 경우에 양성 반응을 보였다(Fig. 7 D, E). AADC 발현은 조사하지 않았지만 TH 유전자의 발현이 되었으므로 C4-*Nurr*1은 SHH과 FGF-8을 처리하면 도파민 신경세포로 분화 유도됨을 알 수 있었다. 본 연구에서는 SHH과 FGF-8을 처리한 후 TH에 대한 면역세포화학반응만을 수행하였는데, 향후 TH 이외의 효소에 대한 역전사효소-PCR (RT-PCR)을 수행해야 할 것으로 사료된다.

*Nurr*1의 발현이 중뇌 도파민 신경세포에 제한되어 있지는 않지만 *Nurr*1이 결여된 생쥐에서 중뇌 도파민 신경세포만이 결핍되었고, *Nurr*1의 발현이 TH의 발현보다 발생과정에서 먼저 일어난다(6). 따라서, 중뇌 도파민 신경세포의 분화에 *Nurr*1이 필수적이다.

본 연구에서는 *Nurr*1을 과발현하는 인간 신경간세포주를 확립하여 도파민 신경세포로 분화 유도를 시도하였다. 그러나, C4와 A3 두 종류의 신경간세포에서 *Nurr*1 과발현만으로는 도파민 신경세포로 분화에서 가장 중요한 도파민 생합성에 관여하는 효소인 TH의 발현이 유도되지 않았다. 도파민 신경세포로 분화 유도하기 위해서 *Nurr*1 과발현 세포주인 C4-*Nurr*1과 A3-*Nurr*1을 확립한 후, TH 발현과 도파민 신경세포의 분화에 관계하는 여러 요소들을 처리하여 도파민 신경세포의 분화를 유도하였다.

폴스콜린은 C4-*Nurr*1과 A3-*Nurr*1에서만 TH 발현 증가와 함께 AADC 발현이 일어났고, 레티노산은 폴스콜린과 비교해서 낮은 수준이지만 A3-*Nurr*1에서 TH 발현과 함께 AADC 발현이 유도되었다. 레티노산은 비타민 A의 유사체로서 세포의 증식을 억제하고 분화를 유도하는 효과가 있는 물질로 레티노이드 (retinoid) 핵 수용체에 의해 신호가 전달되는데, 레티노이드 핵 수용체중에 레티노이드 X 수용체 (retinoid X receptor (RXR))가 *Nurr*1과 이합체를 형성할 수 있다. 폴스콜린은 TH 발현을 현저하게 증가시킴을 알 수 있었는데 TH 프로모터에 환상-AMP 응답효소 (c-AMP responsive element, CRE) 서열이 존재하고 이 CRE 서열이 TH의 기본적인 발현에 필요하다(13, 14). 폴스콜린은 세포 내 cAMP의 양을 증가시키므로 TH 발현에 효과가 있었다. 그러나, AADC는 레티노산과 폴스콜린을 동시에 처리하면 대부분의 경우에 발현수준이 낮아진다. TH와 AADC가 함께 발현되어서 도파민 신경세포의 형질을 보이는 경우는 C4-*Nurr*1은 폴스콜린, A3-*Nurr*1은 레티노산과 폴스콜린을 처리하였을 경우에 도파민 신경세포의 형질을 나타냄을 알 수 있었다. 그리고, bFGF도 TH 발현에 효과가 큰 것으로 나타났으나, AADC가 발현되지 않았으므로 레티노산과 폴스콜린과는 다른 기작을 통해 작용함을 추측할 수 있다.

별아교세포 공동배양에 의한 분화 유도의 결과를 보면 *Nurr*1 과발현 세포주인 C4-*Nurr*1과 A3-*Nurr*1에서만 TH 발현에 있어서는 bFGF, 레티노산, 폴스콜린에 비해 큰 효과가

있었다. 공동배양에 사용한 삽입 배양 용기 (culture plate insert)에는 미세 구멍이 있어서 배양접시에서 배양하고 있는 세포와 삽입 배양 용기에서 배양되는 별아교세포 사이에 직접적인 접촉을 방지하고 별아교세포가 방출하는 거대 분자들은 통과할 수 있게 구성되었다. 따라서, TH 발현을 유도할 수 있는 분자가 별아교세포로부터 생산되고 있음을 알 수 있다. *Nurr*1 단백질은 NBRE (NGFI-B response element)에 결합해서 유전자를 활성화시키는데, 최근에 TH 프로모터에 *Nurr*1 단백질이 결합하는 염기서열 (TH-NBRE1)이 밝혀졌다 (15). 별아교세포가 생산하는 분자 중에 아직 밝혀지지 않은 *Nurr*1 리간드가 있어서 TH 발현에 효과가 있을 것이라고 추측할 수 있다.

발생과정동안 SHH과 FGF-8의 발현이 교차하는 장소에서 도파민 신경세포가 발견되었다는 보고에 의해 C4-*Nurr*1에 SHH과 FGF-8을 처리해서 도파민 신경세포로의 분화를 유도하였다. 그 결과 C4-*Nurr*1은 TH를 발현하는 신경세포로 분화가 되었다. SHH은 세포막에 존재하는 수용체 복합체 Ptc-Smo의 Ptc와 결합을 하고 이 신호를 Smo가 전사조절인자인 Gli에 전해서 유전자의 활성을 조절하는 기작이다. 쥐 TH 유전자 4.5 kb의 5' flanking region의 염기서열을 보면 5군데의 Gli 결합부위가 존재한다(16).

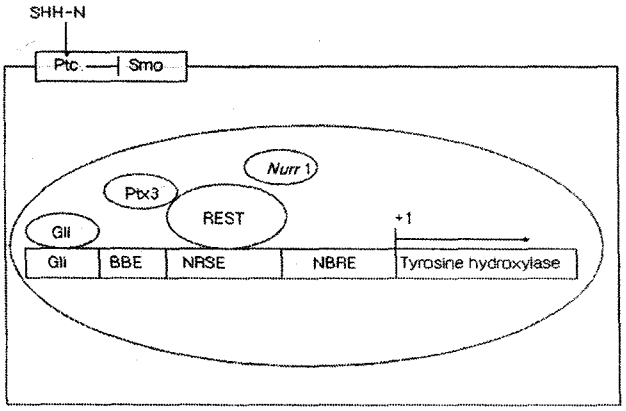

Figure 8. A proposed model for regulation of the tyrosine hydroxylase(TH) gene expression.

최근 뇌 신경세포에서만 발현되는 많은 유전자들이 NRSE (neuronal restrictive silencer element or RE1) 염기서열을 가지고 있으며, 비 신경세포에서 신경세포 특이적 유전자의 발현 억제는 전사조절인자인 REST (RE1-silencing transcription factor)가 NRSE에 결합해서 조절되고, 신경세포로 분화가 이루어지면 REST의 발현이 억제됨으로써 신경세포 특이적인 유전자들의 활성이 일어난다는 보고가 있었다(17). TH 유전자도 NRSE 염기서열이 존재하므로 도파민 신경세포로 분화를 유도하기 위해서는 REST의 발현억제가 필수적이라 할 수 있다. 따라서, 분화를 유도하면 REST의 발현 수준이 어떻게 변화하는지 조사해볼 필요가 있을 것이다. 또한 도파민 신경세포 발생에 *Nurr*1 유전자와는 독립적으로 *ptx3*와 *Lmx1b* 두 유전자가 같이 발생에 관여하는 기작이 필요하다는 보고도 있다. 도파민 신경세포의 분화는 이와 같이 상당히 복잡하며 최종적으로 모식도에 본 연구에서 수행한 실험들과 여러 보고들을 기초로 도파민 신경세포의 분화에서 중요한 TH 유전자 발현에 대한 가상적인 모델 (model)을 도식화 하였다(Fig. 8). 또한 도파민 신경세포 분화와 관련된 여러 기작들은 아직 이해하지 못한 부분이 많으므로 앞으로 좀더 활발한 연구가 지속 되어야 할 것이다.

또한 본 연구에서 얻은 결과를 바탕으로 앞에서 언급한 유도인자들의 다른 조합 뿐만 아니라 도파민 신경세포 분화에 중요한 여러 유전자들의 조합이나 발현 조절 등을 통해 도파민 신경세포의 대량 확보 및 동물모델에 이식을 통해 *in vivo* 에서 분화 유도한 도파민 신경세포의 역할을 조사할 필요가 있을 것으로 예상된다.

요 약

중추신경계의 신경간세포가 파킨슨병과 뇌졸중과 같은 퇴행성 뇌 질환의 치료뿐만이 아니라 신경세포 발생과정에서의 중요성 때문에 최근에 커다란 관심의 대상이 되고 있다. 중추신경계의 발생과정 동안에, 중뇌의 도파민 신경세포의 형성은 두 가지의 분자생물학적인 기작에 의해서 결정된다. 첫째로, FGF-8, sonic hedgehog 그리고 전사조절인자 인 *Nurr*1이 도파민 신경세포의 형질을 결정짓는다. 또 다른 기작으로는, 전사조절인자 인 Lmx1b와 Ptx3가 중요하게 관련되어있다. 특히 *Nurr*1이 결핍된 생쥐에서, 타이로신수산화효소 (Tyrosine hydroxylase, TH) 면역양성 세포들이 중뇌흑색질에서 발견되지 않으므로 *Nurr*1이 도파민 신경세포의 발생에 필수적임을 알 수 있다. 본 연구에서는 도파민 신경세포의 형질을 유도하는데 있어서 *Nurr*1이 매개하는 기작을 연구하기 위해서 레트로 바이러스를 이용하여 *Nurr*1을 도입한 무한증식 신경간세포를 사용하였다. *Nurr*1 유전자의 과발현 만으로는 신경간세포에서 도파민 신경세포의 형질을 유도하지는 못하지만, 레티노이드 (retinoid, RA)와 폴스콜린 (forskolin, FK)을 처리하여 TH와 방향성 L-아미노산 탈카르복시화효소 (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) mRNA의 발현을 유도하였다. 또한, *Nurr*1 과발현 신경간세포를 사람 별아교세포와 공동배양 하여 TH 발현량을 많이 증가시켰다. 이러한 공동배양실험에서, RA와 FK를 처리하면 TH의 발현수준이 더욱 더 증가함을 발견하였다.

이러한 결과들은 *Nurr*1 유전자를 도입한 사람 신경간세포가 파킨슨병 환자들에게 세포이식을 통한 유전자 치료의 유용성을 시사하고 있다.

감 사

저자들은 본 연구에 사용된 인간 *Nurr*-1 유전자를 제공해준 일본 후지타 대학의 히로시 이치노즈 (Prof. Hiroshi Ichinose) 교수에게 감사드립니다. 본 연구는 아주대학교 뇌질환연구소 (Kim, H.J.; Kim, S.) , 농림부 바이오장기 생산 연구사업 연구비 (Han, J.), 산업자원부 지원 신라대 해양생물RIS사업단 (Choi, I. S.; Joo, H.)에서 일부를 지원 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Fahn, S. (1986), Parkinson's disease, In *Diseases of the Nervous System*, A. K. Asbury, G. M. McKhann, and W. I. McDonald, Eds., p1217, W. B. Saunders, Philadelphia.
2. Brundin, P., R. E. Strecker, H. Widner, D. J. Clarke, O. G. Nilsson, B. Astedt, O. Lindvall, and A. Bjorklund (1998), Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release, *Exp. Brain. Res.* **70**, 192-208.
3. Dunnett, S. B. (1991), Transplantation of embryonic dopamine neurons: what we know from rats, *J. Neurol.* **238**, 65-74.
4. Brustle, O. and R. D. Mckay (1996), Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 688-695.
5. Weiss, S., C. Dunne, J. Hewson, C. Wohl, M. Wheathey, A. C. Peterson, and B. A. Reynolds (1996), Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis, *J. Neurosci.* **16**, 7599-7609.
6. Saucedo-Cardenas, O., J. D. Quintana-Hau, W. D. Le, M. P. Smidt, J. J. Cox, F. D. Mayo, J. P. H. Burbach, and O. M. Conneely (1998), *Nurr*1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4013-4018.
7. Cazorla, P., M. P. Smidt, K. L. O'Malley, and J. P. H. Burbach (2000), A Response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter, *J. Neurochem.* **74**, 1829-1837.
8. Zetterstrom, R. H., L. Solomin, L. Jansson, B. J. Hoffer, L. Olson, and T. Perlmann (1997), Dopamine neuron agenesis in *Nurr*1-deficient mice, *Science.* **276**, 248-250.
9. Ichinose, H., T. Ohye, T. Suzuki, C. Sumi-Ichinose, T. Nomura, Y. Hagino, and T. Nagatsu (1999), Molecular cloning of the human *Nurr*1 gene: characterization of the human gene and cDNAs, *Gene.* **230**, 233-239.
10. Ye, W., K. Shimamura, J. L. R. Rubenstein, M. A. Hynes, and A. Rosenthal (1998), FGH and shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate, *Cell.* **93**, 755-766.
11. Sakurada, K., M. Ohshima-Sakurada, T. D. Palmer, and F. D. Gage (1999), Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain, *Development.* **126**, 4017-4026.
12. Wagner, J., P. Akerud, D. S. Castro, P. C. Holm, J. M. Canals, E. Y. Snyder, T. Perlmann, and E. Arenas (1999), Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in *Nurr1*-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes, *Nature Biotech.* **17**, 653-659.
13. Felts, K., J. C. Bauer, and P. Vaillancourt (1999), High-titer retroviral vectors for gene delivery, *Strategies Newsletters.* **12**, 74-77.
14. Trocme, C., C. Sarkis, J. M. Hermel, R. Duchateau, S. Harrison, M. Simonneau, R. Al-Shawi, and J. Mallet (1998), CRE and TRE sequence of the rat tyrosine hydroxylase promoter are required for the basal expression in adult mice but not in the embryo, *Euro. J. Neurosci.* **10**, 508-521.
15. Iwawaki, T., K. Kohno, and K. Kobayashi (2000), Identification of a potential *Nurr*1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells, *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **274**, 590-595.
16. Schimmel, J. J., L. Crews, S. Roffler-Tarlov, and D. M. Chikaraishi (1999), 4.5 kb of the rat tyrosine hydroxylase 5' flanking sequence directs tissue specific expression during development and contains consensus sites for multiple transcription factors, *Mol. Brain Res.* **74**, 1-14.
17. Huang, Y., S. J. Myers, and R. Dingledine (1999), Transcriptional repression by REST : recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes, *Nature Neurosci.* **2**, 867-872.