

## 연령별 지방 중간엽 유래 줄기세포의 신경세포로의 분화 능력 비교

조정윤 · 강성근 · 최인수 · 라정찬<sup>†</sup>

알앤엘바이오 중앙연구소

## Comparison of Neural Cell Differentiation of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived from Young and Old Ages

Jung-Youn Jo, Sung-Keun Kang, In-Su Choi and Jeong-Chan Ra<sup>†</sup>

Research Center, RNL BIO Co., Ltd, Seoul 153-803, Korea

**ABSTRACT** : Recently, adipose mesenchymal stem cells (AdMSC) that are similar to bone marrow MSC and blood derived MSC are thought to be another source for stem cell therapy. However, the diseases that can be applied for stem cells therapy are age-dependent degenerative diseases. Accordingly, the present study investigated the growth and differentiation potential to neural cells of human AdMSC (hAdMSC) obtained from aged thirty, forty and fifty. The growth of cells and cell viability were measured by passage and neural differentiation of hAdMSC was induced in neural differentiation condition for 10 days. Our results demonstrated that cell number, viability and morphology were not different from hAdMSC by age and passage. Immunofluorescence analysis of neural cell marker (TuJ1, NSE, Sox2, GFAP or MAP2) demonstrated no significant differences in neural cell differentiation by age and passage. As the number of passage was increased, the mRNA level of MAP2 and Sox2 was decreased in hAdMSC from age of 50 compared to hAdMSC from age of 30. In conclusion, the present study demonstrated that ability of neural cell differentiation of hAdMSC was maintained with ages, suggesting that autologous stem cells from aged people can be applied for stem cell therapy with age-dependent neural disease with the same stem cell quality and ability as stem cell derived from young age.

**Key words** : Stem cell therapy, Human adipose mesenchymal stem cell, Neural differentiation, Aging, Cell growth.

**요약** : 최근 골수와 혈액으로 유래된 중간엽 줄기세포와 비슷한 능력을 가지는 것으로 알려진 지방 유래 중간엽줄기세포가 새로운 세포 치료제로 떠오르고 있다. 하지만 줄기세포를 이용하여 치료하려는 질병은 나이가 들어감에 따라 발병하는 퇴행성 질환들이 대부분인데, 노화가 진행됨에 따라 줄기세포의 능력이 차이가 있다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 노화가 일어남에 따라 발생하는 신경성 질환을 자가 유래 지방 중간엽 줄기세포를 이용하여 치료함에 있어서 노화가 진행됨에 따라 얻어진 지방줄기세포가 세포학적으로 변화는 없는지에 대해 줄기세포 성장능, 생존율과 신경세포로의 분화유도 능력을 비교하였다. 30대, 40대, 50대에서 사람 지방 유래 줄기세포를 분리 배양하여 연령별 계대에 따른 세포수와 생존율을 측정하고, 줄기세포 성장능력을 비교 분석하였고, 지방 줄기세포를 신경세포 배양 조건 하에서 10일 동안 배양하여 신경 분화능력을 연령별로 비교하였다. 실험결과, 세포수와 생존율, 세포 모양이 연령과 계대별에 의해 차이가 없다는 것을 확인하였다. 신경 분화 후 면역형광염색법을 통해 분석한 결과, 연령에 따른 신경 분화능력의 차이가 관찰되지 않았다. 분자 유전적으로 신경세포 마커의 발현을 mRNA 수준에서 분석한 결과, 연령별 간의 차이가 몇 개의 유전자 발현을 제외하고는 차이가 발견되지 못했다. 하지만 계대가 진행될수록 50대군의 줄기세포에서 MAP2와 Sox2의 mRNA 발현이 30대군의 줄기세포에 비해 상대적으로 낮게 발현됨이 확인되었다. 결론적으로 자가 지방 중간엽 줄기세포의 신경세포 분화능력이 연령에 상관없이 차이가 없음이 관찰되었으며, 이는 나이 든 사람으로부터 얻어진 지방 줄기세포도 젊은 사람에서 얻어진 세포와 마찬가지로 능력으로 자가 세포 치료제로 사용될 수 있다는 점을 말해주고 있다.

<sup>†</sup> 교신저자: 서울특별시 금천구 가산동 550-1 알앤엘바이오 중앙연구소.  
(우) 153-803, (전) 02-858-8021, (팩) 02-858-8140, E-mail: jkra@ml.co.kr

## 서 론

줄기세포는 무한적인 자가 재생과 원하는 조직이나 장기의 분화 능력이 있는 미분화된 세포로써(Lin et al., 2005) 골수나 혈액, 근육, 연골, 지방 등 다양한 조직에서 쉽게 얻어진다. 이러한 인체를 구성하고 있는 조직 내에 존재하는 성체줄기세포는 자가증식 및 분화능력과 함께 면역 거부 반응도 비교적 적고, 배아줄기세포에 비해 윤리적인 문제도 없기 때문에 최근 줄기세포를 이용한 질병 치료에 있어 중요한 소스로 부각되고 있다(Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2001; Zuk et al., 2001; Wagner et al., 2008).

현재 많은 연구 자료들을 통해 알려진 성체줄기세포는 골수 및 혈액 줄기세포가 대표적인데, 최근에 알려진 지방으로부터 유래된 지방 유래 중간엽 줄기세포가 골수나 다른 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 특성과 마찬가지로 다분화능한 성격을 지니고 있어 지방, 골, 연골, 근육 또는 신경 세포로의 분화가 가능하다고 알려져 있다(Safford et al., 2005; Yuan et al., 2009). 이러한 지방 유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포에 비해 조직의 채취가 용이하고, 배양 과정이 비교적 쉬우며, 세포의 증식력이 빨라 풍부한 세포의 양을 얻을 수 있다는 장점과 다능성의 분화능력으로 인해 허혈성 질환 및 여러 질환 치료의 새로운 재생 치료제로써 부각되고 있으며, 이것은 환자 자신에게서 추출하여 사용할 수 있다는 장점이 있다(Ashjian et al., 2003; Nakagami et al., 2006).

이러한 줄기세포를 이용하여 세포 치료제로 적용하는 질병은 나이가 들어감에 따라 발병하는 질환들이 많다. 따라서 자가줄기세포를 이용하여 퇴행성 질환의 치료시 나이 든 사람에서 얻어진 줄기세포가 젊은 사람으로부터 얻어진 줄기세포와 마찬가지로의 능력을 가지고 있어야만 치료효과가 극대화 될 수 있다. 하지만 최근의 보고에 의하면, 중간엽 줄기세포도 시간이 경과함에 따라 세포의 모양이 커지고 불규칙해지며, 증식이 멈추는 등의 형태학상의 변화를 일으키고, 줄기세포의 숫자가 감소하고 그 기능이 약해져 이로 인해 질병을 초래할 수 있다고 한다(Fibble et al., 2003; Wagner et al., 2008). 노화를 지칭하는 이러한 변화들은 최근 연구자료에서 중간엽 줄기세포가 계대되는 체외 배양상에서 분화 능력이 감소한다고 알려졌고, 이러한 점은 우리의 기관이 손상되었을 때 이를 치유하기 위한 줄기세포의 능력과 많은 조직

의 재생 능력이 점진적으로 감소할 수 있다는 결과를 뒷받침하고 있다(Shi et al., 2005; Williams et al., 2008). 따라서, 퇴행성 질환을 가진 나이 든 환자에서 유래된 골수, 혈액 또는 지방 중간엽 줄기세포를 치료에 적용하기 전에 줄기세포의 기능 및 생물학적 특성이 충분히 입증되어야 한다. 즉, 노화에 따르는 줄기세포의 특성상 한계와 자가 유래 및 동종이계 적용 시 안정적이고 효과적으로 이식할 수 있는지 검증해야 한다고 하겠다(Chhabra et al., 2009).

노화에 따라 중풍, 치매와 같은 신경성 질환이 많이 발생되는데, 이러한 신경성 질환에 대해 중간엽 줄기세포의 자가 세포 이식 치료에 관한 사례들도 보고되어 있지만(Gordon et al., 2009), 이러한 연구 결과에서 사용된 줄기세포가 노화에 따라 능력이 변하는지 등에 대해 비교하지는 않아 실제적으로 나이 든 사람의 줄기세포를 이용하여 자가줄기세포 치료에 이 결과를 적용하는데는 어려움이 있다고 하겠다. 노화에 따르는 중간엽 줄기세포의 능력에 관한 연구 등은 골수 유래 중간엽 줄기세포가 가장 많은 연구가 되어 있는데, 이러한 연구는 노화에 의한 세포의 증식력이나 골세포로의 분화능에 관한 연구들이 대부분이고(Bonab et al., 2006; Izadpanah et al., 2008), 노화에 따른 신경 분화 능력에 대한 비교 논문은 발표되지 않고 있다.

이에 본 연구에서는 노화가 일어남에 따라 발생하는 신경성 질환에 지방 유래 자가 중간엽 줄기세포의 치료 적용 시 본인의 줄기세포의 노화 여부에 따라 어떠한 영향이 있는지, 즉 나이 든 사람의 줄기세포를 본인에게 적용하기에 세포학적으로 변화는 없는지에 관해 연령별에 따르는 지방 유래 중간엽 줄기세포의 성장 속도, 생존율을 조사하고, 또한 지방 줄기세포를 신경 세포로 분화 유도함으로써 나이에 따른 분화능을 비교하고자 수행하였다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 재료

지방 중간엽 줄기세포배양을 위해 RCME(RNL Bio, Seoul, Korea)와 RKCM(RNL Bio) 배지를 사용하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), butylated hydroxyanisole(BHA), hydrocortisone, insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), adenosine 3'5'-cyclic monophosphate sodium salt monohydrate(cAMP)는 SIGMA Chemical사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하

였고, Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)은 Welgene 사(Daegu, Korea), epidermal growth factor(EGF), fibroblast growth factor(FGF), penicilline, trypsin/EDTA은 Life Technologies사(NY, USA), fetal bovine serum(FBS)은 Global Life Science사(CA, USA)에서 구입하였다. 면역 형광 염색 시 사용한 Sox2, MAP2, GFAP 1차 항체들은 Chemicon사(Chemicon International, USA)와 NSE, TUJ1의 1차 항체들은 Abcam사(UK)에서 2차 항체인 Alexa fluor-488(마우스와 토끼 유래), -568(토끼유래)은 Molecular Probes사 (Molecular Probes Inc, USA)에서 구입하였다. RNA extraction kit과 RT-PCR kit은 iNtRON Biotechnology사(iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)에서 구입하였다.

## 2. 세포배양

지방 중간엽 줄기세포는 라 등(라정찬, 2008)의 방법에 따라 분리배양하였다. 간단히 설명하면 건강한 30대부터 50대 까지 각각 3명씩 정상인으로부터 채취된 지방조직을 phosphate-buffered saline(PBS)로 여러 번 세척한 후 1 mg/ml collagenase I(Gibco, USA)을 1시간 동안 37°C에서 처리하였다. 100 mm cell strainer로 거른 뒤 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 10% heat inactivated FBS가 포함된 RCME 배지로 5% CO<sub>2</sub>, humidified, 37°C 조건에서 배양하였다. 다음 날 세포의 부착을 확인하고 부착되지 않은 세포를 제거하고 5% FBS가 포함된 RKCM으로 교환하였다. 4~5일간 배양 용기 바닥에 부착하도록 둔 뒤 5% FBS가 포함된 RKCM 배지로 배양하였다. 세포의 시간에 따르는 성장도를 관찰하기 위해 세포 성장률(cell population doubling level, CPDL) assay를 실시하였다.

## 3. 연령별 및 계대별에 따른 세포 계수와 생존력 측정

지방조직으로부터 처음 분리한 세포를 계대 2번째까지 배양한 후 각 계대마다 tryphan blue(Life Technologies, NY, USA)로 염색하여 계수 및 생존을 측정을 하였다.

## 4. 신경세포 분화

지방 중간엽 줄기세포의 신경 분화 유도를 위해 세포를 혈구계로 계수한 후, 10% FBS와 100 units/ml의 penicillin-streptomycin, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF가 포함된 DMEM 배양액에  $1 \times 10^4$  cells/ml 농도로 4 chamber 배양 용기(Nalge

Nunc International, NY, USA)에서 5% CO<sub>2</sub>, humidified, 37°C 조건에서 배양하였다. 다음 날 세포의 부착 정도와 배양 상태를 확인한 후 신경 분화 유도 배지로 교환하였다. 신경 분화 유도 배지는 DMEM 배양액에 10% FBS와 100 units/ml의 penicillin-streptomycin이 포함된 기존 배양액에 2% DMSO, 200 μM BHA, 1 μM hydrocortisone, 5 μg/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 mM cAMP를 첨가한 배지로 2~3일마다 배양액을 교환하며 신경 분화를 유도하였다. 약 8일에서 10일 후 지방줄기세포의 신경세포로의 분화 여부를 관찰하기 위해 면역 형광염색과 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)를 실시하였다.

## 5. 면역형광 염색

배양 10일째 면역 형광 염색을 실시하여 신경세포로의 분화를 확인하였다. 신경 세포 배양액을 제거한 뒤 PBS로 세척한 후, 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 이 후 0.3% Triton-X 용액으로 교체하고 10분간 정치하였다. 이 후 5% bovine serum albumin(BSA) blocking 용액에 각 신경 분화 항체를 첨가하여 하루 동안 반응시켰다. 일차 항체인 1 μg/ml TUJ1(마우스 유래), 1 μg/ml MAP2(마우스 유래), 1 μg/ml NSE(토끼 유래), 1 μg/ml Sox2(토끼 유래) 또는 1 μg/ml GFAP(토끼 유래)로 염색하였고, 2차 항체인 Alexa fluor-488(마우스 또는 토끼 유래) 또는 Alexa fluor-568(토끼 유래)으로 반응시킨 후 형광 현미경(Axiovert 300, Carl Zeiss, Germany)로 사진 촬영하였다. 현미경하에서 400배 배율로 전체 세포와 형광을 발현하는 세포를 계수하였다. 발현된 세포의 계수는 발현된 세포/전체 세포수, 예를 들어 50/50=100%로 표기하였다.

## 6. RT-PCR

배양 10일째 0.25% trypsin/1 mM EDTA을 첨가하여 세포를 분리한 다음 PBS로 세척하고 1,500×rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 농도를 측정 후 1 μg의 RNA와 maxime RT Pre mix kit(iNtRON Biotechnology)로 역전사 반응을 실시하였다. 역전사 반응 후 Taq DNA polymerase, dNTP, reaction buffer, gel loading buffer로 구성된 maxime PCR premix kit(iNtRON Biotechnology)와 각각의 primer로 94°C에서 1 min, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분, 72°C에서 2분간 38 cycle 조건으로 PCR을

실시하였다. 실험에 사용된 프라이머 염기서열은 다음과 같다. TUJ1, sense strand(5'-TCTCACAAGTACGTGCCTCGA-3') and antisense strand(5'-TGATGAGCAACGTGCCCAT-3'). Sox2, sense strand(5'-CAAGATGCACAACCTCGGAGA-3') and antisense strand(5'-GTTTCATGTGCGCGTAACTGT-3'). NSE, sense strand(5'-AAGGACAAATACGGCAAGGA-3') and antisense strand(5'-TGGACCAGGCAGCCCAATC-3'). GFAP, sense strand(5'-GCTCGATCAACTACCGCCAACA-3') and antisense strand(5'-GGCAGCAGCTGTCAGGTC-3'). MAP2, sense strand(5'-TCAGAGGCAATGACCTTACC-3') and antisense strand(5'-GTGGTAGGCTCTTGGTCTTT-3'). GAPDH, sense strand(5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3') and antisense strand(5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3').

PCR로 증폭된 산물을 size maker와 함께 1% 아가로스 겔과 1X TAE 용액을 사용하여 150 volt에서 30분 동안 전기 영동한 후 Gel Doc(Fuji Film, USA)으로 관찰하였고, Fuji molecular imaging software로 이미지 측정을 한 후 정량화 하였다. 신경세포 마커 mRNA의 발현 정도는 컨트롤 유전자로 사용된 GAPDH의 발현에 대한 상대적 값으로 표시하였다.

## 7. 통계처리

모든 실험 결과는 평균값±표준 편차(means±SD)로 제시하였다. 시험 처리군 간의 평균값 비교는 one way ANOVA와 Tukey's multiple comparison test에 의해서 이루어졌으며, 유의적 차이는  $p<0.05$ 의 수준에서 검증하였다.

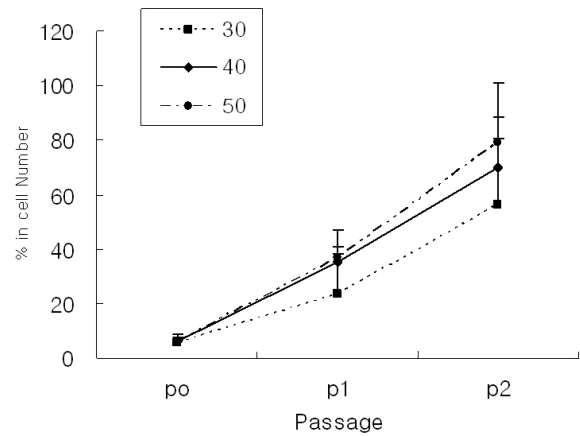
## 결 과

### 1. 연령별 및 계대에 따른 세포 계수와 생존율 측정

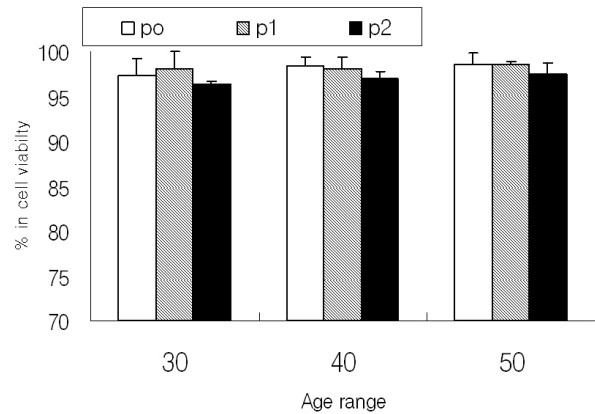
지방 조직으로부터 분리한 줄기세포를 2계대까지 배양한 후 계대 배양 시 세포를 trypan blue로 염색하여 계수에 따른 생존율을 측정하였다. 실험 결과 30, 40, 50대에서 얻어진 지방줄기세포의 세포 증식능력에서 유의한 차이가 관찰되지 않았고(Fig. 1A), 생존율도 3군에서 모두 97% 이상을 보여 생존율 또한 연령별 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

### 2. 지방 중간엽 줄기세포로 유도된 신경세포의 형태학적 관찰

A.

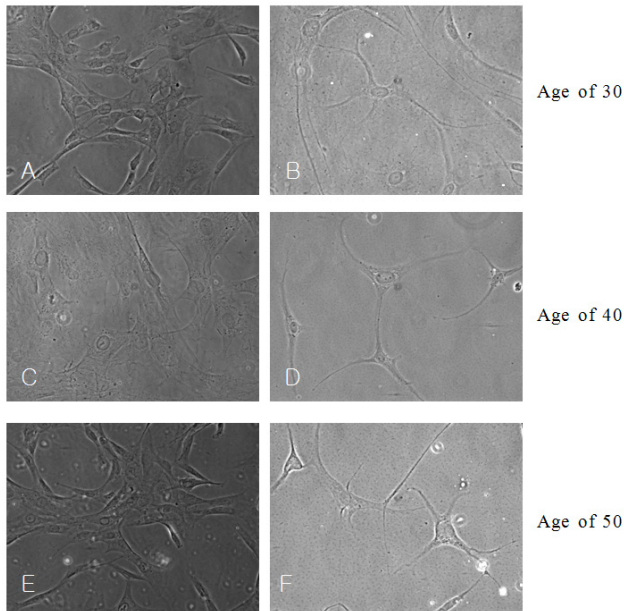


B.



**Fig. 1. Cell proliferation and cell viability rate by culture passage of adipose stem cells derived from various ages.** (A) proliferation rate and (B) cell viability were determined by counting cell with a hemacytometer after trypan blue staining. Every experiment was repeated three times ( $p<0.05$ , one way ANOVA and Tukey's multiple comparison test).

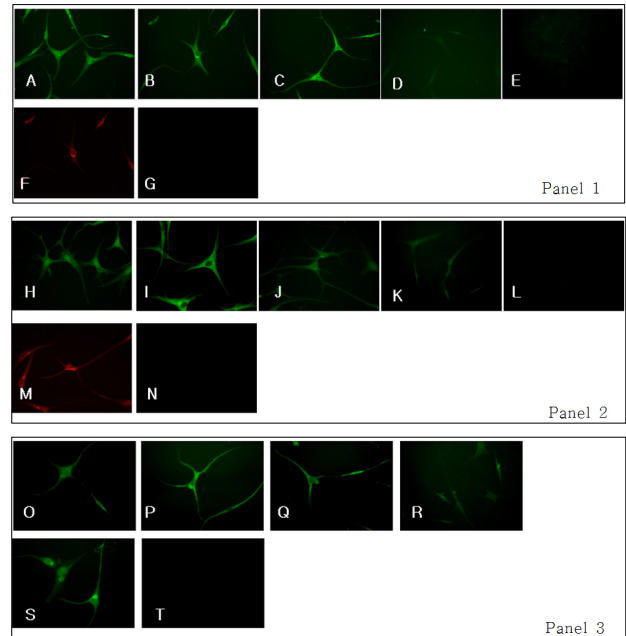
지방 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 유도한 결과 신경 분화 배지로 교체하고, 약 4일째부터 신경세포의 모양을 띄기 시작하였다. 분화유도 후 배양 6일째에 지방 중간엽 줄기세포 대조군과 신경세포로 분화 유도한 세포를 비교한 결과, 신경세포의 특징인 양극형 방추사(bipolar spindle) 모양이 나타났고 neurite 주변으로 branching되는 현상이 관찰되었다. 연령별, 계대별로 분화된 세포의 형태를 비교한 결과 신경세포와 유사한 모양을 관찰할 수 있었고, 형태학적으로 거의 차이가 없었다(Fig. 2).



**Fig. 2. Morphological change of human adipose mesenchymal stem cells (hAdMSC) after neural differentiation.** The hAdMSC of passage 2 from age of 30, 40 or 50 in control medium at day 6 of differentiation induction (A, C and E). The hAdMSC of passage 2 from age of 30, 40 or 50 in neural induction medium at day 6 of differentiation induction (B, D and F). Every experiment was performed at triplication.

**3. 연령별 지방줄기세포의 신경 분화 후 면역형광 염색 분석**

30대와 40대, 50대로부터 얻어진 지방줄기세포를 3세대 (Fig. 3), 4세대(Fig. 4), 또는 5세대(Fig. 5)에서 신경세포로 분화를 유도한 후 10일째에 신경표지 마커 항체를 이용하여 면역 형광 염색을 실시하였다. 신경세포분화 유도 결과, 계대별 또는 연령별과 관계없이 신경세포 표지자인 TUJ1과 NSE는 발현율이 매우 높았으며, 그 다음 순서대로 별아교 세포 표지자인 GFAP와 다능성 및 신경 세포 표지자인 Sox2의 발현율이 높은 것으로 나타났으며, 한편 신경세포 표지자인 MAP2의 발현율은 매우 낮게 관찰되었다(Fig. 3~5). 이러한 연령별 또는 계대별 지방줄기세포의 신경 분화 정도를 면역 형광 염색된 세포를 현미경하에서 계수하여 비교한 결과 TUJ1, NSE, Sox2, GFAP 마커를 발현하는 세포가 연령별 및 계대별 간에 유의적인 차이가 없었다(Table 1). MAP 신경마커를 발현하는 세포는 다른 신경마커들에 발현하는 세포에 비해 상대적으로 적었지만(100% vs. 22~31%), 계대별

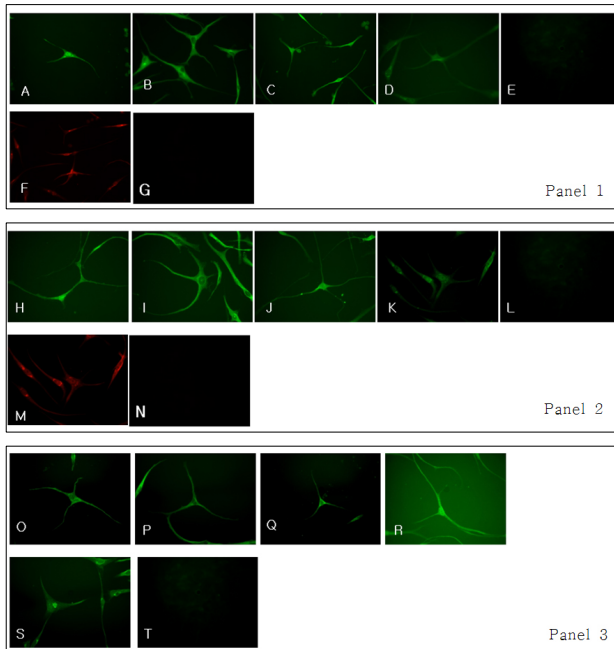


**Fig. 3. Immunofluorescence staining of human adipose mesenchymal stem cells (hAdMSC) at passage 3 after neural differentiation.** Neural differentiation of hAdMSC from age of 30 (Panel 1), 40 (Panel 2) or 50 (Panel 3) was induced for 10 days in the neural induction media and stained with each neural cell marker. After staining with antibodies for NSE (A, H and O), TUJ1 (B, I and P), GFAP (C, J and Q), MAP2 (D, K and R) or Sox2 (F, M and S), cells were visualized with fluorescence of alexa-488 (green) or -568 (red) staining. The control for alexa-488 (E, L and T) and -568 of control (G and N) are the group stained with only the 2<sup>nd</sup> antibody without the primary antibody. Number of fluorescent cells was counted under the microscope at the magnification of 400. Every experiment was performed in triplication.

또는 연령별간에 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다(Table 1).

**4. 연령별 신경 분화의 RT-PCR**

지방 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 세포에서 신경 분화 정도를 비교하기 위하여 RT-PCR 방법을 이용하여 신경 표지자의 유전자 발현 정도를 알아보았다. 실험 결과, 연령별이나 계대별로 신경표지 마커인 NSE 유전자의 발현율이 가장 높았으며, TUJ1, Sox2, MAP2의 유전자 발현율이 순서대로 높게 관찰되었다(Fig. 6A). 이러한 결과를 자세히 분석하기 위해 분자 imaging software Gel Doc(Fuji Film,

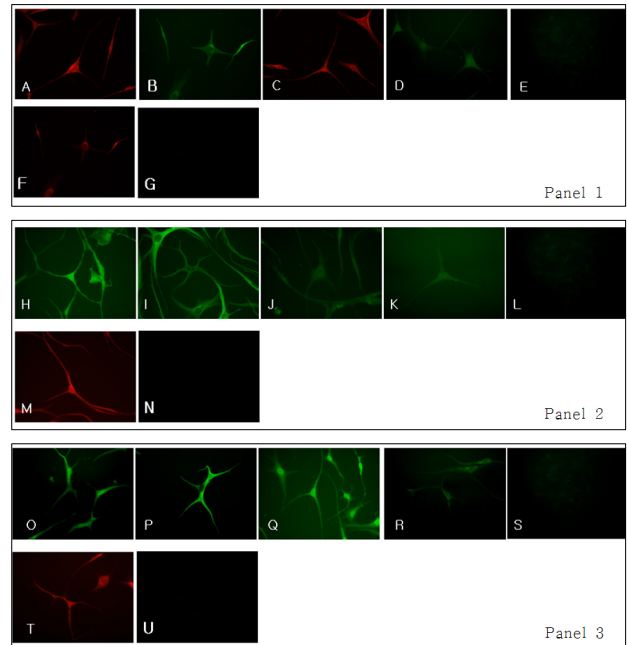


**Fig. 4. Immunofluorescences staining of human adipose mesenchymal stem cells (hAdMSC) at passage 4 after neural differentiation.** Neural differentiation of hAdMSC from age of 30 (Panel 1), 40 (Panel 2) or 50 (Panel 3) was induced for 10 days in the neural induction media and stained with each neural cell marker. After staining with antibodies for NSE (A, H and O), TUJ1 (B, I and P), GFAP (C, J and Q), MAP2(D, K and R) or Sox2 (F, M and S), cells were visualized with fluorescence of alexa-488 (green) or -568 (red) staining. The control for alexa-488 (E, L and T) and -568 of control (G and N) are the group stained with only the 2<sup>nd</sup> antibody without the primary antibody. Number of fluorescent cells was counted under the microscope at the magnification of 400. Every experiment was performed in triplication.

USA)으로 관찰하고, Fuji molecular imaging software(Fuji Film, USA)를 이용하여 각각의 유전자 발현량을 정량한 결과, 계대 3번에서 30대의 NSE 발현률이 50대보다 높게, 계대 4에서는 30대의 NSE와 MAP2의 발현률이 40대와 50대보다 높은 유의성을 나타내었다. 또한 30대의 MAP2와 Sox2 발현률이 40, 50대보다 높게 유의성을 나타내었다(Fig. 6B).

## 고 찰

줄기세포는 다능성 및 전분화성이 있음이 이미 여러 논문



**Fig. 5. Immunofluorescences staining of human adipose mesenchymal stem cells (hAdMSC) at passage 5 after neural differentiation.** Neural differentiation of hAdMSC from age of 30 (Panel 1), 40 (Panel 2) or 50 (Panel 3) was induced for 10 days in the neural induction media and stained with each neural cell marker. After staining with antibodies for NSE (A, H and O), TUJ1 (B, I and P), GFAP (C, J and Q), MAP2 (D, K and R) or Sox2 (F, M and T), cells were visualized with fluorescence of alexa-488 (green) or -568 (red) staining. The control for alexa-488 (E, L and S) and -568 of control (G, N and U) are the group stained with only the 2<sup>nd</sup> antibody without the primary antibody. Number of fluorescent cells was counted under the microscope at the magnification of 400. Every experiment was performed in triplication.

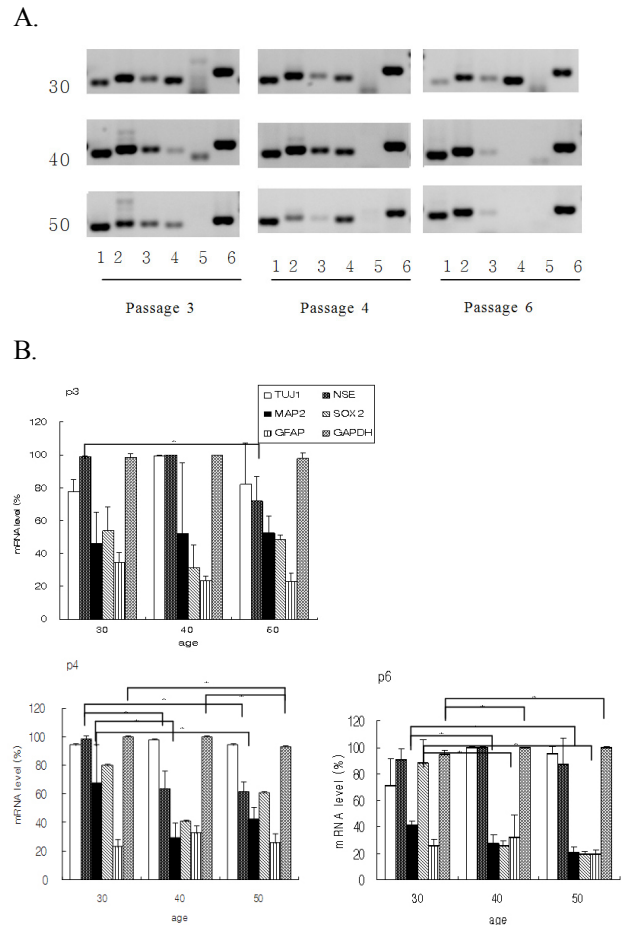
에 증명된 바 있으며, 성체 줄기세포인 중간엽 줄기세포 역시 이러한 특성을 가지고 있어 원하는 특정 세포로 분화할 수 있다고 알려져 있다. 예를 들어, 골수나 혈액 또는 지방으로부터 유래된 중간엽 성체 줄기세포의 경우 다 분화능한 성격을 지니고 있어, 지방, 골, 연골, 근육, 신경으로의 분화와 조직 재생이 가능하다고 알려져 있다(Zuk et al., 2001; Sanchez-Ramos et al., 2000; Ashijan et al., 2003). 성체 줄기세포의 일종인 골수 유래 중간엽 줄기세포와 지방 유래 중간엽 줄기세포는 특성이 비슷하거나 분화 및 자가 증식의 능력이 뛰어난 만큼 손상된 기관의 회복과 세포 재생에도 효과가 있으며,

**Table 1. Quantification of neural marker expression in human adipose mesenchymal stem cells by immunofluorescence staining after neural differentiation induction**

Marker	Passage	Expression (%)		
		30 age	40 age	50 age
NSE	p2	100±0	100±0	100±0
	p4	100±0	100±0	100±0
	p6	100±0	100±0	100±0
TUJ1	p2	100±0	100±0	100±0
	p4	100±0	100±0	100±0
	p6	100±0	100±0	100±0
Sox2	p2	100±0	100±0	100±0
	p4	100±0	100±0	100±0
	p6	100±0	100±0	100±0
MAP2	p2	29±6	31±3	26±2
	p4	28±5	27±2	26±3
	p6	26±2	25±5	22±2
GFAP	p2	100±0	100±0	100±0
	p4	100±0	100±0	100±0
	p6	100±0	100±0	100±0

이식 후 유지 시 매우 뛰어나게 면역계 반응을 잘 조절하고 면역 거부 반응도 적기 때문에 세포 치료제의 목적으로 사용될 가능성이 최근 부각되고 있다. 또한 지방줄기세포는 자가나 동종 이식 시 안정적이고 효과적으로 이식이 가능하다고 보고하였다(Mizuno et al., 2009). 그래서 골수 유래와 지방 유래 중간엽 줄기세포는 당뇨병, 퇴행성 관절염, 대수주성 이식편병, 크론병, 척수 손상, 말기 간 질환, 허혈성 심질환과 같은 여러 질병 치료나 연골 및 근육의 회복, 골 결핍에 대한 조직 재생에도 적용되어질 수 있다고 보고되었다(Chhabra et al., 2009).

줄기세포를 이용하여 세포 치료가 적용한 질병들은 거의 노년층에 많이 분포되어 있는데, 이러한 노령층으로부터 얻어진 줄기세포를 이용하여 자가줄기세포 치료요법을 하려면 노화에 따른 줄기세포의 연구가 필요하다고 할 수 있다. 이러한 이유는 여러 연구결과에 의하면 노화가 진행됨에 따라 줄기세포의 체외 배양상에서 환경적 조건과 어떠한 분화를 유도하느냐에 의해 세포의 배양상 수명이 증가하거나 감소하며, 이것은 텔로미어 길이가 감소하는 비율에 영향을 주는 것으로 확인하였다(Bonab et al., 2006).



**Fig. 6. RT-PCR analysis for neural cell differentiation marker in human adipose mesenchymal stem cells (hAdMSC).** The Gel Doc image after electrophoresis (A) and image quantitation using Image analyzer (B). Neural differentiation of hAdMSC was induced for 10 days in the neural induction media and mRNA of neural cell markers was quantified using image analyzer after RT-PCR. (A), lane to 1 from 6 indicates TUJ1, NSE, MAP2, Sox2, GFAP and GAPDH. (B), RT-PCR analysis showed significantly different. \* $p < 0.05$ . Every experiment was performed at triplication. The data presented as mean  $\pm$  SD.  $p < 0.05$ ,

줄기세포의 세포 치료에 있어서 중요한 요소는 세포수에 있다고 할 수 있는데, 보고(Bonab et al., 2006)에 의하면 세포의 population doubling시 하나의 중간엽 줄기세포로부터 50번의 population 만큼 자라는데 약 10주의 시간이 소요되며, 계대가 증가할수록 텔로미어의 길이는 짧아진다고 한다. 이러한 노화에 따른 줄기세포 능력 비교는 골수 유래 줄기세

포에서 많이 연구되어져 있는 바 한 예로, 어린 쥐와 성인 쥐의 세포의 배양 사이에서 몇 가지 나이에 관련된 세포적이고 분자적인 차이점이 발견됐으며, 이는 세포 배양 시 성인 쥐보다 어린 쥐의 세포가 생착되는 능력과 증식력, 골세포로의 분화 능력이 더 뛰어나다는 결과가 보고되었다(Bonab et al., 2006). 이것은 integrin과 cadherins와 같은 세포 표면 adhesion molecule의 발현이 더 크게 발현하거나 두 군의 중간엽 줄기세포의 population 차이 때문이라고 추측한다. 골수 유래 줄기세포와 마찬가지로 비록 쥐의 지방 유래 중간엽 줄기세포의 연구 결과이지만, 나이에 따라 지방 유래 중간엽 줄기세포의 생물학적 능력들이 관련이 있다는 결과가 보고되었다(Shi et al., 2005).

이에 본 연구는 노화가 진행되면서 발생하는 노인성 신경성 질환의 치료함에 있어 자가 지방 유래 중간엽 줄기세포의 임상적용을 위해 본인의 노화 정도가 줄기세포 특성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 연구 내용으로 나이에 따른 지방줄기세포의 차이를 세포 성장속도, 생존율, 신경 분화 정도를 비교 분석하였다. 지방 조직으로부터 지방 중간엽 줄기세포의 분리와 세포에 대한 검증은 2008년 제주대학교 논문을 통해 확인하였다(라., 2008). 이미 셋업된 방법을 통하여 30대, 40대, 50대의 건강한 사람으로부터 지방 줄기세포를 분리 배양한 다음 계대 0부터 2계대까지 세포 성장 속도와 세포 생존율을 측정하였다. 세포 성장 속도와 증식율을 본 연구에서 계대 2번째까지만 관찰한 이유는 현재 계대 3번째에서 연구용 또는 상업임상에 적용하고 또한 줄기세포를 보관하기 때문에 계대 2까지만 관찰하였다. 하지만 이번 논문에는 데이터를 기술하지 않았지만, 본 연구팀에서 분리배양한 지방중간엽 줄기세포는 12계대까지 세포 생존율 및 증식율이 각 계대마다의 차이가 없었음을 확인하였다. 계대 6번째까지 신경세포로의 분화를 유도한 이유는 추후 더 반복된 계대에서 세포 치료제의 용도로 세포 적용을 고려하여 계대 6번째까지 신경 분화 유도의 안정성을 확인하였다. 먼저 연령별 및 계대별로 처음 분리시부터 계대 2번째까지의 세포수와 그에 따르는 생존율을 측정하였다. 4일 간격으로 계대된 세포의 수는 연령과 계대가 증가함에 따른 차이가 없었으며, 생존율도 차이가 없이 모든 연령과 계대에서 97% 이상의 결과를 보였다. 이러한 결과는 2006년 stem cells 연구논문에서도 비슷한 결과를 밝힌 바 있으며(Honczarenko et al., 2006), 지방 유래 중간엽 줄기세포의 장점으로 앞서 언

급했듯이 세포의 풍부한 양을 얻을 수 있고 골수 유래 중간엽 줄기세포에 비해 증식이 빨라 배양 작업을 최소화 할 수 있다는 것으로 뒷받침하고 있다. 골수 유래 줄기세포는 1 kg의 골수로부터 약 50일 동안 배양하여  $5 \sim 36 \times 10^6$ 개까지의 세포수를 얻을 수 있고, 계대 2번째에서는 population doubling 시간이 24~28시간, 2번째에서는 68~72시간, 계대 16번째에서는 90~180시간이 소요된다고 발표되었다(Honczarenko et al., 2006). 이에 비해 지방 유래 중간엽 줄기세포는 5 g의 지방 조직에서  $5 \sim 6 \times 10^6$ 개의 세포를 추출하여 계대 2번째까지 배양하는데 약 8일이 소요되며,  $7 \sim 9 \times 10^7$ 개의 세포를 얻을 수 있어 치료에 있어 많은 수의 세포를 확보할 수 있는 장점이 있다.

연령별 또는 계대별 세포 성장속도와 생존율의 차이가 관찰되지 않아 신경세포로의 분화 정도의 차이를 알아보았다. 분리 계대 3번째부터 6번째까지 신경세포로 유도한 지방 유래 중간엽 줄기세포는 80% 이상이 신경 분화 유도시 신경세포로 분화되었고, 분화된 세포 모양은 연령별이나, 계대가 빠르거나 늦은 것에 차이 없이 동일하게 신경세포와 같은 모양으로 변화하였으며, 특히 신경세포의 특징인 양극형 방추사(bipolar spindle) 모양과 neurite 주변으로 branching되는 현상을 나타내었다. 육안적인 형태적으로 연령별 및 계대별 신경 분화 정도가 차이가 관찰되지 않아 신경세포 표지 마커의 면역 형광 염색 방법을 통해 연령별, 계대별 차이를 확인해 보았다. 그 결과 연령이 증가에 따른 신경 분화 표지자의 발현 정도에 차이가 없었으며, 연령 및 계대와 관계없이 신경세포 표지자인 TUJ1, NSE와 별아교세포 표지자인 GFAP의 발현이 가장 높았으며, 그 다음으로 Sox2의 발현이 높게 나타났으며, 신경 표지자 MAP2 단백질의 발현이 제일 낮았다. 발현된 세포를 현미경상에서 정량하여 분석한 결과, MAP2를 제외한 나머지 마커들이 관찰한 전체 세포에서 모두 발현하는 반면, MAP2 마커 발현은 22~31%의 세포에서만 발현되었다. 정량을 통해 이러한 신경마커들이 연령별 및 계대별로 차이가 있는지 분석한 결과, 연령별 및 계대별 간에 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 전체 세포 중에 연령별 신경세포 발현 정도의 차이를 더 자세히 분석하기 위해 신경 분화 표지자 발현의 차이를 mRNA 수준에서 보고자 RT-PCR 실험을 실시하였다. 먼저 각각의 연령별로 신경 분화 표지자의 양상을 관찰한 결과, 계대가 진행될수록 연령이 높은 사람으로부터 얻어진 지방줄기세포에서 몇 개의 신경



세포 마커 (NSE, MAP2와 Sox2)의 발현이 젊은 군으로부터 얻어진 세포에서 보다 다소 낮아진 것을 확인할 수 있었다. mRNA 수준에서의 이러한 차이는 나이가 든 사람으로부터 얻어진 지방줄기세포를 실험실 내에서 계대 배양을 오래 하면 신경세포 분화능이 감소할 수도 있을 가능성이 있다는 것으로 생각될 수 있으나 면역형광염색법을 이용한 단백질 분석에는 차이가 없는 것으로 봐서 이러한 것이 mRNA 수준의 차이가 직접적으로 단백질 발현 세포수 차이로 이어지지 않아 신경세포로의 분화능력이 나이 든 사람으로부터 얻어진 세포에서 감소한다고는 말할 수 없을 것으로 사료된다. 한가지 흥미로운 사실은 미분화된 지방줄기세포를 이용하여 신경세포분화 마커의 발현을 mRNA 수준에서 분석한 결과, 분화된 세포보다는 약하지만 신경 세포 마커가 발현되었다 (데이터 생략). 이러한 결과는 양막 상피줄기세포에서 보고 (Miki et al., 2005)된 바와 같이 성체 줄기세포가 내인성으로 mRNA 수준에서 신경세포 마커를 발현하고 있다는 결과가 일치한다. 추후 실험을 통하여 이러한 mRNA의 발현이 단백질 발현으로 이루어지는지에 대해서는 면역형광염색 또는 Western blot 법 등을 통하여 확인할 필요가 있을 것이다.

본 면역 형광 염색 방법과 RT-PCR 방법을 통해 연령별 지방 중간엽 줄기세포가 신경세포로 분화하는 능력을 비교하는 본 연구에서 젊은 연령인 30대에서는 신경세포로의 분화가 더 잘 유도되며 세포의 수명이 증가할수록 세포의 분화능력이 떨어지는 것으로 예측하였으나, 실험 결과 연령별 및 계대별로 신경 분화의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 3~6, Table 1). 이전에 세포 배양 상에서 제공자의 나이에 따른 중간엽 줄기세포의 노화의 영향을 알아본 연구 결과에서도 66세와 18~29세로 선정했으며, 이 연구 결과에서도 제공자의 나이에 따른 분화 정도는 확실한 차이를 발견하지 못했다(Bonab et al., 2006). 이는 63세와 10세 이하 확실한 분화간의 차이를 보인 2003년 Stenderup의 결과와는 달리 연령 대상간 차이가 적기 때문이라고 고찰하고 있다. 이러한 이전의 연구 결과들로 미루어 보면 본 연구도 관찰된 결과가 실제적으로 연령별로 차이가 없는 것인지 아니면 Bonab 등(2006)과 같이 30대, 40대, 50대의 연령대의 격차가 적기 때문인지에 대해서는 추후 연구를 통하여 규명되어야 할 것이다. 또한 노화의 정도를 정확히 확인할 수 있는 텔로미어 연구 결과가 없어 연령별 차이를 확실히 비교할 수는 없으나, 초기 배양부터 118일 배양 기간에 약 9번째 계대까지

배양된 세포의 텔로미어 길이가 약 0.5 Kbp 정도 짧아졌다는 2000년도에 발표된 PNAS 지의 연구(Colter et al., 2000)를 감안할 때 우리의 실험은 단지 약 2달 정도, 계대 6번째 (신경세포 분화 실험)까지만 증식시켰기 때문에 비록 텔로미어 결과를 수행하지 않았지만 텔로미어 상에서도 그 차이가 미비했을 것으로 예측할 수 있다.

요약적으로 본 연구는 각 연령별 지방 유래 중간엽 줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 유도함으로써 나이 든 대상자에게 줄기세포 적용에 관해 문제점은 없는지 연령별 중간엽 줄기세포의 성장속도, 생존율, 신경세포로의 분화 정도를 비교 분석하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 연령이나 계대가 증가함에 세포증식을, 생존율에 있어서 차이가 관찰되지 않았다. 비록 몇 개의 신경세포 마커 발현 정도가 mRNA 수준에 연령별로 차이가 관찰되었으나, 단백질 수준에서는 연령별 및 계대별로 신경세포 마커의 발현의 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 결론적으로 나이 든 사람으로부터 분리 배양된 지방줄기세포를 노인성 질환의 치료를 위해 자가줄기세포를 적용하는 것이 문제가 없을 것으로 사료된다. 하지만 지방 유래 중간엽 줄기세포의 연령별 또는 계대별에 따라 일어나는 신경세포 외의 여러 가지 세포 분화에 대한 차이와 분자적 수준인 텔로미어의 연구를 통해 노화에 따라 일어나는 병인의 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 알앤엘바이오의 연구개발자금의 지원으로 이루어졌습니다.

## 인용문헌

- Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2003) *In vitro* differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111:1922-1231.
- Black IB, Woodbury D (2001) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis* 27:632-636.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M. (2006) Mesenchymal stem cell:

- characteristic and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 44:215-230.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol* 7:14-21.
- Chhabra P, Mirmira RG, Brayman KL (2009) Regenerative medicine and tissue engineering: contribution of stem cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 14:46-50.
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in culture of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3213-3218.
- Deng YB, Yuan QT, Liu XG, Liu XL, Liu Y, Liu ZG, Zhang C (2005) Functional recovery after rhesus monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cell-derived neurons. *Chin Med J* 118, 18:1533-1541.
- Fibble WE, Noort WA (2003) Mesenchymal stem cells hematopoietic stem cell transplantation. *Ann NY Acad Sci* 996:235-244.
- Gordon D, Scolding NJ (2009) Human mesenchymal stem cell culture for neural transplantation. *Methods Mol Biol* 549:103-118.
- Gimble J, Guilak F (2003) Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5:362-369.
- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE (2006) Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24:1030-1041.
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunnell BA (2008) Long term *in vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68:4229-4238.
- Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC (2005) Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 14:92-102.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC (2005) Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 23:1549-1559.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226:507-520.
- Mizuno H (2009) Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 76:56-66.
- Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y (2006) Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thrombo* 13:77-81.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Safford KM, Rice HE (2005) Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr Drug Targets* 6:57-62.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiated into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 164:247-256.
- Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT (2005) The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 116:1686-1696.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassen M (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33:919-926.
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3:2213-2225.
- Williams BA, Keating A (2008) Cell therapy for age-

related disorders: Myocardial infarction and stroke-a mini review. *Gerontology* 54:300-311.

Yuan XD, Yan X, Yang H, Gao ZQ, Li KH, Han Q, Lu S, Chen XW, Jiang H, Zhao CH (2009) *In vitro* study of directional inducible differentiation of inner ear hair cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 44:323-328.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-

based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295.

라정찬 (2008) 계대 배양된 사람 지방 유래 줄기세포의 안정성 및 하지 허혈동물 모델에서 혈관 신생에 관한 연구. 제주대학교, p 99.

---

(received 25 September 2009, received in revised form 5 November 2009, accepted 7 November 2009)