

간세포이식을 통한 간질환 극복과 유전자 치료의 가능성

경북대학교 의과대학 소아과학교실

최 병 호

The Possibility of the 'Cure' for Liver Diseases by Hepatocyte Transplantation and Hepatocyte based Gene Therapy

Byung-Ho Choe, M.D., Ph.D.

Department of Pediatrics, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

서 론

간이식은 말기 간부전 환자의 생명을 구할 수 있는 획기적인 치료법이다. 그러나 공여간의 절대 부족으로 인하여 생체 부분 간이식, 분할 간이식 등의 여러 수술적 전략이 개발되었음에도 불구하고 공여간 부족 현상을 해결할 수는 없었다. 최근 간세포이식(hepatocyte transplantation)에 대한 많은 연구가 이루어져 말기 간부전 환자가 간이식을 받을 때까지 생존 기간을 연장해 줄 수 있을 것으로 기대되며 향후 간이식을 대체할 수 있을 가능성도 열어두고 있다. 급성 간부전에 있어서도 간세포이식을 시행함으로써 간이식 대기 중에 생명을 잃는 일을 막을 수 있으며 간부전의 회복이 간세포이식 중에 생긴다면 간이식을 하지 않아도 생존할 수 있을 것이다.

간세포이식은 간세포를 배양하여 환자에게 주사하는 방식이므로 간이식에 비해 기술적으로 매우 간단하고 반복하여 시술할 수도 있으며 원래 간을 제거할 필요도 없다. 또한 유전적 대사성 간질환 또는 전신질환이 있을 경우에는 이식된 간세포의 정상 유전자가 환자의 부족한 간기능을 회복시켜줄 수도 있을 것이다. 신신 분리되어 배양된 간세포에 유전자 조작을 할 경우에는 간세포를 이용한 유전자치료도 할 수 있을 것이다.

간세포이식의 방법론을 향상시키기 위한 연구에는 공여간에서 간세포를 분리, 배양, 보존하고 간세포에 유전자 조작을 하는 것 등이 포함된다. 간세포이식의

주 연구 영역은 이식 간세포의 이식편화(engraftment) 및 간 재증식(liver repopulation)을 통한 생존, 기능에 관한 연구와 인간 간세포 자체의 분리, 보존, 안정적 확보 및 간세포 의거 유전자치료를 포함한 임상적 응용에 관한 것이다.

1. 간세포 분리(isolation), 동결보존(cryopreservation), 간세포 배양

Collagenase 관류(perfusion)법을 이용하여 간세포를 분리한다. 분리된 간세포는 시간 의존성 생존율을 보이므로 계대 배양을 하던지 항상 사용할 수 있도록 동결보존을 하여야 한다. 많은 임상 연구에서 수개월 이상 액체 질소통에 동결보존 되었던 간세포를 녹여서 사용하였다. 신신하게 분리된 동종(allogenic) 간세포이식의 한계는 환자에게 이식이 필요한 시간에 적절한 공여간을 구하기 어렵다는 것이다.

1) 일차 배양 간세포(primary cultured hepatocyte)

일반적으로 일차 배양 간세포는 배양용기에 단층으로 부착되어 배양된다. 현재의 세포 배양 조건으로는 일차 배양 간세포가 계속 증식할 수 없으며 배양된 일차 배양 간세포는 수일 내로 간세포 특이 기능을 상실하게 된다. collagenase 관류법으로 분리된 일차 배양 인간 간세포는 세포 배양에서 4일 정도까지만 기능을 보인다¹⁾. 그러므로 일차 배양 간세포는 동물 실험용으로는 사용할 수 있으나 임상에 적용하기에는 곤란하다.

2) 불멸화 간세포(immortalized hepatocyte)

불멸화 간세포주란 분화된 간세포의 특성을 유지하면서 무한정으로 계속 배양되는 간세포주를 말한다. 세포의 불멸화는 특이 암유전자를 간세포에 넣어 줌으로서 가능하다. 현재 사용되는 불멸화 간세포주는 simian virus 40 large T antigen을 전달감염(transfection) 시켜서 만들었는데 수 차례 계대 배양하여도 간세포 특이 단백질과 효소를 발현하는 등 분화된 간세포의 형태와 기능적 특성을 지니고 있다. 그러나 현재까지 인간에 대한 적용 문제를 생각할 때는 안전성이 더 확립되어야 한다. 비록 불멸성이 종양화를 직접 의미하지는 않지만 대부분의 불멸화 세포는 자발적이거나 발암 물질 또는 암유전자에 의해 유도된 암성형질전환(neoplastic transformation)을 할 가능성이 높다. 즉 환자는 간세포이식 후 육체적 삶의 질을 향상시킬 수 있겠으나 암 발생의 위험을 안게 되므로 정신적 삶의 질은 오히려 나빠질 수도 있게 된다.

이러한 단점을 극복하기 위한 노력으로 조건부 불멸화 세포주와 가역적 불멸화 세포주가 개발되었다. thermolabile SV40 T Ag을 이용하여 간세포를 불멸화 시키면 간세포의 성장과 분화정도를 조절할 수 있다. 허용온도인 33°C에서는 무한정으로 배양이 가능하지만 생체체온(37°C-39°C)에서는 SV40 T Ag치가 급속히 감소하게 되어 성장과 세포분화가 멈추게 된다. 그러나 37°C에서 완전히 소멸되지 않을 경우 SV40 T Ag이 암유전자로 작용하여 암을 유발할 위험도 잠재하게 된다.

불멸화 유전자 부분 양쪽에 LoxP site를 붙여 간세포에 형질도입(transduction)하여 불멸화 간세포주를 획득하게 되었는데 이 세포주에 Cre recombinase를 발현하는 adenovirus로 전달감염 시키면 불멸화 유전자 양쪽 LoxP site를 정확히 잘라서 불멸화 유전자 부분을 없애 버리고 원래의 간세포로 만들 수 있다. 또한 자살 유전자인 herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk)를 붙여서 향후 유사시 ganciclovir로 간세포를 제거할 수 있도록 이중 안전 장치를 마련하였다(Fig. 1). 가역적 불멸화 인간 간세포(reversibly immortalized human hepatocyte)가 Cre/Lox gene 위치 특이성 유전자재조합을 이용하여 개발되었으며 이를 이용한 연구에서 90% 간절제를 시행한 쥐에 이식한 결과 기능적으로 안정적이었고 쥐의 급성 간부전을 예방할 수 있었고 장기 생존시킬 수 있었다^{2,3}). 가역적 불멸화 쥐 간세포를 이용하여 간경변 쥐모델에서 간성뇌증을 예방한 후 ganciclovir를 투여하여 HSV-tk를 발현하는 간세포를 없애면 간성뇌증의 예방 효과도 없어짐이 증명되었다⁴).

불멸화 인간 간세포는 약물 대사 연구 등에도 이용이 가능하고 생인공간(bioartificial liver) 개발에도 적용할 수 있다. 생인공간 장치는 급성간부전이 있거나 간이식 대기 중인 환자의 생명을 연장하기 위한 보조 장치로 임상에 적용할 수 있다. 그러나 생인공간에 공급할 신선한 인간 간세포를 대량 공급할 수 없으므로 돼지의 간에서 간세포를 분리하여 생인공간에 이용하여 왔다. 그러나 이중 조직은 면역학적 문제와 이종친

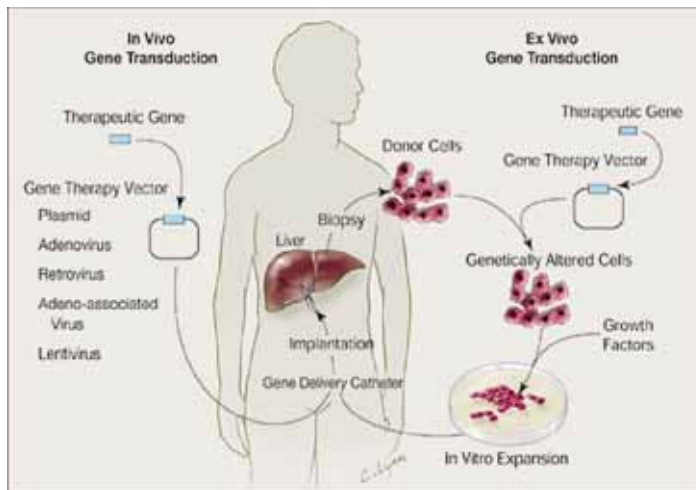


Fig. 1. Diagram of *in vivo* and *ex vivo* gene therapy.

화성(xenotropic) 바이러스를 인간에게 전염시킬 수 있다는 위험성이 내포되어 있으므로 불멸화 인간 간 세포의 적용은 이러한 문제를 해결할 수 있다.

2. 간세포이식 장소와 이식편화(engraftment)

engraftment란 이식된 간세포가 간실질의 세포망 속에 통합 또는 결합되는 것을 의미한다.

1) 간, 비장

간세포이식에서 가장 이상적인 장소는 간의 구조가 짜여져 있고 간실질 세포 이외의 비실질 간세포와 상호 작용이 가능하다는 점에서 숙주의 간이 가장 선호되어 왔다. 그리하여 많은 간세포이식이 간문맥이나 비장정맥을 통해 이루어졌다. 주입된 간세포는 간으로 흘러가서 동모양혈관(sinusoid)에 도달하며 일부가 sinusoid의 내피를 뚫고 space of Disse로 가서 간실질 내에서 생존하게 된다⁵⁾. 수일이 지나면 이식 간세포가 숙주 간의 기질(matrix)에 통합되어 기능을 시작할 수 있으며 증식할 수 있게 되고, 숙주의 간세포와 이식 간세포 사이에 담소관(bile canaliculi)도 만들어지게 된다. 이식된 간세포는 급성 간손상이 있거나 간경변이 있을 때에 증식할 수 있음이 밝혀졌으며 이식된 간세포의 증식능을 증강시키기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이식 간세포는 비장 안에서 생존이 가능하며 이식된 간세포가 분화된 코드 구조를 형성할 수 있도록 해주어서 정상적 간 구조를 재생할 수 있게 하고 또한 정상적인 간세포의 합성, 대사, 해독 기능을 보여 준다. 비장에 이식된 간세포의 2/3이상이 간문맥을 통하여 간으로 가게 된다. 간문맥이나 비장정맥을 통한 간세포 투여는 간문맥 혈전, 문맥 고혈압, 폐 색전증 등의 합병증을 유발할 수 있으므로 이러한 합병증이 생기지 않을 정도의 간세포를 주입해야 한다. Engraftment가 될 수 있는 최대량은 대개 숙주 간세포의 2-5%정도 범위 내에서 결정된다. 이런 가능한 합병증이 발생할 수 있었음에도 불구하고 현재까지 간세포이식의 임상적 시도는 비교적 안전하게 진행되어 왔다⁶⁾.

2) 이소성 장소(ectopic site)

간이나 비장 외의 장소에 이식할 경우 이식 공간이 넓어져 간세포를 더 많이 이식할 수 있는 장점이 있다. 또 간문맥으로 간세포를 투여하는 것보다 합병증이 적고 안전하다. 게다가 숙주의 간에 이식하지 않

므로 이식된 간세포와 숙주 간세포를 구별할 노력이 필요가 없어 연구 관점에서 볼 때에도 유리하다.

이소성 장소로는 복강이나 신장 캡슐 하부 등이 연구되어왔다. 단점으로는 이식 간세포의 engraftment가 부적절하고 생존을 위한 혈관신생이 어려워 간세포의 수명이 매우 짧다는 것이다. 생존율을 높이기 위한 전략으로 세포외기질(extracellular matrix) 성분을 제공하여 이식 세포를 부착하여 지지해 주기 위한 방법이 여러 가지로 개발되었다. 제1형 콜라겐으로 코팅된 dextran 미세운반체(microcarrier)를 이용하여 복강 내에 이식된 간세포의 생존율과 치료효과를 높인 연구도 있으며 세포외기질 gel과 간세포를 같이 신장 캡슐 하부에 이식하여 생존율을 높였다는 보고도 있다^{7,8)}.

또한 이소성 간세포이식의 성공을 위하여 간친화성(hepatotropic) 재생 자극을 지속적으로 공급해주는 것이 중요하다. 문맥 혈에는 간친화성 자극을 위한 풍부한 호르몬 인자가 존재하고 다른 순환계에는 존재하지 않으므로 문대정맥 단락(portocaval shunt)을 만들어 주면 이런 호르몬 인자들을 전신 순환계로 보낼 수가 있어서 이소성 장소에 이식된 간세포에 간친화성 인자를 공급할 수 있게 된다⁹⁾.

3. 재증식(repopulation)

간세포이식을 이용한 유전자치료는 유전 질환의 치료에 효과적으로 적용될 가능성이 높다. 이식된 간세포로 간 재증식이 계속 일어난다면 치료용 유전자가 환자에게 지속적으로 전달되어 치료 효과를 보이겠지만 현재로서는 한계가 있다. 비록 이식된 간세포가 숙주의 간에서 engraft가 잘 이루어지고 오랫동안 기능을 한다 하더라도 숙주 전체 간의 총량에 비해서는 매우 적은 양이므로 질환을 교정하기에는 부족할 것이다. 또 이식할 동종 간세포를 여러 공여자의 것을 모아서 양을 늘릴 경우에는 조작도 많아질 뿐만 아니라 거부반응과 면역억제제의 양이 증가할 것이며 감염의 위험도 높아질 것이다.

이식 간세포에 의한 간의 대량 재증식은 숙주 간세포가 죽거나 재생과 증식이 예방된 상태에서 유사분열 자극(mitotic stimulation)이 이루어 질 때 가능하다. 식물 알칼로이드, retrorsine, 방사선 조사 등으로 전처치 할 경우 숙주의 간세포 증식을 억제할 수 있으며 이때 간부분 절제, 갑상선 호르몬 투여 등으로

이식 간세포의 분열을 촉진시킬 수 있다. Retrorsine 과 기타 pyrrolizidine alkaloid 등은 발암성으로 인해 임상에서 사용할 수 없으므로 방사선 조사 등을 간세포이식 전에 환자의 간에 시행하여 숙주 간세포의 증식을 차단하면 간세포이식을 통한 생체 외(ex vivo) 유전자치료를 효과적으로 할 수 있을 것이다^{6, 10}. 간세포이식 전에 Cyclophosphamide로 전처치를 한 경우에 간 동모양혈관 내피(hepatic sinusoidal endothelium)를 괴멸시켜 이식 간세포의 engraftment를 촉진하고 간 실질에 더 빨리 통합시킬 수 있었다는 연구도 발표되었다¹¹.

4. 동물 모델과 임상적 치료 시도

불멸화 간세포의 간세포이식 후 치료 효과를 규명하기 위해 여러 형태의 간부전 동물 모델에 적용한 연구가 있어 왔다. 인간의 간질환과 유전질환에 대한 동물 모델이 속속 개발되어 현재까지 간세포이식의 많은 연구 결과가 알려져 있다(Table 1)¹².

급성 간부전 모델인 90% 간절제를 한 쥐에 대한 실험에서 간세포이식을 받은 쥐들은 80% 이상이 생존하였고 대조군 쥐는 모두 죽었다. CCl₄로 유발시킨 간경변 쥐와 문대정맥 단락술로 간성뇌증을 일으킨 쥐 등의 만성 간질환 모델을 비롯하여 유전성 간질환 동물 모델 등에 간세포이식을 적용한 많은 연구가 있

어 왔다.

임상치료도 전격성 간부전, 간경변, 대사성 간질환 환자를 대상으로 이미 수십 차례 이상에서 시도되었다. 긍정적 결과를 시사하는 소견도 보였지만 전격성 간부전의 경우 그 예후가 원인 질환에 따라 다양할 수 있으며 연구 대상 환자의 수가 적고 대조군 선정에도 문제가 있었으므로 인간 간세포이식의 임상적 효과에 대한 결론을 내리기에는 아직 이르다. 게다가 정상 간기능을 유지하기 위해서는 양적으로 정상간세포가 적어도 20%가 필요한 데 간세포이식으로 이식할 수 있는 간세포의 양은 환자 간의 5%에 불과한 것도 문제점이다⁸.

Retrorcine은 간세포의 세포 주기(cell cycle)를 차단하는 pyrrolizidine alkaloid로서 기존 간세포의 증식을 억제하고 이식된 간세포의 증식을 촉진시킬 수 있으므로 만성 간질환에 대한 유전자치료 연구에 적용할 수 있는 간 재증식 연구 모델로 이용될 수 있다. 간세포이식 전에 부분 간절제를 시행하면 간세포의 증식을 촉진시킬 수 있는데 이때 Retrorcine을 투여하면 이식 간세포가 간세포의 주류가 될 가능성도 있다¹³.

인간 간세포를 면역내성 동물이나 면역결핍 동물에 이식하게 되면 동물의 간을 인간화할 수 있고 chimeric mouse model을 이용하면 침팬지나 wood-

Table 1. Outcome of Hepatocyte Transplantation in Animal Models of Human Disease

Animal Model	Human Disease	Enzyme Deficiency	Outcome
Gunn rat	Crigler-Najjar syndrome	Bilirubin-uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UDP-GT)	Decreased serum bilirubin levels, Conjugated bilirubin detected in bile
Eizai rat	Hyperbilirubinemia	Impaired canalicular transport of bile acid glucuronide	Decreased serum bilirubin levels, Positive biliary excretion
Long-Evans cinnamon rat	Wilson's disease	Abnormal <i>ATP7B</i> gene	Decreased hepatic copper deposition, Decreased mortality
Nagase analbuminemic rat	Hypoalbuminemia		Increased serum albumin levels
Tyrosinemic mouse	Tyrosinemia type I	Fumarylacetoacetate hydrolase	Correction of metabolic abnormalities
Peruvian his/her mouse	Histidinemia	Histidine-alpha-deaminase	Normalization of urinary histidine levels
Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbit	Hypercholesterolemia	Deficiency of low-density lipoprotein receptors	Decreased serum cholesterol levels
Factor IX-deficient dogs	Hemophilia B	Factor IX deficiency	Gene therapy model

chuck을 이용하지 않고도 B형, C형 간염바이러스의 감염과 증식을 연구할 수 있는 인간 특이성 감염의 동물 모델을 만들어 만성 감염에 대한 인간 간세포 특이 기능 관련 연구를 시도할 수 있을 것이다^{8,10}.

5. 간지향성(liver directed) 유전자치료

1) 생체 내, 생체 외 유전자치료(in vivo and ex vivo gene therapy)

간세포이식은 전격성 간부전, 만성간질환 뿐 아니라 대사성 또는 유전성질환 영역에도 임상적으로 유용하게 쓰일 수 있다. 이식 간세포 내의 정상 효소를 환자에게 공급할 수 있다는 점과 생체 외 유전자치료를 간세포이식에 이용할 수 있다. 즉 환자의 간의 일부를 절제한 후 간세포를 분리 배양한 후 필요한 정상효소를 형질도입 시키는 다시 환자에게 간세포이식을 하는 것이다(Fig. 2). 과거 각광 받던 생체 내 유전자치료는 바이러스 vector를 인체에 직접 주입하는 방식인데 ornithine transcarbamylase(OTC)결핍 환자에 대한 adenovirus를 이용한 유전자 치료 임상 시험에서 환자가 사망한 사고가 난 이후 유전자치료의 임상시험이 전면 보류되게 되었다.

유전자치료를 위한 간세포의 활용은 배양된 일차 간세포를 유지하고 조작하기 어려운 것이 문제이다. 간세포를 안정적으로 확보하기 위하여 조건부 불멸화 간세포주가 개발되어 사용되고 있다.

2) 간세포 의거(hepatocyte based) 유전자치료

간세포 의거 유전자치료에는 결손 유전자 산물의

대체, 배양된 간세포에 증식력을 부여하는 것, 동종 이식 거부 예방, 변이유전자를 발현하는 숙주 간세포의 대량 대체 후 재증식, 이종 간세포의 성장을 가능하게 하는 것, 인간 특이성 감염에 대한 동물 모델 개발 등이 있다.

대사성 간질환(α_1 -antitrypsin 결핍증, tyrosinemia, Wilson병 등)과 간질환은 없지만 선천성 고빌리루빈혈증, 가족성 고지혈증, OTC 결핍증, 당원병(glycogen storage disease) 등의 대사장애가 있을 때 간세포이식을 응용할 수 있다. 간세포는 단백을 합성해서 혈액으로 분비하므로 혈액응고 인자, 성장호르몬, 인슐린 등의 유전자를 간세포에 전달해 주면 간질환이 아닌 전신 질환, 즉 혈우병 등의 치료에도 간세포 이식을 이용할 수 있을 것이다(Table 2)⁶.

동종 간세포이식은 면역억제 요법이 필요하지만 자가(autologous) 간세포 이식은 생체 외 유전자치료도 가능하게 하면서 면역억제 요법이 필요가 없다는 장점이 있으므로 거부반응이나 재증식 문제도 자동으로 해결이 된다. 또한 생체 내 유전자 치료 시 생길 수 있는 virus vector의 독성이나 면역원성(immunogenicity) 문제도 피할 수 있다. 자가간세포이식도 도입된 유전자가 만들어 낸 단백질이 숙주에게 면역원으로 작용할 수는 있다. CTLA4 같은 면역조절 유전자를 치료유전자와 같이 간세포에 전달할 경우 숙주 면역계를 동종간세포에 대해 선택적으로 무반응 하도록 만들어 동종 간세포이식의 거부반응도 예방할 수 있을 가능성도 있다¹⁰.

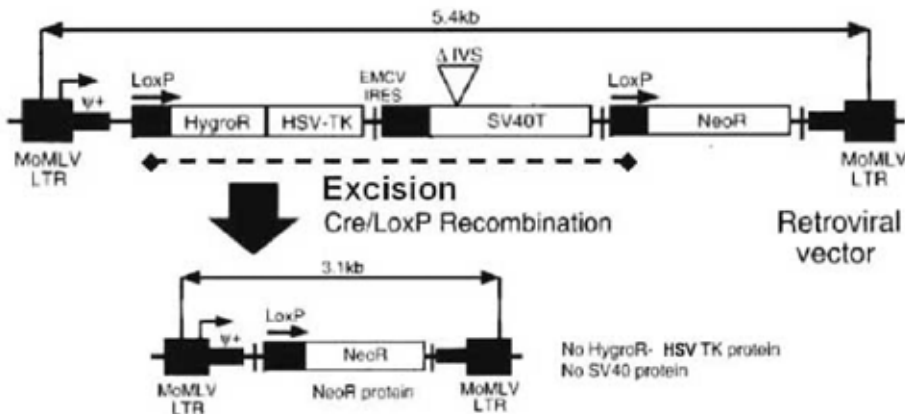


Fig. 2. Schematic diagram of the retroviral vector that could reverse hepatocyte immortalization by site-specific excision of SV40 T Ag. MoMLV, Moloney murine leukemia virus; LTR, long terminal repeat; HygroR, hygromycin B resistance gene; NeoR, neomycin resistance gene.

Table 2. Selected Conditions Potentially Amenable to Hepatocyte Transplantation

Associated liver disease	No liver disease
Metabolic diseases <ul style="list-style-type: none"> · Alpha-1 antitrypsin deficiency · Erythropoietic protoporphyria · Lipidoses, e.g., Gaucher's disease, Niemann-pick disease · Tyrosinemia, type 1 · Wilson's disease 	Metabolic deficiency states <ul style="list-style-type: none"> · Congenital hyperbilirubinemia, e.g., Crigler-Najjar syndrome · Familial hypercholesterolemia · Hyperammonemia syndromes · Defects of carbohydrate metabolism
Chronic viral hepatitis, cirrhosis, and liver failure	Deficiency of circulating proteins <ul style="list-style-type: none"> · Coagulation defects, e.g., hemophilia · Hereditary angioedema
Fulminant liver failure due to viral hepatitis, drug toxicity, etc.	

3) 유전자 전달 vector

적절한 유전자치료 vector는 분열 간세포와 정지 간세포 모두에게 유전자 전달이 가능해야 하고, 장기간 전달유전자(transgene)의 발현을 시켜야 하며, 숙주에게 조작이 필요 없어야 하고, 병을 유발해서는 안 된다. 그 외 꾸리기(packaging) 용량이나 유전자 전달 방법 등의 기술적 특성도 vector 선택에 중요한 점이다.

Adenovirus vector는 episomal vector로서 간세포에 유전자 전달이 매우 효과적이지만 adenoviral vector에 대한 숙주의 면역 반응 때문에 이식된 유전자 조작 간세포가 죽게 되어 전달된 유전자도 소실되어 버리는 것이 문제가 된다.

Retrovirus vector가 외부 유전자를 provirus형태로 숙주 간세포 genome에 통합되게 하여 장기간 지속적인 transgene 발현을 유지할 수 있어서 이상적이며 Moloney-murine leukemia virus(MLV)와 lentivirus가 대표적인 retrovirus vector이다. 그러나 간세포가 분열할 때만 세포핵막이 용해가 되고 MLV가 세포핵 내로 들어가서 염색체에 통합이 일어나게 되는데, 간세포는 배양 중에 분열을 계속하지 않는 것이 문제이다. 그래서 성장인자를 배지에 첨가하여 간세포 증식을 촉진시켜 형질도입(transduction) 효율을 증가시키거나 vesicular stomatitis virus G(VSVG) glycoprotein을 이용하여 MLV의 역가를 높여 형질도입 효율을 올리기도 한다. Human immunodeficiency virus(HIV)-1에서 유래된 lentivirus는 분열세포와 비분열세포 모두를 감염시켜 형질도입을 시킬 수 있는 vector로서 간세포 형질도입에 MLV보다 매우 효과적임이 알려져 있다⁸⁾. 그러나 숙주 genome에 통합하

는 virus vector는 insertional mutagenesis의 위험과 통합 후 transgene의 발현이 억제되는 점이 문제가 될 수 있어서 최근에는 여러 vector의 장점을 살린 hybrid vector가 개발되었다¹⁰⁾.

4) 간 지향성 유전자치료의 전략

간질환에 대한 유전자치료의 전략으로는 유전자 강화요법, 비정상 유전자 수리, 내재성 유전자 발현의 억제, 바이러스 효소 prodrug 치료, ribozyme, anti-sense oligonucleotides 등이 소개되어 있다¹⁴⁾.

유전자 강화요법은 정상 유전자가 없거나 기능을 할 수 없는 질환에서 정상유전자를 주입하는 것이다. 가족성 고콜레스테롤혈증은 LDL 수용체 유전자의 결함으로 LDL cholesterol이 증가하게 되는데 5명의 환자에게서 부분 간절제술 후 간세포를 분리 배양하여 정상 LDL 수용체 유전자를 encoding한 재조합 retrovirus로 형질도입한 후 간세포이식을 실시하였다. 이들 중 3명에서 큰 부작용 없이 LDL cholesterol이 감소됨이 관찰되었다¹⁵⁾. 장기적 효과에 대한 문제가 있었으며 자가 간세포의 이용이 한정되어 있는 점이 문제이다. 간세포이식 후에 시행한 간조직검사에서 LDL 수용체 양성 세포가 거의 보이지 않아서 이 연구는 생체 외 유전자치료의 가능성도 열어주었지만 장기적 효과가 없음을 보여주었다.

손상된 유전자가 정상유전자보다 증가 되어 비정상적인 단백질 계속적으로 만들어지는 질환을 가진 환자에서는 정상유전자를 도입해 준다 하더라도 효과가 없을 것이다. 유전자 수리가 숙주에서 스스로 일어나기는 하나 매우 적게 일어나므로 자연 회복이 어렵다. 숙주의 수리 기전을 강화시켜 손상된 유전자를 교정할 수 있는 유전공학적 방법이 개발되었으나 검정 중

에 있다. chimeric RNA/DNA oligonucleotide를 만들어 단일 염기 변이를 RNA domain에 만들면 세포의 DNA 수리 기전을 유인할 수 있다는 것인데 쥐의 factor IX 유전자를 대상으로 한 실험이 있었다¹⁴⁾.

6. 전 망

1) 간 모세포(hepatic stem cell)

간 stem cell은 분화된 간세포보다 생존율이나 분화조절에서 유리하다. 심한 간손상 후의 간 재생에 간 모세포가 관여하게 되면 여러 종류의 간세포 재생에 더욱 효과적일 수 있을 것이며 유전자 치료를 위한 조작에도 분화된 세포보다 쉽게 형질도입을 시킬 수 있을 것이다. 환자의 혈액에서 수확할 수 있으므로 면역억제제가 필요가 없다는 장점도 있다. 또한 유전자 뿐 아니라 만성 B형 간염 치료를 위한 interferon α 등의 cytokine 전달에도 유용할 것으로 생각한다¹⁶⁾.

조혈 모세포(hematopoietic stem cell)도 간세포로 분화되어 증식할 수 있고 이미 수백만 명의 잠재적 공여자가 등록되어 있다는 장점이 있지만 아직 간세포이식보다 효과적이지 못하다.

2) 생인공간(bioartificial liver) 보조장치

체의 생인공간 보조장치는 해독과 일부 대사기능을 제공해줌으로써 말기 간환자가 간이식을 기다리는 동안 생존을 연장시킬 수 있고 전격성 간부전 환자가 자연 회복될 수 있도록 생존시간을 연장시켜줄 수 있다. 간세포는 생반응기(bioreactor) 안의 기질(matrix)에 부착되어서 환자의 혈액과 생화학적 상호작용을 하게 된다. 정상 간세포 총량의 약 20-40%가 생존을 위해 필요하지만 2%만 있어도 재생을 방해하는 것으로 알려져 있는 transforming growth factor (TGF) α 의 혈중 농도를 감소시키기에는 충분할 수 있다¹⁷⁾. 캡슐화 된 이종 간세포를 이용한 이식가능 생인공간이 개발되어 급성간부전 치료에 성공을 거둔 연구가 보고되었다¹⁸⁾.

3) 조직공학 제조간(tissue engineered liver)

생체 내 분해성이 있는 합성 중합체 골격(polymer scaffold)에 간실질 세포와 비실질 간세포를 심어주면 생조직을 만들어 낼 수 있으며 영구적으로 이식을 하여 간기능을 제공할 수 있다. 간세포이식과 마찬가지로 자가세포를 이용할 수도 있으며 유전자조작을 한 간세포를 이용할 수도 있다. 간친화성 자극을 해주면 간세포들은 불용성 세포외기질 물질과 중합체 구조를

따라 간 원래의 모습으로 증식할 수 있게 된다. 그리고 생체 내로 이식이 이루어지면 중합체 골격은 분해되어 흡수가 되므로 새로 만들어진 간조직만 남게 된다. 간 전구(progenitor)세포를 이용하면 성숙 간세포와 상피세포로 분화가 가능하여 간조직과 혈관 구조물까지 이식 전에 만들 수가 있게 된다¹⁷⁾. 간의 전체 기능이 가능한 조직공학 제조간 개발에는 아직 많은 난관이 남아있다.

4) 이종이식(xenotransplantation)

공여간의 부족을 해결하고 인공 장기의 기술적 한계를 극복하기 위하여 이종 장기 이식이 활발히 연구되고 있다. 이종 간이식 또는 간세포이식이 성공한다면 공여간 부족 현상은 사라질 것이다. 비비원숭이(Baboon)는 인간장기에 비교적 일치하지만 공급에 한계가 있을 것이며 체세포 복제를 통한 공급확대도 상용화되기까지는 윤리적 문제 등으로 많은 장벽이 있을 것으로 생각한다. 돼지가 이종 장기의 공급원으로서 가장 선호되는데 그 이유는 인간과 비슷한 장기 크기를 가지고 있고 많은 돼지가 사육되고 있으며 무균상태로 기를 수 있고 유전자 조작이 가능하다는 점이다. 인간유전자를 삽입하여 면역거부반응을 억제시킨 돼지간을 이용한 이종 간세포이식도 연구가 되고 있다.

이종이식의 최대 걸림돌은 공여장기에 대한 숙주의 거부반응 등의 면역반응이다. 초급성 거부 반응은 유전자 조작 돼지가 인간 보체 조절 단백을 생산하게 함으로써 많은 극복이 이루어져 있다. 그러나 아직도 면역학적으로 극복해야 할 장애가 많으며 돼지와 인간 장기 상호간에 생리적 기능이 서로 다르다는 점과 동물의 장기가 사람에게 이식될 때 감염원으로 작용할 수도 있다는 점이 해결해야 할 과제이다. 현재 돼지 유전자에서 retrovirus(PREV)가 발견되었고 실험실에서 인간세포를 감염시킬 수 있음이 알려져 있지만 돼지의 조직이나 세포로 치료받은 수천 명의 환자에서는 감염의 증거가 아직 발견되지는 않았다. 그러나 동물의 바이러스가 사람에게 감염될 경우 환자가 속한 인구 전체 집단으로 전염될 가능성도 있기 때문에 특별한 주의가 필요하다¹⁷⁾.

7. 결 론

간세포이식은 이미 많은 동물실험에서 급성간부전, 간경변, 대사성 간질환에 효과가 있음이 밝혀져 있으

며 최근 들어서는 많은 임상적용과 연구가 보고되고 있다. 아직 급성간부전이나 대사성 간질환 모두에서 기존의 간이식을 대체할 수 없으며 해결해야 할 과제가 많은 것이 현실이다. 하지만 동종 간세포이식은 경피적 방법으로 할 수 있을 만큼 간단하고 engraftment는 정상 간 구조의 변형을 일시적으로 비교적 미미하게 일으키며 거부반응은 현재 수준의 면역억제제로 조절이 가능하다. 또 이식된 간세포가 거부반응에 의해 소멸되더라도 기존 간조직과 간기능에 영향을 주지 않는다. 유전자치료학의 발전, 간세포 배양, 동결보존법, 이식 간세포에 의한 재증식 등의 발전, 새로운 간세포주와 다양한 동물모델의 개발에 힘입어 간세포이식을 통한 인류 간질환의 극복과 간세포를 이용한 유전자치료가 머지 않은 미래에 성공적일 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- 1) Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, et al. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst* 1982;68:771-8.
- 2) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000;287:1258-62.
- 3) Cai J, Ito M, Westerman KA, Kobayashi N, Leboulch P, Fox IJ. Construction of a non-tumorigenic rat hepatocyte cell line for transplantation: reversal of hepatocyte immortalization by site-specific excision of the SV40 T antigen. *J Hepatol* 2000;33:701-8.
- 4) Cai J, Ito M, Nagata H, Westerman KA, Lafleur D, Chowdhury JR, et al. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology* 2002;36:386-94.
- 5) Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM. Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis* 1999;19:15-26.
- 6) Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:40-50.
- 7) Demetriou AA, Whiting JF, Feldman D, Levenson SM, Chowdhury NR, Moscioni AD, et al. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science* 1986;233:1190-2.
- 8) Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001;79:617-30.
- 9) Kaufmann PM, Sano K, Uyama S, Schloo B, Vacanti JP. Heterotopic hepatocyte transplantation using three-dimensional polymers: evaluation of the stimulatory effects by portacaval shunt or islet cell cotransplantation. *Transplant Proc* 1994;26:3343-5.
- 10) Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-7.
- 11) Malhi H, Annamaneni P, Slehra S, Joseph B, Bhargava KK, Palestro CJ, et al. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology* 2002;36:112-21.
- 12) Ng VL, Alonso M, Bezerra JA. Hepatocyte transplantation. *Advancing biology and treating children. Clin Liver Dis* 2000;4:929-45, vii.
- 13) Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, et al. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-29.
- 14) Shetty K, Wu GY, Wu CH. Gene therapy of hepatic diseases: prospects for the new millennium. *Gut* 2000;46:136-9.
- 15) Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995;1:1148-54.
- 16) Forbes S, Vig P, Poulsom R, Thomas H, Alison M. Hepatic stem cells. *J Pathol* 2002;197:510-8.
- 17) Sundback CA, Vacanti JP. Alternatives to liver transplantation: from hepatocyte transplantation to tissue-engineered organs. *Gastroenterology* 2000;118:438-42.
- 18) Sarkis R, Wen L, Honiger J, Baudrimont M, Delelo R, Calmus Y, et al. Intraperitoneal transplantation of isolated hepatocytes of the pig: the implantable bioartificial liver. *Chirurgie* 1998;123:41-6.