

## 신경 분화 유도한 인체 지방조직 유래 간질세포의 신경 표현형과 유전자 발현

심수경 · 오득영 · 전영준 · 이백권 · 안상태 · 이종원

가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실

### Neuronal Phenotypes and Gene Expression Profiles of the Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in the Neuronal Induction

Su Kyung Shim, M.S., Deuk Young Oh, M.D.,  
Young Joon Jun, M.D., Paik Kwon Lee, M.D.,  
Sang Tae Ahn, M.D., Jong Won Rhie, M.D.

Department of Plastic Surgery, College of Medicine, The  
Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose:** Human adipose tissue-derived stromal cells(hADSCs) can be expanded *in vitro* and induced to differentiate into multiple mesenchymal cell types. In this study we have examined various neuronal phenotypes and gene expression profiles of the hADSCs in the neuronal induction.

**Methods:** The hADSCs were isolated from human adipose tissue and they were characterized by the flow cytometry analysis using CD13, CD29, CD34, CD45, CD49d, CD90, CD105 and HLA-DR cell surface markers. We differentiated the hADSCs into the neuronal lineage by using chemical induction medium and observed the cells with contrast microscopy. The immunocytochemistry and western blotting were performed using the NSE, NeuN, Trk-A, Vimentin, N-CAM, S-100 and  $\beta$ -Tubulin III antibodies.

**Results:** The hADSCs were positive for CD13( $90.3 \pm 4\%$ ), CD29( $98.9 \pm 0.7\%$ ), CD49d( $13.6 \pm 6\%$ ), CD90( $99.4 \pm 0.1\%$ ), CD105( $96\% \pm 2.8\%$ ) but negative for CD34, CD45 and HLA-DR. The untreated cultures of hADSCs predominately consisted of spindle shaped cells and a few large, flat cells. Three hours after the addition of induction medium, the hADSCs had changed

morphology and adopted neuronal-like phenotypes. The result of immunocytochemistry and western blotting showed that NSE, NeuN, Trk-A, Vimentin, N-CAM, S-100 and  $\beta$ -Tubulin III were expressed. However, NSE, NeuN, Vimentin were weakly expressed in the control.

**Conclusion:** These results indicate that hADSCs have the capability of differentiating into neuronal lineage in a specialized culture medium. hADSCs may be useful in the treatment of a wide variety of neurological disorders.

**Key Words:** Human adipose tissue-derived stromal cell, Neuronal differentiation, Neuron-specific protein

### 1. 서 론

중추신경계는 질병이나 외상에 의한 손상 후에 자가 재생 능력이 제한되어 있다고 알려져 있었다. 최근에 뇌척수 손상, 뇌졸중, 파킨슨병 등의 난치성 질환의 치료에 줄기 세포를 이용하려는 노력이 활발하게 진행되고 있다.<sup>1</sup> 줄기 세포는 발생단계에서부터 인체의 모든 장기를 형성하고 성장 후에는 체내에 존재하여 장기나 조직의 기능을 복원하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 줄기세포를 얻는 과정은 크게 두 가지로 대별하여, 발생초기의 배반포(blastocyst)에서 얻어지는 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 발생과정이 끝난 성인 또는 태반에서 얻어지는 성체줄기세포(adult stem cell)가 있다. 이 두 가지 줄기세포는 서로가 상이한 특징을 가지고 있어서, 배아줄기세포의 경우는 미분화 상태의 자가 재생산 능력이 뛰어나서 증식이 용이하지만, 생체 내에 세포치료를 위해 이식한 경우 미분화 상태의 세포가 증식하는 암(teratoma)의 발생 가능성을 고려해야 한다.<sup>2</sup> 반면, 성체줄기세포는 생체 내에 이식된 후 장기의 특성에 맞게 분화하는 장기 특이적 분화(site-specific differentiation) 및 본래의 세포 특성과 다른 종류의 장기세포로 교차분화(trans-differentiation)할 수 있는 형성성(plasticity of stem cell)을 가지고 있으며 많은 종류의 세포로 분화될 수 있는 중복성(multipotentiality of stem cell)이 있는 것으로 밝혀지면서 성체줄기세포를 통한 세포치료의 가능성을 높이고 있다.<sup>3</sup>

Received November 8, 2006

Revised November 28, 2006

**Address Correspondence:** Jong Won Rhie, M.D., Department of Plastic Surgery, Kangnam St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea. Tel: 02) 590-1350 / Fax: 02) 594-7230 / E-mail: rhie@catholic.ac.kr

\* 본 논문은 2006년 제 61차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 포스터 발표되었음.

\* 본 논문은 2006년 가톨릭세포치료사업단 기초과학연구사업 연구비에 의하여 이루어졌음.

Woodbury 등<sup>4</sup>은 성체줄기세포로서 대표적인 골수 유래 줄기세포(BMSC; bone marrow stem cells) 이용하여 외배엽기원인 신경세포계열로의 분화를 시도하였고, 이에 Sanchez-Ramos 등<sup>5</sup>은 상피세포 성장인자(EGF; epidermal growth factor) 등을 이용하여 간엽줄기세포를 신경세포로 분화시켰다. 그러나 골수 유래 줄기세포는 세포 획득 시 환자의 고통이 수반되고 임상에 적용하기 위한 충분한 양의 세포를 얻기 위해서는 여러 번 채취를 해야 하는 부담이 있기 때문에 다른 부위에서 자가줄기세포를 얻으려는 노력이 시도되고 있다.

이에 저자는 인체에서 쉽게 접근 할 수 있고 많은 양의 세포를 얻을 수 있는 지방조직으로부터 지방유래 간질세포(hADSCs; human adipose tissue-derived stromal cells)를 분리한 후 신경세포로의 분화를 유도하여, 분화 초기 단계에서 발견되는 다양한 신경세포의 세포표면 항원, 특정 발현 물질을 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 인체 지방조직 유래 간질세포의 분리 및 증식

인체로부터 얻은 지방조직을 항생균-항진균제(antibiotic-antimycotic; Gibco BRL, Grad Island, NY)가 포함된 인산 완충 용액(phosphate buffer saline; PBS; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO)으로 세척한 후 아주 잘게 잘랐다. 잘게 자른 지방조직을 0.03% collagenase(Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO)와 혼합하여 37°C에서 1시간 진탕 후, 동량의 DMEM-hg(Dulbecco's Modified Eagle's Media high glucose; Gibco BRL, Grad Island, NY)과 10% 우태혈청(FBS; Gibco BRL, Grad Island, NY), 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin(Gibco BRL, Grad Island, NY)으로 구성된 간질 배양액 효소반응을 중화시켰다. 이를 250g에서 10분간 원심 분리하여 상층에 부유된 지질과 지방세포층을 제거하였다. 하부의 간질혈관 분획의 침전 세포층(cellular pellet)은 100 µm mesh filter에 통과시켜 불순물을 제거하고 37°C/5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 간질 배양액으로 배양하였다. 초기 24시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 후, 3일에 한 번씩 새로운 배양액을 교환해 주었으면 약 80% 이상의 세포 포화 상태(confluence)에 이르면, 0.25% trypsin-EDTA(Gibco BRL, Grad Island, NY)로 세포를 분리한 후 계대배양하였다.

### 나. 지방조직 유래 간질세포의 특성분석

세포의 표면항원 측정을 위해 단층 성장하는 간질세포에서 배양액을 제거한다. 배양된 세포를 PBS로 1회 세척하고 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응

시킨 후 분리하였다. PBS 세척 후 세포 수를  $1 \times 10^6$  cells/ml(PBS pH7.4 containing 1% Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO))로 준비한다. 이를 5 ml polystyrene Round-Bottom Tube에 100 µl씩 분주한 뒤 형광물질(FITC; fluorescein isothiocyanate)로 표지된 isotype, CD13, CD29, CD34, CD45, CD49d, CD90, CD105, HLA-DR를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨다. 2 ml의 PGB로 세척 후 Flow Cytometry(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 다. 신경세포로의 분화 유도

배양 중인 지방조직 유래 간질세포는 4대 계대배양되었다. 5대 계대배양 시 신경세포로 분화하기 위한 전 처리로 항생제를 첨가하지 않은 DMEM에 20% FBS가 첨가된 배양액을 사용하여 24시간 동안 배양한다. 신경세포로의 분화 유도를 위해 DMEM에 2% Dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO)와 200 µM Butylated hydroxyanisole(BHA; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO)이 함유된 20 ml DMEM 배양액으로 배양한다. 대조군은 간질배양액이 첨가된 세포군을 이용하였다.

### 라. 면역형광염색을 이용한 세포표면 항원 분석

지방조직 유래 간질세포를 24 well plate에  $3 \times 10^3$  cells/well의 농도로 하여 20% FBS가 포함된 DMEM-hg 배양액으로 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양한다. 간질세포의 포화도를 유지한 채로 신경세포로의 분화를 유도한다. 분화 유도 후 배양액을 제거하여 PBS로 2회 세척하고 4%의 고정액으로 상온에서 15분간 고정시키고 항체의 투과성을 높이기 위해 0.2% Triton X-100으로 상온에서 5분간 반응시킨다. 이 후 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 5% Horse Serum이 들어간 PBS 용액으로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체 NeuN, β-Tubulin III, Vimentin(Mouse monoclonal; Chemicon, Int, San Diego, CA), NSE(Mouse monoclonal; Dako, Glostrup, Denmark), Trk-A(Rabbit polyclonal; Upstate, Lake Placid, NY), N-CAM(Mouse monoclonal; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO), S-100(Rabbit polyclonal; Novocastra, MA, USA)로 4°C에서 24시간 동안 반응시킨다. PBS 용액으로 2회 세척한 후 2차 항체인 Cy2 conjugated sheep anti-mouse IgG, Cy3 conjugated anti-mouse IgG, Texas Red conjugated anti-rabbit(Jackson Immuno-Research Lab. West Grove, PA)을 실온에서 30분간 반응시켰다. 대조염색으로 세포핵을 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride(DAPI; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO)으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.

**마. 단백질 발현 측정**

한 well 당  $5 \times 10^5$ 개의 지방조직 유래 간질세포가 배양된 6 well plate에서 세포를 분리한 후에 RIPA lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 100 mM,  $\text{NaF}$ , 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% NP-40, 1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin)로 분해시켜 단백질을 얻었다. Bovine serum albumin(BSA; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO)을 표준시료로 사용하였고, Bradford assay(Bio Rad, USA)로 추출한 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질을 Lammlie sample buffer(0.625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)를 넣고 100°C에서 5분간 끓인 후 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동 한 겔을 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF membrane(Bio Rad, USA)에 전이시키고 5% skim milk를 함유한 Tris buffered saline tween 20(TTBS; 20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 0.1% tween 20 pH 7.5)으로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 각각의 일차 항체: NeuN,  $\beta$ -Tubulin III, Vimentin, NSE, Trk-A, N-CAM에 넣어 4°C에서 24시간 반응한 후 TTBS로 3회 세척하였다. 그 이후 HRP-conjugated anti-rabbit or mouse 이차 항체 용액(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)으로 1시간 동안 상온에서 반응하였으며, TTBS로 다시 세척한 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL; Amersham Inc, UK)를 사용하여 발색시켜 X-ray film에 노출하여 현상하였다. 단백질 밴드 강도는 Luminescent image analyzer(LAS-3000; Science Lab)를 이용하여 분석하였다.

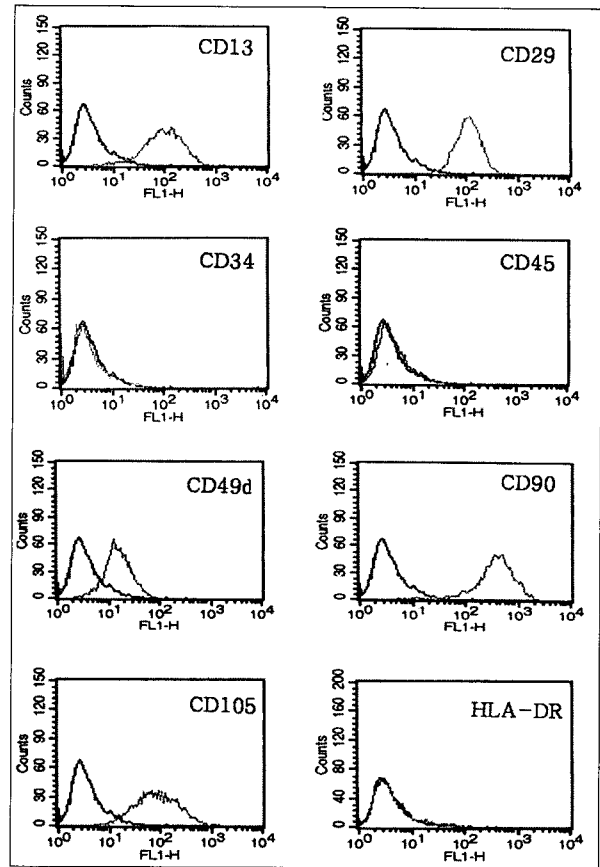
**바. 통계 분석**

모든 통계처리는 SPSS for windows(version 10.0 SPSS Inc.)를 이용하여 처리하였으며 각 측정치는 평균  $\pm$  표준편차로 요약하였다.

**III. 결 과**

**가. 인체 지방조직 유래 간질세포의 특성분석**

미분화상태의 간질세포가 발현하는 세포표면 항원을 Flow Cytometry 분석한 결과 조혈줄기세포의 특징적 항원인 CD34와 과립구 계통의 공통 항원 CD45는 발현하지 않았으며, 간엽성 줄기세포에서 확인되는 항원인 CD13 (90.3  $\pm$  4%), CD29(98.9  $\pm$  0.7%), CD49d(13.6  $\pm$  6%), CD90 (99.4  $\pm$  0.1%), CD105(96  $\pm$  2.8%)의 발현 양성을 보였다 (Fig. 1). 또한 면역반응에 관여하는 HLA class II항원인 HLA-DR은 발현되지 않았다(Fig. 1). 이는 간질세포가 조혈계 표면항원을 발현하지 않는다는 기존의 결과와 일치

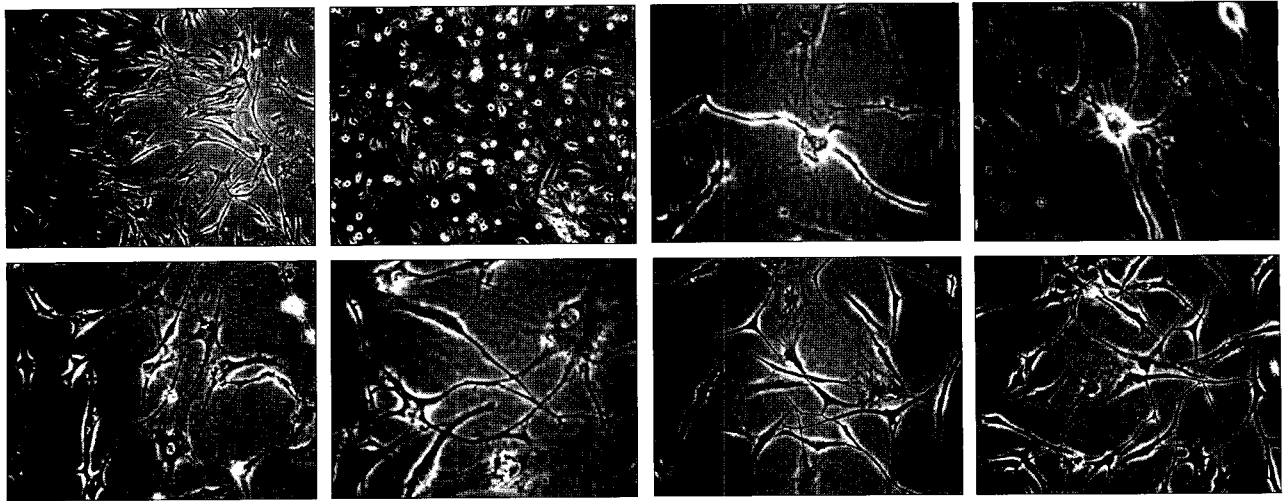


**Fig. 1.** Characterization of the hADSCs. As described under "Experimental Procedures", the hADSCs at passage 4 were subjected to flow cytometry analysis. Undifferentiated hADSCs were stained with monoclonal antibodies directed against CD13, CD29, CD34, CD45, CD49d, CD90, CD105, HLA-DR and coupled to fluorescein isothiocyanate(FITC); these signals are indicated as green lines, An isotype matched monoclonal antibody served as a control; these signals are indicated as black lines. hADSCs are positive for CD13(90.3  $\pm$  4%), CD29(98.9  $\pm$  0.7%), CD49d(13.6  $\pm$  6%), CD90(99.4  $\pm$  0.1%), CD105(96  $\pm$  2.8%) and negative for CD34, CD45, HLA-DR.

하며 세포표면 표식자의 발현에 있어서는 기존 간엽줄기세포의 표면항원 분석결과와 동일하였다.

**나. 신경세포로의 분화**

지방조직 유래 간질세포의 형태는 납작한 방추형 모양의 섬유모세포(fibroblast)와 비슷한 형태를 보인다(Fig. 2A). DMSO/BHA 처리하여 신경세포로의 분화가 유도된 1시간 후, 납작한 모양의 지방조직 유래 간질세포의 세포질이 핵 쪽으로 움츠러들어 수축된 다극성(multipolar) 형태나 양극성(bipolar)의 신경세포 형태로 변화하였고 핵은 빛을 띠었다(Fig. 2B). 분화된 세포는 배양 3시간 후 신경세포와 같이 핵 주위부와 돌기가 뚜렷이 구분되었으며, 가지를 형성하여 핵 주위로부터 뻗어 나와 점점 가늘어졌고



**Fig. 2.** Neuronal induced morphological change in the hADSCs. Morphologic changes following neuronal induction of hADSCs. (A) hADSCs grown under control conditions. hADSCs consisted predominantly of spindle shaped-like fibroblastic cells and a few large, flat cells and higher cell densities( $\times 100$ ). (B) hADSCs after 1hr of culture with neuronal induction media. Cells display cytoskeletal rearrangements to form cells that have phase bright nuclei and extend cellular processes( $\times 100$ ). (C, D) Three hours later, Morphological changes of neuronal differentiation include cytoplasm retraction toward the nucleus and increasingly spherical appearance of cell bodies and extend long thin neuronal-like phenotypes. Cells increasingly display neuronal traits of pyramidal, perikaryal appearances( $\times 400$ ). (E-H) Progressive morphological changes of hADSCs at 1-3 days following neuronal induction include elongated processes appearance of cell bodies( $\times 200$ ). Control Neuronal induction Neuronal induction(no stain).

세포의 핵 주위부는 더욱 둥근 모양을 띠었다(Fig. 2C, D). 점차적으로 돌기들은 다듬어지면서 일차 및 이차의 가지 를 내는 양상을 보였다(Fig. 2E). 또한 이 가지들은 주위의 돌기 가지들과 접촉하는 모습을 나타냈다. 시간이 지남에 따라 신경세포의 형태를 가진 세포들이 증가하였으며 24 시간의 처리가 끝난 후, 초기 방추형 모양의 간질세포 형태를 관찰할 수 없었으며 90% 이상이 신경세포의 형태를 가졌다(Fig. 2E-H).

#### 다. 면역형광염색

DMSO/BHA 처리한 세포의 신경세포로의 분화를 확인 하기 분화 유도 후 고정시켜 신경세포 특이 표현형(marker) 인 NeuN, NSE, N-cam, Trk-A,  $\beta$ -Tubulin III와 신경교세포의 표현형인 S-100, Vimentin으로 면역학적 염색을 수행 하였다. 지방조직 유래 간질세포(대조군)는 NeuN이 발현 되지 않는 반면 신경세포화한 상당수의 세포의 핵 부위에 NeuN이 발현되었다(Fig. 3H). NSE 발현되어 신경세포화 가 확인된 세포의 모양은 단순한 양극성형과 양극성형이 확장된 다극성 형태였다(Fig. 3I). 또한 신경 성장인자 (nerve growth factor)인 Trk-A와(Fig. 3J) 초기 신경교세포의 표현형인 Vimentin(Fig. 3K), S-100(Fig. 3N) 그리고 신경세포 분화의 초기 표식인자로 알려진  $\beta$ -tubulin III이 발현된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3L). 신경세포 부착분자 인 N-CAM(neural cell adhesion molecule) 또한 발현되었

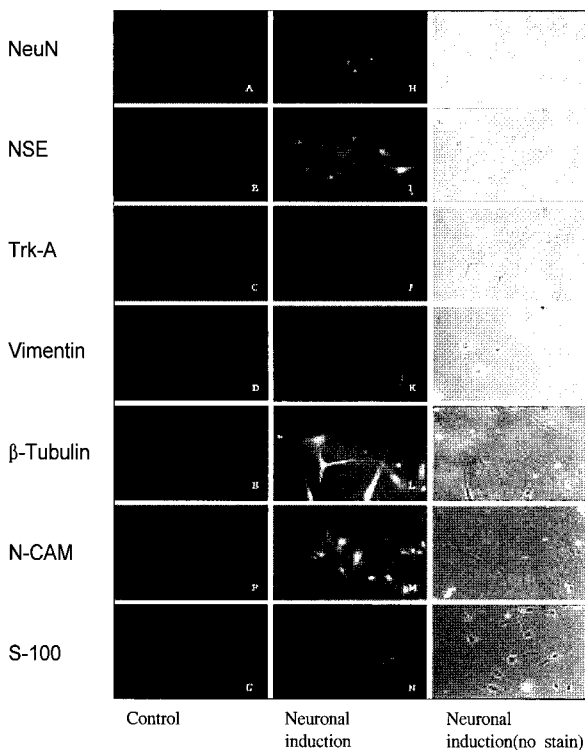
다(Fig. 3M). 광학현미경 관찰하여 신경세포 표현형(phenotype)을 확인하고 형광염색 사진과 비교하여 염색부위를 알 수 있었다(Fig. 3O-U). 대조염색으로서 DAPI 염색 통해 모든 세포의 핵을 확인할 수 있었다(Fig. 3A-G).

#### 라. Western blotting 분석을 통한 신경세포-특이 단백질의 발현

신경분화유도 3일 후에 단백질을 분리하여 시행하였다. 간질세포(대조군)에서는 NSE, NeuN, Vimentin이 미약하게 발현되는 것을 확인할 수 있었고, DMSO/BHA로 신경 세포화한 세포에서는 NSE, NeuN, Vimentin이 대조군에 비해 그 발현량이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 또한 DMSO/BHA 처리한 결과 신경세포-특이 단백질 Trk-A, NCAM,  $\beta$ -Tubulin III의 발현이 확인되었다(Fig. 4).

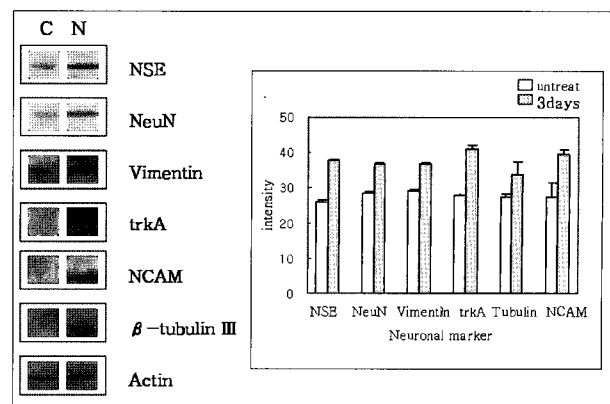
## IV. 고 찰

줄기세포는 자가 증식능력(self-renewal)과 특정한 조직 세포로의 분화능력(tissue-specific cell differentiation)으로 정의된다.<sup>6</sup> 이런 줄기세포는 그 분화가능성에 따라서 전 개체가 분화가능한 줄기세포(totipotent stem cell)와 모든 배엽의 세포로 분화 가능한 줄기세포(multipotent stem cell)로 개념적인 분류를 할 수 있다. 또한 얻을 수 있는 획득원에 따라서 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 신생



**Fig. 3.** Immunocytochemical analysis of neuronal cell marker expression. The hADSCs were kept as a control(A-G) or they were treated with neuronal induction medium(H-N). (H) Intense NeuN expression with staining primarily nuclear; (I) NSE expression with staining cytoplasm; (J) Low level of Trk-A expression with staining cytoplasm; (K) Strong Vimentin expression with staining cytoplasm; (L)  $\beta$ -Tubulin expression with staining cytoplasm; (M) Lack N-CAM expression with staining cytoplasm; (N) Strong S-100 expression with staining cytoplasm and nuclear. hADSCs that exhibited a neuronal-like structure stained positive (O-U). hADSCs with a flattened, spindle-like structure did not( $\times 200$ ).

아줄기세포(neonatal stem cell) 및 성체줄기세포(adult stem cell)로 분류를 할 수 있다. 이 중 성체줄기세포의 경우 피부줄기세포, 조혈줄기세포, 중간엽줄기세포 등이 있으며 또한 다른 조직과는 다르게 재생능력이 거의 없다고 알려진 신경계에서도 신경줄기세포의 존재가 밝혀졌다.<sup>7</sup> 이런 신경줄기세포는 신경원(neurons), 성상세포(astrocytes), 회돌기 아교세포(oligodendrocyte) 등으로 증식 분화할 수 있다는 사실이 밝혀져 신경계질환의 치료에 가장 이상적인 세포로 생각되었지만 신경줄기세포가 해마(hippocampus)의 치상회(dentate gyrus) 및 뇌실주위의 subventricular zone(SVZ) 등 심부에 위치하기 때문에 뇌 손상 없이 채취가 어렵고 또 많은 양의 세포를 얻을 수 없어 세포치료의 가장 이상적인 형태인 자가세포이식이 아직 임상 적용되지 못하고 있다. 그런데 신경줄기세포가 조혈모세포, 골격근세포로 분화되기도 하고 조혈모세포가 신경세



**Fig. 4.** Western blotting analyzed the neuronal marker genes. hADSCs were treated with neuronal induction media for 3 days, and protein expression was analyzed by western blotting. The  $\beta$ -actin bands show equal loading of protein for each sample expression. Lane C represents hADSCs maintained non inductive control media. Lane N represents hADSCs neuronal induction medium. The data represents the mean SD of the staining expression intensity.

포, 심장근육 및 골격근세포, 간세포로 분화되는 등 다양한 교차분화(transdifferentiation)가 확인되어 성체줄기세포의 분화능이 제한되었다는 종래의 관점을 바꾸는 계기가 되었고, 따라서 최근에 성체 골수 유래 줄기세포를 이용하여 다양한 신경계질환의 연구를 하게 되면서 많은 진전을 보이고 있다. 그러나 골수 유래 줄기세포를 임상에서 이용할 때, 줄기세포를 채취할 때의 통증이나 이환(morbidity), 채취된 세포의 수가 적다는 단점이 있어 줄기세포의 다른 원천을 찾게 되었다.

인체 지방조직은 골수와 같이 중배엽 기원세포이면서 쉽게 분리될 수 있는 지지구조(supportive stroma)를 함유하여 또 다른 줄기세포의 원천이 될 수 있고, 지방 추출물 안에 줄기세포로 추정되는 세포들이 있으며, 이를 인체 지방조직 유래 간질세포라 명명하였다.<sup>8</sup> 인체 지방조직에서 분리한 간질세포의 일차배양 시에 조혈세포, 혈관주위세포, 내피세포, 그리고 평활근세포가 다양하게 포함되어 있으나, 계대배양을 하면서 이런 세포들의 수가 빠르게 줄어들게 되고 2-3회 배양을 하면 상피세포와 조혈세포의 항원을 발현하는 세포들은 관찰되지 않기 때문에 본 실험에서는 4번 계대배양을 한 세포를 사용하여 세포 표면 항원 발현 분석을 하였다. 이들 세포는 표면 항원으로 CD13, CD29, CD49d, CD90, CD105가 양성으로 발현되었으며 CD34와 CD45는 발현되지 않았다.<sup>9</sup> 이 중 CD13은 aminopeptidase N으로 호중구, 과립구에서 공통적으로 발현이 되며 CD29는 integrin  $\beta 1$  chain에 작용하는 항원으로 림프구, 내피세포, 상피세포 등 다양한 세포에서 발현한다.<sup>10</sup> 또한 CD90은 Thy-1으로도 불리며 T세포와 신경세포에 많이

발현되어 신호전달체계에 관여하며 CD105는 TGF- $\beta$ 의 수용체로서,<sup>11</sup> 중간엽 줄기세포의 분화에 필수적인 표면항원으로 알려져 있다. 이상의 세포 표면 항원 발현 양상 결과는 문헌에서 보고된 골수 유래 줄기세포와 동일하였으며 이는 간엽성 뿐 아니라 외배엽성인 신경세포로의 분화능력을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.<sup>5</sup> 또한 조혈모세포와 골수성적혈구 전구세포에서 발현되는 CD34와 단핵구에서 발현하는 CD45가 발현되지 않은 것으로 보아 대부분의 세포들이 조혈줄기세포가 아닌 간엽성 줄기세포인 것으로 생각된다. 인체 지방조직 유래 간질세포를 임상에 이용하기 위해 충분한 양의 자가 줄기세포의 획득이 어려운 경우 동종이식이 가능해야 할 것으로 생각된다. 그런데 아직까지 인체 지방조직 유래 간질세포의 면역반응에 대한 기전은 알려지지 않았지만, 여러 문헌에서 골수 유래 줄기세포의 동종간 이식 시에 문제가 되는 면역거부반응에 대해 줄기세포에 면역억제력이 있다는 사실이 밝혀졌다.<sup>12</sup> 골수 유래 줄기세포는 MHC class II와 co-stimulatory molecule B7을 발현하지 않기 때문에 동종 특이적 T 세포의 증식을 유도하지 않아 면역을 유발하지 않는다고 한다.<sup>13</sup> 미분화된 인체 지방조직 유래 간질세포에서 면역반응에 관여하는 HLA class II항원인 HLA-DR이 발현되지 않은 것으로 보아 골수 유래 줄기세포와 유사한 기전으로 면역억제력을 가지고 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 인체 지방조직 유래 간질세포를 신경세포로 분화 유도하여 신경세포와 유사한 형태로 변화됨을 관찰하였으며 신경전구세포나 신경세포로 분화가 제대로 이루어졌는지를 확인하기 위해서 각각의 고유한 세포표면항원이나 특정 발현 물질이 나타나는지를 신경세포에 특이적 항체를 이용한 면역 형광염색을 통해 확인하였다. 분화 유도 후 상당수의 세포의 핵 부위에 NeuN의 발현이 관찰되었고 신경세포로의 분화 마지막 단계에서 주로 이루어지는 NSE가 세포질 부위에서 발현하였다. 신경세포화가 확인된 세포의 모양은 단순한 양극성형과 양극성형이 확장된 다극성 형태였다. 산성단백질로서 발생학적으로 신경외배엽(neuroectoderm)에서 유래한 조직에 분포하며 초기 신경교세포의 표형형인 S-100과 Vimentin 그리고 신경세포 분화의 초기 표식인자로 알려진  $\beta$ -Tubulin III이 발현된 것을 확인할 수 있었다. 신경 성장 인자인 Trk-A와 신경세포 부착 분자인 NCAM 또한 발현되었다. Trk-A는 신경 성장인자에 반응해 신경계(nervous system) 발달에 관여하는 핵심인자로 알려져 있으며 NCAM은 신경조직에서 발견되는 막표면 당단백으로 부착이나 인식과 같은 세포간의 상호작용에 작용한다고 알려져 있으며 신경연접 생성과정에도 관여한다고 알려져 있다. 그리고 면역조직화학염색에서의 결과를 정량화하여 관찰하기 위해서 Western

blotting을 시행하였고 또한 신경세포-특이 단백질의 발현을 확인하였다. NSE는 glycolytic enzyme enolase와 iso-enzyme이며, 이는 신경내분비 세포를 포함한 모든 신경세포에서 발현되고 이것의 발현은 신경세포로의 분화 마지막 단계에 주로 이뤄진다. 그러나 Woodbury 등<sup>4</sup>이 화학적 조성이 다른 배양액을 이용한 신경분화 초기 단계에서의 NSE 발현을 보고하였다. NeuN은 분열 후, 후기분열 시작시에 발현하는 것으로 보고되었다.<sup>14</sup> Trk-A는 4가지 군 중에(Trk-A, Trk-B, Trk-C, Trk-E) 신경세포 성장인자에 가장 친화성을 가지는 항체로, 이는 신경세포 분화 시 초기 신경세포의 자가 인산화를 유도하여 성숙-신경세포에서 표현된다.<sup>15</sup> 또한 Woodbury 등<sup>4</sup>은 신경 분화 초기 단계에서 보다 분화 후 단계에서 발현량이 증가한다고 보고하였다. 이 분화 유도 3일 후에 분석한 결과 발현이 확인되었다. NCAM은 단일 유전자에서 mRNA가 생성될 때 선택적 접합에 의하여 180 kD 이외에 140 kD, 120 kD의 단백질로 만들어질 수 있는데 본 실험결과 NCAM 중 120 kD에 해당되는 단백질이 관찰되었다. 이는 여러 종류의 신경세포가 존재하며 인체 지방조직 유래 간질세포에서 신경분화 유도한 세포는 그 중의 한 종류에 해당하기 때문으로 사료된다. 신경세포-특이 단백질 NSE와 NeuN은 미분화 인체 지방조직 유래 간질세포에서 미약하게 발현되었으나 신경분화유도 된 세포에서의 발현량이 증가한 것은 상당수의 세포가 신경세포화 된 것으로 추정할 수 있다. 주로 세포골격을 이루는 Vimentin은 줄기세포에서 발현하는 중간세포 단백질로 세포 분화 동안 발현된다. 세포분화, 세포증식, 세포사멸 동안 다른 중간세포 단백질에 의해 대체된다. 또한 대부분이 인단백질(phosphoproteins)이고 세포가 분열하는 동안 인산화 작용을 하면서 세사들을 재조직한다. 분화하지 않은 세포군과 비교했을 때 Vimentin이 증가한 것으로 보아 신경 분화 유도 후 세포의 형태변화가 있었음을 알 수 있었다.

본 실험에서는 인체 지방조직 유래 간질세포를 신경 분화 유도하여 신경세포 특이 단백질의 발현을 확인하였다. 그러나 이 세포들이 궁극적으로 성숙한 신경세포 분화할 수 있을지는 확인할 수 없었다. 앞으로 미분화 세포로부터 신경세포를 효과적으로 얻기 위해서는 신경 분화 유도물질을 통한 다양한 배양환경과 성장인자를 조성해야 하며 여러 기본적인 신경세포 단백질 외에 보다 특이적인 단백질들을 파악하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

인체 지방조직 유래 간질세포는 화학적 신경 분화 배지에 의해 신경세포로 증식 및 분화 능력을 가지고 있음을

확인하였고, 미분화 세포로부터 신경세포로의 분화 초기 단계에서 발현되는 여러 기본적인 표지 단백질을 파악하였다. 신경세포의 분화과정을 연구하는데 유용한 정보로 사료되며 분화유도물질을 통한 접근법과 함께 세포분화에 관여하는 유전자의 조절을 통한 접근법이 병행되어야 할 것이다.

## REFERENCES

- Deng YB, Yuan QT, Liu XG, Liu Y, Liu ZG, Zhang C: Functional recovery after rhesus monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal-stem cell-derived neurons. *Chin Med J(Engl)* 118: 1533, 2005
- Lee IW: Stem cells and neurosurgery. *J Korean Neurosurg Soc* 33: 1, 2003
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC Jr, Reagan CR, Lucas PA: Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 202: 137, 1995
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364, 2000
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Copper DR, Sanberg PR: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 164: 247, 2000
- Filip S, Mokry J, English D, Vojacek J: Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy. *Folia Biol(Praha)* 51: 180, 2005
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC Jr, Reagan CR, Lucas PA: Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 202: 137, 1995
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, HedrickMH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211, 2001
- Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS: Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14: 311, 2004
- Mendrick DL, Kelly DM: Temporal expression of VLA-2 and modulation of its ligand specificity by rat glomerular epithelial cells *in vitro*. *Lab Invest* 69: 690, 1993
- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA: Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 185: 98, 2000
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol* 30: 42, 2002
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC: Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75: 389, 2003
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM: NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201, 1992
- Encinas M, Iglesias M, Llecha N, Comella JK: Extracellular-regulated kinases andphosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem* 73: 1409, 1999