

## 신경줄기세포 이식을 통한 신경질환 치료법의 효율을 높이기 위한 전략

아주대학교 의과대학 뇌질환연구센터, 신경과학교실

김병곤

### Towards the Replacement Therapy Using Neural Stem/Progenitor cells for Neurological Disorders: Strategies to Enhance Therapeutic Capacity of Transplantation Approaches

Byung Gon Kim, M.D., Ph.D.

*Brain Disease Research Center, Department of Neurology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

Transplantation of neural stem/progenitor cells (NPC) holds potential to improve functional outcomes in various neurological disorders. It seems more difficult than previously envisioned, however, to functionally replace the lost neural cells by grafted NPCs. A lack of appropriate developmental cues in the injured tissue contributes to the failure to guide the NPCs to survive, differentiate, grow axons, and functionally integrate to the host neural circuit. Therefore, we need to design possible strategies to recapitulate the developmental processes for the grafted NPCs to fully mature into functional neural cells. To enhance survival of NPCs following transplantation, pharmacological treatments targeting apoptosis and inflammation can be combined with transplantation. Genetic overexpression of prosurvival genes or growth factors can also improve survival. In vitro predifferentiation not only provides neural cells of a specific lineage in high purity but also greatly reduces chances of a tumor formation. Genetic overexpression of various transcription factors or manipulating molecular microenvironment of the host can also be tried to force differentiation of NPCs to a desired lineage. Pharmacological application to overcome myelin inhibition or enzymatic degradation of the inhibitory extracellular matrix will enhance axonal growth of NPC-derived neurons. Increasing synaptic activity by behavioral training or patterned electrical stimulation may promote proper development of synaptic integration and myelination of the axon. A thorough understanding of cellular and molecular aspects of neural development will help design more sophisticated strategies to enhance therapeutic capacity of NPC transplantation to reconstruct the damaged neural circuit.

J Korean Neurol Assoc 24(6):527-534, 2006

**Key Words:** Neural progenitor cell, Transplantation, Survival, Differentiation, Axon growth, Synaptic integration

## 서 론

줄기세포는 스스로의 복제능력(self-renewal capacity)을

유지하면서 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 능력(pluripotency)을 지닌 미성숙 세포를 뜻한다. 최근 수 년간의 폭발적인 줄기세포생물학의 발전은 시험관 내에서 줄기세포의 배양과 분화를 가능하게 하였고, 이러한 세포들을 이용하여 손상된 조직이나 장기를 재생하고자 하는 재생 의학에 대한 관심을 증가시켰다. 포유동물의 중추신경계는 재생 능력이 매우 저하되어 있고 따라서 다양한 신경학적 질환들로 인하여 소실된 신경기능의 자발적인 회복을 기대하기 힘들다. 따라서 줄기세포를 이용한 신경질환 치료법의 개발은 다른 장기의 질환들에 비하여 보

\* Byung Gon Kim, M.D., Ph.D.

Brain Disease Research Center, Ajou University School of Medicine  
San 5 Wonchon-dong, Yeongtong-gu, Suwon, 443-721, Korea  
Tel: +82-31-219-4495 Fax: +82-31-216-6381  
E-mail: kimbg@ajou.ac.kr

\* 본 연구의 일부는 뇌질환연구센터 / 한국과학재단의 지원에 의하여 이루어졌음.

**Table 1.** selected studies in the literature that have employed transplantation of neural stem/progenitor cells in animal models of various neurological disorders

Disease category	Animal model	Donor cells	Outcomes	Ref
Parkinson's disease	rat, 6-OHDA model	mouse ESC-derived dopaminergic neurons	<i>in vivo</i> differentiation, electrophysiology, behavioral recovery	1
Parkinson's disease	monkey, MPTP model	primate ESC-derived dopaminergic neurons	<i>in vivo</i> differentiation, functional imaging, behavioral recovery	2
cerebral ischemia	mouse, MCAO model	primate ESC-derived neural progenitors	<i>in vivo</i> differentiation, retrograde tracing	3
cerebral ischemia	rat, MCAO model	human NSC	<i>in vivo</i> differentiation	4
cerebral hemorrhage	rat, collagenase injection model	human NSC <sup>a</sup>	<i>in vivo</i> differentiation, behavioral recovery	5
spinal cord injury	rat, contusion model	human ESC-derived oligodendrocyte	<i>in vivo</i> differentiation, behavioral recovery	6
spinal cord injury	rat, contusion model	rat GRP	<i>in vivo</i> differentiation, electrophysiology, behavioral recovery	7
spinal cord injury	rat, contusion model	human NSC	<i>in vivo</i> differentiation, behavioral improvement, depleting human cells by diphtheria toxin abolished functional recovery	8
motor neuron disease	rat, virus- induce motor neuron death	human ESC <sup>b</sup>	behavioral improvement, neuroprotection via humoral mechanism	9
motor neuron disease	rat, virus- induce motor neuron death	mouse ESC-derived spinal motor neurons	<i>in vivo</i> differentiation, behavioral recovery, electrophysiology, formation of neuromuscular junction	10
demyelinating disease	mouse, EAE model	mouse NSC <sup>c</sup>	<i>in vivo</i> differentiation, behavioral improvement, reduction of glial scar	11
Huntington's disease	rat, 3-nitropropionic acid model	human NSC	<i>in vivo</i> differentiation, behavioral recovery, neuroprotection via humoral mechanism	12

6-OHDA; 6-hydroxydopamine, MPTP; 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine, EAE; experimental allergic encephalomyelitis, ESC; embryonic stem cell, NSC; neural stem cells, <sup>a</sup>injected intravenously, <sup>b</sup>embryonic germ cell derived stem cell, <sup>c</sup>injected intravenously or intrathecally

다 더 많은 관심이 집중되고 있다.

다양한 신경질환의 동물모델을 이용하여 신경조직 특이 신경 줄기세포 혹은 신경전구세포, 혹은 배아줄기세포에서 분화시킨 신경전구세포를 이식한 많은 연구들은 줄기세포의 이식이 신경학적 기능의 향상에 도움이 될 수 있음을 보고한 바 있다(Table 1).<sup>1-12</sup> 하지만 아직까지 줄기세포의 이식으로 인한 신경학적 기능 향상의 기전에 대해서는 정확하게 알려진 바가 없다. 신경줄기세포를 이용한 치료의 궁극적인 목표는 이식된 줄기세포가 손상된 신경 혹은 교세포를 대체(replace)하여 기존의 숙주(host) 신경조직에 성공적으로 통합(integration)되고 적합한 기능을 발휘하는 것이다. 현재까지 이식된 신경줄기세포가 상기의 목적, 즉 완벽한 대체(replacement)를 달성하였음을 철저히 증명한 연구는 매우 드물다. 신경줄기세포의 이식으로 인

한 신경학적 기능의 향상은 많은 경우 이식된 신경줄기세포에서 분비되는 신경영양인자, 신경줄기세포의 면역조절기능, 내인성 신경전구세포의 동원 등에 의하여 이루어질 것으로 추정되고 있다.<sup>13,14</sup> 이러한 이차적 기능(세포대치기능이 아닌)은 반드시 세포의 이식이 아닌 작은 분자량의 화학약물(small chemical)이나 펩타이드 등 기존의 약물치료기술을 통해서도 충족될 가능성이 있고, 따라서 약물치료와의 비교 전임상연구가 선행되어야만 임상적인 효용성을 논의할 수 있을 것이다.

신경줄기세포의 이식을 통한 소실된 신경세포의 대체는 현재까지의 과학적 성과만으로는 달성하기 어렵다고 인식되고 있다.<sup>15</sup> 이식된 신경줄기세포가 질병으로 인하여 소실된 신경 및 교세포를 기능적으로 대체하기 위해서는 이식된 신경줄기세포의 생존, 분화, 이동, 축삭의 성장 및 신경연접의 형성과 같은 기본적인 생

물학적 과정들이 진행되어야 한다. 하지만 손상된 신경조직에 이식된 후에는 신경줄기세포 고유의 문제점(cell-autonomous) 혹은 세포외 환경적 요인(non cell-autonomous)들에 의하여 상기 현상들이 많은 제약을 받게 된다. 따라서 신경줄기세포의 이식을 통하여 소실된 신경 및 교세포를 효율적으로 대체하기 위해서는 상기한 생물학적 과정들이 일어날 수 있도록 도와주는 부가적인 전략이 필요하다.

본 논문에서는 이식된 신경줄기세포를 이용하여 각종 신경질환에 의하여 소실된 신경 및 교세포들을 기능적으로 대체하는 치료의 효율을 높일 수 있는 전략에 대하여 토의하고자 한다. 토의될 전략들은 1) 이식된 신경줄기세포의 생존 향상, 2) 신경줄기세포 분화의 조절 및 촉진, 3) 신경줄기세포에서 분화된 신경세포 축삭의 성장, 4) 숙주 신경조직과 이식된 신경줄기세포의 기능적 통합의 촉진 등이다. 신경줄기세포의 기원(origin)에 따른 줄기세포 고유의 차이점, 즉 배아줄기세포에서 유래된 신경줄기세포, 뇌 혹은 척수 특이 신경줄기세포, 혹은 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)에서 유래한 줄기세포의 장단점 및 한계에 대한 논의는 여기서 다루지 않는다. 본 논문에서는 배아줄기세포에서 유래된 신경전구세포, 신경조직 특이 신경줄기세포 혹은 신경전구세포에 국한하여 토의하는데, 용어의 혼돈을 피하기 위하여 이들 세포를 모두 신경전구세포(neural progenitor cell; 이하 NPC)로 통일하여 사용한다. 주로 척수 및 뇌손상, 뇌졸중과 같은 급성 신경계 손상의 맥락에서 논의되되, 다른 신경질환에 대한 내용을 배제하지는 않는다.

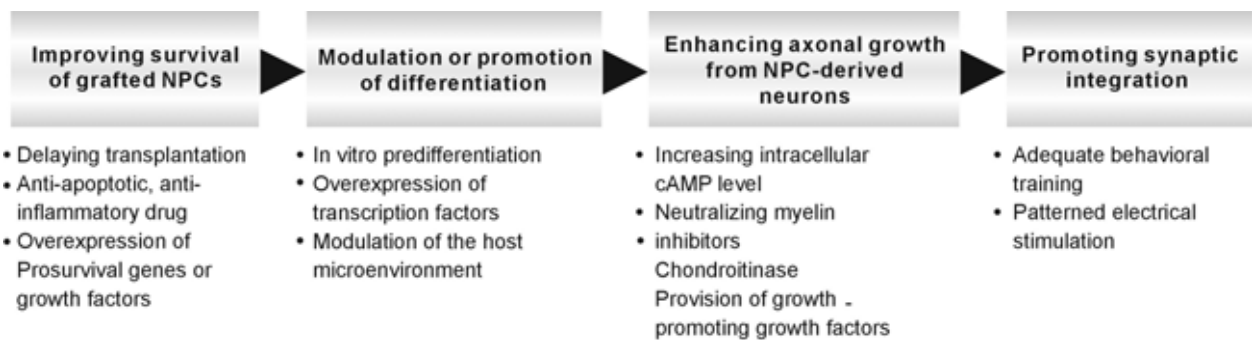
**본 론**

성숙한 포유류의 신경계 혹은 신경회로망의 발생은 태아의 NPC들이 증식하다가 신경세포로 분화하는 것으로부터 출발

한다. 계속되는 발생관련 인자들은 생성된 신경세포가 올바른 위치를 차지하도록 하고, 제자리를 잡은 신경세포는 신경연접(synapse)의 타겟이 되는 신경세포를 향하여 축삭을 자라게 된다. 자라난 축삭들이 타겟 신경세포와 적절한 신경연접을 형성하면서 신경의 활성을 통하여 신경연접이 안정화(stabilize)되고 성숙한 신경회로망이 갖추어지게 된다. 손상된 신경조직에 NPC를 이식하여 신경회로망을 복원하기 위해서는 이식된 NPC들이 앞서 언급한 발생의 과정을 순서대로 밟아 나아가야 한다. 하지만 발생시와는 달리 손상된 신경조직은 이러한 과정이 잘 진행될 수 있도록 도와주는 여러 세포-분자적인 요인들이 결여되어 있다. 따라서 이식된 NPC들이 숙주신경조직에 기능적으로 통합되기 위해서는 아래와 같은 각각의 과정에 적합한 치료전략의 병행이 필요할 것으로 생각된다(Fig. 1).

**1. 이식된 NPC들의 생존 향상**

이식된 NPC들은 손상된 신경조직 내에서 많은 수가 사멸하고 매우 적은 수의 세포만이 살아 남는 것으로 알려져 있다.<sup>16,17</sup> 이식 후 NPC의 사멸은 1) 적합한 성장인자의 결여, 2) 손상조직에서 분비되는 독성 인자들, 또는 3) NPC들의 생착 및 발생에 필요한 요인들의 부족 등에 기인한다. 외상성 뇌손상 후 이식된 NPC들의 사멸기전을 조사한 연구에 의하면 NPC의 사멸은 caspase 및 calpaine 모두에 의하여 일어나지만 caspase에 의한 사멸이 보다 우세하기 나타난다.<sup>17</sup> 파킨슨씨병 모델에서의 graft 생존에 관한 연구를 보게 되면 이식된 세포의 생존율이 약 2-20%되는 것으로 나타나 있다.<sup>18</sup> 저자의 연구실에서는 이식된 NPC들의 생존을 향상시키기 위하여 항고사 단백질인 Bcl-XL을 과발현시켜 손상된 척수에 이식하는 실험을 수행하였다. 흥미롭게도 Bcl-XL의 과발현은 초기 2주간의 생존에는 큰 영향



**Figure 1.** A diagram to summarize possible strategies to enhance therapeutic capacity of transplantation of neural stem/progenitor cells to reconstruct the damaged nervous tissue. NPC; neural progenitor cell, cAMP; cyclic adenosine-3',5'-monophosphate

을 미치지 못하였으나 이후 7주까지 발생하는 지연성 사멸을 방지하였다.<sup>19</sup> 이러한 사실은 이식된 NPC 사멸의 기전이 시기에 따라 다를 수 있음을 시사한다고 하겠다.

생존하는 이식 NPC의 수와 행동학적 기능 향상의 정도는 밀접한 관계가 있다.<sup>19,20</sup> 따라서 이식 후 일어나는 NPC의 사멸을 방지하고 생존을 향상시키는 전략은 NPC의 이식을 통한 치료 효율을 크게 향상시킬 수 있다. 이식된 NPC들의 생존은 신경손상 후 이식 시기에 많이 좌우될 수 있다.<sup>21</sup> 즉 손상 이후 바로 이식하는 경우는 손상으로 인한 독성 물질의 축적으로 인하여 이식 세포의 생존율을 떨어뜨린다.<sup>22,23</sup> 이렇게 이식의 시기를 조절하는 것만으로도 생존율을 향상시킬 수 있고 따라서 최근에는 손상 후 며칠 간의 간격을 두고 지연성으로 이식하는 방법들을 많이 사용하고 있다.

이식과 약물치료를 병행함으로써 이식 NPC들의 생존을 향상시킬 수 있다. 면역억제제나 caspase 억제제의 사용이 파킨슨씨병 모델에서 이식된 신경조직의 생존을 향상시킨다는 것이 밝혀진 바 있다.<sup>24,25</sup> 또한 성체의 척수에서 분리한 NPC를 척수손상 부위에 이식하면서 growth factor, minocycline, cyclosporine 등을 함께 병행 투여하게 되면 이식된 NPC의 생존이 크게 향상됨이 보고되었다.<sup>26</sup> 유전적인 변형을 통하여 생존에 관한 유전자나 growth factor를 과발현시킴으로써도 생존율의 향상을 꾀할 수 있다. 특히 apoptosis의 최종단계를 억제하는 Bcl-2나 Bcl-XL의 과발현이 각각 뇌허혈 및 척수손상에서 줄기세포의 생존을 향상시키고 기능적인 회복을 배가시킬 수 있음이 보고되었다.<sup>19,27</sup> 이러한 목적으로 prosurvival 유전자인 Akt1 등도 NPC의 생존 향상에 시도해 볼 수 있을 것이다.<sup>28</sup> 하지만 생존을 증가시키기 위한 유전적 변형은 종양형성의 가능성을 높일 수 있기 때문에 매우 주의하여야 하겠다. GDNF와 같은 성장인자를 과발현시킨 경우에도 이식된 NPC의 생존 향상을 기대할 수 있다.<sup>29</sup>

## 2. NPC 분화의 조절 및 촉진

일단 손상된 신경 조직에서 생존한 NPC들이 소실된 신경 혹은 교세포를 기능적으로 대체하기 위한 필요조건은 적합한 phenotype을 갖춘 세포로의 분화가 이루어지는 것이다. 미성숙한 NPC가 숙주 신경조직에 이식되면, 숙주 신경조직의 미세환경에 반응하여 숙주 신경조직에 적합한 분화 양상을 나타내는 것이 알려져 왔다.<sup>30</sup> Neurogenic region인 해마나 뇌실하영역(subventricular zone)에서는 신경세포로 분화할 수 있지만, nonneurogenic region인 대뇌피질, 소뇌 혹은 척수에서는 신경세포로 잘 분화하지 않는다.<sup>30,31</sup> 따라서 손상 받지 않은 정

상 신경조직의 nonneurogenic region에서의 신경세포로의 분화 전략이 필요하다. 손상된 신경조직의 경우에는 neurogenic region이라고 하더라도 신경세포로의 분화가 매우 억제되는 것이 알려져 있다.<sup>32,33</sup> 특히 손상을 받은 nonneurogenic region, 예를 들어 손상된 척수의 미세환경은 이식된 NPC들의 신경세포로의 분화를 강하게 억제한다. 손상된 척수에 NPC들을 이식한 초기의 연구들은 이식된 NPC의 대부분이 정상교세포로 분화하거나 미분화된 상태로 남아있고,<sup>34</sup> 신경세포로 분화가 제한된 전구세포(neuronal restricted precursors)를 이식해도 신경세포로의 분화가 적극적으로 억제됨을 보고하였다.<sup>35</sup> 손상 후 숙주 신경조직에서는 이차적인 염증 반응이 진행되는데, 이러한 염증반응에는 정상교세포 반흔(astroglial scar)의 형성을 촉진하는 사이토카인이나 성장인자, 특히 IL-6, ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), bone morphogenic protein (BMP)의 분비가 동반되고, 이러한 미세환경에 의하여 신경세포로의 분화는 억제되고 정상교세포로의 분화만 촉진되어 교세포 반흔의 형성을 증가시키는 결과를 가져올 것이다.<sup>36</sup> 이러한 사실들은 손상 후의 소실된 신경세포의 기능적인 대체를 위해서는 NPC의 신경세포 분화를 촉진할 수 있는 전략의 병행이 필요함을 시사한다고 하겠다. 손상된 신경조직에서는 신경세포의 분화뿐 아니라 수초를 형성하는 펄프교세포(oligodendrocyte)의 분화도 억제되는데, 대표적인 탈수초 질환인 다발성 경화증이나 탈수초화(demyelination)가 기능 손상에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 척수 손상의 경우 펄프교세포로의 분화를 촉진시키는 전략이 필요하다.<sup>6</sup>

이식된 NPC가 신경세포나 펄프교세포 계통으로 분화되는 것을 촉진하는 하나의 방법은 이식 전, 시험관내에서 미리 분화를 시키는 것이다. 이러한 predifferentiation의 장점은 이식을 할 때 이미 특정 세포로 운명이 어느 정도 결정된 세포를 사용함으로써 생체 내에서 종양 형성의 가능성을 감소시킬 수 있다는 데에 있다. 특히 배아줄기세포의 경우 predifferentiation을 시킴으로써 악성기형종(teratocarcinoma)의 발생을 감소시킬 수 있다.<sup>37</sup> 배아줄기세포에 retinoic acid를 처리하여 신경세포로의 분화를 증가시킬 수 있고,<sup>38</sup> retinoic acid와 sonic hedgehog을 순차적으로 처리하게 되면 척수의 운동신경원 세포(spinal motor neuron)로 분화시킬 수 있다.<sup>39,40</sup> 최근의 연구들은 5가지 정도 단계의 순차적인 배양을 통하여 신경세포나 펄프교세포로의 선택적인 분화를 유도할 수 있다.<sup>37</sup> 신경조직에서 얻은 NPC의 경우 배아줄기세포와 같이 각종 성장인자나 혈청의 배합을 통한 분화과정의 조절이 보다 힘든 것으로 알려져 있다. 몇몇 연구에서는 immunopanning 방법을 사용하여 NPC를 신경으로 분화된 전구세포(neuronal restricted precursors; NRP) 혹은 교

세포로 분화된 전구세포(glial restricted precursors; GRP)로 분리하여 이식하였다.<sup>7,35</sup> NPC를 신경세포 혹은 핏지교세포로 predifferentiation시키는 또 하나의 방법은 신경세포의 분화를 조절하는 전사인자들의 발현을 유전자 변형을 통하여 조절하는 것이다. 예를 들어 신경세포의 분화를 조절하는 Mash-1 이나 Neurogenin과 같은 전사인자의 발현은 신경세포로의 분화를 촉진할 것이다. Neurogenin이 과발현된 NPC는 척수에서는 핏지교세포로의 분화가 촉진될 수도 있다. Hofstetter (2005) 등은 성인의 척수에서 추출한 NPC의 분화를 조절하기 위하여 lentiviral vector를 이용하여 neurogenin-2를 과발현시켰는데, neurogenin-2가 과발현된 NPC는 핏지교세포로의 분화가 증가하였고, 배측 백질에서 새로운 수초의 형성이 증가시킴이 관찰되었다.<sup>41</sup> 핏지교세포로의 분화를 촉진하기 위하여 본 실험실에서는 Olig2 전사인자를 사용한 바 있는데, Olig2가 과발현된 불사화 인간신경줄기세포는 손상된 척수에서 백질로 이동하여 핏지교세포로 분화되는 것이 관찰되었고, 백질의 재수초화를 촉진하는 것을 관찰할 수 있었다.<sup>42</sup>

이식된 NPC들의 분화를 조절할 수 있는 또 하나의 방법은 숙주 신경조직내의 분화 및 증식에 관여하는 분자적인 미세환경에 변화를 주는 것이다. NT-3 및 BDNF는 핏지교세포의 생존, 증식, 수초 형성에 매우 중요한 작용을 나타내는데, Cao (2005) 등은 NT-3와 BDNF의 작용을 모두 가지는 multineurotrophin을 GRP에 과발현시켜서 GRP의 핏지교세포로의 분화를 촉진시켰으며, multineurotrophin-GRP를 이식받은 동물들이 대조군이나 GRP만을 이식 받은 동물들에 비해 보행기능이 보다 향상되고, 경두개자극 운동유발전위도 multineurotrophin-GRP를 이식받은 동물에서만 회복됨을 관찰하였다.<sup>7</sup> 발생시에 핏지교세포의 발생 및 분화는 배측에서 분비되는 sonic hedgehog (Shh)과 등쪽에서 분비되는 BMP의 농도 구배에 많은 영향을 받게 된다.<sup>43</sup> Bambakidis와 Miller (2004)는 A2B5 항체에 결합하는 GRP를 손상된 척수에 이식하여 보행기능의 향상과 축삭의 신경전도가 회복됨을 보고하였는데, Shh을 병행 치료하였을 경우 이러한 기능적 회복이 보다 더 향상됨을 관찰되었다.<sup>44</sup> BMP 신호전달의 조절을 위해서 BMP의 길항작용을 하는 noggin을 NPC에 과발현시켜 이식하였을 때, 이들 세포가 신경세포와 핏지교세포로 더 많이 분화함이 관찰되었고, 이러한 변화는 행동학적인 기능의 향상과 동반되었다.<sup>45</sup> 이러한 실험들은 발생시에 작용하는 신호전달을 숙주조직 내에서 조절함으로써 이식된 NPC들의 분화를 유도할 수 있는 가능성을 제시했다고 할 수 있다.

### 3. NPC에서 분화된 신경세포 축삭의 성장

중추신경계 신경 세포의 축삭은 손상으로 인하여 절단된 후에 재생하지 않는데, 주된 이유는 손상된 신경조직에 재생을 억제하는 분자적인 환경이 조성되기 때문이다.<sup>46</sup> 1980년대 후반에 핏지교세포 및 수초가 축삭의 성장을 강력히 억제한다는 것이 알려졌다.<sup>47</sup> 이후의 연구들은 수초의 성분인 Nogo, MAG, OMgp 등이 축삭의 성장을 억제하는 물질들임을 밝혔고,<sup>48</sup> 이들 수초 관련 단백질들을 억제할 경우 축삭의 성장을 유도할 수 있음이 알려졌다.<sup>49</sup> 한편 신경세포 내에 cAMP 유도체를 주입하거나 cAMP 분해효소인 phosphodiesterase를 억제하여 cAMP의 양을 증가시키면 myelin에 의한 억제를 극복할 수 있다.<sup>50</sup> 또 다른 종류의 축삭 성장 억제물질은 교세포 반흔에서 생산되는 chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) 이라는 세포외 기질단백질의 일종으로,<sup>51</sup> 역시 신경손상 후 축삭의 재생을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 CSPG를 chondroitinase라는 효소를 이용하여 분해하게 되면 척수 손상 후 축삭의 재생 및 기능적 향상을 기대할 수 있다.<sup>52</sup>

이식된 NPC가 신경세포로 분화하여 손상된 신경세포를 대체하고자 한다면, 분화된 신경세포에서 축삭이 자라나야 숙주조직의 신경세포와 신경연접을 이룰 수 있을 것이다. 손상된 신경조직에 수초의 파편들이 많이 유리되고 교세포 반흔의 형성이 촉진된다는 점을 고려한다면, NPC들이 성공적으로 신경세포로 분화하였다고 하더라도 축삭의 성장이 매우 저해됨을 예상할 수 있다. 예를 들어 배아줄기세포에서 분화된 척수 운동신경세포의 축삭 성장은 수초 성분에 의하여 저해를 받음이 보고되었다.<sup>40</sup> 이 연구에서 배아줄기세포에서 분화된 척수 운동신경세포와 수초억제작용을 극복할 수 있는 cAMP 생산 촉진 약물이나 Rho kinase 억제제를 병행 투여하였을 때 배아줄기세포유래 운동신경세포 축삭의 성장이 촉진됨이 관찰되었다. 보다 최근 같은 연구팀은 같은 운동신경질환 모델에서 배아줄기세포유래 척수운동신경세포를 이식하고 cAMP analogue인 dibutyryl cAMP와 cAMP의 분해를 억제하는 phosphodiesterase inhibitor (rolipram)를 주입하고, 말초신경에 GDNF를 공급하는 복합치료를 시행한 결과, 이식된 배아줄기세포유래 척수운동신경세포로부터 근육까지의 축삭의 성장을 유도할 수 있었으며 행동학적 및 전기생리학적 기능의 회복을 관찰할 수 있었다.<sup>10</sup> Hamada 등(2006)은 배아줄기세포에서 Nogo에 대한 수용체를 발현하지 않는 척수운동신경세포를 분화시켰는데, 이 세포들을 척수에 이식하였을 때 광범위한 축삭의 성장을 관찰할 수 있었다.<sup>53</sup> 교세포 반흔에서 생산되는 CSPG를 효소를 이용하여 분해하였을 때, 이식된 미성숙 척수 신경들의 축삭의 성장이 향상되었다.<sup>54</sup> 이러한 실험 결과들은 수초 및 교세포 반흔 유래 축삭억제 성분들이 모두 이식된 NPC들에서 유래된 신경세포의 축삭 성장을

방해하여 궁극적으로는 숙주 신경회로망에 기능적으로 통합되는 것을 저해할 것임을 시사한다고 할 수 있겠다. 최근의 연구는 chondroitinase 처리에 의한 CSPG의 분해가 이식된 NPC의 척수병변내 전이(migration) 과정을 촉진한다고 보고하였다.<sup>55</sup> 따라서 축삭 재생 억제 성분을 조절하는 치료를 NPC의 이식과 병행하는 전략은 이식된 NPC들로부터 분화된 신경세포의 축삭의 성장을 촉진시킬 수 있을 뿐만 아니라 병변내에서의 전이도 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

#### 4. 숙주 신경조직과 이식 NPC의 기능적 통합의 촉진

신경회로망의 발생에서 가장 마지막에 이루어지는 것이 신경연접의 형성이다. 축삭의 성장 및 초기 수상돌기의 형성은 유전적으로 이루어지는데, 즉 각종 전사인자의 조합에 의하여 시공간적으로 그 발현이 치밀하게 조절되는 각종 생리활성 물질(신경영양인자, 사이토카인) 및 그 수용체에 의하여 형성과정이 결정되게 된다. 이에 비하여 연접전 말단(presynaptic terminal)을 형성하는 최종 단계의 축삭의 성장 및 연접후 말단(postsynaptic terminal)을 형성하는 수상돌기의 분지(arborization) 형성과정 등은 신경세포의 활성화도에 많은 영향을 받게 된다. 특히 초기의 신경연접의 형성은 무작위적인 연접 전후 말단의 만남에 의하여 시작되었다가, 신경전도가 활발하게 이루어지는 연접이 강화되고 그렇지 않은 연접은 퇴화되는 가지치기(pruning)의 과정을 거치게 되는데, 이 과정에서 외부의 환경적인 요인이 많이 관여하게 된다.<sup>56</sup>

이식된 NPC들이 성공적으로 신경세포로 분화하고 축삭을 자라난 후 궁극적으로 기능을 발휘하기 위해서는 숙주의 신경세포와 적절한 신경연접을 형성하여야 한다. 신경연접을 형성하지 못한다면 아무 기능을 발휘하지 못하게 되고, 잘못된 신경연접을 형성하기 되면 통증이나 간질과 같은 부작용을 불러 일으킬 가능성이 있다.<sup>41</sup> 이식된 NPC에서 유래된 신경세포가 적절한 신경연접을 형성하는 데에 어려움이 있을 수 있다. 손상된 신경조직에 이식된 NPC는 비정상적인 신경신호의 입력을 받을 것이고, 거꾸로 이식된 세포와 연결된 숙주 신경세포도 구심로 차단(deafferentation)에 의하여 이차적인 변화를 겪고 있기 때문이다. 따라서 적절한 신경연접의 형성을 촉진하고 잘못된 신경연접의 형성을 억제하기 위해서는 NPC들이 이식된 부위에서 발휘할 것으로 기대되는 신경기능의 반복적인 활성화가 필요하다. 즉 운동피질에 이식된 NPC의 적절한 신경연접을 위해서 반복적인 운동을 통한 운동피질의 신경세포의 활성도를 증가시킴으로써 운동에 참여하는 적절한 신경연접을 촉진할 수 있을 것이다. 이러한 관점에서 새롭게 생성되어 후각팽대(olfactory

bulb)로 전이된 신경세포들이 새로운 냄새자극에 반응한다는 최근의 연구결과<sup>57</sup>는 이식된 NPC유래 신경세포들이 외부에 훈련에 반응하여 숙주신경회로에 기능적 통합이 촉진될 수 있다는 가능성을 제시한다고 하겠다. 향후 행동학적 훈련 혹은 패턴을 갖춘 전기적인 자극이 이식된 NPC들의 기능적인 통합을 촉진시킬 수 있는가에 연구가 이루어질 것으로 예상된다.

흥미롭게도 수초를 형성하는 퓌지교세포의 증식 및 분화 과정에 있어서도 신경세포의 활성화, 즉 활동 전위가 중요한 역할을 담당하게 된다.<sup>58</sup> 이러한 연구결과는 수초의 두께가 환경적인 요인에 의하여 많이 지배를 받는다는 기존의 관찰들을 설명할 수 있다.<sup>59</sup> 특히 최근의 연구는 활동전위를 성상교세포가 감지하고 푸린계 신호전달을 통해서 퓌지교세포의 수초형성을 촉진함을 보고하였다.<sup>60</sup> 상기 연구들은 신경의 활성을 증가시키는 행동학적 훈련이나 전기적인 자극이 이식된 NPC에서 유래한 퓌지교세포의 기능, 즉 수초화를 향상시킬 수 있다는 흥미로운 가능성을 제시하고 있다. 이러한 가능성이 입증된다면 다발성 경화증과 같은 탈수초성 질환이나 척수손상과 같이 백질의 병변이 기능소실에 주요한 역할을 담당하는 신경질환을 위한 NPC 이식치료기술의 향상에 전기를 마련할 수 있을 것이다.

### 결론

NPC들을 손상된 신경조직에 단순히 이식하는 것만으로는 이식 치료의 궁극적인 목표인 기능적인 대체를 이루기는 매우 힘들다. 손상된 숙주 신경조직은 미성숙 NPC들이 생존하여 기능적 신경세포 혹은 교세포로 분화, 성숙하는데 필요한 발생학적인 인자들을 충분히 제공할 수 없다. 따라서 NPC의 이식과 함께, 생존, 분화, 축삭의 성장 및 기능적인 통합을 촉진할 수 있는 병행치료 전략의 수립이 필요하다. 정상 중추신경계 발달의 세포-분자적 측면에 관한 보다 철저한 이해는 보다 효과적인 전략을 개발하는 데에 많은 도움을 줄 수 있을 것이다. 효과적인 병행 치료 전략의 개발은 이식된 NPC들이 숙주 신경조직에 통합되어 소실된 신경세포 혹은 교세포를 대체하는 치료 효율을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

### REFERENCES

1. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-56.
2. Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest*

- 2005;115:102-109.
3. Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, Imazato T, Nishimura M, Fujimoto M, et al. Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:906-914.
  4. Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11839-11844.
  5. Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003;34:2258-2263.
  6. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005;25:4694-4705.
  7. Cao Q, Xu XM, Devries WH, Enzmann GU, Ping P, Tsoulfas P, et al. Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multilineurotrophin-expressing glial-restricted precursor cells. *J Neurosci* 2005;25:6947-6957.
  8. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14069-14074.
  9. Kerr DA, Llado J, Shablott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* 2003;23:5131-5140.
  10. Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, Carmen J, Dike S, Shats I, Rubin LL, Drummond J, Krishnan C, Hoke A, Maragakis N, Shefner J, Rothstein JD, Kerr DA. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol* 2006;60:32-44.
  11. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003;422:688-694.
  12. Ryu JK, Kim J, Cho SJ, Hatori K, Nagai A, Choi HB, et al. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 2004;16:68-77.
  13. Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:395-406.
  14. Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Snyder EY, Rothstein JD. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 2004;27:322-331.
  15. Snyder EY, Park KI. Limitations in brain repair. *Nat Med* 2002;8:928-930.
  16. Boockvar JA, Schouten J, Royo N, Millard M, Spangler Z, Castelbuono D, et al. Experimental traumatic brain injury modulates the survival, migration, and terminal phenotype of transplanted epidermal growth factor receptor-activated neural stem cells. *Neurosurgery* 2005;56:163-171.
  17. Bakshi A, Keck CA, Koshkin VS, LeBold DG, Siman R, Snyder EY, et al. Caspase-mediated cell death predominates following engraftment of neural progenitor cells into traumatically injured rat brain. *Brain Research* 2005;1065:8-19.
  18. Hurelbrink CB, Armstrong RJE, Luheshi LM, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA. Death of dopaminergic neurons in vitro and in nigral grafts: reevaluating the role of caspase activation. *Exp Neurol* 2001;171:46-58.
  19. Lee SI, Kim BG, Hwang DH, Kim HM, Park IH, Kim SU. Overexpression of Bcl-XL promotes survival of transplanted human neural stem cells and graft-mediated locomotor recovery in rat spinal cord injury model. Program No. 762.18. 2006 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006. Online.
  20. Riess P, Zhang C, Saatman KE, Laurer HL, Longhi LG, Raghupathi R, et al. Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2002;51:1043-1052.
  21. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* 2005;19:1839-1841.
  22. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 2002;69:925-933.
  23. Hill CE, Moon LD, Wood PM, Bunge MB. Labeled Schwann cell transplantation: Cell loss, host Schwann cell replacement, and strategies to enhance survival. *Glia* 2006;53:338-343.
  24. Wennberg L, Czeck KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z, et al. Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation* 2001;71:1797-1806.
  25. Cichetti F, Costantini L, Belizaire R, Burton W, Isacson O, Fodor W. Combined inhibition of apoptosis and complement improves neural graft survival of embryonic rat and porcine mesencephalon in the rat brain. *Exp Neurol* 2002;177:376-384.
  26. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Morshead CM, Fehlings MG. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26:3377-3389.
  27. Wei L, Cui L, Snider BJ, Rivkin M, Yu SS, Lee CS, et al. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2005;19:183-193.
  28. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195-1201.
  29. Bakshi A, Shimizu S, Keck CA, Cho S, LeBold DG, Morales D, et al. Neural progenitor cells engineered to secrete GDNF show enhanced survival, neuronal differentiation and improve cognitive function following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 2006;23:2119-2134.
  30. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 1996;383:624-627.
  31. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult

- dentate gyrus. *J Neurosci* 2000;20:8727-8735.
32. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 2002;8:955-962.
  33. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302:1760-1765.
  34. Cao QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 2001;167:48-58.
  35. Cao QL, Howard RM, Dennison JB, Whittemore SR. Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord. *Exp Neurol* 2002;177:349-359.
  36. Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2004;76:265-276.
  37. Dihne M, Bernreuther C, Hagel C, Wesche KO, Schachner M. Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells* 2006;24:1458-1466.
  38. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999;5:1410-1412.
  39. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110:385-397.
  40. Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, et al. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7123-7128.
  41. Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 2005;8:346-353.
  42. Hwang DH, Kim BG, Kim EJ, Lee SI, Joo IS, Kim SU. Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig2 induces myelination and enhances locomotor recovery in rat spinal cord injury model. Program No. 585.6. 2006 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006. Online.
  43. Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 2000;1:20-29.
  44. Bambakidis NC, Miller RH. Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion. *Spine J* 2004;4:16-26.
  45. Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M, et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol* 2004;189:33-44.
  46. Fournier AE, Strittmatter SM. Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:89-94.
  47. Caroni P, Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1988;1:85-96.
  48. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002;417:941-944.
  49. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995;378:498-501.
  50. Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, Bregman BS, Filbin MT. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8786-8790.
  51. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 1997;390:680-683.
  52. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002;416:636-640.
  53. Hamada M, Yoshikawa H, Ueda Y, Kurokawa MS, Watanabe K, Sakakibara M, et al. Introduction of the MASH1 gene into mouse embryonic stem cells leads to differentiation of motoneuron precursors lacking Nogo receptor expression that can be applicable for transplantation to spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2006;22:509-522.
  54. Kim BG, Dai HN, Lynskey JV, McAtee M, Bregman BS. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans potentiates transplant-mediated axonal remodeling and functional recovery. *J Comp Neurol* 2006;497:182-198.
  55. Ikegami T, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Okada S, Iwanami A, et al. Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 2005;22:3036-3046.
  56. Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 1996;274:1133-1138.
  57. Magavi SSP, Mitchell BD, Szentirmai O, Carter BS, Macklis JD. Adult-born and preexisting olfactory granule neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo. *J Neurosci* 2005;25:10729-10739.
  58. Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 2002;36:855-868.
  59. Fields RD. Myelination: an overlooked mechanism of synaptic plasticity? *Neuroscientist* 2005;11:528-531.
  60. Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, et al. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 2006;49:823-832.