

생분해성 고분자 담체를 이용한 태아 간세포의 이식

¹곽 소 정 · ²최 동 호 · ³백 승 삼 · ⁴김 상 수 · ⁴최 차 용 · † ¹김 병 수

¹한양대학교 공과대학 응용화학공학부, ²순천향대학교 의과대학 외과학교실

³한양대학교 의과대학 병리학교실, ⁴서울대학교 생물화학공학 협동과정

(접수 : 2004. 2. 27., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Implantation of Fetal Hepatocytes on Biodegradable Polymer Scaffolds

So-Jung Gwak¹, Dongho Choi², Seung Sam Paik³, Sang-Soo Kim⁴, Cha Yong Choi⁴, and Byung-Soo Kim^{1†}

¹Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Hanyang University, Seoul 133-759, Korea

²Department of surgery, College of Medicine, Soonchunhyang University, Seoul 420-767, Korea

³Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-759, Korea

⁴Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology,

Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received : 2004. 2. 27., Accepted : 2004. 6. 24.)

Whole liver transplantation, the currently available treatment of end-stage liver disease, has limitations including serious donor shortage, fatal surgical complications, risk of allograft rejection, and the requirement of life-long immunosuppression. In this study, we investigated the possibility of reconstructing liver tissues *in vivo* by implanting fetal hepatocytes on polymer scaffolds as a potential method to replace the current treatments. Fetal hepatocytes were freshly isolated from mice and seeded onto porous mesh scaffolds fabricated from polyglycolic acid, a biodegradable synthetic polymer. The seeded scaffolds were implanted into peritoneal cavity of athymic mice for one week. As a control, fetal hepatocytes were implanted without scaffold. One week after transplantation, liver-like tissues formed. Histological and immunohistochemical analyses indicated that the hepatocytes and liver tissue structures (bile ducts) were present in the newly formed tissues. In the control group, no transplanted hepatocytes were observed. These preliminary results suggest that liver tissues may be regeneration by transplanting fetal hepatocytes on polymer scaffolds.

Key Words : Fetal hepatocyte, polyglycolic acid, polymer scaffold, bile duct, liver

서 론

간은 생체 내에서 가장 대사활동이 활발하고 복잡한 기능을 가지고 있는 장기이다. 또한 체내에 들어오는 독성물질을 해독하고, 인체에 필요한 단백질의 합성 및 장으로부터 유입된 병원소의 여과와 면역학적인 역할을 수행하는 중요한 기관이다. 일반적으로 손상된 간조직은 스스로 재생할 수 있는 능력을 가지 있지만, 선천적인 간질환이나, 말기 간질환의 경우 자

가 재생능력이 떨어지므로 그 치료를 위해 간이식이 필요하다. 최근 몇 십 년 동안 면역학과 장기 이식술의 발전으로 말기 간질환에서 많은 간이식술이 시행되고 있으며 현재 선천성 혹은 후천성 말기 간질환의 유일한 치료법으로써 간 이식술을 이용하고 있다(1). 그러나 간 이식술은 공여간의 절대적인 부족과 심각한 합병증에 대한 문제와 평생에 걸친 면역억제제의 투여 등의 많은 단점을 가지고 있다(2). 최근에는 생체 간이식 및 분할 간이식술 등이 개발되어서 공여간 부족에 대한 문제는 해결하였지만 여전히 장기이식에서 공여자의 부족은 미해결 상태이다(3). 이런 점에서 말기 간질환 환자의 새로운 치료법으로써 간세포를 이용한 이식이 활발히 연구되고 있다.

간세포를 이용한 간 질환의 치료법은 간이식에 대한 문제점을 해결하기 위해서 활발히 연구되고 있다(4, 5). 간세포 이식은 간 이식술에 비해서 비교적 간단하고, 반복 시술할 수 있는

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
College of Engineering, Hanyang University, Seoul 133-759,
Korea

Tel : +82-2-2290-0491, Fax : +82-2-2298-4101

E-mail : bskim@hanyang.ac.kr

장점을 가지고 있다. 또한 기존의 간이식에 비해서 합병증이 적다. 또한 자신의 간세포를 이용할 경우 면역억제제의 사용을 피하고 유전으로 인한 선천성 간질환의 유전자 치료를 가능하게 할 수 있다. 간세포를 복강에 이식하는 경우는 시술이 아주 간단하고, 넓은 공간을 활용할 수 있어서 많은 양의 세포를 이식시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 일반적으로 복강 내에 간세포만을 이식한 경우에는 광범위한 세포 괴사나, 세포유실이 일어나는 등 조직재생에 한계가 있었다(6). 세포유실과 세포의 괴사를 막기 위하여 간세포를 단독으로 이식하는 것보다 여러 가지 생분해성 matrix를 이용한 간세포 이식에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 간세포 이식의 초기에 비분해성 미립자에 부착된 간세포를 복강 내 이식하여 경우 장기간 생존을 확인하였다(7). 그러나 비분해성 matrix를 이용할 때 발생하는 면역거부반응 때문에, 생분해성인 스폰지 형태의 matrix나 collagen gel을 이용한 연구가 진행되었다. 이렇게 많은 간세포이식 연구에도 불구하고 세포에 대한 면역 반응이나 이식된 세포의 생존율과 기능적인 면에서 주목할 만한 성과를 보이지 못하는 실정이다.

본 연구에서는 조직공학적인 대안으로 생분해성 고분자 담체인 PGA를 이용하여 태아의 간세포를 이식하여 간조직 재생의 가능성을 알아보았다. 만약, 간세포 이식에 의하여 간조직 재생이 가능하다면, 이 방법은 더욱 많은 연구를 거친 후, 문제점을 가진 현재의 간치료 방법을 대체할 수 있는 새로운 치료법이 될 수도 있을 것이다.

재료 및 방법

동물

임신 후 16일 된 FVB 마우스 태아를 간세포 이식의 공여자로 이용하였고 5주된 면역결핍 마우스 (SLC, Tokyo, Japan)를 수혜자로 사용하였다. 사육온도는 20°C에서 24°C, 습도는 50-60%로 유지하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 12시간 암명주기로 사육하였다.

간세포의 분리

무균상태에서, 임신 후 16일된 FVB 마우스 태아의 간을 분리하였다. 분리된 간을 차갑게 유지하며 Williams' medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 충분히 씻어 주변의 이물질을 제거하고, pipeting을 통하여 분리된 간을 잘게 조각 내었다. 100 μ m의 체를 이용하여 간 조각을 잘게 간 후에, 여과액을 원심분리하여 태아 간세포를 얻었다.

이식

간세포를 부착하고 이식하기 위해서 삼차원적인 담체로서 생분해성 고분자인 폴리글리콜산 (polyglycolic acid, PGA, Albati International Research, USA) 섬유 부직포의 다공성 매트릭스를 사용하였다. 고분자 담체는 5 × 5 mm²의 크기로 잘라서, ethylene oxide gas로 멸균시킨 뒤, 사용하기 하루 전에 10% 소태아 혈청이 들어있는 DMEM/F12 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)배지에 담가두었다. PGA 담체에서 배지를 제거한 뒤, 분리한 간세포를 담체에 부착시켰다. 간세포를 부착

한 PGA담체를 면역결핍 마우스의 복강에 이식하였다. 간세포의 부착을 확인하기 위하여 이식 전에 주사전자현미경 (SEM, Hitachi, Tokyo, Japan)검사를 실시하였다. 대조군으로는 간세포만 면역결핍 마우스의 복강에 이식하였다.

조직학 검사

이식 후 1주에 이식편을 회수하여 조직학 검사를 실시하였다. 회수된 조직을 10% formalin (Sigma, St. Louis, MO, USA)용액에 24시간 고정하고 파라핀에 포매하여 블록을 만든 후, 4 μ m의 박편을 제조하여 헤마토실린&에오신 (H&E) 염색을 실시하였다. 이식한 간세포를 확인하기 위해서 alpha-fetoprotein염색을 실시하였다.

결 과

이식된 간세포의 부착확인

간세포의 이식 전 간세포가 부착되지 않은 PGA 담체 (Fig. 1A)와 간세포가 부착된 PGA 담체 (Fig. 1B)의 주사 전자 현미경 검사를 실시하였다. PGA 담체의 주사전자현미경 검사결과 세포 등이 부착할 수 있는 공간을 가지며 서로 얽혀져 있는 섬유들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A). 간세포가 부착된 PGA 담체의 주사 전자 현미경결과 PGA 담체에 간세포가 정상적으로 부착되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2B).

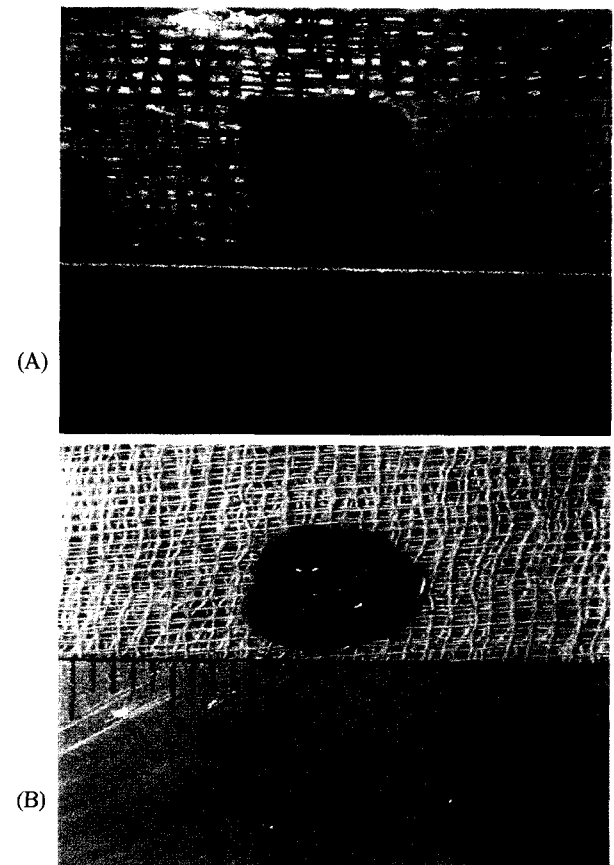


Figure 1. (A) Unseeded biodegradable, porous PGA polymer scaffold. (B) Fetal hepatocyte-seeded PGA scaffold.

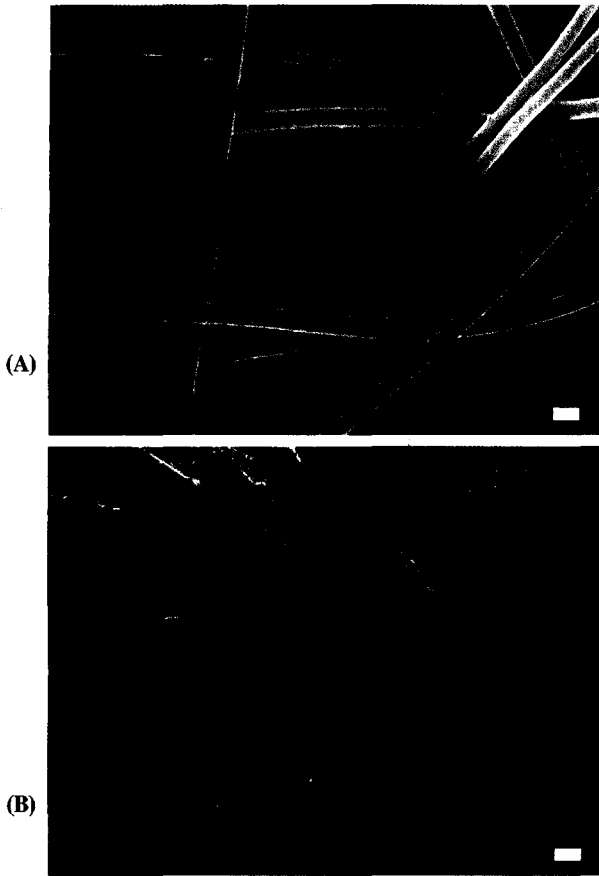


Figure 2. SEM images of (A) unseeded PGA scaffold, and (B) fetal hepatocyte-seeded PGA scaffold. The SEM image showed that hepatocytes attached on the polymer scaffold (Scale bars=20 μm).

이식된 간세포과 담체의 형태학적 관찰

이식 1주 후에 복강에 이식한 이식물들을 관찰하였다. 고분자 담체 없이 간세포만을 이식한 경우 면역결핍 마우스의 복강 내에 조직형성을 확인할 수 없었다. 이에 반해 PGA 담체에 간세포 이식한 경우 면역결핍 마우스의 복강 내의 장간막 위에서 이식하여 형성된 조직체를 확인하였고, 그 외 복강 내의 장기에는 이상이 없었다(Fig. 3).



Figure 3. Gross view of red mass (arrow) formed on the intestinal mesentery of an athymic mouse one week after transplantation of fetal hepatocytes on PGA scaffolds.

이식된 간세포의 조직학적 확인

이식 1주후 조직을 회수하여 H&E 염색을 실시한 결과 분해되지 않고 남아있는 PGA 섬유와 PGA 섬유 사이에 괴사되지 않고 존재하는 간세포 군을 발견할 수 있었다 (Fig. 4A). 또한 PGA 사이에서 담세관 구조를 확인하였다 (Fig. 4B). 이식된 태아 간세포를 확인하기 위해서 alpha-fetoprotein 항체를 이용하여 면역염색을 실시한 결과 간세포의 세포질에 특이적으로 염색되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

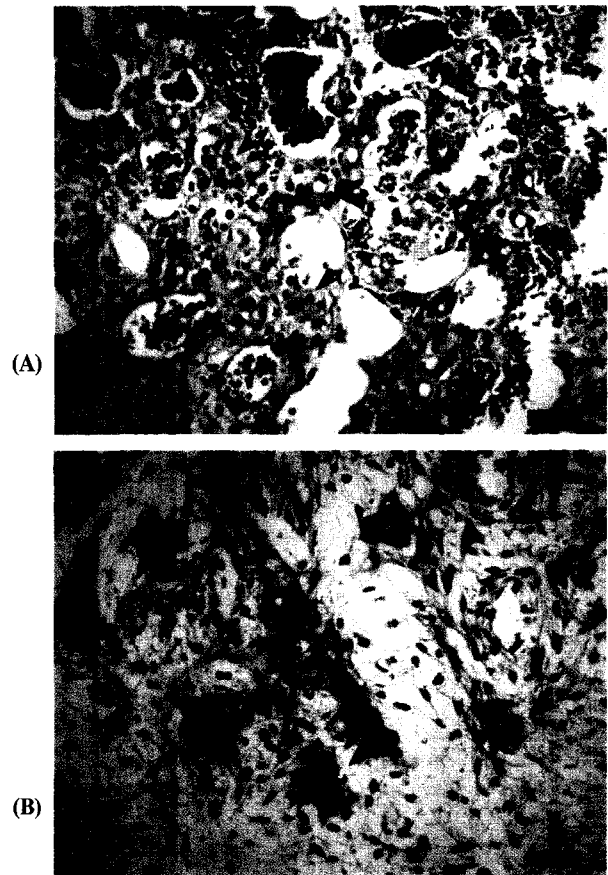


Figure 4. Histology analyses (H&E stain) of the seeded implants at one week. (A) Transplanted fetal hepatocytes (arrowheads) and PGA fibers (arrows) were present. (B) The bile ducts (arrowhead) were regenerated in the implants (Scale bars=50 μm).

요 약

후천적인 급성, 만성 간부전은 간 질환을 가지고 있는 환자들의 가장 큰 사망의 원인일 뿐만 아니라, 삶의 질을 제한한다. 이러한 간질환의 가장 효과적인 치료법으로 간이식술이 시술되고 있다. 국내에서도 간이식술이 성공적으로 시행되고 있지만 공여간의 획득이 쉽지 않고, 감염 및 면역거부의 위험이 있으며, 시술 후 평생 면역억제제를 복용하여야 하므로 신체적, 경제적으로 부담이 큰 치료법이다. 이러한 시점에서 보다 근본적인 해결을 위해서 간세포이식을 시도하였다. 간세포 이식은 1960년대에 간세포가 분리가 가능해지면서 본격적으로 시작되었다(8). UDPGT (uridine diphosphate

glucuronyl transferase)결핍에 의해 손상된 간기능의 회복을 위하여 황달성 백서의 피하에 쥐의 간세포들을 이식한 결과 혈장 빌리루빈치가 현저히 감소된 결과를 보였다(9). 간세포 이식은 간부전에서 간 대사기능 보조, 선천성 유전질환의 결핍기능 교정 및 체외 유전자 치료 등의 임상적용이 가능하다. 간세포이식은 간세포의 분리의 방법(8)이 알려지고, 비장에 이식된 간세포가 비장 조직 내에서 장기간 생존하여 간조직과 유사한 구조를 만드는 것을 확인한 후부터 간세포 이식으로 간질환을 치유하고자 하는 노력이 시작되었다. 간세포 이식은 다양한 방법을 이용하여 다양한 장소에 시행이 되었는데, 간(10-12), 간문맥(13-16), 비장(17-19), 복강(20), 장간막(21-23), 대망(20), 췌장(24, 25), 신장피막(26) 피하조직(21, 22, 27) 등에 이식이 되었고 이식된 수혜자도 마우스, 백서, 토끼, 돼지, 개, 원숭이 등의 여러 종류의 동물에서 다양한 양상을 보였다. 현재 문제가 되고 있는 급성, 만성 간질환을 동시에 해결하려는 목적으로 연구가 진행되고 있지만 간세포 이식에 있어서 어떤 장기가 가장 효과적인지 어떤 방법이 가장 효율이 높은지에 대해서 확실하게 정해진 것이 없는 실정이다. 1980년대에 Vacanti 등(28)에 의해서 담체를 이용한 간세포이식이 시작이 되었다. 생분해성 폴리머담체는 유착된 세포가 성장하고 조직화하는데 필요한 골격 역할을 하였으며, 폴리머의 다공성 형태는 산소와 영양분의 공급을 도와주었다. 시간이 지날수록 폴리머 사이로 혈관이 형성되면서 숙주의 조직과 결합하고 생분해성 폴리머는 분해 되어 완전한 조직을 형성한다.

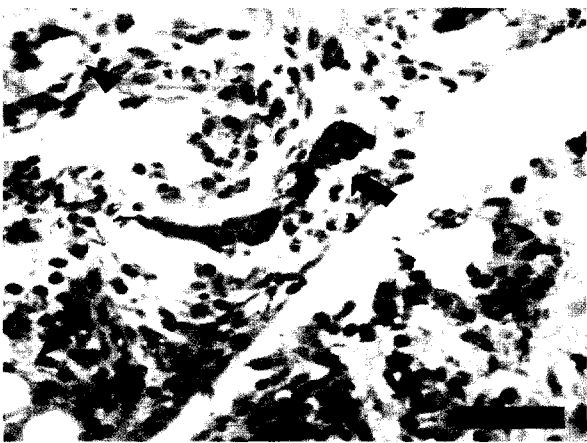


Figure 5. Immunohistochemical analysis of the seeded implants at one week. Arrow indicates positive staining for alpha-fetoprotein. Arrowheads indicate PGA fibers. Scare bar=50 μ m.

최근에는 성인의 공여 간을 대체하기 위하여 태아 간세포 및 조간모세포 등의 이용 가능성이 언급되고 있다(29, 30). 태아 간세포의 장점은 성인세포보다 분열 잠재성이 높고, 조직 적합항원의 표현 수준이 낮고, 완전히 성장된 조직에 존재하는 수지상 세포 (dendritic cell)가 없기 때문에 거부 반응을 줄일 수 있다. 그 밖에 산소 분압이 낮은 상태에서 쉽게 생존할 수 있으며, 세포 사이의 접촉이 강하지 않기 때문에 분리 과정에서 발생할 수 있는 기계적 손상이 심하지 않고, 냉동 보관에서 생존율이 성인세포보다 높다.

본 연구에서는 PGA 담체에 부착된 태아 간세포를 체내에 이식한 후 이식된 간세포가 괴사되지 않고 담체관 구조를 가진 간조직을 형성하였으며, PGA 담체의 형태가 남아서 그 지지체의 역할을 수행함을 확인하였다. 이는 기존의 많은 연구에서 간세포를 이식하였을 때 세포가 초기에 다량히 괴사함으로써 이식된 간세포의 효과를 보기 어려웠던 점에 비해 간세포 이식에 있어서의 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다. 또한 세포 성장성이 뛰어난 태아의 간으로부터 간세포를 얻어 다수의 간 질환 환자의 치료를 위해 사용할 수 있으므로, 기존의 간 이식의 공여장기 부족의 문제점을 해결 할 수 있을 것이다. 이 방법이 간질환의 치료방법으로 가능성을 가지기 위해서는 간 세포의 이식으로 형성된 간 구조와 세포의 장기간 생존과 간 기능의 유지 여부를 조사하여야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 생분해성 고분자 담체인 PGA 담체에 부착된 간세포의 이식을 통해서 이식된 간세포가 괴사하지 않고 남아 있으며 간 조직 구조의 일종인 담체관 유사구조를 확인하였다. 조직공학적인 간세포 이식 방법의 개발은 간 질환에 새로운 치료방법 개발의 가능성을 열어줄 수 있다.

감 사

이 연구는 2001년 한양대학교 교내연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Williams, R. and J. Wendon (1994), Indications for orthotopic liver transplantation in fulminant liver failure, *Hepatology* 20(1 Pt 2):S5-10S.
- Lucey, M. R. (1996), Immunosuppression after liver transplantation, *J. Hepatology*, 24, 503-505.
- Sommacale, D., O. Farges, G. M. Ettorre, P. Lebigot, A. Sauvanet, J. Marty, F. Durand, and J. Belghiti (2000), *In situ* split liver transplantation for two adult recipients, *Transplantation* 69, 1005-1007.
- Lee, H., R. A. Cusick, F. Browne, T. H. Kim, P. X Ma, H. Utsunomiya, R. Langer, and J. P. Vacanti (2002), Local delivery of basic fibroblast growth factor increases both angiogenesis and engraftment of hepatocytes in tissue-engineered polymer devices, *Transplantation* 73, 1589-1593.
- Uyama, S., P. M. Kaufmann, U. Kneser, H. C. Fiegel, J. M. Pollok, D. Kluth, J. P. Vacanti, and X. Rogiers (2001), Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts, *Transplantation* 71, 1226-1231.
- Ponder, K. P., S. Gupta, F. Leland, G. Darlington, M. Finegold, J. DeMayo, F. D. Ledley, J. R. Chowdhury, and S. L. Woo (1991), Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15, 1217- 1221.
- Demetriou, A. A., J. F. Whiting, D. Feldman, S. M. Levenson, N. R. Chowdhury, A. D. Moscioni, M. Kram, and J. R. Chowdhury (1986), Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes, *Science* 233, 1190-1192.

8. Berry, M. N. (1969), High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study, *J. Cell. Biol.* **43**, 506-520.
9. Rugstad, H. E., S. H. Robinson, C. Yannoni, and H. Armen (1970), Transfer of bilirubin uridine diphosphate-glucuronyltransferase to enzyme deficient rats, *Science* **170**, 553-555.
10. Zhang, H., E. Miescher-Clemens, G. Drugas, S. M. Lee, and P. Colombani (1992), Intrahepatic hepatocyte transplantation following subtotal hepatectomy in the recipient: A possible model in the treatment of hepatic enzyme deficiency, *J. Pediatr. Surg.* **27**, 312-316.
11. Ponder, K. P., S. Gupta, F. Leland, G. Darlington, M. Finegold, J. DeMayo, F. D. Ledley, J. R. Chowdhury, and S. L. C. Woo (1991), Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1217-1221.
12. Gupta, S., E. Aragona, R. P. Vemuru, K. K. Bharava, R. D. Burk, and J. R. Chowdhury (1991), Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver regeneration, *Hepatology* **14**, 144-149.
13. Matas, A. J., D. E. Sutherland, M. W. Steffes, S. M. Mauer, A. Lowe, R. L. Simmons, and J. S. Najarian (1976), Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: Decrease of plasma bilirubin in Gunn rats, *Science* **192**, 892-894.
14. Sutherland, D. E., M. Numata, A. J. Matas, R. L. Simmons, and J. S. Najarian (1977), Hepatocellular transplantation in acute liver failure, *Surgery* **82**, 124-132.
15. Sommer, B. G., D. E. Sutherland, A. J. Matas, R. L. Simmons, and J. S. Najarian (1979), Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine-induced acute liver failure in rats, *Transplant. Proc.* **11**, 578-584.
16. Holzman, M. D., J. Rozga, D. F. Neuzil, D. Griffin, A. D. Moscioni, and A. A. Demetriou (1996), Selective intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic and Gunn rats, *Transplantation* **55**, 1213-1219.
17. Jiang, B., M. Sawa, T. Yamamoto, and S. Kasai (1997), Enhancement of proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in cirrhotic rats by hepatic stimulatory substance, *Transplantation* **63**, 131-135.
18. Kusano, M., and M. Mito (1982), Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen, *Gastroenterology* **82**, 616-628.
19. Mito, M., M. Kusano, T. Onishi, T. Saito, and H. Ebata (1978), Hepatocellular transplantation: Morphological study in hepatocytes transplanted into rat spleen, *Gastroenterol. Jpn.* **13**, 480-490.
20. Makowka, L., L. E. Rotstein, R. E. Falk, J. A. Falk, R. Zuk, B. Langer, L. M. Blendis, and M. J. Phillips (1981), Allogeneic and Xenogeneic hepatocyte transplantation, *Transplant. Proc.* **13**, 855-859.
21. Zhang, H., E. M. Clemens, G. Drugas, S. M. Lee, and P. Colombani (1992), Intrahepatic hepatocyte transplantation following subtotal hepatectomy in the recipient: A possible model in the treatment of hepatic enzyme deficiency, *J. Pediatr. Surg.* **27**, 312-316.
22. Uyama, S., P. M. Kaufmann, T. Takeda, and J. P. Vacanti (1993), Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotropic stimulation, *Transplantation* **55**, 932-935.
23. Johnson, L. B., J. Aiken, D. Mooney, B. L. Schoo, L. Griffith-Cima, R. Langer, and J. P. Vacanti (1994), The mesentery as a laminated vascular bed for hepatocyte transplantation, *Cell Transplant.* **3**, 273-281.
24. Jaffe, V., H. Darby, C. Selden, and H. J. F. Hodgson (1988), The growth of transplanted liver cells within the pancreas, *Transplantation* **45**, 497-498.
25. Vroemen, J. P., W. A. Buurman, C. J. van der Linden, R. Visser, K. P. Heirwegh, and G. Kootstra (1988), Transplantation of isolated hepatocytes into the pancreas, *Eur. Surg. Res.* **20**, 1-11.
26. Ricordi, C., P. E. Lacy, M. P. Callery, P. W. Park, and M. W. Flye (1989), Trophic factors from pancreatic islets in combined hepatocyte-islet allografts enhance hepatocellular survival, *Surgery* **105**, 218-223.
27. Jirtle, R. L. and G. Michalopoulos (1982), Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes, *Cancer Res.* **42**, 3000-3004.
28. Vacanti, J. P., M. A. Morse, W. M. Saltzman, A. J. Domb, A. Perez-Atayde, and R. Langer (1988), Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices, *J. Pediatr. Surg.* **23**, 3-9.
29. Fine, A. (1994), Human fetal tissue research: practice, prospects, and policy, *Cell Transplant.* **3**(2), 113-145.
30. Zheng, Y. W. and H. Taniguchi (2003), Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver, *Semin. Liver Dis.* **23**(4), 337-48.