

**세포응용연구사업**  
**Stem Cell Research**

**개의 척수손상 동물모델에서 줄기세포를  
이용한 세포이식치료 기술개발**

Development of stem cell transplantation therapy  
using canine spinal cord injury model

서울대학교 의과대학

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 과학기술부가 지원하는 세포응용연구사업단 “줄기세포를 이용한 척수신경손상 세포이식치료 기술개발”과제 (세부과제 “개의 척수손상 동물모델에서 줄기세포를 이용한 세포 이식 치료 기술개발”) 의 단계보고서로 제출합니다.

2005. 5.

주관연구기관명 : 서울대학교 의과대학

주관연구책임자 : 윤 병 우

협동연구기관명 : 가톨릭대학교 의과대학

협동연구책임자 : 전 신 수

보고서 초록

과제관리번호	SC13161	해당단계 연구기간	2004.4.1 - 2005.3.31	단계 구분	1단계 / 총3단계
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	세포응용연구사업			
연구과제명	개의 척수손상 동물모델에서 줄기세포를 이용한 세포이식치료 기술개발				
연구책임자	윤 병 우	해당단계 참여연구원수	총 : 20 명 내부 : 10 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 125,000 천원 기업: 0 천원 계: 125,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 의과대학		참여기업명	해당없음	
국제공동연구	상대국명 :	해당없음	상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :	해당없음	연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면수	
<p>최근의 연구결과들은 설치류의 다양한 척수손상 모델에서 이식한 신경줄기세포가 이식된 이후에 성공적으로 생존하고, 이주하며, 축삭의 재생을 촉진하고 결과적으로 기능적 회복을 유도함을 보여주고 있다. 하지만, 설치류와 같은 소형동물의 데이터만으로 바로 임상에 적용하는 것은 무리이기 때문에, 줄기세포의 이식 효과는 개나 원숭이와 같은 중대형 동물에서 검증되어야 한다. 따라서 본 연구는 인간신경줄기세포를 개의 척수손상 모델에 이식한 후 이식된 세포가 적절히 생존하며 기능적 회복을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여 수행하였다. 모두 8마리의 개가 연구에 사용되었으며, 제2 요추 부위에서 척수를 원편에서 5mm 길이로 잘라내는 lateral hemisection 모델을 사용하였다. 이 연구에서 줄기세포 이식군은 200 microliter의 성장촉진 매트릭스(matrigel)에 <math>10^7</math>개의 인간신경줄기세포를 분주한 혼합물을 절단된 척수에 이식하였으며, 대조군은 같은 양의 matrigel만 이식하였다. 이식 전에 줄기세포는 이식 후 이주과정을 spoiled gradient-recalled (SPGR) MR imaging을 이용하여 생체내 추적하기 위해 superparamagnetic iron-oxide nanoparticles (SPIO)에 처치하여 염색하였다. 기능적 회복 정도는 본 연구를 위해 개발한 canine locomotor scale을 사용하여 매주 한번씩 검사하였으며 모든 동물은 12주 후에 희생되었다. 이식된 신경줄기세포는 수술 2, 4, 12 주에 시행된 SPGR MRI에서 국한된 저음영 소견으로 쉽게 관찰되었다. 이식된 세포는 이식 부위로부터 주변부위로 이주하는 것으로 생각되었다. 대조군과 비교하면 matrigel과 신경줄기세포의 혼합물을 이식한 이식군에서는 보행기능 평가에서 의미 있게 향상된 기능적 회복을 확인할 수 있었다 (11.2 2.1 vs. 15.4 1.7, respectively at 12 weeks; <math>p &lt; 0.05</math>). 인간신경줄기세포는 개 척수손상 모델에 이식된 후 MRI를 이용하여 쉽게 생체에서 추적할 수 있으며, 이식된 줄기세포는 개 척수손상의 기능적 회복을 돕는 것으로 보인다. 본 연구결과는 2단계에서 더 많은 동물 실험을 통해 검증되어야 할 것이다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	줄기세포, 척수손상, 이식, 자기공명영상			
	영 어	stem cell, spinal cord injury, transplantation, magnetic resonance imaging			

## 요 약 문

### I. 제 목

개의 척수손상 모델에서 신경줄기세포와 성장촉진 매트릭스의 이식 효과 (Transplantation of Growth-Promoting Matrix Seeded with Human Neural Stem Cells in Canine Spinal Cord Hemisection)

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근의 연구결과들은 설치류의 다양한 척수손상 모델에서 이식한 신경줄기세포가 이식된 이후에 성공적으로 생존하고, 이주하며, 축삭의 재생을 촉진하고 결과적으로 기능적 회복을 유도함을 보여주고 있다. 하지만, 설치류와 같은 소형동물의 데이터만으로 바로 임상에 적용하는 것은 무리이기 때문에, 줄기세포의 이식 효과는 개나 원숭이와 같은 중대형 동물에서 검증되어야 한다. 따라서 본 연구는 인간신경줄기세포를 개의 척수손상 모델에 이식한 후 이식된 세포가 적절히 생존하며 기능적 회복을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여 수행하였다.

### III. 연구개발의 방법

모두 8마리의 개가 연구에 사용되었으며, 제2 요추 부위에서 척수를 왼편에서 5 mm 길이로 잘라내는 lateral hemisection 모델을 사용하였다. 이 연구에서 줄기세포 이식군은 200 microliter의 성장촉진 매트릭스(matrigel)에  $10^7$ 개의 인간신경줄기세포를 분주한 혼합물을 절단된 척수에 이식하였으며, 대조군은 같은 양의 matrigel만 이식하였다. 이식 전에 줄기세포는 이식 후 이주과정을 spoiled gradient-recalled (SPGR) MR imaging을 이용하여 생체내 추적하기 위해 superparamagnetic iron-oxide nanoparticles (SPIO)에 처치하여 염색하였다. 기능적 회복 정도는 본 연구를 위해 개발한 canine locomotor scale을 사용하여 매주 한번씩 검사하였으며 모든 동물은 12주 후에 희생되었다.

### IV. 연구개발결과

이식된 신경줄기세포는 수술 2, 4, 12 주에 시행된 SPGR MRI에서 국한된 저음영 소견으로 쉽게 관찰되었다. 이식된 세포는 이식 부위로부터 주변부위로 이주하는 것으로 생각되었다. 대조군과 비교하면 matrigel과 신경줄기세포의 혼합물을 이식한 이식군에서는 보행기능 평가에서 의미 있게 향상된 기능적 회복을 확인할 수 있었다 (11.2 ± 2.1 vs. 15.4 ± 1.7, respectively at 12 weeks;  $p < 0.05$ ).

## V. 연구개발결과의 결론

인간신경줄기세포는 개 척수손상 모델에 이식된 후 MRI를 이용하여 쉽게 생체에서 추적할 수 있으며, 이식된 줄기세포는 개 척수손상의 기능적 회복을 돕는 것으로 보인다. 본 연구결과는 2단계에서 더 많은 동물 실험을 통해 검증되어야 할 것이다.

## S U M M A R Y

Background and Purpose: Previous studies have reported that exogenous neural stem cells may successfully survive, migrate, promote axonal regeneration, and improve functional recovery in various rodent models of spinal cord injury. However, because larger animals are more analogous to humans, the experimental favorable results should be confirmed in these animals such as dogs or monkeys. Therefore, the present experiment was undertaken to determine whether human neural stem cells survive and improve functional outcome in a canine model of hemisection.

Methods: Eight mongrel dogs were studied. Lateral hemisection in the left side was induced by removal of unilateral block of 5 mm thickness at L2 level. We transplanted either 1) matrigel (200 microliter) alone as a growth-promoting matrix or 2) matrigel seeded with human neural stem cells ( $10^7$  cells) into the transected cavity. Before transplantation, human neural stem cells were incubated with superparamagnetic iron-oxide nanoparticles (SPIO), and were *in vivo* traced by a spoiled gradient-recalled (SPGR) MR imaging. Using a canine gait scale, functional outcome was assessed regularly at intervals of one week, and the animals were sacrificed at 12 weeks.

Results: Transplanted neural stem cells were readily identified as small areas of dark signal intensity in the SPGR MR imaging at 2, 4, and 12 weeks after surgery. The implanted cells seemed to migrate slowly from the implanted center to the periphery. Compared to the dogs treated with matrigel alone (n=4), the dogs that treated with a mixture of matrigel and human neural stem cells (n=4) showed significantly improved functional recovery in the gait analysis (11.2 ± 2.1 vs. 15.4 ± 1.7, respectively at 12 weeks;  $p < 0.05$ ).

Conclusions: We conclude that human neural stem cells mixed with matrigel can be visualized *in vivo* using a MR imaging system, and have beneficial effects in the canine hemisection model.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. Purpose of study -----	8
Chapter 2. Background: present status of progress -----	9
Chapter 3. Methods and results of study -----	10
Chapter 4. Degree of study achievement and contribution to the related fields -----	17
Chapter 5. Application plan of the study results -----	18
Chapter 6. References -----	19

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	10
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	17
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	18
제 6 장 참고문헌	19



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절. 연구의 배경

인간의 신경세포는 다른 세포와는 다른 특징들을 가지고 있다. 태아 때 가지고 있는 미분화된 신경세포는 여러 가지 외부자극에 의해서 분화가 일어나고, 일단 분화가 끝난 세포는 다시는 분열을 하지 않는 특징을 가지고 있다. 인간의 중추 신경계는 대뇌와 척수로 구성되어 있는데, 이 대뇌와 척수는 거대한 신경세포의 덩어리로서 각 세포간의 무수한 연락망으로 이어져 있다. 척수신경손상(Spinal cord injury; SCI)의 경우, 기능 손상은 일차적으로 척수에 가해지는 물리적인 손상과 이차적으로 발생하는 일련의 면역반응과 화학 물질에 의해 신경통로가 파괴되어 영구적으로, 감각, 운동 그리고 자율신경계기능을 상실시키게 된다.

본 연구과제는 의과학이 고도로 발달된 지금도 별다른 치료법이 없는 척수손상에 대한 치료적 방법으로 대두된 줄기세포의 치료의 현실화를 목표로 두고 있다. 척수손상의 가장 흔한 원인인 교통사고 및 산재사고 등은 왕성한 사회활동을 하는 젊은 연령군에서 많이 발생하므로, 척수손상환자의 연령군이 여타 만성 퇴행성질환에 비해 상당히 낮다. 이에 젊은 인구의 영구적 노동력상실로 인한 사회적 손실이 상당할 뿐 만 아니라, 평생 장애를 안고 살아가야 하므로 본인 및 가족들의 심리적 및 경제적 부담 역시 심각하다. 현재까지 전무한 척수 장애환자의 회복에 도움이 될 수 있는 치료법이 개발된다면, 개인 및 가족뿐만 아니라 사회 전체적으로 상당한 파급효과가 기대된다.

## 2절. 연구의 목적

### 1. 척수손상 개 모델 확립

중형 동물 모델로서 개의 실험적 가치는 상당하나, 기존 자료가 매우 드문 상태임. 특히 개에서 재현성 있는 척수 hemisection 모델 및 이에 따른 기능적 평가술을 확립한다면 향후 다양한 실험에 매우 중요한 자료로 사용될 것임.

### 2. 척수손상 개 모델에서의 세포이식치료기술 확립

향후 영장류에서 척수손상모델에서의 줄기세포 이식 치료술의 전임상을 시행할 때 시행착오를 줄여 실험의 재원과 시간을 현격히 단축시킬 수 있을 것이며, 이식술의 성공률도 현저히 높아질 것임.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

미국의 Wisconsin 대학의 J.A. Thomson에 의해서 만들어진 인간 배아 줄기세포 (embryonic stem cell; ESC) (Science, 1998)는 인간의 몸을 구성하는 모든 세포로 분화 가능한 분화전능을 가지고 있으며, 영구히 미분화 상태로 유지하면서 분열 할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 이 세포에서 신경 세포로의 분화도 가능한 것으로 밝혀졌다. 만약, 줄기세포로부터 분화된 신경세포를 손상된 척수조직에 이식을 하면 기능이 돌아온다는 연구결과가 Washington 대학의 McDonald에 의해서 흰쥐에 마우스 배아 줄기세포를 이식하여 기능회복을 증명되기도 하였다 (1999). 흰쥐를 이용한 척수 손상 모델을 이용하여, 척수 손상 이후 줄기세포이식치료에 의해 회복이 촉진되는 기전으로 크게 기존의 신경세포가 파괴되는 것을 막고, 탈수초화된 세포의 재수초화가 촉진되고, 다른 신경줄기로의 우회가 일어나며, 새로운 운동 및 감각 신경의 재생이 가능하다는 사실이 실험적으로 확인되었다.

한편 현재까지 척수 손상 모델에서 세포 이식 치료의 효과가 보고 된 동물은 거의 흰쥐였으나, 흰쥐의 척수 신경은 사람 크기의 십분의 일 정도로 아주 작고, 신경해부학적 및 신경생리학적 구조가 인간과 다르기 때문에 현 단계에서 흰쥐의 실험만으로 사람의 전임상 단계를 대신하기는 현실적으로 어려울 것이다. 게다가 쥐에서 시행한 치료방법에 의한 효과가 큰 동물에서도 재현이 가능하다는 근거가 아직 없기 때문에, 영장류나 사람을 대상으로 한 임상 실험 이전에 중형 동물실험을 거쳐야 할 필요가 있겠다.

원숭이 실험은 원숭이의 공급 및 시설 등의 제약으로 인해 흰쥐 실험과 같이 다량으로 할 수 없으므로 대안으로 개 모델에서 최적의 세포 주입술 및 이식체에 대한 사전 지식축적이 경제적, 과학적 측면에서 필요하겠다. 이후 개 모델에서 쌓인 데이터를 원숭이 실험에 적용한다면 한층 더 검증된 기술이 될 것으로 사료된다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1절. 개 척수손상 모델 및 줄기세포 주입법의 확립

1단계 3차 년도에 시작한 본 연구에서는 척수손상 모델 확립을 위해 모두 7마리의 개를 대상으로 hemisection을 시행하였고, 각 실험전에서는 모두 일관된 기능 손상 정도를 나타내어 모델이 확립되었음을 확인하였다. 확립된 실험과정은 아래와 같다.

실험견은 acepromazine hydrochloride (0.1 mg/kg), ketamine hydrochloride (10 mg/kg), a mixture of 50% nitrous oxide and 50% oxygen, and halothan (0.5% to 0.7%)으로 마취한다. 실험견은 기관지 삽관하고 정상 호흡 및 산-염기 균형을 위해 인공호흡을 유지한다. 체온은 직장체온계로 감시하고 heating pad를 이용해 정상체온을 유지하며, 10mL/kg/hr의 속도로 0.9% 생리식염수를 정맥주사한다. Sterile technique으로 2번째 요추 부위(L2)에 laminectomy를 가한다. No. 11 surgical blade를 이용하여 척수의 posterior median sulcus를 따라 5 mm 길이의 종축 절단을 시행하고, rostral 및 caudal 말단에 측면절단을 하며, microscissor로 절개된 조직을 제거함으로써 unilateral hemisection을 만든다. Surgicell과 gelfoam으로 지혈이 되면 두 명의 다른 연구자가 병변이 모델로 적합한 지 여부를 판단한다. 줄기세포와 Matrigel로 채운 pipet tip을 transection gap에 위치하고 channel을 개봉한 뒤 내용물을 삽입한다. 이식 부위는 hydrocephalus shunt film 조각으로 덮고, 경막과 주위 근육조직 및 피부를 봉합하고 실험견을 마취에서 회복시킨다. Ringer's lactate solution (10 mL)과 Elizabeth collar를 수술 후 하루 동안 주입한다. 수술 직후 동물은 욕창을 막기 위해 3시간마다 체위를 바꿔준다. 실험견을 마취에서 회복시킨 후, 우리 안에서 자유롭게 활동할 수 있도록 한다. Ampicillin은 7일간 근육주사하고, 과체중을 방지하고 신경행동학적 검사의 동기 부여를 위해 제한된 음식을 공급한다. 모든 동물은 25°C의 온도와 40%의 습도, 그리고 12시간씩 밤낮 변화에 맞게 조명을 조절한 환경에서 각 우리 당 한 마리씩 사육된다.

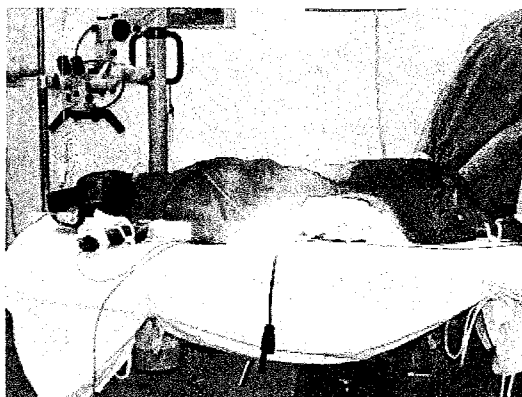


그림 1. 마취 직후 수술 직전 상태

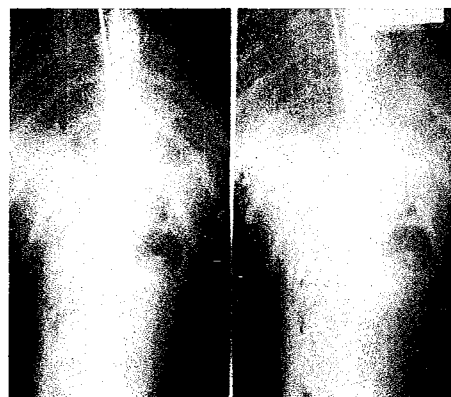


그림 2. L2 level을 확인하기 위한 X-ray



그림 3. L2 level에서 경막을 열고 척수를 노출한 상태(A)와 hemisection을 시행한 직후의 모습(B).

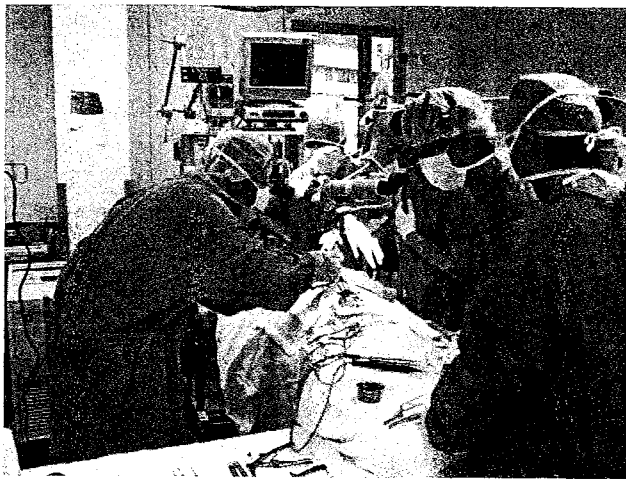


그림 4. 현미경을 이용한 미세수술 광경



그림 5. 줄기세포와 matrigel의 혼합액을 주입하는 모습(A)과 주입 직후 hemisection cavity가 혼합액으로 채워진 모습(B).

## 2절. 개 척수손상 모델에서 기능평가 방법의 확립

척수손상 연구는 대부분 흰쥐를 대상으로 이루어진 것이기 때문에 줄기세포 분야 뿐 아니라 다른 분야에서도 개를 이용한 척수손상 연구는 상당히 드물다. 따라서 이 연구에서 가장 중요한 결과인 기능회복의 정도를 비교하기 위한 표준화된 평가방법은

이전까지 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 과거에 여러 동물에서 실험된 방법(Dewey et al., 2003; Faden et al., 1984)을 적용하여 새로운 canine locomotor scale을 구축하였다. 간단히 언급하자면, 행동학적 검사법은 두 명의 연구자에 의해 매 5일마다 점수를 확인하고 비교한다. 실험견의 행동학적 점수는 아래 표와 같이 21점을 만점으로 하여 구축하였다. 각 단계는 leg movement without weight support, weight support, plantar stepping (proprioception), stand up himself / leg moving at standing, walking coordination, walking parallel, toe clearance, normal의 단계로 구성되어 있다. 이는 과거에 주로 쓰던 단편적인 방법인 6-point modified Tarlov scale(Faden et al., 1984)에 비해 훨씬 우수한 방법으로 생각된다. 6-point modified Tarlov scale은 0 = absent of voluntary movement; 1 = spontaneous movement but inability to support; 2 = ability to support weight but unable to walk; 3 = ability to walk but with marked Spasticity and/or ataxia; 4 = ability to run but with mild Spasticity and/or ataxia and 5 = normal motor function으로 구성되어 있다. 새로 확립한 canine locomotor scale은 아래와 같다.

GRADE	INDICATION	SCORE	Locomotor Scale
I	Leg movement Without weight support	0	No observable hind limb (HL) movement or No voluntary movement or HL Stretch out at sitting position
		1	Observable voluntary movement of one or two joints but can not tract against leg traction by examiner
		2	Voluntary traction against leg traction by examiner or HL sweeping but no weight support or Occasional to frequent HL flexion position at sitting position but no weight support
II	Weight support	3	Occasional weight supported knuckling but no leg moving to other place, but can not stand up himself
		4	Frequently weight supported knuckling but no leg moving to other place, but can not stand up himself
		5	Consistent weight supported knuckling but no leg moving to other place, but can not stand up himself
III	Plantar stepping (Proprioception)	6	Weight supported occasional paw position but no leg moving to other place, but not stand up himself
		7	Weight supported frequently paw position but no leg moving to other place, and occasionally stand up himself
		8	Weight supported consistently paw position but no leg moving to other place, and occasional to frequent stand up himself
IV	Stand up himself Leg moving at standing	9	Frequent to consistent stand up himself and Weight supported with frequent to consistent plantar stepping and occasional moving to leg, but not stand next step
		10	Frequent to consistent stand up himself and Weight supported with frequent to consistent plantar stepping and frequently moving to leg, and occasionally stand next step, but no FL-HL coordination
		11	Frequent to consistent stand up himself and Weight supported with frequent to consistent plantar stepping and frequently moving to leg, and frequent stand next step, but no FL-HL coordination
V	Walking Coordination	12	Frequent to consistent moved dorsal or plantar steps and occasional FL-HL coordination, but not parallel
		13	Frequent to consistent moved dorsal or plantar steps and frequently FL-HL coordination, but not parallel
		14	Frequent to consistent weight supported plantar steps, consistent FL-HL coordination, but not parallel
VI	Walking parallel	15	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, occasional parallel, but no toe clearance
		16	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, frequent parallel, but no toe clearance
		17	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, frequent to consistent parallel, but no toe clearance
VII	Toe clearance	18	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, frequent to consistent parallel, and occasional toe clearance
		19	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, frequent to consistent parallel, and frequent toe clearance
		20	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, frequent to consistent parallel, and frequent toe clearance
VIII	Normal	21	Consistent weight supported plantar steps, frequent FL-HL coordination, consistent parallel, and consistent toe clearance

### 3절. 인간신경줄기세포주의 배양 및 관리

본 연구진은 이 연구를 위해 인간신경줄기세포주(human neural stem cell line)를 사용한다. 이 세포주는 줄기세포 연구의 세계적인 권위자인 아주대학교 김승업 교수가 캐나다의 British Columbia 대학에서 확립한 세포주로서 이 실험을 위해 지속적으로 공급할 예정이다. 이 세포주의 출처, 분리 및 배양, 관리에 관한 내용은 Nature Biotechnology에 출판된 논문(Flax et al., 1998)에 자세히 기술되어 있으며 최근 논문(Cho et al., Neuroreport 2002)에 본 연구에서 사용할 HB1.F3 인간신경줄기세포주에 관한 내용이 기술되어 있다. HB1.F3 cell line은 15주 인간 태아 telecephalon에서 분리한 것이고, 신경줄기세포의 특징적 표지자인 nestin과 vimentin을 표현한다. 이 세포주는 rat의 뇌로 이식 시 신생물(neoplasm)을 형성을 하지 않는 것이 보고 되어있으며 유전학적 이상은 없는 것으로 확인하였다.

본 연구에서는 hemisection시킨 척수에 이식하기 위해 biodegradable implant인 matrigel과 혼합하여 줄기세포-생체기질 복합물을 제작한다. Matrigel은 laminin, collagen IV, entactin and heparan sulphate proteoglycan과 일부 growth factors를 함유하고 있으나, 그 자체로는 손상된 axon의 재생을 촉진하지는 않는 것으로 알려져 본 연구에서 줄기세포의 효과를 규명하는 데에는 가장 적절한 생체기질로 생각되었다.

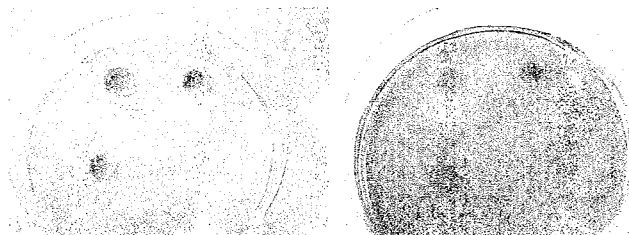


그림 6. 신경줄기세포-생체기질(matrigel) 복합물

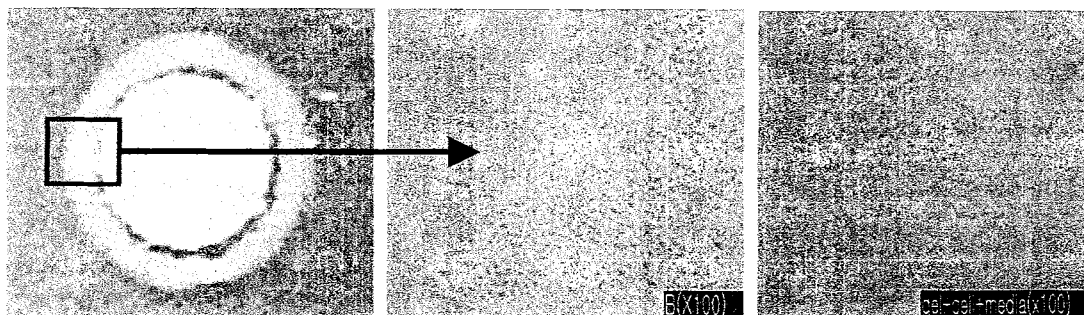


그림 7. 생체기질(matrigel) 내에서 증식하는 신경줄기세포와 신경세포로 분화된 모습

#### 4절. 인간신경줄기세포 이식결과 (preliminary results)

위의 준비과정을 끝내고 실제적으로 본 연구에 진입하였으며 현재 개 척수손상 모델에서 신경줄기세포의 역할에 관한 연구가 한창 진행 중이다. HB1.F3 cell-matrigel complex를 이식할 실험견과 matrigel만 이식할 대조군을 각각 5-10 마리씩 제작하여 실험을 진행할 예정이며 현재 세포이식군 4마리와 대조군 4마리가 실험되었다. 전반적인 실험진행과정은 아래와 같다.

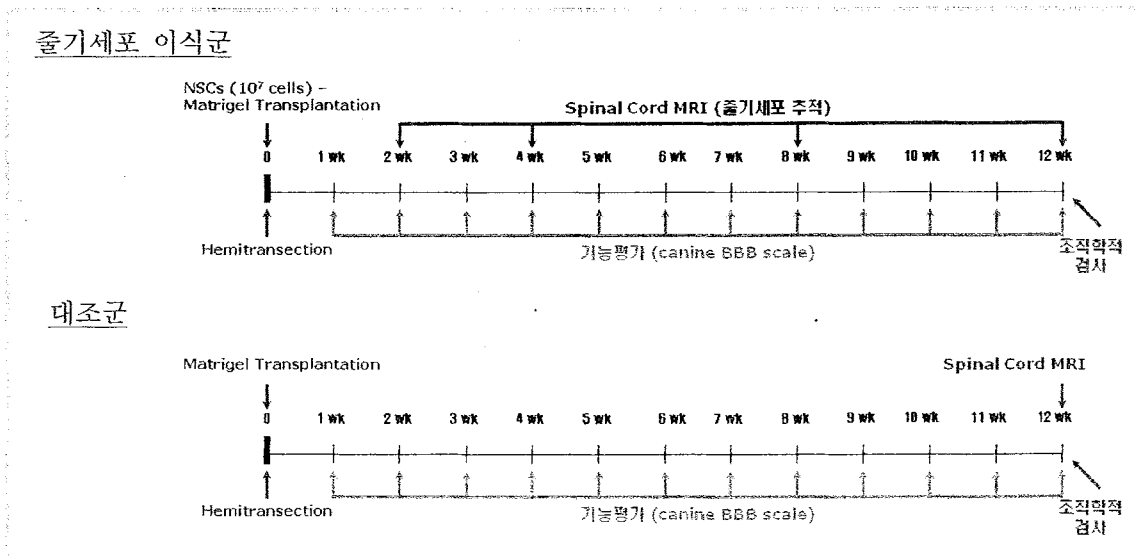
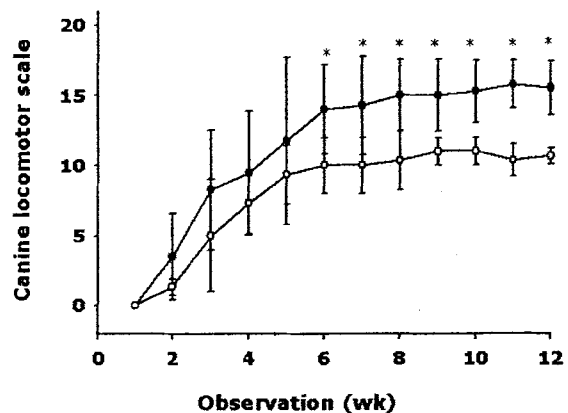


그림 8. Schematic protocols

실험은 진행 중이지만, 현재까지의 결과에서는 행동학적 검사에서 의미 있는 결과가 나오고 있다. 대조군과 비교하면 matrigel과 신경줄기세포의 혼합물을 이식한 이식군에서는 보행기능 평가에서 의미 있게 향상된 기능적 회복을 확인할 수 있었다 (11.2 ± 2.1 vs. 15.4 ± 1.7, respectively at 12 weeks;  $p < 0.05$ ).

아직 통계적으로 의미 있는 수까지 진행된 것은 아니므로 2단계에서 보충 실험으로 결론을 낼 예정이다.

그림 9. 행동학적 검사소견



## 5절. MRI를 이용한 인간신경줄기세포의 생체내 추적

Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles(SPIO)는 임상적으로 매우 유용한 *in vivo* 추적자이다. SPIO로 염색된 세포는 MRI를 이용하여 생체 내에서 추적할 수가 있어서 향후 환자에서의 적용 가능성이 매우 높은 방법이다. 본 연구진은 HB1.F3를 조직내로 주입 후 세포의 이동을 알기 위해 SPIO중 하나인 Feridex<sup>®</sup>를 3일간 염색한 후에 제대로 염색이 되었는지 *in vitro*로 관찰하였다.

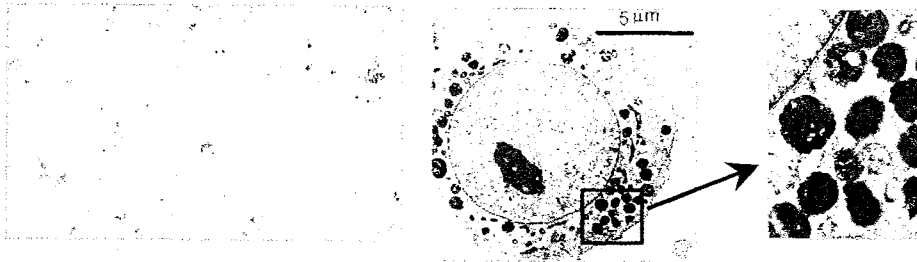


그림 10. Feridex<sup>®</sup>에 염색된 세포를 Prussian blue 염색하여 관찰한 소견 (LM & EM)

위의 방법으로 SPIO로 염색한 인간신경줄기세포주를 hemisection 시킨 개에게 이식한 후에 3D-T2\*-weighted gradient-echo (GRE) sequence or spoiled gradient recalled (SPGR) sequence를 이용하여 이식된 세포주를 생체 내에서 추적하는데 성공하였다.

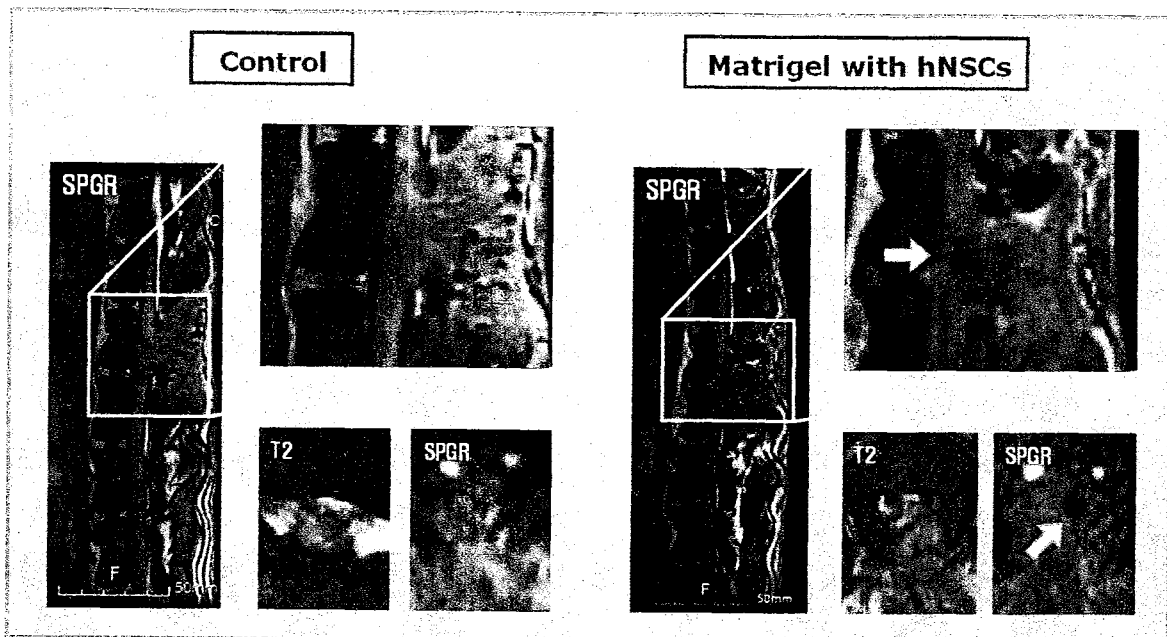


그림 11. SPGR sequence MRI에 의해 저음영 소견으로 관찰되는 이식된 줄기세포.



초기에 SPGR MRI를 통해 저음영으로 관찰된 줄기세포는 시간이 지날수록 주변 부위로 migration하는 양상으로 관찰되었다.

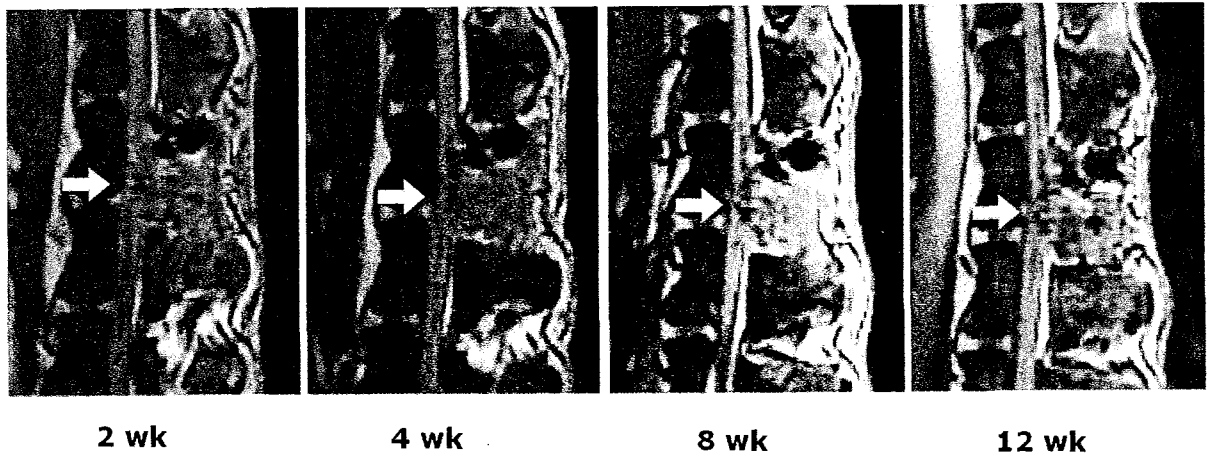


그림 12. 주변부위로 이주하는 양상으로 관찰되는 이식된 줄기세포.

## 6절. 이식된 인간신경줄기세포의 조직내 생존 여부

12주에 희생시킨 개의 조직소견에서 H&E 및 Luxol fast blue 염색으로 hemisection model 적절하게 제작되었음을 확인할 수 있었음.

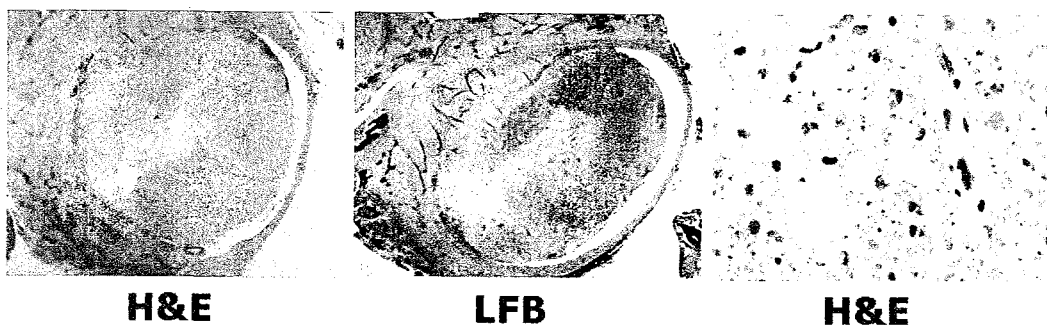
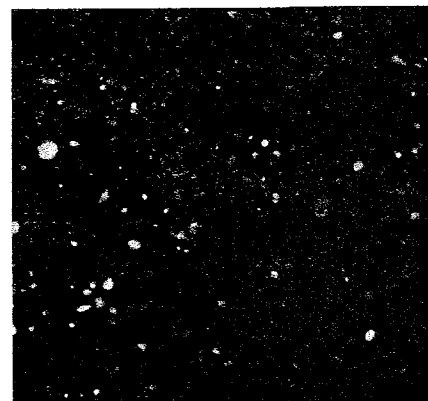


그림 13. 조직소견

인간신경줄기세포임을 확인하기 위한 human nuclei antibody 염색에서 조직절편에서 다량으로 관찰되는 줄기세포를 확인하였음.

그림 14. Human nuclei 염색



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

계획서(협약서)상의 1단계 연구개발 세부목표	추진실적	달성도(%)
○ 개 척수손상 모델의 제작 및 기능회복평가기술 확립	일관된 개 척수손상 모델을 확립하였고 modified BBB scale 확립	100%
○ 배아줄기세포 및 성체 줄기 세포로부터 신경세포로의 분화 유도	애초에 계획된 인간배아줄기세포주는 본 연구진에서 보유 중인 인간신경줄기세포 주(HB1.F3)로 교체하였고, 이를 세포응용 사업단에 보고한 바 있음. 인간 신경줄기 세포주는 이미 신경세포 등으로의 분화가 잘 알려져 있으며 본 실험에서는 생체기 질(matrigel) 내에서 증식하고 신경세포 및 성상세포로 분화하는 세포를 다수 관 찰하였음.	100%
○ 척수손상 개 모델에 세포이식 기반기술 확립	현재 HB1.F3 세포주를 주입한 2마리의 실 험견과 생체기질만 주입한 4마리의 대조 군이 있으며 아직 실험견이 희생되지 않 아 줄기세포의 이주, 증식 및 분화를 관찰 하지는 않은 상태임. 1년차 실험기간인 2005. 3월까지의 결과가 나와 100%를 달 성할 것으로 예상됨.	60%

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

현재까지 척수손상 모델에서 세포이식 치료의 효과는 흰쥐를 사용한 연구가 대부분이었으나, 흰쥐의 신경해부학적 및 신경생리학적 구조가 인간과 상당히 다르기 때문에 흰쥐에서의 연구결과를 환자에게 바로 적용하기는 현실적으로 매우 어려운 일이다. 게다가 흰쥐에서 시행한 치료방법에 의한 효과가 큰 동물에서도 재현이 가능하다는 근거가 아직 없기 때문에 환자에게 적용하기 이전에 흰쥐에서의 연구결과는 중형동물 및 영장류 실험을 통해 그 효능이 입증되는지 타당성은 있는지 여부가 반드시 확인되어야만 한다. 원숭이 실험은 원숭이의 공급 및 시설 등의 제약으로 인해 흰쥐 실험과 같이 대량으로 할 수가 없다는 단점이 있다. 따라서 그 대안으로 개와 같은 중형동물에서의 검증이 필요하며, 개 실험에서 쌓인 연구결과를 원숭이 실험에 적용하는 방법이 가장 합리적이라고 생각된다.

현재 연구가 진행 중이지만 중형동물인 개에서의 본 실험결과는 향후 임상적용을 위해 원숭이 실험의 전단계로서 매우 고무적이라고 할 만하다. 본 연구결과는 마무리 되는 대로 2단계 원숭이에서의 실험을 거쳐 3단계에서 임상시험을 통해 환자에게 적용할 예정이다. 본 연구팀은 줄기세포를 이용한 뇌졸중 실험의 경험을 다수 가지고 있고(Chu et al., 2003; Chu et al., 2004), 서울대 의과대학 신경과-신경외과 및 서울대 수의과의 협력으로 개의 모델 제작 및 이식 후 평가, 관리가 용이하다는 강점을 가지고 있다.

본 연구과제의 목표는 의학이 고도로 발달된 지금도 뚜렷한 치료법이 없는 척수손상에 대한 새로운 치료적 방법으로서 줄기세포 이식법의 임상화에 목표를 두고 있다. 통계에 따르면, 미국에서만 한해 11,000 여명의 새로운 환자가 발생하고 있으며, 모두 20-30만 명의 환자가 척수손상으로 고통을 받고 있다고 한다. 우리나라에서도 약 7만 명이상의 환자가 있을 것으로 예상이 되며, 줄기세포의 이식술의 확립이 된다면 연간 수백억 달러이상의 의료시장 창출이 기대된다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Ramon y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford: Oxford University Press; 1928.
2. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. JAMA 1911;57:878-880.
3. Fukuoka M, Matsui N, Takanobu O, Murakami M, Seo Y. Magnetic resonance imaging of experimental subacute spinal cord compression. Spine 1998;23:1540-1549.
4. Li GL, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. Acta Neuropathol 1999;98:473-480.
5. Ohta K, Fujimura Y, Nakamura M, Watanabe M, Yato Y. Experimental study on MRI evaluation of the course of cervical spinal cord injury. Spinal Cord 1999;37:580-584.
6. Perdiki M, Farooque M, Holtz A, Li GL, Olsson Y. Expression of endothelial barrier antigen immunoreactivity in blood vessels following compression trauma to rat spinal cord. Acta Neuropathol 1998;96:8-12.
7. Duncan EG, Lemaire C, Armstrong RL, Tator CH, Potts DG, Linden RD. High-resolution magnetic resonance imaging of experimental spinal cord injury in the rat. Neurosurgery 1992;31:510-519.
8. Schwartz ED, Yeziarski RP, Pattany PM, Quencer RM, Weaver RG. Diffusion-weighted MR imaging in a rat model of syringomyelia after excitotoxic spinal cord injury. Am J Neuroradiol 1999;20:1422-1428.
9. Bilgen M, Abbe R, Narayana PA. Dynamic contrast-enhanced MRI of experimental spinal cord injury: in vivo serial studies. Magn Reson Med 2001;45:614-622.
10. Bilgen M, Abbe R, Liu SJ, Narayana PA. Spatial and temporal evolution of hemorrhage in the hyperacute phase of experimental spinal cord injury: in vivo magnetic resonance imaging. Magn Reson Med 2000;43:594-600.
11. Fujii H, Yone K, Sakou T. Magnetic resonance imaging study of experimental acute spinal cord injury. Spine 1993;18:2030-2034.

12. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA* 1911;57:878880.
13. Alderman JL, Osterholm JL, DAmore BR, Moberg RS, Irvin JD. Influence of arterial blood pressure upon central hemorrhagic necrosis after severe spinal cord injury. *Neurosurgery* 1979;4:5355.
14. Martinez LJ, Alderman JL, Kagan RS, Osterholm JL. Spatial distribution of edema in the cat spinal cord after impact injury. *Neurosurgery* 1981;8:450453.
15. Schouman-Claeys E, Frijas G, Cuenod CA, Begon D, Paraire F, Martin V. MR imaging of acute spinal cord injury: results of an experimental study in dogs. *AJNR Am J Neuroradiol* 1990;11:959965
16. Falconer JC, Narayana PA, Bhattacharjee MB, Liu SJ. Quantitative MRI of spinal cord injury in a rat model. *Magn Reson Med* 1994;32:484491.
17. Hackney D, Ford JC, Markowitz RS, Hand CM, Joseph PM, Black P. Experimental spinal cord injury: imaging the acute lesion. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994;15:960961.
18. Narayana PA, Kudrle WA, Liu SJ, Charnov JH, Butler BD, Harris JH Jr. Magnetic resonance imaging of hyperbaric oxygen treated rats with spinal cord injury: preliminary studies. *Magn Reson Imaging* 1991;9:423428.
19. Weirich SD, Cotler HB, Narayana PA, et al. Histopathologic correlation of magnetic resonance imaging signal patterns in a spinal cord injury model. *Spine* 1990;15:630638.
20. Ford JC, Hackney DB, Alsop DC, et al. MRI characterization of diffusion coefficients in a rat spinal cord injury model. *Magn Reson Med* 1994;31:488494.
21. Li GL, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;98:473480.
22. Ohta K, Fujimura Y, Nakamura M, Watanabe M, Yato Y. Experimental study on MRI evaluation of the course of cervical spinal cord injury. *Spinal Cord* 1999;37:580584.
23. Perdiki M, Farooque M, Holtz A, Li GL, Olsson Y. Expression of endothelial barrier antigen immunoreactivity in blood vessels following compression trauma to rat

- spinal cord. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;96:812.
24. Duncan EG, Lemaire C, Armstrong RL, Tator CH, Potts DG, Linden RD. High-resolution magnetic resonance imaging of experimental spinal cord injury in the rat. *Neurosurgery* 1992;31:510519.
25. Schwartz ED, Yeziarski RP, Pattany PM, Quencer RM, Weaver RG. Diffusion-weighted MR imaging in a rat model of syringomyelia after excitotoxic spinal cord injury. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999;20:14221428.
26. Bilgen M, Abbe R, Narayana PA. Dynamic contrast-enhanced MRI of experimental spinal cord injury: in vivo serial studies. *Magn Reson Med* 2001;45:614622.
27. Bilgen M, Abbe R, Liu SJ, Narayana PA. Spatial and temporal evolution of hemorrhage in the hyperacute phase of experimental spinal cord injury: in vivo magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 2000;43:594600.
28. Faden AI, Jacobps TP, Patrik DH, Smith MT. Megadose corticosteroid therapy following experimental spinal injury. *J Neurosurgery* 1984; 60:712-717.
29. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12:1-21.