



줄기세포의 신경계 임상적용 I: 신경줄기세포를 중심으로

박 국 인^{1,2*} | 연세대학교 의과대학 ¹소아과학교실, ²BK21 의과학 사업단

Clinical applications of human neural stem cells in neurodegenerative diseases, especially neonatal hypoxic-ischemic brain injury and spinal cord injury

Kook In Park, MD^{1,2*}

¹Department of Pediatrics and ²Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

*Corresponding author: Kook In Park, E-mail: kipark@yuhs.ac

Received February 7, 2011 · Accepted February 21, 2011

Multipotent neural stem cells (NSCs) are operationally defined by their ability to self-renew, to differentiate into cells of all glial and neuronal lineages throughout the neuraxis, and to populate developing or degenerating CNS regions. The recognition that NSCs that were propagated in culture could be reimplanted into the mammalian brain, where they might integrate appropriately throughout the mammalian CNS and stably express foreign genes, has unveiled a new role for neural transplantation and gene therapy and a possible strategy for addressing the CNS manifestations of diseases that heretofore had been refractory to intervention. Proliferating single cells were isolated from the telencephalic region of human fetal cadavers at 13 weeks of gestation and were grown as neurospheres in long-term cultures. We investigated the characteristics of the growth, differentiation, and region-specific gene expression of human NSCs. An intriguing phenomenon with possible therapeutic potentials has begun to emerge from our observations of the behavior of NSCs in animal models of neonatal hypoxic-ischemic brain and spinal cord injury. During phases of active neurodegeneration, factors seem to be transiently elaborated to which NSCs may respond by migrating to degenerating regions and differentiating specifically towards replacement of dying neural cells. NSCs may attempt to repopulate and reconstitute ablated regions. In addition, NSCs may serve as vehicles for gene delivery and appear capable of simultaneous neural cell replacement and gene therapy. After the approval of the Institutional Review Board of Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine and Korean Food and Drug Administration, an investigator-sponsored clinical trial of the transplantation of human NSCs into patients with severe perinatal hypoxic ischemic brain injury and traumatic cervical motor complete spinal cord injury have been performed. The existing data from these clinical trials have shown to be safe, well tolerated, and of neurologically-some benefits.

Keywords: Neural stem cells; Hypoxic-ischemic brain injury; Spinal cord injuries; Cell therapy

서 론

신경줄기세포(neural stem cells)란 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가갱신(self-renew)을 보이고, 한 개의 줄기세포로부터 다양한 신경원세포(neuron) 및 교세포(glia)로 분화하는 분화의 다능성(multipotency)을 보이는 세포를 의미한다. 이러한 신경줄기세포는 태아기에서는 신경계 전반에 걸쳐 다양한 해부학적 부위에 존재하여 신경계를 형성하며, 성체 뇌에서도 해마(hippocampus) 치상회(dentate gyrus)의 과립하층(subgranular layer) 및 뇌실(lateral ventricle) 주위의 뇌실하층(subventricular zone)에 신경줄기세포가 존재함이 밝혀졌고[1-7], 최근의 연구에 의하면 시상하부(hypothalamus)와 편도체(amygdala), 대뇌피질 및 척수 등에서도 줄기세포가 천천히 증식하면서 신경세포를 생성함이 보고되었는데, 아직 그 존재 여부가 확증된 상태는 아니다[8,9]. 이러한 성체 신경줄기세포는 일생을 통하여 계속 증식하고, 과립하층 줄기세포는 치상회의 과립층(granular zone)으로 이주하여 과립신경세포(granular neuron)로 분화하며 주위 신경세포와 접합형성과 신경회로에 통합되어 학습 및 기억능력에 관여하고, 뇌실하층 줄기세포는 rostral migratory stream을 통하여 후구(olfactory bulb)로 이주하여 과립신경세포 및 사구체주위 신경세포(periglomerular neuron)로 분화하고 신경회로에 통합되어 후각기능에 관여한다[1-7]. 한편 대뇌피질에서 일부 증식하고 있는 세포는 단순히 위성 신경교세포(satellite glia)로 간주되었으나, 증식세포 표지자와 신경원세포의 표지자를 동시에 발현하여 억제성 중간신경원세포(inhibitory interneuron)가 새롭게 생성된다고 보고되었다[10,11]. 따라서 신경줄기세포는 과립하층 및 뇌실하층 외에 성체 중추신경계의 보다 광범위한 지역에 주로 휴면상태로 존재하면서 소수의 신경원세포 및 교세포를 생성하거나, 일부 극소수의 세포가 다능성 신경줄기세포로 전환되어 새로운 신경세포를 생성할 가능성도 있다. 이상으로 지난 20여 년간의 연구를 통하여 한 번 손상되면 재생되지 않는 것으로 알려져 있는 인간을 포함한 포유류의 중추신경계에 내인성(endogenous) 신경줄기세포가 존재하고 본 세포는 일생을 통하여 증식·

분화하여 새로운 신경원 및 교세포를 생성하며, 또 시험관 내에서도 외인성(exogenous) 신경줄기세포를 배양할 수 있고 신경계로 이식 전 미리 신경원 및 교세포로 분화 유도할 수 있게 됨에 따라 퇴행성 신경계질환에서 본 내인성 및 외인성 신경줄기세포를 이용한 신경재생치료의 가능성에 관심이 증가하고 있다.

신경줄기세포의 신경재생치료적 특성

퇴행성 신경계질환은 다양하게 급·만성으로 국소성, 다소성 혹은 범발성으로 뇌 및 척수 등의 중추신경계에 신경원세포 혹은 교세포가 사멸하거나 기능부전을 보이는 광범위한 범주의 질환이다. 이러한 퇴행성 신경계질환에서 신경줄기세포의 치료적 유용성을 요약하면, 1) 손상 혹은 기능부전을 보이는 신경계에 본 세포를 이식 시 전체 숙주 신경축(host neuraxis)에 통합되어 시간적·공간적 신경발달 미세환경신호에 반응하여 세포 구조학적 및 기능적으로 적절한 신경세포로 분화되어 기능부전을 보이거나 사멸한 신경세포를 대체하고, 손상된 신경회로(neural circuitry)를 재건하여 신경재생을 유도하는 가능성을 보인다; 2) 시험관 내에서 미리 다양한 정도로 손상 혹은 기능부전을 보이는 신경세포로 분화유도(신경원세포 전구세포[neuronal progenitor cell or neuroblast], 희소돌기아교세포 전구세포[oligodendrocyte progenitor cell], 성상세포 전구세포[astrocyte progenitor cell])한 후, 숙주 신경계에 이식하여 손상된 신경세포를 효율적으로 대체·재생할 수 있다; 3) 이식된 공여세포는 숙주 신경세포에 통합되어 신경접합을 형성하고 적절한 신경전달물질을 분비하여 국소 재신경지배(reinnervation)를 형성한다; 4) 중추신경계 이식 시 신경축에 걸쳐 광범위하게 이주하므로 국소성, 다소성 및 범발성 신경계 질환에 있어서도 손상 혹은 결함을 보이는 세포, 효소, 신경영양인자, 신경전달물질, 수초(myelin), 세포외기질(extracellular matrix), 세포표면물질 등을 제공할 수 있다; 5) 공여세포뿐만 아니라 숙주 신경세포의 생존, 이주, 분화, 재생 등에 영향을 미치는 다양한 신경영양인자(NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, VEGF, bFGF, GDNF 등)들을 분비한다;

6) 다양한 항염증물질 혹은 면역제어물질(cytokines [TNF α , TL1-A, TRAIL, CD95L, PGE2, NO, IL-1Ra, IL-4, IL-10, TGF- β], chemokines, chemokine receptors 등) 등을 분비한다; 7) 혈관생성촉진 물질 등도 분비하고; 8) 신경줄기세포는 (비)바이러스성 vector에 의하여 생체 외에서 쉽게 유전자 형질이입이 가능하다; 9) 간편하고 안전한 방법으로 뇌 및 척수로 이식되어 신경계에 생착된 후, 외부에서 이입한 유전자산물을 직접적, 지속적, 그리고 조절되는 양상으로 분비할 수 있다; 10) 생분해성 합성 고분자화합물(biodegradable synthetic polymer matrix)과 공동배양 시 세포의 성장, 증식 및 분화가 촉진되므로 본 세포를 조직공학적인 방법으로 이용하여 신경조직의 재생을 유도할 수 있는데, 최근에는 세포 성장을 돕는 자가조립(self-assembling) nanofibers와 hydrogels, 그리고 laminin fragments와 같은 생활성분자(bioactive molecules)로 세포 배양용 인공 미세환경 등을 개발하여 신경줄기세포의 성장과 분화를 시험관 내에서 조절하고 생체 내 이식법을 개발 중에 있다[12-20].

신경줄기세포의 임상적용 시 고려사항

최근까지 신경줄기세포의 증식과 분화 등의 행동을 조절하는 많은 환경인자, 유전자 및 화학물질 등이 보고되었고 [21], 이러한 인자들을 이용하여 비교적 균질의 분화 신경세포를 배양하여 여러 가지 신약개발, 독성검사 및 세포치료에 적용하는 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 배아줄기세포와 유도전분화능줄기세포(induced pluripotent stem cells [iPS] or reprogrammed cells)를 이용하여 보다 효율적이고 균질한 특정 신경세포로의 분화유도 실험이 활발히 이루어지고 있다. 그러나 배아줄기세포 및 iPS는 증식성이 뛰어나고 하고 다양한 세포로의 분화유도 가능성을 보이지만 종양형성 등의 안전성 문제가 아직 완전히 해결되지 않은 상태이다. 따라서 향후 가까운 미래에서는 세포 증식능과 분화 가능성이 제한되어 있지만 비교적 안전한 신경줄기세포를 대상으로, 배양조건의 변화와 분화세포의 분리 등 전통적인 방법을 이용하여 균질한 신경세포 아형(subtypes)을 획득하고 세포치료 임상시도에 적용될 가능성이 높다고 하겠다.

실제 미국 StemCells Inc.는 라이소좀축적질환(lysosomal storage disease) 중 하나인 유전성 희귀 신경질환인 Batten disease (neuronal ceroid lipofuscinosis) 환아를 대상으로 U.S. Food and Drug Administration (FDA) 공식 허가 하에 인간 신경줄기세포를 뇌 이식하는 임상 1상 시험을 진행하였고, 이식 1년 후 안전성에 특별한 문제점이 없다고 보고하였으며, 향후 장기간에 걸쳐 환자의 안전성과 질병 경과를 관찰 중에 있고[22], 최근에는 또 다른 희귀 유전성 신경질환이며 백질장애질환(leukodystrophy)인 Pelizaeus-Merzbacher disease 환아를 대상으로 인간 신경줄기세포 이식 임상 1상 시험이 시작되었다. 그러나 실제 전세계에서 공식적으로 아직 퇴행성 신경계질환 환자를 대상으로 신경줄기세포를 포함한 다양한 줄기세포 이용 세포치료의 효능이 증명되었거나 허가된 경우는 없는 실정이다. 이러한 사실에도 불구하고 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 일부 난치성질환 환자를 대상으로 합리적인 이유 없이 혹은 과학적 및 임상적 기초자료가 불충분함에도 불구하고 실제 임상에서 다양한 줄기세포 이용 세포치료가 일부 시행되고 있는데, 이러한 행위는 항상 효과를 과대평가하고 부작용 발생은 과소평가하는 경향을 보인다[23]. 따라서 난치성 퇴행성 신경계질환에서 줄기세포 이용 세포치료가 성공하기 위해서는 임상시험을 위한 명확한 계획서가 필요하고, 여기에는 줄기세포 임상적용에 필요한 단계적인 기초연구 및 임상연구 이정표 설정, 그리고 임상시험에 따른 윤리적, 사회적, 경제적, 법적, 행정적 규범들의 확립도 필요하다.

인간 신경줄기세포의 임상적 적용을 위해서도 아직 많은 연구가 필요한데, 1) 신경계 발달과정에서 신경줄기세포에서 각종 다양한 전구세포 및 특이 신경세포로의 분화기전 규명과 줄기/전구세포 특이표지인자가 발굴; 2) 신경줄기세포의 증식, 성장, 분화기전 연구를 통하여 세포이식에 충분한 수의 신경세포를 안전하게 대량 배양·증식하고 적절한 신경세포로의 분화유도 기술 확립; 3) 이식된 신경줄기세포가 신경계 내에 생착, 이주, 분화 및 숙주 신경계에 통합되는 분자생물학적 기전 규명; 4) 내인성 신경줄기세포에 의한 신경계 재생기전 규명 및 신경치료에 이용방법 개발; 5) 신경줄기세포에 치료적 유용성을 보이는 유전자 혹은 단백질의 안전

하고 효율적 전달방법 개발; 6) 퇴행성 신경계질환의 병태생리 기전 규명을 통하여 각각의 질환치료에 줄기세포 이용 세포치료의 적절성 및 경제성을 먼저 평가하고, 이식 세포 종류 확인(예를 들면, 대증요법으로 일부 치료약물이 개발되어 있는 파킨슨씨병인 경우 한 번의 줄기세포 이식과 평생에 걸친 약물치료 간에 수월성을 비교하여 세포치료 여부를 결정하여야 하고, 현재 특별한 치료법이 없는 난치성 질환인 근위축성 측삭경화증 [Amyotrophic lateral sclerosis]인 경우는 세포치료에 따르는 부작용 발생위험과 기대되는 치료효과를 비교하여 환자에게 보다 유용한 방향으로 세포치료 실행 여부를 결정하여야 함); 7) 각각의 난치성 신경계질환의 병태생리에 따른 기능적 이식술 개발(예를 들면, 파킨슨씨병은 주로 도파민 신경세포 이식, 근위축성 측삭경화증인 경우는 주로 운동신경세포 이식, 뇌졸중 혹은 알츠하이머병인 경우는 다양한 종류의 혼합 신경세포 이식, 다발성 경화증인 경우는 희소돌기아교세포 이식 등을 고려할 수 있고, 질환의 병태생리에 따라 미분화세포 혹은 건강한 성상세포 이식 등을 고려할 수도 있음); 8) 질환모델 동물에서 세포이식의 확실한 신경기능 개선효과 확인과 장기간에 걸쳐 부작용 발생에 대한 평가; 9) 다양한 다른 종류의 성체줄기세포, 배아줄기세포, iPS 세포 혹은 리프로그래밍 세포 유래 신경세포 이식과 태아 혹은 성인 중추신경계 유래 신경줄기세포 이식 간에 세포치료제로서의 안전성 및 유효성 비교평가; 10) 신경줄기세포의 항염증작용, 면역억제조절작용 및 성장인자 발현 등으로 인한 신경보호작용; 11) 다양한 원인에 의한 복합 퇴행성 신경계질환에서 줄기세포 이용 세포치료와 더불어 다양하고 다원적인 치료법을 함께 적용하는 전략개발 등에 대한 연구들이 진행되어야 할 것이다.

신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 모델에서 줄기세포 치료

주산기 가사(perinatal asphyxia)에 의한 신생아 저산소성 허혈성(hypoxia-ischemia, HI) 뇌 손상의 발생빈도는 1,000명 만삭아 출생 당 2-4명에서 발생하고, 환자의 20-50%는 신생아기에 사망하며, 중등도 뇌 손상인 경우 생

존아의 30-50%에서, 중증 뇌 손상인 경우 90% 이상에서 정신지체(mental retardation), 뇌성마비(cerebral palsy), 난치성 간질, 시력 혹은 청력장애, 학습장애 등의 중증 신경발달학적 후유증이 동반된다[24,25]. 지난 수십 년 동안 고위험 신생아에 대한 주산기 치료가 획기적으로 발전하였고 새로운 신경보호제 개발을 위한 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고, 최근 저체온증(hypothermia) 유발이 중등도 HI 뇌 손상에서 제한된 신경보호효과를 보인다는 결과 외에 [26] 신생아 HI 뇌 손상에 대한 특별한 치료법이 없으며, 주로 일반적 대증요법이 진행되고 있다. 따라서 줄기세포를 이용한 세포치료는 특별한 치료법이 없는 난치성 신생아 HI 뇌 손상에 대한 새로운 가능성을 보이는 신경재생치료법으로 연구되고 있다.

신생아 HI 뇌 손상에 대한 줄기세포치료 연구는 크게 태아 혹은 성체 중추신경계 유래 신경줄기세포와 골수 혹은 제대혈 등의 비신경계 조직유래 줄기세포를 이용한 연구로 나눌 수 있다. 생후 7일된 미성숙 생쥐 뇌에 국소성 HI 뇌 손상을 유발 후 쥐 신경줄기세포를 뇌 손상 부위에 이식한 결과, 공여세포는 일시적 증식과 뇌 손상 부위로 특이적으로 이주함을 보이고, 손상 부위와 주변 대뇌피질 접경부위(penumbra)에 확고히 정착하며, 신경원세포, 희소돌기아교세포 및 성상세포로 분화하여(일부 공여세포는 미분화세포로 존재) 뇌 손상으로 손실된 신경세포를 재생함을 보였다[27].

신경줄기세포는 뇌 손상 시 발현되는 다양한 인자(cytokines, chemokines, growth factors, neurotrophic factors, cell adhesion molecules, integrins, cell surface molecules, extracellular matrix, etc.) 등에 반응하여 특이적으로 뇌 손상 부위로 이주함을 보이는데, 신생아 HI 뇌 손상 동물모델에 CXCR4 (chemokine 일종인 stroma-derived factor-1 α [SDF-1 α]의 receptor) 발현 설치류 혹은 인간 신경줄기세포를 뇌 손상 반대편 대뇌 반구(cerebral hemisphere)에 이식할 경우 공여세포는 뇌량(corpus callosum) 및 대뇌 반구간 교련(interhemispheric commissures) 등을 통하여 SDF-1 α 농도가 증가된 뇌 손상 부위로 이주함을 보였다[28]. 이러한 결과는 뇌 손상 시 발현되는 염증반응물질인 chemokine에 대하여 chemokine

receptor를 발현하는 신경줄기세포 내 신호전달반응에 의하여 세포증식, 이주 및 분화 등의 신경재생적 반응이 일어남을 나타낸다.

뇌 손상 부위에 이식된 공여세포는 약 5% 정도에서 신경원세포로 분화하지만[27], 신경발달 과정에서 신경원세포의 생성을 촉진하는 NT-3를 과발현시킨 신경줄기세포를 뇌 손상 부위에 이식할 경우 공여세포는 뇌 손상 부위에서는 10-20%, 뇌 손상 접경부위에서 약 80% 이상에서 신경원세포 표지인자를 발현하고, gamma amino butyric acid (GABA), acetylcholine, glutamate 발현 신경원세포 아형으로 분화하였다[29]. 이러한 결과는 신경줄기세포에 성장인자, 싸이토카인, 신경발달관련 유전자 등을 발현케 한 후 뇌 손상 부위에 이식할 경우, 공여세포뿐만 아니라 숙주 신경세포에도 작용하여 신경세포의 분화유도, 신경돌기 성장 촉진, 손상된 신경회로 복구, 신경세포 생존 강화 등을 유도할 수 있음을 보였고, 한 번의 신경줄기세포 이식으로 손상된 신경세포를 대체하는 세포치료와 적절한 신경영양인자를 동시에 제공하는 유전자치료가 가능함을 제시하였다.

신경줄기세포의 높은 신경재생능력에도 불구하고 중증 HI 뇌 손상인 경우 급격한 조직괴사로 인하여 큰 뇌공동증(porencephaly)을 형성하므로 공여세포는 숙주 신경조직 및 성형(template)의 부족으로 신경재생이 제한적이며, 혈액공급이 원활하지 않아 생존도 감소한다. 따라서 공여세포의 조직화와 성장, 이주 및 분화를 유도하는 성형인 생분해성 합성 고분자화합물(biodegradable synthetic polymer scaffold; polyglycolic acid, PGA)를 이용하여 신경줄기세포와 공동 배양한 후 신경줄기세포-PGA 복합체를 HI 뇌 손상 부위에 이식하였는데, 공여세포의 확고한 정착, 뇌 손상 부위 감소, 혈관생성 촉진, 다양한 신경세포로의 분화, 신경원세포로의 분화 및 신경돌기 신전 촉진, 염증반응의 감소 및 뇌량을 통한 양측 대뇌 반구 사이 신경연결형성 등이 유도됨을 보였다[12]. 이러한 결과는 향후 고분자화합물과 신경줄기세포를 이용하여 중증 HI 뇌 손상 시 세포치료 및 신경조직 공학적 치료가 가능함을 제시하였다.

신경줄기세포는 HI 뇌 손상 부위에 이식된 후 신경세포로 분화하여 사멸된 신경세포를 재생할 뿐만 아니라 다른 복합적

인 기능을 보이는데, 뇌졸중 모델에서 정맥 주사된 신경줄기세포는 뇌 손상 부위에 정착된 후 대부분 미분화된 세포로 존재하고 이러한 미분화 세포는 항 염증작용, 신경상처조직형성 감소, 숙주 신경세포의 보호 등의 작용을 하는 것으로 보고되었고[30], 뇌출혈 모델에서 정맥 주사된 신경줄기세포는 비장에 축적되어 면역제어조절 작용에 의하여 신경보호 효과를 보였다[31]. 이러한 연구결과들은 모두 신생아 HI 뇌 손상에서 신경줄기세포의 세포치료적 유용성을 보여주지만, 신경줄기세포의 신경보호기전, 신경재생기전, 공여세포와 숙주 신경세포와의 적절한 신경회로 형성여부, 이식 후 장기간에 걸쳐 공여세포의 생체 내 기능, 급성 및 만성 뇌 손상에서 신경줄기세포의 치료 효과비교 등에 대한 연구가 더 필요한 실정이다.

비신경계 조직유래 줄기세포로 먼저 인간 제대혈줄기세포(human umbilical cord blood stem cells)를 HI 뇌 손상 모델에서 복강, 정맥, 경동맥 등에 주사한 결과 뇌 손상 부위에 정착된 공여세포는 별로 없었고 있어도 신경세포로의 분화는 드물었으나, 이식군에서 신경기능개선 효과를 보였고, 인간 제대혈 유래 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)를 뇌 손상 부위에 이식한 경우 일부 공여세포는 성상세포로 분화하고 역시 신경기능 개선효과를 보고하였다[32,33]. 이러한 결과는 이식된 제대혈줄기세포가 손상된 신경세포를 재생하기보다는 신경영양인자, 싸이토카인, 항염증인자, 면역제어조절인자 등을 발현하여 신경세포 보호효과를 보이는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 현재 HI 뇌 손상을 보이는 만성 신생아를 대상으로 자가 제대혈줄기세포 투여의 안전성 및 적용가능성을 평가하는 임상 1상 시험이 미국 Duke대학에서 시행되고 있으며, 세포 투여 후 신경학적 검사와 뇌 magnetic resonance imaging (MRI) 검사 등이 진행되고 있다[34].

성체 뇌졸중 모델에서 골수유래 단핵구세포(bone marrow mononuclear cells) 및 골수유래 중간엽줄기세포 이식이 신경보호와 재생효과가 있음이 보고되었고, 최근에는 환자를 대상으로 본 세포를 이식하여 긍정적인 결과를 보고하였다[32,33,35,36]. 신생아 HI 뇌 손상 모델에서 골수유래 중간엽줄기세포를 심장에 이식한 경우 공여세포는 양측 대뇌 반구에 정착함을 보이고 신경기능 개선을 보였으나, 대

부분의 세포는 성상세포 및 소신경교세포(microglia)로 분화하였으며 뇌 손상 정도를 개선시키지 못하였고[37], 중간엽줄기세포를 뇌 손상 부위에 직접 이식한 경우 공여세포는 극히 일부분만 신경세포로 분화하고 주로 항 염증효과에 의하여 내인성 신경줄기세포에 의한 신경세포 생성이 촉진되고 신경기능이 개선됨 등을 보고하였다[38]. 그러나 향후 신생아 HI 뇌 손상 모델에서 골수유래 줄기세포 이식이 뇌졸중 모델과 유사한 신경기능 개선효과를 확인하고, 아급성 혹은 만성 신생아 HI 뇌 손상에서도 이식효과를 평가하기 위한 더 많은 연구가 필요하다.

신생아 HI 뇌 손상 환자에서 줄기세포 이용 세포치료 확립을 위해서는 동물실험 등에서 세포치료의 안전성 문제가 일단 확보되면, 실제 임상 1상 연구에서는 세포이식 방법, 이식세포 수, 이식세포 종류 및 세포이식 시기 등을 평가하는 연구가 함께 고려되어야 한다. 현재까지 가장 적절한 세포이식 방법은 아직 결정되지 않았는데, 신생아 HI 뇌 손상 모델에서 대부분의 세포이식은 뇌 손상 실질 부위에 바로 세포를 이식하였으나 너무 침투적 이어서 뇌 손상을 줄 수 있고, 뇌실 내(intracerebroventricular) 이식할 경우 뇌 실질 내로 공여세포가 광범위하게 확산되거나 뇌실(lateral ventricle)에서 멀리 떨어진 부위는 도달하기 힘들며, 폐쇄성 뇌수종(obstructive hydrocephalus)을 일으킬 수도 있다. 최근 신경계질환 모델에서 줄기세포의 정맥 내 주사는 간편, 비침투적, 안전한 방법이며 주로 세포사멸을 억제하여 신경기능을 개선시킨다고 보고되었으나[32], 단지 소수의 공여세포만 뇌 손상 부위에 정착되고 폐, 콩팥, 간 및 비장 등에 공여세포가 축적되므로 임상적용 전에 세포이식에 따른 다른 장기에서의 정착된 세포의 성장 및 독성 등에 대한 평가가 이루어져야 할 것이다[39]. 줄기세포의 정맥 내 주사를 대체하는 방법은 동맥 내 주사하여 공여세포가 전신으로 공급되지 않고 뇌 손상 혹은 뇌 손상 접경부위에 잘 정착되고 신경기능 개선을 유도하는 것인데, 최근의 연구에 의하면 세포의 동맥 내 주사는 미세혈관 폐쇄와 허혈성 뇌 손상에 의하여 치사율이 높다고 보고되었다[32,40,41]. 그러나 최근 브라질에서 만성 허혈성 뇌졸중 환자를 대상으로 자가 골수줄기세포를 동맥 내 주사하여 임상적용 가능성을 보고하였다[35].

신생아 HI 뇌 손상에서 뇌의 병리적 환경이 뇌 손상 후 시간에 따라 급격히 변화하므로 세포이식 시기 결정에 중요한 영향을 미치는데, 뇌 손상 후 3-7일 사이에 가장 대사적, 생화학적 및 분자적 활성도가 높기 때문에 이 시기가 세포이식에 가장 적합하다고 보고하였고[27], 뇌 손상 2-3일 후 세포 이식하면 세포증식 및 내인성 신경재생 기전이 가장 활발하다고 하였다[38]. 그러나 만성 HI 뇌 손상 모델에서 줄기세포 이식의 유효성을 보고한 바는 별로 없어 이러한 만성 뇌 손상에서 줄기세포 이식의 임상적 적용은 한계점이 있다.

신생아 HI 뇌 손상 및 뇌졸중을 포함한 신경계질환에서 세포치료를 위하여 가장 적합한 세포는 아직 결정된 바 없지만[42], 신경줄기세포 이식이 세포치료의 표준이라고 간주된다. 그러나 일부 연구에서 공여세포의 낮은 생존율, 제한된 세포이주, 미분화 혹은 신경교세포로의 분화 등으로 신경재생에 제한을 보인다고 보고하였고, 자가 신경조직 혹은 사망한 태아조직 획득과 충분한 양의 신경줄기세포 배양의 어려운 점, 동종세포 이식에 따른 면역거부 반응 및 종양형성 가능성, 신경줄기세포 유래 특이 신경세포로 분화 유도 후 이식할 경우 뇌 손상 급성기에 즉각적인 사용이 어렵고, 면역반응 및 배양액에 의한 오염 등의 가능성이 제기 될 수 있다. 골수 및 제대혈유래 중간엽줄기세포 사용 시에도 적절한 신경세포로의 분화유도가 잘 되지 않는 점 외에 상기 신경줄기세포와 유사한 안전성, 유효성 및 세포배양에 소요되는 시간에 의하여 즉각적인 세포이식이 어렵다는 점을 들 수 있다. 한편 제대혈 및 골수 유래 단핵구 세포(mononuclear cells)는 자가세포를 즉각적으로 간편하고 편리하게 주사기 시 혹은 동결보관 후 필요할 때 사용할 수 있는 장점이 있는 반면에, 아직 세포특성이 확립되어 있지 않고, 세포이식의 안전성 및 유효성도 평가되어야 한다[40,43].

신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 환자에서 인간 신경줄기세포 이식 임상시험

본 연구팀은 임신 13주에 자연 유산된 태아의 사체 조직을 미국 국립보건원과 한국 보건복지부 생명윤리법안, 교육과학기술부 세포응용연구사업단 윤리위원회의 연구지침을

따르고, 연세의대 세브란스병원 기관생명윤리위원회의 허가 및 보호자의 동의를 받고 획득한 다음, 태아 중추신경계의 종뇌(telecephalon) 부위를 해부하여 동물혈청은 포함되지 않고 mitogenic cytokines이 포함된 'defined media(내용물의 조성이 정의된 세포배지)'에 인간 신경줄기세포를 신경구(neurospheres) 형태로 배양하였다. 본 신경구는 시험관 내에서 doubling time(세포 수가 2배 증식하는데 소요시간)이 약 5일 정도로 빠르게 증식하였고, 1년 이상 계속 계대배양이 가능하였으며, 염색체 검사 상 정상 소견을 보였고, 증식조건에서 약 95-99% 이상의 세포가 nestin, vimentin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), Pax6, glutamate astrocyte-specific transporter or EAAT1, Sox2와 같은 미성숙 신경줄기세포의 표지자를 발현하여 신경줄기세포, 전구세포, 방사교세포(radial glial cell), 일부 신경원 및 신경교세포 전구세포 등이 혼합된 복합 신경줄기/전구세포 덩어리 형태를 보였다[42]. 분화조건에서 인간 신경줄기세포는 β -Tubulin-III를 발현하는 초기 신경원세포, O4를 발현하는 희소돌기아교세포 전구세포, GFAP를 발현하는 성상세포로 분화하였고, glutamate, GABA 등의 신경전달물질을 주로 발현하였으며, 전뇌(whole brain) 특이적인 Pax6, Dlx2, Emx2, Otx2와 같은 지역특이 유전자를 발현하였다[44].

본 세포를 institutional GMP 시설인 세브란스병원 세포치료센터에서 장기간 계대배양하면서 세포배양 'passage'마다 시험관 내에서 증식·분화형태를 평가하였고, 주기적인 염색체검사 혹은 유전자의 array comparative genomic hybridization 검사를 통하여 유전자가 정상세포임을 확인하였으며, 마이코플라스마, 세균, 곰팡이, 바이러스(HIV-1/2, HTLV-1/2, Hepatitis A/B/C, HSV-1/2, CMV), syphilis, toxoplasmosis 등 병원체에 오염되지 않고 내독성(endotoxin) 검사도 음성임을 확인하였고, 동결보관 후 해동 시에도 세포 특성변화가 없음을 보였다.

동물실험으로 생후 7일된 CD1 생쥐에서 국소성 HI 뇌 손상을 유발하고 1주일 후 뇌 손상 부위에 인간 신경줄기세포를 이식한 결과, 공여세포는 뇌 손상 부위 및 접경부위에 광범위하게 생착, 이주함을 보였고, 신경원세포, 희소돌기아교

세포, 성상세포로 분화하고, 일부는 미분화 상태로 있었으며, 이식된 신경세포는 glutamate, GABA, acetylcholine 등의 신경전달물질을 발현하고, 숙주 신경세포와 신경접합을 형성함을 확인하였다. 숙주동물 뇌 조직학적 검사 상 대조군에 비해 이식군에서 신경염증 반응이 증가하지 않았고, 뇌경색증 범위는 대조군에 비해 유의하게 감소하지는 않았으나, 신경학적 검사 상 유의하게 신경기능 호전을 보였고, 비정상적인 신경행동 소견이나 뇌 종양 형성 등은 보이지 않았다.

본 연구팀은 상기 연구결과를 바탕으로 '중증 주산기 HI 뇌 손상 환자에서 동종(allogenic) 인간 신경줄기세포 이식에 의한 세포치료법 확립'이란 연구자 주도 임상시험 계획서를 연세대학교 의과대학 세브란스병원 기관생명윤리위원회에 제출하여 승인받았고, 2006년 식약청에서 임상시험 시행을 허가받았다. 본 연구는 비무작위, 전향적, 공개적 임상연구(phase I/IIa)이며, 출생 시 병력, 아프가 점수, 심폐소생술 실시 여부, 동맥혈가스검사, 뇌파검사, 이학적, 신경학적 및 방사선과적 검사 상 중증 HI 뇌 손상을 받은 신생아를 대상으로 하였고, 선천성 기형, 선천성 감염증, 유전성/대사성/염색체이상 질환, 출혈성 뇌 질환, 부당경량아/자궁내성장 지연, 소두증 등이 동반되었거나 저체온증 및 기타 세포치료를 포함한 다른 신경보호치료를 받은 환자는 제외하였다. 중증 HI 뇌 손상(신경병리학적 분류; severe diffuse hypoxic-ischemic encephalopathy [HIE], cerebral cortex-deep brain predominant HIE, deep brain-brainstem predominant HIE, focal or multifocal cerebral infarction, cystic periventricular leukomalacia)으로 세브란스병원 소아과에 입원한 환자를 대상으로 상기 임상시험 기준에 적합하며, 보호자가 줄기세포 이식 치료에 동의한 경우에 한하여 세브란스병원 세포치료센터에서 배양된 인간 신경줄기세포를 전신마취 하에 수술 방에서 신경외과 의사가 뇌 이식하였다. 세포이식 전과 이식 후 정기적으로 혈액검사, 이학적 및 신경학적 검사, 뇌파검사, 뇌 MRI 검사, diffusion tensor MRI, MR spectroscopy, visual evoked potential, brainstem evoked response audiometry, gross motor function measure (GMFM; GMFM-88, GMFM-66),

Bayley scoring, social quotient 검사를 실시하였고, 세포 이식 위치는 수술 하루 전 뇌 MRI 검사하고 이식 당일 수술 방에서 navigational MRI로 다시 위치를 확인하였는데, 손상된 뇌 실질, 뇌 낭종(cyst), 혹은 뇌실 부위 등에 5×10^4 /microliter 농도의 미분화 인간 신경줄기세포를 양측 뇌에 나누어서 각각 1 mL씩 직접 주사하였다. 현재까지 뇌 손상 후 1.5개월에서 2년 이상 경과한 아급성 및 만성 HI 뇌 손상 환자 40명을 대상으로 인간 신경줄기세포를 이식하였고, 동종세포 이식 후 면역억제제는 투여하지 않았으며, 세포이식 후 2년 이상 추적검사를 실시하고 있다. 줄기세포 이식과 직접 관련된 뇌출혈, 뇌막염/뇌염, 뇌종양, 뇌수종, 경련, 통증, 강직, 면역소크, 신경학적 기능 악화, 비 정상적인 신경학적/신경행동학적 이상 소견은 관찰되지 않았으며, 세포이식 후 6개월-1년 간격으로 찍은 뇌 MRI 검사에서도 이상소견이 관찰되지 않아 인간 신경줄기세포 이식은 안전하고 적용 가능한 세포치료법임을 보여주고 있다. 세포치료의 유효성 여부는 본 임상연구가 이중맹검 무작위 대조시험이 아니고, 뇌 MRI 검사 상 환자마다 HI 뇌 손상의 해부학적 위치, 정도, 범위 및 신경병리 소견이 다양하며, 세포이식 시 환자의 연령도 다르며, 세포이식 시기도 아급성에서 만성까지 범위가 넓고, 신생아의 뇌는 발달단계에 있어 연령마다 발달 기준이 달라져 세포이식 후 장기간 추적검사가 필요하므로 현재로서는 명확한 평가를 할 수 없다. 그러나 일부 환자는 세포이식 후 뇌경색증의 범위가 유의하게 감소하고 신경학적 기능과 운동 및 인지기능의 호전을 보이고 있어, 향후 전체 대상환자에서 세포이식 후 적어도 1년 6개월 이상 추적검사가 끝날 경우 유효성에 영향을 미치는 임상자료를 정리·분석하여 일차 결과를 발표하고자 하며, 그 후 계속하여 장기간에 걸쳐 세포치료의 안전성 및 유효성 결과를 추적할 예정이다.

척수손상에서 줄기세포 치료

급성 사고성 척수손상(acute traumatic spinal cord injury)은 경추(cervical vertebral segment) 부위에서 가장 많이 발생하며, 사지마비, 인공호흡기 의존 호흡, 운동, 감

각, 자율신경계 등 거의 모든 신체기능 장애를 유발하나, 현재로는 특별한 치료법이 없는 재앙적인 수준의 난치성 질환이다. 척수손상 시 동반되는 병리변화는 상행 및 하행 신경 축삭돌기 경로(axonal pathway) 손상, 척수 신경세포 손상, 염증반응, 신경반흔 형성 및 탈수초화(demyelination) 등으로 복합적인데, 척수손상 동물모델에서 다양한 줄기세포 혹은 줄기세포 유래 세포들을 이식한 경우 손상된 척수 신경세포의 재생, 신경영양인자 제공, 손상된 신경 축삭돌기의 성장 촉진, 염증반응 감소 등의 기전으로 신경기능을 개선시키기가 제안되었다[45-47]. 척수손상 모델에 신경줄기세포를 이식한 경우에도 유의한 신경재생 및 치료효과를 보였는데[13,48-53], 최근에는 아급성 혹은 만성 척수손상 모델에 인간 태아 중추신경계 유래 신경줄기세포를 이식한 경우도 공여세포는 잘 생착, 이주 및 분화하고 장기간에 걸쳐 운동기능 호전을 보고하였고[49,54], 신경기능 호전 기전은 공여세포 유래 신경세포가 숙주동물의 신경회로에 통합되거나 신경돌기를 형성하고 숙주동물의 운동신경세포와 신경접합을 형성한다고 하였다[55,56].

이러한 동물실험 자료는 주목할 만하지만 제한적 신경기능 개선 효과를 보였고, 실제 척수손상 환자를 대상으로 임상시험 시에는 여러 사항을 고려하여야 하는데, 1) 동물실험에 주로 사용되는 설치류의 이동 운동(locomotor movement) 기능은 영장류나 인간에 비해 피질척수로(corticospinal tract)를 통한 신호입력에 크게 영향 받지 않아 실제 임상결과는 다를 수 있으며, 2) 동물실험에서는 대부분 경중/중등도 척수손상 모델을 사용하는데 실제 환자에서는 심각한 신경기능 손실을 보이는 중중 손상이 문제이며, 모델동물에서 사용한 척수손상의 종류와 세포이식 시기 등이 실제 임상시험에서 적절한 대상환자를 결정하는데 중요한 요인이 되고, 3) 척수손상의 정도 및 위치도 임상시험에서는 중요한 고려사항인데, 예를 들면 신경영양인자 투여 혹은 수초화를 촉진시키는 치료법은 손상부위 척수조직이 일부 남아 있는 불완전 척수손상 환자에게 적용하는 것이 더 적절할 것이며, 경추손상 환자가 흉추/요추손상 환자보다 훨씬 많지만 경추손상 환자에서 새로운 치료법의 실패는 더 큰 부작용을 남길 가능성이 있다. 4) 중등도 혹은 불완전 척수손상은

자연회복률이 높아 새로운 치료법의 유효성을 판정하는데 어려움이 있고, 유효성 판정 시 신경기능의 임상적 평가 외에 전기생리학적 검사, 영상검사 등을 함께 하는 것이 도움이 될 것이며, 5) 세포이식에 따른 종양 혹은 신경성 통증 등 부작용 발생 가능성을 항상 주의하여야 한다. 그 외 최근에는 보다 객관적, 체계적, 윤리적 임상시험 적용을 위한 국제적 노력의 일환으로 International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis에서는 임상시험을 위한 지침을 제정하기도 하였다[57-60].

척수손상 환자에서 줄기세포 이식치료는 아직 극히 초보적이고 미성숙 단계인데, 전 세계에서 과학적인 합당한 이유와 대조군도 없이 성급한 많은 임상시험이 진행되어 치료효과 평가가 쉽지 않고 부작용 발생이 우려되며, 이러한 무분별한 임상시도는 오히려 줄기세포 전체 연구분야에 역효과를 발생할 수 있다. 그러나 척수손상 동물실험에서의 긍정적인 결과를 바탕으로 비교적 과학적으로 잘 고안된 일부 시험적인 임상시험이 시작되었는데, 골수유래 단핵구 세포 혹은 골수유래 줄기세포, 제대혈 줄기세포, olfactory ensheathing cells, Schwann cells, activated macrophage, T cells 등이 실제 척수손상 환자에 이식되었고[61-69], 최근 중국에서 만성 척수손상 환자에서 제대혈 단핵구세포와 lithium을 주사하는 대규모 임상시험이 진행되고 있으나 아직 결과가 보고되지 않았으며[70], 미국의 Geron은 인간 배아줄기세포 유래 희소돌기아교세포 전구세포를 급성 척수손상 환자에 이식하는 임상시험을 FDA에서 승인 받았다. 그럼에도 불구하고 현재까지의 연구결과 척수손상 환자에서 일부 줄기세포 혹은 세포이식은 특별한 부작용 발생은 보고되지 않았으나, 신경기능 개선효과가 없었거나 있어도 극히 제한적인 유효성을 보였다. 따라서 척수손상 환자에서 줄기세포 치료는 아직 허용되지 않은 상태이다[20,47].

척수손상 환자에서 인간 신경줄기세포 이식 임상시험

본 연구팀은 상기 HI 뇌 손상 모델 및 환자에게 이식한 동일한 인간 신경줄기세포를 사용하여, 동물실험으로 성체

Sprague-Dawley rat에서 NYU impactor로 흉추 9번 척수(T9) 위치에 좌상성(contusion) 척수손상을 유발하고 1주일 후 척수손상 부위에 인간 신경줄기세포를 이식하였다. 척수 조직 분석결과 공여세포는 척수손상 부위 및 접경부위에 광범위하게 생착, 이주함을 보였고, 일부 신경원세포, 희소돌기아교세포, 성상세포로 분화함을 보였으나 대부분은 미분화 상태로 있었으며, 공여세포가 생착된 부위 위로 일부 옮겨진 숙주 척수신경세포들의 성장이 촉진됨을 보였고, 실제 운동 및 감각신경세포 돌기가 손상부위 및 그 주변부에 신전됨을 확인하였다. 세포이식 10주 후까지 정기적으로 뒷발의 이동 운동, 운동유발전위검사(motor evoked potential), 체성감각 유발전위검사(somatosensory evoked potential), 신경성 통증 발생 여부를 관찰한 결과, 세포 이식군은 대조군에 비해 뒷발의 운동기능이 증가하였고, 운동 및 체성감각 유발전위검사 상 해당 파(wave)의 진폭(amplitude)은 증가하고 잠재기(latency)는 감소함을 보였으며, 신경성 통증이 악화되지 않았다. 그 외 숙주동물 척수 조직학적 검사상 대조군에 비해 이식군의 신경염증 반응이 증가하지 않았고, 비정상적인 신경행동 소견이나 종양 형성 등은 보이지 않았다.

본 연구팀은 상기 연구결과를 바탕으로 ‘척수손상 환자에서 동종 인간 신경줄기세포 이식에 의한 세포치료법 확립’이란 연구자 주도 임상시험 계획서를 연세의대 세브란스병원 기관생명윤리위원회에 제출하여 승인받았고, 2006년 식약청에서 임상시험 시행을 허가받았다. 본 연구는 비무작위, 전향적, 공개적 임상연구(phase I/IIa)인데, 환자의 나이는 18세에서 60세 사이 성인이고, 외상으로 인한 경추 손상 환자이며, 2002 International Standards for Neurological Classification of SCI 평가 지침서에 따라[55] American Spinal Injury Association Impairment Scale (AIS) 신경학적 검사상 AIS grade A (AIS-A, 척수손상 부위보다 아래 부위에 운동 및 감각기능이 없는 완전 척수손상) 및 AIS-B(척수손상 부위보다 아래 부위에 운동기능은 없고, 천추[sacral vertebral segment] 4-5번 부위[S4-S5]를 포함한 부위에 일부 감각기능이 남아있는 불완전 척수손상) 환자를 대상으로 하였고, 척추손상 부위가 2군데 이상, 척추 뼈의 불완전

고정, 약물남용, 다른 내과적, 신경학적 및 정신과적 질환, 뇌 손상, 척추 외 다른 뼈의 골절 혹은 관절위축 등이 동반된 환자, 다른 줄기세포 혹은 세포이식 받은 환자, 말초신경전도검사(peripheral nerve conduction studies) 상 척수손상에 동반하여 말초신경 및 신경근 손상이 동반된 환자는 모두 제외하였다. 외상으로 인한 척수손상으로 세브란스병원 신경외과 및 재활의학과에 입원한 환자를 대상으로 상기 임상시험 기준에 적합하며, 환자 및 보호자가 줄기세포 이식 치료에 동의한 경우에 한하여 세브란스병원 세포치료센터에서 배양된 인간 신경줄기세포를 전신마취 하에 수술 방에서 신경외과 의사가 척수에 이식하였다. 세포이식 전과 이식 후 정기적으로 혈액검사, 이학적 및 신경학적 검사, AIS 신경학적 검사(AIS grade, ASIA motor score [AMS], ASIA pin prick score, ASIA light touch score, neurological level), 척수 MRI 검사, 전기생리검사(운동유발전위검사, 체성감각 유발전위검사, 근전도검사), 신경성 통증 평가검사(visual analogue scale), 강직 평가검사(modified Ashworth scale)를 실시하였다. 세포이식 위치는 수술 전 척수 MRI 검사하고 위치를 확인하였는데, 전신마취 하에 손상 부위에 척추후궁절제술(posterior laminectomy)을 시행한 후 경막을 열고 척수손상 중앙부, 중앙부에서 5 mm 떨어진 근위부와 원위부에 23G 바늘로 척수 표면에서 5 mm 깊이로 들어가 1×10^5 /microliter 농도의 미분화 인간 신경줄기세포를 각각 500, 250, 250 microliter씩 천천히 주사하였다. 동종세포 이식에 따른 면역억제반응을 회피하기 위하여 세포이식 4일 전부터 면역억제제인 cyclosporine (3 mg/kg)을 투여하기 시작하여 4주간 투여하고, 2 mg/kg로 감량하여 3주간 투여하고, 다시 1 mg/kg로 감량하여 2주간 투여하였다.

현재까지 총 19명의 경추 척수손상 환자 (AIS-A, 17명; AIS-B, 2명)에서 인간 신경줄기세포를 이식하고 세포이식 후 1년 이상 추적검사를 완료하였고, 대조군은 같은 연구기간 동안 외상성 경추손상을 받고 연세의대 세브란스병원 재활의학과에 입원하여 AIS 신경학적 검사 상 AIS-A 및 B 환자로 판명되고 1년 이상 추적검사를 실시한 15명 환자를 대상으로 하였다. 세포이식 군에서 줄기세포 이식과 직접 관련된 척수출혈, 뇌막염/척수염, 척수종양, 척수 공동증

(syrinx), 경련, 통증, 강직, 면역쇼크, 신경학적 기능 악화, 비 정상적인 신경학적/신경행동학적 이상 소견은 관찰되지 않았으며, 세포이식 2개월, 6개월, 1년 후에 찍은 척수 MRI 검사에서도 척수손상 부위가 확대되거나 이상소견이 관찰되지 않아 인간 신경줄기세포 이식은 안전하고 적용 가능한 세포치료법임을 보여주고 있다. 세포치료의 유효성 여부는 본 임상연구가 이중맹검 무작위 대조시험이 아니고, 척수 MRI 검사 상 환자마다 척수손상의 해부학적 위치, 정도, 범위 및 신경병리 소견이 다양하며, 세포이식 시기도 아급성에서 만성까지 범위가 넓어 현재로서는 명확한 평가를 할 수 없다. 그러나 이식군에서 불완전 척수손상을 보인 AIS-B 환자 2명은 1년 후 모두 AIS-D로 변하여 척수손상 부위보다 아래부위에 운동기능이 회복되고, 주요근육의 50% 이상에서 근육기능점수가 3점 이상 이어서 부축기를 잡고 걸을 수 있으며[5], 완전 손상을 보인 AIS-A 환자 17명 중 3명에서 AIS-B 혹은 C 로 변하여 일부 운동 및 감각기능이 회복됨을 보였다. 완전 척수손상 환자 중 특히 세포이식을 척수손상 후 3-8주 사이의 아급성기에 이식 받은 환자 중 30%에서 AIS grade의 변화를 보였다. 그러나 대조군 15명에서는 최초 신경학적 평가 후 1년 후에 실시한 검사에서 AIS grade의 변화를 보인 환자는 없었으며, 평균 AMS 점수도 대조군에 비해 이식군에서 유의하게 증가되었으며, 운동 및 감각신경기능이 정상을 보이는 가장 낮은 척수분절(spinal segment)을 가리키는 neurological level의 변화도 이식군에서 대조군에 비해 유의하게 증가함을 보였다. 따라서 경추 척수손상 환자에서 인간 신경줄기세포 이식 치료는 안전하고 적용 가능하며, 어느 정도의 신경학적 유효성을 보이거나 향후 보다 많은 환자를 대상으로 이중맹검 무작위 대조시험을 실시하여 장기간에 걸쳐 세포치료의 안전성 및 유효성을 평가하는 임상시험이 필요하다.

결 론

신경줄기세포는 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가갱신을 보이고, 한 개의 줄기세포로부터 다양한 신경원세포 및 교세포로 분화하는 분화의 다능성을 보이는 세포를 의미한

다. 이러한 신경줄기세포는 태아기에서는 신경계 전반에 걸쳐 다양한 해부학적 부위에 존재하여 신경계를 형성하며, 한번 손상되면 재생되지 않는 것으로 알려져 있는 인간을 포함한 포유류의 성체 중추신경계에도 존재하고 일생을 통하여 증식·분화하여 새로운 신경원 및 교세포를 생성한다. 신경줄기세포는 시험관 내에서 장기 배양할 수 있고, 생체 내 이식 시 공여세포는 생착, 이주 및 분화하여 숙주신경계에 통합되며, 외부 유전자를 발현하고, 이식 전 미리 신경원 및 교세포로 분화 유도할 수 있게 됨에 따라 퇴행성 신경계질환에서 본 세포를 이용한 신경재생치료 가능성에 관심이 증가하고 있다. 본 연구팀은 임신 13주에 유산되어 사망한 태아의 종뇌 부위에서 인간 신경줄기세포를 배양·확립하여 생체 내외에서 특성 분석한 후, 기관생명윤리위원회와 식약청 허가 하에 주산기 중증 HI 뇌 손상 환아와 외상성 경추 손상으로 운동완전 척수손상을 보이는 성인환자를 대상으로 인간 신경줄기세포를 이식하는 연구자 임상시험을 시행하였다. 현재까지 줄기세포 이식에 따른 특별한 부작용을 관찰할 수 없었고 일부 환자에서 신경기능의 호전을 관찰할 수 있어, 급성 뇌·척수손상 소아 및 어른 환자에서 인간 신경줄기세포의 뇌·척수 이식은 안전하고 적용가능하며, 어느 정도의 신경기능 개선효과의 가능성을 보였다. 따라서 향후 보다 많은 환자를 대상으로 이중맹검 무작위 대조시험을 통하여 장기간에 걸쳐 신경줄기세포 치료의 안전성 및 유효성을 평가하는 임상시험이 필요하다.

Acknowledgement

This work was supported by the Stem Cell Research Center, Healthcare Technology R&D Project (A091159), and National Research Foundation (NRF) grant (2010-0020289) by Korean Government, and the Faculty Grant of Yonsei University College of Medicine.

핵심용어: 신경줄기세포; 저산소성 허혈성 뇌손상; 척수손상; 세포치료

REFERENCES

1. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neu-

rons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2074-2077.

2. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994;264:1145-1148.

3. Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 1993;11:173-189.

4. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 1996;383:624-627.

5. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433-1438.

6. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4:1313-1317.

7. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-1710.

8. Fowler CD, Liu Y, Wang Z. Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev* 2008;57:342-351.

9. Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1477-1497.

10. Cameron HA, Dayer AG. New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biol Psychiatry* 2008;63:650-655.

11. Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:65-71.

12. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 2002;20:1111-1117.

13. Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3024-3029.

14. Ashton RS, Banerjee A, Punyani S, Schaffer DV, Kane RS. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. *Biomaterials* 2007;28:5518-5525.

15. Cullen DK, Stabenfeldt SE, Simon CM, Tate CC, LaPlaca MC. In vitro neural injury model for optimization of tissue-engineered constructs. *J Neurosci Res* 2007;85:3642-3451.

16. Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, Fehlings MG, Stupp SI, Kessler JA. Self assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *J Neurosci* 2008; 28: 3814-3823.

17. Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani



- G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 2005;436:266-271.
18. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3:537-544.
 19. Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, Clark D, Rose H, Fu G, Clarke J, Mc Kercher S, Meerloo J, Muller FJ, Park KI, Butters TD, Dwek RA, Schwartz P, Tong G, Wenger D, Lipton SA, Seyfried TN, Platt FM, Snyder EY. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat Med* 2007;13:439-447.
 20. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders: time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010; 120:29-40.
 21. Kokovay E, Shen Q, Temple S. The incredible elastic brain: how neural stem cells expand our minds. *Neuron* 2008; 60:420-429.
 22. Study of HuCNS-SC cells in patients with infantile or late infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) [Internet]. Bethesda (MD): U. S. National Institute of Health [updated 2010 Nov 5; cited 2011 Apr 29]. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00337636?term=batten&rank=4>.
 23. Lau D, Ogbogu U, Taylor B, Stafinski T, Menon D, Caulfield T. Stem cell clinics online: the direct-to-consumer portrayal of stem cell medicine. *Cell Stem Cell* 2008;3:591-594.
 24. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207(Pt 18):3149-3154.
 25. Dilenge ME, Majnemer A, Shevell MI. Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. *J Child Neurol* 2001;16:781-792.
 26. Sahni R, Sanocka UM. Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Perinatol* 2008;35:717-734, vi.
 27. Park KI, Hack MA, Ourednik J, Yandava B, Flax JD, Stieg PE, Gullans S, Jensen FE, Sidman RL, Ourednik V, Snyder EY. Acute injury directs the migration, proliferation, and differentiation of solid organ stem cells: evidence from the effect of hypoxia-ischemia in the CNS on clonal "reporter" neural stem cells. *Exp Neurol* 2006;199:156-178.
 28. Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Houry SJ. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 18117-18122.
 29. Park KI, Himes BT, Stieg PE, Tessler A, Fischer I, Snyder EY. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: Evidence from engraftment of Neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol* 2006;199:179-190.
 30. Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, Kilic E, Kilic U, Salani G, Brambilla E, West MJ, Comi G, Martino G, Hermann DM. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain* 2009;132(Pt 8):2239-2251.
 31. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM, Hong NH, Kim JH, Ban JJ, Park HK, Kim SU, Park CG, Lee SK, Kim M, Roh JK. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain* 2008;131(Pt 3):616-629.
 32. de Paula S, Greggio S, DaCosta JC. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86:451-464.
 33. Pimentel-Coelho PM, Mendez-Otero R. Cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stem Cells Dev* 2010;19:299-310.
 34. Cord blood for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [Internet]. Bethesda (MD): U. S. National Institute of Health [updated 2009 Oct 19; cited 2011 Apr 29]. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00593242>.
 35. Barbosa da Fonseca LM, Gutfilen B, Rosado de Castro PH, Battistella V, Goldenberg RC, Kasai-Brunswick T, Chagas CL, Wajnberg E, Maiolino A, Salles Xavier S, Andre C, Mendez-Otero R, de Freitas GR. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. *Exp Neurol* 2010;221:122-128.
 36. Correa PL, Mesquita CT, Felix RM, Azevedo JC, Barbirato GB, Falcao CH, Gonzalez C, Mendonça ML, Manfrim A, de Freitas G, Oliveira CC, Silva D, Avila D, Borojevic R, Alves S, Oliveira AC Jr, Dohmann HF. Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke. *Clin Nucl Med* 2007;32:839-841.
 37. Lee JA, Kim BI, Jo CH, Choi CW, Kim EK, Kim HS, Yoon KS, Choi JH. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatr Res* 2010;67:42-46.
 38. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun* 2010;24:387-393.
 39. Janowski M, Walczak P, Date I. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev* 2010;19:5-16.
 40. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke Participants. *Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular*

- and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke* 2009;40:510-515.
41. Li L, Jiang Q, Ding G, Zhang L, Zhang ZG, Li Q, Panda S, Lu M, Ewing JR, Chopp M. Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an MRI study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:653-662.
 42. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38(2 Suppl):817-826.
 43. Borlongan CV. Cell therapy for stroke: remaining issues to address before embarking on clinical trials. *Stroke* 2009;40(3 Suppl):S146-S148.
 44. Kim HT, Kim IS, Lee IS, Lee JP, Snyder EY, Park KI. Human neurospheres derived from the fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed. *Exp Neurol* 2006;199:222-235.
 45. Barnabe-Heider F, Frisen J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 2008;3:16-24.
 46. Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M. Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2009;32:105-114.
 47. Sahni V, Kessler JA. Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nat Rev Neurol* 2010;6:363-372.
 48. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;181:115-129.
 49. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14069-14074.
 50. Hofstetter CP, Holmström NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisén J, Olson L. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 2005;8:346-353.
 51. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005;25:4694-4705.
 52. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Morshead CM, Fehlings MG. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26:3377-3389.
 53. Ziv Y, Avidan H, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. Synergy between immunecells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13174-13179.
 54. Salazar DL, Uchida N, Hamers FP, Cummings BJ, Anderson AJ. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model. *PLoS One* 2010;5:e12272.
 55. Hooshmand MJ, Sontag CJ, Uchida N, Tamaki S, Anderson AJ, Cummings BJ. Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery. *PLoS One* 2009;4:e5871.
 56. Yan J, Xu L, Welsh AM, Hatfield G, Hazel T, Johe K, Koliatsos VE. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord. *PLoS Med* 2007;4:e39.
 57. Steeves JD, Lammertse D, Curt A, Fawcett JW, Tuszynski MH, Ditunno JF, Ellaway PH, Fehlings MG, Guest JD, Kleitman N, Bartlett PF, Blight AR, Dietz V, Dobkin BH, Grossman R, Short D, Nakamura M, Coleman WP, Gairia M, Privat A; International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: clinical trial outcome measures. *Spinal Cord* 2007;45:206-221.
 58. Fawcett JW, Curt A, Steeves JD, Coleman WP, Tuszynski MH, Lammertse D, Bartlett PF, Blight AR, Dietz V, Ditunno J, Dobkin BH, Havton LA, Ellaway PH, Fehlings MG, Privat A, Grossman R, Guest JD, Kleitman N, Nakamura M, Gairia M, Short D. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. *Spinal Cord* 2007;45:190-205.
 59. Lammertse D, Tuszynski MH, Steeves JD, Curt A, Fawcett JW, Rask C, Ditunno JF, Fehlings MG, Guest JD, Ellaway PH, Kleitman N, Blight AR, Dobkin BH, Grossman R, Katoh H, Privat A, Kalichman M; International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: clinical trial design. *Spinal Cord* 2007;45:232-242.
 60. Tuszynski MH, Steeves JD, Fawcett JW, Lammertse D, Kalichman M, Rask C, Curt A, Ditunno JF, Fehlings MG, Guest JD, Ellaway PH, Kleitman N, Bartlett PF, Blight AR, Dietz V, Dobkin BH, Grossman R, Privat A; International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP Panel: clinical trial inclusion/exclusion criteria and ethics. *Spinal Cord* 2007;45:222-231.
 61. Feron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, Geraghty T, Mackay-Sim A. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain* 2005;128(Pt 12):2951-2960.
 62. Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, Marder JB, Yoles E, Belkin M, Schwartz M, Hadani M. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a

- treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. *J Neurosurg Spine* 2005;3:173-181.
63. Moviglia GA, Fernandez Vina R, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, Bastos F, Farina P, Etcheagaray G, Barbieri M, Martinez G, Picasso F, Schmidt Y, Brizuela P, Gaeta CA, Costanzo H, Moviglia Brandolino MT, Merino S, Pes ME, Veloso MJ, Rugilo C, Tamer I, Shuster GS. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy* 2006;8:202-209.
 64. Sykova E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konradova SL, Kobyłka P, Padr R, Neuwirth J, Komrská V, Vavra V, Stulik J, Bojar M. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 2006;15:675-687.
 65. Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, Choi BH, Park H, Ha Y. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 2007;25:2066-2073.
 66. Geffner LF, Santacruz P, Izurieta M, Flor L, Maldonado B, Auad AH, Montenegro X, Gonzalez R, Silva F. Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes is safe and improves their quality of life: comprehensive case studies. *Cell Transplant* 2008; 17:1277-1293.
 67. Mackay-Sim A, Feron F, Cochrane J, Bassingthwaighe L, Bayliss C, Davies W, Fronck P, Gray C, Kerr G, Licina P, Nowitzke A, Perry C, Silburn PA, Urquhart S, Geraghty T. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain* 2008;131(Pt 9):2376-2386.
 68. Saberi H, Moshayedi P, Aghayan HR, Arjmand B, Hosseini SK, Emami-Razavi SH, Rahimi-Movaghar V, Raza M, Firouzi M. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci Lett* 2008;443:46-50.
 69. Lima C, Escada P, Pratas-Vital J, Branco C, Arcangeli CA, Lazzeri G, Maia CA, Capucho C, Hasse-Ferreira A, Peduzzi JD. Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 2010;24:10-22.
 70. Lithium and cord blood cell for spinal cord injury [Internet]. Wanchai: Chinese Spinal Cord Injury Network [cited 2011 Apr 11]. Available from: http://www.chinascinet.org/index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=57.



Peer Reviewers' Commentary

본 논문은 신생아 저산소성 허혈성 뇌손상 환아와 척수손상 환자에 대해 국내에서는 처음으로 연구자 임상시험으로 시도한 동종 인간신경줄기세포 치료 경험과 약 2년 이상 추적 경과에 대해 자세히 기술하고 있다. 또한 신경줄기세포의 특성과 임상 적용시 신경줄기세포를 세포치료제로 사용하는 경우 반드시 고려되어야 할 사항도 요약하여 기술하였다. 본 임상적용 결과는 자가줄기세포를 이용한 임상시험의 한계를 넘어 인간 신경줄기세포의 뇌·척수 이식은 안전하고 적용 가능하며, 제한된 신경기능 개선효과의 가능성을 보인 것을 증명한 귀중한 임상자료를 제시하고 있지만, 한편 필자는 향후 보다 많은 환자를 대상으로 이중 맹검 무작위 대조시험을 통하여 장기간에 걸쳐 신경줄기세포 치료의 안전성 및 유효성을 평가하는 임상시험이 더 필요하다는 신중한 의견도 제시하고 있다.

[정리:편집위원회]