

제대혈 줄기세포 연구의 현재와 미래

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

김 현 옥

Human Umbilical Cord Blood as a Source of Stem Cell Based Therapy : Current Practice and Future Prospects

Hyun Ok Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

21세기 생명공학의 최종 목표는 “삶의 질 향상”에 있으며 특히 생명공학분야는 인류의 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책을 제시하고 있다. 이런 면에서 최근 크게 각광받고 있는 줄기세포(stem cell)란 아직 운명이 결정되지 않은 미숙한 세포로 특수한 성장인자의 작용으로 인체를 구성하는 신경세포, 간세포, 뼈, 혈관 등 각 장기를 이루는 세포로 분화할 수 있는 “만능 세포”로 불리며 난치병 치료의 열쇠로 알려져 있다. 따라서 줄기세포의 순수분리와 배양기술은 불치병 치료의 새로운 패러다임이며 줄기세포 연구를 통한 난치성 질환 치료는 생명공학분야에서 가장 각광받는 분야이다. 또한 각 나라마다 줄기세포 연구를 원천기술 확보 차원에서 집중적으로 지원하고 있기 때문에 이런 줄기세포를 이용한 세포 대체 치료요법의 응용은 무궁무진하다 하겠다.

줄기세포는 크게 인간의 배아줄기세포와 성체줄기세포로 구분된다. 그러나 배아줄기세포는 의학적인 활용도는 크지만 사람으로 성장할 수 있는 배이를 파괴해야 얻을 수 있다는 점에서 생명윤리 논쟁이 빚어지고 있다. 이에 반해 성체줄기세포는 줄기세포의 성질을 쉽게 상실한다는 단점이 있으나 생명윤리 논쟁을 피할 수 있어 줄기세포를 이용한 새로운 치료의 최적 대안으로

떠오르고 있다.

성체줄기세포는 출산시에 나오는 탯줄 혈액인 제대혈과 성인의 골수에서 얻는 농축 골수액에 포함되어 있다. 특히 제대혈이나 골수로부터는 혈액이 되기 전단계의 줄기세포인 조혈모세포를 다량 얻을 수 있다. 즉 조혈모세포원으로 골수, 말초혈액 및 제대혈이 이용되고 있으며, 골수조혈모세포를 질병의 치료에 이용한 것은 우리가 흔히 이야기하는 골수이식으로 백혈병환자에서 비교적 환자의 특성과 비슷한 건강한 사람의 골수조혈모세포 이식을 성공리에 실현하게 됨으로써 처음 의료에 도입되었다. 이후 조혈모세포가 분화됨에 따라 여러 형태의 세포로 변할 수 있는 성질이 알려지면서 환자 자신의 조혈모세포를 이용한 질병치료의 가능성은 신체가 면역반응으로 저항을 일으키지 않는다는 장점도 있고 무엇보다도 생명존중의 원리와 충돌하는 부담도 없어 최근 들어 각광받게 되었다.

제대혈을 이용한 연구개발의 필요성

제대혈은 제대(umbilical cord)와 태반(placenta)으로부터 얻는 혈액으로 골수와 말초혈액에 이어 조혈모세포의 또 다른 공급원이다(Table 1). 현재 실용화되어 있는 줄기세포치료법의 대표적인 것은 골수조혈모세포 이식술이며 제대혈내의 줄기세포를 이용한 연구는 1988년에 Faconi 빈혈 오빠에게 여동생의 제대혈을 이식하여 혈연간 제대혈 이식이 성공한 이후 소아에서

주관책임자 : 김현옥, 120-752, 서울시 서대문구 신촌동 132 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
전화 : (02) 361-5864-전송 : (02) 313-0956
E-mail : hyunok1019@yumc.yonsei.ac.kr

Table 1. 조혈모세포의 출처

골수	전통적인 조혈모세포의 출처 수혈자 체중 kg당 10~15 mL (최종 유핵세포 양 1~4x10 ⁸ /kg에 해당)의 채집시 전신 또는 국소 마취를 위해 수술실을 필요로 함. 부작용(마취 부작용, 국소 신경병, 통증 또는 국소 감염 등)의 발생율이 매우 낮음. 상대적으로 T 세포의 오염이 적음. 주로 동종 이식에 이용
말초혈액	화학요법, 조혈성장인자 처리 또는 두 방법을 병행하여 조혈모세포를 혈액으로 이동시키고, 평균 1~3회의 성분채집 과정이 필요(최종 투여량은 환자 체중 kg 당 2x10 ⁶ CD34 양성 세포) 부작용(catheter 혈전증, 감염, 혈소판 감소증, 저칼슘혈증, 저혈압, 성장인자에 의한 부작용 등)의 발생율이 매우 낮음 자가이식의 경우 종양세포의 오염이 골수보다 낮고 착상이 빠르게 진행되므로 자가이식에 주로 시행됨 동종 이식의 가능성 증가
제대혈	출산 직후 태반으로부터 척출(50~200 mL) 이식시 유핵세포(median 2x10 ⁷ /kg), CD34 양성세포(median 2x10 ⁵ /kg) 신생아의 장래를 위해 또는 HLA-형질 분석 후 다른 환자를 위해 냉동 장기 보존

▶ 혈장줄기	당뇨병		
▶ 신경줄기	뇌종양	척수손상	
	파킨스씨병	간질	알츠하이머병
▶ 골수간엽줄기	골형성이상		
	척수마비	근육퇴행질환	인공뼈, 연골
	골다공증		
▶ 조혈모세포	심근경색증	급·만성 백혈병	각종대사성유전질환
골수, 제대혈	자가면역질환	악성종양치료 중 골수 재생	
말초혈액	선천, 후천성 면역결핍		재생불량성빈혈 등 혈액질환
	장기이식을 위한 면역관용유도(미니이식)		
	혈관폐쇄증후군	간질환	종양의 면역치료
	신장질환		

시도단계
 동물실험단계
 임상실험단계

Fig. 1. 세포치료 적용가능 분야.

혈연간 및 비혈연간 조혈모세포 이식이 이루어지고 있다.¹ 현재까지 전세계적으로 3,500에 이상 제대혈이식이 이루어졌고² 국내에서도 2003년 총 47예의 제대혈 이식을 포함하여 지금까지 11개의 이식센터에서 총 100예의 제대혈 이식이 시행되었다.^{3,4} 즉 제대혈 내에는 말초혈액이나 골수와 비교하여 증식력이 뛰어난 조혈모세포가 많이 포함되어 있는 것으로 확인되었고 제대혈 줄기세포에서 다양한 조직으로 분화가 가능성이 증명되면서 제대혈은 조직 재생 및 백신 치료의 새로운 조혈모세포원으로 각광받기 시작하였다.⁵ 그러나 제대

혈은 과거에는 버려지는 분만의 부산물로서 쉽게 얻을 수 있다는 장점은 있으나 그 안에 포함된 성체 줄기세포 수가 워낙 적기 때문에 치료에 필요한 충분한 양의 세포를 얻기 위해 체외 증폭 과정이 필요하며 또한 이 과정 중 조혈줄기세포의 다분화능을 유지시킬 수 있는 방법이 개발될 필요가 있다. 따라서 제대혈 이식은 조혈모세포 이식술의 역사에 괄목할만한 발달을 가져온 주역이 되고 있으나 아직까지 제대혈내의 줄기세포를 이용한 난치성 질환 치료의 가능성을 확인하기 위한 연구는 실험단계이며, 가능성을 확인하는 정도에 그치고

있는 실정이다(Fig. 1).

제대혈을 이용한 다양한 임상적 연구분야

1. 제대혈 조혈모세포의 생체의 증폭 배양

제대혈은 1회 얻을 수 있는 최대량이 50~200 mL로 한정되어 있으며, 다량의 줄기세포가 포함되어 있다고 예상은 할 수 있지만 치료적 효과를 얻기 위해서는 대량 생산기술의 확립이 선행되어야 한다.⁶ 즉 조혈모세포를 체외에서 증폭할 수 있는 능력은 치료부문에 있어 폭 넓은 가능성을 제시한다. 첫번째 목표는 장기적으로 골수의 기능을 재생할 수 있는 조혈모세포의 수를 증폭하는 것이다. 두 번째 목표는 항암 화학요법 치료 또는 방사선 치료 후 빠른 말초혈액 세포 수치의 회복을 촉진할 수 있는 다계열 또는 단일 계열 전속 전구세포군(progenitor cells)을 증폭하는 것이며 셋째로 세포치료용으로 사용하기 위해서는 이식에 필요한 충분한 양의 조혈모세포를 대량 생산할 수 있도록 하는 것이다. 조혈모세포의 증식 기술이 확립된다면 현재 제대혈을 이용한 조혈모세포 이식이 소아 외에도 성인에서 가능하고 그 외 다른 세포로의 분화유도를 위해서도 좀 더 쉽게 적용 가능해 질 수 있다. 여러 가지 배양기술의 연구로 유핵세포를 400배까지 증폭하여 생체배양을 할 수 있으나 이 세포들의 이식효과는 아직 증명되지 못하고 있으며 아직까지는 생착율을 증가시켰다는 증거 또한 없다.⁷ 조혈모세포의 생체의 증폭배양에서 가장 중요한 것은 분화하는 과정 중 “Stemness”를 유지하는 것으로 세포분화를 억제시켜 조혈모세포의 증식을 촉진시키는 세포배양법과 골수의 미세환경을 조성함으로써 좀 더 양질의 줄기세포를 대량 생산하는 방법들이 연구, 개발 중이다.⁸

2. 신경세포로의 분화유도

인간의 태반에서 추출한 제대혈 단핵구내에 풍부하게 존재하는 모세포로부터 신경세포로의 분화가능성을 확인하기 위하여 neurofilament, nestin, microtubule associate protein 2 (MAP2), glial fibrillary acidic protein (GFAP)과 같은 각종 신경세포 표지자들의 발현유무를 면역염색과 RT-PCR 방법을 이용

하여 확인하였다. 신선 제대혈 단핵구내에 신경모세포 표지자인 nestin 양성 세포의 92%가 CD133에 동시에 양성인 모세포임을 확인하였다. 신경세포로 분화를 유도하기 위하여 β -mercaptoethanol을 처리하였을 때 neurofilament, nestin, NeuN, MAP2, GFAP와 같은 신경세포 및 교세포 표지자가 발현되었으며 형태학적으로 신경세포와 유사한 세포돌기를 분지하는 세포로 분화를 확인할 수 있었다. 즉 본 연구를 통하여 인간 제대혈내에 신경세포로의 분화가 가능한 모세포의 존재가능성을 확인할 수 있었다.⁹

3. 혈구세포로의 분화유도

적혈구는 임상적으로 가장 많이 사용되는 혈액제제로서 적혈구제제의 새로운 세포원 개발은 수혈에서의 획기적인 개선을 갖고 올 수 있다. 따라서 조혈모세포는 혈구세포의 모세포이므로 CD34+로 분리한 조혈모세포를 체외에서 증폭시킨 후 사이토카인의 자극을 통해 적혈구로 분화시키는 연구가 보고되었다. 정상 분만 후에 얻어지는 제대혈에서 CD34+ 양성세포를 분리하며 단계별 세분화된 조건에서 배양을 진행하였다. 배양 초기에는 조혈모세포의 증식을 촉진, 유지하는 단계로 Stem cell factor (SCF), Thrombopoietin (Tpo), Flt-3 ligand (Flt-3) 등의 성장촉진인자가 첨가된 배지에서 배양을 진행하였으며 후반에는 적혈구의 분화를 촉진하기 위해 Erythropoietin (Epo)가 포함된 배지에서 배양을 시행하였다. 세포의 증식과 분화를 알아보기 위해 배양 기간동안 정기적으로 세포수를 측정하고 현미경으로 배양된 혈구세포의 모양을 관찰하였다. 배양 초기에는 CD34가 가장 dominant한 표지자였지만 후반의 erythropoietin 자극을 통해 glycoporphin A나 transferrin receptor인 CD71 등을 측정하여 적혈구의 분화여부를 판단할 수 있었다.¹⁰

4. 제대혈에서 내피기원 세포 분리 및 배양을 통한 분화유도

제대혈로부터 CD34+ 세포를 분리하여 vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 fibroblast growth factor-basic (FGF-b)을 포함한 여러 가지 사이토카인, 특히

thrombopoietin (TPO)이 내피기원세포 증식에 미치는 효과를 관찰하였고, 체외 배양을 시도하였다.

제대혈에서 분리된 CD34+ 세포는 총 단핵구의 평균 0.32%이었고 순수도는 평균 84.04%이었다. CD34 양성이면서 CD38 음성인 원시조혈모세포는 단핵구 중 0.05%, CD34 양성 세포 중 7.44%였으며, AC133과 Flk-1/KDR이 모두 양성인 내피기원세포는 단핵구 중 0.15%, CD34 양성 세포 중 1.73%이었다. CD34 양성 세포에 다양한 조합의 사이토카인을 첨가하여 배양한 결과, 기본 조합인 VEGF, IL-1 β , FGF-b에 stem cell factor와 flt3-ligand 및 TPO를 모두 첨가하였을 때 부유 세포 및 부착 세포수가 가장 많이 증가되었으며, 다른 사이토카인이 모두 존재하는 상태에서 TPO를 첨가하였을 때의 부유 및 부착 세포수가 TPO를 첨가하지 않았을 때보다 통계적으로 유의하게 높게 나타나 TPO가 내피기원세포에서 내피세포로의 분화에 직접적으로 기여하는 것으로 생각되었다($p < 0.05$, Wilcoxon rank sum test). CD34+ 세포로부터 4주간 배양된 부착 세포의 표지자 분석 결과 내피세포 특이표지자인 KDR과 CD31 및 CD62E는 발현되었으나 CD34와 CD117 및 CXCR4는 거의 발현되지 않아 적절한 사이토카인 종류 및 조합에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각되었다. 그러나 배양 과정에서 내피세포의 특징인 cord like structure 및 cobblestone 모양을 관찰함으로써, 배양된 부착 세포가 내피세포임을 확인할 수 있었다.¹¹

5. 수지상 세포로의 분화유도

수지상 세포는 현재까지 알려진 가장 강력한 면역세포로서 항원특이 면역반응을 유도하거나 수지상 세포의 특성을 강화하여 임상에 활용할 수 있는 세포치료제들이 개발되고 있으며, 주로 진행성 암이나, 감염성 질환 등에 많은 연구가 진행되고 있다. 수지상 세포는 말초 혈액에서 단핵구 계열을 분리하여 분화시키는 방법이 가장 많이 이용되고 있으나 조혈줄기세포를 이용한 수지상 돌기세포의 분화 유도 또한 최근 조혈모세포의 자기 갱신 능력과 체외 증폭방법이 소개되면서 수지상 돌기세포의 유도도 많이 보고되고 있다.¹² 제대혈을 이용한 수지상세포의 분화 유도의 장점은 ① 제대혈은 쉽

게 구할 수 있으며 ② 제대혈 은행을 통해 환자와 HLA가 동일한 제대혈을 찾을 가능성으로 맞춤형요가 가능할 수 있어 제대혈을 이용한 수지상 세포의 임상적 용이 확대될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 제대혈 조혈모세포를 이용한 미성숙 수지상 세포의 분화유도의 임상적 의의는 이미 질환에 이환된 자가세포로 수지상 세포로 유도하여 치료 백신으로 사용하는 것 보다는 건강한 세포로부터의 수지상 세포의 적용이 더 효용이 높을 것으로 예상된다. 따라서 제대혈내의 줄기세포의 양적인 면을 극복하기 위해 일차적으로 제대혈유래 조혈줄기세포를 1주, 2주, 3주, 4주 체외증폭한 후 이를 미성숙 수지상 세포로 분화시키고 이를 활성화한 후 기능이 강화된 수지상 세포를 생산하였다. 수지상 세포의 기능적 활성을 확인하기 위해 CMV 바이러스에 감염된 fibroblast에 대한 cytotoxicity test를 증명함으로써 제대혈내의 CD34+ 세포를 이용한 수지상 세포로의 분화를 유도할 수 있었다.¹³

6. Hepatic progenitor cell의 분화 유도

제대혈로부터 조혈모세포와 중간엽줄기세포의 분화유도와는 달리 간세포(hepatic cell)는 내배엽의 성격을 갖고 있기 때문에 제대혈내의 줄기세포로부터 간세포의 전구세포를 배양한다는 것은 아직 확실하게 성공하지는 못하고 있다. 그러나 최근 Kakinuma 등은 제대혈로부터 유핵세포를 분리한 후 human hepatocyte growth factor를 첨가한 배지에서 albumin을 생산하고 간세포의 표지자를 발현하는 간 전구세포로 분화를 유도한 연구 결과를 발표하였다.¹⁴

결 론

제대혈을 이용한 줄기세포에 대한 국내의 연구동향은 첫째 제대혈 유래 조혈줄기 세포의 배양 및 증폭기술은 도입단계이고, 둘째로 국내 제대혈은행은 공익사업의 차원에서 운영되고 있지 못하며, 셋째로 국내 조혈줄기세포의 정성적 분류기술은 미흡함으로 요약된다. 그러나 제대혈의 생물학적 특성과 이식의 임상적 문제점 및 제대혈 보관방법까지 모든 분야에서 연구와 개발이 빠르게 발전하고 있으므로 제대혈이식을 통한 환자의 치

료성적으로는 획기적 향상이 기대된다. 그러나 제대혈내의 줄기세포에 의한 조직분화성에 대한 연구는 아직까지 규명된 바는 많지 않지만 많은 연구자들에 의해 생체외 배양, 특정 조직의로의 분화 유도에 방향으로 연구가 진행될 것으로 생각된다.

줄기세포를 실제로 치료목적으로 이용하려면 줄기세포를 분리한 다음 일정기간 동안 분화하지 않는 상태를 유지하는 기술이 필요하다. 또 필요한 때 특정한 기능을 하는 세포로 바꾸려면 해당 유전자만 활성화하도록 특정한 단백질과 효소를 통해 조작해야 한다. 이 과정은 유전체 및 단백질 연구와 밀접하게 연관되어 있다. 미국국립보건원 원장이었던 헤럴드 바머스 박사는 이 과정이 원활히 이뤄지려면 최소 10년은 걸릴 것이라고 예상하였다. 국내에서는 혈액중양질환 외에 제대혈을 이용한 세포치료의 임상적 적용은 아직 보고된 바 없다. 줄기세포를 이용하여 고장난 신체의 일부만 새것으로 바꾼다는 것은 꿈의 의료시대임에는 틀림없다. 그러나 우리 과학계는 이를 임상에 적용하기에는 아직도 넘어야 할 많은 장애가 있다는 것도 인식하고 있어야 한다.

참 고 문 헌

- 1) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.* 2001 ; 344 : 1870-1.
- 2) Grewall SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003 ; 101 : 4233-44.
- 3) 구홍희. 제대혈 조혈모세포이식 - 과거, 현재 그리고 미래. *대한수혈학회지* 2004 ; 15 : 83-8
- 4) Lee YH, Kook H, Koo HW, Kim YJ, Kim HO, Shin HY, et al. Current and future of cord blood banking and transplantation in Korea. *The 8th*

Tokyo International Symposium in Cord Blood Transplantation; 2004. p8.

- 5) Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol* 2002 ; 13 : 160-4.
- 6) Devine SM, Lazarus HM, Emerson SG. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplantation* 2003 ; 31 : 241-52.
- 7) Wagner JR, Verfaillie CM. Ex vivo expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 2004 ; 32 : 412-3.
- 8) Kim HS, Lim JB, Min YH, Lee ST, Lyu CJ, Kim ES, et al. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ cells in a collagen bead-containing 3-D culture system. *Int J Hematol* 2003 ; 78 : 126-32.
- 9) Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, et al. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. *Neuro Report* 2001 ; 12 : 3523-7.
- 10) Neildez-Nguyen TM, Wajeman H, Carden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, Kobari L, Thierry D, Douay L, Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nature Biotechnology* 2002 ; 20 : 467-71.
- 11) Shin JW, Lee D, Kim MJ, Song KS, Kim H, Kim HO. Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion. *Yonsei Med J* in submission.
- 12) Bontkes HJ, Gruijl TD, Schurhuis GJ, Scheper RJ, Meijer CJLM, Hooijberg E. Expansion of dendritic cell precursors from human CD34+ progenitor cells isolated from healthy donor blood; Growth factor combination determines proliferation rate and functional outcome. *J Leukoc Bio* 2002 ; 72 : 321-8.
- 13) Kim HO. Expansion and differentiation of dendritic cells in clinical scale from human cord CD34+ progenitor cells. *Yonsei Biomedical Symposium*; 2004. p24-8.
- 14) Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Satto K, Hara Y, et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003 ; 21 : 217-27.