

척수손상백서에서 인간 제대혈 세포이식에 의한 신경기능의 회복

인하대학교 의과대학 신경외과학교실¹, 연세대학교 의과대학 신경외과학교실²
 하 윤¹ · 윤승환¹ · 박형천¹ · 김금년² · 윤도흠² · 조용은²

Transplantation of Human Umbilical Cord Blood Improves Neurological Outcomes in the Rats after Traumatic Spinal Cord Injury

Yoon Ha, M.D., Ph.D.,¹ Seung Hwan Yoon, M.D., Ph.D.,¹ Hyung Chun Park, M.D., Ph.D.,¹
 Keung Nyun Kim, M.D., Ph.D.,² Do Heum Yoon, M.D., Ph.D.,² Yong Eun Cho, C.A., M.D., Ph.D.²
Department of Neurosurgery,¹ Inha University College of Medicine, Incheon, Korea
Department of Neurosurgery,² Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : Recent advances in stem cell biology make it possible to induce the regeneration of injured axons and to replace lost cells in the injured spinal cord. It has been found that stem cells in human cord blood differentiate into mature neurons and glial cells both in vitro and in vivo. These findings suggest that human umbilical cord blood cells(HUCBs) can be used as therapeutic donor cells in cases of spinal cord injury.

Methods : To attempt the repair an injured cord following spinal cord injury(SCI), we transplanted HUCBs into contused spinal cords. This was found to promote a long-term improvement in neurologic function relative to a lesion-control group. HUCBs were cultured in vitro for 7 days. Bromodeoxyuridine(BrdU) was added to the media to allow the BrdU to integrate into dividing cells. Cultured HUCBs(2X10⁶ cells) were then injected into the injury epicenter 7 days after SCI. The Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) locomotor rating system was used to score functional improvement in HUCBs transplanted rats. Immunohistochemical staining for neurofilament, microtubule associated protein 2(MAP-2), glial fibrillary acidic protein(GFAP), and nestin was performed.

Results : Immunohistochemical analysis 5 weeks after SCI showed that gliogenesis of the transplanted donor HUCBs had occurred within the adult rat spinal cord. These donor-derived astrocyte-like cells extended their processes into the host tissues and integrated well. HUCBs derived neurons(neurofilament, MAP-2) and nestin expressing cells were also detected. Behavior analysis using BBB rating scores showed that functional improvement was greater in transplanted rats than in non-treated rats.

Conclusion : HUCBs are one of the potential sources for transplantation material for the treatment of SCI.

KEY WORDS : Human umbilical cord blood cell(HUCBs) · Spinal cord injury · Transplantation · Gliogenesis · GFAP · Bromodeoxyuridine(BrdU).

서 론

중추신경계 손상의 하나인 척수 손상은 비가역적인 것으로 손상 후 재생은 매우 어려운 것으로 알려져 왔다. 최근까지 척수 손상에 대한 치료 및 재활 요법의 괄목할 발전에도 불구하고 손상의 근본 원인이 되는 신경 조직의 재생이 이루어지지 않아 근본

치료가 불가능한 상태이다. 최근의 임상에서 사용되는 치료법으로는 손상된 척수에 대한 근본 치료보다는 이차적인 척수 손상을 막기 위한 수술적 치료와 약물 치료가 시도 되고 있으나 아직 뚜렷한 치료효과를 지니는 약물은 개발되지 않고 있다^{16,32)}.

최근의 발달된 줄기세포 연구는 많은 신경외과 의사들에게 척수 신경 손상의 치료 뿐만 아니라 각종 난치성 뇌신경질환에 대한 치료가능성을 제공해주고 있다^{4,28)}. 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 배아의 inner cell mass에서 분리한 줄기세포로서 다양한 종류의 자손세포로 분화가 가능한 잠재력을 지닌 세포로 알려져 있다^{37,39,40)}. 시험관내에서 일정한 배양조건을 유지하게 될 경우 신경세포로의 분화를 유도할 수 있음이 규명된 이후 배아줄기세포를 이

- Received : July 21, 2003 • Accepted : November 3, 2003
- Address for reprints : Yong Eun Cho, M.D., Ph.D., Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
 Tel : 02) 3497-3390, Fax : 02) 393-9979
 E-mail : ydhscho@yumc.yonsei.ac.kr

용 척수신경손상의 치료에 대한 시도가 있어왔다²⁹⁾. 척수손상부위에 배아줄기세포를 이식한 경우 신경학적 기능 회복을 촉진시킬 수 있음에도 불구하고 이식된 배아줄기세포로부터 암세포로의 변형가능성(transformation) 및 배아줄기세포 사용에 대한 윤리적 종교적 문제점들이 아직까지 해결되지 않은 상태로 남아있어 임상치료 목적으로 이용되기까지는 앞으로도 많은 연구와 시간을 요구하고 있다^{11,36)}.

태아 및 성인의 중추신경계 내에는 신경줄기세포가 존재한다^{19,20,23)}. 신경줄기세포는 신경세포(neuron)뿐만 아니라 각종 교세포(astrocytes, oligodendrocytes)로의 분화가 가능한 줄기세포로 중추신경계의 손상에 대한 복구기능을 담당한다²⁰⁾. 그러나 이들 신경줄기세포는 임상치료용으로 이용되기에는 수적으로 매우 적을뿐 아니라 다량의 공여자 뇌조직을 분리해야 하는 등 어려움을 가지고 있다.

최근에 성인의 골수조직에 신경세포로 분화가 가능한 다량의 줄기세포가 존재한다는 사실이 규명된 이후 이들 골수유래 줄기세포를 이용한 신경질환의 치료 모델들이 속속 개발되고 있다^{24,27)}. 골수 내에는 혈구세포생산을 담당하는 줄기세포뿐만 아니라 골수조직의 기질형성을 담당하는 골수기질세포(bone marrow stromal cell)이 존재한다. 이들 골수기질세포로부터 신경세포로의 분화가 시험관내에서 증명되었다^{34,38)}. 골수기질세포를 손상 받은 중추신경조직에 이식할 경우 이식된 골수기질세포로부터 신경세포로의 분화가 가능하며 신경기능의 회복을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{22,27)}. 신생아의 혈액 내에도 다량의 왕성한 분화능력을 가지는 줄기세포가 존재한다. 이들 신생아 혈액내 줄기세포는 버려지는 태반내의 혈액으로부터 다량 추출이 가능하여(제대혈 세포) 이식치료의 난제 중 하나인 충분한 공여자 확보가 용이하다는 장점을 가지고 있다. 뇌조직 손상 후 정맥 내로 주입한 제대혈 세포로부터 신경세포로의 분화와 신경기능의 회복을 촉진시킬 수 있다는 보고는 척수손상치료에도 제대혈 세포치료가 가능함을 제시해주는 연구결과이다²⁵⁾.

이에 본 연구자들은 외상성 척수신경 손상 모델에서 제대혈 세포의 이식효과를 확인하고자 척수손상 백서의 척수 내에 시험관내에서 1주간 배양하여 증식시킨 제대혈 세포를 이식하여 이들 이식된 제대혈세포로부터 신경세포로의 분화여부를 확인하였으며 제대혈 이식으로 인한 신경기능회복의 촉진효과를 판정하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서는 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley 300~350g)를 pentobarbital(50mg/kg) 복강내 주사로 전신 마취한 후, atropine sulfate(0.8mg/kg)로 근육주사 한 뒤 척수 손상 모델을 만들었다.

실험군 설계는 제대조혈모세포의 이식효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 고안하였다. A군 : 대조군(척수 손상부위에 배지주사), B군 : 실험군(척수손상부위에 제대혈세포 2×10^6 cells 주사)로 나누었다.

1차 수술 및 척수손상

실험동물을 8,9 흉추에 척추후궁 절제술(laminectomy)를 실시하였다. 실험동물을 spinal cord dropping device (NYU impactor)^{10, 12)}에 올려놓고 clamp로 척추돌기를 고정한 뒤 척수상방 25mm지점에 직경 2mm무게 10gm인 rod를 위치한 뒤 rod를 떨어뜨려 손상을 준 후 손상 부위를 봉합하고 항생제 (Kanamycin, 0.6cc/kg)를 근육 주사하였다.

인간 제대혈 세포 추출

건강한 성인 산모로부터 정상 질식 분만 후 제대정맥에서 헤파린 처리한 주사기를 사용하여 100~150ml의 제대혈을 채취하였다. 제대혈 20ml를 부피가 1:2되도록 RPMI 1640(Gibco BRL, Carlsbad, CA)으로 희석한 뒤 4개의 원추형 시험관에 4ml Ficoll-Hypaque (d=1.077g/ml, Pharmacia Uppsala, Sweden)위에 조심스럽게 중층하였다. 2,800rpm에서 10분간 원심분리 하여 형성된 저비중의 단핵구층을 Pasteur pipette으로 흡입하여 새로운 시험관에 옮겼다. RPMI 1640으로 2회 세척하여 단핵구를 얻었다.

분리된 세포는 10ml의 골수배양배지 20% fetal bovine serum (FBS;GIBCO BRL, Carlsbad, CA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle media(DMEM, GIBCO BRL, Carlsbad, CA)배지, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin에 1ml당 2×10^7 세포밀도로 분주한 뒤 3일째 bromodeoxyuridine(BrdU, Sigma, St. Louis, MO)를 첨가하여 3ug/ml의 농도가 되도록 하였다.

신선 제대혈 단핵구 면역염색

분리된 제대혈 세포를 poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO)이 도포된 배양기에 5시간 부착시킨 뒤 면역염색을 시행한다. 사용한 일차항체로는 nestin(mouse monoclonal, Transduction lab., Franklin Lakes, NJ 1:500)과 phycoerythrin conjugated CD133 (mouse monoclonal, Miltenyl Biotech, Germany 1:100), 이차항체로는 Biotinylated anti-mouse IgG antibodies (광학현미경 검정)과 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-mouse IgG antibodies (형광현미경 검정)를 사용하였다.

4% paraformaldehyde(Sigma, St. Louis, MO)으로 세포고정을 시행하였으며 0.1% Triton X-100(Sigma, St. Louis, MO)를 20분간 처리하여 세포막 투과성을 증가시켰다. 일차항체는 4°C에서 24시간 반응시켰으며 이차항체는 37°C에서 10분간 처리하였다. Tris-

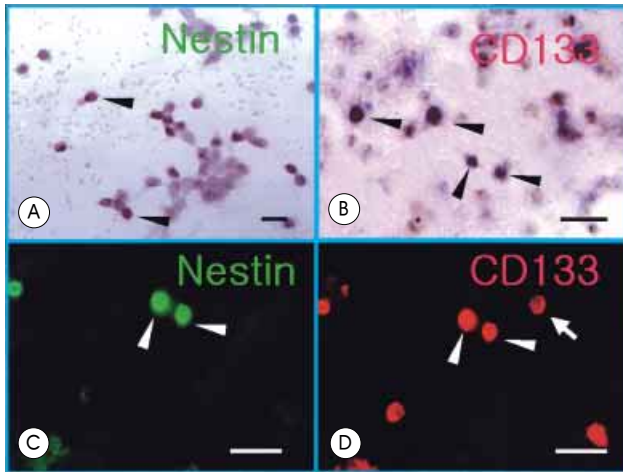


Fig. 1. Immunocytochemical staining of human cord blood monocytes shows cells which were immunoreactive to nestin (A) and CD (cluster of differentiation)133 (B). A : Nestin expression is found exclusively on subpopulations of mononuclear cells. B : Cell membrane protein CD133 expression is detected in mononuclear cell populations. C,D : Confocal microscopic images of cord blood monocytes in which double-labeled immunofluorescent preparations demonstrate the co-expression of nestin and CD133. The arrowheads in C and D show the same cells co-express nestin and CD133. The arrow in D shows CD133 reactive cell which is not immunoreactive to nestin. Scale Bar =20µm

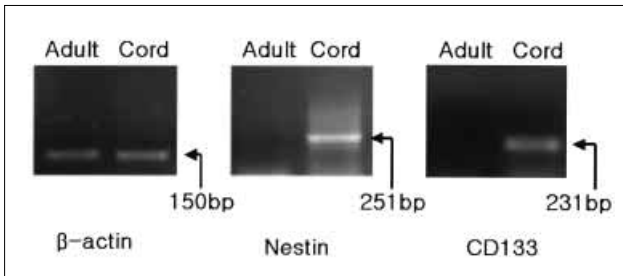


Fig. 2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) analyses using nestin, CD133 primers. RNA is isolated from fresh adult and cord blood. β-actin serves as an internal control. In adult and cord blood cells, no significant intensity differences in-actin bands are noticed. Nestin and CD133 expression are seen exclusively in cord blood. Nestin and CD133 expression are not observed in adult blood. The data presented are representative of three independent experiments.

HCl buffer용액에서 streptavidin과 horseradish peroxidase(Vector Laboratories, Burlingame, CA) 중합반응을 유도한 뒤 diaminobenzidine(DAB) chromogen(Vector Laboratories, Burlingame, CA) 을 첨가하여 5 분간 반응시켰다. hematoxylin으로 counterstain 시행한 뒤 광학현미경으로 관찰하였다. nestin과 CD133에 대한 이중항체 형광검사는 일차항체인 nestin 항체를 처리한 후 FITC-conjugated anti-mouse IgG 항체를 반응시켰다. 이후 이차항체의 unbound Fab 부분은 mouse

IgG를 첨가하여 포화시켰다. 마지막으로 phycoerythrin conjugated CD133 일차항체를 첨가한 뒤 confocal microscope (Nikon, Kawasaki, Japan)로 검경하였다.

신선 제대혈 단핵구 세포내의 nestin, CD133 mRNA RT-PCR

Trizol-LS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)를 이용하여 분리된 제대혈 세포내 전체 RNA를 추출하였다. Random hexamers를 이용하여 80°C, 5분간 반응시켜 first-strand RNA를 합성하였다.

Superscript kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)를 이용 42°C, 50분간 반응시켜 역전사(reverse transcription)시켰다. Primer는 Map draw program을 이용하여 디자인 하였으며 이들은 각각 : (1)nestin, accession no. X65964, the upstream (5')primer-positions 1791-1810 (5' aggatgtggaggtagtgaga-3'), the downstream (3')primer-positions 2040-2021 (5'-ggagatctcagtggctctt-3'), 251 bp amplified product. (2)CD133, accession no. Y00067, the upstream (5')primer-positions 1510-1531 (5'-gagcgcaaagactacctgaaga-3'), the downstream (3')primer-positions 1719-1740 (5'-cgactctagctcgatgctcttg-3'), 231 bp amplified product.

PCR(Biometra, Goettingen, Germany) cycle은 94°C, 30초, 57°C, 30초, 72°C, 30초로 전체 30cycle을 시행하였다. PCR products는 ethidium bromide를 첨가한 1.6% agarose gel로 전기영동을 실시하였으며 성인의 혈액세포를 대조군으로 하였다.

제대혈 단핵구 이식

제대혈세포를 배양하던 배지를 제거하고 PBS용액으로 3차례 세척한 후 500g의 속도로 원심분리 하였다. 세포 이식 전 trypan blue exclusion assay방법으로 cell viability를 측정하여 80%이하의 세포는 사용하지 않았다.

척수 손상 7일째 2×10^6 cells(3-5ul/total volume)의 cell suspension(배양1주째)을 만들어 주사기에 재운 뒤 실험동물을 pentobabital(50mg/kg)로 전신마취한 후 후궁절제된 T8-9부위를 노출하였다. 28G 주사바늘을 이용 10분에 걸쳐 척수 손상부위에 서서히 주입하였다.

실험동물관리 및 행동검사

손상을 받은 쥐들은 영상 200C의 조건에서 사육되었으며 손상 후 bladder function이 약화되어 스스로 소변을 할 수 없는 쥐들은 squeezing을 하여 인위적으로 오줌을 빼 주었다. 행동검사는

Michele Basso등이 개발한 Basso, Bresmahn, and Beattie (BBB) locomotor rating scale을 사용하여 분석하였다³⁾ (척수손상 전, 척수손상직후, 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일, 35일). 검사는 double blind technique를 이용하여 분석하였으며 검사결과는 두 검사자의 관측치의 평균값으로 하였다. 통계는 unpaired t-test를 시행하였다.

조직검사

실험동물을 희생시킨 후(척수손상 5주 후) 생리식염수 및 4% paraformaldehyde를 심장을 통하여 관류시킨 후 척수를 적출하여, 조직을 10% formalin에 넣어 고정한 뒤 frozen고정한 뒤 조직 절편을 만들어 염색을 진행하였다. 조직 블록을 10um의 두께로 절편하여 조직 슬라이드에 부착하였다.

Anti-human nuclear proteins(MAB 1281, 1:50, Chemicon, Temecula, CA) 를 제대혈 세포에 대한 표지자로 이용하고 일차항체로 처리한 후 흡윤상자를 이용하여 40C에서 18시간 동안 방치하였다. PBS buffer(pH 7.6)로 충분히 세척한 후에 발색제로 DAB를 사용하였다. 발색반응이 끝난 뒤 elution 용액으로 조직과 항체와의 결합을 분리한 뒤 각각 nestin, GFAP(glial fibrillary acidic protein; mouse monoclonal, 1:100, Sigma, St. Louis, MO)으로 이중면역염색을 시행한다. 발색제로 nickel hydrochloride를 이용하였다.

형광면역반응은 BrdU에 대한 항체(sheep poly-Ab, 1:100; Biosdesign, Saco, Maine)와 neurofilament(mAb, 1:100; Sigma, St. Louis, MO), GFAP 또는 microtubule associated protein

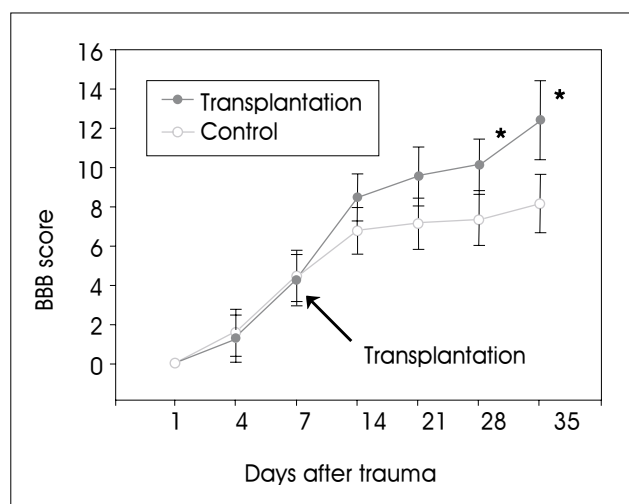


Fig. 3. Analysis of locomotor recovery as measured by Basso, Bresmahn, and Beattie locomotor rating scale scores. Animals treated with cord blood cells 1 week after spinal cord injury show significantly improved locomotor recovery. (*, $P < 0.05$. Data represent means \pm S.E.)

2(MAP-2, mAb, 1:100; Sigma, St. Louis, MO)를 반응 시킨 후 이차항체로 texas red가 결합되어 있는 anti-sheep antibodies(anti-sheep poly-Ab, 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA)과 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합되어 있는 anti-mouse antibodies(1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 반응시킨 후 confocal microscope으로 검경 하였다.

결 과

신선 제대혈 단핵구 세포에서 nestin 및 CD 133항원의 발현

Nestin 항원의 발현을 일부의 세포에서 관찰할 수 있으며 역시 세포막항원인 CD133항원의 발현도 일부의 단핵구에서 관찰되었다(Fig. 1A, B). 이들 항원의 동시발현여부를 구명하기 위하여 시행한 이중 형광면역염색법에서 CD133항원을 발현하는 세포의 $60 \pm 8\%$ 의 세포가 nestin항원을 동시에 표현함을 확인할 수 있었다(Fig. 1C,D).

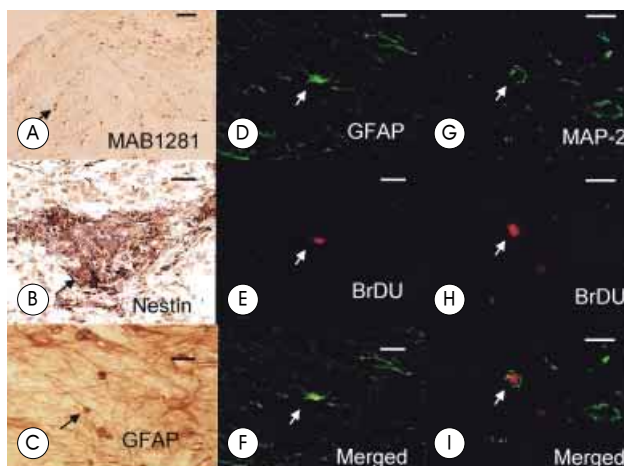


Fig. 4. Expression of anti-human nuclear antibody (MAB1281), nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in the injured spinal cord [transplanted with bromodeoxyuridine (BrdU) incorporated HUCBs]. A: MAB1281 antigens were found in injured spinal cord tissue, suggesting that transplanted HUCBs integrate well in the rat spinal cord (the arrow indicates MAB1281 immunoreactive cells). B: Double immunohistochemical staining with MAB1281 and anti-nestin antibody showing transplanted HUCBs form nestin-expressing cell clusters (the arrow indicates a MAB1281 immunoreactive nestin-expressing cell). C: Double immunohistochemical staining with MAB1281 and anti-GFAP antibody showing some transplanted HUCBs differentiate astrocytes (the arrow indicates a MAB1281 immunoreactive GFAP-expressing cell). D-I: Immunofluorescent Rhodamine (red) showed that anti-BrdU-reactive HUCBs (E, H) express phenotypes of astrocytic marker GFAP (D) and neuronal marker MAP-2 (G) in the recipient rat spinal cord. Laser confocal image showing colocalization of immunofluorescent labels GFAP and BrdU (F), MAP-2 and BrdU (I). Approximately 2% of the BrdU-reactive cells expressed GFAP (astrocytes) and less than 1% MAP-2 (neurons). Bar = 15 μ m.

신선 제대혈 단핵구 세포에서 nestin 및 CD 133 mRNA 발현

Nestin 과 CD133 mRNA 의 발현을 RT-PCR법을 이용하여 확인하였다(Fig. 2). 성인의 혈액내 단핵구에서는 nestin 및 CD133 mRNA의 발현이 관찰되지 않으나 제대혈 단핵구에서 추출한 RNA에는 nestin 및 CD133 mRNA의 발현을 확인할 수 있다.

척수손상백서의 신경기능회복

척수신경 손상부위에 제대혈 단핵구를 이식한 실험군(n=20)이 주입한 대조군(n=20)에 비하여 척수신경기능회복이 촉진됨을 확인할 수 있다(p<0.05)(Fig. 3). 대조군의 BBB점수는 각각 평균 4.5(2주), 7.2(3주), 8.25(5주)였으며, 실험군은 각각 4.3(2주), 9.4(3주), 12.5(5주) 였다.

제대혈 단핵구 이식 척수조직 면역염색

항 human nuclear protein항체인 MAB1281로 염색한 척수 조직내 제대혈 세포가 이식되어 생존하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 이들 MAB1281양성 세포중 일부는nestin 항원을 발현하고 있으며 특히 nestin 양성 세포들은 척수 조직내 세포군집을 이루고 있었다(Fig. 4B).

일부의 MAB1281양성세포에서는 신경 교세포 특이 항원인 GFAP를 발현하는 양성세포로 분화되었음을 확인하였다(Fig. 4C).

BrdU양성세포에서 GFAP, MAP-2, neurofilament의 발현여부를 confocal microscope으로 검사 하였다. BrdU양성세포 중 일부에서 신경교세포 특이항원인 GFAP(Fig. 4D,E,F)와 신경세포 특이항원인 MAP-2(Fig. 4G,H,I)항원을 발현하였다. 신경세포 특이항원인 neurofilament면역염색에서 대부분의 BrdU양성세포들이 neurofilament를 발현하는 신경세포 사이에 위치하는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 5A,B,C) 일부의 BrdU양성세포는 neurofilament를 발현함을 알 수 있었다(Fig. 5D,E,F).

고 찰

중추신경계 손상에 대한 치료는 외과적 치료뿐만 아니라 약물 치료 및 재활치료에 이르기까지 다양한 치료방법이 소개되어 왔다^{6, 32)}. 그러나 오늘날에 이르기까지 신경기능의 회복을 촉진시킬 수 있는 획기적인 치료법은 개발되고 있지 않다. 중추신경계 손상의 치료법 개발이 어려운 가장 큰 이유는 한번 손상된 신경계 조직은 재생이 거의 불가능하기 때문이다. 최근에 성인의 뇌조직 내에도 신경줄기세포가 존재하여 신경손상의 복구를 담당하는 것으로 알려지고 있으나 임상적으로 유용한 효과를 거둘 정도의 역할

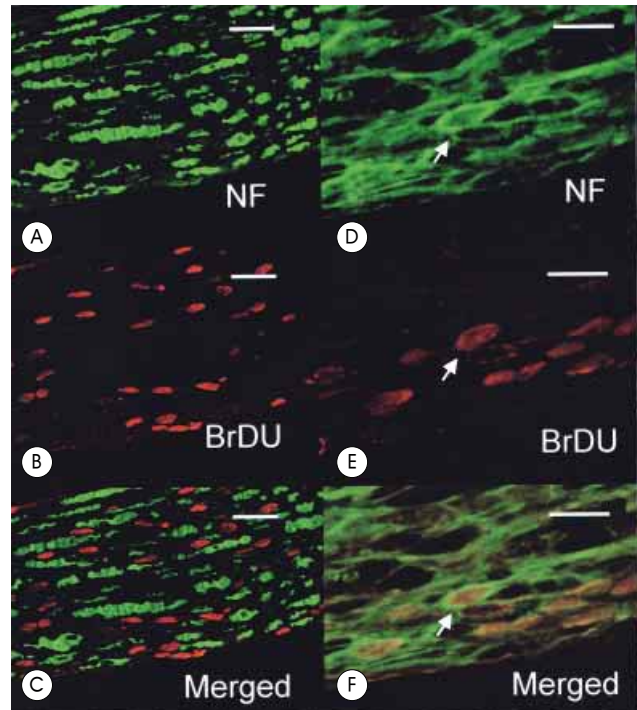


Fig. 5. Expression of BrdU and neurofilament in an injured spinal cord [transplanted with HUCBs incorporating bromodeoxyuridine (BrdU)]. A-F Immunofluorescent Rhodamine (red) showed that anti-BrdU-reactive HUCBs (B,E) express phenotypes of neuronal marker neurofilament (A,D) in the recipient rat spinal cord. The laser confocal image shows the colocalization of immunofluorescent labels neurofilament and BrdU (C,F). Most BrdU immunoreactive cells were not immunoreactive to neurofilament (C). These BrdU expressing cells were arranged mainly along the spinal cord in parallel with neurofilament expressing cells (C). Less than 1% of the BrdU-reactive cells expressed neurofilament on their cytoplasm (F). Bar=15µm

을 수행하지는 못한다²⁰⁾. 따라서 충분한 양의 줄기세포 이식과 같은 치료법에 많은 연구들이 집중되고 있다. 다양한 줄기세포들이 중추신경손상의 공여세포로 연구되고 있으나 각각의 세포들이 가지는 문제점 등으로 인하여 아직까지 임상적으로 유용한 줄기세포는 개발되고 있지 않고 있다^{19,23)}. 대부분의 배아 및 태아조직에서 분리한 줄기세포는 그 분열 및 분화능력의 탁월함에도 불구하고 생체 내에서 분화 및 분열을 인위적으로 조절하기가 매우 힘들뿐 아니라 윤리적 종교적 문제가 아직 해결되지 않고 있어 임상적 유용성은 아직까지 의문시 되고 있다^{11,36)}.

제대혈 줄기세포는 대부분 의학적 폐기물로 처리되어 왔던 태반 혈액에 다량으로 존재하는 줄기세포로 채취가 용이하여 최근까지도 백혈병, 악성빈혈 등 각종 혈액질환의 골수이식에 필요한 공여 세포로서 이용되어왔다^{6,9)}. 그러나 최근의 연구결과들은 이들 제대혈 줄기세포들 역시 혈구세포뿐 아니라 다른 종류의 세포로의 분화 가능성을 제시하고 있다^{17,18,35)}.

본 연구에서 제대혈에서 분리한 단핵구내 신경줄기세포의 표지

자인 nestin항원이 발현됨을 확인할 수 있었다. 특히 대부분의 nestin항원을 발현하는 세포들이 조혈줄기세포 특이 항원으로 알려진 CD 133항원을 동시에 발현하고 있었다²⁶⁾. 이는 제대혈 세포내에 신경세포로의 분화가 가능한 줄기세포의 존재에 대한 간접적인 증거로 여겨진다. 물론 신경줄기 세포의 특이 항원으로 밝혀진 nestin항원 발현이 혈관 내피세포(vascular endothelial cells), 성상세포(astrocytes) 이외에도 hepatic stellate cell과 췌장 islet cell에서도 발견되고 있다^{13,21,31)}. 이러한 보고들은 제대혈에서 nestin항원이 발현되었다는 사실 만으로는 제대혈내 신경줄기세포의 존재를 증명하기는 어렵다는 사실을 시사하고있다. 그러나 제대혈액내 neuronspecific enolase의 활성도가 증가되어 있고²⁾, 중추신경계의 성장이 생후 2년까지도 왕성하게 이루어진다는 사실은 제대혈내 신경줄기세포의 존재를 강력히 제시하는 소견이다.

시험관내 배양실험에서 Ha 등^{14,15)}의 연구에서 시험관내 배양한 제대혈 단핵구로부터 b-mercaptoethanol을 처리함으로써 신경세포 및 신경교세포의 특이항원의 발현을 확인할 수 있고, Sanchez-Ramos 등³⁵⁾도 제대혈 줄기세포로부터 GFAP의 발현을 확인하였으며, Bicknese 등⁷⁾은 bEGF를 처리함으로써 신경항원과 교세포항원을 발현하는 세포로 분화를 유도할 수 있었다. 또한 성인에서도 지속적인 신경세포 생성이 일어나는 해마(hippocampus)의 혈관구조는 다른 뇌조직과는 달리 내피세포 사이의 틈새(vascular niche)구조가 잘 발달되어 있어 혈액으로부터 줄기세포의 이동 및 분화가 유리하게 되어있다는 보고³³⁾는 극히 적은 양이어서 현재의 의학 기술로 분리가 어렵지만 성인의 혈액 내에도 신경세포분화가 가능한 줄기세포의 존재가능성을 제시해준다. 이러한 보고들을 종합해보면 제대혈 줄기세포는 조혈작용뿐만 아니라 신경계 발달에도 중요한 공여세포로서의 역할을 수행하며 신생아기의 순환계는 산소공급 및 각종 면역세포의 이동통로로서의 역할 뿐만 아니라 각종 줄기세포의 이동경로로서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

이러한 실험적 보고들을 바탕으로 본 연구자들은 신생아의 제대혈을 분리하여 척수손상백서의 손상부위에 이식하였다. 본 연구자들은 1주간의 시험관내 배양기간을 두었는데 이는 이 기간 동안 분열세포의 DNA에 특이적으로 삽입되는 BrdU를 처리하여 제대혈 줄기세포에 표지자를 부착시키기 위함이었다²⁵⁾. 배양조건에서 신경세포로의 분화를 유도하기 위한 어떠한 조작도 시행하지 않았으며 1주간 배양한 줄기세포에서 neurofilament나 GFAP와 같은 신경-교세포 항원의 발현을 확인할 수 없었다.

척수손상부위에 제대혈 줄기세포를 이식한 뒤 BBB scoring을 통해 신경학적 회복의 정도를 평가하였는데 제대혈 줄기세포를 이식하였던 경우가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 신경기능의 회복됨을 확인할 수 있었다. 이는 외상성 뇌손상 실험쥐의 꼬리

정맥으로 제대혈 세포를 주입함으로써 신경기능의 회복을 확인한 LuD 등의 보고²⁵⁾와 함께 외상성 중추신경 손상 모델에서 제대혈 줄기세포의 치료효과를 입증한 결과로 사료된다. 본 연구에서는 이식된 세포로부터 성상세포 표지자인 GFAP와 신경세포 특이항원인 MAP-2 및 neurofilament의 발현을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 항원의 발현 정도가 GFAP는 2%, MAP-2 및 neurofilament는 1% 이하의 BrdU 양성세포에서 발현 되는 등 신경세포로의 분화가 극히 소수의 세포에서 일어남을 확인할 수 있었다. 이러한 소견은 이식된 제대혈 세포가 신경기능회복에 미치는 영향이 신경세포로 분화로 인한 효과 보다는 제대혈내 풍부한 각종 줄기세포로부터 분비되는 cytokine들이 손상된 척수조직의 기능회복에 중요한 역할을 하였을 가능성을 제시한다. 이는 조혈줄기세포에서 분비되는 각종 인자들이 조혈세포의 분화 및 성장을 유도할 뿐 아니라 신경계세포들의 분화에도 중요한 역할을 하기 때문이다^{5,30)}.

본 연구에서 이식된 줄기세포들이 신경축삭의 재생에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 희돌기 교세포로의 분화가능성을 확인하지는 못하였다. 일부의 탈수초성 질환 모델에서 골수기질세포를 이식할 때 이식된 기질세포로부터 희돌기 교세포로의 분화가 확인되었던 보고¹⁾는 제대혈 줄기세포들 역시 희돌기 교세포로 분화가능성을 제시하며 추후 연구가 요망된다.

결론

척수손상백서의 척수손상부위에 시험관내에서 1주간 배양한 인간 제대혈 세포를 이식하여 신경기능회복을 촉진시킬 수 있었으며 일부의 이식된 세포로부터 신경세포 및 교세포로의 분화를 확인할 수 있었다.

• Acknowledgement

본 연구는 연세대학교 의과대학 교수연구비(1999-02) 및 인하의대 신진교수연구비(30373)에 의하여 수행되었음.

References

1. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD : Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci* **22** : 6623-6630, 2002
2. Amer-Wahlin I, Herbst A, Lindoff C, Thorngren-Jerneck K, Marsal K, Alling C : Brain-specific NSE and S-100 proteins in umbilical blood after normal delivery. *Clin Chim Acta* **304** : 57-63, 2001
3. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC : A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* **12** : 1-21, 1995
4. Becker D, Sadowsky CL, McDonald JW : Restoring Function after Spinal Cord Injury. *Neurolog* **9** : 1-15, 2003
5. Berezovskaya O, Maysinger D, Fedoroff S : The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neuron vulnerability to injury. *Int J Dev Neu-*

- roschi 13 : 285-299, 1995**
6. Bhattacharya A, Slatter M, Curtis A, Chapman CE, Barge D, Jackson A, et al : Successful umbilical cord blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. **Bone Marrow Transplant 31** : 403-405, 2003
 7. Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA : Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. **Cell Transplant 11** : 261-264, 2002
 8. Buzanska L, Stachowiak E, Stachowiak M, Domanska-Janik K : Neural stem cell line derived from human umbilical cord blood - morphological and functional properties. **J Neurochem (Suppl 2) 85** : 33, 2003
 9. Chivu M, Diaconu CC, Brasoveanu L, Alexiu I, Bleotu C, Banceanu G, et al : Ex vivo differentiation of umbilical cord blood progenitor cells in the presence of placental conditioned medium. **J Cell Mol Med 6** : 609-620, 2002
 10. Constantini S, Young W : The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. **J Neurosurg 80** : 97-111, 1994
 11. Gershon D : Complex political, ethical and legal issues surround research on human embryonic stem cells. **Nature 422** : 928-929, 2003
 12. Gruner JA : A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. **J Neurotrauma 9** : 123-126 ; discussion 126-128, 1992
 13. Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Cho YE, Kim TS : Nestin and small heat shock protein expression on reactive astrocytes and endothelial cells in cerebral abscess. **Neurosci Res 44** : 207-212, 2002
 14. Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, et al : Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. **Neuroreport 12** : 3523-3527, 2001
 15. Ha Y, Yoon DH, Yeon DS, Kim HO, Lee JJ, Cho YE, et al : Neural Antigen Expressions in Cultured Human Umbilical Cord Blood Stem Cells in vitro. **J Korean Neurosurg Soc 30** : 963-969, 2001
 16. Hugenholtz H : Methylprednisolone for acute spinal cord injury : not a standard of care. **CMA J 168** : 1145-1146, 2003
 17. Kadner A, Hoerstrup SP, Tracy J, Breymann C, Maurus CF, Melnitchouk S, et al : Human umbilical cord cells : a new cell source for cardiovascular tissue engineering. **Ann Thorac Surg 74** : S1422-1428, 2002
 18. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, et al : Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. **Stem Cells 21** : 217-227, 2003
 19. Kennea NL, Mehmet H : Neural stem cells. **J Pathol 197** : 536-550, 2002
 20. Kokaia Z, Lindvall O : Neurogenesis after ischaemic brain insults. **Curr Opin Neurobiol 13** : 127-132, 2003
 21. Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF : Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. **Biochem Biophys Res Commun 293** : 670-674, 2002
 22. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al : Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat : neurotrophins and functional recovery. **Neurology 59** : 514-523, 2002
 23. Lim DA, Flames N, Collado L, Herrera DG : Investigating the use of primary adult subventricular zone neural precursor cells for neuronal replacement therapies. **Brain Res Bull 57** : 759-764, 2002
 24. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M : Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. **Neuroreport 12** : 559-563, 2001
 25. Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, et al : Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. **Cell Transplant 11** : 275-281, 2002
 26. Ma Y, Zou P, Xiao J, Huang S : [The expression and functional characteristics of AC(133) antigen in cord blood hematopoietic cells]. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi 41** : 798-800, 2002
 27. Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M : Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. **J Neurotrauma 19** : 1609-1617, 2002
 28. McDonald JW, Howard MJ : Repairing the damaged spinal cord : a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. **Prog Brain Res 137** : 299-309, 2002
 29. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nat Med 5** : 1410-1412, 1999
 30. Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, Spray DC, Kessler JA : Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. **Nature 362** : 62-65, 1993
 31. Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, et al : Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. **Hepatology 29** : 520-527, 1999
 32. O'Connor PA, McCormack O, Gavin C, Dungan R, Kirke C, McCormack D, et al : Methylprednisolone in acute spinal cord injuries. **Ir J Med Sci 172** : 24-26, 2003
 33. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH : Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J Comp Neurol 425** : 479-494, 2000
 34. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al : Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp Neurol 164** : 247-256, 2000
 35. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al : Expression of neural markers in human umbilical cord blood. **Exp Neurol 171** : 109-115, 2001
 36. Saran M : The ethics of cloning and human embryo research. **Princet J Bioeth 5** : 25-36, 2002
 37. Sasai Y : Generation of dopaminergic neurons from embryonic stem cells. **J Neurol (Suppl 2) 249** : II41-44, 2002
 38. Song S, Sanchez-Ramos J : Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. **Methods Mol Biol 198** : 79-88, 2002
 39. Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, et al : Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. **Circulation 107** : 1912-1916, 2003
 40. Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ : In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. **Differentiation 71** : 18-27, 2003