



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

신경계 분화 중배엽 줄기세포를 이용한  
급성 척수 손상 백서의 신경학적 회복 연구

2018년 10월

서울대학교 대학원  
의학과 뇌신경과학 전공  
김 충 효

신경계 분화 중배엽 줄기세포를 이용한  
급성 척수 손상 백서의 신경학적 회복 연구

지도교수 정 천 기

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2018년 10월

서울대학교 대학원  
의학과 뇌신경과학 전공  
김 충 효

김 충 효의 의학박사 학위논문을 인준함

2018년 12월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)

A study on recovery of acute severe spinal cord injury  
of rat using neuronal differentiated mesenchymal  
stem cell

By Choonghyo Kim, M.D.

A Thesis Submitted to the Department of Medicine in Partial  
Fulfilment of the Requirements for the Degree of Doctor of  
Philosophy in Medicine (Brain and cognitive Science) at the Seoul  
National University College of Medicine

December 2018

Approved by thesis committee:

|          |       |
|----------|-------|
| Chairman | _____ |
| Member   | _____ |

# 초 록

## 신경계 분화 중배엽 줄기세포를 이용한 급성 척수 손상 백서의 신경학적 회복 연구

서울대학교 대학원

의학과 뇌신경과학 전공

김 충 효

현재까지 중배엽 줄기세포를 이용한 수많은 연구가 진행되었으나 척수 손상 환자의 예후에 관련되며 급성 척수 손상기 주요 반응인 교증 반응에 대한 줄기세포의 역할에 대해서는 알려져 있지 않다. 이에 신경계 분화 중배엽 줄기세포를 급성 중증 척수 손상 모델에 이식하여 급성 교증을 조절을 통한 척수 손상의 회복을 보고자 하였다.

중배엽 줄기세포를 신경계 분화 후 급성 중증 척수 손상 모델에 이식 후 1, 3, 7일에 교증과 관련된 matrix metalloproteinase와 사이토카인의 변화를 Real time polymerase chain reaction, Enzyme linked immunosorbent assay, Western blot을 통해 확인하였다. 교증의 정도 및 척수 손상의 회복 여부는 손상 후 7일과 28일에 병리학적 검사를 통해 확인하였다. 손상 후 1일과 이후 7일 간격으로 28일까지 행동학적 검사를 통하여 신경학적 회복 확인하였다.

급성 중증 척수 손상 백서에 줄기세포를 시행하였을 때 손상 후 1일째 MMP-2의 상승과 signal transducer and activator of transcription

3(STAT3)의 증가의 경향을 보였으며 손상 후 7일째 병리 검사에서 교증의 증가를 보였다. 줄기세포 치료군에서 척수 손상 급성기에 STAT3를 제외한 다른 교증과 관련된 사이토카인은 감소 또는 감소의 경향을 보였으며 특히 손상 후 7일 nuclear factor- $\kappa$ B는 유의하게 감소하였고 이와 관련된 p65 인산화도 감소의 경향을 보였다. 손상 후 21일부터 줄기세포 치료군에서 운동능력의 회복을 보였으며 이는 28일까지 지속되었다. 손상 후 28일 병리검사에서 줄기세포 치료를 한 척수는 더 많은 백질의 보전을 보였으며 7일에 비해 교증 반흔의 감소를 보였다.

급성기 신경계 분화 중배엽 줄기세포 치료는 중증 척수 손상 백서의 운동능력의 회복과 백질의 보전을 보였고 이는 MMP-2 상승과 관련된 급성 교증의 조절을 통한 척수 손상의 회복임을 확인할 수 있었다.

주요어: 척수 손상, 중배엽 줄기세포, 교증, 반흔

학번: 2008-30559

# 목 차

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 서론 .....                           | 8  |
| 대상 및 방법 .....                      | 12 |
| 1. 신경계 분화 중배엽 줄기세포의 준비 .....       | 12 |
| 2. 급성 중증 척수 손상 모델에 줄기 세포 이식.....   | 13 |
| 3. 줄기세포 치료가 급성 교증에 미치는 영향 분석 ..... | 14 |
| 4. 병리 검사를 통한 척수 손상의 회복 분석.....     | 17 |
| 5. 통계학적 분석.....                    | 18 |
| 결과 .....                           | 19 |
| 1. 척수 손상 1일 MMP-2의 증가.....         | 19 |
| 2. 급성기 사이토카인의 변화.....              | 19 |
| 3. 급성 교증의 증가와 만성 반흔의 감소 .....      | 20 |
| 4. 신경학적 회복과 백질의 보전 .....           | 21 |
| 5. 급성기 이식으로 감소된 줄기세포 생존율 .....     | 21 |
| 고찰 .....                           | 23 |
| 결론 .....                           | 32 |
| 참고문헌 .....                         | 33 |
| Abstract .....                     | 47 |

# 표 목차

|  |           |
|--|-----------|
| <b>[Table 1] Oligonucleotide primers and PCR cycling conditions.....</b> | <b>37</b> |
|--|-----------|

## LIST OF FIGURES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>[Figure 1] The effects of MSCs on MMPs in acute SCI.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>[Figure 2] The MMPs levels of MSC .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>[Figure 3] The effects of MSCs on STAT3 related to astrogliosis in acute SCI.....</b>                       | <b>40</b> |
| <b>[Figure 4] The effects of MSCs on cytokines related to astrogliosis in acute SCI.....</b>                   | <b>41</b> |
| <b>[Figure 5] The effects of MSCs on NF-<math>\kappa</math>B pathway in acute SCI.....</b>                     | <b>42</b> |
| <b>[Figure 6] Analysis of GFAP-positive astrogliosis with MSC treatment at acute SCI.....</b>                  | <b>43</b> |
| <b>[Figure 7] Time course of behavioral recovery with MSC transplantation at acute severe SCI of rats.....</b> | <b>44</b> |
| <b>[Figure 8] Increased spared white mater with acute MSC treatment at 28<sup>th</sup> day after SCI.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>[Figure 9] Confocal microscopy image of CDFA-SE tracked MSC at 28<sup>th</sup> day after SCI .....</b>      | <b>46</b> |

# 서 론

## 1. 척수 손상 연구의 현황

척수 손상 환자는 전세계적으로 100만명당 23명의 빈도로 발생한다고 알려져 있다<sup>1</sup>. 척수손상은 환자에게 비가역적인 마비를 일으켜 활동의 제한, 삶의 질의 저하, 경제능력의 상실을 가져오며 사회경제적으로 의료비 상승 등의 문제를 발생시킨다<sup>2</sup>. 우리나라에는 67,000여명의 환자가 척수 손상으로 인한 마비를 가지고 살고 있는 것으로 추정되고 있다<sup>3</sup>.

현재까지 어떤 치료로도 척수 손상으로 인한 마비를 호전할 수 없기에 이를 극복하기 위해 전세계적으로 많은 연구가 시행되어 왔다. 1990년 이후 분자생물학의 발전으로 척수손상의 기전이 밝혀지게 되면서 개발된 척수 손상 치료 후보 물질과 또한 2000년 후 본격화된 줄기세포를 이용한 많은 임상 연구가 진행되었으나 아직까지 마비를 가진 척수 손상 환자의 의미 있는 운동 능력의 회복은 보고되지 않았다<sup>4,5</sup>.

## 2. 중배엽 줄기세포를 이용한 척수 손상 연구의 한계

### 1) 중배엽 줄기세포 특성으로 인한 한계

중배엽 줄기세포는 염증을 조절하며 신경보호 물질을 분비하며 신경재생의 매개체로 쓰일 수 있다는 장점으로 척수 손상 후 발생하는 복잡한 화학 작용과 반흔(Scar) 형성을 극복하기 위해 척수 손상 연구에 적용되었다. 그러나 중배엽 줄기세포는 배양방법 및 세포 자체의 특성으로 인해 다양한 세포 성

질, 일정치 않은 세포의 반응성, 낮은 신경계 분화율을 가져 신경 손상 연구에 한계를 가지고 있다. 전임상 연구에서 성공한 증배엽 줄기세포를 척수 손상 환자에 적용하였을 때 마비의 회복은 없이 일부에서는 통증의 악화나 백혈병 발병과 같은 심각한 합병증이 발표되고 있으며 줄기세포 치료가 효과와 기전의 증명 없이 상업적으로 임상실험이 시행되고 있다는 문제도 제기되고 있다<sup>6,7</sup>. 따라서 최근 미국에서는 Na channel blocker인 Riluzole을 이용한 연구(RISCIS: Riluzole In acute Spinal Cord Injury Study), Rho antibody를 이용한 연구(SPRING: SPinal cord injury Rho Inhibition INvestiGation) 등 이전 알려진 척수손상기전을 조절하는 물질을 이용하거나 신경세포(ah SC: Autologous Human Schwann cell in Chronic spinal cord injury) 또는 희돌기전구세포(AST-OPC1)를 이용한 연구(SCI-Star study) 등 보다 분화된 세포를 이용하는 임상연구가 보다 활발하게 이루어지고 있다.

## 2) 중증 척수 손상을 반영 못하는 전임상 실험 모델의 한계

전임상 연구에서 긍정적인 연구결과를 토대로 진행되었던 많은 임상연구가 실패하는 또 다른 이유는 전임상 연구에서 시행된 척수 손상 모델이 실제로 치료가 필요한 중증 척수 손상 환자를 대표하지 못하기 때문이다. 즉 대부분의 전임상 연구가 임상적으로 치료가 필요한 중증(severe) 척수 손상 환자를 대표할 수 없는 중등도(moderate) 척수 손상 모델로 척수손상의 회복을 증명하고 임상연구에서는 이를 중증 척수 손상 환자에 적용하였다는 점이다. 예를 들면 현재 미국에서 임상 시험이 진행되고 있는 대표적인 척수손상 치

료제의 후보군인 Riluzole의 전임상 연구는 실제 척수 손상의 기전과 상이하  
며 재현성이 떨어지는 등쪽 반측절단 모델(dorsal hemisection model)을 통  
해 손상 후 2주 이내 Basso Beattie and Bresnahan scale(BBB)로 평균 9  
점 이상 회복되는 중등도 척수손상 모델로 치료 효과를 증명하였다<sup>8</sup>. 이에 반  
하여 임상연구에서는 완전척수 손상 환자에 수술과 함께 Riluzole을 주고 척  
수 손상의 회복 가능성만 보였고 동시에 신경학적 회복없이 폐렴 등 감염,  
통증의 악화 등의 합병증 증가도 보고하였다<sup>9</sup>.

### 3) 척수손상 예후의 결정적 시기와 기전에 적용 못한 전임상 실험

손상의 정도와 함께 척수 손상 환자의 예후를 결정하는 요인은 척수 소  
상 급성기에 치료를 시행하였는지 여부이다. Fehling 등은 전향적 연구  
로서 24시간 이내 수술적 치료가 척수 손상의 예후를 호전시킨다고 보고  
하였으며 높은 증거력을 가진 연구가 아니더라도 Bracken 등은  
methylprednisolone 치료를 8시간 이내 시작하는 것이 예후를 호전시  
킬 수 있다고 보고 하였다<sup>10,11</sup>. 척수 손상 급성기는 세포생리학적으로도  
신경손상의 가장 중요한 시기로 손상 후 15분내에 희돌기아교세포의  
50%가 사멸하며, 4시간 이내 신경세포가 죽기 시작하고 사이토카인의  
상승으로 소아교세포와 대식세포가 이동하여 손상 부위에 위치하며 탈수  
초가 일어나고 정상세포의 활성화와 이동을 돕는다<sup>12-14</sup>. 특히 이 시기의  
활성화된 정상세포의 증가와 이동으로 급성 교증이 발생하여 척수내 신  
경 세포를 손상시키고 결과적으로는 손상의 회복을 막는 반흔 형성의 원  
인이 된다<sup>12</sup>. 고전적으로 반흔을 만드는 교증을 억제하는 치료제가 개발

되어 왔으며 중배엽 줄기세포 치료도 역시 이를 억제하거나 극복하기 위해 고안되었다. 그러나 2006년 Okada 등은 signal transducer and activator of transcription3(STAT3)가 활성화된 정상세포의 이동을 통하여 척수손상의 손상 범위의 감소에 기여한다고 발표하였으며 2016년 Anderson 등은 STAT3를 통한 급성 교증을 억제하면 반흔이 증가되고 척수 손상이 악화됨을 증명하여 급성 교증이 척수 손상의 파급을 막으며 반흔 형성을 억제한다고 발표하였다<sup>15,16</sup>. 척수 손상의 회복에 결정적 영향을 주는 급성 교증을 목표로 치료가 이루어질 수 있다면 척수 손상의 회복의 가능성을 높여 줄 수 있으나 대부분의 줄기세포 전임상 실험은 이식된 세포의 생존을 높이기 위하여 아급성기(7일 이후)에 이식을 시행하여 줄기세포의 급성기 교증에 대한 작용은 알려져 있지 않다<sup>17-20</sup>.

### 3. 급성교증 조절을 통한 줄기세포 척수 손상 치료 연구

현재 중배엽 줄기세포를 이용한 척수 손상 임상 연구는 의미 있는 신경학적 회복을 보여주지 못하고 안전성 문제까지 제기되어 정체되어 있다. 임상 연구의 성공을 위해서는 일관성 있는 안전성이 확보된 중배엽 줄기세포를 척수 손상 환자의 예후를 결정하는 급성기에 중증 척수 손상 환자와 유사한 척수 손상 모델에 이식하여 척수 손상의 회복과 그 기전을 확인하는 전임상 연구가 필요하다.

따라서 균일한 중배엽 줄기세포를 신경계 분화시켜 급성 중증 척수 손상 모델에 이식하여 반흔 형성의 원인이 되는 급성 교증을 조절하여 척수 손상의 회복과 그 기전을 연구하고자 하였다.

# 연구대상 및 방법

## 1. 신경계 분화 중배엽 줄기세포의 준비

- 1) 2주된 백서(Sprague-Dawley rat; Japan SLC, Inc. Hamamatsu, Japan)를 안락사한 후 대퇴골, 경골을 분리한 후 근육과 지방을 제거하고 HF2 media (Dulbecco ' s phosphate-buffered saline (DPBS; Welgene, Daegu, Korea) + 2% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Welgene)) 3 ml를 대퇴골 경골의 해면골 부위에 주입하여 골수의 세포를 모은다.
- 2) 모인 세포를 50ml conical tube에 모으고 세포를 resuspension시킨 후 HF2 media로 50ml까지 채운 후 1200rpm, 4분간 원심 분리한다.
- 3) Pellet에 RBC lysis buffer(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10ml을 첨가하고 상온에 10분 간 방치한다.
- 4) 10분 뒤, HF2 media로 50ml까지 채운 뒤 1200rpm, 4min 원심분리 후 상층액을 버리고 예열된 MSC media 10ml로 pellet을 resuspension해 준다.
- 5) 4)의 solution을 70 $\mu$ m mesh를 이용해서 filtering 후 1200rpm, 4min 로 원심분리 후 cell을 MSC media 5ml로 resuspension 해주고 40배 정도 희석한 다음 cell counting 한다
- 6) 100mm culture dish에 labeling 하고 1% gelatin(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 3ml를 1-2분간 처리 후 용액을 버리고 9ml MSC media 첨가 후 예열한 후  $1 \times 10^7$ /100mm dish로 세포를 seeding 해준다.
- 7) 70~80% confluency 정도 배양 후 (day 10~14) 계대 배양한다.
- 8) 계대 배양 passage 5에 neurogenic differentiation을 시행한다<sup>21</sup>.
- 9) 먼저 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Gibco Invitrogen)+ 2%

dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich)을 이용하여 5시간 동안 pre-induction을 시행한다.

10) 이후 Neuronal induction medium(High glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium(HG-DMEM) + 10% heat-inactivated FBS, 10 lg/L basic fibroblast growth factor (b-FGF; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) + 10 lg/L human epidermal growth factor (R&D Systems, Inc.) + 1 mM dibutyrylcyclic AMP (Sigma-Aldrich) + 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich))으로 7일 동안 neuronal differentiation을 시행한다

11) 이식 직전에 CFDA SE cell tracer(Thermo Fisher scientific, MA, USA)를 이용하여 세포를 tracking하여 200,000 /20ul으로 만들어 Hamilton syringe에 이식할 세포를 준비한다

## 2. 급성 중증 척수 손상 모델에 줄기세포 이식

1) 모든 실험과정과 사육 등은 강원대학교 동물 실험 위원회 (Institutional Animal care and use committee(IACUC))의 승인을 받고 시행되었다.

2) 행동학적 검사와 4주 병리학적 검사, 급성기 교증 반응을 위해 49마리의 8주에서 10주의 암컷 백서에 클립 압박 척수 손상 모델을 이용하여 중증 척수 손상 모델을 만들었다.

3) ketamine과 xylazine으로 복강 마취를 시행한 후 알콜과 베타딘으로 소독한 후 cefazolin 주사한 후 midline incision후 근막과 근육을 절개

한 후 흉추 10-11 후궁절제술을 시행하였다.

4) 행동학적 검사와 4주 병리학적 검사를 위해서 실험군에서는 8마리의 백서에서 척수손상 후 흉추 10번과 12번을 고정기구를 이용하여 수평을 만들고 1시간 뒤에 epicenter에서 5mm 위에 microinfuser(Model KDS-310; Muromachi Kikai Co., Tokyo, Japan) 를 이용하여 20ul의  $5 \times 10^5$  신경계 친화 증배엽 줄기세포를 4분간 주입하였다. 세포의 유실을 막기 위해 주입 후 5분간 Hamilton 주사기를 척수에 위치한 후 제거하였다. 대조군으로는 8마리에서 줄기세포 대신 MSC media를 주입하였고 9마리에서는 척수 손상만 주었다.

5) 척수손상 후 근육과 피부를 봉합하고 이후 매일 배뇨를 돕고 1주일간 cefazolin을 복강내 주입하였다.

6) 척수 손상의 회복은 암맹으로 평가자 두 명이 4분간 BBB를 평가하여 수술 후 1일부터 이후 매주, 4주까지 측정하였고 4주에 부검 후 병리학적 검사를 시행하였다.

7) 척수 손상 후 교증 반응의 변화를 확인하기 위해 추가적으로 24 마리의 중증 척수 손상 모델로 3마리씩 실험군과 대조군을 만들어 1일, 3일, 1주일에 사이토카인과 MMP 변화를 확인하였고 1주일에 병리학적 검사를 통해 교증 반응의 정도와 줄기세포의 생존을 확인하였다.

### 3. 줄기세포 치료가 급성 교증에 미치는 영향 분석

#### 1) 급성 교증 분석을 위한 척수 준비

급성 중증 척수 손상 모델에 줄기세포를 이식 한 줄기세포 치료군과 대

조군으로 만든 각각 3마리의 백서를 척수 손상 후 1일, 3일, 7일에 안락사 농도로 마취한 후 척수 조직을 분리하여 손상 진원지(epicenter)에서 주위 1cm block을 만들어 균질화한(homogenate) 후 아래 실험을 진행하였다.

## 2) MMP 분석을 통한 급성 교증 반응 비교

척수 손상 후 교증 및 줄기세포의 회복기전에도 관여한다고 알려져 있는 MMP의 변화를 확인하기 위해 줄기세포 치료 후 MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9의 변화를 Real-time polymerase chain reaction 로 확인하였다. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 손상된 척수에서 mRNA를 추출하고 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover kit (Toyobo, Osaka, Japan)을 이용하여 cDNA를 합성하였고 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) under the 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems)을 이용하여 특정유전자의 발현정도를 확인하였다. 시발체(primer)는 Primer3 software (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research)를 이용하여 GenBank for rat에서 cDNA 염기서열을 얻어서 분석하였다(Table 1)

## 3) 사이토카인 분석을 통한 급성 교증 반응 비교

### ELISA

신경계 친화 증배엽 줄기세포가 급성 교증에 미치는 영향을 확인하기 위해 interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-10, C-X-C motif chemokine (CXCL)-2, CXCL-10, Tumor growth factor(TGF)- $\beta$ , Tumor

necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , STAT3 and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 변화를 ELISA를 이용하여 줄기세포 치료군과 대조군을 비교하였다. 손상된 척수에서 단백질을 얻어 protease inhibitor cocktail에 준비하여 FineTest (Wuhan Fine Biological Technology Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China)에서 구매한 ELISA kits (IL-1 $\alpha$ , IL-10, CXCL-2, CXCL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , STAT3, NF- $\kappa$ B)을 Epoch microplates reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)에서 확인하였다

### Western blot

척수 손상의 회복을 억제하는 교증의 기전으로 알려진 NF- $\kappa$ B의 변화를 확인하기 위하여 동일한 시기에 줄기세포 치료군과 대조군에 대해 Western blot으로 p65 인산화(phosphorylation) 정도를 분석하였다. 손상된 척수에서 얻은 단백질을 RIPA lysis buffer와 a protease inhibitor cocktail로 준비하여 10% SDS-polyacrylamide gels에서 영동하였다. 분리된 단백질은 0.45- $\mu$ m nitrocellulose transfer membranes에서 electroblot 하였고 5% skim milk in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 (TBST) buffer에서 1시간 block 하였다. 그리고 1:1000 diluted anti-NF- $\kappa$ B p65 and anti-p-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) primary antibodies for 24h를 4 $^{\circ}$ C로 probe하였다. 세 차례 10분간 세척 후 polyclonal anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody로 실온에서 1시간 동안 배양 후 Pierce ECL Western Blot substrate. Band densitometry 와 Image J software

analysis를 통해 발현정도를 확인하였다.

#### 4. 병리적 검사를 통한 척수 손상의 회복 분석

1) 척수 손상 후 7일과 28일에 교증과 반흔의 정도와 백질의 보존 정도, 줄기세포의 생존여부를 확인하기 위해서 병리학적 검사를 시행하였다.

2) 부검용량의 ketamine, xylazine으로 마취하여 백서의 반응 없음을 확인하고 심장을 통해 0.1M PBS로 관류 후 0.1 M PBS 용액에 4% paraformaldehyde (PFA), pH 7.4로 고정하였다. 후궁절제술을 통해 척수를 epicenter 위아래로 1cm 잘라서 0.1 M PBS 용액에 4% PFA, pH 7.4로 고정하고 이후 0.1 M PBS 용액에 30% sucrose 용액을 통해 2일간 동결 준비를 한 후 OCT 용액을 통해 동결하였다.

2) 줄기세포 치료에 따른 반흔의 정도와 반흔 조직 주위 세포의 변화는 척수 손상 후 7일 과 28일 시상방향(sagittal)으로 중심관을 포함한 두개의 슬라이드를 선택하여 측정하였다. 반흔의 측정을 위해 GFAP를 이용하여 염색이 되지 않는 섬유성 반흔 조직과 전체 척수 조직을 image J를 이용하여 측정하여 괴사 조직과 척수 전체 면적을 비교하여 분석하였다. 척수 손상 후 세포의 분포는 성상세포계열은 Glial fibrillary acidic protein(GFAP: 1:200; Abcam)를 통해, 소교세포(microglial cell)/대식 세포(macrophage)은 ionized calcium-binding adapter molecule 1(IbA 1:200; Abcam)을 이용하여 반흔 인접 부위의 세포수의 변화를 측정하였고 희돌기 아교세포 (Oligodendroglial precursor cell; OPC)은 Neural/glial antigen 2(NG2; 1:500, Millipore)를 통하여 시상

조직 전체를 측정하였다.

3) 척수 손상의 회복 정도는 손상 후 28일에 부검한 동결된 조직의 축상으로(axial section) 자른 척수를 Hematoxylin and eosin(H&E)과 neurofilament 염색을 통해 보전된 백질을 표기하여 Cavalieri 방법을 이용하여 손상 진원지(epicenter)에서 머리쪽, 꼬리쪽으로 100um씩 간격으로 측정하여 삼차원적으로 전체 남아있는 척수 면적에서 백질 보전의 정도를 파악하였다<sup>22</sup>.

4) 신경친화 중배엽 줄기세포의 생존과 분화는 DAPI를 처리하고 Alexa Fluor 488을 통해 확인하였고 이의 분화는 신경세포는 NeuN(1:500, Millipore), 희돌기아교세포는 NG2(1:500, Millipore), 성상 세포는 GFAP(1:200, Abcam)와 이차항체는 Chicken Anti-rabbit IgG antibodies Alexa Fluor 594(1:150, Molecular probe)를 이용하여 confocal microscopy(Olympus FLUOVIEW - FV300)를 이용하여 측정하였다.

## 5. 통계학적 분석

모든 실험결과는 평균과 표준편차를 통한 오차(SEM; standard error of the mean)로 표시하였고 통계학적 분석은 unpaired student t-test를 이용하여 분석하였다. 세포분화 및 증식에 실험군과 비교군과의 분석은 Duncan' s method, Bonferroni post hoc test ANOVA 검정을 이용하여  $p < 0.05$ 를 기준으로 통계적 유의성을 검증하였다(StatView 5.0; SAS institute, Cary, NC. USA).

# 연구결과

## 1. 손상 후 1일 MMP-2의 증가

중배엽 줄기세포과 급성 교증과의 관계를 파악하기 위하여 급성 교증의 주요기전인 MMP의 변화를 척수 손상 후 1일, 3일, 7일에 RT-PCR로 확인하였다. 급성 척수 손상이 다른 MMP의 변화는 줄기세포 치료군과 대조군의 차이가 없었으나 척수 손상 후 1일에 MMP-2는 줄기세포 치료군에서 통계적으로 유의하게 상승하였고 MMP-3는 감소하였다(Fig 1). 아급성기 척수손상에 증가한다고 알려져 있는 MMP-2는 대조군에서 이전의 보고와 같이 척수 손상 후 7일까지 점진적 상승의 소견을 보였으나 줄기세포 치료군에서는 손상 후 1일 급격한 증가를 보였으며 이후에는 감소의 경향으로 대조군과 차이없이 증가 추세를 보였다 (Fig 1B). 이러한 줄기세포 치료 군에서 척수 손상 후 1일 상승된 MMP-2는 신경계 분화 중배엽 줄기세포의 증가된 MMP-2가 직접 관련되었을 것으로 보인다(Fig 2).

## 2. 급성기 사이토카인의 변화

신경계분화 중배엽 줄기세포가 급성 교증에 미치는 기전을 확인하기 위하여 척수 손상 후 1일, 3일, 7일 교증과 관련된 사이토카인의 변화를 확인하였다. 척수 손상의 회복을 돕는 교증과 관련이 있다고 알려진 STAT3는 줄기세포 치료 군에서 손상 후 1일째 증가의 경향성을 보였다(Fig 3). STAT3를 제외한 교증과 관련된 모든 사이토카인들은 대조

군에 비해 감소되거나 감소의 경향을 보였다(Fig 4). STAT3와 반대로 대표적으로 척수 손상을 악화시키는 교증의 기전으로 알려져 있는 NF- $\kappa$ B는 척수 손상 후 7일 줄기세포 치료군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였고 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유발한다고 알려져 있는 TNF- $\alpha$ 는 척수 손상 후 1일과 3일에 감소되었다(Fig 5A). 줄기세포의 NF- $\kappa$ B를 통한 급성 교증에 미치는 기전을 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B의 신호전달 체계상 아래쪽에 있는 p65의 인산화를 Western blot으로 분석하였다(Fig 5B). 척수 손상 후 p65 인산화/p65의 비율은 척수 손상 후 1일에 감소하였으며 통계적인 유의성은 없었으나 척수 손상 후 3일과 7일에도 감소의 경향을 보였다(Fig. 5C).

### 3. 급성교증의 증가와 만성 반흔의 감소

줄기세포 치료를 통한 척수 손상 후 시간 경과에 따른 교증의 변화를 파악을 위해 시상(Sagittal)면으로 잘라진 척수를 GFAP 염색을 통해서 교증을 평가하였다. 척수 손상 후 1주일에는 중배엽 줄기세포를 이식한 척수에서 대조군에 비해서 통계학적 유의하게 섬유성 반흔이 증가되어 있었다(Fig 5). 또한 줄기세포 치료 군에서 급성 교증성 반흔에 GFAP 양성 정상 세포의 증가를 확인할 수 있었다. IbA1검사를 통해 소교세포가 교증 조직과 주위 조직까지 광범위하게 침윤됨을 확인하였으나 대조군과 차이는 없었다. NG2 검사를 통한 희돌기아교세포는 교증 조직과 별개로 척수 전반에서 관찰할 수 있었고 역시 대조군과 차이는 없었다. 척수 손상 4주에 GFAP 염색을 통한 만성 반흔의 면적을 비교하였을 때

줄기세포 치료군과 대조군의 차이가 없었으나 줄기세포 치료 군에서는 1주에 증가된 급성 교증에 반하여 4주 만성 반흔의 면적은 현저하게 감소하였다(Fig 5).

#### 4. 신경학적 회복과 백질의 보전

급성 신경계 분화 증배엽 줄기세포 치료를 통한 신경학적 회복은 매주 BBB를 통한 행동학적 검사를 통해 확인하였다. 급성기 줄기세포 치료를 한 백서의 운동능력은 척수 손상 후 2주까지는 대조군과 차이가 없었으나 3주부터 통계적으로 유의하게 회복을 보였으며 이는 4주에도 더욱 명확히 지속되었다( $p < 0.05$ ) (Fig 6). 줄기세포의 배양액을 이식한 백서들의 행동학적 회복은 척수손상만 시행한 대조군과 차이가 없어 신경계 친화 줄기세포의 작용을 통한 행동학적 회복임을 알 수 있었다.

척수 손상 후 4주에 축상으로 자른 척수의 H&E와 neurofilament염색을 통해 보전된 백질을 검사한 후 이를 Cavalieri 방법을 통하여 3차원으로 계산하여 척수 손상 후 백질의 보전 정도를 확인하였다. 급성기 줄기세포를 치료한 백서 척수에서 더 많은 부피의 백질이 통계학적으로 유의하게 보전된 것을 확인할 수 있었고 GFAP 검사를 통한 반흔의 평가와 같이 척수 손상 진원지(epicenter)에서의 반흔의 감소가 현저하였다(Fig. 7).

#### 5. 급성기 이식으로 감소된 줄기 세포 생존율

척수 손상 7일째 이식된 줄기세포는 이식된 부위 주변에서 일부

생존하고 있었으며 신경계 세포로의 분화는 확인할 수 없었다. 이식 후 28일에는 대부분의 형광을 내는 신경계 친화 줄기 세포는 핵을 소실한 죽어 있는 세포들로 확인되었고 일부에서만 세포의 생존을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 이를 통하여 척수손상 급성기 신경계 분화 중배엽 줄기세포의 치료 후 3주 이후 나타난 척수 손상의 회복은 생존한 줄기 세포 생존의 직접적인 작용이 아니라 이전에 기술한 대로 이식된 줄기세포를 통해 상승된 MMP-2와 관련된 급성 교종의 증가를 통해 간접적으로 이루어졌음을 알 수 있다.

# 고찰

## 1. 일관된 신경계 친화 증배엽 줄기세포의 확보

증배엽 줄기세포는 환자에서 얻기 쉽고 신경보호 물질을 분비하여 신경 손상을 억제하며 축삭(axon)의 성장의 모체(matrix)로서의 역할을 할 수 있는 장점으로 인하여 척수 손상의 치료 연구에 많이 이용되어 왔다. 그러나 동시에 증배엽 줄기세포는 얻는 개체에 따라 일정하지 않은 반응성, 배양법으로 인한 세포의 이질성과 특성의 차이, 낮은 신경계 분화율로 인해 결과의 재현성에 한계를 가지고 있으며 신경계 세포 외의 다른 세포로의 분화 또는 백혈병 발생의 위험을 가지고 있다<sup>7</sup>. 안정적으로 일정한 형질의 신경계 분화능을 가진 증배엽 줄기세포를 다량으로 얻을 수 있다면 척수 손상의 치료 효과를 높이고 합병증 발생의 위험을 낮출 수 있을 것이다.

증배엽 줄기세포 배양에 있어서 배양의 효율과 형질의 결정에 가장 중요한 시기는 착상과 초기 성장이다. 이를 위해 증배엽 줄기세포 생존을 억제하는 것으로 알려져 있는 혈액세포와 응고 물질을 제거하기 위해 체(Mesh)로 골수에서 수확한 세포들을 거르고 젤라틴을 이용하여 초기 착상을 도왔을 때 세포가 착상 및 생존이 증가하였으며 보다 많은 일관된 증배엽 세포를 배양할 수 있다는 것을 확인하였다<sup>23</sup>. 또한 분화실험을 통해 젤라틴의 노출이 증배엽 줄기세포의 지방 및 골 세포로의 분화에는 영향을 주지 않으나 신경계 분화시 보다 많은 양의 신경계 분화 줄기세포를 배양할 수 있음을 확인하였다<sup>24</sup>. 이러한 신경계

분화 세포의 증가가 줄기세포 배양시 함께 배양된 신경전구세포의 증가에 의한 것이 아니라 중배엽 줄기세포의 신경분화를 통해서만 신경 세포로의 분화율이 통계적으로 유의하게 증가함을 증명하여 젤라틴이 중배엽 줄기세포의 신경계 분화에 직접 관여함을 보고 하였다<sup>25</sup>.

젤라틴은 중배엽 줄기세포 배양시 세포의 착상과 펼침에 관여하고 인체에서도 세포외 기질(Extracellular matrix)의 일부로서 세포의 착상과 이동에 관여하며 신경계 분화에 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>26</sup>. Trappmann 등은 착상되는 물질의 탄성에 따라 줄기세포가 분화를 결정한다고 보고 하여 이식에 사용된 중배엽 줄기세포는 초기 착상에 사용된 젤라틴의 영향으로 일관된 세포의 특성 및 높은 신경계 분화율을 가지며 MMP-2(gelatinase A)의 상승을 가져왔을 것으로 보인다(Fig 2)<sup>26</sup>. 이러한 신경계 분화율이 높은 일관된 중배엽 줄기세포로 교증의 조절을 통해 보다 안정하게 척수손상의 회복을 연구할 수 있었다. 그러나 젤라틴이 중배엽 줄기세포의 신경계 분화율을 높이고 젤라틴을 분해하는 MMP-2(gelatinase A)의 상승에 미치는 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 2. 클립을 이용한 중증 척수 손상 모델

척수 손상의 예후를 좌우하는 가장 중요한 요인은 손상의 정도이다. 불완전 척수 손상 환자의 경우 75%에서 운동기능의 회복을 하는 것으로 알려져 있어 새로운 치료 또는 줄기세포 치료는 중증 척수 손상 환자에게 필요하다. 따라서 중증 척수 손상 환자를 대표할 수 있는 동물

모델을 안정적으로 만드는 것은 줄기세포 치료의 임상 적응을 위해 매우 중요하다. 왜냐하면 전임상 치료에서도 중등도 척수 손상(Moderate SCI) 모델에 효과를 증명한 줄기세포 치료가 중증 척수 손상(Severe SCI) 모델에서는 효과가 없음을 보고하고 있고 중증 척수 손상 환자에는 더욱 효과가 없을 수 있기 때문이다<sup>27</sup>. 따라서 척수 손상 환자와 비슷한 기전을 가진 일관성과 재현성이 높은 중증 척수 손상 모델을 선택하여 전임상 실험을 하는 것이 임상 실험의 성공을 위해 매우 중요하다<sup>28, 29</sup>. 반측 절단 손상(hemisecion) 모델은 손상 후 동물 관리가 용이하고 손상된 특정 신경길 확인에는 도움이 되어 과거 전임상 실험으로 많이 시행되었으나 실제 척수 손상과 손상 기전이 상이하며 재현성이나 일관성이 떨어진다고 보고 되었다<sup>28, 29</sup>. 완전 절단(complete transection) 척수 손상 모델은 완전히 척수를 자르고 그 사이에 gelform 등을 넣어 완전 척수 손상(complete spinal cord injury: American spinal cord injury association impairment scale(AIS) A)에 해당하는 전임상 모델을 만들 수 있으나 역시 손상기전이 실제 척수 손상과는 다르며 합병증과 사망률이 높아 널리 사용되지 않는다<sup>28, 29</sup>. 실제 척수손상과 기전이 유사하며 일관성과 재현성이 높은 중증 척수 손상 모델은 상용화된 척수 손상 기계를 이용한 척수 좌상(contusion) 모델과 클립(clip)을 이용한 척수 압박 (compression) 손상 모델이다<sup>29</sup>. 척수 좌상 모델은 손상을 주는 물체의 상용화된 기계에 따라 손상을 주는 기구의 자유낙하의 높이, 좌상의 힘 또는 좌상의 전이 정도를 조절하여 척수에 일정한 크기의 손상을 줌으로서 중증, 중등도, 경도의

척수 손상 모델을 만드는 방법이다. 대표적인 상용화된 척수 손상 기계는 Infinite horizon impactor (Precision Systems and Instrumentation LLC, VA, USA)로 고정 장치로 척추체를 잘 고정하고 손상을 주는 힘을 90kd으로 하고 척수에 일정한 전이(displacement)가 일어나게 척수 손상을 주면 되어 일관성 있는 중증 척수 손상 모델을 만들 수 있다고 보고 하였다<sup>30</sup>. 클립을 이용한 척수 손상 모델은 클립의 압박력(closing force)와 클립 손상 후 유지시간 (clipping time)에 따라 손상 정도를 조절할 수 있어 용이성과 경제성이 높아 1978년 개발된 후 최근까지 많이 사용되고 있다<sup>28,29,31</sup>. Rivlin이나 Fehling은 각각 180g, 98g의 동맥류 수술에 쓰이는 클립(aneurysmal clip)을 이용하여 중증 척수 손상 모델을 만들었고 같은 연구소의 Poon 등은 50g의 상품화된 클립(Walsh Manufacturing, Oakville, ON, Canada)을 제작하여 AIS A의 척수 손상 모델을 만들 수 있다고 보고 하였다<sup>31-33</sup>. 이 모델은 수술자의 숙련도가 필요하고 경제적이며 일관성 있게 중증 척수 손상 모델을 만들 수 있기에 클립을 이용한 척수 압박 손상 모델을 선택하여 척수 손상 모델을 만들었다. 75g 동맥류 클립(Aesculap, Center Valley, PA, US)를 이용해 1분간 척수 손상을 주었을 때 4주 이상 BBB 점수가 평균 3(2-5)정도 되는 중증 척수 손상 모델로 실험을 진행하였다.

### 3. 급성 척수 손상에서 교증 조절을 통한 줄기세포 치료

활성화된 성상 세포와 교증은 척수 손상 후 발생하는 특징적인 세포 생물학적인 변화이다. 교증은 척수 손상 후 발생하는 복잡한 화학

작용과 정상세포의 변형과 증가를 통해 반흔 형성(Scar)으로 끝나는 일련의 작용으로 gliosis, glial scar reaction 등 여러 용어가 혼재되어 사용되고 있으며 현재는 astrogliosis가 가장 널리 사용되고 있다<sup>34</sup>. 급성 교증은 조직학적으로 손상 중심부의 세포외 조직과 섬유아세포로 구성된 섬유성 반흔과 그 밖으로 활성화된 정상세포로 구성되는 교증성 반흔으로 나뉘게 된다<sup>35</sup>. 줄기세포 치료를 통한 교증 반응의 변화를 확인하기 위해 척수 손상 후 1주일에 조직 검사를 통해 급성 교증을 확인하였다. 중배엽 줄기세포를 이식한 손상된 척수에서는 통계학적으로 유의하게 섬유성 반흔이 증가되어 있었고 급성 교증성 반흔에 활성화된 정상 세포의 증가를 확인할 수 있었다.

급성 척수 손상기 정상세포는 염증 관련 사이토카인을 통하여 활성화되며 그 수가 증가하며 MMP의 작용을 통해 손상 부위로 이동하고 Blood-Spinal-Barrier를 붕괴하여 손상부위의 악화와 염증을 만들기도 하고 손상 조직에서 glutamate, potassium을 흡수해 성장인자 및 사이토카인을 생산하기도 하며 세포 재배열을 통해 섬유성 반흔이 더 이상 파급되는 것을 막기도 한다<sup>12,35-37</sup>. 급성 척수 손상과 관련된 대표적인 MMP는 MMP-9으로 주로 손상된 신경과 혈관, 중성구와 대식세포에서 분비되며 손상 후 1일 최고로 상승하고 이후 감소한다<sup>36,41</sup>. 또한 급성 척수 손상에서 MMP-2는 주로 활성화된 정상세포와 손상된 신경에서 표현되며 척수 손상 후 5일 상승하여 14일까지 증가하여 척수 손상 회복에 관련됨이 보고되었다<sup>37,40</sup>. 줄기세포 치료를 통해 증가된 교증의 기전을 찾기 위해 척수 손상 후 1일, 3일, 7일에 급성 척수

손상에서 MMP의 변화를 측정해 보았다. 척수 손상 후 1일 MMP-2가 대조군에 비해 또한 3일과 7일에 비교해 유의하게 상승되었다. 대조군에서는 MMP-2는 이전에 알려진 바와 같이 척수 손상 후 1-7일에 점진적 증가를 보였으나 줄기세포군에서는 손상 후 1일 유의하게 상승하고 손상 후 3일 감소되었다가 7일에 상승되었다. Lozito 등은 중배엽 줄기세포가 표면에 MMP-2를 표현하며 외부의 pro MMP-2를 활성화할 수 있다고 보고하였다<sup>39</sup>. 척수손상 연구에 사용된 중배엽 줄기세포는 분화시 성상세포 계열의 세포가 38.48%를 차지하고 있고 MMP-2가 유의하게 증가되어 있어 이로 인해 손상 후 1일 척수에서 MMP-2 발현이 상승되었으며 이로 인해 활성화된 성상세포의 이동의 증가, 섬유성 교종의 증가를 가져온 것으로 보인다<sup>40,41</sup>. 척수 손상 후 1일, 3일, 7일에 교종 관련 사이토카인의 변화를 확인하였을 때 척수 손상 후 1일 STAT3만 유일하게 증가의 경향을 보였다. STAT3는 척수손상의 회복에 도움을 주는 급성 교종의 대표적인 기전이며 활성화된 성상세포의 이동으로 손상의 범위 감소에 기여한다고 보고되었다<sup>15,16,34,37</sup>. Renault-Mihara 등은 이러한 STAT3를 통한 교종 반응이 MMP-2의 증가와 관련이 있고 MMP9 과는 관련이 없음을 보고하였다<sup>38</sup>. 1주에 증가된 교종은 척수 손상 회복에 도움을 주는 MMP-2, STAT3를 통해 이루어진 것으로 보인다.

만성기 교종은 심한 척수 손상의 경우 세포가 없는 공동(Post traumatic cystic cavitation)이 생성되며 주위 교종 반흔이 생기게 된다. 손상 후 28일이 반흔의 정도와 백질의 보전 정도를 확인하였을 때

줄기세포 치료 군에서 만성 반흔의 크기 감소가 두드러지며 대조군에 비해 백질이 더 많이 보전되었음을 확인할 수 있었다. 행동학적 검사도 줄기세포 치료 군에서 21일부터 통계적으로 유의하게 운동능력의 회복을 보였다. Hsu 등은 척수 손상 급성기에 증가된 MMP-2는 반흔 형성을 조절하여 척수 손상의 회복을 돕는다고 보고하였다<sup>41</sup>. Veeravalli 등은 손상 후 7일 제대혈 줄기세포 이식으로 인한 상승된 MMP-2가 chondroitin sulfate proteoglycan의 제거를 통해 21일에 만성 반흔의 감소 및 척수 손상의 회복을 가지고 온다고 보고 하였다<sup>42</sup>.

이에 반해 STAT3를 제외한 신경염증이나 교증과 관련된 사이토카인은 줄기세포 치료에 따라 척수 손상 급성기에 모두 감소 또는 감소의 경향을 보였다. Brambila 등은 NF- $\kappa$ B의 상승이 척수손상의 회복을 억제하는 교증 반응의 기전이라고 보고 하여 이를 억제하면 척수 손상의 회복이 이루어짐을 보고하였다<sup>43</sup>. 급성 척수 손상에 줄기세포를 이식하였을 때 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유발한다고 알려져 있는 TNF- $\alpha$ 는 척수 손상 후 1일과 3일에 감소되었고 NF- $\kappa$ B는 손상 후 7일에 감소하였다. 그러나 NF- $\kappa$ B의 신호전달 체계상 아래쪽에 있는 p65의 인산화를 Western blot으로 분석하였을 때 척수 손상 후 p65 인산화/p65의 비율은 척수 손상 후 1일에 감소하고 척수 손상 후 3일과 7일에는 통계적인 유의성은 없이 감소의 경향을 보였다(Fig. 5). 1주에 증가된 교증은 척수 손상 회복에 도움을 주는 MMP-2, STAT3를 통해 증가된 활성화된 정상 세포의 이동과 작용으로 손상 부위를 감소시켜 만성기 반흔이 감소되며 백질이 보존된 것으로 보인다<sup>38</sup>. 줄기세포

치료에 따른 급성기 NF- $\kappa$ B의 감소와 관련된 교증 조절에 따른 후기 교증의 감소와 척수 손상의 회복에 대해서는 더 연구가 필요하다.

#### 4. 급성 척수 손상에서 줄기세포의 생존율 증진

전임상 실험에서 언제 줄기세포를 이식할 것인가라는 문제는 어떻게 하면 급성기에 성공적인 줄기세포치료를 할 수 있을 것인가로 연결되는 과제이다. 이전에 기술한대로 대부분의 전임상 실험에서는 척수손상 급성기에 이식하면 세포의 생존율이 매우 낮기에 주로 아급성기인 일주일 이후에 줄기세포 치료를 시행하고 있다<sup>17-20</sup>.

신경계 분화 중배엽 줄기세포를 급성기 척수손상에 이식하였을 때 이식 후 4주가 되면 대부분 사멸하여 공초점 현미경으로 겨우 그 생존을 확인할 수 있는 정도로 낮은 생존율을 보였다. 신경계 친화 중배엽 줄기세포 생존율의 저하는 이전 여러 논문에 보고되고 있듯이 급성기의 세포 생존에 적대적인 환경이 원인인 것으로 보인다<sup>17,19</sup>. Parr 등은 극히 일부에서 생존한 신경 줄기세포가 백서 척수 손상으로 인한 공동(cavitation)의 의미 있는 감소를 보이며 신경학적 회복에 도움을 주었기 때문에 줄기세포의 생존이 장기적 신경학적 회복에 필요조건은 아니라고 보고하였다<sup>27</sup>. 낮은 줄기세포의 생존율에도 척수 손상의 회복을 보였으나 보다 안정된 결과를 얻기 위해서는 줄기세포의 생존을 위협하는 급성 척수 손상의 환경이나 물질을 억제하는 보조적인 치료가 동반되어야 할 것으로 보인다.

대표적으로 척수 손상 급성기 줄기세포의 생존에 적대적인 환경을

만드는 물질이자 반흔(scar)을 이루는 주된 물질로 알려진 것은 CSPG이다. 초기 척수손상과 관련된 다른 대표적인 물질인 Nogo or Myelin associated glycoprotein 같은 myelin inhibitor는 세포 구조로서 존재하기 때문에 척수 손상 이후 양의 변화가 없으나 CSPG은 손상을 입은 직후 성상세포나 신경세포, 아돌기세포에서 생산하기 때문에 손상 후 24시간에 급격히 증가하여 72시간이 되면 이미 축삭의 성장과 신경 재생을 막으며 상승한다. 이렇게 증가된 CSPG는 줄기세포의 생존을 억제할 뿐 아니라 신경생성과 신경세포로의 분화를 억제하는 역할을 한다고 보고되고 있다. 따라서 척수 손상 급성기에 상승되어 줄기세포의 생존과 분화를 막는 CSPG를 억제하는 Chondroitinase ABC 등이 급성기 척수손상 후 신경줄기 세포의 이식 및 생존을 높이는 후보 물질이 될 수 있다. 그러나 Chondroitinase ABC는 생체에서 과량으로 분비되면 세포 독성을 가지며 동시에 생체내에서 금방 비활성화되어 이를 조절할 수 있는 추가적인 고려가 있어야 한다. 따라서 점진적으로 생체내 일정한 양의 Chondroitinase ABC를 분비할 수 있도록 조절할 수 있다면 척수 손상의 회복과 줄기세포의 생존을 향상에 도움을 줄 수 있다<sup>44</sup>.

또 다른 방법으로는 적대적 환경에 노출을 조절하기 위해 hydrogel과 같은 이식체를 통하여 줄기세포를 점진적 이식하는 방법이 있을 수 있다. Poly ethylene glycol(PEG) hydrogel은 구멍의 크기(pore size), 단단함(stiffness) 등의 물리적 특성을 조절하여 분해속도를 조절하며 지속적으로 세포를 이동시킬 수 있으며 물질을 추가하여 비세포환경을

통해 신경계 분화도 촉진시킬 수 있어 hydrogel을 통해 줄기세포의 점진적 이식으로 줄기세포의 생존율 향상을 시도해 볼 수 있을 것이다<sup>45</sup>.

## 결론

급성기 신경계 분화 중배엽 줄기세포 치료는 중증 척수 손상 백서의 운동 능력의 회복과 더 많은 백질의 보전을 보였고 이는 MMP-2 상승과 관련된 급성 교증의 증가를 통한 척수 손상의 회복임을 확인할 수 있었다. 급성기 줄기세포 치료를 통한 STAT3 증가와 NF- $\kappa$ B 감소의 두 기전이 급성 교증의 증가와 만성 반흔 감소에 미치는 직접적 인과 관계와 낮은 줄기세포의 생존율을 높이는 방법에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 참고 문헌

1. Fitzharris M, Cripps RA, Lee BB: Estimating the global burden of traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord* 2011; 52: 117-122.
2. Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, Fehlings MG: Spinal cord injury: time to move? *J Neurosci* 2007; 27:11782-11792.
3. Han ZA, Lee BS, Kim W, Lee SJ, Im HJ, Kim C, et al: People with Spinal Cord Injury in Korea. *Am J Phys Med Rehabil* 2017; 96: S83-S85.
4. Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, Tetzlaff W: Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine* 2005; 30: S3-13.
5. Tator CH: Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties and recommendations. *Neurosurgery* 2006; 59: 957-982.
6. Blight A, Curt A, Ditunno JF, Dobkin B, Ellaway P, Fawcett J, et al: Position statement on the sale of unproven cellular therapies for spinal cord injury: the international campaign for cures of spinal cord injury paralysis. *Spinal Cord* 2009; 47: 713-714.
7. Song K, Li W, Li M: Acute promyelocytic leukemia following autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for traumatic brain injury: A case report. *Oncol Lett* 2015; 10: 2905-2908.
8. Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L: Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 2002; 22: 6570-6577.
9. Grossman RG, Fehlings MG, Frankowski RF, Burau KD, Chow DS, Tator C et al: A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2014; 31:239-255.
10. Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, W Cadotte D, Harrop JS, et al: Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury, results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study(STASCIS). *PLoS One* 2012; 7: e32037.
11. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al: A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1405-1411.

12. Fawcett JW, Asher RA: The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999; 49: 377-391.
13. McTigue DM, Sahinkaya FR: The fate of proliferating cells in the injured adult spinal cord. *Stem Cell Res Ther* 2011; 14:7.
14. Griffiths IR, McCulloch MC: Nerve fibres in spinal cord impact injuries. Part 1. Changes in the myelin sheath during the initial 5 weeks. *J Neurol Sci* 1983; 58: 335-49.
15. Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K et al: Conditional ablation of STAT3 or SOCS3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 2006; 12: 829-834.
16. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Sofroniew MV et al: Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature* 2016; 532: 195-200.
17. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al: Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2199-2204.
18. Chiba Y, Kuroda S, Maruichi K, Osanai T, Hokari M, Yano S, et al: Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model. *Neurosurgery* 2009; 64: 991-1000.
19. Cusimano M, Biziato D, Brambilla E, Donegà M, Alfaro-Cervello C, Snider S, et al: Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain* 2012; 135: 447-460.
20. Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC et al: Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 2006; 20: 278-296.
21. Jiang J, Lv Z, Gu Y, Li J, Xu L, Xu W, Lu J, Xu J: Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res* 2010; 66: 46-52.
22. Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, Scheff SW: Cyclosporin A treatment following spinal cord injury to the rat: behavioral effects and stereological assessment of tissue sparing. *J Neurotrauma* 2001; 18: 513-522.
23. Park YH, Yun JI, Han NR, Park HJ, Ahn JY, Kim C, et al: Mass production of early-stage bone-marrow-derived mesenchymal stem cells of rat using gelatin-

coated matrix. *Biomed Res Int* 2013; 347618.

24. Han NR, Yun JI, Park YH, Ahn JY, Kim C, Choi JH, et al: Generation of priming mesenchymal stem cells with enhanced potential to differentiate into specific cell lineages using ECM protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 436: 413-417.

25. Lee H, Han NR, Hwang JY, Yun JI, Kim C, Park KH, Lee ST: Gelatin Directly Enhances Neurogenic Differentiation Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Without Stimulation of Neural Progenitor Cell Proliferation. *DNA Cell Biol* 2016; 35: 530-536.

26. Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, Strange DG, Li Y, Oyen ML, et al: Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat Mater* 2012; 27: 642-649.

27. Parr AM, Kulbatski I, Zahir T, Wang X, Yue C, Keating A, et al: Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience* 2008; 155: 760-770.

28. Robins SI, Fehlings MG: Models of experimental spinal cord injury Translational relevance and impact, *Drug Discov Today Dis Models* 2008; 5: 5-11.

29. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V et al: Spinal cord injury models a review. *Spinal Cord* 2014; 52: 588–595.

30. Kim C, Farhadi HF, Ngwenya L: Modeling of graded contusional spinal cord injury in the mouse the infinite horizon impactor. *J Neurotrauma* 2013; 30: A80

31. Rivlin AS, Tator CH: Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 1978; 10: 38-43.

32. Fehlings MG, Tator CH: The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1995; 132: 220-228.

33. Poon PC, Gupta D, Shoichet MS, Tator CH: Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine* 2007; 32: 2853-2859.

34. Sofroniew MV: Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.*2009; 32: 638-647.

35. Yuan YM, He C: The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull*

2013; 29: 421-435.

36. Zhang H, Chang M, Hansen CN, Basso DM, Noble-Haeusslein LJ: Role of matrix metalloproteinases and therapeutic benefits of their inhibition in spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 206-220.

37. Okada S, Hara M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Nakashima Y: Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neurosci Res* 2018; 126: 39-43.

38. Renault-Mihara F, Mukaino M, Shinozaki M, Kumamaru H, Kawase S, Baudoux M, et al: Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation. *J Cell Biol* 2017; 216: 2533-2550.

39. Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS: Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biology* 2014; 34: 132-143,

40. Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ: Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist* 2010; 16: 156-170.

41. Hsu JY, McKeon R, Goussev S, Werb Z, Lee JU, Trivedi A: Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006; 26: 9841-50.

42. Veeravalli KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, Fassett D, et al: Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after SCI. *Neurobiol Dis* 2009; 36: 200-212

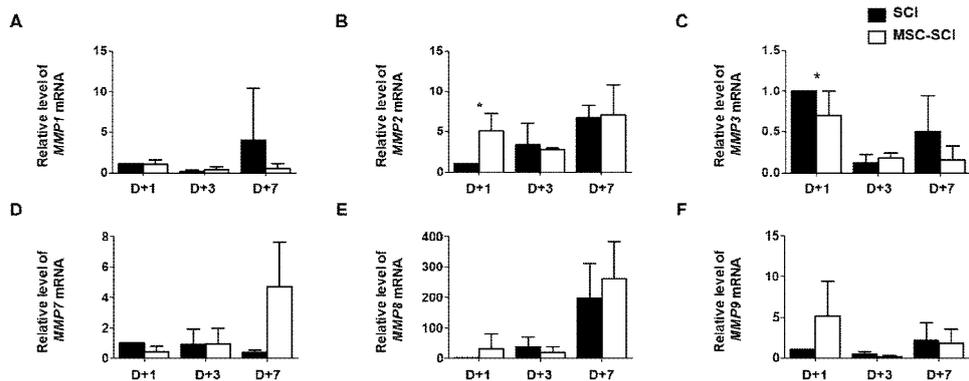
43. Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, et al: Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 2005; 202: 145-156.

44. Tester NJ, Plaas AH, Howland DR: Effect of body temperature on chondroitinase ABC's ability to cleave chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *J Neurosci Res* 2007; 85: 1110–1118

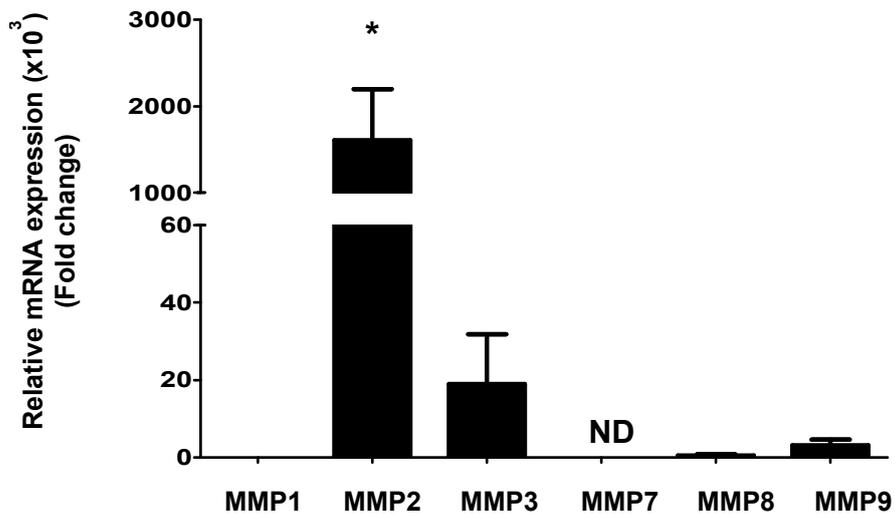
45. Lee ST, Yun JI, Jo YS, Mochizuki M, Vlies AJ, Kontos S, Ihm JE, et al: Engineering integrin signaling for promoting embryonic stem cell self-renewal in a precisely defined niche, *Biomaterials* 2010; 31:1219-1226.

**Table 1.** Oligonucleotide primers and PCR cycling conditions.

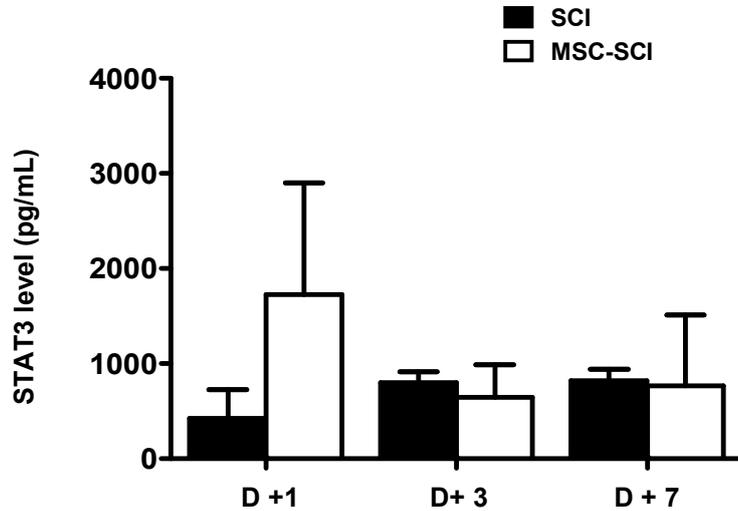
| Genes        | GenBank<br>number | Primer sequence        |                       | Size<br>(bp) | Temper<br>ature<br>(°C) |
|--------------|-------------------|------------------------|-----------------------|--------------|-------------------------|
|              |                   | Sense (5'>3')          | Anti-sense (5'>3')    |              |                         |
| <i>GAPDH</i> | NM_017008.4       | ggacctcatggcctacatgg   | cccctcctgtgttatgggg   | 179          | 60                      |
| <i>MMP-1</i> | NM_001134530      | ctccccaaatcccatccagc   | ttgagctcagctctggcatg  | 160          | 60                      |
| <i>MMP-2</i> | BC074013          | ggccgtacaatcttcaactgca | agcacctttcttgggcacaa  | 182          | 60                      |
| <i>MMP-3</i> | NM_133523         | tacggctgtgtgctcactca   | gctccctgtcactctcagcc  | 197          | 60                      |
| <i>MMP-7</i> | L24374            | ttagtgggggactgcagaca   | tcctcaccatccgtccagtac | 169          | 60                      |
| <i>MMP-8</i> | NM_022221         | tggacctcagacaacctgt    | tcaactgtctcagctgggga  | 159          | 60                      |
| <i>MMP-9</i> | NM_031055         | tcattctcagtgccggaagc   | ggacacatagtgaggaggact | 183          | 60                      |



**Figure 1. The effects of MSCs on MMPs in acute SCI.** After SCI induction with or without MSC transplantation, the spine homogenates were isolated at Day1 to Day7 in the SCI for real-time qRT-PCR. The mRNA level of (A) MMP-1, (B) MMP-2, (C) MMP-3, (D) MMP-7, (E) MMP-8 and (F) MMP-9 was detected in indicated time point after SCI. The relative expression was calculated with  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and normalized with *GADPH*. Only MMP-2 was increased in MSC-treated SCI rat with statically significance at Day1 after SCI (D+1). Data are presented as the mean  $\pm$ SD of three animals. \*  $p < 0.05$  compared in each group. D; Day.

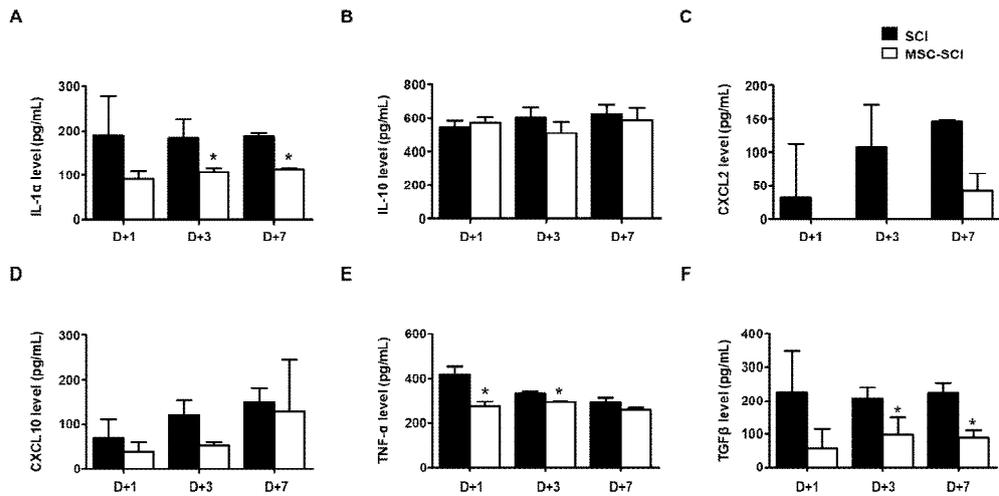


**Figure 2. MMP levels in MSC.** The MSC from our protocol has increased MMP-2 production compared to other MMPs with statistically significance. \*  $p < 0.05$  for significant difference among each MMP gene expression in MSC



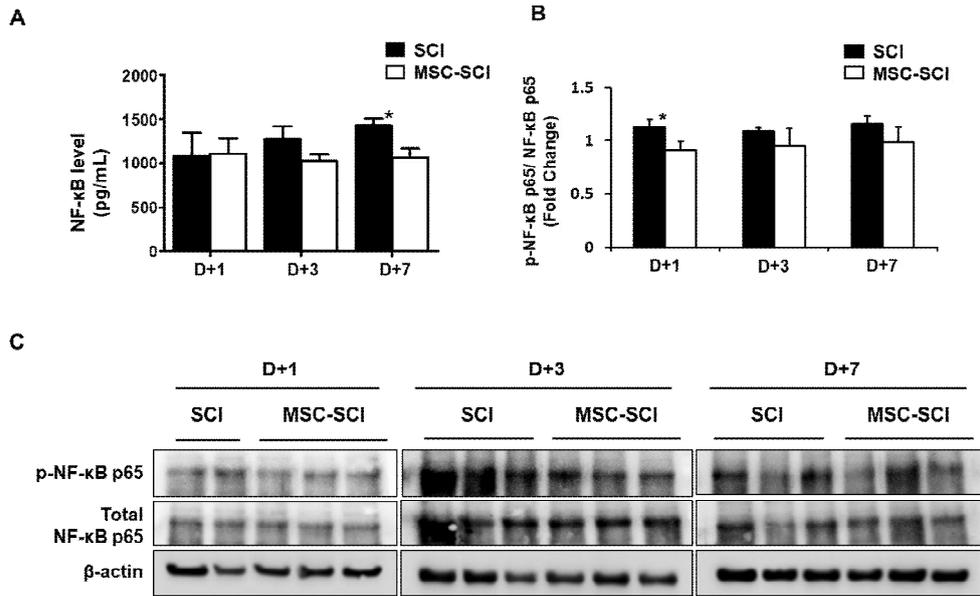
**Figure 3. The effects of MSCs on STAT3 related to astrogliosis in acute SCI.**

The activation of STAT3 was detected by ELISA analysis. The value was calculated along with regression analysis of standard curve. MSC treatment induces MMP2 expression and STAT3 activation in SCI rat. Data are presented as the mean  $\pm$ SD. D; Day. STAT3 was evaluated for acute astrogliosis at 1<sup>st</sup> day (D+1), 3<sup>rd</sup> day (D+3) and 7<sup>th</sup> day (D+7) after SCI. STAT3 had an increased tendency in injured spinal cord with MSC transplantation at first day after SCI. STAT3 was checked at three rats each.

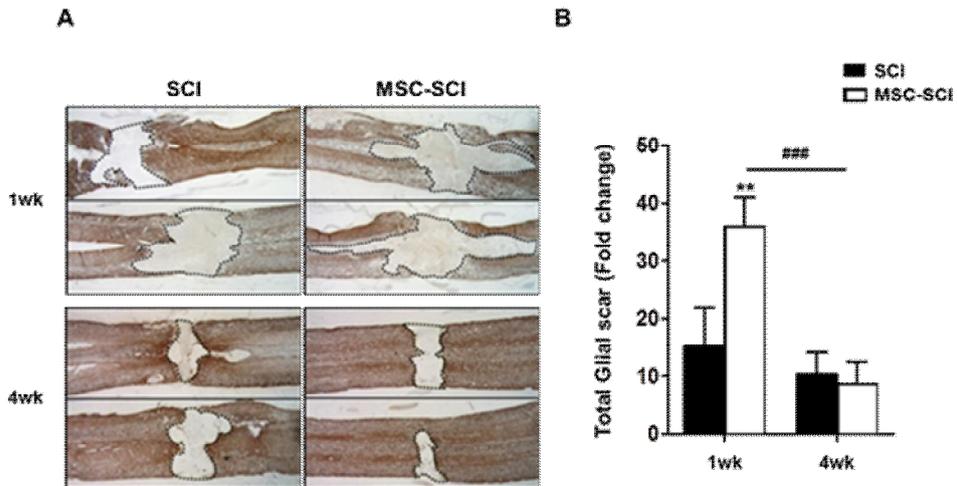


**Figure 4. The effects of MSCs on cytokines related to astrogliosis in acute SCI.**

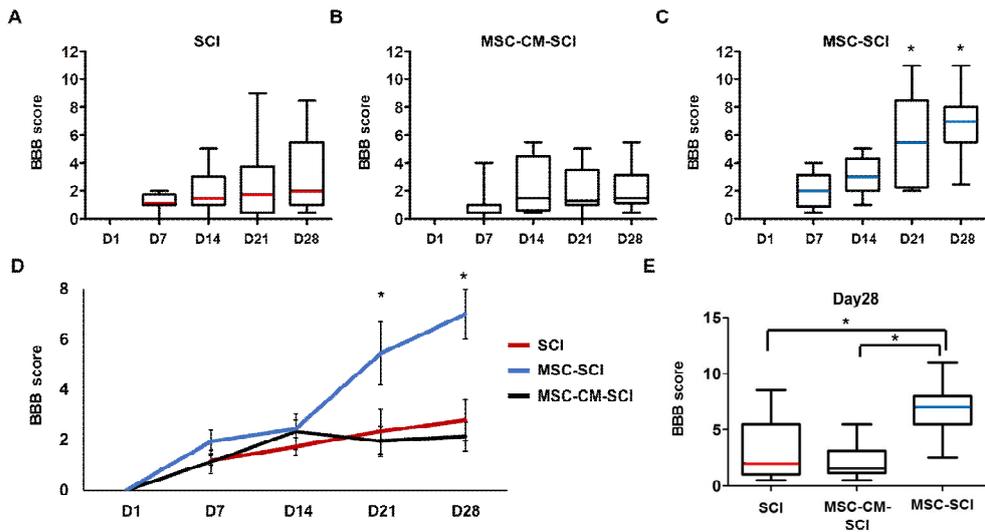
After SCI induction with or without MSC transplantation, the spine homogenates were isolated at day of first (D+1), third (D+3) and seventh (D+7) after SCI (n=3). The expression of cytokine/chemokine including (A) IL-1 $\alpha$ , (B) IL-10, (C) CXCL-2, (D) CXCL-10, (E) TNF- $\alpha$ , and (F) TGF- $\beta$  was evaluated for acute astrogliosis using ELISA analysis. Each value was calculated along with regression analysis of corresponding standard curve. MSC treatment decreased the level of cytokine/chemokine in SCI rat. \* $p < 0.05$  for MSC-SCI compared with SCI at indicated time point. D; Day.



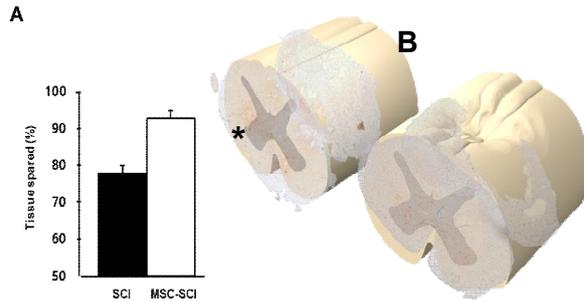
**Figure 5. The effects of MSCs on NF-κB pathway in acute SCI.** After SCI induction with or without MSC transplantation, the spine homogenates were isolated at Day1 to Day7 in the SCI after MSC transplantation for western blot analysis and ELISA assay to detect neuron-inflammatory pathway through activation of NF-κB p65 (p-NF-κB, 65-kDa). (A) ELISA confirmed the activation of NF-κB according to manufacturer's instruction. The value was calculated along with regression analysis of standard curve. MSC treatment decreased the activation of NF-κB in SCI rat. (B) Western blot analysis determined the phosphorylation of NF-κB p65 at Serin 536 residue. Total NF-κB and β-actin were used for loading control. the phosphorylation level of the inflammatory transcriptional factor NF-κB p65 at Ser536 of spinal cord was slightly decreased at 1-, 3- and 7 d after injury. (C) The representative bands showed the ratio of p-NF-κB p65 to total NF- κB. Data are presented as the mean ±SD \*  $p < 0.05$  for MSC-SCI compared with SCI at indicated time point. D; Day.



**Figure 6. Analysis of GFAP-positive astrogliosis with MSC treatment at acute severe SCI (A)** The astrogliosis was described using represent 2 images of each groups (n=3). The extent of astrogliosis was measured by bright-field microscopy with Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive staining in mid sagittal section of SCI at 1 week(wk) and 4 wk. (B) The dotted line for area occupied by glial scar in (A) was shown as stereological quantification by image J. Data are presented as the mean  $\pm$ SD. The area of acute astrogliosis was increased by MSC treatment in SCI at 1wk, but it was decreased in chronic astrogliosis at 4wk. \*\* $p < 0.01$  compared with SCI at each group. ### $p < 0.001$  compared with at 1wk and 4wk in MSC-SCI group. D; Day.

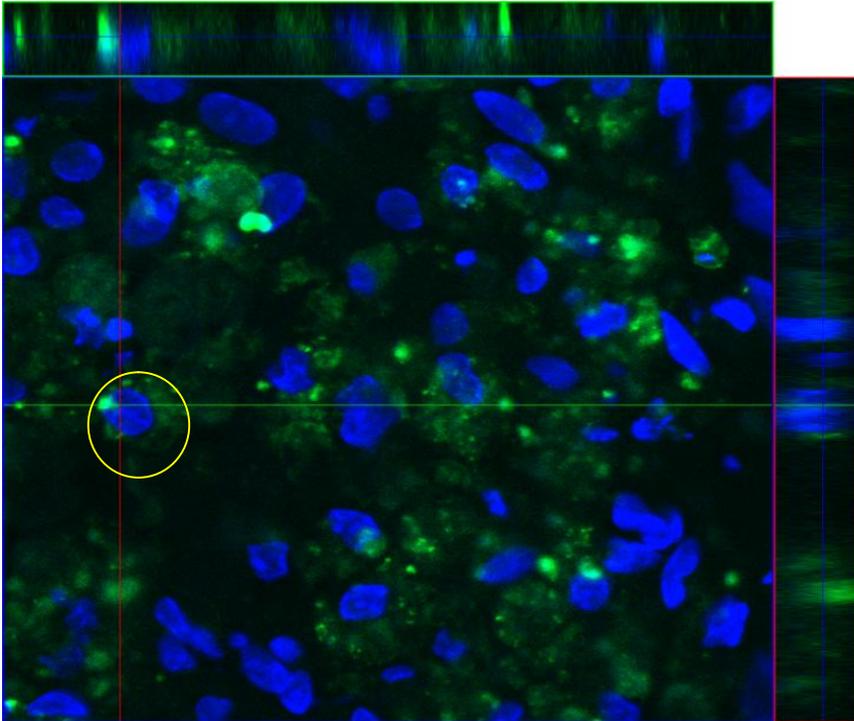


**Figure 7. Time course of behavioral recovery with MSC treatment in acute severe SCI.** For the comparison of behavioral outcome, twenty-five female SD rats were anesthetized and exposed to severe SCI using the clipping compression technique. Nine rats were performed SCI(SCI) and eight rats were performed SCI with infusion of MSC culture medium (MSC-CM-SCI) for control. MSC were infused at eight rats (MSC-SCI). (A-C) Functional outcome was analyzed serially with the Basso Beattie and Bresnahan (BBB) scale at postoperative one day and weekly for four weeks. (D) From 21days after SCI, the rats with MSC treated group had better behavioral outcome with statistically significance than of SCI group. (E) This effect showed obvious differences between groups at D28. \* $p < 0.05$  for MSC-CM-SCI or MSC-SCI vs. SCI. D; Day.



**Figure 8. Increased spared white mater with MSC treatment at 28<sup>th</sup> day after SCI.** At 4 weeks after SCI, histological outcome was determined by their relative mean percentage of spared white tissue by the Cavalieri method. The axial slide was selected every 100um from epicenter to rostral and caudal direction with Hematoxylin & eosin and neurofilament staining. (A) The mean area of spared white mater in tissue was expressed as proportional area (percentage, %). MSC treated SCI rat had more spared white matter at the lesion epicenter compared with SCI rats. \* $p < 0.05$  compared with SCI group. (B) The illustrated three-dimensional reconstructed images were shown with representative two axial sliced caudal and epicenter of injured spinal cord in SCI only(left) and MSC treated rat(Right).

## DAPI/CFDA-SE



**Figure 9. Confocal microscopy image of CFDA-SE tracked MSC at 28<sup>th</sup> day after SCI.** The survived MSC were visualized by confocal microscopy at 28days after transplantation. Yellow circle means survived NP-MSC was visualized by DAPI (blue) positive cells co-localized with CFDA-SE (green) with high resolution.

## ABSTRACT

# **A study on recovery of acute severe spinal cord injury of rat using neuronal differentiated mesenchymal stem cell**

Choonghyo Kim

Department of Medicine

Medicine (Department of Brain and Cognitive sciences) Major

The Graduate School

Seoul National University

### ***Introduction***

Treatment with mesenchymal stem cells (MSC) in spinal cord injury (SCI) has been highlighted as therapeutic candidate for SCI. Although astrogliosis is a major phenomenon after SCI, the role of MSC on astrogliosis is still controversial. In this study, we determined whether acute transplantation of MSC improves the outcome of SCI through modulating astrogliosis.

## ***Methods***

Bone marrow derived rat MSCs were induced neural differentiation and transplanted at acute severe SCI rats. Matrix metalloproteinase (MMP) and neuro-inflammatory pathway were analyzed for acute astrogliosis at 1, 3 and 7 d after SCI in RT-PCR, ELISA and western blot analysis. Functional outcome was assessed serially at postoperative 1 d and weekly for 4 weeks. Histopathologic analysis was undertaken at 7 and 28 d following injury in immunohistochemistry.

## ***Results***

In RT-PCR analysis, mRNA levels of MMP2 was significantly increased in MSC transplanted rats at 1<sup>st</sup> day after SCI. Transplantation of MSCs increased tendency of STAT3 at 1<sup>st</sup> day after SCI, while decreased other cytokines in acute SCI. Especially NF- $\kappa$ B was decreased at 7<sup>th</sup> day after SCI and phosphorylation of p65 by NF- $\kappa$ B pathway was slightly decreased at acute SCI by MSC treatment. In immunohistochemistry, MSC transplantation increased acute astrogliosis whereas attenuated scar formation with increased sparing white matter of spinal cord lesions. In BBB locomotor scale, the rats of MSC treated group exhibited improvement of functional recovery.

## ***Conclusion***

Transplantation of MSC reduces the inflammatory reaction and modulates astrogliosis via MMP2/STAT3 pathway leading to improve functional recovery after SCI in rats.

**Key words: Injury spinal cord, Mesenchymal stem cell, Gliosis, scar**

**Student number:2008-30559**