

# 성견골수줄기세포의 신경세포로의 분화

최병호<sup>1</sup> · 허진영<sup>2</sup> · 박동균<sup>3</sup> · 김병용<sup>4</sup> · 이승호<sup>5</sup> · 박선영<sup>1</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실 (원주기독병원), <sup>2</sup>울산대학교 강릉아산병원 치과

<sup>3</sup>연세대학교 원주의과대학 이비인후과학교실, <sup>4</sup>Me-Plus 치과, <sup>5</sup>카톨릭 치과병원

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2003;29:1-4)

## DIFFERENTIATION OF ADULT CANINE BONE MARROW STEM CELLS INTO NEURONS

Byung-Ho Choi<sup>1</sup>, Jin-Young Huh<sup>2</sup>, Dong-Joon Park<sup>3</sup>,  
Byoung-Yong Kim<sup>4</sup>, Seoung-Ho Robert Lee<sup>5</sup>, Sun-Young Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Yonsei University

<sup>2</sup>Department of Dentistry, Kangnung Asan Hospital

<sup>3</sup>Department of Otolaryngology, Wonju College of Medicine, Yonsei University

<sup>4</sup>Me-Plus dental clinic, <sup>5</sup>Korean Baylor Academy and KIDA

In this study, we showed that neurons could be generated from adult canine bone marrow stem cells by culturing with DMSO/BHA/FeCl<sub>2</sub>. These neurons differentiated from the bone marrow stem cells formed neurites, expressed neuron-specific markers. This differentiation was enhanced by FeCl<sub>2</sub>. These results suggest that iron can effectively initiate differentiation of adult bone marrow stem cells into neurons.

**Key words** : Neuronal differentiation, Tissue engineering, Cell culture, Stem cells

### I. 서 론

최근 여러 연구에 의하면 성체골수줄기세포가 골세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포 등 여러 형태의 세포로 분화될 수 있다고 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 또한 발생학적 배엽 (germ layer)의 한계를 넘어서서 비간엽세포로도 분화될 수 있음이 밝혀졌다<sup>3</sup>. 1999년 Kopen 등은<sup>4</sup> 골수줄기세포를 쥐의 좌측뇌실에 이식함으로써 성상교세포 (astrocytes)와 신경세사 (neurofilament)를 함유한 신경세포로의 분화를 관찰하여 골수줄기세포의 뇌질환 치료에 이용 가능성을

을 시사하였다. 또한 생체의실험에서도 성체골수줄기세포가 신경세포형태로 분화되면서 신경세포 관련 표지물질이 다량으로 생성됨이 보고되었다<sup>3,5,6</sup>. 이러한 실험결과들은 성체골수줄기세포가 신경세포로 분화될 수 있어 뇌질환 및 신경질환의 치료에 이용될 수 있음을 시사한다. 이러한 목적에 성체골수줄기세포를 이용하기 위하여 먼저 이들 세포들을 효과적으로 신경세포로 분화시킬 수 있는 방법이 중요하다. 그리하여 본 연구에서는 성견골수줄기세포를 신경세포로 효과적으로 분화시킬 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

### II. 재료 및 방법

#### 1. 성견골수줄기세포의 분리 및 배양

체중이 15kg 이상되는 성견을 실험동물로 사용하였으며 이들의 장골에서 26게이지 주사바늘을 이용하여 골수를 채취하였다.

#### 최 병 호

강원도 원주시 일산동 162번지

연세대학교 원주의과대학 구강악안면외과

Byung-Ho Choi

Department of OMFS, Wonju Christian Hospital, Yonsei University

162 Ilsan-Dong, Wonju, Kwangwon-Do, Korea

Tel: 033-741-1430 Fax:033-748-2025

E-mail: choibh@wonju.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제번호: 02-PJ1-PG1-CH07-0001).

골수줄기세포의 분리 및 배양은 Sanchez 와 Ramus<sup>6)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 간략히 요약하면 약 3 mL의 골수를 20% 우태혈청 (FBS, Gibco)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) 3 mL와 혼합한 후 30분 동안 원심분리를 시행하였다. 상층액과 중간층의 액을 분리채취하여 성장용 배양액과 혼합한 후 이를 75cm<sup>2</sup> 세포배양용 플라스크에 넣어, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 사용한 성장용 배양액은 DMEM을 기본배지로 하여 여기에 20% FBS, 10 ml/L non-essential amino acid, 10 ml/L vitamin, 10 ml/L sodium pyruvate, 10 ml/L antibiotic을 첨가한 것을 사용하였다. 3일후 배양액을 교환하면서 플라스크 바닥에 부착되지 않은 세포들은 제거하고, 바닥에 부착되어 자라는 세포들을 배양하였으며 2-3일 간격으로 배양액을 교환 공급하였다. 세포들이 바닥을 덮으면 트립신 처리하여 계대배양을 시행하였다. 4-6차에 걸친 계대배양후의 세포들을 신경세포로의 분화 실험에 사용하였다.

### 2. Flow cytometry

골수줄기세포의 배양에 조혈세포 (hematopoietic cell)가 함께 섞여 있는지 확인하기 위하여 Facscan (Becton Dickinson Immunocytometry system, CA, USA)를 사용하여 flow cytometry 분석을 시행하였다. 이때 조혈세포에 존재하는 항체를 인식할 수 있는 CD14, CD34, CD45 세포표면항체로 passage 1 세포배양에서 얻은 세포에 표시하여 분석을 시행하였다.

### 3. 신경세포로 분화

성견골수줄기세포를 신경세포로 분화시키기 위하여 성견골수 줄기세포를 DMEM에 2% DMSO (dimethylsulfoxide), 20 $\mu$ M BHA (butylated hydroxyanisole), 50 $\mu$ M FeCl<sub>2</sub>, 100ng/mL nerve growth factor (NGF), 100ng/mL brain-derived neurotrophic factor (BDNF)를 첨가한 배양액으로 7일간 배양함으로써 유도하였다. 신경세포로 분화되는지 확인하기 위하여 도립 위상차 현미경으로 형태학적 변화를 관찰하였으며 면역세포화학적 염색을 사용하여 신경세포 표지 항체의 표현을 관찰하였다.

### 4. 면역세포화학적 염색

형태학적으로 보여지는 신경세포가 실제로 신경세포의 특성을 보유하고 있는지의 여부를 조사하고자 신경세포에서 발현되는 것으로 알려진 단백질에 대한 항체를 사용하여 면역세포학적 염색을 수행하였다. 염색방법은 일반적으로 사용되는 방법과 동일하게 수행되었다. 분화용 배지로 배양을 시작한 후 7일째 세포를 4% paraformaldehyde로 10분간 상온에서 고정한 후 항체를 처리하여 염색하였다. 신경세포 표지 항체인 neurofilament-M (NF-M, Chemicon)과 neuron-specific enolase (NSE, Polysciences)를 사용하였다. DAKO (DAKO LSAB 2 system, HRT, CA, USA) 염색키트를 사용하여 세포염색을 시행하여 신경 관련 물질의 발현을 확인하

였다. 염색된 세포의 관찰은 일반 광학 현미경하에서 관찰하였다. 정량적인 비교를 위해 전체 세포수에 대한 NSE 와 NF-M에 양성으로 염색된 세포수의 비율을 계산하였다. 세포수의 계산은 각 샘플에서 중복되지 않게 10개의 부위에서 Fugi-digital camera로 촬영한 사진에서 계산하였다.

## III. 결 과

일차배양에서 얻은 성견골수줄기세포를 flow cytometry 한 결과 CD14, CD34, CD45에 대하여 음성반응을 보였다 (Fig. 1). 이것은 골수줄기세포의 배양에 조혈세포가 존재하지 않음을 나타낸다.

성견골수줄기세포를 성장용 배양액으로 배양할 때는 세포들이 섬유아세포의 형태를 가지면서 증식하였다. 그러나 분화용 배양액을 사용하여 배양을 시작한 후부터는 수 시간 내에 돌기를 뺏으면서 신경세포의 모양으로 바뀌어 갔다. 4일 후부터 양극성 세포 (bipolar cell) 및 다극성 세포 (multipolar cell)의 다양한 신경세포의 모양을 나타내었다 (Fig. 2). 7일 동안 분화용 배양액으로 배양시 세포들은 계속적으로 분화형태를 나타내었다.

7일 동안 분화시켰을 때, 신경세포 관련 표지 물질이 다량으로 생성되어 신경세포로의 분화가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 면역세포화학적 염색 결과에서 신경세포의 모양을 가진 대부분의 세포들이 NSE 와 NF-M 항체에 염색이 되었다 (Fig. 3 and 4). 이때 세포에서 자라나온 축삭 (neurites)도 염색되었다. 몇몇 세포들은 염색이 되지 않거나 매우 약하게 염색되었다. NSE에 염색된 세포수의 비율은 45% 였으며, NF-M에 염색된 세포수의 비율은 70% 였다.

## IV. 고 찰

최근 줄기세포가 인체의 여러 장기를 구성하는 세포들로 분화 가능하다는 것이 밝혀지면서 줄기세포를 이용한 장기재생 연구가 활발히 연구되고 있다. 줄기세포는 배아줄기세포, 태아줄기세포, 성체줄기세포로 나눌수 있다. 배아줄기세포는 인체의 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지기 때문에 이론적으로 인체의 모든 장기를 인공적으로 만들 수 있고<sup>7)</sup> 현재 많은 종류의 장기 치료를 위해 배아줄기세포의 사용이 연구되고 있다. 그러나 배아줄기세포는 윤리적 문제점을 안고 있다. 태아조직에서 분리한 태아줄기세포도 분화능력은 우수하나 윤리적인 문제점과 면역 거부반응의 문제점을 안고 있다. 성체줄기세포는 자가골수줄기세포가 사용될 수 있어 윤리적인 문제점과 면역 거부반응의 문제점이 없어 최근 많은 연구가 되고 있으며 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 지방세포 등 여러 형태의 세포로 분화될 수 있다는 보고가 있다<sup>2,8)</sup>. 그리하여 현재 여러 종류의 장기 치료를 위해 사용이 연구되고 있다. 성체줄기세포중 신경줄기세포는 뇌에서 채취해야 하는 문제점 때문에 임상적으로 사용하는데 한계가 있는 반면, 골수줄기세포는 장골에서 쉽게 채취할 수 있고 배양이 쉽고 세포의 증식속도도 빨라 장기 치료를 위

해 골수줄기세포를 사용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로 치매나 파킨슨병, 간질 등을 포함하는 퇴행성 뇌질환을 앓고 있는 환자들은 10% 미만이나 고령화되고 있는 선진 국가의 경우, 노인 인구의 증가에 따른 심각성이 대두되고 있으며, 또한 안면마비나 감각이상등 신경질환을 앓고 있는 환자의 증가에 따른 치료제 개발뿐만 아니라 치료 방법 및 원인을 밝혀내기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 따라서 특정 뇌질환 및 신경질환을 치료하는데 중요한 역할을 담당할 것으로 예상되는 성체골수줄기세포를 신경세포로의 분화가 재현성 있게 이루어질 수 있다면 이들 질환 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구결과는 성체의 골수에서 줄기세포를 분리하여 배양한 세포가 발생학적 배양의 한계를 넘어서서 비간엽세포인 신경세포로의 분화가 가능함을 나타낸다.

배아줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 위한 유도인자에 관하여는 여러 연구결과가 있다. 일반적으로 사용된 신경세포 유도인자로서 bFGF, Retinoic acid (RA), BDNF, PDGF, NT3, EGF, NGF 등이 있다<sup>9,12)</sup>. 그러나 성체줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 위한 유도인자에 관한 연구는 몇 편에 불과하였다. 2000년 Woodbery 등은<sup>3)</sup> 신경세포로의 분화에 antioxidant인 DMSO 와 BHA를 사용하였으며, 2000년 Sanchez-Ramos 등은<sup>6)</sup> EGF와 BDNF를 첨가하여 신경세포로의 분화를 유도하였으며, 2002년 Kim 등은<sup>5)</sup> FGF와 retinoic acid (RA)를 첨가하여 신경세포로의 분화를 유도하였다. 본 연구에서는 성체골수줄기세포의 신경세포로의 분화에 FeCl<sub>2</sub>, DMSO, BHA가 유효하게 작용됨이 나타났다. 특히 FeCl<sub>2</sub>가 신경세포분화를 유도하는 기전에 관하여는 잘 알려져 있지 않지만 본 연구에서 철을 첨가하였을 때 neurite outgrowth가 더 촉진되었다. 이러한 관찰은 blood monocytes를 dendritic cell로 분화시키는데 철이 필요하다는 연구결과와 일치하며<sup>13)</sup>, Gazitt 등도<sup>14)</sup> 철을 세포분화유도에 사용하여 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다. 본 연구에서 DMSO와 BHA만 사용하는 것보다 철을 첨가한 것이 미분화된 세포의 증식을 억제하면서 축색을 뺀 세포의 수를 더 증가시켜 효과적으로 신경세포로의 분화가 이루어짐을 관찰하였다.

신경세포로의 분화에 관하여 보고된 논문에서 면역세포화학적 염색 방법을 이용하여 신경세포 관련 표지물질이 발현되는 것을 확인하여 세포분화를 확인하였는데 Sanchez-Ramos 등은<sup>6)</sup> 약 5%미만에서 fibronectin, nestin, NeuN이 발현되는 것을, Kim 등은<sup>5)</sup> 약 16%에서 neurofilament 물질이 존재하였음을 확인하였다. 본 연구에서는 FeCl<sub>2</sub>/DMSO/BHA를 첨가하여 신경세포로 분화를 유도한 후 상당히 높은 신경세포 관련 표지물질이 발현되는 것

을 관찰하였는데 약 45%에서 NSE가 약 70%에서 NF-M이 발현되었다. 이와 같은 결과에서 성체 골수줄기세포에서 신경세포로의 분화가 가능함을 보여주었다. 그러나 본 연구에서 기능적으로 어떠한 세포로 분화를 이루고 있는지 조사가 이루어 지지 않았다. 향후 성체골수줄기세포로부터 특정 질환 치료에 알맞은 순도 높은 기능성 신경세포로의 분화 시스템 개발이 계속적으로 이루어져야할 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-74.
2. Pittenger M et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
3. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-370.
4. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout the forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711-10716.
5. Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *NeuroReport* 2002;13:1185-1188.
6. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exper Neurol* 2000;164:247-256.
7. Walker JM. Embryonic stem cells: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2000
8. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
9. Brain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Devel Bio* 1995; 168:342-357.
10. Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1996;16:1091-1100.
11. Wohl CA, Weiss S. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astrogliol differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J Neurobiol* 1998;37:281-290.
12. Shetty AK, Turner DA. In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *N Neurobiol* 1998;35:395-425.
13. Kramer JL, Baltathakis I, Alcantara OSF, Boldt D. Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors is dependent on expression of p21 (WAF1/CIP1) and requires iron. *Bri J Haematol* 2002;117:727-734.
14. Gazitt Y, Reddy SV, Alcantara O, Yang J, Boldt DH. A new molecular role for iron in regulation of cell cycling and differentiation of HL-60 human leukemia cells: Iron is required for transcription of p21 (WAF1/CIP1) in cells induced by phorbol myristate acetate. *J Cell Physiol* 2001;187:124-135.

사진부도

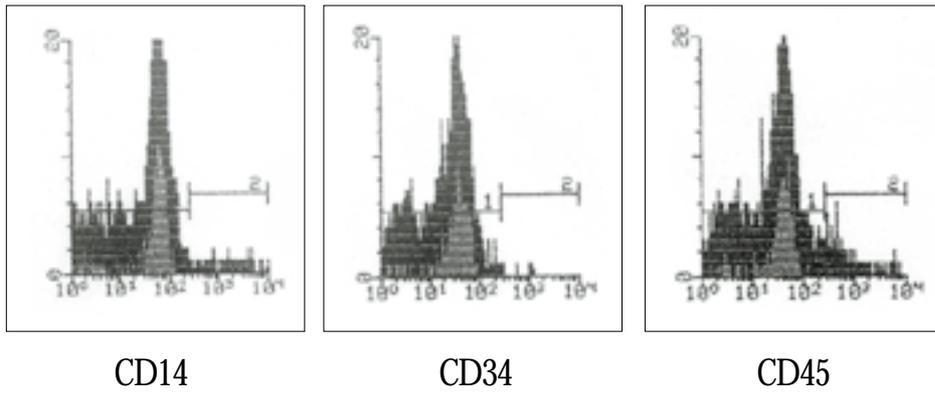


Fig. 1. Characterization of undifferentiated bone marrow stem cells.



Fig. 2. Neuronal differentiation of bone marrow stem cells.



Fig. 3. NSE expression in differentiating neurons.

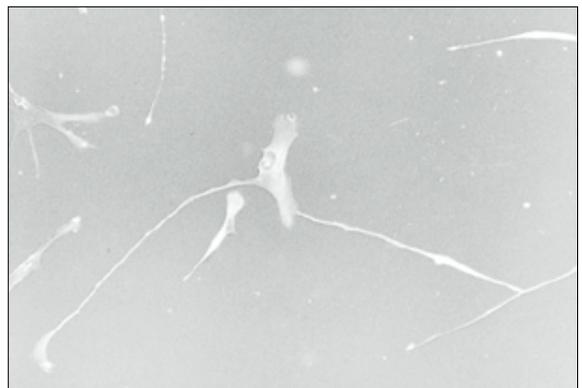


Fig. 4. NF-M expression in differentiating neurons.