

극소 저 출생체중 미숙아에서 자가 제대혈 줄기세포 이식을 통한 신경 손상 방지 연구

포천중문의대 소아과학교실, 고려대학교 의과대학 소아과학교실*,
인제대학교 의과대학 소아과학교실†, 포천중문의대 임상의학연구소‡

채규영 · 이규형 · 은소희* · 최병민* · 은백린* · 강훈철† · 최명재† · 김남근‡ · 오도연‡

A pilot study of neuroprotection with umbilical cord blood cell transplantation for preterm very low birth weight infants

Kyu Young Chae, M.D., Kyu Hyung Lee, M.D., So-Hee Eun, M.D.*, Byung Min Choi, M.D.*
Baik-Lin Eun, M.D.*, Hoon-Chul Kang, M.D.†, Myung Jae Chey, M.D.†
Nam Keun Kim, M.D.‡ and Doyeun Oh, M.D.‡

Department of Pediatrics, Pochon CHA University, Korea University
Inje University†, Institute for Clinical Research‡

Purpose : Preterm very low birth weight infant have high rate of adverse neurodevelopmental sequele. Recently, there have been lots of reports that human umbilical cord blood transplantation ameliorates functional deficits in animal models as hypoxic ischemic injury. This pilot study was undertaken to determine the clinical efficacy and safety of autologous umbilical cord blood cell transplantation for preventing neurodevelopmental sequele in perterm VLBW.

Methods : Subjects were 26 preterm infants whose birth weight are less than 1,500 g and delivered under the intrauterine period 34 weeks. Autologous umbilical mononuclear cells (about $5.87 \times 10^7/kg$) were injected to neonate via the umbilical vein on the postnatal 24-48 hour. The therapeutic efficacy was assessed by numbers of nucleated RBC, urinary uric acid/creatinine ratio, concentration of neuron specific enolase (NSE), interleukin 6 (IL6), interleukin-1 β (IL-1 β), and glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) in serum and cerebrospinal fluid on day 1 and 7.

Results : There were no significant differences in the numbers of the nucleated RBC, urinary uric acid/creatinine ratio, concentration of creatine kinase between the transplanted infants and controls. But the nucleated RBC is more likely to be rapidly discharged in the transplanted group. In the transplanted group, the concentrations of IL6, IL-1 β , and GDNF were no significant difference between day 1 and 7, although GDNF seemed to be elevated. Serum NSE concentration was significantly elevated after transplantation, but not in CSF.

Conclusion : It is suggested that autologous umbilical cord blood transplantation in preterm very low birth weight infant is safe to apply clinical practice. Long term follow up study should be needed to evaluate the potential therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation for neuroprotection. (Korean J Pediatr 2007;50:882-890)

Key Words : Umbilical cord blood transplantation, Preterm, Neuroprotection

서 론

극소 저 출생체중아에서의 저산소성-허혈성 뇌증은 심한 신경학적 발달 장애 또는 사망의 중요한 원인이다. 최근 의학의 발전을 통해 태아 감시 장치 및 산부인과적인 처치의 새로운 개발로 신생아 처치가 급속히 발달되고 태아 곤란증과 신생아 가사에 대한 병리생리학적 이해의 정도가 깊어졌음에도 불구하고

접수 : 2007년 7월 17일, 승인 : 2007년 7월 30일
이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2005-003-E00132)
본 논문의 요지는 2006년 제 56차 대한소아과학회 추계학술대회에서 구연발표 하였음
책임저자 : 채규영, 포천중문 의과대학 소아과학교실
Correspondence : Kyu Young Chae, M.D.
Tel : 031)780-5229 Fax : 031)780-5239
E-mail : barnabas@cha.ac.kr

고 저산소성-허혈성 뇌증으로 인한 신경학적 장애의 빈도는 지난 수십 년간 거의 변화가 없는 상태이다¹⁾.

한편 제대혈에 조혈모세포가 풍부히 있다는 사실이 밝혀진 이후 제대혈 줄기세포는 소아에서 골수 이식술을 대체하는 중요한 자원으로 백혈병 및 재생불량성 빈혈 등의 질환에서 사용되기 시작하였다²⁾. 이후 제대혈 줄기세포는 뇌졸중, amyotrophic lateral sclerosis와 척수 손상 질환 등을 가진 동물에 투여 되었으며, 제대혈 줄기세포 이식이 실험 동물의 빠른 기능 회복과 손상 부위의 감소, 그리고 질환의 진행을 억제하는 효과를 가진다는 것을 밝혔다^{3, 4)}. 특별히 저산소성-허혈성 뇌증을 가진 실험 동물에 사람의 제대혈 줄기세포를 투여한 경우에도 뇌 손상 부위를 감소시키고 그 기능을 의미 있게 개선시킨다⁵⁾. 그러나 아직까지 사람에게서 그 효과가 충분히 밝혀지지 않은 상태이며 특별히 저산소성-허혈성 뇌증이 잘 동반되는 미숙아에서 줄기세포 이식이 손상부위를 감소시키며 기능을 개선하는지에 대해서는 아직 연구가 없는 상태이다. 이에 저자들은 신경학적 손상 위험이 높은 극소 저 출생체중 미숙아들을 대상으로 하여 제대혈 줄기세포 자가 이식술을 시행하였으며 이 연구를 통해 자가 제대혈 줄기세포 이식술이 실제로 신경학적 손상을 얼마나 효과적으로 예방하는지 또한 미숙아에서의 저산소성-허혈성 뇌증에 근본적인 치료로서 대안이 될 수 있는지 알고자 하였다

대상 및 방법

1. 대상

2005년 4월부터 2006년 5월까지 포천중문의대 분당차병원, 고려의대 안산병원, 인제대의 상계 백병원에서 출생한 출생체중 1,500 g 미만, 제대연령 34주 이하인 극소 저 출생체중 미숙아 26명을 대상으로 하였으며 대조군으로는 같은 시기에 출생한 동일한 조건의 체중과 제대연령을 가진 11명의 미숙아를 대상으로 하였다.

2. 방법

1) 환자의 모집

분만 예정 환자의 임신 주수가 34주 이하이고 태아 예상 체중이 1,500 g 미만인 경우 미리 산모와 보호자를 만나 임상실험의 개요에 대해 설명하였다. 분만 후 상기 조건에 일치하는 경우 두 번째 방문하여 제대혈 자가 수혈 여부에 대해 상담하였으며 이때 산모 또는 보호자가 자의로 임상 실험에 동의하는 경우에만 실험군으로 참여하였다. 또한 제대혈 이식 시술 전 이에 대한 가능성 있는 위험성을 문서와 슬라이드 등을 통해 보호자에게 의료진이 직접 설명하였고 보호자의 서면 동의 하에 진행하였다. 그러나 제대혈 장기 보관을 원하거나 임상 실험에 참여하기를 거부하는 경우에는 모두 제외하였으며 진행 중에도 원하는 경우 언제든지 중단할 수 있었다. 이 연구는 각 병원의 임상

실험 윤리위원회의 심의 후 허가되었으며 제대혈의 조작이나 증폭이 없다는 조건 하에 한국 식품의약 안정청의 안정성 여부에 대한 문의를 통과하였다.

2) 제대혈 분리

제대혈은 분만실 또는 수술실에서 헤파린이 들어 있는 소아용 제대혈 보관용기에 받은 후 15 mL의 원추형 시험관에 분리하여 넣었고 1.077 비중의 Ficoll-hypaque(Amersham Pharmacia, Pittsburgh, USA) 용액으로 중첩시킨 다음 저온 원심기에 30분간 400 g로 원심 침전시켰다. 분리된 세포층을 파스퇴르 피펫을 이용하여 단핵구 세포층을 채취하였으며, 다른 시험관에 옮긴 후 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium: American Type Culture Collection, Manassas, USA)을 희석액으로 사용하여 3회 원심 침전시킨 후 상층액을 버려 Ficoll-hypaque를 제거하였다. 생존 세포 검사 후 총 단핵구 세포수 및 CD34(+) 세포수를 측정하였다. 모든 과정은 무균적으로 시행되었다.

3) 제대혈 투여

생후 24-48시간 사이에 분리된 단핵구 세포를 제대혈 정맥 또는 중심정맥을 통해 투여하였다. 투여량은 아직까지 정해진 바가 없어 백혈병 치료 시의 투여 용량인 단핵구로서 $1-3 \times 10^8/\text{kg}$ 또는 CD34(+) 세포로서 $1-3 \times 10^6/\text{kg}$ 을 투여 목표 용량으로 하였다. 투여 된 세포가 수액관에 붙는 것을 최대한 피하기 위해 정맥에 가장 가까운 위치에서 투여하였다.

4) 환자의 평가

초기 생후 첫 1개월 시의 평가 변수들로서는 저산소성-허혈성 뇌증의 예측 지표로 사용되는 유핵 적혈구수(nucleated red blood cell, NRBC), 소변내의 uric acid/creatinine 비와 neuron specific enolase(NSE), interleukin-6(IL6), interleukin-1 β (IL-1 β) 등과 신경세포 보호 작용이 있는 것으로 알려진 glial cell derived neurotrophic factor(GDNF)의 농도를 제대혈 줄기세포 이식 전(생후 1일)과 투여 후 약 1주일 후에 혈청 및 뇌척수액에서 측정하였다. 뇌 초음파는 생후 첫 1-3일 사이에 처음 시행되었고 이후 임상 상태에 따라 1-2주, 혹은 4주 후에 시행되었다. 임상적으로는 생후 1개월에 두위 증가가 출생 시 보다 2 cm 이상 증가했는지 여부와 함께 뇌 병변, 기관지폐 이형성증, 미숙아 망막증, 그리고 괴사성 장염 등의 발생 빈도를 평가하였다.

3. 통계

실험 대상 환자에서 치료군으로의 선택은 확률화 등의 계획법을 사용하였고 통계적인 분석은 t-검정 또는 Wilcoxon Rank Sum 검정을 시행하였다. 통계적 유의 수준은 0.05로 정하고 모든 자료분석은 SAS 통계분석프로그램(버전 9.1, NC, USA)을 사용하였다.

결 과

1. 임상적 특징

제대혈 자가 줄기세포 이식군과 대조군 사이에서의 제태연령, 출생 시 체중, 첫 혈액에서의 산도, 1분 및 5분 Apgar 점수, 그리고 기계 호흡 기간은 양군 간에 차이를 보이지 않았다(Table 1).

2. 투여된 제대혈 줄기세포 수

태반으로부터 채취된 제대혈의 평균 부피는 86 mL(45-128 mL) 였으며 이식된 제대혈 줄기세포수는 단핵구로서 평균 5.87

(1.78-15.46)×10⁷/kg, CD 34(+) 세포로서 1.18(0.1-3.29)×10⁶/kg 투여 되었다. 세포 생존율은 평균 98%에 달했다. 최종 투여량은 1-10 mL 로 부피를 줄여 헤파린 1 unit와 함께 투여되었다(Table 2).

3. 저산소성-허혈성 뇌손상의 조기 표식 인자

제대혈 자가 줄기세포 이식군과 대조군 사이에서의 생후 제 1 일에 시행한 유핵 적혈구 수, 소변에서의 uric acid/creatinine 비, 혈청 NSE, IL-6, IL-1β 값은 실험군 및 대조군 모두 현재 까지 알려진 만삭아에서의 가사 상태 기준치보다 높았으며 uric acid/creatinine 비, 혈청 NSE, IL6, IL-1β 값은 제대혈 자가 줄기세포 이식군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계학적으로는 두군 간에 차이를 보이지 않았다. 뇌 보호 인자로 알려진 GDNF

Table 1. Clinical Characteristics of Patients with Umbilical Cord Blood Transplantation and Controls

	UCBCT (n=26)	Control (n=11)	P-value
Gestational age (wk)	29.9±1.91 (26-32)	29.8±2.31 (26-32)	0.96
Birth Weight (kg)	1.30±0.29	1.32±0.18	0.39
Initial pH	7.27±0.07	7.26±0.09	0.32
Apgar score (1 min)	3.76±1.48	3.77±1.48	0.25
Apgar score (5 min)	6.29±2.11	5.91±1.19	0.08
Mechanical Ventilation (days)	9.6±22.9	5.7±5.7	0.59

Table 2. Data of Umbilical Cord Blood Transplantation*

NO.	Initial Vol (mL)	Inj Vol (mL)	WBC (/μL)	MNC (×10 ⁷)	CD34 (/μL)	CD34 (%)	CD34 (×10 ⁶)	Viability (%)
1	125	10	5,000	5	85.5	1.71	0.86	99
2	84	6	20,500	12.3	259.1	1.26	1.55	99
3	53	10	3,150	3.15	158.4	5.03	1.58	99
4	117	1	7,000	7	129.8	1.85	1.30	99
5	103	1	2,500	2.5	13.9	0.56	0.14	99
6	128	1	6,930	6.93	73.1	1.16	0.73	93
7	65	1	16,000	16	341	2.13	3.41	100
8	45	1	2,600	2.6	115.9	4.46	1.16	99
9	76	1	4,100	4.1	18.4	0.45	0.184	90
10	76	1	4,770	4.77	20.4	0.43	0.204	100
11	70	1	6,730	6.73	28.34	0.5	0.2834	99

*Data from Pochon CHA University Bundang CHA hospital
Abbreviations : MNC, mononuclear cell; Inj, injected; Vol, volume

Table 3. Levels of Markers in Umbilical Cord Blood Transplantation and Control at Day 1 of Life

	UCBCT	Control	P value
Nucleated RBC (No./100 WBC)	26.5±53.9	26.1±24.1	0.97
Urinary UA/Cr ratio	7.1±8.1	4.0±1.8	0.08
NSE (ng/mL)	20.4±12.1	17.6±6.7	0.49
Interleukin-6 (pg/mL)	79.6±99.2	43.8±70.9	0.32
Interleukin-1β (pg/mL)	5.48±11.13	1.85±0.84	0.16
GDNF (pg/mL)	493.3±103.7	491.3±100.8	0.42

Abbreviations : UCBCT, umbilical cord blood cell transplantation; UA, uric acid; Cr, creatinine; NSE, neuron specific enolase; GDNF, glial cell derived neurotrophic factor

는 두 군 간에 농도의 차이가 없었다(Table 3).

생후 제 1일, 3일, 5일, 그리고 7일에 측정된 유핵 적혈구의 수(NRBC/100 WBC)의 감소 속도는 제대혈 자가 줄기 이식군이 대조군에 비해 급격한 감소를 보여 더 빨리 정상화되는 경향을 보였다(Fig. 1A). 초기에 극심한 증가를 보였던 제대혈 이식군 중 2명은 사망하였고 대조군 중 1명은 심한 신경학적 손상을 받았으며 모두 신생아 패혈증과 연관된 감염과 관계가 있었다(Fig. 1B).

3. 제대혈 자가 줄기 이식 전후의 표식인자 변화

제대혈 자가 줄기 이식 전후에 시행한 저산소성-허혈성 뇌증

Table 4. Serum and Cerebrospinal Fluid levels of Neuron Specific Enolase, Interleukin-6, Interleukin-1 β , and Glial Cell Derived Neurotrophic Factor in Day 1 and 7 of Life in UCBCT

Markers		D 1 of life	D 7 of life	P value
NSE (ng/mL)	Serum	19.1 \pm 8.9	12.3 \pm 4.9	0.008
	CSF	28.8 \pm 8.6	29.8 \pm 11.3	0.79
Interleukin-6 (pg/mL)	Serum	96.3 \pm 107.6	69.9 \pm 95.3	0.01
	CSF	2.75 \pm 1.42	2.31 \pm 1.36	0.058
Interleukin-1 β (pg/mL)	Serum	3.8 \pm 5.9	3.5 \pm 7.0	0.86
	CSF	0.19 \pm 0.11	0.25 \pm 0.21	0.31
GDNF (pg/mL)	Serum	506.4 \pm 110.9	624.9 \pm 632.3	0.82
	CSF	48.9 \pm 5.0	53.0 \pm 16.5	0.71

Abbreviations : NSE, neuron specific enolase; IL-6, interleukin-6; IL-1 β ; GDNF, glial cell derived neurotrophic factor

의 지표들에서 혈청 NSE와 IL-6는 생후 제 7일에 의미 있게 감소하였으나 뇌척수액에서는 통계학적인 의미를 보이지 않았다(Fig. 2). 혈청 IL-1 β 는 생후 제 7일에 감소하는 경향을 보였으나 통계학적인 의미는 없었고 뇌척수액에서도 차이를 보이지 않았다. 혈청 GDNF 농도는 줄기세포 이식 후 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 의미는 없었고 뇌척수액 역시 차이가 없었다(Fig. 3).

4. 뇌실 내 출혈

뇌 초음파 상 뇌실 내 출혈은 줄기세포 이식군 26명에서 grade I, II-III, IV가 각각 4명, 2명, 1명이었고 대조군 11명에서는 grade I이 2명, grade IV가 1명으로 통계학적인 의미는 없었다(Fig. 4).

5. 생후 1개월의 두위 성장

생후 1개월의 두위 성장(2 cm 이상)은 줄기세포 이식군에서 11명(46%), 대조군은 3명(27%)으로 줄기세포 이식군에서 더 많았으나 통계학적인 의미는 없었다(Fig. 5).

6. 생후 1개월에서의 합병증 발생

생후 1개월에서의 뇌병변은 줄기세포 이식군 24명 중 3명에서 뇌실주위 연화증이 발생하였고 그 중 1명은 뇌실확장증을 동반하였으며 대조군에서는 11명 중 2명에서 뇌실주위 백질연화증과 뇌실확장증이 발생하였다. 뇌 병변 이외에 저출생 미숙아와

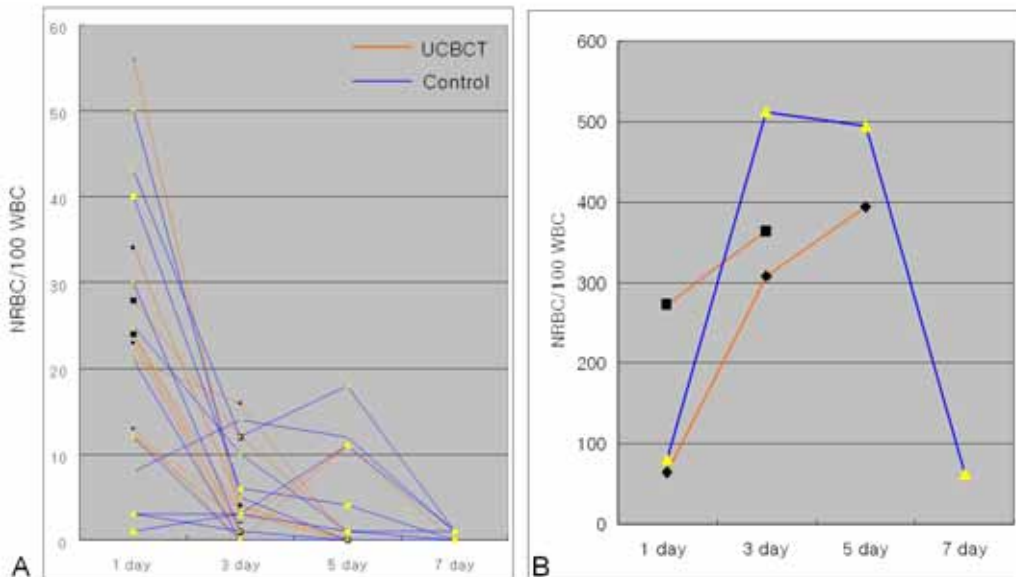


Fig. 1. (A) Nucleated RBC in patients with umbilical cord blood transplantation and Control at day 1, 3, 5 and 7 of Life. The nucleated RBC is more likely to be rapidly discharged in the transplanted group. (B) Two patients with umbilical cord blood transplantation who showed severely increased nucleated RBC at the early postnatal days were died for sepsis related with infection (black square & diamond). One patient with markedly increased nucleated RBC had severe neurologic sequelae in control group (blank triangle). Abbreviations : UCBCT, umbilical cord blood cell transplantation.

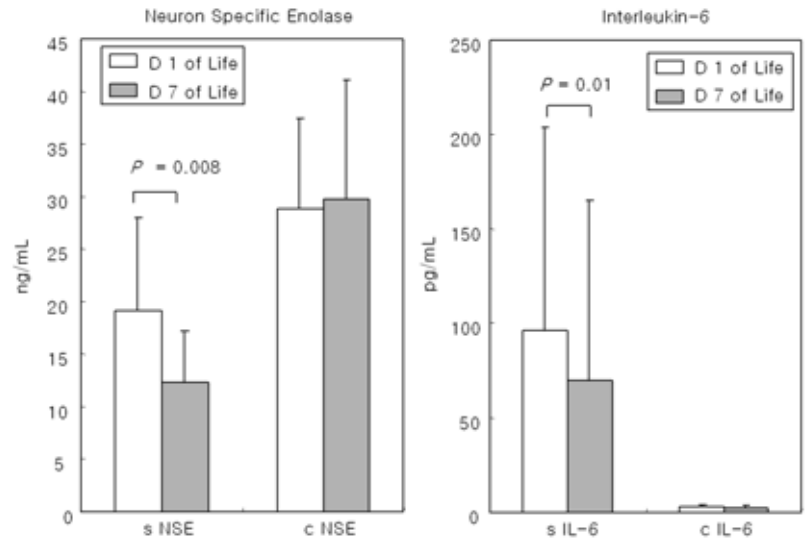


Fig. 2. Plasma and cerebrospinal fluid levels of neuron specific enolase, Interleukin-6 on day 1 and 7 of life in patients with umbilical cord blood transplantation. Abbreviations: s NSE, serum neuron specific enolase; c NSE, cerebrospinal fluid neuron specific enolase.

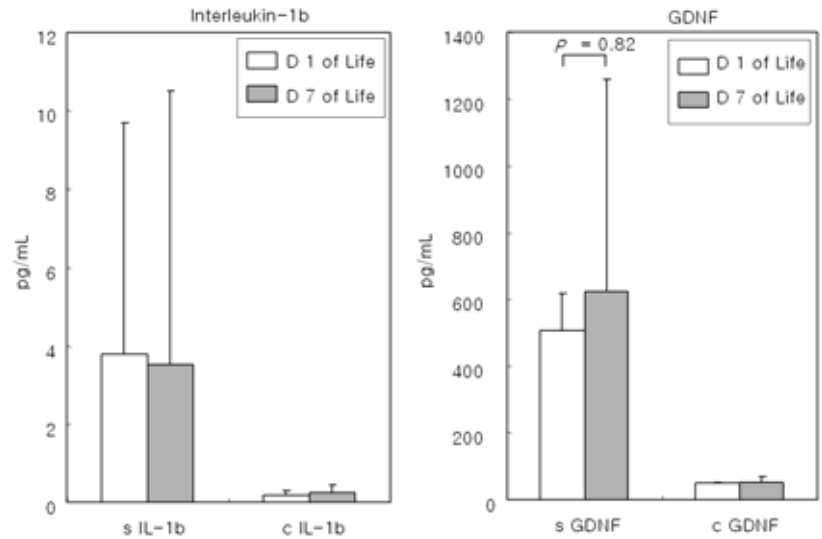


Fig. 3. Plasma and cerebrospinal fluid levels of interleukin-1b, glial cell derived neurotrophic factor on day 1 and 7 of life in patients with umbilical cord blood transplantation.

연관된 합병증으로 줄기세포 이식군에서 기관지폐이형성증 및 괴사성 장염이 각각 1명씩 발생하였고 대조군에서는 미숙아 망막증이 2명에서 발생하였다. 신생아호흡곤란 증후군과 연관된 패혈증으로 2명이 줄기세포 이식군에서 사망하였으며 세포 이식과는 연관관계가 없었다(Fig. 6).

고 찰

지난 30여년간 뇌성 마비의 발생 빈도는 변화가 거의 없는 상태이며 치료 또한 근본적인 예방 또는 치료 없이 재활 또는 경련에 대한 항간질치료 등의 보존적 요법만이 아직까지 가능한 상태이다. 이 연구는 극소 저출생체중 미숙아들을 대상으로 하여 근본적인 치료적 접근으로서 자가 제대혈 줄기세포 이식을 최초

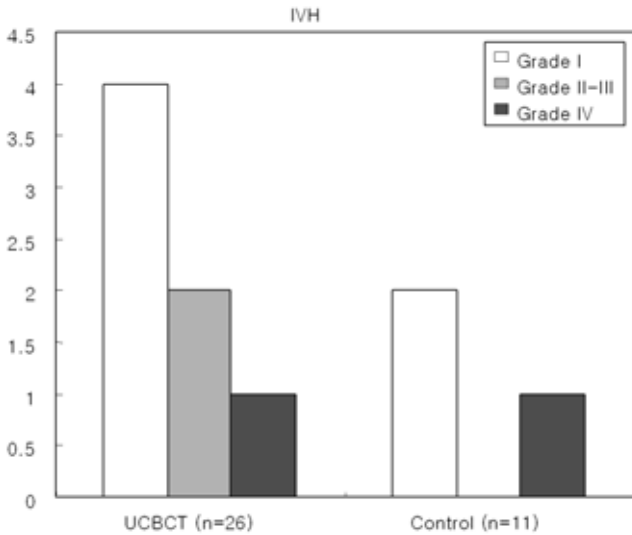


Fig. 4. Intraventricular hemorrhages in patients with umbilical cord blood transplantation and control.

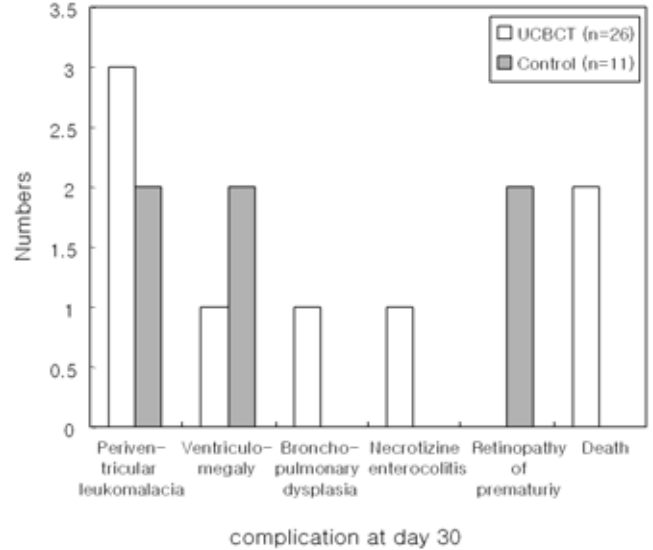


Fig. 6. Complications at day 30 of life in patients with umbilical cord blood transplantation and control.

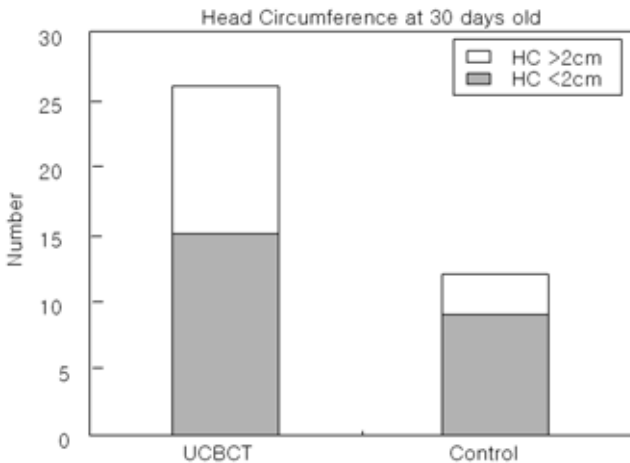


Fig. 5. Head Circumference on day 30 of life in patients with umbilical cord blood transplantation and control. Abbreviations : s NSE, serum neuron specific enolase; c NSE, cerebrospinal fluid neuron specific enolase.

로 시도하였다

조산은 뇌성마비 발생의 가장 중요한 요소로서, 만삭아의 경우 1,000명 출생 당 1.0-1.5명에서 뇌성마비가 발생하지만 극소 저 출생체중 미숙아에서는 8-10%까지 그 발생율이 증가한다^{6, 7)}. 이는 극소 저 출생체중 미숙아에서 신경계 및 심장-호흡기계의 미숙으로 인한 뇌 혈류 조절 불능과 저혈압, 그리고 미숙아 폐 질환 등에 의해 저산소성-허혈성 뇌증이 만삭아에 비해 높게 발생하는 것에 기인한다. 저산소성-허혈성 뇌증에 의한 미성숙 희소돌기아교세포(pre-mature oligodendroglial cell) 사멸은 뇌실 주위 백질 연화증을 발생시키는 중요한 원인이 되며 이는 뇌성 마비와 발달 장애의 중요한 원인이 된다. 뇌 백질 부위로 가는 혈관의 미숙과 뇌혈관 자율 조절의 실조, 허혈성 뇌손상 부위의

재관류로 인한 산소 자유 라디칼의 증가, 모체 및 태아 감염과 관련된 여러 싸이토카인, 뇌실 내 출혈, 그리고 흥분성 아미노산인 글루타메이트의 증가 등이 극소 저 출생체중 미숙아에서 미성숙 희소돌기아교세포 사멸을 증가시킨다⁸⁾.

뇌실주위 백질연화증을 예방하기 위해서는 태아 또는 신생아의 뇌혈류 이상을 빨리 감지하여 충분한 혈류 공급이 될 수 있도록 도와주고 산소 자유라디칼의 제거, 글루타메이트에 대한 길항제 투여, 그리고 신생아 및 모체의 감염을 치료하는 것 등을 통해 미성숙 희소돌기아교세포를 보호해야 한다⁸⁾. 그러나 태아의 뇌혈류 이상을 빨리 발견하여 교정하는 것이 실제 임상에서는 많은 제약이 있다. 비타민 E 등과 같은 항산화제를 통한 산소 자유라디칼의 제거는 태아에 미칠 약물의 부작용이 아직 검증이 되지 않은 상태이며 또한 topiramate와 같은 글루타메이트 길항제도 태아에 대한 안전성이 확립되지 않은 상태이다. 따라서 현재 저산소성 허혈성 뇌증을 보호하기 위한 실제적인 방법으로 allopurinol 투여를 통한 자유 라디칼의 제거, 전신 또는 두부 저체온 요법 등이 일부에서 시도되고 있지만 아직 보편적인 치료로는 사용되지 못하고 있는 상태이다^{9, 10)}.

한편, 제대혈 줄기세포를 뇌졸중 또는 뇌손상 등의 신경학적 질환 모델을 가진 동물에 투여하는 경우 줄기세포가 손상 부위로 이동하며 손상부위가 최소화되고 빠른 기능 회복을 보임이 1990년대 말부터 증명되기 시작하였다^{11, 12)}. 이후 줄기세포는 서로 다른 조직의 다양한 세포들로 분화되는 뛰어난 가소성을 가짐이 밝혀졌으며 줄기세포를 이용한 치료는 뇌졸중을 포함한 여러 난치성 뇌질환의 근본적인 치료 방법 중 하나로서 주목 받게 되었다^{13, 14)}. 줄기세포 이식을 통한 치료 효과는 손상된 세포를 구조적으로 재생 시키기보다는 GDNF 등과 같은 신경 보호 물질 또는 신경 영양 물질(neurotrophic factors) 등을 분비하여

손상 경계 영역(penumbra zone)의 세포자가사멸을 막고 내생적인 재생을 촉진하는 것으로 추정된다^{15, 16}. 제대혈에는 풍부한 조혈 모세포와 선조 세포(progenitor cell)가 있으며, 특히 제대혈내의 줄기세포는 분화능력과 이주 능력(migration potential)이 뛰어난 것으로 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹. 또한 이식 후에 이식편대숙주질환의 발생률이 매우 낮으며 성인의 골수 줄기세포에 비해 체외 증폭이 잘 되고 오랜 기간동안 클론을 잘 유지시킬 수 있다²⁰. 뿐만 아니라 골수 천자 없이 충분한 양을 쉽고 안전하게 얻을 수 있으며 저장과 사용이 용이할 뿐만 아니라 윤리적인 문제가 거의 없다는 점에서 여러 분야의 질환에 실용적으로 사용할 수 있는 줄기세포이다. 현재 림프구 및 골수성 백혈병, Fanconi 빈혈, 재생불량성 빈혈, Hunter 증후군, Wiskott-Aldrich 증후군, 베타 탈라세미아, 그리고 신경모세포종 등의 난치성 질환에서 사용되고 있으나 아직 미숙아 질환에서의 자가 제대혈 줄기세포 이식은 저자들이 알기에 아직까지 보고가 없었다. 비록 성인에서의 뇌졸중, 또는 실험 동물에서의 저산소성-허혈성 모델이 주산기의 미숙아 뇌 손상과는 다르지만 기본적으로 같은 병리학적 공통점을 가지므로 본 연구는 극소 저 출생체중 미숙아에서 저산소성 허혈성 뇌증으로 인한 뇌실주위 백질 연화증이 자가 제대혈 줄기세포 이식을 통해 예방될 수 있는지 알고자 시행되었다. 이 연구 초기에는 만삭아들에서의 저산소성-허혈성 뇌증의 치료도 목표로 하였으나 태아 감시체계의 발달로 인하여 태아가 급성 뇌증에 이르기 이전에 대부분 진단되고 응급 제왕절개 수술을 통해 분만 되어 실제로 병원 내에서 만삭아에서 발생한 뇌증의 진단 기준(5분 Apgar 점수가 7 미만, 제대혈 또는 첫 동맥혈 pH가 7.1 미만, 저긴장성, 신경반사 이상, 기면 등)을 모두 만족시키며 분만 된 경우를 찾기 어려웠다. 분만 전 태아 감시 없이 외부에서 급히 전원 되어 오는 경우에는 신생아 뇌증이 의심되더라도 실제 Apgar 점수 또는 첫 제대혈의 산도를 알기 어려웠고 또한 대부분 응급 수술, 산모의 자궁 과열, 감염 등이 동반되어 제대혈을 받기에 부적절하였다. 따라서 만삭아들에서의 신생아 뇌증은 실제 임상 상황에서 발생함에도 불구하고 피험자 선정에서 제외하게 되었다. 향후 만삭아에서의 저산소성-허혈성 뇌증의 치료로는 자가 제대혈 줄기세포 이식보다는 현재 가동중인 제대혈 은행을 통한 동종 제대혈 줄기세포 이식을 시도하는 것이 실제적인 방안으로 생각된다.

본 연구에서 제대연령, 출생 시 체중, 첫 혈액에서의 산도, 그리고 기계 호흡 기간은 제대혈 자가 줄기세포 이식군과 대조군 간에 차이를 보이지 않았다. 이식된 제대혈 줄기세포수는 단핵구로서 평균 $5.87 \times 10^7/\text{kg}$, CD 34(+) 세포로서 $1.18 \times 10^6/\text{kg}$ 투여 되어 분리된 단핵구 수는 처음 목표 수치에 비해 적었으나 CD 34(+) 세포의 수는 목표치에 도달하여 충분한 수의 줄기세포가 투여 된 것으로 생각되었다. 적절한 줄기 세포 투여 양에 대한 보고는 아직 없으나 투여 된 수에 비례하여 치료 효과를 가지는 것으로 알려지고 있다²¹. 분리 된 후의 줄기세포 생존율은 90-100%로 세포 독성을 가질 수 있는 Ficoll은 원심 침전 과정을

거치며 완전히 제거되어 Ficoll을 이용한 줄기세포의 분리는 안전한 방법으로 생각되며 오탄당(pentastarch) 용액을 이용한 분리보다 최종 부피를 줄일 수 있어 미숙아에 투여 시에 적은 용량으로 줄 수 있는 장점이 있었다. 제대혈 줄기세포는 성인줄기세포에 비해 쉽게 응집되고 수액관에 잘 붙어 이를 방지하기 위해 부피를 줄이는 최종 단계에서 헤파린 1 unit를 추가하였으며 이에 따르는 출혈성 경향 혹은 급성 뇌실 내 출혈 등의 부작용은 발견 할 수 없었다. 생후 제 1일의 저산소성-허혈성 뇌증의 조기 표식 인자들인 유핵 적혈구수²², 소변내의 uric acid/creatinine 비²³, neuron specific enolase²⁴, interleukin-6²⁵, interleukin-1 β ²⁶ 등은 두 군에서 통계학적인 차이 없이 정상 만삭아에서 보고된 수치보다 모두 증가하여 극소 저 출생체중 미숙아들이 가사 상태에 놓여 있음을 반영하였다. GDNF는 신경세포 보호 작용이 있는 것으로 알려져 있는데²⁷ 이의 분석 역시 두군 간에 농도의 차이가 없어 극소 저 출생체중 미숙아 두 군에서의 초기 조건은 같은 것으로 추정되었다. 제대혈 자가 줄기 이식 후 표식 인자 변화로서 생후 제 1일, 3일, 5일, 그리고 7일에 측정된 유핵 적혈구의 수(NRBC/100 WBC)의 감소 속도는 제대혈 자가 줄기 이식군이 대조군에 비해 급격한 감소를 보여 더 빨리 정상화되는 경향을 보였다. 이는 이식된 제대혈을 통한 보호 효과로 추정되나 통계적인 의미를 갖기 위해서는 더 많은 실험 참여 인원이 필요할 것으로 생각된다. 특별히 평균 5배 이상의 유핵 적혈구수 증가를 보였던 미숙아들은 사망하거나 심한 신경학적 손상을 받아 유핵 적혈구 수치가 비교적 초기에 자유라디칼에 의한 미숙아 손상과 예후를 잘 반영하는 것으로 추정되었다. 제대혈 줄기세포 이식군 내에서 생후 제 1일과 7일에 측정하였던 표식 인자들은 혈청 수준과 뇌척수액의 수준이 서로 일치하지 않아 일관된 결과를 보이지 않았다. 즉, NSE와 IL-6와 같은 뇌손상 관련 인자들은 줄기세포 이식 후 혈청 수준이 의미 있게 감소하였으나 뇌척수액에서는 변화를 보이지 않았다. GDNF는 생후 제 7일에 혈청 및 뇌척수액에서 모두 증가하는 경향을 보였으나 이와 같은 증가가 줄기세포 투여로 인한 효과인지 뇌세포 성장에 따른 경과인지는 구분되지 않았다. 뇌실 내 출혈 빈도 또한 두 군간의 특이한 차이를 보이지 않았다. 생후 1개월에서 2 cm 이상 두위가 성장한 미숙아도 줄기세포 이식군에서 더 많은 경향을 보였으나 자가 줄기세포 이식에 따른 효과로 추정하기는 실험 대상수가 적었다. 생후 1개월에서의 합병증으로서, 뇌실주위 백질연화증은 줄기세포 이식군 24례 중 3례, 대조군 11례 중 2례가 발생하여 줄기세포 이식군에서 조금 적게 발생한 경향을 보였다. 연구 기간 중 사망은 줄기세포 이식군에서 2명 발생하였으며 각각 제대 기간 28주에 770 g, 870 g으로 출생 한 환자들로서 신생아호흡곤란 증후군이 지속적으로 악화되어 신생아 폐혈증으로 모두 사망하였고 줄기세포 이식술과는 직접적인 연관성을 찾을 수 없었다.

이 연구가 가지는 한계점으로는 예비연구 형태로서 한정된 수의 실험군 내에서 시행되어 통계적인 의미를 갖기 힘들었고, 또

한 정상 대조군에서 반복적인 뇌척수액 검사를 실행하기 어려워 제대혈 이식 후 대조군에서의 표식인자 변화를 비교하지 못했다. 이와 같은 점은 향후 연구에서 덜 침습적이고도 정교한 표식인자가 필요함을 시사하며 충분한 수의 실험군과 대조군을 대상으로 장기적인 추적관찰을 통해 줄기세포 이식 효과를 평가하는 것이 필수적일 것으로 생각된다.

극소 저 출생체중 미숙아에서의 저산소성-허혈성 뇌증에 대한 자가 제대혈 줄기세포 치료는 손상된 조직에 대한 근본적인 치료 시도로서 윤리적인 측면에서도 특별한 문제점이 없이 환자 자신의 줄기세포를 이용함으로써 줄기세포 투여로 인한 이식편대숙주반응 등의 부작용을 근본적으로 예방할 수 있고 동시에 방법적으로도 쉽게 시행할 수 있다는 점에서 안전하고 실용적인 방법이라고 생각되나 임상적인 치료 효과가 장기적으로 증명되어야 할 것이다. 또한 자가 제대혈 줄기세포 치료가 실용화 될 경우에는 산소 라디칼 독성과 연관된 뇌실 내 출혈, 미숙아 망막증이나 기관지 폐 이형성증, 괴사성 장염 등에서도 예방 혹은 치료 효과가 동반될 것으로 예상된다. 향후 제대혈 줄기세포를 이용한 다양한 신생아 질환의 예방 및 치료적 접근은 의학적인 발전뿐만 아니라 사회적, 경제적 측면에서 막대한 이득을 가져올 것으로 예상되므로 이에 대한 후속 연구 및 지원이 지속되어야 할 것이다.

요 약

목적 : 제대혈액 내 줄기세포 자가 이식이 극소저출생 미숙아의 신경학적 손상을 방지할 수 있는지 알아보려고 하였다.

방법 : 출생체중 1,500 g 미만, 제대연령 32주 이하인 미숙아 26명을 대상으로 하였다. 환자의 제대혈에서 단핵구만 분리한 후 생후 24-48시간 사이에 단핵구로서 평균 $5.87 \times 10^7/\text{kg}$ 개를 정맥 주사 하였다. 평가 변수들로서는 저산소성-허혈성 뇌증의 예측 지표로 사용되는 유핵 적혈구수, 소변내의 uric acid/creatinine 비와 NSE, IL-6, IL-1 β 등과 신경세포 보호 작용이 있는 것으로 알려진 GDNF의 농도를 혈청 및 뇌척수액에서 측정하였다. 임상적으로는 생후 1개월의 두위 증가 정도와 함께 뇌 병변, 기관지폐 이형성증, 미숙아 망막증, 괴사성 장염 등의 발생 정도를 평가하였다.

결과 : 1) 소변내 uric acid/creatinine 비는 줄기세포 자가 이식군과 대조군 사이에 차이가 없었으나 유핵 적혈구수의 감소는 줄기세포 이식군에서 빠르게 감소하는 경향을 보였다. 2) 제대혈 자가 줄기 이식 전후에 시행한 혈청 NSE와 IL-6는 생후 제 7일에 의미 있게 감소하였으나 뇌척수액에서는 통계학적인 의미를 보이지 않았다. 혈청 IL-1 β 는 생후 제 7일에 감소하고, 혈청 GDNF 농도는 줄기세포 이식 후 증가하는 경향을 보였으나 모두 통계학적인 의미는 없었고 뇌척수액에서도 차이를 보이지 않았다. 3) 생후 1개월에서의 두위 성장(2 cm 이상)은 줄기세포 이식군에서 11명(46%), 대조군은 3명(27%)이었다. 4) 생후

1개월에서의 뇌병변은 줄기세포 이식군 24명 중 3명에서 뇌실주위 연화증이 발생하였고 그 중 1명은 뇌실확장증을 동반하였으며 대조군에서는 11명 중 2명에서 뇌실주위 백질연화증과 뇌실확장증이 발생하였다. 5) 줄기세포 이식군에서 기관지폐이형성증 및 괴사성 장염이 각각 1명씩 발생하였고 대조군에서는 미숙아 망막증이 2명에서 발생하였다. 6) 줄기세포 이식군에서 신생아호흡곤란 증후군과 연관된 패혈증으로 2명이 사망하였으며 제대혈 줄기세포 자가 이식과는 연관관계가 없었다.

결론 : 극소 저출생체중 미숙아에서 제대혈 자가이식술은 윤리적인 문제없이 쉽게 시행할 수 있는 안전하고 실용적인 신경손상 예방 및 치료법으로 기대된다. 향후 장기적인 신경학적 추적 검사 및 비침습적이며 정교한 평가 변수 확립이 필요하다.

References

- Himmelmann K, Hagberg G, Beckung E, Hagberg B, Uvebrant P. The changing panorama of cerebral palsy in sweden. IX. Prevalence and origin in the birth-year period 1995-1998. *Acta Paediatr* 2005;94:287-94.
- Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153-65.
- Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: Engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:271-8.
- Newman MB, Davis CD, Borlongan CV, Emerich D, Sanberg PR. Transplantation of human umbilical cord blood cells in the repair of CNS diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:121-30.
- Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 2004;35:2390-5.
- Grether JK, Cummins SK, Nelson KB. The California cerebral palsy project. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1992;6:339-51.
- Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrant P. Changing panorama of cerebral palsy in sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. *Acta Paediatr* 2001;90:271-7.
- Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001;50:553-62.
- Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, Kose K, Gunes I. Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol* 2007;36:17-24.
- Edwards AD, Azzopardi DV. Therapeutic hypothermia following perinatal asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F127-31.
- Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-8.
- Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker

- KR, Zigova T, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 2004; 35:2390-5.
- 13) Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001;7:259-64.
- 14) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711-6.
- 15) Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1393-408.
- 16) Johansson CB. Mechanism of stem cells in the central nervous system. *J Cell Physiol* 2003;196:409-18.
- 17) Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A, Douglas GW, Friedman H, Cooper S, et al. Human umbilical cord blood: A clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning* 1990;8(Suppl 1):89-91.
- 18) Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993;178:787-91.
- 19) Voermans C, Gerritsen WR, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Increased migration of cord blood-derived CD34+ cells, as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells across uncoated or fibronectin-coated filters. *Exp Hematol* 1999;27:1806-14.
- 20) Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995;86:3745-53.
- 21) Ende N, Chen R, Reddi AS. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:665-9.
- 22) Ghosh B, Mittal S, Kumar S, Dadhwal V. Prediction of perinatal asphyxia with nucleated red blood cells in cord blood of newborns. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;81:267-71.
- 23) Chen HJ, Yau KI, Tsai KS. Urinary uric acid/creatinine ratio as an additional marker of perinatal asphyxia. *J Formos Med Assoc* 2000;99:771-4.
- 24) Celtik C, Acunas B, Oner N, Pala O. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2004;26:398-402.
- 25) Tekgul H, Yalaz M, Kutukculer N, Ozbek S, Kose T, Akisu M, et al. Value of biochemical markers for outcome in term infants with asphyxia. *Pediatr Neurol* 2004;31:326-32.
- 26) Aly H, Khashaba MT, El-Ayouty M, El-Sayed O, Hasanein BM. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2006;28:178-82.
- 27) Harvey BK, Chang CF, Chiang YH, Bowers WJ, Morales M, Hoffer BJ, et al. HSV amplicon delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor is neuroprotective against ischemic injury. *Exp Neurol* 2003;183:47-55.