

Ⅲ : 바이오장기용 무균돼지 생산 및 전임상 적용을 위한 장기기능 평가(I)

1. 개요

연간 약 15,000명 이상의 환자가 장기 이식을 필요로 하지만 실제로 이식이 이루어지는 경우는 3,000명 이하로 심각한 이식 장기 부족에 직면해 있다 (1-3). 그러므로 현재 면역거부반응 조절 시스템 개발을 통한 다양한 종류의 바이오장기용 무균돼지 생산시스템을 개발하고, 이를 통해 인체에 적용할 수 있는 형질전환 무균돼지를 대량생산하고 산업화하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (4-7). 이들 연구의 최종 목표는 바이오장기 생산기술을 실용화하여 장기 부족 및 기능 이상으로 고통 받는 환자들에게 장기를 공여하여, 이들의 목숨을 구하고 더불어 삶의 질을 향상시키는데 있다. 이와 같이 이종간 장기 이식은 사람 장기 기증자의 심각한 부족을 해결할 수 있는 가장 가능성 있는 방안들 중 한 가지로 여겨지고 있으며, 현재 바이오-의학 연구에 있어서 바이오장기는 매우 큰 관심을 불러일으키고 있다.

초기에는 침팬지와 원숭이와 같은 영장류가 유전학적으로 사람과 가깝고 면역학적으로 유사하기 때문에 장기 공여 동물로서 고려되었지만 이들 영장류는 느린 성장률, 적은 산자 수, 사육의 어려움, 작은 크기와 같은 많은 단점을 가지고 있다.

그러나 돼지는 사육하기 쉽고, 사람 장기와 생리학적, 해부학적으로 유사하며, 빠른 성숙속과 짧은 임신기간 및 많은 산자 수를 가지기 때문에 사람과의 종간 이식에 있어 영장류를 뛰어넘는 가장 적합한 이종장기 공여 동물로서 생각되고 있다 (8-11). 만약 이식시 사람에서 면역 반응을 일으키지 않는 이상적인 무균돼지가 생산되고, 안전성을 포함한 전임상 적용 및 평가기술이 확립된다면 사람 이식 장기의 부족을 해결할 수 있을 것이다. 이 원고에서는 면역거부반응 극복 기술을 이용한 바이오장기용 무균돼지 생산 방법을 간단히 설명하고 바이오장기 전임상 적용을 위한 장기 기능 평가 방법에 대해 자세히 기술하고자한다.

2. 면역거부반응 극복 기술을 이용한 바이오장기용 무균돼지 생산

1) 이식거부반응 극복

돼지-영장류간 장기이식 시 가장 문제가 되는 것은 보통 초급성 거부반응, 급성 맥관성 거부반응/체액성 이종이식 거부반응, 면역 세포 매개성 거부반응 그리고 만성 거부반응이라 불리는 면역 기작의 연쇄 반응에 의한 이식 장기의 거부반응이다. 수 분 내에 이식 장기의 거부반응을 일으키는 초급성



한 호 재
수의생리학 박사
전남대학교 교수
hjhan@chonnam.ac.kr



류 정 민
전남대학교 수의과대학
jmryu1559@gmail.com

거부반응은 돼지-영장류간 장기 이식에서 최초의 장벽으로 생각되고 있다 (12-14). 알파-1,3-갈락토오스 전달효소의 항원결정인자가 사람, 유인원, 원숭이에서는 없기 때문에 특정 탄수화물인 알파-1,3-갈락토오스 전달효소는 사람과 영장류에 돼지의 장기를 이식했을 때 초급성 거부반응을 일으키는 주요한 요인이다 (15, 16). 알파-1,3-갈락토오스 전달효소 유전자를 제거한 “knock-out” 돼지는 갈락토오스를 발현하지 않기 때문에 초급성 거부반응을 완화시키는데 사용되고 있다 (17-19). 하지만 갈락토오스 전달효소를 막는 것은 초급성 거부반응을 억제하지만, 급성 맥관성 거부반응은 막지 못하는 심각한 문제점을 갖고 있다.

전형적 보체 경로도 초급성 거부반응에 관여하는 것으로 알려졌다. 사람 혈액에 노출된 돼지의 내피에서 일어나는 기작은 사람 혈액에 노출된 사람 내피와 비교해 봤을 때 유사한 기작도 존재하지만, 트롬보모듈린 (thrombomodulin)과 조직 인자 경로 억제제 같은 내피세포 단백질과 연관된 응고 억제 경로의 효과를 감소시켜 혈전증을 일으킬 수 있는 것으로 알려졌다 (13, 20).

급성 맥관성 거부반응/체액성 이종이식 거부반응은 이식 후 24시간 이내에 발생해 조직을 점차적으로 파괴하는 거부반응이다. 급성 맥관성 거부반응은 비-갈락토오스 전달효소 항체와 이식 장기의 내피 활성을 포함하는 이종-반응 항체와 보체 그리고 응고 시스템에 의해 개시되는 것으로 알려져 있다. 이러한 급성 맥관성 거부반응은 체액성 반응과 B 림프구, T 림프구의 세포 반응에 의해 수 일 안에 발생한다.

CD154/CD40 경로에 대한 항체는 이종 항원에 반응하는 T 세포와 B 세포의 거부 반응을 완화시키는데 사용되고 있다 (21, 22). 직/간접적인 이종 항원에 의한 감작은 영장류의 T 세포에 돼지의 항원을 제시할 수 있는 것으로 알려졌다.

“항원제시세포”에서 발현되는 CD86등을 포함하는 B7군 단백질들과 CD40과 CD80은 활성화된 T 세포에서 주로 발현되는 리간드인 CD154와 CD28에 결합하거나 CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)에 결합한다. 그러므로, CD28과 B7군 단백질을 막는 것은 영장류에 돼지의 장기를 이식할 때 나타나는 거부반응을 완화시키는데 이용될 수 있다.

자연살해세포 (natural killer cells)도 사람에게 돼지의 장기를 이식했을 때 발생하는 거부반응에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (23, 24). 돼지 이종장기 이식 실패의 초기 원인은 미세혈관 혈전증을 일으키는 항체-매개성 내피 손상인 것으로 생각된다 (25). 그러므로 돼지-영장류 이식에 있어 미세혈관 혈전증에 관여하는 요인은 이식 전에 형성된 비-갈락토오스 전달효소에 대한 항체의 존재, 비-갈락토오스 전달효소 항원에 대한 매우 낮은 농도의 항체, 자연살해세포 혹은 대식세포의 활성, 선천적 응고 조절 기능부전 등으로 생각된다 (26).

2) 유전자 조작

유전자 조작 돼지는 연구뿐만 아니라 상업적으로도 큰 가치를 가지며, 사람의 질병에 대한 모델로도 이용할 수 있다 (27, 28). 돼지의 유전자 조작을 위해 레트로바이러스 벡터 (29), 렌티바이러스 벡터 (30), 정자-매개 유전자 치환 (31)과 체세포 핵 치환이 사용되고 있다.

렌티바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달은 높은 효율을 보이기 때문에 세포에 변형 유전자를 삽입하는 실험에 다양하게 사용되었고, 정자-매개 유전자 치환 또한 비 바이러스성 플라스미드 벡터와 함께 사용되고 있다.

체세포 핵 치환은 유전자가 조작된 체세포를 이용해 돼지를 생산하기 위한 최적의 도구가 되고 있다 (32). 최근 이종장기용 돼지를 만드는데 있어 Cre 부위-특이 DNA 재조합효소 시스템이 생체 내 DNA를 조작하는 유용한 방법으로 이용되고 있다. CMV (cytomegalovirus) 프로모터에 EGFP (Enhanced green fluorescent protein) 유전자를 삽입하여 loxP 종결 염기서열에 대한 Cre-매개성 절단이 일어나는 경우 EGFP 유전자가 발현되도록 만든 리포터 돼지가 만들어졌다 (33, 34). 이러한 리포터 돼지는 재조합 동물 조직을 만들었을 때 Cre-매개성 절단이 일어나는지의 여부를 생체 외 실험을 통해 확인할 수 있게 해준다. 돼지의 유전자 조작 모델은 위에서 말한 면역거부반응을 극복하기 위해 주로 연구되었다.

초급성 거부반응은 알파-1,3-갈락토오스 전달효소의 항체와 밀접한 관련이 있기 때문에 일반적으로 갈락토오스 전달효소 유전자를 제거하는 것이 이종장기 이식에 있어 중요한 예방적 유전자 조작으로 생각되고 있다. 이러한 갈락토오스 유전자 제거 "knock-out" 돼지는 다른 유전자 변형을 도입할 수 있는 기본적인 "표준 플랫폼" 돼지로 역할을 할 것으로 생각되고 있다 (35). 초급성 거부반응은 GGTA1 발현기능이 결여된 유전자 조작 장기 공여 돼지를 이용하여 극복될 수 있을 것으로 보인다. 사람 알파-1,2-푸코실 전달효소나 사람 베타-1,4-N-아세틸글루코사민 전달효소 III 유전자를 삽입하여 경쟁적 당화를 촉진함으로써 알파-1,3-갈락토오스 전달효소의 항원제시부위를 줄이려는 시도가 이루어졌다 (36).

또한 사람의 분해촉진인자 (human decay-accelerating factor; hDAF), CD46, CD59과 같은 사람 보체조절단백질에 대한 유전자 조작 돼지도 만들어졌다 (37, 38). 자연살해세포 매개성 거부반응을 감소시키기 위한 유전자 조작 돼지도 확립되었으며, 최근에는 이종장기 이식을 위해 세 가지 유전자 (CD59/DAF/hTM)가 삽입된 돼지가 만들어졌다 (39, 40). 이러한 유전자 삽입 또는 제거를 통해 만들어진 돼지의 장기를 영장류에게 이식하면 초급성 거부반응, 급성 맥관성 거부반응, 그리고 면역매개성 거부 반응을 막아 생존을 연장시킬 수 있을 것으로 기대된다.

3) 돼지 유래 감염성 인자 극복

돼지 장기를 환자에 이식했을 경우, 이식을 실시한 환자에 감염성 인자들이 전파될 수 있는 위험성에 대한 경각심이 높아지고 있으며, 돼지가 가지고 있는 다양한 바이러스 중 돼지의 유전자내에 삽입되어 있는 내인성 레트로바이러스가 가장 중요한 위험인자 중의 하나로 생각되어지고 있다 (41, 42). 이종장기 이식용 돼지의 주의 깊은 선별과 돼지의 유전자 조작을 통해 이러한 내인성 레트로바이러스나 다른 병원체에 의한 감염 위험을 줄일 수 있을 것이다.

돼지에는 사람에게 친화성을 보이는 내인성 레트로바이러스 A, B와 돼지 세포에만 감염되는 내인성 레트로바이러스 C의 두 가지 형태가 존재하는데, 이 중 내인성 레트로바이러스 A와 B는 대부분의 돼지의 유전자에 존재하는 것으로 알려졌다 (43, 44). 짧은 또는 긴 기간 동안 내인성 레트로바이러스를 HEK-293 세포에 감염시킨 경우에도 숙주세포나 내인성 레트로바이러스의 LTR (Long terminal repeat) 서열에는 변화를 일으키지 않았다 (9). 이종 장기 이식 시 발생 할 수 있는 초급성 거부반응을 줄이기 위해 사용되어지는 항 갈락토오스 항체의 제거와 돼지의 유전자 조작을 통한 사람 보체조절단백질의 발현 제거는 숙주의 방어시스템을 무너뜨려 돼지 장기 유래의 바이러스에 의한 감염을 용이하게 할 수 있다.

혈중 돼지 내인성 레트로바이러스의 양은 갈락토오스 전달효소를 제거한 돼지 또는 갈락토오스 전달효소를 제거한 돼지 장기를 이식받은 개코원숭이에서 증가되지 않았다 (45).

돼지 장기를 이식 받은 환자에서 레트로바이러스 감염의 위험을 줄이기 위해서 1) 장기 공여 돼지의 유전적 검사를 통하여 레트로바이러스 감염 여부를 정확히 확인, 2) 이식 후에 항바이러스인자의 투여, 3) 바이러스 백신, 4) RNA 간섭 (interference)을 이용한 바이러스 복제 억제, 5) 다양한 항체요법, 6) 항바이러스 제한인자를 이용한 증식 억제법 등이 이용되고 있다 (46). 돼지 내인성 레트로바이러스 이외에도 다양한 바이러스 (돼지 사이토메갈로 바이러스, 헤르페스 바이러스, 헤파티티스 E 바이러스)들이 잠재적 위험을 가지고 있으므로 이종장기 이식 전 제거되거나 억제 되어야한다 (47).

3. 전임상 적용을 위한 바이오장기 기능 평가 기술

돼지의 장기를 사람에게 적용할 경우 사람과의 생리학적 상이성에 대한 적절한 대처의 부재로 인해 다양한 문제가 파생될 가능성이 높다 (48). 그러므로 장기 공여 동물에 대한 이상적인 생리학적 평가법의 확립 및 정확한 생리학적 자료의 구축은 필수적이라 할 수 있다.

현재 비침습적으로 돼지와 사람 장기의 생리학적 지표를 측정하고, 그 결과를 비교, 분석하여, 바이오장기로서의 유용성을 평가해 보는 연구가 진행되고 있다. 이를 통해 빠른 시기에 적절한 공여 돼

지를 선별하여 선택적으로 사육 및 관리함으로써 경제적 효과를 가질 수 있는 표준 평가 방법이 확립 될 것으로 기대되고 있다.

따라서 여기에서는 환자에 적합한 장기 공여 돼지의 선별 및 기능 정상성 판정을 위해 이종간 장기 이식의 주요대상이 되는 심장, 폐, 간, 신장 및 주요 혈관에 대한 생리학적 모니터링 방법에 대해서 기술하고자 한다.

1) 심장

심장은 전신 순환계를 뒷받침하며 인체에서 하나밖에 존재하지 않는 중요 장기이다. 따라서 사람에서 동종 심장 이식은 전적으로 뇌사자의 기증에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 동종 장기 이식의 대체로 돼지 심장의 이용은 심장 기능에 이상이 있는 환자에서 궁극적인 해결책이 될 수 있다 (49-51). 하지만 이러한 이종간 심장이식을 위해서는 돼지와 사람 심장 사이의 해부학적/생리학적 평가가 이루어져야만 한다.

크기와 형태는 비슷하더라도 돼지의 심장이 기능적으로 적절치 못하다면 돼지의 심장을 이종간 장기이식에 이용할 수 없을 것이다. 방사선, 심초음파, 다검출기전산화촬영 (MDCT), ^{99m}Tc 동위원소를 이용한 핵의학 영상장치를 이용하여 돼지의 심장에 대한 평가가 이루어졌다.

심장 기능의 평가치는 평가법에 의해 차이가 날 수 있기 때문에 사람에서 이용되는 방법을 이용하여 측정된 평가치를 사람과 비교함으로써 사람과 돼지 심장의 기능적 차이를 확인하는 실험이 이루어졌다.

① 방사선 촬영

척추심장점수 (vertebral heart score:VHS)를 평가하여 미니돼지와 일반돼지의 흉강 내 정상 심장 위치를 확인한 결과에 따르면, 사람과는 달리 돼지의 심장은 장축을 따라 후방으로 회전되어 우심실이 좌심실에 비해 더 뒤쪽에 위치하는 것으로 관찰되었다.

이러한 차이는 앞쪽에서 뒤쪽으로 더 타원형을 나타내는 돼지의 흉강과, 직립보행 (upright posture)을 하는 사람과 제행운동 (unguligrade)을 하는 돼지의 체위 차이에 의한 것으로 생각되고 있다.

또한 미니돼지와 일반돼지의 척추심장점수를 평가한 결과 장축의 길이에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 단축의 길이는 미니돼지에서 더 짧은 것으로 관찰되었다 (그림 1, 표 1) (52).

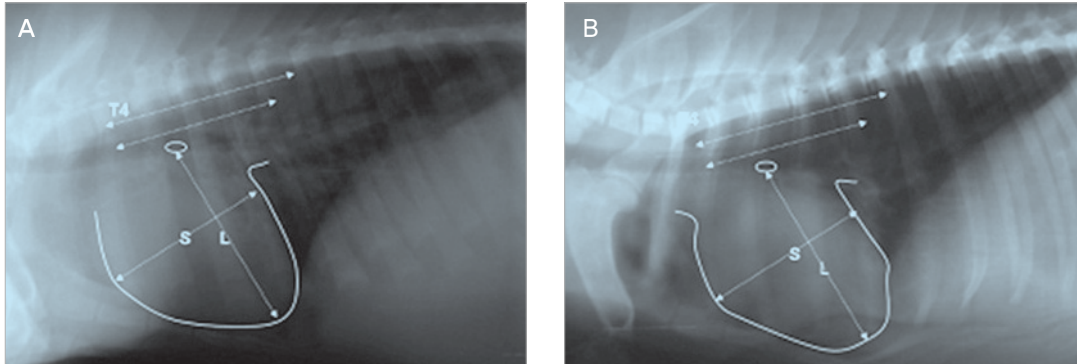


Figure 1. Lateral radiographic view of a conventional pig and a micropig. The images show the vertebral heart score (VHS) measurement method using the lateral chest radiograph. A: representative picture of conventional pig, B: representative picture of micropig. L: long-axis heart dimension, S: short-axis heart dimension, T4: fourth thoracic vertebra.

< Table 1. The vertebral heart score of conventional pigs and micropigs >

	Conventional pig	Micropig
Long-axis (L)	4.65±0.15	4.82±0.14
Short-axis (S)	4.40±0.01	3.78±0.09
Vertebral heart score (VHS)	9.05±0.15	8.6±0.14

② 심초음파 촬영

심초음파는 다양한 심혈관계 질환을 진단하는데 있어 중요하게 활용되고 있으며, 이차원과 도플러 심초음파를 통해 심장의 해부학적 구조, 심실 기능, 혈액동학적 교란 등의 다양한 정보를 얻을 수 있다. 심초음파를 이용해 심장 주요 혈관의 혈액동학적 평가와 심장의 해부학적 및 기능적 평가가 실시되었다.

일반돼지와 미니돼지의 심장 구조에는 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었지만, 좌심실 박출속도 (Left ventricle outflow track velocity), 증감도, 단축율 (Left ventricle fraction shortening)은 미니돼지에서 현저하게 낮은 것으로 나타났다. 이는 미니돼지와 일반돼지의 심장 형태와 크기의 차이에 의한 것으로 생각되고 있다. 사람과 돼지의 심초음파 평가치는 유사한 것으로 확인되었다 (그림 2, 표 2-3) (52).

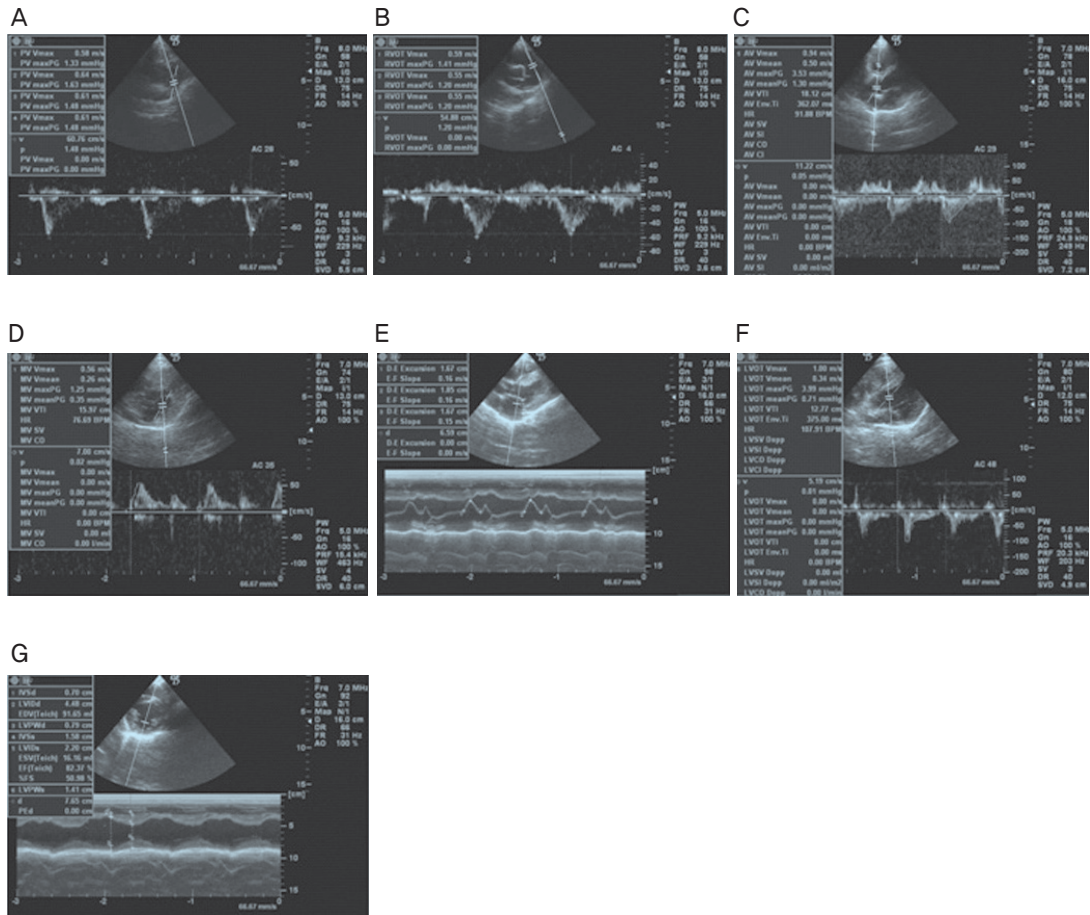


Figure 2. Representative images of echocardiography. A: pulmonic valve trace, B: right ventricle trace, C: aortic valve trace, D, E: mitral valve trace, F, G: left ventricle trace.

< Table 2. Comparison of the values of micropigs and normal humans measured by 2D echocardiography >

	Human	Micropig
End diastolic volume of left ventricle (ml)	84.70±24.6	70.27±21.40
End systolic volume of left ventricle (ml)	35.20±13.9	25.95±4.15

〈 Table 3. Comparison of the values of micropigs and normal humans measured by doppler echocardiography 〉

	Human	Micropig
Left ventricular outflow tract peak velocity (m/s)	0.99±0.21	0.85±0.01
Left ventricular outflow tract velocity time integral (cm)	20.00±4.00	13.35±1.68
Mitral valve E-wave peak velocity (m/s)	0.75±0.16	0.53±0.05
Mitral valve A-wave peak velocity (m/s)	0.55±0.18	0.34±0.02
E/A ratio	1.50±0.50	1.63±0.11
Mitral valve deceleration time (ms)	183.00±38.00	228.71±32.78

③ 다검출기전산화촬영 (Multi-detector computed tomography; MDCT)

다검출기전산화촬영을 이용한 미니돼지 심장의 해부학적/생리학적 평가를 실시하여 확장기말 심실 용적 (End diastolic volume), 수축기말 심실용적 (End systolic volume), 일회박출량 (stroke volume), 심박출량 (cardiac output; l/ml), 심근용적 (myocardial mass) 및 관상동맥의 형태학적 구조에 대한 연구를 실시하였다. 미니돼지와 일반돼지 사이에 관상동맥의 형태학적 차이는 관찰되지 않았다. 미니돼지와 일반돼지의 박출계수는 각각 59%와 52.93%로 유의적인 차이는 관찰되지 않았고, 사람의 박출계수가 50~55%인 것을 고려했을 때, 돼지의 심장을 사람에 이식 시 충분히 기능할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 또한 심초음파를 이용한 박출계수에 비해 MDCT를 이용하여 얻어진 수치가 더 낮았지만 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. 이는 체중, 나이, 개체 등의 차이와 측정방법의 차이에 의한 것으로 생각되고 있다 (그림 3-4, 표 4) (53).

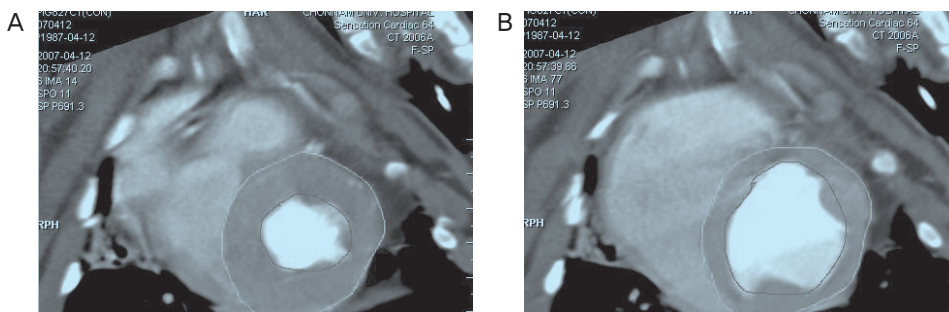


Figure 3. Left ventriculogram by computerized tomography (A: end-systolic phase, B: end-diastolic phase) in a micropig

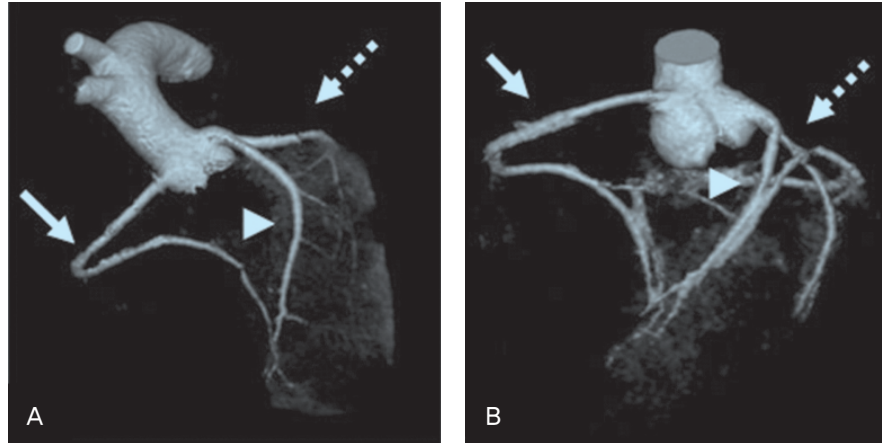


Figure 4. Coronary circulation by computerized tomography in a conventional pig (A) and a micropig (B). Arrow: right circumflex artery (RCA), Arrowhead: left anterior descending artery (LAD), Arrow with dotted line: left circumflex artery (LCX)

< Table 4. Comparison of ejection fraction (EF) detected by multidetector row computed tomography (MDCT) and echocardiography in conventional pigs and micropigs >

	Ejection fraction (%)	
	MDCT (n=3)	Echocardiography (n=5)
Conventional pig	52.93±3.10	65.47±5.170
Micropig	59.00±5.56	58.40±8.180

④ ^{99m}Tc-tetrofosmin을 이용한 핵의학적 평가

^{99m}Tc-tetrofosmin을 이용한 핵의학적 심장 생리 평가에서는, 미니돼지의 심박출량 및 심실의 운동성을 파악하여 정확한 심장 생리 평가법 구축에 관한 연구를 실시하였다 (54).

이러한 평가법은 심장 관류 결손을 확인하고 관상동맥 질환을 진단하는데 특이적인 방법으로 알려져 있다. 수축기말 심실용적은 10ml로 측정되었고 확장기말 심실용적은 49ml로 측정되어 약 79%의 박출계수 (Ejection fraction; EF)를 가지는 것으로 보고되었다. 또한 심첨과 심실 외측벽에서 이상이 관찰되었지만 결손 부위의 움직임이 정상으로 나타나 관류 결손은 아닌 것으로 관찰되었다 (그림 5-7) (55, 56).

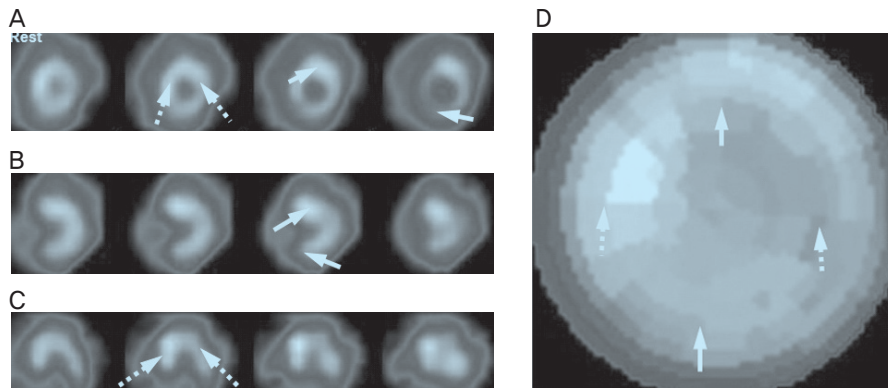


Figure 5. Cardiac perfusion images. A-C: These images showed myocardial perfusion (Yellow arrow: anterior wall, Yellow dotted arrow: septal wall, white arrow: inferior wall, white dotted arrow: lateral wall). Cardiac short-axis (A), vertical long-axis (B), horizontal longaxis (C) was represented. The polar map (D) an image showing quantified values of perfusion of each cardiac region as a map.

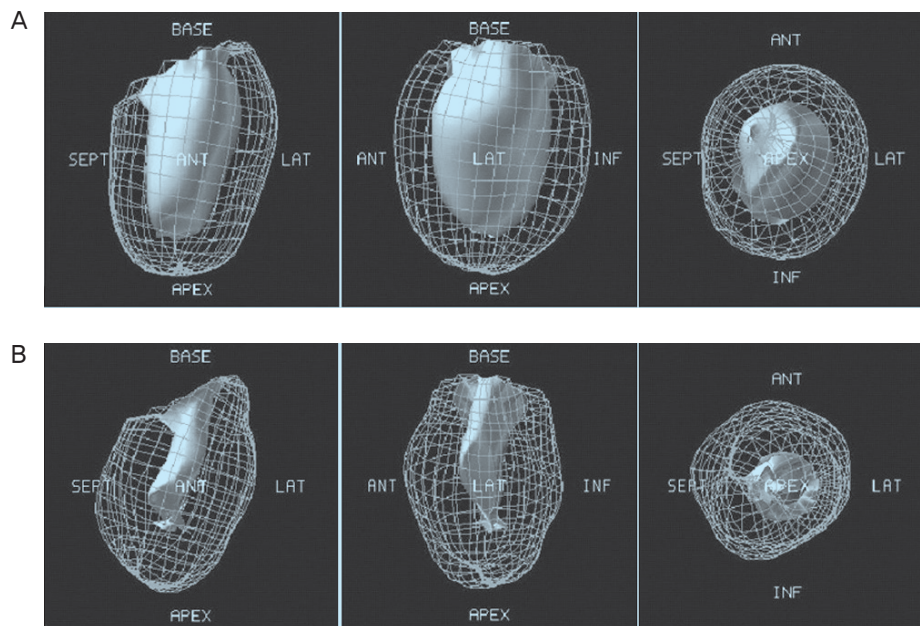


Figure 6. These images represent the cardiac wall motion reconstructed as 3 dimensional image. The cardiac wall motion images showed a visualization of the radioactivity of ^{99m}Tc -tetrofosmin in the heart and cardiac perfusion volume. A: end-diastole volume B: end-systole volume.

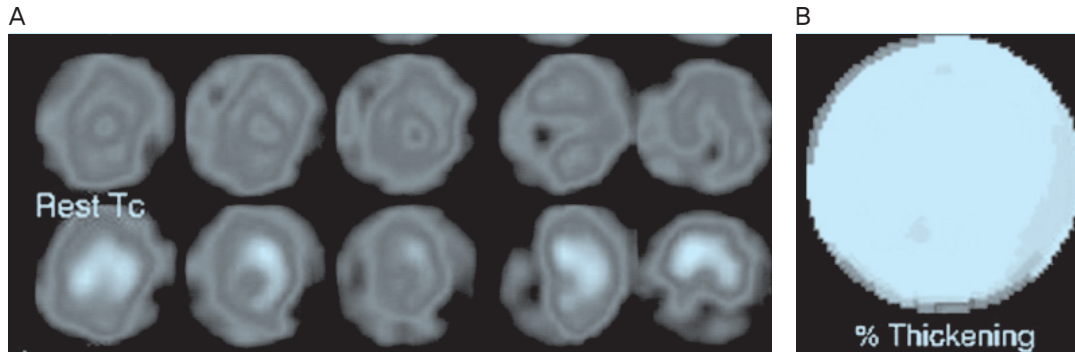


Figure 7. Images representing the quantitative wall motion and thickening that provides evidence of the ventricular function. A: thickening (above: end-diastolic image, below: end-systolic image), B: thickening map

⑤ 심장 이식 시 거부 반응

사람의 면역반응조절단백질인 분해촉진인자 (human decay-accelerating factor)의 유전자를 삽입한 돼지 심장에 사람 혈액을 관류하였을 때, 초급성 거부반응이 일어나지 않고 심장의 신진대사와 기능이 비교적 안정적으로 유지되는 것으로 보고되었다 (57, 58). 분해촉진인자 유전자 삽입 돼지를 이용하였을 때 초급성 거부반응이 나타나지 않고 이식 후 최대 6개월까지 생존하는 것으로 관찰되었지만, 알파-1,3-갈락토오스 전달효소 유전자를 제거한 돼지의 심장 이식은 체액성 이종이식 거부반응이나 만성 거부반응을 일으켜 심장 이식에 실패하였다 (59). 최근 심장 판막의 이종 이식을 위해 판막의 석회화에 있어 알파-1,3-갈락토오스 전달효소 항원의 역할을 알파-갈락토오스 전달효소를 가진 개체와 결여된 개체를 통해 연구되었으나, 돼지-영장류간 심장 이종이식의 성공률을 증가시키지 못하는 것으로 확인되었다 (60). 따라서 거부반응은 돼지의 심장을 이용한 이종장기이식을 위해 반드시 극복되어야함을 보여준다.

이러한 연구들을 바탕으로 성공적인 돼지 이종장기 이식을 위한 선행조건이 제시되었다. 1) 이소 이식된 돼지 심장은 적어도 6개월간 생존하고 기능 할 수 있어야 하며 2) 동소 이식된 돼지 심장은 몇몇 영장류의 경우 6개월 이상, 보통은 3개월 이상 지속적으로 생존하고 기능 할 수 있어야 한다. 3) 심각한 소모성 응고병증 (consumptive coagulopathy)이 없어야 하며 4) 감염이나 악성종양과 같은 면역억제 관련 합병증의 발생이 낮아야 한다 (61). 또한 성공적인 이종 심장이식을 위해서는 환자의 선별도 고려되어야 한다 (62).

- 다음호에 계속 -