

골수 유래 간엽간세포로부터 신경양세포로의 분화
(Neuron like differentiation of
Bone marrow derived mesenchymal stem cell)

연세대학교 원주의과대학 대학원

의 학 과

배 금 석

골수 유래 간엽간세포로부터 신경양세포로의 분화
(Neuron like differentiation of
Bone marrow derived mesenchymal stem cell)

지도교수 강 성 준

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008년 7월 18일

연세대학교 원주의과대학 대학원

의 학 과

배 금 석

배 금 석의 박사 학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 원주의과대학 대학원

2008년 7월 일

감사의 글

이번 논문을 완성하기까지 참으로 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다.

체계 있어 학위 과정의 길은 학문의 길 보다는 어쩌면 인격수양의 과정에 더 가깝지 않았나 싶습니다. 이제 비로소 모든 과정을 마치고 논문의 마지막 마무리를 글로 남기려 하니 저를 도와주신분들이 이렇게도 많았음을 부족하지만 이 지면을 통해 감사함을 표합니다.

먼저 능력이 많지 않은 체계 힘든 외과 업무를 열과 성으로 무사히 이루어 낼 수 있도록 건강과 열정을 허락하신 하나님께 먼저 감사와 영광을 돌립니다. 그리고 참으로 부족한 저를 학문의 길로 불러 들여 오늘의 저가 있게해 주신 평생의 스승이자 지도교수님이신 강성준 교수님의 은혜에 고개 숙여 깊이 감사드립니다. 또한 논문이 완성되기까지 지도편달을 아끼지 않으신 노병선 교수님, 등영건 교수님, 김대성 교수님, 박광화 교수님과 박동준 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 가운데 논문의 완성도를 위하여 항상 저를 질책해 주시고 조언을 아끼지 않으신 김현수 교수님께도 감사의 말씀드립니다. 임상의사로서 수술과 학업에 정진할 수 있도록 주위에서 뒷받침 해 주신 우리 외과학 교실 교수님들께 감사드립니다. 또 바쁜 일정속에서 저를 있게 해준 우리 후배 외과의국원들에게 감사의 마음을 전하며, 무엇보다 바쁜 시간에도 고생하시며, 실험 준비와 모든 과정을 함께 도와준 강영모 연구원 외 파미셀직원 여러분께 진심으로 경의와 감사의 뜻을 표합니다.

제가 어린시절부터 사랑과 관심으로 제 인생의 든든한 후원자가 되어 주신 부모님의 희생과 사랑이 없었다면 제가 오늘 이 자리에 없었을지도 모릅니다. 끝으로, 참으로 셀 수조차 없는 긴 시간을 학업과, 진료에 매달려온 저를 내조해 준 아내와, 사랑스러운 딸과 함께 이 작은 완성의 기쁨을 나누고 싶습니다.

2008년 7월 18일 저자 씀

목 차

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 실험재료 및 방법	6
1. 골수 채취 및 간엽간세포 배양	6
2. 유세포 분석 (FACS)	6
3. 분화능 검사	6
(1) Osteogenic differentiation of human MSCs	7
(2) Chondrogenic differentiation of human MSCs	7
(3) Adipogenic differentiation of human MSCs	7
4. 분화능 확인	7
(1) 골아세포의 Alkaline Phosphatase staining	8
(2) 연골분화세포의 Safranin O 염색	8
(3) 지방세포의 Oil red-O staining	8
5. 신경세포 분화	8
6. 면역 염색	9
(1) 면역화학염색	9
(2) 면역형광염색	9
7. Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction	10
(1) Total RNA 분리	10
(2) cDNA 합성	10
(3) PCR	10
(4) 전기영동	11
8. Western blotting	11
III. 결과	12
1. 골수 채취 및 간엽간세포 배양	12
2. 유세포 분석 (FACS)	12
3. 분화능 검사	12
(1) 골아세포의 Alkaline Phosphatase 및 silver nitrate 염색	12
(2) 연골분화세포의 Safranin O 염색	12
(3) 지방세포의 Oil red-O staining	12
4. 골수 유래 신경양세포로의 분화	13
5. 면역 염색	13
(1) 면역화학염색	13
(2) 면역형광염색	13
6. Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction	14
7. Western blotting	14
IV. 고찰	15

참고문헌	27
영문요약	32

표 목 차

도표 1. cDNA 합성 Cycle	18
도표 2. PCR용 Prime 염기서열	18
도표 3. cytokine group의 EGF 또는 EGF와 HGF로 2주 처리한 후 성장, 증식 된 세포의 NSE, NeuN, GFAP에 대한 양성적 면역세포화학염색 비율.....	18

그 립 목 차

그림 1. 간엽간세포 배양 사진(100X).....	19
그림 2. 유세포 분석.....	20
그림 3. 골아 분화 후 염색 사진.....	21
그림 4. 음성 대조군과 Chondrogenic media 3주 처리 군의 safranin 염색.....	21
그림 5. 지방세포 분화 유도 후 Oil Red-O staining.....	22
그림 6. 신경양분화유도 후 광학 현미경 사진.....	22
그림 7. 면역화학 염색.....	23
그림 8. Cytokine 그룹의 2주 후 신경양세포를 신경세포 특이 항체를 이용한 확인 (a, b)GFAP, (c, d)NeuN, (e, f)MAP2, (g, h)Gal C.....	24
그림 9. Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction.....	25
그림 10. Western blotting.....	26

국문요약

골수 유래 간엽간세포로부터 신경양세포로의 분화

일반적으로 골수 내 존재하는 간엽간세포의 수는 매우적어 단핵세포 (mononuclear cell) 1×10^6 개 중 2~5개 정도의 비율을 차지한다고 알려져 있어 정상적으로 인체 내에 간엽간세포 수가 1×10^6 개 정도일 것으로 추정된다. 그러나 골수로부터 분리 및 배양이 비교적 간단하고 생체 외(ex vivo)에서의 증식력도 우수하여 줄기세포의 특징을 소실하지 않으면서 10억 배 이상으로 증식시킬 수 있다.

간엽간세포는 다기능적이며 세 개의 배아층에서 분화되는 모든 세포들로 자라는 특성이 있다. 신경세포로의 분화가 가능한 세포들을 찾아내는것은 세포적 치료에 무한한 가능성을 주고 있다. 본 연구에서 우리는 골수에서 유래된 간엽간세포가 신경세포적 분화가 유도가능한지에 대하여 알아보았다. 우리는 인간의 간엽간세포가 상피성장인자, 간세포성장인자, 혈관내피성장인자가 포함된 매질에서 배양시 신경학적 분화에 대해 기술하였다. 본연구에서 분화된 세포 집단들에서 신경세포 특이 표지자를 찾기위해 위상차 현미경, 역전사 PCR, 면역형광, 면역세포화학을 사용 분석하였다. 이런 배양 조건에서 간엽간세포는 여러 가지의 신경아교세포에 특이적인 표지자를 표현하는 신경 세포 표현형으로 유도되었다. 본연구에서 골수 유래 간엽간세포의 증식 및 신경양세포 분화 능력은 골수유래간엽간세포의 퇴행성 신경질환 및 뇌졸중 등과 같은 질환에서 폭넓은 세포치료제로의 적용 가능성을 보여주었다. 기존의 여러 화학물질을 이용한 화학적 신경양세포 분화유

도방법은 화학 물질의 독성 때문에 임상 시험에 적용하는 데 많은 제약이 따르게 된다. 이와는 대조적으로 본 연구에서 사용된 상피성장인자, 혈관내피성장인자 및 간세포성장인자는 우리 몸에서 분비되는 성장인자임으로 이를 이용한 분화유도방법은 안전성이 높아, 추후에 신경양세포로 분화 유도시킨 세포를 임상적 치료방법으로 적용함에 있어서 제한이 적을 것으로 판단된다. 또한 자가의 골수에서 유래하므로 면역 거부 반응 등의 심각한 문제없이, 적은 양의 골수에서 많은 신경양세포를 얻을 수 있어 임상에 치료법으로 매우 유용하게 적용할 수 있을 것이다.

앞으로 이와 같이 골수 유래 간엽간세포로부터 분화된 신경양세포의 특징을 분자생물학적 및 생리학적으로 기존의 신경세포와 비교분석이 필요하며, 이들의 이식 가능성과 동물에서의 분화 가능성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 골수 유래 간엽간세포, 신경양세포 분화

골수 유래 간엽간세포로부터 신경양세포로의 분화

<지도교수 강 성 준>

연세대학교 원주의과대학 대학원 의학과
배 금 석

I. 서론

19세기 후반부터 여러 연구자들에 의해 골수(bone marrow) 내에, 대표적인 줄기세포인 조혈모세포이외에 중배엽의 골, 연골 등을 형성하는 비조혈줄기세포 (nonhematopoietic stem cells)가 존재할 것으로 제안되었으며, 1968년 Friedenstein 등에 의해 이들 세포가 골을 형성할 수 있음이 증명되었고, 1985년 Owen M. 등은 조혈모세포와의 유사성을 기초로 하여, 자가 생성 (self renewal)과 다양한 결합조직(connective tissue)으로의 분화 능력 (multidifferentiation capacity)을 지닌 세포가 골수 내에 존재할 것이라고 보고하였고(1), 이러한 세포들은 골수유래 (bone marrow-derived) 간엽간세포 (mesenchymal stem cells) 혹은 골수기질줄기세포 (marrow stromal stem cells)로 명명되며 전 세계적으로 수많은 연구들이 진행되고 있다.

간엽간세포는 비조혈모세포로서 골수뿐만 아니라, 지방, 체대혈, 배아조직에서 얻어지며(2-5, 9-13) 중간엽기원의 세포들인 골수기질세포, 지방세포, 조골세포, 연골세포, 건세포, 근세포 등으로 다양하게 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다(6-8). 또한 간세포 등의 내배엽기원 조직과 외배엽기원의 신경조직으로 분화할 수 있는 능력도 가지고 있어 재생 의학적 세포치료제로서 이용하려는 노력들이 활발하게 이루어지고 있다.

일반적으로 골수 내 존재하는 간엽간세포의 수는 매우적어 단핵세포 (mononuclear cell) 1×10^6 개 중 2~5개 정도의 비율을 차지한다고 알려져 있어 정상적으로 인체 내에 간엽간세포 수가 1×10^6 개 정도일 것으로 추정된다. 그러나 골수로부터 분리 및 배양이 비교적 간단하고 생체 외(ex vivo)에

서의 증식력도 우수하여 줄기세포의 특징을 소실하지 않으면서 10억 배 이상으로 증식시킬 수 있다. 특히 Kuznetsov 등은 증식에 필요한 몇몇 성장인자를 밝혀냈는데, 간엽간세포는 혈청 (serum)과 혈소판유래 증식인자 (platelet-derived growth factor), 염기성 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor), 전환성장인자 β (transforming growth factor β), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor) 등을 포함한 여러 가지 성장인자들의 존재 하에서 생체의 균집들(in vitro colonies)을 형성할 수 있음을 보고하였다 (14,15).

고대 중국인들이 ‘뇌는 골수의 바다이다’라는 표현으로 골수가 뇌 조직의 원천이라고 믿었던 믿음(16)이 최근에 와서 하나씩 증명되고 있다. Eglitis MA. 등은 골수 유래 세포가 피질(cortex)에서부터 뇌간(brain stem)까지, 뇌 전체 지역에서 발견됨을 보고하였다 (17). 특히 사람 간엽간세포의 경우, 쥐의 선조(striatum)로 주입시켰을 때, 쥐의 성상교세포 (astrocyte)와 유사한 방식으로 생착, 이동 및 생존함을 보였으며, 이때 전형적인 골수 간엽간세포 표지들이 상실 되는 것이 관찰되었다 (18). Kopen 등은 골수 간엽간세포를 신생 쥐의 좌측 뇌실(lateral ventricle)에 이식하였을 경우, 전뇌(forebrain)와 소뇌(cerebellum) 도처로 이동하였으며 일부 세포가 성상교세포 (astrocyte)와 신경세사 (neurofilament)를 함유한 신경세포로 분화됨을 관찰하였다 (19). 이와 더불어 Brazelton 등은 골수이식모델에서 골수간세포를 혈관 내 주입시, 주입된 세포가 중추신경계에서 신경세포로 분화됨을 확인하였고 (20) 또한 Mezey 등도 골수세포들을 쥐의 복강 내 주입시, 이들 세포가 뇌로 이동하고 신경세포로 분화되는 것을 보고하였다 (21).

또한 최근 여러 연구를 통하여 골수 간엽간세포가 생체 외에서도 신경세포로 분화가 가능함을 확인하였다. Sanchez-Ramos 등은 레티노산(retinoic acid)과 뇌유래 신경성인자(brain-derived neurotrophic factor) 등을 이용하여 골수 유래 간엽간세포가 뉴런 (neuron) 및 성상교세포 등을 포함한 신경세포로 분화시켰다 (22). 또한 Woodbury 등은 β -mercaptoethanol (BME), dimethyl sulfoxide (DMSO), butylated hydroxyanisole (BHA) 등과 같은 항산화제 (antioxidant)를 이용하여 골수 유래 간엽간세포를 신경세포로 분화시켰는데, 그 결과 수 시간 내에 대부분의 간엽간세포 (80%)가 뉴런모양의 세포로 변화되고 뉴런 특이적 마커를 발현함을 확인하였다 (23).

위와 같이 골수유래 간엽간세포의 신경세포로의 분화가능성을 보여주는 여러 연구결과들은, 각종 뇌질환 및 신경질환 치료에 골수유래 간엽간세포를 이용할 수 있음을 제시해준다. 따라서 본 연구에서는 골수 유래 간엽간세포를 신경세포로 효과적으로 분화시키는 방법을 모색하고자 분화인자로서 상피세

포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)와 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)를 사용하여 신경세포로의 분화양상을 관찰하였다.

EGF 및 VEGF는 뇌 조직 유래의 신경간세포 배양 시, 증식을 자극하는 성장인자로서 기능하는 것으로 알려져 있다 (24,25,26,28).

HGF는 4개의 크링글(kringle)을 가지는 α 사슬(chain)과 세린 프로테아제와 유사한 (serine protease-like) β 사슬로 구성된 이종이량체(heterodimer)로서 산란인자(scatter factor)로도 불리며, 티로신 활성화수용체(tyrosine kinase receptor)인 c-Met와 결합하고 (29), 다형질성장성 역할(pleiotrophic roles)을 지니는 성장인자이다 (30). 특히 신경 조직 내에서 receptor tyrosine kinase와 그 리간드(ligand) 들이 발현되며 이들은 뉴런(neuron)의 생존이나 분화 및 재생에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

신경원성 분화의 능력이 있는 세포들은 세포성 치료에 대한 넓은 잠재력을 가지고 있다. 신경 조직은 손상 이후 교정에 대한 능력에 한계를 가지고 있다 (31-34). 일반적으로 신경 세포성 치료에 제안된 세포원은 배아 줄기 세포와 배아 또는 성인 뇌 조직으로부터의 신경 줄기 세포를 이용한다(35-38). 그러나 배아 줄기세포와 신경 줄기세포는 다양한 윤리적 및 법적 제약으로 임상 적용이 제한적이다.

골수유래 간엽간세포가 신경교세포적(분화된 교세포와 신경세포로 증식할 수 있는 신경교전구세포)인 표현형을 지닌 세포로 분화할 수 있는 능력은 근위축성 측색경화증(Amyotrophic Lateral sclerosis), 파킨슨씨병(Parkinson's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease) 같은 퇴행성 신경질환을 가진 환자의 치료에 있어서 중요한 과정이다(39-41). 조혈모세포나 간엽간세포의 저장소 역할을 하는 골수는 죽어가는 신경을 보호하거나, 대체하는 세포치료를 하는데 있어서, 배아줄기세포를 대체할 수 있는 것으로 인식되고 있다 (42-45). 사실, 환자에게 적은 고통을 주면서 자가 유래 줄기세포를 얻고, 이를 시험관에서 증식, 분화시키며 같은 환자에게 재이식 시키는 개념은 새롭고 흥미로운 가능성을 가지게 한다.

본 연구에서는 인체 내에 존재하는 성장인자들을 이용하여 신경세포로 분화시켰으므로 퇴행성 신경질환(neurodegenerative diseases)등의 치료에 획기적인 자가 유래 세포치료(autologous cell therapy)가 가능할 것으로 기대된다.

II. 실험재료 및 방법

1. 골수 채취 및 간엽간세포 배양

병력이 없는 정상 지원자들을 대상으로 골반(pelvis)으로부터 골수 약 10mL 정도를 채취하여 헤파린이 함유된 유리관으로 옮겨 저장하였다. 10mL의 골수에 30mL의 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline; PBS)를 첨가하고, 혼합용액 20mL를 10mL의 Ficoll-Paque™ plus(1.077g/mL, Amersham Pharmacia Biotech) 용액 위로 천천히 흘려보낸 후 2,000rpm으로 20분간 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation) 하였다. 다음 맨 위층과 Ficoll-Paque™ plus 계면에 있는 단핵세포 층을 회수하고 인산완충용액을 20mL 넣어준 후 다시 1,800rpm으로 5분간 원심분리를 하여 단핵세포만을 회수하였다.

분리된 단핵구 세포에 완전분화배지(DMEM, 10% FBS, 1x penicillin-streptomycin)를 넣은 후, 배양용기 (T-75)에 적당한 양의 단핵구 세포 (2×10^5)를 접종하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다.

7일에서 10일후에 단핵구 세포에서 간엽간세포만 배양용기 바닥에 붙어서 증식하게 되므로 배지를 교환해 준 후, 간엽간세포가 배양용기의 80% 이상을 차지하면 세포를 다른 배양용기 (T-175)로 옮겨서 계대 배양한다. 3-4일에 한 번씩 배지를 교환하여 5회 정도 계대배양을 하였다.

2. 유세포 분석 (FACS)

배양된 세포들은 PBS로 세척하고, 12,000 rpm에서 10분 동안 침전시켰다. 1×10^6 cells/mL의 농도로 세포를 부유하고, 각각의 항체 [SH2 (CD105-FITC, SEROTEC), SH4(CD73-PE, BD), 대조군 (IgG1-FITC 및 IgG1-PE, BD)] 을 10ul/ 10^5 cells의 농도로 첨가하여 45분간 실온에서 반응시킨 후, PBS로 3회 세척 한 후 침전 시키고, column으로 세포를 떨어뜨리고, flow buffer (0.1% sodium azide, 1% paraformaldehyde, 0.5% bovine serum albumin)로 고정시키고 Epics XL(Beckman Coulter)상에서 분석 하였다. 음성대조군은 항체 [(CD45-FITC (BD), CD34-FITC (BD), CD14-FITC (BD)]을 사용하여 위의 방법으로 분석하였다.

3. 분화능 검사 (50)

(1) Osteogenic differentiation of human MSCs

배양초기의 간엽간세포(second passage)를 완전배지에 부유하여 24well plate에 분주(5×10^4 cells/well)하여 넣고 24시간 배양한 후 골아세포 분화배지[High-glucose DMEM, 10% fetal bovine serum, 0.1 μ M dexamethasone (Sigma), 10mM β -glycerol phosphate, 50 μ M L-ascorbic acid]로 교체하여 3주 동안 배양하였다. 배지의 교체는 주 2회 실시 하였다.

(2) Chondrogenic differentiation of human MSCs

간엽간세포 (passage 1 or 2, 2×10^5 cells)를 chondrogenic medium [High-glucose DMEM, 2.5 % FBS, ITS+ Premix (6.25 μ g/mL insulin, 6.25 μ g/mL transferrin, 6.25 μ g/mL selenous acid, 5.35 μ g/mL linoleic acid, 1.25 μ g/mL bovine serum albumin), 1 mM Pyruvate, 37.5 μ g/mL Ascorbic acid, 10^{-7} M dexamethasone (Sigma)]에 부유시키고 450 \times g로 10분간 원심분리를 수행하여 세포를 침전시키고 침전된 세포를 micromass 형태로 연골세포 분화배지에서 3주간 배양하였다. 배양 중 배지는 주 2회 교체하였고 3주 후 염색을 통하여 분화를 확인하였다.

(3) Adipogenic differentiation of human MSCs

간엽간세포 (1×10^4 cell/cm²)를 완전배지에 부유하여 6 well plate에 분주하여 넣고 48시간 배양한 후 100%의 밀도로 배양된 세포를 3일 추가 배양한다. 지방세포분화유도배지[AI (Adipogenic Induction Medium); high glucose DMEM, 10% fetal bovine serum, 1 μ M dexamethasone (Sigma), 10 μ g/mL insulin (Sigma), 100mM indomethacin (Sigma), 0.5mM methyl-isobutylzanthine (Sigma)]로 72시간 동안 배양하여 분화를 유도시켰다. 지방세포분화유도배지를 제거하고 지방세포분화유지배지[AM(Adipogenic Maintenance Medium); high glucose DMEM, 10% fetal bovine serum, 10 μ g/mL insulin(Sigma)]를 이용하여 24시간 배양하였다. 위와 같이 지방세포분화유도배지와 지방세포분화유지배지 교체를 3회 반복하여 처리한 후 지방세포분화유지배지로 4주간 추가배양 하였다.

4. 분화능 확인

(1) 골아세포의 Alkaline Phosphatase staining

사람 간엽간세포의 골아세포로 분화되는 지를 확인하기 위하여 alkaline phosphatase 염색법을 수행하였다. 24 well plate에서 3주간 배양된 세포에 media를 제거한 후 PBS로 2회 세척하였다. 차가운 (ice-cold) methanol (99.9%)을 첨가하여 실온에서 2분간 고정시킨 후 3차 증류수로 2회 세척하였다. BCIP/NBP (Sigma) liquid substrate를 넣어주어 실온에서 10분 동안 반응 시킨 후 3차 증류수로 2회 세척하였으며, 이후 광학현미경으로 발색정도를 확인하였다 (51).

(2) 연골분화세포의 Safranin O 염색

배양 된 세포를 PBS로 세척한 후 차가운 (ice-cold) acetone에 1~2분간 고정하였다. Mayer's hematoxylin 용액으로 10분간 염색 후 bluing solution으로 세척 하고 다시 증류수로 세척하였다. 0.1% safranin O 용액을 첨가하여 5분간 반응시킨 후 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol, xylene 순서로 2분 간격마다 교체하였다. Mounting 하여 광학현미경으로 검경하여 분화를 확인하였다 (52).

(3) 지방세포의 Oil red-O staining

사람 간엽간세포의 지방세포로 분화여부를 확인하기 위하여 oil red O에 의한 지질염색법을 수행하였다. 6 well plate에서 4주간 배양된 세포에 4% paraformaldehyde (in PBS) 첨가하여 4-12시간 고정시킨 후 60% isopropanol (in PBS)로 세척하였다. 60% oil red-O solution (in PBS)으로 45분간 염색하고 증류수로 세척한 후 100% isopropanol로 다시 세척하고 Mayer's hematoxylin 용액으로 세포핵을 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 신경세포 분화

신경세포로의 분화는 cytokine만 처리한 경우와 cytokine과 여러 가지 chemical을 처리한 두 그룹으로 나누었다. 먼저 간엽간세포를 배양기 전체를 차지하게 배양 시킨 후 Cell scraper로 분리시킨다. 분리된 간엽간세포는 서로 뭉쳐진 형태가 되는데, 이것을 1-2 cluster/cm² 되게 배양기에 넣어 주어 배양한다. 24시간이 지난 후 배양기에 간엽간세포가 붙어서 자라기 시작할 때 각각의 그룹에 맞게 Cytokine 및 Chemical을 넣어 주어 배양하였다. 먼저 Cytokine 그룹에는 DMEM 기초배지에 EGF

(epidermal growth factor, 10 ng/mL, Gibco BRL), HGF (hepatocyte growth factor, 20 ng/mL, R&D Systems), VEGF (Vascular endothelial growth factor, 20 ng/mL, R&D Systems)를 첨가하여 14 일 동안 3일 간격으로 배지를 교환하여 배양하였다. Chemical 그룹은 DMEM 기초배지에 7일간 배양한 후, 8일째부터는 Chemical compound (butylated hydroxyanisole 200uM, KCl 5mM, Valproic acid 2uM, Forskolin 10uM, Hydrocortisone 1uM, Insulin 5uM)를 첨가한 배지에서 5일간 배양하였다.

6. 면역 염색

(1) 면역화학염색

분화된 세포를 1 cm²의 커버 글라스 위에 1×10⁴ cells/cm² 농도로 부착시켰다. 세포가 부착된 후, PBS로 5분간 세척한 후 4% 파라포름알데히드를 포함하는 PBS로 15분간 고정시키고, PBS로 5분간 두 번 세척하였다. 이후 1% BSA와 0.2% Triton X-100이 들어있는 PBS로 5분간 처리한 후 일차 항체를 첨가하여 16시간 동안 반응시켰다. 상기 일차항체로는 anti-human NSE (neuron-specific enolase; Chemicon Inc.), anti-human NeuN (Chemicon Inc.), anti-human β-tubulin III (Sigma Co.), anti-human GFAP (glial fibrillary acidic protein; Sigma Co.) 및 anti-human MAP-2 (microtubule-associated protein-2) 항체를 사용하였다. 일차 항체와의 반응이 종료된 후 0.5% BSA가 포함된 PBS로 15분간 두 번 세척하였다. 이차 항체를 넣고 30분간 배양한 다음 0.5% BSA가 포함된 0.1M PBS로 5분간 두 번 세척하였다. 이후 Avidin-biotin 반응을 30분간 수행하였다 (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratory Inc.). PBS로 5분간 두 번 세척한 다음 발색 기질로서 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate, Sigma Co.)을 넣어 5분간 반응시켰다. PBS로 5분간 처리하여 반응을 중지시키고 PBS 5분간 두 번 더 세척하였다. 반응물을 건조시킨 후 증류수로 5분간 세척하였다. 이후 증류수, 70, 80, 95 및 100% 에탄올을 이용하여 차례로 탈수시키고, 고정하였다

(2) 면역형광염색

면역 형광 염색은 세포를 culture slide (4 chamber, BD Falcon)에 옮긴 후 1-2일 배양하였다. 세포에 4% paraformaldehyde (in PBS) 첨가

하여 4-8시간 고정시킨 후 PBS로 3회 세척하고 blocking 용액 (5% BSA in PBS)을 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. 항체 (primary antibody)를 4℃에서 1시간 동안 반응시키고 PBS로 3회 후 mounting solution을 첨가하고 커버글라스를 덮은 후 형광현미경하에서 관찰하였다. 신경세포의 항원의 발현여부를 검사하기 위하여 NeuN,(1:100, Chemicon) GFAP(1:1000, Chemicon), MAP-2(1:500, Chemicon), NSE(1:100, Chemicon), TH2(1:1000, Chemicon), Gal C(1:500, Chemicon) 단일클론항체를 사용하여 면역 형광 염색을 시행하였다.

7. RT-PCR

(1) Total RNA 분리

175 mm 배양기에 키웠던 각각의 세포를 PBS 로 2회 세척 후 AccuZol(Bioneer Inc.) 1mL을 첨가 한 후 cell scraper로 세포를 수집하여 1.5mL Centrifuge tube에 담는다. 200ul chloroform을 첨가 한 후 15초 동안 강하게 섞어 주고, 5분 간 ice에 방치 하고, 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리한다. 1.5mL tube에 상층액을 옮긴 후 동량의 isopropyl alcohol을 첨가 하여, -20℃에서 10분간 방치하고, 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심 분리하여, 상층액을 제거 후 80% ethanol 1mL으로 세척 후, 다시 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심 분리 하여 상층액을 제거한다. RNA pellet은 상온에서 10-20분간 건조 시킨 후, DEPC-water를 넣어 녹여준 후 55-60℃에서 10분간 방치 한다.

(2) cDNA 합성

분리 된 total RNA는 DNase를 처리한 후 cyclescript RT preMix (dT20, Bioneer Inc.)에 RNA 1ug을 넣어 준 후 도표 1의 cycle을 15회 수행하여 cDNA를 합성하였다. (도표 1)

(3) PCR

합성된 각각의 cDNA를 주형으로 PCR premix (Bioneer Inc.)를 이용하여 도표 2의 primer로 PCR을 수행하였다. 반복은 30회 이었다. (도표2)

(4) 전기영동

PCR에 의해 합성 되어진 DNA 절편은 1.5% agarose gel을 사용하여 1X TAE buffer 상에서 50V의 전압으로 전기영동을 하고 ethidium bromide로 염색하여 U. V illuminator로 관찰하였다.

8. Western blotting

배양기 내의 세포를 PBS로 2회 세척 후 cell scraper를 이용하여 분리하고 1.5 mL tube에 모은 후 RIPA buffer (1% triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 50 mM NaCl₂, 50 mM tris-HCl, 1 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF)를 넣어 주어 lysate를 얻었다. Protein sample 은 protein assay solution 으로 정량하여 4X sampling buffer를 첨가하여 5분간 끓여주었다. 그 후 10% SDS polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동하였다. 전기영동 후 transfer buffer (25mM Tris base, 0.2M glycine, 20%methanol)를 사용하여 Immobilon membrane (Millipore)으로 30V에서 1시간 transfer 하였다. blocking buffer (5% skin milk, 1X TBS, 0.1% Tween20)에서 1시간 blocking 한 후 4℃에서 항체 (GFAP, NSE, Gal C, NeuN)로 12시간 반응 시켰다. 그 후 washing buffer (1X TBS, 0.1% Tween20)로 5분 씩 3번 washing 한 후, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체로 한 시간 동안 반응시킨 후, 다시 3번 washing buffer로 washing하고, ECL (enhanced chemiluminescence) system (Amersham Bioscience)으로 확인하였다.

Ⅲ. 결과

1. 골수 채취 및 간엽간세포 배양

골수 내의 유핵 세포를 배양기에서 배양을 시작 한 7일 후 현미경 상에서 세포군집 (그림 1)이 확인 되었으며, 부착된 세포는 전형적인 간엽간세포 모양 (여러 돌기를 가진 방추형 모양의 섬유아세포 형태)을 이루고 있음을 확인하였다. 15일 후에는 1차 계대배양을 할 수 있었다.

2. 유세포 분석 (FACS)

골수유래 간엽간세포의 확인을 위하여 유세포분석을 수행하였다. 4회 계대 배양된 세포를 수집하여 간엽간세포 특이적 표지인자인 SH2와 SH4의 발현을 조사한 결과 세포의 99.8%로 양성으로 확인 되었으며, 조혈세포의 대표적인 표지인자인 음성대조군의 항체 (CD45, CD34, CD14)에 대해서는 음성반응을 보였다. (그림2) 이와 같은 결과를 통해, 배양된 세포는 조혈세포가 아닌 순수한 간엽간세포임을 확인하였다.

3. 분화능 검사

(1) 골아세포의 Alkaline Phosphatase 및 silver nitrate 염색

[High-glucose DMEM, 10% fetal bovine serum, 0.1uM dexamethasone (Sigma), 10mM β -glycerol phosphate, 50 uM L-ascorbic acid]로 교체하여 3주 동안 배양 후 염색한 결과, alkaline phosphatase 및 silver nitrate 염색에서 양성 결과를 통해 간엽간세포가 골아세포로 분화할 수 있음을 확인하였다. (그림3)

(2) 연골분화세포의 Safranin O 염색

원심분리를 이용하여 간엽간세포를 micromass 형태로 만들어 준 후 chondrogenic medium에서 3주 배양 후 Safranin O 염색결과 연골세포로 분화됨이 관찰되었다. (그림 4)

(3) 지방세포의 Oil red-O staining

AI(Adipogenic Induction Medium)로 72시간 동안 배양 후, AM(Adipogenic Maintenance Medium)를 이용하여 4주간 추가 배양 한 후 Oil red-O staining을 수행한 결과에서, 지방세포로 분화됨 (Oil

red-O에 의해 붉게 염색되어진 지방방울이 세포내에 생성됨)을 관찰하였다. (그림 5)

4. 골수 유래 신경양세포로의 분화

각각의 그룹에서 cytokine과 chemical을 첨가 하여 배양한 결과, 분화가 진행될수록 신경세포와 유사하게 세포의 돌기가 길고 가늘어지며 반면 세포핵을 중심으로 세포질이 차지하는 부분이 줄어드는 형태적인 변화를 보였다. cytokine 1주 후부터 신경세포의 형태가 관찰 되었으며, 2주 후에는 대부분의 세포가 유사 신경세포의 모양을 띄었다. 특히 Chemical 그룹에서는 세포와 세포간의 다양한 형태의 filament 구조를 확인 할 수 있었다. (그림 6)

다음으로 신경양세포 분화에 이용된 cytokine의 효과를 비교 관찰하기 위해 EGF 단독으로 처리하거나 또는 EGF와 HGF를 동시에 처리하여 2주간 성장 및 증식된 세포를 대상으로 신경세포 표지인자 (marker)인 NSE (Neuron Specific Enolase) 및 NeuN (Neuronal Nuclei)과 성상교세포 표지인자인 GFAP (glial fibrillary acidic protein)에 대해 면역세포화학염색을 실시한 결과, EGF 단독 처리했을 때 각각의 표지인자에 대해 양성으로 염색되는 세포가 매우 적은 반면, EGF와 HGF를 동시에 처리했을 때 각각의 표지인자에 대해 양성으로 염색되는 세포들이 뚜렷하게 관찰되었다. 위의 결과를 토대로 각각의 조건에서 양성으로 염색되는 면역세포화학염색비율을 조사하였을 때, EGF만 처리한 것 보다는 EGF와 HGF를 동시에 처리해준 배양기에서 양성 면역세포화학염색 비율이 월등히 높았다. (도표3)

5. 면역 염색

(1) 면역화학염색

Cytokine 2주 그룹의 세포를 대상으로 각각의 신경세포 표지인자 (NSE, NeuN 및 GFAP)에 대해 면역화학염색을 실시한 결과, 모두 양성으로 염색됨을 확인하였다 (그림 7). 즉 cytokine으로 간엽간세포를 신경양세포로 분화 유도시켰을 때, 주로 신경세포와 성상교세포로 분화되었음을 확인하였다.

(2) 면역형광염색

GFAP의 면역형광염색의 경우 cytokine 2주 그룹에서 형광을 띄었으며,

NeuN의 경우는 cytokine 2주 그룹에서 양성을 띄었지만, control에서도 약한 형광을 보였다. MAP2 (Microtubule-associated protein 2)의 경우는 Cytokine 2주 그룹에서 강한 형광을 보였다. 희소돌기아교세포 (Oligodendrocyte)의 표지인자인 Gal C (galactocerebroside)의 경우 cytokine 2주 그룹에서만 강한 형광을 보였다. (그림 8) 이러한 결과를 통해 간엽간세포가 신경세포 및 성상교세포로 분화될 뿐만 아니라 희소돌기아교세포로도 일부 분화될 수 있음을 확인할 수 있었다.

6. RT-PCR

GFAP의 경우 모든 그룹에서 유전자 발현을 보였으나 cytokine 만 2주 처리한 group에서 발현이 증가함을 보였다. NSE의 경우 control 그룹에서 미세한 유전자 발현을 보인 반면 cytokine 2주 그룹에서 가장 높은 발현을 보였고 chemical 그룹에서도 마찬가지로 control 그룹보다 발현이 높음을 보였다. MAP2, NF-M 그리고 GAP43의 경우 chemical 그룹에서만 발현됨이 관찰되었다. (그림 9) 위의 결과를 통해 분화조건에 따라 일부 신경양세포 특이적 표지인자의 발현이 차이가 있음을 확인하였다.

7. Western blotting

GFAP의 경우 Control 그룹을 제외한 분화를 유도한 모든 그룹에서 단백질 발현을 보였으며, chemical 그룹 보다 cytokine 그룹에서 보다 높은 단백질 발현을 보였다. NSE의 경우 모든 그룹에서 단백질 발현 양상을 보였으나 특히 cytokine 2주 그룹에서 높은 발현이 관찰되었다. Gal C의 control 그룹에서도 약한 단백질 발현을 보였으나 chemical 그룹에서 보다 높은 단백질 발현을 보였다. NeuN의 경우 cytokine 2주 그룹과 chemical 그룹에서 높은 단백질 발현을 보였다. (그림 10) 위의 결과를 통해 분화 조건에 따라 일부 신경양세포 특이적 표지인자의 발현이 차이가 있음을 확인하였다.

IV. 고찰

골수 유래 간엽간세포를 EGF, VEGF 및 HGF와 같은 cytokine을 이용하여 신경양세포로 증식 분화시킨 위 결과를 통해, 다음과 같은 세 가지 가능성이 존재할 것으로 추정할 수 있다.

첫째는 생체 외에서 증식 및 배양된 골수 유래 간엽간세포 내에 신경세포로 분화할 수 있는 신경세포의 하집단(subpopulation)이 존재할 수 있다는 것과, 둘째, 골수 유래 간엽간세포가 MET (mesenchymal epithelial transformation)와 같은 과정을 통해 신경세포로 전이분화 (trans-differentiation)되었을 가능성이 있다. 셋째는 RT-PCR과 Western blotting의 결과를 통해 알 수 있듯이 분화조건에 따라 각기 다른 특성을 갖는 신경양세포로의 분화가 가능하다는 것이다.

P. Bossolasco 등은 간엽간세포의 유세포 분석을 통하여 nestin과 beta-tubulin III 와 함께 O4와 GFAP도 양성을 보이는 것으로 미루어 간엽간세포는 이미 신경양세포로 분화 가능한 하집단이 존재할 수 있다고 추정하였다 (46). 이와 더불어 Jiang 등도 폭 넓고 선택적으로 증식된 세포들이 신경세포, 성상세포, 회돌기세포의 형태학적 특징을 가지는 다기능 전구세포들로 분화될 수 있음을 보고 하였다 (47). 또한 Chamberlain 등에 의해도 간엽간세포의 전이분화의 가능성이 증명되었다 (48).

골수 유래 간엽간세포의 증식 및 분화 시, EGF만 처리한 군과, EGF와 HGF를 동시에 처리한 군에서의 NSE, NeuN, GFAP에 대한 면역세포화학염색 양성율에 대한 결과에서 알 수 있듯이, EGF는 세포의 증식을 자극하고, HGF는 신경양세포로의 분화를 자극하는 것으로 판단된다.

EGF는 bFGF와 더불어 쥐나 인간의 뇌에서 유래한 신경 줄기세포나 신경전구세포를 성장, 증식 시키는데 사용되는 인자로 알려져 있다. 또한 이전 보고에서 골수 유래 간엽간세포가 EGF에 대한 수용체를 발현한다는 것이 밝혀져 있기 때문에 (51), 본 연구에서의 EGF는 골수 유래 간엽간세포의 신경양세포로의 증식 및 분화에 관여할 것으로 추정된다 (24-26,49,50).

HGF는 다형질성장성 기능 (pleiotrophic function)을 갖는다고 알려져 있고 (30), HGF가 신장 상피세포 폐 상피세포, 위장 및 장 점막 상피세포, 각막 상피 그리고 피부 표피 등을 포함한 여러 종류의 상피세포의 기관발생이나, 조직재생에 중요한 역할을 할 뿐 만아니라 (52-54), 골 형성세포, 근육세포 등 간질세포의 성장 및 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (55-57). 또한 HGF는 희귀한 신경성 인자 (neurotrophic factor)로서 뇌 조

직 전체에서 발견되는 것으로 알려져 있다 (58-61). 특히, HGF는 해마와 중뇌 뉴런의 생존을 향상시키며 신피질 외식 (neocortical explant)에서 신경돌기(neurite)의 성장을 초래하는 것으로 알려져 있다 (58,61). 말초 신경계에서의 HGF는 운동성 뉴런의 생존 인자로 기능하며 특히 발달과정에서 척수 운동 뉴런에 대하여 축삭 화학주성인자 (axonal chemoattractant)로서 기능하고 (62), 또한 감각 뉴런 (sensory neuron)과 부교감신경 뉴런 (parasympathetic neuron)의 성장과 생존에도 관여하는 것으로 알려졌다 (63).

현재 퇴행성질환, 외상, 그리고 허혈성 손상 등을 포함한 많은 중추신경계 질병에 대한 수술 및 약물 치료법은 치료 결과가 매우 제한적이어서 손상된 신경계를 회복하는 결과를 기대하기가 어렵다. 손상된 신경조직을 재생하는 치료를 위해 신경세포 이식이란 치료방법이 대두되었고 성인 파킨슨씨병 환자에게 태아의 도파민성의 신경세포 이식연구가 성공적인 결과를 낳았다 (36). 그러나 배아나 태아의 줄기세포의 치료법 적용은 아직 많은 윤리적 문제를 안고 있어 논란의 여지가 많다. 또한 성체 신경 줄기세포 (adult neuronal stem cells; NSCs)는 성체로부터 충분한 양을 확보하기에 한계가 있기 때문에 (31,64) 임상적인 치료법으로는 매우 적절하지 못하다(65).

반면, 골수유래 간엽간세포의 뛰어난 증식능력은 성체신경줄기세포의 수적 한계를 극복할 수 있을 뿐만 아니라 골수유래 간엽간세포에서 신경성 세포의 특성을 가지는 세포로 분화할 수 있음이 밝혀져 손상된 신경세포를 회복시킬 수 있는 능력이 확인되었다.

이러한 골수유래 간엽간세포의 신경세포 분화 능력을 이용하여, 뇌졸중 동물 모델 연구에서 간엽간세포의 주입시켰을 때, 증상이 회복되고 신경학적 결손이 감소한 결과들이 보고되었다(68-71). 또한 손상된 뇌 조직에 직접 주입하지 않고 혈관을 통하여 주입된 골수유래 간엽간세포가 혈액 뇌장벽을 통과하여 손상된 뇌 조직으로 이동하는 능력이 있음이 밝혀졌다 (2,66,22,23,67). 임상연구에서, Bang 등은 뇌경색 환자를 대상으로 골수에서 추출한 자가 (autologous) 간엽간세포를 증식 후 정맥 주사하여 경색부위 크기 감소 및 뇌실의 위축 감소 등과 같은 신경학적 증상 개선 효과를 보고하였다 (72).

본 연구에서 골수 유래 간엽간세포에서 증식 및 신경양세포 분화 능력은 골수유래간엽간세포의 퇴행성 신경질환 및 뇌졸중 등과 같은 질환에서 폭넓은 세포치료제로의 적용 가능성을 보여주었다. 기존의 여러 화학물질을 이용한 화학적 신경양세포 분화유도방법은 화학 물질의 독성 때문에 임상 시험에 적용하는 데 많은 제약이 따르게 된다. 이와는 대조적으로 본 연구에서 사용된 EGF, VEGF 및 HGF는 우리 몸에서 분비되는 성장인자임으로 이를 이용한

분화유도방법은 안전성이 높아, 추후에 신경양세포로 분화 유도시킨 세포를 임상적 치료방법으로 적용함에 있어서 제한이 적을 것으로 판단된다. 또한 자가의 골수에서 유래하므로 면역 거부 반응 등의 심각한 문제없이, 적은 양의 골수에서 많은 신경양세포를 얻을 수 있어 임상에 치료법으로 매우 유용하게 적용할 수 있을 것이다.

앞으로 이와 같이 골수 유래 간엽간세포로부터 분화된 신경양세포의 특징을 분자생물학적 및 생리학적으로 기존의 신경세포와 비교분석이 필요하며, 이들의 이식 가능성과 동물에서의 분화 가능성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

도표 1. cDNA 합성 Cycle

Step	Reaction	Tem.	Time
step 1	primer annealing	37°C	30sec
step 2	cDNA synthesis	48°C	4min
step 3	melting secondary structure & cDNA synthesis	55°C	30sec

도표 2. PCR용 Prime 염기서열

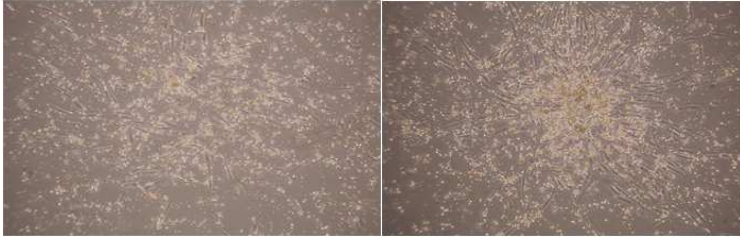
	Primer seq.
GFAP	for: GTG GGC AGG TGG GAG CTT GAT TCT rev: CTG GGG CGG CCT GGT ATG ACA
NSE	for: CCC ACT GAT CCT TCC CGA TAC AT rev: CCG ATC TGG TTG ACC TTG AGC A
Map2	for: CCA TTT GCA ACA GGA AGA CAC rev: CAG CTC AAA TGC TTT GCA ACT AT
NF-M	for: GAG CGC AAA GAC TAC CTG AAG A rev: CAG CGA TTT CTA TAT CCA GAG CC
GAP 43	for: TTT CCC ACC CAC TAG CCC TCT TTC rev: ATA TTT TGG ACT CCT CAG ATG AAC G

도표 3.

	NSE 양성 염색 세포	NeuN 양성 염색 세포	GFAP 양성 염색 세포
EGF로 성장. 증식된 세포	0.9 %	0.8 %	1.2 %
EGF와 HGF로 성장. 증식된 세포	56 %	75 %	24 %

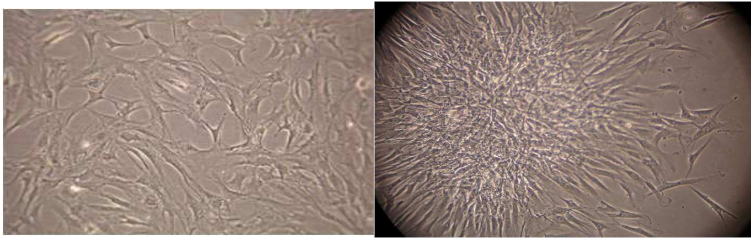
* 100X 한면의 총세포수와 양성염색 세포의 비율 (총 5면에 평균 값)

그림 1. 간엽간세포 배양 사진(100X)



(a) 골수 배양 후 7일

(b) 골수 배양 후 14일



(c) 4번의 계대 배양

(d) pellet culture

그림 2. 유세포 분석

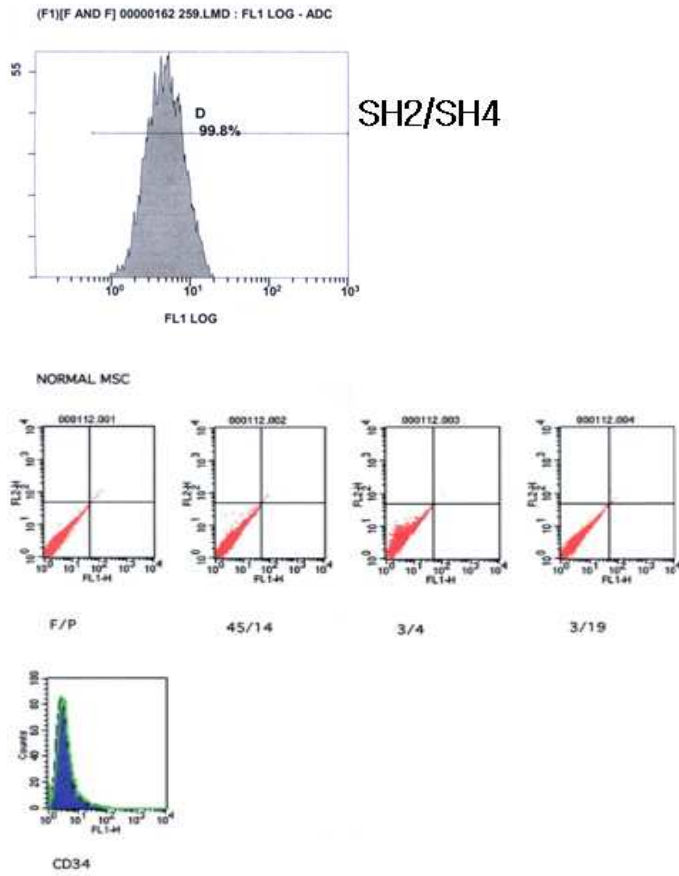
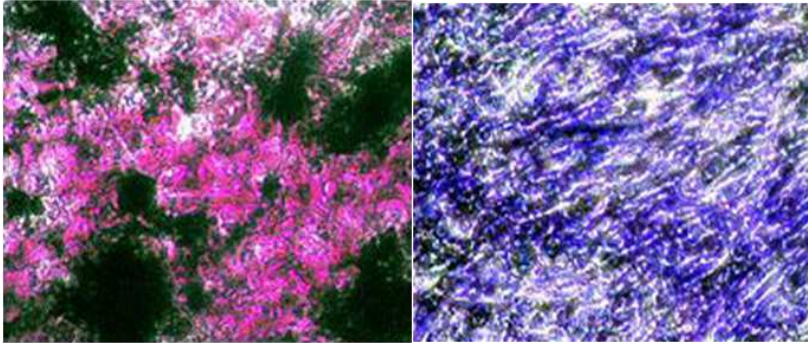


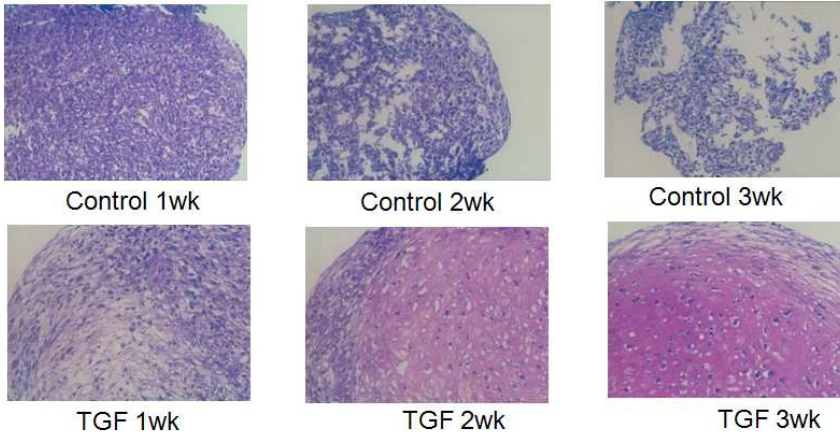
그림 3. 골아 분화 후 염색 사진



(a) Alkaline phosphatase stain

(b) Silver nitrate stain

그림 4. 음성 대조군과 Chondrogenic media 3주 처리 군의 safranin 염색



Control 1wk

Control 2wk

Control 3wk

TGF 1wk

TGF 2wk

TGF 3wk

그림 5. 지방세포 분화 유도 후 Oil Red-O staining

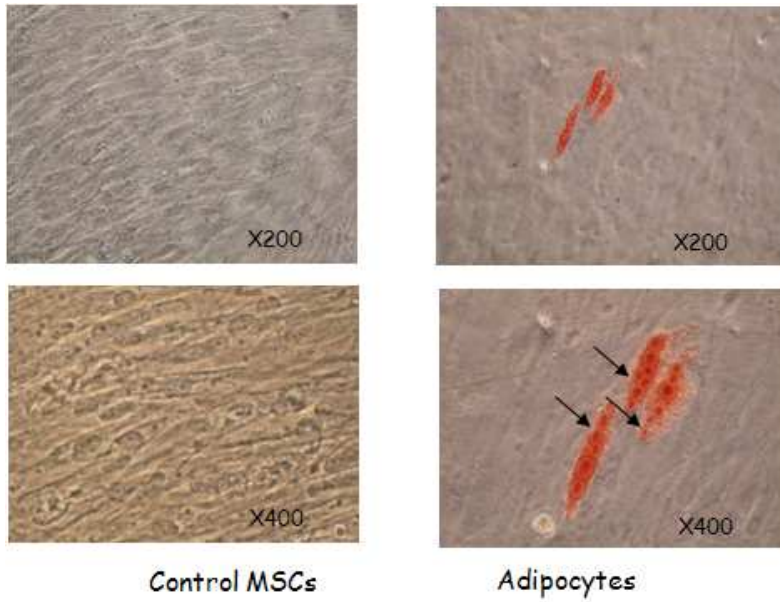
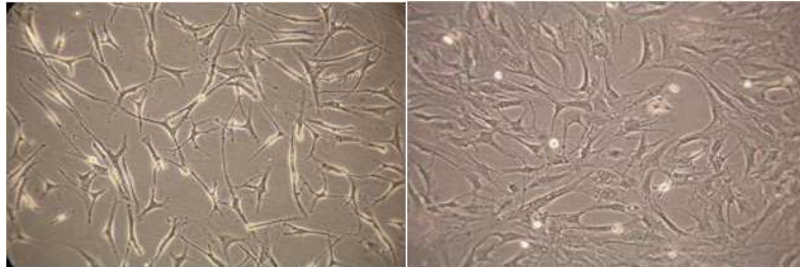
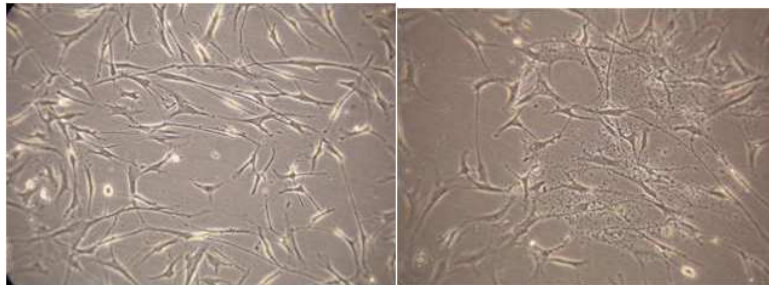


그림 6 신경양분화유도 후 광학 현미경 사진



(a) 간엽간세포

(b) Cytokine 그룹의 1주 경과



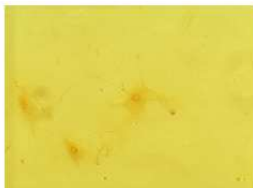
(c) Cytokine 그룹의 2주 경과

(d) Chemical 그룹의 2주 경과

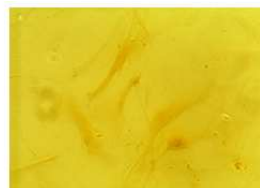
그림 7. 면역화학 염색



(a) NSE



(b) NeuN



(c) GFAP

그림 8. Cytokine 그룹의 2주 후 신경양세포를 신경세포 특이 항체를 이용한 확인 (a, b)GFAP, (c, d)NeuN, (e, f)MAP2, (g, h)Gal C.

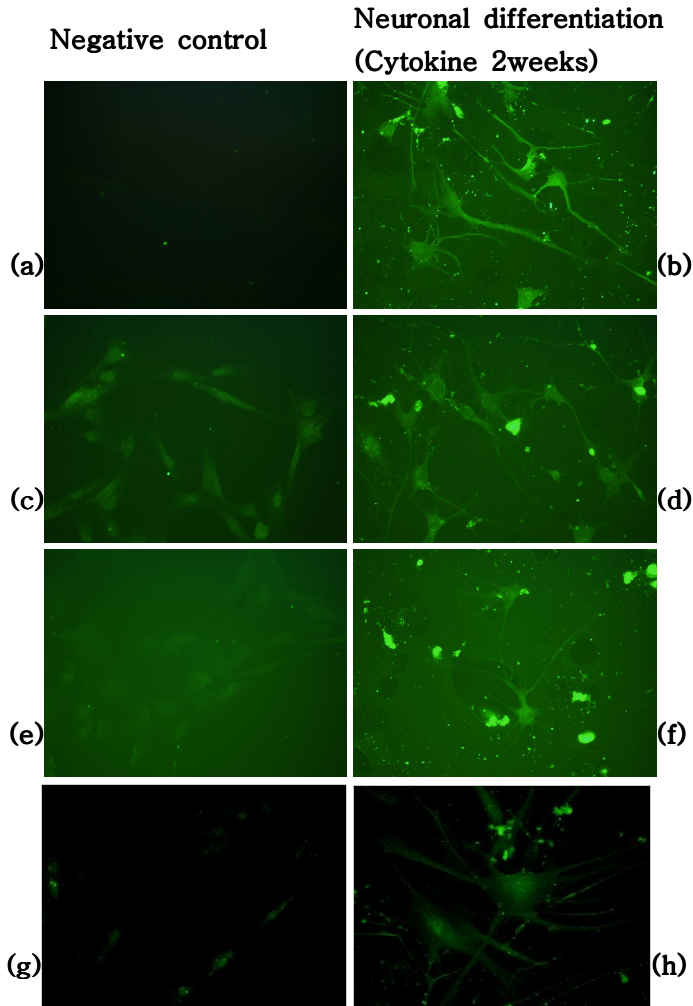


그림 9. Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction

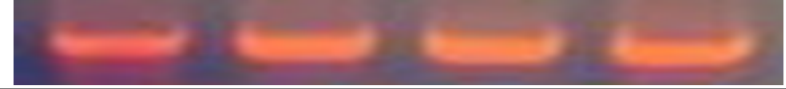

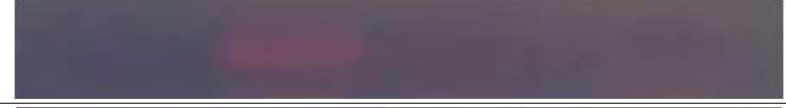
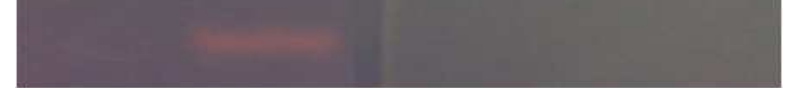





				GFAP
				NSE
				MAP2
				NF-M
				GAP 43
control group	chemical group	cytokine 1 weeks group	cytokine 2 weeks group	

그림 10. Western blotting

				GFAP
				NSE
				Gal C
				NeuN
control group	cytokine 1 weeks group	cytokine 2 weeks group	chemical group	

참고문헌

1. Owen M (1985) In: Peck WA (ed.) Bone and mineral research, Vol. 3. New York. Elsevier, pp. 1-25
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. (1999) Science 284:143-7.
3. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinnet DG. (2001) Stem Cells 19:408-18.
4. Le Blanc K, Pittenger M. Cytotherapy 2005;7:36-45.
5. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. (2004) Cell Physiol Biochem 14:311-24.
6. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson Jr NA, et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:186-91.
7. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. (2000) Science 290:1775-9.
8. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. (2000) Science 290:1779-82.
9. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. (2001) Tissue Eng 7:211-28.
10. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. (2005) Stem Cells 23:412-23.
11. Panepucci RA, Siufi JL, Silva Jr WA, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, et al. (2004) Stem Cells 22:1263-78.
12. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. (2004) Stem Cells 22:1338-45.
13. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. (2001) Blood 98:2396-402.
14. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG (1997) Br J Haematol 97:561
15. van den Bos C, Mosca J, Winkes J, Kerrigan L, Burgess WH, Marshak DR (1997) Human Cell 10:45
16. Morse WR (1938) Chinese Medicine. Hoeber, New York
17. Eglitis MA and Mezey E (1997) Proc Natl Acad Sci USA

- 94:4080-4085
18. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:3908
 19. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:10711-10716
 20. Timothy R. Brazelton, Fabio M. V. Rossi, Gilmore I. Keshet, Helen M. Blau (2000) Science 290:1775-1779
 21. Eva Mezey, Karen J. Chandross, Gyongyi Harta, Richard A. Maki, Scott R. McKercher. (2000) Science 290:1779-1782
 22. J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Cardozo-Pelaez et al. (2000) Exp Neurology 164:247-256
 23. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. (2000) J Neurosci Res 15:61:364-370
 24. Reynolds BA, W Tetzlaff, S Weiss. (1992) J Neurosci 12:4565-4574
 25. Reynolds BA, S Weiss. (1992) Science 255:1707-1710
 26. Reynolds BA, S Weiss. (1996) Dev Biol 175:1-13
 27. Richards LJ, TJ Kilpatrick, PF Bartlett. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:8591-8595
 28. Melissa K Carpenter, Xia Cu, Zhong-yi Hu, Jennifer Jackson et al. (1999) Exp Neurology 158:265-278
 29. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tshiro K, Shimizu S. (1989) Nature 342:440-443
 30. Kunio Matsumoto, Toshikazu Makamura. (1997) Biochem Biophys Res Commun 239:639-644
 31. Gage, F.H. (2000) Science 287:1433-1438.
 32. Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D. (2000) Nature 405:892-893.
 33. Rakic, P. (2002) J Neurosci 22:614-618.
 34. Temple, S., Alvarez-Buylla, A. (1999) Curr Opin Neurobiol 9:135-141.
 35. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I. (1995) Dev Neurobiol 168:342-357.
 36. Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S. (2001) N Engl J Med 344:710-719.
 37. Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K., Sawle, G., Rothwell, J.D.M., Bjorklund,

- A. (1990) *Science* 247:574-577.
38. McKay, R. (1997) *Science* 276:66-71.
39. Huttmann, A., Li, C.L., Duhrsen, U. (2003) *Ann Hematol* 82:599-604.
40. Isacson, O., Bjorklund, L.M., Schumacher, J.M. (2003) *Ann Neurol* 53:S135-S148.
41. Silani, V., Cova, L., Corbo, M., Ciammola, A., Polli, E. (2004) *Lancet* 364:200-202.
42. Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boille'e, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., Brown Jr., R.H., Julien, J.P., Goldstein, L.S.B., Cleveland, D.W. (2003) *Science* 302:113-116.
43. Holden, C., Vogel, G. (2002) *Science* 296:2126-2129.
44. Moore, B.E., Quesenberry, P.J. (2003) *Leukemia* 17:1205-1210.
45. Svensen, C.N., Langston, J.W.L. (2004). *Nat Med* 10:224-225.
46. P. Bossolasco et al. (2005) *Experimental Neurology* 193:312-325
47. Jiang, Y., Balkrishna, N.J., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz- Gonzales, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M. (2002) *Nature* 418:41-49.
48. Chamberlain, J.R., Schwarze, U., Wang, P.R., Hirata, R.K., Hankenson, K.D., Pace, J.M., Underwood, R.A., Song, K.M., Sussman, M., Byers, P.H., Russell, D.W. (2004) *Science* 303: 1198- 1201.
49. Richards LJ, TJ Kilpatrick, PF Bartlett (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8591-8595
50. Melissa K Carpenter, Xia Cu, Zhong-yi Hu, Jennifer Jackson et al. (1999) *Exp Neurology* 158:265-278
51. Robert J. Dean, Annemarie B. Moseley (2000) *Exp Hematol* 28:875-884
52. Noji S, Tshiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama, K, Teguchi S, Nakamura T (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 173:42-47
53. DeFrances MC, Wolf CH, Michalopoulos GK, Zarnegar R (1992) *Development* 116:387-395
54. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C (1993) *J Cell Biol* 123:223-235
55. Sato T, Haketa Y, Yamaguchi Y, Mano H, Tezuka K, Matsumoto K,

- Nakamura T, Mori Y, Yoshizawa K, Sumitani K, Kodama H, Kumegawa M (1995) *J Cell Physiol* 164:197-204
56. Grano M, Galimi F, Zambonin G, Colucci S, Cottone E, Zallone AZ, Comoglio PM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7644-7648
57. Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM (1995) *J Cell Physiol* 165:307-312
58. Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude, GF Ishii T, Dienes, HP, Lindholm D, Schirmacher P (1994) *J Cell Biol* 126:485-494
59. Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T (1995) *Mol Brain Res* 32:197-210
60. Yamagata T, Muroya K, Mukasa T, Igarashi H, Momoi M, Tsukahara T, Arahata K, Kumagai H, Momoi T (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 210:231-237
61. Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K, Nakamura T, Nakajima K, Kohsaka S (1996) *J Neurosci Res* 43:554-564
62. Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG, Jr Bladt, F Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M (1996) *Neuron* 17:1157-1172
63. Fleur Davey, Mark Hilton, Alun M Davies (2000) *Mol Cell Neurosci* 15:79-87
64. Temple, S., Alvarez-Buylla, A. (1999) *Curr Opin Neurobiol* 9: 135-141.
65. Aboody, K.S., Brown, A., Rainov, N.G., Bower, K.A., Liu, S., Yang, W., Small, J.E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Blabk, P., Breakefield, X., Snyder, E. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12846-12851.
66. Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., McKercher, S.R., (2000) *Science* 290:1779-1782.
67. Zhao, L., Duan, W., Reyes, M., Keene, C.D., Verfaillie, C.M., Low, W.C. (2002) *Exp Neurol* 174:11-20.
68. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, et al. (2003) *J Neurosci Res* 73:778-786.
69. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, et al. (2001) *J Neurol Sci* 189:49-57.
70. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, et al. (2002) *Neurology* 59:514-523.
71. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, et al. (2002)

Exp Neurol 174:11-20.

72. Bang and Lee et al. (2005) Ann Neurol 57:874-882.

73. Nagai A, Kim WK, Lee HJ, Jeong HS, Kim KS, et al (2007). PLoS ONE. Dec 5;2(12):e1272.

ABSTRACT

Neuron like differentiation of Bone marrow derived mesenchymal stem cell

Keum Suk Bae

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei Wonju Medical College

(Directed by Professor Sung Jun Kang)

Generally, population of mesenchymal stem cells (MSCs) are very small, and there are only 2~5 cells in every 1×10^6 mononuclear cells. Normally, it is suggested that about 1×10^6 MSCs are present in human body. However, they are easily cultured and extracted from bone-marrow. Also, their proliferation capability is excellent that without losing its stem cell characteristics, their number can be grown 1 billion times greater than the original number.

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent and give rise to distinctly differentiated cells from all three germ layers. The identification of cells capable of neuronal differentiation has great potential for cellular therapies. We examined whether bone marrow-derived MSCs can be induced to undergo neuronal differentiation. We described here the neural-like differentiation of human MSCs induced by culturing in a medium comprising epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor. The differentiated cell populations under study were analyzed by means of phase-contrast inverted microscopy, RT-PCR, immunofluorescence, and immunocytochemistry to

identify the expression of neural specific markers. This culture condition induced MSCs to exhibit a neural cell phenotype, expressing several neuro-glial specific markers.

The ability to proliferate and differentiate into neuron like cells of bone-marrow derived MSCs showed possibility of their wider application in cellular therapy of many diseases such as neurodegenerative disease and cerebral infarct. However, preexisting methods of chemically inducing neuron-like cells with several chemical factors have limitations in clinical application due to its toxicity. On the contrary, epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor, and hepatocyte growth factor used in this experiment are factors that are secreted in human. Thus, once MSCs are induced to differentiated into neuron like cells, it is considered safe and less limitations to apply clinically, and MSCs derived from autologous source of bone-marrow also pose no serious immunologic threats to patient. Lastly, it is possible to obtain large quantity of neuron like cells in small volume of bone marrow. Therefore, MSCs' potential in therapeutical application is clinically valuable.

In future, the authors considered that neuron like cells differentiated from bone-marrow derived MSCs are needed to be compared and analyzed with preexisting neuronal cells physiologically and molecular biologically, and studies on their transplantation possibility and differentiation capability in animal model are further required.

Key words : Mesenchymal stem cells (MSCs), neural differentiation