

## 신경줄기세포의 냉동보관법 확립

권광원<sup>1</sup>, 김미란<sup>2</sup>, 서해영<sup>1,3</sup>, 이영돈<sup>1</sup>, 김성수<sup>1\*</sup>

아주대학교 의과대학 <sup>1</sup>해부학교실, <sup>2</sup>산부인과학교실, <sup>3</sup>아주대학교 뇌질환연구센터

### 〈 초 록 〉

신경줄기세포(neural stem cells)는 신경세포와 신경아교세포를 형성할 수 있는 능력을 가진 세포로서 발생중인 중추신경계뿐만 아니라 성인 뇌조직의 제한된 부위에서도 발견된다. 본 연구에서는 사람 신경줄기세포의 장기간 보존을 위하여 냉동보관 방법을 확립하였다. 또한 냉동보관된 태아 뇌조직으로부터 신경줄기세포를 분리, 배양할 수 있는 가능성을 조사하였다. 우선 신경줄기세포의 표지자로 알려진 nestin의 발현과 함께 green fluorescence protein (GFP)을 발현하는 형질전환 생쥐를 이용하여 신경구의 형태로 증식된 세포가 신경줄기세포임을 GFP 발현을 통해 확인하였다. 태아의 신경줄기세포는 신경구에서 nestin의 발현을 통해 확인하였고, 분화조건에서 신경세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포로 분화하는 것으로 미루어 이들이 다분화능을 유지하고 있음을 확인하였다. 신경구를 냉동보관하고 해동시킨 후 다시 증식시켜 얻은 신경구의 분화능력은 냉동 전의 신경구와 차이를 나타내지 않았다. 또 임신 10~15주의 태아의 대뇌조직을 잘게 부수어 신경구와 동일한 방법으로 냉동보관한 후 이를 해동시켜 신경구의 형성을 유도한 경우에도 신경세포와 별아교세포로의 분화능력이 유지됨을 관찰하였다. 이는 조직에 남아있던 신경줄기세포가 생존하여 증식하였기 때문으로 추정된다. 본 연구의 결과는 뇌조직이나 대량 배양된 신경구를 장기간 냉동보관하여 필요한 시기에 해동, 배양하여 신경줄기세포의 이식에 사용할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

찾아보기 낱말 : 신경줄기세포, 신경구, 냉동보관, 세포치료제

### 서 론

신경줄기세포(neural stem cells)는 미분화 상태로 자기증식능력을 가지며, 중추신경계를 구성하는 신경세포, 별아교세포 및 희소돌기아교세포 등의 세포로 분화할 수 있는 다분화능을 갖는 세포이다(Gage, 2000). 신경줄기세포나 신경전구세포의 표지자(marker)로 알려진 nestin을 이용한 연구(Lendahl *et al.*, 1990; Dahlstrand *et al.*, 1995)를 통해 이러한 신경줄기세포는 척추동물의 발생초기에 신경관 및 신경관에 주로 분포하며, 최근에는 성숙한 포유류의 뇌에도 존재한다고 보고되었다(Pagano *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2000a, b).

시험관에서 basic fibroblast growth factor (bFGF)와 epidermal growth factor (EGF)가 첨가된 배지를 이용하면 신경줄기세포가 선택적으로 증식되면서 신경구(neurosphere)를 형성하는데 이러한 신경구 형성을 통한 신경줄기세포의 분리 및 배양방법은 생쥐와 사람의 태아 뇌조직에서 이미 성공된 바 있다(Svendsen *et al.*, 1997, 1998; Vescovi *et al.*, 1999).

최근, 신경줄기세포는 세포대치요법을 통한 뇌질환 치료 목적으로 많은 연구가 진행되고 있으며 실제 파킨슨씨병의 실험동물에 적용한 결과, 신경기능의 회복을 확인된 바 있다(Bjorklund *et al.*, 2000). 그러나 태아와 성인의 뇌로부터 신경줄기세포를 분리하고 배양할 수 있음이 확인되었음에도, 그 재료의 취득이 어렵고 세포의 균질성 및 장기간 배양이 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 신경줄기세포를 뇌질환치료 목적의 세포치료제로서 사용하기 위한 조건 중의 하나는 빠른 시간 안에 충분한 양의 신경줄기세포를 얻을 수 있어야 한다. 따라서 뇌조직이나 대량 배양된 신경구를 냉동 보존하고, 이를 원하는 시기에 즉시 해동하여 세포치료를 위한 다량의 신경줄기세포를 얻을 수 있는 조건의 확립이 필요하다.

Nestin은 제VI형 중간세포로서 신경줄기세포의 표지자로 널리 사용되고 있다. Nestin은 발생 중에 주로 신경외배엽에서 발현되는데 신경계에서 nestin의 발현은 nestin 유전자의 2번째 intron에 의하여 조절된다(Zimmerman *et al.*, 1994). 이 nestin의 2번째 intron에 의해 형광을 발하는 green fluorescence protein (GFP)가 발현할 수 있도록 고안된 유전자를 도입한 nestin-enhancer-GFP 형질전환 생쥐는 생체 내에서 신경줄기세포를 형광을 통해 직접 확인할 수 있는 유용한 수단으로 사용할 수 있다(Yamaguchi *et al.*, 2000). 또한 이 생쥐는 중추

\*본 연구는 식품의약품안전청의 바이오제품의 특성, 약리, 임상평가기술 개발사업(03142바이오020)의 지원을 받아 수행되었음.

\* 교신저자: 김성수

Tel: 031-219-5037, Fax: 031-219-5039, E-mail: kimdmg@ajou.ac.kr

신경계 발생 중 신경줄기세포 단계에서 형광을 띠기 때문에 신경줄기세포를 순수하게 분리하고 배양하는데 유용한 장점을 갖는다.

본 연구에서는 이 형질전환 생쥐로부터 신경줄기세포를 분리하여, 냉동보관에 따른 신경줄기세포의 nestin 발현양상 및 분화능력의 변화를 관찰하였고, 냉동보관된 사람 신경줄기세포를 해동시킨 경우와 냉동된 뇌조직에서 분리한 신경줄기세포의 분화 특성을 서로 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

Nestin-enhancer-GFP 형질전환 생쥐는 M. Yamaguchi (Tokyo Univ., Tokyo, Japan)로부터 제공받았으며, 태아의 뇌조직은 아주대학교병원 산부인과에서 산모치료를 위해 유산된 태아를 보호자 동의하에 제공받아 아주대학교 의료원 임상연구위원회의 승인을 거쳐 사용하였다. 세포배양에 이용된 neurobasal medium, N2 supplement, B27 supplement, DMEM, Hank's balanced salt solution (HBSS), 0.25% trypsin (EDTA free), 200 mM glutamine은 Gibco-BRL사(Grand Island, NY)에서 구입하였고, DNaseI은 Roche사(Mannheim, Germany)의 제품을 사용하였다. 성장인자로 leukemia inhibitory factor (LIF)는 Chemicon사(Temecula, CA), epidermal growth factor (EGF)는 Sigma사(St. Louis, MO), 그리고, basic fibroblast growth factor (bFGF)는 동아제약에서 각각 구입하여 사용하였다. 면역형광염색에서는 1차 항체로 사람특이적 nestin에 대한 단일클론항체 (Chemicon, Temecula, CA),  $\beta$ -tubulin III에 대한 단일클론항체 (BAbCO, Richmond, CA), glial fibrillary acidic protein에 대한 단일클론항체 (GFAP; Sigma, St. Louis, MO) 및 galactocerebroside에 대한 단일클론항체 (GalC; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)를 사용하였고, 2차 항체로는 FITC-conjugated anti-mouse IgG (Vector, Burlingame, CA)를 사용하였다. 대조염색에는 Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO)을 사용하였다.

### 2. 신경줄기세포의 분리 및 배양

발생 12.5일 된 nestin-enhancer-GFP 형질전환 생쥐에서 분리한 앞뇌 조직을 DNaseI (10  $\mu$ g/mL)이 포함된 0.25% trypsin 용액 내에서 단일세포로 분리하였다. 분리한 세포는  $1 \times 10^6$  cells/mL의 밀도로 생쥐의 신경줄기세포 배지 (20 ng/mL bFGF, 20 ng/mL EGF,  $1 \times N2$  supplement가 포함된 DMEM : F12 (1 : 1))에서 배양하였고 매 2일마다 새로운 배지로 바꾸어 주었다. 사람의 신경줄기세포의 분리는 임신 10~15주 태아의 뇌막을 제거한 후 대뇌를 분리하여 작게 조각을 내어 HBSS로 씻어냈다. 씻어낸 뇌조직을 DNaseI (10  $\mu$ g/mL)이 포

함된 0.25% trypsin 용액으로 처리하여 단일세포로 분리한 후  $1 \times 10^5$  cells/mL의 밀도로 희석하여 사람의 신경줄기세포 배지 (20 ng/mL bFGF, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL LIF,  $1 \times B27$  supplement가 포함된 neurobasal)에서 매 3일마다 새로운 배지로 교체해 주면서 배양하였다. 신경줄기세포의 계대배양은 7~10일간의 배양을 통해 형성된 신경구를 trypsin 처리하여 단일세포로 분리한 후,  $110 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 가라앉은 세포를 HBSS로 씻어준 후,  $10^5$  cells/mL로 희석하여 계대배양하였다.

### 3. 신경줄기세포 및 뇌조직의 냉동보관

신경구의 냉동보관은 신경구의 직경이 150~200  $\mu$ m 되었을 때, 10% DMSO를 포함하는 배양액 내에서  $-70^\circ\text{C}$ , 16시간 동안 냉동시킨 후, 액체 질소에 2주 이상 보관하였다. 태아 뇌조직의 냉동보관은 뇌조직을 잘게 조각낸 후 신경구와 같은 방법으로 냉동보관하였다. 액체질소에서 냉동된 신경구는  $37^\circ\text{C}$ 의 수조에서 즉시 해동시킨 후 원심분리관으로 옮겨 10 mL의 HBSS를 넣고  $110 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 과정을 2회 반복해서 DMSO를 완전히 제거한 후 위의 방법을 통해 배양하였다. 냉동된 뇌조직은 위와 동일한 방법으로 해동시킨 후 trypsin 처리하여 단일세포를 분리하고 이로부터 신경구 형성을 유도하였다.

### 4. 신경줄기세포 분화 및 면역 형광 염색

직경 100~150  $\mu$ m 크기의 신경구를 poly-L-ornithine (10  $\mu$ g/mL)이 코팅된 커버글라스에 부착시키고, 성장인자가 없는 배지에서 7일간 배양하여 분화를 유도하였다. 부착된 세포를 4% paraformaldehyde로 10분 동안 고정한 후, 비특이적 면역 반응을 없애기 위해 1% bovine serum albumin과 10% horse serum이 포함된 용액으로  $4^\circ\text{C}$ 에서 16시간 처리하였다. 신경줄기세포의 확인을 위해서 anti-nestin (1 : 500)을, 분화된 신경세포의 확인을 위해서는 anti- $\beta$ -tubulin III (1 : 500)를, 별아교세포는 anti-GFAP (1 : 200)를, 희소돌기아교세포는 anti-GalC (1 : 50)를  $4^\circ\text{C}$ 에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 0.03% Triton X-100이 들어 있는 PBS 용액으로 3회 씻어낸 다음 2차 항체로 FITC conjugated anti-mouse IgG (1 : 200)를 실온에서 30분간 반응시켰다. 대조염색으로 세포핵을 Hoechst 33258 (1  $\mu$ g/mL)로 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

### 5. 통계분석

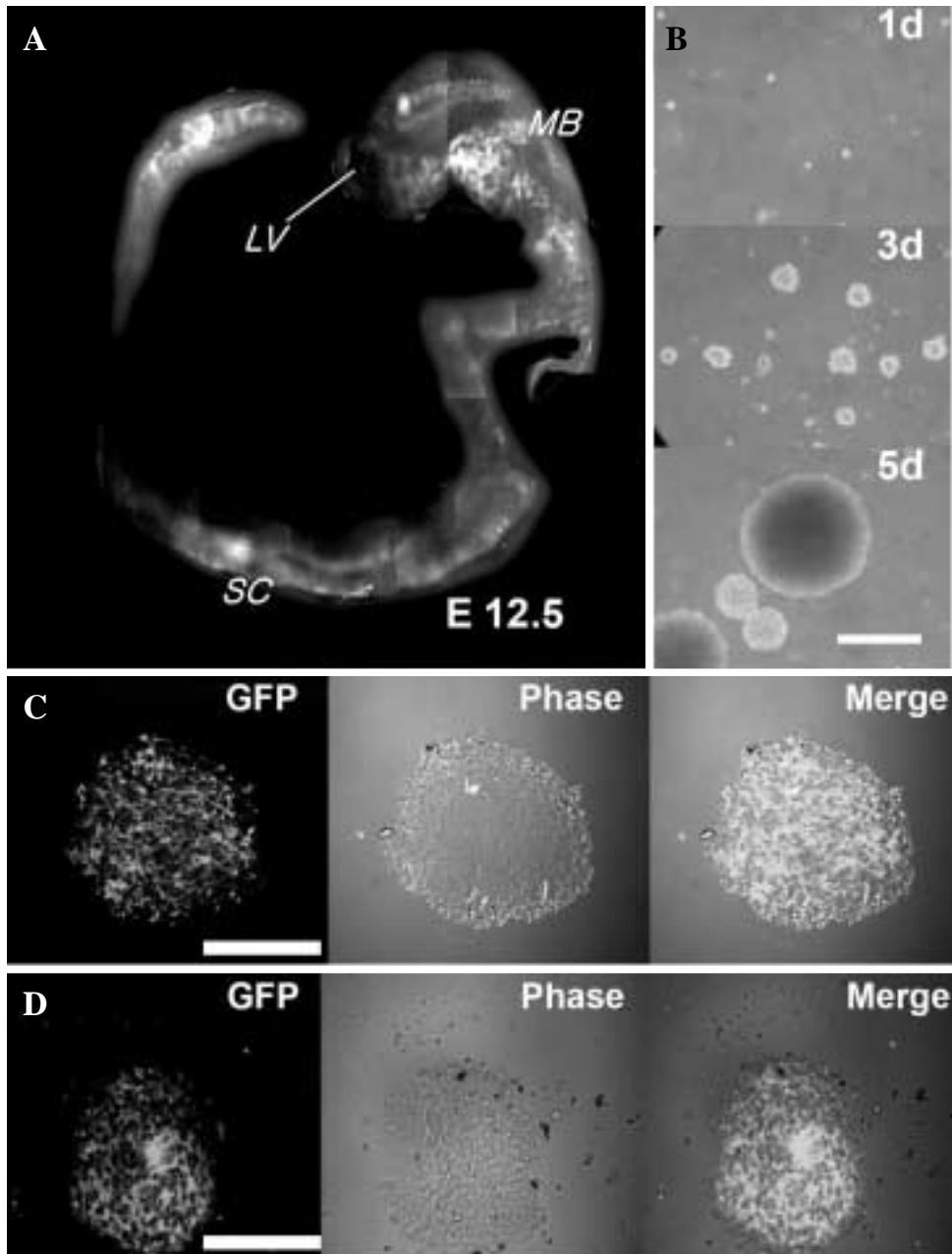
모든 data는 mean  $\pm$  S.E.M으로 표시하였고, 두 실험군간의 차이는 Student's t-test를 이용하여 확인하였다. 통계분석은 SPSS (v10.0)을 이용하였고,  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

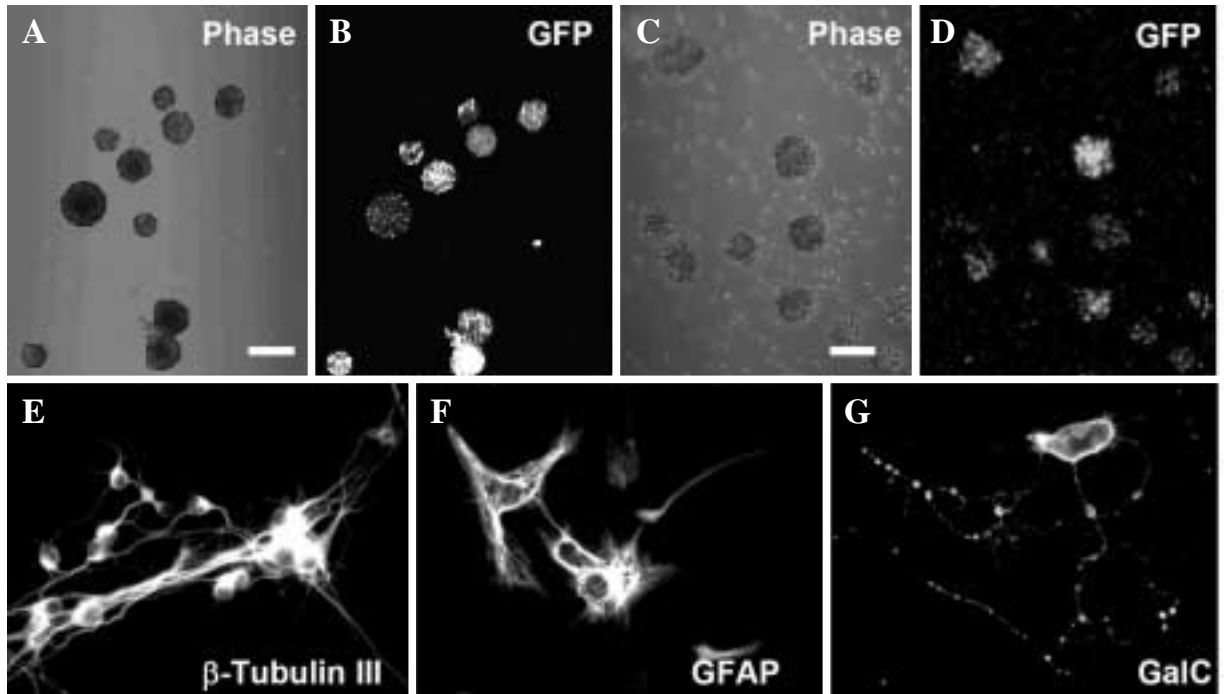
1. 발생 중인 Nestin-enhancer-GFP 형질전환 생쥐로부터 신경줄기세포의 분리

Nestin promoter와 enhancer에 의해 GFP의 발현이 조절되

는 유전자를 가진 형질전환 생쥐의 발생 12.5일째 온조조직표본을 형광현미경으로 관찰한 결과, 신경줄기세포 및 신경전구세포가 주로 분포하는 뇌실구역에서 GFP가 강하게 발현됨을 확인하였다(Fig. 1A). 이 형질전환 생쥐의 앞뇌에서 분리된 신경줄기세포로부터 증식된 신경구(Fig. 1B)는 GFP를 강하게 발현하였으며(Fig. 1C) 이러한 GFP의 발현은 계대배양을 통



**Fig. 1.** Isolation and culture of neural stem cells from nestin-enhancer-GFP transgenic mice. Forebrain cells harvested from E12.5 transgenic mice were cultured in neural stem cell culture medium for 7 days. After the size of neurospheres reached to 100~150 μm in diameter, the cells were harvested with 0.25% trypsin and DNaseI and transferred to fresh plates with 10<sup>5</sup> cells/mL. (A) Whole-mount fluorescent micrograph showing GFP expression throughout the CNS of an E12.5 embryo. (B) Photomicrographs are representatives of neural stem cell cultures isolated from the forebrain of transgenic mice at 1, 3, and 5 days after plating. (C) GFP expression of primary neurosphere and (D) 6<sup>th</sup> neurosphere. MB, midbrain; LV, lateral ventricle; SC, spinal cord. (B-D) Bar, 100 μm.



**Fig. 2.** Cryopreservation of neural stem cells derived from nestin-enhancer-GFP transgenic mice. Primary neurospheres obtained from transgenic mice (A) were cryopreserved with 10% DMSO as cryoprotectant in liquid nitrogen. After 2 weeks of cryopreservation, neurospheres were thawed and plated in the neural stem cell culture medium. Thawed neural stem cells were proliferated and formed neurospheres (C). Fluorescent micrographs showing GFP expression before (B) and after (D) cryopreservation. Cryopreserved neurospheres were differentiated into neural lineage cells by removing growth factors from the culture medium. 7 days after neural induction, the cells were immunostained against anti- $\beta$ -tubulin III antibody (E), anti-GFAP antibody (F), and anti-GalC antibody (G). (Scale bar = 100  $\mu$ m).

해 6번째 형성된 신경구에서도 그대로 유지되었다 (Fig. 1D).

## 2. 형질전환 생쥐에서 유래한 신경줄기세포의 냉동보관

발생 12.5일의 형질전환 생쥐의 앞뇌에서 분리한 신경줄기세포를 신경구 상태로 10% DMSO가 첨가된 조건에서 2주간 액체질소에서 냉동한 후 다시 해동시켰다. 냉동과 해동과정을 통해 신경구는 모두 단일세포로 분리되었으며, 이를 1주일간 배양한 결과 다시 신경구를 형성하였고 이 신경구에서 GFP 발현은 냉동하기 전의 것과 차이가 없었다 (Fig. 2A-D). 냉동보관한 신경구를 구성하는 신경줄기세포의 분화능을 살펴보기 위해 성장인자를 제거하고 1주일간 분화를 유도하였다. 신경세포의 표지자인  $\beta$ -tubulin III 항체, 별아교세포 표지자인 GFAP 항체 및 희소돌기아교세포의 표지자인 GalC 항체를 이용하여 면역형광염색을 시행한 결과, 냉동보관 후에도 신경세포, 별아교세포 및 희소돌기아교세포로 분화할 수 있는 능력이 유지되고 있음을 확인하였다 (Fig. 2E-G).

## 3. 태아의 뇌조직으로부터 신경줄기세포의 분리 및 배양

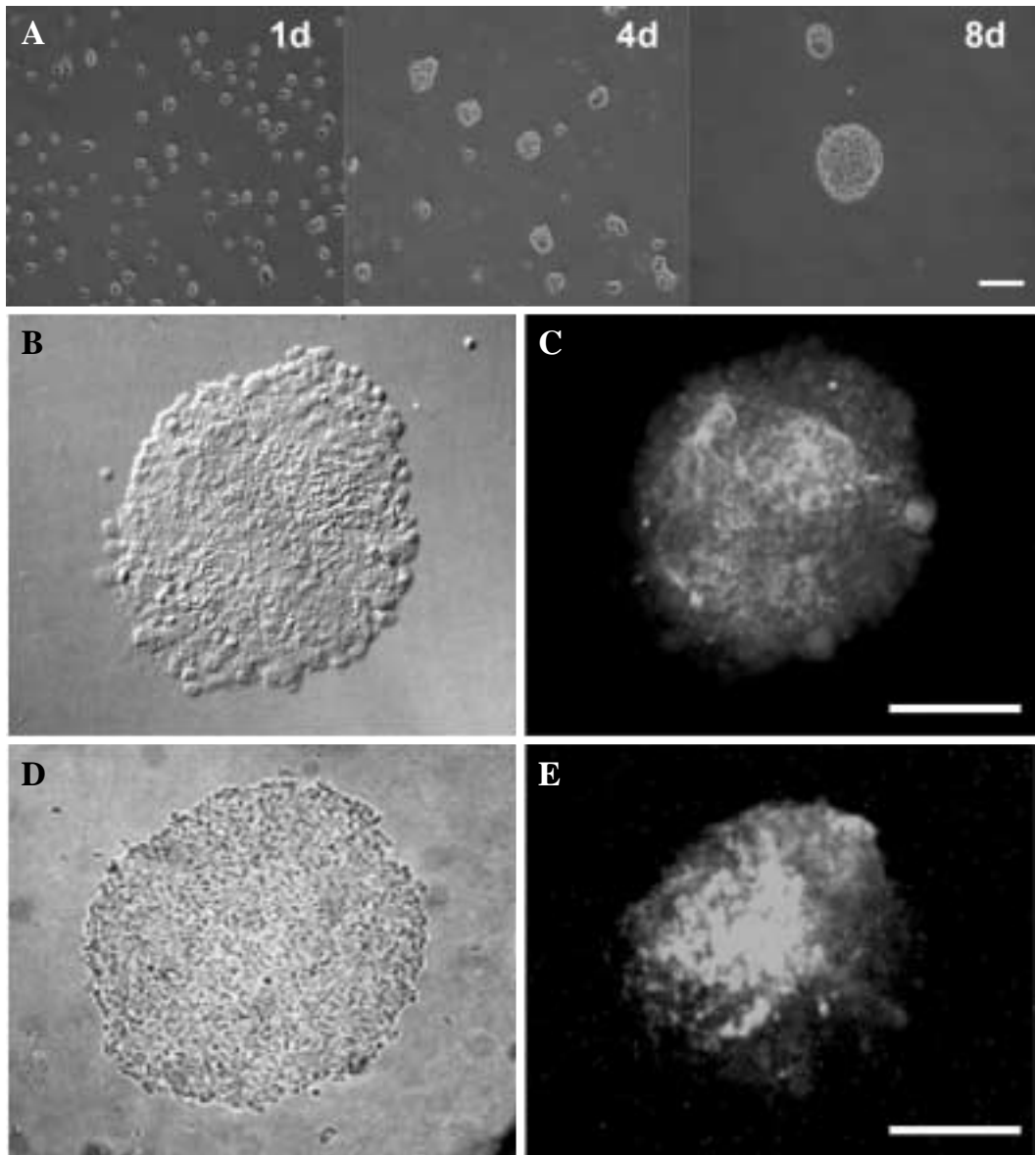
태아의 대뇌에서 분리된 세포를 신경줄기세포 배지에서 7~

10일간 배양하였다. 조직에서 분리된 단일세포는 배양 4일경부터 신경구를 형성하기 시작하여 10일경에는 직경이 약 150~200  $\mu$ m에 이르는 1차 신경구를 형성하였다 (Fig. 3A). 이 신경구를 trypsin과 DNaseI을 처리해 단일세포로 분리한 후 새로운 배양액에서 계대배양하면 배양 후 7~10일 사이에 다시 150~200  $\mu$ m 크기의 2차 신경구를 형성하였다.

## 4. 사람 신경줄기세포의 냉동보관

냉동보관이 신경줄기세포의 분화능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1차 신경구를 액체질소에서 2주간 냉동보관 후 해동시켰다. 냉동된 1차 신경구는 해동과정에서 특별한 처리 없이 모두 단일세포로 분리되었으며, 이 세포들은 배양 7~10일 후 150~200  $\mu$ m 크기의 2차 신경구를 형성하였다. 이 때 형성된 2차 신경구의 수는 냉동하기 전에 형성된 1차 신경구의 수와 차이가 없었다 (data not shown). 냉동보관에 의해 nestin의 발현이 변화되는지를 보기 위해 면역형광염색을 시행한 결과, 냉동 전의 1차 신경구와 냉동 후의 2차 신경구 모두에서 nestin의 발현은 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3B-E).

냉동보관 전후의 신경줄기세포의 분화능력을 살펴보기 위하여 7일간 분화를 유도한 후, 신경세포 및 별아교세포에 대



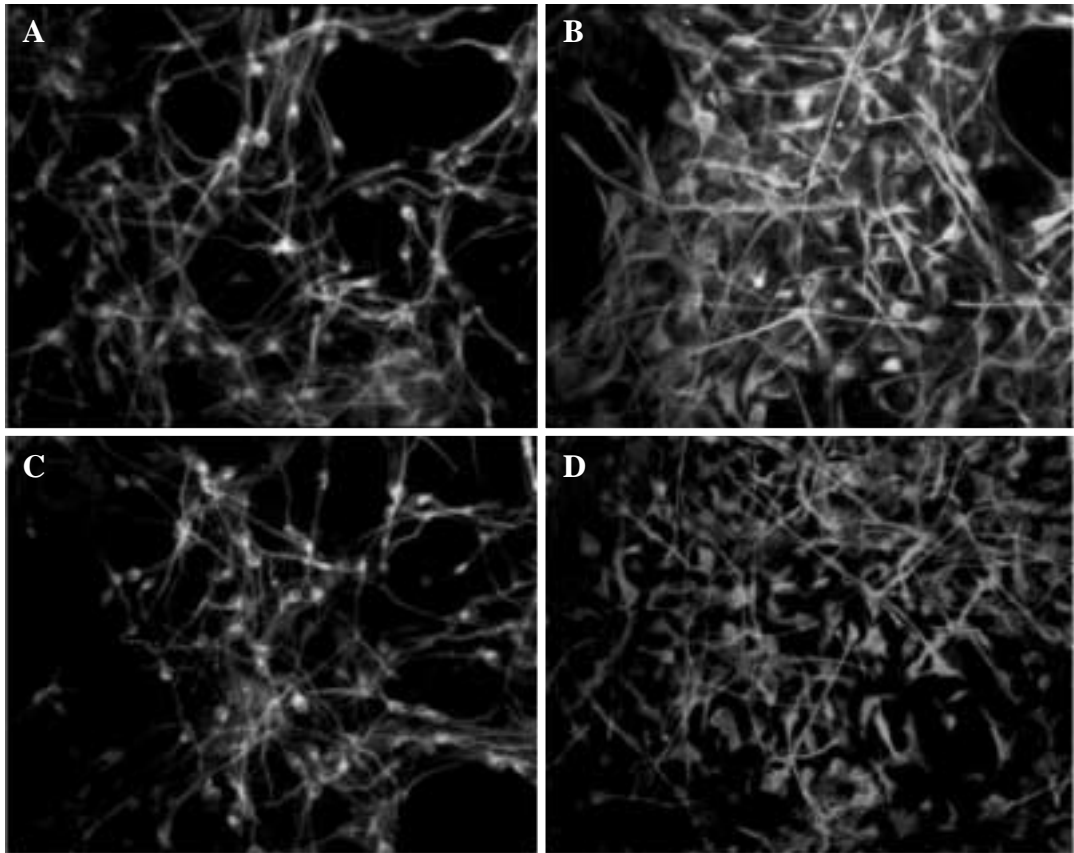
**Fig. 3.** Isolation of neural stem cells from human fetal brain. Single cells isolated from 12 weeks human fetal brain tissue were plated at a density of  $7 \times 10^5$  cells/10 cm dish, and cultured for 10 days in the neural stem cell culture medium. A subset of these cells was divided, proliferated, and formed spheres of undifferentiated cells (A). The expanded neural stem cells were frozen after the addition of DMSO as a cryoprotectant. These cells were thawed after 2 weeks of storage in liquid nitrogen and cultured as described in materials and methods. The neural stem cells derived from cryopreserved neurosphere had the same overall appearance (B) as ones that derived without cryopreservation (D). The vast majority of the cells in these cultures expressed the neural stem cell marker nestin (C, E) (Scale bar = 100  $\mu$ m).

한 면역형광염색을 시행하였다. 신경줄기세포로부터 신경세포 및 별아교세포의 분화 양상은 냉동 전 후를 비교할 때 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A-D).

#### 5. 냉동보관된 뇌조직으로부터 신경줄기세포의 배양

냉동보관된 태아 뇌조직으로부터 신경줄기세포의 분리 가능성을 알아보기 위하여 2주 및 23주 동안 액체질소에 보관

하였던 뇌조직에서 신경줄기세포의 분리, 배양을 시행하였다. 냉동보관된 뇌조직에서도 신경구의 형성을 유도할 수 있었으며(Fig. 5A), 신경줄기세포의 표지자인 nestin의 발현도 뚜렷하였다(Fig. 5B). 또한 이들 신경구는 신경세포와 별아교세포로의 분화능력을 유지함을 확인하였다(Fig. 5C-D). 2주 및 23주 동안 냉동보관된 조직으로부터 분리한 신경줄기세포의 분화 양상을 정량적으로 조사한 결과, 이들로부터 분화된 신경세포와 별아교세포의 수는 냉동보관 기간에 따라 통계적으로



**Fig. 4.** Immunocytochemical identification of differentiated cells. Differentiation potentials of neural stem cells that isolated from fresh tissue or cryopreserved neurospheres were compared. Upon withdrawal of growth factors the neurospheres were differentiated into neural lineage cells. After 7 days of induction, the cells were immunocytochemically stained for a neuronal marker,  $\beta$ -tubulin III (A, C), and an astrocyte marker, GFAP (B, D). Immunostained cells were counterstained with Hoechst 33258. (A, B) Differentiated cells from unfrozen neurosphere, and (C, D) from cryopreserved neurospheres.

의미 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5E).

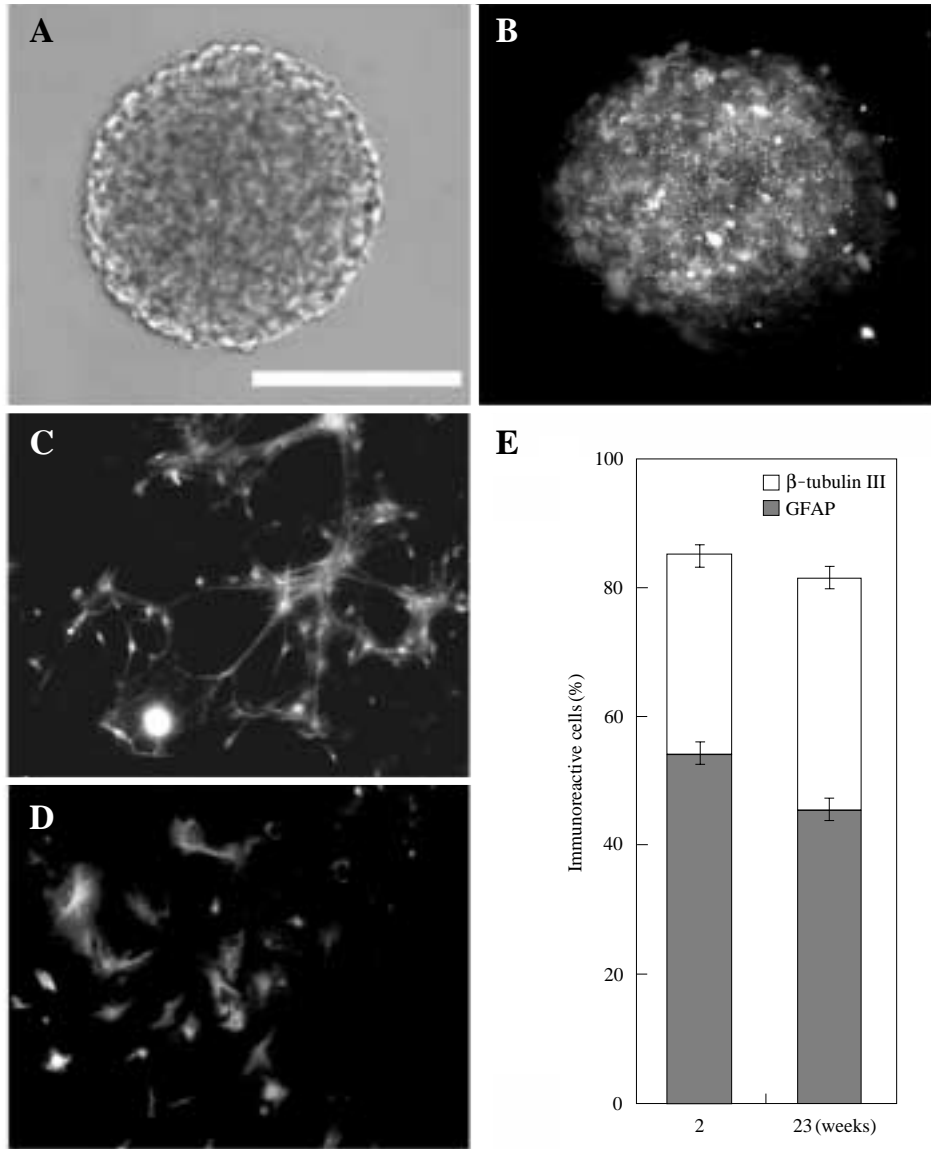
## 고 찰

신경줄기세포는 퇴행성 신경계 질환이나 외상에 따른 신경 손상에 대한 세포치료제로서의 가능성 때문에 최근 매우 활발한 연구가 진행되고 있다. 그러나 세포 치료제로서 신경줄기세포는 뇌조직의 공여자를 구할 수 없고, 치료가 이루어져야 될 시기에 충분한 양의 세포를 빠른 시간 내에 확보하기가 어렵다는 문제점을 갖고 있다. 따라서 앞으로 신경줄기세포가 실제 임상적으로 이용되기 위해서는 신경줄기세포를 분리할 수 있는 뇌조직이나, 신경줄기세포 자체, 즉 신경구를 장기간 보관할 수 있는 기술의 확립이 매우 중요하게 고려되어야 할 과정이다.

신경줄기세포 또는 신경전구세포의 표지자로 알려진 nestin은 제VI형에 속하는 중간세사단백질의 하나로 중추신경계의

발생과정 중 신경줄기세포에서 발현되다가, 신경세포로 분화하면 신경세포로 대체된다. Nestin 유전자는 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있으며, 이 중 첫번째 intron은 근육세포의 발생과정에서, 두번째 intron은 신경발생과정에서 nestin의 발현을 조절하는 enhancer 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(Hockfield *et al.*, 1985; Lendahal *et al.*, 1990; Dahlstrand *et al.*, 1995). 최근 nestin의 두번째 intron의 조절에 의해 GFP가 발현되도록 고안된 형질전환 마우스가 제작되어(Yamaguchi *et al.*, 2000) *in vivo* 또는 *in vitro*에서 신경줄기세포의 거동에 관한 연구에 유용하게 사용되고 있다(Johansson *et al.*, 2002; Murayama *et al.*, 2002). 본 연구에서도 nestin-enhancer-GFP 형질전환 생쥐로부터 신경줄기세포를 분리하기에 앞서 발생 12.5일 된 형질전환 생쥐에서 GFP의 발현을 관찰한 결과, 발생중인 중추신경계에서 특이적으로 GFP가 발현됨을 확인하였다(Fig. 1A).

본 연구에서는 발생 12.5일 된 형질전환 생쥐의 앞뇌로부터 신경줄기세포를 분리, 배양하고, 냉동보관에 따른 줄기세포



**Fig. 5.** Cryopreservation of fetal brain tissue as neural stem source. Fetal brain tissue was cryopreserved for 23 weeks in liquid nitrogen. After cryopreservation, the brain tissues were thawed and dissociated with 0.25% trypsin and DNaseI into single cells. A subset of cells was divided, proliferated, and formed spheres of undifferentiated cells (A), and these neurospheres were immunoreactive for anti-nestin antibody (B). Cryopreserved tissue driven neurospheres were differentiated into neural lineage cells, and their phenotypes were identified with immunostaining against  $\beta$ -tubulin III (C) and GFAP antibody (D). Differentiation potentials of neural stem cells isolated from short term storage (2 weeks) and long-term storage (23 weeks) were compared by immunocytochemical staining (E). Data are shown as the averages  $\pm$  SEM from six independent experiments. (Scale bar = 100  $\mu$ m)

의 성격 및 분화능의 변화를 살펴보았다. 조직에서 분리한 신경줄기세포는 성장인자가 포함된 배지에서 GFP를 발현하는 신경구를 형성하면서 증식되었고 (Fig. 1C), 6번의 계대배양 후에도 신경구에서 GFP의 발현은 지속되었다 (Fig. 1D). 이러한 결과는 nestin을 발현하는 신경줄기세포를 시험관 내에서 신경구 배양법을 통해 계속적으로 증식시킬 수 있다는 보고 (Vescovi *et al.*, 1999)와 일치하는 것이다. 이 신경구를 냉동보관하였을 경우, nestin의 발현 양상의 변화 및 분화능력의 차

이를 살펴보기 위해, 신경줄기세포로부터 처음 형성된 1차 신경구를 10% DMSO가 첨가된 배양액에서 냉동보관하고 2주 후 해동시켜 다시 배양하였다. 그 결과 냉동과정을 거친 후에도 다시 신경구가 형성되었으며, GFP의 발현 양상도 냉동 전의 신경구와 차이가 없었다 (Fig. 2A-D). 또한 냉동보관을 거친 신경줄기세포의 분화를 유도한 결과, 정상적으로 신경세포, 별아교세포 및 희소돌기아교세포로의 분화가 일어남을 확인하였다 (Fig. 2E-G). 이러한 결과는 생쥐의 배아줄기세포에

서 유래한 신경줄기세포의 냉동보관에 따른 분화능의 유지에 관한 보고(Hancock *et al.*, 2000)와 일치하는 결과로, 신경줄기세포를 신경구의 상태로 냉동보관하여도 신경줄기세포의 증식능력 및 분화능력이 계속 유지되고 있음을 나타낸다.

이러한 결과를 바탕으로 사람 태아의 신경줄기세포에서 유래한 신경구에 대해 냉동보관의 가능성을 살펴보았다. 태아의 뇌조직에서 분리한 신경줄기세포는 생쥐의 경우와 마찬가지로 신경구를 형성하면서 활발하게 증식되었으며, 이 신경구는 2주간의 냉동보관을 통해서도 증식능력 및 nestin의 발현 양상은 계속 유지되었다(Fig. 3). 또한 신경세포 및 별아교세포로의 분화능력이 있어서도 냉동보관에 따른 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

이는 사람의 신경줄기세포를 시험관 내에서 대량으로 배양하여, 신경구의 상태로 냉동보관한 후 필요에 따라 녹여 이용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

사람의 신경줄기세포를 얻기 위해서는 산모의 건강을 위한 합법적인 낙태아의 뇌조직이나, 뇌수술 과정에서 얻어지는 일부 조직 또는 사후 공여된 뇌조직을 사용할 수 있다. 대부분의 경우 뇌조직을 냉동보관하기는 쉬우나, 뇌세포 분리를 목적으로 한 외과적 수술이나 공여가 아닌 경우 신경줄기세포를 직접 분리, 배양하기는 힘들다. 뇌조직의 냉동보관에 관한 연구는 흰쥐의 대뇌조직을 동결보관한 후 해동하여 신경세포를 배양하거나(Petite *et al.*, 1995; Negishi *et al.*, 2002), 성인의 뇌조직을 냉동보관하여 성인의 뇌세포를 배양할 수 있다는 보고(Brunet *et al.*, 2003)가 있으나, 사람의 신경줄기세포 또는 태아 뇌조직의 냉동보관에 관한 가능성은 아직까지 알려지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 사람의 신경줄기세포를 신경구의 형태로 냉동보관하는 방법과 함께 냉동보관된 태아의 뇌조직으로부터 신경줄기세포의 배양 가능성 및 보관 기간에 따른 신경줄기세포의 특성 변화를 살펴보았다. 태아 뇌조직의 냉동보관 방법은 대뇌 반구 전체를 얼리는 경우보다 작은 조각으로 잘라 얼리는 경우가 세포생존율이 높다는 보고(Negish *et al.*, 2002)를 참고하여 대뇌조직을 작은 조각으로 냉동보관하였다. 냉동보관된 조직으로부터 배양된 세포는 얼리지 않은 조건(Fig. 3D, E)과 마찬가지로 nestin의 발현이 뚜렷한 신경구를 형성하였고 분화 조건에서 신경세포와 별아교세포로 분화 양상도 차이가 없었다(Fig. 5A-D). 냉동보관 기간에 따라 신경줄기세포의 특성이 변하는지를 보기 위해 2주 및 23주 동안 액체질소에 보관하였던 뇌조직으로부터 신경구의 형성 및 분화 양상을 비교한 결과, 두 경우 모두 정상적으로 신경구를 형성하였고 이들로부터 분화된 신경세포와 별아교세포의 수도 의미 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5E). 이에 관한 조사는 앞으로 더 이루어져야 할 것이나 본 연구의 결과는 신경구 형성을 유도한 후에 냉동시키는 방법보다 좀 더 용이한 조직 상태로 상당히 장기간 냉동보관하여도 분화능력을 그대로

로 갖고 있는 신경세포를 다량으로 얻을 수 있다는 가능성을 보여주는 것이다.

최근 질병 동물모델을 대상으로 신경줄기세포 이식을 통해 신경계질환의 치료가능성이 제시되면서, 신경줄기세포의 응용에 대한 기대가 높아지고 있다. 신경줄기세포는 줄기세포 자체, 또는 특정세포로 분화 유도된 신경세포를 뇌의 손상부위에 직접 이식하는 세포대체요법이나, 특정 유전자가 도입된 줄기세포를 이식하는 유전자 치료법에 그 이용가치가 높을 것으로 예상된다. 본 연구에서 얻어진 결과는 앞으로 신경줄기세포를 이용한 신경계질환 치료법 개발에 필수적으로 요구되는 충분한 양의 세포 확보 방법을 개발하는데 출발점이 될 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Bjorklund A, Lindvall O : Cell replacement therapies for central nervous system disorders, *Nat Neurosci* 3: 537-544, 2000.
- Brunet J-P, Pellerin L, Magistretti P, Villemure J-G : Cryopreservation of human brain tissue allowing timely production of viable adult human brain cells for autologous transplantation, *Cryobiol* 47: 179-183, 2003.
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U : Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system, *Brain Res Dev Brain Res* 84: 109-129, 1995.
- Gage FH : Mammalian neural stem cells, *Science* 287: 1433-1438, 2000.
- Hockfield S, McKay RD : Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system, *J Neurosci* 5: 3310-3328, 1985.
- Johansson CB, Lothian C, Molin M, Okano H, Lendahl U : Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS, *J Neurosci Res* 69: 784-94, 2002.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD : CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein, *Cell* 60: 585-595, 1990.
- Murayama A, Matsuzaki Y, Kawaguchi A, Shimazaki T, Okano H : Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain, *J Neurosci Res* 69: 837-47, 2002.
- Negishi T, Ishii Y, Kawamura S, Kuroda Y, Yoshikawa Y : Cryopreservation of brain tissue for primary culture, *Exp Anim* 51: 383-390, 2002.
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Eteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA : Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb, *Stem Cells* 18: 295-300, 2000.
- Petite D, Calvet M-C : Cryopreserved neuronal cells in long-term cultures of dissociated rat cerebral cortex: survival and morphometric characteristics as revealed by immunocytochemistry, *Brain*



- Res 669: 263-274, 1995.*
- Roy NS, Benraiss A, Wang S, Fraser RA, Goodman R, Couldwell WT, Nedergaard M, Kawaguchi A, Okano H, Goldman SA : Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone, *J Neurosci Res 59: 321-331, 2000a.*
- Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA : In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus, *Nat Med 6: 271-277, 2000b.*
- Svendsen CN, Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T, Caldwell MA : A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells, *J Neurosci Methods 85: 141-152, 1998.*
- Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, Borg MG, Tosser AE, Tyers P, Karmioli S, Dunnett SB : Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of parkinson's disease, *Exp Neurol 148: 135-146, 1997.*
- Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, Poulin P, Ferrario M, Wanke E, Frolichsthal-Schoeller P, Cova L, Arcellana-Panlilio M, Colombo A, Galli R : Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation, *Exp Neurol 156: 71-83, 1999.*
- Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K : Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice, *Neuroreport 11: 1991-1996, 2000.*
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A : Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors, *Neuron 12: 11-24, 1994.*

## — Abstract —

## Establishment of a Method for Cryopreservation of Neural Stem Cells

Kwang Won Kwon<sup>1</sup>, Mi Ran Kim<sup>2</sup>, Haeyoung Suh-Kim<sup>1,3</sup>,  
Young Don Lee<sup>1</sup>, Sung Soo Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, <sup>2</sup>Obstetrics and Gynecology, and  
<sup>3</sup>Brain Disease Research Center, Ajou University, School of Medicine, Suwon, Korea

Neural stem cells are multipotent stem cells that can differentiate into neurons and glial cells. Neural stem cells are found in not only developing nervous system but some restricted regions in adult brain. Here, we presented an effective method that allows a long-term preservation of neural stem cells without losing multipotency.

First, we isolated neural stem cells from the developing forebrain of nestin-EGFP transgenic mice carrying green fluorescence protein (GFP) driven by nestin promoter and enhancer. Primary neurospheres isolated from these mice highly expressed GFP. The expression of GFP in neurospheres was sustained for several passages. In order to investigate the effect of freezing on the stem cell properties, we cryopreserved the primary neurospheres for 2 wks in liquid nitrogen. GFP expression pattern as well as differentiation potential of the secondary neurosphere formed after cryopreservation were not that different from those of the primary neurosphere formed before cryopreservation. When the same cryopreservation method was applied to neural stem cells isolated from human fetal brain (gestation 13~15 wks), the expression of nestin, a stem cell marker, and differentiation patterns were not changed after cryopreservation.

We also performed isolation of neural stem cells from long-term cryopreserved human fetal brain tissues. The neurospheres were successfully formed and showed similar differentiation properties with neurospheres isolated from fresh brain tissue. In addition, we demonstrated multipotentiality of neural stem cells was not changed with the duration of cryopreservation of brain tissue, suggesting the self renewability and multipotentiality of neural stem cells were not affected by long-term cryopreservation. The present results provide an useful information for the development of stem cell expansion which is essential factor in clinical application of stem cells.

**Key words** : Neural stem cells, Neurosphere, Cryopreservation, Cell therapy product