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

Tyrosine Hydroxylase 유전자가 주입된 인간 배아줄기세포의 체외 신경세포 분화

마리아 기초의학연구소/마리아바이오텍[1], 서울대학교 약리학교실[2], 마리아불임병원[3]

신현아[1] · 김은영[1] · 이금실[1] · 조황윤[1] · 김용식[2] · 이원돈[3] · 박세필[1*] · 임진호[3]

In vitro Neural Cell Differentiation of Genetically Modified Human Embryonic Stem Cells Expressing Tyrosine Hydroxylase

Hyun Ah Shin[1], Eun Young Kim[1], Keum Sil Lee[1], Hwang Yoon Cho[1], Yong Sik Kim[2], Won Don Lee[3], Sepill Park[1*], Jin Ho Lim[3]

Maria Infertility Hospital Medical Institute/Maria Biotech[1], Seoul National University Dept. of Pharmacology[2], Maria Infertility Hospital[3]

Objective: This study was to examine in vitro neural cell differentiation pattern of the genetically modified human embryonic stem cells expressing tyrosine hydroxylase (TH).

Materials and Methods: Human embryonic stem (hES, MB03) cell was transfected with cDNAs cording for TH. Successful transfection was confirmed by western immunoblotting. Newly transfected cell line (TH#2/MB03) was induced to differentiate by two neurogenic factors retinoic acid (RA) and b-FGF. Exp. I) Upon differentiation using RA, embryoid bodies (EB, for 4 days) derived from TH#2/MB03 cells were exposed to RA (10^{-6} M)/AA (5×10^{-2} mM) for 4 days, and were allowed to differentiate in N2 medium for 7, 14 or 21 days. Exp. II) When b-FGF was used, neuronal precursor cells were expanded at the presence of b-FGF (10 ng/ml) for 6 days followed by a final differentiation in N2 medium for 7, 14 or 21 days. Neuron differentiation was examined by indirect immunocytochemistry using neuron markers (NF160 & NF200).

Results: After 7 days in N2 medium, approximately 80% and 20% of the RA or b-FGF induced Th#2/MB03 cells were immunoreactive to anti-NF160 and anti-NF200 antibodies, respectively. As differentiation continued, NF200 in RA treated cells significantly increased to 73.0% on 14 days compared to that in b-FGF treated cells (53.0%, $p<0.05$), while the proportion of cells expressing NF160 was similarly decreased between two groups. However, throughout the differentiation, expression of TH was maintained (~90%). HPLC analyses indicated the increased levels of L-DOPA in RA treated genetically modified hES cells with longer differentiation time.

Conclusion: These results suggested that a genetically modified hES cells (TH#2/MB03)

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.

could be efficiently differentiated in vitro into mature neurons by RA induction method.

Key Words: Human embryonic stem cell, TH, Differentiation, RA, b-FGF

Parkinson's disease (PD)는 중뇌 내 학질부위에 위치한 도파민성 신경세포의 점진적인 퇴화로 인하여 선조체로의 도파민 분비가 결여되어 발병하는 퇴행성 신경 질환 이다.[1] 이 질병 치료 시 가장 우선적으로 사용되는 방법으로는 blood-brain-barrier를 자유롭게 드나드는 도파민 전구물질인 L-dopa를 보충하는 것이다. 그러나 이러한 처방은 질병 초기단계의 motor symptoms은 완화시킬 수 있으나, 장기간 사용했을 경우 부작용이 발생하는 단점이 있다. 보다 나은 근원치료를 위하여 도파민 생합성의 rate-limiting enzyme으로 작용하는 tyrosine hydroxylase (TH)을 발현하는 분화된 세포를 이용하면 화학치료 (chemotherapeutics)시 발생될 문제를 해결할 수 있다. 태아 뇌조직의 세포 이식은 가장 효과적인 방법으로 인식되어지지만, 다수의 환자에게 이용되는 데에는 수급 및 윤리적인 문제가 따라주지 못하는 문제점을 안고 있다.[2] 한편, TH를 발현하도록 유전적으로 변형시킨 세포를 이식하는 것은 PD치료의 또 다른 대안으로 이용 가능하다.[3] 실험적으로는 TH 운반체로 viral vector 또는 lipid-based vectors 등의 다양한 vectors가 이용되었지만 이식 후 TH가 오랫동안 유지되지 않는다고 보고되었다.[4] 한편, 착상전 배아의 내배엽 세포에서 유래되어 다능성 (pluripotency)을 보유한 배아줄기세포는 태아 뇌조직을 대신하여 이용할 수 있는 재료원으로 간주되고 있다.[5~6] 배아줄기세포는 분화조건에 따라 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있다. 최근 10여 년간의 연구결과로 배아줄기세포로부터 신경세포로 분화시키는 연구는 많은 성과가 이루어져 왔으나,[7~11] 특히 Zhang 등[12]은 인간 배아줄기세포로부터 TH를 발현하는 신경세포로의 분화가 극히 저조하며 또한 Reubinoff 등[13]은 GABA 나 Glutamate 신경세포로의 분화는 분화된 신경세포의 35%와 15%를 차지한 반면 상대적으로 TH의 발현율은 <1%으로 극히 저조함을 보고하였다.

따라서 본 연구는 TH유전자가 주입된 인간 배아줄기세포 주를 생산하여 여기에 신경세포 유도 물질인 retinoic acid (RA)와 basic fibroblast growth factor (b-FGF)를 이용하여 체외 분화시킴으로써 TH가 발현되는 다수의 신경세포 생산이 가능한지를 조사하고, 이들 분화된 세포가 L-DOPA를 보유하고 있는 유용한 세포인지의 여부를 조사하고자 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상 및 인간 배아줄기세포의 배양

본 실험에 사용된 MB03세포는 인간의 불임시술 과정에서 사용되고 남은 잉여 배아를 5년 이상 동결 보존한 뒤, 환자의 동의를 받고 사용하여 확립되어진 미국 국립보건원에 등록된 인간 배아줄기세포 주 이다.[14] MB03 인간배아줄기세포는 초기 배양 10계대까지 misogynic C를 처리한 STO (ATCC CRL-1503, 250,000 cells/1.77cm^2, #3653, Becton Dickinson, NJ, USA)세포 feeder 위에서 Knockout-Dulbecco's modified Eagle's medium (KO-DMEM; Gibco, Grand Island, New York)에 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT), 1 mM glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 1% ribonucleosides, 1% non-essential amino acids (NEAA)과 4 ng/ml b-FGF가 첨가된 줄기세포 배양액으로 배양된 뒤 생쥐세포와의 공동배양에 따른 종간 오염을 줄이기 위해 STO 세포 없이 5% Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA) 이 코팅된 배양접시에서 영양화 배양액 (conditioned medium)으로 10회 추가 계대 배양된 것이다.

2. TH 유전자를 MB03 인간배아줄기세포에 주입

먼저 유전자를 주입할 MB03세포를 대략 5×10^{4}개로 10 cm 배양접시 (Falcon # 3003)에 심는다. 다음날 pcDNA3.1 vector에 실려있는 6 μg의 TH cDNA를 restriction enzyme으로 잘라 linearize시키고 FuGene 6 (Pharmacia)와 혼합하여 MB03세포가 들어있는 배양접시에 넣는다. 24시간 후 배양액은

유전자가 주입된 세포만을 선별하기 위해 neomycin (250 μg/ml)이 첨가된 배양액으로 갈아 준다. 배양에서 관찰된 콜로니 (colony)는 subcloning cylinder (Fisher)를 이용하여 각각 구분하고, 증식된 콜로니만의 배양을 위해 각각의 콜로니는 4-well dish (Nunc)에 옮겨 배양하며 3 cm dish (Falcon, #3001), 6 cm dish (Falcon, #3002) 그리고 10 cm dish로 옮겨가며 대량 배양하였다. 배양 후 일부의 세포는 동결을 실시하고 일부는 계속 유지하면서 TH 유전자가 MB03 세포 내에 잘 주입되어 있는지의 여부를 조사하기 위해 western blotting과 면역세포화학염색법 (immunocytochemistry)을 실시하였다.

3. Western blotting에 의한 유전자 전이 확인

유전자 주입처리 후 배양된 MB03세포에 TH 유전자가 들어있는지의 여부를 조사하기 위해, 획득된 세포는 Nonidet P-40 buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 100 μM PMSF] 50 μl에 넣어 lysis 시킨다. Bradford (Bio Rad) 방법으로 시료 내 단백질을 정량하고, 동량의 2X SDS western 시료 buffer [130 mM Tris (pH 6.8), 20% glycerol, 4.6% SDS, 10% mercaptoethanol] 을 첨가한 다음 5분간 끓인다. 동일량의 단백질을 10% SDS-PAGE 젤의 각 well에 걸어 전기영동을 실시한 다음, PVDF membrane에 transfer하고 anti-TH antibody (Chemicon)와 5% skim milk 가 들어있는 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 (TBST) 완충용액으로 blotting을 실시하였다. TBST 완충용액에서 세척하고, transfer membrane은 실온에서 HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody에 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 다시 TBST 용액으로 세척하였다. 단백질 band 결과는 chemiluminiscence (ECL, Amersham)로 확인하고 X-ray film에 노출하였다.

4. TH 유전자가 들어있는 인간 배아줄기세포의 신경세포 분화

분화 유도를 위해 배아줄기세포는 0.025% trypsin/EDTA로 처리한 후 2회 이상 세척하여, bacteriological dish (Falcon, #1007)에 대략 3×10^4 cells/cm^{2}개의 세포를 넣어 20% serum replacement (SR)이 들어있는 줄기세포 배양액 내에서 4일간 부유 배양하여 3배엽성의 특성을 갖는 embryoid body (EB)를 형성시켰다. 신경세포 분화 유도제는 b-FGF와 RA를 이용하였다. RA에 의한 신경분화를 위해서, 4일령의 EB는 RA (10^{-6} M, Sigma)와 ascorbic acid (5×10^{-2} M, Sigma)가 함유된 20% SR 배양액에서 4일 동안 추가 부유 배양하여 신경전구세포 형성을 유도하였다. 신경세포로의 분화를 위해서 EB는 0.025% trypsin/EDTA 로 처리한 후 2회 세척하고 1 μg/ml laminin (R&D systems Inc, Minneapolis, MN)이 코팅된 glass coverslip에 2×10^5 cells/cm^{2}의 농도로 부착되어 7일, 14일 또는 21일 동안 N2배양액 내에서 배양하였다. N2배양액은 DMEM/F12 배양액에 혈청대신 N2 첨가물인 insulin (Sigma, 5 mg/L), putrescine (Sigma, 100 μM), sodium selenite (Sigma, 30 nM), apo-transferrin (Sigma, 100 μg/ml), progesterone (Sigma, 20 nM)이 첨가된 신경분화용 배양액이다. 또한 b-FGF를 이용한 신경분화에서, 4일령의 EB는 신경전구세포 선별을 위해 먼저 0.1% gelatin이 코팅된 배양접시에 부착시킨 뒤 혈청이 없는 insulin/transferrin/selenium/fibronectin (ITSFn medium; Sigma, Saint Louis, Missouri) 배양액 내에서 8일 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 세포는 신경전구세포 증식을 위해 0.025% trypsin/EDTA로 회수되고 2회 이상 세척된 뒤 다시 1 μg/ml laminin이 코팅된 glass coverslip에 부착하여 10 ng/ml b-FGF (KOMA biotech Inc.)가 포함된 N2 배양액에서 6일 동안 배양하였다. 그리고 최종적으로 신경세포로의 분화를 위해 b-FGF가 제거된 N2 배양액에서 7일, 14일 또는 21일 동안 배양하였다.

5. 면역세포 화학 염색방법을 이용한 TH 발현 및 신경세포유도 확인

세포형태의 고정은 4% paraformaldehyde (Sigma)로 10분간 상온처리 하였고, 항체의 세포막 투과를 높이기 위해 0.02% Triton X-100 (Sigma)을 10분간 처리하였다. 비 특이적 결합을 방지하기 위하여 5% normal goat serum (Vector)으로 1시간 동안 상온에서 반응시켰고, 1차 항체의 처리는 4℃에서 overnight로 반응시켰다. 1차 항체로는 신경세포의 미성숙 단계에서 발현하는 물질에 대한 항

체로서 anti-neurofilament 160 (NF 160; monoclonal antibody, 1:4,000, Sigma, Figure 2 A-C), 성숙 단계에서 발현하는 물질에 대한 항체로서 anti-neurofilament 200 (NF200; monoclonal antibody, 1:4,000, Sigma, Figure 2 D-F), TH발현을 조사하기 위해 anti-TH (1:1000, Chemicon)를 사용하였다. 형광발현을 조사하기 위한 2차 항체로는 Rhodamine (TRITC)-Conjugated Affini Pure F(ab')2 Fragment Goat Anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Imunoresearch, 1:800)을 처리하였다. 그리고 총 세포에서 염색된 세포의 비율을 효율적으로 검토하기 위해 DAPI (4', 6-diamidine-2'phenylindole dihydrochloride, 1:2,000, Roche) 염색을 상온에서 1시간 동안 추가적으로 실시하였다. 염색이 끝난 각각의 sample들은 mounting하여 590nm TRITC 발광필터가 장착된 Nikon 형광 현미경 하에서 분석하였다.

6. 고성능액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatographic, HPLC)

TH 유전자가 주입된 배아 줄기세포에서의 L-DOPA 양을 측정하기 위하여 HPLC 방법을 사용하였다. 분화 후 7, 14, 21일 배양 일에 대략 5×10^6 세포를 PBS buffer에 한번 세척한 뒤, 원심 분리하여 세포괴를 얻고 0.1 mM EDTA 항산화제가 첨가된 0.1 M perchloric acid (Sigma-Aldrich, Switzerland)를 첨가하여 초음파 마쇄기 (sonicator)로 세포를 lysis시켜 균등액을 제조한 후, 다시 12,000 g에서 10분 원심 분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액은 니트로셀룰로스 막 여과지 (nitrocellulose membrane filter; 0.4 μm)로 여과한 뒤 HPLC (Gilson)에 주입하였다. HPLC에서 분리된 물질들은 전기화학검출기 (electrochemical detector)로 검출하였다. 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.

7. 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 각각 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 유전자 주입된 인간 배아줄기세포에서 TH 단백질의 발현

pcDNA3.1 vector를 이용한 TH 유전자 주입결과, 9개의 유전자 주입된 인간배아줄기세포 콜로니가 선별되었고, 그 중 2개 (TH#2/MB03, TH#8/MB08)의 콜로니에서 TH 단백질이 발현되는 것을 western blotting으로 확인하였다. 또한, 본 실험에 사용된 TH#2/MB03 세포의 TH 단백질 발현을 면역세포화학염색법으로 조사하였을 때, 대조군인 MB03세포에서는 TH 발현이 확인되지 않은 반면 유전자 주입된 TH#2/MB03 대부분의 세포에서 TH가 발현하는 것을 확인하였다.

2. TH#2/MB03 세포의 체외 신경세포로의 분화유도

TH#2/MB03 세포를 RA또는 b-FGF를 첨가하여 신경전구세포로 유도한 뒤 신경분화용 배양액에서 21일까지 장기간 분화시켰다. 세포 내 TH 발현이 분화 과정 중에도 지속되는지 확인하기 위해 TH 염색을 실시 하였을 때, Figure 1에 나타낸 바와 같이 분화가 진행되는 21일 동안에도 80~90% 이상의 세포에서 TH가 발현되고 있음이 확인되었다. 한편, b-FGF를 이용한 신경세포 분화에서 미성숙 신경세포의 성장 단계에서 나타나는 표지인자인 NF160은 7일째 70.0% 세포에서 확인되다가 14일과 21일째에 각각 51.0%와 29.8%로 감소되는 경향을 나타낸 반면 (Figure 1), 성숙 신경세포골격의 중간 미세섬유에서 확인되는 표지 물질인 NF200은 7일째 23.3% 에서 점차 증가하여 14일째 52.8%까지 나타내다가 21일째 대략 51.0%의 결과를 나타내었다 (Figure 1). 하지만 RA 분화유도제를 처리한 결과, NF160 발현 세포는 7일, 14일과 21일째에 각각 80.0%, 20.0%와 10.0%로 b-FGF처리군과 유사하게 감소되는 결과를 나타내지만 NF200에 대한 결과는 각각 20.0%, 73.0% 와 71.0%로 차이를

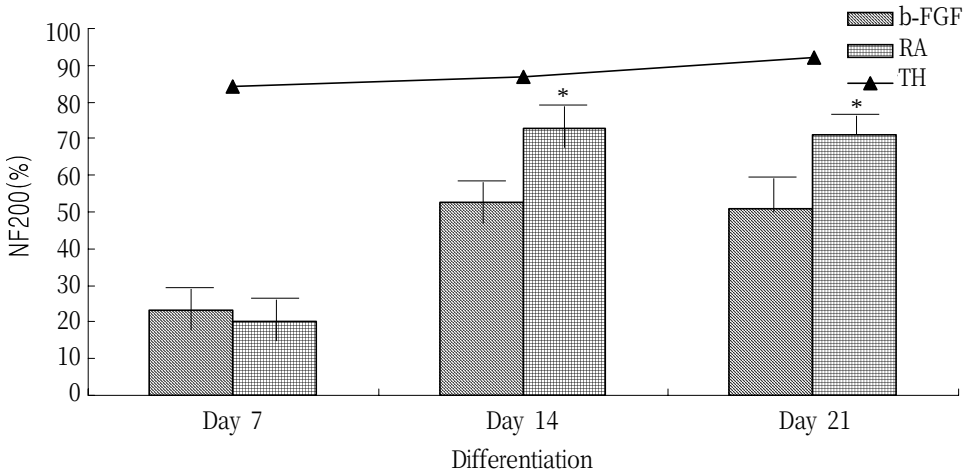

Figure 1. Stage-specific influence of b-FGF or RA on TH#2MB03 cells differentiation. The percentage of cells expressing TH and NF200 were assayed by immunocytochemistry.
*indicates significantly different from the b-FGF treatment group ($p < 0.05$).

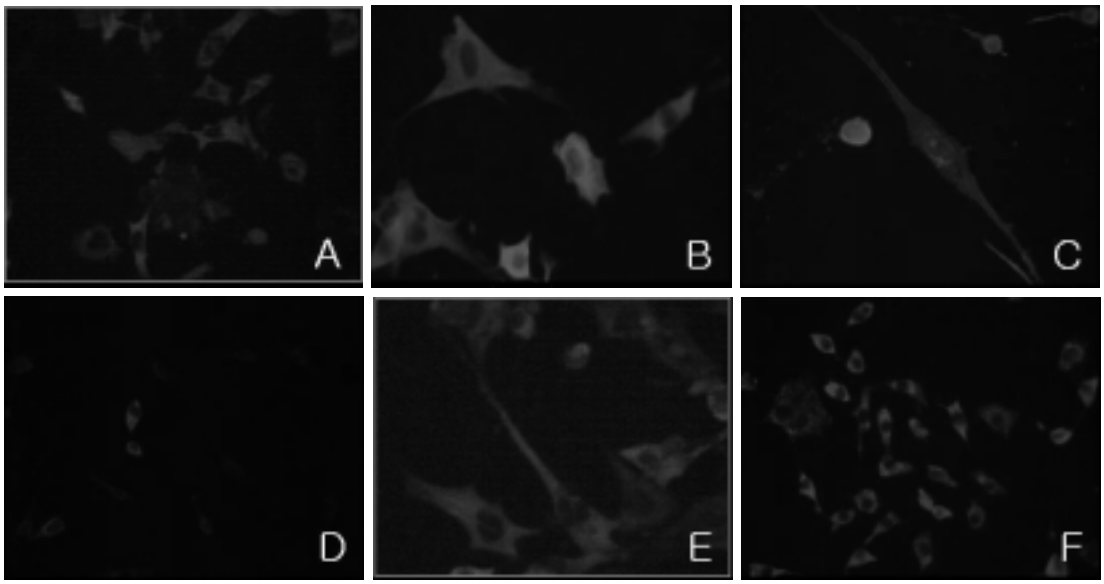

Figure 2. In vitro neural differentiation of TH#2/MB03. Stage-specific influence of b-FGF on TH#2/MB03 cells differentiation. **(A)~(C)** Immunostaining for NF160 of 7, 14 and 21 days cells plated on coverslip shows that proportion of cells expressing NF160 decreased rapidly at 21 days, **(D)~(F)** Immunostaining for NF200 of 7, 14 and 21 days cells plated on coverslip shows that proportion of cells expressing NF200 decreased rapidly at 21 days.

나타내어 (Figure 1), TH#2/MB03 인간배아줄기세포를 신경세포로 분화하는 데에 있어서는 분화유도제로 RA를 사용하는 것이 분화중간단계인 14일째부터 성숙신경세포의 획득을 유의하게 증가시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다 ($p<0.05$).

3. HPLC에 의한 L-DOPA 확인

TH#2/MB03 세포로부터 신경세포형성이 용이한 RA 처리군의 L-dopa 양을 측정한 결과, 7일째 41 pmole/mg protein, 14일째 264 pmole/mg protein, 21

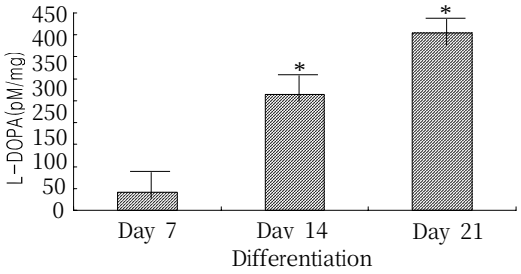

Figure 3. HPLC quantification of L-DOPA from *in vitro* cultured neural cells-differentiated with N2 medium for 21 days, after induction with RA.
* indicates significantly different from the control ($p < 0.05$).

일째 405 pmole/mg protein로 점차적으로 증가되어 대조군의 결과 (19 pmole/mg protein)에 비교했을 때 분화가 진행될수록 유의하게 높게 나타나는 것을 확인하였다 ($p< 0.05$).

고 찰

본 연구는 TH 유전자가 주입된 인간 배아줄기세포 (TH#2/MB03)가 체외에서 RA 분화유도제를 이용하여 신경세포로의 분화가 용이하게 이루어질 수 있으며, 이 기간 내내 TH 발현이 감소되지 않고 파킨슨 질병치료에 유용한 L-DOPA형성이 가능하므로 세포성 치료에 유용하게 이용될 수 있다는 가능성을 시사한다.

도파민 신경세포 생산에 대한 연구는 생쥐 배아줄기세포유래 신경세포 분화연구에서 여러 보고가 이루어져 왔으나,[9~11] 인간의 배아줄기세포를 이용한 체외분화 연구에서 파킨슨병 질환치료에 유용하게 이용할 만한 충분한 양의 도파민 신경세포가 생산되었다는 보고는 아직까지 없다.[12~13,15~16] 한편, 우리는 인간 배아줄기세포로부터 도파민 신경세포 분화의 가능성을 조사하는 예비실험에서, 최종 분화단계인 21일째에 대략 10~20%의 TH를 발현하는 신경세포가 만들어지는 것을 확인하였다 (data not shown). 따라서 이러한 한계를 극복하고자, 도파민 형성의 limiting enzyme으로 알려진 TH 유전자를 배아줄기세포에 주입하여 다수의 TH를 발현하는 배아줄기세포를 확립하였다.

TH는 PD 환자의 뇌에서 사라지는 효소중의 하나이다. 이와 같은 이유로, 의약품 또는 세포 차원에서 TH cDNA를 운반하거나 이 유전자가 오랜 기간 발현되도록 하는 많은 시도가 이루어져 왔다. 그러나 다양한 vectors를 이용한 실험 결과는 만족스럽지 않았다. Adenoviral vector에 의해 운반된 유전자는 episome상태로 머물러 있어 그 지속성이 매우 어렵고, retroviral vector는 신경세포를 제외한 분열하는 세포에서만 infection되는 어려움이 있다. Adenoviral vector는 외래유전자에게는 제한된 공간을 가지고 있으며, liposome 유래 vectors는 그 효율이 매우 낮다. 게다가, 이들 vector의 공통된 문제점은 의료목적으로 사용될 만큼 운반유전자의 발현이 충분히 유지되지 않는다는 것이다.[3,4] 본 실험에서는 pcDNA3.1 vector를 이용하여 TH가 주입된 여러개의 배아줄기세포 콜로니를 획득하였고, western blotting방법으로 세포주의 TH 발현율이 가장 높은 TH#2/MB03 세포주를 확인하였다. 또한 면역세포화학염색법을 통하여 90%이상의 세포에서 TH가 발현되는 것을 확인하였다.

특정부위의 질환치료를 위한 세포이식은 그 부위에 적합한 분화된 형태의 세포를 요구한다. 이는 미분화된 세포를 이식하였을 경우 종양이 발생할 빈도가 높기 때문이다. 하지만 체외에서 분화를 시행하더라도 100% 완벽한 원하는 세포를 획득하기는 어렵다. 실제 세포분화에는 다양한 분화인자와 cytokine이 관여하며 이와 같은 동일한 체내환경을 체외에서는 만들어낼 수 없기 때문이다. 그러므로 원하는 타입의 세포가 보다 많이 획득될 수 있는 분화방법을 확립하는 것은 매우 중요하다. 본 실험에서는 파킨슨 질환치료에 좀 더 근접하기 위해 인간 배아줄기세포에 TH 유전자를 주입하였고 신경세포분화에 주로 이용하는 두 개의 factor (RA 와 b-FGF)를 이용하여 두 개의 분화방법을 비교하였다. RA는 배아줄기세포의 신경발달과 성숙신경세포의 생산을 증진시키고 도파민이나 세로토닌 수용체를 발현시켜 신경돌기 복합체 형성에 관여한다고 알려져 있다.[15] 분화유도제 b-FGF는 mesenchymal, neuroectodermal과 endothelial 등 다양한 세포의 증식에 관여하는 인자이며 불멸화된 hypothalamic 신경세포들의 분화와 성숙에 관여한다고 알려져 있다.[12,13] 또한 이들 분화인자는 인간 배아줄기세포로부터 신경세포 분화연구에 주

로 이용되었다. 일반적으로 b-FGF는 신경전구세포 상태를 유지하는 데에 유효한 것으로 알려져 있으며,[12,13,16] 이와 더불어 EGF, PDGF 그리고 IGF을 이용가능성을 조사한 실험보고도 있다.[13,16] 한편, 10^{-6} M RA를 이용하여 성숙 신경세포 군이 일정하게 매우 높은 비율로 형성되어질 수 있다고 Schuldiner 등 (2001)[15]은 보고하였다.

TH#2/MB03 인간 배아줄기세포를 각각 다른 배양방법으로 b-FGF와 RA를 첨가하여 신경전구세포로 유도한 뒤 신경분화용 배양액에서 21일까지 장기간 분화시켰을 때, 분화기간이 길어질수록 성숙 신경세포골격의 중간 미세섬유에서 확인되는 표지 물질인 NF200 양성 세포 수는 50~70% 증가되는 반면, 미성숙 신경세포의 성장 단계에서 나타나는 표지인자인 NF160은 10~30%로 감소되는 경향을 반복 조사결과에서 확인하였다. 특히, 성숙신경세포의 비율이 RA를 처리하는 군에서 분화 14일째부터 유의하게 높게 나타났으며 이러한 경향은 21일째에도 지속되었다. 한편 분화 최종일까지의 TH 발현율은 80~90%로 유지되어 TH#2/MB03 세포로부터의 신경세포분화는 RA 인자를 사용하는 분화방법이 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 한편, TH는 dopamine의 전구물질인 L-DOPA를 tyrosine으로부터 생산하는 데에 직접 관여되는 효소이다. 앞서 서론에서 언급했던 바와 마찬가지로 파킨슨 질환치료와 연관시켜 놓고 볼 때, L-DOPA 존재는 매우 중요하다. 본 연구에서는 신경분화가 진행될수록 세포 내 L-DOPA의 양이 유의하게 증가되는 것이 확인되었다. 현재 이들 세포를 이용한 파킨슨 질환동물모델에서의 유용성 검토가 진행되고 있는 중이다.

따라서, 본 연구에서는 TH 유전자가 주입된 배아줄기세포 (TH#2/MB03)를 RA 신경분화 인자를 이용하여 분화를 유도한 결과 L-DOPA를 가진 높은 수율의 성숙 신경세포로 분화됨을 확인하였으며 이들 세포는 파킨슨 질환의 치료목적을 위한 연구에 이용될 수 있다는 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Shastry BS. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. Neurosic Res 2001; 41:5-12.
2. Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Buarke MA, Chaen E, Li JM, et al. Functional fetal nigral grafts in a patients with Parkinson's disease: Chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies, J Comp Neurobiol 1996; 370: 203-30.
3. Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. Mol Neurobiol 1998; 16: 285-309.
4. Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivirotto P, Bringas J, et al. Convection-Enhanced Delivery of AAV Vector in Parkinsonian Monkeys; In Vivo Detection of Gene Expression and Restoration of Dopaminergic Function Using Pro-drug Approach. Exp Neurol 2000; 164: 2-14.
5. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000; 18: 399-404.
6. Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. Science 1998; 282: 1145-47.
7. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol 1995; 168: 342-57.
8. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci 1995; 108: 3181-8.
9. 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; 20: 1-7.
10. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, Macky RD, Efficient generation of midbrain and

hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2000; 18: 675-9.

11. Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Yokota H, Shiroi A, et al. Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. Stem cells 2003; 21: 171-80.
12. 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.
13. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001; 19: 1134-40.
14. NIH Human Embryonic Stem Cell Registry. National Institutes of Health. USA. http://stemcells.nih.gov/registry/eligibilityCriteria.asp
15. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. Brain Res 2001; 913: 201-5.
16. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. Exp Neurol 2001; 172: 383-97.