

방사선의 의학적 이용연구

Radiation Research for Clinical Application

방사선 손상 조직회복 기술 개발

Development of therapeutic strategy for the recovery  
of radiation-induced tissue damage

주관연구기관  
한국원자력연구소  
부설 원자력의학원

과 학 기 술 부

# 제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “방사선 손상 조직 회복 기술 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2005. 5. .

연 구 기 관 명 : 원자력의학원

연 구 책 임 자 : 손 영 숙

연 구 원 : 김 천 호 김 태 환  
박 현 숙 진 용 재  
박 영 건 이 동 선  
이 승 재 이 은 경  
이 지 연 정 희 용  
정 은 경 한 규 보  
홍 현 숙

위탁연구기관명 : 가톨릭의과대학

위탁연구책임자 : 오일환

연 구 원 : 김 세 은 임 정 연  
조 원 경

## 최종연구보고서 초록

과제 관리번호	M2-0333-01-0001	해당단계 연구기관	원자력의학원	단계구분	3단계 /총3단계
연구사업명	중사업명	원자력연구개발 중장기계획 사업			
	세부사업명	원자력연구개발 중장기계획 사업			
연구과제명	대과제명	방사선의 의학적 활용 기술 개발			
	세부과제명	방사선 손상조직 회복기술 개발			
연구기관명 (연구책임자)	원자력의학원 (손영숙)	해당단계 연구인력	내 : 6 M·Y	연구비	정부 : 468,700 천원
			외부 : 10 M·Y		민간 :            천원
			계 : 16 M·Y	계 : 468,700 천원	
위탁연구	연구기관: 가톨릭의과대학    연구책임자: 오일환				
국제공동연구	상대국명:	상대국연구기관명:			참여기업
색인어 (각5개이상)	한글 : 방사선, 줄기세포, 조혈모, 위장관, 상처치유				
	영어 : Radiation, stem cell, hematopoietic, gastrointestinal, wound healing				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				면수	61
<p>1. 연구 개발 목표 및 내용</p> <p>목표: 재생의학 기술을 이용한 방사선 피폭 환자 치료용 손상 조직 회복 기술 개발</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 조혈 줄기세포 및 간충직 세포를 이용한 방사선 손상회복 세포치료기술개발</li> <li>• 줄기세포 및 서방형 성장인자 전달을 이용한 위장관계 손상 치료기술</li> <li>• 성체줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 손상 치료기술 개발</li> </ul> <p>2. 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 방사선 조사 후 골수 재생능의 단계별 분석</li> <li>• 골수재생과정에서의 기질세포의 역할 규명</li> <li>• 방사선조사에 의한 기질세포기능변화 분석</li> <li>• 이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면역관용유도 물질 개발</li> <li>• 위장관계 손상 치료를 위한 서방형 성장인자 전달법 수립</li> <li>• 성체 조직에서 교차 분화 가능한 잔여 줄기세포 탐색</li> <li>• 성체 줄기세포의 신경줄기세포 특이적 분화 유도 조건 수립</li> </ul> <p>3. 기대효과 및 활용방안</p> <p>손상조직에서 다량 분비되고 골수의 간충직 줄기세포를 유리시켜 손상 부위로 모이게 해 주는 substance-p를 의료용 재료에 함유시켜 controlled release가 가능하도록 개발을 추진하여 각종 손상 조직 치료에 활용될 수 있는 의료제품으로 실용화시킬 계획임. 아울러 방사선에 의한 골수 및 위장관 손상의 substance-p 및 DDS 이용 신치료법 구축</p>					

# 요 약 문

## I. 제 목

방사선 손상 조직 회복 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

목적:

재생의학 기술을 이용한 방사선 피폭 환자 치료용 손상 조직 회복 기술 개발

필요성:

현재 원자력 발전 이외의 대체 에너지 개발 기술의 대안이 없는 현 시점에서 원자력 발전은 불가피한 우리의 선택일 수밖에 없고, 이와 같은 상황에서 원자력 종사자들의 불의의 사고에 대한 방사선 피폭 치료 기술은 시급한 기술적 과제이다. 이를 위하여 국가방사선 비상 응급 진료 대책 및 체계 구축 외에도 방사선에 대한 생체의 손상 및 재생 기술이라는 기반 기술로서 또한 더욱 개발되어야 한다. 원자력 발전 외에도 핵의학을 비롯한 전리방사선 관련 기술은 현대 의학에 있어서 진단 및 치료수단으로 확고한 자리를 잡아가고 있다. 따라서 치료 방사선에 대한 노출에 대비한 치료법 개발도 그 중요성이 대두되고 있다. 인체는 전리방사선에 노출되었을 때 골수, 생식세포, 각막, 폐, 위장관계, 신경계 및 피부 등의 신체의 각 부위에 장애를 유발한다.

현재 방사선 피폭에 의한 조직 손상 및 방사선 치료 시 동반되는 조직 손상을 치료하는 기술은 국내·외적으로 취약하다. 최근 들어 줄기세포를 이용한 손상

조직 재생에 대한 기대가 점점 현실로 다가오고 있다 (Nature, March, 2001; Nature Cell Biology, September, 2001). 배아 줄기세포 뿐 아니라 성체 조직에도 다양한 pluripotent stem cell/multi-potent stem cell이 존재한다고 보고 되면서 이들 성체 줄기세포의 identification 및 selection, 배양, 분화 기술에 대한 연구가 매우 활발하다. 아울러 조직 공학적 개념을 도입하여 이들 세포에 생체 진화적인 matrix를 제공하여 조직을 재건, 세포를 이식하여 손상된 조직을 재생/복구, 생체 내의 생리활성 물질을 찾아 이를 약물로 개발, 생체의 재생 기능을 촉진하는 재생 치료법 개발 등, '재생의학'이라는 새로운 학문의 틀이 그 자리를 잡아가고 있다. 재생의학은 최첨단 의료과학으로서, 본 연구 개발 성공 시 핵심의료 기술을 확보함으로써 선진국 기술종속을 탈피하고 국제 경쟁력을 확보할 수 있으며, 장기 및 조직 이식의 대체 요법으로 국민의 의료의 질 향상과 함께 국민 보건 의료에 크게 기여하리라고 본다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. 조혈 줄기세포 및 간충직 줄기세포 (mesenchymal stem cell, MSC) 를 이용한 방사선 손상회복 세포치료기술개발

##### 가. 방사선 조사 후 골수의 재생능 및 기질세포의 영향

##### 1) 방사선 조사 후 골수 재생능의 단계별 분석

단기성 줄기세포에 대한 방사선 조사의 영향은 비장 집락군을 형성할 능력이 있는 세포를 동정하는 colony forming unit-spleen (CFU-S) 의 수적 변화를 방사선 조사 후 추적하였으며, 전구세포 및 oligo-lineage progenitor cell 들에 미치는 영향은 semi-solid methyl-cellulose에서 집락을 형성하는 능력을 측정하는 colony forming cell (CFC) assay를 통하여 동정하였음.

골수기질세포에 대한 영향은 방사선 조사된 골수세포를 채취하여, 10 - 14일간 기질세포를 배양하여, 집락군 (CFU-F)를 형성하는 세포들의 변화를 crystal violet 염색을 통하여 추적하였음.

## 2) 골수재생과정에서의 기질세포의 역할 및 방사선 조사에 의한 기질세포기능 변화 분석

방사선 조사에 의한 골수기질세포의 재생 역학 분석

골수 재생 중 기질세포의 역할 분석

### 나. 이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면역관용유도 물질 개발

#### 1) 쥐 MHC (조직항원) 및 FasL CD40 유전자 발현 Retroviral Vector의 벡터 제작

Class I 및 II MHC Type이 상이한 세 가지 mouse strain을 구입하여 breeding 하여 retroviral vector 외에 유전자의 발현벡터를 조사하였다.

#### 2) 생쥐 골수세포에의 유전자 이식 조건 확립

골수세포로의 효과적인 유전자전달 기술의 확보를 위해 total bone marrow, 혹은 lineage marker-positive 세포를 제거한 분화초기세포를 분리하여 cytokine 존재 하에서 유전자 전달 효율을 비교 검토하였다.

#### 3) 생쥐모델에서의 골수이식이 이형 MHC를 지닌 조직거부에 미치는 영향

골수이식의 이식 조직에 대한 관용성 유도 효과를 검증하고 이식 protocol을 확립하기 위하여 Balb/c mouse에 C57BL6 골수를 이식하고 골수를 이식한 경우와 control 사이에 이식된 피부조직에 대한 거부반응 Kinetics의 차이를 분석하였다.

### 다. 손상조직 미세환경에서 간충직 줄기세포 가동화 인자 추적

골수의 간충직 줄기 세포(mesenchymal stem cell)가 손상된 조직의 회복에 관여하는지를 검토하고, 이 과정에 골수로부터 간충직 세포를 혈중으로 유리시키는 기능을 가진 인자들을 PCR과 ELISA로 분석하여, 관련 후보 인자를 동정하고, 이 후보인자가 간충직 줄기세포가 골수로부터 유리(mobilization)되어 혈중으로 이동하여 손상 조직에 침착하여 손상 조직 회

복에 에 관여하는지를 분석하였다.

라. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 substance-p의 역할 규명

1) MMP activity

In vitro상에서 간충직 줄기세포에 substance-p를 처리하여 MMP 활성도가 증가하는지를 gelatin zymography로 확인, MMP 분비 및 TIMP-1의 분비, MT1-MMP의 발현을 면역블롯팅으로 확인하였다.

2) 세포 이동

Millicell(insert plate)을 이용하여 간충직 줄기세포의 하층부에 substance-p를 농도별로 처리하여 간충직 줄기 세포가 농도 의존적으로 이동하는지 확인하였다.

마. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 substance-p의 신호 전달

Substance-P 100 nM을 간충직 줄기세포에 처리 후 Erk 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

바. Substance-p 혈중 내 injection에 의한 CD29+ cell의 혈중 유리

골수로부터 간충직 줄기 세포의 혈중 유리에 대한 영향을 알아보기 위해 알칼리 화상 모델 생쥐의 꼬리 부분 정맥에 0.1 n/g(65ng/g)의 substance-P를 주사, 24 시간 후 전체 혈액을 취하여 그 중 단핵구를 분리하고, 간충직 줄기세포의 표지자인 CD29 (integrin b1)에 대한 면역 염색을 실시하여 혈중에 존재하는 간충직 줄기세포의 비율을 확인 하였다.

사. substance-p iv injection의 손상 치유 촉진 효과

알칼리 화상을 입힌 뒤, substance-P를 주사하지 않은 토끼와 주사한 토끼의 각막을 비교하여 substance-p가 상처 치유에 영향을 미치는지 확인 하였다.

2. 줄기세포 및 서방형 성장인자 전달을 이용한 위장관계 손상 치료기술

가. 위장관 줄기세포의 동정 및 최적 배양 조건 수립

일차 분리 배양 된 crypt cell의 기저부 세포에서 발현되는 후보 표지자들을 면역 염색으로 확인.

세포외 기질과 성장인자의 조합으로 세포 배양의 조건을 최적화.

나. 위장관 조직 재생의 최적 성장인자 병합 조건 수립, 서방형 담체 개발

1) 방사선 조사 위장관계 손상 회복 모델

생쥐에 전신 피폭의 방사선 dose를 다양하게 조사 후 위장관 조직을 whole mount 염색하여 위장관 손상 및 재생을 확인하기에 적정 dose를 수립하였다.

2) 위장관 조직 재생의 최적성장 서방형 담체 개발

생체적합성이 뛰어난 젤라틴을 이용하여 pH에 따른 방출거동이 다른 두 종류의 담체 개발

다. 조직재생의 지지체의 제조 조건의 수립을 위한 nanopattern 제조 및 세포외기질 성분의 선택적 코팅법 개발

1) Gene activated matrix (GAM) 물질 개발

2) 나노 스탬프(nano stamp) 제조

3) 친수성/소수성질이 다른 두 종류의 알칸치올유도체[o-Mercapto-oligo (ethylene glycol)] 합성을 통한 패턴확인으로 선택적 코팅법을 개발

3. 성체줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 손상 치료기술 개발

가. 성체 조직에서 교차 분화 가능한 잔여 줄기세포 탐색

성인줄기세포의 탈분화능 및 다분화능이 보고 되면서 다분화능 자가 줄기세포를 이용한 다양한 조직 재생의 가능성에 대한 기대가 증가하게 되었고, 최근에 진피에 존재하는 skin derived precursor cells (SKPs)이 보고되었다. 이들 세포는 in vitro에서 근육, 신경, glial 세포로 분화가 가능함이 입증되었다. 이와 같은 보고는 인체의 가장 큰 면적을 차지하며, 체외에 있어 생검이 용이한 피부 조직의 multi-potent stem cell source로서의 가능성을 탐색하였다.



#### 나. 조직 특이적 분화 유도 조건 수립

DMEM 과 F-12 가 3:1 로 혼합된 배지에 B27, 40 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml LIF를 첨가하여 배양 후 다양한 분화 유도 조건을 제공하여 신경 줄기세포의 표지자인 nestin 발현 여부 및 dendrite형성, 신경세포 표지자인 bIII tubulin, post-mitotic 신경세포 표지자인 MAP2, astrocyte 표지자인 GFAP 발현 여부를 비교 관찰하였다.

### IV. 연구개발결과

#### 1. 조혈 줄기세포 및 간충직 세포를 이용한 방사선 손상회복 세포치료기술개발

##### 가. 방사선 조사 후 골수의 재생능 및 기질세포의 영향

1) 분화단계가 진행된 전구세포(progenitor cell)들에 비해 미분화된 조혈줄기세포들이 방사선 조사에 대해 더 sensitive하며, 초기 생착이 가능한 Lymphoid progenitor cell 들이 Myeloid progenitor cell 에 비해 더 sensitive 한 것을 관찰 하였다.

2) 골수 미세 환경을 구성하는 간충직 줄기세포들도 방사선 조사에 조혈 줄기세포와 유사한 정도로 파괴되며, 5-6 주부터 재생되기 시작하고, high dose radiation 에서 재생하는데 더 시간이 걸림을 관찰하였다.

3) 방사선 조사에 의해 파괴된 골수미세구조는 1주일 이내에 거의 지방화 현상이 일어나, 정상구조를 대치함을 확인하였으나, 이들 지방세포의 기원에 대해서는 추가적 연구가 필요하다.

4) 골수파괴 후 재생되는 부착성 중간엽 줄기세포는 대부분 공여자 쪽이 아닌 수여자의 세포로 구성되어 있어 골수에 homing 하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 배양된 중간엽 줄기세포는 체내 주입 시 주로 간, 비장에 1-3일에 걸쳐 분포하다가 14일 이전에 소실되며, 골수로는 거의 생착되지 않음을 관찰하였다.

5) 그러나, 조혈줄기세포의 이식을 통한 골수재생과정에서 중간엽줄기세포와 혼합된 경우 유의하게 생착량이 증가되는 것을 관찰하였다.

나. 이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면역관용유도 물질 개발

1) 쥐 MHC (조직항원) 및 FasL CD40 유전자 발현 Retroviral Vector의 벡터의 제작

retroviral vector 외에 Kb, Db, IAb MHC 유전자 및 CD40유전의 발현벡터의 합성 및 발현이 확인되었음.

2) 생쥐 골수세포에의 유전자 이식 조건 확립

lineage marker를 지닌 세포를 제거한, 초기분화세포를 이용하여 유전자 이식을 수행하여 40 % 정도의 유전자 이입률 확인.

3) 생쥐모델에서의 골수이식이 이형 MHC를 지닌 조직거부에 미치는 영향

Day -5, Day -1에 anti-thymocyte serum을 복강 주사하고, Day 0 에 350 rad의 sub-lethal irradiation을 가하는 protocol을 확립하였다. skin transplant는 day 6에 수행하였다. 골수를 이식한 경우에 이식된 피부 조직이 장기간 유지됨이 관찰되었다.

다. 손상조직미세환경에서의 골수 간충직줄기 세포 가동화 인자 추적

분석한 20종의 인자들 중 Substance-P가 손상 조직 및 혈액에서 초기에 양이 증가가 가장 큰 후보인자임을 확인하였다.

라. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 Substance-p의 역할 규명

1) MMP activity

In vitro상에서 간충직 줄기세포에 Substance-p를 처리한 결과 농도 의존적으로 MMP-2와 -9의 분비량이 증가, TIMP-1, -2의 분비량은 감소, MT1-MMP의 분비량은 증가하는 것으로 세포외 기질은 분해하는 방향으로 작용함을 알 수 있고, 세포 이동에 positive영향을 미치리라 예상된다. Gelatin zymography 결과 MMP의 활성화도가 증가하는 것을 확인하였다.

2) 세포 이동

Millicell(insert plate)을 이용하여 간충직 줄기세포의 하층부에

substance-p를 농도별로 처리한 결과 substance-p가 농도 의존적으로 간충직 줄기 세포를 이동하는 것을 확인하였다.

마. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 Substance-p의 신호 전달

Substance-P 100 nM을 처리한 경우 Beta-catenin이 핵으로 이동한 것을 면역형광염색으로 확인하였고 또한 동일한 세포의 배양액에서 beta catenin에 의해 발현되는 단백질인 VEGF 및 fibronectin의 분비가 증가한 것을 확인하였다. 초기 signal인 Phospho-ERK level을 비교한 결과 1시간 배양 후 control에 비해 Phospho-ERK level이 높았으며 Substance-P 1, 10, 100 nM 모두에서 비슷한 수준으로 나타났다.

바. substance-p iv injection에 의한 CD29+ cell의 혈중 유리 증가

혈액 내 단핵구의 면역 염색을 실시한 결과 Substance-P를 주사하지 않은 경우에 비해 주사한 경우 CD29+ 세포들이 혈액 내 15배 정도 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 골수로부터 혈액으로 간충직 줄기세포가 이동되는 과정에 Substance-P가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 골수로부터 혈액으로 간충직 줄기세포가 이동되는 과정에 Substance-P가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

사. substance-p iv injection의 손상 치유 촉진 효과

알칼리 화상을 입은 뒤, Substance-P를 주사한 토끼의 각막은 상처 치유 속도가 현저하게 증가하였고 상처 부위에 CD29발현 세포의 비율이 증가하였다. 즉, substance-p가 간충직 줄기세포를 골수로부터 상처 부위로 이동시켜 상처 치유를 촉진하는 것으로 사료되었다.

2. 줄기세포 및 서방형 성장인자 전달을 이용한 위장관계 손상 치료기술

가. 위장관 줄기세포의 동정 및 최적 배양 조건 수립

일차 분리 배양 된 crypt cell의 기저부 세포에서만 특이적으로 b-catenin의 핵 내 발현이 관찰되었고 이 부위에서 Wnt target molecule의 발현을 더욱 확인하였고, HGF/SF와 type IV collagen (기저막 성분)의

조합으로 일차배양 위장관 상피세포의 콜로니 형성이 현저하게 향상되었다.

나. 위장관 조직 재생의 최적 성장인자 병합 조건 수립, 서방형 담체 개발

1) 방사선 조사 위장관계 손상 회복 모델

Whole mount 염색법으로 다양한 방사선 dose에서의 위장관 손상 및 재생을 확인하여 8 Gy를 위장관계 손상의 dose로 설정하였다.

2) 위장관 조직 재생의 최적성장 서방형 담체 개발

pH에 따라 팽윤정도가 다른 두 종류의 gelatin을 이용하여 위장관에서 성장인자의 서방성을 유지할 수 있는 서방형 담체 개발 및 성장인자 전달 기술을 확립하였다.

다. 조직재생의 지지체의 제조 조건의 수립을 위한 nanopattern 제조 및 ECM 성분의 선택적 코팅법 개발

1) Gene activated matrix (GAM) 물질 개발

Plasmid를 보호하기 위한 GAM 물질로서 Water-soluble low molecular weight chitosan (LWWC)를 제조하였고, Plasmid/LMWC complex가 형성되고 안전하게 보호함을 확인

2) 마이크로 스탬프(micro stamp) 제조

전자빔 식각 방법(Electron beam lithography)과 광 식각 방법(photo lithography)으로 스탬프를 제조하였고, 전자현미경, 위상차 현미경을 이용하여 패턴을 확인

3) 알칸치올[o-Mercapto-oligo(ethylene glycol)] 유도체 합성

HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> (OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH의 합성하기 위해 전구물질로 Undec-1-en-11-yl tri(ethylene glycol) Fw=302를 합성하여 계속해서 반응중간체인 1-Methyl carbonyl thio-undec-11-yltri (ethylene glycol) 합성하였으며, 최종 알칸치올 유도체인 1-Mercaptoundec-11-yl tri (ethylene glycol) 합성하여 선택적인 패턴 형성에 사용

4) ECM 성분의 선택적 코팅법 개발

PDMS 스탬프와 합성된 알칸치올 분자 잉크를 이용한 자가배열단층막을 제조한 다음, FN을 선택적으로 흡착시켰다. 이때 세포외기질과 형광체의 결합물(FITC conjugated ECM)을 이용한 패턴의 확인

### 3. 성체줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 손상 치료기술 개발

#### 가. 성체 조직에서 교차 분화 가능한 잔여 줄기세포 탐색

정상 피부 조직에는 신경 전구 세포가 존재하지 않음을 확인하였다. 또한 시험관 배양을 통해 피부 유래 섬유아세포의 약 80%를 신경세포로 유도시킬 수 있었음을 확인하였다.

#### 나. 조직 특이적 분화 유도 조건 수립

Spheroid 유도 및 nestin 발현 증가는 bFGF에 기인함을 규명하였다. 신경으로의 분화를 유도하기 위해 forskolin, retinoic acid, NGF, buffalin, PA6 feeder, 좌골신경에서 분리한 Schwann cells와 공동 배양 연구 등이 진행 중이다. 진피에서 유래한 Nestin 발현하는 spheroid의 특성 분석결과 neural crest stem cell 표식자인 p75를 발현하였고 그러나 인체 피부조직의 frozen 조직의 조직염색에서는 nestin 발현세포를 거의 확인 할 수 없어서 nestin 발현 spheroid 세포군은 인체 내의 잔류 줄기세포가 in vitro 배양 조건에서 선택적인 확장 혹은 induction에 의한 것으로 평가하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구결과는 방사선 조사 후 가장 예민하게 파괴되는 기관인 골수계의 방사선 조사에 따른 생물학적 영향평가의 지표로 활용될 수 있을 것임

2. 본 연구결과는 방사선 조사로 파괴된 골수 재생기술 개발을 위한 기반 자료로 활용될 수 있을 것임

3. 조혈줄기세포의 이식에 의한 재생과정에서 골수 미세 환경의 파괴와 중간엽

줄기세포의 생착특성을 밝힌 본 연구를 통하여, 보다 효과적인 미세 환경 재생을 위한 중간엽줄기세포 이식기술의 필요성을 밝혔으며, 골수 내 주입 (intrafemoral injection)등의 세포 재생기술 개발을 촉진하게 될 것으로 예상됨.

4. 손상조직에서 다량 분비되고 골수의 간충직 줄기세포를 유리시켜 손상 부위로 모이게 해주는 substance-p의 새로운 기능을 규명하였으므로 이를 특허 출원하고 또한 substance-p를 의료용 재료에 함유시켜 controlled release가 가능하도록 patch 형태로 개발을 추진하여 각종 손상 조직 치료에 활용될 수 있는 의료제품으로 실용화시킬 계획임.

5. 인체 피부 조직에서 신경 전구세포로 분화 유도시키는 기술을 개발하였고, 이는 본인의 신경 전구세포가 대부분 뇌 깊숙이 존재하고 있어 inaccessible stem cell로 활용이 어려우나 skin biopsy가 쉽고 상당량의 신경 전구세포(80% 이상)를 확보하는 기술로 본 과제에서 발전시켰으므로 accessible 신경 전구세포로서 신경계 및 척추 질환에도 활용 될 수 있는 중요한 기술로서 특허 출원이 진행 중이며 세포치료제로서의 in vivo 효능 검토 후 신경 치료세포치료제로 개발 할 것임.

6. 본 과제에서 개발할 줄기세포를 이용한 세포 치료 기술은 방사선에 의한 손상 조직의 기능 회복 및 조직 재생에 뿐만 아니라 여러 만성 질환, 난치성 질환, 사고, 암 절제술 및 방사선 암 치료 등으로 인한 조직 손상 및 기능 장애를 회복 시켜줄 고부가가치의 치료 기술로서 활용도가 클 것임.

S U M M A R Y  
( 영 문 요 약 문 )

I. Title

Development of therapeutic strategy for the recovery of radiation-induced tissue damage

II. Objectives and importance of the project

Objectives:

To develop regeneration technology for the radiation-induced tissue damage

Background

There has been increase in the number of nuclear power plants due to short of energy sources and radiation-related facilities due to its medical application in Korea. Therefore we are having increasing chances of radiation exposure. However we need to have safety and therapeutic strategy for those radiation-exposed victims. The most sensitive organs to radiation damages are bone marrow, gastrointestinal system and neuronal system. Currently, regenerative medicine and stem cells are emerging technologies. Recent report reveals that only embryonic stem cells but also adult stem cells share equal pluripotency, which brings omnipotent therapeutic power for tissue damages (Nature, March, 2001; Nature Cell Biology, September, 2001). In future, regenerative medicine will play a significant role in the treatment of the radiation-exposed

patients. In this regard, this project would make a significant step for the advance toward regeneration medicine for the cure of radiation-exposed victims.

### III. Scope and contents of the project

#### 1. Cell therapy using haematopoietic stem cell and bone marrow stroma cell

##### A. Regeneration capacity of bone marrow and marrow stroma cell implication to bone marrow regeneration after irradiation

###### 1) Grade analysis of bone marrow regeneration after irradiation

Radiation effect on bone marrow was analyzed by counting both colony forming unit-spleen (CFU-S) and colony forming cell (CFC) on semi-solid methyl-cellulose. After collecting irradiated bone marrow, primary cultured marrow stroma cells were analysed for CFU-F (crystal violet).

###### 2) Effects of marrow stroma cell on bone marrow regeneration

Kinetic assay of Regeneration capacity of marrow stroma cells after irradiation

Analysis of the role of marrow stromal cells during bone marrow regeneration

##### B. Immune tolerance induction using histocompatibility antigen and FAS gene delivery

###### 1) Construction of retroviral vector expressing MHC and FasL CD40 gene

###### 2) Optimization of gene delivery to mouse bone marrow

###### 3) Analysis of effects of bone marrow transplantation of allogenic MHC antigen in mouse model (Graft-versus-host reaction)



C. Identification of mobilization factor of mesenchymal stem cell

Identify candidate factors to mobilize mesenchymal stem cells among factors expressed in wound environment.

D. Biological effects of substance-p on mesenchymal stem cell mobilization from bone marrow

1) MMP activity

Expression of MMP-2, -9, MT1-MMP, TIMP-1 and MMP activity (zymography) of mesenchymal stem treated with substance-p.

2) Cell migration

We investigated whether substance-p induced mesenchymal stem cell migration/invasion using Millicell (insert plate).

E. Substance-p induced signal transduction pathway of mesenchymal stem cells

We analyzed Erk activation of mesenchymal stem treated with substance-p.

F. Effect of substance-p on mesenchymal stem cell (CD29+ cell) mobilization to the blood

We analyzed whether the proportion of CD29+ cells increased in the blood by intravenously injected substance-P (0.1 nmole/g(65ng/g)) in the mouse alkali burn model.

G. The wound healing effect of substance-p (iv injection)

In the rabbit alkali burn model, we investigated whether substance-p affected the rate of wound healing.

2. Remedy of damaged gastrointestinal tissue using stem cell therapy and sustained growth factor delivery system

A. Identification of GI stem cell and optimal culture condition

We immuno-stained whole crypts and intestine tissue sections with candidate stem cell markers. Primary culture condition of intestinal epithelium was optimized by the combination of extra-cellular matrix and cytokines.

B. Sustained growth factor delivery carrier, and combined condition for gastrointestinal tissue regeneration

1) Whole body irradiation animal model

2) Development of gelatin matrices as drug carrier for gastrointestinal tissue regeneration

C. Development of selectively nano-patterned ECM coating method for tissue engineered scaffolds

1) Gene activated matrix

2) Synthesis and identification of o-Mercapto-oligo(ethylene glycol) derivatives

3) Selectively ECM coating method using nano-patterned PDMS stamps

3. Transdifferentiation of adult stem cell to the therapeutic target cells

A. Identification of rudiment stem cells in adult tissues

Adult stem cells have been reported to have tremendous capability of differentiation, equal to embryonic stem cell, multipotency and pluripotency. A recent report showed that the unknown population of skin derived precursor cells (SKPs) in the skin of postnatal animal and man. Those cells were able to differentiate into myocytes, neurons, glial cells in vitro. Skin has advantages over other tissues, in that it has a massive size and easy to obtain.

## B. Establishment of tissue-specific differentiation condition for SKPs

Neural precursor cells were induced by the following conditions as DMEM: F-12 (3:1), B27, 40 ng/ml of bFGF, 20 ng/ml of EGF and 20 ng/ml of LIF. Neural precursor cells were further induced to differentiate into various lineages of neuronal and astrocytes and identified by the expression of nestin,  $\beta$ III tubulin, MAP2 (post-mitotic neuronal marker), GFAP (astrocyte marker) and morphological characteristics (dendrite formation).

## IV. Results

### 1. Cell therapy using haematopoietic stem cell and bone marrow stroma cell

#### A. Regeneration capacity of bone marrow and marrow stroma cell implication to bone marrow regeneration after irradiation

1) Radiation sensitivity was different at various lineages: more sensitive in progenitor cells than in mature cells, more sensitive in lymphoid lineage cells than in myeloid lineage cells.

2) Marrow stroma cells are as sensitive as haematopoietic stem cells. Regeneration occurred from 5 - 6 weeks and took more in higher doses.

3) Bone marrow was repopulated by adipose tissues within 1 week, but their origin was unknown and further study is required.

4) After bone marrow destruction, bone marrow was eventually repopulated, not by donor marrow stroma cells but by recipient marrow stroma cells. Regenerating marrow stroma cells appeared to be derived from the host. After irradiation, donor marrow stroma did not home to

bone marrow but migrated to spleen and liver within 1 - 3 days but disappeared within 14 days.

5) Mesenchymal stem cells enhanced the graft rate of haematopoietic stem cells.

B. Immune tolerance induction using histocompatibility antigen and FAS gene delivery

1) Construction of retroviral vector expressing MHC and FasL CD40 gene

We confirmed the expression of retroviral vector and Kb, Db, IAb MHC and CD40.

2) Optimization of gene delivery to mouse bone marrow

We optimized gene delivery to mouse bone marrow using early precursor cells (up to 40 % of gene delivery rate) as target.

3) Analysis of effects of bone marrow transplantation of allogeneic MHC antigen in mouse model (Graft-versus-host reaction)

We established a protocol as follows: i) intraperitoneal injection of anti-thymocyte serum at day -5 and Day -1, ii) sub-lethal irradiation at Day 0 (350 rad, iii) skin transplant at day 6.

C. Identification of mobilization factor of mesenchymal stem cell

We identified substance-p as mobilizing factor of mesenchymal stem cells to the wound site.

D. Biological effects of substance-p on mesenchymal stem cell mobilization from bone marrow

1) MMP activity

Substance-p increased the secretion of MMP-2, -9 and MT1-MMP and decreased the secretion of TIMP-1 and -2. Zymography showed that substance-p enhanced the activity of MMP-2 and -9. This result

implies that substance-p induces cell migration/invasion via MMP/TIMP modulation.

## 2) Cell migration

Substance-p induced mesenchymal stem cell to migrate/invade through the collagen on the Millicell (insert plate) chamber at a concentration-dependent manner.

### E. Substance-p induced signal transduction pathway of mesenchymal stem cells

Translocation of beta-catenin from cytoplasm to the nucleus occurred by the treatment of substance-P (100 nM). Secretion of VEGF and fibronectin to culture medium increased as well. Erk phosphorylation occurred at 16 hours at all ranges of the concentration of 1, 10 and 100 nM of substance-p.

### F. Effect of substance-p on mesenchymal stem cell (CD29+ cell) mobilization to the blood

The proportion of CD29+ cells in the blood was increased up to 15 times at 24 hours after injecting substance-P (0.1 nmole/g(65ng/g)) in mouse alkali burn model. This result supports substance-p as mobilization factor of mesenchymal stem cell from bone marrow to blood.

### G. The wound healing effect of substance-p (iv injection)

In the rabbit alkali burn model, intravenously injected substance-p dramatically increased wound healing rate, comparing to untreated alkali burn animal. Substance-p plays a significant role in wound healing.

## 2. Remedy of damaged gastrointestinal tissue using stem cell therapy and

sustained GF delivery system

A. Identification of GI stem cell and optimal culture condition

Nuclear translocation of beta-catenin was observed in the crypt base cells, candidate stem cell location. We are further investigating the expression of Wnt target molecules in the crypt base.

HGF/SF and type IV collagen significantly increased colony forming efficiency.

B. Sustained GF delivery carrier, and combined condition for gastrointestinal tissue regeneration

1) Whole body irradiation animal model

2) Development of two kinds of gelatin matrices with different pH-dependent swelling behavior as sustained GF delivery carrier

C. Development of selectively nanopatterned ECM coating method for tissue engineered scaffolds

1) Synthesis of water-soluble low molecular weight chitosan as gene activated matrix and their complex formation with plasmid DNA

2) Synthesis and identification of 1-Mercaptoundec-11-yl tri(ethylene glycol) for selective ECM adsorption

3) Selectively ECM coating method using nanopatterned PDMS stamps

3. Transdifferentiation of adult stem cell to the therapeutic target cells

A. Identification of rudiment stem cells in adult tissues

Nestin-expressing cells were not found in normal adult skin. We optimized in vitro culture condition to induce nestin-expressing spheres (up to 80 %) and it was bFGF-dependent.

B. Establishment of tissue-specific differentiation condition of SKPs

Neural precursor cells induced from skin shared common features with neural crest stem cells, in that SKP expressed p75. However we failed SKPs to differentiated neuronal cells or glial cells. Further investigation on the neuronal or glial differentiation is undergoing using co-culture system with Schwann cells.

#### V. Plan and proposal of application

1. This result provides the biological indicator for radiation sensitivity of bone marrow cells and marrow stroma cells.

2. This result provides development of therapeutic strategy for the bone marrow transplantation/regeneration of radiation-exposed victims.

4. We identified a novel mobilization factor of bone marrow-derived stroma cells. We are further developing clinical application of substance-p as a wound healing agent for the various injuries caused not only by radiation but also by other diseases.

5. We developed a protocol for the induction of neural precursor cells from skin-derived cells. Since skin is easily accessible source, this technology could bring immense impact on the treatment of spinal cord injury or neurodegenerative diseases.

# CONTENTS

## ( 영 문 목 차 )

Chapter 1	Introduction	1
1	Economical, social and technological significance of the project	1
2	Technological background of the project	3
3	Economical and social background of the project	5
4	Cultural background of the project	6
Chapter 2	Current status of the related technology	7
1	Current status of the related technology	7
2	Weak point of the current technology	10
3	Prospectus	11
4	Possibility of technology transfer from foreign countries	13
Chapter 3	Contents and results of the project	14
1	Cell therapy using haematopoietic stem cell and bone marrow stroma cell	14
1)	Regeneration capacity of bone marrow and marrow stroma cell implication to bone marrow regeneration after irradiation	14
2)	Immune tolerance induction using histocompatibility antigen and FAS gene delivery	22
3)	Identification of mobilization factor of mesenchymal stem cell	24
4)	Biological effects of substance-p on mesenchymal stem cell mobilization from bone marrow	26
5)	Substance-p induced signal transduction pathway of mesenchymal stem	



cells	28
6) Effect of substance-p on mesenchymal stem cell (CD29+ cell) mobilization to the blood	29
7) The wound healing effect of substance-p (iv injection)	30
2 Remedy of damaged gastrointestinal tissue using stem cell therapy and sustained growth factor delivery system	33
1) Identification of GI stem cell and optimal culture condition	33
2) Sustained growth factor delivery carrier, and combined condition for gastrointestinal tissue regeneration	33
3) Development of selectively nano-patterned ECM coating method for tissue engineered scaffolds	39
3 Transdifferentiation of adult stem cell to the therapeutic target cells	52
1) Identification of rudiment stem cells in adult tissues	52
2) Establishment of tissue-specific differentiation condition for SKPs	54
Chapter 4 Research achievements and contribution to the related area	56
1 Objectives	56
1) Objectives	56
2) Yearly objectives	56
2 contribution to the related area	57
Chapter 5 Plan and proposal of application	59
Chapter 6 References	60

# 목 차

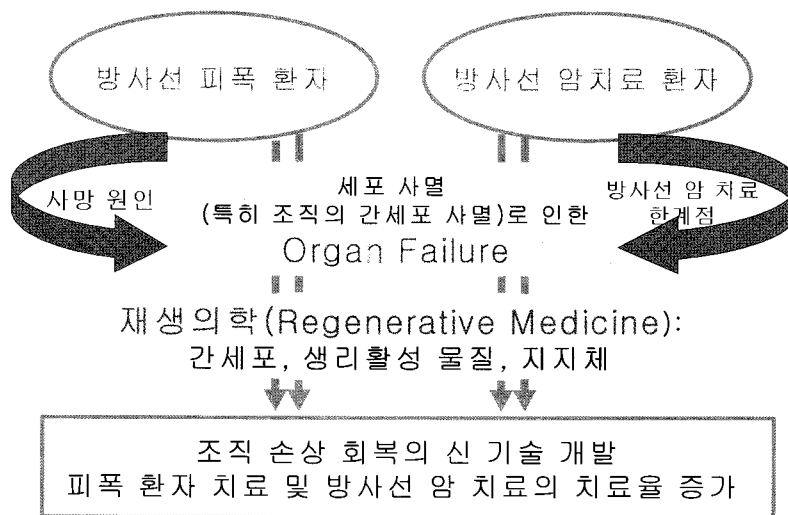
제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성	1
제 2 절 연구개발의 기술적 측면	3
제 3 절 연구개발의 경제, 산업적 측면	5
제 4 절 연구개발의 사회문화적 측면	6
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	7
제 1 절 지금까지의 연구개발 실적	7
1. 선진국 연구개발동향 및 기술수준	7
2. 국내기술개발동향 및 기술수준	9
제 2 절 현기술상태의 취약성	10
제 3 절 앞으로의 전망	11
제 4 절 국내에서 연구개발 하는 대신 기술도입 가능성	13
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	14
제 1 절 조혈 줄기세포 및 간충직 줄기세포 (Mesenchymal stem cell; MSC)를 이용한 방사선 손상 치료기술 개발	13
1. 조혈줄기세포의 최적 확장 기술 개발 및 방사선 조사 후 골수 재생능의 단계별 분석, 골수 재생과정에서의 기질세포의 역할 및 방사선 조사에 의한 기질세포의 기능 변화 분석	13
2. 이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면역관용유도 물질 개발	22
3. 손상조직미세환경에서 간충직 줄기세포(mesenchymal stem cell) 가동화 인자 추적	24

4. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 Substance-p의 역할 규명	26
5. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 Substance-p의 신호 전달	28
6. substance-p iv injection에 의한 CD29 + cell의 혈중 유리 증가	29
7. Substance-P iv injection의 손상 치유 촉진 효과	30
제 2 절 줄기세포 및 서방형 성장인자 전달을 이용한 위장관계 손상 치료기술	33
1. 위장관 줄기세포의 동정 및 최적 배양 조건 수립	33
2. 위장관계 조직 재생의 최적 성장인자 병합 조건 수립, 서방형 담체 개발	34
3. 조직재생 지지체의 제조 조건의 수립을 위한 nanopattern 제조 및 Nanopattern 위의 ECM 성분의 선택적 코팅법 개발	39
제 3 절 성체 줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 손상 치료 기술 개발	52
1. 성체 조직에서 교차 분화 가능한 잔여 줄기세포 탐색	52
2. 조직 특이적 분화 유도 조건 수립	54
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	56
제 1 절 최종 목표 및 연차별 목표	56
1. 최종목표	56
2. 연차별 목표	56
제 2 절 관련 분야에의 기여도	57
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	59
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	60
[참고문헌]	

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

○ 본 과제는 원자력 발전이외에 대체 에너지 개발 기술의 대안이 없는 현 시점에서 원전 종사자들의 불의의 사고에 대한 방사선 피폭에 대한 치료 기술 개발로 국가방사선 비상 응급 진료 대책 및 체계를 구축하기 위해 해결해야할 시급한 기술적 과제이며, 방사선 및 치료용 핵종을 이용한 암 치료는 국부적인 정상 조직의 기능이 소실로 인한 원자력의 의약적 활용 범위를 제한하여 이를 극복할 수 있는 과제이다.



○ 핵의학을 비롯한 전리방사선 관련 기술이 현대의학의 중요한 진단 및 치료수단으로 자리 잡았지만, 방사선 치료 및 방사선 노출에 대해 보다 효과적인 안전성 및 치료법 개발의 중요성이 대두되고 있다. 전리방사선에 노출되었을 때 골수, 생식세포, 각막, 폐, 위장계, 신경계, 및 피부 등의 신체의 각 부위에 장애를 유발함.

○ 특히, 방사선 노출시 5년 내 50%에서 골수의 손상을 입는 용량이 (TD50/5)

4.5 Gy (참고: Brain 60 Gy, Lung 24.5 Gy, Bladder 45 Gy)임이 보고되어 있고, 따라서 방사선에 의한 신체조직 손상 중 가장 먼저 나타나고, 쉽게 파괴되는 기관은 혈액 및 임파계를 생산하는 골수 (bone marrow) 임.

- 현재 방사선 피폭에 의한 조직 손상 및 방사선 치료 시 동반되는 조직 손상을 치료하는 기술이 국내외적으로 취약하여, 방사선 피폭 환자의 효과적인 치료가 절실히 요구
- 그러나 최근 줄기세포를 다양한 조직으로 분화시킬 수 있는 기술이 실험실 수준에서 진행되고 있고 또한 성인 조직 일부에서 다양한 조직으로 분화시킬 수 있는 multi-potent stem cell이 존재함이 규명되고 있어 줄기세포를 이용한 손상 조직 재생에 대한 기대가 점점 현실로 다가오고 있고, 윤리학적 으로 문제가 없는 조직 재생의 유일한 대안으로 인식(Nature, March, 2001; Nature Cell Biology, September, 2001)
- 인체 성인 조직에 존재하는 multi-potent stem cell의 분리 분화 기술 및 이를 이용한 손상 조직 기능의 회복 및 회복을 촉진 시키는 생리활성 물질 개발 등 세포치료 기술과 신속한 조직 재생을 위한 조직 재생 유도형 지지체의 개발을 통한 hybrid 인공장기 및 조직의 개발은 새로운 분야로서 최첨단 의료과학이므로 본 연구 개발 성공 시 파급효과가 크고 핵심의료 기술을 확보함으로써 선진국 기술종속을 탈피하고 국제 경쟁력을 확보할 수 있으며, 장기 및 조직 이식의 대체 요법으로 국민 의료의 질 향상과 함께 국민 보건 의료에 크게 기여
- 그러나 본 연구 개발 분야는 최첨단 원천 의료기술로서 막대한 부가가치와 수요에 비하여 임상이 필용하여 상품화가 단기간에 성공하기 어렵기 때문에 민간에서는 수행이 불가능한 기술 분야로, 다분야의 전문가의 긴밀한 협력 및 지속적인 의료 연구 개발이 필요한 분야임

## 제 2 절 연구개발의 기술적 측면

- 첨단 재생의학 기술 및 조직공학 기술의 발전으로 여러 손상 기관의 재생 및 치료 기술이 가능하게 되었고 상기 과제가 BT 신기술을 원자력의 의학적 평화적 이용 증대를 위한 기술로서 신속히 적용하는 성공적 사례를 제공하게 될 것임
- 선진국의 경우 줄기세포를 이용한 조직공학기술이 방사선 피폭 환자의 기술로서 적용 가능성이 재생의학의 주요 기술 분야로 자리를 잡고 있고 몇몇 조직의 경우 임상 시도 및 동물 실험 단계에서 그 유용성이 입증되고 있음 (일본 NIRS에서는 조직공학 생인공피부를, 미국 Oakridge 및 Osiris는 방사선 치료 환자에 allogeneic mesenchymal stem cell 치료)
- 성체 조직에 rudiment 혹은 residual stem cell 형태로 존재하는 성체줄기세포가 동정되었고, 이는 multipotency 및 pluripotency까지의 plasticity를 보유하고 있으며 특정 lineage로 분화가 가능할 것으로 기대되어 손상 조직의 세포치료제로 가장 효용성이 높은 기술로 평가받고 있음 (MAPC(multipotent adult progenitor cells): Nature June, 2002)
- 성체 줄기세포를 여러 lineage의 세포로 교차 분화시키기 위한 연구가 stem cell 미세환경 재조합 연구 등으로 진행되고 있고, 교차 분화 연구사례로 embryonic stromal cell을 기질 세포로 제공하므로 limbal stem cell를 타 피부 조직으로 교차 분화시켰고 (Development, 2001) 또한 SKP(Skin derived precursor cells)를 신경세포 혹은 glial cell로 분화시킬 수 있었으므로 accessible stem cell를 이용한 교차 분화 연구가 실용성이 높은 세포 치료기술로 인정받고 있음
- 일본 NIRS가 제공하는 자료에 의하면 피부재생을 피폭 환자에 적용하였고, 피

폭 환자의 유전자 발현의 DNA chip 및 생물학적 반응 평가를 위한 실험 모델로 줄기세포로 재생한 인공피부를 활용하여 그 유용성 입증하였고, 일본 히로시마 대학의 원폭 방사능 의학 연구소의 경우 줄기세포 이용 재생의학 기술을 피폭 환자 치료 기술로 개발 중

- 골수재생능은 조혈모세포의 각 단계별로 상이한 능력을 가지고 있으며, 분화된 세포만 손상받은 경우는 일시적으로 골수세포가 감소하지만, 다시 재생될 수 있음. 그러나 방사선 용량이 일정량 이상 노출될 경우, 파괴된 골수를 재생할 수 있는 조혈모세포 (hematopoietic stem cell) 까지도 파괴되어, aplastic anemia 및 pancytopenia를 유발할 수 있으며, 방사선 조사시, 골수의 다양한 조혈 기능 세포 중, 미분화정도에 따라 서로 상이한 재생력을 가짐.
- 방사선 조사에 따라 이들 다양한 단계의 조혈기능 세포들이 파괴되는 양상과 역학의 차이가 아직 연구되지 않았기 때문에 방사선에 의해 손상받는 세포단계에 대한 연구는, 파괴된 정도에 따른 차별적인 재생치료를 가능하게 하므로, 보다 효과적인 골수재생기법을 개발하는데 필수적인 연구임.
- 각 분화단계별 골수세포 파괴 양상의 차이는 골수의 재생치료방식에 큰 차이를 나타낼 수 있으며, 방사선 조사량별로 골수 내에서 파괴되는 세포의 성상이 서로 상이하며, 이에 따라 골수재생의 속도 및 효율이 상이하게 됨.
- 따라서 방사선 조사에 따른 각 분화단계별 골수계 세포의 아사 및 재생능을 특성화 하는 것이 이에 따른 재생회복기술 개발에 절실히 필요함.
- 미국 Oakridge 국립 연구소 및 Osiris의 경우 골수 조혈 모세포와 중배엽 간 세포의 공동 이식을 방사선 치료 환자에 적용한 사례 등이 최근 보고 되고 있음

### 제 3 절 연구개발의 경제, 산업적 측면

- 미국, 일본, 유럽 등에서 BT 산업에 활발한 기술 투자를 하고 있고, 국내의 경우도 21 세기 경제성장 엔진으로 생명공학을 꼽고 있고, 정부도 생명공학 육성 정책, Bio-Korea 건설을 추진 (생명공학 육성 기본 계획 3 단계 (2002-2007)에 약 12조원의 투자 예상)
- 생체 조직공학 분야의 산업화 기술 분석, 산업화 자본의 투자 추이 분석, 기술 공유 콘소시움의 moderator 역할을 하는 Pittsburgh Tissue Engineering Initiative(PTi)는 인체 세포원을 이용한 조직공학 세포치료 기술 분야가 21세기 미래 산업의 가장 유망한 신산업으로 지정하고 하고 있음
- PTi 분석 자료에 의하면 생체 조직공학 기술은 미국 산업계에서 가장 빠르게 부상하고있는 BT 기술 분야로서 고부가 신산업으로 재생의학의 총 시장 규모는 약 4000억 US\$ 이며, 이중 engineered tissue의 생산 비용은 800억 US\$로 추정하고 있음(척추 손상, dendritic cell 치료법 및 뇌졸중 치료분야의 잠재적 시장규모는 약 75억 US\$정도)
- 신경계, 암치료, 기타 조직손상 및 난치성 질환 치료 분야에 생체 조직공학 및 줄기세포 이용 기술의 활용이 가까운 장래에 폭발적으로 이루어질 것으로 예상되기 때문에 미국 및 선진국과 기술 경쟁에서 우위를 차지하려면 신속한 연구 개발로 시장을 선점하는 것이 현 시점에서 매우 시급한 사안임.
- 골수를 재생할 수 있는 조혈줄기세포에 관련된 연구는 생명공학 분야에서도 최첨단에 해당하는 기술로서, 세계 바이오 산업의 핵심적 콘텐츠를 형성하고 있으며, 골수파괴에 따른 재생기술은 방사선 피폭 뿐 아니라 각종 난치병뿐 치료에서도 중요한 핵심기술에 해당하므로, 이에 관련된 지적 재산권 및 산업재산권의 확보가 막대할 것으로 예상됨
- 조직공학 및 재생의학 기술은 기술 자체가 산업이고 bench to bed 기술로서 임상 적용이 신속한 기술 분야로서 가장 큰 고부가 기술이며 기술개발이 지연될 시 상당한 기술료를 지불해야할 산업임



#### 제 4 절 연구개발의 사회문화적 측면

- 방사선 피폭 환자의 치료 기술 개발 및 방사선 암 치료 환자의 손상 조직 회복 기술 개발이 과학 기술부 산하 원자력 병원이 최우선적으로 해결해야 할 숙제임
- 피폭 환자의 치료 기술의 개발이 피부 조직 및 조혈 조직이 외에는 거의 전무한 상태였으므로 최신 신기술의 신속한 적용을 통한 피폭 환자 치료 기술 개발로 국가 방사선 비상 대책을 수립하여 원전에 대한 국민의 불안감을 해소하고 원자력의 평화적 이용을 극대화함
- 방사선 암세포 살상에 관한 연구는 활발히 진행되고 있지만 방사선 치료 후 손상 조직 회복 기술 개발을 연구는 저조하여 '방사선 암치료'의 한계점이 되고 있으나, 상기 과제를 통한 방사선 피폭 환자의 치료 기술이 개발되면 방사선 암치료 환자의 정상 조직 재생에도 적극 활용할 수 있음
- 현재의 전신 방사선 조사 후 새로운 골수세포를 이식하는 과정은 효과적인 골수재생을 하기위한 기술개발을 더욱 필요로 하지만, 다양한 적용가능성에도 불구하고 골수재생을 위한 조혈모세포 이식은 아직도 쉽지 않고, 골수재생을 위한 과정에서의 생착실패, 생착지연, 또는 임파구들에 의한 편대숙주반응 (Graft-versus-Host disease) 등으로 인한 치료 중 사망률 등으로 고도의 의학 기술을 요하는 분야로 남아있음
- 따라서 효과적인 골수재생 기술의 개발은 방사선 피폭후의 재생, 난치병 치료 및 의료원가 절감이라는 막중한 사회적 필요성을 가지고 있음.
- 최근 첨단 생명공학 기술의 개발로 과거 (1997년) 중장기 연구 기획 당시에 비해 고려될 수 없었던 줄기세포를 이용한 재생의학 기술이 피폭환자 치료 기술의 가시적 결과를 낼 것으로 기대되고 있고 또한 피폭환자 치료의 유일한 대안으로 인정받고 있음.
- 원자력 에너지의 개발이 가속화 되는 과정에서, 에너지 측면이외에도, 인간의 환경과 건강에 미치는 영향에 대한 성실한 노력이 요구되고 있으며, 예측하지 않았던 상황에 대한 모든 가능성에 대비하기 위해 의학적, 과학적 연구개발을 병행함으로써, 보다 활성화 된 원자력 에너지의 개발에 대한 사회적 합의를 유도하는 데 기여함.

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 제 1 절 지금까지의 연구개발 실적

#### 1. 선진국 연구개발동향 및 기술수준

- 인체 손상 조직의 기능을 회복시켜줄 인체 세포원을 이용한 조직공학 기술 및 세포 치료 기술은 약 10년 전에 탄생한 학문 분야로서 Harvard 의대, MIT, GIT, Rice 대학 등을 중심으로 다 학제 간 공동 연구로 추진되어 왔지만, 최근에 이 분야 연구가 줄기세포 공학 기술의 개발과 더불어 급속히 발전하고 있다. 특히 미국에서는 여러 바이오텍 회사들이 설립되어 줄기세포를 세포치료제로 혹은 줄기세포를 이용한 조직공학 제품을 생산하고 있고 가장 급성장하는 산업 분야로 지목하고 있다(Pittsburgh Tissue Engineering Initiative 분석 자료).
- Advanced Tissue Science, Genzyme Tissue Repair, Organogenesis가 피부, 연골, 혈관 등이 조직공학 제품을 생산하고 있고, Osiris가 mesenchymal stem cell 및 연골 세포 치료제를 개발하여 임상 2 상 단계까지 진입하였고, 그 외 Astrom Bioscience Inc이 dentric cell 및 골수 이식, Alexion, Stem cell science Inc, Gerone사 등이 신경줄기세포 치료제, Curis사가 당뇨병 세포치료제 등을 개발하고 있다.
- 위장관 궤양의 조직 재생 과정에 gastrin, enteroglucagon, EGF, TGF, IL-11, prostaglandin 등 성장인자 및 싸이토칸의 발현이 증가되는 것으로 보고 되었고 또한 Imperial Cancer Research Fund의 Dr Wright는 재생과정에 상처 주변의 crypt stem cell의 일부가 EGF, trefoil peptides들을 점막상피 표면에 제공하여 상처조직의 재생을 유도한다고 발표하였으며, 이러한 연구결과는 손상된 장점막 상피 표면에 EGF를 공급함으로써 조직의 재생이 촉진될 것으로 예측
- 위장관계 lumen으로 성장인자를 효과적으로 전달하기 위하여서는 pH에 따라 분해능을 조절하는 DDS기술이 개발되어야한다. 성장인자의 펩타이드류와 사이

토크인류의 단백질 자체가 거대 분자로 고분자 막으로부터 확산 속도가 낮고, 초기 버스트의 문제점으로 collagen 등의 천연고분자와 생분해성 합성 고분자인 폴리락타이드(PLA), 폴리글리 콜라이드(PGA)를 이용한 단백질 전달체 제조에 관한 연구가 진행 중이다. 일본 Kyoto 대학의 Ikada 박사 연구진은 젤라틴(acidic 형, basic형)을 이용하여 성장인자의 등전 점(bFGF의 경우 9.6)에 따라서 성장인자를 분류하고 이들을 정전기적으로 결합시켜 특정 성장인자의 효율을 증대시킨 연구 결과를 보고하고 있으며, 또한 미국 미시간 대학의 Mooney 교수는 혈관 제조를 위한 연구의 일환으로 혈관의 주된 구성 세포인 혈관 내피세포와 평활근세포 각각에 특이적으로 작용하는 VEGF와 PDGF를 고분자 지지체 중에 함유시켜 시간에 따른 성장인자의 방출 거동을 조사하여 VEGF에 의한 혈관 내피세포의 성장에 따른 미세혈관의 형성이후에, PDGF가 방출되면서 평활근세포의 ECM 성분의 분비를 촉진하여 성숙된 혈관의 재생을 돕게 해주는 dual release 지지체를 개발

- 신경 줄기세포가 subventricular zone에 존재함이 Karolinska Institute의 Johansson CB & Frisen J, Rockefeller 대학의 Doetsch F & Bongso A 등에 의해 보고되었지만 실제 세포 치료제로 적용하기에는 한계점이 있는 donor site이므로 세포 치료제로 적용 가능한 accessible donor site를 찾으려는 연구가 도처에 진행되었고 가장 용이한 조직으로 피부를 꼽고 있다. 성공한 예로 사람의 피부 진피층에 neural cell, glial cell, muscle, adipocyte로 분화되는 다분화능의 줄기세포인 SKP가 존재함이 보고되었고(Nature Cell Biology 2001년 9월 및 Nature 2002년 6월 발표), 골수 내에 존재하는 MAPC가 거의 모든 장기/조직으로 분화 가능한 pluripotency를 보유하고 있는 것으로 Minnesota 대학의 Verfaillie가 보고(Nature 2002년 7월 발표)하였다. 이들 성체 줄기세포가 장차 세포 치료제로서의 공여 조직이 될 것이며 현재 이 분야 연구자들이 lineage-specific 분화 유도조건을 찾는 연구를 진행하고 있고 특히 신경계의 경우 현재의 2-3%의 분화 효율을 더욱 향상시킬 수 있는 분화 유도 조건을 개발 중임.

- 교차 분화 혹은 탈분화/재분화 유도에 관한 연구로는 blastocoel에 이식한 성체 표피세포가 거의 모든 lineage의 조직에서 발견되어 그 plasticity가 입증되고 있고, 각막의 limbal stem cell을 embryonic fibroblast와 공동 배양하므로 표피 stem cell로 교차 분화된 예가 보고되고 있고, 이외에 Rockefeller Dr E Fuchs, NYU의 Dr. TT Sun, SUNY SB의 Dr Maja Matic 등이 교차 분화 연구를 수행하고 있다. 이는 분화 유도 조건의 설정을 조절하므로 성체 줄기 세포의 plasticity를 증가시킬 수 있다는 것을 의미하고 상기 과제에서 바로 이러한 교차 분화 유도 조건을 수립할 예정이다

## 2. 국내기술개발동향 및 기술수준

- 국내 세포 치료 및 조직공학 분야 연구는 이제 막 태동하는 단계이지만 선진국의 경우도 이 분야 기술 개발이 약 10년 정도의 역사만을 가지고 있으므로 현 단계에서 이 분야 연구에 집중적 투자가 진행된다면 충분히 선진국과의 기술 격차가 줄고 어떤 기술은 선진국보다 기술 우위에 있을 수도 있는 기술 경쟁력 확보에 유리한 고부가 기술 분야이다.
- 자가 골수 이식 연구는 가톨릭대 오일환 교수 등 여러 대학 병원에서 임상 시도를 하고 있지만 골수 줄기세포의 확장력 증진, 분화 유도, 생착을 증진 연구 등은 거의 전무한 상태이고 한양대 정 희용 교수, 세종대 오 덕재 교수 등이 일부 추진하고 있고, 제대 혈의 골수 세포 및 mesenchymal stem 이용 연구가 Medipost, Cellontech 등 몇 개의 biotech 벤처 회사들이 추진하고 있다.
- 특히, 조혈모세포의 동정 및 특성에 관계된 연구는 현재 국내에서 임상적인 면에서 일부 이루어지고 있지만, 방사선 조사후 발생하는 골수의 세포특이적 성분에 대한 기능적 분석 및 재생역학에 대한 연구는 거의 부재한 상황으로, 골수재생을 연구하기 위한 동물 이식 모델이나 세포분화 단계별 파괴양상에 대한 특이적 동정은 방사선 의학 연구의 핵심적 기반임에도 불구하고 거의 연구체계가 형성되어 있지 않은 상황임.

- 현재 유일하게 방사선 손상 조직 치료 연구가 진행되고 있는 실험실로는 원자력의학원 생체조직 재생연구실로서 상기 연구실의 손영숙 실장은 생인공피부 기술을 국가지정연구실 사업 및 원자력 실용화 사업으로 추진하여 실용화 단계까지 추진하였고, 줄기세포 분리/분화 유도 기술 개발과 세포 훈련기술 등을 개발하여 다수의 특허 기술을 확보하고 있고 이들 여러 기술은 본 과제의 성공적 연구 목표 달성에 적극적으로 활용될 것이다. 또한 상기 기관은 줄기세포학, 조직공학, 재생의학과 관련한 국내 유일의 기술력을 보유하고 다학제 간 공동연구가 가능한 인적자원을 확보하고 있는 그룹이다. 상기 실험실은 박현숙 박사가 위장관계 crypt stem cell의 동정 기술 및 방사선 조사 후 조직 재생에 cryptic fission이 동반된다는 연구를 수행하였고, 김천호 박사는 서방형 성장인자 전달 기술 등 생체 재료 및 DDS 분야의 연구를 수행하여, 다 학제 간 긴밀한 공동연구가 전제 조건인 조직공학 연구를 수행하는데 최적의 연구 기관이 될 것으로 기대하고 있다.
- 표피세포 및 SKP의 교차 분화에 관한 연구는 원자력의학원 생체조직 재생연구실을 제외하고는 전무하며, 광주 과기원의 전장수 교수가 연골세포의 탈분화/재분화 신호전달 연구를 국가지정연구실 사업으로 하고 있고 대전 성모 병원의 이 일우 교수 및 아주대 서 해영 교수가 MSC의 신경세포 교차 분화 연구를 하고 있다.

## 제 2 절 현기술상태의 취약성

- 현재까지 조직공학 기술을 이용한 조직 재생 기술을 방사선 피폭 환자의 치료 및 조직 손상의 기능 회복을 위해 실질적으로 임상 적용한 사례는 많지 않지만 골수 이식을 방사선 피폭 환자에 적용, 생인공 피부가 방사선 피폭 환자의 피부 손상에 적용한 사례가 있다. 그러나 상기 기술들이 상용화 기술로 발전하는데는 국내외적으로 많은 기술 개발이 필요하다. 그 대상 기술로는 골수 조혈

모세포의 확장의 한계점 극복, 제공한 세포 치료제의 낮은 생착률 문제 해결을 위한 세포 훈련 및 bioractor 제작 기술, 이식 조직 및 시스템과의 연결/동화 문제, 조직 재생 속도에 맞는 성장인자 방출 기술, 세포 유입 및 성장 속도 제어 가능한 지지체 개발 등이다.

기술명	선진국 대비 국내기술수준				
	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	80% 이상
자가 골수 이식 연구					■
줄기세포 분리 및 분화 유도 기술				■	
조혈모세포 확장 및 분화 기전 연구			■		
위장관계 줄기세포 연구		■			
성장인자 선택적 방출 기술 개발			■		
성인줄기세포의 교차분화 연구		■			
연골세포의 분화 기전 연구				■	
연골의 조직공학				■	
인공지지체 제조기술				■	
세포/유전자 치료 연구			■		

### 제 3 절 앞으로의 전망

재생의학 및 조직공학 기술이 지닌 경제적 파급효과와 줄기세포 생물학 연구의 발전속도를 볼 때 향후 5년 사이에 급속도로 발전할 것으로 추측할 수 있다. 그 발전의 방향은,

- 첫째, 성체 줄기세포를 이용한 조직 재생이 피부 및 연골에서 성공적으로 개발되어 임상시도 단계에까지 진입하였으므로 자가 성인 줄기 세포를 이용한 세포 치료 기술 및 조직공학 기술이 향후 2-4년 이내에 다른 장기까지 실용화 단계로 진입할 것이며, 피부 및 연골에서 산출된 기술이 다른 조직의 재생에 핵심 기술로 활용될 것이다.
- 둘째, 성체 조직의 일부에 rudiment stem cell 혹은 residual stem cell이 존

재함, MAPC, SKP와 같이 다양한 조직으로 분화가 가능한 것으로 보고되고 있으므로 장차 자가 성체 줄기세포를 이용한 세포 치료 및 교차 분화를 통한 다른 lineage로의 분화 기술이 향후 5년 내에 가시적인 수준으로 개발될 것이고 면역거부 반응 및 유전 질환 등의 문제점이 없는 이상적 세포 치료 기술 및 재생의학 치료법이 될 것이다.

- 셋째, 성체 조직으로부터 분리된 줄기세포는 세포 확장 중에 stemness를 상실하기 쉬우므로 in vitro에서 stem cell niche (stem cell이 숨어있는 은밀하고 특별한 장소)를 재조합하는 연구가 장차 2-3년 내에 가시적인 기술로 창출될 것이다.
- 넷째, 세포이식 혹은 조직 이식 후 공여 세포의 낮은 생착률 등의 실질적인 문제를 해결할 cell preconditioning 기술이 향후 1-2년 내에 조직공학 연구 분야에 적극적으로 활용될 전망이고, 이를 engineered tissue 제조 단계에까지 적용할 bioreactor로 개발되어 현재의 bench에서 임상까지의 5-10년의 실용화 기간이 상당히 단축될 전망이다.
- 다섯째, Functional Genomics, Proteomics, Stem Cell Biology 기술로부터 제공되는 정보로부터, 향후 6-7년 사이에 조직 특이적 분화 및 증식에 관여하는 유전자 네트워크 및 신호전달체계에서의 단백질 네트워크가 완벽히 규명될 전망이다이며, 이러한 기초정보로부터 성체 줄기세포의 증식, 분화, 교차 분화를 자유롭게 조절할 수 있는 유전자 및 신호조절물질들이 개발될 것이다.
- 여섯째, 배아줄기세포를 이용한 조혈모세포 및 다른 lineage로 특이적 분화 기술은 아직 초보 단계이고 Scale-Up 단계에 이르지 못해 실용적이진 않으나 이러한 배양기술은 향후 5년 사이에 획기적으로 개선될 전망이며, 특히 수정란에의 핵이식 기술과 결합될 때 엄청난 경제적 잠재력을 지니고 있다.
- 일곱째, 제대혈 은행 및 성체 줄기세포 은행의 이용이 더욱 일반화되어 미래의 조혈모세포의 필요에 대비하는 것이 관행이 되리라 판단되나 이에 많은 경제적 대가가 필요할 것이다

#### 제 4 절 국내에서 연구개발 하는 대신 기술도입 가능성

- 현재까지 방사선 피폭에 의한 조직 손상 및 방사선 치료 시 동반되는 조직 손상을 치료하는 기술 개발이 국내 뿐 아니라 구미 선진국에서조차 외적으로 취약하고 집중적으로 추진되지 못하여, 방사선 피폭 환자의 효과적인 치료가 제대로 진행되지 못함
- 선진국의 경우 줄기세포를 이용한 조직공학기술이 방사선 피폭 환자의 기술로서 적용 가능성이 재생의학의 주요 기술 분야로 자리를 잡고 있고 몇몇 조직의 경우 임상 시도 및 동물 실험 단계에서 그 유용성을 입증(일본 NIRS의 조직 공학적 생인공피부, 미국 Oakridge 및 Osiris의 방사선 치료 환자에 allogeneic mesenchymal stem cell 치료 등) 하고 있지만 본 연구진이 유사한 기술 수준 혹은 그 이상을 보유하고 있고 이들 기술은 일부 국제 특허 출원으로 지적 소유권을 확보하고 있으므로 선진국으로부터 기술 이전의 필요성이 없음
- 선진국의 경우 현재 연구 단계에 있는 기술이 많으므로 선진 연구 그룹과 공동 연구 및 워크샵 기회를 확대하여 기술 공유를 꾀하고, 이를 한 단계 더 수정/발전시켜 새로운 지적 소유권을 확보할 전략을 가지고 있다. 또한 이 분야 기술의 역사가 짧아서 선진국과 기술 격차가 가장 적은 연구 분야이고 또한 분야 기술의 많은 부분을 외국biotech 회사가 보유하고 있으므로 기술 이전 자체가 용이하지 못하고, 상당한 R&D 투자 자금을 요구 할 것이며, 기술 도입 대신에 국내 연구 투자로 국내 연구 기반을 조성하고 관련 지적 소유권을 확보 할 수 있는 기회를 충분히 활용해야 할 것이다



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 조혈 줄기세포 및 간충직 줄기세포 (Mesenchymal stem cell; MSC)를 이용한 방사선 손상 치료기술 개발

#### 1. 조혈줄기세포의 최적 확장 기술 개발 및 방사선 조사 후 골수 재생능의 단계별 분석, 골수 재생과정에서의 기질세포의 역할 및 방사선 조사에 의한 기질세포의 기능 변화 분석

##### 가. 연구 내용 및 방법

###### 1) 방사선 조사 후 골수재생능의 단계별 분석

단기성 줄기세포에 대한 방사선 조사의 영향은 비장집락군을 형성할 능력이 있는 세포를 동정하는 colony forming unit-spleen (CFU-S) 의 숫적 변화를 450 rad, 900 rad 로 방사선 조사후 추적하였으며, 전구세포 및 oligolineage progenitor cell 들에 미치는 영향은 semi-solid methylcellulose에서 집락을 형성하는 능력을 측정하는 colony forming cell (CFC) assay를 통하여 동정하였음.

장기성 세포를 정량하는 것은 생체내에서 골수를 재구성 하는 능력을 직접 시험하는 경쟁적골수재구성세포 (competitive repopulating unit: CRU)를 동정하였음

골수기질세포 (stromal cell) 에 대한 영향은 방사선 조사된 골수세포를 채취하여, 10-14일간 기질세포를 배양하여, 집락군 (CFU-F)를 형성하는 세포들의 변화를 crystal violet 염색을 통하여 추적하였음.

###### 2) 골수재생과정에서의 기질세포의 역할 및 방사선 조사에 의한 기질세포 기능변화 분석

방사선 조사에 의한 골수기질세포의 재생 역학 분석: 골수내의 미세환경 (microenvironment)을 구성하는 성분인 기질세포 (stromal cell) 은 조혈모세포의 증식과정에 중요한 지지역할을 하는 것으로 알려져 있으나, high dose radiation에 의

해 파괴됨. 따라서 다양한 용량의 radiation을 받은 후 기질세포군의 파괴역학을 조사하고, 그 이후 stromal cell 들의 시간에 따라 재생되는 양상을 분석함

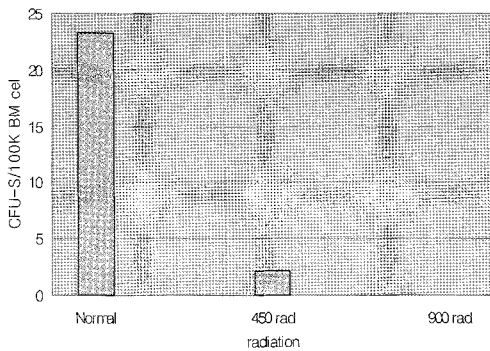
골수재생중 기질세포의 역할 분석: 조혈모세포가 재생되기 위한 미세환경으로서의 stromal cell 의 기능을 연구하기 위해, 기질세포의 co-transplantation 이 골수재생과정에 미치는 영향을 연구하였으며, MSC를 intrafemoral injection 한 후 조혈줄기세포에 대한 재생역학에 미치는 영향을 연구하였음.

## 나. 연구 결과

### 1) 방사선 조사 후 골수재생능의 단계별 분석

① 집락군 형성세포 (CFC) 및 비장집락세포 (CFU-S)의 방사선 감수성 분석: 방사선 조사에 의한 단기생착성 세포의 변화에 대한 분석에서, Sublethal dose (450 rad) 로 방사선 조사된 골수세포는 Non-irradiated 대조군에 비해 50%의 CFC가 파괴되었으며, CFU-S는 10%가 생존하였다(그림 1).

그림 1. Effect of Radiation on CFU-S



Effect of Radiation on CFC

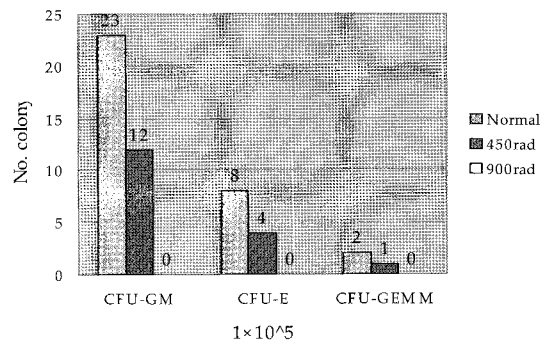


그림 1. 방사선의 집락군 형성에 미치는 영향

② 생착성 조혈줄기세포의 방사선 조사에 대한 감수성 분석: CRU assay 에서는 3주에서 12주에 걸친 이식생착량에 있어 대조군이 60%의 공여자 기원 세포생착을 보인데 비해, 방사선 조사된 골수세포는 5%의 생착율을 나타내었

다. 또한, 방사선 조사된 세포들이 이식된 후 재생되는 양상에 있어 이식 3주째 Lymphoid cell의 생착 감소가 Myeloid cell 에 비해 두드러지게 나타났으나, 이식 6주 및 12주 째의 Long-term Engraftment 에 있어서는 각 Lineage 별 차이가 감소하였다 (그림 2). 그러나 900 rad로 조사된 골수의 경우는 CFC, CFU-S12, CRU 모두 발견되지 않았다.

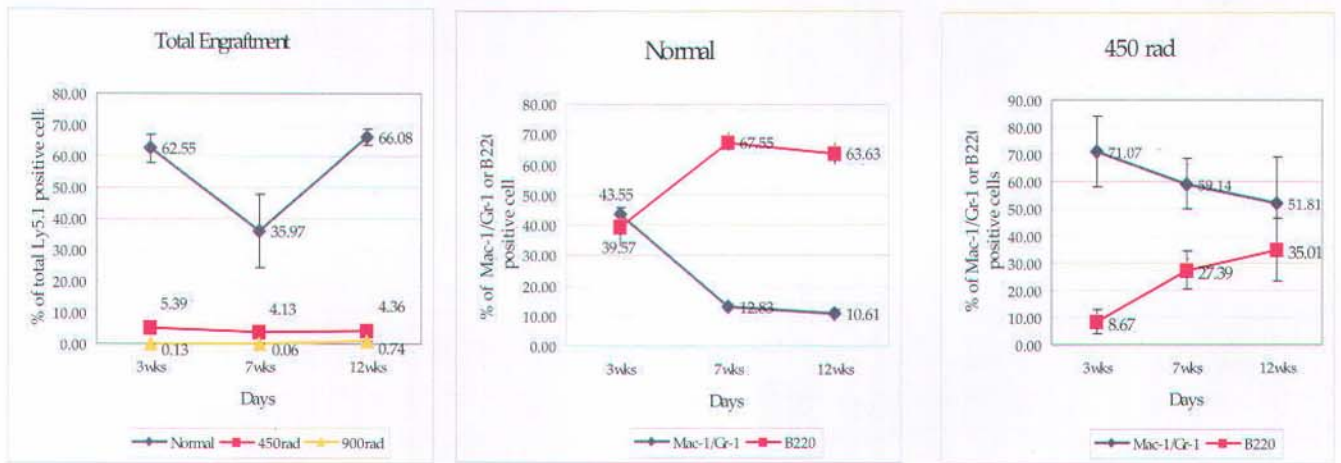


그림 2. 생착성 조혈줄기세포의 방사선 조사에 대한 감수성 분석

## 2) 골수재생과정에서의 기질세포의 역할 및 방사선 조사에 의한 기질세포 기능변화 분석

방사선 조사에 의한 골수기질세포의 재생 역학 분석: 골수내의 미세환경(microenvironment)을 구성하는 성분인 기질세포 (stromal cell) 은 조혈모세포의 증식과정에 중요한 지지역할을 하는 것으로 알려져 있으나, high dose radiation에 의해 파괴되며, 따라서 다양한 용량의 radiation을 받은 후 기질세포군의 파괴역학을 조사하고, 그 이후 stromal cell 들의 시간에 따라 재생되는 양상을 분석하였다.

또한 조혈모세포가 재생되기 위한 미세환경으로서의 stromal cell 의 기능을 연구하기 위해, 기질세포의 co-transplantation 이 골수재생과정에 미치는 영향을 연구하였으며, MSC를 intrafemoral injection 한 후 조혈줄기세포에 대한 재생역학에 미치는 영향을 연구하였다.

① 기질세포군 (Mesenchymal stromal cell)의 방사선 조사에 대한 감수성 분석: Stromal cell 의 경우는 450rad로 조사된 경우 대조군에 비해 1개의 Femur 당 CFU-F 가 대조군에 비해 5%로 감소하였으며, 900rad의 경우 0.8%로 감소하였다 (아래 표 참조).

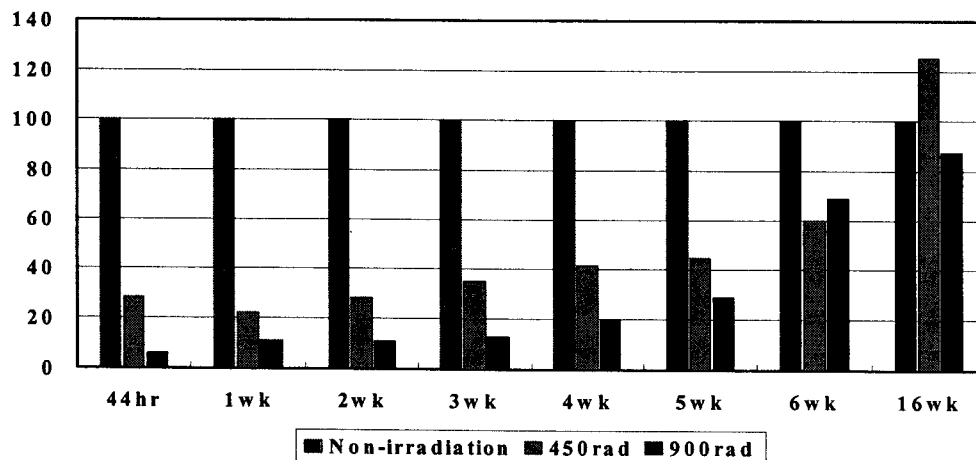
	Cell Dose	No. CFU-F
Normal	$5 \times 10^6$	45
450rad	$5 \times 10^6$	24
900rad	$3 \times 10^6$	4

② 방사선 조사후 MSC의 재생역학 분석: 450 rad 및 900 rad 의 방사선으로 골수기질세포를 파괴한 후 GFP transgenic mice 로부터  $1 \times 10^5$  개의 골수세포를 이식하여, 이후 골수에서 재생되는 MSC 의 숫자를 CFU-F 집락군 동정을 통하여 추적하였음.

그림 3에 표시한 바와 같이 450 rad 로 조사된 경우 5-6주 동안 정상치의 40-50 % 가 재생되고, 파괴 후 16주에 정상치에 도달함. 그러나 high dose (900 rad)로 조사된 경우는 5주 까지 정상치의 30 % 이하로 유지되다가 5주 이후 재생되기 시작하여 16주에 정상치의 90% 까지 도달함.

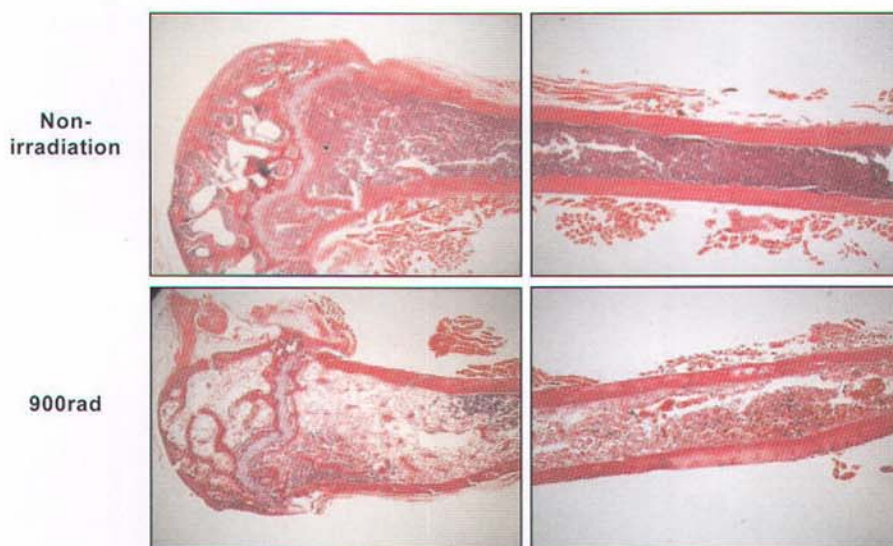
따라서, high dose radiation 의 경우는 이식 초기 (6 주 이전)에 골수 내 기질세포의 지지작용이 부족한 상태에서 조혈줄기세포가 재생되고 있음을 발견함.

그림 3) radiation injury 후 MSC 의 재생역학 분석



③ 방사선 조사 후 골수 내 미세환경의 변화: 방사선 조사에 의해 기질세포가 파괴될 경우 발생하는 미세환경의 변화를 조사하기 위하여 방사선 조사 1주일 후 대퇴골을 조직염색 (H&E) 하였음. 그 결과, 방사선 조사 후 거의 전체의 골수가 지방세포로 대체되어 있음을 확인하였음 (그림 4). 그러나 현재, 이들 지방세포가 기질 중간엽줄기세포들이 adipose tissue 로 분화한 결과인지, 또는 골수내 존재하던 adipocyte 가 방사선 조사후 증식한 결과인지는 분명하지 않음.

그림 4) 방사선 조사에 의한 골수미세환경 변화



④ 골수의 지방화에 대한 원인분석 연구: 방사선 조사후 골수 내 지방화 현상이 세포군의 소실과 관련된 것인지 조사하기 위하여, 방사선 조사후,  $1 \times 10^6$  의 골수세포를 IV 또는, 대퇴골내주사 (intrafemoral injection) 에 의해 주입하였다. 현재 시간별로 이들 세포주입군에서의 지방화에 대한 영향을 분석중이다.

⑤ 골수 기질 재생세포의 기원분석: 방사선 조사 후 골수의 기질을 재생하는 세포가 공여자군 또는 이식된 세포에서 기원하는지 조사하기 위하여, GFP transgenic mice 의 골수를 이식한 후 10 주에, 재생된 골수를 배양하여 바닥에 부착된 (adherent cells) 세포군을 계대배양하며 CD45 에 대한 양성도를 측



정하였다. 이들 부착성 세포의 serial passage 에 따른 조혈계 (CD45 양성) 세포의 비율의 감소를 추적한 결과, 그림 5와 같이 방사선 조사 여부에 관계없이 초기 계대배양에서는 CD45 양성 세포가 대부분이나, 8 passage 이후 부터는 CD45 음성인 부착성 중간엽성 세포로 대체되었다.

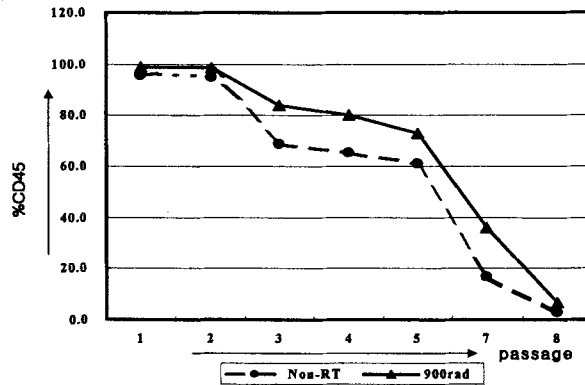
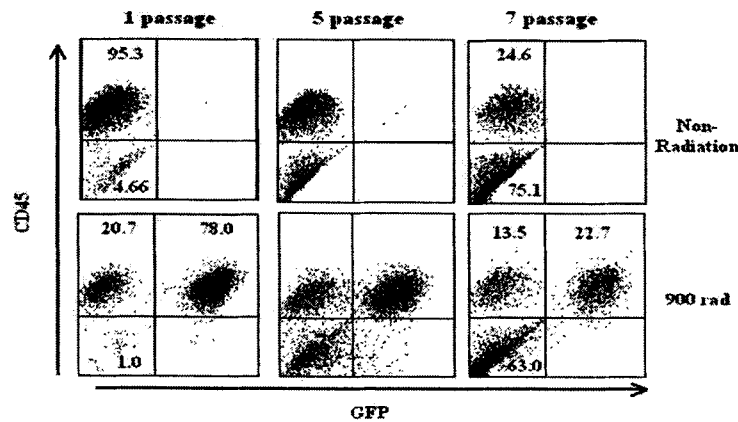


그림 5. 방사선 조사에 의한 골수 미세환경 변화

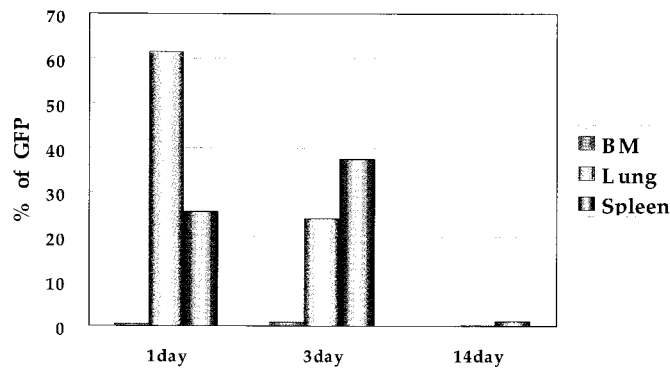
이 결과를 기초로, 방사선 조사에 의해 파괴된 골수기질 재생세포의 기원을 분석하였다. GFP transgenic mice를 이식한 생쥐의 골수를 배양한 뒤, 8세대 까지 계대배양하는 과정에서 부착성 중간엽세포중, 공여자 유래 (GFP 양성) 및 수여자 유래 (GFP 음성)세포의 분포를 확인한 결과, 그림 6) 에 나타난 바와 같이, 8세대 이후 나타나는 CD45음성 (중간엽성 세포)는 대부분 GFP 음성 (수여자 유래)로 판명되었다.

그림 6) tg-GFP marrow 이식후 재생된 중간엽줄기세포 기원분석



⑥ 중간엽 줄기세포의 이식 후 체내분포 조사: 골수 중간엽 줄기세포의 이식 후 골수미세환경으로 생착되지 않는 것을 확인하였으므로, 주입된 중간엽 줄기세포의 생체 내 분포를 조사하였다. 중간엽 줄기세포를 추출하여, MIG (MSCV-IRES-GFP) 레트로바이러스 에 감염시킨 후 정맥주사 하였다. 그림 7에 나타난 바와 같이 초기 1-3일간 대부분의 세포가 lung 이나 spleen 에 분포하다가 14일 쯤 거의 소실되었으며, 골수로 이동하는 세포의 양은 거의 없었다.

그림 7) 중간엽 줄기세포의 체내분포 조사



그러나 그림 5에 나타난 바와 같이, 재생된 골수로부터 확인된 중간엽 줄기세포는 GFP 음성으로 확인되었다. 즉, 공여자보다는 수여자의 골수에서 재생되는 것이 확인되었으며, 공여자의 골수 중 MSC 는 생착되지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통하여, 골수의 미세환경을 구성하는 중간엽줄기세포들이 골수에 생착하는데 장애가 있음을 확인하였다.

⑦ 중간엽줄기세포가 조혈줄기세포의 기능성에 미치는 영향: 골수미세환경을 구성하는 중간엽줄기세포가 조혈줄기세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NOD/SCID mice 모델을 이용하여,  $3 \times 10^4$  CD34 양성세포를 다양한 비율의 MSC 와 co-transplantation 한 후 생착에 미치는 영향을 분석하였다. 그림 8에 나타난 바와 같이 1:1 -1:3 의 비율에서는 영향을 주지 않지만, 1:10 이상에서는 중간엽줄기세포의 혼합이식에 의해 뚜렷한 생착증진효과가 나타남을 알

수 있었다. 따라서, 방사선 조사에 의해 파괴된 중간엽줄기세포를 재생하는 것은 골수내의 조혈줄기세포가 생착 및 증식하는데 지지작용을 함을 확인할 수 있었다.

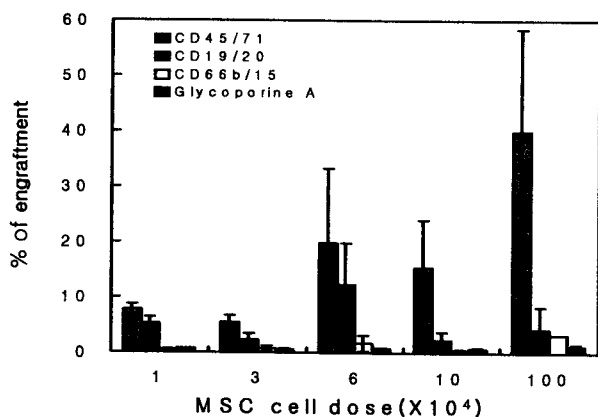


그림 8. 중간엽 줄기세포의 방사선 dose에 의한 변화

본 연구를 통하여,

a. 분화단계가 진행된 전구세포(progenitor cell)들에 비해 미분화된 조혈줄기세포들이 방사선 조사에 대해 더 sensitive하며, 초기 생착이 가능한 Lymphoid progenitor cell 들이 Myeloid progenitor cell 에 비해 더 sensitive 한 것을 관찰 하였다.

b. 골수 미세환경을 구성하는 MSC 들도 방사선 조사에 조혈줄기세포와 유사한 정도로 파괴되며, 5-6 주부터 재생되기 시작하고, high dose radiation 에서 재생하는데 더 시간이 걸림을 관찰하였다.

c. 방사선 조사에 의해 파괴된 골수미세구조는 1주일 이내에 거의 지방화 현상이 일어나, 정상구조를 대체함을 확인하였으나, 이들 지방세포의 기원에 대해서는 추가적 연구가 필요하다.

d. 골수파괴 후 재생되는 부착성 중간엽줄기세포는 대부분 공여자 쪽이 아닌 수여자의 세포로 구성되어 있어 골수에 homing 하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 배양된 중간엽줄기세포는 체내 주입 시 주로 간, 비장에 1-3일



에 걸쳐 분포하다가 14일 이전에 소실되며, 골수로는 거의 생착되지 않음을 관찰하였다.

e. 그러나, 조혈줄기세포의 이식을 통한 골수재생과정에서 중간엽줄기세포와 혼합된 경우 유의하게 생착량이 증가되는 것을 관찰하였다.

따라서, 골수계가 방사선 조사에 의해 파괴된 경우, 조혈줄기세포의 이식을 통한 재생과정에서, 골수미세환경의 재생을 촉진할 수 있는 방안이 필요함을 확인할 수 있었으며, 골수내 직접주입 (intrafemoral injection)에 의해 미세환경 재생이 증진될 수 있는지 추가적 연구가 진행 중이다.

## 2. 이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면역관용유도 물질 개발

### 가. 연구 내용 및 방법

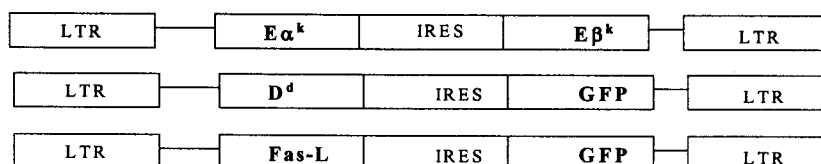
#### 1) 쥐 MHC (조직항원) 및 FasL CD40 유전자 발현 Retroviral Vector의 벡터의 제작

아래 그림에서와 같이 Class I 및 II MHC Type이 상이한 세 가지 mouse strain을 구입하여 breeding 하여 retroviral vector 외에 유전자의 발현벡터를 조사

**MHC Types of the Mouse Strains Used:**

<b>B10.A:</b>	<b>Kk I-Ak I-Ek Dd</b>
<b>B10.A(2R):</b>	<b>Kk I-Ak I-Ek Db</b>
<b>B10.A(4R):</b>	<b>Kk I-Ak I-Ek/b Db</b>

#### Murine Stem Cell Retrovirus



## 2) 생쥐 골수세포에의 유전자 이식 조건 확립

골수세포에의 효과적인 유전자전달 기술의 확보를 위해 total bone marrow, 혹은 lineage marker-positive 세포를 제거한 분화초기세포를 분리하여 cytokine 존재 하에서 유전자 전달 효율을 비교 검토하였다.

## 3) 생쥐모델에서의 골수이식이 이형 MHC를 지닌 조직거부에 미치는 영향

골수이식의 이식 조직에 대한 관용성 유도 효과를 검증하고 이식 protocol을 확립하기 위하여 Balb/c mouse에 C57BL6 골수를 이식하고 골수를 이식한 경우와 control 사이에 이식된 피부조직에 대한 거부반응 Kinetics의 차이를 분석하였다. Day -5, Day -1에 anti-thymocyte serum을 복강 주사하고, Day 0 에 350 rad의 sublethal irradiation을 가하는 protocol을 확립하였다.

## 나. 연구 결과

### 1) 쥐 MHC (조직항원) 및 FasL CD40 유전자 발현 Retroviral Vector의 벡터의 제작

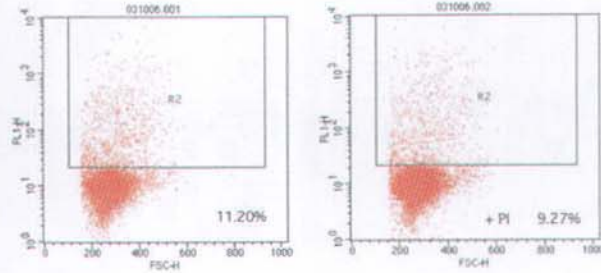
쥐 MHC (조직항원) 및 FasL CD40 유전자 발현 Retroviral Vector의 벡터의 제작: retroviral vector 외에 Kb, Db, IAb MHC 유전자 및 CD40유전의 발현벡터의 합성 및 발현이 확인되었음.

### 2) 생쥐 골수세포에의 유전자 이식 조건 확립

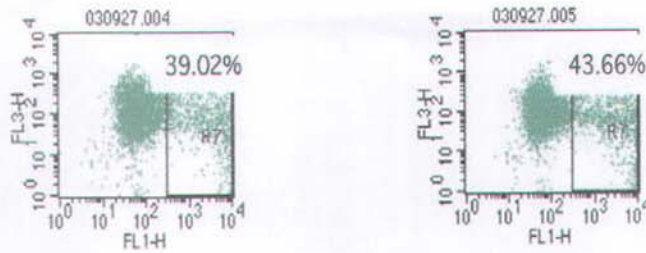
분리된 분화 초기세포는 cytokine 존재 하에서 유전자 전달 효율이 아래의 그림과 같은 결과를 얻었다. 따라서 향후 실험에서는 lineage marker를 지닌 세포를 제거한, 초기분화세포를 이용하여 유전자 이식을 수행하기로 결정.

## Efficiency of Retroviral Infection in Mouse Bone Marrow Cells

Total bone marrow:



Lin- bone marrow:



3) 생쥐모델에서의 골수이식이 이형 MHC를 지닌 조직거부에 미치는 영향

3가지 서로 다른 조건을 이용하여 골수이식을 수행한 결과, Day -5, Day -1에 anti-thymocyte serum을 복강 주사하고, Day 0 에 350 rad의 sublethal irradiation을 가하는 protocol을 확립하였다. 이 때 skin transplant는 day 6에 수행하였다. 아래의 그림에서 보는 바와 같이 골수를 이식한 경에 이식된 피부 조직이 장기간 유지됨이 관찰되었다.

3. 손상조직미세환경에서 간충직 줄기세포(mesenchymal stem cell) 가동화 인자 추적

가. 연구 내용 및 방법

골수의 간충직 줄기 세포(mesenchymal stem cell)가 손상된 조직의 회복에 관여하는지를 검토하고, 이 과정에 골수로부터 간충직 세포를 혈중으로 유리시키는 기능을 가진 인자들을 PCR과 ELISA로 분석하여, 관련 후보 인자를

동정하고, 이 후보인자가 간충직 줄기세포가 골수로부터 유리(mobilization)되어 혈중으로 이동하여 손상 조직에 침착하여 손상 조직 회복에 에 관여하는지를 분석하였다. PCR과 ELISA 결과에서 후보인자로 동정된 substance-P를 대상으로 간충직 줄기세포의 분열, beta-catenin 핵내 이동, MMPs의 활성화 등의 기능 분석으로 mobilization factor로서의 역할을 규명하였고, 또한 substance-P가 간충직 줄기세포의 migration, mobilization에 직접 관여 여부를 확인하기위하여 간충직 줄기세포를 in vitro collagen plug 위에 배양한 후 이들이 substance-P 처리후 collagen를 분해하여 millicell 아래로 이동하는지 여부를 평가하였다.

## 나. 연구 결과

분석한 20종의 인자들 중 초기부터 발현되고 그 수준에 오랫동안 지속되는 것은 Substance-P 였고, VEGFR-1 역시 비슷한 양상을 나타냈으며 inflammatory cytokine인 IL-1, TNF-alpha 역시 화상 후 초기에 발현이 증가하였다. SCF, HIF-1alpha는 3일째 발현이 증가하였으며 일주일 후에는 발현이 감소하였다. VEGF, VEGFR-2의 경우 후반에 발현이 되었다. RT-PCR을 통해 증가한 인자들 중 혈액으로 분비되는 것을 Eliza로 확인, Substance-P가, 손상 조직 및 혈액에서 초기에 양이 증가가 가장 큰 후보인자임을 확인하였다.

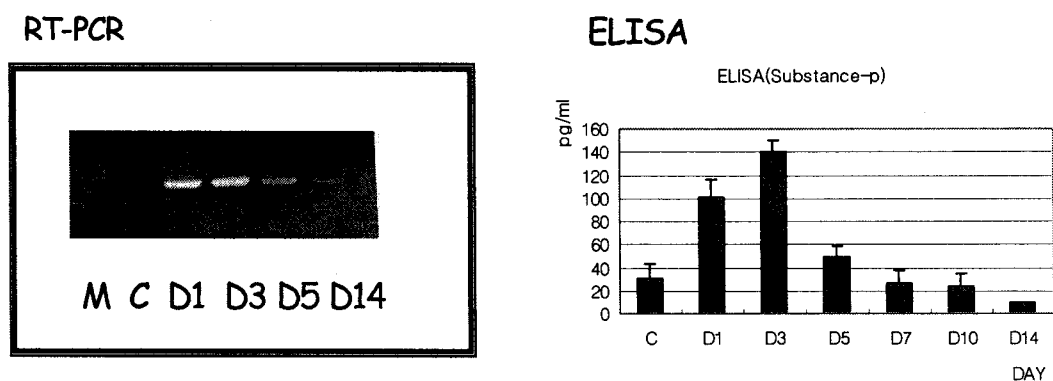


그림 9 After alkali burn, change of Substance-P expression is detected by ELISA, RT-PCR

#### 4. 간충직 줄기 세포의 유리에 대한 Substance-p의 역할 규명

##### 가. 연구 내용 및 방법

###### 1) MMP activity 측정

골수 내에 붙어있는 간충직 줄기세포의 mobilization의 초기 단계에 Substance-P가 작용할 것이라 예상하여 In vitro상에서 간충직 줄기세포에 Substance-p를 처리하여 MMPs 활성도가 증가하는지를 gelatin zymography로 분석한 결과 MMP-2,9의 분비가 증가하였고 반면 MMP의 Inhibitor인 TIMP-1의 분비는 감소함을 확인하였다. 또한 MMP-2,9의 활성화에 중요한 세포막에 부착한 MT1-MMP의 발현 역시 Substance-p의 처리 후 증가함을 형광 염색 및 western blot으로 하였다. 이는 손상된 신경 및 손상 조직에서 배출되는 substance-p는 혈종을 통해 골수 내 전달되어 이곳에 저장된 간충직 줄기세포를 혈중으로 mobilization 시켜 간충직 줄기세포가 손상 조직으로 모이게 하여 손상조직의 회복에 관여하게 할 것으로 추정케 하는 중요한 연구 결과이다.

###### 2) cell migration assay

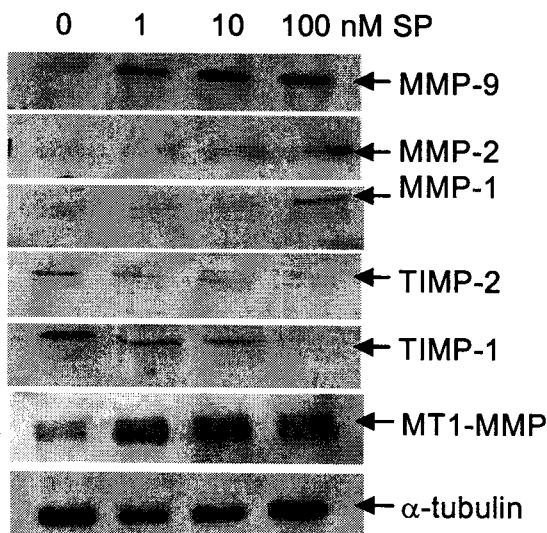
Millicell(insert plate)내 collagen plug를 만들고 상층부를 type IV collagen으로 coating하여 결체조직과 유사 구조를 재현하였고 그 상층부에 간충직 줄기세포를 배양하고 하층부에 chemoattractant로 substance-p를 농도별로 처리한 결과 substance-p 농도 의존적으로 간충직 줄기세포가 collagen을 분해하여 하층부로 이동하였다. 이는 substance-P가 간충직 줄기세포의 골수로부터 혈중으로 mobilization에 직접적으로 관여할 것을 의미하는 결과 현재 특허 출원 및 논문 출간을 진행하고 있다.

## 나. 연구 결과

### 1) substance-p에 의한 인체 MSC의 MMP 발현 증가 및 TIMPs 발현 감소

골수 내에 붙어있는 MSC의 mobilization의 초기 단계에 Substance-P가 작용할 것이라 예상하여 In vitro상에서 MSC에 Substance-p를 처리하여 MMPs 활성도가 증가하는지를 gelatin zymography로 분석한 결과 MMP-2, 9의 분비가 증가하였고 반면 MMP의 Inhibitor인 TIMP-1의 분비는 감소함을 확인하였다. 또한 MMP-2, 9의 활성화에 중요한 세포막에 부착한 MT1-MMP의 발현 역시 Substance-p의 처리 후 증가함을 형광 염색 및 western blot으로 하였다. 이는 손상된 신경 및 손상 조직에서 배출되는 substance-p는 혈증을 통해 골수내 전달되어 이곳에 저장된 MSC를 혈증으로 mobilization 시켜 MSC가 손상 조직으로 모이게 하여 손상조직의 회복에 관여하게 할 것으로 추정케 하는 중요한 연구 결과이다.

#### Immunoprecipitation of MMPs and TIMPs



#### Gelatin zymography

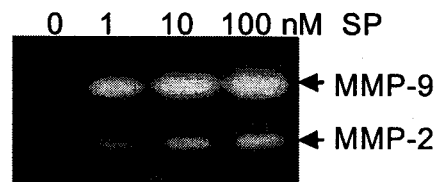


그림 10. Substance-P 처리 후 나타나는 MMP 및 TIMP의 발현 변화

## 2) substance-p에 의한 MSC cell migration 촉진

millicell(insert plate)내 collagen plug를 만들고 상층부를 type IV collagen으로 coating하여 결체조직과 유사 구조를 재현하였고 그 상층부에 MSC를 배양하고 하 층부에 chemoattractant로 substance-p를 농도별로 처리한 결과 substance-p 농도 의존적으로 인체 MSC가 collagen을 분해하여 하층부로 이동하였다.

## 5. 간층직 줄기 세포의 유리에 대한 Substance-p의 신호 전달

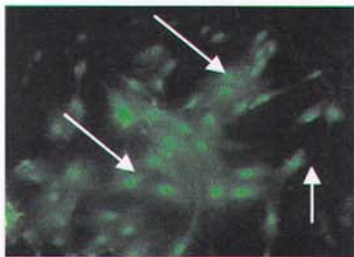
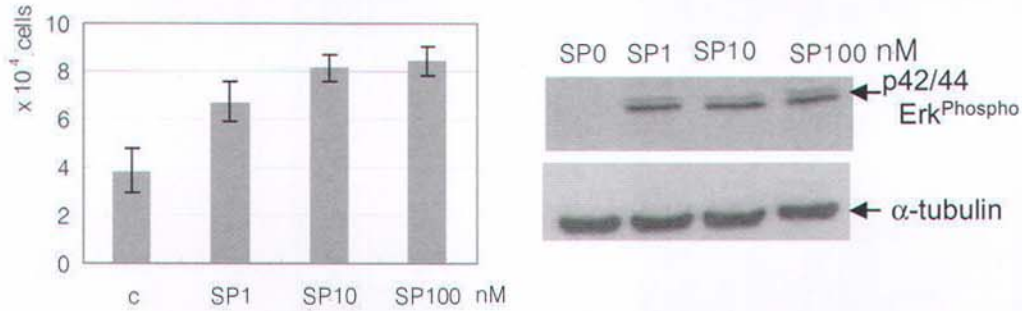
### 가. 연구 내용 및 방법

Substance-P 100 nM을 처리 후 Beta-catenin에 대한 면역 형광 염색을 실시, 발현 위치를 확인하고 또한 동일한 세포의 배양액에서 beta catenin에 의해 발현되는 단백질인 VEGF, Fibronectin 분비를 비교하고, 초기 signal인 Phospho-ERK level을 비교하였다.

### 나. 연구 결과

Beta-catenin의 핵내 이동에 substance-p의 역할을 평가한 결과 Substance-P 100 nM을 처리한 경우 Beta-catenin이 핵으로 이동한 것을 면역형광염색으로 확인하였고 또한 동일한 세포의 배양액에서 beta catenin에 의해 발현되는 단백질인 VEGF, Fibronectin 분비를 비교한 결과 Substance-P를 처리한 경우 증가하는 VEGF 및 fibronectin의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 초기 signal인 Phospho-ERK level을 비교한 결과 16 시간 배양 후 control에 비해 Phospho-ERK level이 높았으며 Substance-P 1, 10, 100nM 모두에서 비슷한 수준으로 나타났다.

## SP effect on cell proliferation and Erk activation



**Nuclear translocation of beta catenin by substance-p**

그림 11. substance-p에 의한 인체 MSC의 증식 증가

## 6. substance-p iv injection에 의한 CD29 + cell의 혈중 유리 증가

### 가. 연구 내용 및 방법

골수로부터 중배엽 줄기 세포의 혈중 유리에 대한 영향을 알아보기 위해 알칼리 화상 없이 Substance-P를 쥐의 꼬리 부분 정맥에 0.1 nmole/g(65ng/g)으로 주사하고, 주사 24시간 후, 전체 혈액을 취하고 단핵구를 분리하였다. 이를 48시간 동안 배양하고 suspension 세포들을 제거하였다. 3.7% formalin으로 배양된 세포들을 고정하고 중배엽 줄기 세포의 marker인 CD29+로 면역 염색을 실시한 결과 Substance-P를 주사하지 않은 경우에 비해 주사한 경우 CD29+ 세포들이 혈액 내 15배 정도 증가한 것을



확인 할 수 있었다. 이를 통해 골수로부터 혈액으로 증배엽 줄기세포가 이동되는 과정에 Substance-P가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

#### 나. 연구 결과

면역 염색을 실시한 결과 Substance-P를 주사하지 않은 경우에 비해 주사한 경우 CD29+ 세포들이 혈액 내 15배 정도 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 골수로부터 혈액으로 증배엽 줄기세포가 이동되는 과정에 Substance-P가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

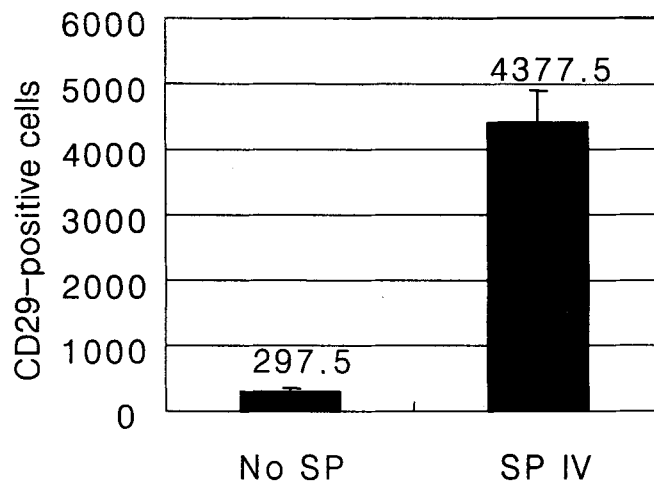


그림 12. CD29+세포의 혈중으로의 유리에 대한 영향

### 7. Substance-P iv injection의 손상 치유 촉진 효과

#### 가. 연구 내용 및 방법

알칼리 화상을 입은 뒤, Substance-P를 주사하지 않은 토끼와 주사한 토끼의 각막을 비교하였다(그림 13). 화상 직후 안구의 상처 부위는 원형 디스크 모양으로 하얗게 변하였고 수 초안에 충혈 되기 시작하였으며 상

처 부위를 중심으로 혈관이 많이 생성되는 것을 관찰 기간 내내 볼 수 있었다. Substance-P를 주사하지 않은 경우, 혈관 생성이 시간이 지날수록 감소하긴 하였으나 안구 적출 전(7일)까지 남아있었으며, 하얗게 변한 상처 부위도 그대로 남아있었다. 또한 면역 염색을 통해 상처 부위 세포들의 변화를 관찰한 결과, 화상 초반에는 stroma 부분에서 염증세포와 적혈구가 관찰되었고 상피 세포층은 한층 정도로 얇은 상태를 유지하였다. 그리고 상피 세포의 경우 화상 후 7 일 쯤 까지 큰 변화 없이 비슷한 수준을 유지하였으나 Stroma 부분의 경우 염증 세포와 적혈구가 줄어들고 증배염 줄기 세포로 추정되는 세포(fibroblast-like cells)들이 상처부위로 들어온 것을 볼 수 있었다. 혈중 CD29+ 세포들을 관찰한 결과, 초기에는 많지 않았던 세포들이 화상 후 7 일 쯤에 가장 높은 수치를 나타내는 것을 확인하였다. 이를 통해 혈액 내 증배염 줄기 세포가 증가한 시기와 상처 부위에서 관찰되기 시작한 시기가 일치함을 알 수 있었다.

Substance-P를 주사한 경우, 초반에는 주사하지 않은 토끼와 비슷한 상태를 보였으나 3일 후부터는 혈관 생성이 눈에 띄게 줄기 시작했고 하얗게 변했던 상처 부위도 주사하지 않은 토끼에 비해 투명해졌다. 그리고 화상 후 7일이 지났을 때, 상처 부위에 집중적으로 생겼던 혈관이 모두 없어졌으며 하얗게 변했던 상처 부위도 투명해졌다. 특히 면역 염색을 실시한 결과, 주사하지 않은 토끼에서 화상 후 7일째에 보였던 fibroblast-like cells이 5일째 관찰되었으며 7일째에는 관찰할 수 없었다. 또한 화상 후 7일이 지난 후까지 얇게 한층 정도만 유지되었던 상피 세포도 같은 시기, Substance-P를 주사한 경우 층이 두껍게 형성되어 정상 조직에 가깝게 재생이 되어 있음을 확인 할 수 있었다. 혈중 CD29+ 세포들의 수준을 시간 별로 확인한 결과, 화상 후 5일째에 가장 높은 수준을 나타냄을 확인하였으며 이는 조직에서 fibroblast-like cells이 사라졌던 7일째(화상 후)에 크게 줄어든 것을 관찰하였다. 이를 통해 Substance-P를 주사한 경우 증배

엽 줄기 세포가 상처 부위로 이동하는 시기가 앞당겨진 것을 확인할 수 있다.

#### 나. 연구 결과

본 연구 결과는 MSC를 골수로부터 유리시켜 손상 치유에 참여하게 하는데 Substance-p의 새로운 역할을 규명하는 결과로 현재 한국 특허출원을 하였고 (2004년 10월), 논문을 제출하였다(2005년 1월). 또한 학술회의 (한국 안과학회, 2회 발표, 미국 안과 연구학회 2004년 4월 발표, 국제조식공학회 발표 2004년 10월, 서울 국제 줄기세포 심포지움 발표 2004년 9월, 미국 NICDR에 발표 2004년 12월)에 발표하였다.

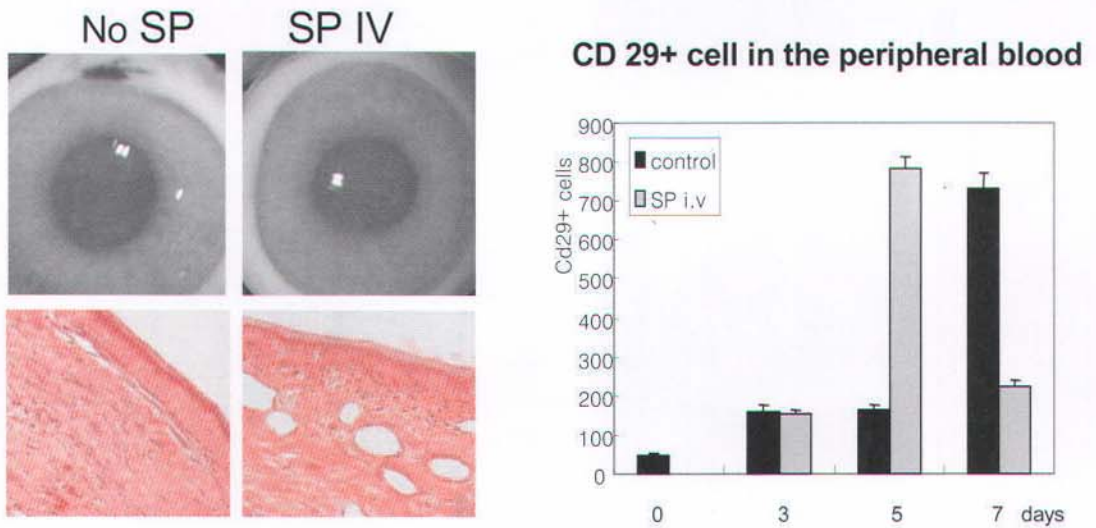


그림 13. Substance-P 처리 후 혈중 및 상처 부위에서 발견되는 CD29+ cells

## 제 2 절 줄기세포 및 서방형 성장인자 전달을 이용한 위장관계 손상 치료기술

### 1. 위장관 줄기세포의 동정 및 최적 배양 조건 수립

#### 가. 연구 내용 및 방법

##### 1) 줄기세포 표지자 (후보 단백질)

세포를 이용한 치료에 있어서 줄기세포를 선택적으로 수집할 수 있는 기술이 요구되고, Crypt stem cell 표지자를 연구하는 데에 있어 whole crypt의 whole mount immunofluorescence의 이용 가능성을 stem cell 표지자로 거론되는 b-catenin의 형광 염색을 실시하여 확인하였다.

줄기세포 표지자를 연구하기 위하여 b-catenin을 crypt whole mount 면역형광염색 결과 b-catenin 핵 및 세포질 염색을 확인하였다. 위장관 crypt 기저부에는 b-catenin/wnt signal이 정상적으로 활성화 되어 있는 것으로 기보고 되어 Wnt target 중 적절한 molecule을 찾고 있다.

##### 2) 최적 배양 조건

위장관 crypt epithelial cell을 효율적으로 분리·배양하기 위해 Cytokine과 세포외 기질을 달리하여 최적 배양조건을 수립하였다.

#### 나. 연구 결과

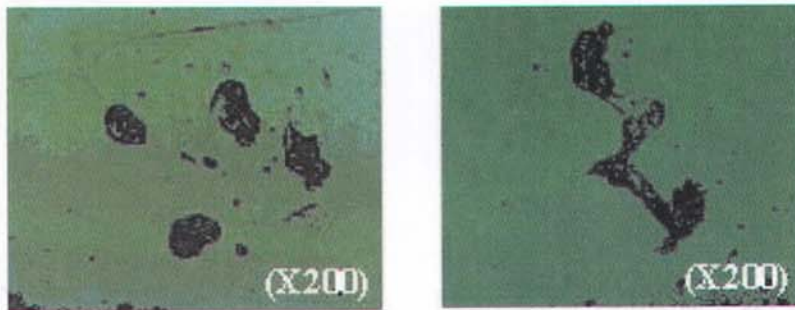
##### 1) 줄기세포 표지자 (후보 단백질)

줄기세포 표지자를 연구하기 위하여 b-catenin을 crypt whole mount 면역형광염색 결과 b-catenin 핵 염색을 확인하였다. 또 Frizzled1, 2, notch, MDR-1등이 줄기세포 후보 단백질로 연구 추진 중이다. 특히, 위장

관 crypt 기저부에는 b-catenin/wnt signal이 정상적으로 활성화 되어 있기 때문에 Wnt target 중 하나가 MDR-1이므로 이를 세포 표면 표지자로 보고 확인 중이다.

## 2) 최적 배양 조건

세포의 기질로 type IV collagen, Cytokine으로 Hepatocyte growth factor/ scatter factor (HGF/SF)를 50 ng/ml 사용했을 때 Matrigel과 EGF를 사용했을 때보다 2배 이상의 콜로니 형성율을 나타내었다. Type IV collagen coating, HGS/SF 50 ng/ml에서 콜로니 형성율이 최대에 이릅니다.



### **Type IV collagen coated dish, with EGF (10 ng/ml) + HGF/SF (50 ng/ml)**

그림 14. 상피세포의 일차배양 과정에서 형성된 콜로니의 위상차 현미경 사진

## 2. 위장관계 조직 재생의 최적 성장인자 병합 조건 수립, 서방형 담체 개발

### 가. 연구 내용 및 방법

#### 1) 방사선 조사 위장관계 손상 회복 모델

방사선 조사 위장관계 손상 모델 수립: Whole body irradiation을 6 Gy 부터 12 Gy (Cs133 3.3 Gy/mim) 범위에서 조사 후 위장관 점막을

whole-mount상태에서 methylene bluse로 염색하여 해부현미경에서 손상 부위를 측정하여 적정 모델 수립. 방사선 조사 위장관계 손상 모델 수립: Whole body irradiation을 6 Gy부터 12 Gy (Cs133 3.3 Gy/mim) 범위에서 조사 후 위장관 점막을 whole-mount로 염색하였다.

## 2) 위장관 조직재생의 최적성장 서방형 담체개발

젤라틴 A와 B(10, 8, 6w/v%)는 증류수에 녹여 50℃에서 1시간 동안 교반하면서 가열하고 4℃에서 gel화 시킨 다음, EDC가 함유되어 있는 아세톤:증류수가 9:1로 혼합된 용액에서 가교를 시켜 담체를 제조하였다.

## 나. 연구 결과

### 1) 방사선 조사 위장관계 손상 회복 모델

위장관 점막을 whole-mount로 염색한 결과 ulcer 유도 부위를 확인할 수 있었다 (그림 15). 약 8 Gy의 방사선 조사군에서 약 200 여개의 손상 부위가 발생하였고 7 일에 걸쳐 회복되었다. 이에 반하여 7 Gy에서는 재생이 2-3일에 걸쳐 이루어 졌고, 8 Gy 이상에서는 조직의 재생이 이루어 지지 않았다. 따라서 Gastrointestinal syndrome의 치료법 개발 모델로는 12 Gy를 설정, 재생 기전 연구에는 8 Gy를 설정하는 것이 적절하다. 손상 부위가 방사선 조사량이 높은 경우 (12 Gy 이상)에는 소장 전범위에서 관찰되는 데에 비하여 8 Gy 이하에서는 소장 중심부분에서 주로 관찰되었다. 대장은 소장에 비하여 손상이 매우 적게 관찰되었다 (일본 IFAA 및 한국 생화학회, 한일 조직공학회에 포스터 발표, Int. Symposium on Rad Emergencies-Medical Preparedness and assistance에서 초청 발표).



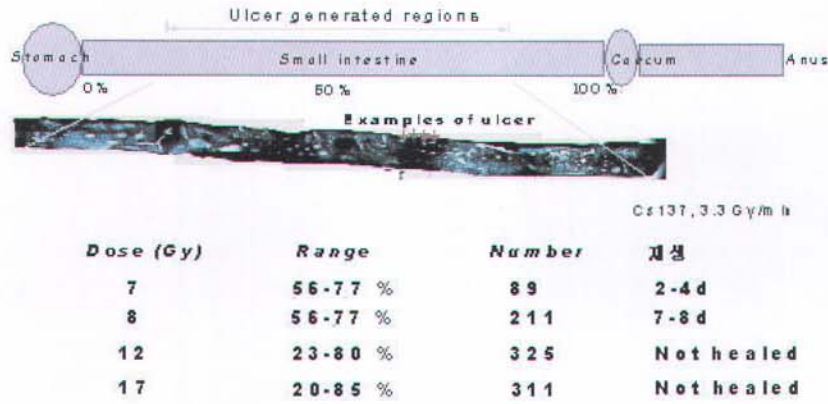


그림 15. 방사선 조사 후 whole-mount 염색하여 확인된 손상 부위의 모습과 방사선 조사량에 따른 손상의 수와 형성 부위, 재생 속도

위장관 상피세포 재생 기전 연구를 위하여 방사선 조사 모델을 수립하였다. 위의 실험, 방사선량에 따른 ulcer 유도실험에서 재생 기전 연구에는 8 Gy를 설정하는 것이 적절하였기 때문에 mouse에 방사선 8 Gy를 whole body에 조사하였다. Tunnel assay 결과, 방사선 조사 4.5시간 후 crypt cell death가 stem cell zone으로 추정되는 위치에서 가장 활발히 일어났고 2-3일간 지속되었으며 7일 이후에는 cell death가 정상화 되었다(그림 16).

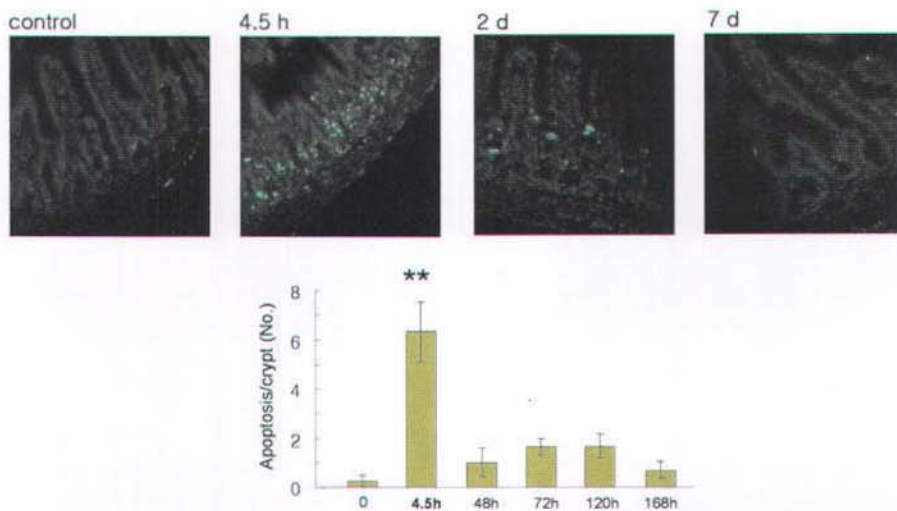


그림 16. 방사선 조사 후 시간에 따른 small intestine Tunnel assay

방사선 조사 후 시간에 따른 small intestine 상피세포의 crypt와 villus의 길이 변화를 조사하였다. 4.5시간 후 crypt cell의 급격한 death로 인해 2-3일째 Villus atrophy가 일어났다. 그 후 4-5일째에는 crypt hyperplasia 가 일어남으로써 crypt 의 숫자와 길이가 회복되었고 이로 인하여 7 일째에는 Villus atrophy 또한 회복되는 것이 확인되었다 (그림 17, 18, 19).

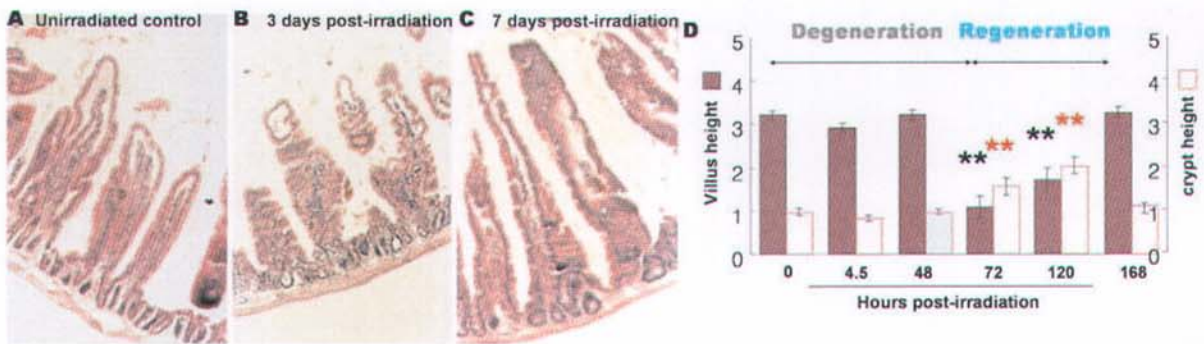


그림17. 방사선 조사 후 시간에 따른 small intestine 상피세포의 crypt와 villus의 길이 변화

### Crypt death and recovery

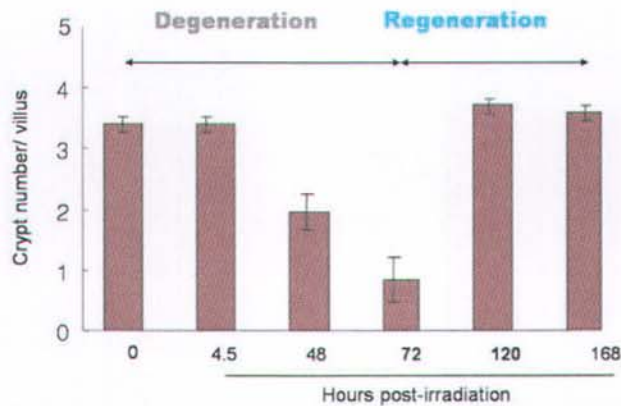


그림18. 방사선 조사 후 시간에 따른 small intestine 상피세포의 crypt number 변화 (회복)



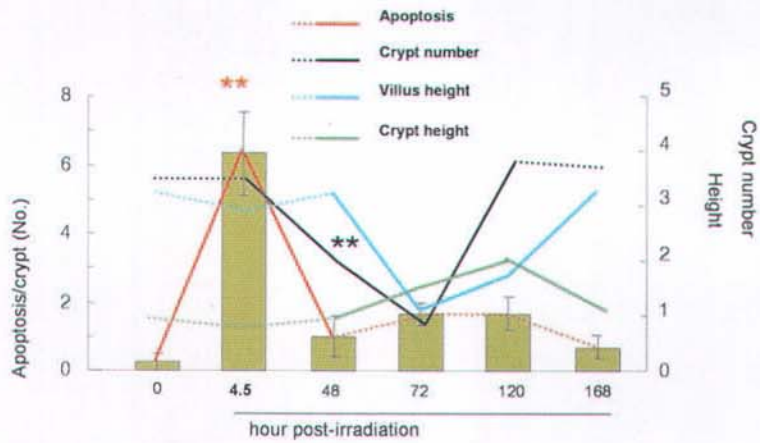


그림 19. 방사선 조사 후 시간에 따른 small intestine의 회복

## 2) 위장관 조직재생의 최적성장 서방형 담체개발

### 가) 젤라틴 담체 개발

EDC의 농도가 0.05, 0.1w/v일 때는 빠르게 팽윤하였지만 0.15w/v%부터는 거의 팽윤 정도는 변화 없고 150 시간 이상까지 일정하게 유지된다. 이런 경향은 젤라틴의 분해 정도를 조사한 경우에도 같은 결과를 볼 수 있었다. EDC의 농도가 0.15w/v% 이상일 때는 시간에 따른 분해 정도는 변화가 거의 없이 150 시간까지 유지하였고, EDC의 농도가 0.05일 때는 거의 처음부터 0차 반응에 따라 감소함을 알 수 있었다(그림 20).

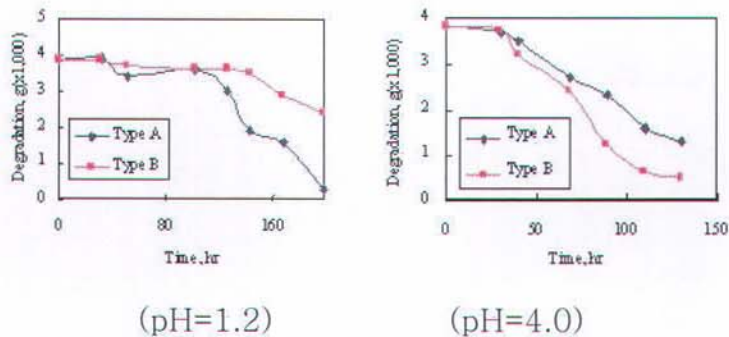


그림 20. 젤라틴 담체의 종류 pH에 따른 분해거동

나) In vitro enzymatic degradation 및 Swelling

EDC의 농도가 증가할수록 팽윤 정도는 감소한다. 이는 EDC의 농도의 증가로 인한 가교의 정도가 증가하여 가교 사이의 공간이 좁아지면서 팽윤 정도는 감소하였다(그림 21).

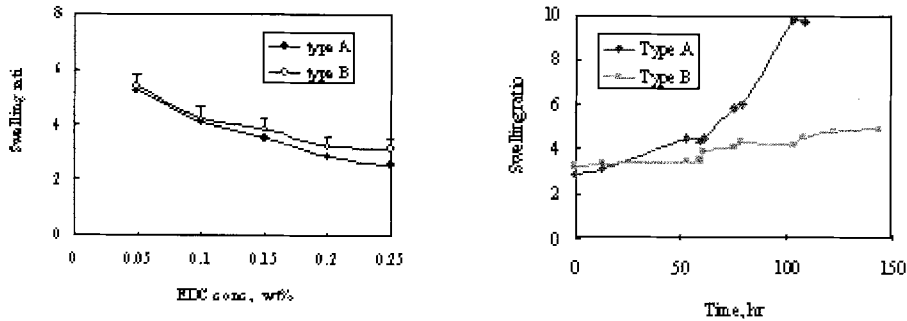


그림 21. 젤라틴 담체의 종류 및 가교도에 따른 팽윤도

젤라틴의 경우 타입에 따라 음이온과 양이온을 가지므로 위장에서 분비되는 음이온을 가진 펩신에 의해 전하에 따라 다르게 분해된다. 젤라틴의 타입이 A인 경우는 B인 경우보다 빠르게 팽윤 정도가 증가하였다. 이것은 젤라틴A에 흡착하는 펩신의 양이 젤라틴 B보다 더 많은 까닭이다. 이런 결과는 젤라틴의 분해 실험에서도 같은 결과를 얻었다. 따라서 젤라틴은 전하에 따라 펩신과의 이온комплек스로 그의 팽윤 및 분해속도가 달라짐을 알 수 있었고, pH에 따라 팽윤정도가 다른 두 종류의 gelatin을 이용하여 위장관에서의 성장인자의 서방성을 유지할 수 있는 서방형 담체 개발 및 성장인자 전달 기술을 확립하였다.(고분자학회 학술회의 발표 및 한국공업화학회 투고 준비 중.)

3. 조직재생 지지체의 제조 조건의 수립을 위한 nanopattern 제조 및 Nanopattern 위의 ECM 성분의 선택적 코팅법 개발

## 가. 연구 내용 및 방법

### 1) Gene activated matrix (GAM) 물질 개발

#### 가) Water-soluble low molecular weight chitosan (LMWC) 제조

Chitosan (Fluka : Deacetylation degree, 85%) 5g (20mg/ml) 을 35% HCl에 0℃, 3시간 녹인 후, 50℃에서 3시간 hydrolysed 시켜 LMWC을 제조하였다.

#### 나) Plasmid/LMWC complex 형성

Transfection efficiency는 pBlue script II (pBC ; size 3.0kb)를 선택하여 E. coli strain DH5a에 transformation하여 QIAGEN plasmid maxi kit로 isolation 하였다.

#### 다) Plasmid/LMWC complex형성과 gel retardation

plasmid/LMWC complex에서 분리 정제된 plasmid를 1% agarose gel에서 100V로 전개하여 plasmid/LMWC complex의 DNase I protection을 Fluor-SMultimager (Bio-Rad)로 확인하였다.

### 2) 마이크로 스탬프(micro stamp) 제조

#### 가) 전자빔 식각 방법(Electron beam lithography)

- ① 원하는 형태의 패턴을 CAD나 CADENCE 소프트웨어를 이용하여 설계하고 전자빔(EBMF 10.5, LEICA社)을 이용하여 실리콘 웨이퍼 상의 포토레지스트(photoresist, PMMA)에 원하는 패턴을 그려 넣는다.
- ② 현상(Developing)하여 광분해 된 포토레지스트를 제거한다.

- ③ 건식 식각(Dry etching)을 이용하여 웨이퍼를 일정 깊이만큼 플라즈마(Plasma)를 이용하여 식각한다. 전자빔 식각(Electron Beam Lithography)방법으로는 최대 0.5 um 까지 식각이 가능하다.
- ④ 건식 식각 공정에서 남은 포토레지스트를 제거한다.
- ⑤ 실리콘 일레스토머(Mixture silicon elastomer-184) : 실리콘 경화제(silicon elastomer curing agent-184)를 10:1 혼합하여 웨이퍼에 일정량 분주한 후 (Dow corning Corporation, Midland, MI) 100도에서 1시간 이상 경화시켜 스탬프(PDMS stamp)를 완성시켰다.

#### 나) 광 식각 방법(photo lithography)

- ① photo lithography에서는 먼저 photo mask를 제작한다. Electron beam을 이용하여 빛을 투과하는 glass 웨이퍼상에서 포토레지스트를 식각하고 Developing하여 광분해 된 포토레지스트를 제거한다.
- ② Photo mask에 UV를 투과시켜 원하는 패턴으로 포토레지스트를 노광시킨 다음 Dry etching을 이용하여 웨이퍼를 일정 깊이만큼 Plasma를 이용하여 식각한다. Electron Beam Lithography 방법으로는 0.5 um이상의 깊이 까지 식각하고, 이 후 공정은 e-beam lithography의 공정과 같이 Dry Etching -> P/R 제거 -> 실리콘 일레스토머 분주 -> 경화 -> 스탬프 완성시킨다.

### 3) 스탬프의 패턴 확인

#### 가) 전자현미경(SEM)을 이용한 패턴확인

패터닝된 PDMS를 에탄올을 이용하여 수차례 씻은 후 건조한 다음, 스탬프 표면에 Gold Coater를 이용하여 금 코팅하여 전자현미경을 이용하여 패턴을 관찰한다.

나) 위상차 현미경을 이용한 패턴 확인

패터닝된 PDMS를 에탄올을 이용하여 수차례 씻은 후 건조한 다음 빛의 각도를 적절히 조절하여 위상차 현미경으로 패턴을 확인한다.

#### 4) 알칸치올[o-Mercapto-oligo(ethylene glycol)] 유도체 HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>(OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH의 합성

가) Undec-1-en-11-yl tri(ethylene glycol) Fw=302 합성

50% 수산화나트륨 용액 트리에틸렌 글리콜을 혼합하여 기름탕에서 질소 충전된 상태로 100도에서 30분간 반응 시킨 다음 1.0g의 of 11-bromoundec-1-ene(Aldrich)를 첨가한 후 24시간 동안 반응을 진행한다. 반응 종결후 냉각한 후에 n-Hexane을 이용하여 6회에 걸쳐 반응 생성물을 추출한다. Evaporator를 이용하여 생성물을 농축한 다음 실리카겔 컬럼과 Ethyl Acetate를 사용하여 정제한다.

나) 1-Methylcarbonylthio-undec-11-yltri (ethylene glycol) 합성

위의 과정으로 합성된 Olefins을 메탄올 용매를 이용하여 300mM의 용액을 만든 후, 2-4 당량에 해당하는 티오아세트산(Thioacetic acid)와 광개시제인 AIBN을 5-10mg 첨가하고 4-6시간동안 450W의 수은램프(450-W, medium-pressure mercury lamp (Ace Glass) filtered through Pyrex.)를 이용하여 광반응을 진한다. 실리카겔 컬럼과 Ethyl Acetate와 Methanol를 사용하여 정제한다.

다) 1-Mercaptoundec-11-yl tri (ethylene glycol) 합성

위의 과정으로 합성된 티오아세테이트(thioacetate)를 0.1N 염산용액(메탄올)에 첨가하여 상온에서 4-5일 정도 반응시켜서 알칸치

올[o-Mercapto-oligo(ethylene glycol)] 유도체를 합성한 다음 실리카겔 컬럼으로 정제한다.

5) PDMS 스탬프와 알칸치올 분자 잉크를 이용한 자가배열단층막 (SAMs, Self Assembled Monolayers)제조

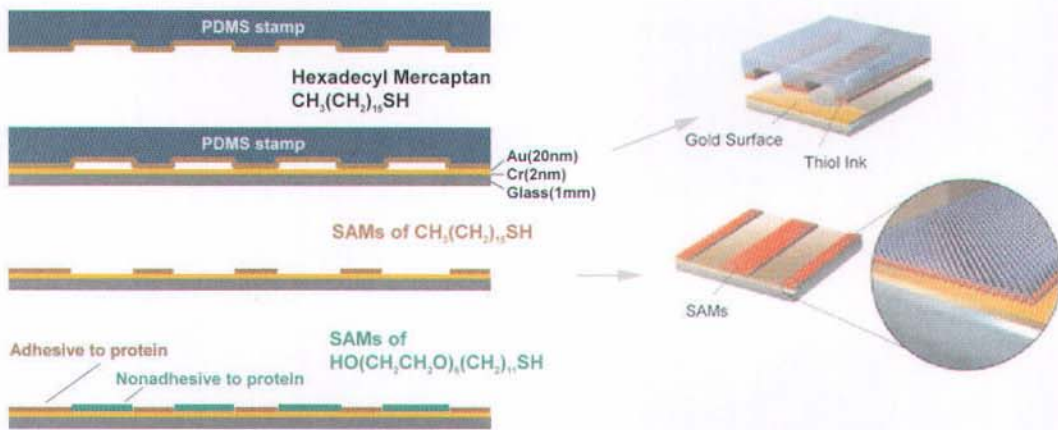


그림 22. PDMS 스탬프를 이용하여 두 종류의 알칸치올 분자의 SAMs를 형성시키는 과정을 나타내는 모식도

가) 헥사데실머캡토(Hexadecanethiol) 용액(TCI社)을 작은 병에 소량 분주한 후 제작된 스탬프를 매달아 70도에서 10분간 방치하여 스탬프 표면에 알칸치올 분자를 흡착시킨다.

나) 금박막 웨이퍼 (Gold coated Glass wafer; Au(20nm)/Cr(5nm)/Glass wafer)에 패턴이 식각된 면의 스탬프를 약 10초 정도 적당한 압력을 가하여 접촉시킨다. 자가배열단층막(SAMs) 분자는 1초 안에 형성된다.

다) 합성된 알칸치올[o-Mercapto-oligo(ethylene glycol)] 유도체의 1mM 용액으로 옮긴 후 6시간 이상 방치하여 SAMs를 형성시킨다.

라) SAMs를 형성하지 못한 분자를 에탄올을 이용하여 씻어낸 후 마지막으로 탈이온수(Deionized Water)를 이용하여 씻어서 완성한다. 보관은 질소 충전된 곳에서 한다.

## 6) 세포외기질(ECM)흡착

SAMs를 형성하고 있는 두 종류의 분자는 각각 반대의 특성을 가지고 있다. Hexadecanethiol SAMs는 소수성(Hydrophobic)의 성격을 갖고 있으므로 세포외기질(ECM)등의 단백질을 흡착하는 성질이 있는 것에 반하여 합성을 통하여 얻어진 알칸치올 유도체는 친수성(Hydrophilic)의 성질을 갖고 있으므로 세포외기질등의 단백질을 흡착하지 못하게 하는 성질을 갖고 있다.

ECM 중 Fibronectin의 용액 (20 ug/ml)에 완성된 SAMs 웨이퍼를 담가 1시간 동안 4도에서 방치한 다음 탈이온화수를 이용하여 조심히 씻어내면 Hexadecanethiol SAMs를 따라 흡착된 Fibronectin의 패턴을 얻게 된다.

## 7) 세포외기질(ECM)의 패턴의 확인

가) 세포외기질(ECM)의 항체를 이용한 패턴의 확인

- ① 피브로넥틴의 패턴이 형성된 웨이퍼를 3.7% 포르말린(Formaldehyde)에 20분간 상온에서 담구어 피브로넥틴을 고정한 후 PBS를 이용하여 3차례 씻는다.
- ② 피브로넥틴(Fibronectin)에 대한 monoclonal anti-body(Ab)를 상온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3차례 씻는다.
- ③ 피브로넥틴(Fibronectin)에 대한 2차 항체 Ab(fluorescein anti-mouse IgG, VECTOR)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 3차례 씻는다.
- ④ Mounting solution인 Vectashield(Vector LAB)를 이용하여 slide

glass에 고정시킨 다음 형광 현미경을 이용하여 패턴을 확인한다.

나) 세포외기질과 형광체의 결합물(FITC conjugated ECM)을 이용한 패턴의 확인

- ① 친수성과 소수기의 성질을 가진 알칸치올의 SAMs가 형성된 웨이퍼를 DW로 씻는다.
- ② collagen-Fluorescein(SIGMA)의 20ug/ml 용액에 4도에서 1시간 동안 담근다.
- ③ Mounting solution인 Vectashield(Vector LAB)를 이용하여 slide glass에 고정시킨다.
- ④ 형광 현미경을 이용하여 패턴을 확인한다.

#### 8) ECM의 패턴위에서 세포배양

가) 피브로넥틴의 패턴이 형성된 웨이퍼를 10% Penicillin Streptomycin(in PBS)에 1시간 이상 담가 멸균한다.

나) PBS, Media(FGM)로 각각 린스한 다음, N-HDF 세포를 분주하여 2일 배양한다.

다) 형광 염색(Immuofluorescence)하여 세포의 형태를 관찰한다.

### 나. 연구 결과

#### 1) Gene activated matrix (GAM) 물질 개발

가) Water-soluble low molecular weight chitosan (LMWC) 제조  
depolymerized chitosan은 FT-IR spectrum과 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을



통해서 구조적으로 chitosan임을 확인하였고, 확인된 depolymerized chitosan의 molecular weight는 GPC(Asahi Pack GFA-30F column, 50°C, 0.5 ml/min 0.5 % acetate buffer (pH 4.0), RI detector (SP6040 Differential Refractometer Electronics Unit), pullulan standard)로 분석하여 약 1,000 - 3,000 Mw 임을 확인하였다.

#### 나) Plasmid/LMWC complex 형성

Purity는 Ultrospec 3100 pro (Amersham pharmacia biotech)를 사용하여 OD260/ OD280 ratio로 확인하였으며 농도는 1(OD260)=50ug으로 확인하였다. plasmid/LMWC complex는 다양한 양의 LMWC에 plasmid DNA 1ug을 천천히 조금씩 첨가한 후, 전기영동하여 Fluor-S Multilmager(Bio-Rad)로 DNA의 위치를 확인하여 약 1 : 10에서부터 complex를 형성되어 size의 변화가 있음을 확인하였고, complex 형성 시 첨가되는 solution에 따라 retardation을 확인하였다.

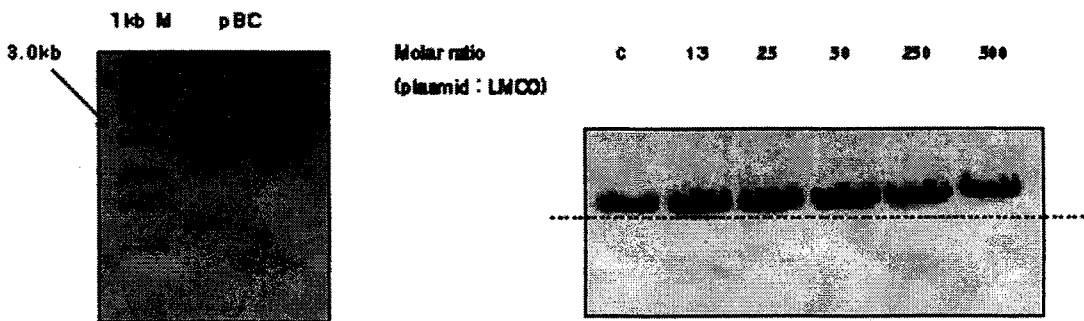


그림 23. Plasmid/LMWC complex 형성 확인

#### 다) Plasmid/LMWC complex형성과 gel retardation

plasmid/LMWC complex sample의 DNase I protection은 1:10배에서 DNase I에 의해 plasmid가 완전히 degradation 됐으며 약 500-1000배에서 protection 됨을 확인을 통해 GAM 물질로서의 가능성을 확인하였다. (생물공학회, 고분자학회 2회 등 학술회의에서 발표)

## 2) 스탬프의 패턴 확인

### 가) SEM을 이용한 패턴확인



그림 24. 다양한 스케일과 형태의 패턴이 형성된 스탬프(PDMS) 표면의 전자주사현미경사진 2500배 배율의 이미지

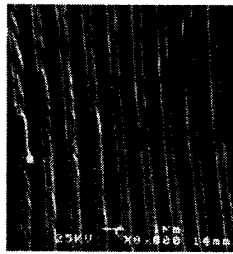


그림 25. 0.5  $\mu\text{m}$ 의 스트립라인(Strip line) 패턴이 형성된 스탬프(PDMS) 표면의 전자주사현미경사진 8000배 배율의 이미지

### 나) 위상차 현미경을 이용한 패턴 확인

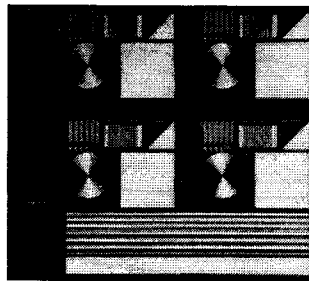


그림 26. 다양한 스케일과 형태의 패턴이 형성된 스탬프(PDMS) 표면의 위상차 현미경(Stereo microscope)사진

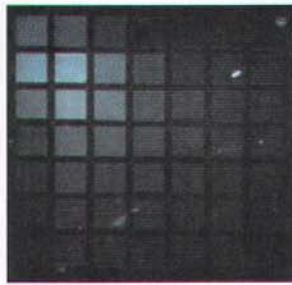


그림 27. 다양한 스케일과 형태의 패턴이 형성된 스탬프(PDMS) 표면의 전자주사현미경(SEM)사진. 100배 배율의 이미지

### 3) 알칸치올[o-Mercapto-oligo(ethylene glycol)] 유도체 HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>(OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH의 합성

#### 가) Undec-1-en-11-yl tri(ethylene glycol) Fw=302 합성

반응을 종결하고 생성된 분자를 헥산으로 6회이상 추출한 후 용매를 증발 시켜 남은 Olefin을 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 분리한 후 바닐린(Vaniline)을 이용하여 가열한 후 원하는 생성물의 위치를 확인한다.

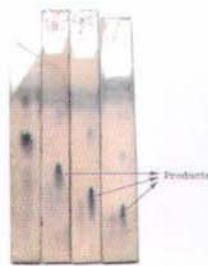


그림 28. 생성물의 TLC 결과

전개액의 종류에 따라서 전개되는 속도와 분리되는 순도의 차이를 알 수 있었다. 원하는 생성물은 두 번째 전개되는 분자로 추측된다. 전개액은 좌측 첫 번째부터 메탄올:에틸아세테이트=2:8, 메탄올:에틸아세테이트=1:9, 메탄올:에틸아세테이트=19:1, 100%에틸아세테이트이다.

실리카겔을 이용하여 분리한 후 NMR(핵자기공명) 스펙트럼을 분석하여 합성된 생성물을 확인하였다: 수율 78% HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.25(12H), 1.55(2H), 1.7(1H), 2.05(2H), 3.45(2H), 3.55- 3.75(24H), 4.9-5.05(2H), 5.75-5.85(1H)

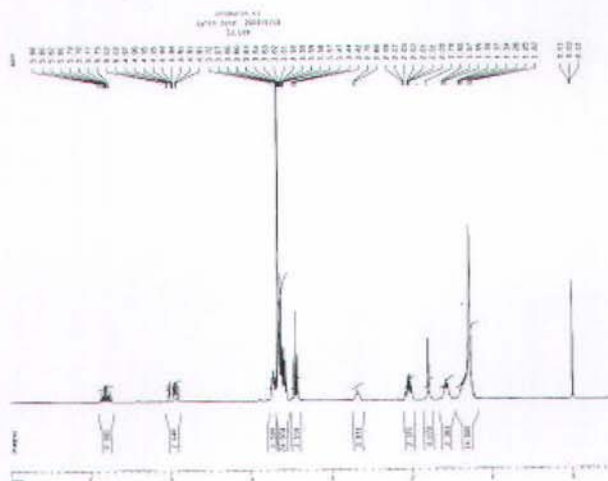


그림 29. 생성물의 NMR 스펙트럼 결과

나) 1-Methylcarbonylthio-undec-11-yltri (ethylene glycol) 합성



그림 30. 반응물과 생성물의 TLC 결과

반응물(각각 TLC의 좌측)과 생성물(각각 TLC의 우측)의 TLC 결과를 통하여 생성물에 치올그룹이 형성되어 흡광을 하고 있는 것을 확인할 수 있다. 실리카겔을 이용하여 분리한 후 NMR(핵자기공명) 스펙트럼을 분석하여 합성된 생성물을 확인하였다.: HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>)

1.25(14H), 1.5(4H), 2.3(3H), 2.4(1H), 2.8(2H), 3.4(2H), 3.5-3.7(24H)

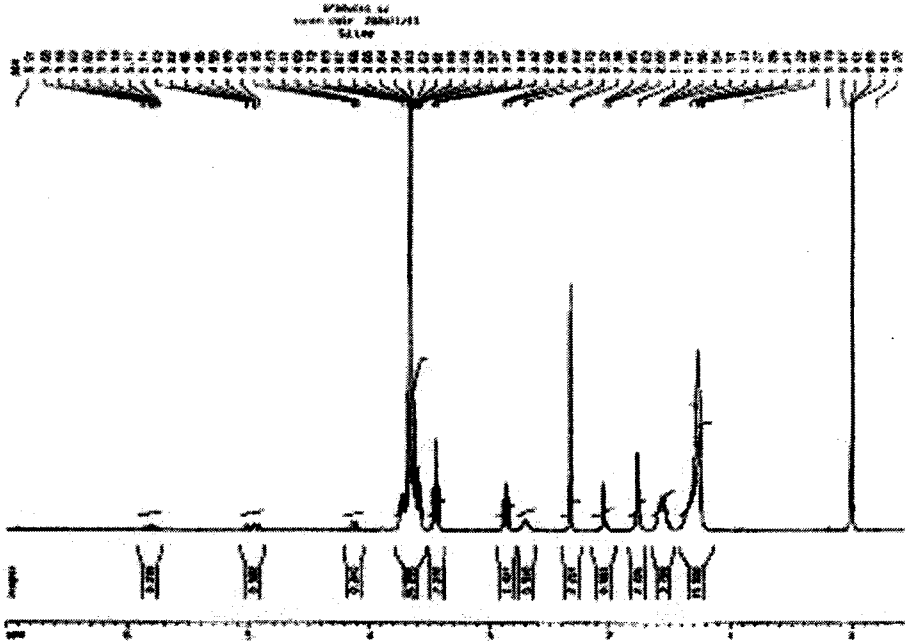
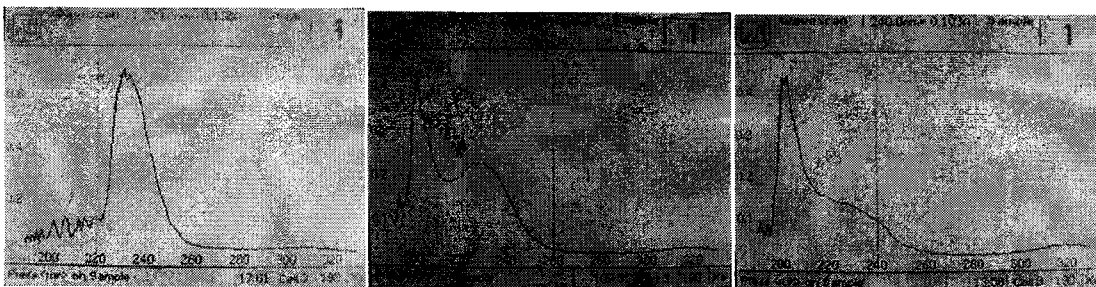


그림 31. 생성물의 NMR 스펙트럼 결과

다) 1-Mercaptoundec-11-yl tri (ethylene glycol) 합성

S-H 그룹의 UV 흡수 파장은 204-210 nm 인 것을 기준으로 UV 스펙트럼을 통하여 반응의 진행 정도를 알 수 있었다.



(a) (b) (c)

그림 32. (a) 반응을 시작하기 전 반응물의 UV 스펙트럼, (b) 반응을 시작한지 17시간 이후에 측정된 UV 스펙트럼, (c) 반응시작 후 46시간 이후의 스펙트럼. S-H 그룹이 생성물에 포함되었고 반응이 충분히 완료되었음을 알 수 있다.

실리카겔을 이용하여 분리한 후 NMR(핵자기공명) 스펙트럼을 분

석하여 합성된 생성물을 확인하였다: <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
 1.25(14H), 1.35(1H), 1.6(4H), 2.5(2H), 2.7(1H), 3.45(2H), 3.55-  
 3.75(24H)

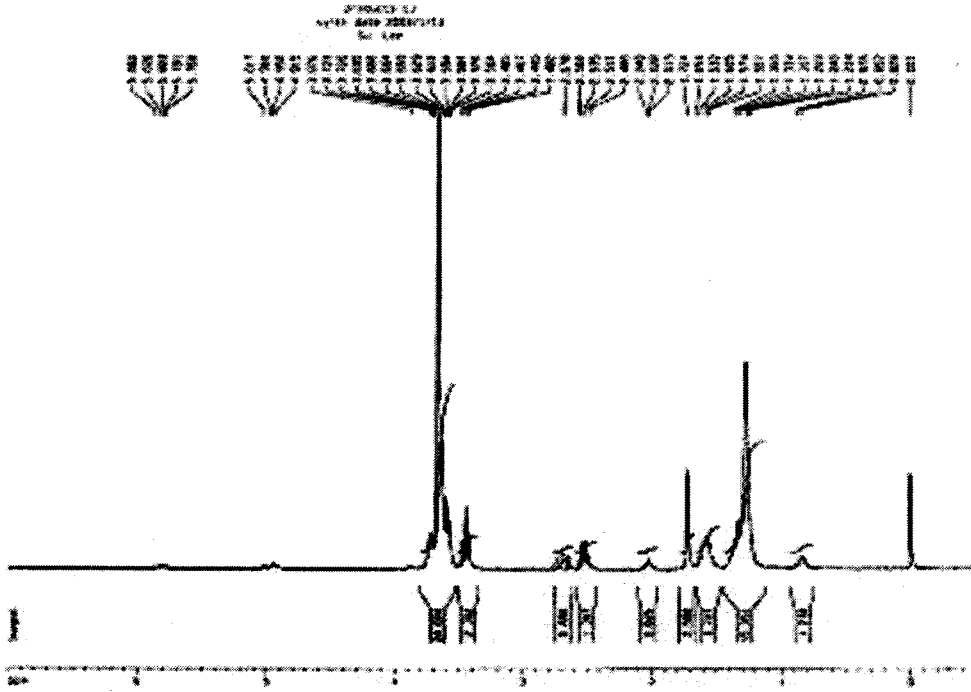


그림 33. 생성물의 NMR 스펙트럼 결과

#### 4) PDMS 스탬프와 알칸치올 분자 잉크를 이용한 자가배열단층막 (SAMs, Self Assembled Monolayers) 제조

PDMS 스탬프에 헥사데실머캅토(Hexadecanethiol) 분자를 흡착 시킨 후 금박막 웨이퍼(Gold Coated Wafer)에 스탬핑한 후에 금을 부식시키는 KCN 용액에 웨이퍼를 10분 담그면 헥사데실머캅토(Hexadecanethiol) 분자의 SAMs가 형성되지 않은 곳은 KCN에 의해 부식되어 색이 변하는 것을 확인 할 수 있었다.

#### 5) 세포외기질(ECM)의 패턴의 확인

ECM(Fibronectin)을 흡착시킨 후 면역형광염색(Immunofluorescence)를 한 후 형광현미경을 이용하여 패턴을 확인한 결

과 파이브로넥틴의 선택적 패터닝이 형성되어 있음을 확인하였고, 인체 섬유아세포의 분포가 파이브로넥틴 위에서 집중적으로 분포됨을 알 수 있었다.



그림 34. 다양한 스케일과 모양으로 패턴이 형성된 피브로넥틴 형광염색사진

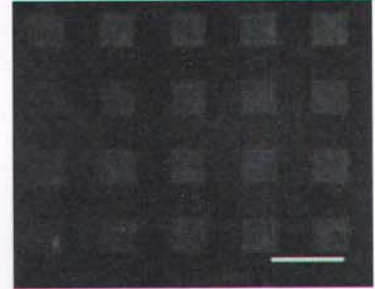


그림 35. 2um\*2um의 점 패턴으로 이루어진 피브로넥틴의 형광염색 사진, 흰색의 바는 4 um 이다.



그림 36. N-HDF 세포를 피브로넥틴의 패턴위에서 배양한 후 형광염색 사진

### 제 3 절 성체 줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 손상 치료 기술 개발

#### 1. 성체 조직에서 교차 분화 가능한 잔여 줄기세포 탐색

##### 가. 연구 내용 및 방법

성인줄기세포의 탈분화능 및 다분화능이 보고 되면서 다분화능 자가 줄

기세포를 이용한 다양한 조직 재생의 가능성에 대한 기대가 증가하게 되고 많은 논문들이 쏟아져 나오고 있다. 인체의 대표적인 neurogenic region에 해당하는 hippocampus와 subventricular zone은 임상적으로는 inaccessible stem cell로 분류가 된다. 성인의 자가세포 치료를 위해서는 다분화능줄기세포의 확보가 필요한데, 확보가 용이하여야 한다. 최근에 진피에 존재하는 skin derived precursor cells (SKPs)이 보고되었다. 이들 세포는 in vitro에서 근육, 신경, glial 세포로 분화가 가능함이 입증되었다. 이와 같은 보고는 인체의 가장 큰 면적을 차지하며, 체외에 있어 생검이 용이한 피부 조직의 multipotent stem cell source로서의 가능성에 큰 희망을 안겨주고 있다. 본 실험실에서도 진피 유래 미분화 세포를 신경조직을 주요 대상 조직으로 하여 지난 1년 간 분화 조건을 설정하여 왔다. 실험 방법은 피부 조직을 먼저 dispase 처리하여 진피층만을 분리하고, 여기에 hyaluronidase, collagenase, DNase를 처리하여 single cell suspension으로 분리 후 neurotrophin cocktail인 B27와 bFGF, EGF, LIF를 첨가하여 배양하면 일부 세포가 neurosphere와 같은 spheroid를 형성한다. 시간이 지남에 따라 spheroid의 크기가 커지므로 이들을 pipetting하여 적당한 크기로 나누어 계대 배양하였다.

## 나. 연구 결과

정상 피부 조직에는 신경 전구 세포가 존재하지 않음을 확인하였다. 또한 시험관 배양을 통해 약 20%를 신경세포로 유도시킬 수 있었음을 확인하였다.

다양한 분화 유도 조건을 제공, 신경세포로의 교차분화 가능성을 관찰하였다.



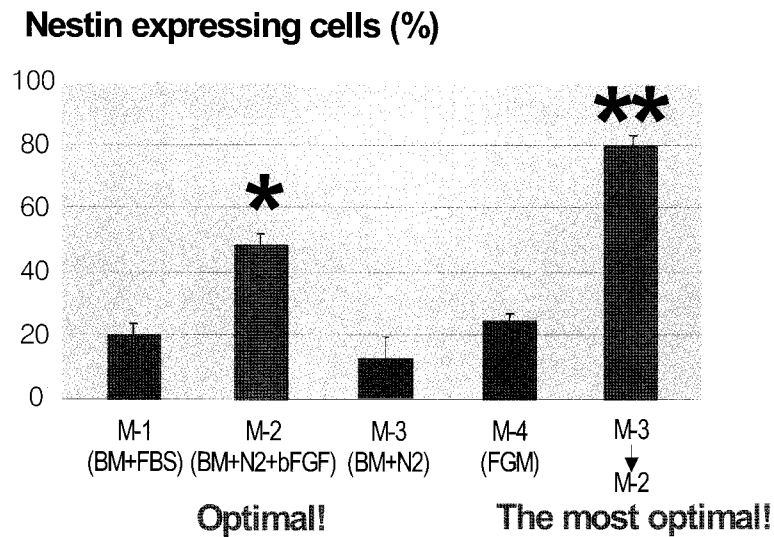


그림 37. 배양 조건에 따른 Nestin 발현량의 변화

- 피부 조직에서 accessible 신경 전구세포를 확보하는 기술 개발로 최적화 조건 수립하여 약 80% 까지 신경 전구세포를 유도하는 기술로 발전시켰다.
- 학술회의 발표 (ASCB 2003.12, Keystone Symposia 2004.1)
- 특허 출원

## 2. 조직 특이적 분화 유도 조건 수립

### 가. 연구 내용 및 방법

세포는 DMEM 과 F-12 가 3:1 로 혼합된 배지에 B27, 40ng/ml bFGF, 20ng/ml EGF, 20 ng/ml LIF를 첨가하여 배양 후 다양한 분화 유도 조건을 제공하여 신경 줄기세포의 표지자인 nestin 발현 여부 및 dendrite형성, 신경 세포 표지자인 bIII tubulin, post-mitotic 신경세포 표지자인 MAP2, astrocyte 표지자인 GFAP 발현 여부를 비교 관찰하였다.

또, 인체 성인 및 신생아의 포피 조직을 dispase 처리로 표피층을 제거하고 microvessel endothelial cells을 MACS로 분리/제거한 후 이들 세포를 6개의 다른 배양 조건 (F medium, FGM, Step II (DMEM/F12 + N2 supplement), Step III(DMEM/F12 + N2 supplement + bFGF + laminin), Step II priming + Step III, MSC neural medium)에서 성장시킨 후 신경전구세포의 marker인 nestin, bIII tubulin 등으로 형광 염색하여 nestin 발현율을 비교하였다.

## 나. 연구 결과

Serum과 성장인자가 없는 조건인 Step II로 미리 priming시킨 경우 Step III 배양으로 약 80% 이상의 세포가 nestin를 강하게 발현한 것을 확인하였다(그림 3-) 이전의 Canada F Miller 그룹의 방법(3개월의 spheroid culture, very low incidence)보다 훨씬 진보한 효율적인 신경전구세포 유도 방법인 two step neural induction protocol를 개발하였다. Step III 배양 4일후에 spheroid을 유도 할 수 있었고 확장 배양 할 수 있었다. spheroid 유도 및 nestin 발현 증가는 step III medium의 bFGF에 기인함을 규명하였다.

신경으로의 분화를 유도하기 위해 forskolin, retinoic acid, NGF, buffalin, PA6 feeder, 좌골신경에서 분리한 Schwann cells와 공동 배양 연구 등이 진행 중이다.

진피에서 유래한 Nestin 발현하는 spheroid의 특성 분석결과 neural crest stem cell 표식자인 p75를 발현하였고 그러나 인체 피부조직의 frozen 조직의 조직염색에서는 nestin 발현세포를 거의 확인 할 수 없어서 nestin 발현 spheroid 세포군은 인체 내의 잔류 줄기세포가 in vitro 배양 조건에서 선택적인 확장 혹은 induction에 의한 것으로 평가하였다.

## 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제 1 절 최종 목표 및 연차별 목표

#### 1. 최종목표:

재생의학 기술을 이용한 방사선 피폭 환자 치료용 손상 조직 회복 기술 개발

- 조혈 줄기세포 및 간충직 세포를 이용한 방사선 손상회복 세포치료기술개발
- 위장관계 줄기세포 동정 및 서방형 성장인자 전달 기술을 이용한 위장관계 손상 회복 기술 개발
- 성체 줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 피폭 환자 치료 기술 개발

#### 2. 연차별 목표

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	과제평가시 평가기준	연구비 (천원)
제1차 년도 (2003)	조혈 줄기세포 및 간충직 세포를 이용한 방사선 손상 회복 세포치료 기술 개발	-조혈줄기세포의 최적 확장 기술 개발 -조혈 줄기세포 분화 유도 조건 수립; 전리 방사선에 의한 골수세포 분화 단계별 파괴 역학 규명(위탁) -이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면역관용유도 물질 개발	-조혈줄기세포 최적 확장 조건 수립(현재 자가골수 이식술의 2배 이상 효율 증진)	225,700
	서방형 성장인자 전달 기술을 이용한 위장관계 손상 회복 기술 개발	-위장관 줄기세포의 동정 및 최적 배양 조건 수립 -위장관계 조직 재생의 최적 성장인자 병합 조건 수립, 서방형 담체 개발	-위장관 줄기세포 동정 -위장관계 조직 재생의 최적 성장인자 선정 및 서방형 담체 제조 기술 개발	
	성체 줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 피폭 환자 치료 기술 개발	-성체 조직에서 교차 분화 가능한 잔여 줄기세포 탐색 -조직 특이적 분화 유도 조건 수립 (신경 및 기타 표피조직)	-교차 분화 유도 미세환경 조건 및 분화 표식자에 의한 분화 유도 정도 평가	

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	과제평가시 평가기준	연구비 (천원)
제2차 년도 (2004)	조혈 줄기세포 및 간충 직 세포를 이용한 방사 선 손상 회복 세포치료 기술 개발	-훈련된 MSC의 HSC 생착률 증진 효과 분 석 -골수 기질세포, 조혈 줄기세포의 생착률 증진 효과 분석: 골수재생과정에서의 기질 세포의 역할 및 방사선 조사에 의한 기질 세포 기능 변화 분석(위탁) -이형조직항원 및 Fas 유전자 이식으로 면 역관용유도 물질 개발	-간충직 세포 및 기질세포의 조 혈줄기세포의 생착률 증진 기술 의 <i>in vivo</i> 효과 평가 -MSC의 세포훈련 기술 수립 -면역관용유도 물질 개발	243,000
	서방형 성장인자 전달 기술 개발을 이용한 위 장관계 손상 회복 기술 개발	-조직 재생 유도형 지지체 제조를 위한 nanopattern 및 gene activated matrix (GAM) 물질 개발 -서방형 성장 인자의 위장관계 손상 회복 효과의 <i>in vivo</i> 평가 (방사선 조사 실험동 물 대상)	-위장관계 줄기 세포 동정 및 배 양조건 수립 -Nanopattern 위의 ECM 성분의 선택적 코팅법 개발 -GAM 제조를 위한 지지체 개발 -서방형 성장 인자의 위장관계 손상 회복 효과의 <i>in vivo</i> 평가	
	성체 줄기세포의 교차 분화를 통한 방사선 피 폭 환자 치료 기술 개발	-교차 분화 신경계 세포의 기능 분석 및 <i>in vivo</i> 세포 치료 효능 평가 -교차 분화 기타 표피 조직의 <i>in vivo</i> 세포 치료 효과 분석 및 이식술 확립	-교차분화 신경계, 기타 표피 조 직의 세포의 세포치료 효능 평가 및 이식술 확립	

## 제 2 절 관련 분야에의 기여도

방사선 피폭의 주 표적 기관인 골수 및 골수 기질, 위장관계에 대해 방사선에 의한 조직 손상 정도를 단계별, 방사선 피폭 후 시간대별로 분석하여 조직 손상 정도 및 범위를 분석하여 이를 기반으로 손상 치료기술을 개발하므로, 방사선 손상에 특이적인 환경에서의 조직 손상 회복기술을 개발 할 수 있게 되었다. 본 연

구에서 방사선 조사의 주 표적 기관으로 선택한 골수, 위장관계, 신경계 조직의 경우 방사선 피폭에 가장 민감한 세포가 조직의 줄기세포임이 본연구진 뿐만 아니라 여러 연구진에 의해 이미 입증되었으므로 줄기세포를 이용한 세포치료기술의 개발이 방사선 피폭 환자 치료에 가장 중요한 핵심 기술이 됨을 규명하였다.

골수 조혈모세포의 생착 및 골수 내의 repopulation 과정에 골수 기질세포인 증배엽 줄기세포의 역할의 증대성을 규명하였다. 증배엽 줄기세포를 공동 투여하므로 골수 손상의 회복이 촉진되는 연구 결과는 방사선 피폭 및 방사선을 이용한 암 치료의 부작용 치료 등에 근간 기술로서 적용될 수 있을 것이다.

방사선 손상 및 기타 조직 손상에서 형성되는 손상 미세 환경을 분석하여 증배엽 줄기세포를 가동화시켜 손상 부위로 homing되게 하는 substance-p의 역할을 규명하여 이를 특허 출원하였고 이는 방사선에 의한 여러 피부 조직의 손상뿐만 아니라 허혈성 조직 손상 즉 허혈성 심장질환, 뇌질환 등에도 적용될 수 있는 기술로서 관련 분야의 기술 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

인체 피부 조직의 세포를 장기간 spheroid로 배양하므로 신경 전구세포를 유도하는 기술이 2001년에 Nature Cell Biology에 보고 되어 본인의 accessible stem cell로서 피부 조직이 갖는 큰 장점이 부각되었으나 장기간 세포배양에 따른 유전적인 reprogramming의 가능성 등이 제시되었으나, 본 연구에서는 12일 만에 80% 이상을 신경전구세포의 특성을 보유하는 세포로 유도하였으므로, 본 연구의 기술 개발이 상기 기술의 실용화에 기여한바가 크고 특히 방사선 조사에 의한 말초신경 손상 및 중추신경계 손상에 본인의 accessible stem cell로서 교차 분화시켜 임상에 적용할 수 있는 기반을 마련하였다는 점에서 성인 줄기세포를 이용한 신경세포 치료제로 개발 될 것이며 관련 특허가 출원되었고 한 후 이 분야는 세포 응용 연구사업의 신경 전구세포 이용 기술로서 추가 연구가 추진될 것이다

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 과제에서 방사선에 의한 골수 조혈모세포 및 기질세포(중배엽줄기세포)의 방사선 파괴 역학을 규명한 것은 골수 재생에서의 조혈모세포 뿐만 아니라 중배엽 줄기세포가 중요한 역할을 함을 제시하는 결과로서 방사선 피폭 환자 치료 및 방사선 암치료의 부작용, 골수 이식(bone marrow transplantation)등에 적용될 수 있는 중요한 핵심 기술이 될 것이다.
- 중배엽 줄기세포가 중배엽 유래의 여러 조직을 재생시킬 수 있는 다분화 성인 줄기세포임에도 불구하고 본인세포를 채취하는데 상당한 한계점이 있고 말초 혈액에서 회수 빈도가 아주 낮아 중배엽줄기세포의 세포치료제로 활용하는데 제한이 되었으나 본 과제에서 규명한 손상조직에서 유리되는 substance-p가 골수의 중배엽 줄기세포를 혈중으로 가동화시켜 손상 회복을 촉진시켜줌을 확인하였다(특허 출원 완료). substance-p를 본 연구에서 수립한 방사선 유발 위장관계 손상 동물 모델에 적용하여 방사선 유발 위장관 점막 손상 치료에 유효성을 평가하고 나아가 다양한 장관계 궤양 치료에도 적용할 수 있도록 치료제로 개발할 계획이다. 특히 peptide 제제가 위장관계의 효소에 취약하므로 본 연구과제에서 기술 개발한 encapsulation을 통한 controlled release 방법을 적용할 계획이다
- 인체 피부 조직에서 신경 전구세포로 분화 유도시키는 기술을 개발하였고, 이는 본인의 신경 전구세포가 대부분 뇌 깊숙이 존재하고 있어 inaccessible stem cell로 활용이 어려우나 skin biopsy가 쉽고 상당량의 신경 전구세포(80% 이상)를 확보하는 기술로 본 과제에서 발전시켰으므로 accessible 신경 전구세포로서 신경계 및 척추 질환에도 활용될 수 있는 중요한 기술로서 세포치료제로서의 in vivo 효능 검토 후 신경 치료세포치료제로 개발할 것이다(특허 출원 완료)
- 세포혼련 기술은 현재의 세포 치료 기술 및 조직공학 분야 기술의 기술적 한계점을 극복할 기술로서, 이식 세포의 생착률 및 생존률 증진 등 실질적인 치료 기술의 효율 증진에 주요 핵심기술이며 ex vivo 유전자 치료 세포의 생존률 증진에도 적용될 것이다

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

1. Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J. L., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., Miller, F. D.: *Nat Cell Biol.* **3**: 778-84 (2001)
2. Slack, J.: *Nat Cell Biol.* **3**: 205-206 (2001)
3. Bottenstein, J. E. and Harvey, A. L.: (1985) editors, p. 3, Plenum Press: New York and London.
4. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., Thomson, J. A.: *Nat Biotechnol.* **19**: 1129-33 (2001)
5. Tarasenko, Y. I., Yu, Y., Jordan, P. M., Bottenstein, J., Wu, P.: *J. Neurosci Res.* **78**: 625-636 (2004)
6. Eriksson, C., Bjorklund, A., Wictorin, K.: *Exp Neurol.* **184**: 615-635 (2003)
7. Kelly, C. M., Zietlow, R., Dunnett, S. B., Rosser, A. E.: *Cell Transplant.* **12**: 215-223 (2003)
8. Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., McKay, R. D.: *Nat Biotechnol.* **18**: 675-679 (2000)
9. Messam, C. A, Hou, J., Major, E. O.: *Exp Neurol.* **161**: 585-596 (2000)
10. Tohyama, T., Lee, V. M., Rorke, L. B., Marvin, M., McKay, R. D., Trojanowski, J. Q.: *Lab Invest.* **66**: 303-313 (1992)
11. Dahlstrand, J., Lardelli, M., Lendahl, U.: *Dev Brain Res.* **84**: 109-129 (1995)
12. Dupin, E., Real, C., Ledouarin, N.: *An Acad Bras Cienc.* **73**: 533-545 (2001)
13. Bronner-Fraser, M.: *Exp Cell Res.* **218**: 405-417 (1995)
14. Le Douarin, N. M., Dupin, E.: *Curr Opin Genet Dev.* **13**: 529-536 (2003)
15. Kim, J., Lo, L., Dormand, E., Anderson, D. J.: *Neuron.* **38**:17-31 (2003)
16. Rahul S, Amit K, G.M. Whitesides, D.E. Ingber: *Science* **264**: 29 (1994)
17. K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **252**: 1164 (1991)

18. C. S. Chen, M. Mrkshch, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, Science 276: 30 (1997)
19. Lim, M. et al :The ocular surface 1: 53-65 (2003)
20. Lai, X. et al : Peptides 19 : 1209-1212 (1998)
21. Jeffrey, L. et al : PNAS 100 : 2397-2402 (2003)
22. Okamoto, R. et al: Nature Med 8 : 1011-1017 (2002)
23. Orlic, D. et al: Nature 410: 701-705 (2001)
24. Shake, J. G. et al: Ann. Thorac. Surg 73 : 1919-1925 (2002)
25. De Ugarte, D. A. et al : Cell Tissue Organs 174 : 101-109 (2003)
26. Mizuno, H: J. Nippon Med. Sch 70: 428-431 (2003)
27. Zuk, P. et al: Mol. Biol. Cell 13 : 4279-4295 (2000)
28. Ye, J. et al : Eye : 1-5 (2004)
29. Miller, A. et al : Neurosci. Lett 23 : 243-249 (1981)
30. Araki, K. et al : Curr Eye Res 13 : 203-211 (1994)
31. Nakamura, M. et al : Diabetologia 46 : 839-842 (2003)
32. Nakamura, M. et al : Exp. Eye. Res 65: 321-329 (1997)
33. Watanabe, M. et al : Jpn J Ophthalmol 46 : 616-620 (2000)
34. Kim, J. C. et al :Exp. Eye Res 70 : 329-337 (2000)
35. Baddoo, M. et al : J. Cell. Biochem 89 : 1235 -1249 (2003)
36. Philip, E. et al : Blood 81 : 1205-1213 (1993)
37. Lafleur, M. A. et al : FEBS lett 553 : 457-463 (2003)
38. Toth, M. et al : Biochem. Biophys. Res. Commun 308 : 386-395 (2003)
39. Gradl, D. et al : Mol. Cell. Biol 19 : 5576-5587 (1999)
40. Boer, J. D. et al : Tissue eng.10 : 393-401 (2004)
41. Reya, T. et al. : Nature 423 : 409-414 (2003)
42. Rombous, W. J. C.and Ploemacher, P. E : Nature 17 : 160-170 (2003)
43. Rameshwar, P. : Clin. Immunol. Immunopathol 85 : 129-133 (1997)