

Therapeutic Application of Neural Stem Cells for Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury

Kook In Park, M.D., PhD., Kyoyeon Goo, M.D., Ph.D., Kwangsoo Jung, B.A.*, Miri Kim, B.A.*, Il-Sun Kim, M.Sc., Seokhwan Yun, M.Sc.*, Il-Shin Lee, PhD., Jeong Eun Shin, M.D., Ha Yang Yu, M.D., Ho Seon Eun, M.D., Jung Eun Kim, M.D., Ran Namgung, M.D., PhD., and Chul Lee, M.D., PhD.

Department of Pediatrics, BK21 Project for Medical Science*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

신생아 저산소성 허혈성 뇌손상에서 신경줄기세포의 치료적 적용

연세대학교 의과대학 소아과학교실, BK21 의과학 사업단*

박국인 · 구교연 · 정광수* · 김미리* · 김일선 · 윤석환* · 이일신 · 신경은 · 유하양 · 은호선 · 김정은 · 남궁란 · 이철

ABSTRACT

Neural stem cells (NSCs) are characterized by a capacity for self-renewal, differentiation into multiple neural cell lineages, and migration toward damaged sites in the central nervous system (CNS). NSCs expanded in culture could be implanted into the brain where they integrate into host neural circuitry and stably express foreign genes. It hence appears that transplantation of NSCs has been proposed as a promising therapeutic strategy in neurological disorders. During hypoxic-ischemic (HI) brain injury, factors are transiently elaborated to which NSCs respond by migrating to degenerating regions and differentiating towards replacement of dying neural cells. In addition, NSCs serve as vehicles for gene delivery and appear capable of simultaneous neural cell replacement and gene therapy (e.g. with factors that might enhance neuronal differentiation, neurites outgrowth, proper connectivity, neuroprotection, and/or immunomodulatory substances). When combined with certain synthetic biomaterials, NSCs may be even more effective in 'engineering' the damaged CNS towards reconstitution. Human NSCs were isolated from the forebrain of an aborted fetus at 13 weeks of gestation and were grown as neurospheres in cultures. After the characterization of human NSCs in preclinical testing and the approval of the IRB, a clinical trial of the transplantation of human NSCs into patients with severe perinatal HI brain injury has been performed. The existing data from these clinical trials have shown to be safe, well tolerated, and of neurologically-some benefits. Therefore, long-term and large scale multicenter clinical study is required to determine its precise therapeutic effect and safety.

Key Words: Neural stem cells, Neonatal hypoxic-ischemic brain injury, Cell therapy

Received: 10 July 2013

Accepted: 13 August 2013

Correspondence to:

Kook In Park, M.D., Ph.D.

Division of Neonatology,

Department of Pediatrics,

Severance Children's Hospital, and

Brain Korea 21 Project for Medical

Sciences, Yonsei University College

of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodae

moon-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: +82 -2-2228-2059,

Fax: +82 -2-393-9118,

E-mail: kipark@yuhs.ac

Copyright(c)

By Korean Society of Neonatology.

All rights reserved.

서론

신경줄기세포(neural stem cells)는 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가갱신(self-renew)을 보이고, 신경계를 이루는 신경원세포(neuron), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 및 성상세포(astrocyte)로 분화하는 분화의 가능성을 보이는 세포로 정의한다. 신경줄기세포는 신경계 발생 초기에는 측 뇌실(lateral ventricle)을 둘러싸고 있는 뇌실층(ventricular zone)의 신경상피세포(neuroepithelial cells)이며, 발생 중기부터 측 뇌실과 피막(pia mater)을 연결하는 긴 세포돌기를 보이는 이극세포(bipolar cell)인 방사교세포(radial glial cell)가 신경줄기세포이다. 방사교세포는 뇌실층에서 계속 대칭/비 대칭 증식(symmetric/asymmetric division)하며, 딸세포(daughter cell)는 내뇌실하층(inner subventricular zone, ISVZ)으로 이동하여 중간신경전구세포(intermediate progenitor) 혹은 중간변천증폭세포(transit amplifying cell)가 된다. 본 세포는 계속 증식하면서 전체 대뇌를 이루는 신경원세포로 분화하고, 일부는 신경교세포로도 분화된다¹⁾. 또한 방사교세포는 뇌실층에서 떨어져 나가 외뇌실하층(outer subventricular zone, OSVZ)으로 이동하여 계속 증식하여 외뇌실하층에서 방사교세포, 중간신경전구세포 혹은 중간변천증폭세포가 되고, 본 세포들은 계속 증식하여 전체 대뇌를 이루는 신경원세포로 분화하여 대뇌 형성에 중요한 작용을 하며, 일부는 신경교세포로 분화한다²⁾. 방사교세포는 성인에 이르러서는 성체 신경줄기세포인 뇌실하층의 성상세포로 변이된다³⁾. 성체 신경줄기세포인 성상세포는 B형 세포라고 하며 GFAP (glial fibrillary acidic protein)를 발현하고 비교적 증식을 많이 하지 않으며, B형 세포는 빠르게 증식하는 중간변천증폭세포 혹은 중간신경전구세포인 C형 세포(GFAP-, EGF receptor+, Dlx2+)로 바뀌어 증식하면서 신경전구세포의 숫자를 늘리고, 다시 신경아세포(neuroblast)인 A형 세포(PSA-NCAM+, doublecortin+)로 변화하여 증식하면서 rostral migratory stream을 따라서 전방으로 이동하여 후구(olfactory bulb)에 도달한 후 과립층(granular zone)에 통합되어 과립신경세포(granular neuron)가 되고, 사구체층에서는 사구체 주위신경세포(periglomerular neuron)로 분화하여 후각기능에 관여한다³⁾. 또 전사인자 olig2를 발현하는 일부 뇌실하층 B형 세포는 희소돌기아교세포로 분화하여 뇌량(corpus callosum), 선조체(striatum), 해마채궁(fimbria fornix) 등에 분포한다⁴⁾. 성체 신경줄기세포는 뇌실하층 뿐만 아니라 뇌 해마(hippocampus)의 치상회(dentate gyrus)의 과립하층(subgranular layer)에도 두 종류의 세포로 존재하는데, 1형 줄기세포는 Sox2와 GFAP를 발현하며 비교적 증식을 하지 않는 조용한 세포이고, 긴 신경돌기를 내어 치상회의 과립층을 가로질러 해마의 분자층(molecular layer)에 도달하는 형태를 띤다. 2형 줄기세포는 Sox2는 발현하나 GFAP는 발현하지 않

으며, 빠르게 증식하고 긴 세포돌기는 없다. 해마의 신경줄기세포 계보는 1형 세포에서 2형 세포로, 2형 세포는 중간신경전구세포가 되고, 전구세포는 신경아세포로 분화하고 이주하여 과립세포층에서 성숙한 글루탐산 과립신경세포(glutamatergic granular neuron)가 되며, 축삭돌기(axon)를 해마의 hilum과 CA3 지역으로 보내어^{5,6)}, 주위 신경세포에 접합(synapse) 되고 신경회로(neural circuitry)에 통합되어 학습 및 기억능력에 관여한다. 1형 및 2형 줄기세포는 성상세포로도 분화하며, 중간신경전구세포는 희소돌기아교세포로도 분화한다⁶⁾. 또한 신경줄기세포는 상지에서 언급한 뇌의 과립하층 및 뇌실하층 뿐만 아니라 시상하부(hypothalamus)와 편도체(amygdala)⁷⁾, 대뇌피질 및 척수⁸⁾ 등에서도 천천히 증식하면서 신경세포를 생성함이 보고되었는데, 아직 그 존재 여부가 확증된 상태는 아니다. 따라서 신경줄기세포는 과립하층 및 뇌실하층 외에 성체 중추신경계의 보다 광범위한 지역에 주로 휴면상태로 존재하면서 소수의 신경원세포 및 교세포를 생성하거나, 일부 극소수의 세포가 다능성 신경줄기세포로 전환되어 새로운 신경세포를 생성할 가능성도 있다⁹⁾.

이상으로 손상되면 재생되지 않는 것으로 알려져 있는 포유류의 중추신경계에 신경줄기세포가 존재하고 본 세포는 일생을 통하여 증식·분화하여 새로운 신경원 및 교세포를 생성한다. 또한 생체 외에서 신경줄기세포를 대량 배양할 수 있고, 신경원 및 교세포로 분화 유도할 수 있으며, 중추신경계에 이식한 경우 이식세포의 생착, 이주, 분화 및 외부 유전자의 발현 등을 확인하게 됨에 따라 난치성 신경계질환에서 신경줄기세포를 이용한 신경재생치료의 가능성에 관심이 증가하고 있다.

중추신경계에 존재하는 신경줄기세포의 기능적 의의

중추신경계에 존재하는 신경줄기세포는 신경재생 기능에 참여하는데, 1) 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상인 경우 CXCL12 등의 chemokine의 영향으로 뇌 손상 부위에서 원거리에 존재하는 뇌실하층의 줄기세포가 뇌 손상 부위로 특이적으로 이주하여 신경재생에 참여함이 확인되었고^{10,11)}, 2) BDNF (brain-derived neurotrophic factor)와 같은 성장인자들을 측 뇌실에 주입하여 뇌실하층 줄기세포를 뇌 손상 부위로 이주케 할 수 있으며, 3) 뇌 손상 시 혹은 BDNF, CNTF (ciliary neurotrophic factor), Shh (sonic hedgehog) 등의 성장인자를 뇌에 주입할 경우 대뇌피질, 선조체(striatum), 뇌 중격(septum), 시상(thalamus), 시상하부 등에서 신경줄기세포로부터 일부 새로운 신경세포가 생성됨이 보고되었다^{8,12)}. 따라서 향후 신경손상 시 내인성 신경줄기세포의 신경재생기능을 이용하여 줄기세포의 증식, 이주, 분화, 신경연결 등을 조절함으로써

써 신경재생을 유도할 수 있는 방법도 개발할 수 있다. 신경줄기 세포는 단순히 뇌의 특정부위에서 일생을 통하여 증식하면서 새로운 신경세포를 생성할 뿐만 아니라 이러한 신경세포생성은 환경적 및 유전적 요인들에 영향을 받아 변화는 가소성(plasticity)을 보이며, 특정 뇌 기능에도 영향을 미친다. 특히 1) 운동, 좋은 환경, 스트레스 감소, 호르몬, 임신, 카레취 등은 해마 치상회에서 신경세포생성을 촉진시키거나, 2) 노화는 신경세포생성을 감소시키고, 동물의 종(species) 및 주(strain)에 따라 신경세포생성 정도도 다르며, 3) 뇌 질환(저산소성 허혈성 뇌 손상, 뇌졸중, 간질, 우울증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병 등)도 영향을 미친다^{5,13-15}. 신경세포생성은 신경세포의 증가, 신경회로의 구조적 변경, 신경접합증가, 신경접합력의 변화 등을 초래하여 신경 가소성을 증가시키는데, 해마 치상회에서 새로 생성된 신경원세포는 주위 신경세포들에 비해 LTP (long-term potentiation) 역치가 낮고 GABA (gamma aminobutyric acid)에 의한 억제효과에 민감하지 않아 학습과 기억능력을 증가시킨다. 또한 최근에는 다양한 약물들이 신경줄기세포의 증식과 분화에 영향을 미친다고 보고되었는데, 항우울제, 항정신약물, 항콜레스테롤제, 발기부전치료제 등을 들 수 있고, 따라서 약물개발 시 화학약물이 인지기능에 미치는 영향 등을 조사하여 부작용 발생을 최소화하여야 할 것이다¹⁶. 이 분야의 연구는 현재 시작 단계에 있으며 향후 노화와 연관된 기억능력 감소 치료제, 항우울제 개발, 뇌 인지 및 감각기능 향진제 개발 등을 기대할 수 있을 것이다.

신경줄기세포의 배양

신경세포의 시험관 배양법 및 배지개발의 비약적 발전으로 신경계로부터 신경전구세포를 채취 및 분리하여 다양한 성장인자를 사용하여 대량으로 배양할 수 있게 되었는데, 쥐의 태아 전뇌 (forebrain)에서 단일세포 단위의 전구세포를 배양함으로써 포유류의 중추신경계에도 계속 자가 갱신하고, 분화의 가능성을 보이는 신경줄기세포가 존재함이 확인되었고^{17,18}, 성체 신경계에서도 신경줄기세포를 시험관내에서 부유하는 미성숙, 미분화된 세포 덩어리 (cell clusters)인 “neurospheres” 형태로 배양할 수 있게 되었다¹⁹. 따라서 이러한 신경줄기세포의 배양방법 개발은 생체내외에서 신경줄기세포의 존재여부를 확인해 줄 뿐만 아니라 줄기세포의 자가갱신 및 분화기전 연구에도 중요하며, 인간 신경줄기세포도 배양하게 됨에 따라²⁰ 중계연구(translational research)와 세포치료제 개발에도 크게 기여할 수 있게 되었다.

시험관 내에서 신경줄기세포의 존재, 빈도 및 활동 등을 측정하는 간편한 방법으로 neurosphere assay를 사용하여 왔다. 세포 증식인자(basic fibroblast growth factor and/or epidermal growth

factor)가 함유된 무혈청(serum-free)의 특정배지(defined media)에서 미성숙, 미분화된 세포가 증식하여 neurospheres 형태로 배양되고, 분화조건 시에는 신경원세포 및 교세포로 분화한다. 본 primary neurospheres를 단일세포로 분리하여 같은 세포성장배지에서 증식시킬 경우 단일세포 차원에서 미성숙 상태로 다시 증식하여 neurosphere (secondary neurosphere)를 형성할 수 있고, 역시 분화조건 하에서 세포분화의 다능성을 보일 경우 신경줄기세포의 존재를 확인하는 방법이다²⁰. 그러나 모든 줄기세포가 단일세포 차원에서 secondary neurosphere를 형성하는 것은 아니며, 한 개의 줄기세포가 반드시 한 개의 neurosphere를 형성하는 것도 아니고, neurosphere를 형성하였다고 하여 반드시 한 개의 줄기세포가 있다고 할 수 없어, neurosphere assay만으로는 정확히 신뢰성 있게 줄기세포의 존재와 빈도를 측정할 수 없다. 따라서 향후 신경줄기세포 및 전구세포, 줄기세포가 아닌 세포를 분리할 수 있는 새로운 측정방법들이 개발되어야 할 것이다²¹. 신경줄기세포 배양방법에 있어서 최근에는 3차원 세포배양법이 개발됨에 따라 세포와 세포 상호관계에 대한 연구를 진행할 수 있고, 시험관내에서 신경계질환 모델을 확립하여 신경계에 대한 약물개발 및 독성검사를 시행하는 연구가 진행 중에 있으며, 세포성장을 도와주는 자가조립(self-assembling) nanofibers와 hydrogels, 그리고 laminin fragments와 같은 생활성분자(bioactive molecules)로 세포 배양용 인공미세환경 등의 개발로 신경줄기세포의 성장과 분화를 시험관내에서 조절하고 생체 내 이식실험에 적용 중에 있다²²⁻²⁶.

신경줄기세포로부터 특이 신경세포로의 분화

신경계 발달 초기에 신경줄기세포는 신경계에 분포하는 위치에 따라 지역 특이적인 신경세포로 적절히 증식 및 분화한다. 즉 신경줄기세포는 지역 특이성을 보여 신경계에 위치하는 지역정보를 함유하고 있으나, 신경계의 다른 위치로 이식될 경우 이식된 부위의 환경적 요인에 의하여 지역 특이성이 변화하는 가소성을 보인다^{21,27}. 또 신경줄기세포는 신경계 발달단계에 따른 시간적 특이성도 보이는데 발달단계 초기 줄기세포는 다양한 신경세포로 분화될 수 있지만 후기에 추출된 줄기세포는 분화 가능성이 제한적이며²⁸, 각 줄기세포에 시간 특이적 발달프로그램이 내재되어 있어 세포배양 시 발달신호의 단계적 발현이 재현된다²⁹. 신경줄기세포는 비대칭적 증식을 통해서 신경원세포로 먼저 분화되고 계속 증식을 통하여 신경교세포를 생성하기 시작하는데, 이러한 시간적 분화형태의 변화는 세포 내부에 프로그램 되어있거나 외부 환경적 요인에 의해서도 일어난다. 따라서 신경계를 이루는 다양한 신경세포는 신경계 발달 시 공간적 및 시간적 신호에 의해

특성화되는 신경줄기세포에 의해 생성되는데, 이러한 공간적 및 시간적 신호에 의해 신경계 형태가 특성화되는 분자기전의 규명이 신경줄기세포 생물학의 주요한 연구목표이며, 이러한 지식은 배아줄기세포와 유도 전분화능줄기세포(induced pluripotent stem cells)로부터 특이 신경세포로의 분화유도 시에 적용될 수 있다³⁰⁻³². 최근까지 신경줄기세포의 증식과 분화 등을 조절하는 많은 환경인자, 유전자 및 화학물질 등이 보고되었고³³, 이러한 인자들을 이용하여 비교적 균질의 분화 신경세포를 배양하여 여러 가지 신약개발, 독성검사 및 세포치료에 적용하는 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 배아줄기세포 및 유도 전분화능줄기세포를 이용하여 보다 효율적이고 균질한 특정 신경세포로의 분화유도 실험이 활발히 이루어지고 있다. 그러나 배아줄기세포 및 유도 전분화능줄기세포는 무한정 증식하고 다양한 세포로의 분화유도 가능성을 보이지만 종양형성 등의 안전성 문제가 아직 완전히 해결되지 않은 상태이다. 따라서 향후 가까운 미래에서는 세포 증식력과 분화가능성이 제한되어 있지만 비교적 안전한 신경줄기세포를 대상으로 배양조건의 변화와 분화세포의 분리 등 전통적인 방법을 이용하여 비교적 균질한 신경세포 아형을 획득하고 세포치료 임상시도에 적용될 가능성이 높다고 하겠다.

신경줄기세포의 치료적 유용성

퇴행성 신경계질환(neurodegenerative disease)은 급·만성으로, 국소성(focal), 다소성(multifocal) 혹은 범발성(diffuse)으로 중추신경계에 신경세포가 사멸하거나 기능 부전을 보이는 난치성 질환으로, 광범위한 범주의 질환이다. 이러한 퇴행성 신경계질환에서 신경줄기세포의 치료적 유용성은 1) 신경계질환 모델의 중추신경계에 신경줄기세포를 이식하면 이식세포는 생착, 생존, 이주 및 숙주 신경회로에 통합되어, 시간적/공간적 신경발달 미세환경신호 혹은 신경계질환 특이적인 신호에 반응하여 적절한 신경세포로 분화되어, 기능부전을 보이거나 사멸한 신경세포를 대체하고 손상된 신경회로를 재건하여 신경재생을 유도하며; 2) 시험관 내에서 미리 신경원세포 전구세포(neuronal progenitor), 희소돌기아교세포 전구세포(oligodendrocyte progenitor), 성상세포로 분화 유도한 후, 숙주 신경계에 이식하여 손상된 신경세포를 보다 효율적이고 특이적으로 재생할 수 있고; 3) 이식세포는 숙주 신경계에 통합되어 신경접합을 형성하고 적절한 신경전달물질을 분비하여 국소 재신경지배(reinnervation)를 형성한다; 4) 이식세포는 숙주 신경계에서 뇌 손상 부위로 특이적으로 이주하거나, 전체 신경축에 걸쳐 광범위하게 이주하므로, 국소성, 다소성 혹은 범발성 신경계 질환에서 손상/결함을 보이는 세포, 효소, 신경영양인자, 신경전달물질, 수초(myelin), 세포외기질(extracellular

matrix), 세포표면물질 등을 제공할 수 있다; 5) 이식세포는 숙주 신경세포의 생존, 이주, 분화, 재생 등에 영향을 미치는 다양한 신경영양인자(NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, VEGF, bFGF, GDNF, VEGF 등)들을 분비하여 신경보호 및 재생을 유도한다; 6) 신경줄기세포는 다양한 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokines) 혹은 면역제어물질(immunomodulators; TNF α , TLI-A, TRAIL, CD95L, PGE2, NO, IL-1Ra, IL-4, IL-10, TGF- β), chemokines, chemokine receptors 등을 분비하여 신경재생을 촉진한다; 7) 혈관생성촉진 물질 등을 분비하여 신경재생을 유도하고; 8) 신경줄기세포는 (비)바이러스성 vector에 의하여 생체 외에서 쉽게 유전자 형질이입이 가능하며 신경보호 및 재생을 촉진시키는 물질의 발현을 유도할 수 있다; 9) 간편하고 안전한 방법으로 중추신경계에 이식되어 생착된 후, 외부에서 이입한 유전자산물을 직접적, 지속적, 그리고 조절되는 양상으로 분비할 수 있고; 10) 생분해성 합성 고분자화합물(biodegradable synthetic polymer matrix)과 공동배양 시 신경줄기세포의 성장, 증식 및 분화가 촉진되므로 본 세포를 조직공학적 방법으로 이용하여 신경조직의 재생을 유도할 수 있으며, 최근에는 세포성장을 돕는 자가조립 nanofibers와 hydrogels, 그리고 laminin fragments와 같은 생활성분자(bioactive molecules)로 세포 배양용 인공미세환경 등을 개발하여 신경줄기세포의 성장과 분화를 시험관 내에서 조절하고, 생체 내 이식술에 적용할 수 있다^{22-26,34-37}.

신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 동물모델에서 줄기세포 이식

저산소성 허혈성 뇌 손상 신생아의 20-50%는 신생아기에 사망하며, 중등도 뇌 손상인 경우 생존아의 30-50%에서, 중증 뇌 손상인 경우 90% 이상에서 중증 신경발달학적 후유증이 동반된다^{38,39}. 지난 수십 년 동안 고위험(high-risk) 신생아에 대한 주산기 치료가 획기적으로 발전하였고 새로운 신경 보호제 개발을 위한 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고, 최근 치료적 저체온증 적용 시 중등도이상의 저산소성 허혈성 뇌 손상에서 제한된 신경보호 효과를 보인다는 결과 외에⁴⁰, 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상에 대한 특별한 치료법이 없으며, 주로 일반적 대증요법이 진행되고 있다. 따라서 줄기세포를 이용한 세포치료는 특별한 치료법이 없는 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상에 대한 새로운 신경재생치료법으로 연구되고 있다.

신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상에 대한 줄기세포치료 연구는 크게 태아 혹은 성체 중추신경계 유래 신경줄기세포와 골수 혹은 제대혈 등의 비신경계 조직유래 줄기세포를 이용한 연구로 나눌 수 있다. 생후 7일된 미성숙 생쥐에서 국소성 저산소성 허혈성 뇌

손상을 유발 후 쥐 설치류 신경줄기세포를 뇌 손상 부위에 이식한 결과, 공여세포는 일시적 증식과 뇌 손상 부위로 특이적으로 이주함을 보이고, 손상 부위와 주변 대뇌피질 접경부위에 확고히 정착하며, 신경원세포, 희소돌기아교세포 및 성상세포로 분화하여 뇌 손상으로 손실된 신경세포를 재생함을 보였다¹¹⁾. 신경줄기세포는 뇌 손상 시 발현되는 다양한 인자(cytokines, chemokines, growth factors, neurotrophic factors, cell adhesion molecules, integrins, cell surface molecules, extracellular matrix, 등)들에 반응하여 뇌 손상 부위로 특이적으로 이주함을 보이는데, 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 동물모델에 CXCR4 발현 신경줄기세포를 뇌 손상 반대편 뇌에 이식할 경우 이식세포는 뇌량(corpus callosum) 및 대뇌 반구간 교련(interhemispheric commissures) 등을 통하여 SDF-1 α (stroma-derived factor-1 α) 농도가 증가된 뇌 손상 부위로 이주함을 보였다¹⁰⁾. 이러한 결과는 뇌 손상 시 발현되는 염증반응물질인 chemokine에 대하여 chemokine receptor를 발현하는 신경줄기세포 내 신호전달반응에 의하여 세포의 증식, 이주 및 분화 등의 신경재생적 반응이 일어남을 나타낸다. 뇌 손상 부위에 이식된 신경줄기세포는 약 5% 정도에서 신경원세포로 분화하지만¹¹⁾, 신경원세포로의 분화를 촉진하는 neurotrophin-3 (NT-3)를 과발현시킨 신경줄기세포를 뇌 손상 부위에 부위에 이식할 경우 공여세포는 뇌 손상 부위에서는 10-20%, 뇌 손상 접경부위에서 약 80% 이상에서 신경원세포로 분화하고, GABA, acetylcholine, glutamate 발현 신경원세포로 분화함을 보였다¹⁴⁾. 실제 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 동물 모델에 인간 신경줄기세포를 이식한 경우도 줄기세포는 뇌 손상 부위에 정착하고, 광범위하게 이주함을 보이며, 신경원 및 교세포로 분화하고, 다양한 신경전달물질을 발현하는 신경세포로 분화함을 확인하였으며, 주위의 숙주 신경세포와 신경접합도 형성하였다. 바이러스 벡터를 이용하여 다양한 신경영양인자(BDNF, NT-3, VEGF, GDNF 등)를 과발현(overexpression)하게 한 인간 신경줄기세포를 뇌 손상 부위에 이식한 경우도 잘 정착하고 보다 많은 공여세포가 신경원세포로 분화하였으며, 발현된 신경영양인자로 인하여 숙주 신경세포에 대한 신경보호 및 영양효과(trophic effect)도 확인되었다. 신경행동검사에서도 이식군이 대조군에 비해 뇌경색증 범위가 감소하고, 신경기능 및 학습과 기억능력도 향상됨이 확인되었다. 또한 Neurogenin 2 (Ngn2)와 같은 신경계 발달 시 신경원세포 생성을 촉진시키고 대뇌 발달에 중요한 역할을 하는 전사인자를 발현케 한 인간 신경줄기세포를 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에 이식한 경우, 이식세포의 정착, 신경세포로의 분화, 신경돌기 신전(neurites extension), 신경접합 형성 등이 모두 촉진되고, 손상된 피질척수로(corticospinal tract) 재생이 강화되어 신경기능도 복구도 크게 강화됨을 보였다. 이러한 결과는 신경줄기세포에 성장인자, 싸이토카인, 신경발달관련 유전자 등을 발현케 한 후 저산소

성 허혈성 뇌 손상 부위에 이식할 경우, 공여세포뿐만 아니라 숙주 신경세포에도 작용하여 신경세포의 분화유도, 신경돌기 성장 촉진, 손상된 신경회로 복구, 신경세포 생존/보호 강화, 신경접합 촉진 등을 유도할 수 있음을 보였고, 한 번의 신경줄기세포 이식으로 손상된 신경세포를 대체하는 세포치료와 적절한 신경영양인자를 동시에 제공하는 유전자치료가 가능함을 제시하였다.

신경줄기세포의 높은 신경재생능력에도 불구하고 중증 저산소성 허혈성 뇌 손상인 경우 급격한 조직괴사로 인하여 뇌 실질에 큰 와동(cavity)을 형성한다. 따라서 중증 뇌 손상 부위에 이식된 줄기세포는 신경조직 및 성형(template)의 부족으로 인하여 신경재생능력이 제한되며, 뇌 손상 부위에 혈액공급도 원활하지 않아 생존도 감소한다. 따라서 이식세포의 조직화와 성장, 이주 및 분화를 유도하는 성형인 생분해성 합성 고분자화합물 비계(biodegradable synthetic polymer scaffold)를 이용하여 신경줄기세포와 공동 배양한 후 신경줄기세포-비계 복합체를 저산소성 허혈성 뇌 손상 부위에 이식하였는데, 이식세포의 확고한 정착, 뇌 손상 부위 감소, 혈관생성 촉진, 다양한 신경세포로의 분화, 신경원세포로의 분화 및 신경돌기 신전 촉진, 염증반응의 감소 및 뇌량을 통한 양측 대뇌 반구 사이 신경연결형성 등이 유도됨을 보였다²²⁾. 이러한 결과는 향후 고분자화합물 비계와 신경줄기세포를 이용하여 중증 저산소성 허혈성 뇌 손상 시 신경조직공학적 치료가 가능함을 제시하였다. 한편 중추신경계에 직접 이식된 신경줄기세포는 신경손상/질환 부위에 이식세포가 특이적으로 이주하고 정착하여 손상된 신경세포로 분화함을 보이나, 성숙한 성체 중추신경계에 이식된 공여세포는 일반적으로 생체 내 이주 범위가 제한적이며, 신경계 손상 부위에 직접 이식할 경우도 일부 세포는 주변 신경조직 부위로 광범위하게 이주함을 보인다. 한편 손상된 신경계에 직접 줄기세포를 이식할 경우는 수술적 처치를 하여야 하는데, 이러한 침습적 방법을 피하기 위하여 줄기세포를 혈액 내 주사하는 경우 중추신경계에 이주/생착하는 공여세포는 극히 제한적이다. 따라서 생체 내로 이식된 신경줄기세포가 신경손상 혹은 질환 부위로 특이적이며 효과적으로 이주, 생착 및 이탈을 방지하는 기술이 요구된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 먼저 줄기세포 내로 초자성(superparamagnetic) zinc doped-magnetic nanoparticles들을 이입하여 사용할 수 있는데, 생체 내로 나노입자가 이입된 줄기세포를 이식한 후에 자석을 이용하여 자장을 걸어주면 이식세포의 생체 내 이동과 생착을 외부에서 제어조절이 가능하다. 예비연구에서 나노입자를 인간 신경줄기세포에 효과적으로 이입할 수 있었고, 자성을 이용하여 줄기세포를 신경손상 혹은 질환 부위에 특이적으로 이주, 생착 및 분화시킬 수 있었다. 따라서 나노공학과 줄기세포의 융합연구를 통하여 신경계에 새로운 비침투적 줄기세포 이식술을 개발할 수 있고, 신경계에 이식된 줄기세포의 이주, 생착 및 분화를 외부에서 제어조절 가능하며, 나노입자를 통

하여 줄기세포에 다양한 신경재생촉진/보호물질/분화유도물질 등을 제공하며, 생체 내 이식된 줄기세포를 효과적으로 추적할 수 있는 영상기술을 개발할 수 있어 앞으로 첨단 융합연구가 기대된다.

또한 신경줄기세포는 저산소성 허혈성 뇌 손상 부위에 이식 후 사멸된 신경세포를 재생할 뿐만 아니라 항 염증작용/면역제어조절 작용 등의 "bystand effect"에 의한 치료적 기능도 보이는데⁴²⁾, 뇌졸중 모델에서 정맥 주사된 신경줄기세포는 뇌 손상 부위에 정착된 후 대부분 미분화된 세포로 존재하고 이러한 미분화 세포는 항 염증작용, 신경상처조직 형성 감소, 숙주 신경세포 보호 등의 작용을 하는 것으로 보고되었고⁴³⁾, 뇌출혈 모델에서 정맥 주사된 신경줄기세포는 비장에 축적되어 면역제어조절 작용에 의하여 신경보호 효과를 보였다⁴⁴⁾. 이러한 연구결과들은 모두 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상에서 신경줄기세포의 치료적 유용성을 보여주지만, 신경줄기세포의 신경보호/재생기전, 이식세포와 숙주 신경세포와의 적절한 신경회로 형성여부, 이식 후 장기간에 걸쳐 공여세포의 생체 내에서의 기능, 급성 및 만성 뇌 손상에서 신경줄기세포의 치료 효과 비교 등에 대한 연구가 더 필요한 실정이다.

비신경계 조직유래 줄기세포로 먼저 인간 제대혈 줄기세포를 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에서 복강, 정맥, 경동맥 등에 주사한 결과, 뇌 손상 부위에 정착된 공여세포는 별로 없었고 신경세포로의 분화는 드물었으나 이식군에서 신경기능개선 효과를 보였고, 인간 제대혈 유래 중간엽기저세포(mesenchymal stromal cells)를 뇌 손상 부위에 이식한 경우 일부 공여세포는 정상세포로 분화하고 역시 신경기능 개선효과를 보고하였다^{45,46)}. 이러한 결과는 이식된 제대혈 줄기세포가 손상된 신경세포를 재생하기보다는 신경영양인자, 싸이토카인, 항 염증인자, 면역제어조절인자 등을 발현하여 신경세포 보호효과를 보이는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 현재 저산소성 허혈성 뇌 손상을 보이는 만성 신생아를 대상으로 자가 제대혈 줄기세포 투여의 안전성 및 적용가능성을 평가하는 임상 1상 시험이 미국 Duke 대학에서 시행되고 있으며, 세포 투여 후 신경학적 검사와 뇌 magnetic resonance imaging (MRI) 검사 등이 진행되고 있다⁴⁷⁾. 성체 뇌졸중 모델에서 골수유래 단핵구세포(bone marrow mononuclear cells) 및 골수유래 중간엽 기저세포 이식이 신경보호와 재생효과가 있음이 보고되었고, 최근에는 환자를 대상으로 본 세포를 이식하여 긍정적인 결과를 보고 하였다^{45,46,48)}. 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에서 골수유래 중간엽 기저세포를 심장에 이식한 경우 공여세포는 양측 대뇌 반구에 정착함을 보이고 신경기능 개선을 보였으나, 대부분의 세포는 정상세포 및 소신경교세포(microglia)로 분화하였으며 뇌 손상 정도를 개선시키지 못하였고⁴⁹⁾, 중간엽 기저세포를 뇌 손상 부위에 직접 이식한 경우 공여세포는 극히 일부분만 신경세포로 분화하고 주로 항 염증효과에 의하여 내인성 신경줄기

세포에 의한 신경세포 생성이 촉진되고 신경기능이 개선된 등을 보고하였다⁵⁴⁾. 그러나 향후 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에서 골수유래 기저세포 이식이 뇌졸중 모델과 유사한 신경기능 개선효과를 보이는지 확인하고, 아급성 혹은 만성 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상에서도 이식효과를 평가하기 위한 더 많은 연구가 필요하다.

신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 환자에서 줄기세포 이용 세포 치료 확립을 위해서는 동물실험 등에서 세포치료의 안전성 문제가 일단 확보되면, 실제 임상 1상 연구에서 세포이식 방법, 이식세포 수, 이식세포 종류 및 세포이식 시기 등을 평가하는 연구가 함께 고려되어야 한다. 현재까지 가장 적절한 세포이식 방법은 아직 결정되지 않았는데, 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에서 대부분의 세포이식은 뇌 손상 실질 부위에 바로 세포를 이식하였으나 너무 침투적이어서 뇌 손상을 줄 수 있고, 측 뇌실 내에 이식할 경우 뇌 실질 내로 이식세포가 광범위하게 확산되거나 측 뇌실에서 멀리 떨어진 부위는 이식세포가 이주/생착하기 힘들며, 폐쇄성 뇌수종을 일으킬 수도 있다. 최근 신경계질환 모델에서 줄기세포의 정맥 내 주사는 간편, 비침투적, 안전한 방법이며 주로 세포사멸을 억제하여 신경기능을 개선시킨다고 보고되었으나⁴⁵⁾, 단지 소수의 이식세포만 뇌 손상 부위에 생착하고, 폐, 콩팥, 간 및 비장 등에 공여세포가 축적되므로 임상 적용 전에 세포이식에 따른 다른 장기에서의 안전성 및 독성 등에 대한 평가가 이루어져야 할 것이다⁵¹⁾. 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상에서 뇌의 병리적 환경이 뇌 손상 후 시간에 따라 급격히 변화하므로 세포이식 시기 결정에 중요한 영향을 미치는데, 뇌 손상 후 3-7일 사이에 가장 대사적, 생화학적 및 분자적 활성도가 높기 때문에 이 시기가 세포이식에 가장 적합하다고 보고하였고¹¹⁾, 뇌 손상 2-3일 후 세포를 이식하면 세포 증식 및 내인성 신경재생 기전이 가장 활발하다고 하였다⁵⁰⁾. 그러나 만성 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에서 줄기세포 이식의 유효성을 보고한 바는 별로 없어 만성 뇌 손상에서 줄기세포 이식의 임상적 적용은 한계점이 있다.

신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 및 뇌졸중을 포함한 신경계질환에서 세포치료를 위하여 가장 적합한 세포는 아직 결정된 바 없지만, 신경줄기세포 이식이 세포치료의 표준이라고 간주된다. 그러나 일부 연구에서 공여세포의 낮은 생존율, 제한된 세포이주, 미분화 혹은 신경교세포로의 분화 등으로 신경재생에 제한을 보인다고 보고하였고, 자가 신경조직 혹은 사망한 태아조직 획득과 충분한 양의 신경줄기세포 배양이 어려운 점, 동종세포 이식에 따른 면역거부 반응 및 종양형성 가능성, 신경줄기세포 유래 특이 신경세포로 분화 유도 후 이식할 경우 뇌 손상 급성기에 즉각적인 사용이 어렵고, 면역반응 및 배양액에 의한 오염 등의 가능성이 제기될 수 있다. 골수 및 제대혈 유래 중간엽 기저세포 사용시에도 적절한 신경세포로의 분화유도가 되지 않는 점 외에 상기 신경

줄기세포와 유사한 안전성, 유효성 및 세포배양에 소요되는 시간에 의하여 즉각적인 세포이식이 어렵다는 점을 들 수 있다. 한편 제대혈 및 골수 유래 단핵구 세포(mononuclear cells)는 자가세포를 즉각적으로 간편하고 편리하게 주산기 시 혹은 동결보관 후 필요할 때 사용할 수 있는 장점이 있는 반면에, 아직 세포특성이 확립되어 있지 않고, 세포이식의 안전성 및 유효성도 평가되어야 한다.^{52,53)}

신경줄기세포 임상적용을 위한 선행연구

신경줄기세포의 증식과 분화 등의 행동을 조절 하는 많은 환경인자, 유전자 및 화학물질 등이 보고되었고³⁴⁾, 이러한 인자들을 이용하여 비교적 균질의 분화 신경세포를 배양하여 여러 가지 신약개발, 독성검사 및 세포치료에 적용하는 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 배아줄기세포와 유도전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cells [iPS] or reprogrammed cells)를 이용하여 보다 효율적이고 특정 신경세포로의 분화유도 실험이 활발히 이루어지고 있다. 그러나 배아줄기세포 및 iPS 세포는 다양한 신경세포로의 분화유도 가능성을 보이지만 종양형성 등의 안전성 문제가 아직 완전히 해결되지 않은 상태이며, 최근 리프로그래밍 줄기세포는 유전적 및 후생유전적 변형, 염색체 이상, 단일 유전자 돌연변이, 유전자 발현형태의 변화 등도 보고되고 있어 향후 더 많은 연구가 필요한 실정이다. 따라서 가까운 장래에는 세포 증식능과 분화 가능성이 제한되어 있지만 비교적 안전한 신경줄기세포를 대상으로, 배양조건의 변화와 분화세포의 분리 등 전통적인 방법을 이용하여 세포치료 임상시도에 적용할 가능성이 높다고 하겠다. 실제 미국 Stem Cells Inc.는 라이소좀축적질환(lysosomal storage disease) 중 하나인 유전성 회귀 신경질환인 Batten disease (neuronal ceroid lipofuscinosis) 환아를 대상으로 미국 FDA 허가 하에 인간 신경줄기세포를 뇌 이식하는 임상 1상 시험을 진행하여, 세포치료에 따른 안전성에 특별한 문제점이 없다고 보고하였으나, 회귀 질환이어서 환자 참여가 줄어들어 계속적인 임상연구는 중단된 상태이다⁵⁴⁾. 또한 최근에는 또 다른 회귀 유전성 신경질환이며 백질장애질환(leukodystrophy)인 Pelizaeus-Merzbacher disease 환아를 대상으로 인간 신경줄기세포 이식 임상 1상 시험 결과가 보고되었는데, 역시 안전성에 특별한 문제점은 없었으며, 뇌 MRI 검사상 일부 이식세포에 의한 뇌 백질에 수초화가 관찰됨이 보고되었다⁵⁵⁾. 그러나 실제 전세계에서 공식적으로 아직 퇴행성 신경계질환 환자를 대상으로 신경줄기세포를 포함한 다양한 줄기세포 이용 세포치료의 효능이 증명되었거나 허가된 경우는 없는 실정이다. 이러한 사실에도 불구하고 우리나라를 포함한 세계적으로 일부 난치성질환 환자를 대상으로 합리적인 이유 없이

혹은 과학적 및 임상적 기초자료가 불충분함에도 불구하고 실제 임상에서 다양한 줄기세포 이용 세포치료가 일부 시행되고 있는데, 이러한 행위는 항상 효과를 과대평가하고 부작용 발생은 과소평가하는 경향을 보인다⁵⁶⁾. 따라서 난치성 퇴행성 신경계질환에서 줄기세포 이용 세포치료가 성공하기 위해서는 임상시험을 위한 명확한 계획서가 필요하고, 여기에는 줄기세포 임상적용에 필요한 단계적인 기초연구 및 임상연구 이정표 설정, 그리고 임상시험에 따른 윤리적, 사회적, 경제적, 법적, 행정적 규범들의 확립도 필요하다.

인간 신경줄기세포의 임상적 적용을 위해서도 아직 많은 연구가 필요한데, 1) 신경계 발달과정에서 신경줄기세포의 다양한 전구세포 혹은 특이 신경세포로의 분화기전 규명과 줄기/전구세포 특이표지인자가 발굴; 2) 신경줄기세포의 증식, 성장, 분화기전 연구를 통하여 세포이식에 충분한 수의 신경세포를 안전하게 대량 배양, 증식하고 적절한 신경세포로의 분화유도 기술 확립; 3) 이식된 신경줄기세포가 신경계 내에 정착, 이주, 분화 및 숙주 신경계에 통합되는 분자생물학적 기전 규명; 4) 내인성 신경줄기세포에 의한 신경계 재생기전 규명 및 신경치료에 이용방법 개발; 5) 신경줄기 세포에 치료적 유용성을 보이는 유전자 혹은 단백질의 안전하고 효율적 전달방법 개발; 6) 퇴행성 신경계질환의 병태생리기전 규명을 통하여 각각의 질환치료에 줄기세포 이용 세포치료의 적절성 및 경제성을 먼저 평가하고, 이식 세포 종류 확인; 7) 각각의 난치성 신경계질환의 병태생리에 따른 기능적 이식술 개발; 8) 질환모델 동물에서 세포이식의 확실한 신경기능 개선효과 확인과 장기간에 걸쳐 부작용 발생에 대한 평가; 9) 다양한 다른 종류의 성체줄기세포, 배아줄기세포, iPS 세포 혹은 리프로그래밍 세포 유래 신경세포 이식과 태아 혹은 성인 중추신경계 유래 신경줄기세포 이식 간에 세포치료제로서의 안전성 및 유효성 비교 평가; 10) 신경줄기세포의 항 염증작용, 면역제어조절작용 및 성장인자 발현 등으로 인한 신경보호작용 규명; 11) 신경줄기세포의 치료적 유용성 기전 규명 및 신경계질환의 병태생리 상호 작용 연구를 통하여 가장 적절한 줄기세포 이식 방법, 이식 시기 등에 관한 연구; 12) 다양한 원인에 의한 복합 퇴행성 신경계질환에서 줄기세포 이용 세포치료와 더불어 다양하고 다원적인 융복합 치료법을 함께 적용하는 전략개발 등에 대한 연구들이 진행되어야 할 것이다.

중증 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 환아에서 인간 신경줄기세포 이식 임상시험

본 연구팀은 임신 13주에 유산된 태아의 사체 조직을 보건복지부 생명윤리법안을 따르고, 연세의대 세브란스병원 기관생명윤

리위원회와 보호자의 동의서를 받고 획득한 다음, 태아 중추신경계의 중뇌(telecephalon) 부위를 해부하여 동물혈청은 포함되지 않고 mitogenic cytokines이 포함된 'defined media'에 인간 신경줄기세포를 신경구(neurospheres) 형태로 배양하였다. 본 신경구는 시험관 내에서 doubling time (세포수가 2배 증식되는 데 소요시간)이 약 5일 정도로 빠르게 증식하였고, 1년 이상 계속 계대배양이 가능하였으며, 염색체 검사상 정상 소견을 보였고, 증식조건에서 약 99% 이상의 세포가 nestin, vimentin, GFAP, Pax6, glutamate astrocyte-specific transporter or EAAT1 (GLAST), Sox2와 같은 미성숙 신경줄기세포의 표지자를 발현하여 신경줄기/전구세포 형태를 보였다²²⁾. 분화조건에서 인간 신경줄기세포는 β -Tubulin-III를 발현하는 초기 신경원세포, O4를 발현하는 희소돌기아교세포 전구세포, GFAP를 발현하는 성상세포로 분화하였고, glutamate, GABA 등의 신경전달물질을 주로 발현하였으며, 전뇌(forebrain) 특이적인 Pax6, Dlx2, Emx2, Otx2와 같은 지역특이 유전자를 발현하였다²³⁾. 본 세포를 institutional GMP 시설인 세브란스병원 세포 치료센터에서 장기간 계대배양하면서 세포배양 'passage'마다 시험관 내에서 증식·분화형태를 평가하였고, 주기적인 염색체검사 혹은 유전자의 array comparative genomic hybridization 검사를 통하여 유전자가 정상세포임을 확인하였다. 또한 마이코플라스마, 세균, 곰팡이, 바이러스(HIV-1/2, HTLV-1/2, Hepatitis A/B/C, HSV-1/2, CMV), syphilis, toxoplasmosis 등 병원체에 오염되지 않고 내독성(endotoxin) 검사도 음성임을 확인하였고, 동결보관 후 해동 시에도 세포 특성변화가 없음을 확인하였다. 동물실험으로 생후 7일된 CD1 생쥐에서 국소성 저산소성 허혈성 뇌 손상을 유발하고 1주일 후 뇌 손상 부위에 인간 신경줄기세포를 이식한 결과, 공여세포는 뇌 손상 부위 및 접경부위에 광범위하게 정착, 이주함을 보였고, 신경원세포, 희소돌기아교세포, 성상세포로 분화하고, 일부는 미분화 상태로 있었으며, 이식된 신경세포는 glutamate, GABA, acetylcholine 등의 신경전달물질을 발현하고, 숙주 신경세포와 신경접합 형성함을 확인하였다. 숙주동물 뇌 조직학적 검사 상 대조군에 비해 이식군에서 신경염증 반응이 증가하지 않았고, 뇌경색증 범위는 대조군에 비해 유의하게 감소하지는 않았으나, 신경학적 검사 상 유의하게 신경기능호전을 보였고, 비정상적인 신경행동 소견이나 뇌 종양 형성 등은 보이지 않았다.

본 연구팀은 상기 연구결과를 바탕으로 '중증 주산기 저산소성 허혈성 뇌 손상 환자에서 동종 인간 신경줄기세포 이식에 의한 세포치료법 확립'이란 연구자 주도 임상시험 계획서를 연세대학교 의과대학 세브란스병원 기관생명윤리위원회에 제출하여 승인 받았고, 2006년 식약청에서 임상시험 시행을 허가 받았다. 본 연구는 비무작위(non-randomized), 전향적, 공개적 임상연구(phase I/IIa)이며, 출생 시 병력, 아프가 점수, 심폐소생술 실시 여부, 동

맥혈가스검사, 뇌파검사, 이학적, 신경학적 및 방사선과적 검사상 중증 저산소성 허혈성 뇌 손상을 받은 신생아를 대상으로 하였고, 선천성 기형, 선천성 감염증, 유전성/대사성/염색체 이상 질환, 출혈성 뇌 질환, 부당경량아/자궁내성장지연, 소두증 등이 동반되었거나 저체온증 치료 및 기타 세포치료를 포함한 다른 신경보호치료를 받은 환자는 제외하였다. 중증 저산소성 허혈성 뇌 손상으로 세브란스 병원 소아과에 입원한 환자를 대상으로 상기 임상시험 기준에 적합하며, 보호자가 줄기세포 이식 치료에 동의한 경우에 한하여 세브란스병원 세포치료센터에서 배양된 인간 신경줄기세포를 전신마취 하에 수술방에서 신경외과 의사가 뇌에 이식하였다. 세포이식 전과 이식 후 정기적으로 혈액검사, 이학적 및 신경학적 검사, 뇌파검사, 뇌 MRI 검사, diffusion tensor MRI, MR spectroscopy, visual evoked potential, brainstem evoked response audiometry, gross motor function measure (GMFM; GM-FM-88, GMFM-66), Bayley scoring, social quotient 검사를 실시하였고, 세포 이식 위치는 수술 하루 전 뇌 MRI를 검사하고 이식 당일 수술 방에서 navigational MRI로 다시 위치를 확인하였는데, 손상된 뇌 실질 혹은 뇌실 부위 등에 5×10^4 /microliter 농도의 미분화 인간 신경줄기세포를 양측 뇌에 나누어서 각각 1 mL씩 직접 주사하였다.

현재까지 뇌 손상 후 1.5개월에서 2년 이상 경과한 아급성 및 만성 저산소성 허혈성 뇌 손상 환자 41명을 대상으로 인간 신경줄기세포를 이식하였고, 동종세포 이식 후 면역억제제는 투여하지 않았으며, 세포이식 후 2년 이상 추적검사를 실시하고 있다. 줄기세포 이식과 직접 관련된 뇌출혈, 뇌막염/뇌염, 뇌종양, 뇌수종, 경련, 통증, 강직, 면역쇼크, 신경학적 기능 악화, 비 정상적인 신경학적/신경행동학적 이상 소견은 관찰되지 않았으며, 세포이식 후 6개월-1년 간격으로 찍은 뇌 MRI 검사에서도 이상소견이 관찰되지 않아 인간 신경줄기세포 이식은 안전하고 적용 가능한 세포치료법임을 보여주고 있다. 세포치료의 유효성 여부는 본 임상연구가 이중맹검(double blind) 무작위 대조시험이 아니고, 뇌 MRI 검사 상 환자마다 저산소성 허혈성 뇌 손상의 해부학적 위치, 정도, 범위 및 신경병리 소견이 다양하며, 세포이식 시 환자의 연령도 다르며, 세포이식 시기도 아급성에서 만성까지 범위가 넓고, 신생아의 뇌는 발달단계에 있어 연령마다 발달 기준이 달라져 세포이식 후 장기간 추적검사가 필요하므로 현재로서는 명확한 평가를 할 수 없다. 그러나 일부 환자는 세포이식 후 뇌경색증의 범위가 유의하게 감소하고 신경학적 기능과 운동 및 인지기능의 호전을 보이고 있다. 향후 전체 대상환자에서 세포이식 후 적어도 2-3년 이상 추적검사가 끝날 경우 임상자료를 정리, 분석하여 일차 결과를 발표하고자 하며, 그 후 계속하여 장기간에 걸쳐 세포치료의 안전성 및 유효성 결과를 추적할 예정이다.

결론

신경줄기세포는 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가갱신을 보이고, 한 개의 줄기세포로부터 다양한 신경원세포 및 교세포로 분화하는 분화의 다능성을 보이는 세포를 의미한다. 이러한 신경줄기세포는 태아기에서는 신경계 전반에 걸쳐 다양한 해부학적 부위에 존재하여 신경계를 형성하며, 한번 손상되면 재생되지 않는 것으로 알려져 있는 인간을 포함한 포유류의 성체 중추신경계에도 존재하고 일생을 통하여 증식, 분화하여 새로운 신경원 및 교세포를 생성한다. 신경줄기세포는 시험관 내에서 장기 배양할 수 있고, 생체 내 이식시 공여세포는 생착, 이주 및 분화하여 숙주신경계에 통합되며, 외부 유전자를 발현하고, 이식 전 미리 신경원 및 교세포로 분화 유도할 수 있고, 항 염증인자, 면역조절인자, 신경영양인자 및 신경가소성 촉진인자 등을 발현함이 확인되어 퇴행성 신경계질환에서 본 세포를 이용한 신경재생/보호치료 가능성에 관심이 증가하고 있다. 신경줄기세포를 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 동물 모델에 이식한 결과, 이식세포는 뇌 손상 부위로 특이적으로 이주함을 보이고, 손상 부위에 확고히 생착하며, 다양한 신경세포로 분화하여 신경세포를 재생함을 보였다. 신경줄기세포에 성장인자, 싸이토카인, 신경발달관련 유전자 등을 발현케 한 후 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에 이식할 경우, 이식세포 및 숙주 신경세포에 autocrine/paracrine으로 작용하여 신경세포의 분화유도, 신경돌기 성장 촉진, 손상된 신경회로 복구, 신경세포 생존/보호 강화, 신경접합 촉진 등을 유도할 수 있음을 보였고, 신경줄기세포 이식으로 손상된 신경세포를 대체하는 세포치료와 적절한 신경영양인자, 항 염증인자, 성장인자 등을 동시에 제공하는 유전자치료가 가능함을 제시하였다. 또한 고분자화합물 비계와 신경줄기세포를 이용하여 중증 저산소성 허혈성 뇌 손상 시 신경조직공학 치료 가능함을 제시하였고, 나노입자 및 줄기세포의 융합연구를 통하여 신경계에 새로운 비침투적 줄기세포 이식술을 개발할 수 있으며, 이식세포의 이주, 생착 및 분화를 외부에서 제어조절 가능하며, 이식세포를 생체 내에서 효과적으로 추적할 수 있는 영상기술 개발 가능성을 확인하였다. 본 연구팀은 임신 13주에 유산되어 사망한 태아의 중뇌 부위에서 인간 신경줄기세포를 배양, 확립하여 생체 내외에서 특성을 분석한 후, 기관생명윤리위원회와 식약청 허가 하에 주산기 중증 저산소성 허혈성 뇌 손상 환아를 대상으로 인간 신경줄기세포를 이식하는 연구자 임상시험을 시행하였다. 현재까지 줄기세포 이식에 따른 특별한 부작용을 관찰할 수 없었고 일부 환자에서 신경기능의 호전을 관찰할 수 있어, 인간 신경줄기세포 이식은 안전하고 적용 가능한 세포치료법임을 제시하였다. 따라서 향후 신경줄기세포 이식 경로, 이식 시간 및 적절한 대상 환아 선택, 치료적 유용성이 높은 기능성 신경줄기세포의 개발, 조직공학 및 나노공학 융복

합 연구를 통한 줄기세포 기반 복합 기능성 치료법 개발, 많은 환자를 대상으로 이중맹검 무작위 대조 다기관 임상시험 시행 및 장기간에 걸친 줄기세포 치료의 안전성/유효성을 평가를 통한 세포치료법 개발이 필요하다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from the Korea Healthcare Technology R&D Project (A091159, A121943), Ministry for Health and Welfare, the National Research Foundation of Korea (2010-0020289), Ministry of Science and Technology, and the Faculty Grant of Yonsei University College of Medicine (6-2006-0017), Republic of Korea. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1) Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 2011;146:18-36.
- 2) Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17528-32.
- 3) Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004;41:683-6.
- 4) Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 2006;26:7907-18.
- 5) Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008;132:645-60.
- 6) Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 2011;70:687-702.
- 7) Fowler CD, Liu Y, Wang Z. Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev* 2008;57:342-51.
- 8) Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1477-97.
- 9) Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:65-71.
- 10) Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine re-

- ceptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:18117-22.
- 11) Park KI, Hack MA, Ourednik J, Yandava B, Flax JD, Stieg PE, et al. Acute injury directs the migration, proliferation, & differentiation of solid organ stem cells: Evidence from the effect of hypoxia-ischemia in the CNS on clonal "reporter" neural stem cells. *Exp Neurol* 2006;199:156-78.
 - 12) Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 2005;310:679-83.
 - 13) Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386:493-5.
 - 14) Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996;16:2027-33.
 - 15) Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 2006;16:233-8.
 - 16) Dietrich J, Han R, Yang Y, Mayer-Pröschel M, Noble M. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 2006;5:22.
 - 17) McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:66-71.
 - 18) Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001;414:112-7.
 - 19) Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-10.
 - 20) Jakel RJ, Schneider BL, Svendsen CN. Using human neural stem cells to model neurological disease. *Nat Rev Genet* 2004;5:136-44.
 - 21) Kim HT, Kim IS, Lee IS, Lee JP, Snyder EY, Park KI. Human neurospheres derived from fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed. *Exp Neurol* 2006;199:222-35.
 - 22) Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 2002;20:1111-7.
 - 23) Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3024-9.
 - 24) Ashton RS, Banerjee A, Punyani S, Schaffer DV, Kane RS. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly (lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. *Biomaterials* 2007;28:5518-25.
 - 25) Cullen DK, Stabenfeldt SE, Simon CM, Tate CC, LaPlaca MC. In vitro neural injury model for optimization of tissue-engineered constructs. *J Neurosci Res* 2007;85:3642-51.
 - 26) Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, Fehlings MG, et al. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *J Neurosci* 2008;28:3814-23.
 - 27) Urbach R, Technau GM. Dorsoroventral patterning of the brain: a comparative approach. *Adv Exp Med Biol* 2008;628:42-56.
 - 28) Pearson BJ, Doe CQ. Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:619-47.
 - 29) Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 2008;3:289-300.
 - 30) Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 2008;22:152-65.
 - 31) Gaspard N, Bouchet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Ameel J, et al. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 2008;455:351-7.
 - 32) Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yone-mura S, Matsumura M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 2008;3:519-32.
 - 33) Kokovay E, Shen Q, Temple S. The incredible elastic brain: how neural stem cells expand our minds. *Neuron* 2008;60:420-9.
 - 34) Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 2005;436:266-71.
 - 35) Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3:537-44.
 - 36) Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, et al. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat Med* 2007;13:439-47.
 - 37) Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010;120:29-40.
 - 38) Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207:3149-54.
 - 39) Dilenge ME, Majnemer A, Shevell MI. Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. *J Child Neurol* 2001;16:781-92.
 - 40) Higgins RD, Raju T, Edwards AD, Azzopardi DV, Bose CL, Clark RH, et al. Hypothermia and other treatment options for neonatal encephalopathy: an executive summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD workshop. *J Pediatr* 2011;159:851-8.e1.
 - 41) Park KI, Himes BT, Stieg PE, Tessler A, Fischer I, Snyder EY.

- 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;199:179-90.
- 42) De Feo D, Merlinia A, Laterza C, Martino G. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. *Curr Opin Neurol* 2012;25:322-33.
- 43) Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, Kilic E, Kilic U, Salani G, et al. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain* 2009;132:2239-51.
- 44) Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in hemorrhagic stroke. *Brain* 2008;131:616-29.
- 45) Paula Sd, Greggio S, DaCosta JC. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86:451-64.
- 46) Pimentel-Coelho PM, Mendez-Otero R. Cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stem Cells Dev* 2010;19:299-310.
- 47) Cord blood for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [Internet]. Bethesda (MD): U. S. National Institute of Health [cited 2013 July 2]. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00593242>.
- 48) Barbosa da Fonseca LM, Gutfilem B, Rosado de Castro PH, Battistella V, Goldenberg RC, Kasai-Brunswick T, et al. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. *Exp Neurol* 2010;221:122-8.
- 49) Lee JA, Kim BI, Jo CH, Choi CW, Kim EK, Kim HS, et al. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neo-natal rat model. *Pediatr Res* 2010;67:42-6.
- 50) van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun* 2010;24:387-93.
- 51) Janowski M, Walczak P, Date I. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev* 2010;19:5-16.
- 52) Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke Participants. *Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke*. *Stroke* 2009;40:510-5.
- 53) Borlongan CV. Cell therapy for stroke: remaining issues to address before embarking on clinical trials. *Stroke* 2009;40:S146-8.
- 54) Study of HuCNS-SC cells in patients with infantile or late infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) [Internet]. Bethesda (MD): U. S. National Institute of Health [cited 2013 July 2]. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00337636?term=batten&rank=4>.
- 55) Gupta N, Henry RG, Strober J, Kang SM, Lim DA, Bucci M, et al. Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci Transl Med* 2012;4:155ra137.
- 56) Lau D, Ogbogu U, Taylor B, Stafinski T, Menon D, Caulfield T. Stem cell clinics online: the direct-to-consumer portrayal of stem cell medicine. *Cell Stem Cell* 2008;3:591-4.