大韓不妊學會誌:第31卷 第1號 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 1, 2004, 3

신경성장촉진 인자가 인간 배아줄기세포 유래 도파민 분비 신경세포형성에 미치는 영향

마리아 기초의학연구소/마리아바이오텍[1], 서울대학교 신경외과학교실[2], 서울대학교 약리학교실[3], 건국대학교[4], 마리아불임병원[5]

이금실[1] · 김은영[1] · 신현아[1] · 조황윤[1] · 왕규창[2] · 김용식[3]
이훈택[4] · 정길생[4] · 이원돈[5] · 박세필[1] · 임진호[5]

Effects of Neurotrophic Factors on the Generation of Functional Dopamine Secretory Neurons Derived from *in vitro* Differentiated Human Embryonic Stem Cells

Keum-Sil Lee[1], Eun Young Kim[1], Hyun Ah Shin[1], Hwang Yoon Cho[1], Kyu Chang Wang[2], Yong Sik Kim[3], Hoon Taek Lee[4], Kil Saeng Chung[4], Won Don Lee[5], Sepill Park[1], Jin Ho Lim[5]

Maria Infertility Hospital Medical Institute/Maria Biotech[1], Seoul National University Department of Neurosurgery[2], Seoul National University Department of Pharmacology[3], Konkuk University[4], Maria Infertility Hospital[5]

Objective: This study was to examine the *in vitro* neural cell differentiation patterns of human embryonic stem (hES) cells following treatment of various neurotrophic factors [basic fibroblast growth factor (bFGF), retinoic acid (RA), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and transforming growth factor (TGF)-α], particulary in dopaminergic neuron formation.

Methods: The hES cells were induced to differentiate by bFGF and RA. Group I) In bFGF induction method, embryoid bodies (EBs, for 4 days) derived from hES were plated onto gelatin dish, selected for 8 days in ITSFn medium and expanded at the presence of bFGF (10 ng/ml) for another 6 days followed by a final differentiation in N2 medium for 7, 14 and 21 days. Group II) For RA induction, EBs were exposed of RA (10^{-6} M) for 4 days and allowed to differentiate in N2 medium for 7, 14 and 21 days. Group III) To examine the effects of additional neurotrophic factors, bFGF or RA induced cells were exposed to either BDNF (10 ng/ml) or TGF-α (10 ng/ml) during the 21 days of final differentiation. Neuron differentiation and dopamine secretion were examined by indirect immunocytochemistry and HPLC, respectively.

Results: The bFGF or RA treated hES cells were resulted in similar neural cell differentiation patterns at the terminal differentiation stage, specifically, 75% neurons and 11% glial cells. Additionally, treatment of hES cells with BDNF or TGF-α during the terminal differentiation stage led to significantly increased tyrosine hydroxylase (TH) expression of a dopaminergic

주관책임자: 박세필, 우) 130-812 서울특별시 동대문구 신설동 103-11, 마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소
Tel: (02) 2250-5653, Fax: (02) 2250-5669, e-mail: sppark@mariababy.com
*본 연구는 보건복지부 바이오보건기술개발사업 우수 핵심사업연구비 (01-PJ10-PG8-01EC01-0010)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

neuron marker, compared to control ($p<0.05$). In contrast, no effect was observed on the rate of mature neuron (NF-200) or glutamic acid decarboxylase-positive neurons. Immunocytochemistry and HPLC analyses revealed the higher levels of TH expression (20.3%) and dopamine secretion (265.5 ± 62.8 pmol/mg) in bFGF and TGF-α sequentially treated hES cells than those in RA or BDNF treated hES cells.

Conclusion: These results indicate that the generation of dopamine secretory neurons from *in vitro* differentiated hES cells can be improved by TGF-α addition in the bFGF induction protocol.

Key Words: Human embryonic stem cell, Neural cell differentiation, Basic fibroblast growth factor, Transforming growth factor-α, Dopaminergic neuron

신경계질환 중 퇴행성 뇌질환은 신경계의 제한된 회복능 때문에 매우 심각한 문제로 대두된다.[1] 최근에, 줄기세포는 파킨슨병, white-matter loss, 척추손상과 같은 퇴행성 뇌질환 치료의 도구로 사용되어질 수 있다고 보고되었다.[2,3] 따라서 배아줄기세포로부터 기능성 도파민 신경세포를 만들어낼 수 있다면 파킨슨병 치료를 위한 세포치료요법 (cell replacement therapy)에 유용하게 이용되어질 수 있다.[4~6] 배아줄기세포는 수정란이 착상되기 전 단계인 포배기 배아 (blastocyst)의 내부세포괴 (inner cell mass)로부터 유래된 다능성 세포 (pluripotent cell)로 분화를 인위적으로 억제하는 조건에서는 미분화상태로 무한하게 증식이 가능하며, 또한 놓여진 분화 환경에 따라 다양한 세포로 분화할 수 있는 잠재력을 갖고 있다.[7,8] 인간 배아줄기세포로부터 신경세포로의 분화에 대한 연구는 인간의 신경세포형성 초기단계를 연구할 수 있을 뿐만 아니라 신경치료요법의 공여 세포원을 무제한적으로 만들어낼 수 있기 때문에 매우 귀중한 연구분야이다.[3] 인간 배아줄기세포의 신경세포로의 분화경향은 retinoic acid (RA)[9,10] 나 다른 신경성장촉진인자들을 포함한 분화 인자들에 의해 상당히 영향을 받는다.[2,3] 생쥐 배아줄기세포 연구에서, 분화 마지막 단계에서 생존을 증진시킬 수 있는 인자들 (IL-1β, GDNF, neurturin, TGF-β3 or db-cAMP)을 첨가하였던 결과, 배아줄기세포로부터 도파민 신경세포의 회수율과 생존율이 유의하게 향상된다는 보고가 있었다.[6] 그러나, 현재까지 인간의 배아줄기세포를 이용한 체외분화 연구에서 파킨슨병 질환치료에 유용하게 이용할 만한 충분한 양의 도파민 신경세포가 생산되었다는 보고가 없다.

따라서, 본 실험의 목적은 본 연구소가 보유하고 있는 미국 NIH에 등록된 MB03 배아줄기세포주에 다양한 신경성장촉진 인자들을 처리하여 신경세포로의 분화경향을 조사하고, 이들 처리방법에 따른 도파민 신경세포 형성율을 조사하는데에 있다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

본 실험에 사용된 MB03 세포 (Figure 1A) 는 인간의 불임시술 과정에서 사용되고 남은 잉여 배아를 5년 이상 동결 보존한 뒤, 환자의 동의를 받고 사용하여 확립되어진 미국 국립보건원에 등록된 인간 배아줄기세포주이다.[11] 이들 세포의 초기배양은 미국 ATCC사에서 구입한 STO (immortalized mouse embryonic fibroblast, CRL-1503) 세포를 250,000 cells/1.77cm^{2}로 준비한 뒤, 그 위에서 10회 계대 배양되었으며, 이때 사용된 줄기세포배양액은 Knockout-Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY)에 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT), 1 mM glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 1% ribonucleosides, 1% non-essential amino acids과 4 ng/ml bFGF를 첨가하였다. 또한, 생쥐세포와의 공동배양에 따른 종간 오염을 줄이기 위해 STO 세포없이 5% Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA)이 코팅된 배양접시에서 영양화배양액 (conditioned medium)으로 10회 추가 계대 배양하였다. 영양화 배양액은 STO

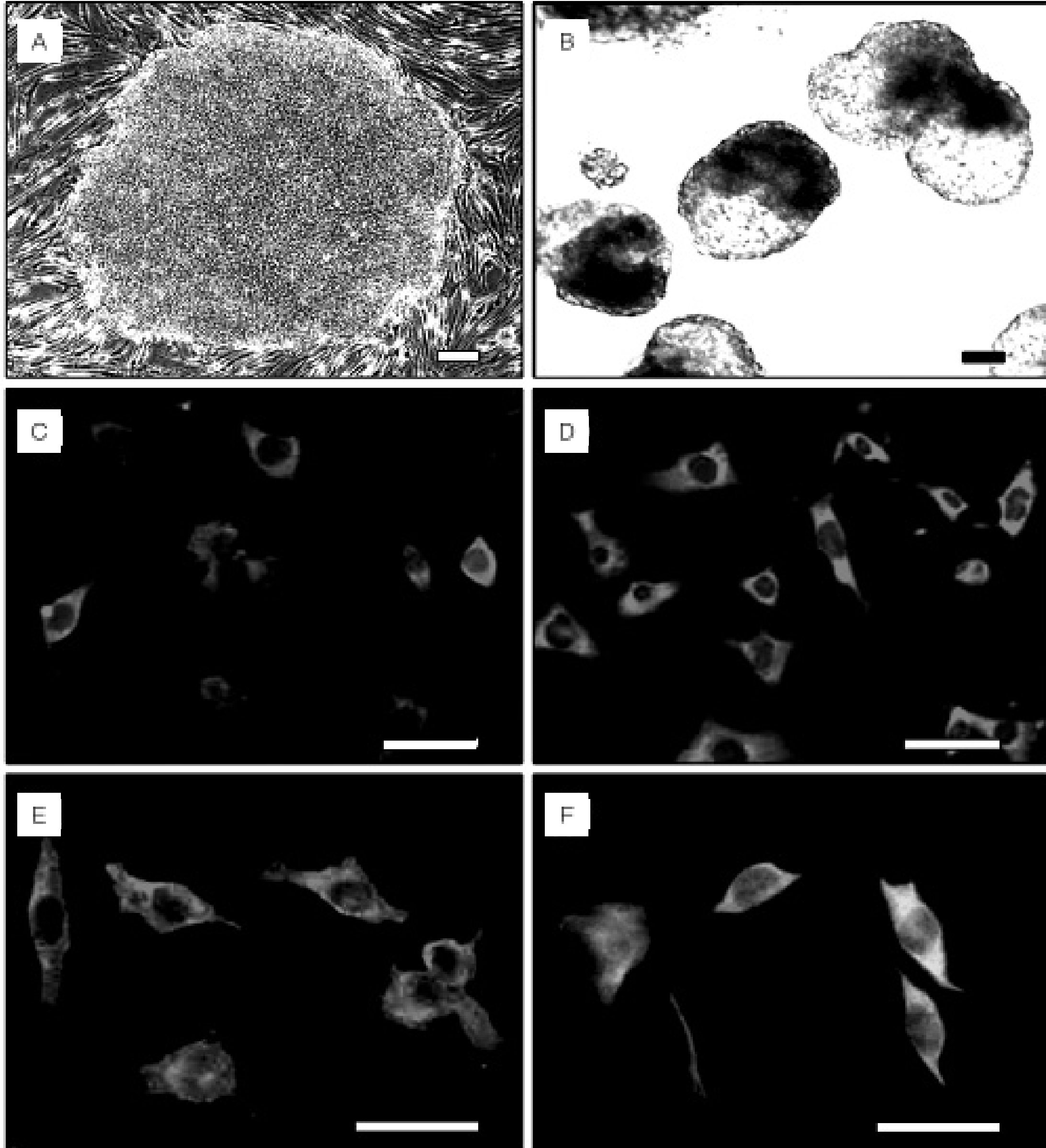

Figure 1. MB03 human embryonic stem (hES) cells and their *in vitro* neural cell differentiation. **(A & B)** Phase morphology of established MB03 hES cells and embryoid bodies.; **(C)** Indirect immunocytochemistry demonstrated positive reactions for neurofilaments (NF) 160 (a marker of immature neurons), **(D)** NF-200 (a marker of mature neurons), **(E)** glial fibrillary acid protein (a marker of astrocytes), **(F)** glutamic acid decarboxylase (a marker of GABAergic neurons. Scale bars = 100 μm.

세포가 들어있는 배양용기 (4×10^6 cells/75 cm^2)에 20% FBS를 대신하여 20% serum replacement (SR; Gibco)가 첨가된 줄기세포 배양액을 사용하여 2일부터 일주일간 매일 배양액을 교체해주면서 수거하였으며, 0.22 μl 필터로 여과한 뒤 줄기세포 배양에 사용하였다.

2. 인간 배아줄기세포의 신경세포로의 분화

인간 배아줄기세포의 신경세포 분화 유도제는 bFGF와 RA를 이용하였다. 또한, 신경세포분화를

더 증진시키고자 brain derived neurotrophic factor (BDNF)나 transforming growth factor (TGF)-α와 같은 신경성장 촉진인자를 첨가하여 그 효과를 조사하였다. 분화 유도를 위해 배아줄기세포는 1차적으로 0.025% trypsin/EDTA로 처리된 후 2회 이상 세척하였으며, bacteriological dish (Falcon, #1007)에 3×10^4 cells/cm^2개의 세포로 넣은 뒤 20% SR이 들어있는 줄기세포 배양액 내에서 4일간 부유 배양하여 3배엽성의 특성을 갖는 embryoid body (EB)로 형성시켰다 (Figure 1B).

1) bFGF에 의한 신경분화

4일령의 EB는 신경전구세포 선별을 위해 먼저 0.1% gelatin이 코팅된 배양접시 (Falcon, #3002) 에 부착시킨 뒤 혈청이 없는 insulin/transferrin/selenium/fibronectin (ITSFn medium; Sigma, Saint Louis, MO) 배양액 내에서 8일동안 배양되었다. 이렇게 배양된 세포는 신경전구세포 증식을 위해 0.025% trypsin/EDTA로 회수되고 2회 이상 세척된 뒤 다시 1 μg/ml laminin (R&D systems Inc, Minneapolis, MN)이 코팅된 glass coverslip에 2×10^5 cells/cm^2의 농도로 부착되어 10 ng/ml bFGF (KOMA biotech Inc. Korea)가 포함된 N2-배양액에서 6일 동안 배양되었다. 그리고 최종적으로 신경세포로의 분화를 위해 bFGF가 제거된 N2-배양액에서 7일, 14일 또는 21일 동안 배양되었다. N2-배양액은 DMEM/F12 배양액에 혈청대신 insulin (5 mg/L, Sigma), putrescine (100 μM, Sigma), sodium selenite (30 nM, Sigma), apo-transferrin (100 μg/ml, Sigma), progesterone (20 nM, Sigma) 이 첨가된 신경분화용 배양액이다.

2) RA에 의한 신경분화

4일령의 EB를 RA (10^{-6}M, Sigma)가 포함된 20% SR 배양액에서 4일동안 추가 부유배양하여 신경전구세포 형성을 유도하였다. 신경세포로의 분화를 위해서는 RA를 제거하고 laminin이 코팅된 glass coverslip에 부착하여 7일, 14일 또는 21일동안 N2-배양액 내에서 배양하였다.

3) 신경성장 촉진인자의 첨가에 따른 신경분화

분화유도제가 제거되고 신경세포로의 분화를 유도하는 N2-배양액만이 처리되는 21일동안에 10 ng/ml BDNF (Chemicon) 또는 10 ng/ml TGF-α (R&D systems Inc)의 첨가가 신경세포의 분화와 기능성 신경세포의 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

3. 면역세포화학염색 (Immunocytochemistry)

신경분화의 정도는 신경세포에서 발현되는 것으로 알려진 단백질에 대한 항체를 사용한 면역세포화학염색 방법을 이용하여 조사하였다. 세포형태의 고정은 4% paraformaldehyde (Sigma)로 10분간 상온처리 하였고, 항체의 세포막 투과를 높이기 위해 0.02% Triton X-100 (Sigma)을 10분간 처리하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위하여 5% normal goat serum (Vector)으로 1시간 동안 상온에서 반응시켰고, 1차 항체의 처리는 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 분화단계에 따른 1차 항체로는 신경세포의 미성숙 단계에서 발현하는 물질에 대한 항체로서 anti-neurofilament 160 (NF 160; monoclonal antibody, 1:4,000, Sigma, Figure 1C), 신경세포의 성숙 단계에서 발현하는 물질에 대한 항체로서 anti-neurofilament 200 (NF200; monoclonal antibody, 1:4,000, Sigma, Figure 1D), 신경 보조세포로 알려져 있는 성상교세포 (astrocyte)에 대한 표지 항체로 anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; polyclonal antibody, 1:500, DAKO, Figure 1E)을 사용하였다. 한편, 기능성 신경세포에 대한 표지 항체로는 도파민 신경세포에 대한 anti-tyrosine hydroxylase (TH; monoclonal antibody, 1:1,000, Chemicon)와 GABAergic 신경세포에 대한 anti-glutamic acid decarboxylase (GAD; 1:4,000, Chemicon, Figure 1F)가 사용되었다. 형광현미경을 이용한 관찰을 위해 2차 항체로는 TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate) conjugated goat anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG (1:800, Jackson Immunoresearch)와 FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated goat anti rabbit IgG (1:200, Jackson Immunoresearch)을 처리하였다. 그리고 마지막으로 모든 시료의 염색 빈도를 좀 더 정확하게 조사하기 위하여 DAPI (4', 6-diamidine-2'phenylindole dihydrochloride, 1:2,000, Roche)염색을 상온에서 1시간 동안 추가적으로 실시하였다. 염색이 끝난 각각의 시료들은 포매하여 그 결과를 Nikon 형광현미경을 이용하여, FITC의 경우 520 nm, TRITC의 경우 630 nm 발광필터에서 관찰하였다. 200배율의 현미경에서 분석 필드는 20군데 이상 조사하였고,

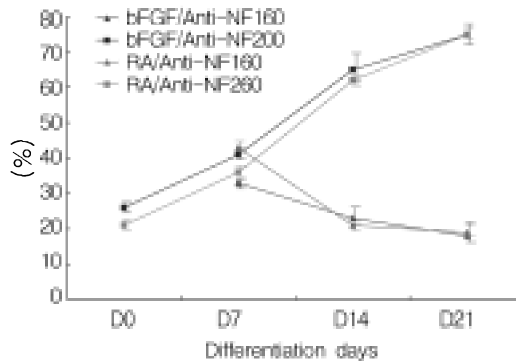

Figure 2. Addition of bFGF or retinoic acid during neural progenitor formation of hES cells induced similar neurofilament (NF) expression patterns. As progress of neuronal differentiation of hES cells, immunostaining for NF200 increased, in contrast to that for NF160.

조사된 총 세포수는 대략 1000개 이상이었으며, 실험의 재현성을 높이기 위하여 각각의 처리군에서 6회 반복 실시하였다.

4. 고성능액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatographic, HPLC)

배아 줄기세포에서 얻어진 신경세포 내 dopamine 양을 측정하기 위하여 HPLC방법을 사용하였다. 시료는 bFGF 분화유도계의 대조군과, BDNF첨가군 그리고 TGF-α 첨가군으로 나누어 조사하였다. 분화 최종단계인 21일 배양일에 대략 5×10^6 세포를 PBS buffer에 한번 세척한 뒤, 원심분리하여 세포괴를 얻고 0.1 mM EDTA 항산화제가 첨가된 0.1M perchloric acid (Sigma-Aldrich, Switzerland)를 첨가하여 초음파 마쇄기 (sonicator)로 세포를 융해시켜 균등액을 제조한 후, 다시 12,000 g에서 10분 원심분리하여 그 상층액을 수획하였다. 상층액은 니트로셀룰로스 막 여과지 (nitrocellulose membrane filter, 0.4 μm)로 여과한 뒤 HPLC (Gilson)에 10 μl의 시료를 주입하였다. HPLC에서 분리된 물질들은 전기화학검출기 (electrochemical detector)로 확인하였다. HPLC 분리조건은 Shiseido C18 column을 사용하고 이동상 (mobile phase)은 0.07 mM sodium phosphate monobasic, 1 mM sodium octanesulfonic acid, 0.1 mM EDTA, 8% acetonitrile (pH 4.0) 용액을 유속 0.7 ml/min으로 사용하였다. 실험수행에 따른 오차범위를 확인하고 도파민 결과수치를 보정하기 위해 균등액 제조시 일정량의 2 μM dihydroxybenzylamine (DHBA; Sigma)를 첨가하여 내부기준 (internal standard)으로 사용하였다.

5. 통계분석

형광발현율 결과의 통계학적 분석은 SAS release 8.02 (TS level 02M0)으로 조사하였고, HPLC 결과는 one-way ANOVA test 후 Mann-Whitney U test를 시행하여 p값이 0.05이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결　　과

1. 분화유도제 처리에 따른 신경세포로의 분화

인간 배아줄기세포를 bFGF 와 RA를 첨가하여 신경전구세포로 유도한 뒤 신경분화용 배양액에서 21일까지 장기간 분화시켰을 때, 분화기간이 길어질수록 성숙 신경세포골격의 중간 미세섬유에서 확인되는 표지 물질인 NF200 양성세포수는 bFGF 처리군의 경우 26.2 ± 2.7% (D0)에서 75.1 ± 4.0% (D21)로, RA처리군의 경우 21.4 ± 2.0% (D0)에서 75.3 ± 2.7% (D21)로 증가되는 반면, 미성숙 신경세포의 성장 단계에서 나타나는 표지인자인 NF160은 bFGF처리군의 경우 33.1 ± 1.3% (D7)에서 18.2 ± 4.2% (D21)로 RA처리군의 경우 43.3 ± 2.2% (D7)에서 19.4 ± 1.3% (D21)로 감소되는 유사한 경향을 나타내어 두 방법 모두 신경세포의 분화에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다 (Figure 2). 또한, 신경보조세포로의 발현 정도를 확인하기 위하여 성상교세포에만 특이적으로 발현하는 중간 미세섬유인 GFAP를 조사하였던 바, 배양 7일에는 30~34%, 배양 14일에는 16~22%, 그리고 배양 21일에는 9~12%로 두 처리군 모두 유사하게 발현율이 감소한다는 것이 확인되어 본 실험에 사용된 분화방법은 신경보조세포로의 분화는 억제되고 신경세포로의 분화가 더 많이 유도된다는 것을 알 수 있었다.

2. 신경전구세포단계에서 신경성장촉진 인자의 첨가가 성숙 신경세포 형성에 미치는 영향

신경성장 촉진인자인 BDNF 또는 TGF-α 를 신경

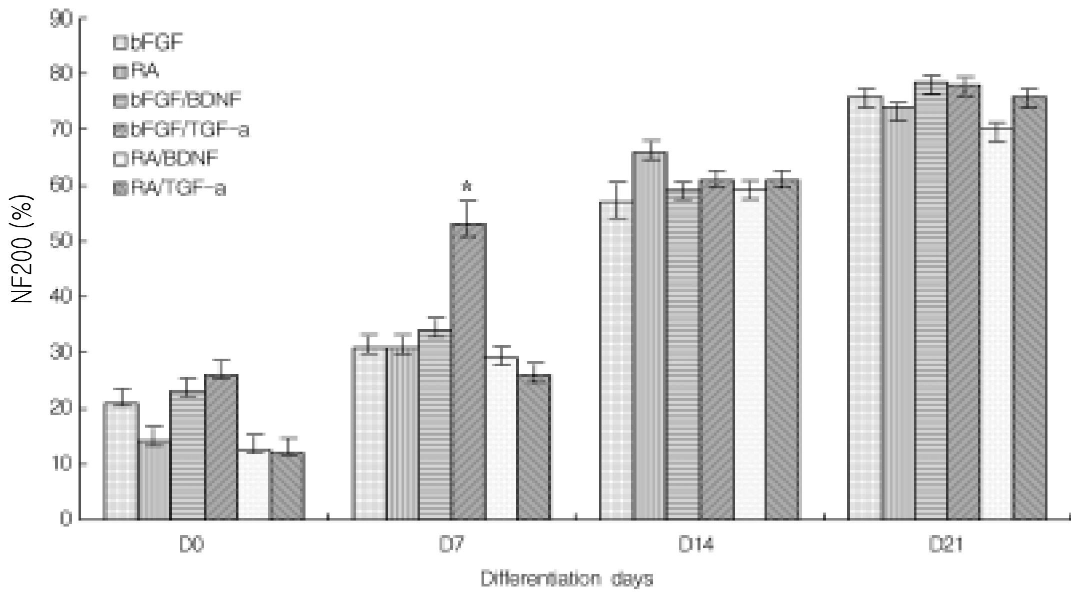

Figure 3. Effects of neurotrophic factors (BDNF and TGF-α) on the *in vitro* differentiation of hES cells. Data are presented as the mean±SD of six independent experiments.
*indicates significantly different from the other treatment groups at day 7 (SAS release 8.02 TS level 02M0, $p < 0.05$)

세포로 분화시키는 21일 동안에 첨가하여 NF-200을 기준으로 비교 조사하였던 결과, 최종단계인 21일째 bFGF 유도군에서 78.1 ± 2.7%과 78.4 ± 3.3%을 나타내고 RA 유도군에서 70.3 ± 1.2%와 76.1 ± 2.7%를 각각 나타내어 비 첨가군과 (bFGF; 76.2 ± 2.3%, TGF-α; 74.2 ± 2.0%) 유의한 차이 없는 유사한 NF-200의 증가를 확인하였다 (Figure 3). 그러나 분화 7일째 bFGF 유도군 중 TGF-α를 처리한 군 (53.4 ± 5.5%)의 결과가 다른 군들 (26.2 ± 2.7%~ 34.3 ± 1.7%)보다 유의하게 높게 나타나 ($p<0.05$), bFGF로 신경분화를 유도하고 TGF-α를 추가적으로 처리하는 것이 신경세포로의 분화가 좀 더 빠르게 진행됨을 알 수 있었다.

3. 분화조건에 따른 기능성 신경세포 분화

신경분화 시스템에서 최종적으로 획득된 신경세포가 퇴행성 뇌질환 세포치료에 접근가능한지의 여부를 알아보기 위하여 면역세포화학적 염색방법을 이용해 도파민성 신경세포로의 분화정도를 TH 발현세포의 빈도로 확인하였다. 그 결과 두 분화 유도방법에서 공통적으로 BDNF또는 TGF-α를 처리하는 것이 유의하게 TH발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있었으며 ($p<0.05$) 두 분화 유도군간에 있어서는 유의한 차이는 나타나지 않으나, bFGF 유도군이 RA 유도군 보다 분화 유도되는 기간 내내 지속적으로 TH 발현율이 높다는 것을 알 수 있었다 (Figure 4). 특히 bFGF 유도군 안에서도 TGF-α 처리군 (D7; 14.0 ± 2.7%, D14; 16.2 ± 2.7%, D21; 20.4 ± 2.3%)이 BDNF 처리군 (D7; 9.2 ± 2.2%, D14; 11.3 ± 3.2%, D21; 16.2 ± 2.3%)과 대조군 (D7; 3.4 ± 1.7%, D14; 5.2 ± 1.8%, D21; 9.3 ± 2.3%) 보다 TH 발현세포의 빈도가 높다는 것을 알 수 있었다. 한편, GABAergic 신경세포의 표지인자인 GAD 발현율은 배양 21일째 26~30%로 유사하게 나타나 BDNF나 TGF-α의 첨가에 의해 크게 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

4. 고성능 액체크로마토그래피에 의한 도파민 검출 확인

TH발현율이 높은 bFGF유도군의 dopamine 생성을 HPLC 방법으로 확인하였던 바, BDNF (151.4 ± 36.5 pmol/mg)와 TGF-α (265.5 ± 62.8 pmol/mg)를 처리한 군의 결과가 대조군의 결과 (52.3 ± 8.4 pmol/mg)에 비해 유의하게 높게 나타나는 것을 확인하였다

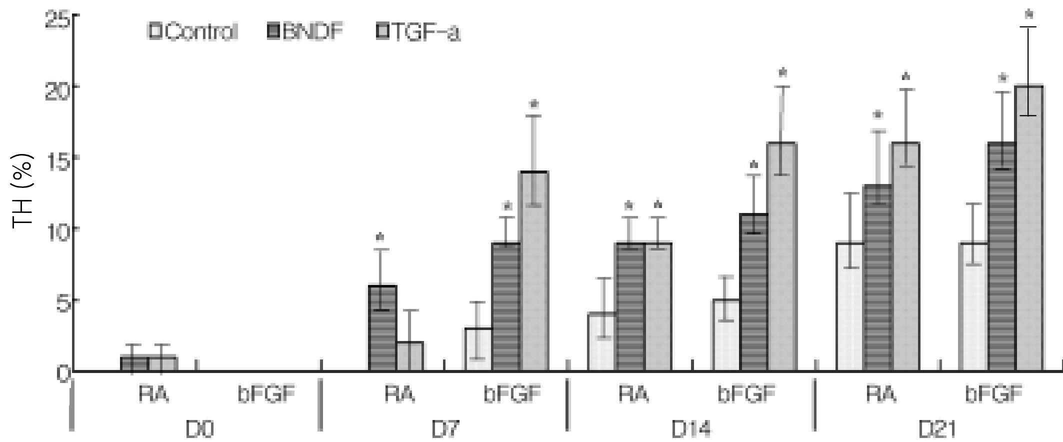

Figure 4. TH expression from *in vitro* differentiated hES cells, following RA or bFGF induction, and BDNF or TGF-α treatment, respectively. Data are presented as mean±SD of six independent experiments.
* indicates significantly differences different in the values obtained from the control group in the same induction method and culture days ($p<0.05$).

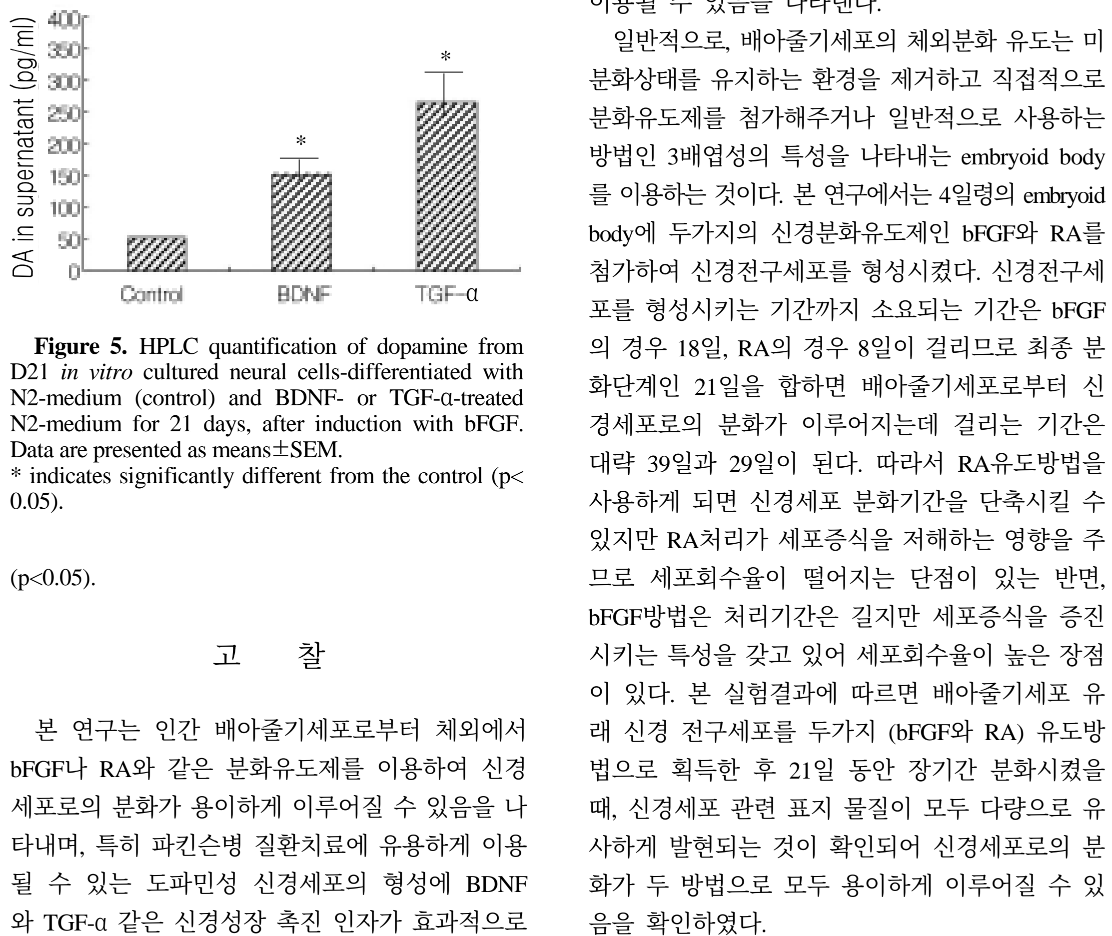

Figure 5. HPLC quantification of dopamine from D21 *in vitro* cultured neural cells-differentiated with N2-medium (control) and BDNF- or TGF-α-treated N2-medium for 21 days, after induction with bFGF. Data are presented as means±SEM.
* indicates significantly different from the control ($p<0.05$).

($p<0.05$).

고　　찰

본 연구는 인간 배아줄기세포로부터 체외에서 bFGF나 RA와 같은 분화유도제를 이용하여 신경세포로의 분화가 용이하게 이루어질 수 있음을 나타내며, 특히 파킨슨병 질환치료에 유용하게 이용될 수 있는 도파민성 신경세포의 형성에 BDNF와 TGF-α 같은 신경성장 촉진 인자가 효과적으로 이용될 수 있음을 나타낸다.

일반적으로, 배아줄기세포의 체외분화 유도는 미분화상태를 유지하는 환경을 제거하고 직접적으로 분화유도제를 첨가해주거나 일반적으로 사용하는 방법인 3배엽성의 특성을 나타내는 embryoid body를 이용하는 것이다. 본 연구에서는 4일령의 embryoid body에 두가지의 신경분화유도제인 bFGF와 RA를 첨가하여 신경전구세포를 형성시켰다. 신경전구세포를 형성시키는 기간까지 소요되는 기간은 bFGF의 경우 18일, RA의 경우 8일이 걸리므로 최종 분화단계인 21일을 합하면 배아줄기세포로부터 신경세포로의 분화가 이루어지는데 걸리는 기간은 대략 39일과 29일이 된다. 따라서 RA유도방법을 사용하게 되면 신경세포 분화기간을 단축시킬 수 있지만 RA처리가 세포증식을 저해하는 영향을 주므로 세포회수율이 떨어지는 단점이 있는 반면, bFGF방법은 처리기간은 길지만 세포증식을 증진시키는 특성을 갖고 있어 세포회수율이 높은 장점이 있다. 본 실험결과에 따르면 배아줄기세포 유래 신경 전구세포를 두가지 (bFGF와 RA) 유도방법으로 획득한 후 21일 동안 장기간 분화시켰을 때, 신경세포 관련 표지 물질이 모두 다량으로 유사하게 발현되는 것이 확인되어 신경세포로의 분화가 두 방법으로 모두 용이하게 이루어질 수 있음을 확인하였다.

분화유도제 bFGF는 mesenchymal, neuroectodermal과 endothelial 등 다양한 세포의 증식에 관여하는 인자이며 불멸화된 hypothalamic 신경세포들의 분화와 성숙에 관여한다고 알려져 있다.[12] 이러한 발견은 bFGF가 신경세포형성 (neurogenesis) 에 영향을 준다는 보고와도 일치된다.[2,3] 한편, 또다른 분화유도제 RA는 쥐의 배아줄기세포와 배아종양세포 연구에서 처리하는 농도와 분화 시간에 따라 신경,[13] 심근,[14] 근육,[15] 지방,[16] 그리고 혈관근육[17]으로 유도할 수 있다고 보고되었다. 그리고 RA는 배아줄기세포의 신경발달과 성숙신경세포의 생산을 증진시키고 도파민이나 세로토닌 수용체 (receptor)를 발현시켜 신경돌기 복합체 형성에 관여한다고 알려져 있다.[10]

또한 최종 분화단계에서 신경성장촉진 인자나 cytokine 등은 도파민 신경세포의 생존을 유의하게 증가시키는 효과가 있다고 알려져 있다.[6] BDNF는 신경의 발달과 다형성 (plasticity)에 기능하며 중추신경계의 줄기세포유래 신경전구세포가 신경세포와 신경보조세포로 분화되는데에 작용하는 것으로 보고되었다.[18,19] TGF-α는 외배엽 그리고 중배엽기원의 세포분열에 기여하고 축색의 생장과 중추신경계 유래 미성숙 및 성숙 신경세포의 분화과정 대사에 관여한다고 보고되었다.[14,20] 본 실험에서 bFGF나 RA를 제거하고 분화 21일 동안 신경분화용 배양액인 N2-배양액에 신경성장 촉진인자를 첨가하였을 때에도 신경세포로의 분화는 대조군과 유사한 분화빈도를 나타낸다는 것이 NF-200 양성세포의 빈도수조사를 통해 확인되었다. 그러나 bFGF 분화유도군 중 TGF-α 처리군의 신경분화는 다른 처리군에 비해 유의하게 빠르게 이루어짐을 알 수 있었으며, 이러한 경향은 TH 발현빈도조사에서도 증명되었다. 각 분화유도군 그리고 신경성장촉진인자 처리군을 포함한 총 6군의 TH 발현율을 조사하였던 결과, RA 유도군보다는 bFGF 유도군에서 발현율이 높으며 신경성장촉진인자 처리군이 대조군보다 유의하게 TH 발현율이 높게 나타났다. 그리고 신경성장촉진 인자중에서도 TGF-α 처리군의 결과가 BDNF 처리군의 결과보다 높게 나타나, 본 실험에서 인간 배아줄기세포유래 신경세포분화는 bFGF방법으로 신경분화를 유도하고, 분화단계 21일동안 TGF-α를 N2-배양액에 첨가하였을 때 대조군에 비해 2배 이상의 (20%) 의 도파민 신경세포를 형성시킬 수 있다는 것을 TH발현율을 통해 확인하였다. 또한, 세포내 도파민양을 HPLC방법을 통해 조사하였던 바, 앞선 내용과 일치하게 bFGF로 유도하고 TGF-α를 처리한 군에서 유의하게 높은 것을 알 수 있었다.

태아, 신생아 또는 성체 줄기세포들의 일차배양으로부터 도파민 신경세포의 생산 효율은 매우 낮아 그들을 치료목적의 공여세포로 사용하는데는 제한적이다. 그러므로, 인간 배아줄기세포로부터 도파민신경세포로의 분화는 세포 이식이나 조직 재생과 같은 방식으로 파킨슨병을 치료해보고자 하는 새로운 시도를 위한 치료방법의 중요한 요인으로 많은 관심을 집중시키고 있다.[21] 배아줄기세포의 신경세포로의 분화는 RA와 bFGF와 같은 인자들에 의해 증진될 수 있지만, 이들 인자는 비-신경계열 세포로의 분화도 유도한다.[7] 다양한 질환 각각에 적합한 세포로의 분화 및 이들 세포의 순도를 증진시키는 것은 세포치료를 목적으로 하는 모든 세포분화 연구분야의 공통되는 목표이다.

따라서, 본 실험에서 인간 배아줄기세포유래 신경세포 분화는 bFGF 분화유도제를 사용하고 TGF-α 신경성장촉진인자를 첨가시키는 분화방법에 의해 파킨슨병 질환치료에 도움이 되는 TH를 발현하는 기능성 도파민 신경세포의 생성율을 높일 수 있다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Isacson O. The production and use of cells as therapeutic agents in neurodegenerative diseases. Lancet Neurol. 2003; 2(7): 417-24.
2. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotech 2001; 19: 1129-33.
3. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. Nat Biotech 2001; 19: 1134-40.

4. Kim JH, Auerbach JM, Rodrigues-Gomez JA, Velasco I, Gavi D, Lumesky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature 2002; 418: 50-6.
5. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, Mckay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotech 2000; 18: 675-9.
6. Rolletschek A, Chang H, Guan K, Czyz J, Meyer M, Wobus AM. Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. Mech Dev 2001; 105: 93-104.
7. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 11307-12.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
9. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. Exp Neurology 2001; 172: 383-97.
10. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. Brain Research 2001; 913: 201-5.
11. NIH Human Embryonic Stem Cell Registry. National Institutes of Health. USA. http://stemcells.nih.gov/registry/ eligibilityCriteria.asp
12. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocr Rev. 1987; 8(2): 95-114.
13. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. Dev Biol 1995; 168: 342-57.
14. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusodal, atrial and ventricular cell types. Mech Dev 1993; 44: 41-50.
15. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differen tiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. Dev Biol 1994; 164: 87-101.
16. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G, Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*. J Cell Sci 1997; 110: 1279-85.
17. Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase,H, et al. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells a retinoic acid and db-cAMP *in vitro* differentiation model. FASEB J 1997; 11: 905-15.
18. Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. J Neurosci 1995; 15: 5765-78.
19. Murphy DD, Cole NB, Segal M. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11412-7.
20. Schreiber AB, Winkler MW, Derynck R. Transforming growth factor-a: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science 1986; 232: 1250-3.
21. Svendsen CN, Smith AG. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. Trends Neurosci 1999; 22: 357-64.