

博士學位論文

계대 배양된 사람 지방유래 줄기세포의
안전성 및 하지허혈 동물모델에서
혈관신생에 관한 연구



濟州大學校 大學院

獸醫學科

羅廷燦

2007 年 12 月

계대 배양된 사람 지방유래 줄기세포의
안전성 및 하지허혈 동물모델에서
혈관신생에 관한 연구

指導教授 李 慶 甲

羅 廷 燦

이 論文을 獸醫學 博士學位 論文으로 提出함

2007年 12月

羅廷燦의 獸醫學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長_____

委 員_____

委 員_____

委 員_____

委 員_____

濟州大學校 大學院

2007年 12月

목 차

초	록	i
총	설	1
제 1 장.	지방 유래 줄기세포의 분리, 배양 및 특성 연구	5
I.	서 론	6
II.	재료 및 방법	9
III.	결 과	14
IV.	고 찰	29
제 2 장.	지방줄기세포의 안전성, 발암성 및 체내 분포 확인	33
I.	서 론	34
II.	재료 및 방법	36
III.	결 과	45
IV.	고 찰	59
제 3 장.	하지허혈 동물모델에서의 지방유래 줄기세포 효능	62
I.	서 론	63
II.	재료 및 방법	66
III.	결 과	70
IV.	고 찰	77
총	결 론	81
참	고 문 헌	83
요	약	90

Safety of passaged human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell and its ability of neovascularization in an animal model for hindlimb ischemic disease

Advised by professor Kyoung-Kap Lee

Jeong-Chan Ra

Department of Veterinary Medicine
Graduate School of Cheju National University
Jeju 690-756, Korea

Abstract

This study was conducted to assess the characteristic of the adult stem cells from adipose tissue and to demonstrate the safety and clinical feasibility of therapeutic angiogenesis.

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAdMSCs) were isolated post abdominal liposuction. The hAdMSCs were expanded *ex-vivo* culture and were found to have the following characteristics: spindle-shaped, tight attachment to the culture dish and self-renewal capacity during a serial passage. Immunophenotypically, these cells were positive for CD73 and CD90, while negative for CD31, CD34 and CD45. The hAdMSCs demonstrated a diverse plasticity including the capacity to differentiate into adipocytes, osteocytes, neurocytes and myocytes. They also were able to generate sphere formations in the

colony-forming assay. Further characterization using karyotyping revealed a normal, euploid set of chromosomes in hAdMSCs up to 12 passages.

Toxicity tests for hAdMSCs in SCID mice were conducted. Test groups were divided into saline control group, hAdMSC low dose group (2×10^5 cells/kg BW), medium dose group (2×10^6 cells/kg BW), high dose group (2×10^7 cells/kg BW), and maximum dose group (2×10^8 cells/kg BW). The cells were administered once intramuscularly and all groups were observed for 13 weeks. The toxicity tests showed no abnormalities. Therefore, a safe quantity for hAdMSCs was determined as 2×10^8 MSCs/kg BW or higher. To compare tumor occurrence in BABL/c-nu nude mice, MRC-5 (human fetal lung cell line) cells were used as a negative control and A375 (human malignant melanoma cell line) cells were used as a positive control. Test groups were divided into hAdMSC low dose group (2×10^6 cells/kg BW), medium dose group (2×10^7 cells/kg BW), and high dose group (2×10^8 cells/kg BW). The cells were injected subcutaneously one time and all groups were observed for 26 weeks for tumorigenicity. Every subject in the positive control group that was injected with A375 developed tumors and no tumor was found in the negative control group and hAdMSC injected groups. To investigate the distribution of hAdMSCs in the body, the hAdMSCs were marked with CM-DiI fluorescent dye and injected into SCID mice. Test groups were divided into hAdMSC medium dose group (2×10^6 cells/kg BW) and maximum dose group (2×10^8 cells/kg BW). After the cells were injected into thigh muscle one time, autopsy and histopathologic examinations were conducted at 24 hours, one week and four weeks. Up to four weeks, the fluorescent marked hAdMSCs were observed in the injected muscles area but not in any other

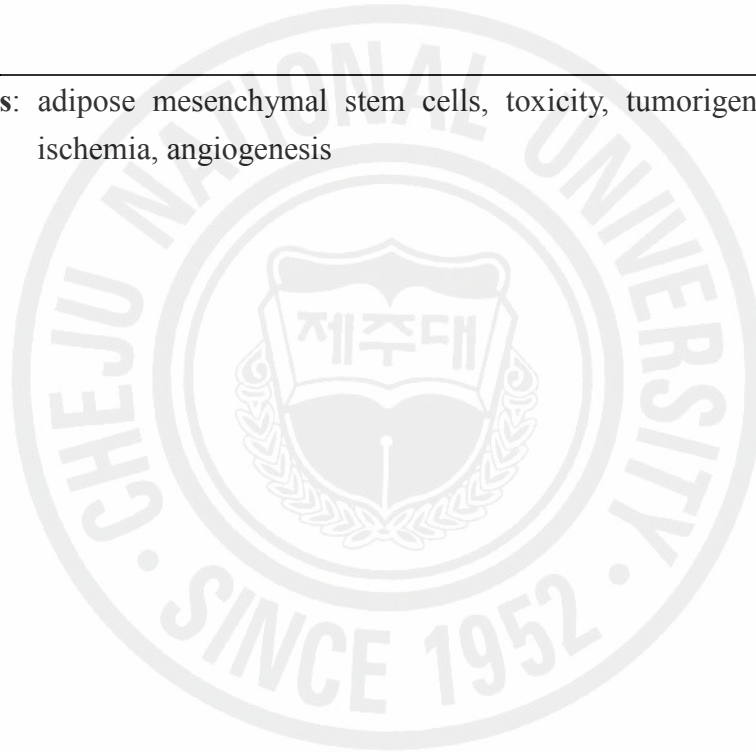
examined organs.

The *in vitro* tube formation assay showed that hAdMSCs formed capillary-like structures on matri-gel under shear stress or certain growth factor conditions. The hAdMSCs took up Dil-labeled acetylated low density lipoprotein (Dil-Ac-LDL) and positively stained for the von Willebrand factor (vWF), the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2, KDR) and ulex europaeus agglutinin 1 (UEA-1) at the cell surface. Endothelial cells characteristic was also confirmed by analyzing the expression of the endothelial-specific vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin) and VEGF receptors 1 (Flt-1) at the mRNA level. A lower limb ischemic model in a BABL/c-nu nude mouse was produced by ligation and dissection the femoral artery and their major branches in the right thigh surgically. Test groups were divided into saline control group, low dose group (1×10^6 cells/kg BW), medium dose group (5×10^6 cells/kg BW), and high dose group (1×10^7 cells/kg BW) and observed for four weeks. Lower limb total amputation rate was 75 % (9 out of 12) for the saline control group and 16.67 % (2 out of 12) for the low dose group. Medium dose groups showed no mouse that had its leg completely amputated. In addition, the high dose group also showed no mouse that had lower limb amputated except one mouse had partial foot amputation. Compared to the saline control group which did not have any mouse whose lower limb healed completely, 7 mice in the low dose group (58.3 %), 6 mice in the medium dose group (50.0 %) and 9 mice in the high dose group (75.0 %) were healed to normal level, validating the effect of hAdMSCs in treating mouse with lower limb ischemia. Also, an increase in neovascularization in proportion to the hAdMSC injection amount was validated from investigating blood

flow amount using laser doppler and the number of capillaries per area using alkaline phosphatase dye in the ischemic region.

In conclusion, hAdMSCs are easy to obtain, can grow to large quantities, are multipotent and do not involve any ethical problems. Especially, in the case of autologous transplant, the hAdMSCs do not show any toxicity and tumorigenicity. The excellent capability of neovascularization of the hAdMSCs makes them ideal for clinical approaches as a cell treatment for the ischemic blood vessel diseases.

Key words: adipose mesenchymal stem cells, toxicity, tumorigenicity, hindlimb ischemia, angiogenesis



총 설

인간의 수정란은 수정 (fertilization) 이후에 자궁에 착상하기까지 14 일이 소요된다. 착상된 수정란은 세 층의 배엽, 조혈기관과 혈관으로 분화되는 내배엽, 피부와 신경을 구성하는 외배엽, 그리고 근육을 생산하는 중배엽을 형성한다. 각 세포는 모두 동일한 유전자를 가지고 있으나 장기 또는 조직을 이루는 세포들은 그 조직에 따라 발현되는 유전자가 서로 다르기 때문에 상피세포, 혈액세포, 근육세포 등 모양과 기능이 다른 210 여 가지의 세포로 분화 발생된다. 과거 많은 연구들은 배아 줄기세포는 전능성 (totipotency)이 있는 반면, 성체 줄기세포는 이미 분화가 진행되어 한정된 세포들로만 분화하는 것으로 이해 해왔다. 그러나 성체에서도 서로 기능이 다른 세포로 분화할 수 있는 줄기세포 (stem cell)가 존재한다는 것이 알려지면서 이러한 비가역적, 고정적 줄기세포 분화 개념이 바뀌게 되었다.

1998년 Geiger 등은 성체의 줄기세포인 조혈모 세포가 태아발생 과정의 여건하에 태아발생에 관여할 수 있는지 보기 위하여 성인이 된 쥐의 조혈모 세포를 발생중인 배반포에 주입하였다. 그 결과 발생과정 중의 거의 모든 단계, 즉 난황 (yolk sac), 태아간, 성체의 골수에 대한 검사에서 주입되었던 성인의 조혈모 세포가 발견되었다. 더구나 인간의 성인형 헤모글로빈인 베타 글로빈을 발현하는 쥐 (transgenic mouse for beta globin)로 부터 성인형 조혈모 세포를 이식하였을 때, 이들에게서 태아형 헤모글로빈인 감마글로빈이 발현되는 것을 발견하였다. 즉 성체가 되어 발생과정이 완료된 성체 줄기세포가 특정한 미세환경 (microenvironment) 하에서는 태생기의 세포분화과정을 다시 반복할 수 있다는 것이 제시되었다 (Geiger 등, 1998). 이는 Dolly의 복제 실험에서도 체세포의 핵을 이입했을 때 그로부터 한 개체의 발생에 필요한 모든 유전적 발생과정이 가능하게 된 것 (Wilmut 등, 1997)과 동일한 증명이다. 따라서 이들 두 연구는 성체로 이미 분화가 진행된 세포라 할지라도 그들의 핵 내에는 발생과정에 필요한 세포로 역분화 되어 모든 종류의 세포를 생산해 낼 수 있는 유전적 정보를 아직

도 보유하고 있으며, 이들은 이러한 특수한 미세환경하에서 유전자 재편성 (genetic reprogramming)이 될 수 있다는 것이 증명되었다.

또 다른 연구로 성체가 된 쥐의 뇌로부터 뇌신경 전구체들의 집락에 해당하는 신경반구(neurosphere)를 발생중인 쥐의 배아반포에 주입한 후 거기서 발생한 태아의 각 조직을 조사한 결과 주입된 신경반구의 세포는 그 본래 태생이 외배엽성 발생기원을 가졌음에도 불구하고 심장, 위, 내장, 원시신경삭 (notocord), 신장전구체(mesonephron) 및 뇌에 해당하는 각종 발생기원의 세포를 모두 만들어 내는 것을 확인하였다 (Clarke 등, 2000). 이러한 과정은 2001년 Krause 등 (Krause 등, 2001)의 연구에서 더욱 확고히 정립되었다. 즉 성인 쥐의 골수에서 조혈모 세포를 분리한 후 이들을 PKH로 세포막 염색한 후 다른 쥐에 이식하고, 이들에게 이식된 염색된 조혈모세포를 한계 희석법을 이용하여 한 개씩 발생중인 배아반포에 주입함으로써 이들 세포의 분화과정을 추적하였다. 그 결과 이식된 단위 조혈모 세포들이 혈액을 비롯한 신체내의 거의 모든 장기를 구성하는 것이 한 개의 세포단위에서 증명되었다. 따라서 성체 줄기세포가 가지고 있는 분화의 잠재성은 과거 고전적 생물학이 가졌던 것과 같은 개념의 변화를 초래한 동시에 줄기세포의 정체성에 대한 개념의 재정립을 요구하게 되었다. 즉 과거에는 배아로부터 발생한 전능성 줄기세포 (totipotent stem cell), 다능성 줄기세포 (multipotent stem cell), 장기특이적 줄기세포 (tissue specific stem cell) 들이 각기 다른 특성을 가진 별도의 독립적인 세포단위 (clonal identity)로 존재할 뿐 아니라 이들 각 세포의 클론에 따라 상이하게 주어진 분화능력과 자가재생산능력이 결정되어 있는 것으로 생각되었다. 그러나 최근의 발생학적 형성성에 대한 연구들로 인하여 독립된 실체로서의 줄기세포의 개념보다는, 주어진 미세환경 (microenvironment)과 장기특성에 따라 발생하는 세포의 특수한 기능 (stem cell as a function)으로서의 개념이 대두되기 시작하였다.

줄기세포는 다음과 같은 두 가지 속성을 가지고 있는데 첫째, 세포가 자신과 동일한 세포군을 만들면서 무제한 분열될 수 있는 능력을 가져야 하고, 둘째, 비대칭으로 분열하여 서로 다른 두 개의 딸세포를 생성할 수 있는데, 그 하나는 모세포와 동일하여 원래의 줄기세포 라인을 지속하는데 반해, 다른 하나는 유전자

발현 양상이 달라지며 다양한 형태로 진행하여 모세포에 비해 증식 및 분화 능력이 약화되어 결국 하나 혹은 적은 종류의 세포 밖에 생산해 내지 못하는 “progenitor” 또는 “precursor” 세포가 된다.

줄기세포는 인체조직 및 장기에 극소수로 존재하면서 인체의 항상성을 유지하는 기능을 수행하는 기간세포를 의미하며, 이들 세포는 오랜 기간 동안 세포 분열을 지속하면서 미분화 상태를 유지하는 self-renew 능력과 특정 환경이나 조건일 경우에 심장을 박동시키는 심근 세포 혹은 췌장의 인슐린 생성 세포와 같이 특정한 기능을 가진 세포로 변화할 수 있는 다능성 (multipotency)을 갖는 세포이다.

줄기세포는 얻을 수 있는 source 조직에 따라, 성인의 세포 또는 조직에서 유래하는 성체 줄기세포와 착상 전 배아로부터 분리할 수 있는 배아줄기세포로 구분할 수 있다. 성체줄기세포는 배아줄기세포와는 달리 연구 및 치료적 목적에 사용하는 것에 대한 윤리적 논란의 소지로부터 자유롭다는 장점을 지닌다. 성체 줄기세포 중 하나인 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells; MSC)는 지방세포, 섬유아세포, 근세포, 골세포, 연골세포 등 lineage-specific differentiation이라는 과정에서 중배엽 세포로 분화될 수 있는 능력을 가진다 (Lin 등, 2006). 사람의 중간엽 줄기세포는 특이적인 호르몬이나 성장요소를 이용한 적합한 배양 조건에서 중배엽 조직 계열, 예를 들면 골격근, 뼈, 인대, 연골, 지방으로 분화될 수 있다 (Lin 등, 2006; Barry 와 Murphy, 2004; Pittenger 등, 1999).

줄기세포를 이용하는 세포 치료의 기본 개념은 이러한 분화 능력을 근간으로 손상된 세포 또는 조직을 줄기세포를 이용하여 기능성이 부여된 새로운 세포 또는 조직으로 분화, 재생시켜 질병의 근원적 치료를 가능하도록 하는 것이다. 세포 치료제는 첨단 생명공학기술을 이용하여 현재의 의학으로는 치유 방법이 희박한 인류의 난치 질병을 치료하는 새로운 형태의 치료법으로 환자에게 직접 세포를 주입하여 손상된 세포의 기능이나 조직을 회복시키므로 기존의 수술요법이나 약물요법의 한계를 극복할 수 있는 가능성을 내포하고 있다.

현재 다양한 세포 및 조직 유래의 세포치료제 개발이 진행되고 있으며 그 중심에는 위축되거나 혹은 완전히 상실된 세포를 정상으로 대체하는 능력을 보

유하고 있는 것으로 여겨지는 줄기세포가 자리잡고 있다. 줄기세포가 회복이 어려운 많은 질병으로부터의 고통을 경감시키고 그 기능을 복구할 수 있게 될 것으로 많은 사람들이 전망하고 있다. 배양된 줄기세포는 조직을 회복시키는 기능 뿐만 아니라 질병의 기전을 분석하거나 신약을 screening하는 도구로, 그리고 유전자 치료의 전달체로도 역할 할 수 있을 것으로 기대된다 (Evers 등, 2003).

최근 약물적 치료가 어렵고 외과적 처치로도 예후가 좋지 않은 질환에 세포를 이용한 치료적 접근이 활발히 연구되고 있으며, 또한 근골격계, 암, 심혈관계, 당뇨, 혈액질환, 신경질환 등 다양한 난치성 질환이 세포치료제 대상이 될 것으로 예상된다. 그러나 아직 연구 역사가 매우 짧고 관련 지식의 축적 정도가 상대적으로 낮으며 현재까지 줄기세포를 포함하는 세포치료제 개발은 개발초기 단계이므로, 임상적으로 활용되기 위해서는 세포 치료제의 안전성과 효능 평가가 반드시 선행되어야 한다.

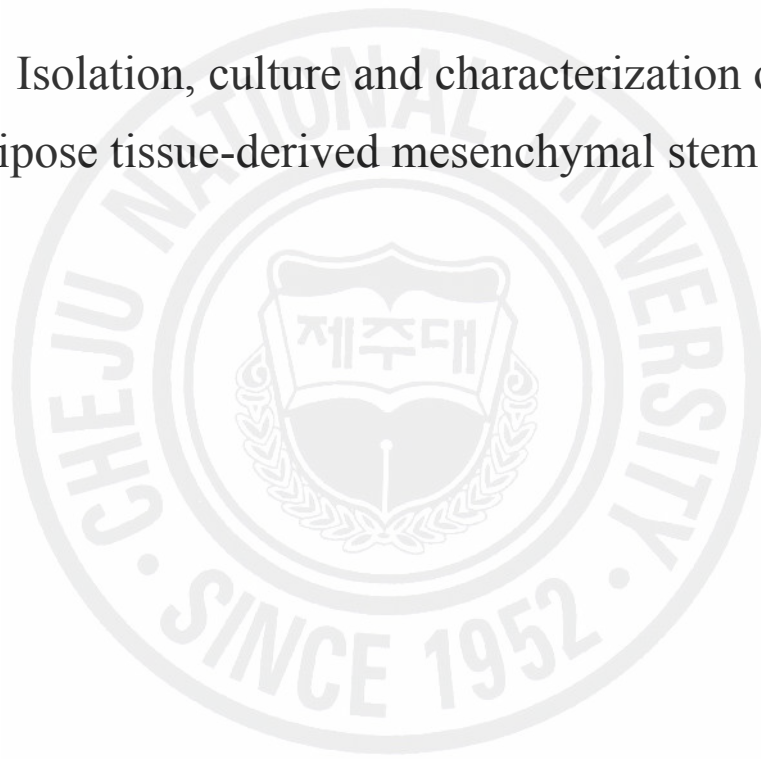
지방유래 중간엽 줄기세포는 비교적 고통 없이 채취할 수 있으며, 골수와 비교할 때 줄기세포 양을 더 많이 확보할 수 있고 배양이 간단하여 대량 증식이 가능한 장점이 있다. 또한 분화 능력도 골수 유래 줄기세포와 차이가 없다고 밝혀지고 있다.

본 연구에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 안전성 및 허혈성 질환에서의 치료 효능을 평가하고자 한다. 이에 *in vitro*에서 지방유래줄기세포의 특성 및 다분화능 그리고 혈관형성 능력에 대해 조사하여 지방유래줄기세포의 허혈성 질환에 대한 치료제로서의 가능성을 확인하였다. 그리고 *in vivo*에서 지방유래 중간엽 줄기세포를 하지허혈 동물모델의 허혈부 근육 내로 투여하여 임상적 개선 여부를 평가하였다.

제 1 장.

지방유래 줄기세포의 분리, 배양 및 특성 연구

Isolation, culture and characterization of
adipose tissue-derived mesenchymal stem cells



I. 서론

골수에서 비혈구성 줄기세포가 존재한다는 사실은 130 년 전 독일의 병리학자 Cohnheim에 의해 발견되었다. 이로 인해 창상 치유 과정에서 collagen 섬유를 보충하는 섬유아세포의 원천을 골수가 제공할 수 있다는 가능성을 제시하였다 (Prockop, 1997). 골수가 다른 중간엽 세포로 분화할 수 있는 세포를 가지고 있다는 증거는 Friedenstein 등에 의해서 처음 밝혀졌으며, 골수 조직을 4 시간 배양 후 플라스크 바닥에 달라붙지 않는 대부분의 조혈세포를 제거함으로써 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있었다 (Friedenstein 등, 1976). 바닥에 부착된 세포는 외형상 다양하기는 했으나 가장 단단히 달라붙은 세포는 방추형의 모양이었고, 2~4 개의 세포가 모여 2~4 일 동안 큰 변화 없이 있다가 그 후 급속히 증가하였으며, 여러 세대 배양을 거치는 동안 부착 세포들은 외형적으로 섬유아세포 형태로 균질해졌다. 그들은 그 세포들이 작은 조각의 뼈나 연골과 비슷한 colony로 분화한다는 것을 발견하였는데, 이러한 관찰은 1980년대 다른 연구진들에 의해서 더욱 활발히 이루어졌다 (Ashton 등, 1980; Castro-Malaspina 등, 1980; Bab 등, 1986). Friedenstein 등은 골수에서 분리한 세포가 골아세포, 연골세포, 지방세포 및 근육모세포로 분화 가능한 다분화능을 가지고 있다는 방법을 확립하였으며, 이들 세포들은 현재 중간엽 형태의 세포로 분화하는 능력이 있다고 하여 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells; MSC)로 불려지고 있다.

MSC는 현재 골수 이외에도 지방 조직, 양수, 뼈막, 태아 조직 등에서 분리될 수 있으며, 각 부위에서 분리된 MSC의 표현형이 조금씩 차이가 난다고 하였다 (Nakahara 등, 1991; Campagnoli 등, 2001; In't Anker 등, 2003). 지방 조직의 stromal vascular cell fraction (SVF)은 줄기세포 연구 차원에서 더욱 활발히 연구되는데, 이는 다능성 (pluripotent)을 지닌 지방조직 유래 stromal cell을 풍부하게 제공하기 때문이다 (Zuk 등, 2002; Casteilla 등, 2005). 동일한 환자로부터 골수유래 중간엽 줄기세포와 지방유래 줄기세포 (adipose tissue-derived stromal cell; ASC)를 비교한 연구에서 stromal cell의 부착성, growth kinetics, 세포 노화 측면에서 차이가 없는 것으로 확인되었다 (De Ugarte 등, 2003). 또

한 이들 ASC는 골수 중간엽 줄기세포와 동등한 수준의 분화 잠재력을 가지고 있으며, colony 형성능과 세포 배양에서의 증식능 유지에 골수 중간엽 줄기세포보다 우수하다고 보고하였다 (Lee 등, 2004).

지방유래 줄기세포는 N-acetyl-L-cysteine, ascorbic acid-2-phosphate와 같은 항산화제가 첨가되고, 칼슘 농도가 낮을 때 성장률과 life span이 증가된다 (Lin 등, 2005). 또한 ASC의 증식은 fibroblast growth factor (FGF-2)에 의해 자극 받을 수 있고 (Chiou 등, 2006), ASC가 vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin like growth factor (IGF-1)와 같은 잠재적 growth factor들을 분비하는 것으로 알려져 있다 (Wang 등, 2006). ASC는 지방 제공자의 나이, 조직의 타입 (흰색지방, 갈색지방), 채취 장소 (피하, 장기지방 등), 외과적 시술방법, 배양조건, 플라스틱에의 노출, plating density, 배지 조성 등에 따라 증식률이나 분화능이 영향을 받을 수 있으며 (Schäffler 등, 2007), 또한 이식된 지방은 유래된 조직의 고유한 특성을 가져서 세포 치료 후 대사적으로나 세포적으로 서로 다른 습성을 보인다. 중간엽 줄기세포의 증식 빈도로 볼 때는 외과적 처리 방법에 따라 doubling time이 달라지기도 하는데, 초음파 지방흡입술에 비해 외과적 절제나 tumescent liposuction 이 세포 증식에 있어 장점을 가지는 것으로 알려져 있다.

이렇듯 많은 연구들에서 지방조직에는 근육이나 연골, 신경, 조혈세포와 같은 계통으로 분화할 수 있는 다분화능의 세포가 있다는 보고가 있으며, 심지어 지방유래 중간엽 줄기세포 (AdMSC)가 *in vitro*에서 신경세포 및 심근세포로도 분화된다. AdMSC는 골수나 제대혈에서 분리한 줄기세포와는 다르게 여러 번 반복해서 채취가 가능하며 골수처럼 채취할 때 환자에게 고통을 주지도 않으며 자가 유래 (autologous)이기 때문에 면역학적 거부반응이 없다는 장점을 가진다. 그러나 지방줄기세포에 관련된 기초적인 연구 자료들이 적기 때문에 지방줄기세포의 분리절차의 표준화, 특성규명, 분화능 그리고 세포치료제로서의 역할과 기전에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

이에 본 연구에서 골수유래의 중간엽 줄기세포에 비해서 채취하기 쉽고, 많

은 수의 배양이 용이하며, 무엇보다도 골수에 비해 분리되는 중간엽 줄기세포의 양이 100~1000 배나 더 많고, self-renew 능력 및 multipotency 능력도 뛰어난 것으로 여겨지는 지방유래 중간엽 줄기세포를 체내 지방 조직으로부터 분리, 배양하였다. 그래서 이들 지방유래 중간엽 줄기세포가 *in vitro* 배양시 어떠한 배양 특성을 가지는지, 미분화 상태로 증식이 유지되는지 그리고 다양한 조직으로의 분화 능력을 보유하는지 확인하여 줄기세포의 실제적 임상적용을 위한 체계적 배양 방법을 확립하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 지방 조직의 입수

지방조직 흡입술 (liposuction)을 앞 둔 기증자로부터 지방 조직에 대한 연구용 목적의 사용 동의를 얻은 후 지방 조직을 입수하였다. Liposuction (biopsy) 과정은, 먼저 알코올 솜을 이용해서 복부 피부를 소독한 후 베타틴 용액으로 재차 소독을 하고, 2 % lidocaine (대한염산리도카인2%주, 대한약품공업, 서울)을 사용하여 국소 마취를 유도하고 복부를 약 2 mm 정도 절개하였다. 피하지방층에 tumescent 용액 (2 % lidocaine 40 ml, 0.1 % epinephrine 1 ml, sodium bicarbonate 20 ml/1 l saline)을 주입하고 10분 가량 기다린 후, 지방 조직과 혼합된 tumescent 용액을 10ml 주사기에 연결된 metal cannula를 이용해서 채취하였다. 채취한 지방 조직은 4°C로 보관하여 실험실로 운송하였다.

2. 지방 유래 줄기세포 분리 및 배양

캡이 달린 10ml 주사기를 실험 청정 구역에서 3000 rpm으로 3 분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후에 시료는 세 개 층, 적혈구와 그 외 성분을 포함하는 lower aqueous층, 지방조직이 있는 중간층 그리고 상층의 오일층으로 분리된다. 그 중 중간엽 줄기세포가 들어있는 지방층만을 주사기를 이용해서 옮겨 spinner 배양 플라스크에 1 ml을 넣고 1 mg/ml collagenase I (Gibco, Carlsbad, CA)을 4 ml 첨가하였다.

37°C shaking incubator에서 1 시간 동안 약하게 흔들어 주면서 배양한 후에 DMEM 5 ml을 넣어서 100 μ m cell strainer로 여과하고 나서 1500 rpm에서 5 분 동안 원심 분리하여 지방층에서 줄기세포 분획을 분리하였다. 분리한 줄기세포 분획을 다시 1500 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전된 세포에 10 % fetal bovine serum (FBS; Gibco), 0.2 mM ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO), antibiotic-antimycotics (Cellgro, Manassas, VA)가 포함된 DMEM (Gibco)배지를 첨가해주었다.

1~2 일간 배양 후 T25 배양 접시에 부착된 세포만 남기고 PBS로 세척하고 defined Keratinocyte-SFM (DKS; Gibco) 배지로 교환을 통해 미부착 세포를 제거하였다. 세포가 90 % confluence를 보이면 trypsin/EDTA (Tryple Express solution, Gibco)를 사용해 배양 접시로부터 떼어내고 효소 반응을 멈추기 위해 DKS 배지를 넣고 원심 분리한 다음, T75 flask에서 새로운 DKS배지를 넣어 계대 배양하였다. 세포 계대 시에 트리판 블루 (Gibco) 염색 시약을 이용하여 혈구계수기로 세포 생존율과 세포 수를 측정하였다.

3. 세포 성장 및 세포 수 측정

배양된 지방줄기세포는 현미경을 통해 육안으로 관찰하였다. Passage 3의 지방줄기세포를 수거하여 세포 수를 계산하여 각 세부 실험에 맞도록 세포 수를 조정하여 사용하였다. 세포수는 세포 현탁액에서 20 μ l의 검체를 채취하여 준비된 네 개의 트리판 블루 시약 각 20 μ l에 계단 희석하여서 염색된 세포현탁액 10 μ l를 커버슬라이드가 덮여있는 혈구 계산판의 한쪽에 주입하고 현미경 상에서 혈구 계산판 가장자리 눈금 4 군데에서 살아있는 세포만을 돌리 계수기를 이용하여 계수하였다. 같은 방법으로 반복 측정하여 평균값을 계산하여 세포수를 산출하였다.

4. Fluorescent activated cell sorter (FACS) 분석

배양된 지방 줄기세포를 PBS에 2 % FBS가 첨가된 시약 (staining buffer) 1 μ l을 넣고 부유시켜 1 시간 동안 4°C에서 반응시킨 후 원심분리하여 세포와 상층액을 분리시켰다. 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시키고 부유된 세포는 96-well plate에 surface marker 당 2×10^5 개의 세포로 각각 분주하고 surface marker antibody 2 μ l를 첨가하여 40 분간 암실에서 반응시켰다. PBS 200 μ l로 2 회 세척한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 남아 있는 세포에 PBS 200 μ l를 첨가하고 잘 혼합하였다. FACS tube에 넣어 총 볼륨이 500 μ l가 되도록 PBS를 첨가하고 FACS를 이용하여 세포수를 계산하였다.

중간엽 줄기세포 특이적인 세포 표면 항원으로는 CD73, CD90을 선택하였

고, 중간엽 줄기세포 이외의 다른 세포의 혼입이 없는 것을 확인하기 위한 표지자로는 CD31, CD34, CD45를 선택하였다.

5. 세포 성장률 (cumulative population doubling level; CPDL)

지방유래 중간엽 줄기세포의 계대수에 따라 cumulative population doubling level (CPDL) 값을 조사하였다. CPDL은 세포의 증식율을 나타내는 지수로서, 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$CPDL = \ln(N_f/N_i)/\ln 2$$

(Ni=초기 seeding한 세포수; Nf=최종 세포수)

6. 핵형 분석 (Karyotyping)

염색체 이상 유무를 판별하기 위해 T-75 flask에서 50~60 % 배양된 지방 줄기세포를 삼광의료재단 (서울, 대한민국)에 의뢰하여 핵형 분석을 실시하였다.

7. 분화능 확인

배양된 지방줄기세포의 여러 세포로의 분화 능력을 확인하기 위해 지방세포 분화, 조골세포 분화, 신경세포 분화, 근세포 분화 및 matrigel에서의 tube 형성 능력을 평가하였다.

7. 1. Adipogenic differentiation

배양된 지방줄기세포를 6-well plate에 well 당 1×10^5 cells씩 넣고, 일반 배양배지에서 키웠다. 세포를 부착시킨 후 50 % 정도 성장하였을 때 배지를 adipogenic induction medium DMEM-LG (5 % FBS, 1 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin, 200 μ M indomethacin, 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX))로 교체하였다. 지방 방울 (lipid droplet)이 생성되는지 관찰해가며 2~3 주간 배양 한 후, 지방 방울을 oil red O로 염색하여 확인하였다.

7. 2. Osteogenic differentiation

배양된 지방줄기세포를 6-well plate에 well 당 1×10^5 cells씩 넣고 일반 배지에서 배양하였다. 세포를 부착시킨 후 50 % 정도 성장하였을 때 배지를 osteogenic induction medium (Cambrex, East Rutherford, NJ)으로 교환해 주고, 3~4 일 마다 배지를 교환해가며 2~3 주간 배양하였다. Alizarin red S로 염색하여 세포를 관찰하였다.

7. 3. Neural differentiation

배양된 지방줄기세포를 6-well plate에 well 당 1×10^5 cells씩 첨가하고 일반배지에서 배양하였다. 세포를 부착한 후 50 % 정도 성장하였을 때 PBS로 3 회 세척하고 Neural progenitor media (Cambrex) 배지로 교환해 주고 2일 주기로 배지를 교체해주었다. 2~3 주간 신경 세포로의 분화를 유도한 후, 신경 세포 특이적인 표지인 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 발현을 확인하였다.

7. 4. Myogenic differentiation

Four-well chamber를 2 시간 동안 10 ng/ml fibronectin을 사용해서 코팅하고 배양된 지방줄기세포를 3×10^4 cells씩 첨가하여 하루 동안 배양하였다. 10 μ M 5-azacytidine으로 24 시간 동안 배양하고 PBS로 세척한 후 배지를 myogenic induction medium (Cambrex)로 교환해 주었다. 3~4 일 마다 배지를 교환해가며 2~3 주간 배양하여 skeletal muscle myosin을 면역 염색하여 세포 분화를 확인하였다.

8. 스피어 형성능 평가

스피어 (sphere) 형성을 위해 5 ml antibiotic antimycotic solution (100x;

Gibco), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone (Sigma), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (Sigma), 20 ng/ml EGF (Invitrogen, Carlsbad, CA), B27 (Gibco), 40 ng/ml bFGF (Gibco) 및 β -mercaptoethanol (Sigma)이 포함된 MEBM (Cambrex) 배지를 6-well 플레이트에 분주하고, 각 well에 1×10^5 cells/ml의 세포를 seeding 한 후 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 3일간 현미경을 사용하여 sphere 형성여부를 주기적으로 관찰하였다.

9. 보관 시간에 따른 지방유래 줄기세포 안정성 평가

9. 1. 지방유래 줄기세포 수 및 생존률 변화

세 명의 기증자로부터 분리 배양한 3 계대 지방유래 줄기세포 (LM060019: 'A'로 표기, LM060029: 'B'로 표기, RPC070629-1F: 'C'로 표기)를 1ml 주사기에 1.5×10^7 cells/500 μl saline 용량으로 담아 4°C 에서 각각 0, 12, 24, 48, 56, 64 및 72 시간 동안 보관하면서 각 보관 시간 별로 세포 수 및 세포 생존률을 세 번 반복하여 측정하였다.

9. 2. 지방 유래 줄기세포 표면 항원 발현의 변화

위에서 언급한 3 계대 지방 줄기세포 'A', 'B', 'C'를 fluorescent activated cell sorter (FACS) 분석 방법을 이용하여, 72 시간 동안 각 보관 시간 별로 중간엽 줄기세포 양성 항원인 CD73, CD90의 발현을 측정하였고 다른 세포의 혼입이 없는 것을 확인하기 위하여 CD31, CD34 및 CD45의 발현을 각각 3 회 반복 측정하였다.

III. 결 과

1. 지방 줄기세포 성장

지방유래 중간엽 줄기세포는 방추상의 섬유아세포 (fibroblast-like morphology) 모양으로 바닥에 길쭉길쭉한 모양으로 붙어 자라는 특징을 가지며 subculture를 반복하여도 형태가 잘 유지되었다 (Fig 1).

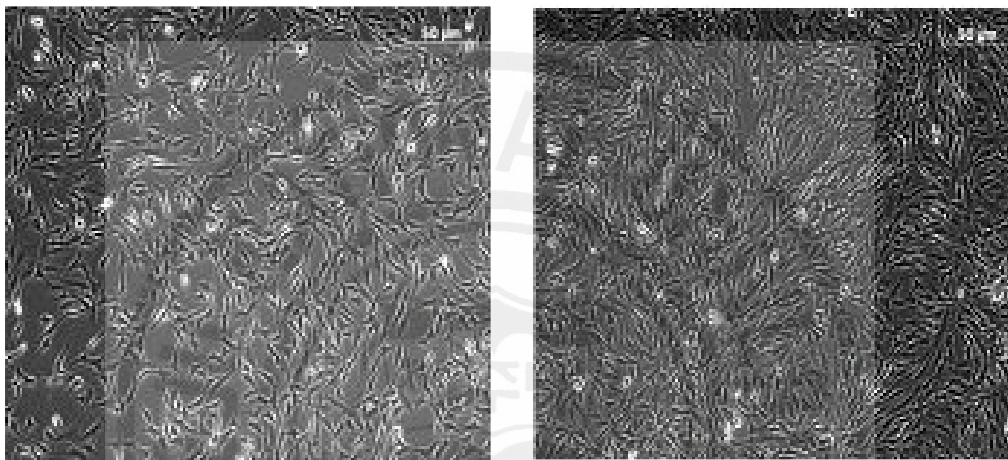
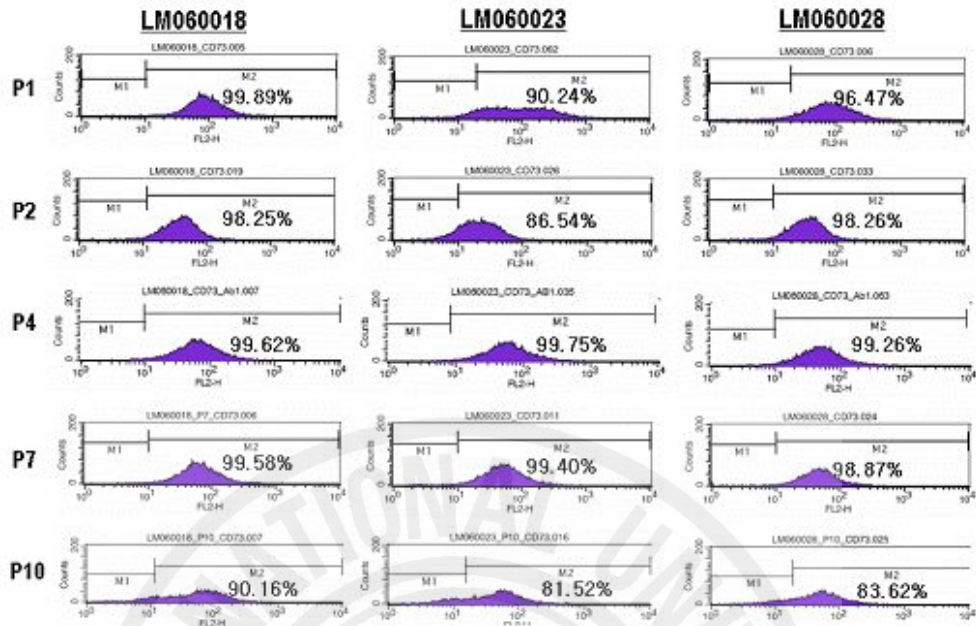


Fig 1. The adipose stem cell population with a typical fibroblastic morphology was observed using phase contrast and bright field microscopy. Day 3 culture of hAdMSC showed 70% confluency (*Left*) and day 4 culture of hAdMSC showed 90% confluency (*Right*).

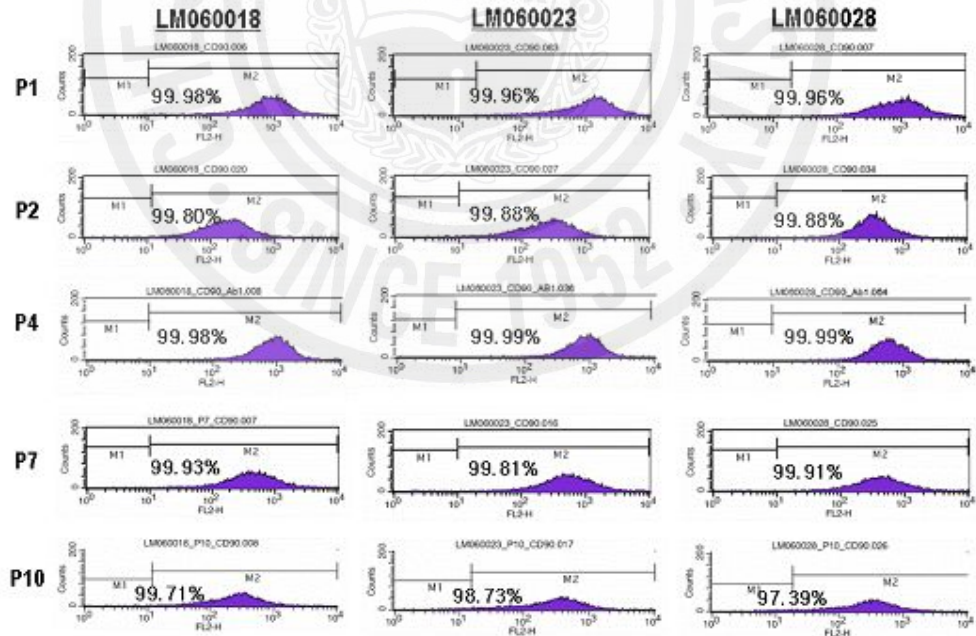
2. 지방 줄기세포 표면항원 분석

세 명의 서로 다른 기증자의 지방 조직으로부터 분리 배양한 중간엽 줄기세포를 대상으로 10 계대까지 세포 표면 항원을 분석하였다. 분석에 사용한 지방유래 줄기세포는 다른 성별 유래의 지방 줄기세포가 포함되도록 선택하였다 (LM060018 (male), LM060023 (male), LM060028 (female)). 중간엽 줄기세포 확인을 위한 표면항원으로 CD73, CD90을 사용하였고, 줄기세포의 분리 배양 중 다른 세포의 혼입이 없었는지 관찰하기 위한 표면항원 CD31, CD34, CD45를 사용하여 조사하였다 (Fig 2).

A. CD73 expression

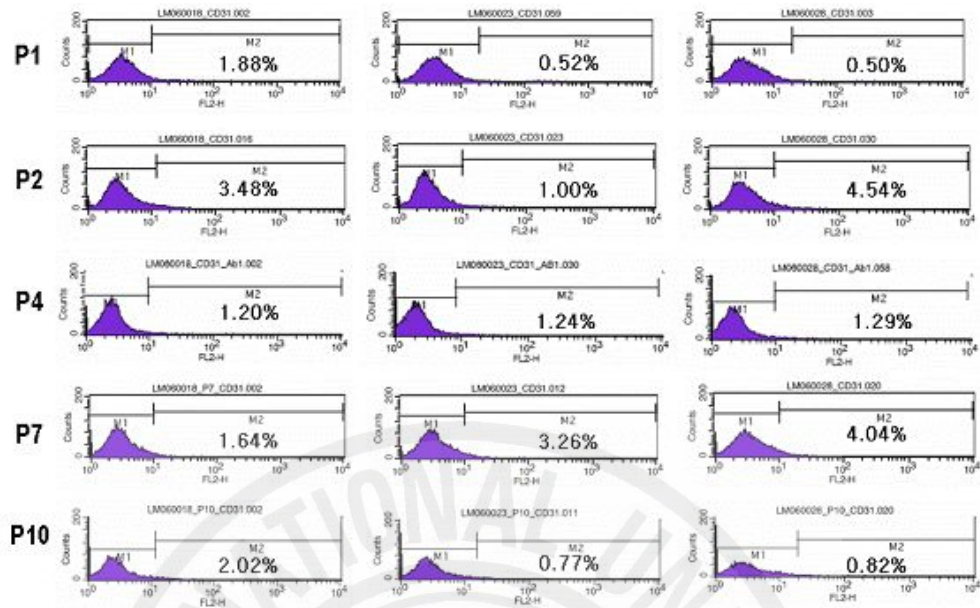


B. CD90 expression

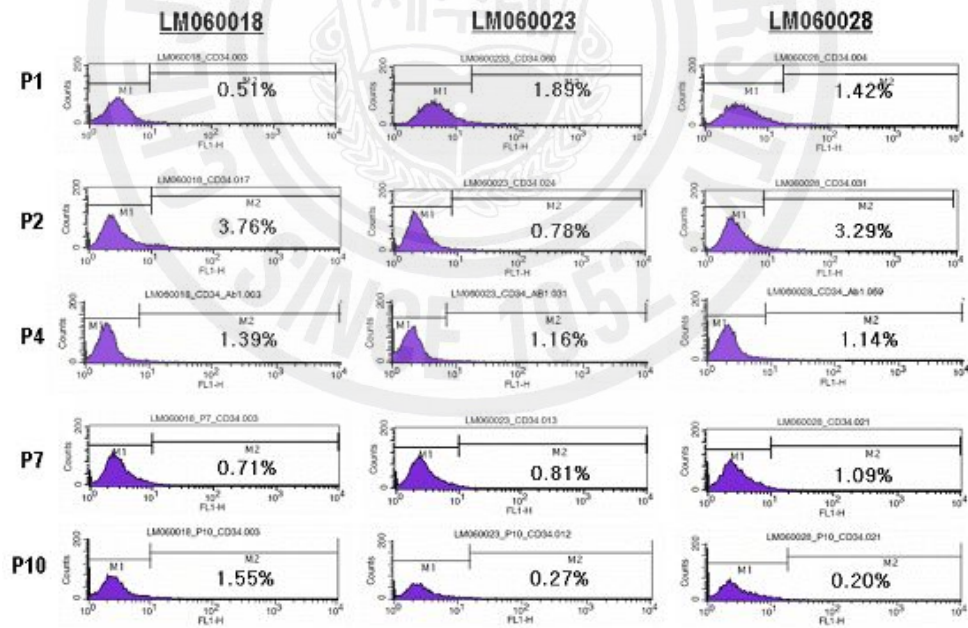


(continue.)

C. CD31 expression



D. CD34 expression



(continue.)

E. CD45 expression

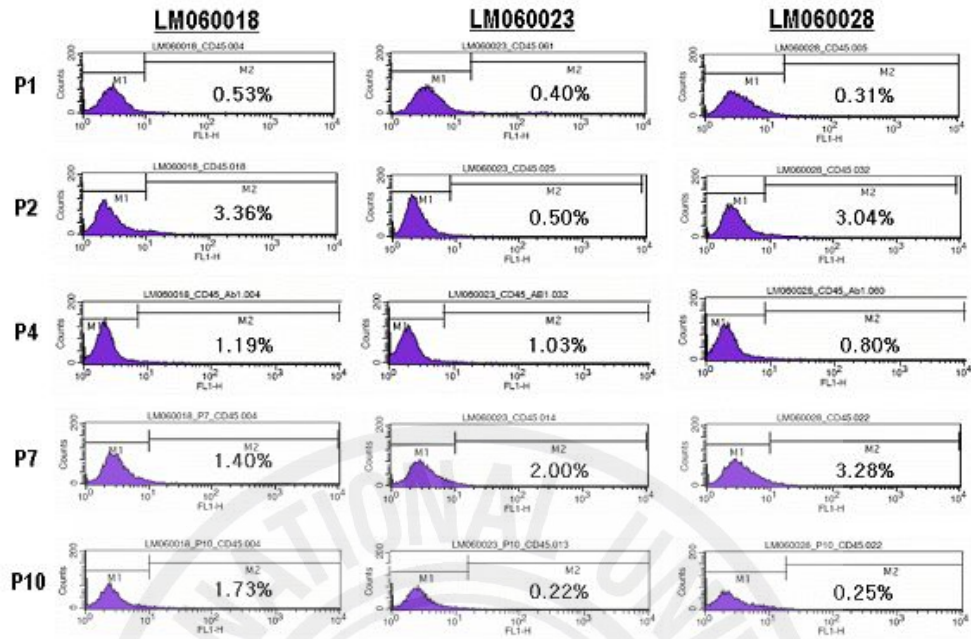


Fig 2. Human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) from three different donors sorted by fluorescent activated cell sorter (FACS) for (A) CD73, (B) CD90, surface markers expressed in adult MSC, and (C) endothelial cell marker CD31, (D) hemangioblast marker CD34 and (E) panhematopoietic cell marker CD45.

중간엽 줄기세포 특이적인 표면항원으로 알려진 CD73은 7 계대까지 98 % 이상의 높은 수준으로 발현하다가 10 계대에서는 80 % 정도 수준으로 발현이 다소 감소하였다. 중간엽 줄기세포 특이적인 표면항원으로 알려진 CD90 역시 10 passage까지 97% 이상의 높은 발현을 유지하였다 (Table 1).

Table 1. Summary of FACS results of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) from three different donors. The surface marker expression level did not vary much after P1 through to P10

Sample	Passage	Positive marker (%)		Negative marker (%)		
		CD73	CD90	CD31	CD34	CD45
LM060018	1	99.89	99.98	1.88	0.51	0.53
	2	98.25	99.80	3.48	3.76	3.36
	4	99.62	99.98	1.20	1.39	1.19
	7	99.58	99.93	1.64	0.71	1.40
	10	90.16	99.71	2.02	1.55	1.73
LM060023	1	90.24	99.96	0.52	1.89	0.40
	2	86.54	99.88	1.00	0.78	0.50
	4	99.75	99.99	1.24	1.16	1.03
	7	99.40	99.81	3.26	0.81	2.00
	10	81.52	98.73	0.77	0.27	0.22
LM060028	1	96.47	99.96	0.50	1.42	0.31
	2	98.26	99.88	4.54	3.29	3.04
	4	99.26	99.99	1.29	1.14	0.80
	7	98.87	99.91	4.04	1.09	3.28
	10	83.62	97.39	0.82	0.20	0.25

3. 세포 성장률 (cumulative population doubling level; DPDL)

계대수에 따른 CPDL 값은 지방 줄기세포의 계대수 7 및 12에서 각각 17~30로써 배양한 지방 줄기세포의 증식률이 매우 우수함을 나타내었다.

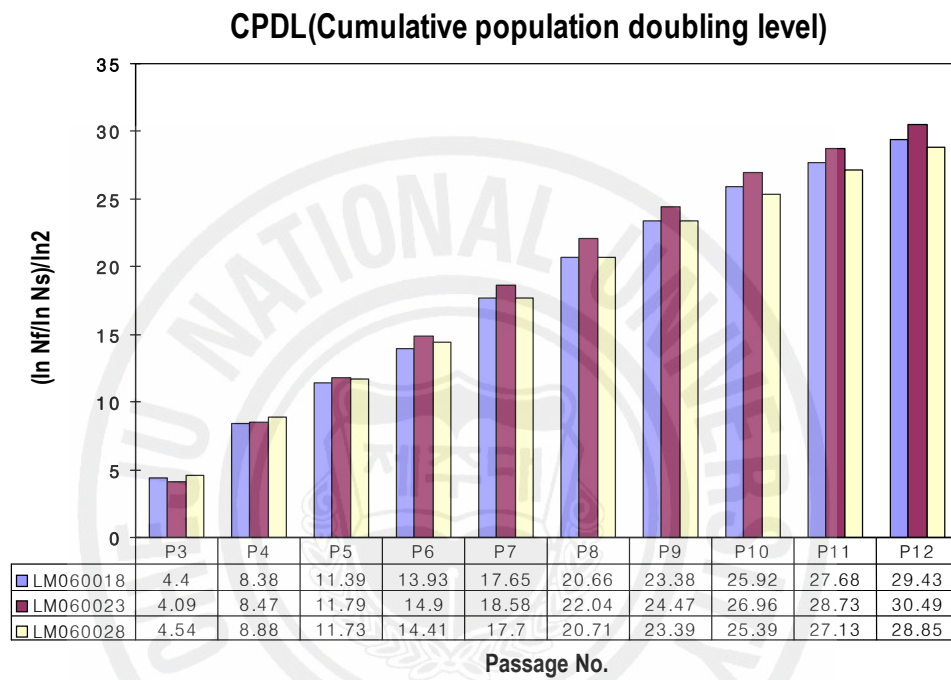
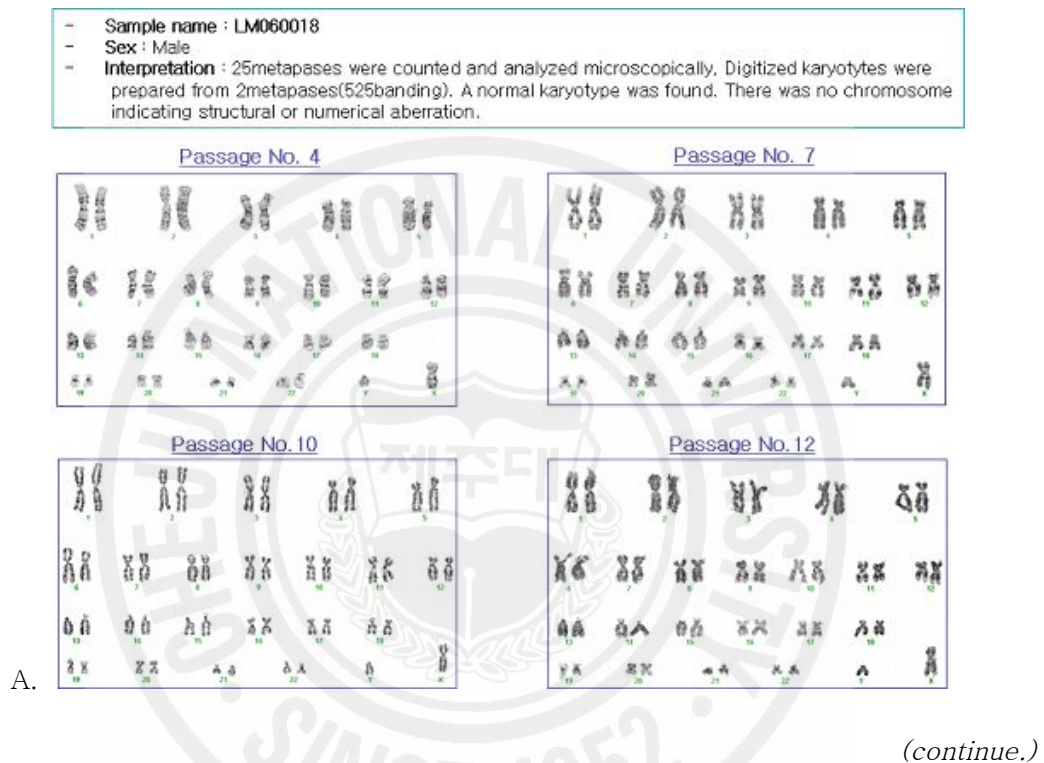


Fig 3. Cumulative population doubling level (CPDL) achieved after serial passaging of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) from three different donors was determined.

4. 핵형 분석 (Karyotyping)

지방유래 중간엽 줄기세포의 유전적 안전성을 입증하기 위하여, 세 명의 기증자의 지방 조직에서 분리, 배양한 지방 줄기세포의 핵형을 분석한 결과 12 계대에 이르기까지 염색체 이상을 발견할 수 없었다 (Fig 4).



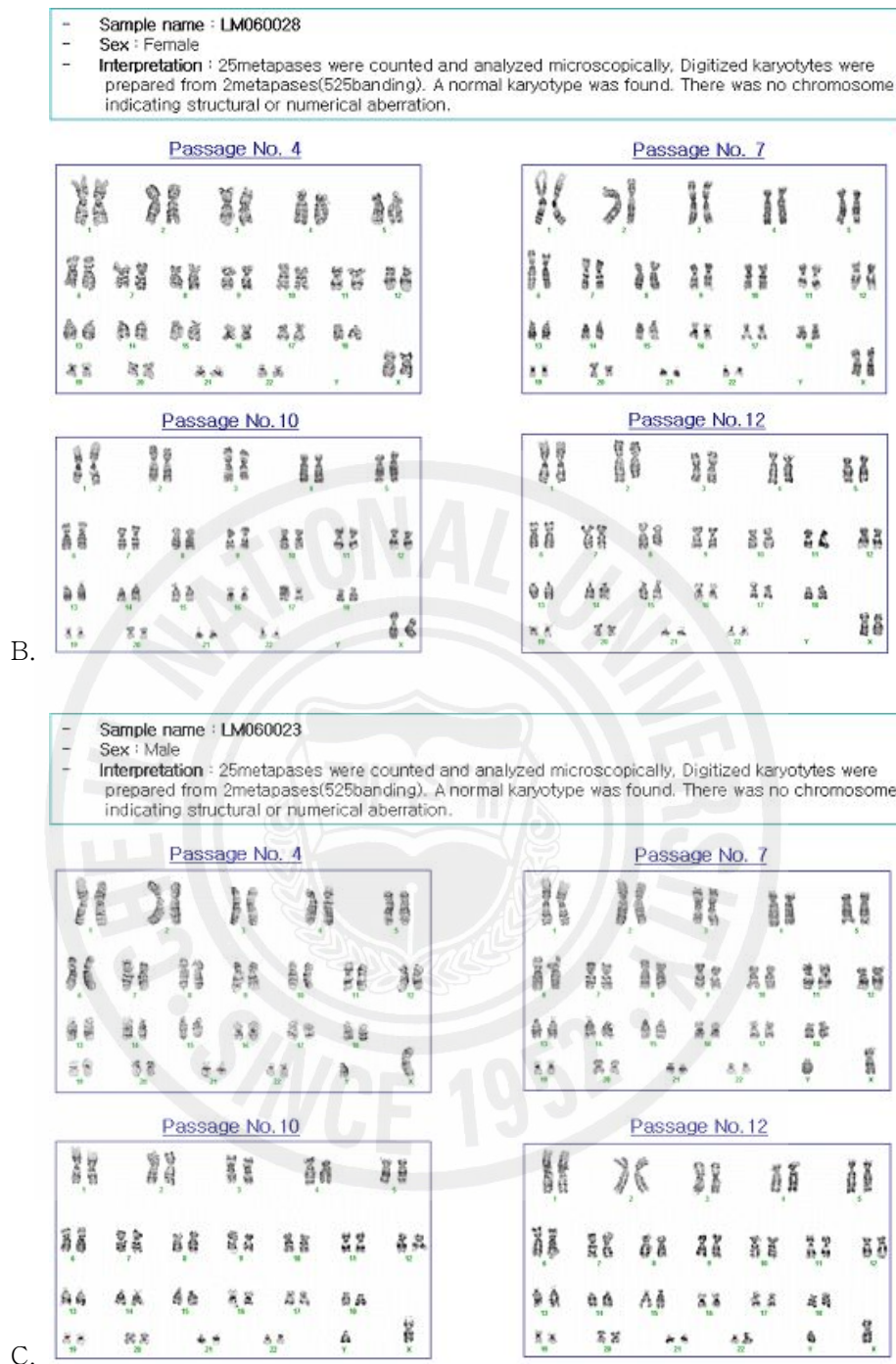
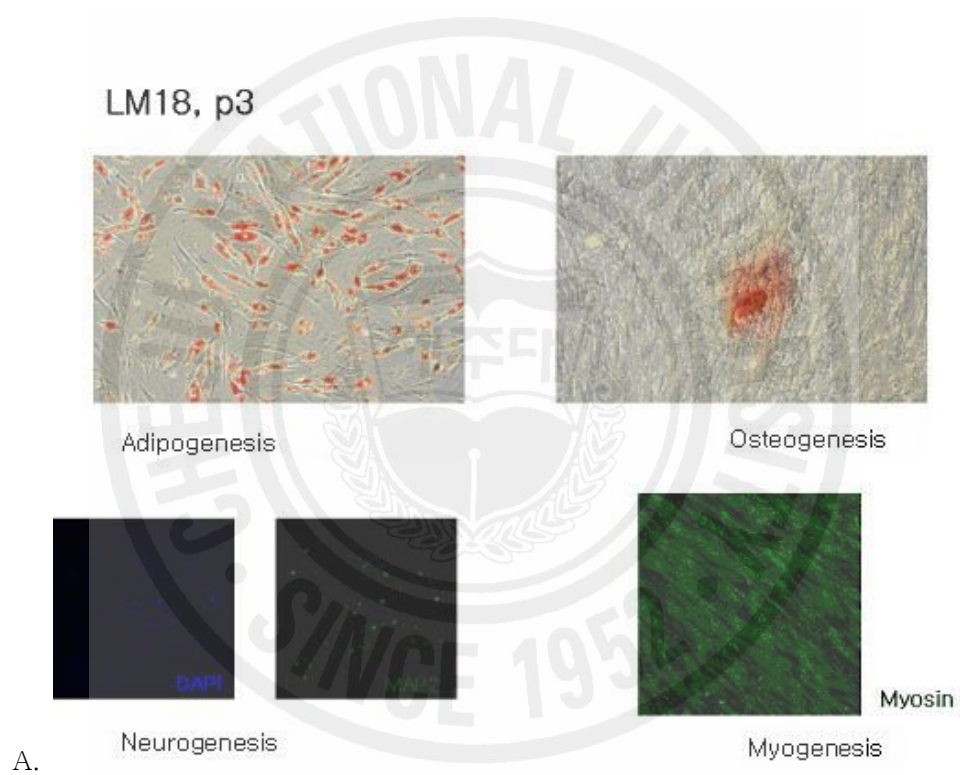


Fig 4. Karyotype of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) from three different donors. There was no chromosome indicating structural or numerical aberration in (A) a male donor LM18, (B) a female donor LM28 and (C) a male donor LM23. The hAdMSC maintained a normal karyotype up to 12 passages.

5. 분화능 확인

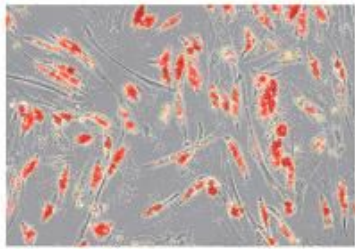
세 명의 기증자로부터 배양된 지방 줄기세포를 3 계대와 그 이후인 4 계대에 걸쳐 각기 다른 조직세포로 다양하게 분화되는지 여부를 확인한 결과, 지방세포, 골세포, 신경세포 및 근육세포로 분화되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 5).



(continue.)

Fig 5. Multipotent differentiation capacity was confirmed from three different donor's AdMSC. Adipogenesis, osteogenesis, neurogenesis and myogenesis observed in (A) passage 3 MSC from donor LM18, (B) passage 4 MSC from donor LM18, (C) passage 3 MSC from donor LM23, (B) passage 4 MSC from donor LM23 and (E) passage 3 MSC from donor LM28.

LM18, p4



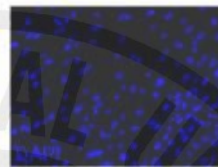
Adipogenesis



Osteogenesis



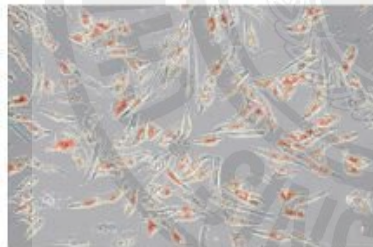
Neurogenesis



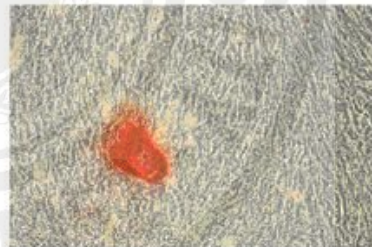
Myogenesis

B.

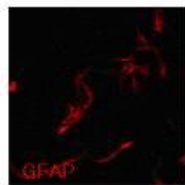
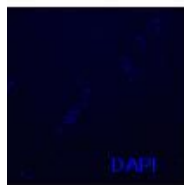
LM23, p3



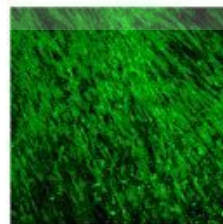
Adipogenesis



Osteogenesis



Neurogenesis

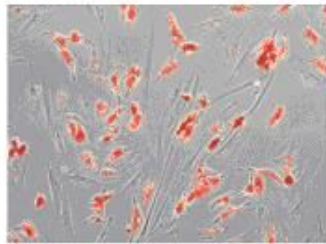


Myogenesis

C.

(continue.)

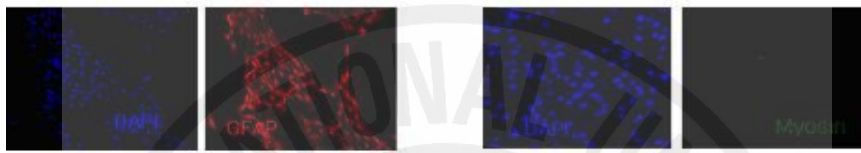
LM23, p4



Adipogenesis



Osteogenesis

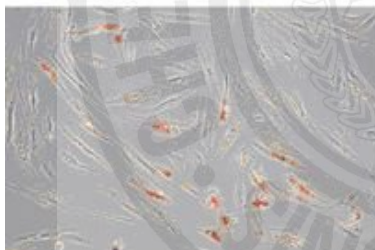


Neurogenesis

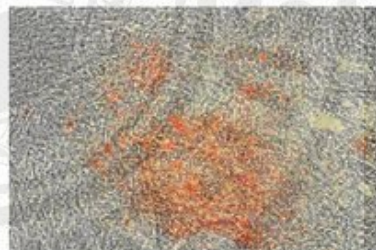
Myogenesis

D.

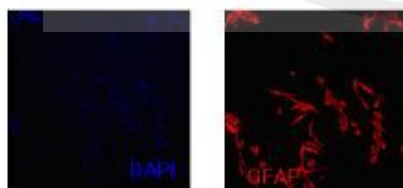
LM28, p4



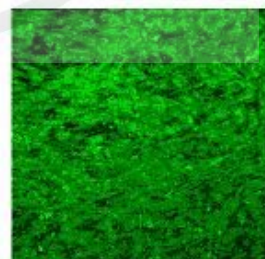
Adipogenesis



Osteogenesis



Neurogenesis



Myosin

Myogenesis

E.

6. 스피어(sphere) 형성능

본 실험에서 분리 배양한 지방 줄기세포를 N-acetyl-L-cystein (NAC)가 함유된 mammary epithelium basal medium MEBM 배지에 B27, BFGF, EGF, insulin, hydrocortisone, mercaptoethanol을 첨가하여 배양한 결과 sphere가 형성됨을 확인할 수 있었다 (Fig 6).

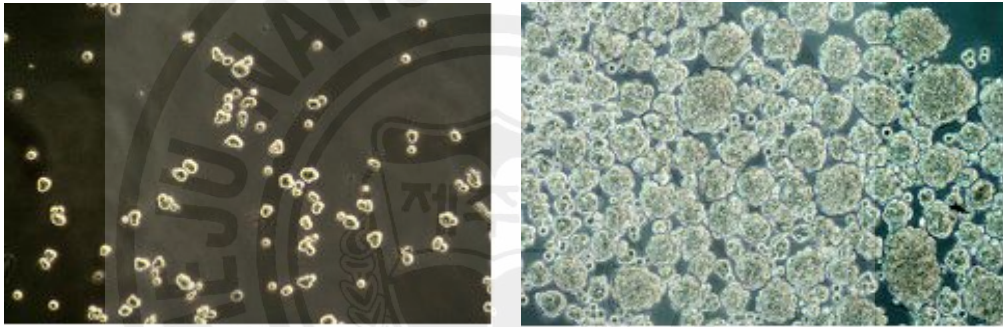


Fig 6. Human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) growing in aggregates as spheres. After 2~3 day within the primary cultures, a number of small floating cell spheres that no longer adhered to the culture dish were observed (*Left*) and increased sphere size with culture time (*Right*).

7. 보관 시간에 따른 지방 유래 줄기세포 안정성 평가

0 시간부터 12 시간 간격으로 최대 72 시간에 이르는 동안 일곱 번의 측정에서 각각의 세포 수, 생존률, 중간엽 줄기세포 양성 표지자 관련 FACS 및 순도 관련 FACS를 세 번 반복 시험한 결과, 모든 측정 시점의 결과에서 특별하게 생존률이 떨어지거나 이상이 있는 경우는 없었다. 배양한 지방유래 줄기세포는 최소 72시간까지 약 80 % 이상의 생존률이 유지되는 것을 확인하였으며 (Table 2), 중간엽 줄기세포 양성 표지자 관련 FACS 및 순도 관련 FACS 결과도 높은 수준으로 유지되었다 (Table 3).

Table 2. A 72-hour time course study of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) viability (%) (A) and total cell count ($\times 10^7$ cells/500 μl) (B). Experiment were repeated 3 times each time point and data are presented as the mean \pm standard deviation.

A.

Viability (%)	Donor A	Donor B	Donor C
0 hr	94.23 \pm 2.68	95.90 \pm 1.28	94.10 \pm 1.18
12 hr	92.57 \pm 1.99	92.83 \pm 1.74	92.07 \pm 1.62
24 hr	88.07 \pm 2.68	90.07 \pm 1.62	87.37 \pm 0.70
48 hr	91.97 \pm 2.00	88.70 \pm 1.42	85.33 \pm 0.80
56 hr	89.40 \pm 4.36	84.87 \pm 3.01	86.13 \pm 4.48
64 hr	90.20 \pm 1.10	83.87 \pm 0.87	81.83 \pm 1.20
72 hr	90.37 \pm 1.45	84.97 \pm 5.66	81.00 \pm 2.36

B.

Total cell count ($\times 10^7$ cells/500 μl)	Donor A	Donor B	Donor C
0 hr	1.39 \pm 0.03	1.40 \pm 0.02	1.38 \pm 0.02
12 hr	1.40 \pm 0.02	1.39 \pm 0.02	1.37 \pm 0.01
24 hr	1.38 \pm 0.03	1.38 \pm 0.03	1.37 \pm 0.03
48 hr	1.38 \pm 0.02	1.40 \pm 0.02	1.38 \pm 0.02
56 hr	1.40 \pm 0.02	1.38 \pm 0.03	1.35 \pm 0.03
64 hr	1.40 \pm 0.02	1.38 \pm 0.03	1.35 \pm 0.02
72 hr	1.38 \pm 0.02	1.37 \pm 0.01	1.38 \pm 0.03

Table 3. A 72-hour time course FACS analysis of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) marker for MSC (A) and for impurity (B). Experiment were repeated 3 times each time point and data are presented as the mean \pm standard deviation.

A. MSC marker

FACS (%)		Donor A	Donor B	Donor C
0 hr	CD73	95.2 \pm 0.9	92.5 \pm 2.4	94.2 \pm 0.6
	CD90	95.6 \pm 0.4	92.0 \pm 3.3	94.2 \pm 0.7
12 hr	CD73	89.7 \pm 5.8	94.7 \pm 0.7	94.4 \pm 0.1
	CD90	90.0 \pm 4.5	96.1 \pm 1.0	94.7 \pm 0.3
24 hr	CD73	96.6 \pm 0.3	94.8 \pm 2.6	92.3 \pm 0.6
	CD90	96.2 \pm 1.0	96.6 \pm 0.1	93.1 \pm 0.6
48 hr	CD73	92.9 \pm 1.8	94.3 \pm 1.0	93.4 \pm 0.7
	CD90	91.7 \pm 2.9	96.6 \pm 0.3	94.1 \pm 0.6
56 hr	CD73	94.9 \pm 2.0	94.8 \pm 1.0	89.4 \pm 7.2
	CD90	96.3 \pm 0.6	96.5 \pm 0.1	95.4 \pm 0.6
64 hr	CD73	94.3 \pm 4.1	84.9 \pm 2.3	85.5 \pm 2.4
	CD90	92.8 \pm 3.3	95.8 \pm 0.0	95.4 \pm 0.3
72 hr	CD73	96.4 \pm 0.4	94.9 \pm 1.3	91.2 \pm 1.3
	CD90	96.5 \pm 0.4	96.5 \pm 0.7	95.8 \pm 0.8

(continue.)

B. Impurity marker

FACS (%)		Donor A	Donor B	Donor C
0 hr	CD31	0.90 ± 0.37	0.47 ± 0.07	1.47 ± 0.40
	CD34	0.58 ± 0.20	0.44 ± 0.06	1.03 ± 0.10
	CD45	0.52 ± 0.08	0.37 ± 0.05	0.88 ± 0.02
12 hr	CD31	0.26 ± 0.08	0.37 ± 0.31	0.69 ± 0.23
	CD34	0.24 ± 0.04	0.29 ± 0.22	0.54 ± 0.08
	CD45	0.21 ± 0.07	0.25 ± 0.19	0.57 ± 0.13
24 hr	CD31	0.23 ± 0.07	0.42 ± 0.07	1.46 ± 0.23
	CD34	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.09	1.49 ± 0.22
	CD45	0.20 ± 0.01	0.26 ± 0.05	1.28 ± 0.24
48 hr	CD31	1.41 ± 0.39	0.25 ± 0.04	1.26 ± 0.16
	CD34	0.69 ± 0.25	0.24 ± 0.02	1.28 ± 0.36
	CD45	0.64 ± 0.25	0.26 ± 0.08	0.95 ± 0.19
56 hr	CD31	0.63 ± 0.06	0.27 ± 0.08	1.16 ± 0.07
	CD34	0.45 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.19 ± 0.24
	CD45	0.40 ± 0.05	0.26 ± 0.11	0.23 ± 0.06
64 hr	CD31	0.93 ± 0.14	0.41 ± 0.03	0.29 ± 0.07
	CD34	0.84 ± 0.17	0.34 ± 0.05	0.23 ± 0.04
	CD45	0.80 ± 0.18	0.29 ± 0.03	0.22 ± 0.07
72 hr	CD31	1.00 ± 0.19	0.49 ± 0.25	0.31 ± 0.20
	CD34	0.80 ± 0.14	0.32 ± 0.05	0.23 ± 0.12
	CD45	0.73 ± 0.16	0.26 ± 0.03	0.19 ± 0.09

IV. 고 찰

세포 치료제 산업은 난치병 치료의 첨단 생명과학 분야이며, 2000년 이후 국내에서 기술 개발이 매우 활발히 이루어지고 있다. 세포치료제 분야의 한국특허는 1993년 출원을 시작으로 꾸준한 성장세를 나타내고 있으며, 특히 2000년 이후에는 특허 출원이 매우 활발해져서 세포치료제 분야에 대한 높은 관심을 나타내고 있다. 줄기세포의 경우, 최근에 그 관심도와 특허 성장률이 높아지고 있어 관련 기술 개발이 활발히 이루어지고 있다. 세포치료제를 통해 치료가 가능한 신경계 질환, 허혈성 질환, 근골격계 질환, 당뇨병, 면역체계 질환, 피부이식 등이 주 치료대상으로 될 것이다. 줄기세포는 기존 의약품과 의료기술의 경계를 무너뜨리는 새로운 개념의 기술로 특히 병든 세포, 조직, 장기를 대체하여 기존의 의약품, 수술법 등으로 치료가 어려웠던 뇌경색, 척수마비 등 여러가지 난치성 질병에 대해 근원적으로 치료할 수 있는 재생의학 (regenerative medicine)이다. 현재 혈액암 (백혈병)에 상용화된 치료법 중의 하나인 골수이식은 줄기세포 치료법 중의 하나이다. 골수이식은 1939년에 처음 시도되었으며 면역거부반응을 비롯한 여러 가지 부작용을 극복하지 못하고 있다가 40년이 지난 1969년 성공적인 이식이 이뤄진 후 조직적합성 항원 개발, 동종골수이식 성공 (1972년) 등이 바탕이 되어 현재는 세계적으로 연간 7,000건 이상이 시행되고 있다 (Karl 등, 2004). 현재 신경계 질환을 포함하여 허혈성 질환, 근골격계 질환 등 여러 난치병 치료를 위해 줄기세포를 이용한 치료법을 시도하고 있으나, 배아줄기세포의 경우 줄기세포의 획득과 사용에 따른 윤리적인 문제점과 배아 줄기세포의 배양을 위한 난자 제공자 확보 어려움, 그리고 체내에서 종양을 형성한다는 보고가 있어 임상에 바로 적용하기에 어려운 점이 있다 (Denker, 2006). 반면 성체 줄기세포는 그 안전성이 입증되어 있고 지방유래 중간엽 줄기세포인 경우 간단한 지방흡입술을 통해 채취가 가능하며 자가이식 형태이기 때문에 면역거부반응이라는 부작용을 최소화할 수 있으며 반복적인 시술이 가능하다는 장점을 가지고 있다 (García-Olmo 등, 2005).

지금까지 성체줄기세포의 경우는 대부분이 골수나 체대혈을 이용해서 얻어왔

으며, 성체줄기세포 치료제의 개발도 이를 통해서 이루어져 왔다. 그러나 골수의 취득 단계에서 전문적인 기술과 골수 제공자의 고통이 따른다는 점을 고려해 볼 때, 지방 조직에서의 줄기세포 분리는 전문적인 기술이나 제공자의 적은 고통으로 줄기세포를 대량으로 분리 배양하여 동종 이식이 아닌 자가 이식으로 보다 수월하게 치료에 적용할 수 있다는 장점으로 그 발전 가능성이 매우 크다.

사람의 중간엽 줄기세포를 정의하기 위한 최소한의 조건을 ISCT (International Society for Cellular Therapy)의 Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee는 다음과 같이 제시하였다. 첫째, 중간엽 줄기세포는 일반적인 배양상태에서 배양플라스크에 붙어서 자라야 한다. 둘째, 중간엽 줄기세포는 CD105, CD73, CD90을 발현하여야 하고, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, 그리고 HLA-DR 등은 발현하지 않아야 한다. 셋째, 중간엽 줄기세포는 *in vitro*에서 osteoblasts, adipocytes, chondroblasts로 분화되어야 한다는 것이다 (Dominici 등, 2006).

줄기세포의 임상적 적용을 위해서는 체외에서 배양된 줄기세포가 유전학적으로 안정하고 여러 사람에게서 얻은 지방 조직으로 분리한 줄기세포가 형태학적, 세포면역학적 특성, 분화 능력 등의 결과에서 일관성 있는 결과를 보여 주어야 한다. 특히 줄기세포의 임상적 적용을 위해서는 임상적용을 위한 세포수를 얻기 위해 체외에서 증식 배양을 시켜야 하는 과정이 필요로 한다. 이러한 지속적인 체외 배양된 줄기세포는 유전학적으로 불완전하고 체내에 있는 줄기세포와 세포면역학적으로 다른 표현형을 나타낼 수 있다. 최근에 배아줄기세포의 연구 결과를 살펴보면 배아줄기세포를 체외에서 지속적으로 배양할 경우 유전학적으로 이상을 일으켜 핵형에 이상이 있으며 세포의 특성에 변화가 있음이 보고 되었다 (Imreh 등, 2006; Hanson과 Caisander, 2005). 본 연구에서는 이러한 기준에 보고된 연구 결과를 바탕으로 지방유래 줄기세포를 체외에서 배양할 경우 형태학적 및 유전학적 변화가 없는지와 여러 명의 지방 공여자에서 분리한 지방유래 줄기세포에서 일관성 있는 결과를 얻을 수 있는지에 대해 실험을 수행하였다.

본 실험에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 특성은 방추사 형태의 세포가 배양

접시에 붙어 자라며, 미분화 상태에서 성상이나 핵형이 변화하지 않은 채 12 계대까지도 self-renew 능력을 보여 주었고, 그리고 분리 배양한 지방유래 줄기세포의 세포표면 표지자 발현을 유세포 분석법을 이용하여 분석해 본 결과 중간엽 유래 줄기세포 표지자인 CD73과 CD90를 발현하였으며, 조혈모세포 특이 항원인 CD34, 내피세포 표지자인 CD31, 백혈구 표지자인 CD45를 발현하지 않는 것을 확인하였다. 또한 계대가 계속 진행됨에 따라 그 증식 속도 (CPDL)가 저하되지 않았다. 이러한 특성은 ICST에서 규정하고 있는 중간엽 줄기세포의 정의에 부합되는 결과이다. 또한 줄기세포의 분화 능력에 있어서도 특정 조건의 환경에 노출시킨 결과 hAdMSC가 지방세포, 골세포, 신경세포 및 근육세포로 분화되는 것을 관찰하였다. 지방유래 중간엽 줄기세포는 높은 증식률 때문에 특정 배지 조건하에서 분화되지 않은 상태로 유지시키는 경우 sphere를 형성하는 능력이 있는데 (Moon 등, 2006), 본 연구에서 분리, 배양된 지방유래줄기세포에서도 sphere를 형성하며 미분화 상태를 유지하는 것을 관찰하였다.

중간엽 줄기세포의 특성을 갖는 지방 줄기세포 배양을 확립하였다 하더라도, 줄기세포를 임상 적용시에는 배양배지가 아닌 단순한 제형 (예, 생리식염수)에 줄기세포를 부유시켜야 되는데, 이러한 경우 안전성이 더 확보되어야 한다. 따라서 지방유래줄기세포가 배양배지가 아닌 다른 환경에서 쉽게 그 성질을 잃는다면 지방 줄기세포를 다른 연구에 응용할 수 있는 기회가 많이 제한되고 또 응용한다 하더라도 그 결과의 신뢰성이 현격히 저하될 수 밖에 없다. 따라서 본 연구에서 분리배양에 성공한 지방유래 줄기세포의 실제적 임상적용을 위해 지방줄기세포를 배양배지가 아닌 생리 식염수에 부유시킨 후 지방줄기세포의 생존율 및 세포표면 항원의 변화에 대한 시험을 실시하였다. 지방유래 줄기세포를 생리식염수에 부유시키고 12 시간 간격으로 최대 72 시간에 이르기까지 보관된 지방 줄기세포의 세포 수, 생존률 그리고 세포 표면 항원을 관찰한 결과 지방 줄기세포는 냉장 조건에서 최소 72 시간 이상 세포수 및 생존율 면에서 안정한 것을 확인하였으며 세포표면 항원의 표현에도 변화가 없는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 지방 줄기세포를 필요로 하는 곳이 2~3 일 정도 시간적, 공간적으로 떨어

저 있어도 충분히 수요자의 요구를 충족 시킬 수 있다는 것과 해외에서 사용도 가능하다는 것을 시사한다.

따라서 본 실험 결과를 종합하여 보면 분리 배양된 hAdMSC가 ISCT의 Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee에서 사람 중간엽 줄기세포로 정의 내린 특성을 확실히 나타내고 기존의 연구자들 (Casteilla 등, 2005; Zuk 등, 2002)이 보고한 지방유래 줄기세포의 특성과 일치함을 알 수 있다. 그리고 이들 지방 줄기세포는 분화능이 우수하여 척수손상, 신경질환, 골절, 심장질환, 당뇨, 피부재생을 포함한 다양한 세포손상질환에 적용할 수 있을 것으로 기대되며 앞으로 증가하는 노령인구의 건강한 노후를 위해서도 사용 될 것으로 기대된다.

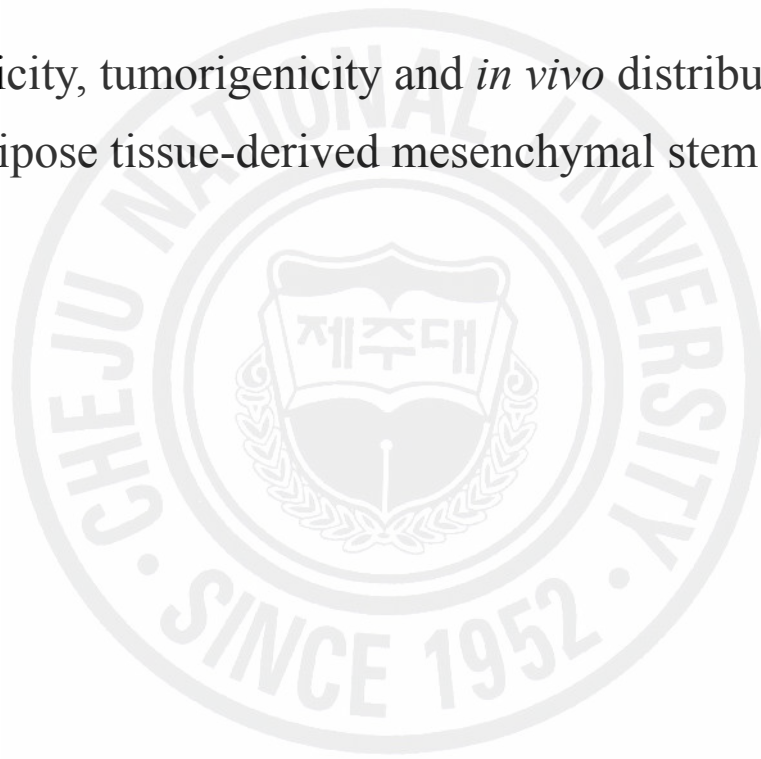
연구 결과 체외에서 지속적으로 배양된 지방유래줄기세포는 유전학적으로 안정하여 12 세대 까지도 핵형에 변화를 일으키지 않고, 성장속도에 변화를 주지 않았으며 장기간 배양에도 줄기세포 특이 표면 표지자에 변화가 없다는 것이 확인하였다. 또한 본 연구는 세 명의 성별이 다른 기증자에게서 얻은 지방 조직으로부터 분리 배양한 hAdMSC를 가지고 실험을 진행한 결과 각 실험에서 일관성 있는 결과를 얻었다. 이러한 일관성 및 신뢰성이 있는 연구 결과는 본 연구에서 분리 배양된 지방유래 줄기세포의 임상적 적용에 적합한 줄기세포라는 것을 증명하고 있다.

실제적으로 지방유래줄기세포의 임상 적용을 위해서는 동물에서의 안전성 (전임상) 및 각 질환 모델에서의 유효성에 대한 평가 연구가 절실히 요구되는 바이다. 이에 제 2장에서는 지방유래 줄기세포의 동물에서의 안전성을 제 3장에서는 질환모델 동물에서의 유효성 평가에 대한 연구를 수행하였다.

제 2 장.

지방줄기세포의 안전성, 발암성 및 체내분포 확인

Toxicity, tumorigenicity and *in vivo* distribution of
adipose tissue-derived mesenchymal stem cells



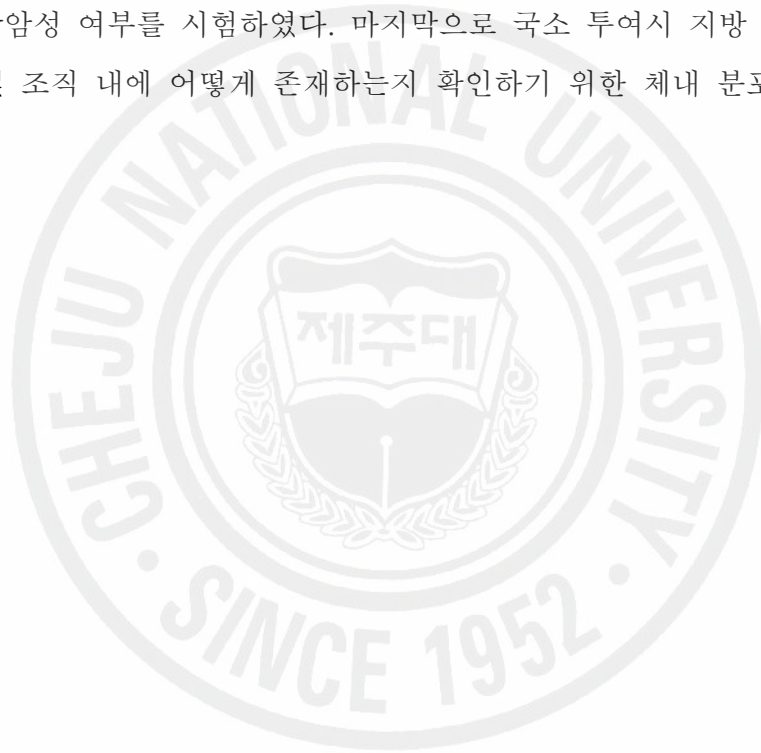
I. 서론

최근 여러 가지 질병으로 인한 조직 및 기관의 기능부전에 대해 조직 재생 또는 기능 회복을 목적으로 하는 재생의학이 주목 받고 있다. 그 방법으로 줄기 세포나 첨단 인공소재의 의료기구 개발 및 세포 치료 분야에 많은 연구가 진행되고 있다 (Evers 등, 2003). 배아줄기세포는 전능성을 가지고 있으나 수정란을 사용하는 점 때문에 윤리적 논란의 소지가 있는데 반해, 성체줄기세포는 배아줄기세포의 윤리적 문제가 없다는 점에서 재생의학 및 세포 치료분야에서 관심을 받는 가장 큰 이유 중 하나이다 (Cedar 등, 2006; Gruen과 Grabel, 2006; Bongaerts와 Severijnen, 2007). 그 가운데에서도 골수에 존재하는 중간엽 줄기세포 및 조혈모세포, 혈관내피 전구세포는 여러 의료 분야에 적용이 기대되며, 골수와 체대혈 중에는 중간엽 줄기세포와 조혈모세포 보다 한층 더 윗 단계에서 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포 (multipotent adult progenitor cells; MAPS)가 존재한다는 것도 보고되어 있다 (Pittenger 등, 1999). 더욱이 골수뿐 만 아니라 다른 여러 조직에서도 줄기세포가 존재한다는 것이 밝혀졌으며, 그 중 지방 조직도 줄기세포를 충분히 보유하고 있다는 것이 알려졌다 (Zuk 등, 2001). 지방유래의 중간엽 줄기세포가 뼈, 연골, 지방, 근육으로 분화 가능하다는 것은 이미 연구자들에게 잘 알려진 사실이며 (Casteilla 등, 2005; Zuk 등, 2002), 이 밖에도 신경세포, 간세포, 심근세포 등 중간엽을 넘어서는 분화도 보고되고 있어 (Safford 등, 2002; Seo 등, 2005) 성형외과 분야 뿐 아니라 동맥경화, 심근경색, 간경변, 당뇨병 등에서의 치료적 적용이 기대되고 있다. 지방유래 중간엽 줄기세포는 채취가 간편하고 체외에서 분리 배양하는 기술도 확립되어 있어 세포 치료에 매우 실용적으로 접근하기 쉬운 줄기세포 중 하나이다.

줄기세포는 다분화능과 함께 자기복제능을 가진 세포이기 때문에, 정상세포 이면서도 증식능력을 가졌다는 점에서 암세포와 공통적인 성질을 가지고 있다고 할 수 있다. Rubio (2005) 등은 사람 지방조직유래의 중간엽 줄기세포를 4~5 개월 장기간 배양을 지속하면 형질변경 즉, 암세포의 성질을 가진다고 하였다. 그러나 최근 중간엽 유래 줄기세포 특성의 차이점 때문에, 골수, 체대혈, 지방유래

중간엽 줄기세포를 여러 가지 측면에서 비교 분석한 보고도 있다 (Kern 등, 2006). 그러나 사람지방유래 중간엽 줄기세포가 장기간 배양 시 암세포로 전환되지않는다 하더라도 그러한 위험성에 대해 주의를 기울일 필요는 있다.

기존 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 사람의 지방 조직을 채취하여 *in vitro*로 사람 지방유래 중간엽 줄기세포를 분리 배양하여 얻은 최종 산물이 생체에 어느 정도의 위험성을 가지고 있는지 판단하기 위하여 첫째로 실험 동물에 투여하였을 때 생체에서 지방유래 줄기세포가 어떠한 독성을 보이는지 시험하였다. 둘째로 배아줄기세포에서 특히 문제가 되고 있는 종양 유발 가능성을 확인하기 위한 발암성 여부를 시험하였다. 마지막으로 국소 투여시 지방 줄기세포가 생체 기관 및 조직 내에 어떻게 존재하는지 확인하기 위한 체내 분포 시험을 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 단회 투여 독성 시험

1. 1. 실험 동물

SCID 마우스 (Harlan, Indiana Polis, IN) 6 주령 암컷 및 수컷 각각 114 마리씩 구입하여 1 주일간 순화하였으며, 건강한 동물만을 선별하여 암, 수 각 100 마리씩을 독성 시험에 사용하였다. 지방 줄기세포 투여 전에 체중을 측정하여 층별 연속 무작위법으로 군 분리를 실시하였으며, 군 간 유의성이 없음을 확인하였다. 사육상자 내의 개체식별은 입수 후 순화기간 및 시험기간 동안 ear punch법으로 하였다. 또한 군 및 사육상자의 식별을 위해 사육상자 전면 에 시험번호, 시험물질명, 군명, 동물번호 등을 기재한 카드를 부착하였고, 군 간의 식별을 위해 사육상자 카드의 색을 구분하였다.

온도 20.3~23.8℃, 상대습도 40.5~60.5 %, 환기회수 12~18 회/hr, 조명 12 시간 (08:00 점등 ~ 20:00 소등), 조도 212±2.89 Lux, 소음 45±0.0 dB, 취기 (암모니아 기준) 0 ppm으로 사육 환경을 조성하였으며, 순화, 검역, 투여 및 관찰기간 중 시험계는 IVCS (Individually Ventilated Caging System) polysulfone 케이지 (365×207×130 mm; Tecniplast Co.)에 5 마리씩 수용하여 1 주일에 한 번 멸균케이지로 교환하여 주었다. 사료는 감마선조사 멸균된 실험동물용 고형사료 (LabDiet 5002)를 자유 급이 하였으며, 음수는 상수도수를 고온고압멸균 (autoclave)하여 공급하였다.

1. 2. 시험군의 분류

시험물질 hAdMSC는 임상 예정용량을 성인 1인 (50kg) 당 1×10^7 cells로 설정하여, 임상 예정용량을 저용량으로 설정하고, 공비 10으로 4 단계의 시험 물질 투여군과 용매 대조군으로 나누었다. 군 당 암, 수 각각 20 마리씩 배치 하였다. 용매 대조군에는 같은 부피의 부형제만을 투여하였다 (Table 4).

Table 4. Experimental design for testing the 13 weeks toxicity of hAdMSC in SCID mice.

Group	Test Item	Dosage (cells/kg BW)	Sex	No. of animals	Animal No.	Route of administration
Control	Saline	0	Male	20	114CM001~114CM020	I.M.
			Female	20	114CF101~114CF120	I.M.
Low	hAdMSC	2×10^5	Male	20	114LM021~114LM040	I.M.
			Female	20	114LF121~114LF140	I.M.
Medium	hAdMSC	2×10^6	Male	20	114MM041~114MM060	I.M.
			Female	20	114MF141~114MF160	I.M.
High	hAdMSC	2×10^7	Male	20	114HM061~114HM080	I.M.
			Female	20	114HF161~114HF180	I.M.
Very High	hAdMSC	2×10^8	Male	20	114VHM081~114VHM100	I.M.
			Female	20	114VHF181~114VHF200	I.M.

1. 3. 시험물질 이식

시험물질 hAdMSC은 줄기세포 분리 및 배양 방법에 준하여 준비하였으며, 투여 시 실험 동물 체중을 측정한 결과를 토대로 투여량 (0.05 ml/30 g BW)을 환산하여 근육 내로 단 회 투여하였다. 시험물질은 투여직전에 투여농도군 별 세포의 수를 계수하여 확인하고 사용하였으며, 투여가 종료된 시험물질은 viability test를 실시하였다. 한편 용매 대조군에는 부형제로 사용하는 saline 을 시험물질 투여군과 동일 용량을 동일한 방법으로 투여하였다

1. 4. 평가

1) 임상증상

시험물질을 투여한 모든 동물에 대하여 1 일 2 회 빈사동물 및 사망여부를 확인하였고, 매주 1 회 외관적 이상 및 임상증상, 이상 징후의 발생여부와 그 정도를 관찰하였다.

2) 체중 변화

모든 동물에 대하여 시험물질의 투여개시 전, 투여개시 후 시험 종료 시까지 매주 1 회 측정하였고, 부검일에 측정하였다.

3) 사료 및 음수 섭취량

사육상자 별로 급여 총량과 잔량을 투여 개시 후부터 시험 종료 시까지 매주 1 회 측정하였다.

4) 뇨검사

시험기간 중 투여개시 후 13 주차에 무작위로 각 군 당 암, 수 각각 5 마리의 동물에 대하여 metabolic cage를 사용하여 채뇨한 후, 뇨검사용 시험지 (Roche, Controltest M, Germany)를 사용하여 Urine analyzer (Roche, Miditron Junior II, Germany)로 pH, specific gravity, leukocyte, nitrite, protein, ketone body, urobilinogen, bilirubin, glucose, occult blood 검사를 실시하였다.

5) 안검사

시험기간 중 투여개시 후 13 주차에 무작위로 각 군 당 암, 수 각각 5 마리의 동물에 대하여 1 회 안과학적 검사를 실시하였다. 검사는 육안 및 검안경으로 실시하였고 전안부, 중간 투광채 및 안저 각각에 대하여 실시하였다.

6) 혈액학적 및 혈청화학적 검사

혈액학적 검사 및 혈청화학적 검사를 위하여 부검당일에 복대정맥에서 혈액을 채취하였다. 군 당 암, 수 각각 10 마리에서 혈액학적 검사와 혈청화학적 검사를 실시하였다. 일반 혈액학적 검사는 leukocyte count (WBC), erythrocyte count (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), platelet (PLT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin

(MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), leukocyte differential 등을 Animal Blood Counter (Melet schloesing laboratoires, MS 9-5, France)를 이용하여 검사하였다.

혈청화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30 분간 방치하여 응고 후 원심분리 (3,000 rpm, 15분)하여 얻은 혈청에 대해서 urea nitrogen (BUN), cholesterol (CHOL), total protein (TP), albumin (ALB), total bilirubin (TB), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (CRN), triglycerides (TG), glucose, K, Cl, Ca, P, Na, A/G ratio 등을 Automatic Chemistry Analyzer (HITACHI, 7070, Japan)로 측정하였다.

7) 병리학적 검사

시험 종료 시 생존한 전 실험동물에 대하여 isoflurane으로 마취한 다음 복대정맥에서 채혈하고 충분히 방혈을 시킨 후 부검을 실시하였다. 군 당 암, 수 각각 20 마리 중 10 마리에 대해서만 장기중량 측정 및 조직병리학적 검정을 실시하였으며, 나머지 10 마리에 대해서는 부검시 육안적 관찰만을 실시하였다.

동물의 부검 시에 우선 피부, 구강 및 눈 등의 외표를 조사한 후 박피하여 피하조직의 상태를 관찰하였다. 그 후 복강, 흉강 및 두개강을 열고 내부기관 및 조직의 상태를 조사하였다. 적출한 조직은 건조를 피하기 위해 신속하게 육안적 관찰 또는 중량 측정을 실시한 후 10 % 중성 포르말린액, 안구는 Davidson액, 고환 및 부고환은 Bouin액 등에 침적하였다.

관찰 장기와 조직은 이식부위, 피부, 유선, 림프절, 타액선, 골 및 골수 (흉골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 부갑상선, 췌, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 고환, 부고환, 난소, 자궁, 질, 뇌, 뇌하수체, 척수, 안구 및 그 부속기, 기타 육안적 병변이 관찰된 장기와 조직 등이었다.

군 당 암, 수 각각 20 마리 중 10 마리에 대하여 심장, 간장, 폐장, 흉선,

비장, 신장(좌, 우), 부신(좌, 우), 고환(좌, 우), 난소(좌, 우), 뇌, 뇌하수체의 중량을 측정하였고, 체중에 대한 비 (상대중량)를 계산하였다.

육안적 관찰 및 중량 측정이 끝난 모든 장기는 고환의 경우 Bouin액, 안구는 Davidson액, 기타 장기는 10 % 중성 포르말린액에 1 주 이상의 충분한 고정기간을 거쳤으며 대퇴골, 흉골, 비강은 탈회과정을 거쳐, 모든 시험군의 전 장기에 대하여 파라핀 포매기 (SHANDON, Citadel 2000)에 포매하여 마이크 로톰 (Microm, HM340E)으로 2~3 μm 절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색하였다. 병리조직학적 검사는 대조군과 최고 용량군에 대하여 실시하였다.

2. 발암성 시험

2. 1. 실험 동물

6 주령의 BALB/c-nu 누드마우스 (Harlan) 암컷 및 수컷 각각 58 마리씩을 구입하여 1 주일간 순화하여 건강한 동물만을 선별한 후 암, 수 각 50 마리씩을 발암성 시험에 사용하였다. 지방 줄기세포 투여 전에 체중을 측정하여 층별 연속 무작위법으로 군 분리를 실시하였다. 사육 밀도 및 사육 환경 등은 위에서 언급한 독성 시험에서의 조건과 동일하게 적용하였다.

2. 2. 시험군의 분류

시험물질 hATMSC는 임상 예정용량을 성인 1인 (50kg) 당 1×10^7 cells로 설정하여, 이에 임상 예정용량의 10배 용량을 저용량으로 설정하고, 공비 10으로 3단계의 시험물질 투여군을 두었으며, 종양발생 비교를 위하여 음성대조군 (MRC-5)과 양성대조군 (A375)으로 나누었다. 군 당 암, 수 각 10 마리로 구성하였다 (Table 5).

Table 5. Experimental design for tumorigenicity of hAdMSC in BALB/c-nu mice.

Group	Test Item	Dosage	Sex	No. of animals	Animal No.	Route of administration
Negative Control	MRC-5	2×10^6 /mouse	Male	10	116NM001~116NM010	S.C.
			Female	10	116NF051~116NF060	
Low	hAdMSC	2×10^6 /kg BW	Male	10	116LM011~116LM020	S.C.
			Female	10	116LF061~116LF070	
Medium	hAdMSC	2×10^7 /kg BW	Male	10	116MM021~116MM030	S.C.
			Female	10	116MF071~116MF080	
High	hAdMSC	2×10^8 /kg BW	Male	10	116HM031~116HM040	S.C.
			Female	10	116HF081~116HF090	
Positive Control	A375	2×10^6 /mouse	Male	10	116PM041~116PM050	S.C.
			Female	10	116PF091~116PF100	

2. 3. 시험물질 접종

시험물질 hAdMSC은 앞서의 줄기세포 분리 및 배양 방법과 같이 준비하였으며, MRC-5 (human fetal lung cell line) 세포주를 음성 대조물질로, A375 (human malignant melanoma cell line) 세포주를 양성 대조물질로 준비하였다. 실험 동물 체중을 측정한 결과를 토대로 투여량 (0.1 ml/mouse)을 환산하여 시험물질과 음성, 양성 대조물질을 1회 피하 주사하였다. 시험물질은 투여직전에 투여농도군 별 세포의 수를 계수하여 사용하였으며, 투여가 종료된 시험물질은 viability test를 실시하였다.

2. 4. 평가

1) 임상증상

시험물질을 투여한 모든 동물에 대하여 매일 빈사동물 및 사망여부를 확인하였고 매주 1 회 외관적 이상 및 임상증상, 이상 징후의 발생여부와 그 정도를 관찰하였다.

2) 체중 변화

모든 동물에 대하여 시험물질의 투여개시 전, 투여개시 후 시험 종료 시까지 매주 1 회 측정하였고, 부검일에 측정하였다.

3) 종양 발생

모든 동물에 대하여 시험물질의 이식개시 후 시험 종료 시까지 26주간 매주 2회 종양발생 유무를 확인하였으며, 종양의 크기는 calipers를 이용하여 측정하여 ($\pi/6 \times \text{길이} \times \text{폭} \times \text{높이}$)의 공식으로 계산하였다. SNUH-IACUC 권고에 따라 종양의 직경이 250 mm 이상이 될 경우 안락사를 실시하였다.

3. 분포 시험

3. 1. 실험 동물

6 주령의 SCID 마우스 (Harlan) 수컷 97 마리를 구입하여 5 일간 순화하며 건강한 동물만을 선별한 후 90 마리를 분포 시험에 사용하였다. 시험 물질 투여 전에 체중을 측정하여 층별 연속 무작위법으로 군 분리를 실시하였으며, 군 간 유의성이 없음을 확인하였다. 사육 밀도 및 사육 환경 등은 위에서 언급한 독성 시험에서의 조건과 동일하게 적용하였다.

3. 2. 시험군의 분류

시험물질 hAdMSC는 임상 예정용량 (50 kg 성인 1 인당 1×10^7 cells)과

독성시험의 투여 용량군을 고려하여 저용량을 임상 예정용량의 10 배 용량으로 설정하고, 공비 100으로 2 단계의 시험물질 투여군과 용매 대조군을 두었다. 시간에 따른 영향을 평가하기 위하여 투여 개시 후 24 시간, 1 주차 및 4 주차에 부검군을 두었으며, 군 당 5 마리로 구성하였다. 시험물질의 체내 분포의 평가는 CM-DiI tagging (Andrade 등, 1996; Ruhparwar 등, 2005) 분석 방법을 사용하였고 용매 대조군에는 같은 부피의 부형제만을 투여하였다 (Table 6).

Table 6. Experimental design for distribution of CM-DiI-labelled hAdMSC in SCID mice

Group	Test Item	Dosage (cells/kg BW)	Sex	No. of animals	Animal No.	Time of sacrifice	Route of administration
Control	Saline	0	Male	5	115CM001~115CM005	24 hr	I.M.
				5	115CM006~115CM010	1 week	I.M.
				5	115CM011~115CM015	4 week	I.M.
Low	hAdMSC	2×10^6	Male	5	115LM031~115LM035	24 hr	I.M.
				5	115LM036~115LM040	1 week	I.M.
				5	115LM041~115LM045	4 week	I.M.
High	hAdMSC	2×10^8	Male	5	115HM061~115HM065	24 hr	I.M.
				5	115HM066~115HM070	1 week	I.M.
				5	115HM071~115HM075	4 week	I.M.

3. 3. 시험물질 이식

시험물질 hAdMSC은 앞서의 줄기세포 분리 및 배양 방법과 같이 준비하였으며, CellTracker CM-DiI (Invitrogen)를 사용하여 제조사의 방법에 준하여 세포를 형광 표지하였다. 본 시험물질은 임상 적용 시 근육 내로 이식하므로, 시험물질과 용매대조물질을 오른쪽 대퇴 근육 내에 이식하였다. 투여 시 실험 동물 체중을 측정한 결과를 근거로 투여량 (0.05 ml/30 g BW)을 환산하여 근육 내로 1회 투여하였다.

3. 4. 평가

1) 임상증상

시험물질을 투여한 모든 동물에 대하여 매일 빈사동물 및 사망여부를 확인하였고, 매주 1 회 외관적 이상 및 임상증상, 이상 징후의 발생여부와 그 정도를 관찰하였다.

2) 체중 변화

모든 동물에 대하여 시험물질의 투여개시 전, 투여개시 후 시험 종료 시기까지 매주 1 회 측정하였고, 부검일에 측정하였다.

3) 체내 분포 양상

시험물질의 세포막에 형광표지 (CellTracker CM-DiI)를 하여, 병리조직 슬라이드 제작 후 형광현미경 (rhodamine filter: TRITC)으로 관찰하였다. 시험물질 투여 개시 후 24 시간, 1 주, 4 주째에 부검을 실시하였으며, 부검 시 채혈하여 blood smear 슬라이드를 제작하고, 이식부위 (우측 대퇴근육), liver, kidney (L/R), adrenal gland (L/R), spleen, thymus, cervical lymph nodes, lung, heart, testis, epididymis, brain, femur를 10 % 중성포르말린에 고정하여 병리조직 슬라이드를 제작하였다. 각 장기별로 20 section (전체 200 serial section 중 매 10번째 section을 슬라이드로 제작)의 슬라이드를 형광현미경으로 관찰하였다. 광학현미경으로 관찰하기 위하여 serial section의 첫 번째 section은 hematoxylin & eosin 염색을 실시하였다.

4. 통계처리 및 결과의 판정

본 시험에서 얻은 측정치들은 SPSS (SPSS 12.0K)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 군간 유의성을 검정하였고, 유의성이 인정될 경우 Dunnett t-test 및 Tukey-Kramer test를 실행하여 대조군과 각 용량군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다 ($p<0.05$).

III. 결 과

1. 독성 시험

사람 지방 중간엽 줄기세포 (hAdMSC)의 SCID mouse에서의 13주 독성시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 1. 사망률 및 일반 임상증상

시험기간 중 암컷 저용량군에서 1 마리가 폐사하였으나 SCID 마우스에서의 자연발생 병변인 림프종으로, 시험물질과 관련이 없는 것으로 판명되었다. 그 외에 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상 등은 관찰되지 않았다.

1. 2. 체중 변화

수컷의 경우 시험물질 투여 후 70 일째에 최고용량 투여군 (25.79 ± 1.68 g)에서 대조군 (23.94 ± 1.71 g)과 비교하여 유의한 증가가, 77, 84, 91 일째에는 고용량 투여군 (25.28 ± 0.87 g, 25.42 ± 1.01 g, 25.44 ± 1.20 g) 및 최고용량 투여군 (25.86 ± 1.58 g, 25.93 ± 1.59 g, 26.03 ± 1.90 g)에서 대조군 (23.93 ± 1.81 g, 23.64 ± 1.97 g, 23.73 ± 1.62 g)과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

암컷의 경우 시험물질 투여 후 63 일째에 중간용량 투여군 (19.60 ± 0.80 g)에서 대조군 (20.60 ± 0.92 g)과 비교하여 유의한 감소가, 70, 77 일째에 저용량 투여군 (19.76 ± 1.07 g, 19.88 ± 1.05 g)과 중간용량 투여군 (19.51 ± 0.81 g, 19.58 ± 0.79 g)에서 대조군 (20.77 ± 0.76 g, 20.88 ± 0.73 g)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다. 84, 91 일째에 전 투여 용량군 (저용량, 19.85 ± 1.18 g, 20.41 ± 1.10 g; 중간용량, 19.58 ± 0.88 g, 19.83 ± 0.90 g; 고용량, 20.10 ± 0.73 g, 20.45 ± 0.86 g; 최고용량, 20.15 ± 1.09 g, 20.45 ± 1.29 g)에서 대조군 (21.05 ± 0.82 g, 21.37 ± 0.85 g)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

1. 3. 사료섭취량, 사료효율 및 사료요구율

사료섭취량에서는 수컷의 경우 시험기간 중 대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았다. 암컷의 경우 투여 8, 9, 10 주째 중간용량 투여군 (2.76 ± 0.18 g, 2.78 ± 0.10 g, 2.57 ± 0.26 g)에서 대조군 (3.18 ± 0.18 g, 3.28 ± 0.33 g, 3.26 ± 0.30 g)에 비하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 12 주째에는 전 투여 용량군 (저용량, 2.62 ± 0.28 g; 중간용량, 2.55 ± 0.12 g; 고용량, 2.54 ± 0.15 g; 최고용량, 2.74 ± 0.24 g)에서 대조군 (3.15 ± 0.19 g)과 비교하여 유의한 감소를, 13 주째에는 저용량 투여군 (2.77 ± 0.24 g)과 중간용량 투여군 (2.92 ± 0.24 g)에서 대조군 (3.46 ± 0.11 g)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

사료효율에서는 수컷의 경우 투여 7, 10 주째에 최고용량 투여군 (0.04 ± 0.003 , 0.02 ± 0.010)에서 대조군 (0.02 ± 0.008 , 0.00 ± 0.005)과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었고, 암컷의 경우 투여 3 주째 최고용량 투여군 (0.02 ± 0.006)에서 대조군 (0.04 ± 0.014)과 비교하여 유의한 감소가, 12 주째에 고용량 투여군 (-0.02 ± 0.011)에서 대조군 (0.01 ± 0.006)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 사료 요구율은 암, 수 모두에서 대조군과 비교하여 유의한 증감이 관찰되지 않았다.

1. 4. 음수섭취량 측정

음수섭취량에서는 수컷의 경우 투여 8, 11 주째에 고용량 투여군 (3.80 ± 0.28 g, 4.29 ± 0.49 g)과 최고용량 투여군 (3.77 ± 0.17 g, 4.12 ± 0.61 g)에서 대조군 (3.13 ± 0.42 g, 3.17 ± 0.50 g)과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 암컷의 경우 10 주째에 중간용량 투여군 (3.20 ± 0.22 g)에서 대조군 (3.90 ± 0.24 g)과 비교하여 유의한 감소가, 12 주째에는 중간용량 투여군 (2.95 ± 0.14 g)과 고용량 투여군 (2.90 ± 0.20 g)에서 대조군 (3.68 ± 0.16 g)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

1. 5. 혈액학적 검사

수컷의 경우 leukocytes 항목 저용량 투여군에서, MCV 항목 최고용량 투여군에서 대조군과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었으며 ($p<0.05$) (Table 7), 암컷의 경우 leukocytes 항목 고용량 투여군에서, erythrocytes 항목 전 투여용량군에서, hemoglobin 항목 고용량 투여군과 최고용량 투여군, hematocrit 항목 전 투여용량군, platelets 항목 중간용량 투여군, 고용량 투여군, 최고용량 투여군에서 대조군과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었다 ($p<0.05$). Basophils 항목 중간용량 투여군에서는 대조군과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p<0.05$) (Table 8).

1. 6. 혈청 화학적 검사

수컷의 경우 고용량, 최고용량 투여군의 chlorine 항목, sodium 항목에서 대조군과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었고 ($p<0.05$) (Table 9), 암컷의 경우 중간용량, 고용량, 최고용량 투여군 total protein 항목, albumin 항목, potassium 항목, calcium 항목, sodium 항목에서 대조군과 비교하여 유의한 증가가, chlorine 항목에서는 고용량, 최고용량 투여군, phosphorus 항목에서는 중간용량, 고용량 투여군에서 유의한 증가가 관찰되었다 ($p<0.05$) (Table 10).

Table 7. Summary of hematological values of male SCID mice treated with hAdMSC intramuscularly in 13-week toxicity study. (^a, Significantly different from the control group; $p < 0.05$)

MALE GROUP SUMMARY OF HEMATOLOGY (PERIOD : 13 WEEKS)					
Dosage (cells/kg BW)	0 (Control; $n=10$)	2×10^5 ($n=10$)	2×10^6 ($n=10$)	2×10^7 ($n=10$)	2×10^8 ($n=10$)
Items	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	1.22 \pm 0.347	2.59 ^a \pm 0.999	1.44 \pm 0.440	1.52 \pm 0.392	1.13 \pm 0.568
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	8.3 \pm 0.58	8.6 \pm 1.00	8.6 \pm 0.62	8.8 \pm 0.41	7.6 \pm 2.69
Hemoglobin (g/dl)	13.2 \pm 0.87	13.6 \pm 1.43	13.8 \pm 0.86	14.1 \pm 0.49	12.4 \pm 4.41
Hematocrit (%)	33.5 \pm 4.15	34.3 \pm 4.20	36.1 \pm 2.51	36.7 \pm 1.43	32.7 \pm 11.61
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	739 \pm 153.6	784 \pm 144.3	894 \pm 97.7	817 \pm 93.9	661 \pm 256.6
MCV (fl)	40.4 \pm 2.97	39.7 \pm 0.91	42.1 \pm 1.41	41.9 \pm 0.74	42.8 ^a \pm 1.82
MCH (Pg)	16.0 \pm 0.38	15.7 \pm 0.37	16.1 \pm 0.44	16.1 \pm 0.39	16.3 \pm 0.91
MCHC (g/dl)	39.7 \pm 2.97	39.6 \pm 1.20	38.2 \pm 0.91	38.4 \pm 0.71	38.0 \pm 1.16
Neutrophils (%)	24.1 \pm 4.46	23.7 \pm 3.23	22.8 \pm 2.91	22.7 \pm 3.27	23.2 \pm 3.75
Eosinophils (%)	0.6 \pm 0.49	0.2 \pm 0.31	0.2 \pm 0.38	0.3 \pm 0.27	0.4 \pm 0.38
Basophils (%)	0.4 \pm 0.19	0.5 \pm 0.35	0.5 \pm 0.28	0.5 \pm 0.11	0.3 \pm 0.21
Lymphocytes (%)	53.1 \pm 2.97	52.9 \pm 4.80	56.1 \pm 4.72	56.8 \pm 4.98	55.7 \pm 6.22
Monocytes (%)	19.7 \pm 2.93	20.7 \pm 4.65	18.0 \pm 1.90	17.7 \pm 2.01	17.6 \pm 4.88
Reticulocytes (%)	1.18 \pm 0.197	1.13 \pm 0.271	1.23 \pm 0.327	1.17 \pm 0.334	1.41 \pm 0.410

Table 8. Summary of hematological values of female SCID mice treated with hAdMSC intramuscularly in 13-week toxicity study. (^a, Significantly different from the control group; $p<0.05$)

FEMALE GROUP SUMMARY OF HEMATOLOGY (PERIOD : 13 WEEKS)					
Dosage (cells/kg BW)	0 (Control; $n=10$)	2×10^5 ($n=9$)	2×10^6 ($n=10$)	2×10^7 ($n=10$)	2×10^8 ($n=9$)
Items	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	0.86 \pm 0.377	1.38 \pm 0.534	1.54 \pm 0.430	1.83 ^a \pm 0.703	1.46 \pm 0.917
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	7.9 \pm 0.47	8.6 ^a \pm 0.54	8.6 ^a \pm 0.22	8.7 ^a \pm 0.28	8.5 ^a \pm 0.63
Hemoglobin (g/dl)	12.6 \pm 0.83	13.3 \pm 1.05	13.3 \pm 0.32	13.8 ^a \pm 0.46	13.7 ^a \pm 0.60
Hematocrit (%)	31.7 \pm 2.56	34.3 ^a \pm 2.95	34.1 ^a \pm 1.39	34.5 ^a \pm 1.10	35.0 ^a \pm 1.66
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	657 \pm 192.4	835 \pm 251.2	882 ^a \pm 116.5	887 ^a \pm 90.9	858 ^a \pm 154.0
MCV (fl)	39.9 \pm 1.53	39.9 \pm 1.49	39.7 \pm 1.42	39.5 \pm 1.23	41.2 \pm 2.81
MCH (Pg)	15.8 \pm 0.34	15.5 \pm 0.47	15.5 \pm 0.33	15.8 \pm 0.41	16.1 \pm 0.71
MCHC (g/dl)	39.7 \pm 1.70	38.9 \pm 1.71	39.1 \pm 1.12	40.0 \pm 1.17	39.1 \pm 1.33
Neutrophils (%)	25.0 \pm 3.43	23.5 \pm 5.29	22.6 \pm 2.16	21.7 \pm 4.78	22.7 \pm 2.11
Eosinophils (%)	1.1 \pm 1.68	0.6 \pm 1.29	0.4 \pm 0.38	0.1 \pm 0.12	0.3 \pm 0.40
Basophils (%)	0.6 \pm 0.30	0.5 \pm 0.14	0.3 ^a \pm 0.19	0.4 \pm 0.15	0.5 \pm 0.10
Lymphocytes (%)	53.6 \pm 2.51	55.3 \pm 4.62	58.6 \pm 2.84	59.0 \pm 5.45	58.1 \pm 2.06
Monocytes (%)	17.0 \pm 1.29	17.9 \pm 2.37	16.2 \pm 1.52	16.7 \pm 0.97	15.5 \pm 2.47
Reticulocytes (%)	1.18 \pm 0.393	1.42 \pm 0.422	1.19 \pm 0.228	1.25 \pm 0.462	1.32 \pm 0.746 ($n=10$)

Table 9. Summary of serum biochemical values of male SCID mice treated with hAdMSC intramuscularly in 13-week toxicity study. (^a, Significantly different from the control group; $p < 0.05$)

MALE GROUP SUMMARY OF SERUM BIOCHEMISTRY (PERIOD : 13 WEEKS)					
Dosage (cells/kg BW)	0 (Control; $n = 10$)	2×10^5 ($n = 10$)	2×10^6 ($n = 10$)	2×10^7 ($n = 10$)	2×10^8 ($n = 10$)
Items	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.
Urea Nitrogen (mg/dL)	22.0 \pm 6.49	20.9 \pm 2.57	22.3 \pm 4.77	27.3 \pm 8.91	26.8 \pm 10.63
Cholesterol (mg/dL)	106 \pm 12.2	110 \pm 18.5	111 \pm 14.2	112 \pm 14.2	109 \pm 10.8
Total Protein (g/dL)	5.0 \pm 0.23	4.9 \pm 0.20	5.0 \pm 0.30	4.9 \pm 0.22	4.9 \pm 0.22
Albumin (g/dL)	1.7 \pm 0.06	1.7 \pm 0.07	1.7 \pm 0.10	1.6 \pm 0.10	1.6 \pm 0.10
Total Bilirubin (mg/dL)	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.04	0.1 \pm 0.05	0.1 \pm 0.09	0.1 \pm 0.05
Alkaline Phosphate (IU/L)	77 \pm 15.0	73 \pm 8.7	69 \pm 8.8	77 \pm 9.2	77 \pm 22.3
Aspartate Aminotransferase (IU/L)	92 \pm 85.2	66 \pm 12.7	71 \pm 16.2	84 \pm 54.1	87 \pm 54.3
Alanine Aminotransferase (IU/L)	36 \pm 33.2	27 \pm 5.6	31 \pm 12.9	38 \pm 15.5	39 \pm 23.0
Creatinine (mg/dL)	0.5 \pm 0.08	0.5 \pm 0.03	0.5 \pm 0.05	0.5 \pm 0.07	0.5 \pm 0.06
Triglycerides (mg/dL)	37 \pm 15.3	52 \pm 28.2	45 \pm 22.2	26 \pm 10.1	26 \pm 18.6
Glucose (mg/L)	120 \pm 24.9	140 \pm 16.3	130 \pm 43.1	127 \pm 24.2	132 \pm 40.2
A/G ratio	0.5 \pm 0.08	0.5 \pm 0.00	0.5 \pm 0.00	0.5 \pm 0.03	0.5 \pm 0.03
Potassium (mmol/L)	5.21 \pm 0.618	5.64 \pm 0.700	5.42 \pm 0.667	5.32 \pm 0.407	5.23 \pm 0.630
Chlorine (mmol/L)	113.2 \pm 3.66	115.6 \pm 2.07	114.8 \pm 3.13	119.2 ^a \pm 3.81	118.6 ^a \pm 4.14
Calcium (mg/dL)	8.8 \pm 0.23	9.0 \pm 0.24	9.0 \pm 0.36	8.9 \pm 0.30	9.0 \pm 0.29
Phosphorus(mg/dL)	6.3 \pm 0.61	6.4 \pm 1.26	6.6 \pm 1.82	7.3 \pm 1.02	7.7 \pm 1.12
Sodium(mmol/L)	151.6 \pm 1.70	152.2 \pm 1.37	153.7 \pm 3.24	156.2 ^a \pm 3.16	156.3 ^a \pm 3.17

Table 10. Summary of serum biochemical values of female SCID mice treated with hAdMSC intramuscularly in 13-week toxicity study. (^a, Significantly different from the control group; $p < 0.05$)

FEMALE GROUP SUMMARY OF SERUM BIOCHEMISTRY (PERIOD : 13 WEEKS)					
Dosage (cells/kg BW)	0 (Control; $n=10$)	2×10^5 ($n=10$)	2×10^6 ($n=10$)	2×10^7 ($n=10$)	2×10^8 ($n=10$)
Items	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.	MEAN \pm S.D.
Urea Nitrogen (mg/dL)	20.4 \pm 3.55	19.2 \pm 4.36	19.2 \pm 2.78	23.7 \pm 5.52	20.4 \pm 3.27
Cholesterol (mg/dL)	73 \pm 11.6	78 \pm 7.8	88 \pm 13.9	81 \pm 13.5	78 \pm 13.2
Total Protein (g/dL)	4.5 \pm 0.14	4.6 \pm 0.16	4.8 ^a \pm 0.18	4.9 ^a \pm 0.22	4.7 ^a \pm 0.12
Albumin (g/dL)	1.5 \pm 0.05	1.6 \pm 0.08	1.7 ^a \pm 0.07	1.7 ^a \pm 0.08	1.6 ^a \pm 0.05
Total Bilirubin (mg/dL)	0.0 \pm 0.03	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.03	0.0 \pm 0.00
Alkaline Phosphate (IU/L)	75 \pm 9.8	72 \pm 9.5	71 \pm 7.6	75 \pm 9.7	73 \pm 5.7
Aspartate Aminotransferase (IU/L)	57 \pm 7.3	64 \pm 12.9	66 \pm 19.0	72 \pm 19.9	62 \pm 11.8
Alanine Aminotransferase (IU/L)	23 \pm 4.1	29 \pm 11.3	27 \pm 7.8	25 \pm 6.3	25 \pm 6.3
Creatinine (mg/dL)	0.4 \pm 0.07	0.5 \pm 0.05	0.5 \pm 0.04	0.5 \pm 0.06	0.5 \pm 0.04
Triglycerides (mg/dL)	44 \pm 24.2	40 \pm 14.2	39 \pm 12.8	29 \pm 8.2	28 \pm 12.3
Glucose (mg/L)	163 \pm 22.4	168 \pm 18.6	168 \pm 23.8	165 \pm 32.2	160 \pm 33.3
A/G ratio	0.5 \pm 0.03	0.5 \pm 0.03	0.5 \pm 0.00	0.5 \pm 0.00	0.5 \pm 0.04
Potassium (mmol/L)	4.59 \pm 0.469	4.98 \pm 0.625	5.24 ^a \pm 0.588	5.51 ^a \pm 0.482	5.49 ^a \pm 0.697
Chlorine (mmol/L)	114.0 \pm 1.42	113.5 \pm 1.64	115.5 \pm 2.65	117.0 ^a \pm 2.62	117.0 ^a \pm 1.64
Calcium (mg/dL)	8.7 \pm 0.21	8.8 \pm 0.15	9.0 ^a \pm 0.13	9.1 ^a \pm 0.30	9.1 ^a \pm 0.35
Phosphorus(mg/dL)	6.0 \pm 0.43	6.1 \pm 0.70	7.4 ^a \pm 1.27	7.6 ^a \pm 1.24	6.8 \pm 1.09
Sodium(mmol/L)	149.0 \pm 1.29	149.4 \pm 1.33	151.4 ^a \pm 1.58	153.8 ^a \pm 2.77	153.6 ^a \pm 1.48

1. 7. 뇨검사 및 안검사

13 주째 뇨검사를 실시한 결과, 암, 수 전 동물에서 대조군에 비하여 특이한 뇨 변화는 관찰할 수 없었으며, 안검사에서도 시험물질에 의한 특이한 변화는 관찰할 수 없었다.

1. 8. 병리학적 검사

육안적 관찰 결과, 수컷의 경우 대조군에서 안구 혼탁 1례, 저용량 투여군에서 피하 조직에 충혈 1례, 경부 임과절 충혈 1례, 비장 비대 1례, 간 비대 및 흰색 반점 1례, 신장 창백 1례, 정낭선 충혈 1례, 부고환 충혈 1례, 폐장 충혈 1례, 흉선 비대 3례, 흉선 충혈 1례가 관찰되었으며, 고용량 투여군에서 고환 위축 1례, 흉선 비대 1례, 최고용량 투여군에서 안구 혼탁 1례, 혀 폴립 1례가 관찰되었다. 암컷의 경우 대조군에서 폐장 충혈 1례, 흉선 비대 1례, 저용량 투여군에서 안구 혼탁 1례, 중간용량 투여군에서 유선 피부 조직하에 mass 1례, 안구 혼탁 2례, 혀 폴립 1례, 최고용량 투여군에서 심장 부종 1례가 관찰되었다. 또한 암, 수 전 투여 용량군에서 심장에 분필을 칠해 놓은 듯 백색 무늬가 다수 관찰되었는데, 이는 SCID마우스에서 자연적으로 흔히 발생하는 병변으로 알려져 있다.

부검 후 장기에 대한 절대중량을 측정한 결과, 수컷의 경우에는 대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았으며, 암컷의 비장은 고용량 투여군 (0.0587 ± 0.0191 g)에서 대조군 (0.0407 ± 0.0093 g)과 비교하여 유의한 증가가, 간장은 고용량 투여군 (0.9091 ± 0.0935 g)과 최고용량 투여군 (0.8591 ± 0.0616 g)에서 대조군 (1.0473 ± 0.1218 g)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

상대중량을 관찰한 결과, 수컷의 경우 간장은 대조군 (5.0064 ± 0.5329 %)에 비해 고용량 투여군 (4.4840 ± 0.3025 %)과 최고용량 투여군 (4.5054 ± 0.3700 %)에서, 고환(좌, 우)은 대조군 (좌, 0.3420 ± 0.0183 %; 우, 0.3500 ± 0.0265 %)에 비해 중간용량 투여군 (좌, 0.2982 ± 0.0496 %; 우, 0.3090 ± 0.0510 %)과 고용량 투여군 (좌, 0.2957 ± 0.0279 %; 우, 0.3031 ± 0.0317 %)

에서, 뇌는 대조군 (1.9553 ± 0.1972 %)에 비해 중간용량 투여군 (1.6697 ± 0.0657 %), 고용량 투여군 (1.7154 ± 0.0728 %)과 최고용량 투여군 (1.7043 ± 0.1338 %)에서 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 암컷의 경우 비장은 대조군 (0.1994 ± 0.0399 %)에 비해 저용량 투여군 (0.2723 ± 0.0544 %)과 고용량 투여군 (0.3105 ± 0.1008 %)에서, 뇌는 대조군 (2.0001 ± 0.0984 %)에 비해 중간용량 투여군 (2.1760 ± 0.1786 %)에서 유의한 증가가 관찰되었으며, 간장은 최고용량 투여군 (4.5967 ± 0.2895 %)에서 대조군 (5.1405 ± 0.4322 %)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

병리조직학적 검사결과 대조군 및 최고 용량군의 암, 수 모두에서 다양한 병변이 관찰되었으나, 모두 시험물질 투여와 관련이 없는 SCID 마우스에서 배경 병변으로 발견되는 병변들이었다. 검경된 모든 동물에서 종양성 병변 및 비종양성 병변은 관찰되지 않았다.

2. 발암성 시험

사람 지방 중간엽 줄기세포 (hAdMSC)의 BALB/c-nu 누드마우스에서의 발암성 시험을 26주에 걸쳐 실시하여 얻은 결과는 다음과 같다.

2. 1. 사망률 및 일반 임상증상

시험기간 중 수컷의 저용량 투여군에서 1 마리가 투여 후 10 주째에 폐사하였으나 이는 시험물질의 영향이 아닌 것으로 판단되었으며, 암컷의 양성 대조군에서 사망한 2 마리는 종양 증식에 의한 것으로 사료된다. 또한 관찰된 임상증상으로 수컷의 다수 개체에서 등, 엉덩이, 생식기 주변부에 가피가 형성된 것을 관찰하였으나 이는 개체간의 공격으로 인한 것으로 사료된다. 그 외에 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상 등은 관찰되지 않았다.

2. 2. 체중 변화

체중변화에 있어서 수컷의 경우 전 기간 동안 음성 대조군과 비교하여 유의한 증감이 관찰되지 않았으며, 암컷의 경우 저용량 투여군에서 투여 후 49, 56, 77, 168, 182 일째에 음성 대조군과 비교하여 증가하는 경향을 보였으나 용량 의존성을 보이지 않았으며 간헐적인 변화로 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 사료되었다.

2. 3. 종양 발생율

시험물질 이식 후 26 주간, 주 2 회 종양의 발생유무를 관찰한 결과 양성 대조군을 제외한 전 개체에서는 종양 발생이 관찰되지 않았으며, 양성 대조군에서는 전 개체에서 종양이 유발되었으며, 종양의 과대 증식을 고려한 인도적 처치를 위해 투여 후 67 일째에 일괄 안락사 할 때까지 계속하여 증식하였다 (Fig 7, 8).

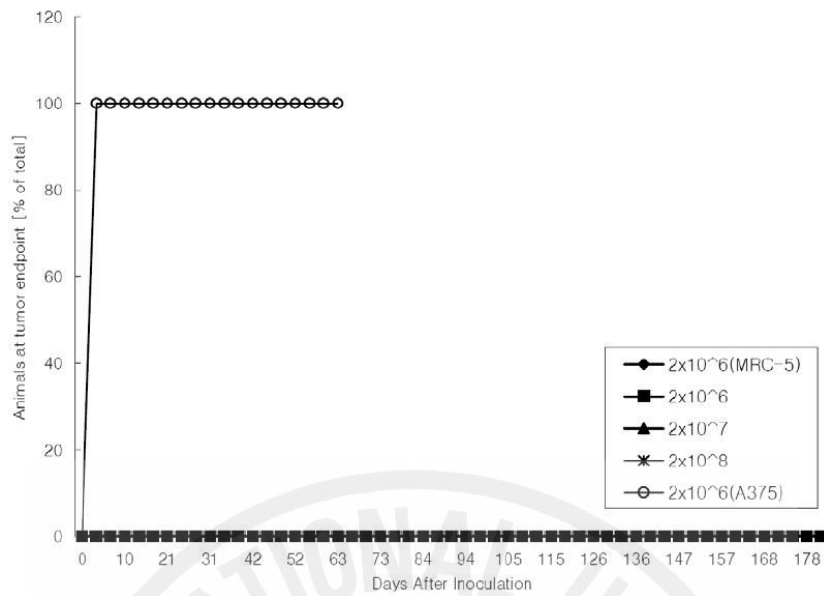


Fig 7. Tumor incidence rate of BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with hAdMSC in tumorigenicity study.

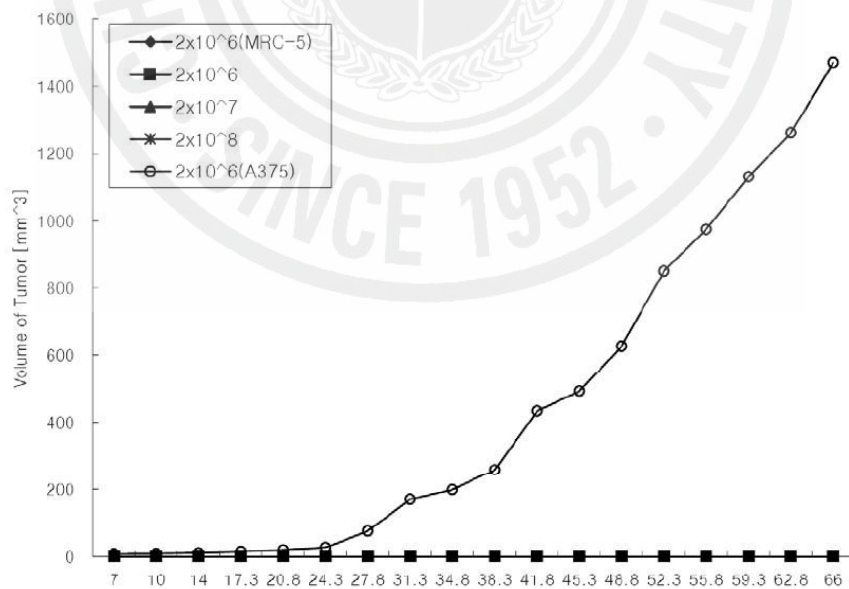


Fig 8. Tumor volume changes of BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with hAdMSC in tumorigenicity study.

2. 4. 장기 무게

부검 후 장기에 대한 절대중량을 측정한 결과, 수컷의 경우 중간용량 투여군 좌측 신장 (0.3579 ± 0.0626 g)에서 음성 대조군 (0.2915 ± 0.0389 g)과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었으며 ($p < 0.05$), 암컷의 경우 음성 대조군 (0.2098 ± 0.0241 g)에 비해 중간용량 투여군 좌측 신장 (0.2355 ± 0.0176 g)에서, 음성 대조군 (0.0042 ± 0.0012 g)에 비해 중간용량 투여군 좌측 부신 (0.0057 ± 0.0013 g)에서, 음성 대조군 (0.0038 ± 0.0011 g)에 비해 우측 부신 (0.0055 ± 0.0011 g)에서, 음성 대조군 (0.4599 ± 0.0160 g)에 비해 뇌 (0.5057 ± 0.0133 g)에서 유의한 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

상대중량 환산 결과, 수컷의 경우 저용량 투여군 폐장 (0.9031 ± 0.3518 %)에서 음성대조군 (1.4125 ± 0.4947 %)과 비교하여 유의한 감소가 관찰되었으며 ($p < 0.05$), 암컷의 경우 고용량 투여군 심장 (0.6191 ± 0.0644 %)에서 음성 대조군 (0.5453 ± 0.0519 %)과 비교하여 유의한 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$).

3. 분포 시험

사람 지방 중간엽 줄기세포 (hAdMSC)의 체내 분포 양상을 평가하기 위하여 SCID mouse를 이용한 분포시험을 실시하였다. 임상예정용량 및 13주 독성시험의 투여용량을 고려하여 저용량 투여군 및 고용량 투여군을 두었으며 동일 용량의 부형제 (saline) 만을 투여하는 용매 대조군을 두었다. CM-DiI 형광표지한 hAdMSC 투여 후 24 시간, 1 주, 4 주째에 부검하여 시간에 따른 분포 양상을 평가하였다.

3. 1. 사망률 및 일반 임상증상

시험기간 중 시험물질을 이식한 전 군에서 폐사는 관찰되지 않았다. 또한 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상 등은 관찰되지 않았다.

3. 2. 체중 변화

전 개체에서 시험기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 체중의 증감은 관찰되지 않았다.

3. 3. 체내 분포 양상 평가

시험물질 투여 개시 후 24시간, 1주, 4주째에 부검하여 형광현미경으로 관찰한 결과 저용량 투여군의 경우 이식부위에서 24시간째에서 형광이 관찰되었으나, 1주, 4주째에는 관찰되지 않았다. 고용량 투여군의 경우 이식부위에서 24시간, 1주, 4주째에 모두 형광이 관찰되었다. 이외의 장기에서는 시험물질의 분포를 관찰할 수 없었다 (Fig 9).

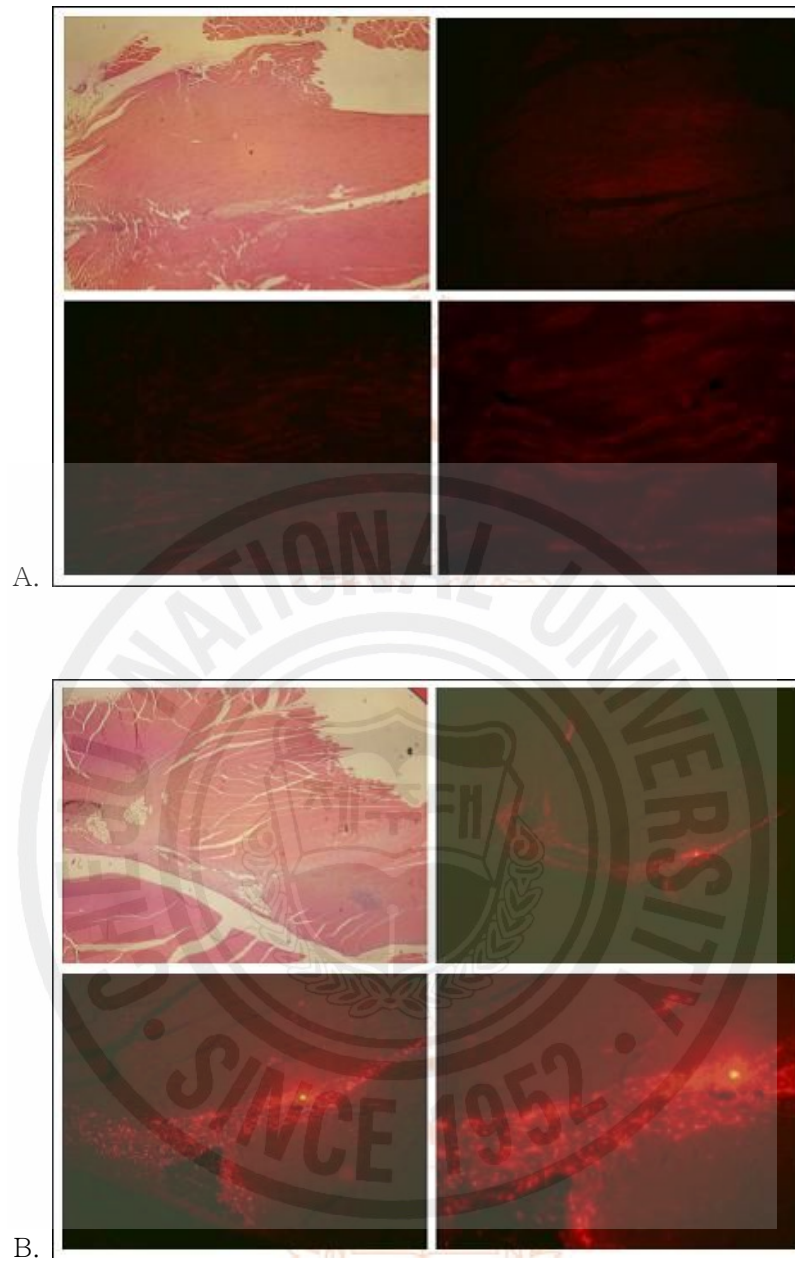


Fig 9. Pictures of CM-diI-labelled hAdMSC distribution at injection site (right hind limb muscle). A markedly higher level of fluorescence was observed in (B) high dosage group (post-injection 1 week), whereas not in (A) control group (post-injection 24 hours). (H&E x40, Fluorescence x40, x100, x200).

IV. 고 찰

독성 실험의 실험 동물을 선택함에 있어서, 본 시험에서는 시험물질의 1회 최대 생산량을 고려하여 마우스를 선택하였으며, 본 시험에 사용된 마우스(SCID)는 면역부전동물로서 시험물질이 사람유래 세포인 점을 감안하여 이종 간의 영향을 최소화한 상태에서 독성을 평가하기 위하여 선택하였다. 실험 결과 시험 기간 중 암컷 저용량군에서 1 마리가 사망하였으나, 이는 시험물질 투여와 관련이 없는 SCID 마우스 자연 병변인 것으로 판명되었다. 이외의 동물은 시험물질에 의한 사망이나 특징적인 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중변화에 있어서 시험의 후반부에서 수컷의 경우 증가 양상이, 암컷의 경우 감소 양상이 관찰되었으나 용량 의존성은 관찰되지 않았다. 사료, 음수 섭취량, 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사, 뇨검사, 안검사에서 일부 유의성 있는 변화가 관찰되었으나, 용량의존적으로 관찰되지 않았고 정상적인 범위에서 변화되어 시험물질에 의한 직접적인 변화로는 인정되지 않았다. 장기중량에서는 비장, 간장, 고환, 뇌 등에서 대조군에 비하여 유의한 증감을 보였으나 조직병리학적 검사에서는 이상 소견이 관찰되지 않았다. 부검 시 육안 병변은 일부 장기에서 경미한 병변들이 관찰되었으나, 시험물질투여와 관련이 없는 SCID 마우스 배경 병변들로서 독성학적으로 중요성이 인정되지 않는 병변들이었다. 또한, 병리조직학적 관찰에서도 시험물질 투여로 인한 병변은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여와 관련되지 않은 병변들이지만 SCID 마우스에서 자연발생적으로 발견되는 병변들이 다수 관찰 되었다. 이런 병변들은 본 시험에 사용된 마우스들이 SCID 마우스인 것을 입증하는 증거가 된다. 결론적으로 hATMSC의 SCID mouse에서 13주 독성시험 결과, 본 실험에서 사용된 사람 지방유래 중간엽 줄기세포의 무해용량 (NOEL)은 2×10^8 cells/kg BW 이상일 것으로 판단되었다.

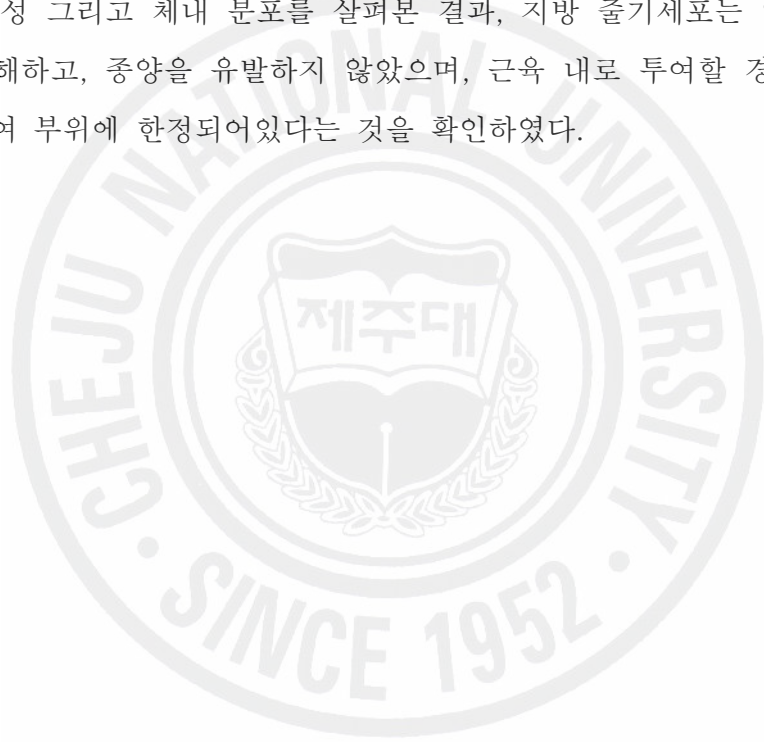
줄기세포의 임상적용을 위해서 암 발생 여부를 확인하는 것은 아주 중요한 실험이다. 배아줄기세포가 성체줄기세포보다 증식율이 좋고 무한정으로 배양할 수 있어 임상적용에 필요한 충분한 세포를 공급할 수 있다는 장점이 있는 반

면 체내 투여시 암 발생을 유발하는 단점이 있어 이러한 점은 배아줄기세포의 임상적용에 있어서 큰 장애가 되고 있다. 이와 달리 성체줄기세포는 암 발생을 유도하지 않는다는 보고도 있다 (Rao, 2007). 본 실험에서 분리 배양에 성공한 지방줄기세포가 암 발생을 일으키는 지에 대한 실험에서 수컷의 저용량 투여 군에서 1 마리가 투여 후 10 주째에 사망하였으나 이는 시험물질의 영향이 아닌 것으로 확인되었으며, 체중변화, 부검 후 장기에 대한 절대중량과 상대중량 모두 간헐적인 변화는 있었으나 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단되었다. 시험물질 이식 후 26주간 주 2회 종양발생의 유무를 확인한 결과 지방줄기세포를 투여한 전 시험군에서 종양발생이 관찰되지 않았으며, 양성 대조군으로 암세포를 투여한 암컷 양성 대조군(A375)에서 종양이 유발되었으며, 이중 사망한 2마리는 종양 증식에 의한 것으로 사료된다. 암이 발생한 양성 대조군의 경우 종양의 과다 증식을 고려한 인도적 처치를 위해 투여 후 67 일째에 일괄 안락사 하였고 안락사 이후 통계처리를 위한 자료에서 제외시켰다. 이 상에서 hATMSC의 BALB/c-nu 누드마우스를 이용한 발암성 시험에서 사람 지방유래 중간엽 줄기세포는 2×10^8 cells/kg BW 농도에서 종양을 유발하지 않았다.

줄기세포의 성공적 임상 치료를 위해서는 줄기세포를 국부적으로 적용하였을 때 체내에 투여된 줄기세포가 질환부위에 분포하여야 질환부위 주변 세포와의 상호작용 및 줄기세포의 자체 효과에 의해 질환을 치료할 수 있고 줄기세포의 국부 투여에 대한 안전성도 확보할 수 있다. 이에 반해 국부적으로 투여한 줄기세포가 질환부위에 있지 않고 다른 부위로 분포한다면 줄기세포 치료 효과는 반감된다. 기존의 연구결과에 따르면 비록 본 실험에서와 달리 전 장기에서 줄기세포의 분포를 확인하지 않았지만 Wang 등 (2006)은 골수유래 줄기세포를 정맥 내로 투여 하였을 경우에도 뼈에 분포한다는 것을 확인하여 줄기세포의 homing effect를 증명하여 줄기세포의 조직 특이적 분포에 대해 보고하였다. 본 실험 결과 시험물질 근육 내 투여 개시 후 24 시간, 1 주, 4 주째에 부검하여 CM-Dil tagging 분석법을 통해 체내 분포 양상을 비교한 결

과, 저용량 투여군의 경우 24 시간째에만 이식부위에서 형광이 관찰되었고, 고용량 투여군의 경우 24 시간, 1 주, 4 주째에 이식부위에서 형광이 관찰되었으나, 이식부위 이외의 장기에서는 형광이 관찰되지 않았다. 지방줄기세포의 국부적 투여시 체내 분포양상을 평가에서 사람 지방유래 중간엽 줄기세포는 이식부위 이외의 장기로는 대량으로 이동되지 않는 것을 확인하였으며, 국부적으로 적용시 줄기세포 치료 효과가 좋을 것으로 사료된다.

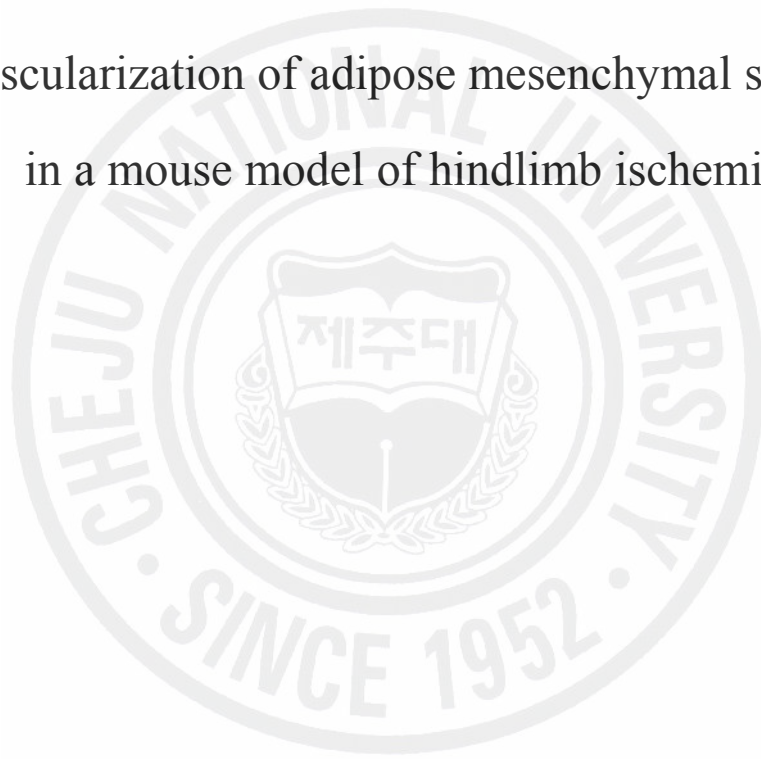
이상에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 임상적용을 위한 동물 모델에서의 독성, 발암성 그리고 체내 분포를 살펴본 결과, 지방 줄기세포는 임상 예정용량에서 무해하고, 종양을 유발하지 않았으며, 근육 내로 투여할 경우 세포의 이동이 투여 부위에 한정되어있다는 것을 확인하였다.



제 3 장.

하지허혈 동물모델에서의 지방유래 줄기세포 효능

Neovascularization of adipose mesenchymal stem cells
in a mouse model of hindlimb ischemia



I. 서론

말초 혈관 질환은 노령화 사회의 커다란 건강 위해 요소 중 하나이다 (Ouriel, 2001). 동맥 경화증과 같은 혈관 질환이 발생하면 체내는 보상적으로 우회 혈관을 만들어서 줄어든 혈류량을 보충하고자 시도한다. 하지만 주요 동맥이 경화되었을 경우 이러한 자발적인 방어 기전이 조직에서 필요로 하는 만큼의 혈류량을 복구시켜주지 못해서 말초 혈관 질환의 말기에 이르면 조직 내 저산소증이 심화되어 허혈성 궤양이나 괴저로 진행된다. 불행히도 이러한 환자의 1/3 이상이 손상부위를 절단해야 한다. 따라서 손상된 허혈성 기관에서 신속한 혈관 재형성이 이루어지도록 하는 것이 생리적 기능을 복원시키는데 중요하다. 여러 가지 단백질 및 유전자에 근거한 치료 전략으로 허혈성 질환의 동물 실험에서 우회 혈관을 증진시키는 연구가 이루어져왔지만 아직도 임상에서의 적용은 만족할만하지 못하다 (Grines, 2002; Simson, 2002).

허혈성 조직에 대한 체내의 반응은 매우 복잡하게 이루어져 있기 때문에, 어느 한가지의 성장 인자만을 주입하는 것으로 해결되지않는다. 따라서 우회 혈관을 형성시키는데 세포를 이용하는 방법이 큰 관심을 받고 있다 (Kalka 등, 2000; Grines 등, 2002). 한가지 예로, 절망적인 하지허혈 환자에게 골수에서 분리한 단핵세포(bone marrow derived mononuclear cells)를 이식한 결과 혈관이 생성되어 치료 효과를 확인한 보고가 있다 (Shintani 등, 2001; Higashi 등, 2004). 골수유래 줄기세포의 부착하며 성장하는 성질을 이용하여 배양으로 세포수를 늘릴 수 있다. 따라서 세포 치료에 필요한 충분한 골수 줄기세포를 배양을 통해서 확보하는 것이 가능하다. 그리고 골수 줄기세포는 *in vitro* Matrigel assay를 통해서 모세혈관 구조를 형성한다는 것이 확인되었다 (Al-Khalidi 등, 2003; Brzoska 등, 2005). 그러나 골수 이식을 수행하기 위해서는 마취 유도 후 많은 양의 골수를 채취해야 하고 일부 환자에게 심한 합병증을 나타내기도 한다.

지방조직 유래의 세포가 monobutyril, vascular endothelial growth factor (VEGF), leptin과 같은 혈관신생 인자를 분비한다는 것이 알려졌다 (Bouloumié 등, 1998; Dobson 등, 1990; Sierra-Honigmann 등, 1998), *in vitro*

에서 내피세포로 분화되어 하지허혈 동물 모델에서 혈류 흐름을 개선시켰다는 보고가 있다 (Cao 등, 2005).

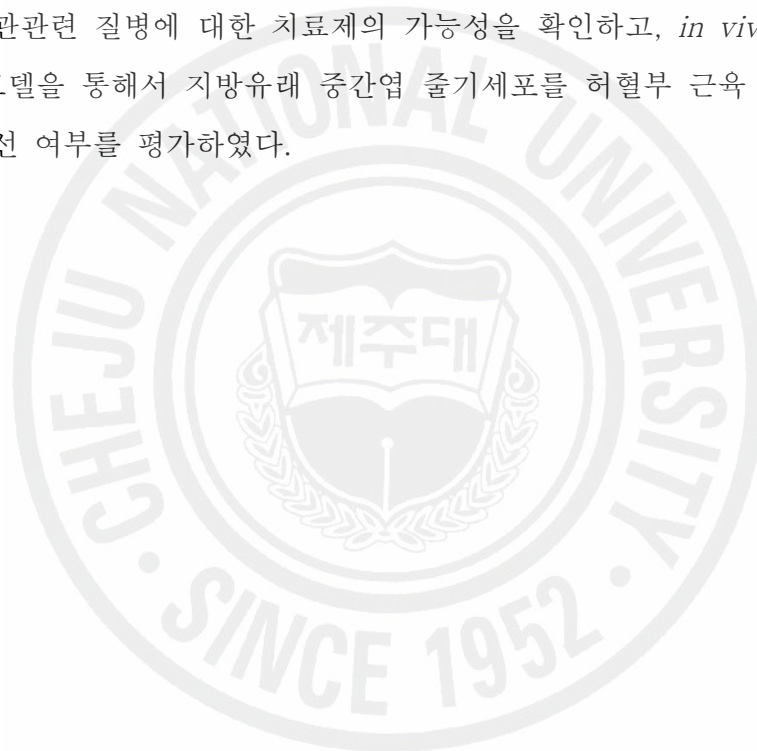
1908년 Buerger가 습관적 흡연자인 20~40대의 남자들에서 하지의 혈관이 폐쇄되어 자발성 괴사를 일으키는 혈관질환에 대해 기술하였다. 이 혈관질환은 병이 진행되면서 동맥과 동시에 부근 정맥까지도 염증을 일으켜서 동맥뿐만 아니라 정맥 폐쇄까지 가져오기 때문에 ‘폐색성 혈전 혈관염 (Thromboangiitis obliterans)’으로 명명되어 왔다 (Buerger, 1908). 버거씨병 질환의 병변은 대부분 슬관절 이하 하지의 소동맥 또는 중간 크기의 동맥에 분절성 염증이 동반되는 혈전성 폐쇄가 발생되는데, 이 질환의 특징인 염증성 변화는 하지 뿐 아니라 전신적인 혈관염을 야기하여 90 %는 상지까지 병변이 진행되고, 43 %의 환자에서는 외견상 정상인 표재 정맥의 혈전성 정맥염을 유발한다. 드물게는 장간막 혈관, 뇌혈관계, 심혈관계도 침범한다고 한다 (Buerger, 1908; Mills과 Porter, 1993).

버거씨병 환자에게 여러 내과적 치료방법들이 연구되어 왔으나 현재로선 효과적인 치료법이 없는 실정이다. 따라서 중등도 이상의 증상을 갖는 환자들은 경피적 혈관 성형술 (percutaneous transluminal angioplasty)이나 수술적 혈관 재건술로 자가혈관 또는 인조혈관을 이용하여 막힌 혈관을 우회 (bypass)하는 수술을 받아야 하지만, 이러한 치료를 시행함에 있어서 적합하지 못한 경우가 흔하다. 즉, 이미 bypass를 시술하였으나 폐색되어 재수술을 하지 못하는 경우, 혈관이 너무 작아 시술이 불가능한 경우, 원위부 run-off 혈관이나 혹은 근위부 inflow 혈관이 없는 경우, 다른 동반 질환으로 인하여 수술에 따른 전신 위험도가 높은 경우 등이다. 이와 같이 심한 허혈 증상을 가지고 있으나 경피적 혈관 성형술과 bypass로 치료를 못할 경우 병변이 진행되면 하지 병변 부위를 절단하여야 한다 (Fiessinger와 Schafer, 1990; Saha 등, 2001; Matsushita 등, 2003).

최근 약물적 치료가 어렵고 외과적 처치로도 예후가 좋지 않은 질환에 세포를 이용한 치료적 접근이 활발히 연구되고 있다. 백혈병 등과 같은 혈액질환 환자에 대해 골수 또는 제대혈을 이식하는 것은 이미 30여 년 전에 시작된 가장 보편화된 세포치료이다. 세포치료는 기존의 보존적 치료개념을 뛰어 넘는 새로운

개념의 재생의학으로 연구 역사가 매우 짧고 관련 지식의 축적 정도가 상대적으로 낮다. 또한 근골격계, 암, 심혈관계, 당뇨, 혈액질환, 신경질환 등 다양한 난치성 질환이 세포치료제 대상이 될 것으로 예상된다. 그러나 현재까지 줄기세포를 포함하는 세포치료제 개발은 개발초기 단계이며, 임상적으로 활용되기 위해서는 세포치료제의 안전성과 효능 평가가 반드시 선결되어야 한다.

본 연구는 앞서 분리 배양하고 안전성과 효능을 평가한 지방유래 중간엽 줄기세포를 이용한 허혈성 질환 치료 가능성을 확인하고자 실시하였다. 본 실험에서는 *in vitro*에서 지방유래줄기세포의 혈관형성 능력을 실험하여 지방유래줄기세포의 혈관관련 질병에 대한 치료제의 가능성을 확인하고, *in vivo*에서 하지 허혈 동물 모델을 통해서 지방유래 중간엽 줄기세포를 허혈부 근육 내로 투여하여 임상적 개선 여부를 평가하였다.



II. 재료 및 방법

1. 지방 유래 줄기세포의 *in vitro* 혈관내피세포 분화

1. 1. *In vitro* tube formation assay

배양된 지방줄기세포를 10 ml M199 (0.5 % FBS-low, phenol red) 배지로 4 시간 동안 starvation 하고, 18 시간 동안 5 dynes/cm² 강도로 물리적인 shear stress를 주었다. 18 시간 후 세포를 counting하여 matrigel이 coating 된 48-well plate에 KSFM 배지와 함께 10⁵ cells/ml의 세포를 분주하고 6 시간 뒤에 tube formation을 관찰하였다.

1. 2. 지방유래줄기세포의 paracrine effect

1) 내피세포 증식정도 분석 (Endothelial cell proliferation assay)

지방유래 줄기세포의 paracrine effect를 알아보기 위하여, 지방유래 줄기세포를 배양했던 배양액 (hAdMSC-CM)이 내피 세포를 증식시키는 정도를 확인하였다. 사람의 대동맥내피세포 (HAEC; human aortic endothelial cell)를 12-well plate에 각 well 당 10,000개씩 세포를 seeding하고 24 시간 동안 EBM-2 / 5 % FBS 배지로 교체하여 배양하였다. 다음날 50 % 신선한 EBM-2 / 5 % FBS 배지와 50 % hAdMSC-CM으로 교체하였다. 지방유래 줄기세포를 배양했던 배양액 처리 후 3 일 뒤 hemocytometer로 세포수를 측정하였다.

2) 내피세포 자멸사 분석(Endothelial cell apoptosis assay)

사람의 대동맥내피세포를 12-well plate에 3일간 배양하고 24 시간 동안 3 µg/ml cycloheximide와 10 ng/ml TNF-α를 포함한 EBM-2 (대조배지)나 hAdMSC-CM을 첨가하여 배양하였다. 24 시간 배양 후 endothelial cell을 4 % 파라포름알데히드에 고정하고 terminal dUTP nick-end labeling (TUNEL) 하였다. 무작위로 선별된 현미경 시야 10 곳에서 TUNEL 양성세포의 전체 세포에 대한 비율을 산정하였다.

2. 동물 모델을 통한 지방유래 줄기세포의 혈관 신생능력 평가

2. 1. 허혈성 하지 모델 정립

6 주령의 수컷 BALB/c-nu 누드마우스 (Harlan)를 대상으로, 100 mg/kg, ketamine (케타라, 유한양행, 대한민국)과 10 mg/kg, rompun (럼푼, 바이엘코리아, 대한민국) 복강내 주사로 전신마취 상태에서 우측 서혜부 및 대퇴부 피부 절개 후 우측 대퇴 동맥과 정맥을 결찰하고 서혜부에서 무릎까지 혈관을 완전 제거하여, 하지 허혈 모델을 만들었다 (Kim 등, 2006).

2. 2. 사람 지방 줄기세포의 준비

시험물질 hAdMSC은 앞서의 지방유래 줄기세포 분리 및 배양 방법과 같이 준비하였다. 사람 지방유래 중간엽 줄기세포를 3 계대까지 배양한 후 saline 부형제에 담아 실험에 사용하였다.

2. 3. 시험군의 분류

시험물질 hAdMSC의 신생혈관 조성 촉진 능력을 확인하기 위하여 투여 용량에 따라 저용량 투여군 (1×10^6 cells/kg BW), 저용량의 10배 용량인 고용량 투여군 (1×10^7 cells/kg BW), 저용량 투여군과 고용량 투여군의 사이에 중간용량 투여군 (5×10^6 cells/kg BW)으로 하였다. 그리고 동일 용량의 saline 만을 투여한 용매 대조군으로 나누어 4 개군 각 군 당 수컷 BALB/c-nu 누드마우스 12 마리씩 배치하였다.

2. 4. 시험물질의 이식

하지 허혈 모델 제작 수술 후 24 시간 뒤에 준비된 시험물질 (hAdMSC)을 하지 허혈 모델의 수술을 받은 대퇴 근육 부위에 3회에 걸쳐 주사하였다. 또한 용매 대조군에도 마찬가지로 saline을 허혈성 근육의 서로 다른 위치에 3회 주입하였다.

2. 5. 평가방법

1) 육안적 평가

시험 물질을 주입하고 4주 후에 시험물질 투여군과 용매 대조군의 수술 받은 다리의 상태를 1) Total amputation, 2) Partial amputation (Above/Knee, Partial foot), 3) Toe necrosis, 4) Grossly normal 네 가지로 분류하였다 (Fig 10). 육안적 관찰로 분류되는 네 가지 다리 상태를 보이는 대표적인 실험 동물의 하지 사진과 각 대표 실험 동물의 혈류 상태 및 조직 내 혈관 분포를 함께 표시하였다 (Fig 10).

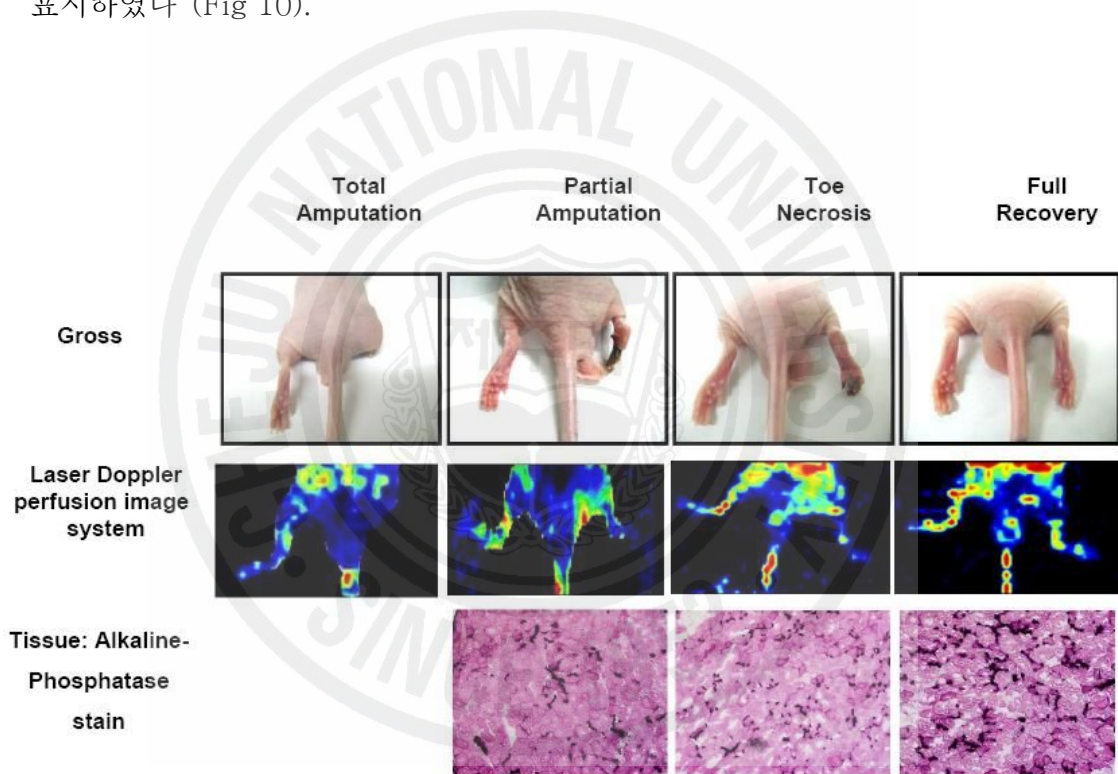


Fig 10. Evaluation of neovascularization in a BALB/c-nu mouse model of hindlimb ischemia. Laser-Doppler analysis of perfusion in the ischemic hindlimbs. Gross finding divided into 4 stage of severity of hindlimb ischemia. Representative color-coded images representing blood flow distribution are presented, and the maximal perfusion is displayed red. Alkaline-phosphatase stain revealed capillary density. Grossly full recovery rate, blood flow and capillary density were all improved in hAdMSC transplantation groups compared to the control saline group in a dose-dependent manner.

2) 혈류 상태 분석

Laser Doppler perfusion imager system (Perimed, AB, Stockholm, Sweden)을 이용하여 세포 이식 4 주 후 생체의 허혈성 조직에서 혈류 상태를 분석하였다. 허혈을 유발한 부위의 혈류는 그 반대편의 손상 받지 않은 부위의 혈류를 함께 측정하여 이에 대한 상대적인 백분율로 표시하였다 (Fig 10).

3) 조직 검사

하지 허혈 수술 및 세포 이식 4주 후 실험동물을 안락사시켜서 허혈 하지의 근육을 분리, 채취한 뒤 cryoembedding된 조직을 8 μ m로 준비 후 alkaline phosphatase 염색 검사를 시행하여서 근육 조직 내 모세혈관 분포를 분석하였다 (Fig 10).

3. 통계처리 및 결과의 판정

본 시험에서 얻은 측정치들은 SPSS (SPSS 12.0K)을 이용하여 두 군간의 비교는 Student's *t-test*를, 그리고 세 군 이상에서는 ANOVA 분석을 실시한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 군간 유의성을 검정하였고, 유의성이 인정될 경우 Dunnett *t-test* 및 Tukey-Kramer test를 실행하여 대조군과 각 용량군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다 ($p<0.05$).

III. 결 과

1. 혈관내피세포 분화

지방유래 중간엽 줄기세포는 *in vitro* tube formation 분석법을 통해 hAdMSC가 matrigel coated multi-well plate에 깔았을 때 혈관내피세포로 분화 유도되었다 (Fig 11).

면역 형광염색을 통해 혈관 생성과 관계되는 vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2, KDR) 및 von Willebrand factor (vWF) 등 혈관내피세포의 특이적인 세포표면표지 (endothelial specific cell surface marker)가 관찰 되었으며 (Fig 12), 혈관내피세포 분화 양상을 확인하기 위해 shear stress와 growth factor를 처리한 경우에 있어서, ulex europaeus agglutinin 1 (UEA-1) 및 acetylated low density lipoprotein (Ac-LDL)의 세포 내 흡수를 관찰할 수 있어 endothelial cell과 유사함을 확인하였다 (Fig 13).

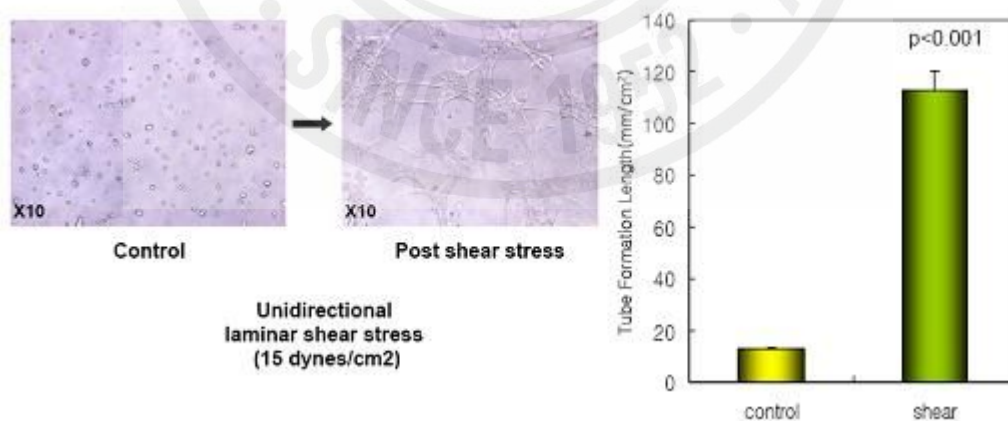


Fig 11. Physiologic shear stress enhanced endothelial cell-like tube formation in matrigel assay. ($p<0.001$ compared with control)

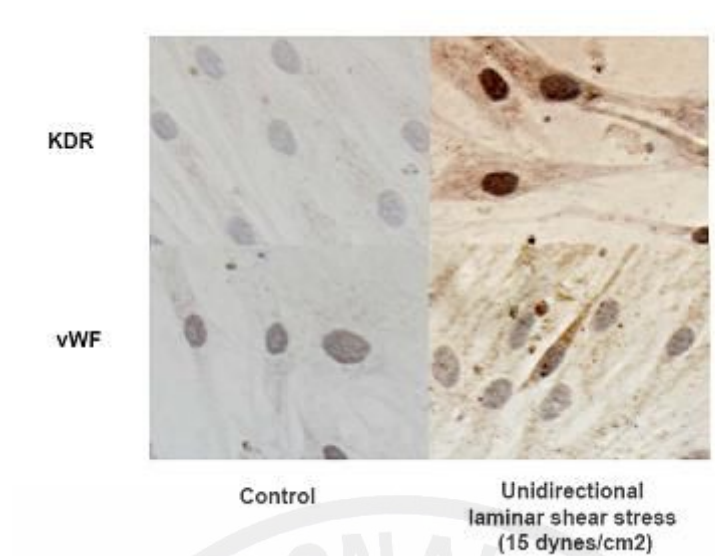


Fig 12. Immunocytochemical stain of endothelial-specific cell surface markers (Dark brown colored as positive stain).

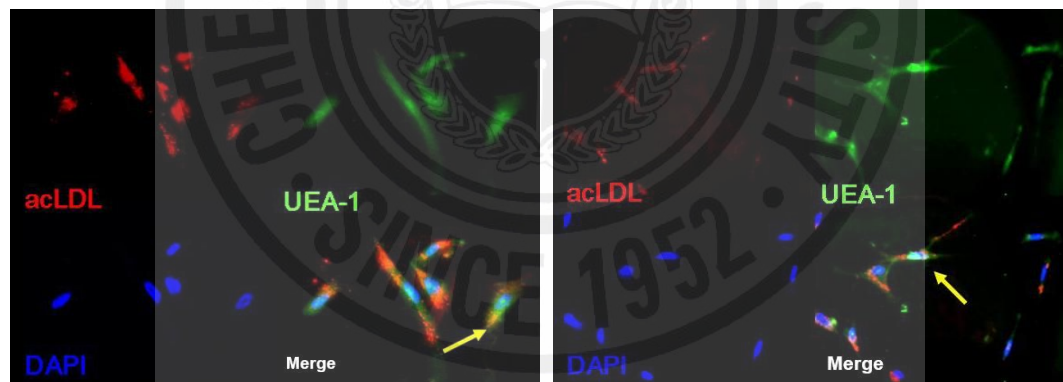


Fig 13. UEA-1 and Dil-acLDL stain as endothelial-like cell phenotype after shear stress (*Left*) and growth factor (10 ng VEGF, 1 μ g hydrocortisone, 3 μ g bovine brain extract and 5% FBS) treatment (*Right*). Cells that were positive for Dil-acLDL and FITC-UEA lectin were considered as endothelial-like cells (*Yellow arrow*).

Shear stress를 가한 후 또는 growth factor를 첨가한 후 분자생물학적 수준에서 endothelial specific cell surface marker를 RT-PCR로 확인한 결과 내피세포 특징적인 vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin) 및 VEGF receptors 1 (Flt-1) 등의 mRNA가 증폭되어 지방유래 줄기세포에서 내피세포 특이적 표면항원을 발현되었다 (Fig 14).

Matrigel assay, immunocytochemistry, RT-PCR 분석을 통해, 지방유래 줄기세포는 물리적으로 shear stress를 가하거나 또는 특정한 growth factor의 신호를 전달에 의해 혈관을 생성할 수 있음을 확인하였다.

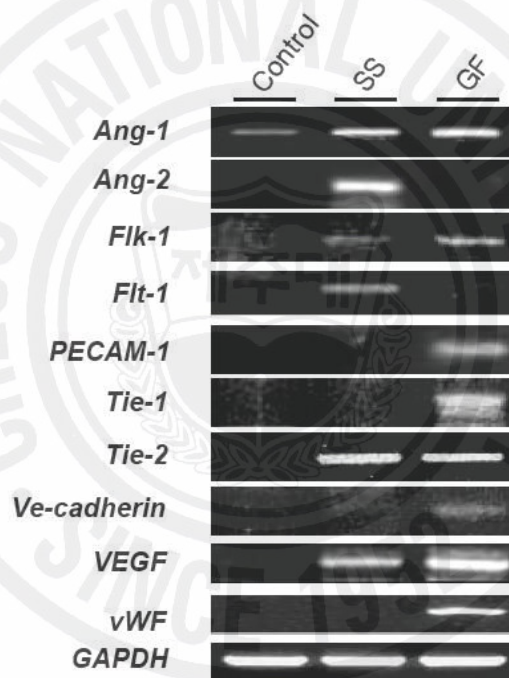


Fig 14. RT-PCR analysis demonstrated the expression of endothelial-specific cell surface markers after shear stress (SS) or combination of growth factors treatment (GF). (Abbreviations: Ang-1,-2, angiopoietin-1, -2; Flk-1, fetal liver kinase-1; Flt-1, fms-like tyrosine kinase-1; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1, Tie-1, tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor-like extracellular domains; Tie-2, tyrosine kinase with epidermal growth factor homology; Ve-cadherin, vascular endothelial cadherin; VEGF, vascular endothelial growth factor; vWF, von Willebrand factor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

2. 지방유래 줄기세포의 paracrine effect

지방유래 줄기세포의 paracrine effect를 알아보기 위하여, 지방줄기세포를 배양했던 배양액 (hAdMSC-CM)이 내피 세포를 증식시키는 정도를 확인하였다. hAdMSC-CM는 사람의 대동맥 내피세포 증식을 증가시켰고, 세포 자멸사 (apoptosis)를 억제함을 확인하였다 (Fig 15).

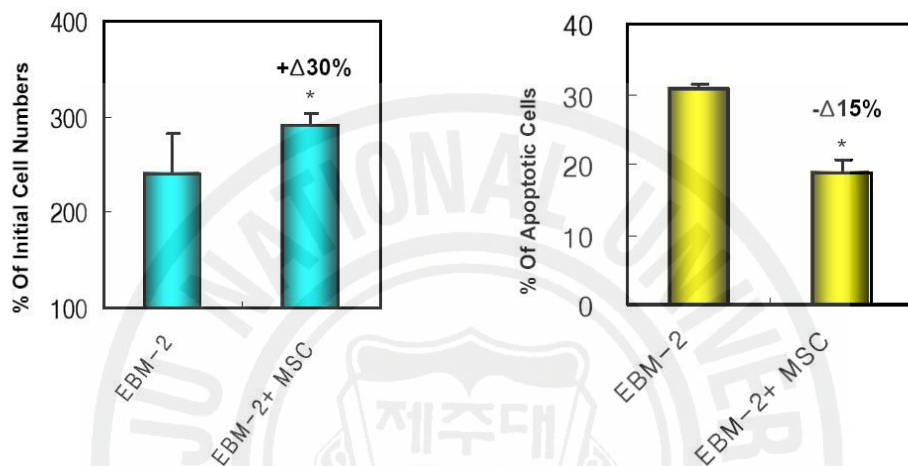


Fig 15. Effect of culture medium from hAdMSC (hAdMSC-CM) on human aortic endothelial cells (HAEC) proliferation (*Left*) and HAEC apoptosis (*Right*). Cell proliferation was determined by direct counting of cell number 3 days after plating. Apoptosis was analyzed by TUNEL assay. Data are shown as mean \pm SEM ($n=3$) (*, $p<0.05$ compared with control).

3. 동물 모델을 통한 지방유래 줄기세포의 혈관 신생능력 평가

하지 허혈 수술 4 주 후 육안 관찰 결과, 생리식염수를 투여한 대조군 ($n=12$)에서는 완전한 사지탈락이 9 마리, 부분적 탈락이 3 마리로 나타났고 회복된 개체는 관찰할 수 없었으며, 저용량 투여군 ($n=12$)에서는 완전 사지탈락 2 마리, 부분적 탈락 2 마리 (무릎 위 1 마리, 무릎 아래 1 마리), 발가락 괴사 1 마리, 그리고 회복된 개체 수가 총 12 마리 중 7 마리로 58.3 %의 회복률을 나

타냈다. 중간용량 투여군 ($n=12$)에서는 완전 사지탈락을 보이는 개체는 없었으며, 부분적 탈락 4 마리 (무릎 위 2 마리, 무릎 아래 2 마리), 발가락 괴사 2 마리, 그리고 회복된 개체 수가 총 12 마리 중 6 마리로 50.0 %의 회복률을 나타냈다. 고용량 투여군 ($n=12$)에서는 역시 전체 사지탈락은 발생하지 않았고 무릎 아래 부분적 탈락을 보인 개체가 1 마리, 발가락 괴사 1 마리 그리고 회복된 개체는 9 마리로 75.0 % 회복률로 나타났다 (Table 11).

Table 11. Physical evidence of ischemic tissue damage grossly evaluated at 4 weeks after surgery. The hAdMSC transplantation group showed the decreasing the rate of hindlimb amputation

Dosage (cells/kg BW)	Total amputation	Partial amputation		Toe necrosis	Full Recovery
		Above/Knee	Partial foot		
0 (control)	9	3	-	-	-
1×10^6	2	1	1	1	7
5×10^6	-	2	2	2	6
1×10^7	-	-	1	2	9

레이저 도플러를 이용하여 하지 허혈 수술 4주 후 슬부의 혈행을 관찰한 결과, 지방줄기세포 없이 saline만 투여한 대조군에서의 상대적 혈류 비율은 64.8 % 인데 반해 저용량 투여군에서는 69.6 %, 중간용량 투여군에서는 71.2 %, 그리고 고용량 투여군에서는 79.6 %를 나타내었다 (Fig 16).

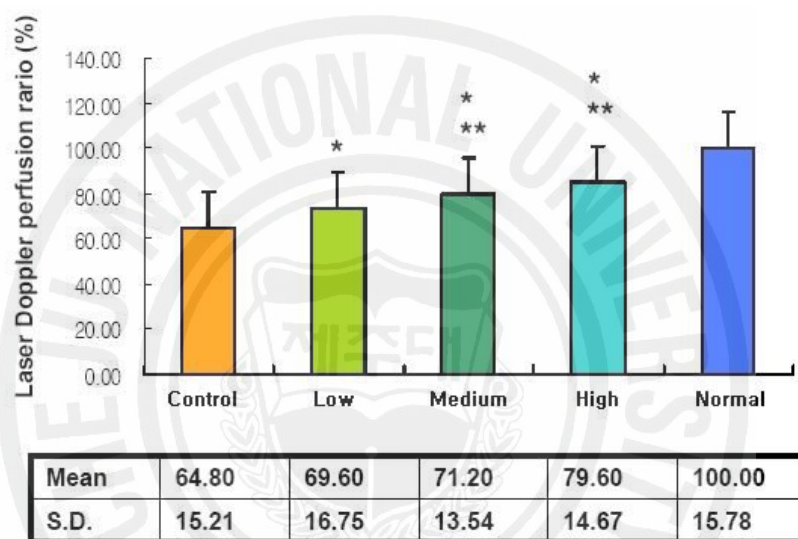


Fig 16. Quantitative analysis with laser doppler in ischemic hindlimb BALB/c-nu mouse model was performed on postoperative day 28. Human adipose-deriver mesenchymal stem cells improved blood flow in a dose-dependant manner. The blood flow was expressed as the ratio to that of the uninjured limb (* $p < 0.05$ compared with control saline group, ** $p < 0.05$ compared with low-dose group).

허혈 조직 내의 모세혈관 생성을 확인하기 위하여 alkaline phosphatase 염색 검사를 시행한 결과, 지방줄기세포 없이 saline만 투여한 대조군의 조직 내 모세혈관 밀도는 $525.57/\text{mm}^3$ 인데 반해, 저용량 투여군에서는 $862.92/\text{mm}^3$, 중간용량 투여군에서는 $1240.00/\text{mm}^3$, 그리고 고용량 투여군에서는 $1565.17/\text{mm}^3$ 을 나타내었고 수술을 실시하지 않은 음성 대조군에서는 $2097.08/\text{mm}^3$ 이었다 (Fig 17).

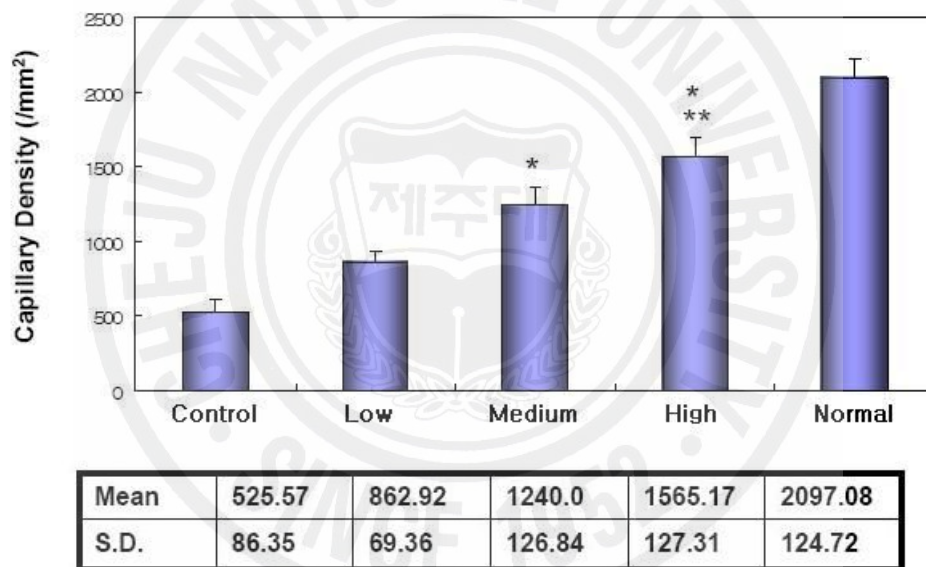


Fig 17. Evaluation of capillary density with alkaline phosphatase staining. The capillaries in 10 different fields were counted. Human adipose-derived mesenchymal stem cells increased capillary density in a dose-dependant manner (* $p < 0.05$ compared with control saline group, ** $p < 0.05$ compared with low-dose group).

IV. 고 찰

혈관 신생에 탁월한 효능을 발휘하는 지방 중간엽 줄기세포의 특성, 지방줄기세포의 안전성, 체내의 다른 기관 및 장기에 불필요하게 분포하지 않는다는 체내 분포시험 결과 등에서 얻어진 결과를 토대로 사람 지방유래 중간엽 줄기세포의 혈관 신생 치료제로서 사람에게 대한 임상 시도를 충분히 도전해 볼 가치가 있다고 여겨지는 바이다. 이러한 대상 질환 중 하나인 버거씨(Buerger)병은 20~40 대에 발병하는 원인 불명의 사지 말단의 혈관 질환이다 (Buerger, 1908; Mills과 Porter, 1993; Kim 등, 2006). 줄기세포의 경우 일반적으로 사람에서 분리하는 시기가 젊을수록 그 분화 및 재생 능력이 뛰어나다고 알려져 있기에, 자가 지방 줄기세포의 혈관 치료제의 대상 질환으로 매우 적절한 것으로 판단된다.

버거씨병은 흡연, 혈관염 발생, 낮은 사회계층, 한냉한 기후 노출 경험, 반복적인 진균 감염, 응혈능 향진 상태, 유전적 소인과 자가면역성 질환까지 다양한 각도에서 원인 규명을 위한 노력이 이루어지고 있으나, 정확한 병인은 아직까지 밝혀지지 않았고, 확실한 치료방법 또한 부재하여 많은 환자들이 고통에서 벗어나지 못하고 있다 (Fiessinger와 Schafer, 1990; Matsushita 등, 2003; Saha 등, 2001). 여러 이유로 인해 심한 버거씨병 증상에 대한 외과적 접근이 불가능한 경우도 많고, 또한 발병 후 10년에 약 20%의 환자가 사지의 일부를 절단하게 되는 의료적 현실에서, 이미 줄기세포의 혈관 신생 능력에 대한 연구보고가 나오기 시작하고 (Kim 등, 2006; Miranville 등, 2004; Nakagami 등, 2005; Rehman 등, 2004), 또한 본 실험의 *in vitro*, *in vivo* 연구를 통해서도 신생 혈관 조성 결과가 밝혀진 바와 같이 지방 줄기세포는 새로운 치료 대안이라 생각된다.

본 실험 결과 사람 지방 조직으로부터 분리, 배양한 중간엽 줄기세포의 혈관 내피세포 특성에서 shear stress에 의한 matrigel 상에서 맥관 구조를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 혈관내피세포의 특이적인 세포 표면 표지자인 KDR 및 vWF가 면역 형광염색을 통해서 관찰 되었으며 UEA-1 및 Ac-LDL의

세포 내 흡수를 관찰되었다. 그리고 분자생물학적 수준에서 내피세포 특징적인 VE-Cadherin 및 Flt-1 등이 세포 내의 mRNA 형태로 발현되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 연구결과는 지방유래 줄기세포가 혈관내피세포로의 분화 및 혈관 생성 능력이 있다는 결과 (Miranville 등, 2004; Cao 등, 2005; Nakagami 등, 2005)와 일치하고 있다.

특히, 지방 줄기세포 없이 그 배양액만을 이용하여 심장혈관내피세포에 대한 세포 증식 및 사멸 효과를 관찰한 실험 결과, 배양액 만으로도 심장혈관내피세포 증식이 유의적으로 증가하였고, 세포 사멸이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 hAdMSC가 혈관으로 분화하는 능력과 더불어 hAdMSC가 분비하는 물질이 분화된 혈관의 증식 등을 상승시키는 paracrine 역할을 함으로써 지방줄기세포가 혈관을 신생하는데 탁월한 능력을 보일 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 연구 결과는, 지방 줄기세포가 vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF) 그리고 transforming growth factor- β (TGF- β)를 분비하며 지방줄기세포가 현저하게 내피세포의 성장을 증가시키고 내피세포의 apoptosis를 감소시킨다(Rehman 등, 2004; Nakagami 등, 2005)는 결과와 일치한다.

지방유래줄기세포의 체내 혈관 신생 능력 및 혈관유래 질환 치료 효과를 알아보기 위해서 대퇴 동맥 및 복제 동맥을 결찰하고 혈관을 모두 제거하는 하지 허혈 모델을 제작하였다 (Kim 등, 2006). 동물 유효성 모델에 이식할 세포가 사람유래 세포인 점을 감안하여 실험 동물을 선택함에 있어서 이종 간의 영향을 최소화하기 위해 면역결핍 BALB/c-nu 누드마우스를 하지 허혈 모델 동물로 선택하였다 (Kim 등, 2006). 시험 물질을 이식하고 실험 동물의 행동 및 허혈 부위의 상태를 관찰한 결과, 혈관을 결찰한 직후부터 모든 개체는 수술측 다리를 전혀 쓰지 못하고 끌고 다니다가 시간이 경과할수록 점차 증상이 완화되어 회복되는 개체가 있는 반면, 술부가 괴사되어 끝내 탈락되는 개체도 존재하였다. 따라서 이러한 결과를 4주 경과 시점에 손상 정도를 네 가지 범주로 분류하여 조사하여 군 간의 차이를 확인하였다. hAdMSC 고용량 투여군에서는 12마리 실험

대상 중 무릎 이하의 탈락 1례를 제외하고는 하지가 절단된 개체를 찾을 수 없었다. 이러한 결과에서 지방 줄기세포를 투여하면 다리를 절단해야만 했던 심각한 상황에서 벗어날 수 있는 가능성을 보여주는 결과이다. 또한 육안적으로 보기에 완전히 회복된 경우를 군 별로 분석해 보면, 생리식염수를 투여한 대조군은 회복된 개체가 전혀 없었던 것에 반해, 지방 줄기세포 저용량 투여군에서는 12마리 중 7마리 (58.3%), 중간용량 투여군에서는 12마리 중 6마리 (50.0%), 그리고 고용량 투여군에서는 12마리 중 9마리 (75.0%)가 정상으로 돌아와 지방 줄기세포의 치료 효과가 매우 높음을 확인할 수 있었다. 본 실험과 유사하게 제대혈유래 중간엽 줄기세포를 이용한 실험에서 Kim 등(2006)은 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 하지 허혈 모델 동물에서 이식한 결과 괴사성 피부 질환이 치료가 되었으며 60%의 실험동물에서 사지 절단이 회복되었음을 보고하고 있다.

또한 육안적 회복의 원인이 어디에 기인하는지 확인하기 위하여 레이저 도플러를 이용해 수술적으로 혈관을 제거한 부위의 혈류 흐름을 조사한 결과, 지방 줄기세포를 투여한 군의 혈류량이 용매 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 특히 혈류량의 증가 정도가 지방 줄기세포 투여 용량과 비례하여 증가하게 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 지방 줄기세포가 혈관 신생을 촉진하여 결찰부 혈류량을 증가시켰다는 것을 의미한다. 이와 같은 사실은 모든 개체의 결찰부위의 근육 조직을 수집하여 조직 내 모세혈관의 수를 조사한 실험 결과로서도 입증되었다. 혈관 결찰 부위의 근육 조직을 alkaline phosphatase로 염색하여 모세혈관을 관찰한 결과 용매 대조군에 비해 중간용량 이상의 지방 줄기세포 투여군에서 그 수가 유의적으로 증가하였고, 혈류량의 조사 결과와 마찬가지로 모세혈관의 수가 투여 용량과 비례하여 증가하는 것을 확인하였다. 본 실험은 제대혈유래 중간엽 줄기세포(Kim 등, 2006)가, 지방유래 중간엽 줄기세포(Miranville 등, 2004; Nakagami 등, 2005; Reman 등, 2004)가 하지 허혈성 모델 동물에서 혈관신생을 촉진시켜 질환의 증상을 개선하였다고 보고와 일치하는 결과를 나타내었다.

이상의 결과에서 지방유래 중간엽 줄기세포 특성 확인과 더불어 지방 줄기

세포의 안전성, 발암성, 체내 분포 및 신생혈관 조성에 대한 유효성을 확인하였으며, 하지허혈 동물모델에서 치료효과를 확인하였다. 이에 지방유래 중간엽 줄기세포가 임상 적용 분야에 매우 활용성이 높을 것이라는 과학적 근거 자료를 제공하였으며, 향후 지방줄기세포를 이용한 세포치료제가 재생의학 연구 분야의 밑거름이 되리라 사료된다.



총 결 론

사람 지방 조직으로부터 분리, 배양한 사람 지방조직 중간엽 줄기세포 (hAdMSC)는 계대 배양을 반복하여도 본래 지니고 있는 방추상의 세포 성상이나 배양 접시에 부착되어 자라는 성질 및 배양 속도 등의 특성이 변하지 않았고, 12 계대에 이르기까지 염색체 이상이 발견되지 않았으며 중간엽 줄기세포 표지자로 알려진 CD73, CD90 세포표면항원도 변함없이 발현하였다.

특정한 신호를 주어 다양한 세포로의 분화를 유도한 결과 지방세포, 골세포, 신경세포 및 근육세포로 분화하는 것을 확인할 수 있었고, colony forming assay를 통해 줄기세포 특징 중 하나인 sphere 형성도 관찰할 수 있었다.

사람 지방조직 중간엽 줄기세포를 SCID 마우스에 근육 내로 단회 투여하여 13주 관찰한 독성시험 결과에서 이상 소견이 관찰되지 않았다.

BALB/c-nu 누드마우스에 hAdMSC를 피하 접종하여 26주 관찰한 발암성 시험 결과에서, 양성대조 A375세포를 접종한 모든 개체에서 종양이 발생한 반면 hAdMSC를 접종한 모든 개체는 종양이 발생하지 않았다.

SCID 마우스에 hAdMSC를 대퇴 근육내로 투여하여 24시간, 1주 및 4주에 CM-DiI로 형광 표지한 hAdMSC의 체내 분포 상태를 조직 검사를 통해 확인한 결과에서 이식부위 근육 조직 이외의 다른 장기에서는 hAdMSC를 찾을 수 없었다.

사람 지방조직 중간엽 줄기세포의 in vitro 혈관 생성능력을 확인할 결과 줄기세포에 물리적 shear stress를 가하거나 특정 성장인자를 첨가한 matrigel assay에서 tube formation를 관찰하였고, 혈관생성과 관련된 KDR, vWF, UEA-1 및 acLDL 세포표면항원 발현과 내피세포 특징적인 Flt-1, V-cadherin 등의 유전자 발현을 확인하였다.

BALB/c-nu 누드마우스 하지허혈 모델에 hAdMSC를 대퇴 근육내 이식한 결

과, hAdMSC 투여군의 허혈부위 혈류량 및 모세혈관 수가 hAdMSC 투여 용량에 비례하여 증가하였으며, 하지 탈락률을 현저히 감소시켰고 완전 복구률을 높은 수준으로 증가시켰다.

결론적으로 사람 지방유래 중간엽 줄기세포의 특성 및 안전성, 발암성, 체내 분포 및 신생혈관 구성에 대한 유효성을 확인한 이번 연구가 지방유래 중간엽 줄기세포의 임상 적용 분야에 매우 가치가 있어 활용성이 높을 것으로 판단된다.



참 고 문 헌

Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 2003, **75**, 204-209.

Andrade W, Seabrook TJ, Johnston MG, Hay JB. The use of the lipophilic fluorochrome CM-DiI for tracking the migration of lymphocytes. *J Immunol Methods* 1996, **194**, 181-189.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980, **151**, 294-307.

Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci* 1986, **84**, 139-151.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**, 568-584.

Bongaerts GP, Severijnen RS. Stem cells from residual IVF-embryos - Continuation of life justifies isolation. *Med Hypotheses* 2007, **69**, 478-480.

Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998, **83**, 1059-1066.

Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **330**, 142-150.

Buerger L. Thrombo-angitis obliterans; a study of the vascular lesions leading to presenile spontaneous gangrene. *Am J Med* 1908, **136**, 567-580.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001, **98**, 2396-2402.

Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **332**, 370-379.

Casteilla L, Planat-Bénard V, Cousin B, Silvestre JS, Laharrague P, Charrière G, Carrière A, Pénicaud L. Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005, **98**, 922-926.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980, **56**, 289-301.

Cedar SH, Cooke JA, Luo Z, Patel MJ, Minger SL. From embryos to embryonic stem cells: biopolitics and therapeutic potential. *Reprod Biomed Online* 2006, **13**, 725-731.

Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **343**, 644-652.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U, Frisén J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000, **288**, 1660-1663.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003, **174**, 101-109.

Denker HW. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics*. 2006, **32**, 665-671.

Dobson DE, Kambe A, Block E, Dion T, Lu H, Castellot JJ Jr, Spiegelman BM. 1-Butyryl-glycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell* 1990, **61**, 223-230.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, **8**, 315-317.

Evers BM, Weissman IL, Flake AW, Tabar V, Weisel RD. Stem cells in clinical practice. *J Am Coll Surg* 2003, **197**, 458-478.

Fiessinger JN, Schafer M. Trial of iloprost versus aspirin treatment for critical limb ischemia of thromboangiitis obliterans: The TAO Study. *Lancet* 1990, **335**, 555-557.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976, **4**, 267-274.

García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005, **48**, 1416-1423.

Geiger H, Sick S, Bonifer C, Müller AM. Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell* 1998, **93**, 1055-1065.

Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002, **105**, 1291-1297.

Gruen L, Grabel L. Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy. *Stem Cells* 2006, **24**, 2162-2169.

Hanson C, Caisander G. Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS*. 2005, **113**, 751-755.

Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K. Autologous bonemarrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004, **109**, 1215-1218.

Imreh MP, Gertow K, Cedervall J, Unger C, Holmberg K, Szöke K, Csöreg L, Fried G, Dilber S, Blennow E, Ahrlund-Richter L. In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J Cell Biochem*. 2006, **99**, 508-516.

In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003, **102**, 1548-1549.

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**, 3422-3427.

Karl GB, Stephen JF, Frederick RA. A history of bone marrow transplantation. In: Thomas' hematopoietic cell transplantation, 3rd ed. Boston: Blackwell Science. 2004: 1-8.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006, **24**, 1294-1301.

Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH, Lee YS, Lee KS, Park HK, Kang KS. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells* 2006, **24**, 1620-1626.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001, **105**, 369-377.

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004, **14**, 311-324.

Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 2005, **14**, 92-102.

Lin Y, Yan Z, Liu L, Qiao J, Jing W, Wu L, Chen X, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W. Proliferation and pluripotency potential of ectomesenchymal cells derived from first branchial arch. *Cell Prolif* 2006, **39**, 79-92.

Matsushita M, Kuzuya A, Kobayashi M, Nishikimi N, Ito M, Oba Y, Yano T, Komori K. Buerger's disease in a 19-year-old woman. *J Vasc Surg* 2003, **38**, 175-179.

Mills JL, Porter JM. Buerger's disease: A review and update. *Semin Vasc Surg* 1993, **6**, 14-23.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004, **110**, 349-55.

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006, **17**, 279-290.

Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**, 2542-2547.

Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 1991, **195**, 492-503.

Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001, **358**, 1257-1264.

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**, 143-147.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997, **276**, 71-74.

Rao M. Tumorigenesis and embryonic stem cell-derived therapy. *Stem Cells Dev* 2007, **16**, 903-904.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004, **109**, 1292-1298.

Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005, **65**, 3035-3039.

Ruhparwar A, Kofidis T, Ruebesamen N, Karck M, Haverich A, Martin U. Intra-vital fluorescence microscopy for intra-myocardial graft detection following cell transplantation. *Int J Cardiovasc Imaging* 2005, **21**, 569-574.

Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **294**, 371-379.

Saha K, Chabra N, Gulati SM. Treatment of patients with thromboangiitis obliterans with cyclophosphamide. *Angiology* 2001, **52**, 399-407.

Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007, **25**, 818-827.

Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **328**, 258-264.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001, **103**, 897-903.

Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998, **281**, 1683-1686.

Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002, **105**, 788-793.

Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006, **291**, R880-884.

Wang X, Li F, Niyibizi C. Progenitors systemically transplanted into neonatal mice localize to areas of active bone formation in vivo: implications of cell therapy for skeletal diseases. *Stem Cells* 2006, **24**, 1869-1878.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997, **385**, 810-813.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002, **13**, 4279-4295.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, **7**, 211-228.



계대 배양된 사람 지방유래 줄기세포의 안전성 및 하지허혈 동물모델에서 혈관신생에 관한 연구

라 정 찬

사람의 지방 조직으로부터 중간엽 줄기세포 (hAdMSC)를 분리 배양하여 줄기세포의 특성 및 독성여부와 발암성, 그리고 임상적 가능성을 조사하고자 본 연구를 수행하였다.

지방유래 줄기세포는 방추상의 섬유 아세포 모양으로 배양용기 바닥에 길쭉한 모양으로 부착되어 성장하며 계대 배양을 반복하여도 그 형태를 잘 유지되었다. 세포표면 항원을 분석한 결과 CD73, CD90을 발현하였고 CD31, CD34, CD45는 발현하지 않았다. 또한 분화를 유도한 결과 지방세포, 골세포, 신경세포 및 근육세포 등 다양한 세포로 분화되는 것을 관찰할 수 있었으며, colony forming assay를 통해 줄기세포의 특성 중 하나로 알려진 sphere 형성을 확인하였다. 유전적 안전성을 확인하기 위하여 핵형분석을 실시한 결과 12계대에 이르기까지 염색체 이상이 발견되지 않았다.

사람 지방조직 중간엽 줄기세포의 SCID 마우스에서의 독성시험에서 용매대조군 및 hAdMSC 저용량 투여군 (2×10^5 cells/kg BW), 중간용량 투여군 (2×10^6 cells/kg BW), 고용량 투여군 (2×10^7 cells/kg BW), 최고용량 투여군 (2×10^8 cells/kg BW)으로 설정하고 근육 내로 1회 투여하여 13주간 관찰한 결과, 이상 소견이 관찰되지 않아 hAdMSC의 무해용량은 2×10^8 cells/kg BW 이상으로 판단되었다. BALB/c-nu 누드마우스에서 종양 발생의 비교를 위하여 음성 대조군으로 MRC-5 (human fetal lung cell line) 세포, 양성 대조군으로 A375 (human malignant melanoma cell line) 세포를 사용하고 hAdMSC 저용량 투여군 (2×10^6 cells/kg BW), 중간용량 투여군 (2×10^7 cells/kg BW), 고용량 투여군

(2×10^8 cells/kg BW)으로 설정한 후 피하로 1회 접종하여 26주 관찰한 발암성 시험 결과, 양성대조 A375 세포를 접종한 모든 개체에서 종양이 발생한 반면, 음성대조 MRC-5 및 hAdMSC를 접종한 모든 개체에서는 종양이 발생하지 않았다. 그리고 줄기세포의 체내 분포 양상을 파악하기 위해 SCID 마우스를 이용하여 CM-DiI 형광 표지된 hAdMSC 중간용량 (2×10^6 cells/kg BW) 및 고용량 (2×10^8 cells/kg BW)으로 시험군을 설정하였다. 대퇴 근육 내로 1회 투여 후 24 시간, 1주, 4주에 부검하고 조직 검사를 통해 CM-DiI 형광 표지된 세포를 조사한 결과, 이식부위 근육 조직에서는 4주차까지 형광 표지된 hAdMSC를 관찰할 수 있었으나 그 이외의 장기 조직에서는 확인할 수 없었다.

사람 지방조직 중간엽 줄기세포에 물리적으로 shear stress를 가하거나 특정 성장인자들을 첨가한 matrigel assay에서, *in vitro* tube formation를 확인할 수 있었고, 면역 형광염색을 통해 혈관 생성과 관련된 KDR, vWF, UEA-1 및 acLDL과 같은 혈관내피세포 특이적 항원을 관찰되었다. 또한 분자생물학적 수준에서 혈관내피세포 특이적인 Flt-1, V-cadherin 등의 발현을 RT-PCR을 통해서 확인하였다. 임상적 가능성을 알아보기 위하여 BALB/c-nu 누드마우스의 오른쪽 다리의 대퇴 동맥 및 복제 동맥을 결찰하고 혈관을 절제하여 수술적으로 하지 허혈 모델을 제작하였다. 용매대조군 및 hAdMSC 저용량 투여군 (1×10^6 cells/kg BW), 중간용량 투여군 (5×10^6 cells/kg BW), 고용량 투여군 (1×10^7 cells/kg BW)으로 하여 4주 동안 비교 관찰하였다. 용매 대조군의 완전 탈락률이 12 마리 중 9 마리로 75 %인데 반해, hAdMSC 저용량 투여군에서 12 마리 중 2 마리로 16.67 %로 낮게 발생하였고 중간용량 및 고용량 투여군에서 다리가 완전히 절단된 개체는 없었다. 더욱이 고용량 투여군에서는 12마리 실험 대상 중 무릎 이하의 탈락 1례를 제외하고는 하지가 절단된 개체를 발견할 수 없었다. 또한 용매 대조군에서 하지가 완전히 회복된 개체가 전혀 없는데 반해 저용량 투여군에서 7 마리 (58.3 %), 중간용량 투여군에서는 6 마리 (50.0 %), 그리고 고용량 투여군에서 9 마리 (75.0 %)가 정상으로 돌아와 hAdMSC의 효능이 매우 높은 것으로 확인되었다. 또한, 레이저 도플러를 이용한 허혈 부위 혈류량 조사 및 alkaline phosphatase 염색을 이용해 허혈 부위 조직의 단위면적당 모

세혈관 수를 조사한 결과에서도 hAdMSC 투여 용량에 비례하여 혈관 신생이 증가함을 확인하였다.

결론적으로, 사람 지방유래 중간엽 줄기세포는 쉽게 얻을 수 있고 대량 증식을 위한 배양이 용이하며 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력 및 윤리적 문제점에서 자유로운 장점을 지니면서도, 특히 자가이식의 경우 독성이 없고 종양을 형성하지 않으며 신생 혈관 조성에 뛰어난 능력을 보이므로 허혈성 혈관 질환에 있어서 세포 치료제로 임상 접근을 하기에 가능할 것으로 판단된다.

색인어: 지방유래 중간엽 줄기세포, 안전성, 발암성, 하지 허혈, 혈관 신생