

성체 백서의 지방조직에서 추출한 중간엽 줄기세포의 5-azacytidine을 이용한 심근세포 분화 유도

최주원* · 김용인* · 오태윤** · 조대윤*** · 손동섭*** · 이태진****

Transformation of Adult Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes with 5-azacytidine: Isolated from the Adipose Tissues of Rat

Ju Won Choe, M.D.*, Yong-In L. Kim, M.D.*, Tae Yun Oh, M.D.**, Dai Yoon Cho, M.D.***, Dong Suep Sohn, M.D.***, Tae Jin Lee, M.D.****

Background: Loss of cardiomyocytes in the myocardial infarction leads to regional contractile dysfunction, and necrotized cardiomyocytes in infarcted ventricular tissues are progressively replaced by fibroblasts forming scar tissue. Although cardiomyoplasty, or implantation of ventricular assist device or artificial heart was tried in refractory heart failure, the cardiac transplantation was the only therapeutic modality because these other therapeutic strategies were not permanent. Cell transplantation is tried instead of cardiac transplantation, especially bone marrow is the most popular donated organ. But because bone marrow aspiration procedure is invasive and painful, and it had the fewer amounts of cellular population, the adipose tissue is recommended for harvesting of mesenchymal stem cells. **Material and Method:** After adipose tissues were extracted from abdominal subcutaneous adipose tissue and intra-abdominal adipose tissue individually, the cellular components were obtained by same method. These cellular components were tried to transformation with the various titers of 5-azacytidine to describe the appropriate concentration of 5-azacytidine and possibility of transformation ability of adipose tissue. Group 1 is abdominal subcutaneous adipose tissue and Group 2 is intra-abdominal adipose tissue-retroperitoneal adipose tissue and omentum. Cellular components were extracted by collagenase and NH₄Cl et al, and these components were cultured by non-induction media - DMEM media containing 10% FBS and induced by none, 3 μmol/L, 6 μmol/L, and 9 μmol/L 5-azacytidine after the 1st and 2nd subculture. After 4 weeks incubation, the cell blocks were made, immunostaining was done with the antibodies of CD34, heavy myosin chain, troponin T, and SMA. **Result:** Immunostaining of the transformed cells for troponin T was positive in the 6 μmol/L & 9 μmol/L 5-azacytidine of Group 1 & 2, but CD34 and heavy myosin chain antibodies were negative and SMA antibody was positive in the 3 μmol/L & 6 μmol/L 5-azacytidine of Group 2. **Conclusion:** These observations confirm that adult mesenchymal stem cells isolated from the abdominal subcutaneous adipose tissues and intra-abdominal adipose tissues can be

*인제대학교 의과대학 서울백병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul Paik Hospital, School of Medicine, Inje University

**성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kangbuk Samsung Hospital, School of Medicine, Sungkyunkwan University

***중앙대학교 의료원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University

****중앙대학교 의료원 해부병리과

Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University

† 본 논문의 실험은 강북삼성병원의 효석연구실에서 시행되었음.

논문접수일 : 2006년 3월 10일, 심사통과일 : 2006년 4월 18일

책임저자 : 최주원 (100-032) 서울시 중구 저동 2가 85, 인제대학교 의과대학 서울백병원 흉부외과

(Tel) 02-2270-0033, (Fax) 02-2270-0038, E-mail: csicarus@freechal.com

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

chemically transformed into cardiomyocytes. This can potentially be a source of autologous cells for myocardial repair.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:511-519)

Key words: 1. Cell biology
2. Cell transplantation
3. Myocardium-cytology
4. Rats

서 론

허혈성 심장 질환의 주요 원인은 관상동맥의 협착에 의한 관상동맥 혈류의 감소이며, 이는 심근의 허혈(ischemia), 경색(infarction) 등을 유발하여 심근의 기능 손실을 일으킨다[1]. 현재 이루어지고 있는 관상동맥 중재술이나 관상동맥 우회로술 등의 치료는 손상 받은 조직의 손상 정도를 경감시키고 추가적인 손상을 방지할 수는 있으나, 괴사된 심근세포를 재생할 수는 없다[2]. 결국 중증의 심부전증이 발생한 경우 심근성형술을 시행하거나 심실보조장치 또는 인공심장 등의 한시적 치료 방법이 시도되기도 하지만, 최종적으로 심장이식 이외의 방법은 현재로서는 제시되지 못하고 있다. 그러나 Dor procedure 또는 Batista operation 같은 심근성형술의 경우 장기적인 효과가 증명되어 있지 못하며 수술의 합병증 및 이환율에 대한 위험부담이 높고, 심실보조장치 또는 인공심장의 경우 혈전증 및 감염 등의 합병증으로 인하여 2~3년 정도의 bridge operation 역할정도만 가능하다. 또한 심장이식의 경우 최근 성적의 비약적인 발전이 보고되고 있으나 공여자가 부족하고, 면역반응으로 인하여 이식된 심장의 장기 성적에는 한계가 존재하여 이를 대신하기 위한 세포이식에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

동종세포이식에 이용될 수 있는 세포는 태아줄기세포(embryonic stem cell), 태아 혹은 신생아 심근세포 등이 있고, 자가세포이식으로는 골격근 근육모세포, 골수에서 기인한 줄기세포 이외의 성체줄기세포 등이 있다[3].

그러나 아직 태아 줄기세포는 실험적이고, 임상적 경험이 없어 안정성이 확보되지 않았으며, 윤리적 문제에서도 사회적 공감대가 형성되지 않았기에, 현재 대부분의 연구 및 임상적 시도는 자가세포를 이용한 세포이식 또는 세포 치료에 중점을 두고 있다[4-8]. 더욱이 최근에 성체 줄기세포(adult stem cell)에 관한 진전이 있어 새로운 개념이

정립되면서 다양한 시도와 다양한 장기에서 성체줄기세포를 찾아내는 시도가 이루어지고 있다. 전통적으로 가장 넓게 시도되고 이용된 장기는 골수이며, 현재까지 골격근 아세포, 평활근세포, 그리고 심근 세포 등 다양한 세포의 이식이 시도되고 있고, 이러한 세포 이식이 심근경색에 의한 심장기능 저하를 예방할 수 있음이 밝혀졌다[9-13]. 그 중 골수에서 성체 중간엽 줄기세포를 추출하여 이를 심장에 이식하는 방법이 여러 연구자에 의하여 시도되었으며, 핵의학적 검사 또는 심장초음파 검사에서 부분적 심근의 재생과 기능의 회복이 보고되었다[9-13]. 그러나 이러한 골수는 채취하는 과정이 침습적이어서 환자에게 과도한 통증을 주며, 10^5 개의 주변 간질세포에서 1개 정도의 중간엽 줄기세포가 존재하는 것이어서 이를 직접 이용할 때에는 치료범위의 한계가 존재한다. 또한 이렇게 얻은 세포의 수를 증가시키기 위해서 실험실에서 증식을 시행할 경우, 시간적 또는 비용적인 면의 지출이 막대할 뿐만 아니라, 감염이나 세포의 손실의 가능성이 있다. Zuk 등[14]은 이러한 문제를 해결하기 위해서 상대적으로 접근이 용이하며, 다량의 조직을 확보할 수 있는 지방조직에서의 성체줄기세포의 추출을 시도하여 성공하였다고 주장하였다. 지방조직에서의 성체줄기세포는 골수에서 추출한 성체줄기세포와 마찬가지로 중배엽에서 분화된 조직이며 광범위한 범위에서 많은 수의 세포를 추출할 수 있기에 넓은 범위의 치료에도 적합하다 하였고, 이러한 지방조직의 성체줄기세포를 이용하여 지방조직, 골형성 조직, 연골형성 조직, 그리고 근육세포 등을 성공적으로 분화유도 하였다[14]. 이러한 배경으로 Rangappa 등은 백서의 복부 피하 지방 조직에서 중간엽 줄기세포를 추출하여 이를 5-azacytidine을 이용하여 심근세포로 분화유도 하였다[15].

본 연구에서는 백서의 지방조직을 복부 피하지방 조직과 복강 내 지방조직으로 나누어 각각 분리 추출하여 두

조직에 동일한 과정의 세포 추출 과정을 거친 후, 5-azacytidine을 이용한 심근세포로의 분화 유도를 시도하였다. 심근 분화유도에 적합한 환경을 찾기 위해서 각각 다른 농도의 5-azacytidine으로 분화 유도를 시행하였고, 다른 성장인자의 추가 없이 지방조직의 분화능력을 비교하여 추출한 성체 중간엽 줄기세포의 심장질환에서의 임상 적용의 가능성과 지방조직의 부위에 따른 분화 유도의 차이가 있는지 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 연구 대상

실험동물은 8주령의 수컷 Sprague-Dawley rats를 사용하였으며, 실험은 강북삼성병원의 동물실험실과 분자생물학 연구실에서 병원윤리위원회의 승인을 얻어 시행하였다.

2) 실험동물의 전처치

Penicillin 0.3 mg/kg를 근육한 후에 마취 없이 경추 골절을 통하여 안락사를 유도하였다.

3) 세포의 분리

실험은 세 차례에 걸쳐서 반복적으로 시행하였으며, 1 회 실험마다 간질세포를 대량으로 획득하기 위하여 세 마리의 성체 백서(Adult Sprague-Dawley rats, 8주령)에서 복부의 피하지방 조직을 적출하여 실험조직 1 (Tissue 1)로 정하였으며, 복강 내 대망(Omentum)과 후복막 지방조직을 적출하여 실험조직 2 (Tissue 2)로 정하였다(Fig. 1, 2).

적출한 지방 조직은 200 units/mL penicillin과 200 µg/mL streptomycin (Gibco Inc., Penicillin-Streptomycin, 15140-122)을 추가한 PBS solution (Gibco Inc., 70013-032)에 세척한 후 Metzenbaum scissors을 이용하여 잘게 다졌다.

적출된 조직을 500 G로 5분간 원심분리하여 부유한 조직만을 얻어내었으며, 지방 조직의 세포외 기질을 제거하기 위하여 0.075% collagenase (Sigma Inc., Collagenase crude type IA, C2674)를 이용하여 37°C, 30분간 담근 후에 10% FBS (Gibco Inc., Certified FBS, 16000-044), 항생제 (Gibco Inc., Penicillin-Streptomycin, 15140-122), 항진균제 (Gibco Inc., Funzizole, 15290-028)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Inc., DMEM, 12430-054)으로 Collagenase 효소를 중화시킨 후에 1,200 G에서 10분간 원심분리를 하여 High-density stromal vascular fraction 침전물을 얻었다.

이 침전물을 160 mM NH₄Cl (Sigma Inc.)을 이용하여 재침전시킨 후에 실온에서 10분 정도 두어 적혈구의 용혈을 유도하였으며, 다시 500 G에서 10분간 원심분리를 하였다.

위의 침전물을 DMEM으로 재침전시킨 후에 70 µm Nylon Mesh (Fisher Inc., Spectra/Mesh Nylon 70 µm, 08-670-199)를 이용하여 여과시켜서 결체조직 등의 세포외 기질을 제거하였으며, 500 G에서 10분간 원심분리하여 최종적인 침전물을 추출하였다.

4) 세포의 배양

추출된 세포는 10% FBS (Gibco Inc., Certified FBS, 16000-044), 항생제(Gibco Inc Penicillin-Streptomycin, 15140-122), 항진균제(Gibco Inc., Funzizole, 15290-018)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Inc., DMEM, 12430-054)를 Non-induction media로 이용하여 100Ø 배양 접시에서 배양하였다. 배양은 2~3일 정도 간격으로 교환하였으며, 배양된 세포의 융합정도(Confluency)가 배양접시의 80~90% 정도가 되면 Trypsin-EDTA (Gibco Inc., 1x Trypsin-EDTA, 25300-054)를 이용하여 2회에 한하여 계대 배양을 시행하였다.

5) 심근의 분화유도

1차 또는 2차 계대배양을 거쳐서 만들어진 4개의 배양 접시는 5-azacytidine (Sigma Inc., A2385)을 1) None, 2) 3 µmol/L, 3) 6 µmol/L, 4) 9 µmol/L의 농도로 각각 첨가하여 심근세포로의 분화를 유도하였다. 5-azacytidine을 이용한 분화 유도는 24시간 동안 시행한 후에 다시 Non-induction media를 이용하여 배양하면서 4주간 배양하였다.

6) 면역 조직 화학 염색(Immunohistochemical staining)

면역 조직 화학 염색(Immunohistochemical staining) 및 결과 판독은 중앙대학교 병리학교실에서 시행하였다. 4주간의 배양이 끝난 후에 각 실험 조직군의 세포들은 cell blocks을 만든 후에, 항원항체 반응의 민감도를 높이기 위하여 monoclonal primary antibody 전용 detection kit (Zymed Inc., HistoStain-Mouse Kit, 85-6543)를 이용하여 검사하였다. 혈관 내피 세포의 대표적 표지 항체 CD34 (Labvision Inc., MS-363-P0), 골격근의 특이항체 heavy myosin chain (Zymed Inc., CH18-0105), 심근의 특이 항체 troponin T (Labvision Inc., MS-295-P0), 가지막으로 평활근에 대한 특이항체 SMA (Labvision Inc., MS-1297-P0)를 이용하여 면역형광염색을 시행하였으며, 형광염색에 반응을 보인 세



Fig. 1. Abdominal subcutaneous adipose tissues (Tissue 1).



Fig. 2. Retroperitoneal adipose tissues (Tissue 2).

포들의 대략적 비율을 비교하였다.

결 과

1) 지방 조직의 분리

8주령 백서의 지방조직을 적출하여 각각의 무게를 측정하였다. 일반적으로 한 마리에서 나온 지방조직의 양은 피하지방조직이 4.76 ± 0.51 gm, 복강 내 지방조직은 3.13 ± 0.36 gm으로 측정되었으며, 육안적으로 후복막 지방조직은 백색의 지방조직이었으나, 복부의 피하지방조직은 갈색지방조직으로 확인되었다(Fig. 1, 2)

2) 면역형광 염색

면역 형광염색의 결과는 Table 1에 요약하였다.

(1) **CD34:** CD34는 대표적인 혈관내피세포의 cell marker로 알려져 있으며, 양성인 경우 혈관의 신생형성이 이루어진

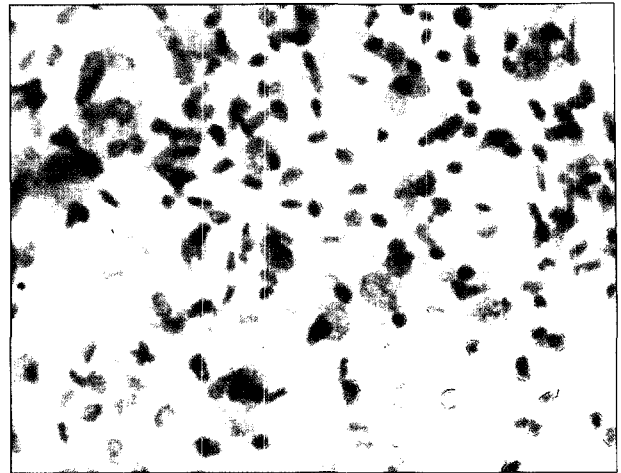


Fig. 3. Light microscopy of the cultured cells stained against CD34 shows no expression.

Table 1. Summarization of the immunohistochemical staining results

	CD34	SMA	HMC	Troponin T
Visceral adipose tissue				
Non-induction	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5-azacytidine - 3 μ mol/L	Neg.	Positive	Neg.	Neg.
6 μ mol/L	Neg.	Positive	Neg.	Positive
9 μ mol/L	Neg.	Neg.	Neg.	Positive
Abdominal subcutaneous adipose tissue				
Non-induction	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5-azacytidine - 3 μ mol/L	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6 μ mol/L	Neg.	Neg.	Neg.	Positive
9 μ mol/L	Neg.	Neg.	Neg.	Positive

다고 추정할 수 있다. 그러나 이번 실험에서는 모두 음성으로 반응을 하였다(Fig. 3).

(2) **Heavy myosin chain (HMC):** 골격근에 대한 cell marker로 검사하였다. 본 실험에서는 모든 실험군에서 음성반응을 보였다(Fig. 4).

(3) **Troponin-T:** 심근 세포의 특이적인 cell marker로 양성인 경우 심근으로 분화되었음을 알 수 있다. 본 연구에서는 복부 피하 지방조직과 복강 내 지방조직 모두에서 추출한 중간엽 줄기세포의 배양에서 6 μ mol/L와 9 μ mol/L 농도의 5-azacytidine으로 분화유도를 시도한 조건에서 10~15% 정도의 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

(4) **SMA:** SMA는 평활근의 cell marker로 본 실험에서는 복

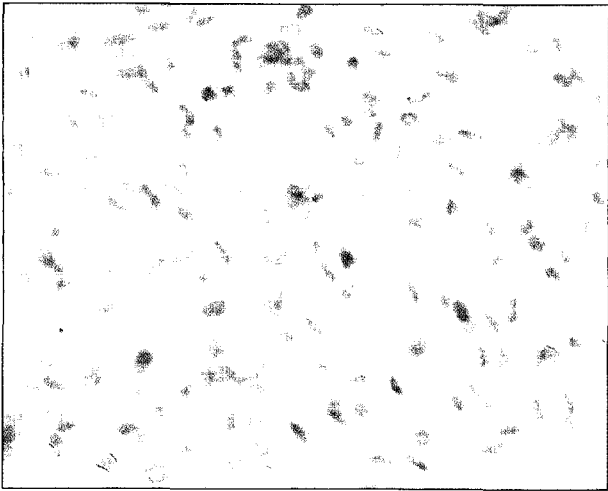


Fig. 4. Light microscopy of the cultured cells stained against Heavy myosin chain shows no expression.

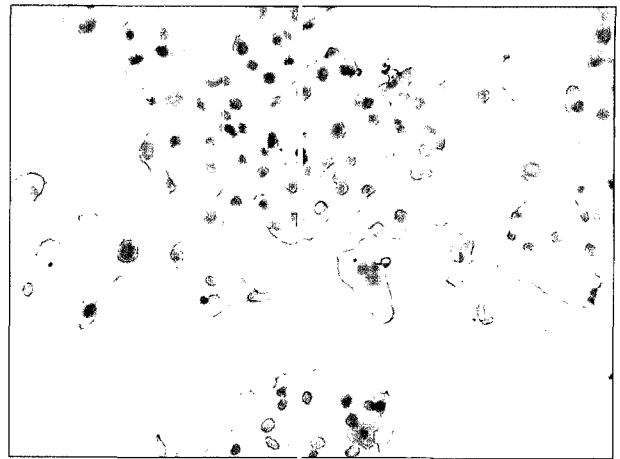


Fig. 6. Light microscopy of the cultured cells from intra-abdominal adipose tissues stained against Troponin-T shows expression.

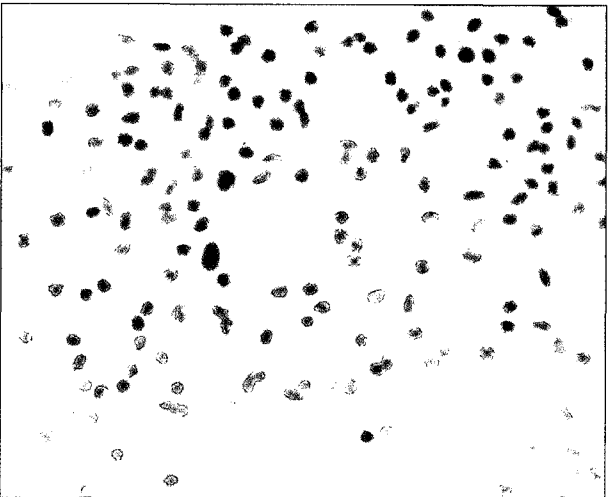


Fig. 5. Light microscopy of the cultured stem cells from abdominal subcutaneous adipose tissues stained against Troponin-T shows expression.

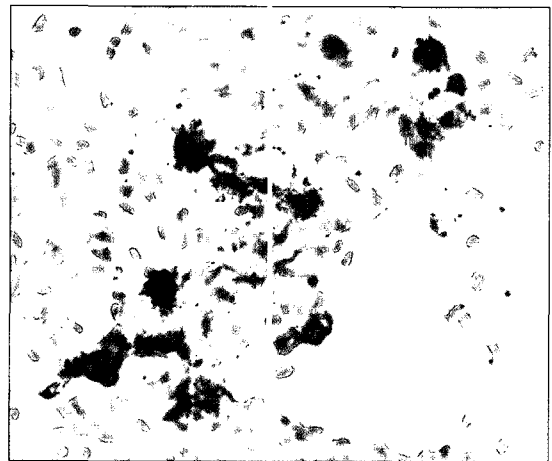


Fig. 7. Light microscopy of the cultured cells from intra-abdominal adipose tissues stained against SMA shows expression.

부지방조직에서 추출한 중간엽 줄기세포의 배양에서 $3\mu\text{mol/L}$ 와 $6\mu\text{mol/L}$ 의 농도의 5-azacytidine으로 분화유도를 시도한 조건에서 5~10% 정도의 양성반응이 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

현재까지 손상된 심근의 재생을 목적으로 세포이식을 시행할 때, 이식할 대상이 되는 세포로는 골격근아세포, 배아 줄기세포, 골수 중간엽 줄기세포, 조혈모세포, 혈액

및 골수 유래 내피 생성 세포 등이 있다[16-18]. 특히, 골수는 체중배엽으로부터 유래된 다양한 기능을 지닌 중간엽 줄기 세포를 함유하고 있는데, 골수 중간엽 줄기세포는 골수에서 중배엽성 조직으로 분화할 수 있어 중배엽성 줄기 세포로 불리기도 한다. 골수 중간엽 줄기세포는 조절된 실험실의 조건하에서 다양한 중간엽 계열로 분화가 가능한데, 이는 여러 가지 중엽 조직의 복구나 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다[19]. 이들 세포들은 지방, 연골과 뼈, 심근과 근육 세포를 포함하는 중간엽 계열 세포들로 실험실(in vitro)과 생체 내(in vivo)에서 분화가 가능한 것으로 보고되었다[20].

그러나 골수 중간엽 줄기세포는 채취 시에 환자에게 상당한 통증을 주게 되고, 추출된 세포의 수가 광범위한 부위의 세포 이식을 시행하기에는 그 수가 충분하지 않는 단점이 있다[14]. 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법을 지방 조직에서 중간엽 줄기세포를 추출하는 것이 한 방법으로 논의되고 있다. 지방조직에서 추출한 세포는 다양한 세포들로 구성되며 대부분 중간엽 계열에서 유래되며, 지방조직 형성, 골 형성, 연골 형성 및 근육을 형성하는 능력을 가지고 있어서 골수 중간엽 줄기세포와 매우 유사하다[14].

이러한 다양한 계열로의 분화는 (1) multiple lineage-committed progenitor cells, (2) multipotent cells from other source (예; pericytes, marrow-derived MSCs from peripheral blood) 또는 이 두 가지의 조합으로 가능할 것으로 여겨진다[14].

실험실에서 심근세포의 분화는 DNA에서 methyl기를 제거(demethylizing)하는 시약인 5-azacytidine 처리하며, cytosine analog인 이 시약으로 분화를 유도 조절하는 어떠한 gene에 변형을 유발하여 유도하는 방법이 가장 널리 사용되고 있으며, 일반적으로 5~10 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도에서 배양되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 6 $\mu\text{mol/L}$ 와 9 $\mu\text{mol/L}$ 의 조건에서 배양된 것이 확인되었다[15]. 그러나 이러한 지방조직에서 중간엽 줄기세포를 추출하여 배양하고, 또는 세포치료에 이용하기 위해서는 지방조직 내의 세포성분이 상대적으로 풍부해야만 가능하다. Zuk 등은 인체에서 지방흡입술로 추출한 지방조직에서 세포성분을 분리하여 배양하는 데 성공하였는데, 체지방의 양적인 면은 개인적인 차이가 있지만, 세포성분의 양은 개인적인 차이가 크게 없다고 주장하면서, 마른 사람에서도 지방조직을 이용한 세포 치료가 가능하다고 주장하였다[14]. 그러나, 현재까지 지방조직을 이용한 대부분의 연구는 조직 내에 세포성분이 많은 개체인 비교적 어린 동물 또는 젊은 연령의 지방조직을 이용하여 실험이 진행되었다. 일반적으로 어린 개체에서의 지방조직은 세포성분이 많은 갈색지방이지만, 노화에 따라 황색지방으로 바뀌기 때문에 이런 조건의 지방조직으로 세포치료가 가능할 것인지 또 같은 효과를 보여줄 수 있는지는 아직 미지수이다. 본 실험에서도 세포성분이 많은 갈색지방의 복부지방조직과 복강 내 지방조직 모두에서 심근의 분화 유도가 관찰되었으나, 이러한 세포치료를 요하는 대부분의 사람들이 고령인 점을 고려할 때 적절한 치료의 효과에 대하여는 추가적인 연구를 필요로 할 것이다.

다음으로 배양된 세포의 Transformation 비율이 실험실에서 배양된 세포의 경우 아직 치료적 방법으로 사용하기에는 만족할 수준에 달하지 못한 것으로 여겨진다. 대부분의 연구에서 10~20% 정도의 양성 반응을 보이고 있어서 이식된 세포가 목표장기로 이동(Homing)을 하여 원하는 세포로만 성장을 유도하는 면에 대하여 추가적인 많은 연구가 진행되고 있는데, 분화 유도를 촉진하는 방법으로 여러 가지 성장인자인 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), stem cell factor (SCF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등을 주사하거나 유전자치료를 병행하기도 하지만 아직 정확한 치료방법이 정해지지는 못하였다[6]. 본 연구에서는 10~15% 정도의 분화유도가 일어났음을 확인하였는데, 실험실의 여건 및 환경의 제약으로 인하여 세포의 수를 비교하거나 정확한 양적 차이에 의한 복부 피하 지방조직과 복강 내 지방조직 간의 차이를 비교하지는 못하였다. 또한 세포의 배양 시 발생하는 contact inhibition은 세포의 분화유도에 큰 장애를 유발한 것으로 생각된다. 그러나 이러한 contact inhibition은 생체 내(in vivo)에서도 일어날 수 있는 반응으로 극복해야 되는 문제로 생각된다. 본 연구에서는 더욱이 배양된 세포를 염색하여 검사하는 과정에서 배양접시에 직접 염색하는 방법이 아닌, 다량 배양 후 이를 cell block을 만들어서 검사하였기에 contact inhibition이 더욱 크게 작용하였을 것으로 여겨진다.

지방조직 추출 과정에서 다른 조직의 오염도 원하는 조직으로의 분화유도를 성공하지 못하게 하는 원인으로 생각된다[14,15]. 본 실험에서도 중간엽 줄기세포가 존재하여 이러한 심근세포로의 분화가 가능했던 것으로 추정되나, 복강 내 지방조직에서 추출한 중간엽 줄기세포를 배양한 경우 SMA 면역형광염색에서 양성반응을 보인 것은 대망의 적출과정에서 소장 또는 대장의 일부 근육이 손상을 받아 같이 적출되어 배양되었을 가능성도 생각해 볼 수 있을 것이다. 그러나, heavy myosin chain에 대한 검사에서는 음성반응으로 골격근 세포는 배양되지 않았기에 복강 내 지방 조직의 분화 특성이 평활근에 더 적절할 가능성도 배제할 수는 없다고 생각되며 추가적인 연구가 필요할 것이다.

본 실험과 유사한 동물 실험에서 다양한 종류의 줄기세포를 이식하여 경색된 부위의 심근조직에서 심근세포와 혈관 내피세포의 생성에 의한 심근의 기능 개선이 이루어졌다는 보고는 많지만, 인체 내로 세포치료를 시행하기 위해서는 세포 이식 후 장기간에 걸친 조사 및 분석을 통

하여 효과와 안정성을 함께 생각해야 할 것이다. 세포 치료의 임상적 적용을 하기 위해서 1) 동물 실험에서의 결과가 인체에서도 같은 결과로 이어질 것인지의 가능성과, 2) 어떤 종류의 세포를, 3) 어떤 방법(cell delivery)으로 이식할 것이며, 4) 심근 경색 후 어느 시기에 하는 것이 효과적인지, 5) 이식된 세포가 기존 세포와 전기, 생리적으로 결합을 이루어 심근세포의 특징인 수축 및 이완이 가능할 것인지, 6) 세포 이식 후 부정맥과 악성 종양의 형성을 포함하여 인체에 발생 가능한 합병증은 어떠한 것이 있는 것인가 등에 대하여 추가적으로 연구되어야 한다.

특히 심장은 단순한 심근세포의 덩어리가 아니라, 이종나선 구조를 가지고 정해진 방향으로 수축하고 이완하는 장기라는 점을 고려할 때 심근세포의 부분적 재생이 가지는 한계는 분명히 존재할 것으로 생각된다. 현재까지 심근경색 환자에게서 시행된 임상 연구들은 면역학적인 문제와 안정성, 그리고 의료법적인 문제를 고려하여 자가 골수 중간엽 줄기세포, 자가 혈액 전구세포 및 자가 골격근 아세포 등 자가 세포 이식만을 이용하고 있다. Strauer 등[10]이 시행한 연구에 의하면 10명의 환자를 대상으로 자가 골수 중간엽세포를 심근 경색부위의 동맥을 통하여 이식하고, 세포 이식 후 약 3개월 후에 비교하여 세포 이식요법을 받은 환자들은 세포를 이식 받지 않은 대조군에 비해 경색 부위가 감소하였고 경색 지역에서 혈류 속도의 증가 및 좌심실 기능이 개선되었다고 보고하였다. 또한 Assums 등[9]은 자가 골수 중간엽 줄기세포 및 자가 혈액 전구세포를 각각 심근 경색증 환자에게 이식한 후 두 세포의 효율성을 비교하였을 때 세포의 종류에 상관없이 유사한 정도로 심장 기능이 개선되었다고 보고하였다.

한편, Menasche 등[13]은 심근경색과 심한 허혈증세를 나타내는 72세의 남자 환자로부터 자가 골격근아세포를 추출한 후 환자의 경색 부위로 이식하여 좌심실의 구출률(Ejection Fraction)이 약 30% 정도 증진되었으며, Positron emission tomography (PET)검사에 의해 대사작용이 증진되었다고 발표하였다. 최근 이 집단은 세포 이식 후 뇌졸중으로 사망한 이 환자의 심장조직을 분석하여 섬유화가 된 지역에서 잘 발달된 골격근관(Skeletal myotube)이 형성된 것을 확인하고 심근의 재생이 일어난 것으로 추정하였다. 그러나 자가 골격근아세포를 이식받은 환자에서 심근의 수축력은 개선되었지만, gap junction의 특이적인 단백질인 connexin43이 탐지되지 않아 주변의 세포와 전기생리적인 연결 없이 수축력이 개선된 기전에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다[13]. 이 집단에서 발표한 다른 논문

에서 골격근아세포 이식 후에 10명의 환자 중 4명의 환자에게서 부정맥이 발생하였으나 이러한 부정맥의 발생이 골격근아세포에 의한 것인지 아니면 허혈성 심근병증(Ischemic cardiomyopathy)에서 일반적으로 나타나는 부정맥인지 여부에 대하여는 아직 논란의 여지가 있다.

위와 같이 골수의 중간엽 줄기세포를 이용한 실험적, 또는 임상적 연구는 많은 시도를 하고 부분적 성과를 거두고 있으나, 아직 많은 환자에게 적용하기에는 한계가 있다. 세포 이식이 시행된 환자 수도 적을 뿐만 아니라 세포 이식 후 대부분 1년 미만의 조사 결과일 뿐이며, 심장 초음파와 방사선 동위원소 검사 등의 주관적이고 간접적인 방법으로 평가한 것이어서 실질적 회복을 파악하는 것에 한계가 있다.

결 론

본 연구 결과, 지방조직에서 추출한 중간엽 줄기세포는 심근세포로 분화할 수 있는 가능성이 충분히 있는 것으로 확인되었으나, 분화유도 비율면에서는 만족할 수준이 되지 못하였으며, 복부 피하지방과 복강 내 지방조직에서 모두 가능한 것으로 판단되었다. 향후 두 조직 간의 분화능력의 차이가 존재하는지, 분화를 유도하기 위한 적절한 배양환경이 어떠한 것인지, 그리고 지방조직에서 세포추출 과정만을 거친 후 심장 내 주입하였을 때 골수에서 추출한 세포를 주입하는 것과 유사한 효과를 기대할 수 있는지에 대하여 추가적인 많은 연구가 필요하겠다.

참 고 문 헌

1. Ortlepp JR, Schmitz F, Bozoglu T, Hanrath P, Hoffmann R. Cardiovascular risk factor: in patients with aortic stenosis predict prevalence of coronary artery disease but not of aortic stenosis: An angiographic pair matched case-control study. *Heart* 2003;89:1019-22.
2. Nir SG, David R, Zaruba M, Franz WM, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2003;58:313-23.
3. Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2003;4:711-7.
4. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
5. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coro-

- nary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:699-705.
6. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 2001;938:221-9.
 7. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:999-1005.
 8. Youn TJ, Son BR, Piao H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in the reperfused or non-reperfused myocardial infarction scar tissues. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:192A.
 9. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
 10. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of Infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in human. *Circulation* 2002;106:1913-8.
 11. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.
 12. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107:2294-302.
 13. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.
 14. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implication for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001;7:211-28.
 15. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Wei ESK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:775-9.
 16. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation* 2003;108(Suppl 1):II259-63.
 17. Itescu S, Schuster MD, Kocher AA. New directions in strategies using cell therapy for heart disease. *J Mol Med* 2003; 81:288-96.
 18. Takano H, Ohtsuka M, Akazawa H, Toko H, Harada M, Hasegawa H. Pleiotropic effects of cytokines on acute myocardial infarction: G-CSF as a novel therapy for acute myocardial infarction. *Curr Pharm Des* 2003;9:1121-7.
 19. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003;108(Suppl 1):II253-8.
 20. Gojo S, Umezawa A. Plasticity of mesenchymal stem cells regenerative medicine for diseased hearts. *Hum Cell* 2003; 16:23-30.

=국문 초록=

배경: 허혈성 심근손상으로 인한 심근경색이나 심근병증으로 인한 심근의 비가역적인 손상은 관상동맥 중재술이나 관상동맥 우회로술 등의 치료로 손상 받은 조직의 손상 정도를 경감시키고 추가적인 손상을 방지할 수 있으나, 괴사된 심근세포를 재생할 수는 없다. 결국 중증의 심부전증이 발생한 경우 심근성형술을 시행하거나 심실보조장치 또는 인공심장 등의 한시적 치료 방법이 시도되기도 하지만, 최종적으로 심장이식 이외의 방법은 현재로서는 제시되지 못하고 있다. 심장 공여자의 부족으로 인한 한계를 극복하기 위해서 세포이식을 통한 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이러한 세포치료에서 가장 넓게 시도되고 이용된 장기는 골수이며, 현재까지 골격근아세포, 평활근 세포, 그리고 심근 세포 등 다양한 세포의 이식이 시도되고 있다. 그러나 이러한 골수는 채취하는 과정이 침습적이어서 환자에게 과도한 통증을 주며, 추출된 세포의 수가 부족한 단점이 있어서, 이러한 문제를 해결하기 위해서 상대적으로 접근이 용이하며, 다량의 조직을 확보할 수 있는 지방조직에서의 성체 줄기세포의 추출이 제시되었다. 대상 및 방법: 본 연구에서는 백서의 지방조직을 복부 피하지방 조직과 복강 내 지방조직으로 나누어 각각 분리 추출하여 두 조직에 동일한 과정의 시포 추출 과정을 거친 후, 5-azacytidine을 이용한 심근세포로의 분화 유도를 시도하였다. 심근 분화유도에 적합한 환경을 찾기 위해서 5-azacytidine을 각각 다른 농도로 사용하였고, 지방에서 추출한 성체 중간엽 줄기세포의 심장질환에서의 임상적용의 가능성과 지방조직의 부위에 따른 분화 유도의 차이가 있는지 관찰하고자 하였다. 백서의 복부 피하지방 조직을 적출하여 실험조직 1로 정하였고, 복강 내 대망(omentum)과 후복막 지방조직을 적출하여 실험조직 2로 정하였다. 적출된 조직에서 collagenase, NH₄Cl 등을 이용하여 세포를 추출하였고, 이를 10% FBS를 함유한 DMEM solution에서 배양하였으며, 1차 또는 2차 계대배양을 거쳐서 5-azacytidine을 각각 none, 3 μmol/L, 6 μmol/L, 9 μmol/L의 농도로 첨가하여 심근세포로의 분화를 유도하였다. 4주간의 배양이 끝난 후 각 실험 조직군의 세포들을 cell blocks으로 만든 후에, CD34, heavy myosin chain, troponin T, SMA에 대한 항체를 이용하여 면역형광염색을 시행하였고, 형광염색에 반응을 보인 세포들의 대략적 비율을 비교하였다. 결과: CD34, heavy myosin chain에 대하여는 모두 음성이었으나, SMA에 대해서는 3 μmol/L, 6 μmol/L의 복강 내 지방조직에서 5~10% 정도의 양성반응을 보였고, troponin T에 대하여는 피하지방조직과 복강 내 지방조직 모두에서 6 μmol/L와 9 μmol/L에서 10~15% 정도의 양성 반응을 보였다. 결론: 본 연구 결과, 지방조직에서 추출한 중간엽 줄기세포는 심근세포로 분화할 수 있는 가능성이 충분히 있는 것이 확인되었으나, 분화유도 비율면에서는 만족할 수준이 되지 못하였으며, 심근세포로의 분화는 복부 피하지방과 복강 내 지방조직에서 모두 가능한 것으로 판단되었다.

- 중심 단어 : 1. 세포생물학
2. 세포 이식
3. 심근 세포학
4. 백서