

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 동물
모델에서 아데노바이러스 벡터를
이용하여 BDNF(brain derived
neurotrophic factor)를 발현하는 인간
신경줄기세포의 이식

연세대학교 대학원

의과학과

박 태 훈

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 동물
모델에서 아데노바이러스 벡터를
이용하여 BDNF(brain derived
neurotrophic factor)를 발현하는 인간
신경줄기세포의 이식

지도교수 박 국 인

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월

연세대학교 대학원

의과학과

박 태 훈

박태훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 박국인 _____ 인

심사위원 _____ 박은숙 _____ 인

심사위원 _____ 김주향 _____ 인

연세대학교 대학원

2008 년 12 월

감사의 글

어느덧 2년의 시간이 흘러 석사과정을 무사히 마치게 되었습니다. 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 아낌없는 열정으로 격려해 주신 은사 박국인 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

부족한 논문을 심사해 주시고 충고하여 논문을 완성하게끔 도와 주신 박은숙 교수님과 김주향 교수님께도 감사드립니다.

또한 실험하면서 힘들 때나 즐거울 때나 같이 있어준 실험실 선배님들과 후배들에게 감사드립니다.

마지막으로 항상 옆에서 저를 믿고 아낌없이 지원해 주신 아버지, 어머니와 가족들에게도 감사드리며 지금 이 순간에도 항상 저를 지켜주시고 인도해 주시는 하나님께 감사드립니다.

저자 씀

<차 례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	10
1. 동물 연구대상 모델.....	10
2. 인간신경줄기세포의 배양	10
3. 재조합 adenoviral vector 제작 및 인간신경줄기세포에 감염	11
가. 재조합 adenoviral vector제작	11
나. 인간신경줄기세포에 감염	13
4. 동물모델에 인간신경줄기세포의 이식.....	13
5. 뇌경색크기측정 및 신경조직 화학적 평가.....	14
가. 뇌경색크기측정	14
나. 신경조직 화학적 평가	14
6. 동물모델 행동검사.....	15
가. Neurological test	15
나. Rota-rod test	16
다. Wire maneuver test	16
라. Morris water maze test	16
8. 통계분석.....	17
III. 결과	18
1. 동물 연구대상 모델 확립.....	18

2. 아데노바이러스 감염된 인간신경줄기세포의 BDNF 발현량 확인...	18
3. 동물모델에 이식된 인간신경줄기세포의 분화형태.....	20
4. 뇌경색크기측정.....	23
5. 동물모델 행동검사.....	25
가. Neurological test	25
나. Rota-rod test	27
다. Wire maneuver test	29
라. Morris water maze test	31
 IV. 고 찰	 33
 V. 결 론	 38
 참고문헌	 39
 영문요약	 45

<그림 차례>

그림 1. BDNF를 발현하는 재조합 아데노바이러스 벡터 제작	12
그림 2. Adeno-CAG-BDNF-hrGFP 바이러스에 감염된 인간신경 줄기세포에서 BDNF 발현양	19
그림 3. 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델에 BDNF 발현 인간 신 경줄기세포 이식 후 공여세포의 생착 및 분화형태	21
그림 4. 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델에 BDNF 발현 인간신 경줄기세포 이식 후 공여세포의 생착 및 분화형태와 신 경영양인자 발현 효과	22
그림 5. 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식한 실험군과 대조 군에서 뇌경색 크기 비교평가	24
그림 6. Neurological test를 통한 신경학적 호전여부 평가...	26
그림 7. Rota-Rod test를 통해 평균 지속 시간의 평가.....	28
그림 8. Wire maneuver test를 통해 상지근력의 평가.....	30
그림 9. Water maze test를 통해 학습과 기억 능력의 평가...	32

<국문 요약>

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 동물 모델에서 아데노바이러스 벡터를 이용하여 BDNF(brain derived neurotrophic factor)를 발현하는 인간 신경줄기세포의 이식

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 (neonatal hypoxic-ischemic brain injury)은 주산기 가사 (perinatal asphyxia)에 의해서 신생아에서 발병하는 대표적 중증 신경계 질환으로 만삭아 1000명 출생아 중 2명에서 발병하고, 미숙아의 경우 약 60%까지 발생한다고 보고되며, 이들 중 상당수에서 신경발달 장애소견을 보인다. 허혈성 뇌 손상은 일반적으로 대뇌피질(cerebral cortex), 해마(hippocampus)등의 부위에서 현저하나 신생아에서는 간뇌 (diencephalon), caudate nucleus, putamen, globus pallidus 등의 기저핵 (basal ganglia) 부위에도 신경세포의 손상이 두드러져 영구적 신경기능상실을 초래한다. 현재까지의 연구에 의하면 손상된 중추신경계의 재생은 거의 불가능하거나 극히 제한적이기 때문에 대부분의 치료는 합병증을 예방하거나 비정상적인 운동 패턴과 경직을 감소시키는데 더욱 중점을 두어 왔다. 또한 척수손상, 뇌졸중 및 파킨슨병 등에서 신경치료는 각종 동물 모델을 통한 연구가 활발히 진행 중이나, 저산소성-허혈성 뇌손상 모델에 대한 연구는 그다지 많지 않은 편이다. 최근 들어 저산소성-허혈성 뇌손상에 대한 많은 연구가 이뤄지고 있고 임상적인 치료를 통해 생존율이 증가한 것은 사실이지만 생존한 경우에도 신경학적 장애를 보이고 있기 때문에 보다 근본적인 치료방법이 절실하다.

신경줄기세포란 미성숙, 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가 갱신 (self-renew)을 보이고, 신경원세포 (neuron) 및 신경교세포 (glia)로 분화하는 분화의 다능성 (multipotency)을 보이는 세포로 정의된다. 신경줄기세포의 증식, 성장 및 분화에 대한 기초연구와 줄기세포의 가소성 (plasticity)을 이용하여 한번 손상되면 특별한 치료 방법이 없는 난치성 신경계질환에 대한 세포 및 유전자치료를 시도할 수 있어

신경계에 대한 재생 의학적 접근 가능성을 제시한다고 하겠다. 뇌손상 후 신경 화학적 변화는 세포사 반응뿐만 아니라 내인성으로 신경보호 반응도 함께 일어나 신경보호 효과를 나타낸다. 이런 경우 중요한 역할을 하는 것이 신경영양인자(neurotrophin)이며 또 회복 과정에서 신경영양인자는 신경가소성을 이끄는 것으로 생각되고 있다. 그 외 신경영양인자는 척추동물의 신경계 발생과정 중 신경세포의 생존과 분화를 결정하는데 절대적으로 필요한 물질이다. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 nerve growth factor (NGF)와 더불어 대표적인 신경영양인자로서 감각신경세포와 운동신경세포의 생존에 중요한 역할을 할뿐만 아니라, 척추동물의 발생과정에서 axon과 dendrite의 성장, 새로운 시냅스의 형성 등 신경세포의 여러 활동에 많은 영향을 끼친다. 또한 중추신경계에서 신경세포 생존과 분화뿐만 아니라 시냅스전달(synaptic transmission)과 시냅스 가소성(synapse plasticity)의 분자기전에 필수적인 역할을 담당하고 있다.

본 연구에서는 생후 7일의 CD-1 쥐에서 우측 경동맥을 결찰 하여 영구적인 허혈성 뇌손상을 유발한 후, 8%의 저 산소 통에서 90분 동안 저산소증에 노출하여 저산소성 허혈성 뇌손상을 유발하였다. 그리고 BDNF를 발현하는 adenoviral vector를 제작하여 임신 13주 태아 종뇌 (telencephalon) 부위에서 채취되어 배양된 인간신경줄기세포에 감염시켜 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 확립하였다. 저산소성 허혈성 뇌손상 동물모델을 대상으로 생후 14일 경 실험군으로는 인간신경줄기세포와 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 각각 뇌손상 부위에 이식하였고, 대조군으로는 H-H buffer를 뇌손상 부위에 주입하였다.

본 연구 결과 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식한 실험군에서 대조군에 비해 뇌경색증 부위의 크기가 유의 있게 감소함을 확인하였으며 ($p < 0.05$), 행동능력평가에 있어서 rota-rod와 wire maneuver test에서는 실험군과 대조군 간에 유의한 차이가 관찰되지는 않았지만 neurological test에서 인간신경줄기세포 및 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식한 실험군이 대조군에 비해 neurological score가 감소하는 경향을 확인하였다. 또 Morris water maze test에서는 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군에서 대조군에 비해 학습과 기억능력이 향상됨을 보였다. 면역조직화학

검사를 통하여 동물모델에 이식된 인간신경줄기세포가 뇌경색증 부위에서 확고히 정착 됨을 관찰하였고, 공여세포는 주로 신경원세포로 분화하였으며 뇌경색증 주위 부위의 대뇌 피질 신경원세포의 신경돌기들의 신장이 발달되었음이 관찰되었다.

결론적으로 신생아 저산소성-허혈성 뇌손상 동물 모델에 인간 신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식할 경우 뇌경색 크기가 감소하였고, 운동행동 능력 검사에서는 상지 운동능력과 운동조정기능에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았지만 Neurological test상 신경학적 기능은 향상되었고, Morris water maze test 상 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식한 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의 있게 학습 및 기억능력의 향상을 확인하였다. 따라서 신생아 저산소성 허혈성 뇌손상에서 인간신경줄기세포 혹은 신경영양인자 발현 인간신경줄기세포의 이식은 뇌손상 부위를 감소시키고, 손상된 신경세포를 대체 및 재생시켰으며, 신경 기능 및 인지기능의 향상을 유발하는 세포 및 유전자치료법을 제공하여, 향후 뇌성 마비 등의 중증 난치성 신경계질환에서 신경재생치료 가능성을 제시하였다.

핵심 되는 말 : 신생아 저산소성-허혈성 뇌손상, 인간신경줄기세포, 신경영양인자, BDNF, 세포치료, 유전자치료, 세포 이식

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 동물 모델에서 아데노바이러스 벡터를
이용하여 BDNF(brain derived neurotrophic factor)를 발현하는 인간
신경줄기세포의 이식

<지도교수 박국인>

연세대학교 대학원 의과학과

박 태 훈

I. 서론

신경줄기세포란 미성숙, 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가 갱신 (self-renew)을 보이고, 적어도 신경원세포 (neuron) 및 신경교세포 (glia)로 분화하는 분화의 다능성(multipotency)을 보이는 세포로 정의된다. 이러한 신경줄기세포는 태아 신경계 전반에 걸쳐 다양한 해부학적 부위에서 존재하며, 최근에는 태아뿐만 아니라 성체의 신경계에서도 줄기세포가 존재하고, 일생을 통하여 특정 부위에서 새로운 신경원세포를 생성한다는 사실이 밝혀졌다.¹⁻⁴ 따라서 향후 신경줄기세포의 증식, 성장 및 분화에 대한 기초연구와 줄기세포의 가소성 (plasticity)을 이용하여 한번 손상되면 특별한 치료 방법이 없는 난치성 신경계질환에 대한 세포 및 유전자치료를 시도할 수 있어 신경계에 대한 재생 의학적 접근 가능성을 제시한다고 하겠다. 최근에 난치성 신경계질환에 대한 유전자 및 세포 치료에 있어서 신경줄기세포를 이용하고자 하는 관심이 커지고 있는 것도 이 때문이다.

신경줄기세포의 치료적 가능성을 요약해보면, 먼저 신경줄기세포는 배양접시에서 쉽게 치료에 필요한 유전자를 세포에 전달할 수 있다.⁵⁻⁸ 간편하고 안전한 방법으로 뇌 혹은 척수 부위에 이식이 가능하고 이식 후 전체 중추신경계에 생착 및 통합된

다. 또한 외부에서 주입한 유전자를 직접적, 지속적, 그리고 조절되는 양상으로 분비할 수 있다.^{6,9} 그리고 손상된 신경계에 신경줄기세포를 이식했을 경우 전체 신경계에 통합되어 미세환경신호를 받아 구조학적 및 기능적으로 적절한 신경세포로 분화해 기능부전을 보이거나 사망한 신경세포를 대체하고, 손상된 신경망을 재건해 중추신경계를 재생케 하는 가능성을 보인다.^{3,7,10} 이외에도 전체 신경계에 걸쳐 광범위하게 이주(migration)하므로 국소성(focal)뿐만 아니라 전신성 신경계질환에 있어서도 손상된 신경세포, 모자라는 효소 및 신경영양인자 등 치료에 유용한 다양한 물질을 제공할 수 있다.¹² 신경줄기세포를 이용해 유전자치료를 할 경우 기본적으로 유전자의 발현이 신경계에 국한되므로 유전자 치료에 따른 부작용을 최소화할 수 있다. 줄기세포를 퇴행성 신경질환 동물모델에 이식하면 신경 병소에서 발현되는 여러 신호에 반응해 손상된 부위에 확고히 정착하고, 신경손상 부위로 특이적으로 이주하며, 적절한 신경세포로 분화해 손상된 신경세포를 대체 및 재생함을 보인다. 또 최근 조직공학의 발달로 개발되는 다양한 고분자화합물과 신경줄기세포를 공동 배양할 경우 신경세포뿐만 아니라 신경조직의 재생을 유도할 수 있다.⁵⁻¹²

신경줄기세포는 신경계에서 유래되었으므로 본태성 (intrinsic)으로 저 농도의 정상 신경세포 고유의 미만성 및 비미만성 인자 (lysosomal enzyme, 신경영양인자, 세포외기저물질, 세포유착인자, 수초, homeoproteins 등)를 분비하므로, 외부에서 이입한 유전자의 표현이 비활성화 되어도 많은 치료적 및 신경발달학적으로 유용한 물질을 계속 제공할 수 있고, 그 외에 아직 알려지지 않은 신경세포 특이 생리활성인자의 공급도 가능하다.¹³⁻¹⁵ 각각 다른 (비)바이러스성 vector를 사용하여 여러 종류의 외부 유전자를 한 세포에 동시에 공급하여 표현케 할 수 있으며 이를 이용하여 외부 유전자산물 (gene products)을 전신성 뇌 병소 부위에 광범위하게 발현케 하는 경우 기본적으로 유전자산물의 발현은 신경계에 국한되므로, 정맥주사 등의 방법을 통한 신체 전반적으로 투여하는 경우에 비하여 유전자 치료에 따른 부작용을 최소화할 수 있다. 세포 이식 방법의 변화 시 원하는 치료인자를 필요로 하는 신경세포들 근접부위에 주입할 수 있어 원거리에 존재하는 다른 신경세포들에 대한 부작용도 최소화할 수 있다.¹⁶⁻¹⁹ 또한 한 종류 및 한 개체 설치류에서 신경줄기세포를 개

발하여 같은 종 혹은 다른 종의 설치류에 뇌 이식 시, 면역억제제를 사용하지 않아도 특별한 거부반응이 없는 면역내성을 보이므로, 한 종류의 신경줄기세포는 같은 종의 여러 개체에 효율적으로 사용될 수 있고, 본 세포를 바이러스성 vectors를 만드는 세포로 사용할 경우 생체 내에서 광범위하게 vectors를 분포시킬 수 있어, 광범위한 신경조직 부위에 바이러스성 vector-매개성 유전자 치료를 할 수도 있다.¹⁴⁻¹⁷이 외에도 생분해성 합성 고분자화합물 (biodegradable synthetic polymer matrix)과 공동배양 시 세포의 성장, 증식 및 분화가 촉진되므로 신경줄기 세포를 조직 공학적 방법으로 이용하여 신경조직의 재생을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 급만성으로 진행되는 신경퇴행변성 (neurodegeneration)시 발생하는 신호에 반응하여 향성 (tropism)과 영양성 (trophism)을 보이는데, 신경계에 이식 후 손상된 부위에 확고한 생착 및 외부 유전자 발현을 보이고, 신경손상 부위로 특이적으로 이주하는 현상을 보이며, 태아기 신경계뿐만 아니라 출생 후 신경손상 시에도 발현되는 신경세포생성신호(neurogenic signals)에 반응하여 적절한 신경세포로 분화하여 손상된 신경세포를 대체 및 재생함을 보인다.^{14,15}

신경줄기세포에 관한 많은 연구가 진행되어오고 있지만 아직까지 인간 신경줄기세포의 증식 및 분화상태에서 동반되는 분자학적인 사건과 생물학적인 특징은 명확히 밝혀지지 않았는데, 인간 신경줄기세포의 증식 및 분화상태에서 특이적으로 발현되는 유전자의 동정과 기능분석이 중요하다. 인간 신경줄기세포의 증식 및 분화 시 차별되게 발현되는 유전자를 확인하여 줄기세포의 증식 및 분화관련 유전자를 확인할 수 있는데, 차별 발현되는 유전자를 탐색하기 위한 기존의 gene expression profiling 방법으로는 microarray, differential display PCR (DD-PCR), serial analysis of gene expression (SAGE), subtractive hybridization 등을 들 수 있으나 높은 위 양성 (false positive), 낮은 재현성 및 고 비용 등의 단점이 있다. 최근 PCR 검사의 특이성 부족이라는 단점을 극복하고자 annealing control primer (ACP)를 사용한 Genefishing PCR 방법이 개발되었는데, ACP primer 가운데 부분에 polydeoxyinosine을 넣어서 PCR과정에서 annealing 온도를 아주 높게 하여도 특이적으로 반응할 수 있게 하여 검사의 높은 위 양성율을 줄일 수 있다.¹⁵⁻²⁰

이러한 연구는 신경줄기세포의 증식 및 분화관련 유전자를 확인하고 증식 및 분화 기전을 규명하여 효율적인 증식·배양방법을 개발하고, 특이적인 성숙한 신경세포로 분화를 유도하여, 신경계 이식 시 높은 생착력과 외부유전자 발현을 보이며, 선택적이고 특이적인 신경세포로 분화 유도하여 숙주 신경계에 구조적 및 기능적으로 적절히 통합되어 치료적 유용성이 높은 줄기세포를 확립케 하여 향후 신경줄기세포의 임상적 적용에 도움이 될 것이다.

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 (neonatal hypoxic-ischemic brain injury)은 주산기 가사 (perinatal asphyxia)에 의해서 신생아에서 발병하는 대표적 중증 신경계질환으로 만삭아 1000명 출생아 중 2명에서 발병하고, 미숙아의 경우 약 60%까지 발생한다고 보고되며, 이들 중 상당수에서 신경발달 장애소견을 보인다.¹⁸주산기 (perinatal period)의 허혈-저산소성 손상(hypoxic-ischemic damage)은 신경계통에 커다란 피해를 주며 신생아(neonate)의 신경계통질환의 가장 중요한 원인이기도하다.^{18,21} 허혈에 의한 뇌의 손상은 일반적으로 대뇌겉질(cerebral cortex)이나 해마(hippocampus)등의 부위에서 현저한 것으로 알려져 있으나 신생아에서는 사이뇌(간뇌, diencephalon)와 더불어 바닥핵(기저핵, basal ganglia)에 속하는 꼬리조가비핵(caudateputamen), 그리고 창백핵(담창구, globus pallidus)등에도 신경세포의 손상이 두드러진다. 이는 뇌 순환 장애로 뇌혈관에 의해 공급되는 뇌의 해부학적 부위의 기능 이상을 일으켜 나타나는 질환으로 일시적 또는 영구적인 기능상실을 초래한다.²³⁻²⁸질병 발병 이후 사망률과 예후는 뇌손상의 정도, 손상위치, 연령 등에 따라 다르게 나타나며 회복은 신경학적 회복과 기능적 회복으로 분류된다. 신경학적 회복은 발병 후 첫 2주 동안에 이루어지는데 회복되는 속도가 가장 빠르고 회복의 50%가 이 시기에 나타나며, 기능적 회복은 외부환경, 운동의 중재 유무, 환자의 의지력 등에 의해 좌우된다.²⁹⁻³¹

현재까지의 연구에 의하면 손상된 중추신경계의 재생은 거의 불가능하거나 극히 제한적이기 때문에 대부분의 치료는 합병증을 예방하거나 비정상적인 운동 패턴과 경직을 감소시키는데 더욱 중점을 두어 왔다. 또한 척수손상, 뇌졸중 및 파킨슨 병 등에서 신경치료는 각종 동물 모델을 통한 연구가 활발히 진행 중이나, 저산소성-

허혈성 뇌손상 모델에 대한 연구는 그다지 많지 않은 편이다.²²

뇌손상 후 신경 화학적 변화는 세포사 반응뿐만 아니라 내인성의 신경 보호 반응도 함께 일어나 신경 보호 효과를 나타내는데 이러한 중요한 역할을 하는 것이 신경영양인자(neurotrophin)이며, 회복 과정에서 신경가소성을 이끄는 것으로 고려되는 것 또한 신경영양인자이다. 신경영양인자는 척추동물의 신경계 발생과정 중 신경세포의 생존과 분화를 결정하는데 절대적으로 필요한 물질이다.³²⁻³⁴ 예를 들어, NGF(nerve growth factor)와 BDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)는 각각 감각신경세포와 운동신경세포의 생존에 중요한 역할을 할뿐만 아니라, 척추동물의 발생과정에서 axon과 dendrite의 성장, 새로운 시냅스의 형성 등 신경세포의 여러 활동에 많은 영향을 끼친다.^{34,35,38}

BDNF는 NGF에 이어 발견된 신경영양인자로서 중추신경계에서 신경세포 생존과 분화뿐만 아니라 시냅스전달(synaptic transmission)과 시냅스 가소성(synapse plasticity)의 분자기전에 필수적인 것으로 보이며, BDNF의 모든 기능은 그 수용체 TrkB와 결합하여 tyrosine kinase를 활성화시켜 다양한 세포 간 신호전달 경로의 방아쇠 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³⁵⁻³⁷ BDNF는 해마, 편도체, 시상, 후각계의 투사 영역, 신경질의 피라미드층, 담창구, 소뇌, 상구 등에서 관찰된다. 지금까지 알려진 BDNF의 작용을 보면 신경유래(neural crest-derived)의 감각신경절세포, 도파민 함유 신경세포, 세로토닌 함유 신경세포 등의 매우 다양한 종류의 신경세포에 대해서 생존이나 발달에 관여하는 영양인자의 기능을 가지고 있는 것으로 보고되었다.^{33,34-38}

이에 본 연구에서는 다양한 해부학적 부위 및 신경발달 단계에 있는 인간의 태아 중추신경계에서 유전자변형 없이 인간 신경줄기세포를 분리 및 배양하여 생체 외에서 증식, 성장 및 분화 특성을 확립하고, 신경줄기세포를 이용한 치료를 통해 손상된 신경 혹은 교세포를 대체하여 기존의 숙주 신경조직에 성공적으로 통합되고 적합한 기능을 발휘하는 것이다. 더 나아가 신경줄기세포의 효과를 보다 향상시키기 위해 각종 신경영양 인자 및 성장 인자를 이용한 유전자 치료와 병행하여 이식된 신경줄기세포의 생존, 이동, 분화 및 축삭의 성장 및 신경연접의 형성을 함께 고려

하고 있다. 즉, 신생아 저산소성-허혈성 동물모델(neonatal hypoxic-ischemic brain injury)을 통해 인간신경줄기세포와 신경영양인자 BDNF를 발현하는 인간신경줄기세포를 이식함으로써 공여세포의 이동과 공여세포의 생착 및 신경병소와의 특이적 관계를 관찰하고, 신경세포로의 분화형태를 확인하며, 뇌경색크기의 비교측정을 통해 숙주 신경세포의 생존 혹은 세포사멸에 미치는 영향, 모델동물에 있어서 신경학적 증상 호전 여부 및 학습과 기억능력에 미치는 영향 등을 연구하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물연구대상 모델

생후 7일의 CD-1(ICR) 쥐에서 우측 경동맥(common carotid artery)를 노출시키고 영구적으로 결찰 하여 허혈성 뇌손상을 유발하였다. 2시간의 회복시간이 주어진 후 온도 조절장치와 산소 측정기(MAXTEC, Salt lake city, UT, USA)가 장착된 chamber내에서 37°C, 산소8%의 환경에서 1시간 30분 동안 유지하였다. 이들은 모두 동물 보호 규정에 의해 관리되며 12시간 간격의 light/dark cycle에서 유지하였다.

2. 인간 신경줄기세포의 배양

과학기술부 및 보건복지부의 생명윤리법안 연구지침을 따르고, 세브란스병원 IRB의 승낙을 받은 후, 임신 13주에 자연 유산되어 사망한 태아의 종뇌 (telencephalon) 부위에서 사전에 보호자의 동의서를 획득한 후, 일부 신경조직을 채취하여 신경줄기세포를 배양하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Ham's F-12 (1:1)(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 이하 세포배양에 사용한 모든 재료는 특이 기재 사항이 없는 한 GIBCO社 제품임)에 1%의 N₂ supplement, 100 units/ml penicillin G sodium과 100 µg/ml streptomycin sulfate (1X P/S)의 항생제를 첨가한 배지 (N₂ 배지)를 기본으로 배양하였고, mitogenic cytokines으로 20 ng/ml의 basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D, Minneapolis, MN, USA), 8 µg/ml의 heparin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 ng/ml의 leukemia inhibitory factor (LIF; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 3-4일마다 배지를 교환하고 7-9일 마다 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA(T/E; GIBCO)를 2분 30초간 처리하여 계대 배양하였다.

3. 재조합 아데노바이러스의 제작 및 인간신경줄기세포에 감염

가. 재조합 아데노바이러스의 제작

BDNF를 cloning 하기 위하여 인간 신경줄기세포에서 mRNA 추출한 후 cDNA 합성하고, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 subcloning(pGEM-T easy-BDNF)하였다. 이때 cDNA의 양 끝단에 BglII와 XhoI restriction site를 tailing하였고 여기에서 얻은 각각의 plasmid를 다시 DH5 α 에 transformation한 후, CsCl₂법으로 mega-prep하여 제한효소 (BglII, XhoI)로 자른 후 전기영동하고, band를 분리 정제하여 pShuttle-IRES-hrGFP vector(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 cloning하였다. Cloning 한 pShuttle-BDNF-IRES-hrGFP Plasmid를 BJ5183 strain E.coli.에 pAd Easy-1 (E1, E3 deleted Adenovirus type 5)와 co-transformation시켜 homologous recombination을 유도하였다. 이렇게 얻은 pAd Easy-BDNF-IRES-hrGFP PacI으로 digestion하여 homologous recombination을 확인하고, 293A cell에 CaCl₂방법으로 transfection하여 Adeno-BDNF-IRES-hrGFP를 제작하였다. 최종적으로 CsCl₂ gradient방법으로 바이러스를 dialysis membrane (Pierce, Rockford, IL, USA)으로 정제하여 CsCl₂을 완전히 제거하였다. Recombinant adeno-viruses의 replication competent virus인지 여부를 A549 plaque assay를 이용하여 평가하고, virus titer는 293 cells을 이용 plaque assay하였다. 또한 Purified viruses 는 PBS with 30% sucrose에 넣어서 사용 시까지 보관하였다.

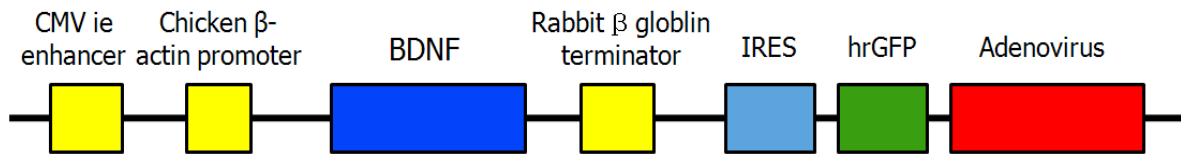


그림 1. BDNF를 발현하는 재조합 아데노바이러스 벡터 제작.

CAG promoter는 CMV immediate early(ie) enhancer, chicken β -actin promoter, rabbit β -globin terminator로 구성되어 있다(노란색; CAG 프로모터, 파란색; BDNF, 하늘색; IRES, 초록색; hrGFP, 빨간색; adenovirus genome). BDNF는 adenovirus genome에 의하여 숙주 세포 내부로 전달되며, CAG 프로모터에 의하여 발현된다.

나. 인간신경줄기세포에 아데노바이러스 감염

상기 제작된 Adeno-CAG-BDNF-hrGFP 바이러스의 감염을 위해, 인간신경줄기세포를 N₂ 배지를 기본으로 bFGF, heparin, LIF를 첨가하여 배양하였고 한 시간 후에 Adeno-CAG-BDNF-hrGFP 바이러스를 35 MOI로 세포에 감염시켰다.

감염 24-48 시간 후 새로운 배지로 바꿔주고 형광현미경으로 관찰하여 감염 여부와 안정성을 확인하였다. 그리고 감염된 인간신경줄기세포에서의 BDNF발현 여부와 발현 정도를 확인하기 위해 ELISA 방법을 이용하여 신경영양인자 발현 여부 및 정도를 확인 및 정량하였다.

4. 동물모델에 인간신경줄기세포 이식

실험동물군은 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델(hypoxic-ischemic brain injury)에 인간 신경줄기세포를 이식한 군(HFT13군; n=36), BDNF를 발현하는 인간 신경줄기세포를 이식한 군(HFT13-Ad-BDNF군; n=36)이고 대조군은 H-H buffer를 이식한 군(Vehicle군; n=36)으로 나누었다.

이식할 인간 신경줄기세포는 5-bromodeoxyuridine(BrdU, 2 μ M)이 첨가된 배지에서 5일간 배양하고, 이식을 위하여 T/E 처리하여 단일세포로 만들고, 남아있는 BrdU를 제거하기 위해 H-H buffer (1X Hanks' balanced salt solution, 10mM HEPES, pH 7.4)로 3회 세척하고, 0.05% trypan blue로 염색하여 8 \times 10⁴cells/ μ l을 준비하였다. 이와 같이 준비된 인간 신경줄기세포는 이식할 때까지 얼음에 보관하였다. 이식 3일 전에 BDNF를 발현하는 재조합 아데노바이러스(Ad-CAG-BDNF hrGFP)를 35MOI로 인간신경줄기세포에 감염시키고 H-H buffer로 3차례 세척하였다. 뇌손상을 유발한지 1주일 후 동물모델을 ketamine(50mg/kg)과 Rompun(10mg/kg)으로 마취시키고, 머리의 피부를 70% 알코올로 소독하고 절개한 후, micropipett을 이용하여 1 \times 10⁵cells/ μ l의 세포 부유 액 총 12 μ l를 쥐의 뇌경색 부위에 주사하였다. 수술도구는 모두 멸균 처리하여 사용하였고 수술부위는 요오드 연고로 소독하고 봉

합하였으며, 마취가 깰 때까지 37°C warm pad에서 안정화시키고, 이식된 인간 신경 줄기세포에 대한 면역거부반응을 막기 위해서 이식 하루 전부터 실험동물이 사망할 때까지 매일 cyclosporine (10mg/kg/day; 종근당, 서울, 대한민국)을 증류수에 희석하여 피하 주사하였다.

5. 뇌경색 크기 측정 및 신경조직 화학적 평가

가. 뇌경색 크기 측정

실험군 및 대조군 동물들은 행동평가가 모두 완료된 시점 (뇌손상 유발 후 12주 경)에서 뇌를 적출한 후 각각 4% paraformaldehyde로 고정한 후, 30% sucrose in 1xPBS로 cryoprotection, OCT mounting medium에 얼렸다. 18 μ m로 Bregma+3.2mm에서 Bregma-5mm까지 4절편 당 1절편씩 취하며 cryosection을 하였다. 각 절편은 54 μ m의 간격을 보인다.

각 조직은 Hematoxylin Gill's formular (vecotor, Burlingame, CA, USA)과 Eosin-Y (sigma, St. Louis, MO, USA)으로 염색을 하고 Virtual microscope (Olympus BX51, Tokyo, JAPAN)으로 사진을 찍은 후 Image J (Broken symmetry software, NIH)를 이용해 면적을 구하였다. 전체 뇌 부피와 뇌경색 부위의 부피는 각 절편의 면적에 두께(18 μ m)를 곱한 후 절편의 합을 구하고, 뇌경색 부피 비율은 정상 측 대뇌반구 부피에서 뇌경색 측 대뇌반구의 부피를 빼고 다시 정상 측의 대뇌반구 부피로 나눈 후 100을 곱하여 정상 측 대뇌반구 부피에 대한 뇌경색 부피의 비율(%)로 구하였다. 뇌경색 부피 (Infarction volume) (%) = (정상 측 대뇌반구 부피 - 뇌경색 측 대뇌반구 부피) / 정상 측 대뇌반구 부피 \times 100

나. 신경조직 화학적 평가

인간신경줄기세포를 이식한 동물의 뇌에서 인간신경줄기세포의 생착과 분포 그리

고 분화정도를 알아보기 위해 면역조직화학염색법을 실시하였다.

실험군 및 대조군 동물들은 행동평가가 모두 완료된 시점(약 12주 후)에서 뇌를 적출한 후 각각 4% paraformaldehyde로 고정한 후, 30% sucrose in 1xPBS로 cryoprotection, OCT mounting medium에 얼렸다. 18 μ m로 Bregma+3.2mm에서 Bregma-5mm까지 4절편당 1절편씩 취하며 cryosection을 하였다. 각 절편은 54 μ m의 간격을 보인다.

슬라이드를 blocking solution (3% Bovine Serum Albumin, 10% Normal Donkey Serum (NDS), 0.2% Triton \times 100 in PBS)에 실온에서 1시간 동안 반응 후, carrier solution (3% NDS, 0.2% Triton \times 100 in PBS)에 rabbit anti-GFP (Invitrogen; 1:200), mouse anti-TuJ1 (Sigma; 1:100), mouse anti-NeuN (Chemicon; 1:40) 항체를 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 반응하였다. 1X PBS로 3회 세척하고 Fluorescein(FITC)-conjugated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, INC., Burlingame, CA, USA; 1:180)과 Texas red(TR)-conjugated anti-mouse IgG (Vector; 1:180)를 carrier solution에 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 10분 반응하였다. 다시 1X PBS로 3회 세척 후 mounting하여 면역현광현미경으로 분석하였다.

6. 동물모델 행동평가

실험동물군은 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델(hypoxic-ischemic brain injury)에 인간신경줄기세포를 이식한 군 (HFT13군; n=36), BDNF를 발현하는 인간신경줄기세포를 이식한 군 (HFT13-Ad-BDNF군; n=36)이고 대조군은 H-H buffer를 이식한 군 (Vehicle군; n=36)과 정상 쥐 군 (Intact군; n=21)으로 나누었다.

각 평가는 실험군과 대조군 모두 시행하며 인간신경줄기세포를 이식한지 3주 후부터 2주 간격으로 11주까지 실시하였다.

가. Neurological test:

동물의 꼬리를 잡고 들어 올렸을 때 (tail suspension) 앞다리의 굴곡(forelimb flexion) 및 몸통 뒤틀기(torso twisting) 관찰, 동물을 평평한 바닥에 놓고 몸통을 뒤집을 때 자발적으로 돌아오는지 여부(right reflection), 동물의 앞다리를 실험대 경계에 놓고 뒷발을 천천히 신전시켰을 때의 반응(placing reaction), 동물을 평평한 판위에 두고 살짝 던져 올렸을 때 발가락의 퍼짐(toe spreading)을 관찰하여 정상이면 '0', 비정상이면 '1'을 주어 각 동물의 점수를 매겼다. 실험군 및 대조군에서 세포이식 3주후부터 2주 간격으로 11주까지 실시하였다.

나. Rota-Rod test:

운동조정기능(motor coordination)을 측정하기 위해 Rota-Rod(Columbus Instruments, Columbus, OH, USA)는 지름3cm인 rotation rod위에 동물을 놓고 4~40rpm의 속력으로 회전하는 rod에서 동물이 떨어질 때까지의 시간을 5분 동안 측정하였다. 3차례 시행하여 평균 지속시간(mean latency)을 분석하였고, 실험군 및 대조군에서 세포이식 3주후부터 2주 간격으로 11주까지 실시하였다.

다. Wire maneuver test:

상지근력(forelimb strength)을 측정하기 위하여 wire maneuver test를 실시하였다. 지름이 2 mm 되는 wire를 지상 60cm 높이에 150cm 길이로 설치하고, 바닥은 짚을 10cm 높이로 깔아 떨어지는 충격을 감소시킨 후, 앞발로 wire를 잡게 한 뒤, 쥐의 몸이 바닥과 수평이 되도록 유지한 상태에서 꼬리를 놓았다. 쥐를 매달고 손으로 몸을 받쳐서 처음 적응 하는 시간 10초를 준 후, 최대 180초 동안 매달아 놓고 쥐가 떨어지는 시간을 초단위로 기록하였다. 실험군 및 대조군에서 세포이식 3주후부터 2주 간격으로 11주까지 실시하였다.

라. Water maze test :

해마를 이용하는 공간지각 학습능력검사를 인간 신경줄기세포 이식 후 12주에 시행하였다. 지름 90 cm 높이 30cm 흰색 수조에 22℃물을 넣고 Skim Milk (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 혼합하여 불투명하게 하고 물 표면에서 1.5 cm 아래에 투명한 Plexiglas 플랫폼을 북서쪽 사분면에 설치하였다. 실험동물마다 하루에 수조의 네 방위에서 실험동물의 수영을 시작하여 한번 씩 실험을 시행하며 6일간 계속하였다. 한 시행마다 쥐가 헤엄쳐서 플랫폼에 위치하여 15초 동안 머무르게 하고 4분 동안 쥐의 젖은 털을 말려주었다. 이때 쥐가 60초 동안 플랫폼을 찾지 못하면 플랫폼으로 긴 막대를 이용하여 안내하여 주고 역시 15초 동안 머무르게 한다. 6일간의 학습과정 후 7일차에 probe test를 실시하는데 이때는 플랫폼을 제거하고 남동쪽 사분면에서 실험동물의 수영을 시작하여 60초 동안 어느 지역에 쥐가 머무르는가를 측정하였다. 이러한 전 과정은 video-tracking system으로 관찰되며 수영거리, 플랫폼에 도달까지 시간, 수영 속도, 수영 지역을 수집, 분석하였다.

7. 통계처리

각 실험군과 대조군의 뇌경색크기 측정 결과는 SPSS 12.0 for windows를 이용하여 통계 분석하였다. 집단 간 통계적 차이는 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. Neurological test, Wire maneuver test, Rata-Rod test, Water maze test는 모수분석의 one way ANOVA test와 unpaired T test를 실시하여 검정하였다. 집단 간 통계적 차이는 역시 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. 그리고 모든 자료는 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ (standard error of mean)으로 표기하였다

Ⅲ. 결과

1. 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델 확립

뇌손상을 유발 1주일 후 뇌 병변 여부를 확인하기 위해 우측 대뇌반구의 측면 및 후면을 육안으로 확인하여 손상 정도에 따라 경중손상 (mild injury; 우측 대뇌반구의 30% 미만 손상), 중등도 손상 (moderate injury; 우측 대뇌반구의 30-50% 손상), 중증 손상 (severe injury; 우측 대뇌반구의 50% 이상 손상)으로 분류하여 실험 대상군으로 포함시켰다.

실험군 (HFT13군; n=47 ; HFT13-Ad-BDNF군; n=52)과 대조군 (Vehicle군; n=55)에서 HFT13군은 경중손상이 15마리, 중등도 손상이 14마리, 중증 손상이 18마리였으며, HFT13-Ad-BDNF군은 경중손상이 18마리, 중등도 손상이 17마리, 중증 손상이 17마리였고, Vehicle군은 경중손상이 15마리, 중등도 손상이 18마리, 중증 손상이 22마리였다. 대조군 및 실험군 모두에서 운동기능, 뇌경색증 크기를 평가하였고 면역조직학적 검사를 실시하였다.

2. 재조합 아데노바이러스에 감염된 인간신경줄기세포의 BDNF 발현량

Adeno-CAG-BDNF-hrGFP 바이러스를 인간신경줄기세포에 감염시켜 BDNF를 발현시킨다. 아데노바이러스의 titer는 1.35×10^7 PFU/ul이었다. 감염된 인간 신경줄기세포가 BDNF를 얼마나 발현하는지 알아보기 위해, 인간 신경줄기세포에 상기의 바이러스를 35MOI로 감염시켰고, 감염 48시간 후의 배지를 수집하여 BDNF 발현량을 ELISA 방법으로 측정하였다.

측정 결과 Adeno-CAG-BDNF-hrGFP가 감염된 인간신경줄기세포는 1×10^6 cells에서 48시간 동안 약 62.5ng의 발현량을 보였다.(그림 2.)

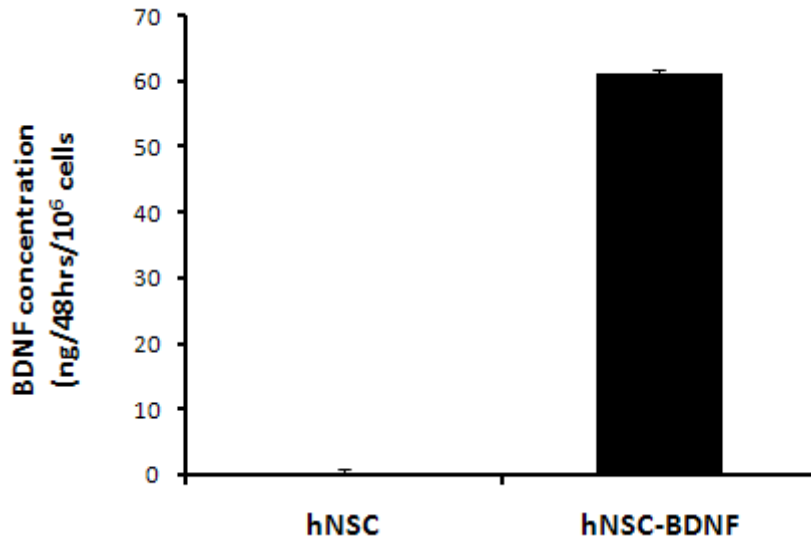


그림 2. Adeno-CAG-BDNF-hrGFP 바이러스에 감염된 인간신경줄기세포에서 BDNF 발현양. ELISA 측정결과 Adeno-CAG-BDNF-hrGFP에 감염된 인간신경줄기세포 1×10^6 cells에서 48시간 동안 약 62.5ng의 BDNF가 발현됨.

3. 저산소성 허혈성 뇌손상 부위에 BDNF 발현 인간신경줄기세포의 이식과 생체 내에서 공여세포의 생착, 분화 및 신경영양효과

실험군 동물의 뇌에 BDNF와 GFP를 발현하는 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식하였을 때 뇌경색증 부위와 주변 대뇌피질 부위에서 GFP 항체로 염색되는 공여세포가 관찰되었다.(그림 3. A, B, E, F)(그림 4. A, C) 이러한 GFP 발현 공여세포들의 특정 신경세포로의 분화여부를 확인하기 위하여 각각의 분화된 신경세포에 특이적으로 발현되는 단백질에 대한 항체를 이용해 면역조직화학 염색법을 실시하였다. GFP를 발현하는 인간신경줄기세포의 약 80-90% 이상에서 초기 신경원세포의 표지인자인 TUJ1을 발현하였고(그림 3. C-F), GFP 양성 공여세포는 성숙 신경원세포의 표지인자인 NeuN도 뇌경색 부위와 주위 대뇌피질 부위에서 발현함이 관찰되었다(그림 5. A-C). 또한 BDNF 발현 인간신경줄기세포가 이식된 우측 대뇌반구의 뇌손상 부위 주변 대뇌피질에서 NF(neurofilament)를 발현하는 신경원세포의 신경돌기의 신전이 발달되어 있음이 관찰되었다.(그림 4. D) 아데노바이러스에 감염되지 않은 인간신경줄기세포를 이식한 경우는 공여세포의 30% 정도가 신경원세포로 분화하였고, 일부는 성상세포 및 회소돌기아교세포와 같은 신경교세포로 분화하였으며, 일부는 미성숙세포의 표지자인 Nestine을 계속 발현하였다 (자료 표시하지 않음).

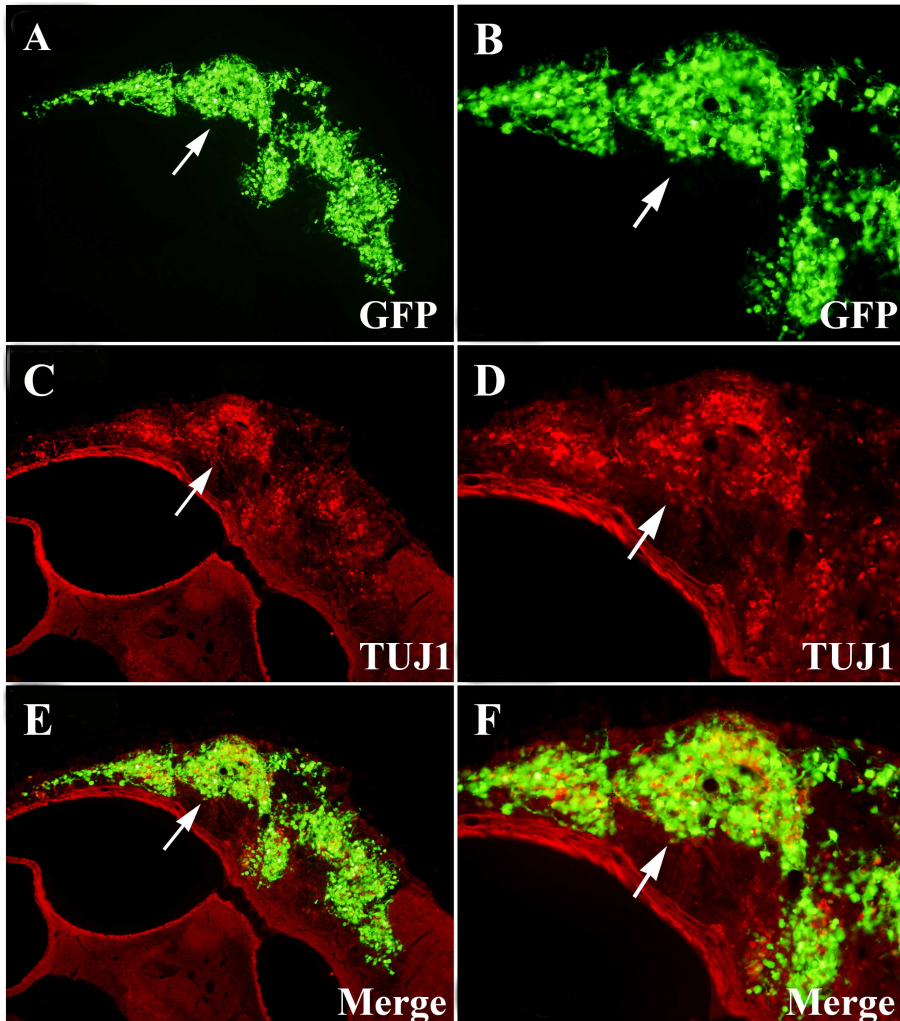


그림 3. 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델에 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식 후 공여세포의 생착 및 분화형태. 뇌손상 부위에 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식하고 2-4주 후 면역조직화학 염색법을 실시하여 면역현광현미경으로 관찰. (A, B, E, F) 뇌손상 부위에 이식된 후 GFP 발현 (green color) 인간신경줄기세포는 뇌손상 부위 및 주변 대뇌피질 부위에 잘 생착함을 보이고, (C-F) GFP 발현 공여 세포는 주로 초기 신경원세포의 표지인자인 TUJ1 (red color)을 발현함을 보임 (화살표, yellow 혹은 orange color). A, C, E; 200배율, B, D, F; 400배율

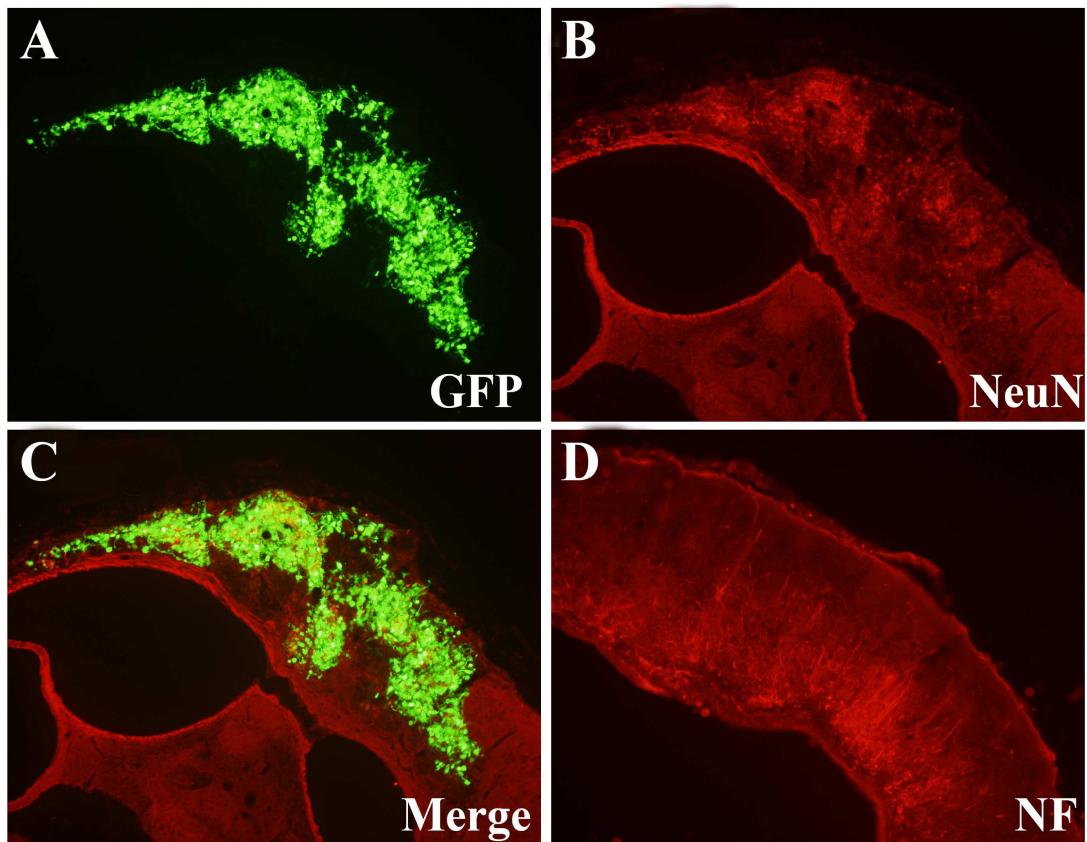


그림 4. 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델에 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식 후 공여세포의 생착 및 분화형태와 신경영양인자 발현 효과. 뇌손상 부위에 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식하고 2-4주 후 면역조직화학 염색법을 실시하여 면역현 광현미경으로 관찰. (A, C) 뇌손상 부위에 이식된 후 GFP 발현 (green color) 인간 신경줄기세포는 뇌손상 부위 및 주변 대뇌피질 부위에 잘 생착함을 보이고, (B, C) GFP 발현 공여세포는 주로 성숙 신경원세포의 표지인자인 NeuN (red color)을 발현함을 보임. (D) 뇌손상 부위 주변 대뇌피질 부위에서 NF (red color)를 발현하는 신경원세포는 신경돌기의 신전이 발달되어 있어 이식된 줄기세포로부터 발현된 BDNF로 인한 신경영양인자 효과를 보임. A-D; 200배율

4. 동물모델 뇌경색 크기 측정

저산소성 허혈성 뇌손상 동물모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식한 실험군과 H-H buffer를 이식한 대조군에서 이식 12주 후 뇌경색 크기를 측정하여 비교하여 보았다. Hematoxylin과 Eosin-Y의 염색을 통해 실험군 (HFT13군;n=18 ; HFT13-Ad-BDNF군, n=15)과 대조군(Vehicle군, n=17)에서 뇌경색 크기를 측정하였는데, 정상 측 대뇌반구 부피에서 뇌경색 측 대뇌반구의 부피를 빼고 다시 정상 측의 대뇌반구 부피로 나눈 후 100을 곱하여 정상 측 대뇌반구 부피에 대한 뇌경색 부피의 비율(%)을 구하였다. BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군과 신경줄기세포 이식군에서 대조군에 비해 뇌경색 부피 비율이 감소함을 보였는데, 인간신경줄기세포 이식군에서 뇌경색 부피 비율은 49.28 ± 2.67 (mean \pm S.E.M)% 이고 대조군에서 뇌경색 부피 비율은 $51.20 \pm 2.23\%$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았지만, BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군에서는 뇌경색 부피 비율이 $42.61 \pm 3.18\%$ 로 대조군에 비해 유의하게 뇌손상 부피가 감소하였다 (그림 5).

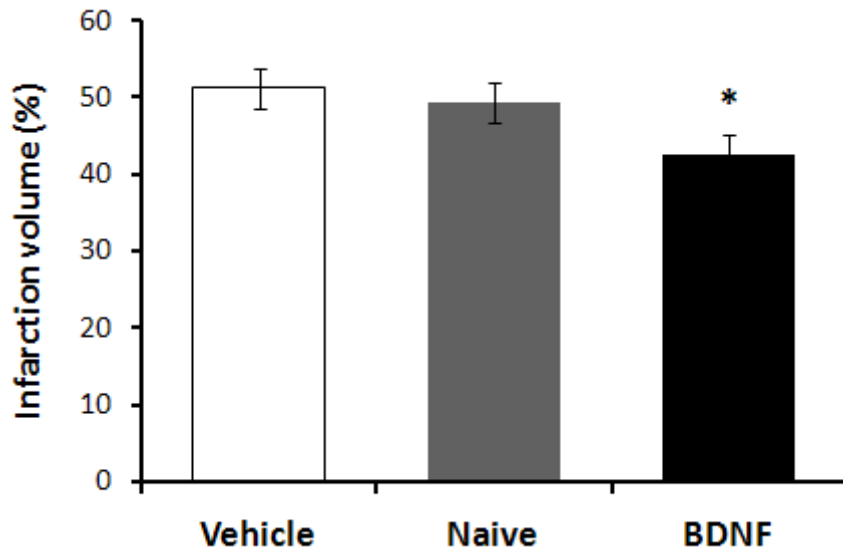


그림 5. 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간 신경줄기세포를 이식한 실험군과 대조군에서 뇌경색 크기 비교평가. 인간신경줄기 세포 (Naive) 혹은 BDNF 발현 인간신경줄기세포 (BDNF) 이식군에서 대조군 (Vehicle)에 비해 뇌경색 부피 비율이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군에서 대조군에 비해 유의 있게 뇌경색 크기 비율이 감소함을 보임. 각 측정값은 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ 으로 나타내었음. (* $P < 0.05$.)

5. 동물모델에서 신경행동학적 평가

각 평가는 실험군과 대조군에서 인간신경줄기세포 혹은 H-H buffer를 이식한 후 3주부터 2주 간격으로 11주까지 실시하였다. 각 측정값은 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ 으로 나타내었고 Anova Fisher's PLSD를 통해 통계 분석하였다.

가. Neurological test

인간신경줄기세포 이식군 (HFT13군, n=15), BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군 (HFT13-AdBDNF군, n=16), Vehicle 이식 대조군 (n=16)과 뇌손상을 유발하지 않은 age-matched 정상 대조군 (Intact군, n=21)을 대상으로 신경학적 기능 평가를 관찰하기 위해 Neurological test를 실시하여 neurological score 값을 비교하였다. 정상 대조군인 Intact군은 거의 정상 신경기능을 보여 neurological score가 0점에 가까웠으며, HFT13군과 HFT13-AdBDNF군은 모두 대조군에 비해 Neurological score가 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 모든 구간에서 유의한 차이를 보이지는 않았다. 그러나 세포이식 5주, 7주, 9주 및 11주에 일부 시점에서 실험군에서 vehicle을 주사한 대조군에 비해 유의 있게 neurological score가 감소함을 보여 신경학적 기능이 호전됨을 확인하였다 (그림 6).

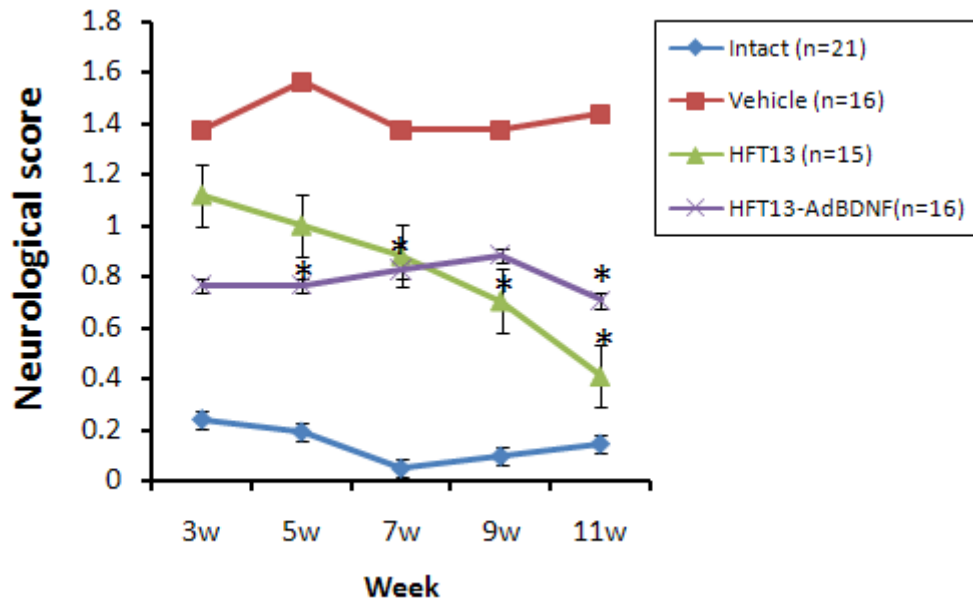


그림 6. 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간 신경줄기세포를 이식한 실험군과 vehicle을 주사한 대조군 및 정상 동물 (Intact)에서 이식 후 기간에 따른 neurological test를 통한 신경학적 기능 평가. HFT13군 및 HFT13-AdBDNF군에서 Vehicle군에 비해 neurological score가 감소하는 경향을 보이고, 이식 후 5주부터 11주까지 일부 시점에서 유의한 차이를 나타냄. 각 측정값은 mean±S.E.M임 (* P<0.05 : Vehicle군과 비교).

나. Rota-Rod test:

운동조정기능 (motor coordination)을 측정하기 위해 HFT13군 (n=18), HFT13-AdBDNF군 (n=16), vehicle군 (n=20) 및 Intact군 (n=17) 모두에서 5분간 3차례 Rota-rod를 실시하여 평균 지속시간 (mean latency)을 분석하였다. Intact군에 비해 HFT13군, HFT13-AdBDNF군 및 Vehicle군 모두에서 평균 지속시간이 짧았으나 각 군 간에 유의 있는 차이를 보이지 않았다. HFT13군과 HFT13-AdBDNF군의 평균 지속시간이 Vehicle군에 비해 증가한 경향을 보였으나 역시 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다 (그림 7). 따라서 실험군이 대조군에 비해 유효하게 운동조정기능이 향상되지 않았음을 보였다.

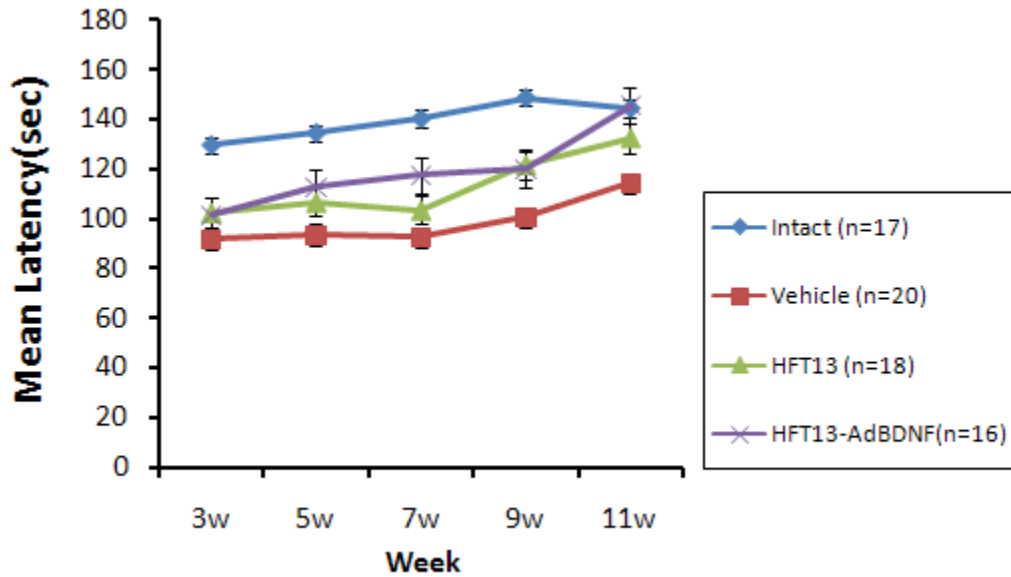


그림 7. 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간 신경줄기세포를 이식한 실험군과 vehicle을 주사한 대조군 및 정상 동물 (intact)에서 이식 후 기간에 따른 Rota-Rod test을 통한 운동조절능력의 비교평가. HFT13 군 및 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군에 비해 Rota-Rod test상 평균 지속시간이 증가한 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않음. 각 측정값은 mean±S.E.M임 (* P<0.05 : Vehicle군과 비교).

다. Wire maneuver test:

세포이식 후 상지근력 (forelimb strength)의 변화를 측정하기 위하여 HFT13군 (n=23), HFT13-AdBDNF군 (n=30), vehicle군 (n=26) 및 Intact군 (n=10)에서 wire maneuver test를 실시하여 철사 줄에서 쥐가 떨어지는 시간을 초단위로 기록하였다. 이때 체중에 따른 영향을 배제하기 위해 실험은 모두 female 동물모델을 통해서만 검정하였다. HFT13군, HFT13-AdBDNF군 및 Vehicle군 모두에서 Intact군에 비해 철사에 매달려 있는 시간이 짧았으며, HFT13-AdBDNF군에서 Vehicle군에 비해 매달려 있는 시간이 증가한 경향을 보였지만 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (그림 8). 따라서 실험군이 대조군에 비해 상지근력은 크게 향상되지 않았음을 확인하였다.

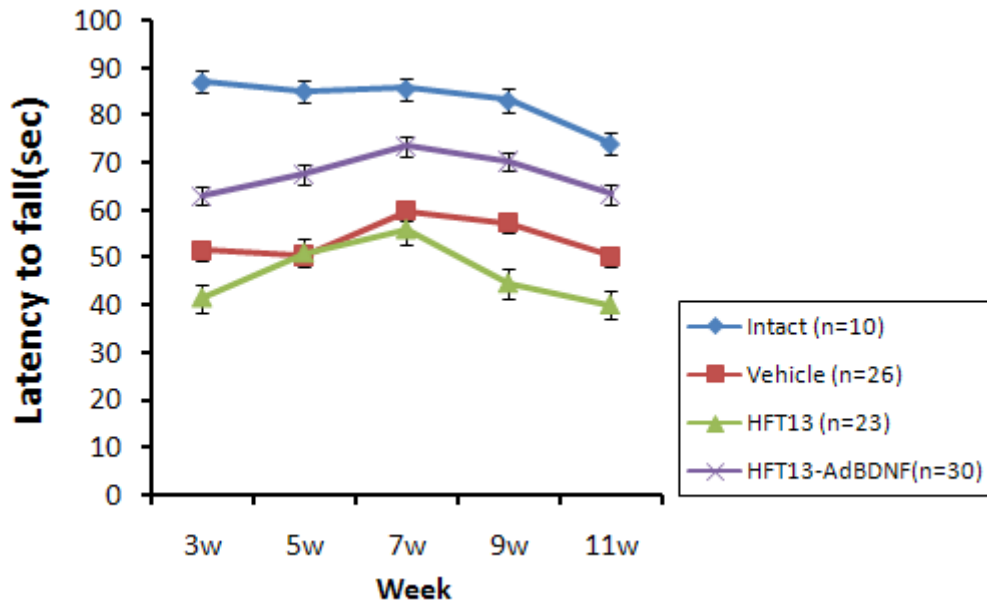


그림 8. 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간 신경줄기세포를 이식한 실험군과 vehicle을 주사한 대조군 및 정상 동물 (intact)에서 이식 후 기간에 따른 wire maneuver test를 통해 상지근력의 비교평가. HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군에 비해 철사에 매달려 있는 시간이 증가한 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않음. 각 측정값은 mean±S.E.M임 (* P<0.05 : Vehicle군과 비교).

라. Water maze test :

실험군인 HFT13군 (n=27) 및 HFT13-AdBDNF군 (n=35)과 대조군인 vehicle군 (n=34) 및 Intact군 (n=21)에서 세포이식 후 학습능력의 변화를 보기위해서 6일 동안 probe의 위치를 학습시켰는데, 4개 군 모두에서 probe를 찾아가는 시간이 점차 줄어드는 것으로 보아 실험군과 대조군 모두에서 학습이 일어나고 있음을 알 수 있었다 (그림 9A). 정상 쥐인 Intact군이 가장 학습능력이 좋았으며 HFT13군과 HFT13-AdBDNF군 모두에서 Vehicle군에 비해 학습능력이 향상됨을 보였다. 그러나 HFT13군과 Vehicle군 간에는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지는 않았고 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군보다 Probe를 찾아가는 시간이 일부 시점에서 유의하게 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (그림 9A). 기억능력의 향상정도를 평가하기 위해 실험 7일째에 probe를 치우고 probe 위치의 정반대 방향으로부터 수영을 시작하여 쥐가 probe가 위치한 지역에 머무르는 시간을 통해서 기억능력을 측정하였는데, 실험군 HFT13군과 HFT13-Ad-BDNF군 모두 Vehicle군에 비해 Probe가 위치한 지역에 머무는 시간이 증가했음을 관찰하였고 특히 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군보다 통계적으로 유효하게 Probe가 위치한 지역에 머무는 시간이 증가하였다 (그림 9B). 따라서 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군에서 대조군에 비해 기억능력이 향상됨을 확인할 수 있었다 (* $P < 0.05$: Vehicle군과 비교).

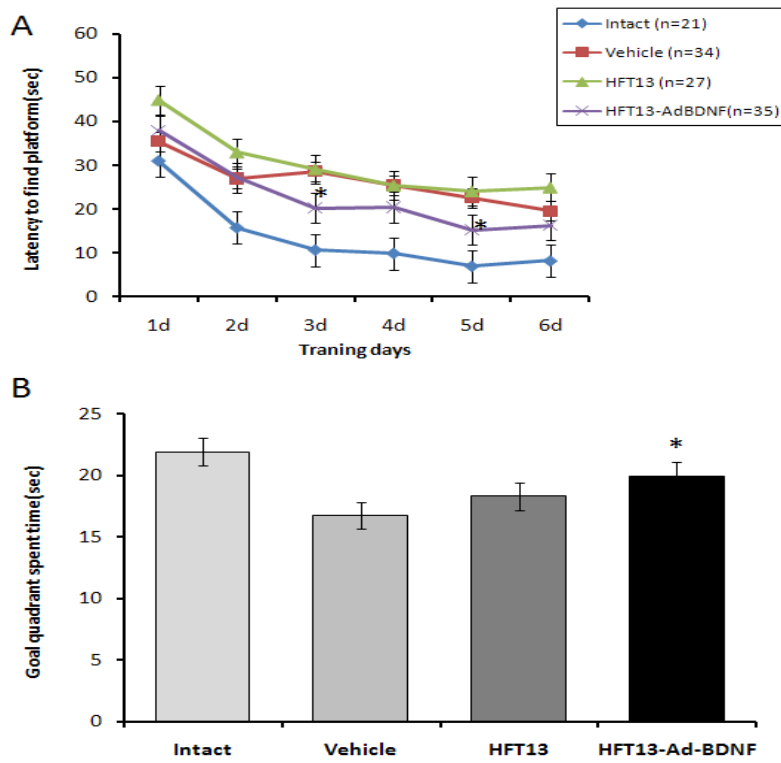


그림 9. 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간 신경줄기세포를 이식한 실험군과 vehicle을 주사한 대조군 및 정상 동물 (Intact)에서 이식 후 기간에 따른 water maze test를 통해 학습 및 기억 능력의 비교평가. (A) 학습능력 측정에서 실험군과 대조군 모두에서 학습이 되는 것을 확인하였음. HFT13군과 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군에 비해 학습능력이 향상됨. 특히 HFT13-AdBDNF군은 Vehicle군보다 Probe를 찾아가는 시간이 일부 시점에서 통계적으로 유의하게 감소하였음. (B) 기억력 측정을 위한 Probe test에서 실험군 HFT13군과 HFT13-AdBDNF군 모두에서 Vehicle군에 비해 Probe가 위치한 지역에 머무는 시간이 증가하였음. 특히 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군보다 통계적으로 유의하게 Probe가 위치한 지역에 머무는 시간이 증가하였음. 각 측정값은 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ 임 (* $P < 0.05$: Vehicle군과 비교).

IV. 고찰

신생아 저산소성-허혈성 뇌 손상 (neonatal hypoxic-ischemic brain injury)은 주산기 가사 (perinatal asphyxia)에 의해서 신생아에서 발병하는 대표적 중증 신경계 질환으로 태반조기박리, Umbilical cord knot과 같은 원인에 의해 뇌에 공급되는 산소와 피의 결핍 때문에 발생한다.³⁹ 이러한 산소와 피의 결핍은 중추신경계 전반에 걸쳐 세포사멸이 일어나게 되고 신경세포(neurons)와 신경교세포(glia)의 파괴는 소아마비, 정신지체, 연하곤란, 시각장애, 청각장애, 소두증, 신경학적 장애와 행동적 장애를 유발하고 심하면 사망에까지 이른다.^{39,40}

신경줄기세포는 스스로 미분화된 상태로 증식할 수 있는 (self-renewal) 능력을 유지하면서 다양한 종류의 신경세포로 분화할 수 있는 분화의 다능력 (multipotency)을 지닌 미성숙 신경세포를 의미한다. 최근 수년간 많은 분야에서 줄기세포에 대한 연구가 이뤄지고 있고 시험관 내에서 줄기세포의 배양과 분화의 가능성은 손상된 조직을 치료하고자 하는 관심을 증대시켰다.¹⁻³ 중추신경계의 재생 능력은 매우 낮은 편이기 때문에 다양한 신경학적 질환들로 인하여 소실된 신경기능의 자발적인 회복을 기대하기는 힘들다.²²

또한 저산소성-허혈성 뇌손상 모델은 수많은 유형의 신경세포(neurons)와 신경교세포(glia)가 죽거나 기능을 상실하는 질병이기 때문에 이들 세포를 동시에 회복시키기란 여간 어려운 문제가 아닐 수 없다.⁴¹⁻⁴³ 그럼에도 불구하고 외부에서 이식된 신경줄기세포들이 뇌졸중 상태의 뇌를 복구할 수 있다는 기대할 수 있는 것은 뇌졸중 직후 뇌의 뇌실인접 구역(subventricular zone, SVZ)에 위치한 신경줄기세포(neural stem cell)로부터 신경세포(neurons)의 생성이 증가되고 이 신경세포들이 손상 부위로 이동하여 이미 죽은 신경세포들과 유사한 형질(phenotypes)을 발현하며 분화되는 것이 확인되었기 때문이다.⁴⁴

현재 뇌졸중 모델에서 사람이나 생쥐의 골수세포(bone marrow stromal cells) 사람의 제대혈세포(human cord blood cells), 사람의 태아 뇌에서 추출한 신경줄기세

포를 배양하여 유도한 neurospheres를 뇌졸중 동물모델에 다양한 방법으로 이식하여 그 효능을 알아보고 있고 줄기세포를 이용하여 뇌졸중 또는 뇌손상 등의 신경학적 질환의 동물모델에 이식하는 경우 줄기세포가 손상부위로 이동하며 손상부위가 감소하고 기능이 회복되는 경향이 보고되기 시작하였다.⁴⁵⁻⁴⁷ 이후 신경줄기세포가 서로 다른 조직의 다양한 세포들로 분화되는 가소성이 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 줄기세포를 이용한 방법은 난치성 뇌질환의 근본적인 치료 방법 중의 하나로 주목 받게 되었다.⁴⁸

각종 신경영양인자 및 성장 인자를 이용한 유전자 치료와 신경줄기세포 이식 치료를 통해 중추신경 재생을 위한 연구가 현재 활발히 진행되고 있으며 일부에서는 임상 적용으로 시도되고 있으나 치료 효과는 아직 불분명한 상태이다.³² 이를 위한 방법으로 신경영양인자 및 성장인자를 직접 뇌실 내로 투여하여 그 효과에 대해 검증하고자 연구하고 있지만 이러한 신경영양인자 및 성장인자는 그 활성도의 지속시간이 짧고, 활성이 상대적으로 떨어지고 비용적인 측면 때문에 어려움이 많았다. 이러한 문제점을 극복하고자 유전자전달 방법을 사용하여 좀 더 안정적이고 지속적으로 원하는 효과를 극대화 시킬 수 있을 것으로 기대하였다.

유전자 전달의 방법으로 현재 널리 쓰이는 바이러스는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노관련 바이러스 등이 있다. 아데노바이러스는 가장 오랫동안 사용된 바이러스 수송체로서, 바이러스내의 유전자의 발현 시간이 상대적으로 짧다는 점과 세포의 분열여부와 상관없이 있기 때문에 대부분의 세포에 적용이 가능하다는 장점이 있다. 하지만 포함할 수 있는 유전자의 크기가 제한된다는 단점과 면역독성의 문제점이 존재한다.^{49,50} 바이러스를 이용한 유전자의 전달 방법이 바이러스 자체의 안정성과 바이러스가 도입된 세포의 암세포화 가능성도 무시할 수 없기 때문에 위험성에 있어서 문제점을 안고 있는 것은 사실이다. 하지만 많은 연구 결과에 의해 유전자조작을 통한 신경영양인자를 발현하는 신경줄기세포의 이식은 세포 스스로 신경영양인자를 생산 분비함으로써 세포를 재생하는데 뛰어난 효능을 발휘하며 이식된 신경줄기세포가 손상된 신경 혹은 교세포를 대체 (replacement)하여 기존의 숙주 신경조직에 성공적으로 통합(integration)되고 적합한 기능을 발휘한

다는 것이 밝혀졌다.^{45,46,51}

또한 본 연구에서 사용한 아데노바이러스 벡터는 바이러스 particle을 형성하고 숙주 감염에 필수적인 E1, E3 유전자가 제거된 벡터를 활용하여 최대한 안정성을 높였고 신경줄기세포, 신경영양인자 그리고 아데노바이러스의 장점만을 활용하여 실험을 진행하였다. 먼저 태아의 중뇌 (telencephalon)부위에서 얻은 인간신경줄기세포를 배양하고 우리가 원하는 BDNF 유전자를 삽입한 벡터와 플라스미드 형태의 바이러스 벡터를 대장균 내에서 재조합하여 원하는 유전자를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 제작하였다. 이렇게 제작된 벡터를 인간신경줄기세포에 감염시켜 동물모델에 이식하였다. 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델에 BDNF를 발현하는 인간 신경줄기세포를 이식하여 신경학적, 행동학적 능력에 호전이 있는지 확인하고자 하였고 이식한 신경줄기세포가 숙주 내에서 생존하여 소실된 신경세포를 대체하고 분화, 이동, 축삭의 성장 및 신경연접의 형성이 이루어지는지를 관찰하고자 하였다.

연구 결과, 이식한 공여세포는 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델의 뇌경색 부위에서 확고히 정착하였으며, 대부분 신경원세포로 분화하였음을 확인할 수 있었다. 또한 뇌손상 주위 대뇌피질 부위에서 숙주동물의 신경원세포의 신경돌기 신장이 발달되어 있음을 확인하여 공여세포에서 분비된 BDNF가 숙주 신경세포에 영양인자로 작용함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 저산소성 허혈성 뇌손상 동물모델에 이식한 경우 공여세포는 뇌손상 부위에 잘 정착하고 신경원세포로 분화하여 손상된 신경원세포를 대체하여 재생함을 보이고, 공여세포에서 분비된 신경영양인자는 숙주 뇌 신경세포에도 작용하여 신경돌기의 신장을 촉진시켜 손상된 뇌 신경세포의 재생에 기여함을 알 수 있었다.

뇌경색 부피 비율(%)의 측정에 있어서도 HFT13군 HFT13-AdBDNF군의 뇌경색 크기가 감소하는 경향을 보였으며, HFT13-AdBDNF군의 경우 Vehicle군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 따라서 인간신경줄기세포의 뇌손상 부위 이식은 손상된 부위에 잘 정착하여 치료적으로 유용한 세포 및 유전자를 전달할 수 있음을 확인하였고, 이식한 인간신경세포의 대부분이 신경원세포로 분화하는 것을 통해 손실된 신경원세포를 대체하고 신경회로를 재생할 수 있는 가능성을 제시하였으

며 숙주 신경세포의 사멸을 예방하고 신경세포의 분화를 촉진시켜 신경재생 가능성을 보여 주었다.

Rota-rod test와 Wire maneuver test를 통한 운동능력 검사에 있어서 실험군이 대조군에 비해 좋아지는 경향을 보이지만 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다. Neurological test를 통한 신경학적 평가에서는 실험군이 대조군에 비해 신경학적 능력이 호전되는 경향을 보였으며 일부 구간에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 특히, Morris water maze test를 통한 학습과 기억 능력의 측정에 있어서 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군에 비해 통계적으로 유의하게 향상됨을 보였는데 신경영양인자인 BDNF는 주로 대뇌피질(cortex), 전뇌 기저부 (basal forebrain)에서 활성화되고 특히 해마(hippocampus)에서 활성화 된다는 것이 알려져 있기 때문에 운동능력 보다 학습(Learning)과 기억(Memory) 능력 향상에 보다 중요한 역할을 담당하고 있다고 생각하였다.

이식한 신경줄기세포에서 분비되는 BDNF는 병변 주위의 숙주 신경세포의 사멸을 억제하고 새로운 혈관 생성을 유도 할 뿐만 아니라 신경원세포로의 분화와 발생에 효과를 보일 것으로 생각된다. 또한 BDNF가 신경세포의 생존과 분화뿐만 아니라 시냅스전달 (synaptic transmission)과 시냅스 가소성 (synapse plasticity)을 활성화에 중요한 역할을 하기 때문이라 생각된다.

결론적으로 저산소성-허혈성 뇌손상 동물모델에서 인간신경줄기세포 혹은 BDNF 발현 인간신경줄기세포의 뇌 손상 부위 이식은 공여세포가 신경원세포로 분화하여 손상된 신경세포를 대체하여 재생하고 신경회로의 재구성에 참여하며, 인간신경줄기세포에서 분비되는 신경영양인자의 작용으로 손상된 숙주 신경세포의 보호, 사멸 방지 및 분화촉진을 유도하여 신경재생 효과를 유도하고, 이식된 신경줄기세포에 의한 항염증작용 및 면역기능조절 작용에 의하여 뇌손상 감소 및 예방효과를 보일 수 있으며, 내인성 신경줄기세포의 증식, 이주 및 분화를 촉진하여 신경재생을 유발할 것이라고 생각된다.

그러나 신경줄기세포의 이식을 통한 소실된 신경세포의 대체 및 재생은 아직까지 많은 점에서 한계가 있는데, 이식된 신경줄기세포가 질병으로 인하여 소실된 신경

원 및 신경교세포를 기능적으로 대체하기 위해서는 이식된 신경줄기세포의 생존, 분화, 이동, 축삭의 성장 및 신경연접의 형성과 같은 기본적인 과정들이 진행되어야 할뿐 아니라 이식된 후 신경줄기세포 고유의 문제점 혹은 세포의 환경적 요인들에 의해 상기 현상들이 제약을 받게 되기 때문이다. 따라서 이식된 신경줄기세포의 생존 향상, 신경줄기세포의 분화의 조절 및 촉진, 신경줄기세포에서 분화된 신경세포의 축삭의 성장 그리고 숙주 신경조직과 이식 신경줄기세포의 기능적 통합을 촉진시킬 수 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 신경줄기세포와 신경영양인자인 BDNF의 특성을 이용하여 저산소성-허혈성 뇌손상 모델과 같은 신경학적 질환에 대한 신경줄기세포 이용 세포 및 유전자치료의 신경재생효과를 확인하고자 하였고, 난치성 신경계질환에 대한 새로운 치료 방법을 제시하고자 하였다. 이를 위해 먼저 합법적으로 유산된 인간 태아 사체의 중추신경계로부터 인간신경줄기세포를 배양하고, BDNF를 발현하는 아데노바이러스를 제작하여 저산소성 허혈성 뇌손상 모델동물의 뇌에 인간신경줄기세포 및 BDNF 발현 인간신경줄기세포를 이식하였다. 세포 이식 후 면역화학검사를 통해 숙주동물의 뇌에서 공여세포의 생존과 생착을 관찰하였고, 이식한 공여세포는 주로 신경원세포로 분화하였으며 공여세포로부터 분비된 BDNF는 뇌손상 주변 대뇌피질 부위에 있는 숙주 신경원세포의 신경돌기 신장을 촉진시킴을 확인하였다. 또한 뇌경색 크기 측정 결과 인간신경줄기세포 이식군 (HFT13군)과 BDNF 발현 인간신경줄기세포 이식군 (HFT13-AdBDNF)이 대조군인 Vehicle군에 비해 뇌경색 크기가 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 운동 및 신경행동능력 검사에 있어서는 상지근력 능력과 운동조정기능에서는 실험군과 대조군에서 유효한 차이를 보이지는 않았지만, Neurological test와 Morris water maze test에서는 HFT13-AdBDNF군이 Vehicle군에 비해 통계적으로 유의 있는 차이를 보여 신경학적 능력 및 학습과 기억능력이 호전되었음을 확인할 수 있었다.

이러한 실험은 향후 인간신경줄기세포의 적절한 신경세포로의 분화유도, 신경줄기세포를 통한 신경영양인자의 공급 및 염증반응의 감소 유도 등을 통하여 다방면에서 효율적인 세포 및 유전자치료 적용 가능성을 평가하는데 유용될 수 있을 것이다. 또한 BDNF를 발현하는 인간신경줄기세포와 같이 유전자 조작 줄기세포를 활용하는 연구는 앞으로 난치성 질환 치료를 위하여 유용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Snyder EY, Park KI. Limitations in brain repair. *Nat Med* 2002; 8(9):928-30.
2. Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Tate BA, et al. Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Therapy* 2002;9:613-24.
3. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with scaffolds seeded with neural stem cells to reconstitute lost tissue. *Nat Biotech* 2002;20(11):1111-7.
4. Ollie Lindvall, Zaal Kokaia, Alberto Martinez-Serrano. *Nat Med* 2004;10:S42-S50
5. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433-8.
6. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997; 276:66-71.
7. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham MJ, et al. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotech* 1998; 16:1033-9.
8. Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C. Van der Kooy D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 1996;19:387-93.
9. Alvarez-Buylla A. Temple S. Stem cells in the developing and adult nervous system. *J Neurobiol* 1998;36:105-14.
10. Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* 1995;374:367-70
11. Yandava BD, Billingham LL, Snyder EY. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;

96:7029-34.

12. Lynch WP, Sharpe AH, Snyder EY. Neural stem cells as engraft- able packaging lines can mediate gene delivery to microglia: evidence from studying retroviral envrelated neurodegeneration. *J Virol* 1999;73:6841-51.
13. Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotech.* 2005;23:862-71.
14. Park KI, Lin S, Flax JD, Nissim S, Stieg PE, Snyder EY. Transplantation of neural progenitor and stem-like cells developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction. *J Neurotrauma* 1999;16:675-87
15. Brustle O, McKay R. Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. *Curr opin neurobiol.* 1999;6:685-8
16. Anne E. Rosser, Rike Zietlow, Stephen B. Dunnett. Stem cell transplantation for neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol* 2007;20:688-92
17. Tomoaki Ikeda. Stem cells and neonatal brain injury. *Cell Tissue Res* 2008;331:263-9
18. Tonya Bliss, PhD, Raphael Guzman, MD, Marcel Daadi, PhD, Gary K. Steinberg, MD, PhD. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38:817-26
19. M. Kameda, T Shingo, K Takahashi, K Muraoka, K Kurozumi, T Yasuhara et al. Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia. *European J Neurosci* 2007;26:1462 - 78
20. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Seminars Ped Neurol.* 2004;11:31-46

21. Ryan J. Felling, Matthew J. Snyder, Michael J. Romanko, Raymond P. Rothstein, Amber N. Ziegler, Zhengang Yang et al. Neural stem/Progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. *J Neurosci* 2009;26(16):4359-69
22. Goldstein M. The Treatment of cerebral palsy: what we know, What we don't know. *J Pediatr* 2004;11:31-46
23. Olle Lindvall, Zaal Kokaia. Recovery and Rehabilitation in Stroke. *Stroke* 2004;35:2691-4
24. Melissa M. McClure, Steven W. Threlkeld, Glenn D. Rosen, R. Holly Fitch. Rapid auditory processing and learning deficits in rats with P1 versus P7 neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 2006;172:114-21
25. Anne M. Comi, Eunpi Cho, Justin D. Mulholland, Andrew Hooper, Qun Li, Yun Qu et al. Neural Stem cells Reduce Brain Injury After Unilateral Carotid Ligation. *Pediatr Neurol* 2008;38:86-92
26. Walter Balduini, Valerio De Angelis, Erika Mazzoni, Mauro Cimino. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 2000;859:318-25
27. Jie Ma, Yu Wang, Jianhua, Min Yang, Keun-A Chang, Linhua Zhang et al. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int* 2007;51:57-65
28. Jeffrey M. Perlman, MB, ChB. Summary Proceedings From the Neurology Group on Hypoxic-ischemic Encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117:S28-S33
29. Kook In Park, B. Timothy Himes, Philip E. Stieg, Alan Tessler, Itzhak Fischer, Evan Y. Snyder. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: Evidence from engraftment of Neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol* 2006;166:179-90

30. Patrick S. McQuillen, R. Ann Sheldon, Carla J. Shatz and Donna M. Ferriero. Selective Vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-Ischemia. *J Neurosci* 2003;23(8):3308-15
31. Afsaneh Gaillard, Laetitia Prestoz, Brigitte Dumartin, Anne Cantereau, Franck Morel, Michel Roger and Mohamed Jaber. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat Neuroscience* 2007;10:1294-9.
32. Thoenen H, Sendtner M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experience to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 2002;5:1046-50
33. Byung Hee Han, David M Holtzman. BDNF Protects the Neonatal Brain from Hypoxic-ischemic Injury in vivo via the ERK Pathway. *J Neurosci* 2000;20(15):5775-81
34. Lindholm D, Carroll P, Tzimagiorgis G, Thoenen H. Autocrine paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci* 1996;8:1452-60
35. Schabitz W, Steingleder T, Cooper-Kuhn C, Schwab S, Sommer C, Schneider A et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 2007;38:2165-72
36. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induced both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 2001;21:6718-31
37. Kirschenbaum B, Goldman SA. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:210-4

38. E Larsson, RJ Mandel, RL Klein. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neuro* 2002;177:18-24
39. Walter Balduini, Valerio De Angelis, Erika Mazzoni, Mauro Cimino. Long lasting behavioral alterations following a hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 2000;859:318-25
40. Anne M. Comi, MD Eunpi Cho, BS, Justin D. Mulholland, BS, Andrew Hooper, BS, Qun Li, MD, PhD, Yun Qu, MD, PhD, Devin S. Gary, PhD et al. Neural stem cells reduce brain injury after unilateral carotid ligation. *Neurol.* 2008;38:86-92
41. Denis English, Stephen K. Klasko, Paul R. Sanberg. Elusive mechanisms of “stem cell”-mediated repair of cerebral damage. *Exp Neurol* 2006;199:10-15
42. C Zhu, X Wang, A Huang, L Qiu, F Xu, N Vahsen et al. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 2009;1-10
43. Jeffrey M. Perlman, MB, ChB. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117:S28-S33
44. Zang RL, Zang ZG, Chopp. M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):345-52.
45. Andreas Arvidsson, Tove Collin, Deniz Kirik, Zaal Kokaia, Olle Lindvall. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:930-70
46. Park KI. Transplantation of neural stem cells cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *YMJ* 2000;41:825-83
47. Park KI, Stieg PE, Snyder EY. Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy in pediatric hypoxic-ischemic brain injury. In: Chan PH, ed. *Cerebrovascular disease.* Cambridge : Cambridge University Press, 2002 :

299-316.

48. Park KI, Tate BA, Ren JM, Sietsma D, Marciniak A, Finkelstein SP, et al. Harnessing neural stem cell biology to compensate for cerebral ischemic injury. In : Kreiglstein J and Klumpp S eds. Pharmacology of Cerebral Ischemia. Stuttgart : Medpharm, 2000 :491-8.
49. Gunnar ANdsberg, Zaal Kokaia, Ronald L. Klein, Nicholas Muzycaka, Olle Lindvall, Ronald J. Mandel. Neuropathological and Behavioral Consiquences of Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Continuous Intrastratial Neurotrophin Delivery in a Focal Ischemia Moded in Rats. Neurobiol Dis 2002;9:187-204
50. Andreas Arvidsson, Deniz Kirik, Cecilia Lundberg, Ronald J. Mandel, Gunnar Andsberg, Zaal Kokaia et al. Elevated GDNF levels following viral vector-mediated gene transfer can increase neuronal death after stroke in rats. Neurobiol Dis 2003;14:542-56
51. Hong J. Lee, Kwang S. Kim, Eun J. Kim, Hyun B. Choi, Kwang H. Lee, In H. Park et al. Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. Stem cell 2007;25:1204-12

Abstract

Transplantation of BDNF-expressing human neural stem cells by adenoviral vector into newborn mice with hypoxic-ischemic encephalopathy

Taehun Park

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kook In Park)

Neonatal hypoxic-ischemic (HI) brain injury is the disruption of blood and oxygen delivery to the brain of a newborn infant. It represents a major cause of neurological injury in newborn infants. Neonatal HI brain injury occurs in 1-2 of 1,000 live term births, and ~60% of the preterm infants who are afflicted with this type of injury sustain permanent brain damage. HI damage usually occurs in the cerebral cortex and hippocampus, but during the perinatal period, it occurs in the diencephalon, caudate nucleus, putamen, globus pallidus, and basal ganglia. This leads to long-lasting devastating disorders.

According to a number of recent researches on this subject, the central nervous system (CNS) cannot be regenerated. Therefore, most of the therapeutic approaches to CNS injury focus on neuroprotection and the reduction of neuronal damage. While many studies have endeavored to develop novel therapeutic modalities using animal models of Parkinson's disease, stroke, and spinal-cord injury, relatively few studies have been conducted using a neonatal HI brain injury model despite the fact that HI brain injury in newborn infants results in serious permanent developmental and neurological handicaps as well as socioeconomic problems. Therefore, the development of new fundamental therapeutic tools for reducing neuronal injury and for neuroregeneration is

urgently needed.

Neural stem cells (NSCs) are immature and undifferentiated and are characterized by the ability to renew themselves through mitotic cell division. They also show multipotency-differentiating, specialized cell types, such as neuron and glia. When NSCs were implanted into a diseased or injured nervous system, they showed not only preferential extensive migration to and engraftment within areas with discrete as well as diffuse abnormalities, but also the capability to replace diseased tissue in an appropriate manner. Therefore, NSCs could be harnessed to develop cell- and stem-cell-based gene therapy for intractable neurological disorders.

After sustaining brain injury, there are responses to neuronal apoptosis and a more potent capacity for endogenous regeneration and neuroprotection because of the neurotrophins. Neurotrophins are a family of proteins that induce the survival, development, and function of the neurons. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is known not only to play a role in inducing neurogenesis and neural development but also as being essential for synaptic transmission and plasticity.

In this study, to investigate the therapeutic potentials of human neural stem cells (hNSCs) in a neonatal HI brain injury model, postnatal-day-7 (P7) CD-1 mice were subjected to unilateral right-common-carotid-artery ligation to induce ischemic brain injury. They were then exposed to 8% oxygen for 90 min, which induced HI brain injury. hNSCs were cultured from the telencephalon of a fetal cadaver at 13 weeks of gestational age and were engineered to express BDNF by adenoviral vector before transplantation. Seven days after the induction of HI brain injury, the hNSCs and BDNF-expressing hNSCs, as well as a vehicle, were injected into the HI-brain-injured lesions, respectively.

As a result, the mice into which BDNF-expressing hNSCs had been transplanted showed a significant reduction of the HI-injured brain volume compared to the vehicle-injected control group. The mice with HI brain injury into which hNSCs and BDNF-expressing hNSCs had been transplanted obtained better neurological scores in the neurological test that was conducted compared to the control group, and the mice into which BDNF-expressing hNSCs had been implanted showed better learning and memory functions compared to the control group in the Morris Water maze test that was administered. There was no significant difference, however, between the cells-injected experimental group and the control group in the rota-rod and wire maneuver test. The

mice into which hNSCs and BDNF-expressing hNSCs had been transplanted showed robust engraftment and foreign-gene expression (GFP and BDNF) within their HI-injured brain lesions. The BDNF-expressing hNSCs were mainly differentiated into the neurons in the HI-injured lesions and the adjacent cortical penumbra. In addition, the BDNF that had been secreted from the donor-derived cells appeared to develop neurites extension and arborization in the host cortical neurons in the cortical penumbra.

In conclusion, the results of this study suggest that the transplantation of hNSCs or BDNF-expressing hNSCs into a neonatal HI brain injury model provides novel cell- and stem-cell-based gene therapy, which could induce significant neuroprotection and could significantly improve the neurological and cognitive functions. Therefore, the therapeutic potentials of hNSCs or BDNF-expressing hNSCs transplantation could be exploited for the treatment of HI brain injury in newborn infants.

KeyWords : Hypoxic-ischemic brain injury, human neural stem cells (hNSCs), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), transplantation, cell therapy, gene therapy