

Experience of Hanyang ALS Clinic for Autologous BM Stem Cell Therapy in the Patients with ALS

김 승 현

한양대학교 의과대학 신경과학교실

서 론

끊임없는 자가 재생능력과 신체내의 모든 조직으로 분화 가능한 능력을 가진 줄기세포를 이용해 난치성 질환에 대한 정복을 위한 21세기 생명과학분야의 관심은 신경계 질환 영역에서도 연구가 활발히 진행 중에 있다. 특히 신경계가 타 장기에 비해 재생능력이 약하지만 신경계 퇴행성질환 및 뇌혈관 질환 등에서도 신경세포 및 조직의 소실 및 손상에 대해 재생능력이 있을 것이며 줄기세포를 이용한 치료방법의 개발은 21세기 국가경쟁력의 핵심전략산업으로 자리를 잡아가리라 기대한다. 그러나 실제적인 임상시도에서는 아직까지는 진정한 의미에서 줄기세포를 이용한 신경재생이라는 분야는 많은 난제가 있기에 줄기세포를 이용한 신경보호치료 혹은 약물전달방법의 도구로서 이용하는 치료 등이 현실적인 접근방법이라고 판단된다.

신경계 뇌질환에서의 줄기세포 치료술

신경퇴행성 질환에서도 줄기세포를 이용한 대체치료가 연구되었는데, 파킨슨병의 쥐모델에서 배아줄기세포를 주입하였을 때 도파민신경세포의 기능을 획득함이 확인되고,^{1, 2} 척수손상 쥐모델에서도 배아줄기세포의 효과가 입증되고 운동신경세포로의 분화가 확인되었다.³ 그러나, 이러한 매력적인 특징들에도 불구하고 배아줄기세포 획득과정에서 비윤리적 문제와 기형종 등 종양의발생가능성들로 인하여최근에는 연구의 진행이 원활히 이루어지지 않고 있으며, 상대적으로 윤리적인 문제와 이상반응의 가능성이 적은 성체줄기세포의 적용가능성이 대두되고 있다. 살아있는 생명체에 있어서 성체줄기세포는 일차적으로 조직을 유지하고 수선하는 역할을 한다. 이러한 성체줄기세포는 여러 장기와조직에서 발견되는데 뇌, 골수, 말초혈액, 혈관, 근육, 피부와 간 등이 대표적인 장기이며, 다른 조직세포로의 분화가능성(transdifferentiation)이 입증되면서 세포치료의 한 영역으로 대두되었다.

성체줄기세포 중 골수유래 줄기세포가 신경계 조직으로 분화됨이 발견되면서 배아줄기세포, 태아줄기세포, 신경계줄기세포를 대신할 대체치료제로 각광받고 있는데, 특히 In vivo 또는 임상시험에서 종양의 발생이 보고된 예가 없으며 환자본인의 골수에서 줄기세포를 획득할 수 있고 이로 인해 면역거부 반응을 최소화 할 수 있는 장점을 특징으로 한다. 골수유래 줄기세포 이식치료는 현재까지 크게 두가지 방향으로 시도된다. 첫째는 세포대체(Cell replacement) 효과를 기대하는 것으로 파킨슨병, 헌팅톤병, 척수손상성실조증, 외상성뇌손상 등에 의한 세포소실을 대체하고자 시도된다. 둘째는 유전자 운반을 목적으로 하는데 줄기세포 자체의 신경성장인자(neurotrophin), 사이토카인(cytokine), 세포부착물질(cell adhesion molecule) 등의 생성능력을 바탕으로 신경보호효과를 기대하는 방법과 유전자 조작을 통해 특정단백질이나 효소결핍질환을 치료하는 방법이 있다.

골수유래 줄기세포 중 Mesenchymal Stem Cells(MSCs)는 특히 신경조직으로의 분화능력 뿐만 아니라 성장인자 및 사이토카인의 분비능력이 탁월하다. MSCs는 Hematopoietic

stem cells(HSCs)의 정착력(localization), 자가재생능력(self-renewal), 분화능력을 유지하기 위한 미세환경을 개선 할 뿐만 아니라,⁴⁻⁶ 동시 이식을 통해 HSCs의 engraft를 향상시킬 수 있으며 이식에 따른 부작용을 최소화할 수 있다.^{7, 8} 이러한 능력들은 세포사이의 상호작용, 사이토카인과 성장인자의 분비에 의한 결과이다. 1996년 Haynesworth 등은 G-CSF, Stem cell factor(SCF), leukemia inhibitory factors (LIF), M-CSF, IL-6, IL-11 등 MSCs의 여러 인자 분비능력을 확인하였다.⁹ 또한, MSCs는 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-15, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Flt-3 ligand, SCF 의 mRNA를 발현한다.¹⁰ 이러한 분비능력은 신경보호인자치료로써 MSCs의 사용가능성을 시사한다. 이외에도 MSCs는 세포치료제로써의 몇 가지 장점을 가지고 있다. Expansion 능력이 높고, 유전적으로 안정되어 있으며, 또한 쉽게 수집되고 이송의 편리성으로 임상연구에 적합하며, 유전자를 포함한 단백질 및 효소 등의 공급 인도자(delivery method)로써의 역할도 기대할 수 있다.¹¹ 또한, 강력한 면역억제능력과 손상부위로의 이주능력을 가지고 있어 다양한 영역에서의 치료효과가 기대된다.^{12,23,24}

이상의 근거들을 바탕으로 본 교실에서는 루게릭병(근위축성측삭경화증, ALS) 쥐 모델 및 환자에서 신경보호적 측면에서의 줄기세포치료를 시도하고 있으며 이에 대한 경험과 결과를 기술하고자 한다.

MSCs를 이용한 루게릭병 쥐모델에서의 줄기세포 치료

1994년 mutant human Cu/Zn-superoxide dismutase를 이용한 루게릭병 쥐모델이¹³,¹⁴ 소개된 이후에 루게릭병의 In vivo model 연구가 활발히 진행되고 있다. 쥐 골수세포¹⁵ 또는 사람의 제대혈 유래 세포^{16, 17}를 이용하여 루게릭병 쥐모델에 적용된 예에서 운동능력의 10-20% 정도 증가와 수명의 연장능력이 확인된 이후 루게릭병 쥐모델에서의 줄기세포치료가 활발히 이루어 졌다. 하지만, 위 연구들은 복강내 또는 정맥내 줄기세포주입연구로써 대부분의 줄기세포가 중추신경계로 도달하지 못하는 단점을 가지고 있다. 이러한 한계점을 극복하기 위해 경막내주입법 또는 cistern magna를 통한 뇌실내주입법이 시도되었다.¹⁸ 위 연구에서는 1X10⁵개의 세포가 사용되었는데 수명이나 운동능력의 향상을 가져오지는 못했으나, 소뇌의 Purkinje cell에 근접한 세포의 이동과 지주막하공간을 통한 세포의 넓은 이동과 분포가 확인되었다.

이전의 결과들을 바탕으로 MSCs의 루게릭병 쥐모델에서 효과를 판정하고 유효한 세포수(적정농도)를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 모두 4 groups 으로 나누어 각 15마리의 쥐모델을 목표로 하였으며, 60일령에 5 μ l의 뇌척수액에 세포를 희석하여 cistern magna 를 통해 세포를 주입하였다(Figure 1).

줄기세포의 효과를 검증하기 위한 방법으로 Rotarod를 포함한 behavior test 와 병리조직학적 검사(ongoing)를 시행하였다. 그래프에 나타나는 봐와 같이 투여된 세포의 수에 따라 rotarod test 의 각 군별 차이가 확인되었으며, Kaplan-Meier method를 이용한 수명비교에서도 각 군별 차이가 보여(Figure 2), 주입된 줄기세포의 용량이 증가할수록 기능적인 악화속도가 감소하며 수명의 연장효과가 있음이 입증되었다.

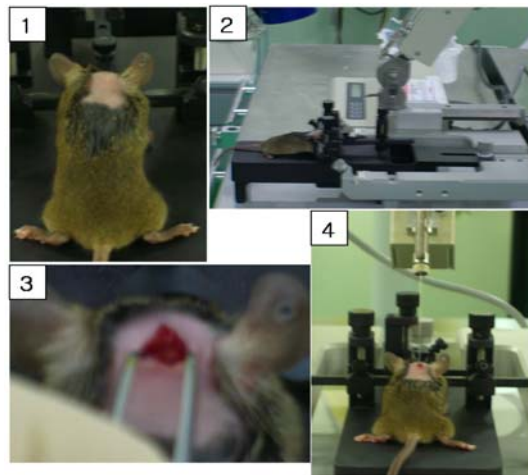


Figure 1. Cisterna magna injection

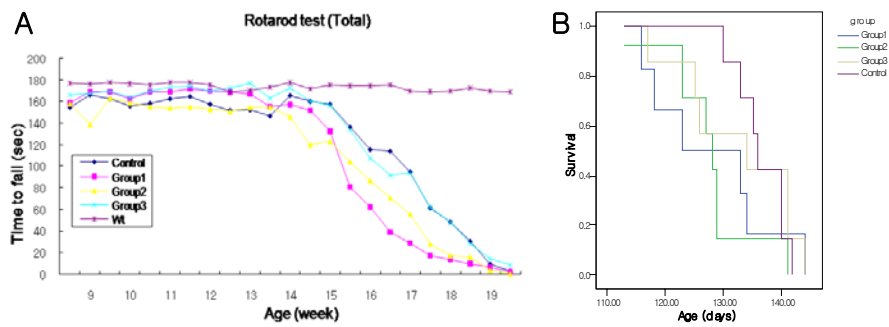


Figure 2. Rotarod test(A) and Survival analysis(B)

자가골수유래 줄기세포(Autologous MSCs)를 이용한 루게릭병 환자에서의 줄기세포 치료

루게릭병 환자에 있어서 줄기세포치료법은 파괴된 운동신경세포의 재생효과보다는 자가골수유래 성체줄기세포의 특징인 다양한 신경성장인자 및 항염증성 사이토카인이 풍부하다는 점을 이용하여 전임상연구결과(루게릭병 동물모델을 이용한 연구 및 뇌경색모델에서의 줄기세포의 신경보호효과에 대한 규명)를 바탕으로 하여 신경보호적 측면에서 치료를 계획하고 식약청 및 기관윤리위원회의 승인을 득한 후 연구자 임상이 수행 중에 있다.

줄기세포를 이용한 루게릭병 환자 치료는 2001년 Janson 등에 의해 최초로 보고되었다. 3명의 루게릭병 환자를 대상으로 하였으며 성체 말초혈액에서 분리된 CD34+ hematopoietic stem cell이 사용되었다. 3명의 환자에서 각기 다른 용량의 세포수가 사용되었는데($2 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$), 2명의 환자에서 주관적인 임상양상의 호전을 나타냈으나 객관적인 지표로서의 효과를 입증하지는 못하였다.¹⁹

MSCs를 이용한 루게릭병 줄기세포치료가 Mazzini 등에 의해 시도되었다. 남자3명, 여자4명의 환자로 시작되었고 이어서 2명의 환자가 추가되어 이들 환자에서의 임상척도의 변화를 보여주었다. 임상척도로는 ALS functional rating scale(ALSFRS), Norris scale, bulbar score, MRC grade 가 사용되었는데, 이 중 ALSFRS의 3년 이상 경과곡선을 보여 줌으로써 효과를 입증하고자 하였다. 하지만, 이들의 연구에는 몇가지 한계점들이 있었다. 연구에 포함된 환자의 질병 진행 정도가 너무 다양하여 객관적으로 통계적 수치화하지 못한 점과, ALSFRS 곡선을 면밀히 살펴보면 질병의 진행이 너무나 완만한 환자가 많아서 임상연구에 적합하지 않은 서서히 진행되는 루게릭병 환자가 다수 포함되거나 루게릭병의 진단자체가 잘못되었을 가능성이 있다고 판단된다. 또한, 줄기세포를 투여하기 위하여 수술적인 방법을 이용한 직접 척수내주입법을 사용하였는데, 환자에게 너무 침해적인 투여법이라는 점에서 윤리적인 문제가 있었다.²⁰⁻²²

현재까지 진행되었던 극소수의 이상시도의 문제점을 고려하여 본 교실에서는 루게릭병 환자에서의 줄기세포치료연구의 문제점을 보완하기 위해 다음의 사항들을 고려하였다. 첫째, 시술과정으로 인해 환자에게 부담이 될 수 있는 수술적 방법을 통한 척수내 직접 주입법 대신 기존 동물실험의 결과들을 바탕으로 경막내 주입법을 택하였다. 둘째, 치료 효과를 증진시키기 위하여 한달 간격으로 2차례 줄기세포치료를 하였다. 셋째, 3개월 간의 Lead-in period(도입기)를 두어 임상척도에 나타나는 질병의 경과양상을 관찰하고 치료기의 질병 경과양상과 비교함으로써 치료 효과여부를 객관화하고자 하였다. 넷째, 환자가 주관적으로 나타내는 증상들은 기술적 분석을 실시하여 bias를 최소화하였다. 다섯째, 연구 대상 환자의 포함조건 및 제외조건을 두어 homogenous group이 되도록 하였다. 본 연구의 포함조건으로는 25세 이상 80세 이하의 환자, El escorial Criteria 에 의한 루게릭병으로 진단된 환자 중 Probable ALS 이상, ALSFRS-R 점수가 21점 이상인 자, 자가 도보나 보호자 도움 하에 외래에 방문할 수 있는 환자를 대상으로 하였다. 연구는 3차례의 입원과 최초 치료 후 6개월까지의 추적관찰기간이 소요된다(Figure 3)

현재까지 18명의 환자가 줄기세포연구에 참여하였으며(Figure 3), 2008년도에 추가 10명이 진행 중에 있다. 치료 효과 판정을 위한 임상척도로는 ALSFRS-R, Norris scale, Appel scale, Pulmonary function study, MRC grade를 사용하고 있으며 이 중 ALSFRS-R의 경과에는 다음과 같다. 그래프(Figure 4)에서 보듯이 치료전의 환자의 증상의 변화에 비해 치료 후 환자의 점수의 감소속도가 완연해 지는 것을 관찰할 수 있었다.

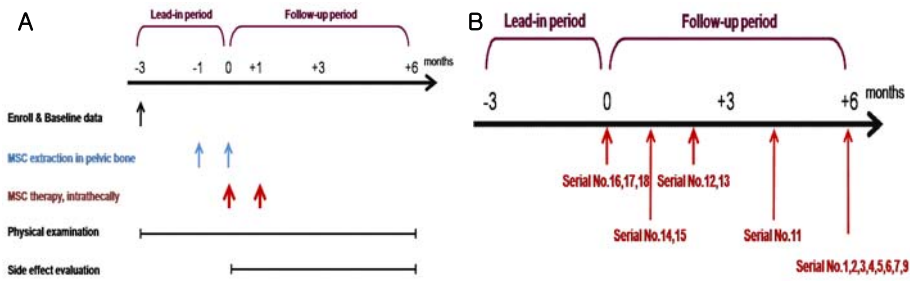


Figure 3. Study flow(A) and Current status of study course(B)

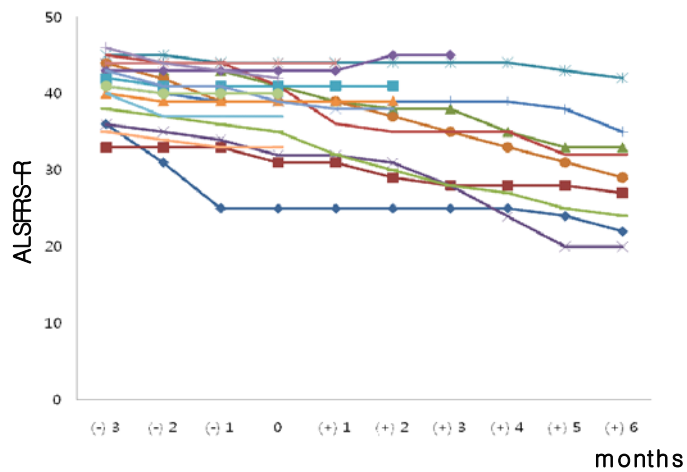


Figure 4. Change of ALSFRS-R score before and after stem cell therapy

줄기세포 치료 후 약 24시간이 경과하면서 초기부터 좋아지는 증상은 주관적인 근력의 향상 및 정서적인 안정감, 속상수축의 감소, 타액분비의 감소, 주관적인 호흡근력의 호전, 하지근력의 호전의 증상 등 다양한 양상을 50%의 환자에서 보였으며 이런 주관적인 증상은 수일에서 2주 정도까지 지속되었다. 18명 환자중 5 명의 환자에서 약 3-4일간 지속 후 자연적으로 소실되는 근육통과 두통이 있었고 한 명의 환자에서 약 7일간 지속된 요통이 관찰되었으나, 현재까지 증대한 이상 반응이 관찰된 예는 없었다.

결 론

특별한 치료약제가 없는 루게릭병의 현실과 줄기세포의 무한한 가능성을 고려할 때 루게릭병에서의 줄기세포 치료는 대체요법, 나아가 적극적인 치료법으로서 가능성이 대두되고 있다. 줄기세포가 처음 주목을 받기 시작하면서 소실된 세포를 대체하고 기능을 수행하기 위한 노력들이 계속되고 있으나 파킨슨병 외에는 이러한 대체요법의 가능성이 아직 보이지 않고 있다. 그러나, 앞서 논거한 바와 같이 줄기세포는 다양한 기전에 의해 소실되어 가는 세포사멸기전을 억제하고 신경염증을 감소시키는 효과가 밝혀지면서 루게릭병을 포함한 신경계 질환에서의 적용가능성이 보이고 있다.

지금까지의 본 교실에서 수행중인 루게릭병 임상연구의 결과에서 보는 바와 같이 줄기세포는 중추신경계에 주입된 후 질병의 진행을 억제하는 효과가 있을 것으로 판단된다. 또한, 루게릭병 쥐 모델 결과에서 확인된 바와 같이 줄기세포의 용량이 증가함에 따라 효과가 함께 증대됨이 확인되고 있다. 앞으로의 임상 연구에서는 대상환자수를 확보하고 줄기세포의 용량과 주입 횟수를 다양화하여 객관적인 효과를 판정하고 또한, 줄기세포의 다양한 신경보호인자 분비능력과 신경염증 억제기전을 확인하여 줄기세포의 신경보호효과를 함께 밝혀보고자 한다.

References

1. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2344-2349.
2. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-56.
3. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999;5:1410-1412.
4. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307-316.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.
6. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-74.
7. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000;7:358-363.
8. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389-398.
9. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585-592.

10. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176:57-66.
11. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211:27-35.
12. Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005;7:36-45.
13. Gurney ME. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 1994;331:1721-1722.
14. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772-1775.
15. Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, et al. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 2004;127: 2518-2532.
16. Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci* 2000;67:53-59.
17. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:255-270.
18. Habisch HJ, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M, Widmann A, Habich A, et al. Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J Neural Transm* 2007;114:1395-1406.
19. Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J. Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:913-915.
20. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, et al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003;4:158-161.
21. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 2006;28:523-526.
22. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;265:78-83.
23. Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, Kim SH. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res.* 2008
24. Koh SH, and Kim SH. Erythropoietin increases the motility of human bone marrow multipotent stromal cells (hBM-MSCs) and enhances the production of neurotrophic factors from hBM-MSCs. *Stem Cells Dev.* 2008