

## 인체 지방조직에서 유래한 줄기세포의 신경세포 분화능 및 신경재생 유도효과

전영준<sup>1</sup> · 이종원<sup>1</sup> · 최윤석<sup>1</sup> · 김영진<sup>1</sup> · 김성은<sup>1</sup> · 이종인<sup>2</sup> · 한기택<sup>1</sup>

가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 재활의과학교실<sup>2</sup>

### The Effects of Adipose Derived Stem Cells on Neurogenic Differentiation and Induction of Nerve Regeneration

Young Joon Jun, M.D.<sup>1</sup>, Jong Won Rhie, M.D.<sup>1</sup>,  
Yun Seok Choi, M.D.<sup>1</sup>, Young Jin Kim, M.D.<sup>1</sup>,  
Sung Eun Kim, B.S.<sup>1</sup>, Jong In Lee, M.D.<sup>2</sup>,  
Ki Taik Han, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery,

<sup>2</sup>Rehabilitation Medicine, The Catholic University of Korea,  
College of Medicine, Seoul, Korea

Using adipose derived stem cells(ASCs), neurogenic differentiation was induced in a mono layered culture medium containing neuronal induction agents. Cells differentiated to the neuronal cells were observed with a inverted microscope and immunofluorescent study.

We made a 15 mm long defect in the sciatic nerve of 14 rats and connected a silicone tube to the defect. Then, we mixed neuronal progenitor cells differentiated from ASCs with collagen gel and grafted them to a group of rats(experimental group) and grafted only collagen gel into another group(control group). In 4 and 8 weeks after the graft, histological observation was made. According to the result, the number and diameter of myelinated axons were significantly increased in the experimental group. In addition, the nerve conduction velocity was improved more in the experimental group and neovascularity also increased. Moreover, reaction with S100 and p75 was observed in regenerated nerves in the experimental group, suggesting that the grafted cells were differentiated into supportive cells such as Schwann's cells.

In conclusion, this research proved that ASCs can multiply and differentiate into neuronal cells. If they are grafted into nerve defects, the grafted cells are differ-

entiated into supportive cells such as Schwann's cells and thus contribute to nerve regeneration. Accordingly, the use of adipose tissue obtained easily without the limitation of donor site can be greatly helpful in treating peripheral nerve defects.

**Key Words:** Adipose derived stem cells(ASCs), Neurogenic differentiation, Nerve regeneration

### 1. 서 론

신경결손의 치료를 위해 자가 신경이식이 이용되어 왔지만, 사용할 수 있는 신경의 길이에 제한이 있다. 자가 신경이식으로 치료되기 어려운 심한 신경결손에 비생물학적 물질인 실리콘관(silicone tube) 같은 신경유도관을 이용하여 신경재생을 촉진시키려는 연구가 시도되었지만 결과는 만족스럽지 못했고, 최근에는 비생물학적 물질과 함께 신경원성 단백질(neurogenic protein) 또는 슈반세포(Schwann cell)와 같은 결합세포(combining cell)를 이용하여 신경재생력을 향상시켜 신경결손을 치료하려는 많은 시도가 다양하게 이루어지고 있다.<sup>1</sup>

1989년에 태아 쥐(fetal rat)의 중추 신경계에 다양한 분화 능력이 있는 세포의 존재가 발견되었으며,<sup>2</sup> 1994년에는 자기 복제 능력을 가진 줄기세포(stem cell)들이 중추신경계에 존재한다고 보고되었다.<sup>3</sup> 이러한 줄기세포들은 다양한 세포로 분화하는 능력을 가지고 있으며, 신경계열의 신경세포뿐만 아니라 성상교세포, 희돌기교세포 등의 신경지지 세포들로 다양하게 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이러한 줄기세포들은 쥐의 뇌실주위, 해마상 용기, 척수 안에 존재하고 있으며, 파킨슨씨병,<sup>4</sup> 척수 손상,<sup>5</sup> 뇌졸중,<sup>6</sup> 다발성 경화증 등<sup>7</sup>과 같은 질환의 치료에 실험적으로 이용되고 있다.

또한 이러한 줄기세포들은 지방조직에도 풍부하게 존재하며, 이러한 지방조직에서 유래한 줄기세포들(adipose derived stem cells: ASCs)도 신경세포로의 분화가 가능함이 보고되었다.<sup>8</sup> 지금까지 중추신경계의 기간세포들을 이용하여 신경재생을 촉진시키려는 연구가 보고되었지만,<sup>9</sup> 본 실험에서와 같이 지방조직에서 쉽게 얻을 수 있는 지

Received November 25, 2005

Revised December 29, 2005

**Address Correspondence:** Ki Taik Han, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kang-Nam St. Mary's Hospital, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-040, Korea. Tel: 02) 590-1350 / Fax: 02) 594-7230 / E-mail: kthan@catholic.ac.kr

\* 본 논문은 호산병원 성형외과 조해석 원장님의 2004년 학술연구비에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

방유래 줄기세포(ASCs)를 이용하여 신경세포의 재생을 연구한 보고는 없었다. 이에 저자들은 성형외과 영역에서 지방흡입을 통해 얻은 지방 추출물에서 줄기세포(ASCs)를 분리하여 신경세포로 분화시키고, 백서의 좌골 신경에 15 mm 결손을 만들어 실리콘관으로 대체한 후, 그 안에 분화된 신경 기간세포(neuronal progenitor cell)를 주입시켜 생체(*in vivo*)에서 신경 재생에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 재료

#### 1) 지방조직의 채취

실험에 사용된 지방 추출물은 수술 중 환자로 부터 채취한 약 10 g의 정상 지방조직을 1% 항세균-항진균제(antibiotic-antimycotic; Gibco BRL, Grand Island, NY)가 포함된 phosphate buffered saline(PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 3회 세척한 후 무균상태에서 직경 약 1 mm 정도로 잘게 잘랐다.

#### 2) 실험동물

몸무게 250 - 270 g의 생후 7주된 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat; Biogm Co., Seoul, Korea) 14마리를 사료 및 생활 조건이 일정하도록 1주일간 사육한 후 실험에 사용하였다.

### 나. 실험방법

#### 1) 지방유래 줄기세포의 분리과 배양

인체에서 추출한 지방조직을 PBS(phosphate-buffer saline)로 깨끗이 씻어내어 불순물과 적혈구세포를 제거하였다. 세척한 추출물(aspirate)을 PBS, 0.075% 콜라겐 분해효소(collagenase type I; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 혼합하여 30분간 37°C에서 가볍게 흔들어 주었다. 동량의 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL, Grand Island, NY)과 10% 우태혈청(fetal bovine serum(FBS); Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 콜라겐 분해효소 작용을 정지시키고, 10분간 250 g에서 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 침전 세포층(cellular pellet)을 DMEM/10%FBS에 재부유 후, 100  $\mu$ m mesh filter에 통과시켜 불순물을 제거하고  $10^3$  -  $10^4$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 배양 플라스크에 배양하였다. 세포의 배양액은 DMEM에 20%의 우태혈청과 항생제(10 U/ml 페니실린 G 소듐염과 10  $\mu$ g/ml 암포테리신 B)를 사용하였다. 초기 24 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 후, 3일에 한 번씩 새로운 배양액을 교환하여 주었으며 약 80% 이상의 세

포 포화상태(confluence)에 이르면, 0.25% trypsin-EDTA (Gibco BRL, Grand Island, NY)로 세포를 분리한 후 계대 배양하였다. 여섯번째 계대배양에는 항생제를 첨가하지 않은 DMEM에 20% 우태혈청이 첨가된 배양액을 사용하였다.

#### 2) 신경세포로의 분화 유도

신경 세포로 분화하기 위한 전처리로 배양액을 20 ml DMEM에 1 mM의 BME( $\beta$ -mercapto-ethanol; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 20% 우태혈청을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 신경세포로 유도하기 위해 다시 20 ml DMEM에 우태혈청을 제거한 10 mM의 BME가 첨가된 배양액으로 교체하여 2시간 동안 처리한 후, 신경세포의 표현형을 지속적으로 유지하기 위하여 2% 디메틸설폭사이드(DMSO; Sigma Chem. Co.)와 200  $\mu$ M 뷰틸레이트하이드로 애니솔(BHA; Sigma Chem. Co.)이 함유된 20 ml DMEM 배양액으로 배양하였으며 4일에 한번씩 새로운 배양액으로 교체하였다.

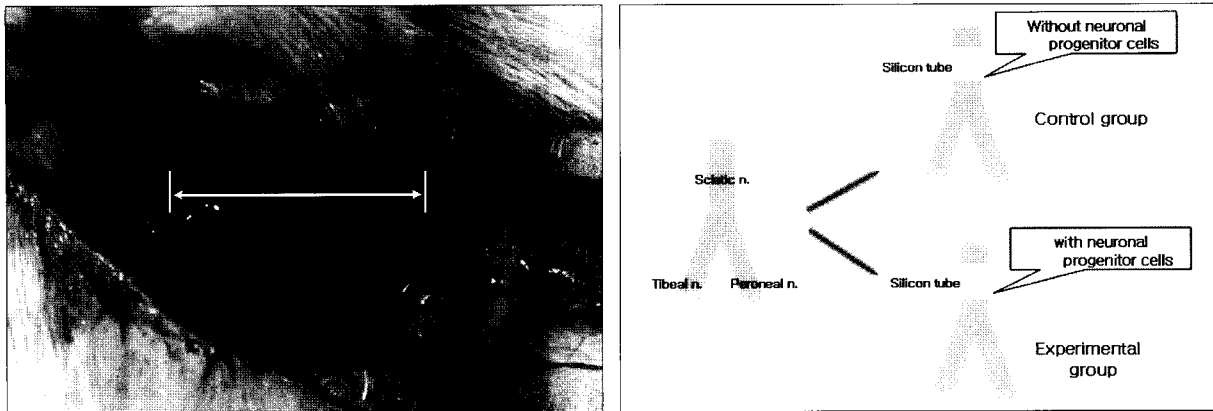
#### 3) 면역형광법을 이용한 지방유래 줄기세포의 분화 관찰

지방유래 줄기세포의 배양액 및 시간에 따른 세포의 형태를 역상 현미경으로 관찰하였고, 분화된 세포로 정착된 슬라이드를 99% 에탄올로 고정시킨 후, 세포내의 퍼록시다아제를 제거하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 5분간 처리하였다. 신경세포에서 특이적으로 발현하는 단백질인 NeuN(neuronal nuclei; Chemicon Int., San Diego, CA)과 신경교세포에 발현하는 단백질인 S100(Dako, Glostrup, Denmark)과 p75(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1차 항체를 상온에서 2시간 동안 처리하였다. 2차 항체인 Cy3-antimouse antibody를 20분간 처리하고 발색제(Rhodamine & GFP; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 떨어뜨린 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

#### 4) 분화된 신경 기간세포의 생체 내 이식

배양 후 12일째의 신경 기간세포들이 이식에 이용되었다. 이식 48시간 전에 10  $\mu$ M BrdU(Bromo-deoxyuridine; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 첨가하여 표지하였으며, 배양된 세포를 콜라겐 겔 배지 0.04 ml에  $4 \times 10^4$  개의 세포가 포함되도록 반복적으로 씻어 균등하게 부유시킨 후 0.8 mm의 내경과 17 mm의 길이를 가진 실리콘 관안에 micropipette을 이용하여 주입하였다.

백서에 Ketamine 100 mg/kg와 Xylazine 10 mg/kg을 복강에 주입하여 마취시키고, 복와위로 사지 및 꼬리를 고정 한 후, 둔부와 대퇴부에 면도를 시행하였다. 둔부와 대퇴부 근육이 다치지 않도록 조심스럽게 절개를 가하여 박



**Fig. 1.** (Left) 15 mm sciatic nerve defect(white arrows) was bridged with a silicone tube. Both the proximal and distal stump of the nerve were inserted 1.0 mm into tube. (Right) Schematic diagram of control and experimental group.

리하고, 양측 좌골신경(sciatic nerve)을 노출시켜 15 mm의 신경결손을 만들었다. 실리콘 관으로 신경결손 부위를 대체한 후, 좌골 신경의 근위부 및 원위부 말단에 실리콘 관이 1 mm씩 끼워지게 한 후, 9-0 nylon으로 2군데 봉합하였다(Fig. 1).

- a. 대조군 (control group; without neuronal progenitor cells): 한측 신경결손 부위를 대체한 실리콘 관 안에 0.04 ml의 콜라겐 겔단을 주입하였다.
- b. 실험군(experimental group; with neuronal progenitor cells): 반대측 신경결손 부위를 대체한 실리콘 관 안에  $4 \times 10^4$ 개의 신경 기간세포들이 포함된 0.04 ml의 콜라겐 겔을 관 안에 주입하였다.

5) 생체 내 신경 기간세포 이식 후 조직 재생의 평가

이식 후 4주(4마리)와 8주(10마리)에 백서의 복강에 Ketamine 100 mg/kg을 주사하여 마취한 후, 복외위로 사지 및 꼬리를 고정시키고 둔부와 대퇴부에 면도를 시행하였다. 좌골 신경과 실리콘 관을 조심스럽게 박리하여 노출시켰다.

a. 조직학적 관찰

이식 후 4주(4마리)와 8주(10마리)에 실리콘 관 안에 형성된 조직을 2.5% glutaraldehyde에 고정시킨 후, Sorenson's phosphate buffer(pH 7.4)로 씻어낸 후 alcohol의 농도를 증가시키며 조직을 탈수시켰다. Propylene oxide로 조직을 씻어내고 파라핀으로 고정하였다. 초박편 절단기를 이용하여 재생된 조직의 중심부에서 2 μm의 두께로 조직을 자른 후, toluidine blue와 hematoxyline-eosin(H&E) 염색을 하여, 각 조직당 광학 현미경으로 400배의 배율에서 4개의 필드(field)를 선택하여 말미집 측삭의 수와 1,000배의 배율에서 5개의 필드를 선택하여 말미집 측삭의 지름

을 측정하여 각각 평균을 비교하였고, 말미집 측삭의 형태도 관찰하였다.

b. 면역 조직 화학적 검사

이식 후 8주에 실험군에서 자른 조직의 일부를 파라핀에 끼워 넣은 후, 미세 절편(microscopic sections)을 99% 에탄올로 고정시킨 후, 세포내의 퍼록시디아제를 제거하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 5분간 처리하였다. BrdU, S100, p75에 대한 1차 항체를 상온에서 2시간 동안 처리하였다. 2차 항체인 Cy3-antimouse antibody와 Cy3-antirabbit antibody를 20분간 처리하고 발색제(Rhodamine & GFP; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 떨어뜨린 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

c. 근전도(electromyography) 검사

기능적 검사를 위해 이식 후 8주에 좌골 신경의 기능적 전기 전달을 측정하기 위해 근전도 검사(Meldec Synergy, Oxford Ins., UK)를 시행하여 비복근(gastrocnemius muscle)으로의 신경 전달 속도를 비교하였다. 전기 자극은 실리콘 관의 근위부와 원위부의 신경분절에 하였고, 활동 기록전극(active recording electrode)은 비복근에, 대조전극(reference electrode)은 아킬레스건(Achilles tendon)에, 접지전극(ground electrode)은 대퇴부의 피하에 삽입하였다. Sweep은 10 ms, gain은 200 μV로 하여 측정 비교하였다.

6) 통계학적 처리

결과를 비교함에 있어, 개체간의 bias를 줄이고 한 개체 안에서 각각을 비교하기 위해 통계학적으로 SPSS for windows<sup>®</sup>(version 10.0 SPSS Inc.)를 이용하여 paired t-test를 시행하였다.

### III. 결 과

#### 가. 지방유래 줄기세포의 분화

##### 1) 배양액 및 시간에 따른 세포의 형태 변화

지방유래 줄기세포의 형태는 납작한 모양이었으며(Fig. 2, Left), BME 처리하여 신경세포로의 분화가 유도된 1시간 후, 납작한 모양의 지방유래 줄기세포의 세포질이 핵 쪽으로 움츠러들어 수축된 다극성(multipolar) 형태나 양극성(bipolar)의 신경세포 형태로 변화하였다. 분화된 세포는 배양 2시간 후 신경세포와 같이 핵 주위부와 돌기가 뚜렷이 구분되었으며 돌기는 가지형성을 하며 핵 주위로부터 뻗어나와 전형적인 신경세포 형태로 분화하였다(Fig. 2, Right).

장기간 신경세포 분화를 유지하기 위해 DMSO/BHA 내에서 배양하면, BME 처리를 한 경우와 마찬가지로 배양 1시간 후 세포질이 핵을 중심으로 움츠러들어 모이는 형태로 변화되며 신경세포의 형태를 이루었다(Fig. 3, Left). 배양 2시간 후 세포의 돌기는 점점 가늘어졌고 세포의 핵 주위 부는 더욱 둥근 모양을 띄었다. 시간이 지남에 따라

신경세포의 형태를 가진 세포들이 증가하였으며 24시간의 처리가 끝난 후, 초기 납작한 모양의 줄기세포 형태를 전혀 관찰할 수 없었으며 90% 이상이 신경세포의 형태를 가졌다(Fig. 3, Right).

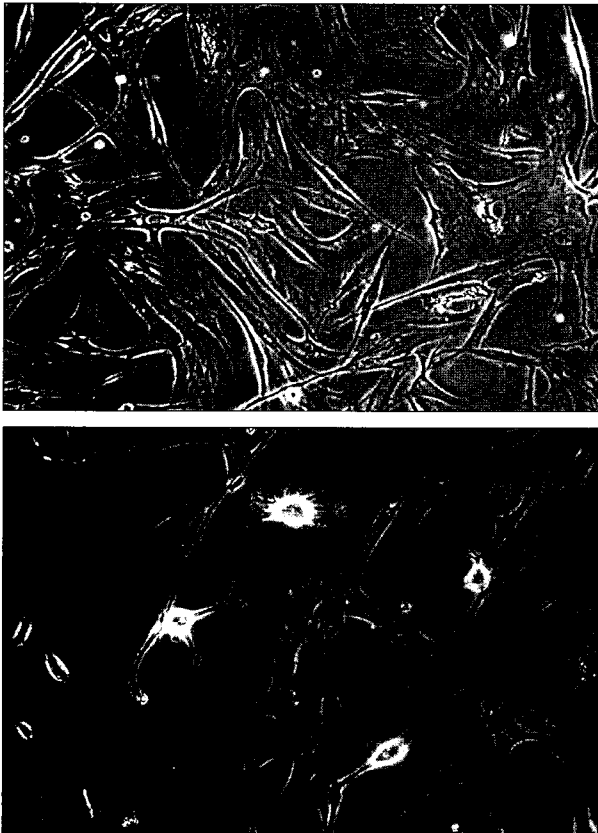
##### 2) 면역형광 검사

신경세포 표현형인 NeuN과 신경교세포 표현형인 S100, p75를 면역세포 화학적 염색을 수행한 결과, 지방유래 줄기세포는 NeuN에 발현되지 않는 반면, DMSO/BHA로 신경세포화 한 세포의 상당수가 NeuN에 발현되어 신경세포로 분화되었다(Fig. 4, Left). 또한 이들 세포 중 일부가 S100(Fig. 4, Center)과 p75(Fig. 4, Right)에 발현되어 성상교세포, 희돌기교세포, 슈반씨 세포와 같은 지지세포로도 분화되었다.

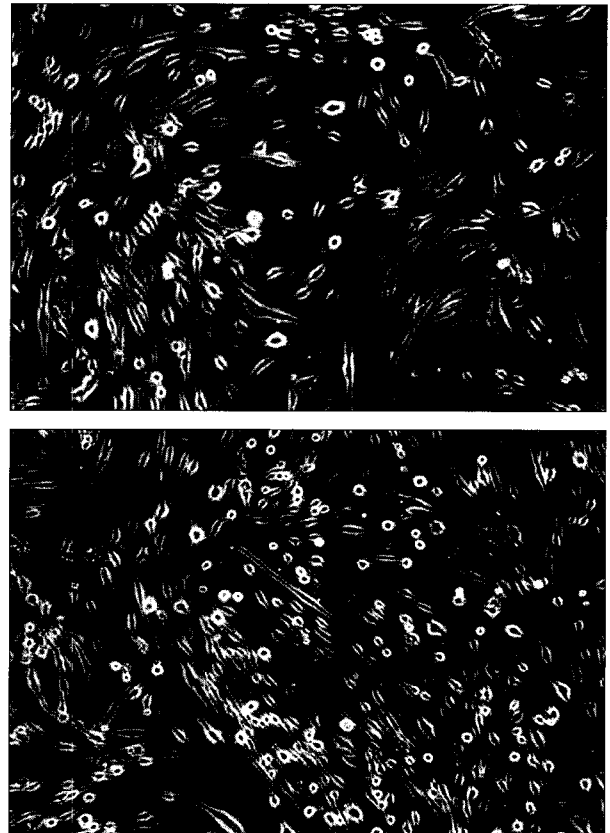
#### 나. 생체내 신경 기간세포 이식 후 재생된 조직

##### 1) 조직학적 소견

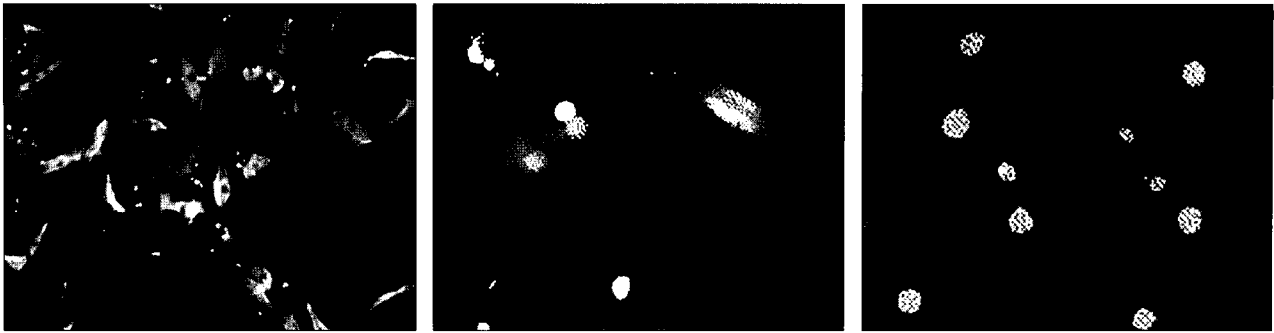
콜라겐 겔만을 이식한 대조군에서는 신경 재생이 이식



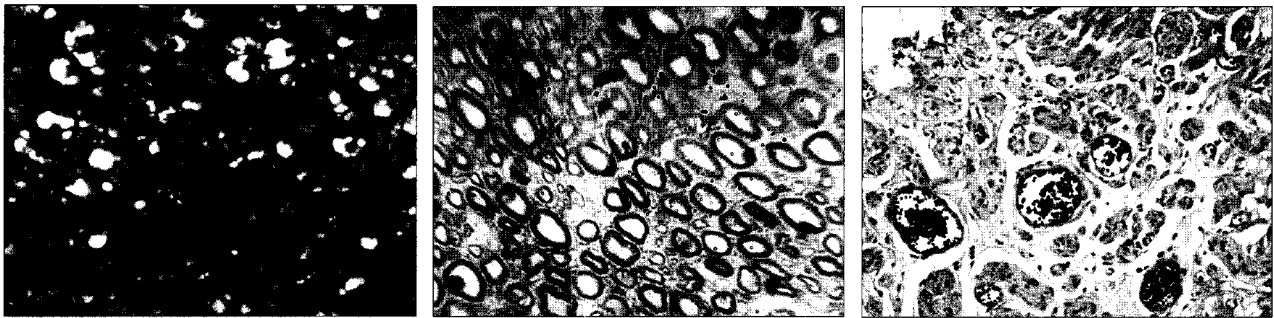
**Fig. 2.** Inverted microscopic findings of neurogenic differentiation of adipose derived stem cells by BME treatment; Flat ASCs were shown at first, retraction of cell body and process elaboration is evident with increasing time. (Above) ASCs, (Below) After 2 hrs treatment. (× 200 magnification)



**Fig. 3.** Inverted microscopic findings of neurogenic differentiation of adipose derived stem cells by DMSO + BHA treatment; ASCs preserving the shape of neuron proliferate with increasing time. (Above) after 1 hr, (Below) after 24 hrs treatment. (× 100 magnification)



**Fig. 4.** Immunofluorescent staining of neurogenic differentiated adipose derived stem cells by DMSO + BHA treatment; (Left) NeuN, (Center) S100 (Right) p75 expression. ( $\times 200$  magnifications)



**Fig. 5.** (Left) Regenerated tissue 8 weeks after grafting of collagen gel not containing neuronal progenitor cells. Although myelinated fibers were noted, they were few and small diameter. (Center & Right) Regenerated nerve 8 weeks after grafting of neuronal progenitor cells embedded in collagen gel. Myelinated cells with a large diameter were observed in a sufficient number. Many fibers had a thick myelin sheath. Angiogenesis was remarkable around the nerve fibers. (Left & Center) Toluidine blue stain,  $\times 1000$ , (Right) Hematoxylin & eosin stain,  $\times 400$ .

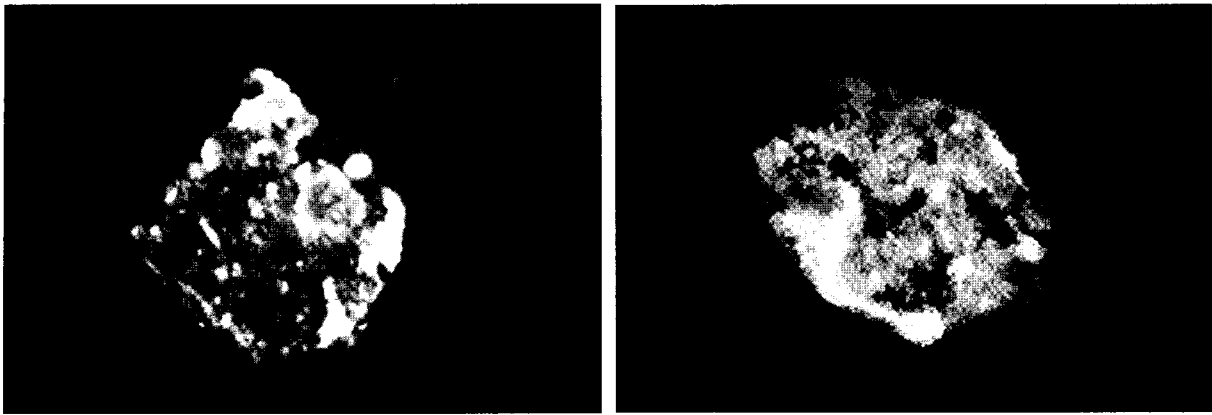
후 4주에서는 관찰되지 않았고, 이식 후 8주에서 10마리 중 2마리에서만 관찰되었으며, 나머지 8마리에서는 실리 콘 관안에 노란색의 조직액만 차있었고 재생된 조직은 없었다. 신경기간세포들을 이식한 실험군에서는 이식 후 4주에 4마리 중 3마리에서 신경 재생이 일어났으며, 이식 후 8주에 10마리 모두 신경 재생이 일어났다. 대조군에서는 반흔 조직 안에 약간의 말이집 축삭이 관찰되었으나(Fig. 5, Left) 실험군에서는 많은 말이집 축삭이 관찰되었고(Fig. 5, Center), H&E 염색에서 재생된 신경 안에 혈관신생(angiogenesis)이 관찰되었다(Fig. 5, Right). 이식 4주 후 실험군에서는 말이집 축삭의 수가 400배의 배율에서 필드당 평균  $502 \pm 114$ 개였고, 이식 8주 후에는 대조군과 실험군에서 각각  $109 \pm 42$ 개,  $776 \pm 90$ 개로 실험군에서의 말이집 축삭의 수가 증가되어 있었고( $p < 0.01$ ), 이식 4주 후 실험군에서 말이집 축삭의 지름은 1,000배의 배율에서 평균  $2.95 \pm 1.79 \mu\text{m}$ 였고, 이식 8주 후에는 대조군과 실험군에서 각각  $1.44 \pm 0.34 \mu\text{m}$ ,  $5.25 \pm 0.94 \mu\text{m}$ 로 실험군에서 지름이 더 큼을 보여주었다( $p < 0.01$ )(Table I).

## 2) 면역 조직 화학적 검사

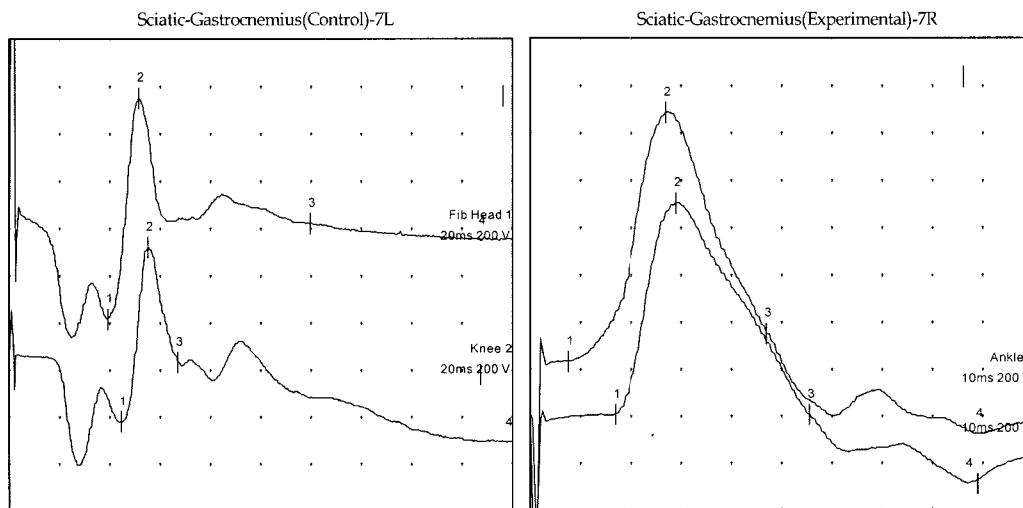
thymidine의 동족체인 BrdU로 표지된 실험군에서 재생된 조직을 anti-BrdU antibody로 면역조직 화학적 염색을 하고 현광 현미경하에서 관찰할 때, 신경섬유 주위의 많은 세포들이 반응하였으며 이는 신경 기간세포들의 생존과 분화를 의미하였다. 더욱이 이들 중 S100, p75와 반응하는 세포들이 관찰되었으며, 이는 이식된 신경 기간세포들의 일부가 슈반씨 세포와 같은 지지세포로 분화되었음을 의미하였다(Fig. 6).

## 3) 근전도(electromyography)

좌골 신경의 신경전달 속도는 재생된 큰 말이집 축삭의 수를 반영하는 것으로, 이식 8주 후 신경전달 속도가 대조군에서는  $22.450 \pm 5.016 \text{ m/s}$ 였고, 신경 기간세포들을 이식한 실험군에서는  $45.511 \pm 5.083 \text{ m/s}$ 로 실험군이 대조군에 비해 신경전달 속도가 증가되어 있었다( $p < 0.01$ )(Fig. 7)(Table I).



**Fig. 6.** Double immunohistochemical staining of regenerated tissue using anti-BrdU antibody and (Left) anti-S100 antibody and (Right) anti-p75 antibody. Both BrdU-antibody-positive(green) and S100 or p75-antibody-positive(red) cells were noted, and the grafted neuronal progenitor cells are considered to have differentiated into Schwann cell-like supportive cells.



**Fig. 7.** Electromyography 8 weeks after grafting between without and with neuronal progenitor cells. (Left) In the tube filled with collagen gel alone, no nerve action potential(NAP) could be recorded on the distal side on electric stimulation of proximal side or decreased nerve conduction velocity was shown. (Right) In the tube filled with neuronal progenitor, clear nerve action potentials(NAPs) could be recorded.

**Table I.** Comparison of Nerve Regeneration

	Without NPCs (Control)		With NPCs (Experimental)	
	4 weeks	8 weeks	4 weeks	8 weeks
Regenerated nerve	0/4	2/10	3/4	10/10
No. of myelinated fibers	-	109 ± 42	502 ± 114	776 ± 90*
Diameter of myelinated fibers(μm)	-	1.44 ± 0.34	2.95 ± 1.79	5.25 ± 0.94*
Nerve conduction velocity(m/s)	-	22.450 ± 5.016	-	45.511 ± 5.083*

Comparison of regenerated nerve, number of myelinated fibers, diameter of myelinated fibers between with and without neuronal progenitor cells.

Significant promotion of regeneration of myelinated fibers was observed 8 weeks after neuronal progenitor cell grafting compared with grafting of collagen gel alone(control).

\*p<0.01. NPC means neuronal progenitor cell.

#### IV. 고 찰

말초신경결손에 자가 신경이식이 이용되어 왔지만, 사용할 수 있는 신경의 길이에는 제한이 있다. 자가 신경 이식으로 치료될 수 없는 큰 신경결손에는 실리콘 관과 같은 비생물학적 물질을 이용한 신경재생이 실험적으로 시도되고 있지만, 신경원성 단백질(neurogenic protein)이 함유되지 않은 관계로 재생될 수 있는 신경의 길이에는 제한이 있다. 그리하여 신경분화 인자인 라미닌(laminin)으로 도포된 관이나 polyglycolic acid관을 이용한 방법도 고안되었으며, 슈반씨 세포를 배양하여 신경 재생력을 향상시켜 신경결손을 치유하려는 방법들도 연구되고 있다.<sup>1</sup>

말초신경이 절단되면 신경조직은 특이한 과정을 거쳐 재생을 하게 된다. 절단 부위의 근위부 축삭은 절단 직후에는 위축되지만 수일 후에는 자라기 시작하면서 말단 부위에는 성장 원추(growth cone)가 형성되어 사방으로 성장해 나간다. 일단 어느 하나의 성장 원추가 적절한 위치에 도달하게 되면 다른 성장 원추는 제거되고 도달에 성공한 축삭만 계속 목표 조직으로 향하게 된다. 이러한 신경 재생에 결정적인 역할을 하는 슈반씨 세포는 말초신경계에 존재하면서 오직 한 개의 축삭만을 둘러싸고 있으며, 최근 들어 가장 활발하게 연구되고 있는 세포이다. 신경 재생에 관여하는 슈반씨 세포의 역할은 라미닌, IV형 콜라겐 등 신경축삭의 성장을 촉진시키는 역할을 하는 basal lamina를 분비하고, 신경 성장인자(nerve growth factor)를 포함하는 여러 종류의 신경 영양 인자들을 분비하며, 신경 성장인자 수용체를 표현시킨다. Bunge 등<sup>10</sup>은 위와 같은 기능을 가진 슈반씨 세포를 배양하여 신경 유도관에 넣고 신경 재생을 유도한 동물실험에서 우수한 재생 효과를 보고하였다. 인체에 적용할 경우 인체 기능에 큰 문제를 초래하지 않고도 슈반씨 세포를 채할 수 있는 말초신경이 산재해 있으므로 기능상으로 중요한 말초신경의 손상 시 자가 슈반세포를 이용한 신경 유도관의 사용 가능성도 제시되었다. 그리하여, 이들 슈반씨 세포들은 조직공학에 이용한 신경 재생의 유도에 많이 이용되고 있으나, 이식하기 위한 공여 세포의 관점에서 볼 때 많은 양의 슈반씨 세포를 추출하기가 어렵고, 증식 및 장기간 보존하기가 어려웠다. 반면, 신경 기간세포(neuronal progenitor cell)들은 증식 능력도 있으면서 오랜 기간 보존될 수 있고, 줄기 세포를 분화시켜 얻을 수 있다.

Pamela 등<sup>11</sup>은 태아의 척수조직이 손상된 척수의 재생에 보조적 역할을 한다고 보고하였다. 배아로부터 추출한 조직이나 세포들이 손상된 조직 특히 신경과 같은 조직을 재생시킬 수 있는 것은 사실이지만, 신경 재생을 촉진시키는 적절한 배아조직이나 세포에 관해 확실한 결론이 난 것

은 없다. 하지만, 지금까지의 많은 연구들이 신경 손상이나 신경질환에 신경 기간세포들을 이식하여 신경조직을 만드는데 매우 효과가 있음을 보고하고 있다. 그러므로 이러한 신경 기간세포들이 신경 재생의 공여 세포로서 가장 적절하다고 생각된다. 배아의 경우 이러한 세포들이 대뇌 피질, 해마상 응기, 소뇌, 기저 전뇌, 척수에 존재한다고 알려졌으며, 이들 간의 차이에 대해서는 알려지지 않았지만, 이들이 신경 재생의 공여 세포로 가장 적절하리라고 생각된다.

골수유래 줄기세포를 임상에서 이용할 때, 줄기세포를 채취할 때의 통증이나 이환(morbidity), 채취된 세포의 수가 적다는 단점이 있어 많은 연구자들이 줄기세포의 다른 원천을 찾게 되었다. 지방조직은 골수와 같이 간엽에서 유래하였고, 쉽게 분리되는 지지구조(supportive stroma)를 함유하여 또다른 줄기세포의 원천이 될 수 있고, Zuk 등<sup>8</sup>은 지방 추출물안에 줄기세포로 추정되는 세포들이 있으며, 이를 지방유래 줄기세포(ASCs)라 명명하였다. 이 세포들은 지방조직에서 추출하여 분리할 수 있고, 배양시 안정적인 성장과 증식을 보여주었다. 한편, 이들 세포들은 골수 유래 줄기세포와 같이 다양한 세포로 분화가 가능함을 보였고, 신경세포로의 분화도 가능함을 제시하였다. 저자는 지방 흡입으로 성형외과 영역에서 쉽게 얻을 수 있는 지방조직에서 줄기세포를 추출하여 신경세포로의 분화에 필요한 배양액 내에서 신경세포로 분화되었음을 확인하였다.

지금까지 중추신경계의 기간세포들을 이용한 말초신경 및 중추신경 재생의 촉진을 위한 연구가 보고되었지만,<sup>9</sup> 본 실험에서와 같이 지방조직에서 쉽게 얻을 수 있는 지방유래 줄기세포(ASCs)를 이용하여 신경세포의 재생을 연구한 보고는 없었다.

최근 다양한 줄기세포계의 발견으로 이들을 이용한 조직 공학적 연구가 가능해졌으며, 신경줄기세포나 신경 기간세포들을 신경질환에 적용하여, 이들의 분화와 증식에 대한 기전이 점차적으로 밝혀지고 있다. 저자의 연구에서는 세포 분열 시 DNA 합성에 필요한 thymidine의 동족체인 BrdU로 표지된 재생 조직을 anti-BrdU antibody로 면역화학적 염색을 하였을 때, 재생된 신경섬유 주위의 많은 세포들이 반응하는 것을 보여주었고, 이는 콜라겐을 함유하고 있는 배지 안에서 증식과 분화가 유도되었음을 의미하였다. 더욱이 일부 세포들이 S100, p75와 반응함을 보여 신경교세포(gliocyte)로 분화될 수 있는 능력도 가지고 있음을 보여주었다.

Windrem 등<sup>12</sup>은 adult human subcortical white matter에서 추출한 기간세포들이 백서 뇌의 탈수초화(demyelinated)된 병변에서 희돌기교세포(oligodendrocyte)로 분화

함을 보고하였고, Hurelbrink 등<sup>13</sup>은 사람의 선조체(striatum)에 있는 신경세포들을 백서의 중추신경에 이종이식한 결과, 광범위하게 이동(migration)이 일어남을 보고하는 등 신경 줄기세포를 이용한 이종이식에 대해 많은 연구가 보고되어 왔으며, 저자의 실험에서도 이종이식을 이용하였다. 또한 Kang 등<sup>14</sup>은 시험관 내에서 사람 지방조직의 기질세포(stromal cell)들이 쥐 신경세포의 교세포 분화(glia differentiation)를 증가시킴을 보고하였다. Beyth 등<sup>15</sup>은 간엽줄기세포(human mesenchymal stem cell)들이 항원표식세포(antigen-presenting cell)의 성숙(maturation)을 변화시켜 면역에 관계하는 T세포가 반응하지 못하도록 유도한다고 보고하였다.

본 실험에서는 지방조직에서 줄기세포들을 추출하고, 이들을 분화시켜 말초신경에 말이집 축삭을 제공함으로써, 신경 재생의 향상을 보여주었다. 보통 10 mm 이하의 신경 결손은 실리콘 관과 같은 비생물학적 물질을 이용하여서도 신경재생이 이루어지지만, 저자들의 실험에서는 자가 재생이 되지 않는 길이 15 mm의 좌골신경 결손에서도 신경 재생이 향상됨을 관찰하였다. 많은 수의 말이집 축삭과 혈관신생이 신경 기간세포들을 이식한 관안에 형성되어졌고, 이렇게 재생된 신경섬유는 운동신경 전도검사에서 신경의 활동전위(action potential)를 보여주어 신경 전도길(nerve conduction route)이 활동적임을 보여 주었다. 이식된 세포(grafted neuronal progenitor cell)에서 유래된 S100 또는 p75 항체에 반응하는 세포들은 좌골 신경 재생에 중요한 역할을 하는 슈반씨 세포와 같은 지지세포로 생각되며, 이들에 의해 신경 재생이 촉진되었으리라 생각된다. 물론, 슈반씨 세포와 같은 지지세포뿐만 아니라 싸이토카인(cytokine)이나 염증반응 등도 신경 재생을 촉진시킬 수 있고, 본 실험에 이용한 실리콘관이 면역 및 염증반응의 장벽역할을 하였을 수도 있으므로, 신경 재생의 기전을 명확히 하고 이식된 세포의 운명을 규명하기 위해 많은 연구가 필요할 것이다.

## V. 결 론

본 실험의 결과로 인체 지방조직에서 추출한 줄기세포는 신경세포로 증식 및 분화 능력을 가지고 있음을 확인하였고, 신경결손 부위에 이식될 때 이식된 세포가 슈반씨 세포와 같은 지지세포로 분화하여 신경 재생력 향상에 기여하였다. 따라서 신경결손 시 공여부의 제한 없이 손쉽게 얻을 수 있는 지방조직을 이용하여 신경 재생력을 향상시킴으로서 말초 신경결손의 치료에 많은 도움이 되리라 사료된다.

## REFERENCES

- Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP: Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 12: 439, 1996
- Temple S: Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340: 471, 1989
- Davis AA, Temple S: A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372: 263, 1994
- Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmiol S, Dunnett SB: Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of parkinson's disease. *Exp Neurol* 148: 135, 1997
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5: 1410, 1999
- Park KI: Transplantation of neural stem cells: cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *Yonsei Med J* 41: 825, 2000
- Hintzen RQ: Stem cell transplantation in multiple sclerosis; multiple choices and multiple challenges. *Mult Scler* 8: 155, 2002
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279, 2002
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M: Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res* 974: 17, 2003
- Bunge MB, Bunge RP, Kleitman N, Dean AC: Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev Neurosci* 11: 348, 1989
- Diener PS, Bregman BS: Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 18: 763, 1998
- Windrem MS, Roy NS, Wang J, Nunes M, Benraiss A, Goodman R, McKhann GM 2nd, Goldman SA: Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes within demyelinated lesions of the rat brain. *J Neurosci Res* 69: 966, 2002
- Hurelbrink CB, Armstrong RJ, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA: Neural cells from primary human striatal xenografts migrate extensively in the adult rat CNS. *Eur J Neurosci* 15: 1255, 2002
- Kang SK, Jun ES, Bae YC, Jung JS: Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells *in vitro*. *Brain Res Dev Brain Res* 145: 141, 2003
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J: Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105: 2214, 2005