

제1형 당뇨병 치료를 위한 생체 모사 고분자를 이용한 이식된 췌도 세포 생존을 증강 기술

황용화 · 황진욱 · 김민준 · 이동윤

1. 서론

1.1 제1형 당뇨

당뇨(diabetes mellitus)는 인슐린의 결핍으로 인하여 생기는 만성 대사질환으로, 크게 인슐린 의존성인 제1형 당뇨병과 인슐린 비의존성 당뇨병인 제2형 당뇨병으로 구분된다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 따르면, 전세계적으로 2000년에는 1억 7천만 명 이상이 당뇨 질환을 가지고 있으며, 2030년에는 3억 6천만 명이 넘을 것으로 추정하고 있다.¹

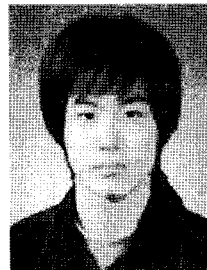
제1형 당뇨병(type 1 diabetes mellitus)은 일종의 자가 면역 질환으로 특정 유전자, 특히 조직적합성유전자(HLA)를 지닌 사람이 환경, 스트레스, 바이러스 등에 노출되어 췌도(pancreatic islet of Langerhans) 베타

세포에 대한 면역반응이 일어나면서 췌도 세포가 파괴되어 인슐린 결핍이 나타난다. 파괴가 진행되면 남아있는 베타세포의 기능에 따라 처음에는 식후 혈당이 정상인에 비해서 높다가 결국 공복 혈당까지 올라가는 상태가 되고, 이 후 모든 베타세포가 파괴되게 된다. **그림 1**은 제1형 당뇨가 생기게 되는 과정을 단계별로 보여주고 있다.

제1형 당뇨가 임상에서 진단이 되고 나면, 남아있는 베타세포로는 정상 혈당으로 돌아오기 힘들다. 따라서 조기 진단하는 방법이 필요하나, 고혈당 발생 이전에 영상학적으로 베타세포 파괴 과정을 인식하는 연구는 아직 초기단계에 머물러 있는 상황이다. 1920년대 인슐린이 처음 사람에게 쓰이면서 제1형 당뇨에 의한 급성 합병증에 의한 사망률은 줄었지만 만성 합병증은 아직도 큰 문제로 남아있다.



황용화
2010 가톨릭대학교 생명공학과(학사)
2010~ 한양대학교 공과대학 생명공학과
현재 (석사과정)



김민준
2010 한양대학교 공과대학 생명공학과(학사)
2011~ 한양대학교 공과대학 생명공학과
현재 (석박사통합과정)



황진욱
2007 충남대학교 생물학과(학사)
2008~ 한양대학교 공과대학 생명공학과
2011 (석박사통합과정 수료)
2011~ (주)오스코텍 연구원
현재



이동윤
1998 한양대학교 생화학(학사)
2000 한양대학교 생화학(석사)
2005 광주과학기술원 신소재공학과(박사)
2005~ 서울대학교 종합약학연구소 연구원
2007 미국 Harvard Medical School
2007~ 박사후연구원
2009~ 한양대학교 공과대학 생명공학과 조교수
현재
2009~ 한양대학교 부설 바이오생명의약연구소
현재 참여교수
2009~ 한양대학교 고령사회연구원 노인성질환
현재 제어연구단 참여교수
2011~ 한양대학교 나노과학연구소 참여교수
현재

Enhancing Viability of Transplanted Pancreatic Islets by Using Biomimetic Polymer to Cure Type I Diabetes Mellitus

한양대학교 공과대학 생명공학과(Yong Hwa Hwang, Min Jun Kim, and Dong Yun Lee, Department of Bioengineering, College of Engineering, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea)

e-mail: dongyunlee@hanyang.ac.kr

(주)오스코텍 연구원(Jin Wook Hwang, OSCOTEC INC., 2-17 Omok-ri, Seonggero-eup Chenonan, Choongnam 331-831, Korea)

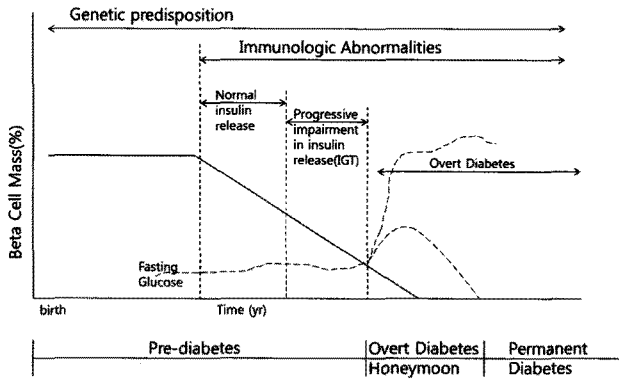


그림 1. 베타세포가 파괴되어 생기는 제1형 당뇨병 단계 과정.

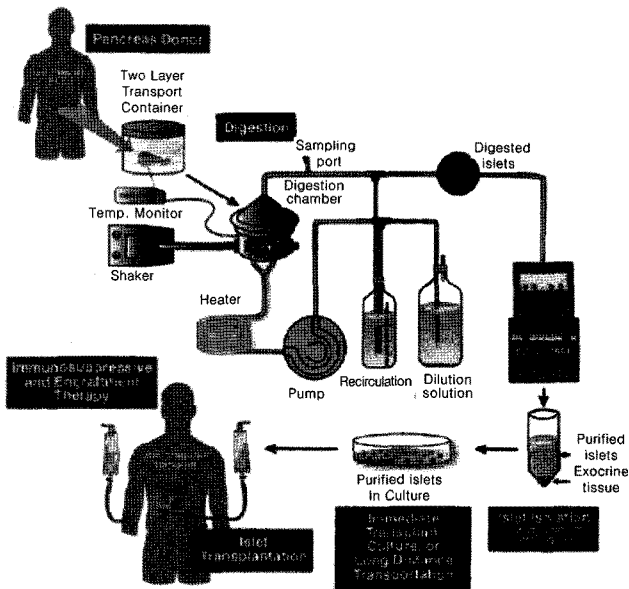


그림 2. 기여자에서 분리된 췌도를 환자에게 이식하는 과정.³

1.2 췌도 세포 이식(Islet Transplantation)

췌장 세포가 파괴되어 생기는 제1형 당뇨병에는 인슐린 치료법 또는 췌도 세포 이식 치료법이 사용되고 있으며, 인슐린 저항성에 의해서 발생하는 제2형 당뇨병에는 경구혈당강하제를 사용하여 인체 내의 혈당을 조절하는 방법이 사용되고 있다. 현재의 당뇨병 치료법은 대부분 인슐린과 경구혈당강하제를 사용하고 있지만, 당뇨병 환자의 혈당을 완벽하게 조절하지 못할 뿐만 아니라 30~50%의 당뇨병 환자에게는 뚜렷한 치료 효과를 나타내지 못하는 경우가 많다. 이에 제1형 당뇨의 궁극적인 치료 방법으로 현재까지 제시된 것은 인슐린을 분비하는 췌장 또는 췌도 세포를 이식하는 것이다. 하지만, 췌장 이식(pancreas transplantation)은 타고형 장기에 비하여 높은 합병증과 이식 후 관리의 어려움을 보이고 있다.² 이에 반하여 췌도 세포 이식(pancreatic islet transplantation)은 반복 시술이 가능하다는 장점을 가지고 있으며, 또한 합병증이 낮아서 환자에게 있어서도 부담이 적다. 췌장 소도의 이식 부위로는 간, 신장, 비장, 복강 등으로 연구가 활발하게 진행되어 지고 있으나, 현재 임상에서 췌도 세포 이식술은 그림 2에서 보는 바와 같이 췌장에서 췌도 세포를 분리하여 간 문맥에 주입하고, 간에 정착한 췌도 세포가 인슐린을 분비하게 하는 방법을 이용하고 있다.

췌도 세포 이식에서의 문제점으로 지적되고 있는 것은 췌장은 다른 장

기에 비해서 기증자의 수가 적고, 분리과정 역시 어렵다는 것이다. 또한 췌도 세포의 간문맥으로의 이식에서 생기는 면역반응이 이식된 췌도 세포의 수를 현저하게 줄어들게 만들기 때문에 이에 대한 해결책이 필요한 실정이다. 이러한 면역반응을 억제하기 위해서 다양한 면역 억제제가 사용되고 있다. 하지만, 면역 억제제는 과다 사용 시 부작용을 초래할 수 있으므로 그 사용량을 조절할 필요가 있다.

1990년대 후반 췌도 세포의 이식은 3명 이상의 공여자의 췌도 세포를 1명의 수여자에게 간문맥을 통해 이식을 해주고, 환자의 면역반응으로 인한 이식된 췌도 세포를 보호하기 위해 면역억제제(sirrolimus, tacrolimus)로 치료한 Edmonton 프로토콜이 췌도 세포 이식으로 각광을 받았다.⁴ A.M. Shapiro 등에 따르면 제1형 당뇨병 환자에게 췌도 세포(6,000~12,000 IE/Kg) 이식 후 4가지 종류의 면역억제제를 Edmonton 프로토콜에 따라 환자에게 복용시킨 결과, 1년 동안 인슐린 사용 없이 혈당조절이 가능함을 보고하였다.⁴ 하지만, 처음 기대와는 달리 5년 안에 많은 환자가 이식된 췌도 세포의 기능을 잃어 인슐린 치료가 필요하게 되었다.⁵ 이후, Edmonton protocol이 세계각국에서 500회 이상 췌도 세포의 이식이 이루어졌으나 대부분의 이식된 췌도 세포는 이식 후 초기에 대부분 그 기능을 상실하게 되어 당뇨병 치료의 효과를 볼 수 없게 되었다.⁶ 이의 주된 원인으로 인식되는 것은 이식한 췌도 세포가 면역반응, 특히 급성 혈액 매개성 염증반응(Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction, IBMIR)에 의해 영향을 받게 되고 산소공급 또한 원활하게 받지 못해 세포 사멸 및 세포괴사로 췌도 세포의 기능을 상실하게 되는 것으로 보고 있다.

Edmonton protocol 이후 췌도 세포 이식에 적합한 방법으로 당뇨의 재유발이 적으면서, 췌도 세포에 독성이 적고, steroid-free의 calcineurin inhibitor를 적게 투여하는 면역 억제제 요법이 중요시되고 있다. 아울러 간문맥을 통한 췌도 세포 이식 후, 췌도 세포의 초기 손상을 줄이고, 이식된 췌도 세포의 생착을 향상시킬 수 있는 방법도 연구되고 있다. 또한, 췌도 세포의 기능과 면역거부 반응을 줄여 생착을 높이기 위한 방법으로 조직공학적인 측면에서의 연구도 활발하게 진행되고 있다. 이를 위해서 간문맥 외의 다른 곳(신장피막 또는 피하)으로 췌도 세포를 이식이 가능하도록 하고, biodegradable scaffolds를 이용하거나,⁷ 췌도 세포를 피막화(encapsulation)하여⁸ 췌도 세포가 혈중에 노출되어 생기는 가장 큰 문제점인 IBMIR등의 문제점들을 해결하고자 하는 노력이 최근에 이루어지고 있다.

2. 알지네이트(Alginate) 고분자를 이용한 췌도 세포의 피막화(Encapsulation)

이종이식 시에 면역세포나 항체의 공격으로 인해 발생하는 면역반응을 극복하기 위하여 췌도 표면 개질화를 통해 췌도를 면역세포로부터 격리시키는 방법이 다양하게 연구되고 있다. 그 중 가장 널리 사용되고 있는 피막재료는 해조류에서 추출한 다당류인 알지네이트(alginate)로⁹ 1980년 Lim, Sun 등에 의해 알려진 생체적합성 고분자이다.¹⁰ 알지네이트를 이용한 췌도 피막화 기술은 이미 많은 연구가 이루어졌으며 네덜란드의 de Vos는 미세피막화 췌도를 실험용 쥐에 이식하여 약 200일간 혈당이 정상적으로 조절되는 것을 확인하였다.¹¹ 이러한 알지네이트 피막화 기술의 기본 원리는 반투과성 막을 형성하는데 있다. 즉, 세포의 외부를 피막을 만들어 영양소(포도당), 산소, 세포 분비 호르몬(인슐린)과 같은

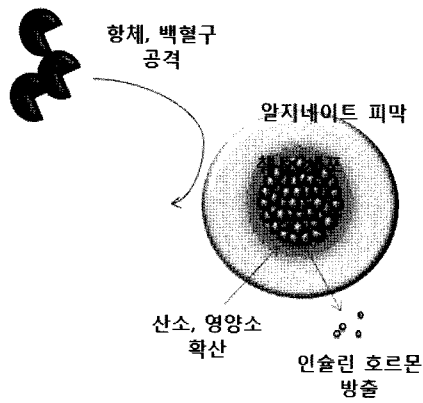


그림 3. 체도 세포의 알지네이트 피막화.

분자량이 작은 물질은 투과할 수 있고 분자량이 큰 면역세포들은 통과할 수 없도록 반투과성 막으로 피막화시킴으로써 면역 격리를 시키는 것이다.

그림 3은 이에 대한 간단한 모식도를 보여주고 있다.

알지네이트 피막화는 크게 거대피막화(macro-encapsulation)과 미세피막화(micro-encapsulation)로 나누어진다. 거대피막화는 평균 2~6 mm의 크기로 한 개의 면역 분리막에 여러 개의 체도 세포를 포함하는 것이다. 반면에 미세피막화는 1 mm 이하의 크기로 하나의 체도 세포를 피막화시키는 것으로 거대피막화에 비해 부피에 대한 표면적의 비율이 높아 산소와 영양소의 확산이 더 좋은 장점이 있다.¹² 미세 피막화는 쉽게 파괴되지 않고 기계적으로 안정하며 제작 절차가 비교적 단순하다는 장점도 있다. 알지네이트 사용의 또 다른 장점들에 대해 알아보면, 알지네이트는 피막 내부의 체도 세포 기능을 방해하지 않는다는 것이다.¹³ 알지네이트는 생리학적인 조건에서 피막화 형성을 가능하게 하는 몇 안 되는 재료 중 하나로, 생리학적 등장액, pH, 그리고 체온에서 피막화가 가능하다. 한편, 체도 세포가 응집되어 부피가 커지게 되면 산소와 영양소의 체도 세포 중심부 확산을 방해하기 때문에 문제가 된다. 알지네이트의 3차원적 피막 구조는 체도 세포가 응집되고 융합되는 것을 막아준다. 마지막으로, 알지네이트 피막화는 소동물, 대동물에 수년간 안정하다는 것이 확인되었다.¹⁴

알지네이트 피막화 기술은 2가 양이온(칼슘이온, 바륨이온)이 포함된 수용액에 알지네이트 방울을 떨어뜨려 교차 결합을 형성하며 피막화시키는 원리를 기본으로 한다. 알지네이트 분자는 그림 4와 같이 mannuronate (M)과 guluronate (G)가 다양한 블록 비율과 서열 순서로 직선 블록을 이루고 있다.

일반적으로 G 블록이 유일하게 2가 이온들을 결합하는 분자로 알려져 있었다. 따라서 알지네이트 젤 형성에는 G 블록이 구조적 특징에 가장 중요하다고 생각되었다. 그러나 최근에 M 블록과 G 블록의 반복적인 배열을 이루는 블록(MG)도 2가 양이온과 함께 교차 결합을 형성한다는 것이 밝혀짐으로써 GG-GG 블록뿐만 아니라 MG-GG, MG-MG 블록도 피막화 형성에 관여한다는 것을 알게 되었다.¹⁶ 알지네이트를 이루는 M, G 블록의 비율과 서열은 알지네이트 피막의 기능에 중요한 역할을 한다. 일반적으로 M 블록 보다는 G 블록의 비율이 높을수록 높은 투과성과 함께 안정한 피막을 형성하는 것으로 보여진다.¹⁷ G 블록의 비율이 높은 알지네이트, G 블록의 비율이 중간 정도인 알지네이트, G 블록의 비율이 낮은 알지네이트를 비교하는 실험에서 G 블록의 비율이 높은 알지네이트가 가장 안정한 결합을 형성하는 것으로 나타났다.¹⁸

이식된 체도 세포의 기능을 오랜 기간 유지하기 위해서는 충분한 산소와 영양소의 공급이 필수적이다. 그러나 알지네이트 피막은 세포와 주변

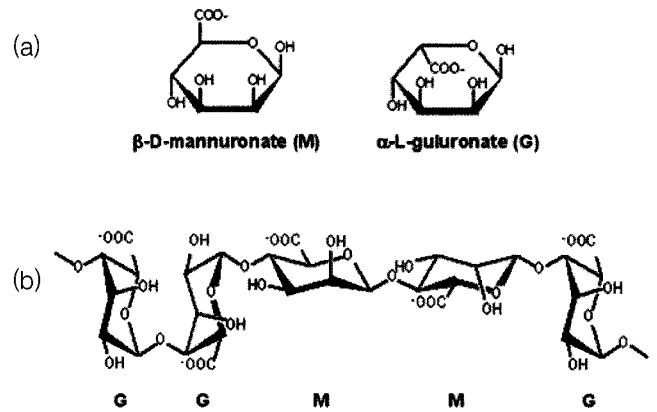


그림 4. (a) The monomers in alginate; (b) The alginate chain.¹⁵

에 형성된 혈관의 직접적인 접촉을 방해한다. 또한 체도 세포에 피막화 처리를 하면 상대적으로 부피가 커지기 때문에 이식 가능한 장소가 복잡으로 제한된다. 대부분의 조직에서 모세혈관으로부터 체도 세포로 산소, 영양소의 최대 확산 거리는 200 μm 이다.¹⁹ 체도 세포는 피막의 표면에서 중심부로 들어갈수록 산소와 영양소를 얻기 힘들어지고 이에 따른 세포 괴사가 발생한다. 알지네이트 피막의 크기를 줄이면 산소, 영양소의 공급 부족도 개선하고, 이식하는 체도 세포의 전체 부피도 줄어들어 복잡이외에 혈관이 풍부한 다른 이식 장소도 모색해 볼 수 있을 것이다.

정전기 액적 발생기(electrostatic droplet generator)를 이용한 알지네이트 방울의 형성 기술 도입은 약 187 μm 크기의 피막 형성을 가능하게 했다.¹¹ 이것은 기존에 800 μm 크기의 피막 보다 4배 정도 작은 크기이다. 그러나 피막 크기를 줄이는 것에도 문제점이 있다. 피막의 크기를 작게 할수록 완전히 알지네이트 안에 피막화되지 못하고 부분적으로 튀어나오는 체도 세포의 비율이 증가하는 것이다.²⁰ 이것은 분명 이식 시에 면역반응을 증가시킬 것이다. 따라서 앞으로의 연구는 알지네이트를 이루는 M, G 블록의 비율, 서열을 고려하고, 세포에 적합한 사이즈로 피막화하여 수술에 적용하는 것이 필요하다. 또한 이러한 피막화의 방법 이외에 요즘은 새로운 방법이 요구되는데, 그 중에 대표적인 방법이 체도 세포의 표면을 생체 고분자물질을 이용하여 직접 개질화하는 기술이 개발 중에 있다.

3. 고분자를 이용한 체도 세포의 표면 개질화 & 피막화

3.1 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 이용한 체도 세포의 표면 개질화

최근에 면역반응을 줄이기 위한 노력으로 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol, PEG)을 사용하여 체도 세포의 표면 개질화(PEGylation)를 시도하고 있다.²¹⁻²⁶ 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 표면 개질화를 처음 시도한 것은 적혈구(RBC)였다.²⁷⁻²⁹ 체도 세포에 폴리에틸렌 글리콜이 화학적으로 붙게 되면 혈장 단백질(plasma protein)의 흡착과 혈소판(platelet)의 접근이 줄어들게 된다. 이것은 이 고분자물질이 수용액상에서 가지는 독특한 성질인 낮은 계면화 에너지, 높은 표면 유동성, 공간적 안정성 때문이다.³⁰

체도 세포의 표면은 콜라겐(collagen) 층으로 이루어져 있다. 이 콜라겐은 주로 아민(NH_2) 잔기를 가지고 있는데, 이 때 폴리에틸렌 글리콜과 아마이드 결합(amide bond)을 이루어 체도 세포주변에 그림 5, 그림 6과 같이 화학적으로 결합을 하게 된다.

이렇게 화학적으로 안정하게 체도 세포에 결합된 폴리에틸렌 글리콜은 이식 후 일어나게 되는 면역 세포(lymphocyte, macrophage)의 공격을 막아주게 된다.^{24,33} 또한, 이 폴리에틸렌 글리콜은 생체 적합성이 뛰어난 물질로 알려져 있기 때문에, 이식 후 체도 세포의 생존율에도 영향을

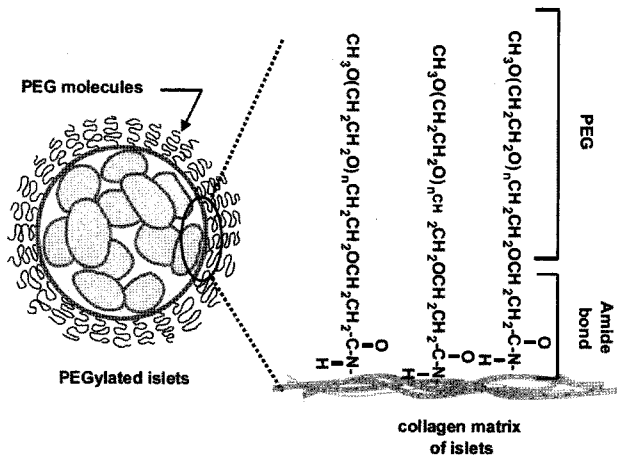


그림 5. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 이용한 체도 세포의 표면 개질화.³¹

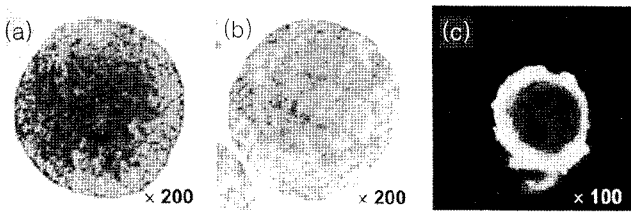


그림 6. 일반적인 체도 세포(a), 폴리에틸렌 글리콜로 표면 개질화한 체도 세포(b), 형광으로 표지한 폴리에틸렌 글리콜로 체도 세포 표면을 개질화한 후, 공초점 현미경(confocal laser scanning microscopic)으로 촬영한 사진(c).³²

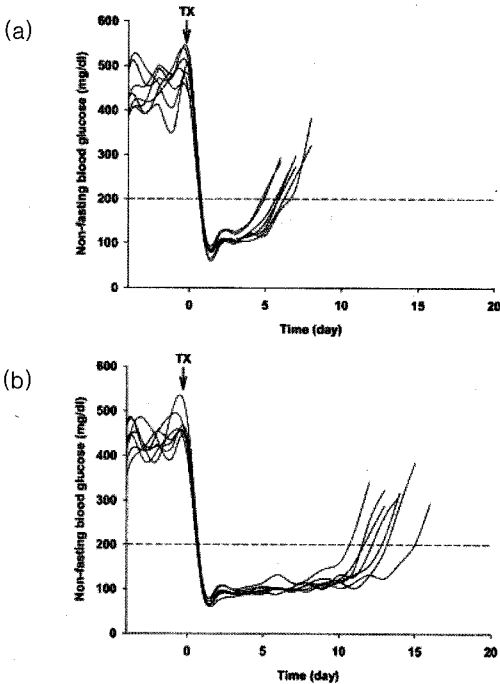


그림 7. 일반 체도 세포(a)와 표면 개질화한 체도 세포(b)의 이종이식 혈당 그래프.³²

미치게 된다. 그림 7에서³² 보는 바와 같이, 일반 체도 세포의 이종 이식 후 면역거부 반응을 일으키는 기간(평균 7일 내)보다 더 향상된 결과(평균 14일 내)를 보이는 것을 알 수 있다. 이것은 이식된 체도 세포의 생존율이 증가했음을 의미한다.

이러한 점에서 폴리에틸렌 글리콜의 체도 세포 개질화는 체도 세포의 활성이나 기능상에는 영향을 주지 않으면서, 세포 면역으로부터 보호를 해주며 여러 사이토카인(cytokine)의 공격을 막아준다고 할 수 있다.

3.2 폴리도파민(Polydopamine)을 이용한 체도 세포의 표면 개질화

해양에서 흔히 볼 수 있는 홍합(mussel)은 영구적인 생물접착의 대표적인 물질로 관심을 끌고 있다. 홍합은 접착단백질(adhesive proteins)을 분비하기 때문에 해양환경 속에서도 안정적으로 붙어 있을 수 있다.³⁴ 홍합의 접착 기능에 핵심 역할을 하는 것은 도파(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, DOPA)이다.³⁵ DOPA는 산화 금속 표면에서 결합을 하거나 아민(amine)이 존재하는 유기체 표면에서 공유적으로 결합을 한다고 알려져 있다.³⁶ 따라서 DOPA의 화학적 결합은 다양한 고분자와의 결합 기능을 제공해 주지만, DOPA가 결합된 고분자는 특정한 종류의 산화물 표면과의 접착을 방해한다. 예를 들어, PEG-DOPA의 결합은 이산화티타늄(TiO₂)에서 성공적인 PEGylation의 전략이지만, 다른 표면에서는 그렇지 못하다.³⁷

카테콜아민(catecholamine)은 다양한 종류의 물질 표면에서 DOPA의 대체물질로써 이용하고 있다. 카테콜아민은 카테콜(catechol)기와 아민기를 가지고 있는데 카테콜은 DOPA 잔기의 바깥 시슬을 이루고 있고, 아민기는 홍합의 접착 단백질에서 라이신(lysine) 잔기의 기능을 가지고 있다. DOPA-lysine motif는 *mytilus edulis* foot protein-5 (Mefp-5)에서 풍부하며, 이것은 홍합에서 물질과 접착 패드(pad)의 결합에서 발견된다. 그림 8은 홍합 접착의 기본적인 모식도를 보여주고 있다.

체도 세포에 있어서 이러한 DOPA의 적용연구가 진행되고 있는데, 앞서 말한 선형 PEG 이외에 6-arm-PEG-catechol를 이용하여 체도

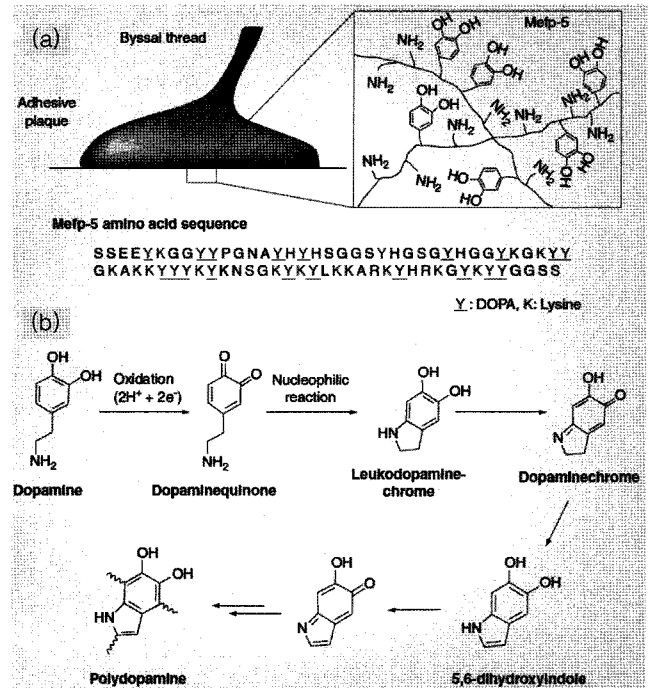


그림 8. 홍합 접착의 분자적 원리. (a) Mefp-5에서 카테콜과 아민의 필수 기능을 구성하는 아미노산 서열, (b) PODA의 화학적 구성.³⁸

세포의 표면을 개질화하는 연구가 진행되고 있다.³⁹ 이러한 시도는 선형 PEG에 비해서 체도 세포 개질화를 더욱 촘촘히 시켜서 면역 세포의 공격으로부터 보호를 해줄 것으로 기대하고 있다. **그림 9**는 6-arm-PEG-catechol를 이용하여 체도 세포 개질화를 시키는 모식도를 나타내고 있다.

이러한 체도 세포를 Edmonton protocol에서 쓰이는 면역억제제

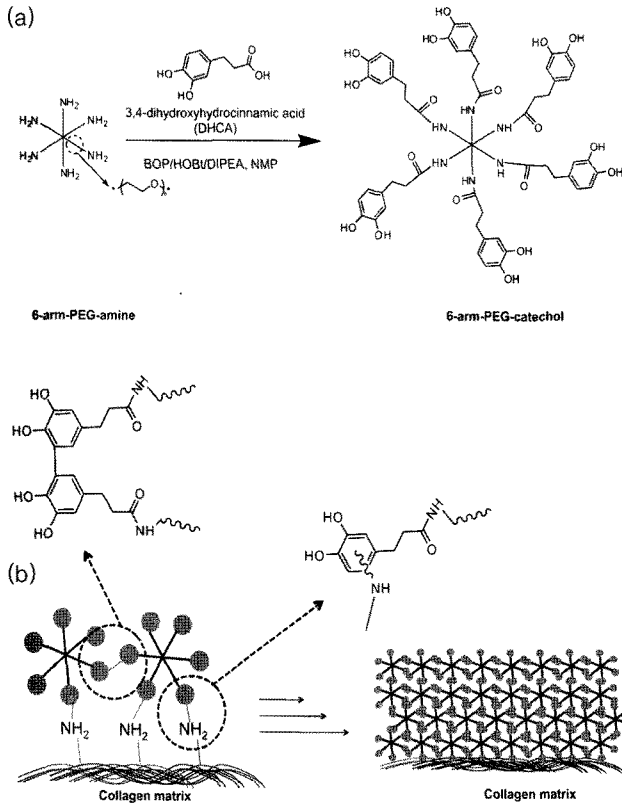


그림 9. 6-arm-PEG-catechol를 이용한 체도 세포 표면을 개질화 모식도.³⁹

(MR1, FK506)와 함께 같이 이종이식을 하게 되면, 6-arm-PEG-catechol이 체도 세포 표면에서 면역 세포의 세포 내 침입을 막아주고, 적은 양의 면역억제제로 인하여 싸이토카인이나 T cell의 공격을 막아 주어 효과적인 치료 효과를 볼 수 있게 된다.

3.3 헤파린(Heparin)을 이용한 체도 세포의 표면 개질화

체도 세포의 간문맥 이식 시 가장 문제가 되는 것으로 지적되고 있는 것은 IBMIR (instant blood mediated inflammatory reaction)이라고 하는 급성혈액매개성 염증반응이다.⁶ 이 반응은 일종의 혈액 응고반응으로 혈소판, 보체(complement)의 활성화 및 중성 과립구(neutrophil granulocyte)와 단핵구(monocyte)의 체도 세포 내 침윤 반응으로 인하여 일어나는 반응이다.⁴⁰ **그림 10**은 IBMIR에 대한 간단한 모식도를 보여주고 있다.

임상에서 체도 세포 동종 이식결과, 이식된 체도 세포가 70%나 파괴된 것이 확인되었는데 이러한 원인으로 크게 지적되고 있는 것이 바로 IBMIR이다.⁴¹ 따라서 이러한 IBMIR을 막기 위한 노력으로 간문맥에 체도 세포 이식 시 수여자에게 항응고제를 같이 넣어 주기도 한다. **표 1**은

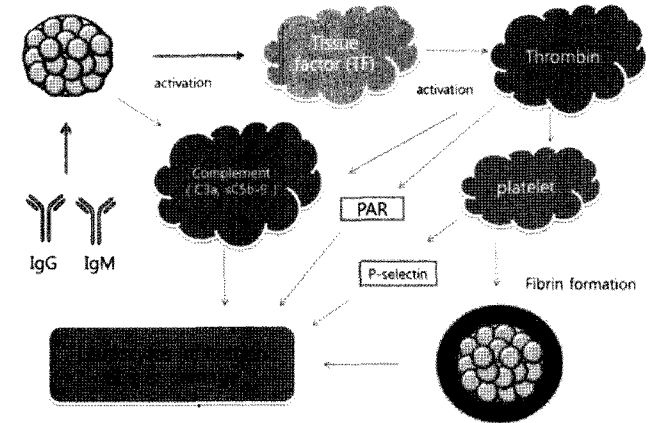


그림 10. 급성혈액매개성 염증반응(IBMIR).

표 1. 체도 세포 이식 시 수여자에게 처리하는 물질(PIC=pro-inflammatory cytokines; IP=intraportal(Iy))⁴²

Agent	Mechanism	Experimental experience	Clinical experience/Applicability
Heparin	Anti-coagulation		In current practice islets are infused in heparinized solution
Low-molecular-weight dextran sulfate	Anti-coagulation complement inhibition	<i>In vitro</i> : Prevention of all aspects of IBMIR in tubing loops model <i>In vivo</i> : Adequate anti-coagulation but limited complement inhibition in monkeys prolonged survival of pig islets transplanted IP in diabetic mice. Reduction of IBMIR in pig-to-NHP islet Tx	Clinical trials in HIV patients in which the antiviral effect of dextran sulfate is tested
Nacystelyn	Anti-coagulation Anti-inflammatory and anti-oxidant effects	<i>In vitro</i> : Prevention of islet-induced coagulation and platelet consumption in tubing loops model	<i>N</i> -acetylcysteine was tested in clinical trials in liver Tx to prevent ischemia-reperfusion injury
Melagatran	Anti-coagulation via thrombin inhibition	<i>In vitro</i> : Reduction of all aspects of IBMIR in tubing loops model	Clinical trials for anti-coagulation in deep venous thrombosis and atrial fibrillation
Anti-TNF- α monoclonal antibody (Infliximab)	Blockade to TNF- α prevents stimulation of its receptor		No clinical difference in a randomized clinical trial in islet Tx
15-Deoxyspergualin	Blockade of PIC production via NF- κ B inhibition	<i>In vitro</i> : Long-term euglycemia after monkey islet allo-Tx	Clinical trials in combined kidney/islet Tx
Activated protein-C	Anti-coagulation Fibrinolysis NF- κ B inhibition	<i>In vitro</i> : Reduction of coagulation, PIC release, cell infiltration, and insulin dumping in syngeneic mice after IP islet Tx	Clinical trials for treatment patients with severe sepsis
Statins	Inhibition of thrombin formation Immunomodulatory and anti-inflammatory effects	<i>In vitro</i> : Dogs transplanted with a marginal autologous islet mass achieved and maintained euglycemia	Clinical trials in heart and kidney Tx

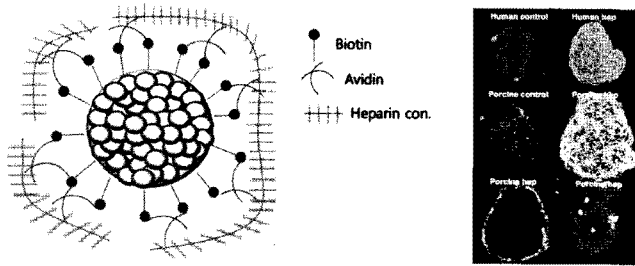


그림 11. 헤파린이 췌도 세포 주위에 결합되어 있는 모식도(좌)와 사람과 돼지 췌도 세포에 헤파린이 붙어있음을 확인한 모습(우).⁴³

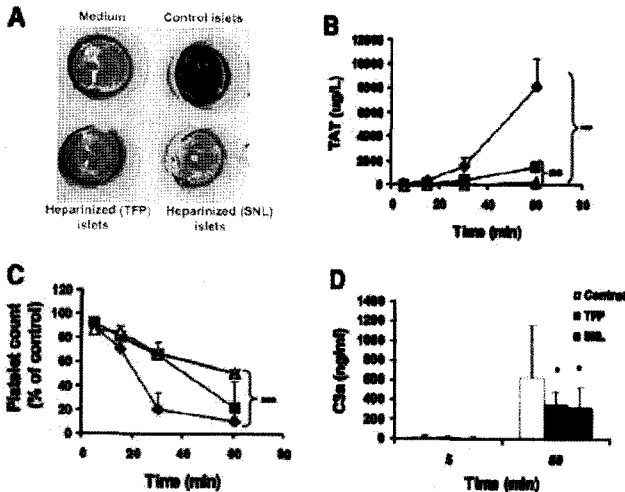


그림 12. 헤파린으로 피막화된 췌도 세포가 IBMIR에서 보이는 영향.⁴³

IBMIR을 막기 위해서 시도했던 연구를 정리한 것이다.

하지만, 이러한 물질들을 사용하여도 IBMIR을 막는데 큰 효과를 보이지 않고 있으며, 여러 부작용을 낳는 한계를 가지고 있다. 따라서 최근 연구에서는 이러한 물질의 사용보다는 췌도 세포 표면을 개질화시켜서 단점을 최소한으로 줄이고자 하는 방향으로 진행되고 있다. 그 중 대표적인 예가 그림 11에서 보는 바와 같이 췌도 세포 바깥에 아비딘(Avidin)과 바이오틴(Biotin)을 매개로 하여 헤파린을 화학적 결합으로 붙여서 이식을 하는 것이다.⁴³

췌도 세포의 헤파린 표면 개질화는 그림 12에서 보는 바와 같이 혈액 응고 반응을 유효히 줄어든게 함을 확인할 수 있었고, IBMIR을 일으키는 원인으로 지적되는 여러 요소들의 활성도 상당히 줄어들게 하고 있음을 알 수 있다.

이렇듯, 췌도 세포의 헤파린 개질화는 기존의 방법들과는 다르게 간혹 맥 이식 시 출혈의 위험(bleeding risk)이 없이 IBMIR에 대한 효과를 기대할 수 있으며, 췌도 세포의 기능에도 영향을 주지 않아 제1형 당뇨병을 치료하는데 있어서 탁월한 방법으로 이용될 수 있다. 또한 헤파린은 많은 혈청 단백질들과 친화성을 가지고 있고⁴⁴ 혈관 내피 성장인자(vascular endothelial growth factor)와⁴⁵ 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor)를 가지고 있어⁴⁶ 혈관을 재형성을 하는데 있어서 촉진적인 역할을 할 수 있다고 알려져 있다.

4. 생체모사 고분자를 이용한 췌도 세포의 생분해성 지지체(Scaffold)



그림 13. 키틴과 키토산의 구조.

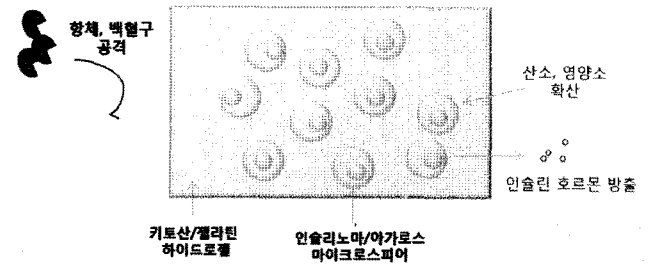


그림 14. 키토산/젤라틴 하이드로젤을 이용한 지지체의 모식도.

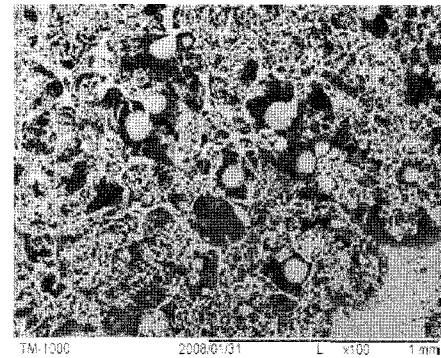


그림 15. 아가로스로 피막화된 췌도 세포를 거대 피막화하고 있는 키토산/젤라틴 하이드로젤.⁴⁹

4.1 키토산(Chitosan)

키토산은 새우와 같은 갑각류의 껍질에 포함된 키틴(chitin)을 탈아세틸화 하여 얻어진 천연 고분자이며 용해 상태에서 양 전하를 띠는 천연 동물성 식이섬유이다. 키틴과 키토산은 생체적합성이 좋고 독성이 적으며 값이 싸고 다루기가 쉽다는 장점을 갖고 있다.⁴⁷ 따라서 두 재료는 생물 의학 물질로서 식품 첨가제, 의약품, 조직공학 등에 광범위하게 사용되고 있다. 특히, 키토산은 생체적합성, 독성이 적다는 장점 때문에 다양한 주입형 재료로 연구되고 있다.⁴⁸ 그림 13은 키틴과 키토산의 구조를 보여주고 있다.

Glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate가 포함된 키토산 수용액은 온도 감응성 재료로서 실온에서는 액체이며 37 °C에서는 하이드로젤이 된다. 이러한 성질을 이용하여 주입형 재료로 유용하게 활용될 수 있는데, K. C. Yang 등은 키토산 하이드로젤을 주입형 인공췌장의 재료로서 사용하였다.⁴⁹ 그림 14에서 보는 바와 같이 췌도 세포에 대해 생체적합성이 좋은 아가로스(agarose)로 미세피막화를 하고 키토산/젤라틴 하이드로젤로 거대피막화를 하였다. 여기서 젤라틴은 키토산 하이드로젤의 기계적 강도를 높이기 위해서 사용되었으며, 키토산/젤라틴 수용액은 미세피막화된 췌도 세포를 주입하기 위한 운반체로서 활용되었다.

In vitro 실험에서 키토산으로 거대피막화하여도 췌도 세포는 인슐린을 정상적으로 분비한다는 것을 확인하였으며 IL-1 β TNF-α와 같은 염증을 유발하는 화학물질을 처리한 경우에도 거대피막화 처리된 췌도 세포는 더 좋은 생존율을 보인 것을 확인하였다. 실제로 키토산/젤라틴으로 거대피막화된 췌도 세포를 이종 이식한 결과, 대식 세포, T 세포의 침투를 효과적으로 막아주었고 성공적으로 혈당을 유지하는 것이 관찰하였다.

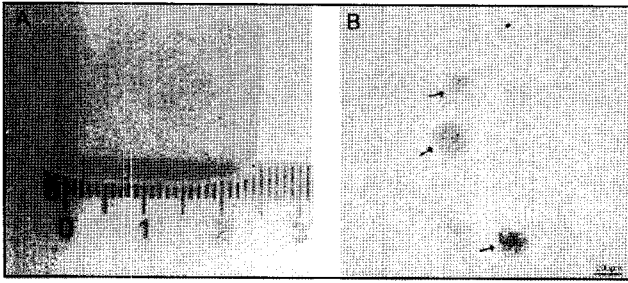


그림 16. (A) 혈장-섬유아세포젤 (B) 혈장-섬유아세포젤 안에 들어간 체도 세포.⁵³

그림 15는 이러한 키토산/젤라틴 하이드로젤을 전자현미경(SEM)을 통해서 확인한 결과이다.

이와 같이 키토산 하이드로젤을 주입형 운반체로 사용할 경우 면역반응으로부터 체도 세포를 효과적으로 보호할 수 있으며, 그에 따라 체도 세포는 생존율이 향상되고 더 오랜 기간 안전하게 기능을 유지할 수 있다.

4.2 섬유아세포(Fibroblast)

체도 세포의 피하 이식 시에는 혈관이 부족하기 때문에 산소, 영양소의 공급이 결핍된다는 문제점이 있다. 이를 해결하기 위해서 염기성 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor), 혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor)와 같은 성장 인자들이 연구되고 있는데, 이 성장인자들은 조직 재생, 신생 혈관형성을 촉진시킨다는 결과를 보이고 있다.⁵⁰ 여기서 섬유모세포성장인자는 혈관 세포의 성장, 이동, 분화를 유도하는데 가장 큰 역할을 하고 있으며, 혈관 내피세포 성장인자는 혈관계의 분화에 필수적인 요소로 알려져 있다. 섬유아세포는 손상 받은 조직에 염증반응 신호 전달을 촉진하고 세포 사이에 콜라겐, 피브로넥틴 등의 세포외기질을 합성하여 상처 치료, 조직 회복에 중요한 역할을 한다.⁵¹ 또한 섬유아세포는 섬유모세포성장인자, 혈관 내피세포 성장인자를 분비하여 내피세포의 혈관 형성을 촉진하며 조절한다.⁵²

피브린과 섬유아세포를 사용하여 만든 젤을 그림 16과 같이 지지체로 체도 세포 이식에 사용한 예가 있다.⁵³ 피브린젤은 3차원적 구조를 형성하여 체도 세포의 성장과 분화를 촉진해주기 때문에 함께 사용되며,⁵⁴ 혈장-섬유아세포젤과 함께 체도 세포를 피하에 이식한 동물 실험 결과, 체도 세포만을 이식한 대조군이 혈당을 제대로 조절하지 못하는 것과는 달리 정상 혈당을 유지시킬 수 있었다. 또한, 이식된 체도 세포 주변에 신생 혈관이 관찰되었으며 콜라겐과 같은 세포외기질도 확인되었다. 이와 같이 체도 세포의 피하 이식 시 섬유아세포를 이용한 재료를 만들면 부족한 신생혈관 형성을 촉진하여 산소, 영양소로 인한 세포 과사를 극복할 수 있다.

5. 결론

성공적인 체도 세포 이식을 위해서는 현재 임상에서 가장 문제로 지적되고 있는 혈액응고 반응과 보체의 활성화 및 염증반응을 보이는 IBMIR을 극복할 수 있어야 하며, 이식된 체도 세포의 생존률을 높여야 한다. 이를 위해서 현재 여러 연구가 진행 중에 있는데, 성공적인 체도 세포 이식을 위한 조건들이 완벽하게 확립되지 않은 실정이다. 성공적인 체도 이식을 위해서는 가장 먼저 체도 세포의 준비과정에서 기증자의 최적 조건을 유지해야 하며, 다양한 원천 세포들로 다량의 세포 수를 확보를 하며, 최적의 기능을 유지할 수 있는 분리, 정제 및 배양 조건들의 정립이 필요하다. 또한 이종 이식에 따르는 이종 면역반응을 극복할 수 있는 최적의 면역억

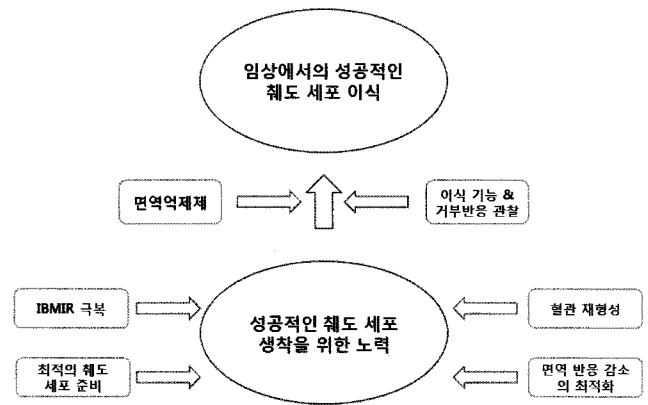


그림 17. 임상에서 성공적인 체도 세포 이식을 위한 전략.

제 요법의 개발이 필요하며, 세포의 apoptosis를 최소화 하기 위한 노력과 혈관 재생성을 위한 조건들이 필요하며, 이식 후, 세포의 기능과 거부반응 등을 꾸준히 관찰할 수 있는 방법의 개발이 필요하다고 할 수 있다. 그림 17은 성공적인 체도 세포 이식을 위한 전략을 간략히 보여주고 있다.

현재 다양한 생체 모사 고분자를 이용하여 성공적인 체도 세포 이식을 위한 연구가 활발히 진행이 되고 있는데, 그러기 위해서는 이러한 기술들을 임상에서 현실화시킬 수 있어야 한다. 또한 간문맥 이식뿐만 아니라, 다양한 경로를 통한 체도 세포의 이식 방법을 적용하여 최적의 조건을 찾는 방법도 병행이 된다면, 당뇨병의 세포 치료(therapeutic treatment)로서 새로운 자리를 차지할 수 있을 것이라 기대된다.

감사의 글 : 이 논문은 2011년도 한양대학교 고령사회연구원의 재정적 지원으로 수행된 것임(HY-2011-T).

참고문헌

1. World Health Organization. Diabetes. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/diabetes/en/> [cited 2007 sep 18].
2. J. M. Venstrom, M. A. McBride, K. I. Rother, B. Hirshberg, T. J. Orchard, and D. M. Harlan, *JAMA*, **290**, 2817 (2003).
3. S. Merani and A. M. Shapiro, *Clin. Sci(Lond)*, **110**, 611 (2006).
4. A. M. Shapiro, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **343**, 230 (2000).
5. A. M. Shapiro, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1318 (2006).
6. E. A. Ryan, *et al.*, *Diabetes*, **54**, 2060 (2005).
7. J. M. Dufour, *et al.*, *Tissue. Eng.*, **11**, 1323 (2005).
8. J. Beck, *et al.*, *Tissue. Eng.*, **13**, 589 (2007).
9. F. Lim and A. M. Sun, *Science*, **210**, 908 (1980).
10. R. Cornolti, M. Figliuzzi, and A. Remuzzi, *Cell Transplant*, **18**, 195 (2009).
11. P. de Vos, *et al.*, *Biomaterials*, **27**, 5603 (2006).
12. P. de Vos, A.F. Hamel, and K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, **45**, 159 (2002).
13. W. M. Fritschy, G. H. J. Wolters, and R. Vanschilfgaarde, *Diabetes*, **40**, 37 (1991).
14. P. Soonshiong, *et al.*, *Lancet*, **343**, 950 (1994).
15. P. Sriamornsak and S. Sungthongjeen, *Aaps. Pharmscitech.*, **8**

- (2007).
16. I. Donati, *et al.*, *Biomacromolecules.*, **6**, 1031 (2005).
 17. A. Martinsen, G. Skjakbraek, and O. Smidsrod, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 79 (1989).
 18. B. Thu, *et al.*, *Biomaterials*, **17**, 1031 (1996).
 19. W. Mueller-Klieser, J. P. Freyer, and R. M. Sutherland, *Brit. J. Cancer*, **53**, 345 (1986).
 20. P. De Vos, *et al.*, *Transplantation*, **62**, 893 (1996).
 21. J. L. Panza, *et al.*, *Biomaterials*, **21**, 1155 (2000).
 22. D. Y. Lee, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 372 (2002).
 23. J. Y. Jang, D. Y. Lee, Park, S. J. Byun, Y., *Biomaterials*, **25**, 3663 (2004).
 24. D. Y. Lee, J. H. Nam, and Y. Byun, *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, **15**, 753 (2004).
 25. J. L. Contreras, *et al.*, *Surgery*, **136**, 537 (2004).
 26. D. Xie, *et al.*, *Biomaterials*, **26**, 403 (2005).
 27. M. D. Scott, *et al.*, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7566 (1997).
 28. M. D. Scott, *et al.*, *Blood*, **93**, 2121 (1999).
 29. M. D. Scott, *et al.*, *Blood*, **94**, 2135 (1999).
 30. M. Amiji and K. Park, *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, **4**, 217 (1993).
 31. Y. Byun, D. Y. Lee, and J. H. Nam, *Biomaterials*, **28**, 1957 (2007).
 32. D. Y. Lee, *et al.*, *Tissue. Eng.*, **12**, 615 (2006).
 33. J. Y. Jang, *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 3663 (2004).
 34. J. H. Waite, *Integr. Comp. Biol.*, **42**, 1172 (2002).
 35. V. V. Papov, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 20183 (1995).
 36. H. Lee, N. F. Scherer, and P. B. Messersmith, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12999 (2006).
 37. J. L. Dalsin, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4253 (2003).
 38. S. Hong, *et al.*, *Nanomedicin (Lond)*, **6**, 793 (2011).
 39. J. H. Jeong, *et al.*, *Biomaterials*, **32**, 7961 (2011).
 40. J. Yang, *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **117**, 124 (2007).
 41. W. Bennet, *et al.*, *Diabetes*, **48**, 1907 (1999).
 42. D. J. van der Windt, *et al.*, *Xenotransplantation*, **14**, 288 (2007).
 43. B. Nilsson, *et al.*, *Diabetes*, **56**, 2008 (2007).
 44. J. Hirsh, *et al.*, *Chest*, **119**, 64S (2001).
 45. N. Ferrara, H. P. Gerber, and J. LeCouter, *Nat. Med.*, **9**, 669 (2003).
 46. J. Schlessinger, *et al.*, *Mol. Cell.*, **6**, 743 (2000).
 47. N. V. Majeti and K. Ravi, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1 (2000).
 48. E. Ruel-Gariepy, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **203**, 89 (2000).
 49. K. C. Yang, *et al.*, *Xenotransplantation*, **15**, 407 (2008).
 50. A. Prokop, *et al.*, *Diabetes Technol. Ther.*, **3**, 245 (2001).
 51. G. M. Beattie, *et al.*, *Diabetes*, **51**, 3435 (2002).
 52. H. Liu, B. Chen, and B. Lilly, *Angiogenesis*, **11**, 223 (2008).
 53. M. P.-Basterrechea, *et al.*, *Tissue. Eng. Part A*, **15**, 569 (2009).
 54. B. Amory, J. L. Mourmeaux, and C. Remacle, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **24**, 91 (1988).