

# 심근경색증 환자에 있어서 Granulocytes-Colony Stimulating Factor를 이용한 줄기세포치료 임상연구의 6개월 추적 결과

– MAGIC Cell Randomized Controlled Trial –

서울대학교병원 임상의학연구소 심혈관연구실,<sup>1</sup> 심혈관센터,<sup>2</sup> 서울대학교 의과대학 내과학교실,<sup>3</sup> 핵의학교실,<sup>4</sup> 서울대학교병원 진단검사의학교실<sup>5</sup>

강현재<sup>1,2,3</sup> · 김효수<sup>1,2,3</sup> · 나상훈<sup>1,2,3</sup> · 장서영<sup>1,2,3</sup> · 강원준<sup>4</sup> · 연태진<sup>1,3</sup> · 구본권<sup>1,2,3</sup>  
김용진<sup>1,2,3</sup> · 이동수<sup>4</sup> · 손대원<sup>1,2,3</sup> · 한규섭<sup>5</sup> · 오병희<sup>1,2,3</sup> · 박영배<sup>1,2,3</sup>

Six Months Follow Up Results of “Granulocytes-Colony Stimulating Factor”  
Based Stem Cell Therapy in Patients with Myocardial Infarction

- MAGIC Cell Randomized Controlled Trial -

Hyun-Jae Kang, MD<sup>1,2,3</sup>, Hyo-Soo Kim, MD<sup>1,2,3</sup>, Sang-Hoon Na, MD<sup>1,2,3</sup>, Shu-Ying Zhang, MD<sup>1,2,3</sup>,  
Won Jun Kang, MD<sup>4</sup>, Tae-Jin Youn, MD<sup>1,3</sup>, Bon-Kwon Koo, MD<sup>1,2,3</sup>,  
Yong-Jin Kim, MD<sup>1,2,3</sup>, Dong Soo Lee, MD<sup>4</sup>, Dae-Won Sohn, MD<sup>1,2,3</sup>,  
Kyou-Sup Han, MD<sup>5</sup>, Byung-Hee Oh, MD<sup>1,2,3</sup> and Young-Bae Park, MD<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Cardiovascular Laboratory, Clinical Research Institute, <sup>2</sup>Cardiovascular Center, Seoul National University Hospital, Seoul,

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, <sup>4</sup>Nuclear Medicine and <sup>5</sup>Laboratory Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

## ABSTRACT

**Background and Objectives :** Granulocytes-colony stimulating factor (G-CSF) has a stem cell mobilizing capacity and favorable effects on ventricular remodeling following a myocardial infarction. G-CSF based stem cell therapy has shown favorable results in animal studies. However, the long term outcome of G-CSF based stem cell therapy in clinical trial remains unknown. Herein, we report the six month follow up results of two different G-CSF based stem cell therapy strategies. **Subjects and Methods :** We compared the intra-coronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells (PBSCs) with G-CSF (n=10), mobilization with G-CSF alone (n=16) and control percutaneous coronary intervention (PCI) alone (n=15) in patients following a myocardial infarction. **Results :** At the six month follow up evaluations, the intra-coronary cell infusion was found to have improved the left ventricular (LV) systolic function and remodeling compared to the baseline, whereas G-CSF alone showed no improvement. Therefore, an intra-coronary cell infusion showed better improvements in the LV systolic function ( $p<0.001$ ) and remodeling ( $p<0.01$ ) than G-CSF alone. Cell infusion also showed better results than the control PCI alone group, but these did not reach statistical significance with the limited number of patients used in this study. Patients who received G-CSF administration showed a modest increase of binary restenosis ( $p=0.185$ ) and a greater late loss in the minimal luminal diameter at the 6 month follow up than the control group. **Conclusion :** An intra-coronary cell infusion of mobilized PBSCs using G-CSF was found to be better than G-CSF alone at the six month follow up evaluation. G-CSF was also found to increase the potential risk of restenosis, especially when administered prior to stent implantation. The efficacy of an intra-coronary infusion of mobilized PBSCs should be evaluated in a large randomized controlled trial. (Korean Circulation J 2006;36:99–107)

**KEY WORDS :** G-CSF ; Myocardial infarction ; Coronary restenosis.

논문접수일 : 2005년 11월 23일

심사완료일 : 2005년 12월 29일

교신저자 : 김효수, 110-744 서울 종로구 연건동 28 서울대학교병원 임상의학연구소 심혈관연구실, 심혈관센터, 서울대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (02) 2072-2226 · 전송 : (02) 766-8904 · E-mail : hyosoo@snu.ac.kr

## 서론

최근의 골수줄기세포를 이용한 심근경색의 줄기세포치료 초기 임상연구는 좋은 임상경과를 보고하고 있다.<sup>1-4)</sup> 골수줄기세포를 이용한 줄기세포치료법은 효과적이며 현재 가장 널리 이용되고 있는 줄기세포치료법이다. 그러나 골수줄기세포를 이용한 줄기세포치료법은 침습적인 골수채취의 과정을 요하며 이는 임상적용에 있어 중요한 제한점이 되고 있다. Granulocytes-colony stimulating factor(G-CSF)는 잘 알려진 골수 줄기세포의 동원 유도제로서 동물실험에서는 그 자체만으로 심기능을 호전시킬 수 있음이 보고되어 있다.<sup>5,6)</sup> 최근에는 G-CSF 투여가 단순히 줄기세포 동원을 통한 기전 이외에도 심근경색증 후의 심근의 병적인 재형성 과정을 저해하고 치유를 촉진하며, 심근세포의 고사를 억제하는 효과 등 부가적인 작용기전이 알려지고 있다.<sup>7-9)</sup> 이 같은 연구 결과들을 바탕으로 G-CSF는 줄기세포치료에 이용될 수 있는 가장 유용한 사이토카인의 하나로 주목받고 있다. 최근의 소수 연구에서 G-CSF 투여만으로 급성심근경색증 환자에서 심기능이 호전되고 임상경과가 호전된다는 보고가 있다.<sup>10-12)</sup> 그러나 대조군 연구를 통한 장기간 추적 연구결과는 매우 부족한 상태이며, G-CSF를 이용하여 동원된 줄기세포를 모집하여 국소 투여하는 치료법을 평가한 연구는 전무한 상태이다. 저자들은 별다른 조작없이 순환혈액내의 줄기세포가 허혈 심근에 회귀하여 결합될 확률은 매우 낮으므로 이를 향상시키기 위한 국소 투여법이 단순 동원법에 비해 나은 효과를 보일 것으로 판단하고 이를 비교 평가하기 위해 G-CSF를 이용한 단순 줄기세포 동원 치료군, G-CSF

를 이용하여 동원된 줄기세포를 모집하여 고농도로 관동맥 내에 주입하는 세포주입군, 그리고 기존의 표준적인 치료만을 시행한 대조군을 비교하는 연구를 진행하였다.

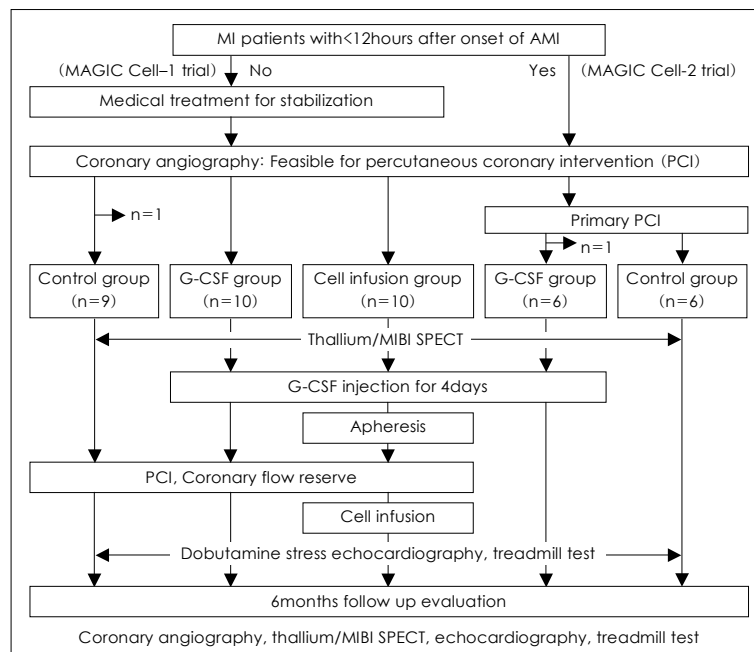
본 연구진은 연구의 중간 결과 발표를 통해 G-CSF를 이용한 줄기세포치료법이 심기능을 호전시키고 심근 허혈과 환자의 운동능력을 호전시킬 수 있음을 보고한바 있다.<sup>13)</sup> G-CSF 투여가 관동맥의 재협착을 유발하거나<sup>13)</sup> 난치성 협심증 환자에게서 허혈을 유발할 수 있다는 잠재적인 부작용과 이로 인한 임상연구의 조기 중단 사례에 대한 보고<sup>14)</sup>에도 불구하고, G-CSF를 이용한 줄기세포치료법은 여전히 매력적인 치료법으로 받아들여지고 있으며 G-CSF를 이용한 다수의 임상연구가 진행되고 있는 상태이다. 저자들은 the Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell Infusion(MAGIC Cell) trial 연구에 참여하였던 환자들의 6개월 임상추적을 완료하여 이를 보고 한다.

## 대상 및 방법

### 방 법

본 연구는 무작위 대조군 2상 임상연구로 진행되었다. 서울대학교병원 기관윤리위원회(IRB)에서 연구계획서를 승인 받은 후 시행되었으며, 대상자들에게는 연구의 과정과 가능한 위험성 등을 설명한 후 동의서를 득하였다. 전체적인 연구의 진행은 Fig. 1에 도시하였다.

본 연구는 MAGIC Cell-1과 -2로 명명된 2개의 연구로 진행되었다. 연구의 진행 방법은 기존의 중간 보고에서 자



**Fig. 1.** Profile of the study. AMI: acute myocardial infarction, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, MI: myocardial infarction, SPECT: single photon emission computed tomography.

세히 기술하였으므로 간략히 소개한다.<sup>13)</sup> MAGIC Cell-1 연구는 급성 및 진구성 심근경색증 환자를 모두 연구대상으로 포함하였으며, 이들을 1) 세포주입군(cell infusion: G-CSF를 이용하여 말초혈액으로 동원한 줄기세포를 채집하여 관동맥성형술 후 경색유발 관동맥내로 주입하는 치료군), 2) G-CSF 단독 투여군(관동맥 성형술과 G-CSF투여만을 받은 치료군)과 3) 대조군(관동맥 성형술 및 표준적인 치료를 받은 군)으로 무작위 배정하였다. 세포주입군과 G-CSF 단독 투여군은 관동맥 성형술 전 4일간 매일 10  $\mu\text{g/kg}$ 의 G-CSF(Dong-A pharmaceutical, Seoul, Korea)를 피하로 투여받았다. G-CSF 투여 후 모든 환자들은 심근경색증의 원인혈관에 스텐트 삽입술을 시행받았다. 세포주입군은 관동맥성형술 직후 미리 채집된 줄기세포를 심근경색증의 원인혈관내로 주입받았으며, 대조군에 대한 위약 투여는 이루어지지 않았다.

MAGIC Cell-2 연구는 급성심근경색증 발생 12시간 내에 성공적으로 스텐트 삽입술을 시행받은 급성심근경색증 환자를 대상으로 진행되었으며, 대상자는 G-CSF 단독 투여군과 대조군으로 무작위 배정되었다. G-CSF 단독 투여군은 적어도 관동맥 성형술 24시간 이후부터 4일간 매일 10  $\mu\text{g/kg}$ 의 G-CSF를 피하로 투여받았다. MAGIC Cell-1, 2 연구는 MAGIC Cell-1 연구의 중간 평가<sup>13)</sup>에서 보고된 관동맥 재협착의 증가 가능성으로 인해 조기 모집 중단하였으나, 대상자에 대한 추적 관찰은 예정대로 진행하여 6개월까지의 추적 관찰을 완료하였다.

본 연구의 제외대상은 1) 지속적인 진행된 심부전(Killip class II 이상 혹은 좌심실 구혈율<25%); 2) 조절되지 않는 심근 허혈이나 심실성 빈맥; 3) 심근경색의 원인 관동맥이 관동맥성형술에 적합하지 않은 경우나 성공적으로 관동맥 성형술이 이루어지지 못한 경우; 4) 75세 이상; 5) 악성 종양; 6) 심각한 감염이나 혈액질환; 그리고 7) 기대여명이 1년 이하인 경우로 하였다.

안전성 평가를 위해 중대 심혈관계 이상반응의 발생(major adverse cardiovascular events; 사망, 새로운 심근경색증의 발생, 관동맥성형술이나 관동맥 우회로술의 시행, 심근 허혈이나 심부전의 악화로 인한 입원)을 평가하였으며, G-CSF 투여와 관련된 통증, 호흡곤란, 흉통, CK-MB, C-reactive protein(CRP) 등의 혈액학적 검사, 심전도, 관동맥 혈류에 비력(coronary flow reserve)을 함께 평가하였다. 연구의 1차적 평가목표는 thallium/MIBI 심근 스펙트(SPECT)를 이용하여 측정된 좌심실 구혈율(LVEF: left ventricular ejection fraction)의 변화로 하였으며, 이차적 평가목표는 좌심실 용적, 심근관류, 운동능력의 변화와 중대 심혈관계 이상반응의 발생으로 하였다. 심근 스펙트로 측정된 좌심실 구혈율과 좌심실 용적은 심초음파를 이용하여 신뢰도를 확인하였다. 심근의 관류는 심근 스펙트, 도부타민 부하심초음파로 평가하였다. 운동능력은 modified Bruce protocol을 이

용하여 treadmill로 측정하였다.

대상군의 수는 G-CSF 투여와 관동맥 내 세포주입이 좌심실 구혈율에 호전시킬 수 있는지를 평가하기 위해 기존의 연구결과를 바탕으로 정하였다.<sup>2)</sup> 좌심실 구혈율의 7% 변화를 확인하기 위해 80%의 통계적 검정력과 5%의  $\alpha$ -error를 허용하였으며, 이를 위해서는 각 연구군당 16명의 대상자가 필요하였다. 추적평가의 탈락율을 25%로 가정하여 각 연구군당 20명의 환자를 모집하기로 계획하였다.

### 대상자의 모집

MAGIC Cell-1 연구는 2003년 1월, MAGIC Cell-2 연구는 2003년 5월에 서울대학교병원에서 시작되었다. 대상자 모집은 전술한 바와 같이 중간 평가에서 제기된 재협착의 위험도 증가에 대한 우려로 2003년 12월 중단되었으나, 대조군의 평가를 위해 2명의 대상자를 추후 IRB의 승인 하에 대조군에 추가 모집하였다.

### 세포의 채집 및 투여

세포주입군에서는 관동맥 성형술 시행 당일 COBE spectra apheresis system(COBE BCT, Inc., Lakewood, CO, USA)을 이용한 단핵구 모집법으로 말초혈액의 줄기세포를 채집하였다. 채집된 세포는 over-the-wire angioplasty balloon catheter를 이용하여 관동맥 성형술 후에 관동맥 내로 투여되었다. 채집 과정 이외에 추가적인 세포에 대한 처치는 가하지 않았으며,  $1.0 \times 10^9$ 개의 채집된 단핵세포가 관동맥 내로 투여되었다. 이는 최소한  $7 \times 10^6$  CD34+ 세포 투여를 보장하기 위하여 정해진 세포수이다. 세포 주입은 nicorandil (Choongwae pharma corp. Seoul, Korea) 및 nitroglycerin 전처치하에 투여되었으며, 시술 중 activated clotting time을 250초 이상으로 유지하였다.

### Thallium/MIBI 스펙트(SPECT)

측정법은 전술한 바와 같이 시행하였으며,<sup>13)15)</sup> 안정시  $^{201}\text{Tl}$ -dipyridamole, 부하시  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi gated SPECT를 관동맥 성형술 전 및 추적 관동맥 조영술 전에 시행하였다. 좌심실 용적과 구혈율은 AutoQUANT(ADAC labs., CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

### Dobutamine stress echocardiography

관동맥 성형술 후 표준적인 경흉부 심초음파 검사와 저용량 도부타민 부하심초음파를 시행하였다(Sequoia, Siemens, Mountain View, CA). 부하심초음파에서는 경색부위의 생존심근여부를 평가하기 위해 10  $\mu\text{g/kg/min}$ 의 도부타민을 투여하면서 검사를 진행하였다.<sup>13)16)</sup> Wall motion score index (WMSI)는 각 부위의 안정시 및 부하시 wall motion score의 평균치를 이용하여 구하였다. 좌심실의 용적 및 구혈율은 biplane modified Simpson's method 방법으로 측정하

였고, 2명의 전문가에 의해 검증되었다.

### Treadmill test

환자에게 가능한 최대한의 운동을 시행하도록 하면서 검사를 시행하였으며(symptom-limited treadmill test), modified Bruce protocol을 이용하였다. 운동시간, 증상, 심전도 변화, 및 유의한 부정맥의 발생여부를 평가하였다. 대상자 중 운동을 제한하는 비심혈관계 질환을 가진 환자는 없었다.

### Quantitative coronary angiography(QCA)

QCA는 연구결과나 대상군에 대한 정보가 없는 독립적인 전문가에 의해 시행되었으며, Quantcor QCA V4.0 program (Pie medical imaging, Netherlands)을 이용하였다. 재협착(Binary restenosis)은 50% 이상의 내경 감소로 정의하였다.

### 자료 수집 및 환자의 추적 관찰

모든 대상자는 연구 시작 후 1, 2, 4, 6개월 시점에서 임상경과, 부작용의 발생여부와 투약력에 대하여 평가하였다. 6개월 시점에 추적 관동맥 조영술과 심근스펙트, 부하심초 음파, 운동부하검사 등이 이루어 졌다. 재협착병변에 대한 관동맥 성형술여부는 시술자의 결정에 맡겨졌다.

### 통계 분석

통계 분석은 안정성은 intention-to-treat 원칙에 의해, 효과는 per-protocol원칙하에 이루어졌다. 연속변수는 평균

± 표준편차로 표시하였다. 대상군 내의 연속변수의 분석을 위해서는 paired t-test를 적용하였고, 대상군 간의 비교를 위해서는 Student's t-test나 one way ANOVA를 적용하였다. 비연속변수에 대해서는 chi-square test나 Fisher's exact test를 이용하였다. 변수간의 상관관계는 Pearson test를 이용하였고, 통계적인 유의성은  $p < 0.05$ 로 하였다. 통계 분석은 SPSS(version 11.0, SPSS Inc)을 이용하였다.

## 결 과

대상자의 특성은 Table 1에 표시하였으며, 연구의 초기 모집 중단에도 불구하고 대상군 간에 유의한 특성의 차이는 없었다.

### 시술 전후 및 입원기간의 경과

시술 전후 시점에서 G-CSF투여와 연관된 중대한 부작용은 없었다. 5명의 환자(19%)가 G-CSF 투여와 관련된 골통을 호소하였으나, 이는 쉽게 진통제로 조절되었고 G-CSF 투여 중단 후 소실되었다. G-CSF 투여기간 중이나 입원기간 중 허혈의 악화나, 중대한 부정맥의 발생 등은 관찰되지 않았다. 또한 G-CSF 투여에도 불구하고 유의한 염증의 악화소견은 관찰되지 않았다(CRP at baseline:  $2.1 \pm 2.8$  mg/dL vs. after G-CSF:  $1.9 \pm 1.5$  mg/dL,  $p=0.728$ ). 혈전성 합병증 또한 관찰되지 않았다.

전술한 바와 같이  $1.7 \pm 0.5 \times 10^9$ 의 수집된 세포(단핵구 기

**Table1.** Baseline characteristics of patients

	Cell infusion group	G-CSF group	Control group	p
	n=10 (%)	n=16	n=15	
Age (years)	$59.4 \pm 9.6$	$55.7 \pm 10.6$	$59.2 \pm 12.6$	0.607
Male : Female	9 : 1	15 : 1	13 : 2	0.802
AMI : OMI	6 : 4	10 : 6	12 : 3	0.469
Thrombolysis or primary PCI	4 (40%)	6 ( 38)	10 ( 67)	0.218
Elective PCI : Primary PCI	10 : 0	10 : 6	9 : 6	
Infarct related artery (LAD : LCx : RCA)	4 : 3 : 3	7 : 3 : 6	5 : 1 : 9	0.455
PCI to non-infarct related artery	3 ( 30)	3 ( 19)	4 ( 27)	0.783
LVEF (%) at baseline	$48.9 \pm 9.0$	$53.6 \pm 12.6$	$46.5 \pm 9.1$	0.183
CRP (mg/dL)	$1.5 \pm 2.7$	$2.3 \pm 2.8$	$1.9 \pm 1.7$	0.740
Risk factors				
Hypertension	5 ( 50)	9 ( 56)	7 ( 47)	0.864
Diabetes mellitus	3 ( 30)	5 ( 31)	3 ( 20)	0.753
Hypercholesterolemia	4 ( 40)	7 ( 44)	6 ( 40)	0.972
Current cigarette smoking	3 ( 30)	8 ( 50)	8 ( 53)	0.682
Medication				
Aspirin + clopidogrel	10 (100)	16 (100)	15 (100)	1.000
Statin	4 ( 40)	7 ( 44)	9 ( 60)	0.542
$\beta$ -blocker	10 (100)	15 ( 94)	13 ( 87)	0.446
ACEI /AT-II receptor blocker	9 ( 90)	16 (100)	13 ( 87)	0.338

AMI: acute myocardial infarction, OMI: old myocardial infarction, PCI: percutaneous coronary intervention, LAD: left anterior descending coronary artery, LCx: left circumflex coronary artery, RCA: right coronary artery, CRP: C-reactive protein, ACE: angiotension converting enzyme inhibitor, AT: angiotensin, G-CSF: granulocytes-colony stimulating factor

준:  $1.0 \times 10^9$ ,  $9.0 \pm 3.0$  mL)를 투여하였으며, 이는  $8.3 \pm 10.2\%$  CD34+ 세포를 포함하고 있었다.<sup>13)</sup> 세포의 관동맥 투여 후 경도의 심근효소 상승이 관찰되었으나(CK-MB 세포 주입 전:  $3.4 \pm 3.0$  IU/L vs. 세포 주입 12시간 후:  $5.6 \pm 4.4$  IU/L,  $p=0.012$ ), 임상적으로 유의한 심근 허혈이나 심부전의 악화, 부정맥의 소견은 관찰되지 않았으며, 혈류에 비력으로 평가한 관동맥 미세순환의 악화도 관찰되지 않았다. 또한 입원 중 중대한 심혈관계 이상반응은 관찰되지 않았다.

#### G-CSF 단독 투여 vs. 관동맥 내 세포 주입(Table 2, Fig 2)

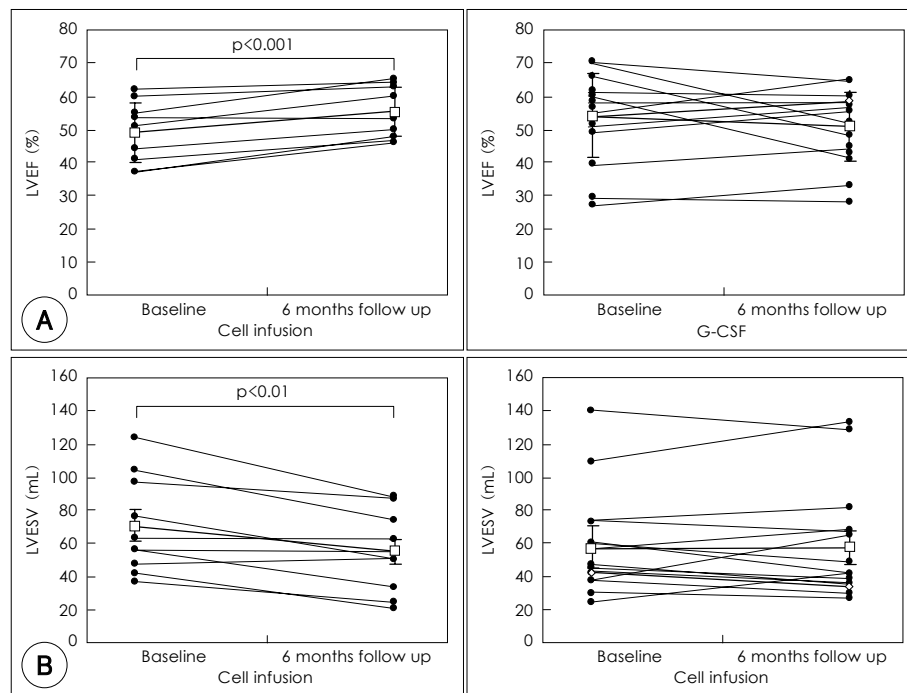
통계적 검증력을 높이기 위해 G-CSF 단독 투여군과 대조군에 대해서는 MAGIC Cell-1, 2의 결과를 통합하여 분석을 시행하였다. 이들 대상군의 특성이나 임상경과는 MAGIC Cell-1, 2간의 비교에서 유사한 양상을 보여 이들을 함께 분석하여도 단독 분석한 경우와 비교하여 연구결과의 변화는 관찰되지 않았다.

세포주입군은 6개월 추적 평가시 기저치에 비하여 좌심실의 구혈율이 유의하게 호전되고(기저치:  $48.9 \pm 9.0\%$  vs. 6

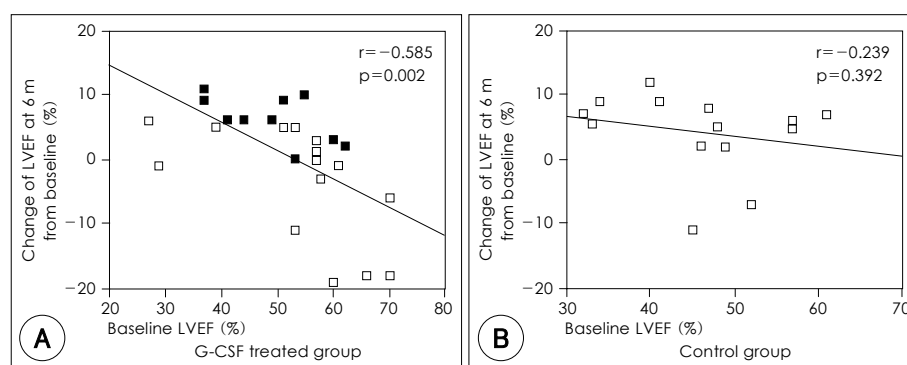
**Table 2.** Results of 6 months follow up evaluation with myocardial SPECT, treadmill test and echocardiography

		Cell infusion group	G-CSF group	Control group
LVEF (%)	At baseline	$48.9 \pm 9.0$	$53.6 \pm 12.6$	$46.5 \pm 9.1$
	At 6months	$55.1 \pm 7.4^\dagger$	$50.7 \pm 10.4$	$50.7 \pm 9.7^*$
LVEDV (mL)	At baseline	$133.0 \pm 34.8$	$120.5 \pm 29.2$	$128.9 \pm 48.9$
	At 6months	$117.4 \pm 37.9^*$	$113.4 \pm 40.0$	$118.7 \pm 47.1$
LVESV (mL)	At baseline	$70.3 \pm 28.9$	$58.6 \pm 30.1$	$70.1 \pm 35.6$
	At 6months	$54.6 \pm 23.7^\dagger$	$58.4 \pm 32.7$	$57.1 \pm 31.5^\dagger$
Perfusion defect (%)	At baseline	$9.0 \pm 9.0$	$12.6 \pm 11.9$	$16.0 \pm 10.4$
	At 6months	$5.1 \pm 4.0$	$9.6 \pm 10.7^*$	$7.9 \pm 9.6$
Exercise duration (sec)	At baseline	$478 \pm 170$	$518 \pm 124$	$454 \pm 153$
	At 6months	$626 \pm 142^\dagger$	$609 \pm 132$	$574 \pm 171^*$
RWMSI	At baseline	$1.43 \pm 0.24$	$1.52 \pm 0.24$	$1.46 \pm 0.20$
	At 6months	$1.40 \pm 0.24^*$	$1.47 \pm 0.25$	$1.44 \pm 0.18^*$

All the enrolled patients completed baseline evaluation and 6 months follow up evaluation. \*:  $p < 0.05$  compared with baseline value,  $^\dagger$ :  $p < 0.01$  compared with baseline value. LVEF: left ventricular ejection fraction, LVEDV: left ventricular end diastolic volume, LVESV: left ventricular end systolic volume, RWMSI: regional wall motion score index, NA: not available, G-CSF: granulocytes-colony stimulating factor, SPECT: single photon emission computed tomography



**Fig. 2.** Change of left ventricular ejection fraction and volume at six months follow up. The patients in the cell infusion group showed improved left ventricular systolic function and remodeling at 6 months follow up compared to baseline. However, G-CSF mobilization alone did not improve left ventricular systolic function and remodeling at all. LVEF: left ventricular ejection fraction, LVESV: left ventricular end systolic volume, G-CSF: granulocytes-colony stimulating factor.



**Fig. 3.** Relationship between baseline left ventricular systolic function and change of left ventricular systolic function. A: the improvement of left ventricular systolic function in patients who had been treated with G-CSF showed inverse correlation with baseline left ventricular systolic function. In multivariate analysis, only baseline left ventricular ejection fraction was related with the change of left ventricular ejection fraction at 6 months follow up (filled box: the cell infusion group, empty box: the G-CSF group). B: in the control group, however, baseline left ventricular ejection fraction was not related with the change of left ventricular ejection fraction in 6 months follow up. LVEF: left ventricular ejection fraction, G-CSF: granulocytes-colony stimulating factor.

**Table 3.** Effects of G-CSF on restenosis

A. Comparison of effects of G-CSF between G-CSF treated patients and control patients

	G-CSF treated group (n=26)	Control group (n=15)	p
Lesion type (A : B1 : B2 : C)	0 : 2 : 11 : 13	0 : 1 : 4 : 10	0.571
Reference diameter (mm)	$3.1 \pm 0.5$	$3.4 \pm 0.4$	0.059
Lesion length (mm)	$22.8 \pm 12.2$	$25.3 \pm 10.2$	0.519
MLD at post-PCI (mm)	$2.9 \pm 0.5$	$3.2 \pm 0.5$	0.030
MLD at 6months follow up (mm)	$1.6 \pm 1.0$	$2.2 \pm 0.9$	0.039
Loss of MLD (mm)	$1.3 \pm 1.0$	$1.0 \pm 0.7$	0.194
Diameter stenosis at 6months follow up (%)	$51 \pm 27$	$35 \pm 25$	0.067
Binary restenosis (n)	12 (46%)	4 (27%)	0.185

B. Comparison of effects of G-CSF between pre-PCI and post-PCI G-CSF administration on restenosis

	Pre-PCI G-CSF group (n=20)	Post-PCI G-CSF group (n=6)	p
Lesion type (A : B1 : B2 : C)	0 : 2 : 8 : 10	0 : 0 : 3 : 3	0.652
Reference diameter (mm)	$3.1 \pm 0.5$	$3.2 \pm 0.5$	0.813
Lesion length (mm)	$23.9 \pm 13.7$	$19.4 \pm 3.7$	0.444
MLD at post-PCI (mm)	$2.9 \pm 0.5$	$2.9 \pm 0.7$	0.963
MLD at 6months follow up (mm)	$1.5 \pm 1.0$	$1.8 \pm 1.0$	0.410
Loss of MLD (mm)	$1.4 \pm 0.8$	$1.0 \pm 0.7$	0.273
Diameter stenosis at 6months follow up (%)	$54 \pm 28$	$42 \pm 26$	0.341
Binary restenosis (n)	10 (50%)	2 (33%)	0.404

PCI: percutaneous coronary intervention, MLD: minimal luminal diameter, G-CSF: granulocytes-colony stimulating factor

개월:  $55.1 \pm 7.4\%$ ,  $p < 0.001$ ), 좌심실 용적이 감소되었다(좌심실 이완기말 용적:  $133.0 \pm 11.0$  mL vs.  $117.4 \pm 37.9$  mL,  $p = 0.026$ , 좌심실 수축기말 용적:  $70.3 \pm 9.1$  mL vs.  $54.6 \pm 7.5$  mL,  $p = 0.004$ ). 그러나 G-CSF 단독 투여군에서는 좌심실 구혈율이나 좌심실 용적 모두 유의한 변화가 관찰되지 않았다(좌심실 구혈율:  $p = 0.218$ , 좌심실 수축기말 용적:  $p =$

0.943). 그러므로 세포주입군이 G-CSF 단독 투여군에 비해 유의하게 좌심실 구혈율과 좌심실용적이 호전되었다(좌심실 수축기말 용적의 변화량:  $p = 0.009$ , 좌심실 구혈율의 변화량:  $p = 0.006$ ). 세포주입군에서 대조군에서 비해 좌심실 구혈율과 용적이 호전되는 경향을 보였으나 대상자의 수가 적어 통계적 유의성은 확인하지 못하였다.

심근 관류를 비교하였을 때 세포주입군과 G-CSF 단독 투여군에서 모두 기저치에 비해 호전되는 양상을 보였으며, 호전의 정도는 G-CSF 투여군에서만 통계적으로 유의하였다. 운동능력의 향상이나 국소 심근벽 운동의 호전은 세포주입군과 대조군에서만 유의하게 관찰되었다. 심근 스펙트로 측정된 좌심실 구혈률은 심초음파로 측정한 검사치와 좋은 상관관계를 유지하였다( $r = 0.749$ ,  $p < 0.001$ ).

#### 줄기세포 치료에 의한 좌심실 기능 호전 예측 인자

G-CSF와 세포투여를 투여 받은 대상군 전체를 대상으로 평가하였을 때 좌심실 기능의 호전은 기저 좌심실 구혈율과 유의한 역의 상관관계를 보였으며( $r = -0.587$ ,  $p = 0.003$ ), 심근 관류 결손의 정도와 양의 상관관계를 보였다( $r = 0.626$ ,  $p = 0.001$ ). 다변수 분석 후에는 기저 좌심실 구혈율만이 독립적으로 6개월 추적관찰시의 좌심실 구혈율의 호전과 유의한 상관관계를 보였다(Fig. 3,  $p = 0.001$ ). 이 같은 상관관계는 세포주입군( $r = -0.869$ ,  $p = 0.001$ )과 G-CSF 단독 투여군( $r = -0.593$ ,  $p = 0.006$ )을 각각 분석하여도 유지되었다. 그러나 세포치료 전 평가한 경색부위의 생존 심근의 존재여부나 생존 심근의 크기는 좌심실 기능 호전과 연관성이 없었다( $p = 0.220$ ).

#### 추적관찰 기간 중의 이상반응

추적관찰 기간 중 사망, 중대한 부정맥, 심근 경색은 관찰되지 않았다. G-CSF 단독 투여군(MAGIC Cell-1) 중 2명이 협심증의 악화로 6개월 시점의 예정된 관동맥 조영술 시

행 전에 관동맥 조영술을 시행 받았다. 이들은 각각 추적 관찰 3개월, 4개월 시점에서 입원하여 관동맥 성형술과 관동맥 우회로술을 시행받았다. 전체적인 중대한 심혈관계 이상 반응의 발생 빈도는 대상군 간에 다르지 않았다( $p=0.445$ ).

### G-CSF와 재협착

기존에 저자들은 G-CSF 투여에 따른 재협착의 악화 가능성을 보고한 바 있다.<sup>13)</sup> 6개월 추적 관찰을 모두 완료한 시점에서 평가하였을 때도 G-CSF 투여군에서 재협착이 증가하는 경향을 관찰하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 3A). 통계적인 유의성이 없었으나 G-CSF를 투여 받은 군에서 최소내경(minimal luminal diameter)의 감소가 더 큰 경향도 관찰되었다. G-CSF 투여 시점의 영향을 비교하였을 때는 관동맥 성형술 전에 G-CSF를 투여한 경우가 이후에 투여한 경우보다 재협착의 빈도가 증가하는 경향을 보였다(Table 3B).

## 고 찰

저자들은 본 연구 결과를 통해 G-CSF로 동원 후 모집된 세포의 관동맥 내 주입이 G-CSF 단독 투여에 비해 심기능의 호전, 심실의 재형성의 방지에 보다 효과적임을 확인하였다. 대조군과 세포 주입군간의 효과의 차이는 대상자의 조기 모집 중단으로 인한 대상자의 수 부족으로 인해 결론을 도출할 수 없었으며, 이의 평가를 위해 1년 이상의 장기간 경과 관찰과 보다 대규모의 대조군 연구를 진행 중이다.

### G-CSF 단독 투여와 관동맥 내 세포 주입의 비교

G-CSF 단독 투여와 세포주입간의 효과의 차이는 줄기세포의 경색 심근부위로의 회귀 및 결합의 정도에 의한 가능성이 큰 것으로 이해된다. 두 방법간의 줄기세포의 회귀 및 경색 심근부위로의 저류 정도를 비교하기 위해 채집된 줄기세포를 18-F-Fluorodeoxyglucose(FDG)로 표지한 후 관동맥 내로 주입한 군과 표지된 줄기세포를 정맥 내로 투여한 군에서의 표지된 줄기세포의 심근 내 잔존율을 주입 후 4시간 후에 비교하였다. 관동맥 내로 주입된 줄기세포는 경색 심근부위에 특이적으로 저류되었으나, 정맥 내로 주입된 세포는 거의 심근 내에서 관찰되지 않았다. 즉 관동맥 내 세포주입이 G-CSF를 이용하여 단순히 말초혈액 내로 줄기세포를 동원하는 방법에 비해 목표 심근 내에 많은 줄기세포를 효과적으로 전달할 수 있고, 이를 통해 심기능 호전을 유발하는 것으로 유추할 수 있다. 즉 줄기세포 치료의 효율을 높이기 위해서는 목표 심근에 국소적으로 고농도의 줄기세포를 전달하는 과정이 필요하다고 할 수 있다.

### 기존의 G-CSF를 이용한 연구들과의 비교

기존의 연구 중 G-CSF 투여만으로 심기능 호전을 보고한

소규모 연구들이 있다.<sup>10)12)</sup> 이에 반해 본 연구에서는 G-CSF 단독 투여만으로는 심기능의 호전을 관찰할 수 없었는데, 기존 연구들과 비교 평가하여 그 차이를 설명하고자 한다. 첫째, 본 연구는 기존 연구와 G-CSF 투여 방법에 차이가 있었다. 기존의 연구는 대부분 '관동맥 성형술 후'에 '장기간' G-CSF를 투여하였다는 차이가 있다. G-CSF 투여 시점에 대해서는 본 연구 대상자 내에서 G-CSF 투여시점에 따라 비교하였을 때 좌심실 수축기 기능의 호전에는 차이가 관찰되지 않아( $p=0.650$ ) 그 자체만으로 차이를 설명하기는 어렵다고 판단되었다. G-CSF 투여 기간에 관해서 살펴보면, 본 연구의 대상자 중 2명의 환자가 각각 6, 7일간 G-CSF 투여받았으나 이들이 다른 대상자에 비해 유의한 심기능의 호전을 보이지는 않았다. 물론 소수의 경험으로 단정할 수 없으나, 저자들은 G-CSF가 염증을 유발할 가능성이 있고, 줄기세포 이외에도 여러 종류 혈액세포의 말초혈액 내로의 동원유도하므로 장기간 투여시 혈전성 합병증의 위험성을 배제할 수 없는 만큼 G-CSF는 줄기세포의 동원 효과를 기대할 수 있는 최소한의 기간 동안만 투여하는 것이 최선이라고 판단하고 있다.

둘째, 대상군의 차이가 있다. 다른 연구에서는 모두 급성 심근경색증 환자만을 대상으로 하였고, 효과를 보인 연구는 모두 대조군이 없는 연구로 진행되었다. 그러나 본 연구에서는 급성 및 진구성 심근경색증이 모두 포함되었고, 대조군 연구로 진행되었다. 본 연구에서 급성 심근경색증과 진구성 심근경색증을 나누어 비교하였을 때 급성 심근경색증에서 보다 나은 좌심실 수축기 기능의 호전을 관찰할 수 있었으나, 통계적 유의성은 없었으며( $p=0.814$ ), 대조군에 비해서도 유의한 호전은 관찰되지 않았다.

### G-CSF를 이용한 줄기세포 치료의 효과

본 연구를 통해 줄기세포치료를 통한 심기능의 호전과 심실재형성의 호전은 심근경색 발생시 남아 있던 생존 심근의 존재여부로 설명될 수 없음을 확인할 수 있었다. 즉 줄기세포치료에 의한 심기능의 호전이 관동맥 재관류에 의한 것만으로 설명될 수 없으며, 관류의 개선이나 국소벽운동의 호전으로 대표되는 혈관신생 및 심근 재생이 그 가능한 설명기전이 될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 현재까지는 환자에서 혈관신생이나 심근 재생을 직접적으로 증명할 수 있는 방법은 없는 상태이며, 주입된 줄기세포의 직접적인 분화나 사이토카인 등에 의한 paracrine 효과 등이 모두 가능한 기전으로 제시되고 있다. 그 외에 G-CSF 자체가 가지고 있는 병적인 심실 재형성의 방지효과가 가능한 기전으로 생각될 수 있겠으나,<sup>7)</sup> 그 기여의 정도는 G-CSF 단독 투여군이 유의한 호전을 보여주지 못한 점을 고려할 때 미미한 정도일 것으로 판단된다.

본 연구에서는 기저 심기능의 저하가 심한 사람일수록 줄기세포치료에 의한 심기능 호전의 정도가 크게 나타났으며,

대조군에서 이 같은 연관성을 확인할 수 없었다. 이런 경향은 기존의 연구에서도 관찰되었다.<sup>2)</sup> 즉 심근 손상이 큰 심근 경색증 환자일수록 치료의 효과가 크다는 희망적인 결과이나, 이 결과를 본 연구에서 배제된 좌심실 기능의 저하가 매우 심한 환자들에게까지 연장할 수 있을지는 분명하지 않다.

### G-CSF가 재협착에 미치는 영향

본 연구에서 저자들은 G-CSF의 투여 자체와 G-CSF의 투여시기가 재협착과 관련이 있음을 확인하였다. 물론 통계적인 유의성은 확인하지 못하였으나 저자들은 실험적 치료에 있어 부작용의 발생은 통계적 유의성보다는 가능성에 좀더 비중을 두어서 평가되어야 한다고 판단하였고 그에 따라 대상군의 모집을 조기 중단한바 있다. 본 연구 결과에 따르면 G-CSF가 관동맥 성형술 전에 투여된 경우에 보다 재협착의 위험도가 더욱 증가하는 경향을 보였으나, 이는 임상연구 전 본 연구진에 의해 시행된 동물 실험결과와는 정반대의 결과이다.<sup>19)</sup> 백서를 이용한 동물 실험에서는 GM-CSF/G-CSF를 혈관손상 유발 전에 투여한 경우에 혈관내피의 재생이 촉진되고 신생내막의 생성도 감소하는 결과를 보였다. 이는 단기간의 동물실험결과가 임상연구에서는 재현되지 않을 수 있음을 보여주는 예라고 할 것이다.

G-CSF에 의한 재협착의 발생을 설명할 수 있는 몇 가지 가설을 고려할 수 있다. 첫째로는 동원된 줄기세포 중 신생내막 생성을 촉진하는 평활근 전구세포가 포함되어 있고, 이들이 신생내막 성장에 기여하는 경우이다. 이 같은 가능성은 Sata 등<sup>17)</sup>의 연구에서 확인되었으며, 본 연구진도 배양조건 내에서 모집된 줄기세포에서 평활근 전구세포의 존재를 확인할 수 있었다. 이 같은 세포는 G-CSF 투여 전에는 말초혈액 내에 극소수만 존재하고 있다. 둘째로는 G-CSF에 의한 동맥경화반 및 혈관내의 염증의 악화 가능성이다. 염증의 악화는 신생내막 성장이나 동맥경화의 중요한 원인의 하나로 알려져 있다.<sup>218)</sup> 그러나 본 연구에서는 신생내막의 증식 정도와 CRP로 측정된 전신 염증의 정도( $r=-0.116$ ,  $p=0.626$ )나 말초혈액 백혈구의 수( $r=-0.078$ ,  $p=0.717$ )에서 연관성을 확인할 수 없었다. 그러나, 혈관 내부의 염증을 직접적으로 측정하지는 못하였으므로, 혈관 내 염증의 신생내막 증식과의 관련성을 배제할 수는 없다고 판단된다.

### G-CSF투여와 관련된 잠재적 부작용과 그 해결책

G-CSF 투여와 관련되어 본 연구에서 보고된 유일한 잠재적 부작용은 재협착의 증가이다. 재협착은 G-CSF를 관동맥 성형술 이후에 투여함으로써 상당부분 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 이것만으로는 잠재적 부작용의 가능성을 충분히 배제할 수 없다고 판단하였고, 약물방출스텐트가 G-CSF에 의한 neointimal growth를 억제할 수 있음을 전임상 연구에서 확인하였고 이를 적용한 임상연구를 진행 중에 있다. 현재 진행중인 'MAGIC Cell-3-DES' 연구

에서는 G-CSF 투여에 따른 재협착 및 최소내경의 감소 정도가 대조군에 비해 차이가 없음을 확인할 수 있었다(6개월 추적관찰 시 최소내경 감소[late loss of MLD]: G-CSF 투여군[n=28]:  $0.17 \pm 0.21$  mm vs. 대조군[n=18]:  $0.23 \pm 0.40$  mm,  $p=0.433$ ). 일부 연구에서 G-CSF 투여에 따른 부작용을 보고하고 있다.<sup>14)20)</sup> 그러나 본 연구에서는 성공적으로 관동맥성형술을 시행한 환자에서 G-CSF를 단기간 투여하는 것은 안전함을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 G-CSF가 효과적인 줄기세포 동원유도제로 이용될 수 있음을 확인하였고, 모집된 세포를 관동맥으로 투여함으로써 심기능을 호전시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 G-CSF는 정도의 재협착 증가 가능성 이외에는 유의한 부작용 없이 안전하게 투여가 가능하였다. 그러나 G-CSF는 염증을 유발하거나 재협착을 유발할 잠재적 가능성을 가지고 있는 만큼 적절한 평가와 시행이 가능한 기관에서 적절히 검토된 계획에 따라 임상연구가 진행되어야 할 것으로 판단되며, 그 효과는 보다 대규모의 장기간 연구를 통해 평가되어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

G-CSF를 이용한 줄기세포치료법이 심기능 호전에 미치는 효과가 임상연구에서 체계적으로 평가되지 못하고 있다. 이에 저자들은 G-CSF를 이용한 2가지 줄기세포 치료법인 줄기세포 동원유도법과 동원유도된 줄기세포를 채집하여 관동맥 내로 주입하는 방법을 대조군 연구를 통하여 비교 평가하고자 하였다.

### 방 법 :

심근경색증 환자를 대상으로 G-CSF 단독 투여군(n=16), 동원유도된 줄기세포를 모집하여 관동맥 내로 투여하는 세포주입군(n=10), 그리고 대조군(n=15)으로 무작위 배정하여 심기능의 호전여부를 6개월 추적관찰을 통해 평가하였다.

### 결 과 :

6개월 추적 관찰결과 세포주입군에서만 치료 전에 비하여 유의한 좌심실 수축기기능의 호전( $p<0.001$ )과 좌심실 용적의 감소( $p<0.01$ )를 관찰할 수 있었으며, G-CSF군에서는 호전이 관찰되지 않았다. 세포주입군에서 대조군에 비해 심기능의 호전의 정도가 큰 경향을 보였으나, 통계적인 유의성은 확인하지 못하였다. 또한 G-CSF를 투여 받은 경우에 대조군에 비해 재협착의 빈도가 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다( $p=0.185$ ).

### 결 론 :

G-CSF는 효과적으로 줄기세포를 동원할 수 있었으며, 관동맥 내 세포주입법이 G-CSF 단독 투여에 비해 심기능의 호전에 있어 우월한 효과를 보였다. G-CSF 투여는 관동맥 재협착을 정도로 증가시키는 경향성을 보였다. 줄기세포치료



법의 효과는 대규모의 장기간 대조군 연구를 통하여 평가되어야 할 것으로 판단된다.

**중심 단어 :** G-CSF ; 심근경색증 ; 재협착.

본 연구는 Korea Health 21 R&D project, 보건복지부(02-PJ10-PG8-EC01-0026), 허혈성 심질환(0 임상연구센터, 보건복지부 412-CR02-0704-0001)와 세포융용연구사업단, 과학기술부(SC3150)의 보조에 의해 진행되었음.

## REFERENCES

- 1) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
- 2) Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1690-9.
- 3) Lim DS. Stem cells for cardiovascular disease. *Korean Circ J* 2004;34:435-40.
- 4) Baek SH. The current concept of cell therapy for heart failure. *Korean Circ J* 2005;35:415-23.
- 5) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10344-9.
- 6) Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104:3581-7.
- 7) Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004;109:2572-80.
- 8) Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 2004;18:851-3.
- 9) Harada M, Qin Y, Takano H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005;11:305-11.
- 10) Suarez de Lezo J, Torres A, Herrera I, et al. Effects of stem-cell mobilization with recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients with percutaneously revascularized acute anterior myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2005;58:253-61.
- 11) Kueth F, Figulla HR, Voth M, et al. Mobilization of stem cells by granulocyte colony-stimulating factor for the regeneration of myocardial tissue after myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129:424-8.
- 12) Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005;112 (Suppl):173-80.
- 13) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-6.
- 14) Hill JM, Syed MA, Arai AE, et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1643-8.
- 15) Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, et al. Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT. *J Nucl Med* 1995;36:2138-47.
- 16) Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 1989;2:358-67.
- 17) Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403-9.
- 18) Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-30.
- 19) Cho HJ, Kim HS, Lee MM, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation* 2003;108:2918-25.
- 20) Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1510-20.