

Regenerative Cell Therapy for the Sensorineural Hearing Loss

Kyoung Ho Park

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Sensorineural hearing loss is the most common disability in the world and nearly one third of all individuals over the age of 65 are affected. For hearing handicapped people, many devices (hearing aid, cochlear implant, middle ear implant etc.) have been developed to reduce or overcome the disability. But these devices do not give perfect benefit to the patients functionally and there are aesthetic problems. That is why researchers have interest in regenerative measures to restore or prevent hearing loss. Recently there were fruitful results from gene and stem cell therapy research for hearing loss. Gene therapy with *Atoh 1* gene and transplantation of stem cells into the cochlea regenerate damaged hair cells and morphologically restore spiral ganglion neurons allowing functional hearing in the deaf animal model. Based on these results, many countries including Korea have done clinical trials in deaf patients. The past ten years have shown an incredible advancement in medical biotechnology in the otologic field and this progress may someday substitute the medical devices for the hard of hearing patients.

Key Words: Hearing Loss, Sensorineural; Regenerative Medicine; Stem Cells

Correspondence to: Kyoung Ho Park
우137-701, 서울시 서초구 반포대로 222,
가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
Department of Otorhinolaryngology-Head
and Neck Surgery, Seoul St. Mary's Hospi-
tal, 222 Banpo-daero, Seocho-gu,
Seoul 137-701, Korea
Tel: +82-2-2258-6213
Fax: +82-2-595-1354
E-mail: khpent@catholic.ac.kr

Received 22 February 2015

Revised 18 March 2015

Accepted 23 March 2015

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

난청은 세계적으로 가장 흔한 장애 중 하나로서, 65세 이상의 노인 중 30%는 일상 생활에 지장을 받을 정도의 청력 저하를 가지고 있다. 2009년부터 2012년까지 실시된 국민건강영양조사 사업에 따르면 우리 나라에서도 70세 이상의 노인 인구 중 25-30%에서 양측 귀에 40 dBHL 이상의 난청을 가지고 있는 것이 확인 되었다(Fig. 1). 또한 항생제나 항암제 등과 같은 이독성 약물의 사용으로 그 비율은 더 많을 것으로 예상된다.

난청이 발생하게 되면 말초 기관의 손상과 함께 와우내와 중추 청각로에 심한 위축이 발생하게 된다. 정상적인 내유모세포의 경우 소리 자극에 따라 와우신경에 활동성 자극을 주게 되는데, 내유모세포의 손상은 와우신경절의 퇴화를 유발하게 되어 난청을 초래하게 된다.

최근 보청기 소프트웨어 및 하드웨어의 발달은 난청인들에게 많은 도움을 주고 있다. 그러나 보청기를 사용할 수 없는 청력이거나 상태에 따라 보청기 착용이 불가능할 경우에는 중이 이식기(middle ear implant)나 골전도 이식기(BAHA, Sophono, Bonebridge 등), 인공와우 이식기 등이 사용된다. 하지만 이러한 장치는 수술비를 포함하여 이식기 자체에 많은 비용이 들고, 미용적인 면에서 외부로의 장치가 드러나는 점을 고려할 때 적용의 한계가 있다. 그리고 말초 기관의 손상과 퇴화, 이와 관련된 와우신경절, 청각중추로의 퇴화는 이러한 장치의 효과를 감소시킨다.

10여 년 전부터 청각 재활에 관한 세포 수준의 많은 연구가 진행되었고 유용한 결과의 발표로 임상 시험들이 시도되었다. 노령화 사회가 진행됨에 따라 청력 회복에 대한 재생 의학적 치료의 요구가 늘어나고 있고, 최근 생명 공학의 기술 발전과 더불어 타 질환에서의 세포 수준의 임상 적용 연구가 활발함에 따라 난청의 치료 가능

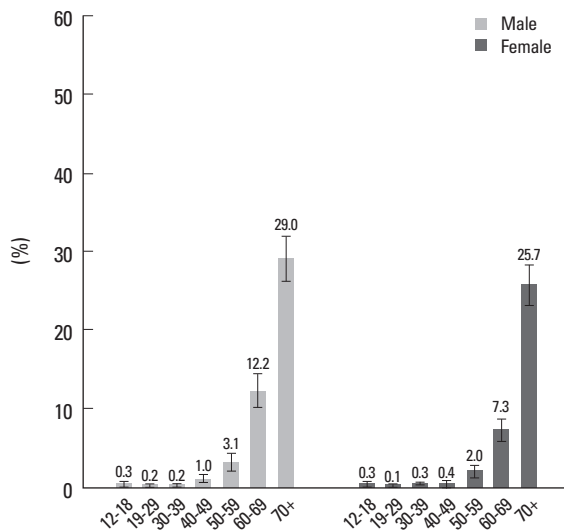


Fig. 1. Prevalence of bilateral hearing loss (>40 dBHL) among the Korean population (>12 years old) (data from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2012).

성을 한층 더 높여주고 있다. 이에 본 논문에서는 난청 치료를 위한 세포 치료의 연구 내용과 그 결과에 대해서 리뷰해 보도록 하겠다.

본 론

세포 수준에서 난청 치료 연구의 전략적 목표는 소실된 유모세포와 와우신경절 신경세포의 재생을 유도하고 이를 통해 기능적 회복을 얻는 데 있다. 이를 위한 재생 의학적 연구는 1) 줄기세포를 통한 치료 연구, 2) 유전자 치료를 통한 연구 그리고 3) 유전자 발현을 조절하는 약제 개발과 재생과 관련된 성장 인자 주입을 통해서 재생을 유도하는(*in-situ* self repair therapy) 연구로 크게 나눌 수 있다. 이들은 모두 장단점을 가지고 있으며 현재까지의 연구 결과를 바탕으로 성체줄기세포와 유전자 발현 조절 약물, 그리고 성장 인자를 통한 치료가 곧 임상에 적용 가능할 것으로 보여지며 각각의 연구 내용들에 대해서 간단히 소개해 보고자 한다.

1. 줄기세포를 이용한 세포치료 연구

줄기세포는 그 원천에 따라 배아 줄기세포와 성체 줄기세포로 크게 구분할 수 있고 성체세포를 유전자 조작 등을 통해서 배아 줄기세포와 같이 증식성을 가진 유도만능줄기세포가 개발되어 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

배아 줄기세포를 이용한 연구에서는 2003년 Li 등이 배아줄기세포로부터 내이전구세포(inner ear progenitor)로 분화를 유도하는 프로토콜을 제시하였고, 이러한 전구세포에서는 내이 특이적인 유전자 표지자를 발현하였다. 분화를 유도하였을 때 유모세포의 발생과 유지에 중요한 *Math 1* (murine atonal homologue 1)과 *Brn3.1*

이 발현되었고 이와 함께 유모세포의 구조 단백질인 *myosin VIIa*, *parvalbumin 3*과 *espin*의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다[1]. 이러한 배아 줄기세포를 난청 동물 모델에 주입하였을 때 줄기세포로부터 신경세포가 분화되었으며 이로부터 신경 돌기들이 코르티 기관으로 자라 들어감을 확인할 수 있었다[2]. 2004년 Kojima 등은 배아의 뇌신경에서 얻은 신경구(neurosphere)에 대해 분화를 유도하였을 때 유모세포 표현형의 단백질 표지자인 *Brn-3c*와 *myosin VIIa*를 발현하는 세포로 분화가 가능하여 이와 같이 미성숙한 신경전구체가 손상된 내이 유모세포의 치료 물질로 사용될 수 있음을 확인하였다[3]. 난청을 유발한 동물에서 미성숙한 신경 전구체를 내이에 직접 주입하였을 때 이들이 코르티 기관 내에 정착됨을 확인할 수 있었고 전자 현미경 소견상 손상된 내이 유모세포가 재생되었다. 이와 함께 청성뇌간반응을 통한 청력 검사를 통해서 기능적으로도 청력이 회복됨을 확인할 수 있었다[4]. 배아 줄기세포를 이용하여 내이의 손상된 유모세포나 신경세포의 재생과 기능적 회복을 유도할 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 배아 줄기세포의 획득 과정에서 윤리적인 문제가 유발되며, 주입 후 종양 형성 가능성 등의 문제는 아직 해결되지 않고 있어서 실제 임상적인 적용에는 한계가 있고 지속적인 연구가 더 필요한 실정이다.

최근 이러한 배아 줄기세포가 가지는 한계점을 극복하는 연구가 소개 되었는데 이것이 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell)이다. 이는 체세포에 강제로 특정 유전자를 발현시켜 만드는 것이다. 2006년 교토대학의 Shinya Yamanaka 등이 처음 mouse에서 만들어 제안하였고 2007년에는 사람의 체세포를 이용하여 만들어 보고하였다[5-7]. 주로 retrovirus를 이용하여 *Oct-3/4* (encoded by *Pou5f1*), *Sox2* (SRY [sex determining region Y]-box 2), *Klf4* (Kruppel-like factor 4), *cMyc* (regulator gene that codes for a transcription factor) 등을 주입하며, 주입 후 3-4주 후 일부 세포들이 줄기세포와 비슷한 모양과 생화학적 특성을 가지게 되고 이후 세포 모양과 doubling time, reprogramed gene, antibiotic selection을 통해서 줄기세포를 분리하게 된다. 이러한 유도만능줄기세포에서 유래된 신경전구체를 난청 동물 모델을 만든 후에 내이에 주입하였을 때 내이에 성공적으로 정착이 되었고 신경계 세포로 분화를 확인할 수 있었다. 이와 함께 분화된 신경세포에서 유모세포로 신경 돌기가 자라 들어감을 알 수 있었다. 따라서 유도만능줄기세포를 이용해서도 난청의 세포치료에 이용할 수 있음을 확인하였다[8]. 그러나 유도만능줄기세포 역시 종양 형성의 가능성을 가지고 있고 실제로 내이에 주입된 유도만능줄기세포의 일부에서 종양 형성이 보고되어 임상적으로 적용되기 위해서는 이 문제를 해결해야 한다[9].

이와 같은 배아줄기세포나 유도만능줄기세포의 줄기세포성은 임상 시 그 효용성에 유리한 면이 있으나 종양형성이나 배양 과정의 어려움, 그리고 윤리적인 문제는 아직 해결되어야 하고 현재로서는 시일이 좀 더 필요한 실정이다. 따라서 현재 세포 치료를 위한 임

상 연구에 있어서는 성체줄기세포가 매우 유리한 측면이 있고 이와 함께 상당수의 줄기세포치료제가 이미 상용화되어 임상적으로도 적용하기가 상대적으로 용이하다.

먼저 골수유래 중간엽 줄기세포를 이용한 연구를 소개하자면 1999년 Kopen 등이 골수유래 중간엽 줄기세포에서 신경세포로 분화가 가능함을 확인하였다[10-12]. 그리고 2008년 Jeon 등이 이 줄기세포로부터 내이 특이적인 유모세포로 분화됨을 증명하였다[13]. 이 연구에서는 골수에서 중간엽 줄기세포를 분리한 후 신경전구체로 분화를 유도하고 이로부터 *Math1* plasmid의 transfection을 통해서 전구체에서 유모세포로 분화를 유도하였다. 그리고 이 분화된 유모세포는 *myosin VIIa*, *espin*, *Brn3c*, *p27Kip*, 그리고 *jagged2*를 발현하고 있어 내이 특이적인 유모세포임을 확인할 수 있었다(Fig. 2)[14]. 이를 통해서 골수 유래의 중간엽 줄기세포가 내이 질환에 대한 세포치료에 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과와 더불어 난청 동물 모델에 대해서 골수 유래의 중간엽 줄기세포를 내이 내로 주입하였을 때 이들은 내이에 성공적으로 정착되었고 신경세포 및 교질세포의 표지자를 나타내는 세포로 분화됨이 확인되었다[15]. 그리고 이와 같은 실험에서 손상된 와우신경절 신경세포의 재생과 함께 기능적으로 청성뇌간반응이 회복이 되었고 임상적으로 충분히 분화됨을 확인하였다[16].

이러한 연구 결과를 바탕으로 본 연구자는 청신경병증 환자 2명에 대해서 자가 골수 유래 중간엽 줄기세포 이식의 유효성과 안전성을 확인하기 위한 임상 시험을 최초로 시행하였다. 질환의 특성상 청력의 회복을 확인할 수는 없었으나, 1년간의 경과 관찰을 통해서 그 안전성을 확인할 수 있었다. 향후 이에 대한 보강 연구를 통해서 좀 더 활발한 임상 연구를 진행할 계획이다.

출산 과정에 발생하는 태반(양막, 양수, 용모막), 그리고 제대의

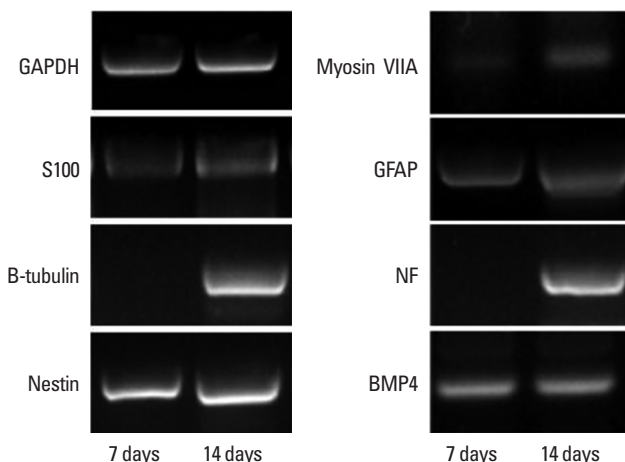


Fig. 2. RT-PCR analyses of gene expression of the differentiated cells from the cultured bone marrow derived mesenchymal stem cell. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; BMP4, bone morphology protein 4.

Warthon's jelly 및 제대혈에는 중간엽 줄기세포가 존재하고 있다. 이들 조직들은 출산과 동시에 대부분 버려지는 조직으로서 이들 조직에서 줄기세포를 획득하는 과정은 윤리적인 면에서 문제가 없으며, 상대적으로 많은 양을 얻을 수 있는 장점이 있다. 이와 함께 동종 간의 이식에 있어서 면역학적으로도 유리한 점이 있다. 또한 종양을 형성하지 않으며 항염증작용과 낮은 면역반응을 보여 실제 임상에서 매우 유용하게 사용될 수 있는 줄기세포의 공급처이다[17-23]. 이와 같은 다양한 분화 능력이 보고되고 있지만 아직 내이 유모세포로의 분화는 보고가 되지 않아 난청 치료에서의 적용 가능성은 알려지지 않았다. 그러나 최근 저자는 사람의 제대혈 중간엽 줄기세포에서 내이 특이적인 유모세포와 신경전구체(neuronal progenitor cell)로의 분화 유도에 성공하였다(Fig. 3)[24]. 이와 함께 난청 동물 모델에서 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 이식시 손상된 유모세포와 와우신경절 신경세포의 재생과 청력 개선의 효과를 보여 향후 임상적 적용에 좋은 전망을 보여 주었다(Fig. 4)[25]. 이는 기존의 이식 연구에서 시행하였던 내이 내 직접 주입이 아닌 혈관 내 주입을 통해서 성공적으로 손상된 내이 내로의 줄기세포 이식을 확인할 수 있었고 이를 통해서 손상된 내이유모세포와 신경세포의 재생을 유도할 수 있었다. 이는 향후 임상 적용에 있어서 줄기세포 이식 경로를 새로 개발하였다는 데에서 매우 중요한 의미이기도 하다. 실제로 사람에게 있어서 직접 내이 내로의 줄기세포의 이식은 임상적으로 환자로 하여금 난청의 심화와 이명, 그리고 어지럼증 등의 부작용을 유발할 수 있기 때문이다. 앞서 언급한 자가 골수 유래 중간엽 줄기세포 혈관 내 주입을 통한 임상 시험에서도 이전의 연구 결과와 선행 연구 결과를 바탕으로 중심 정맥을 통해서 주입하였고 주입 후 아무런 합병증 없이 임상시험을 진행할 수 있었다.

태반 유래의 조직에서 분리된 중간엽 줄기세포의 난청에 대한 세포치료 분야에서는 아직까지 제대로 된 연구 결과가 발표된 바가 없었으나 본 저자의 연구진들은 2010년부터 이에 대한 연구를 진행하였다. 사람의 태반 조직에서 양막과 용모막, wharton's duct를 각각 분리하여 중간엽 줄기세포를 배양하였고 이로부터 내이 유모세포와 신경세포로의 분화를 유도하였다(PCT patent; PCT/KR2014/009485). 각기 분리된 중간엽 줄기세포는 골수나 제대혈의 중간엽 줄기세포와 같이 CD73, CD90, CD105를 발현하고 있었고, CD34, CD14, CD19는 발현하지 않았다. 이들의 분리 과정은 앞서의 제대혈 유래 중간엽 줄기세포에서와 동일하였다.

이들 중간엽 줄기세포를 배양 배지의 조성을 달리하여 유모세포와 신경세포로 분화를 유도하였을 때도 앞서의 연구 결과와 같은 표현형에 맞는 표지자를 발현하고 있었다. 또한 난청 동물에 대해서도 양막과 용모막 유래 중간엽 줄기세포를 이식하였을 때도 청력의 개선을 유도할 수 있었다. 이들 결과에 대해서는 현재 특허 출원 중에 있으며 곧 이에 대한 내용을 논문으로 발표할 계획이다(data not shown).

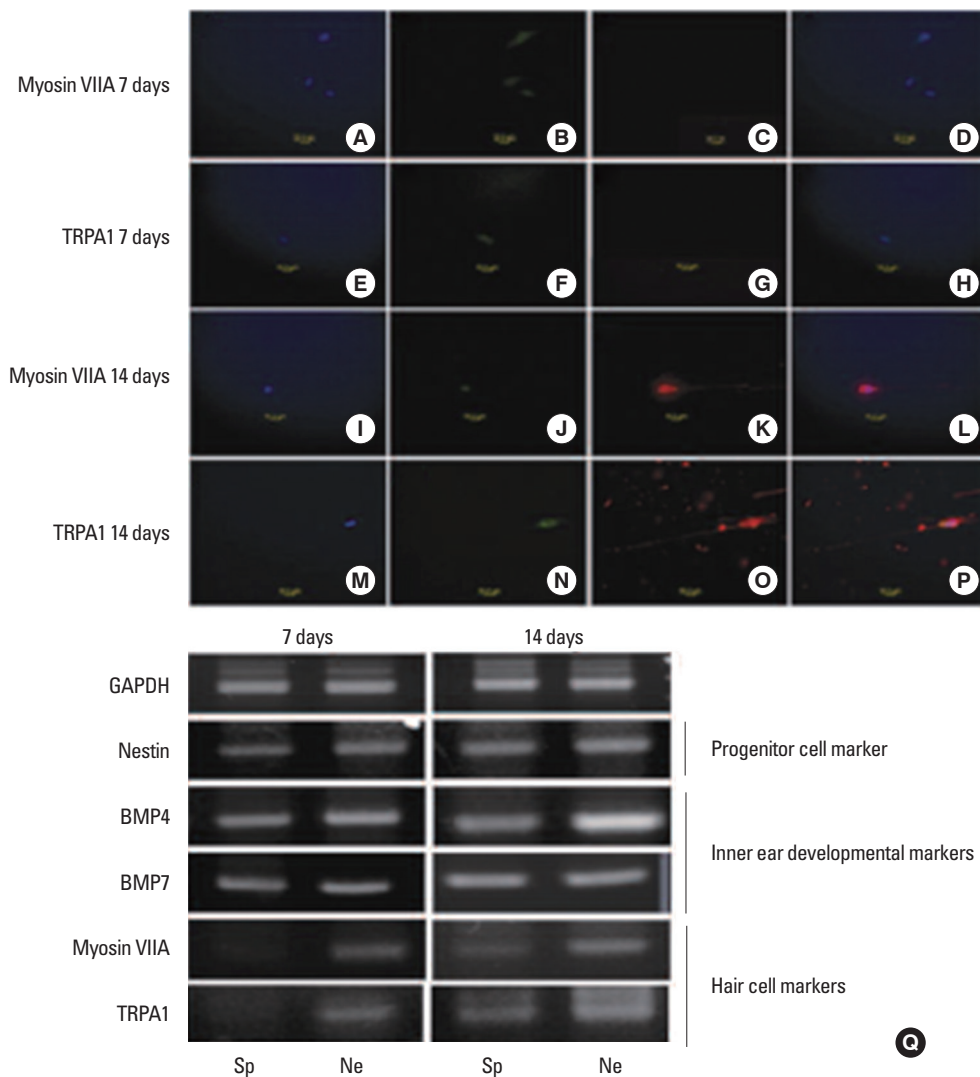


Fig. 3. (A-P) Double-labeled immunocytochemistry of hair cells differentiated from the umbilical cord blood derived mesenchymal stem cell. Nuclei counterstained with DAPI (blue); stained with BrdU (green); all markers visualized with Alexa 555 (red). (D, H, L, P) Merged images, (400, n=3, bars; 50 μ m). (Q) RT-PCR analyses of gene expression of hair cells and specific markers.

BrdU, 5-bromo-2'-deoxy-uridine; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; Sp, neurosphere medium; Ne, neuronal medium.

2. 유전자 치료를 이용한 연구

내이 발생과 관련된 다양한 유전자 중에서 *Atoh 1* gene을 이용한 내이 질환에 대한 유전자 치료 연구 결과가 소개되었다. 이 유전자는 유모세포의 발생에 핵심 유전자로 알려져 있다. Adenovirus를 이용한 내이 내 주입을 통해서 난청이 유발된 실험 동물에서 성공적으로 내이 유모세포의 재생과 기능적으로도 청력 회복을 확인할 수 있었다[26]. 이러한 유전자 치료는 유모세포 주위의 지지세포(supporting cell)를 난청이 발생한 후 퇴화되기 전에 이들 세포를 유모세포로 trans-differentiation시킨다. 이들 세포는 성숙한 유모세포의 표지자를 표현하고 있고 기능도 하게 된다. 내이에 대한 유전자 치료 시에는 adenovirus 외에 herpes virus (HSV), adeno-as-

sociated virus (AAV), sendai virus vector (SEV) 등이 주로 사용되고 있다. 그러나 세포 독성과 면역 반응이 흔한 것으로 알려져 있어 사용의 제한이 있다.

일부 동물 실험에서의 성공적인 청력 회복은 지지세포의 유모세포화에 의한 것이라기 보다는 손상된 유모세포의 재생에 의해 발생한 것으로 알려져 있다. 그리고 성숙한 포유류에서의 실험에서는 지지세포의 유모세포 변화 수율이 적고 성숙한 유모세포 표지자의 발현이 적어서 다른 실험 동물에서와는 다른 결과를 보였다[27].

국내에서는 이에 대한 기초 연구나 임상 연구가 활발히 이루어지지 않고 있지만 현재까지의 연구 결과를 바탕으로 최근 미국 캔사스 대학에서는 45명의 고도 난청을 가진 지원자에 대해서 *Atoh 1*

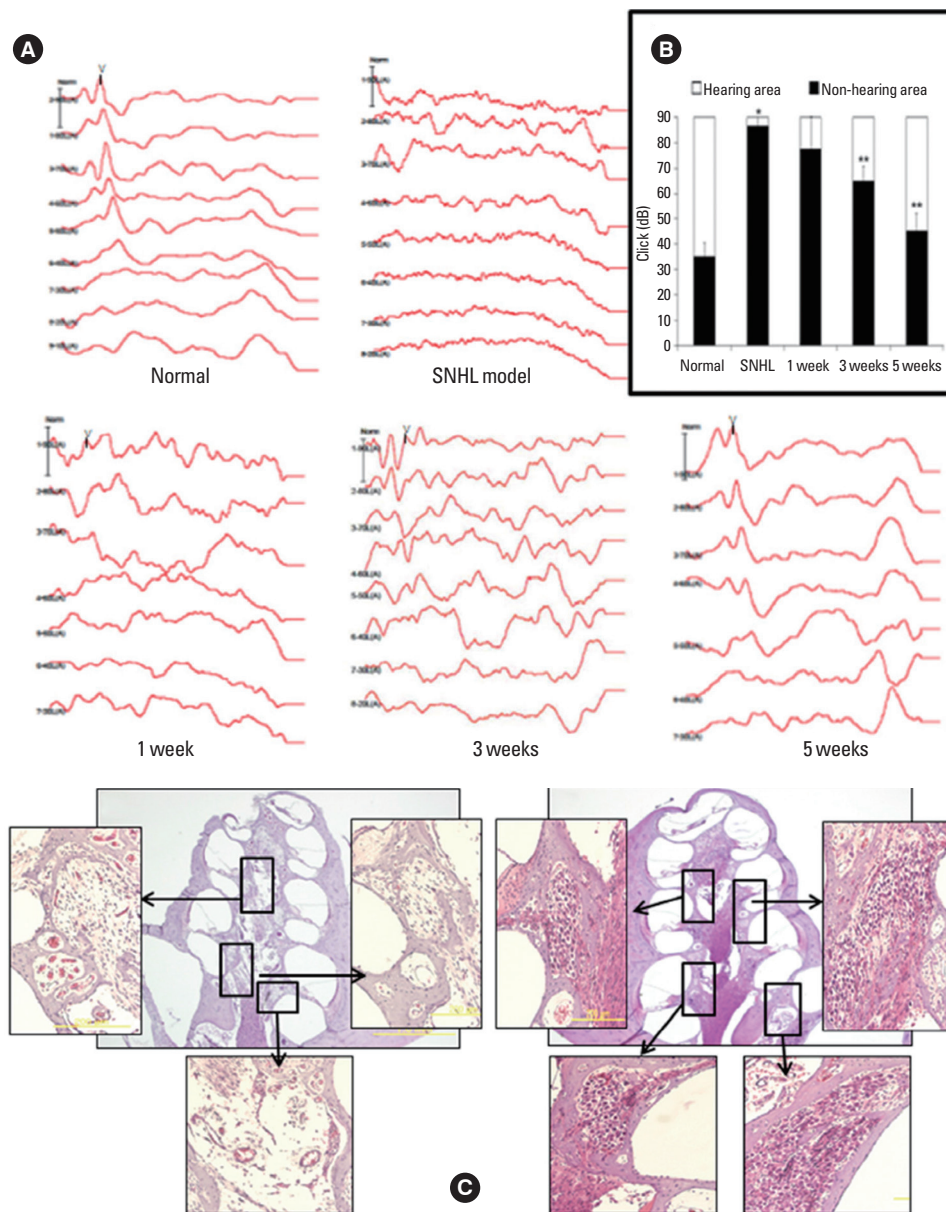


Fig. 4. (A) Auditory brain response (ABR) results compared between normal hearing, SNHL, and UCB-MSC transplantation groups (Top). Click-evoked ABR waves were recorded up to 10 dB in guinea pigs with normal hearing. Three days after application of ouabain and neomycin to the middle ear, an increase was noted in the ABR threshold. After intravenous injection, the UCB-MSC group showed a significant improvement in hearing threshold compared to that for the SNHL group. (B) Representative graph showing the hearing and non-hearing area of each group. Regeneration of SGNs after UCB-MSCs transplantation (Bottom). (C) Severe loss of SGNs from the basal to the apical turn of the cochlea was observed in the SNHL group. (D) Five weeks after transplantation of UCB-MSCs, SGNs were regenerated in all the turns of the cochlea (H & E staining [inside: 40 \times ; n=5; bars, 1.0 mm. outside: 200 \times ; n=5; bars, 100 μ m]).

SNHL, sensorineural hearing loss; UCB-MSC, umbilical cord derived mesenchymal stem cell; SGN, spiral ganglion neuron.

gene를 가진 adenovirus type 5를 이용하여 와우내 이식을 통한 임상 시험을 진행할 계획이다. 이번 임상 시험을 통해서 유전자 치료의 안정성과 효과를 확인하는 계기가 될 것으로 생각된다. 그러나 세포에서의 유전자 발현의 정도를 조절하기가 어려운 점은 임상 적용에 앞서 해결해야 할 문제이다.

3. *In-situ* self repair therapy

일부 성장 인자가 유모세포의 증식과 와우신경절의 생존, 유지에 중요함이 이전의 많은 연구에서 확인되었다. Epidermal growth factor, transforming growth factor α , basic fibroblast growth factor, insulin growth factor 1 (IGF-1) 등이 유모세포의 증식을 유도

Table 1. The number of spiral ganglion cells in a Rosenthal's canal in each group

	Treated	Control
Group 1 1st week	22.667 ± 12.858	29.667 ± 9.626
3rd week	33.750 ± 23.542	25.333 ± 11.535
5th week*	42.166 ± 9.745	25.667 ± 10.191
7th week	24.000 ± 1.000	25.500 ± 4.847
Group 2 1st week	26.333 ± 4.041	27.000 ± 10.139
3rd week	29.666 ± 4.041	23.333 ± 5.921
5th week	26.666 ± 4.949	27.000 ± 10.139
7th week	13.400 ± 7.924	23.166 ± 6.675
Group 3 1st week	34.666 ± 13.316	23.000 ± 10.079
3rd week*	47.000 ± 183.729	26.666 ± 7.284
5th week	34.000 ± 1.414	25.000 ± 8.221
7th week	30.000 ± 1.000	26.500 ± 14.625

Group 1 (BDNF+GDNF+NT-3) on 5 week after the treatment, Group 2 (IGF-1) and Group 3 (EGF+FGF) on 3 week after the treatment.

*P<0.05, significant difference compared with control group.

BDNF, brain derived neurotrophic factor; GDNF, glial cell derived neurotrophic factor; IGF-1, insulin growth factor-1; NT-3, neurotrophin 3; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor.

하는 것으로 알려져 있다[28]. 특히 IGF-1은 MEK/ERK와 PI3K/AKT pathways를 활성화하여 유모세포를 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. Akt가 내이 유모세포의 생존과도 연관되어 있으며 MEK/ERK는 내이 Hensen's과 Claudius'cells의 cell cycle promotion을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 교토 대학의 Ito group에서는 내이의 발달 과정에도 중요한 IGF-1을 스테로이드에 반응하지 않은 돌발성 난청 환자에 대해서 고실 내 투여를 통해서 청력 개선에 있어 유의한 결과를 얻어서 성장 인자의 주입을 통해서 청력 회복의 가능성을 확인하였다[29]. 이와 함께 약물의 효과적인 전달을 도와주는 nanoparticle, poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microparticle, gelatin hydrogel 등을 이용하여 약물이나 성장인자의 효과를 높여주고 있다. 또한 brain-derived neurotrophic factor (BDGF), glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) 등은 소음이나 이독성 약물 노출 후에 와우신경절의 생존에 중요한 것으로 알려져 있다[30].

이와 같은 결과와 더불어 본 연구자의 연구 결과에서 난청을 유발한 동물 모델에서 각각의 성장인자의 효과도 좋았지만 각 성장인자의 혼합 투여 시에 BDNF+GDNF+neurotrophic factor-3 (NT-3) 투여 후 5주차에서 통계적으로 유의하게 와우신경절 신경세포의 수가 증가하였고 청성뇌간반응검사를 이용한 청력 검사에서도 청력의 개선을 얻을 수 있었다(Table 1)[31]. 그러나 IGF-1을 투여한 군의 와우신경절에서는 유의한 효과는 확인할 수 없었으나 유모세포의 재생과 청력의 개선을 확인할 수 있었다[32].

최근 유모세포 등의 재생에 있어서는 cell signaling pathways나 특정 유전자의 발현을 활성화하거나 발현을 억제하는 저분자 물질 혹은 약제를 개발하는 데 집중되고 있다. 그중에서는 *Atoh 1* 유전

자를 활성화하는 물질을 개발하는 것이 유망한 것으로 알려져 있다 (*Atoh-1* activating compound). 세포 주기의 re-entry를 억제하는 유전자들이 포유류 코르티 기관 내의 지지세포에 많이 존재하며 이를 억제하는 물질이 개발된다면 새로운 유모세포를 재생할 수 있는 이론적인 근거가 제시되었다[32,33]. 이와 함께 세포 주기 억제자를 선택적으로 억제할 수 있는 약제 개발은 이러한 분야에서는 가장 중요한 과제로 여겨지고 있다(compound inhibits p27Kip1, retinoblastoma, other cyclin-dependent kinase inhibitors etc)[33]. 또한 주변세포에 의해 사용되는 수용체인 notch signaling의 약리학적 억제를 통해서 유모세포의 형성을 유도할 수 있다(γ -secretase inhibitor 등)[34].

이러한 약제의 유용성은 난청 치료에 희망을 주지만 다양한 난청 동물 모델에서 과연 효과적일지는 더 연구가 필요하며 와우의 폐쇄적인 해부학적 특이성은 약제 자체의 지속적이고 한정된 부위에 대한 효과에 도움을 줄 수 있지만 전신적으로 주입 시 약물 전달의 한계가 있는 것이 단점으로 부각되고 있다.

한편으로는 내이에 존재하는 내인성 줄기세포가 임상적으로 유용하게 사용될 수 있다(Fig. 5). 내이에 존재하는 내인성 줄기세포에 대해서는 2003년 Li 등이 mouse의 난형낭반의 감각신경세포층에서 줄기세포의 특징을 지니는 세포를 분리 배양하여 처음 발표하였다[35]. 이들은 발달 단계 과정의 내이에 특이적인 유전자인 bone morphogenic protein (BMP-4), BMP-7 등이 발현되었고, 또한 유모세포(myosin VIIa, Brn3.1) 등으로 분화를 유도하였을 때 이에 대한 발현을 확인할 수 있었다. 그러나 내인성 줄기세포의 작용에 있어서는 앞서 언급된 성장인자나 줄기세포 재발현과 관련된 약물의 개발이 필수적일 것이다.

이와 함께 본 연구자는 사람의 난형낭반, 구형낭반, 세반고리관의 감각신경세포층에서도 줄기세포의 특징을 보이는 세포를 분리 배양에 성공하여 보고한 바 있다[36]. 이러한 연구 결과는 향후 전정 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

코르티기관에서도 생후 21일째까지의 rat에서 줄기세포의 특성을 보이는 세포가 분리 배양되었다[37]. 그러나 21일 이후와 상위의 포유류의 성체에서는 아직까지 분리 배양되었다는 보고가 없어서 난청의 연구성을 시사하는 것으로 생각된다.

와우신경절에서는 기니아피그와 사람에서 줄기세포 특성을 보이는 세포가 분리 배양되었다[38,39]. 이와 함께 이로부터 분화된 신경세포들은 청각 시스템에 특이적 표지자인 tyrosine kinase receptor인 TrkB와 TrkC를 모두 가지고 있어 와우 신경절의 신경 줄기세포가 청각계에 특이적인 신경세포들로 분화가 가능함을 확인하였다. 이와 같은 성체 내 존재하는 줄기세포에 대해서는 그 존재에 대하여 여러 가지 가설들이 제시되고 있는데 줄기세포들이 각 기관에 일부 남아 있거나 역분화(de-differentiation) 또는 재프로그래밍(re-programming)에 의해 일정한 배양 조건에서 생길 수 있

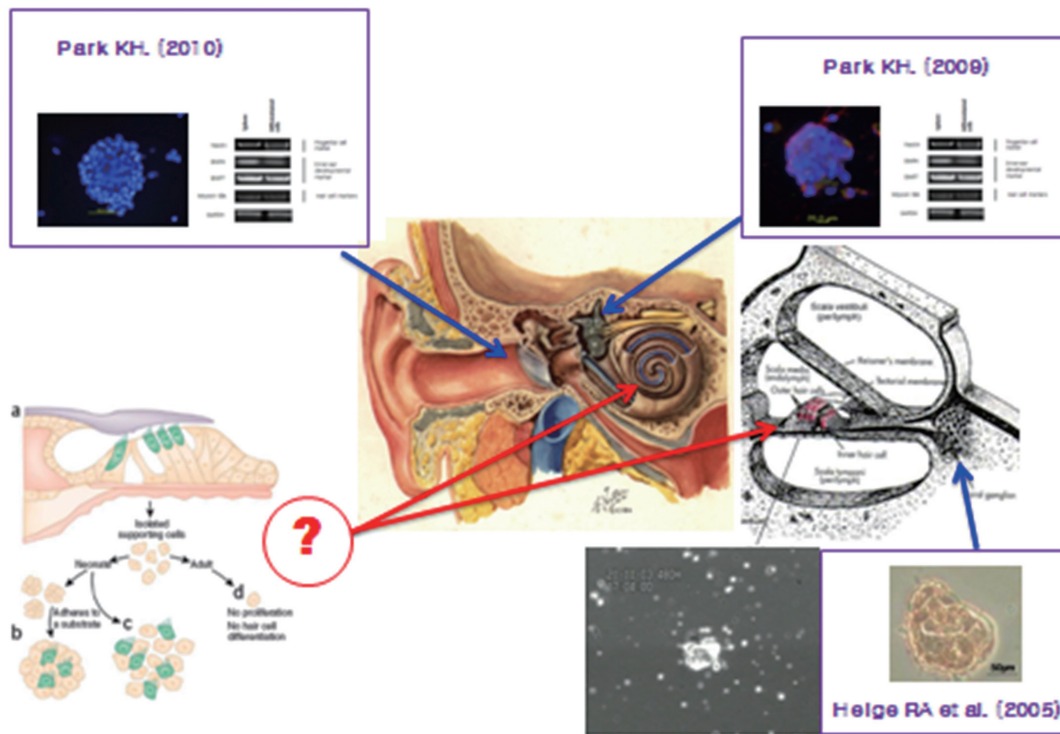


Fig. 5. Endogenous stem cell in the ear. Each part of the ear has its somatic stem cells and it can be used in cell therapy in the future.

다고 알려져 있다[38]. 그러나 본 연구자의 연구 결과에서와 같이 일정한 배양 조건하에서 배양된 세포들이 시간 경과에 따라 증식과 분화 과정을 보여주었고, 구 형태를 보이는 신경계 전구세포에서 시간 경과에 따라 신경세포와 유모세포 등으로 분화되는 과정을 거치는 것으로 보아 내이 내 각 기관 내에 내인성 줄기세포가 존재할 것으로 생각된다[40].

결론

최근 생명 과학 기술의 발전으로 줄기세포와 유전자 치료에 대한 많은 발전이 이루어졌으며 유전자 발현을 조절하는 저분자 화합물 등이 개발되고 있다. 실제로 많은 연구 기술들이 다양한 질환의 환자에게 적용되고 있는 실정이다. 그러나 현실적으로 줄기세포 분화와 유전자 발현의 조절 등의 한계로 인해 향후에도 많은 연구가 필요하다. 특히 내이 구조의 특수성으로 인해서 그 한계는 다른 질환에 비해 더 큰 것이 사실이다. 이와 함께 난청과 같은 질환에서는 중이 이식이나 인공와우이식 등의 기계 공학적 발전으로 인해 재생 의학적 치료의 유용성에 대해서도 회의가 드는 것도 사실이다. 그러나 최근 10여 년간의 생명공학 연구의 발전으로 지금까지의 결과와 가능성을 보여주었던 것처럼 향후 몇 년간의 추가적이고 보완적인 연구를 통해서 보다 효율적이면서 안전하게 난청 환자의 재생 의학적 치료가 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the Basic Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2010-0022231)

REFERENCES

1. Li H, Roblin G, Liu H, Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:13495-500.
2. Corrales CE, Pan L, Li H, Liberman MC, Heller S, Edge AS. Engraftment and differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells in the cochlear nerve trunk: growth of processes into the organ of corti. *J Neurobiol* 2006;66:1489-500.
3. Kojima K, Tamura S, Nishida AT, Ito J. Generation of inner ear hair cell immunophenotypes from neurospheres obtained from fetal rat central nervous system in vitro. *Acta Otolaryngol Suppl* 2004;26-30.
4. Hakuba N, Hata R, Morizane I, Feng G, Shimizu Y, Fujita K, et al. Neural stem cells suppress the hearing threshold shift caused by cochlear ischemia. *Neuroreport* 2005;16:1545-9.
5. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
6. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by

- defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
7. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20.
 8. Nishimura K, Nakagawa T, Ono K, Ogita H, Sakamoto T, Yamamoto N, et al. Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport* 2009;20:1250-4.
 9. Nishimura K, Nakagawa T, Sakamoto T, Ito J. Fates of murine pluripotent stem cell-derived neural progenitors following transplantation into mouse cochleae. *Cell Transplant* 2012;21:763-71.
 10. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:10711-6.
 11. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364-70.
 12. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
 13. Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge AS. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci* 2007;34:59-68.
 14. Lee JH, Kang WK, Seo JH, Choi MY, Lee YH, Kim HM, et al. Neural Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: applicability for Inner Ear Therapy. *Korean J Audiol* 2012;16:47-53.
 15. Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004;15:1-4.
 16. Cho YB, Cho HH, Jang S, Jeong HS, Park JS. Transplantation of neural differentiated human mesenchymal stem cells into the cochlea of an auditory-neuropathy guinea pig model. *J Korean Med Sci* 2011;26:492-8.
 17. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:664-73.
 18. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19:1450-6.
 19. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003; 21:50-60.
 20. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004;22:1330-7.
 21. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.
 22. Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J Vet Sci* 2006;7:343-8.
 23. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Xu XL, Yu XJ. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2006;30:569-75.
 24. Choi MY, Gil KC, Back SA, Park SN, Yeo SW, Park KH. Auditory cell induction from mesenchymal stem cells of human umbilical cord blood. *J Int Adv Otol* 2011;7:137-47.
 25. Choi MY, Yeo SW, Park KH. Hearing restoration in a deaf animal model with intravenous transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;427: 629-36.
 26. Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005;11:271-6.
 27. Richardson RT, Atkinson PJ. Atoh1 gene therapy in the cochlea for hair cell regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:417-30.
 28. Zheng JL, Helbig C, Gao WQ. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J Neurosci* 1997;17:216-26.
 29. Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Application of insulin-like growth factor-1 in the treatment of inner ear disorders. *Front Pharmacol* 2014;5:208.
 30. Altschuler RA, Cho Y, Ylikoski J, Pirvola U, Magal E, Miller JM. Rescue and regrowth of sensory nerves following deafferentation by neurotrophic factors. *Ann N Y Acad Sci* 1999;884:305-11.
 31. Oh JH, Park SN, Choi HG, Choi NY, Han MA, Park KH, et al. Effect of Neurotrophic factors on hearing restoration and spiral ganglion regeneration in deafened animal model. *Tissue Eng Regen Med* 2008;5:849-54.
 32. Cho JH, Park KH, Park SN, Yeo SW. Morphologic Change and Hearing Recovery After Intratympanic Application of Insulin-Like Growth Factor-1 in Guinea Pig. *Int Adv Otol* 2005;6:46-52.
 33. Oshima K, Suchert S, Blevins NH, Heller S. Curing hearing loss: patient expectations, health care practitioners, and basic science. *J Commun Disord* 2010;43:311-8.
 34. Slowik AD, Birmingham-McDonogh O. Hair cell generation by notch inhibition in the adult mammalian cristae. *J Assoc Res Otolaryngol* 2013; 14:813-28.
 35. Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003;9:1293-9.
 36. Park KH, Park SN, Seo JH, Yeo SW, Choi HG, Chang KH. Nestin Expression in Proliferating Cells of Cultured Human Vestibular Organs. *Int Adv Otol* 2009;5:6-10.
 37. Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Monedero RM, Géléoc GS, et al. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8:18-31.
 38. Rask-Andersen H, Bostrom M, Gerdin B, Kinnefors A, Nyberg G, Engstrand T, et al. Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* 2005;203:180-91.
 39. Choi HG, Kim CH, Park SN, Choi MY, Nam SG, Park SC, et al. Isolation and Culture of Adult Neural Stem Cells from Guinea Pig Spiral Ganglion. *Tissue Eng Regen Med* 2009;6:938-41.
 40. Park KH. Endogenous Stem Cells in the Ear. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2013;56:749-53.