

심혈관계 질환의 줄기세포 치료에서 세포 추적 영상

서울대학교 의과대학 핵의학 교실

강 원 준

Tracking of Stem Cells for Treatment in Cardiovascular Disease

Won Jun Kang, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Various stem cells or progenitor cells are being used to treat cardiovascular disease. In ischemic heart disease, stem cell therapy is expected to regenerate damaged myocardium. To evaluate effects of stem cell treatment, the method to image stem cell location, distribution and differentiation is necessary. Optical imaging, MRI, nuclear imaging methods have been used for tracking stem cells. The methods and problems of each imaging technique are reviewed. (Korean J Nucl Med 39(2):146-149, 2005)

Key Words: Stem cell, Tracking, Imaging

서 론

줄기 세포를 이용하여 조직을 재생하려는 시도는 기존에 치료가 불가능하다고 생각되었던 여러 질환에서 새로운 치료 방법으로 주목받고 있다.¹⁾ 심혈관계 질환은 줄기세포의 임상 이용이 가장 활발한 분야 중 하나이다. 심부전은 선진국에서 가장 중요한 사망 원인 중 하나이며 우리나라에서도 그 빈도는 증가하고 있다. 다양한 약제의 개발에도 불구하고 심부전의 치료 성적은 좋지 않다. 심부전 환자에서 줄기세포를 이용하여 심근을 재생시키려는 시도가 광범위하게 행하여지고 있다. 최근에는 실험적 성공을 토대로 실제 환자에게 줄기세포 치료를 병행하는 임상 연구들이 진행되고 있다.²⁻⁴⁾ 환자에게 시행된 몇몇 임상 연구는 줄기세포 치료가 좌심실의 remodeling을 줄이고 기능을 호전시킨다고 보고하고 있다. 다양한 종류의 줄기세포가 임상에서의 이용 가능성을 검증받기 위하여 in vitro와 in vivo에서 시험되고 있다. 이에 따라 줄기세포의 분포, 이동, 분화 등을 파악하는 줄기세포 추적 영상의 중요성도 그 어느 때 보다 강조되고 있다. 충분한 수의 줄기세포가 표적 장기에 충분한 시간 동안 모이는 지 확인하는 것은 줄기세포 치료의 임상적인 효과를 판정하는 데 중요하다. 그러나 살아있는 개체에서 작은 수의 줄기

세포를 추적하는 것은 어려운 일이며 아직까지 완벽하다고 인정받는 방법은 없다. 지금까지 제안된 여러 추적자를 통한 방법들을 비교하고 앞으로의 연구 방향을 알아보고자 한다.

줄기세포의 종류 및 주입 방법

손상된 심근세포의 재생 및 기능 호전을 목적으로 다양한 종류의 줄기세포 치료가 시도되고 있다. 현재 심혈관질환의 치료 목적으로 임상에 시도되고 있는 줄기/전구세포로는 골수 혹은 말초혈액의 줄기세포, 평활근아세포, 심근세포 등이 있다. 사용되는 줄기세포의 종류에 따라 이동과 생착에 차이를 보일 수 있어 각각의 줄기세포 혹은 전구세포마다 세포 추적이 필요하다. Mesenchymal stem cell (MSCs)은 성인의 조직에서 얻을 수 있으며 배양이 가능하고 평활근, 평활근아세포, 심근의 특성을 가진다. MSCs를 손상된 심근에 직접 근주하거나 정맥주사하면 심근에 모여 좌심실의 remodeling을 예방하고 심장의 기능에 도움을 주는 것으로 보고되고 있다.⁵⁾ Hematopoietic stem cell를 이용한 연구도 진행 중이며 심근의 기능 호전과 신생혈관 형성에 관여하는지 연구 중이다.⁶⁾ Embryonic stem cell은 분화의 가능성과 이동성이 다른 adult stem cell 보다 크기 때문에 세포 추적이 필요하다.⁷⁾

줄기세포를 표적 장기에 주입하는 방법으로는 정맥 내 주입, 카테터를 통한 관동맥/말초동맥 주입(purging), 심근세포에 직접 바늘로 주입하는 방법 등이 이용되고 있다. 줄기세포를 정맥 내로 주입을 통한 방법은 폐에서 주로 제거되기 때문에 충분한 양의 줄기세포가 심장으로 모이지 않는다. 심

• Received: 2005. 3. 21. • Accepted: 2005. 4. 13.

• Address for reprints: Won Jun Kang, M.D., Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, #28 Yeongseon-dong, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: 82-2-2072-3793, Fax: 82-2-766-9083
E-mail: mdkw777@snu.ac.kr

지어 관동맥을 통하여 줄기세포를 주입하는 경우에도 실제 심근세포에 남아있는 줄기세포의 양은 3% 정도로 보고되고 있다.⁸⁾ 줄기세포를 심근에 직접 주입하는 방법은 기능 회복에 참여하는 줄기세포의 수를 늘릴 수 있는 방법이지만 부정맥을 일으킬 가능성이 있는 것으로 보고되고 있어 임상에 이용하기에 한계가 있다.⁹⁾

이상적인 줄기세포 추적 기술

줄기세포의 추적 영상을 생체 내에서 효과적으로 얻으려면 줄기 세포에서 특정 신호가 나오도록 처리해야 한다. 이상적인 방법은 세포 내에서 신호가 나오도록 처리하는 것이지만 세포 표면에서 신호가 발생하도록 처리하는 방법도 사용될 수 있다. 많은 방법들이 *in vitro* 와 소동물 실험에서 시도되었지만 임상 환자에게 이용할 수 있다고 널리 인정받는 방법은 아직까지 없다. 이상적인 추적자는 우선 생체에 해가 없고 생체 친화적이어야 한다. 또한 영상으로부터 세포 수를 정량화할 수 있어야 하며, 줄기세포가 사망한 후에도 추적자가 인접한 정상 세포에게 전이되지 않아야 한다. 지연영상에서 비침습적으로 반복적 영상을 얻을 수 있어야 분화된 후에도 영상이 가능하다.

이상적인 줄기세포 추적 영상법은 하나의 세포도 찾을 수 있는 예민도를 가지고 있고 정확한 위치 정보를 제공할 수 있어야 하며 정확한 세포 수를 정량화할 수 있어야 한다. 하나의 세포를 찾을 수 있는 예민도는 줄기세포의 migration를 파악할 수 있다는 점에서 중요하며 임상적으로는 줄기세포가 전신에 작용하여 치료 효과를 기대하는 전신 질환의 치료에 있어 중요하다.

그러나 추적자의 방법 및 기기의 예민도와 관계없이 세포 수의 정량화는 세포분열에 의한 희석, 주변 세포로의 추적자 전이 등에 의하여 한계를 가진다.

줄기 세포 추적 방법

실험동물에서 이식된 줄기세포의 운명을 알기 위해서는 사후 부검을 통한 조직학적 검사법을 이용하면 가능하다. 그러나 생체 내에서 시간 간격을 두고 연속적으로 영상을 얻는 방법이 보다 효과적이다. 또한 환자에게 시행된 임상 시험에서 이식된 줄기 세포의 분포, 이동, 심근으로의 분화, 손상받은 심근과의 융합, 심근 기능 향상에 대한 기여 등을 모니터링하기 위해 비침습적인 *in vivo* 영상법이 시도되고 있다.

1. 광학영상

발광(bioluminescence)와 형광(fluorescence)을 이용한 방법이 줄기세포 추적에 사용될 수 있다. Mice와 rat에서 발광 영상을 통하여 줄기세포의 분포, 생착을 *in vivo*로 영상화한 연구들이 보고되고 있다.^{10,11)} 그러나 발광영상은 알려진 바와 같이 소동물 이상의 큰 개체에서 영상을 하기는 어려우므로 실제 환자에서 임상적으로 이용되기는 어렵다. 형광영상 중 near infrared (700~1000 nm)는 산란과 조직 내 흡수가 비교적 적으므로 임상적으로 이용이 가능할 것으로 기대된다. 형광영상에서 단층영상을 얻으려는 시도가 있으나 현재로서는 피부와 가까운 조직 내에서만 이용 가능하다. Near infrared 형광영상의 주된 장점 중 하나는 현미경에서 이용 가능하여 병리 슬라이드 내에서 하나의 줄기 세포까지 찾을 수 있다는 것이다.

2. MRI

심장 MRI 는 심근내 주사한 경우 정확한 위치에 적정량의 줄기세포가 주입되었는지 확인할 수 있는 방법이다 MRI 를 이용한 줄기세포 추적영상은 주로 T2 영상에서 저신호 강도로 나타나는 iron fluorophore나 ferumoxide 등의 조영제를 이용한다. MRI를 통한 방법은 주입한 원래 세포만 관찰할 수 있으며 이들 세포의 작용이나 증식, 분화 등은 파악할 수 없다. 또한 artifact가 많고 죽은 줄기세포에서 나온 조영제가 대식세포와 같은 정상 세포에 섭취되기 때문에 정량화가 어렵다. 또한 pacemaker, defibrillator 와 같은 인공 산물이 있는 경우 영상을 얻기 어렵다.^{12,13)}

3. 핵의학 영상

Tc-99m, In-111, I-123 등을 이용한 SPECT 영상과 C-11, F-18, I-124 등을 이용한 PET 영상으로 줄기세포의 분포를 영상화할 수 있다. 줄기 세포는 생체 내에 주입하면 대부분의 세포는 전신에 흩어지며 특히 폐, 간, 비장 등에 모이는 특성이 있어 표적 장기에 얼마 모이지 않는다. 따라서 예민도가 높은 검출방법을 이용하여야 영상이 가능하다. MRI나 SPECT 보다 PET의 예민도가 우수하다. 핵의학적 영상법은 줄기세포에 추적자를 붙이는 방법에 따라 직접 추적자를 표지하는 방법과 리포터유전자를 이용하는 방법으로 나눌 수 있다.

1) 세포에 직접 추적자를 표지하는 방법

줄기세포의 치료 분야에서 첫번째 의문은 주입한 줄기세포가 표적 장기에 얼마나 남아있느냐 하는 것이다. 가장 쉽게 할 수 있는 방법이 줄기세포 자체에 추적자를 표지하는

방법이다. 염증의 국소화를 위하여 사용되는 백혈구 스캔에서 백혈구를 표지하는 방법으로 Tc-99m HMPAO나 In-111 oxine를 사용하고 있다. 같은 방법으로 직접 줄기세포에 Tc-99m HMPAO나 In-111 oxine를 표지할 수 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 그러나 줄기세포를 직접 표지하는 방법은 방사성 동위원소의 반감기 때문에 수 시간 내지 수일 정도만 추적이 가능하다는 한계를 가진다. 또한 줄기세포에서 다른 정상세포로 추적자가 이동할 가능성이 있다.

실험동물에서 좌심실 혹은 정맥 내로 줄기세포를 주입한 후 심근경색을 만들어 준 실험모델에서 줄기세포의 운명을 영상화한 보고가 있다.¹⁴⁾ In-111으로 표지한 endothelial progenitor cell은 손상받은 심근으로 모이는 것이 관찰되었다. 이 결과는 In-111 oxine으로 표지하는 방법이 비침습적으로 이식된 줄기세포의 운명을 추적할 수 있는 방법임을 보인 것이다.

2) 리포터 유전자를 이용한 방법

세포추적영상의 목표는 이식한 세포가 심장에 모여들어 줄기세포의 특징인 비대칭적 재생산을 통하여 증식하고 일부는 분화하여 심근세포와 심근내 혈관 세포를 재생하는 과정을 비침습적인 방법으로 영상화하는 것이다. 줄기세포를 직접 영상화하는 방법으로는 줄기세포의 분화 및 증식 과정을 확인할 수 없었다.

리포터 유전자를 이용한 방법이 개발되어 가장 활발히 연구되고 있는데 herpes simplex type-1 thymidine kinase (HSV-TK)를 줄기세포에 이입하고 TK의 기질인 F-18 FHBG를 주입하여 PET 영상을 얻는다.^{17,18)} 이 방법의 주된 장점은 이식된 유전자가 안정적으로 결합한 후에는 지속적으로 영상이 가능하다는 것이다. 세포 분열에 의하여 추적자가 희석될 가능성이 없으며, 특정 효소에 의한 자살유전자를 포함하여 줄기세포를 파괴할 수도 있다. 그러나 단점으로 체외에서 줄기세포에 유전자 조작을 가하는 과정이 필요하며, 영상이 필요할 때마다 기질을 주입해야 한다.

특정 부위에서만 발현되는 안정적인 수용체를 이용한 방법을 이용할 수도 있다. 도파민 D2 수용체의 리간드인 F-18 fluoroethylspiperone (FESP)를 이용하여 이입된 유전자를 영상화하는 방법이 개발되어 있다.¹⁹⁾

Sodium iodide symporter (NIS)를 리포터 유전자로 이용하면 I-123이나 Tc-99m을 이용하여 SPECT영상을 얻을 수 있고 임상에 쉽게 적용할 수 있어 연구가 진행되고 있다.²⁰⁾

리포터 유전자를 이용한 방법은 수개월 동안 줄기세포의 추적 및 정량화가 가능하지만 줄기세포에 유전자 조작을 가하여야 하므로 임상에 바로 적용하기 어렵다.



Fig. 1. F-18 FDG labeled stem cell imaging showed localization of stem cell in myocardium after intracoronary injection. (4 hours after injection)

3) 줄기세포의 F-18 FDG 표지

리포터 유전자를 사람의 줄기세포에 이입하여 환자의 영상을 얻는 방법은 현재로서는 불가능하다. 따라서 리포터 유전자를 이용한 방법은 동물에서의 전임상시험단계의 연구 목적으로 쓰이게 될 전망이다. 현재 환자에게 줄기세포가 투여되어 임상적으로 심장기능이 호전됨이 보고되고 있으나 줄기세포 추적 영상은 환자에서 시행되지 않고 있다. 환자에게 사용된 줄기세포의 단기 행방을 추적하는 데는 In-111을 이용한 SPECT영상을 사용할 수 있으나 SPECT영상이라는 한계를 가지고 있다. F-18 FDG으로 줄기세포를 labeling할 수 있으며 rat²¹⁾와 사람^{8,22)}에서 줄기세포의 FDG PET영상을 얻을 수 있었다(Fig. 1). FDG PET의 직접 표지법은 주사 후 수시간 이내의 영상만 얻을 수 있다는 단점에도 불구하고 현재 진행되는 임상연구에서 안전하게 적용하여 줄기세포의 위치를 추적하고 정량화할 수 있는 방법이다.

결 론

현재 줄기세포의 추적에 이용가능한 방법은 MRI, 광학영상, 핵의학 영상 등이다. MRI는 좋은 3차원 영상을 보여주지만 예민도가 낮다. 광학영상은 현재까지 소동물이나 피부 가까이 있는 경우만 영상이 가능하다. 핵의학 영상 중 리포터 유전자를 이용한 방법은 예민하고 장기간 추적 관찰이 가능한 이상적 방법이지만 유전자 조작이 필요하여 임상에 적용하기에 어려움이 있다. 현재 환자에서 시도되고 있는 임상 시험에는 In-111을 이용한 SPECT 영상이나 FDG PET의 직접 labeling 방법이 사용 가능하다.

References

1. Lee MS, Makkar RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report. *Ann Intern Med* 2004;140:729-37.
2. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-6.
3. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silvar SA, Sousa AL, Silva GV, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transcatheter injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110:II213-8.
4. Wolbert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtengerg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction; the BOOST randomized controlled trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
5. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat, Embryol* 1999;199:391-6.
6. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494-501.
7. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-14.
8. Zeiher AM. Peripheral blood progenitors for cardiac repair. Heart Failure Symposium. 654 *J Am Coll Cardiol* 2004. 268 (Abstract).
9. Hagege AA, Carrion C, Menasche P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;361:491-2.
10. Wang X, Rosol M, Ge S, McNamara G, Pollack H, Kohn DB, et al. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 2003;102:3478-82.
11. Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A, Dusich J, Bachmann MH, Negrin RS, et al. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:221-6.
12. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 2003;228:480-7.
13. van den Bos EJ, Wagner A, Mahrholdt H, Thompson RB, Morimoto Y, Sutton BS, et al. Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Transplant* 2003;12:743-56.
14. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003;107:2134-9.
15. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863-8.
16. Chin BB, Nakamoto Y, Bulte JW, Pittenger MF, Wahl R, Kraitchman DL. ¹¹¹In oxine labeled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nucl Med Commun* 2003;24:1149-54.
17. Gambhir SS, Herschman HR, Cherry SR, Barrio JR, Satyamurthy N, Toyokuni T, et al. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia* 2000;2:118-38.
18. Tjuvajev JG, Avril N, Oku T, Sasajima T, Miyagawa T, Joshi R, et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Res* 1998;58:4333-41.
19. Liang Q, Satyamurthy N, Barrio JR, Toyokuni T, Phelps MP, Gambhir SS, et al. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther* 2001;8:1490-200.
20. Chung JK. Sodium iodide symporter: Its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-200.
21. Tamura M, Unno K, Yonezawa S, Hattori K, Nakashima E, Tsukada H, et al. *Life Sciences* 2004;75:575-84.
22. Kang WJ, Lee DS, Kim H-S, Kang H-J, Hong MK, Eo JS, et al. Assessment of tissue distribution of F-18 FDG labeled hematopoietic stem cell after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 2005 (Abstract, in press).