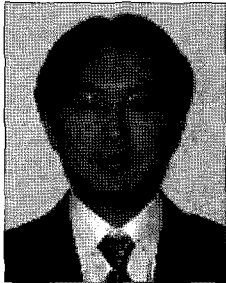
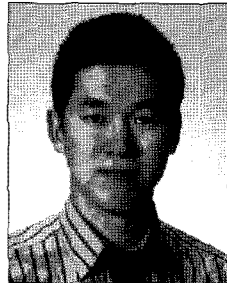


줄기세포공학: 재생의학을 위한 새로운 패러다임

Stem Cell Engineering for Developing
Novel Therapeutics for Regenerative Medicine



연세대학교
생명공학과
조승우



연세대학교
생명공학과
양기석

1. 서론

오늘날 인간의 평균 수명의 증가와 더불어 심혈관질환, 신경질환, 당뇨병, 골관절염 등 퇴행성 질환 및 말기 장기부전 질환의 발병률이 크게 증가하고 있다. 이러한 난치성 질환은 조직손상이 심하지 않은 경우 기존의 약물 투여 및 외과적 수술법으로 치료가 가능하다. 그러나 증상이 심한 많은 환자들의 경우 손상된 조직을 완전히 재생시키고 기능을 회복시키는 보다 근본적인 치료술이 필요하다. 줄기세포는 다양한 세포 및 조직으로 분화가 가능하여 기존의 방법으로는 치유가 어려운 난치성 질환을 위한 새로운 치료제로서 각광받고 있다. 성체줄기세포 연구는 혈액질환이나 면역질환 환자에 대한 조혈모세포 이식술과 같이 비교적 연구가 많이 진행된 분야도 있다. 하지만 배아줄기세포나 최근 보고된 유도만능줄기세포와 같은 전분화능 줄기세포 연구는 근래 5~10년 사이에 주로 이루어져 왔으며 아직도 연구의 초기 단계에 있다. 더욱이 그 동안의 연구는 줄기세포주를 수립하거나 줄기세포의 생물학적 특성을 밝히는데 집중되어 왔다. 근래 진행된 동물실험과 임상연구를 통해 이식된 줄기세포의 생착능 저하로 인한 치료효능 감소와 제어되지 않은 줄기세포 분화에 따른 안전성이 심각한 문제점으로 인식되고 있다. 이러한 상황에서 임상적용 가능한 수준의 줄기세포 치료제를 개발하기 위해 당면한 문제점을 해결할 수 있는 줄기세포 응용기술 개발 연구에 주력할 필요가 있다. 본 원고에서는 줄기세포의 종류 및 특징, 줄기세포 치료제의 개발 현황에 대해 요약하고 줄기세포의 생착능을 향상시키고 분화를 조절하는데 응용될 수 있는 기술을 개발하는 최근의 줄기세포공학 연구 동향을 소개하고자 한다.

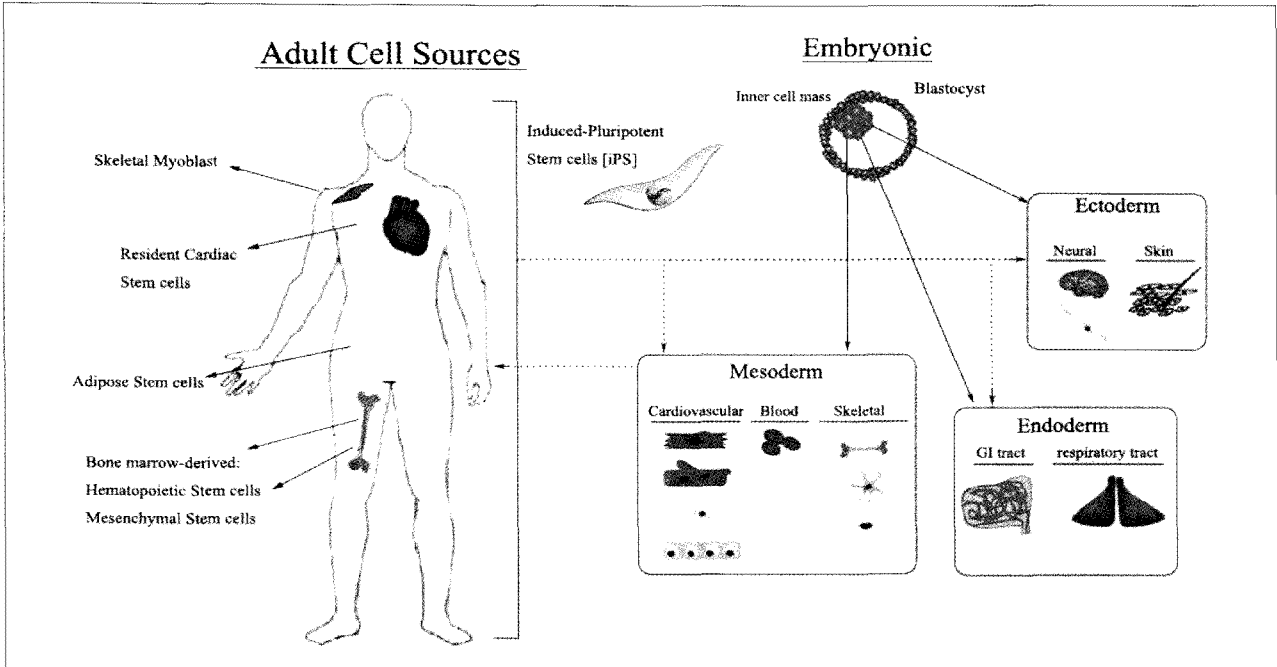


그림 1. 줄기세포의 종류 [참고문헌 1에서 인용].

2. 줄기세포의 종류 및 장단점

줄기세포는 반복 분열하여 자기 재생 (self-renewal) 할 수 있고 특정 조건 하에서 분화하여 다양한 조직을 구성하는 세포가 될 수 있는 분화 능력을 가진 세포를 일컫는다. 다시 말해, 적절한 분화 조절을 통해 다양한 조직생성이 가능하기 때문에 난치성 질환의 치료 가능성을 제시하는 재생의학 분야의 중요한 세포원이라 할 수 있다. 줄기세포의 종류에는 골수 및 지방과 같은 성체 조직 내 존재하는 성체줄기세포 (adult stem cell), 수정된 배아로부터 제작되는 배아줄기세포 (embryonic stem cell), 역분화 (reprogramming) 방법을 통해 분화된 체세포로부터 배아줄기세포와 동등한 표현형질과 분화능력을 갖도록 제작된 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell)가 있다 (그림 1).

2.1. 성체줄기세포 (adult stem cell)

성체줄기세포는 성체의 조직이나 장기 내에 존재하는 줄기세포로 골수, 제대혈, 말초혈액, 지방 조직 내에서 주로 분포한다. 최근에는 심장, 신경, 피부, 근육 등에서도 조직 특이적인 줄기세포가 존재함이 보고되고 있다. 대표적인 성체줄기세포는 조혈모세포 (hematopoietic

stem cell)와 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cell)이다. 조혈모세포는 혈구 및 면역세포로 분화가 가능한 줄기세포로서 주로 골수와 말초혈액에 존재하며 혈액 및 면역질환 치료를 위한 세포 이식술에 활용되어 왔다. 1999년에는 골수에 존재하는 성체줄기세포 중 하나인 중간엽줄기세포가 “Science” 저널에 보고되었는데, 골, 연골 및 지방세포 등으로 분화할 수 있는 다분화능을 가지고 있어서 관련 질환 치료를 위한 재생의학에 활용될 가능성이 제시되었다[2]. 성체 조직에서 채취한 줄기세포는 비교적 간단한 방법을 통해 분리할 수 있고 반복적인 추출이 가능하다는 장점을 가진다. 성체줄기세포는 전분화능 줄기세포인 배아줄기세포에 비해 분화능력이 다소 제한적이지만 자가 조직으로부터 분리, 배양이 가능하여 자가 세포치료제로서 개발될 수 있는 가능성이 있어 현재 다양한 질환에 대한 임상 연구가 진행되고 있다.

성체줄기세포는 동물실험과 임상시험을 통해 치료 효과와 안전성이 상당 부분 입증됐다는 평가를 받고 있다. 많은 줄기세포 연구자들은 골수 및 지방줄기세포를 포함한 성체줄기세포의 조직재생 효과 및 안전성이 추가 연구를 통해 확실히 검증된다면 척수손상, 신경질환, 골/연골질환, 심장질환, 피부재생 등 다양한 조직손상 질환에 적용될 수 있을 것으로 전망하고 있다. 그러

나 세포 이식 후 생착능이 다소 저하되는 경향이 있으며 이에 따라 치료 효능에 한계가 있다는 보고가 있어 이를 극복하기 위한 응용기술을 개발하는 것이 필요하다.

2.2. 배아줄기세포 (embryonic stem cell)

30여 년 전 최초의 배아줄기세포가 쥐 배아에서 확립된 이후 1998년에 이르러 미국 위스콘신대 제임스 톰슨 (James Thomson) 박사에 의해 인간 배아줄기세포 (그림 2)가 확립되었다 [3]. 인간 배아로부터 줄기세포를 분리, 배양하고 이 줄기세포로부터 신경, 연골 및 심장 근육 등 다양한 세포를 만들어 내는데 성공 하면서 배아줄기세포에 대한 관심이 고조되었다. 배아줄기세포는 정자와 난자가 수정되어 얻어진 배아의 초기 발생 단계 중 하나인 배반포 (blastocyst)에 존재하는 내부세포괴 (inner cell mass)로 부터 추출된다. 이렇게 분리된 배아줄기세포는 특정 조건과 자극에 의해 신체를 구성하는 모든 조직 및 장기 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency)을 가지고 있다. 배아줄기세포의 체외 배양을 위해서는 적절한 성장인자와 세포증식에 도움을 주는 지지세포 (feeder cell)가 필요하다. 지지세포 상에서 배양 시 배아줄기세포는 콜로니를 형성하게 되는데 필요한 시점에 특정 세포로의 분화를 유도하여 난치병 치료를 위한 세포치료제로서 이용할 수 있다.

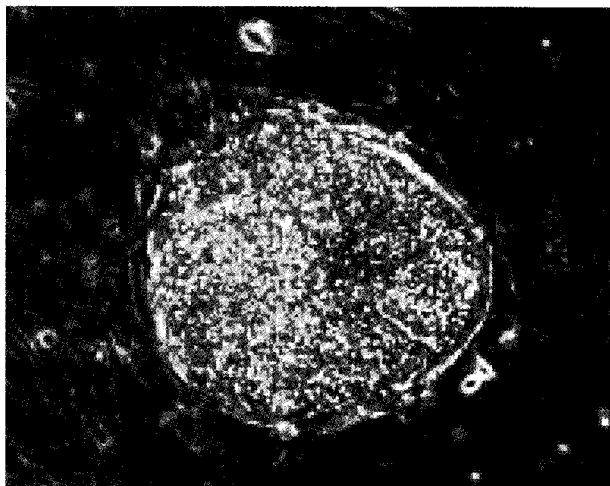


그림 2. 인간 배아줄기세포 [참고문헌 3에서 인용].

그러나 배아줄기세포 치료제가 임상단계에 진입하기까지는 몇 가지 해결해야 할 문제점이 있다. 배아줄기세포

포는 전분화능을 가지고 있어서 분화조절이 매우 어렵기 때문에 생체 내 이식되었을 때 기형종 (teratoma)을 생성할 수 있다. 따라서 원하는 세포로의 분화 조절 및 제어기술이 필수적으로 개발되어야 한다. 또한, 자가세포가 아니기 때문에 면역 반응을 유발할 수 있으므로 핵치환 기술을 적용한 환자 맞춤형 자가 배아줄기세포주를 확립하는 연구가 진행되고 있으나 아직 성공하지 못하였다. 마지막으로, 인간으로 발달할 수 있는 배아를 파괴해야 한다는 윤리적 논란에서 자유로울 수 없다.

2.3. 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell)

2006년 일본의 야마나카 신야 (Yamanaka Shinya) 교수 연구팀이 생쥐의 섬유아세포 (fibroblast)에 배아줄기세포에서 발현되는 4가지 전사인자 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)에 대한 유전자를 도입, 발현시켜 전분화능을 가지는 줄기세포주를 확립하였다 (그림 3) [4]. 이듬해 체세포의 역분화 (reprogramming)에 의한 유도만능줄기세포주의 확립이 인간 체세포에서도 재현되었고 표현형질, 유전자 발현 및 후생적 형질에 있어서도 배아줄기세포와 유사한 성질을 가지고 있음이 밝혀졌다[5]. 이처럼 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 유사하면서도 제작 시 배아가 필요 없기 때문에 윤리적 문제를 피할 수 있으며 자가 줄기세포 치료제로서 개발될 수 있다는 점에서 기존 줄기세포의 대안이 될 수 있다. 실제로 다양한 질환을 가지고 있는 환자로부터 채취된 체세포로부터 각각의 환자를 위한 환자 맞춤형 유도만능줄기세포가 성공적으로 수립되기도 하였다[6].

하지만 자가 세포 치료제로서 개발 가능성에도 불구하고 잠재적 발암유전자인 c-Myc를 비롯 4개 유전자의 발현 조절이 쉽지 않고 바이러스 벡터를 이용한 유전자 도입 방법으로 인한 독성, 면역반응, 및 암유발 가능성이 우려되고 있다. 따라서 최근에는 도입 유전자의 수를 줄이고 바이러스 벡터가 아닌 플라스미드 (plasmid), 이동유전자 (transposon; piggyBag) 및 전사인자 단백질 전달을 통해 역분화 줄기세포를 제작하는 연구결과들이 보고되고 있다[7-9]. 그러나 이러한 새로운 시도는 바이러스 벡터를 이용한 역분화 기술에 비해 줄기세포의

수득률이 떨어지는 문제점을 가지고 있어 역분화 효율이 보다 향상되고 안전하게 유전자 혹은 단백질을 도입하는 기술을 개발하는 연구가 필요하다.

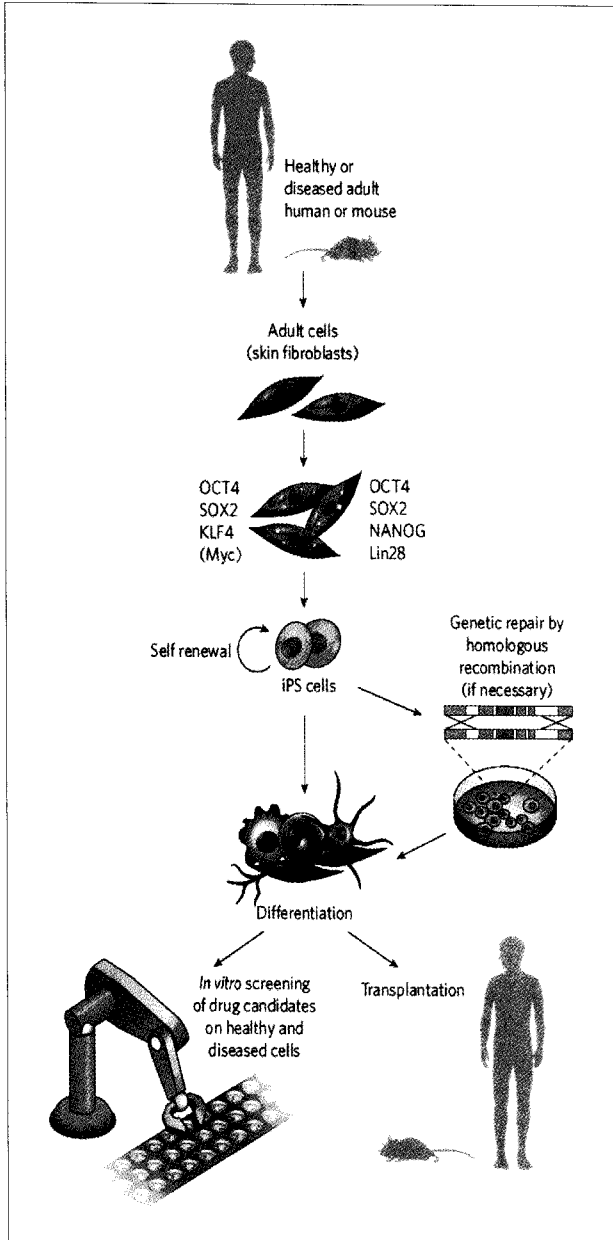


그림 3. 유도만능줄기세포 제작 및 응용 [참고문헌 10에서 인용].

3. 줄기세포 치료제 개발 및 임상적용 현황

줄기세포 치료제는 다양한 질환 동물모델에서의 연구를 거쳐 현재 일부 질환 치료를 위한 임상 시험이 진행 중에 있다. 주요 대상 질환은 허혈성 심혈관질환, 신경계질환 및 골/연골질환으로서 동물모델에서 치료 효

능과 안전성이 상당 부분 검증된 성체줄기세포 위주로 연구가 진행되고 있다. 심장근육 및 혈관세포로 분화가 가능한 골수줄기세포는 이식 후 허혈성 심근경색 혹은 하지허혈 동물에서 심장근육을 재생시키고 혈관생성을 촉진하는 재생능력을 보여주었고 심근경색 및 말초혈관질환 환자를 대상으로 한 임상 2상 및 3상에서 시험되고 있다. 뇌경색, 척수손상 환자 치료를 위한 골수줄기세포 이식술 및 동종 제대혈줄기세포를 이용한 연골결손 치료술도 임상 연구 중에 있다.

줄기세포 동원 유도제를 투여하여 내재적인 줄기세포를 증폭시켜 치료에 사용하는 기술도 현재 임상적으로 적용되고 있다. 과립구콜로니 자극인자 (G-CSF)와 같은 골수줄기세포의 동원 유도제를 환자에게 투여하여 줄기세포의 말초혈액으로 동원을 촉진시킨 후 분리하여 세포치료에 사용하는 방식으로 치료가 진행된다. G-CSF를 이용하여 동원, 증폭된 줄기세포는 심근경색증 환자의 치료에 적용되었을 때 효과적으로 허혈 부위에 혈류량을 증가시키고 심장기능을 크게 호전시켰다[11]. 국내에서 'MAGIC Cell' 치료술로 보고된 이 방법은 현재까지 수백 명 이상의 심근경색 환자에서 효능 및 안전성이 확인되고 있다.

그러나 질환 부위로 이식된 성체줄기세포는 잘 생착하지 못하여 치료 효능이 기대에 미치지 못하는 경우가 많다. 예를 들면 자가 골수 유래 줄기세포가 관상동맥을 통해 국소적으로 급성 심근경색 부위에 이식되었을 때 실제로 치료 효능이 미미하거나 거의 없었다는 보고가 있다[12]. 이는 줄기세포가 배양액이나 생리식염수에 부유되어 이식됨으로써 세포가 부착될 수 있는 환경이 조성되지 못하였기 때문으로 생각된다. 세포가 부착되지 못하면 줄기세포의 생착능이 감소하게 된다. 그 동안 성체줄기세포 임상연구는 대부분 세포만을 이식하는 방법으로 적용되어 왔기 때문에 줄기세포의 치료 효능을 높이기 위한 생착능 향상 응용기술이 필요하다고 하겠다.

배아 및 태아 유래의 줄기세포의 경우 성체줄기세포보다 안전성 및 윤리적 측면에서 우려가 되는 바 임상적용이 쉽지 않았다. 그러나 2009년 미국의 제론 (Geron) 사는 미국 식품의약국 (FDA)으로부터 최초로 인간 배아줄기세포 치료제의 임상시험을 승인 받아 현재 척

수손상 환자를 대상으로 한 임상 연구를 진행 중이다. 2009년 영국의 리뉴런 (ReNeuron)사는 태아에서 추출한 신경줄기세포를 뇌졸중 환자에게 적용하는 임상연구를 영국 의료보건당국으로부터 허가 받아 연구를 진행하고 있다. 그 동안 윤리적인 문제 및 안전성 측면에서의 불확실성 등으로 인해 제한적으로 연구되어 왔던 인간 배아줄기세포 혹은 태아 유래 줄기세포의 최근 임상시험 허가는 세계적으로 관련 줄기세포의 연구를 가속화할 것으로 전망된다.

그 동안 활발히 진행되어 왔던 줄기세포 연구로 줄기세포 치료제 개발에 많은 발전이 있었던 것은 분명하다. 그러나 현재 전 세계적으로 개발 중인 줄기세포 치료제 중 임상이 진행 중인 것은 총 231건이 있으나 이 중 상업화가 임박한 치료제를 검증하는 후기 임상시험 단계인 2상 및 3상 임상시험 건수는 오직 27건으로 집계되어 있다[미국 보건복지부 국립보건원 website (clinicaltrials.gov)에서 분석한 Biopolaris 2010년 2월 통계 자료]. 이처럼 줄기세포가 임상에 응용되고는 있지만 실질적으로 환자에게 적용될 수 있는 치료제로서 개발될 수 있는 가능성이 있는 세포주들은 아직까지는 극소수이며 이는 보다 효과적이며 안전한 줄기세포 치료제를 생산할 수 있는 응용기술이 필요함을 제시한다.

4. 줄기세포의 조직공학적 응용기술

조직재생에 필요한 특정 세포를 체외에서 다공성 지지체 (scaffold)에 배양하여 생체 내로 이식함으로써 손상된 조직을 복원하고 기능을 유지, 회복시키는 것을 목적으로 하는 조직공학 (tissue engineering)은 줄기세포의 응용가능성을 넓힐 수 있다. 조직공학적 응용기술을 통해 줄기세포는 단순한 세포치료술이 아닌 인공조직 및 장기를 제작하는 세포원으로서 활용될 수 있다. 줄기세포와 생분해성 생체재료로 제작된 지지체를 이용하여 인공혈관, 인공피부, 인공기관지 등을 만드는 연구가 활발히 진행되고 있다.

2000년 대에 이르러 줄기세포를 이용하여 인공혈관을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 2001년에는 하버드 의과대학 연구팀이 자가 말초혈액에서 분리, 배양된 줄기세포를 혈관내피세포로 분화시킨 후 세포가 제거된 소구경 무세포 혈관 지지체 (decellularized matrix)에 부착시키고 대동물모델에 이식하였다[13]. 줄기세포가 배양된 인공혈관은 130일 동안 개존율이 유지되었으며 혈관조직의 재생도 관찰되었다. 2003년 일본 동경여자의과대학 연구팀은 유사한 방식으로 자가 골수에서 분리된 단핵줄기세포를 생분해성 합성 고분자

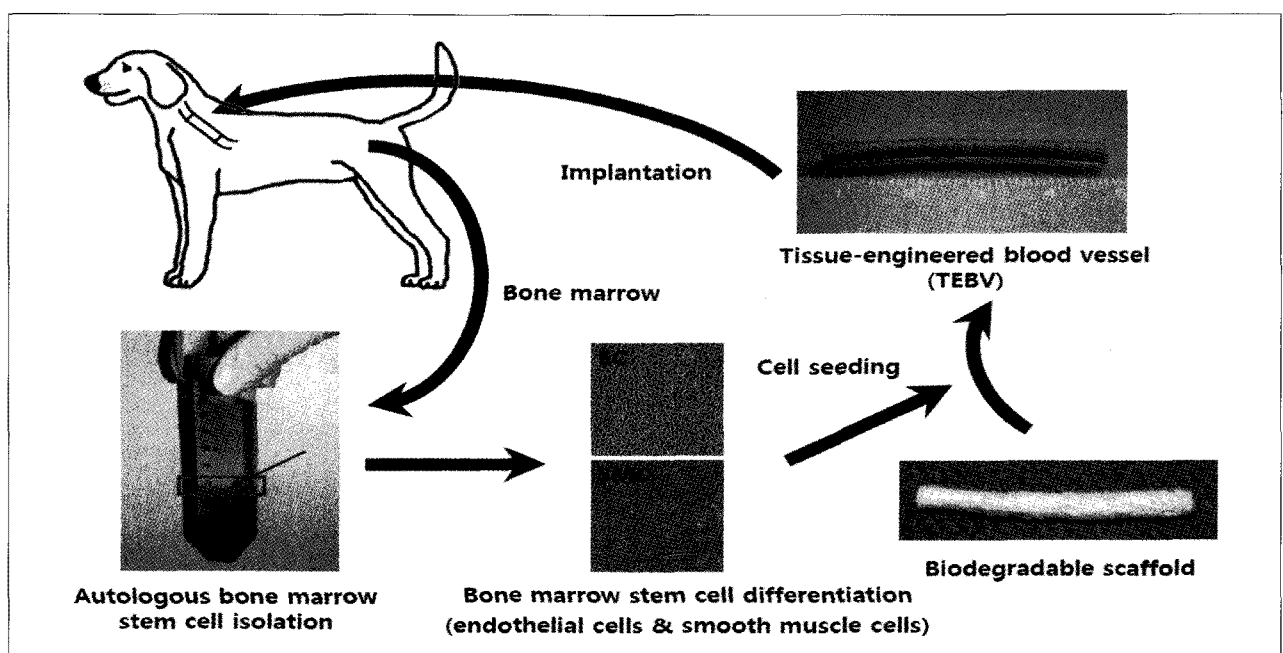


그림 4. 대동물모델에서 성체줄기세포를 이용한 인공혈관 이식 연구.

(PLCL)로 제작된 혈관 형태의 지지체에 부착, 배양한 후 대동물모델에 이식하고 혈관조직 재생을 보고하였다 [14]. 이렇게 개발된 조직공학적 인공혈관은 임상적으로도 적용되어 소아환자들의 기능을 상실한 혈관을 성공적으로 대체하였다[15]. 본 저자 연구팀도 자가 골수줄기세포에서 분화된 혈관세포 (내피세포, 평활근세포)를 이용하여 조직공학적 인공혈관을 개발하였는데 (그림 4) 생체 내에서 인공혈관의 생존율이 크게 향상되었을 뿐만 아니라 성장할 수 있는 조직으로 재생되었음을 보고한 바 있다[16, 17].

심근경색을 치료하기 위한 조직공학적 응용기술도 여러 연구팀에 의해 연구되어 왔다. 2006년 일본에서는 래트의 피하지방으로부터 분리된 중간엽줄기세포를 세포시트 형태로 배양하고 심근경색 동물모델의 허혈 심장부위에 이식함으로써 손상된 심장의 기능이 개선되었다는 결과가 보고되었다[18]. 국내에서도 골수줄기세포를 주사 가능한 피브린 (fibrin) 하이드로젤 혹은 탄성력을 가지는 생분해성 합성 고분자 (PGCL)로 제작된 패치 형태의 스키펴드를 이용하여 심근경색 소동물모델에 이식한 결과 혈관 혹은 심근조직이 재생되고 심장 기능이 회복되었음이 확인된 바 있다[19, 20].

2008년 스페인 연구진에 의해 환자 자신의 골수줄기세포로부터 분화된 연골세포와 상피세포를 이용하여 만들어진 인공기관지 조직을 이식하는 기술이 보고되었다 [21]. 세포가 제거된 기관지 매트릭스에 환자의 줄기세포에서 분화된 세포들을 부착시키고 생물반응기를 통해 배양하는 조직공학 기술을 활용하여 인공기관지를 제작한 후 결핵 후유증으로 기관지가 손상된 호흡곤란 환자에게 이식하였다. 이식 후 환자는 기도 기능이 회복되었고 정상적인 사회활동이 가능하게 되었다.

배아줄기세포를 조직공학적으로 적용한 연구들도 진행되고 있다. 2008년에는 미국 존스홉킨스 의과대학 연구팀이 인간 배아줄기세포에서 중간엽줄기세포를 분리한 후 기능성 하이드로젤 (PEG-DA)을 이용하여 관절 연골을 재생하는 기술을 개발하였다[22]. 배아줄기세포를 심근세포로 분화시킨 후 생분해성 고분자 지지체 (PLGA/PLLA)에 배양시켜 심근조직을 재생한 연구도 보고된 바 있다[23]. 2009년 Lancet 저널에는 인간 배

아줄기세포에서 분화, 배양된 피부세포를 이용하여 제작된 인공피부를 성공적으로 동물모델에 적용한 사례가 보고되었다[24].

위에서 기술되었듯이 다양한 줄기세포를 이용한 조직공학적 응용기술은 자가 세포 공급원의 한계로 인해 충분한 양의 세포를 구하기 힘든 경우 인공장기 제작을 위해 활용될 수 있다. 보다 세포/조직 친화적이며 생체 적합한 재료를 개발하는 연구와 복잡한 형태의 장기를 대체하기 위해 지지체를 원하는 형태로 제작하는 기술이 줄기세포 연구와 함께 수행되어야 할 것으로 사료된다.

5. 줄기세포 치료제의 효능 향상을 위한 성장 인자 및 유전자 전달 기술

성장인자 단백질 혹은 유전자 전달 기술은 줄기세포의 생착능을 향상시키기 위해 적용될 수 있다. 다양한 성장인자 단백질 및 유전자를 서방형 제어 방출 형태로 전달하는 시스템은 줄기세포 이식술과 복합적용되거나 줄기세포를 수식하는 기술로 활용될 수 있다. 결과적으로 줄기세포의 생착과 증식을 향상시킴으로써 치료 효능을 증대할 수 있다.

실제로 혈관생성을 촉진하거나 줄기세포의 증식을 향상시키는 성장인자를 하이드로젤이나 고분자 파티클을 이용하여 서방형 방출하는 기술이 생체 내에서 줄기세포의 생착을 증대시킬 수 있음이 보고된 바 있다. 헤파린과 혼합된 피브린 (fibrin) 하이드로젤을 이용한 섬유아세포 성장인자 (bFGF) 전달기술은 다양한 줄기세포 (골수, 제대혈, 지방줄기세포)와 복합 적용되었을 때 하지허혈, 심장허혈 및 손상된 뇌 조직 내에서 줄기세포의 생존 및 생착을 향상시켰다 [25-27]. 알긴산 (alginate) 하이드로젤을 이용한 혈관내피세포 성장인자 (VEGF) 전달 기술은 인간 제대혈 유래의 혈관내피 전구세포 이식술과 함께 적용되어 하지허혈 치료 효능을 높였다[28].

유전자 전달을 통한 줄기세포 치료 연구는 다양하게 진행되고 있는데 유전자 결함이 있는 환자의 줄기세포 자체를 표적으로 하여 유전자 전달을 통해 결함이 있는 유전자를 교정하거나 발현이 되도록 유도하는 연구가 일반적이다. 그러나 줄기세포로의 유전자 전달 기법은

줄기세포의 증식 및 생착을 향상시키기 위한 수단으로 때로는 유전자 전달이 쉽지 않은 조직 내에서 줄기세포가 지속적으로 유전자를 발현할 수 있도록 유도하는 기술로 활용될 수 있다. 유전자 전달기술과 결합된 줄기세포 치료술이 최적의 치료효능 및 안전성을 보여주기 위해서는 치료기능을 가지는 유전자가 원하는 기간 동안 필요한 만큼 발현될 수 있도록 조절되어야 한다. 현재 많이 연구되고 있는 바이러스 벡터를 이용한 줄기세포 유전자 전달 기술은 내재적인 위험성(독성, 면역반응, 돌연변이 유발 등) 때문에 실제 임상적용이 쉽지 않다. 비 바이러스성 전달체의 경우 도입된 유전자의 발현을 및 발현양이 낮고, 발현 지속시간이 짧기 때문에 이러한 단점을 극복하기 위하여 전달체를 개선하는 방법들이 연구되고 있다.

실제로 유전자 전달에 비 바이러스성 전달체를 이용하여 안전하고 효율적으로 줄기세포 내로 유전자를 전달하는 연구결과들이 최근 보고되고 있다. 예를 들면, 생분해성 고분자 벡터 (poly(β -amino esters), PEI), 고분자 나노파티클 (PLGA nanoparticles) 혹은 리포솜을 이용하여 줄기세포의 성장 (Bcl-2, HO-1, Akt) 혹은 혈관생성 (VEGF)과 관련된 단백질에 대한 유전자를 도입하여 유전적으로 수식된 중간엽줄기세포 치료제를 허혈 동물모델에 성공적으로 적용한 연구사례들이 있다[29-31]. 이러한 향상된 비 바이러스성 유전자 전달 기술은 줄기세포의 성장을 향상시키는 세포신호전달을 촉진시키거나 혈관생성인자를 분비하도록 유도함으로써 줄기세포의 치료효능을 크게 향상시켰다. 바이러스 벡터를 이용한 줄기세포 유전자 전달 방법보다는 아직 까지도 유전자 전달 효율, 발현능, 발현기간 등에 있어 미치지 못하지만 조직손상 치료를 위해 중요한 초기 단계 (1~2주 내)에는 유전자 발현이 지속된다. 따라서, 생체적합하며 부작용을 유발할 가능성이 낮은 전달체를 이용한 유전자 전달 기술은 줄기세포의 치료효능을 향상시키는 안전한 응용기술로 활용될 수 있을 것이다.

6. 줄기세포 배양을 위한 생체재료 개발

배아줄기세포나 유도만능줄기세포와 같은 전분화능

줄기세포의 배양을 위해서는 동물 유래의 지지세포가 필수적이다. 지지세포는 줄기세포에 영양분을 공급하고 세포-세포 상호작용을 도와 줄기세포가 잘 성장할 수 있도록 하는 역할을 한다. 그러나 동물 유래 지지세포는 동물성 병원체 혹은 바이러스의 감염원이 될 수 있으며 대량배양을 위한 공정개발을 어렵게 하는 요인이 된다. 따라서 최근에 동물 유래의 지지세포를 대체할 수 있는 생체재료를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 동안 대체 재료로 시험되어 왔던 매트리지젤 (Matrigel) 상에서는 지지세포 없이 배아줄기세포의 배양이 가능했지만 역시 동물에서 유래한 재료라는 점에서 한계가 있다. 따라서 재조합 유전자 기법으로 제작된 인간 세포의 기질 (extracellular matrix) 단백질 혹은 합성고분자 중 전분화능 줄기세포의 배양에 적용될 수 있는 재료를 발굴하는 다양한 연구가 진행 중에 있다.

최근에는 인간 라미닌 (laminin-511)의 유전자 재조합 기술로 인간 배아줄기세포와 유도만능줄기세포의 배양 시스템에 획기적인 기술을 선보인 연구결과가 보고되었다[32]. 배아줄기세포의 경우 장기간의 배양 (4개월 이상, 20번 이상의 계대 배양)을 거치면 기형종 (teratoma)이 생길 수 있다고 알려져 있다[32]. 개발된 라미닌 상에서 배양을 하면 전분화능 줄기세포가 오랜 기간 동안 기형종의 생성 없이 줄기세포의 성질을 유지하면서 자기 재생 (self-renewal)할 수 있다는 사실이 확인되었다[32]. 세포 배양 접시에 부착된 특정 펩타이드 혹은 합성고분자 물질이 배아줄기세포가 장기간 분화 (differentiation) 없이 줄기세포로서 분열될 수 있도록 유도할 수 있다는 결과도 보고되었다. 펩타이드-아크릴레이트 (peptide-acrylate) 표면 혹은 메타아크릴레이트 (methacrylate) 계열의 합성고분자 표면 상에서 배아줄기세포를 배양한 결과 수십 번의 계대 배양을 거쳐도 분화 없이 줄기세포가 자기 분열할 수 있었다[33, 34]. 개발된 생체재료 상에서 배양된 줄기세포는 매트리지젤 상에서 배양된 줄기세포와 유사한 표현형질을 보여주었고 전분화능이 유지되었을 뿐 아니라 핵형 (karyotype) 분석을 통해 유전적 결함 없이 배양 되었음이 확인되었다.

고효율 스크리닝 (high-throughput screening) 전략을 이용하여 배아줄기세포 배양에 최적의 생체재료를

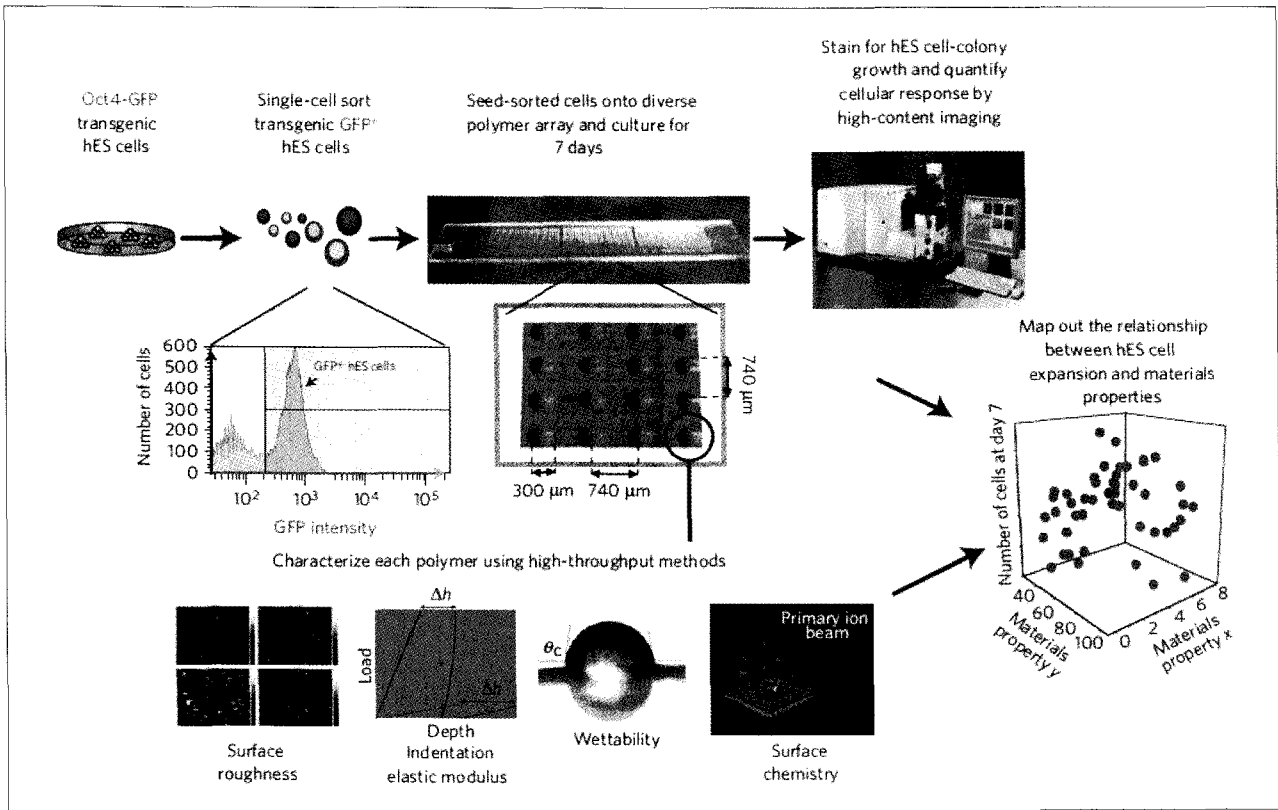


그림 5. 배아줄기세포 배양에 최적의 합성고분자 물질을 발굴하기 위한 마이크로어레이 (microarray) 기법 [참고문헌 35에서 인용].

발굴하는 연구가 최근 MIT 연구팀에 의해 수행되었다 (그림 5)[35]. 다양한 조성으로 구성된 아크릴레이트 고분자를 마이크로어레이 (microarray) 제작에 이용하였는데 고분자의 종류와 조성에 따라 물리적 성질이 달라 지므로 세포 부착이 크게 달라질 수 있을 것으로 기대되었다. 유리 슬라이드 위에 다양한 종류와 조성의 아크릴 레이트 고분자를 나노 리터의 부피로 프린팅하여 마이크로어레이를 제작하고 인간 배아줄기세포를 배양한 후 줄기세포의 부착 및 콜로니 형성을 살펴보았다. 고분자의 성질에 따라 세포부착 및 증식 거동이 크게 달라졌는데 결과적으로는 적당한 소수성 (hydrophobicity)을 가지며 표면이 단단한 재료 상에서 줄기세포의 콜로니가 잘 형성되었다. 발굴된 고분자 재료들은 줄기세포 상의 특정 수용체 (integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$)를 통한 부착을 통해 콜로니 형성 효율이 향상되는 것으로 확인되었다.

7. 줄기세포의 특이적 분화 기술

줄기세포는 분화를 조절하는 성장인자에 의해서뿐만

아니라 세포부착인자에 특정 세포수용체를 통해 결합한 후 발생하는 신호전달에 의해서도 특정 세포로 분화할 수 있다. 따라서 생체 외에서 세포-생체재료 상호작용을 촉진하여 줄기세포를 특정 세포로 분화시킬 수 있는 기능성 생체재료를 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 줄기세포가 부착, 배양되는 재료의 물리적, 화학적 성질 및 기계적 물성에 따라 분화 양상이 크게 달라질 수 있다.

대표적으로 2006년에 골수 유래 중간엽줄기세포의 분화가 배양되는 재료 표면의 기계적 물성 및 신축성 (elasticity)에 따라 조절될 수 있다는 연구결과가 보고된 바 있다[36]. 세 가지의 조직 (뇌, 근육, 골)의 기계적 물성을 모사할 수 있도록 세포가 부착되는 재료 표면의 기계적 강도를 각각 선택한 뒤 줄기세포를 각각의 표면에 배양하여 분화시켰다. 결과적으로 각각의 표면 (뇌, 근육, 골 조직을 모사한 재료)에서 배양된 줄기세포는 각각 신경세포, 근육세포, 골세포로 분화되었다 (그림 6). 이 연구결과를 통해 배양액 및 성장인자뿐만 아니라 세포가 부착되는 재료 표면의 특징도 줄기세포의 분화

를 조절할 수 있음이 확인되었다.

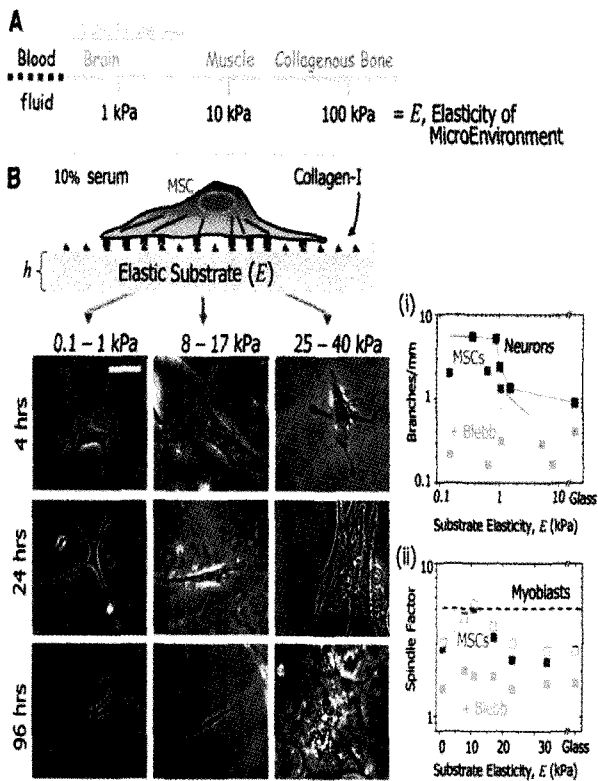


그림 6. 재료의 표면 강도에 따른 중간엽줄기세포의 분화 거동 [참고문헌 36에서 인용].

배아줄기세포의 경우 분화를 조절하는 것이 제한된 분화능을 가지고 있는 성체줄기세포보다 까다로우나 재료의 선택적 적용에 따라 분화를 특정 방향으로 조절하는 것이 가능하다. 배아줄기세포는 분화가 적절히 조절되지 않는 경우 기형종을 생성하기 때문에 임상적용을 위해서 특정세포로의 분화에 최적화된 배양 프로토콜뿐 아니라 분화조절 기능을 가지는 생체재료의 개발이 필수적으로 요구된다.

최근의 연구결과는 세포배양 기질이 배아줄기세포의 분화를 결정할 수 있다는 사실을 보고하고 있다. 배아줄기세포를 합성고분자 (PDMS)로 제작된 소수성의 표면에서 배양했을 때 적당한 크기의 세포덩어리 (embryoid body)가 형성되며 신경세포 및 조혈세포로의 분화능이 향상되었다는 사실이 밝혀졌다[37]. 배아줄기세포를 PEG로 제작된 하이드로젤 마이크로웰 (microwell)에 배양할 때 웰의 크기를 다양하게 제작하여 배양한 결과, 다양한 크기의 세포덩어리가 형성

되었다 (그림 7) [38]. 또한, 배아줄기세포를 심근세포 (cardiomyocyte)와 혈관내피세포 (endothelial cell)로 분화시킬 때 박동을 하는 세포의 수나 발현되는 유전자의 양상이 세포가 배양되고 있는 웰의 크기에 따라 달라진다는 결과가 함께 보고되었다.

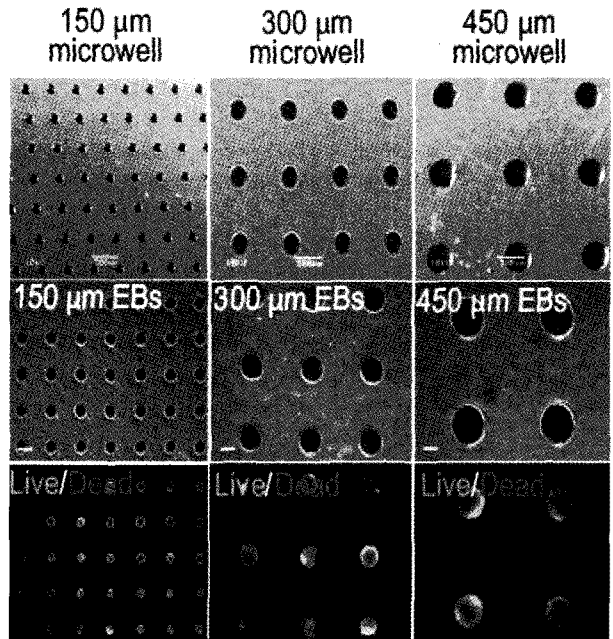


그림 7. 하이드로젤 마이크로웰 (microwell)의 크기에 따른 배아줄기세포 세포덩어리 (embryoid body) 형성 [참고문헌 38에서 인용].

표면에서의 배양에 비해 삼차원적 배양환경은 생체 내 환경을 모사할 수 있으며 더 많은 세포-세포 및 세포-재료 사이의 신호전달을 매개할 수 있으므로 줄기세포의 분화를 조절하는데 더욱 큰 영향을 미칠 수 있다. 세포의 부착에 큰 영향을 미치는 세포외기질 (extracellular matrix) 성분의 조성을 변화시키고 인간 배아줄기세포를 삼차원 배양하여 분화를 조절한 연구 결과가 있다[39]. 콜라젠 (collagen type I), 파이브로넥틴 (fibronectin)과 라미닌 (laminin) 등의 조합을 다양한 농도로 혼합하여 하이드로젤을 제작하고 배아줄기세포 배양하면서 분화를 유도하였다. 줄기세포는 특정 조성의 복합 세포외기질 하이드로젤 [콜라젠 + 파이브로넥틴 (25 μg/ml) + 라미닌 (50 μg/ml)]에서 배양되었을 때, 골세포 (osteoblast)와 내피세포 (endothelial cell)로의 분화가 극대화 되었는데 이러한 분화 양상은

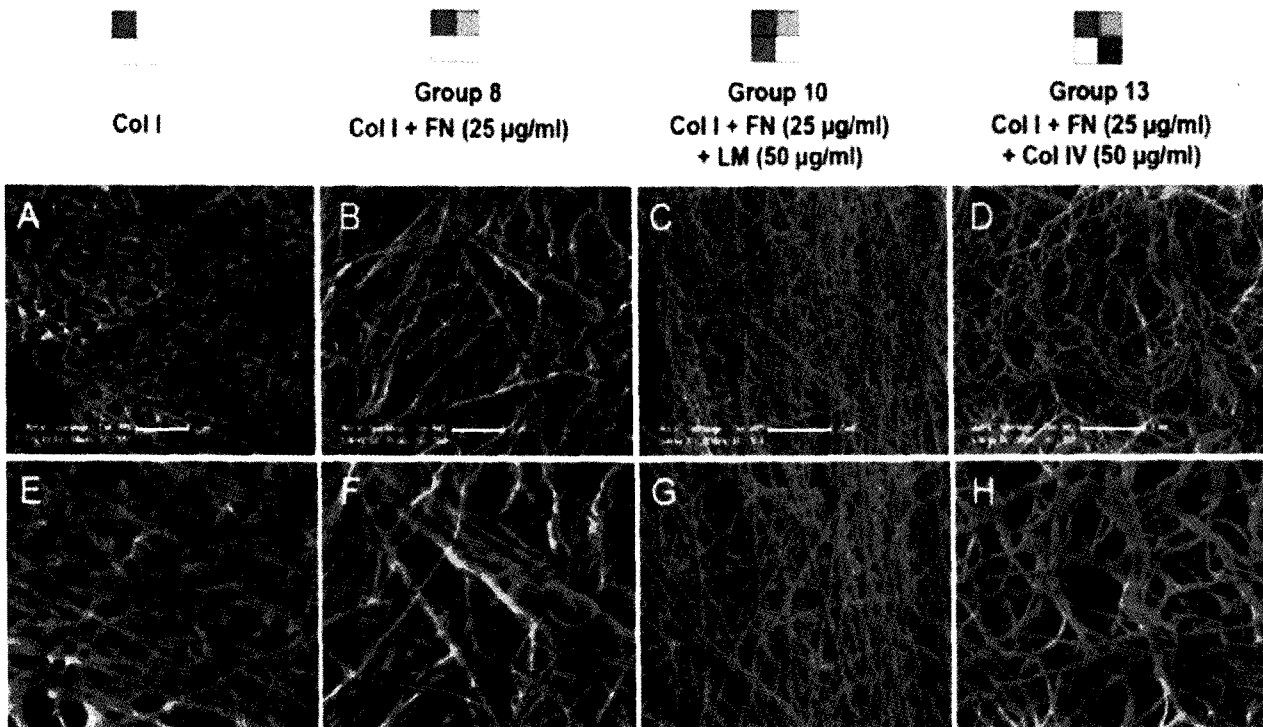


그림 8. 삼차원 하이드로젤 내 세포의 기질 성분의 조성에 따른 콜라겐 섬유의 구조적 변화 [참고문헌 39에서 인용].

하이드로젤의 생화학적 조성뿐만 아니라 그림 8에서 보 여지듯이 매트릭스의 삼차원적 구조 변화에서도 기인 한 것으로 여겨진다.

8. 결론

21세기에 이르러 '무병장수'를 꿈꾸는 사람들에게 난 치성 질환치료의 새로운 가능성을 제시하는 줄기세포 치료제는 큰 기대를 가지게 하였다. 실제로 동물실험에 서의 성공적인 연구결과를 바탕으로 일부 줄기세포 치 료제가 임상적으로 적용되어 평가되고 있다. 그러나 아 직 당면한 문제점이 많은 상황인데 이를 해결할 수 있 는 응용기술 연구는 실제 환자에게 적용 가능한 수준의 치료효능을 보여주며 동시에 안전성이 검증된 줄기세 포 치료제 개발을 가속화할 수 있을 것으로 생각된다. 임상에 적용될 수 있는 수준의 줄기세포 치료제 개발이 미미한 상황에서 위에서 살펴보았던 여러 가지 공학적 응용기술은 난치성 질환 및 만성질환에 대한 새로운 자 가 세포치료제 및 맞춤형 인공장기를 생산하는 재생의 학 분야의 원동력이 될 것이다.

9. 참고문헌

- [1] Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, Radisic M. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(2):169-87.
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
- [5] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M,

- Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
- [6] Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134(5):877-86.
- [7] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322(5903):949-53.
- [8] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):766-70.
- [9] Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):472-6.
- [10] Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008;453(7193):322-9.
- [11] Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 2004;363(9411):751-6.
- [12] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1199-209.
- [13] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. 2001;7(9):1035-40.
- [14] Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation*. 2003;108(14):1729-34.
- [15] Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials*. 2003;24(13):2303-8.
- [16] Cho SW, Lim SH, Kim IK, Hong YS, Kim SS, Yoo KJ, Park HY, Jang Y, Chang BC, Choi CY, Hwang KC, Kim BS. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Ann Surg*. 2005;241(3):506-15.
- [17] Cho SW, Kim IK, Kang JM, Song KW, Kim HS, Park CH, Yoo KJ, Kim BS. Evidence for in vivo growth potential and vascular remodeling of tissue-engineered artery. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(4):901-12.
- [18] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12(4):459-65.
- [19] Ryu JH, Kim IK, Cho SW, Cho MC, Hwang KK, Piao H, Piao S, Lim SH, Hong YS, Choi

- CY, Yoo KJ, Kim BS. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials*. 2005;26(3):319-26.
- [20] Piao H, Kwon JS, Piao S, Sohn JH, Lee YS, Bae JW, Hwang KK, Kim DW, Jeon O, Kim BS, Park YB, Cho MC. Effects of cardiac patches engineered with bone marrow-derived mononuclear cells and PGCL scaffolds in a rat myocardial infarction model. *Biomaterials*. 2007;28(4):641-9.
- [21] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008;372(9655):2023-30.
- [22] Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, Bae J, Cheng L, Elisseeff J. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20641-6.
- [23] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, Gepstein L, Levenberg S. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2007;100(2):263-72.
- [24] Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. *Lancet*. 2009;374(9703):1745-53.
- [25] Bhang SH, Cho SW, Lim JM, Kang JM, Lee TJ, Yang HS, Song YS, Park MH, Kim HS, Yoo KJ, Jang Y, Langer R, Anderson DG, Kim BS. Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs. *Stem Cells*. 2009;27(8):1976-86.
- [26] Cho SW, Kim IK, Bhang SH, Joung B, Kim YJ, Yoo KJ, Yang YS, Choi CY, Kim BS. Combined therapy with human cord blood cell transplantation and basic fibroblast growth factor delivery for treatment of myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(10):974-85.
- [27] Bhang SH, Lee YE, Cho SW, Shim JW, Lee SH, Choi CY, Chang JW, Kim BS. Basic fibroblast growth factor promotes bone marrow stromal cell transplantation-mediated neural regeneration in traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(1):40-5.
- [28] Silva EA, Kim ES, Kong HJ, Mooney DJ. Material-based deployment enhances efficacy of endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(38):14347-52.
- [29] Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lützwow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 2007;25(8):2118-27.
- [30] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(7):1339-50.
- [31] Yang F, Cho SW, Son SM, Bogatyrev SR, Singh D, Green JJ, Mei Y, Park S, Bhang SH, Kim BS, Langer R, Anderson DG. Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3317-22.
- [32] Rodin S, Domogatskaya A, Ström S, Hansson EM, Chien KR, Inzunza J, Hovatta O, Tryggvason K. Long-term self-renewal of human pluripotent stem

- cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):611-5.
- [33] Melkoumian Z, Weber JL, Weber DM, Fadeev AG, Zhou Y, Dolley-Sonneville P, Yang J, Qiu L, Priest CA, Shogbon C, Martin AW, Nelson J, West P, Beltzer JP, Pal S, Brandenberger R. Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):606-10.
- [34] Villa-Diaz LG, Nandivada H, Ding J, Nogueira-de-Souza NC, Krebsbach PH, O'Shea KS, Lahann J, Smith GD. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):581-3.
- [35] Mei Y, Saha K, Bogatyrev SR, Yang J, Hook AL, Kalcioğlu ZI, Cho SW, Mitalipova M, Pyzocha N, Rojas F, Van Vliet KJ, Davies MC, Alexander MR, Langer R, Jaenisch R, Anderson DG. Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. *Nat Mater.* 2010;9(9):768-78.
- [36] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-89.
- [37] Valamehr B, Jonas SJ, Polleux J, Qiao R, Guo S, Gschwend EH, Stiles B, Kam K, Luo TJ, Witte ON, Liu X, Dunn B, Wu H. Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14459-64.
- [38] Hwang YS, Chung BG, Ortmann D, Hattori N, Moeller HC, Khademhosseini A. Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(40):16978-83.
- [39] Yang F, Cho SW, Son SM, Hudson SP, Bogatyrev S, Keung L, Kohane DS, Langer R, Anderson DG. Combinatorial extracellular matrices for human embryonic stem cell differentiation in 3D. *Biomacromolecules.* 2010;11(8):1909-14.