

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 미차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락, 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명 확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

미것은 이용허락규약(Legal Code)을 미해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🖳





2006년 2월박사학위논문

손상된 흰쥐 척수에 사람중간엽세포 이식이 미치는 영향

조선대학교대학원

의 학 과

박 영 란

손상된 흰쥐 척수에 사람중간엽세포 이식이 미치는 영향

Effects of the Human-Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) transplantation on spinal cord injury of the rats

2006년 2월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

박 영 란

손상된 흰쥐 척수에 사람중간엽세포 이식이 미치는 영향

지도교수 김 종 중

이 논문을 의학박사학위 신청 논문으로 제출함.

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

박 영 란

박영란의 박사학위논문을 인준함

| 위원 | 년 장 | 조선대학교 | 교수 | 인 |
|----|------------|-------|------------|---|
| 위 | 원 | 조선대학교 | 교수 | 인 |
| 위 | 원 | 조선대학교 | 교수 | 인 |
| 위 | 원 | 조선대학교 | 교수 | 인 |
| 위 | 원 | 조선대학교 | 교 수 | 인 |

2005년 12월 16일

조선대학교 대학원

목 차

| 丑 | 목 | 차 | | |
|------|------|-----|----|------|
| 도 | 목 | 차 | | |
| ABS' | TRAC | T | | |
| 서 | | 론 | | - 1 |
| 실험 | 범재토 | 모 및 | 방법 | - 4 |
| 결 | | 과 | | - 10 |
| 고 | | 찰 | | - 13 |
| 결 | | 론 | | - 17 |
| 참 | 고 듄 | 무 헌 | | - 19 |
| 사진 |]부5 | E설명 | } | - 27 |

사 진 부 도 _______ 29

표 목 차

| Table | 1. | Primary | antibodies | used | in | this | study | 8 |
|-------|----|---------|------------|------|----|------|-------|-------|
| | | | | | | | | |
| Table | 2. | BBB Scc | res | | | | | 9 |

도 목 차

| Figure 1. Identification of hMSCs cells (In vitro and In vivo) | 29 |
|--|----|
| Figure 2. Identification of hMSCs cells in compressed spinal cord | 30 |
| Figure 3. Differentiation of hMSCs cells in compressed spinal (Colocalization of hNuclei and GFAP) | |
| Figure 4. Differentiation of hMSCs cells in compressed spinal (Colocalization of hNuclei and Map2) | |
| Figure 5. Behavioral outcome of hMSCs transplant (Incline locom | |
| Figure 6. Behavioral outcome of hMSCs transplant (Open-field locombehavior) | |

ABSTRACT

Effects of the Human-Mesenchymal Stem Cells transplantation on spinal cord injury of the rats

Park, Young-Lan

Advisor: Prof. Kim, Jong-Joong, Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Two sources of adult stem cells that have occured great interest are human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) and human umbilical cord blood cells. The hMSCs have been reported to maintain their differentiation capacity into the neuronal-lineages cells in central nervous system. Therefore, thransplantation of hMSCs represented an attractive new form of cellular therapy for clinical application in the spinal cord injury(SCI). The aim of this study is to investigate that the transplanted hMSCs by the venous circulation moved into target zone on compression injury of spinal cord and ameliorated the behavioral impairments associated with SCI.

The SCI of the rats was induced by compressing the spinal cord for 30 second with an aneurysm clip. Cholera toxin subunit B conjugated to fluorescein isothiocyanate (CTX-FITC) prelabeled hMSCs were injected intravenously through the tail vein or directly on SCI site using a 27-gauge needle. Suspensions of hMSCs collected from the human adult were delivered at concentrations in 1 or 5 day after SCI($1 \times 10^6/200 \mu l$ for I.V. injection).

After transplantation of hMSCs, the area of SCI displayed some endogenous background fluorescence, but CTX-FITC prelabeled hMSCs were clearly identifiable. The prelabeled hMSCs observed in injured areas,

but not in noninjured areas and the observed hMSCs were usually round or slightly elongated with a prominent nucleus. The number of hMSCs found in the spinal cord in each case was not plentiful, but the number of cells in the SCI1 + hMSCs group were found more than in the SCI5 + hMSCs. Also, this study demonstrated that transplanted hMSCs were reaffirmed using antisera recognizing human specific nuclei or mitochondia. The result of double immunofluorescence analysis showed some neuronal and glial marker expression in the lesion of SCI. Behavioral test scores of spinal cord injured rats treated with hMSCs at 1 days were significantly improved as compared to scores of rats similarly injured but treated at 5 day as well as the otherwise untreated injured group.

These results suggest that hMSCs are beneficial in reversing the behavioral effects of SCI, even when infused 1 day after injury. Thus, hMSCs may be a viable source of stem cells for treatment of neurological disorders.

서 론

배아줄기세포 (embryonic stem cell)는 중추신경계통 (central nervous system: CNS)의 여러 다른 부위에 이식되었을 때 특징적인 표현형을 가진 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으며 이는 숙주세포의 영향을받아 분화된다 (Lundberg 등, 1996; Qi-lin 등, 2001). 그러나 배아줄기세포는 뇌손상 (Jansen 등, 1997; Borlongan 등, 1998; Ulrica 등, 2002)이나 신경퇴행성질환 (Kordower 등, 1995; Defer 등, 1996)의 임상적 치료에 이용될 가능성이 높음에도 불구하고 윤리성과 논리적 문제 때문에 임상적 응용이 매우제한적이다. 따라서 배아줄기세포의 이러한 단점을 보완할 수 있는 성체줄기세포인 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cells; MSCs)에 대한 연구가 많이진행되어지고 있다.

골수와 탯줄혈액에서 분리한 MSCs가 가장 많이 연구되어지고 있으며 MSCs는 배아줄기세포와 마찬가지로 뼈 (bone)와 연골 (catilige), 심장근육세포 (cardiac myocyte), 신경세포 (neuron)와 신경아교세포 (glia)와 같은 여러다른 유형의 세포들로 분화할 수 있다 (Pittenger 등, 1999; Toma 등, 2002; Kobune 등, 2003). 골수에서 분리된 MSCs는 SH2, SH3 항원 (Pittenger 등, 1999)과 CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺와 같은 특이성 세포표면항원을 가지고있어 조혈모세포와 특이적으로 구분할 수 있으며, 섬유아세포형태로 바닥에착생하는 원리 때문에 쉽게 분리할 수 있다 (Tocci 등, 2003; Javazon 등, 2004). 또한 MSCs는 원래 골수에서 분리되었지만 지방 조직, 탯줄혈액 (umbilical cord blood), 말초혈액, 골격근 그리고 진피와 같은 결합조직에서도 비슷한 양상의 세포들이 분리된다 (Jiang 등, 2002; Wolfgang 등, 2005). 이러한 MSCs는 쉽게 분리할 수 있는 접근성 (accessibility), 세포를 증폭시킬 수 있는 신장성 (expandability)과 다양한 세포로 분화할 수 있는 다능성 (multipotentiality)을 모두 가지고 있어 재생의학의 응용에 매우 큰 참재력을 가지고 있다 (Pittenger 등, 1999; Andrea, 2004).

MSCs는 interleukin (IL)-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF)와 granulocyte-macropharge colony stimulating factor (GM-CSF)와 같은 cytokine을 분비 (Manas 등, 1998)할 뿐 아니라 치료 효과를 가지는 brain derived neurotrophic factor (BDNF)와 vascular endothelial growth factor (VEGF) 등의 성장인자를 분비한다 (Chen 등, 2002). 이러한 인자들의 분비가 MSCs가 손상된 CNS에 이식되면 그 기능이 활성화되어 내재성 세포들을 보호하거나 손상으로 인한 세포를 개선함으로써 기능적 결손을 감소시킨다 (Chen 등, 2001; Lu 등, 2001). 또한 매개물질를 이용하여 여러 유전인자들을 사람중간엽줄기세포 (hMSCs)에 형질전환하여 병변으로 이동시켜 분비할수 있도록 유도하는 등의 유전자치료 (gene therapy)에 대한 응용도 연구되고 있다 (Kazuhiko 등, 2005).

골수에서 분리한 MSCs가 CNS의 손상된 부위에 이식하기 적합하고 축삭돌기의 재생성을 충분히 촉진할 수 있으며 신경세포의 표지 단백질을 발현시키고 신경아교세포 중 별아교세포 (astrocyte), 희돌기아교세포 (oligodendrocyte)로 분화할 수 있다 (Woodbury 등, 2000; Akiyama 등 2002). 한편 CNS의손상과 질병모델 실험동물에 MSCs를 손상부위에 직접 이식하거나 정맥내주사한 경우 행동적 결함의 기능적 개선이 있으며 (Chen 등, 2001; Sasaki 등, 2001) 대뇌의 혈관수축병변 모델에 골수세포 이식은 병변의 크기를 감소시킬뿐만 아니라 기능 회복도 증진시킨다 (Kuroxumi 등, 2004; Iihochi 등, 2004). 또한 말이집탈락 (demyelination)과 척수손상 (spinal cord injury; SCI) 모델에서는 말이집재형성 (remyelination)을 촉진시키고 SCI의 기능 회복을 증진시킨다 (Hofstetter 등, 2002; Akiko 등, 2003; Inoue 등, 2003).

SCI는 심장혈관 및 체온 조절에 영향을 미치며 주어진 반응에 따라 달라지는 신진대사와 호르몬반응 등을 포함한 다양한 생리적 변화의 원인이 된다 (Behrmann 등, 1992). 최근에 SCI에 의한 축삭돌기의 성장과 억제성 인자들사이의 상호작용에 관한 많은 보고 (Cai 등, 1999; Lu 등, 2002)가 있었으나축삭돌기의 재생성과 조직 복구에 대해서는 경미한 회복기전에 의한 것들뿐

이며 실질적인 기능적 회복과 조직 복구를 위한 근본적 치료방법은 거의 없는 실정이다. 그러나 최근에 실험동물에 SCI 모델을 만들어 여러 생물학적물질이나 줄기세포를 대체조직의 중간물질로 이용한 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Bregman 등, 1997; Ramon-Cueto 등, 1998). 그 중에서도 줄기세포 이식은 SCI이나 신경손상에 대한 치료적 방법으로 가장 유망한 해결방법으로 제시되고 있다.

따라서 본 연구에서는 먼저 SCI 모델을 인위적으로 만든 후 1 일과 5 일후에 분화유도를 하지 않은 hMSCs를 꼬리정맥을 통해 이식을 하여 이식날짜에따른 효율성을 비교하고자 하였다. 따라서 먼저, 이식한 hMSCs들이 병변 부위에 혈관순환을 통해 이동하여 안정적으로 정착하고 생존할 수 있는지 관찰하고 human specific nuclei와 mitochondria 항체를 이용하여 재확인하였다. 또한 SCI 부위에서 이식한 hMSCs가 신경세포와 신경아교세포 계통으로 분화되는지를 신경세포분화 표지항체들을 이용하여 관찰하였으며 세포이식을 한후 SCI로 인한 기능적 결함의 회복이 이루어지는지를 변형된 BBB (Basso, Beattie, Bresnehan) 시험을 통해 행동시험으로 평가하였다 (Basso 등, 1995).

실험재료 및 방법

1) 실험동물 및 척수손상

실험동물은 수컷 흰쥐 (sprague dawley-rat) 약 8 주령의 30 마리 (240 ~ 260gm)를 이용하였다. 실험군은 척추궁절제술만 시행한 군 (LO), 척추궁절제술을 시행한 후 hMSCs를 이시한 군 (LO + hMSCs), 척수압박손상만을 시행한 군 (SCIO), 척수압박손상 1일후 hMSCs 주입군 (SCI1 + hMSCs), 그리고 척수압박손상 5 일후 hMSCs 주입군 (SCI5 + hMSCs)으로 분류하였으며 각 군에 사용한 흰쥐는 각각 6마리였다. 모든 실험군은 케타민 (2 ml/kg)을 복막안에주사하여 마취시킨 후 Euler 등(1997)의 방법에 따라 8 ~ 9번째 부위의 가슴척추뼈를 제거하였다. SCI는 척수를 노출시킨 후 클립으로 척수의 배쪽과 등쪽을 동시에 30 초간 압박하여 손상을 주었다. 이후 근육과 피부를 봉합하고 먹이와 물을 제한 없이 공급하여 사육하였으며 수술 후 5 일 동안은 항생제인 세프테졸나트륨 (5mg/300gm)을 5 회 근육주사하고 하루에 2 회씩 배뇨를시켰다.

2) hMSCs 준비와 이식

골수는 조선대학교병원(JB 줄기세포 연구소)로부터 분양받아 사용하였고 hMSCs의 분리와 배양은 Haynesvorth 등(1992)의 보고에 기초하였다. 먼저 분양 받은 골수와 멸균된 0.01M phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4)를 동등한 부피로 혼합한 후 실온에서 900 rpm, 10 분간 원심분리하여 가라앉은 세포들을 다시 부유시켜 Ficoll (Sigma) 용액에 띄어서 900 rpm에서 30 분간다시 원심분리하여 mononuclear cell layer를 분리하였다. 분리된 mononuclear cell은 완전배지 (dulbecco's eagles medium low glucose (DMEM-LG; Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco))에 부유시킨 후 같은 배지로 2회 씻어주었다. 분리된 hMSCs는 T-75 flask에 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서

배양하였고 배지는 3~4 일 후에 교환하여 약 90% confluence가 되면 0.25% trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 계대배양을 하였다. 본 실험에서는 계대배양 다섯 번째의 hMSCs를 사용하였고 분리한 세포는 glucose-saline에 2~3 회 씻어낸 다음 fluorescent isothiocyanate (FITC)가 결합되어 있는 20 μg/ml cholera toxin subunit B (CTX-FITC; Sigma)를 실온에서 15 분 동안 반응시켰다. hMSCs를 이식하기 전에 세포의 생존율과 세포 수를 확인하기 위하여혈액계수측정기(hematocytometer) 슬라이드에 세포부유액 20 μl를 떨어뜨린다음 0.1% trypan blue (Sigma) 180 μl로 염색한 후 현미경으로 관찰하여 세포수에 맞춰 1 x 10⁶개/200μl 되게 1ml 주사기에 나누어 준비하였으며 세포의 생존률은 약 95%였다. CTX-FITC 표지 hMSCs의 주입은 실험 군에 따라 쥐를 원형의 통 (tail access rodent restrainer)을 이용하여 꼬리를 고정시킨 후약 40℃ 정도의 뜨거운 물로 꼬리를 적셔 꼬리정맥을 찾아 미리 준비된 hMSCs를 27 gauge 주사바늘을 이용하여 서서히 주입하였다.

3) 형태학적 분석

조직처리 및 준비

착수를 손상시킨 후, hMSCs를 각각 1 일과 5 일에 이식하여 1, 2, 3, 7 일이 경과된 흰쥐와 행동시험이 끝난 흰쥐를 희생시켰다. 실험동물은 ketamin으로 마취시킨 후 왼쪽 심실을 통하여 생리식염수로 관류세척하고 0.1M phosphate buffer(PB, pH 7.4)용액에 녹인 4% paraformaldehyde로 관류 고정시킨 후 척수를 적출하여 4℃에서 동일 고정 액에 하루 밤 더 고정하였다. 그 후 조직은 4℃에서 30% sucrose (0.1M PB) 용액에 24 시간 침적시킨 다음 냉동절편기(cryostat microtome)를 이용하여 25~30 μm의 두께로 잘라 젤라틴으로 피막된 슬라이드위에 올린 뒤 찬바람을 이용해 실온에서 잘 말린 후 모든 조직절편은 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다.

형광현미경적 면역조직화학염색

본 실험에서는 꼬리정맥을 통해 이식한 hMSCs가 척수의 손상 부위로 이동 하여 생존한 것을 확인하기 위하여 형광면역조직화학염색을 시행하였다. 1차 적으로 hMSCs는 이식하기 전에 CTX-FITC로 표지한 후 꼬리정맥을 통하여 주 입했기 때문에 이를 확인하기 위하여 슬라이드에 있는 조직절편을 매 5 편의 절편마다 1 개의 절편을 선택하여 0.01M PBS (pH 7.4)로 10 분씩 2 회 씻어 낸 다음 조직의 습기를 제거하고 형광물질을 관찰하기 위한 수성봉입제 (Biomeda)를 이용하여 덮개유리로 봉합하여 CTX-FITC에 결합되어 있는 hMSCs 양성세포를 형광현미경으로 관찰하였다. 그 후 다음 단계의 염색을 위하여 덮개유리를 조심스럽게 벗겨낸 다음 다시 0.01M PBS로 10 분씩 2 회 씻어내 10% normal goat serum (NGS)과 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma)를 혼합한 0.01M PB에 실온에서 1시간 반응시킨 후 제 1차 항체인 monoclonal human-nuclei (MAB1281; Chemicon)와 monoclonal human-mitochondria (MAB1273; Chemicon)를 2% NGS가 첨가된 0.01M PBS용액에 각각 1 : 50으로 희석하여 4℃에서 24~48 시간 반응시켰다. 다음날 2차 항체는 0.01M PBS로 10분씩 3 회 씻어낸 후 2차 항체는 goat anti-mouse rhodamine (TRITC; Sigma)과 FITC (Sigma)를 2% NGS가 첨가된 0.01M PBS에 1 : 800으로 희석하 여 실온의 암실에서 1 시간 반응시킨 후 10 분씩 3 회 씻어낸 후 봉입하여 human-nuclei와 human-mitochondria의 양성반응을 형광현미경으로 관찰하였 다.

또한 신경세포로 분화하는지 확인하기 위해 Table 1과 같은 일차 항체들을 이용하였다. 이 실험은 먼저, 준비한 조직을 PBS로 잘 씻어낸 후 10% NGS에 실온에서 1 시간 반응시킨 후 제 1차 항체인 monoclonal human-nuclei와 Table1에 표기된 polyclonal 항체를 비율에 맞춰 동시에 희석하여 4℃에서 24~48시간 반응시켰다. 다음 날 0.01M PBS용액으로 10 분씩 3 회 씻어낸 후 2차 항체는 goat anti-mouse FITC와 goat anti-rabbit texas-red (Vector)을 2% NGS가 첨가된 0.01M PBS용액에 1 : 800으로 희석하여 실온의 암실에서 1

시간 반응시킨 후 10 분씩 3 번 씻어낸 후 봉입하였다. 그리고 형광현미경을 이용하여 FITC로 염색된 nuclei를 관찰하고 같은 절편에서 texas-red로 염색된 신경세포분화 표지단백질들을 확인한 후 두 그림을 합병시켜 두 항체가 같이 발현된 세포를 관찰하였다.

4) 척수손상 후 행동시험

최수를 압박 손상시킨 후 실험동물의 행동평가는 1 주일 간격으로 4 회 실시하였으며 운동 시험 평가는 직경 60 cm 범위의 원안에서의 맨눈관찰 (open field)과 경사 60°의 철망경사 오르기 (incline)를 실시하였다. 실험동물의 운동성을 디지털 비디오 테이프 (digital videotape)에 녹화하여 컴퓨터 비디오 파일로 편집한 다음 관찰하여 BBB score (Table. 2)의 평균 점수를 구하였다. 통계처리를 하기 위해 맨눈 관찰 점수는 중간점수를 선택하였으며 매 측정시 마다 각 실험 군에서 얻은 점수를 평균점수와 표준편차로 표시하여 T-test를 이용하여 분석하였다.

Table 1. Primary antibodies used in this study.

| Antibody | Characteristics | Working dilution | Source |
|-------------------------|---|---------------------|----------|
| Mouse-anti-hMitochondia | Grafted cell (human specificity) | 1: 100 | Chemicon |
| Mouse-anti-hNuclei | Grafted cell (nuclear protein, human specificity) | 1: 50 | Chemicon |
| Rabbit-anti-GFAP | Glial fibrillary acidic protein | 1: 200 | Sigma |
| Rabbit-anti-MAP2 | Neuronal marker | 1:1000 | Chemicon |
| Mouse-anti-MOSP | Myelin/oligodendrocyte specific protein | 1 : 500 | Chemicon |

^{*} h; Human, mono; Monoclonal, poly; Polyclonal

Table 2. BBB Scores.

| Incline | O : No low life we also went | | | | |
|------------|--|--|--|--|--|
| incline | 0 : No leg lift, no placement | | | | |
| | 1 : Attempts leg lift, no weight bearing | | | | |
| | 2 : Leg lift, placement, no weight bearing | | | | |
| | 3 : Leg lift, placement, weight bearing | | | | |
| | 4 : Leg lift, placement, weight bearing with extension | | | | |
| | 5 : Some climbing with hind limbs, no grasping | | | | |
| | 6 : Some climbing with hind limbs, with grasping | | | | |
| | 7 : Climbing slowly, no grasping | | | | |
| | 8 : Climbing slowly with grasping | | | | |
| | 9 : Climbing normally | | | | |
| Open field | 0 : No hind limbs movement, no weight bearing | | | | |
| | 1: Slight movement of 1-2 joints, no weight bearing | | | | |
| | 2 : Extensive movement of 1 joints, no weight bearing | | | | |
| | 3: Extensive movement of 2 joints, may take 1 or 2 steps | | | | |
| | 4: Slight movement of all joints (hip, knee, ankle) | | | | |
| | 5 : Normal walking | | | | |

결 과

CTX-FITC 표지 hMSCs의 동정

주로 hMSCs의 세포막에서 CTX-FITC로 진하게 표지된 것을 관찰하였으며 (Fig. 1-A), CTX-FITC 표지 hMSCs를 이식하지 않은 LO 군과 SCIO 군에서는 손상된 부위에서 내성형광물질이 관찰되었고 (Fig. 1-B,C) 형광표지물질이 뚜렷하게 확인되는 세포는 관찰되지 않았다. 그러나 SCI + hMSCs군의 SCI 부위에서 CTX-FITC 표지 hMSCs가 관찰되었고 손상되지 않은 부위에서는 hMSCs가 거의 관찰되지 않았다. In vivo에서 관찰된 CTX-FITC 표지 hMSCs는 조직의 내성형광물질 때문에 In vitro 상에서 확인된 만큼의 FITC의 강도로 확인되지 않았다. SCI 후 hMSCs 이식 후 1 일의 경우 CTX-FITC 표지 hMSCs가 소수 발견되었고, 2 일부터는 좀 더 많이 나타났고 3 일 후에는 훨씬 많은 수의 CTX-FITC 표지 hMSCs이 관찰되었다 (Fig. 1-D~F). 그러나 7 일 후에 CTX-FITC 표지 hMSCs의 수는 현저하게 감소되었다. 또한 SCI를 준 1 일만에 hMSCs를 이식한 후 7 일째 되는 군과 SCI를 준 5 일만에 hMSCs를 이식한 후 7 일째 되는 군과 SCI를 준 5 일만에 hMSCs가 극소수만이 관찰되었다.

SCI부위에서 관찰된 CTX-FITC 표지 hMSCs는 일반적으로 둥근 모양이나 타원형이며 길이는 직경이 약 10~18 /m 사이의 크기였다. 또한 SCI 부분에 전체적으로 이식된 세포들의 수는 확실하게 확인할 방법이 없었지만 관찰되는 표면적에서 보이는 CTX-FITC 표지 hMSCs의 숫자를 확인한 결과, SCI를 준 1 일만에 hMSCs를 이식한 후 7 일째 되는 군에서 SCI를 준 5 일만에 hMSCs를 이식한 후 7 일째 되는 군에서 BCI를 준 5 일만에 hMSCs를 이식한 후 7 일째 되는 군보다 약간 더 많은 세포들이 관찰되었다 (Fig. 2-A, B).

그리고 본 실험에서는 동물세포와 사람세포를 구분해 주는 사람특이성 monoclonal anti-human nuclei를 TRITC (1:800)을 이용하여 관찰할 수 있었는데 (Fig. 2-D) 이 nuclei-양성반응세포들이 CTX-FITC 표지 hMSCs와 일치

한다는 것은 이 세포가 꼬리정맥으로 이식한 사람의 세포임을 재확인하는 것이다 (Fig. 2-E).

이식한 hMSCs의 분화

먼저 hMSCs를 정맥내이식을 하고 1 주, 4 주가 지난 후 관찰한 결과, 척수의 손상된 부분에서 GFAP와 Nuclei가 동시에 발현된 세포를 확인할 수 있었지만 매우 드물게 나타났다 (Fig. 3-A~C, G~I). 또한 GFAP와 Nuclei가 동시에 발현된 세포들을 1 주와 4 주에 비교해 보면 모두 타원형을 가지며 신경세포에서 특징적으로 나타나는 신경돌기는 형성되지 않았다. 그리고 정맥내이식에서 GFAP를 발현하는 hMSCs가 손상된 부위에서 극소수로 관찰되어 직접이식한 경우 (Fig. 3-D~F)와 비교를 하였다. 그 결과, nuclei에 염색된 hMSCs는 정맥내이식보다 훨씬 많은 수가 관찰되었지만 GFAP와 Nuclei가 동시에 발현된 hMSCs는 숫자적으로 비슷하였다. Map2와 Nuclei가 동시에 발현한 hMSCs의 관찰은 정맥내 이식을 한 경우에서는 전혀 나타나지 않았고 직접 이식한 경우에 관찰할 수 있었는데 그 형태는 이식하기 전의 세포와 차이가 없었다 (Fig. 4-A~C).

행동시험분석

LO 군의 동물들은 마취에서 회복될 때부터 수술을 받지 않은 다른 동물과 같이 어떠한 기능적 결함도 나타나지 않았다. LO + hMSCs 군의 경우 LO 군과 큰 차이가 나타나지 않았다. SCI을 받은 모든 동물들은 뒷다리가 마비되어 상체에 의지하여 움직였으며 SCIO 군에서는 약 1 주일 후에는 뒷다리의 무릎과 발가락의 관절이 자연적 회복증상이 약간 관찰되었다. 그러나 시간이 지 날수록 뒷다리의 자세가 한쪽으로 기울어지는 자세와 아래몸통이 굽어진 자세를 취하고 있었으며 더 이상의 회복증상은 관찰할 수 없었으며 4 주 후에는 초기에 관찰되었던 약간의 회복증상도 관찰되지 않았다.

행동경사시험의 결과는 전체적으로 SCI + hMSCs 군에서 행동적 결함의 회

복은 크게 나타나지는 않았다. 그러나 hMSCs를 이식한 군들은 시간이 지날수록 하지의 엉덩이 관절이 약간씩 움직이고 무릎을 펴기도 했으며 바닥을 딛고 몸통을 들어 올리지는 못했으나 SCIO 군에 비하면 약간 향상된 결과를 관찰할 수 있었다. 전체적으로, 4 주에 걸친 실험군들의 BBB score는 hMSCs를이식한 군들이 SCIO 군에 비해서 매주 마다 상대적으로 높게 나타났다. 그리고 4 주에는 SCIO 군의 회복률이 약간 감소함에 비해 hMSCs를 이식한 군들에서 약간의 회복률이 관찰되었다. 특히 SCI1 + hMSCs 군에서는 SCI5 + hMSCs 군보다 약간 효과적인 회복률을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 맨눈관찰에서행동실험은 거의 경사시험에서 관찰된 것과 비슷하지만 실험한 후 3 ~ 4 주째에는 거의 같은 회복률을 나타냈다 (Fig. 6).

고 찰

흰쥐의 대뇌허혈에서 골수세포의 이식은 손상된 부위의 크기를 감소시키고 행동적 결함을 개선시킨다 (Chen 등, 2001; Kurozumi 등, 2004). 이식된 세포들은 내재성 세포의 생존률을 유지시키고 (Chen 등, 2002) 손상된 축삭의 말이집재형성 (Kato 등, 2000; Akiyama 등, 2001, 2002 a, b)과 같은 신경재생을 촉진한다. 본 연구의 결과는 운동 장치에서 계속적인 뒷다리의 운동성을 관찰함으로써 SCI후에 이식된 hMSCs가 SCI로 인한 운동적 결함이 개선됨을 확인했지만 손상된 조직에 이식된 hMSCs는 이식한 세포 수에 비해 작은수가 관찰되고 이중에서도 신경세포와 신경아교세포의 특이적 표지단백질을 발현하는 세포는 극소수 관찰되었다. 따라서 관찰된 행동적 결함의 개선이이식한 세포의 신경조직발생에 의한 효과가 아닌 이식한 세포들에 의한 신경보호작용 효과로 간주된다 (Daniel 등, 2004; Satoshi 등, 2004).

골수세포뿐만 아니라 골수에서 분리한 MSCs에서는 신경영양인자를 소량으로 분비하고 이식된 MSCs에 의해 자극된 신경아교세포는 GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), BDNF (Brain-derived neurotropic factor)와 NGF (Nerve growth factor)와 같은 인자들의 분비가 유도된다 (Chen 등, 2002). 이러한 여러 신경영양인자들은 신경세포와 신경아교세포의 분화와 재생에 관여한다고 손상된 대뇌에서 초래되는 결손된 신경조직을 보호한다 (Schabitz 등, 1997; Hirouch 등, 2002). 이 물질들에 의한 신경보호기작은 free radical 제거, 항세포사멸 활성과 항염증 활성 등이 있다 (Hirouch 등, 2001). 그리고 골수세포는 Flt-3 ligand, interleukins macrophage colony-stimulating factor와 stem cell factor를 분비 (Majumdar 등, 1998)하며, 신경질환의 개선과 관련된 VEGF, bFGF와 같은 angiogenic growth factor를 제공하고 (Hamano 등, 2002) 면역반응을 억제할수 있는 용해성매개자를 생산한다 (Bernstein 등, 1998). 이러한 분비된 물질로 인한 이식된 골수세포의 영양공급 효과는 이차손상으로부터 방어해주고

이식한 세포의 긴 생존력은 오랜 기간 동안 계속되는 영양공급 효과로 손상된 중추신경계 조직에서 강한 신경보호효과를 가질 것으로 제안된다. 골수세포 및 MSCs는 colony-stimulating factor-1, bone morphogenetic proteins, matrix bound cytokine, IL-1, IL-6, 그리고 cell-cell contact proteins을 제공하여 영양 공급과 신경생성을 증진시킨다 (Prockop 등, 1997, Li 등, 2002).

SCI 후에 이식된 MSCs가 손상된 부위에 존재하는 인자들에 의해서 별아교세포 표지인자인 GFAP가 발현되지만 신경세포 표지인자는 발현되지 않고 (Daniel 등, 2004) 별아교세포를 생산하지 못한다고 보고되었다 (Wehner 등, 2003). 그리고 Chen 등(2001)은 손상된 부위에서 이식한 MSCs가 많은 수는 아니지만 신경세포와 별아교세포로 모두 분화된다고 (Chen 등, 2001; Satoshi 등, 2004; Honma 등, 2005). 본 연구에서는 이식한 hMSCs가 상처부위까지 이동하여 존재하고 면역억제제를 쓰지 않은 조건에서도 많은 숫자는아니지만 4 주까지 살아 존재한다는 것을 확인했으며 이 중에 작은 수는 별아교세포의 표지단백질인 GFAP가 발현됐으며 신경세포 표지단백질인 Map2도국소수 발현됨을 확인하였다. 이러한 다양한 연구결과의 차이점은 MSCs가 이식된 부위의 환경이나 혹은 이식 전에 세포들의 상태와 배양상태가 다르기때문일 것으로 추측된다. 아직까지는 우리가 이식한 세포들이 어떠한 조건에서 잘 생존할 수 있고 분화가 유도되는지는 뚜렷하게 밝혀지지 않았으며 또한 이러한 세포들이 신경세포나 신경아교세포계통의 표지단백질이 발현되어도 기능적 작용을 할 것인지는 더 많은 연구가 필요하다.

정맥내 이식을 하면, 이식한 세포들의 수는 손상된 부분에서 더 집중적으로 존재하는데 이는 정상적인 상태에서는 혈액순환계와 중추신경계 사이의 blood brain barrier를 통과하여 이동하지 못하고 손상된 중추신경조직에서는 파괴된 blood brain barrier를 통해 들어가기 때문이다 (Satoshi 등, 2004). 또한 허혈상해 후 3시간 후부터 blood brain barrier의 투과성이 중가되고(Hatashita 등, 1990) 손상된 CNS의 조직액은 중간엽원시세포의 화학

주성과 monocyte chemoattractant protein-1과 같은 화학주화성 물질을 선택적으로 분비하여 CNS의 손상된 부위로 이식된 MSCs의 이동을 유도한다 (Kim 등, 1996; Satoshi 등 2004). 그래서 정맥내이식은 재수술로 인한 2차 손상없이 세포를 이식할 수 있고 목표 부위에 세포의 이동을 유도할 수 있기 때문에 현재 많이 연구되고 있다. 본 연구에서도 이식한 CTX-FITC 표지 hMSCs가 SCI 부위에 많이 관찰되었고 손상이 되지 않은 조직의 부위에는 거의 발견되지 않았다. 그리고 SCI를 인위적으로 생성시킨 후 하루 만에 이식한 군이 5일후에 이식한 군보다 약간 더 많은 수의 세포들을 손상된 부위에서 관찰된 것으로 보아 하루 만에 이식한 경우가 더 효율적이라 사료된다.

지금까지 이식하기 위한 가장 이상적인 세포 수는 환경이나 세포의 특성때문에 아직 명확하게 제시 되지 않았으나 보편적으로 정맥내이식을 할 경우에 $10^5 \sim 10^7$ 개, 손상된 부위근처에 직접 이식할 때는 $10^3 \sim 10^5$ 개 사이로 사용하였다. Honma 등(2005)과 Mansilla 등(2005)은 hMSCs를 이용하고 Samuel 등(2003)은 hUCB를 이용하여 동물에 정맥내 이식할 때 1×10^6 개의 세포를 이용하였다. 이에 본 연구에서는 분리한 hMSCs를 1×10^6 개의 세포를 이용하여 흰쥐의 꼬리정맥으로 이식하였다. 그리고 MSCs는 다양한 방법으로 응용이 되는데 Honma 등(2005)은 이식 후 hMSCs 생존률의 기간을 늘이기 위해 human telomerase gene (hTERT)를 형질전환시켜 이용하여 1년이 넘게 생존력을 유지하게 하였다. Kazuhiko 등(2005)는 BDNF, GDNF와 같은 성장인자들의 유전자를 MSCs에 형질전환시켜 손상된 CNS에 이식하여 그 효과를 관찰하였다. 따라서 MSCs의 특성을 잘 파악하고 더 연구되어진다면 고치기 힘든 유전자 질병에도 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

동물실험에서 in vivo에서 면역억제를 매개하는데 동물의 피부이식거부 모델에서 MSCs의 정맥내 주사를 통해 이식하여 MSCs를 이식하지 않은 대조군과비교하여 이식한 피부가 더 오래 생존하고 (Bartholomew 등, 2002) 최근에 Mansilla 등(2005)는 사람과 동물 MSCs는 항원을 발현하지 않고 면역억제가나타나 hMSCs를 생쥐의 피부와 SCI 부위에 이식이 면역거부반응이 나타나지

않고 피부상처를 재건하고 SCI으로 인한 행동적 결함을 개선한다고 보고하였다. 또한 사람의 조혈모이식을 할 때 이식거부와 Graft-versus-host disease (DVHD)가 여전히 문제가 되고 있으나 MSCs와 조혈모세포를 동시에 이식을 하면 환자의 회복률이 개선된다는 보고가 있다 (Maitral 등, 2004). 또한 In vitro에서 MSCs는 주조직적합복합체 (Major histocompatibility complex; MHC) II 부류가 발현되지 않고 항원제시세포도 매우 작게 나타나며 MSCs와 림프구의 혼합하여 반응을 보면 T 림프구의 성장을 자극하지 않고 T 림프구의 자극을 억제할 수도 있다 (Klyushnenkova 등, 1998; Bartholomew 등, 2002). 이렇게 MSCs의 이식이 면역반응을 완화할 수 있다는 것은 이식된 골세포들이 손상된 조직 대신 대체되어 쉽게 융합할 수 있을 것이고 이는 조직공학이나 임상 응용에 있어서 매우 중요한 기초가 될 것이다.

결 론

최근에 가장 많은 관심을 받고 있는 골수와 탯줄혈액에서 분리한 MSCs는 성체줄기세포이다. 본 연구에서는 SCI을 준 후 이식한 날짜에 따라 행동적결함의 개선에 대한 차이점과 이식된 hMSC들이 병변부위에 혈관순환을 통해이동하여 안정하게 정착하고 생존하는지 관찰하고 여러 가지 신경세포 분화표지항체들을 이용하여 신경세포, 신경아교세포들로 분화되는지 관찰하였다.

본 실험에서는 골수에서 분리한 hMSCs를 이용하여 SCI의 재생에 사용하였고 SCI은 동맥류 집게를 사용해 약 30초간 압박하여 생산하였다. 그리고 이식할 사람의 hMSCs는 이식하기 전에 CTX-B FITC로 미리 표지한 후 세포 생존률을 측정하였다. 그 다음 hMSCs를 $1 \times 10^6/200 \mu$ l으로 계산하여 27-gauge 바늘이 달린 1ml의 주사기를 사용하여 쥐의 꼬리정맥을 통해 천천히 이식하였다.

SCI후에 hMSCs를 이식한 결과는 운동 장치에서 계속적인 뒷다리의 운동성을 관찰함으로써 SCI으로 인한 운동적 결함이 개선됨을 확인하였고 SCI 후 1일 후에 이식한 군 (SCI1 + hMSCs)이 5일 후에 이식한 군 (SCI5 + hMSCs)이 더 효과적으로 나타났다. 또한 이식된 CTX-B FICT 표지 hMSCs가 손상된 부위까지 이동하여 존재함을 확인하였고 이식된 hMSCs는 전체적으로 매우 적게나타났다. 그러나 SCI5 + hMSCs 군보다는 SCI1 + hMSCs 군에서 이식된 hMSCs가 약간 더 많이 분포하였다. human specific nuclei와 mitochondria 항체를이용하여 CTX-B FICT 표지 세포가 hMSCs임을 재확인하고 이식한 hMSCs가 면역에제를 쓰지 않은 조건에서도 많은 숫자는 아니지만 4 주까지 살아 존재함을 확인하였다. 이 중에 적은 수는 별아교세포의 표지단백질인 GFAP가 발현하였고 신경세포의 표지단백질인 Map2도 발현되었지만 숫자적으로 거의 존재하지 않았다.

따라서 본 연구의 결과는 SCI후에 hMSCs의 이식은 SCI의 운동성 회복에 기여할 수 있다는 것과 손상 후 빨리 이식하는 것이 좀 더 효율적임을 제시한다. 이러한 MSCs에 대한 연구는 자가이식, 유리적, 면역학적 연계에 있어서

다른 세포들을 이식하는 것보다 매우 자유롭기 때문에 현재 세포치료의 완벽한 치료방법으로 제시할 수 없지만 임상응용에 중요한 기초가 될 것이다.

참고 문 헌

- Akiko B., Osamu H., Michio I., Satoshi I., Kiyohiro H. and Kazuo H., "Transplantation of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow into the demyelinated spinal cord." *International congress series* 1252:471-475, 2003.
- Akiyama Y. Akiyama, C. Radtke and J.D. Kocsis, "Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells." *J. Neurosci.* **22**:6623-6630, 2002a.
- Akiyama Y., Honmou O., Kato T., Uede T., Hashi K. and Kocsis J.D., "Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord." *Exp. Neurol.* **167**:27-39, 2001.
- Akiyama Y., Radtke C., Honmou O. and Kocsis J.D., "Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells." *Glia* **39:**229-236, 2002b.
- Andrea B., "Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation." Best Practice & Research Clinical Haematology *17:* 87-399, 2004.
- Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., Mcintosh K., Patil S., Hardy W., and Hoffman R., "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo." Exp Hematology 30:42-48, 2002.
- Basso D.M., Beattle M.S., Bresnahan J.C., "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats." *J of Neurotrauma* 12:1-21, 1995.
- Behrmann D.L., Bresnahan J.C., Beattie M.S., Shah B.R., "Spinal cord injury produced by consistent displancement of the cord in rats:

- behavioral and histologic analysis." *J. Neurotrauma* **9(3):**197-217, 1992.
- Birgit N., Himesa B.T., Shumsky J.S., Gianluca G. and Itzhak F., "Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations."

 Brain research 1035:73-85, 2005.
- Borlongan C.V., Tajima Y., Trojanowski J.Q., Lee V.M. and Sanberg P.R., "Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line." *NeuroReport* **9(16):**3703-3709, 1998.
- Bregman B.S., McAtee M., Dai H.N. and Kuhn P.L., "Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat." *Exp. Neurol.* **148:**475-494, 1997.
- Cai D., Deng K., Mellado W., Lee J., Ratan R.R. and Filbin M.T., "Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro." *Neuron* 35:711-719, 2002.
- Chen J., Li Y., Wang L., Lu M., Zhang X. and Chopp M., "Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." *J. Neurol. Sci.* **189**:49-57, 2001.
- Chen X., Li Y., Wang L., Katakowski M., Zhang L., Chen J., Xu Y., Gautam S.C. and Chopp M., "Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production." *Neuropathology* 22:275-279, 2002.
- Daniel P.A., Dana M.M. and Lyn B.J., "Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats." *Experimental neurology* **190:**17-34, 2004.
- Defer G.L., Geny C., Ricolfi F., Fenelon G., Monfort J.C., Remy P. et al., "Long-term outcome of unilaterally transplanted parkinsonian

- patients: I. Clinical approach." Brain 119:41-50, 1996.
- Hamano K., Li T.S., Kobayashi T., Kobayashi S., Matsuzaki M. and Esato K., "Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis." *Cell Transplant* **9:**439-443, 2000.
- Hatashita S. and Hoff J.T., "Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats." *Stroke* **21:**582-588, 1990.
- Haynesvorth S.E., Barber M.A., and Caplan A.I., "Cell surface antigens on human marrow derivedmesenchymal cells are detected by monoclonal antibody." *Bone* 12:69-80, 1992.
- Haynesvorth S.E., Barber M.A., and Caplan A.I., "Cytokine expression by human marrow derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 a." *J. cell. physiol.* 166:585-592, 1996.
- Hirouchi M. and Ukai Y., "Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia." *Nippon Yakurigaku Zasshi* **120:**107-113, 2002.
- Hofstetter C.P., Schwarz E.J., Hess D., Widenfalk J., El Manira A., Prockop D.J. and Olson L., "Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery." *Proc. Natl. Acad. Sci. 99:*2199-2204, 2002.
- Honma T., Honmou O., Iihoshia S., Harada K., Houkin K., Hamada H., and Kocsis J.D., "Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat." Experimental neurology; in press, corrected proof. 2005.
- Iihoshi S., Honmou O., Houkin K., Hashi K. and Kocsis J.D., "A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats." *Brain Res.* **1007:**1-9, 2004.

- Inoue M., Honmou O., Oka S., Houkin K., Hashi K. and Kocsis J.D., "Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord." *Glia* 44:111-118, 2003.
- Jansen E.M., Solberg L., Underhill S., Wilson S., Cozzari C., Hartman B.K., "Transplantation of fetal neocortex ameliorates sensorimotor and locomotor deficits following neonatal ischemichypoxic brain injury in rats." *Experimental Neurology* **147(2)**:487-497, 1997.
- Javazon E.H., Beggs K.J., and Flake A.W., "Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passagine." *Experimental cell research* **32:**414-425, 2004.
- Jiang Y., Jahagirdar B.N. and Reinhardt R.L. et al., "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature 418:41-49, 2002.
- Kato T., Honmou O., Uede T., Hashi K. and Kocsis J.D., "Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord." Glia 30:209-218, 2000.
- Kazuhiko K., Kiminori N., Takashi T., Yutaka K., Keiji I., Masayoshi K., Sachie H., Hiroaki U., Katsunori S., Yoshinori I., Kazunori K., Osamu H., Kiyohiro H., Isao D. and Hirofumi H., "Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model." *Molecular therapy* 11:96-104, 2005.
- Kim J.S., "Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases." J. Neurol. Sci. 137:69-78, 1996.
- Klyushnenkova E., Mosca J.D. and McIntosh K.R., "Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro:

- implications for allogeneic transplantation." *Blood* **92:**642a, 1998.
- Kobune M., Kawano Y., Ito Y., Chiba H., Nakamura K., Tsuda H., Sasaki K., Dehari H., Uchida H., Honmou O., Takahashi S., Bizen A., Takimoto R., Matsunaga T., Kato J., Kato K., Houkin K., Niitsu Y. and Hamada H., "Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells." Exp. Hematol. 31:715-722, 2003.
- Kordower J.H., Freeman T.B., Snow B.J., Vingerhoets F.J., Mufson E.J., and Sanberg P.R. "Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease." *N. Engl. J. Med.* 332(17):1118-112, 1995.
- Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Kobune M., Hirai S., Uchida H., Sasaki K., Ito Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Date I. and Hamada H., "BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model." *Mol. Ther.* 9:189-197, 2004.
- Li Y., Chen J., Chen X.G., Wang L., Gautam S.C., Xu Y.X., Katakowski M., Zhang L.J., Lu M., Janakiraman N. and Chopp M., "Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery." *Neurology* **59:**514-523, 2002.
- Liu BP., Grandpre T., Strottmatter SM., "Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor." *Science* **297:** 190-1193, 2002.
- Lu D., Mahmood A., Wang L., Li Y., Lu M. and Chopp M., "Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome."

- Neuroreport 12:559-563, 2001.
- Lundberg C., Winkler C., Whittemore S.R. and Bjorklund A., "Conditionally immortalized neural progenitor cells grafted to the striatum exhibit site-specific neuronal differentiation and establish connections with the host globus pallidus." *Neurobiology Discussion* **68(1):**33-50, 1996.
- Maitral B., Szekelyl E., Gjinil K., Laughlin M.J., Dennis J., Haynesworth S. E., and Koç O.N., "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." Bone Marrow Transplantation 33:597-604, 2004.
- Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M. and Gerson S.L., "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." *J. Cell. Physiol.* 176:57-66, 1998.
- Manas K.M., Mark A.T. Joseph D.M., Mark M., and Stanton L.G., "phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cell and stromal cells." *J. of cellular physiology* **176:**57-66, 1998.
- Mansilla E., Marin G.H., Sturla F., Drago H.E., Gil M.A., Salas E., Gardiner M.C., Piccinelli S.B., Petrelli L., Iorio G., Ramos C.A., and Soratti C., "Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries." *Transplantaition proceedings* 37:292-294, 2005.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonerri D.W., "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284(5411):**143-147, 1999.
- Prockop D.J., "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic

- tissues." Science 276:71-74, 1997.
- Qi-lin Cao, Zhang Y.P., Russell M.H., Winston M.W., Pantelis Tsoulfas, and Scott R. Whittemore, Pluripotent stem cells engrafted into the mormal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage." Experimental Neurology 167:48-58, 2001.
- Ramon-Cueto A., Plant G., Avila J. and Bunge M.B., "Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants." *J. Neurosci.* **18:**3803-3815, 1998.
- Samuel S., Kim J.J., Alison E.W., Eugene S.F., Cyndy D.D., and Paul R.S., "Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: Engraftment and benefical influence on behavior." *J. of Hematotherapy & Stem cell research* 12:271-278, 2003.
- Schabitz W.R., Schwab S., Spranger M., and Hacke W., "Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats." *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17:500-506, 1997.
- Satoshi I., Osamu H., Kiyohiro H., Kazuo H., and Jeffery D.K., "A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats." *Brain reserch* 1007:1-7, 2004.
- Sasaki M., Honmou O., Akiyama Y., Uede T., Hashi K. and Kocsis J.D.,
 "Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs
 demyelinated adult rat spinal cord axons." *Glia* **35:**26-34, 2001.
- Tocci A., and Forte L., "Mesenchymal stem cell: Use and perspectives." Hematoloty J. 4:92-96, 2003.
- Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J. and Kessler P.D., "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in

- the adult murine heart." Circulation 105:93-98, 2002.
- Ulrica E., Anders B., and Klas W., "Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain." *Development brain research* 134:123-141, 2002.
- Wehner T., Bontert M., Eyupoglu I., Prass K., Prinz M., Klett F.F., Heinze M., Bechmann I., Nitsch R., Kirchhoff F., Kettenmann H., Dirnagl U. and Priller J., "Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo." J. Neurosci. 23:5004-5011, 2003.
- Wolfgang W., Frederik W., Anja S., Maria F., Ute W., Ulf K., Jonathon Bl., Christian S., Volker E., Wilhelm A. and Anthony D.H., "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." *Experimental Hematology* 33:1402-1416, 2005.
- Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J. and Black I.B., "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." *J. Neurosci. Res.* 61:364-370, 2000.

사진부도 설명

- Figure 1. Identification of hMSCs cells (In vitro and In vivo). A; hMSCs, prelabeled with FITC-conjugated cholera toxin in vitro, B; Laminectomy only, C; Spinal cord injury only. The hMSCs cells prelabeled with FITC-conjugated cholera toxin were injected into the tail vein after compression injury. D 1 days; E 2 days; F 3 days post-injection
- Figure 2. Identification of hMSCs cells in compressed spinal cord. The hMSCs cells prelabeled with FITC-conjugated cholera toxin were injected into the tail vein 1day(A), 5 day(B) after compression injury. A 7 days; B 7 days post-injection, C (CTX-FITC prelabeled hMSCs), D (Human nuclei), E (Merged)
- Figure 3. Differentiation of hMSCs cells in compressed spinal cord (Colocalization of hNuclei and GFAP). A, B, C: 1 week after intravenouse transplantation; D, E, F: 1 week after direct transplantation in compressed spinal cord; G, H, I: 4 week after intravenouse transplantation. Conforcal images show the differentiation of the transplanted hMSCs into astrocytes.
- Figure 4. Differentiation of hMSCs cells in compressed spinal cord (Colocalization of hNuclei and Map2); 1week after transplantation. A:

 Human Nuclei; B: Human Nuclei + Map2 (merged); C: Map2 (neuron specific marker) Conforcal images show the expression of neuronal marker in the transplanted hMSCs.

Figure 5. Behavioral outcome of hMSCs transplant(Incline locomotor behavior). BBB scores for the LO animals exhibited no locomotor deficit and scored a perfect 9. In this study, behavoral scores for SCI1 + hMSCs animals were significantly better than those of SCI5 + hMSCs or SCI only groups. Behavoral scores for SCI only animals slightly decreased over the 3-week test period. (*P<0.05, † P<0.005)

Figure 6. Behavioral outcome of hMSCs transplant (Open-field locomotor behavior). BBB scores for the LO animals exhibited no locomotor deficit and scored a perfect 5. Behavoral scores for SCI1 + hMSCs and SCI5 + hMSCs animals were significantly better than those SCI only groups. Behavoral scores for SCI only animals slightly decreased over the 3-week test period. (*P<0.05)











