발생과 생식 제 12권 제 1호, 1~8 (2008)
Dev. Reprod. Vol. 12, No. 1, 1~8 (2008)

배아줄기세포 유래 신경계세포에서의 세포사멸 연구와 그 응용

이 철 상†

군산대학교 자연과학대학 생물학과

Cell Death Study in Embryonic Stem Cell-derived Neurons and Its Applications

Chul-Sang Lee†

Dept. of Biology, College of Natural Science, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

ABSTRACT : Specific protocols to increase the differentiation of neuronal cells from embryonic stem (ES) cells have been well established, such as retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. For the neuropathological studies, ES-derived neurons (ES neurons) must show normal physiological characteristics related to cell death and survival and should be maintained *in vitro* for a sufficient time to show insults-specific cell death without spontaneous death. When mouse ES cells were plated onto astrocytes monolayer after retinoic acid induction, most ES cells differentiated into neuronal cells, which were confirmed by the presence of specific neuronal markers, and the cultures were viable for at least four weeks. When these cultures were examined for vulnerability to glutamate excitotoxicity, ES neurons were vulnerable to excitotoxic insults mediated by agonist-specific receptors. The vulnerability to excitotoxic death increased with developmental age of ES neurons *in vitro*. Specific receptors for Neurotrophin and GDNF family ligands were present in ES neurons. GDNF and NT-3 could modulate the survival and excitotoxic vulnerability of ES neurons. The vulnerability and resistance to toxic insults, which are essential requirements of model culture systems for neuropathological studies, make ES neurons to a useful model culture system. Especially ES cell are highly amenable to genetic modification unlikely to primary neuronal cells, which will give us a chance to answer more complicated neurophysiological questions. Recently there was an outstanding attempt to explore the cellular toxicity using human ES cells (Schrattenholz & Klemm, 2007) and it suggested that ES cells could be a new model system for neurophysiological studies soon and go further a large-scale screening system for pharmacological compounds in the future.

Key words : ES cells, Neurons, Excitotoxicity, Vulnerability, Survival.

요 약 : 배아줄기세포는 다양한 분화 유도 방법을 통해 신경계세포로 분화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 보다 더 엄격한 선발조건을 적용함으로써 특정 종류의 신경세포만을 확보할 수도 있게 되었다. 세포사멸연구를 포함한 신경생리학적 연구의 대상으로써 중요한 요건은 이렇게 확보한 배아줄기세포 유래의 신경계세포들이 정상적인 신경생리학적 특성을 갖고 있어야 하며, 동시에 그런 신경생리학적 특성이 체외에서 일정기간 동안 이상 자연적인 세포사멸없이 유지되어야 한다는 것이다. 생쥐 배아줄기세포를 retinoic acid로 처리한 후, astrocytes monolayer 위에서 신경계세포로 분화시키면 장기간 생존이 가능한 다수의 신경계세포를 손쉽게 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 면역세포화학적 방법을 통해 신경세포의 생사를 개별세포 수준에서 추적할 수 있다. 배아줄기세포 유래의 신경계세포는 glutamate agonist들에 대해 수용체 특이적 흥분성 신경독성 반응을 보이며, 이 반응은 신경계세포로의 분화가 진행될수록 더욱 뚜렷해지는 양상을 보인다. 신경계세포의 발생분화, 생존에 관여하는 Neurotrophin, GDNF 계열의 신경계 작용 성장인자들의 수용체가 배아줄기세포 유래의 신경계세포에서 발현되고 있으며, 이들에 의해 신경계세포로의 분화과정에서 세포의 생존능 및 신경독성처리에 대한 세포사멸반응이 조절될 수도 있다. 따라서 배아줄기세포 유래의 신경계세포는 신경세포의 생존과 사멸, 그리고 세포손상으로부터의 보호와 같은 신경약리학적 연구를 위한 중요한 특성을 나타내고 있기에 관련 연구를 위한 새로운 연구시스템이 될 수 있는 것이다. 특히 일반적인 신경세포는 유전적 변형이 어려워 다양한 신경약리학적 연구에 많은 제약을 받아왔으나, 이제 유전자 변형 배아줄기세포로부터 얻은 신경세포를 활용하여 연구할 수 있게 됨으로써, 보다 복합적인 신경약리학적 기초연구도 가능하게 되었다. 특히

† 교신저자: 전라북도 군산시 미룡동 68, 국립군산대학교 자연과학대학 생물학과, (우) 573-701, (전) +82-63-469-4588, (팩) +82-63-463-1560, E-mail: chulsangc@kunsan.ac.kr

최근 인간 배아줄기세포 유래 신경계세포도 유사한 신경독성 반응을 보이고 있음이 확인됨으로써(Schrattenholz & Klemm, 2007), 이제 배아줄기세포는 신경약리학적 기초 연구만이 아닌, 나아가 대량의 약물 스크리닝과 같은 제약산업에도 활용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

서 론

배아줄기세포는 적절한 체외조건에서 배양한다면, 다양한 세포로의 분화능력을 유지한 채, 지속적인 증식이 가능하다. 이처럼 배아줄기세포는 뛰어난 세포분화의 다능성(pluripotency)을 갖고는 있으나, 체외배양을 통해 특정 종류의 세포만을 선택적으로 다량 얻는 것은 최근까지도 어려운 형편이었다. 그러나 배아줄기세포를 이용하려는 여러 연구 분야 중에서도 배아줄기세포를 신경계세포로 분화시키려는 세포분화 연구는 오랜 기간에 걸쳐 깊이 있게 진행되어온 결과, 현재 배아줄기세포로부터 몇몇 종류의 신경계세포로만 분화시킬 수 있는 체외배양 및 분화기법이 상당한 수준으로 발전되어 왔다(Bain et al., 1995; Lee et al., 2000; Perrier et al., 2004). 이처럼 다른 경로로의 세포분화를 억제하고, 선택적으로 신경계세포로 분화시킬 수 있다는 것은 배아줄기세포 유래의 신경계세포를 대상으로 다양한 신경약리학적 연구를 진행할 수 있는 기초를 제공한다.

신경세포의 사멸은 발생중에 미성숙한 신경세포에서도 일어나지만, 문제가 되는 것은 일생동안 가장 오래 살아 있어야 할 성숙한 신경세포도 외적 충격이나 질병상태에서, 특히 퇴행성 뇌질환에서 때로는 급속히, 또 때로는 서서히 죽어간다는 것이다(Yuan & Yankner, 2000). 세포의 사멸은 세포가 죽음에 이르는 동안에 보여주는 세포 형태 변화의 차이에 따라 세포자살(apoptosis)과 세포괴사(necrosis)의 이분법적으로 구분되고 있으나(Wyllie et al., 1980), 중추신경계에서의 세포사멸은 이런 방식의 구분이 실제로 불가능하며, 대게는 세포자살과 흥분성 세포독성(excitotocity)에 의한 세포사멸로 구분하는 것이 실제적이다(Olney, 2003). 흥분성 세포독성에 의한 세포사멸은 연구자에 따라 세포괴사(Ferrer et al., 1995; Gwag et al., 1997; Lesort et al., 1997), 또는 세포자살(Filipkowski et al., 1994; Ankarkona et al., 1996), 또 어떤 경우에는 두 가지 형태의 세포사멸 방식이 뒤섞여 있는 것으로 규정하기도 한다(Bonfoco et al., 1995; Portera-Cailliau et al., 1997). 포유동물 중추신경계에서의 흥분성 신경독성을 유도하는 대표적인 신경전달 물질로는 glutamate가 잘 알려져 있다. glutamate는 중추신경계의 신경전달에 필수적인 흥분성 신경전달 물질이지만, 신경세포가 이 신경전달 물질에 과도하게 노출되면 신경세포의 사멸이 초래되는데, 이를 ‘glutamate 신경독성’이라고 하며(Okabe et al., 1996; Wakins & Jane, 2006), 많은 연구를 통해 glutamate의 흥분성 신경독성에 의한 세포사멸 현상이 여러 신경계 질환, 즉 중풍, 간질, 저혈당증 등 급성 신경계 질환을 포함하여, 헌팅턴병, 파킨슨병, 치매 등 만성 퇴행성 뇌질환에서의 신경세포 사멸과정에 깊이 관련되어 있음이 알려지고 있다(Choi, 1992; Lynch & Guttmann, 2002). 신경손상과정에서 나타나는 세포사멸에 관한 세포수준에서의 연구는 주로 신경세포의 primary culture에서 이루어져 왔으나(Choi, 1985; Koh & Choi, 1988), 분열하지 않는 신경세포의 특성으로 인해 유전적 변형이 어렵고, primary culture 준비과정에서의 회복하기 어려운 세포손상이 생기는 등 연구모델로서의 한계점들이 지적되어 왔다.

배아줄기세포는 체외배양과정에서 유전자 변형이 용이할 뿐만 아니라, 배아줄기세포로부터 분화된 신경세포도 정상적인 신경세포로서의 다양한 생리적 특성들을 갖고 있음이 밝혀지고 있다. 따라서 배아줄기세포로부터 분화된 신경계세포를 이용한 신경약리학적 연구는 신경세포 사멸의 기전 및 관련된 여러 신경계질환의 원인을 이해하는데 필요한 새로운 정보를 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 관련 의약품의 개발과 효능검사를 위한 재료로서의 유용성을 검증하는 기회가 될 것이다(Pouton & Haynes, 2007; Schrattenholz & Klemm, 2006; 2007). 이를 위해 본 자료에서는 생쥐 배아줄기세포 유래 신경세포를 이용하여 glutamate 흥분성 신경독성 및 세포자살 유도작용에 의한 세포사멸 반응, 또 그 반응에 영향을 끼칠 수 있는 여러 신경생리적 요소들을 조사한 연구를 정리하고, 이어 인간 배아줄기세포를 대상으로 흥분성 신경독성 반응을 조사한 연구 결과를 기초로 하여 배아줄기세포를 신경계 질환의 약리적 연구 및 약물 스크리닝을 위한 모델 시스템으로 활용할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

배아줄기세포로부터 신경계세포로의 분화 유도

배아줄기세포를 이용한 신경약리학적 연구를 위해서는 가능한 순수 신경계세포를 다량 얻을 수 있어야 할 뿐만 아니라, 이들 신경계세포들의 생존능력이 일정기간 정상적으로 유지되어야 한다. 대개 신경세포들은 체외 생존능력이 제한적이며, 더욱이 순수 배양시 그 생존력은 현저히 저하된다. 배아줄기세포로부터 신경계세포를 얻기 위한 방법은 크게 두 가지로 분류할 수 있다. 그 중 하나는 배아줄기세포에 retinoic acid를 처리하여 신경계세포로의 분화를 유도하는 induction 방법이며(Bain et al., 1995), 다른 하나는 자발적인 분화과정 중에 있는 배아줄기세포에서 신경계세포만을 선발하는 lineage selection 방법이다(Guan et al., 2001). 전자의 방법을 통해 얻은 신경계세포들의 생존능력은 다소 제한적이나, 비교적 간편하게 다량의 신경세포를 얻을 수 있는 장점이 있는 반면, 후자의 방법은 과정이 다소 복잡하여 큰 규모로 진행하기는 어려우나, 선택성과 생존능이 좋다는 장점이 있다. 흥분성 신경독성과 같은 신경약리학적 세포사멸 연구에서는 다량의 신경세포가 필요할 뿐만 아니라, 세포독성 효과를 확인하기 위해서는 충분히 긴 시간 동안 자연적인 세포사멸이 없이 생존할 수 있어야 한다. 최근의 연구에서 retinoic acid로 처리한 배아줄기세포를 astrocyte monolayer 위에서 신경 분화를 유도하였을 때, 대부분의 배아줄기세포가 신경계세포로 분화하였을 뿐만 아니라, 분화된 신경계세포들은 최소 4주 이상의 긴 시간동안 뚜렷한 생존율의 감소 없이 정상적인 생리적 특성을 유지할 수 있음을 보여 주고 있다(McDonald, 2001; Qu et al., 2003). 따라서 지금까지 체외 세포사멸 연구의 대표적인 체외배양모델로 연구되어 왔던 mixed neocortical culture 조건과 매우 유사한 상황에서 배아줄기세포 유래 신경계세포를 대상으로 세포사멸 연구를 할 수 있게 된 것이다. 이는 지금까지 축적된 수많은 신경생리학적 세포사멸 연구에 관한 정보를 이제 배아줄기세포를 이용한 시스템에 적용하여 확인해 볼 수 있게 되었음을 의미하는 것으로써, 두 시스템에서의 연구 결과를 비교함으로써, 보다 생리적인 세포사멸의 특징을 이해하는데 큰 도움이 될 것이다.

생쥐 배아줄기세포를 이용하여 신경계분화를 유도하고, 이들을 대상으로 신경약리학적 세포사멸연구을 진행하는 일련의 과정을 자세히 살펴보면, 먼저 적절한 수준의 혈청과 LIF(leukemiae inhibitory factor)가 포함된 배지에서 미분화 상태로 증식하는 배아줄기세포를 embryoid body 형태로 만들어 분화를 유도한다. 이때 retinoic acid를 적절히 처리하면 대부분의 세포들은 embryoid body 형태에서 신경계 전구세포로 분화하게 된다(Bain et al., 1995). Retinoic acid로 처리된 embryoid body의 세포들을 각각 세포단위로 분리하여 astrocyte monolayer 위에서 배양하면 대부분의 세포가 신경계세포로 분화하게 되는데, 이때 GFP 발현 벡터가 도입된 배아줄기세포를 이용하여 분화를 유도하면 신경세포 특이적 표식인자(NeuN, MAP2, SMI 31/311)는 항상 GFP와 함께 발현되는 것을 확인할 수 있다. 이처럼 분화된 신경세포들을 흥분성 신경독성 유도 물질, 또는 세포자살 유도 물질에 노출시켜 세포사멸을 유도하면 이들 표식인자들이 세포사멸이 일어나면서 함께 사라지는 것을 관찰할 수 있다. 이때 세포사멸 유도물질의 처리에 따른 신경세포의 형태적, 수적 변화를 신경세포 특이적 면역세포화학적 방법으로 조사함으로써, 세포사멸의 정도를 개별 세포 수준에서 정확히 파악할 수 있게 되는 것이다(Qu et al., 2003). 지금까지 신경세포 사멸연구는 신경세포의 제한적인 체외 생존능력으로 인하여 주로 glial cells(astrocytes)과 공동배양하는 mixed neocortical culture 모델에서 연구하여 왔으며, 이때 세포사멸의 정도는 세포사멸로 인해 유출되는 세포질내의 효소의 양을 생화학적으로 분석하는 방법을 사용하여 왔다. 이는 공동배양하는 astrocyte monolayer는 일정수준 이하의 세포사멸 유도처리에 대해 상대적으로 강한 저항성을 나타내기에 이와 같은 비교적 간단한 생화학적 분석법을 적용할 수 있었던 것이다 (Goldberg & Choi, 1993; Xu et al., 2001). 그러나 줄기세포를 신경분화시켜 얻은 배양세포에는 일부 비신경계세포가 포함되어 있을 수 있으며, 이는 앞서 언급한 생화학적 방법으로는 신경계세포 특이적 세포사멸을 정확히 반영할 수 없기에, 배아줄기세포를 이용한 신경계세포의 세포사멸 연구는 면역세포화학적 방법에 의한 개별 신경세포의 사멸을 확인하는 것이 보다 정확한 결과를 얻을 수 있는 방법이 되는 것이다.

배아줄기세포 유래 신경계세포의 흥분성 신경독성 반응

앞서 언급한 바와 같이 신경세포가 glutamate 신경전달물질

에 과도하게 노출되면 세포사멸이 초래되는데, 이를 'glutamate 흥분성 신경독성'이라 한다. Glutamate가 흥분성 신경독성을 유발하는 경로에는 몇 가지 서로 다른 수용체가 관여하고 있음이 glutamate의 agonist/antagonist를 이용한 연구를 통해 잘 알려져 있다(Michaelis, 1998). 리간드 매개성 이온통로 수용체인 AMPA/kainate 수용체와 NMDA 수용체, 대사성 수용체인 metabotropic glutamate 수용체가 그것이다. 특히 NMDA 수용체를 통한 세포내 칼슘이온의 mobilization은 glutamate 흥분성 신경독성 반응의 주요한 경로로 알려져 있다(Goldberg & Choi, 1993; Lynch & Guttmann, 2002). 배아줄기세포 유래 신경세포에서 흥분성 신경독성유도 반응을 조사해 보면(Qu et al., 2003), 이들 분화신경세포들도 glutamate agonist인 NMDA, AMPA, kainate 각각에 대해 흥분성 독성반응에 의한 세포사멸현상이 각각의 수용체 특이적 경로를 통해 나타나는 것으로 확인되었다. 즉, 흥분성 신경독성물질의 장기(24시간) 또는 단기(10분) 처리는 각각 유의한 세포사멸을 유도하였으며, 세포사멸의 정도는 신경독성물질의 처리 농도에 따라 비례적으로 증가하되, 각각의 antagonist의 존재하에서는 세포사멸이 거의 완벽하게 억제되는 현상을 보인 것이다. 이때 흥미로운 것은 배아줄기세포 유래 신경세포는 발생, 분화 정도에 따라 동일한 수준의 신경독성 물질의 처리에 대해서 세포독성 반응이 달리 나타난다는 점이다. 즉, AMPA와 kainate는 초기 분화세포(분화유도 5일째)와 후기 분화세포(분화 유도 9일째 이후)에서 공히 세포사멸을 유도하였으나, 사멸 정도는 후기 분화세포에서 더욱 현저하였다. 또한, NMDA는 초기 분화세포에는 독성반응을 나타내지 않았으며, 분화 후기가 되어서야 비로소 NMDA에 대한 사멸효과를 뚜렷이 나타내었다. 따라서 배아줄기세포 유래 신경계세포에서의 흥분성 세포독성유도 반응도 결국은 신경분화에 따른 glutamate 수용체의 발현 양상과 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다. 다시 말해서 흥분성 독성반응, 특히 NMDA에 대한 세포사멸 효과가 후기 분화세포에서만 뚜렷이 나타나는 것은 발생분화에 따른 NMDA 수용체의 차별적 발현 양상과 관련이 있을 것이라는 것이다. 실제 분화 진행 정도에 따른 NMDA 수용체 subunit들의 mRNA 발현 양상을 real-time PCR로 분석한 결과, NMDA 수용체를 구성하는 subunit들의 발현이 분화가 진행되면서 급격히 증가하여 분화 유도 8일 이후에 이르러서야 각 subunit들이 함께 발현되어 기능성 수용체를 구성할 수 있는 것으로 확인되었다. 특히 NR2B는 분화 초기부터, 그리고 NR2A는 후기에 발현이 급격히 증가하는 현상을 보였는데, 이는 배발생 과정에서의 NMDA 수용체 발현 양상과 유사한 현상으로, 배아줄기세포의 신경계세포로의 분화가 정상적인 배발생 분화과정의 한 부분을 잘 반영하고 있음을 의미하는 것이라고도 할 수 있다. NMDA 처리에 의한 세포사멸과정을 실시간 영상으로 분석해 보면, 신경세포체가 부풀면서 먼저 신경돌기들이 파괴되어 사라지고, 이어 세포체가 파괴되는데, 이런 과정은 지금까지 알려진 흥분성 세포독성에 의한 세포사멸의 전형적인 과정을 그대로 보여 주고 있는 것이다. 따라서 배아줄기세포로부터 유도된 신경계세포들도 지금까지 많이 연구되어 온 neocortical neuron에서의 glutamate 흥분성 신경독성 반응과 매우 유사한 반응을 보이고 있음을 알 수 있다(Koh & Choi, 1988).

신경계 성장인자들이 흥분성 신경 독성에 미치는 영향

Neurotrophin 계열의 신경계 성장인자인 NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 등은 신경계 발생과정에서 여러 중추 및 말초 신경계 부위에서 발현하며, tyrosine kinase 수용체인 trkA, trkB, trkC 등을 통해 신경계세포의 생존, 분화를 촉진할 뿐만 아니라, 뇌질환이나 다양한 원인에 의한 신경손상으로부터 신경세포를 보호하는 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다 (Dechant, 2001). Neurotrophin의 생존촉진 효과는 신경세포의 세포자살 및 흥분성 신경독성에 의한 세포사멸을 방지함으로써 유도되는 것으로 알려져 있으며(Koh et al., 1995), 이런 이유로 말미암아 뇌졸중을 포함한 신경손상을 세포이식으로 치료할 때, BDNF를 함께 처리하는 것이 고려되어 왔다(Xiong et al., 2002). Neurotrophin과 더불어 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 계열의 성장인자들, 즉 GDNF, neurturin, artemin, persephin 들도 주로 중추신경계의 여러 부위에서 발현되어, ret, GFRα1, GFRα2, GFRα3 등의 수용체를 통해 신경세포의 생존을 촉진하고, 세포손상으로부터 신경세포를 보호해 주는 성장인자로 주목받고 있는데(Airaksinen et al., 1999; Nicole et al., 2001), 특히 GDNF는 dopamine 신경세포의 tropic factor로 작용할 뿐만 아니라(Lin et al., 1993), 허혈성 뇌신경손상을 포함하는 다양한 원인에 의한 세포사멸을 억제하는 기능이

잘 알려져 있다(Abe et al., 1977; Wang et al., 1997; Kitagawa et al., 1998; Nicole et al., 2001). Neurotrophin 또는 GDNF계열 성장인자들이 배아줄기세포 유래 신경계세포의 생존 및 흥분성 신경독성 반응에 미치는 영향을 조사하기 위해(Lee et al., 2005), 먼저 이들 성장인자들의 수용체 발현을 분석한 결과를 보면, trkA를 제외한 모든 수용체들의 mRNA가 배아줄기세포 유래 신경계세포에서 발현되고 있으며, 특히 Neurotrophin에 대한 수용체 trkB와 trkC가, GDNF 계열의 성장인자들에 대한 수용체 ret, GFRα1의 발현이 신경계 분화와 더불어 현저히 증가하는 양상을 보인다. 이는 배아줄기세포의 신경계 분화와 분화된 신경세포의 생존에 여러 성장인자들이 관여할수 있음을 시사하는 것이며, 특히 BDNF, NT-3, 그리고 GDNF의 역할이 중요하리라 짐작하게 한다. 여러 성장인자들을 신경계 분화중에 처리하면 세포분열은 촉진되지 않음에도 불구하고, GDNF, NT-3 처리군에서만은 분화된 신경세포의 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이는 GDNF와 NT-3는 배아줄기세포 유래 신경세포의 분열능력에 영향을 주지 않고 생존능력을 향상시킴으로써 분화된 신경세포의 수를 증가시켰음을 의미한다. 하지만 성장인자들의 전처리하에서 NMDA 신경독성 효과를 조사한 결과를 보면 GDNF의 전처리는 예상대로 NMDA 신경독성에 의한 세포사멸 효과를 감소시켰으나, NT-3는 오히려 독성효과를 촉진하는 예상과는 다른, 반대의 결과를 보여 주고 있다. Neurotrophin은 GDNF와 마찬가지로 신경세포의 생존 및 신경돌기의 생성을 촉진하는 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 경우에 따라서는 오히려 신경손상을 촉진할 수도 있다는 보고들도 있음을 고려할 때(Koh et al., 1995; Kim et al., 2003), Neurotrophin은 신경손상의 내용에 따라 신경세포의 사멸을 억제할 뿐만 아니라, 때로는 오히려 세포사멸을 심화시킬 수도 있음을 시사하고 있다. 따라서 배아줄기세포 유래 신경세포를 이용한 다양한 세포독성 반응을 면밀히 검토하는 것은 신경손상에 대한 세포치료시 성장인자들의 병행처리 여부와 기준을 결정하는데 중요한 정보를 제공하게 될 것이다.

유전자 변형 배아줄기세포 유래 신경계세포에서의 세포사멸 연구

흥분성 신경독성 반응과 더불어 세포자살 유도작용은 여러 다양한 원인에 의한 신경계 손상과정에서 볼 수 있는 주요한 세포사멸의 경로이다. 특히 치매, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병 등의 퇴행성 신경계질환에서 세포자살 유도작용이 관여하고 있음은 잘 알려진 사실이다. 뿐만 아니라, 허혈성 뇌손상의 경우에도 앞서 설명한 흥분성 신경독성작용과 더불어 세포자살 유도작용도 중요한 세포사멸의 경로로 알려지고 있다(Yuan & Yankner, 2000). 따라서 배아줄기세포 유래의 신경계세포의 세포자살 유도작용에 대한 반응을 연구하는 것도 다양한 신경계 손상의 원인과 대책을 찾아 가는데 중요한 정보를 제공할 수 있다. 우선 배아줄기세포 유래의 신경세포가 세포자살 유도약물에 대해 보이는 반응을 조사한 결과를 살펴보면, 세포자살 유도물질로 알려진 staurosporine과 etoposide는 배아줄기세포 유래 신경계세포에서도 세포사멸을 유도하였으며, caspase 억제제와 동시에 처리하면 세포사멸작용이 현저히 저하되는 것을 관찰할 수 있다. 이때 세포자살을 유도하는 단백질 분해효소인 caspase-3의 활성상태를 면역형광법으로 분석해 보면, 세포자살 유도물질의 단독 처리시에는 그 활성이 뚜렷이 증가하나, 억제제를 동시에 처리할 경우에는 활성 증가가 관찰되지 않는다. 결국 배아줄기세포 유래 신경세포는 세포자살 유도물질에 의한 선택적인 세포사멸 반응을 보이고 있음을 확인시켜준 것이다. 이 같은 세포자살 유도반응이 세포내 세포자살 유도작용을 조절해 주는 Bcl-2 계열의 단백질들 중에서 세포자살을 차단하는 것으로 알려진 Bcl-2 단백질의 과발현을 통해 억제될 수 있는지, 또한 줄기세포의 유전자 재조합과정이 줄기세포 유래 신경세포의 신경생리적 특성에 미치는 영향을 함께 살펴 보기 위해 Bcl-2 재조합유전자를 줄기세포에 도입하여 유전자 변형 배아줄기세포를 선발하고, 이로부터 분화한 신경계세포를 대상으로 세포자살 유도반응을 조사한 연구 결과를 살펴보면, Bcl-2 단백질을 과발현하는 신경분화세포만이 세포자살 유도물질에 의한 세포사멸 반응을 선택적으로 억제하였으며, 그 억제효과는 Bcl-2 단백질의 발현수준이 높은 세포주에서 더욱 뚜렷함을 보여 주고 있다. 한편, Bcl-2를 과발현하는 유전자 변형세포에서 glutamate 흥분성 신경독성 반응을 조사한 경우에는 kainate에 의한 세포사멸을 억제하지 못한 반면, NMDA에 의한 세포독성은 상당 수준 저하되는 결과를 보여 주고 있다.

인간 배아줄기세포 유래 신경계세포에서의 흥분성 신경독성 연구

현재까지 배아줄기세포 유래의 신경계세포를 활용한 신경약리적 연구는 주로 생쥐의 배아줄기세포를 이용한 것이었다. 하지만 이런 연구의 결과들이 배아줄기세포를 인간 질병 치료를 위한 약물효능검사와 같은 보다 응용적인 분야에 활용하기 위해서는 궁극적으로 인간 배아줄기세포를 대상으로 한 연구로 진행되어야 할 것이다. Schrattenholz과 Klemm (2006, 2007)은 처음으로 인간 배아줄기세포 유래의 신경계세포를 대상으로 NMDA 처리에 따른 세포 사멸 효과, 이와 병행하여 나타나는 세포내 칼슘이미지 등을 분석할 결과, 인간 배아줄기세포 유래의 신경계세포도 흥분성 신경독성 반응을 적절히 나타내고 있음을 보여 주었다. 결국 체외배양한 인간 배아줄기세포 유래 신경계세포도 흥분성 신경독성에 적절히 반응할 수 있는 내부 장치를 잘 갖추고 있음을 의미하는 것이다. 흥분성 신경독성에 의한 세포사멸은 여러 신경계질환의 주요한 세포사멸의 원인임을 상기할 때, 관련된 병리 기전을 이해하고, 치료 약물을 스크리닝하며, 그 효능을 신속하고, 간단히, 그리고 대량으로 수행할 수 있는 체외 모델 시스템을 확립한다는 것은 매우 중요한 의미를 가질 수 있다. 특히 유전적으로 동일한 세포를 대상으로 체외에서 이루어지는 분석은 연구하려는 질병의 특성에 따라 여러 가지 제약이 있는 동물실험을 대체할 수 있는 가능성도 있다. 이처럼 배아줄기세포를 순수 진단용으로 활용하는 것은 줄기세포의 새롭고, 유용한 활용분야를 개척하는 중요한 진전이 될 수 있을 것이다.

결 론

이상에서 살펴본 바와 같이 생쥐 배아줄기세포 유래의 신경계세포를 대상으로, glutamate 흥분성 신경독성 반응, 세포자살 유도반응, 여러 신경계 성장인자에 의한 세포의 생존과 손상 등, 매우 다양한 세포사멸에 관한 연구를 수행해 보면, 배아줄기세포는 신경계 조직배양 실험, 또는 동물대상 실험에서 보여 준 것과 유사한 결과들을 보여 주고 있음을 알 수 있다. 더 나아가 유전자 변형된 배아줄기세포 유래 신경세포도 여전히 정상적인 신경세포의 생존과 사멸, 그리고 세포손상으로부터의 보호와 같은 중요한 신경약리학적 특성을 나타내고 있음을 알 수 있다. 배아줄기세포 유래의 신경계세포가 다양한 신경약리학 연구의 대상 또는 모델 시스템이 되기 위해서는 우선 줄기세포로부터 다량의 신경계세포를, 그것도 매우 순수한 상태로 분화시킬 수 있어야 한다. 이제는 다양한 분화 유도 방법과 부가적인 선발조건을 적용함으로써, 이것이 가능한 수준에 이르렀다. 특히 세포사멸 연구를 위해서 중요한 또 다른 요건은 배아줄기세포 유래의 신경계세포들이 정상적인 신경생리학적 특성을 갖고 있어야 함과 동시에 실험적 처리에 의해 세포사멸현상을 관찰할 수 있는 충분히 긴 기간 동안에도 자연적인 세포사멸은 나타나지 않아야 하는데, 앞서의 연구결과들은 이 같은 조건도 만족시키고 있다. 특히, 최근 인간 배아줄기세포 유래 신경계세포를 이용한 흥분성 신경독성 반응 연구에서도 앞서와 유사한 실험 결과를 보여 준 것은 배아줄기세포의 체외 배양 시스템이 신경약리학적 기초연구에서만이 아니라, 나아가 대량의 약물 스크리닝과 같은 응용분야에까지 활용될 수 있는 가능성이 있음을 시사하고 있다.

인용문헌

Abe K, Hayashi T, Itoyama Y (1997) Amelioration of brain edema by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor in reperfused rat brain. Neurosci Lett 231:37-40.

Ankarkona M, Zhivotovsky B, Holmstrom T (1996) Lamin and β-tubulin fragmentation precedes chromatin degradation in glutamate-induced neuronal apoptosis. Neuroreport 7: 2659-2664.

Arnhold S, Andressen C, Angelov DN, Vajna R, Volsen SG, Hescheler J, Addicks K (2000) Embryonic stem-cell derived neurons express a maturation dependant pattern of voltage-gated calcium channels and calcium binding proteins. Int J Dev Neurosci 18:201-212.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. Dev Biol 168:342-357.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl-d-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA 92:7162-7166.

Choi DW (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell

culture is calcium dependent. Neurosci Lett 58:293-297.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. J Neurobiol 23: 1261-1276.

Dechant G (2001) Molecular interactions between neurotrophin receptors. Cell Tissue Res 305:229-238.

Ferrer I, Martin F, Serrano T, Reiriz J, Perez-Navarro E, Alberch J, Macaya A, Planas AM (1995) Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. Acta Neuropathol 90:504-510.

Filipkowski RK, Hetman M, Kaminska B, Kaczmarek L (1994) DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. Neuroreport 5:1538-1540.

Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. J Neurosci 13:3510-3524.

Gottlieb DI (2002) Large-scale sources of neural stem cells. Annu Rev Neurosci 25:381-407.

Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM (2001) Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. Cell Tissue Res 305:171-176.

Gwag BJ, Koh JY, Demaro JA, Ying HS, Jacquin M, Choi DW (1997) Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. Neuroscience 77:393-401.

Kim HJ, Hwang JJ, Behrens MM, Snider BJ, Choi DW, Koh JY (2003) TrkB mediates BDNF-induced potentiation of neuronal necrosis in cortical culture. Neurobiol Dis 14:110-119.

Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K (1998) Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 29:1417-1422.

Koh JY, Choi DW (1988) Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J Neurosci 8:2153-2163.

Lee CS, Tee LY, Dusenbery S, Takata T, Golden JP, Pierchala BA, Gottlieb DI, Johnson EM Jr, Choi DW, Snider BJ (2005) Neurotrophin and GDNF family ligands promote survival and alter excitotoxic vulnerability of neurons derived from murine embryonic stem cells. Exp Neurol 191: 65-76.

Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotechnol 18:675-679.

Lesort M, Esclaire F, Yardin C, Hugon J (1997) NMDA induces apoptosis and necrosis in neuronal cultures. Increased APP immunoreactivity is linked to apoptotic cells. Neurosci Lett 221:213-216.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 260:1130-1132.

Lynch DR, Guttmann RP (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. J Pharmacol Exp Ther 300:717-723.

McDonald JW (2001) ES cells and neurogenesis. In: Rao MS (ed.), Stem cells and CNS Development. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 207-261.

Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. Prog Neurobiol 54:369-415.

Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen- activated protein kinase pathway. J Neurosci 21:3024-3033.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RDG (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. Mech Dev 59:89-102.

Olney JW (2003) Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. Curr Opin Pharmacol 3:101-109.

Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 101:12543-12548.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997) Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. J Comp Neurol 378: 70-87.

Pouton CW, Haynes JM (2007) Embryonic stem cells as a source of models for drug discovery. Nat Rev Drug Discov 6:605-616.

Qu Y, Vadivelu S, Choi L, Liu S, Lu A, Lewis B, Girgis R, Lee CS, Snider BJ, Gottlieb DI, McDonald JW (2003) Neurons derived from embryonic stem (ES) cells resemble normal neurons in their vulnerability to excitotoxic death. Exp Neurol 184:326-336.

Schrattenholz A, Klemm M (2006) How human embryonic stem cell research can impact *in vitro* drug screening technologies of the future. In: Marx U, Sandig V (eds.), Drug Testing *in vitro*: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology. Wiley/VCH, Weinheim, New York, pp 205-228.

Schrattenholz A, Klemm M (2007) Neuronal cell culture from human embryonic stem cells as *in vitro* model for neuroprotection. ALTEX 24:9-15.

Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM (1995) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. Mech Dev 53:275-287.

Strubing C, Rohwedel J, Ahnert-Hilger G, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM (1997) Development of G protein-mediated Ca^{2+} channel regulation in mouse embryonic stem cell-derived neurons. Eur J Neurosci 9: 824-832.

Wang Y, Lin SZ, Chiou AL, Williams LR, Hoffer BJ (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. J Neurosci 17:4341-4348.

Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. Br J Pharmacol 147:S100-108.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68:251-306.

Xiong H, Futamura T, Jourdi H, Zhou H, Takei N, Diverse- Pierluissi M, Plevy S, Nawa H (2002) Neurotrophins induce BDNF expression through the glutamate receptor pathway in neocortical neurons. Neuropharmacology 42:903-912.

Xu L, Sapolsky RM, Giffard RG (2001) Differential sensitivity of murine astrocytes and neurons from different brain regions to injury. Exp Neurol 169:416-424.

Yuan J, Yankner BA (2000). Apoptosis in the nervous system. Nature 407:802-809.