

#### <특강 4>

### 생쥐 배아줄기세포로부터 유도된 신경계 세포의 세포생물학적 특성

이 철 상

군산대학교 자연과학대학 과학기술학부

#### 서 론

배아줄기세포로부터 유도된 신경계 세포에 대한 신경생리학적 연구는 배아줄기세포와 이로부터 유도된 세포들을 신경계 질환의 치료세포로 활용할 수 있는 가능성을 열었다. 뿐만 아니라 체외배양 및 유전자 변형이 어려운 신경세포의 특성으로 말미암아 초래된 세포유전학적 연구의 한계도 상당 부분 극복할 수 있게 되었다. 배아줄기세포 유래 신경세포를 이용한 세포유전학적 연구는 신경세포를 이해하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 이들을 치료세포로 활용하기 위해서도 반드시 거쳐야 하는 연구과정이다. 본 연구에서는 생쥐 배아줄기세포, 또는 유전자 변형 배아줄기세포로부터 유도한 신경계 세포의 다양한 세포생리적 특성을 분석하였으며, 이들 세포를 특정 모델 실험동물에 이식하여 치료 효과를 조사하였다.

#### 재료 및 방법

배아줄기세포는 KD3 세포주를 사용하였으며, 체외배양은 FBS(15%), LIF (1000 units/ml)를 포함한 DMEM을 기본배양액으로 사용하였다. embryoid body를 retinoic acid로 4-/4+ 방식 (Bain et al., 1995)에 따라 처리한 후 astrocyte와의 공배양, 또는 단독배양을 통해 신경계 세포로 분화를 유도하였다. 신경계 세포특이적 단백질 마커에 대한 항체를 이용하여 신경계 세포로의 분화를 확인하였으며, 신경계 세포의 분화, 생존, 그리고 사멸에 관련된 여러 신호 수용체 (neurotrophin 수용체, GDNF 계열 리간드 수용체, glutamate 수용체등) 유전자들의 발현을 단백질과 mRNA 수준에서 검증하였다. 이를 바탕으로 실제 이런 수용체들이 신경계 세포로의 분화, 생존, 사멸에 관여하는지를 분석하기 위해 배아줄기세포 유래 신경계 세포들의 신경독성 반응에 대한 생존 능력을 조사하였으며, 동시에 신경독성 반응에 대한 생리적, 약리적 저항성도 검토하였다. 마지막으로 허혈성 뇌신경질환 모델 동물에 배아줄기세포 유래 신경계 세포들의 전구체를 이식하여 이들의 생존성과 치료 효과를 조사함으로써 체외배양에서 확인된 배아줄기세포 유래 신경계 세포들의 질환 모델에서의 생존능력과 기능적 integrity를 검토하였다 (그림 1).

#### 결과 및 고찰

생쥐 배아줄기세포는 embryoid body 형성 직후 신경계 전구체 세포가 나타나기 시작하였으며, 이들은 분화유도 조건에 따라 신경세포, 성상세포(astrocytes), 또는 희돌기세포(oligodendrocytes)등의 신경계 세포로 분화하였다. 특히 이들 중 신경세포는 분화과정에서 NMDA수용체의 발현이 점진적으로 증가하였으며, 수용체 성분별 발현 양상은 이미 알려진 포유동물 발생과정에서의 발현양상과 유사하였다. neurotrophin 수용체들과 GDNF계열 리간드 수용체들의 발현 양상은 그 종류에 따라 분화와 더불어 발현양이 현저히 변화하였으며, 특히 GDNF의 신호전달에 관여하는 Ret, GFRA2와 NT3 신호전달에 주로 관여하는 TrkC의 발현증가가 뚜렷하였다. 이를 바탕으로 배아줄기세포 유래 신경세포의 분화과정에 GDNF 계열, 또는 neurotrophin 계열의 성장인자들이 신경세포로의 분화/생존에 관여하지를 조사해 본 결과, 여러 관련 성장인자 중에서 GDNF와 NT3의 처리가 배아줄기세포의 신

경세포로의 분화/생존에 관여하고 있음을 확인할 수 있었다. 분화과정에서 NMDA 수용체의 발현이 증가함에 따라 줄기세포 유래 신경세포의 NMDA에 대한 세포독성 효과도 병행 증가하였다. 세포자살(apoptosis)반응을 억제하는 Bcl-2 유전자를 과발현하는 유전자 조작 배아줄기세포를 이용하여 세포사멸 반응을 조사하였을 때, Bcl-2 배아줄기세포는 다양한 세포자살 유도약물에 대해 저항성을 보였으며, glutamate 흥분성 독성에 대해서는 NMDA에 대해 선택적인 저항성을 나타내었다. 이상의 체외배양실험을 바탕으로 focal ischemic stroke 동물 모델에 Bcl-2 배아줄기세포 유래 신경계 전구세포를 GDNF 또는 NT3 성장인자와 함께 도입하였을 때, 정상 배아줄기세포에 비해 Bcl-2 배아줄기세포에서 유래한 신경세포의 생존능력이 유의성 있게 높게 나타났으며, 동시에 세포자살에 의한 사멸 세포의 수가 감소하였다. 신경행동학적 검토 결과에서도 배아줄기세포를 이식한 동물에서, 이식하지 않은 대조구 동물에 비해 행동적 결함이 덜한 것으로 나타났으며, 이런 효과는 Bcl-2 배아줄기세포를 이식한 경우에 더욱 뚜렷하였다.

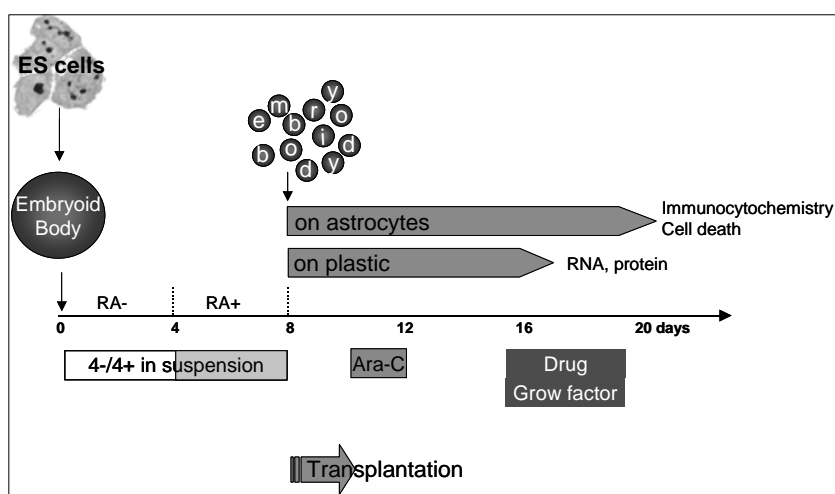


그림 1  
실험과정의 전반적 개요

이상의 연구결과로 배아줄기세포 유래 신경세포의 세포생리적 특성은 조사한 몇몇 경우에서 기존에 알려진 일반 신경세포의 특성과 매우 유사함을 알 수 있었으며, 이는 배아줄기세포 유래 신경세포의 기능적 활용성과 연결될 수 있음을 시사한다. 그러나 배아줄기세포 유래의 신경세포에 대한 다양한 세포생리학적 연구는 여전히 여러 종류의 신경세포들이 혼재하는 상황 속에서 이루어 질 수밖에 없었기에, 이제 보다 선택적인 분화 방법을 활용하여 개별 특정 신경세포에서의 세포생리학적 연구가 면밀히 진행되어야 할 것이다.

### 참고문헌

Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI (1996) *Biochem Biophys Res Commun*, 223: 691-694.  
 Lee CS, Tee LY, Warmke T, Vinjamoori A, Cai A, Fagan AM, Snider BJ (2004) *J Neurochem*, 91: 996-1006.  
 Lee CS, Tee LY, Dusenbery S, Takata T, Golden JP, Pierchala BA, Gottlieb DI, Johnson EM Jr, Choi DW, Snider BJ (2005) *Exp Neurol*, 191: 65-76.  
 Qu Y, Vadivelu S, Choi L, Liu S, Lu A, Lewis B, Girgis R, Lee CS, Snider BJ, Gottlieb DI, McDonald JW (2003) *Exp Neurol*, 184: 326-336.  
 Wei L, Cui L, Snider BJ, Rivkin M, Yu SS, Lee CS, Adams LD, Gottlieb DI, Johnson EM Jr, Yu SP, Choi DW (2005) *Neurobiol Dis*, 19: 183-193.