

## 소아소화기질환에서 줄기세포: Hirschsprung병

건국대학교 의학전문대학원 소아과학교실

배 선 환

### Stem Cell in Pediatric Gastrointestinal Tract Disease: Hirschsprung Disease

Sun Hwan Bae, M.D., Ph.D.

Department of Pediatrics, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea.

Stem cell is characterized with self-renewal and mult-potency. Many pediatric gastrointestinal diseases have defect in enterocytes, enteric nervous system, and Interstitial cell of Cajal. Various kinds of stem cell could be applied to these diseases. Here, the author introduces stem cell for pediatric gastrointestinal diseases, particularly Hirschsprung disease. (Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011; 14(Suppl 1): S42 ~ S46)

**Key Words:** Stem cell, Hirschsprung disease

줄기세포(stem cell)를 이용한 새로운 치료법의 도입은 의학의 여러 분야에서 새로운 문을 열고 있다. 신경세포 재생, 골/연골세포 재생, 피부세포 재생 및 골수세포 재생을 이용한 치료법은 이미 실용화되어 환자치료에 사용되고 있다. 소화기질환에서 줄기세포를 이용한 치료법의 발전은 다소 늦은 감이 있으나, 현재 빠른 속도로 발전하고 있다. 이번 글에서는 줄기세포를 소개하고 이용한 Hirschsprung병의 치료에 대하여 소개하고자 한다.

줄기세포란 원시상태(primitive)이거나 상대적으로 덜 분화된(unspecialized) 태아 또는 성체조직의 세포로 자

신을 스스로 복제하는 능력(self-renewal)과 조직의 모든 세포로 분화(multipotency)할 수 있는 능력을 갖고 있는 세포로 정의할 수 있다<sup>1,2)</sup>. 줄기세포는 세포의 기원, 세포분열 상태, 기관(organ), 및 물리적 특성 등에 따라 분류할 수 있다. 세포의 기원에 따르면 embryonic SC (ESC), induced pluripotent SC (IPSC), mesenchymal SC (MSC), tissue SC (TSC) 등으로 분류할 수 있다. 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 다능성 세포(pluripotent)로 배세포(blastocyte)에서 얻을 수 있으며, 외·중·내배엽(ecto/meso/endoderm) 조직으로 분화할 수 있다. 윤리적 문제로 현재 연구에 제약을 받고 있으며, 면역반응을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. IPSC는 다능성 세포(pluripotent cell)로 체세포(somatic cell)에서 얻을 수 있으며, 외·중·내배엽조직으로 분화할 수 있다. 환자에게 적합한 특별한 세포를 얻을 수 있으며, 이 경우 면

접수 : 2011년 12월 24일, 수정 : 2011년 12월 29일, 승인 : 2011년 12월 29일  
책임저자 : 배선환, 143-729, 서울시 광진구 화양동 4-12  
건국대학교 의학전문대학원 소아과학교실  
Tel: 02-2030-7554, Fax: 02-2030-7749  
E-mail: baedori@hanafos.com

역반응을 조절하기 위한 면역억제가 필요하지 않다. 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)는 multipotent cell로 뼈, 골수, 지방조직 등에서 얻을 수 있으며, 중배엽조직으로 분화할 수 있으며, 외배엽, 내배엽조직으로도 분화가능한 것으로 여겨지고 있다. 면역반응을 유발하지 않는 것으로 여겨지고 있으며, 항염작용을 지니고 있어 이를 이용한 질병 치료도 시도되고 있다. 조직줄기세포는 multipotent cell로 성체조직에서 얻어지며, 해당 조직계열세포(tissue restricted lineage only)로만 분화할 수 있다. 환자에게 적합한 특별한 세포를 얻을 수 있으며, 이 경우 면역억제가 필요하지 않다<sup>1,3</sup>. 세포분열 상태를 기준으로 줄기세포는 상대적으로 세포분열 횟수가 많지 않고 조용한 상태를 유지하는 휴식기 줄기세포(quiescent stem cell, 보기 +4 cells)와 상대적으로 활발하게 세포분열을 하는 활동기 줄기세포(active stem cell, 보기 CBCs)로 나눌 수 있다. 휴식기 줄기세포는 주로 비대칭 분열을 하여 자신의 특징을 지키는 휴식기 세포 및 활동기 줄기세포로 변화할 줄기세포로 분열하여 줄기세포 속성을 유지한다. 활동기 줄기세포는 주로 대칭성 분열을 하여 새로운 세포들이 필요한 요구에 부응한다. +4 cell과 CBC는 서로 전환이 가능한 것(interconversion)이 최근 증명되었으며, 이는 조직이나 기관의 요구에 따라 조절되는 것으로 생각된다<sup>4,5</sup>. 최근 연구에서 호산성 과립세포(paneth cell)가 활동기 줄기세포의 수를 조절하는 데 관여하는 것이 입증되었다<sup>6</sup>. 기관에 따른 분류를 하면 장관줄기세포(소장 및 대장), 식도 줄기세포, 위줄기세포, 간줄기세포, 췌장줄기세포 등으로 구분할 수 있다.

다양한 줄기세포의 획득은 조직 및 기관의 재생이라는 측면에서 여러 가지 장점을 갖고 있지만 종양발생이라는 반대급부도 있음을 인식해야 한다<sup>7</sup>.

줄기세포를 인식하는 방법은 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 표식자(reporter gene)를 갖는 줄기세포를 이식하여 상당기간 관찰하여 이 세포로부터 목적하는 조직의 모든 세포들까지 분화하여 가는 것을 입증하는 방법으로 lineage tracing방법으로 불리며 가장 확실하게 줄기세포를 확인하는 방법이다(Fig. 1)<sup>8</sup>. 두 번째는 줄기세포가 갖고 있는 특정 분자나 단백질(marker molecule)을 확인하는 방법으로 면역조직염색법 등을 이용한다. 예로 OCT4, Nanog, SOX2, SSEA4 등은 인간

배아줄기세포의 지시자(marker)로 사용되며 소장의 CBCs (crypt base columnar cells)는 Lgr5, OLFM4, Ascl2, Msi1 등의 지시자를 갖고 있으며, LRCs (label retaining cells)는 BMI 1, DCAMKL1, mTERT, BmpR1a 등의 지시자를 갖고 있다<sup>9</sup>. 이들 지시자를 이용하면 실험실에서 유용하게 사용된다. 다음으로는 줄기세포의 물리적 특징을 이용하는 것이며, 중간엽줄기세포 정의에 플라스틱에 잘 들러붙는 성질을 포함하는 것이나<sup>3</sup>, 줄기세포의 경우 분화하지 않는 상태에서 둥근모양을 유지하는 것 등을 말한다.

소화기분야에서 줄기세포의 사용은 크게 3가지로 요약할 수 있는 바, 줄기세포 기능(stem cell activity)을 통해 여러 세포로 분화하면서 조직 기능을 원상복구시키는 것이다(restore tissue function). 줄기세포는 간세포, 장세포, 심장세포, 골세포, 지방세포 등으로 분화할 수 있으며, 이를 이용하여 간부전, 심부전, 장부전 등에서 줄기세포 치료를 이용할 수 있다. 두 번째는 줄기세포가 갖는 주변분비 기능(paracrine function)을 이용하여 조직치유(tissue repair)를 촉진하는 것이다. 줄기세포는 VEGF, IGF-1, EGF 등 성장인자를 분비하여 조직치유를 촉진할 수 있다<sup>10</sup>. 세 번째, 중간엽줄기세포는 면역기능을 조절하는 동시에 염증 반응을 억제하는 기능을 갖고 있으며, 이미 염증성 장질환(IBD)에서 치료가 시

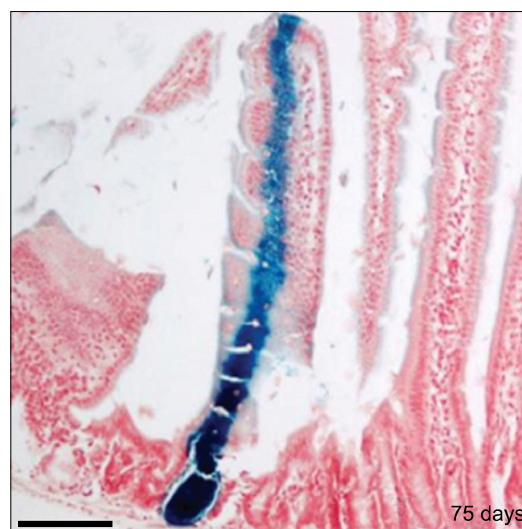
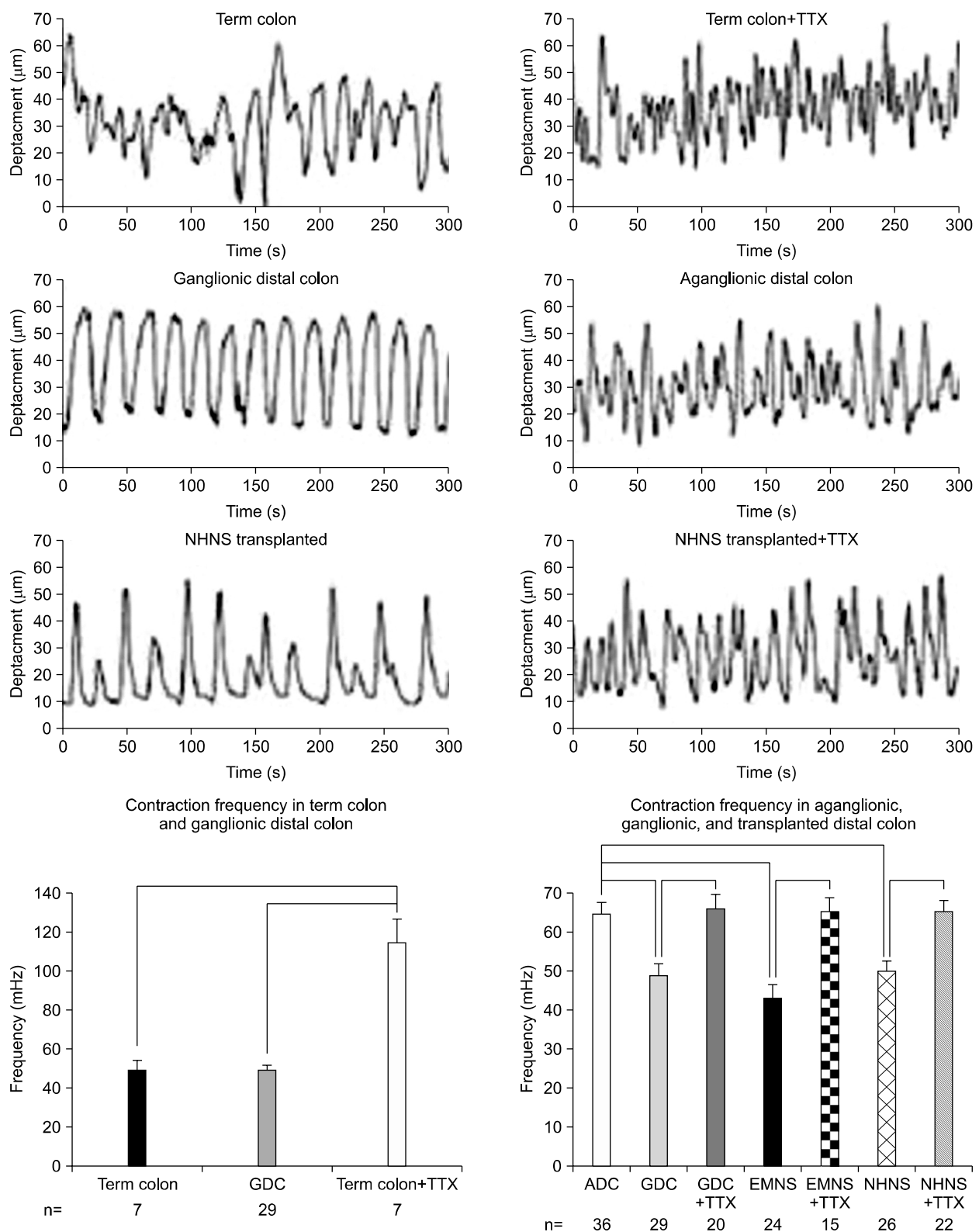


Fig. 1. Lineage tracing in the small intestine confirms intestinal stem cells. In this case, LacZ activity was used as a reporter gene<sup>8</sup>.



**Fig. 2.** Neurons from transplanted neurospheres regulate the contractility of developing gut. EMNS and NHNS transplanted bowel have comparable contraction frequencies to ganglionic distal colon, but have significantly lower contraction frequencies than aganglionic distal colon, demonstrating a functional effect of neurosphere transplantation<sup>18)</sup>. EMNS: aganglionic distal colon transplanted with embryonic mouse neurosphere, NHNS: aganglionic distal colon transplanted with neonatal human neurosphere, TTX: tetrodotoxin.

도되었다. 줄기세포는 PGE2, TGF-beta, IL-10을 통하여 면역반응을 조절하며, 조절 T 세포에 직·간접적으로 관여하고 선천면역과 적응면역에 관여하여 염증반응을 억제한다<sup>11)</sup>. 실제로 소화기영역에서 얻어진 줄기세포 치료의 결과는 간부전에서 중간엽 줄기세포를 이용하여 치료한 경우<sup>12)</sup>, 만성염증성 장질환에서 중간엽 줄기세포를 이용하여 관해를 유도한 경우<sup>13)</sup>, 조직 줄기세포를 이용하여 Hirschsprung병 치료 등을 시도한 경우 등이 보고되어 있다. 소화관에서 줄기세포를 이용한 세포수준의 재생을 목표로 할 때 장세포(gastric epithelial cell, enterocyte, colonocyte), 장신경세포(enteric neuron), 장 ICC (interstitial cell of Cajal)의 재생이 우선적으로 실제화될 것으로 전망된다. 필자의 경험으로 생쥐(mouse)에서 배아줄기세포를 국소적으로 또는 전신적으로 투여하여 위 상피세포를 재생할 수 있었다. 이러한 결과는 향후 단장증후군 등의 치료에서 의미있게 이용될 수 있을 것이다. 장신경세포의 재생측면에서 소아소화기질환 가운데 가장 주목받고 있는 질환은 Hirschsprung병이다. 주지하는 바와 같이 Hirschsprung병은 대장발달 도중 신경능선(neural crest)에서 출발한 신경줄기세포(neural crest cell)들이 목적지에 도달하지 못하여 부교감신경절세포가 형성되지 않는 질환이다<sup>14)</sup>. 현재 장신경줄기세포를 얻을 수 있는 근원으로는 배세포, iPSC, 태아 뇌에서 얻은 신경줄기세포, 태아 비뇌기원 신경줄기세포(예: neural crest stem cell, enteric neural stem cell), 성체조직(신생아/소아/성인 장)에서 얻어지는 장신경줄기세포가 있다. 이 가운데 윤리적 문제나 면역억제제제를 해결할 수 있는 성체조직 장신경줄기세포가 현재 가장 관심을 받고 있다. 성체 장조직을 얻어 여기에서 Neurosphere (줄기세포와 이것으로부터 분화된 초기세포형태들의 덩어리)를 분리하여 이를 증식시켜 신경줄기세포를 확보하게 되는데<sup>15,16)</sup>, 점막 조직과 전층 장 조직을 모두 사용할 수 있으며, 최근 상부위 장관 내시경을 이용하여 채취한 장 점막 조직에서 Neurosphere를 배양해 냄으로써 장신경 줄기세포를 이용한 장신경 재생에 획기적 진보를 이루었다<sup>17)</sup>. 이후 배양된 Neurosphere에서 신경세포, 신경아교세포(glial cell), 민무늬근육(smooth muscle) 등이 분화되는 것이 증명되었으며<sup>15~17)</sup>, 이들 신경이 Hirschsprung병 조직에서 정상적으로 시냅스를 형성하고, 정상적으로 근수축

을 수행할 수 있음을 입증하였다(Fig. 2)<sup>18)</sup>. 현재 Hirschsprung병에서 실제로 장신경줄기세포를 이용한 치료를 적용하는데 있어서는 아직 몇 가지 해결해야 할 문제점이 있을 것으로 생각된다.

첫째, 적절한 Neurosphere를 배양해 낼 조건들에 대한 보편적 프로토콜이 정립되어야 할 것으로 생각된다. 둘째, 소장 또는 대장질환 치료 시 Neurosphere 출처에 대한 차이가 치료 결과에 미치는 영향에 대한 평가가 필요할 것으로 생각된다. 세 번째, 치료 시 필요한 적절한 Neurosphere 수에 대한 결과들이 제시되어야 할 것으로 생각된다. 네 번째, 질환침범 정도에 따라 가장 합리적인 투여경로에 대한 모색이 있어야 할 것으로 생각된다. 다섯 번째, Neurosphere가 대장조직에 안착하여 정상조직으로 분화하는 과정을 돕거나 촉진할 수 있는 요인들에 대한 평가가 필요할 것으로 생각된다. 여섯 번째, Neurosphere 이식 후 이에 대한 모니터링과 평가에 대한 보편적 프로토콜이 정립되어야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Quante M, Wang TC. Stem cell in gastroenterology and hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:724-37.
- 2) Mills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cell. *Gastroenterol* 2011;140:412-24.
- 3) Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* 2010;3:248-69.
- 4) Baker N, De Wetering MV, Clevers H. The intestinal stem cell. *Gen Dev* 2008;22:1856-64.
- 5) Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, Wang Q, Lu MM, Epstein JA. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 2011;334:1420-24.
- 6) Sato T, Van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in the intestinal crypts. *Nature* 2011;469:415-8.
- 7) Kelly PN, Dakic A, Adams M, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cell. *Science* 2007;317:337.
- 8) Snippert H, Van Es JV, van den Born M, Begthel H, Stange DE, Barker N, et al. promin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine.

- Gastroenterology 2009;136:2187-94.
- 9) Umar S. Intestinal stem cells. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:340-8.
- 10) Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:419-27.
- 11) Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Research* 2010;20:510-8.
- 12) Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008;134:2111-21.
- 13) Brittan M, Alison MR, Schier S, Wright NA. Bone marrow stem cell-mediated regeneration in IBD: where do we go from here? *Gastroenterology* 2007;132:1171-3.
- 14) Kapur RP. Hirschsprung disease and other enteric dysgangliosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999;36:225-73.
- 15) Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* 2007;56:489-96.
- 16) Metzger M, Bareiss PM, Danker T, Wagner S, Henzelotter J, Guenther E, et al. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology* 2009;137:2063-73.
- 17) Metzger M, Cadwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology* 2009;136:2214-25.
- 18) Lindley RM, Hawcutt DB, Connell MG, Almond SN, Vannucchi MG, Simonetta M, et al. Human and mouse enteric nervous system neurosphere transplants regulate the function of aganglionic embryonic distal colon. *Gastroenterology* 2008;135:205-16.