

2006년 2월  
석사학위논문

망막색소상피변성 환자에서  
줄기세포 이식

조선대학교 대학원  
의학과  
조형훈



# 망막색소상피변성 환자에서 줄기세포 이식

Stem Cell Transplantation in Retinitis Pigmentosa Patient

2006년 2월

조선대학교 대학원  
의학과  
조형훈

망막색소상피변성 환자에서  
줄기세포 이식

지도교수 최 광 주

이 논문을 의학 석사 학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

조 형 훈

# 조형훈의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 지 남 철 

위원 조선대학교 교수 최 광 주 

위원 조선대학교 교수 양 남 응 

2005년 12월

조선대학교 대학원

# 목차

표 목 차 -----	ii
도 목 차 -----	iii
Abstract -----	1
서 론 -----	2
연구대상 및 방법 -----	3
결 과 -----	4
고 찰 -----	5
참고문헌 -----	7

## 표목차

Table 1. Preoperative and final visual acuity.-----10

## 도목차

Figure 1. Fundus photographs of Case 1 and Case 3.-----11

Figure 2. The scotopic, photopic, and 30Hz flicker responses.

-----12

Figure 3. Preoperative and postoperative fundus photographs of Case 3.-----13

# Abstract

Stem cell transplantation in retinitis pigmentosa patients

Hyung Hun Cho

Advisor : Gwang Ju Choi, M.D., Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Purpose : This study was to evaluate the effect of stem cell transplantation into the sub-retinal space in retinitis pigmentosa(RP) patients for improving their visual acuity. RP is a progressive hereditary disease that leads to the blindness, and there is no reliable treatment for recover the disease until now.

Subject and Method : The author transplanted mesenchymal stem cell extracted from umbilical cord blood into the sub-retina of four RP patients recommended by Korea RP association, and checked the changes of their visual acuity and electroretinograms.

Result : There was no obvious improvement in their visual acuity and elecroretinograms compared with preoperative state. Two patients, however, experienced slight improvements of their color sense and peripheral visual fields, and slight decrease of photophobia. Although there were no any obvious complications in relation to the stem cell transplantation, surgical procedures developed complications such as vitreous hemorrhage and retinal detachment.

Conclusion : Mesenchymal stem cell derived from umbilical cord blood could not improve visual acuity and electroretinogram of RP patients.

## 서 론

망막색소상피변성(색소변성)은 1855년과 1857년 Donder에 의해 안저 소견이 처음으로 기술되었고 유전적으로 진행성의 막대와 원추 광수용체의 변성을 보이는 질환으로 알려져 있다.<sup>1-3</sup> 조직학적으로도 광수용체와 색소상피의 점진적인 변성을 일으키는 것이 확인된다. 대부분의 경우 질환의 초기부터 야맹과 주변시야의 감소를 주로 호소하나, 중심시력은 잘 보존되다가 말기에 시력이 감퇴된다.<sup>4</sup> 색소변성에서 나타나는 전형적인 안저 소견은 망막동맥의 전반적인 협착, 주변부 망막의 골소체 모양의 색소침착과 시신경유두의 창백 등이다.<sup>1-3,5</sup> 망막전위도는 이 질환의 진단에 객관적이면서도 필수적인 자료로서 질환의 초기부터 감소된 반응을 보여 안저가 정상적인 모습을 보인 초기 단계에서도 진단이 가능한 중요검사이다.<sup>1</sup> 중심주위성 색소변성은 비교적 드문 질환으로 황반은 침범하지 않는 상태로 황반 주위에 색소침착과 함께 고리모양의 맥락막 변성이 나타나며 망막주변부의 유두부 및 혈관은 정상으로 보이는 질환이다. 또한 명순응 및 암순응 망막전위도의 소견은 정상이 하이다.<sup>6</sup>

유전적 진행성 질환인 색소변성의 치료는 유전자를 이용한 근본적인 유전자결합의 해결을 시도하는 치료가 가장 합당하다고 생각되지만, 이러한 유전자적인 치료는 지금까지도 동물실험의 단계에 있으며 또한 색소변성의 표현형과 관련된 많은 유전적 이종성 때문에 모든 색소변성환자에 적용할 수 있기까지는 다양한 유전자적 결합의 각각을 해결하는 연구가 이루어져야 한다.<sup>7</sup> 다음으로 시도되고 있는 방법은 근본적인 유전자결합의 해결은 아니지만 병의 진행을 서서히 유도시키려는 시도이다. 신경방어기전을 유도하려는 시도로 비타민 A, 칼슘 등이 사용되고 있다.<sup>8</sup> 이러한 신경방어물질을 이용한 치료로도 병의 진행을 근본적으로 막을 수 없고 종국에는 중심시력의 상실이 초래되는 것을 피할 수 없다.

줄기세포는 미분화된 세포로 특수한 장기나 조직에 존재하면서 조직의 기능이 다할 때까지 스스로 분화되어 새로운 세포로 존재하면서 각각의 조직이나 장기에 필요한 특수세포로 분화되는 능력을 가지고 있다.<sup>9</sup> 그리고 다양한 세포로의 다분화 능력을 지녀 손상된 조직의 복구와 유지에 관여 한다. 이번 연구에서는 아직까지는 그 유효성 및 안정성에 대해 확실히 입증되지는 않았지만 색소변성에서의 광수용체세포로의 분화가 가능하여 시세포의 기능을 회복시키고 시력 개선을 유도할 수도 있는지를 조사하여 보고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

2004년 12월부터 2005년 1월까지 한국RP(Retinitis Pigmentosa)협회로부터 추천된 망막색소변성 환자 4명에 대하여 시력, 안저 및 망막전위도를 검사 그리고 형광안저혈관조영을 시행하고 이 결과를 참고하여 색소변성으로 진단하였다(Fig. 1). 이들 4명 4안을 대상으로 인체제대혈줄기세포를 망막 하에 주입하는 시술을 시행하기 위한 응급임상시험 허가서를 한국 식약청으로부터 발급받아 2005년 4월 29일과 동년 6월 1일에 각각 2명씩 줄기세포이식을 시행하였다. 시술에 사용한 줄기세포는 Medipost(Research Institute of Biotechnology Medipost Co, Seoul, Republic of Korea) 연구소에서 채취 및 배양되어 무균 시험과 이식 적합성을 통과한 인체 제대혈 간엽줄기세포를 제공받아  $2 \times 10^6/\text{ml}$ 로 재 부유시킨 후 망막 하에 0.5ml씩 주입하였다.

시술은 국소 마취하에 통상적인 유리체절제와 뒤유리체박리를 시행한 후 Thomas sub-retinal cannula (33 gauge)를 이용하여 망막 하로 평형염액을 주입시켜 인위적인 망막박리를 유도하였다. 줄기세포를 주입할 수 있는 공간 확보를 위하여 0.5ml의 평형염액을 다시 망막 하에서 제거한 후 26 gauge 주사침을 통하여 줄기세포를 망막 하에 서서히 주입시켰다. 줄기세포가 유착한 후 망막의 재 유착을 돋기 위한 액체-공기 치환을 시행하여 2-3ml의 공기를 유리체강 내에 남기고 시술을 마감하였다. 수술 후 자세는 24시간의 양와위와 이후 3일간의 복와위를 유지하였다. 추적관찰은 수술 후 1주, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월째 시행하면서 시력, 안저, 그리고 망막전위도의 변화를 중심으로 관찰하였다.

시력은 진용한식 시력표를 기준으로 하였고 수술 후 최대 교정시력이 나아지면 시력개선, 나빠지면 악화, 나머지를 무변화로 정의하고, 악화와 무변화를 시력 개선이 없는 것으로 판단하였다.

## 결 과

색소 변성환자에 있어 제대혈 줄기세포 이식으로 시력은 개선되지 않았다(Table 1). 망막의 시세포 기능을 객관적으로 판단 할 수 있는 망막전위도 검사에서도 개선된 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 그러나 환자들이 느끼는 주관적인 소견의 변화로 중례 1과 중례 3에서 색감 감지능력, 주변 시야의 미세한 회복 그리고 야간에 눈부심 현상이 줄어들었다는 소감을 나타냈다. 이러한 주관적인 변화를 객관적으로 분명히 증명할 수는 없으나, 시술 전 후의 안저 사진 상 망막색소의 탈색이 감소한 미세한 변화가 관찰된다(Fig. 3).

수술 합병증으로 줄기세포와 관련된 합병증인 거부반응이나 감염이나 염증 반응은 없었다. 그러나 수술과 관련된 합병증으로 1 안에서 유리체 출혈이 발생하였고 2 주 내에 자연 흡수되었으며, 2례에서 망막박리가 발생하여 액체 공기치환술과 실리콘기름의 삽입으로 망막은 재유착 되었다.

## 고 찰

망막색소상피변성(색소변성)은 망막변성을 일으키는 질환 중 가장 대표적 질환으로 유전성 경향을 보인다. 기본적인 병변은 광수용체세포의 변성으로 이로 인하여 질환의 초기에 야맹과 시야장애를 일으키고 망막전위도가 감소하는 반응을 보이다 질환이 진행하면 색각이상과 중심시력까지도 상실되고 망막전위도가 소실되는 질환이다. 이러한 유전적 성향을 띠면서 시력까지 상실시키는 질환에 대한 치료는 현재까지도 효과적인 방법이 없다.<sup>10,11</sup> 유전성 질환이기 때문에 유전자적인 결함을 해결하는 유전자 치료가 이 질환을 극복해내는 가장 이상적인 치료법이다. 그러나 색소변성에서 보여주고 있는 다양한 유전자적 이종성으로 한 가지 방법의 유전자 치료가 완성된다고 하더라도 다양한 형태로 나타나는 색소변성환자를 각각에 적용하는 것은 가능하지 않다. 때문에 색소변성에서 나타난 다양한 유전자결함을 밝혀내는 단계를 거쳐 실제적으로 환자들에게 적용 가능한 각각의 치료법이 나오기 까지는 많은 시간이 필요하다.

유전자 치료 다음으로 세포치료가 시도되고 있다. 색소변성의 주 병변인 광수용체의 변성을 대체할 세포를 이식하여 변성된 광수용체세포기능을 회복시키려는 방안으로 신경망막세포와 줄기세포의 이식이 시도되고 있다. Das 등<sup>12</sup>은 본인들이 연구하였던 동물실험을 토대로 하여 14주에서 18주 사이의 태아에서 얻은 신경망막세포를 진행된 색소변성환자에 이식하여 특별한 부작용 없이 안전하게 이식을 성공적으로 하였다고 하였으며, Kaplan 등<sup>13</sup>은 어른의 광수용체를 색소변성환자에 이식을 시도한 바 있다. 그러나 Das 등의 연구에서는 이식한 태아신경망막세포가 광수용체로 생존하여 기능을 하는지에 대한 증거가 없고, Kaplan 등의 연구에서는 이식에 따른 거부반응이 발생하여 광수용체가 장기적으로 생존할 수 없었다.

줄기세포는 모든 조직의 근간이 되는 세포로 반복하여 자가 분화, 자가 재생산이 가능한 세포로 다양한 분화 능력을 지녀 특정한 세포로 분화가 가능하여 손상된 조직의 복구와 유지를 시킨다고 알려져 있다.<sup>14</sup> 이러한 줄기세포나 신경 전구를 질을 이식하여 색소변성에서 광수용체의 변성을 극복해보려는 시도가 있었고 동물 실험연구를 통하여 실제적으로 줄기세포가 광수용체세포로의 분화되고 신경연합을 이루었었다.<sup>15-17</sup> 이러한 실험적 연구에서 줄기세포의 주입을 유리체강 내로 시행하여 줄기세포가 실제적인 병소인 망막 하로 이동하여 분화하였는지에 대해선 의문점으로 남는다.<sup>18</sup>

줄기세포는 배아 줄기세포와 성체 줄기세포로 나누어진다. 본 연구에서는 제대혈에서 추출한 성체간엽줄기세포를 이용하였다. 이 세포는 골수에서 유래된 줄기세포

와 비슷한 다양한 분화력을 갖고 있어 중배엽 기원의 세포뿐만 아니라 외배엽 기원의 신경세포로 즉 색소변성에 필요한 광수용체세포로의 분화 잠재력을 갖는다.<sup>19,20</sup> 본 연구에서는 유리체강 내로의 이식을 피하기 위하여 색소상피변성에서 필요한 장소인 망막 하로 주입을 시행하였고 신경세포로의 분화가 가능하다고 판단된 제대혈줄기세포를 사용하였다. 시술을 시행하여 줄기세포와 관련된 합병증은 없었으나 수술과정에서 발생한 망막박리가 재유착되지 못했던 경우도 발생하여 앞으로 보완되어야 할 부분이었다.

또한 일반적으로 성체줄기이식을 시행할 때 동종이식일지라도 처음부터 고려의 대상인 면역억제제의 사용은 본 연구에서는 고려하지 않았다. 이는 망막이 면역특권지역이면서 사용된 제대혈줄기세포 또한 면역성이 낮다는 점 때문이었다.<sup>21,22</sup> 제대혈 줄기세포는 생체 동종 이식 시 면역조절과 림프구의 증식을 억제하는 면역억제 기능을 갖는다. 특히 간엽 줄기세포의 면역 조절 능력은 배아 줄기세포의 동종 이식에서 흔하게 나타날 수 있는 이형성이나 거부반응을 피할 수 있게 한다.<sup>23,24</sup> 간엽 줄기세포는 초기 동종 이식 반응 시에는 억제력이 있어 세포 독성 T 림프구나 동종 반응의 자연 살해세포의 인식을 피하고 분해 물질을 분비하여 세포독성 T 림프구의 형성을 방해한다. 하지만 이미 형성된 세포독성 T 림프구나 자연살해 세포분해를 분해시키지는 못한다.<sup>25</sup> 또한 HLA class I을 발현하고, INF- $\gamma$  유도하에 HLA class II를 발현한다.<sup>26,27</sup> 이런 간엽 줄기세포의 면역 억제작용은 이론적으로 이식편대 숙주병의 유병률과 심각성을 줄이므로 동종 줄기세포 이식술에 있어 상당한 임상적 의미를 부여한다고 할 수 있다.<sup>28</sup>

결론적으로 본 연구에서는 색소상피변성 환자의 치료를 위하여 시행된 제대혈 줄기세포 이식으로 시력 개선이나 망막 전위도 검사상의 호전은 없었다. 그러나 현재까지 적절한 치료법이 없는 상황에서 색소상피변성 환자에 새로운 치료법의 일환으로 줄기세포를 이용한 치료 시도란 점에서 상당한 의미가 있다. 앞으로 좀더 변성된 광수용체를 대신할 적절한 줄기세포의 선택과 개선된 시술방법을 이용한 많은 연구와 노력이 필요하리라 본다.

## 참고문헌

1. Carr RE, Noble KG. Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology* 1981;88:169-72.
2. Stephen J Ryan: *Retina*. ST. Louis, Baltimore, Toronto. The C.V. Mosby Company, 1989;299-413.
3. Heckenlively: *Retinitis Pigmentosa*, Philadelphia, L.B Lippincott Company, John R. Heckenlively.
4. Frank MH, Sayegh MH. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41.
5. Kenneth G Noble, Ronald E Carr. Peripapillary Pigmentary Retinal Degeneration. *Am J Ophthalmol* 1978;86:65-75.
6. Traboulsi EI, O'Neill JF, Maumenee IH. Autosomal recessive pericentral pigmentary retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1988;106:551-6.
7. Delyfer MN, Leveillard T, Mohand-Said S, et al. Inherited retinal degenerations : therapeutic prospects. *Biology of the Cell* 2004;96:261-9.
8. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, et al. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1993;111:761-72.
9. Klassen H, Sakaguchi DS, Young MJ. Stem cells and retinal repair. *Progress in retinal and eye research* 2004;23:149-81.
10. Sharma RK, Ehinger B. Management of hereditary retinal degenerations: present status and future directions. *Surv Ophthalmol* 1999;43:427-44.
11. Lund RD, Kwan ASL, Keegan DJ, et al. Cell transplantation as a treatment

- for retinal disease. *Prog Ret Eye Res* 2001;20:415-49.
12. Das T, del Cerro M, Jalali S, et al. The transplantation of human fetal neuroretinal cells in advanced retinitis pigmentosa patients: results of a long-term safety study. *Exp Neurol* 1999;157:58-68.
  13. Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, et al. Human photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa. A safety study. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1168-72.
  14. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64:278-94.
  15. Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, et al. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1998;12:340-8.
  16. Young MJ, Ray J, Whiteley SJ, et al. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2000;16:197-205.
  17. Ahmad I. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *IOVS* 2001;42:2743-8.
  18. Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, et al. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;268:842-6.
  19. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-20.
  20. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and

umbilical cord blood. J Neurosci Res 2002;69:880–93

21. Jiang LQ, Strelein JW. Immunity and immune privilege elicited by auto-antigens expressed on syngeneic neonatal retina grafts. Curr Eye Res 1992;11:697–709.
22. Jiang LQ, Jorquera M, Strelein JW. Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. Invest Ophthalmol Vis 1993;34:3347–54.
23. Zeller JC, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, et al. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. J Immunol 1999;163:3684–91.
24. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003;198:1875–86.
25. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 2002;99:3838–43.
26. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation 2003;75:389–97.
27. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2003;31:890–6.
28. Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair analysis. Bone Marrow Transplant 2002;29:S2.

Table 1. Preoperative and final visual acuity

		Visual Acuity	
	Age/Sex	Preoperative	Final
Case 1 (OD)	28/M	0.2(0.25)	0.2(0.25)
Case 2 (OS)	46/M	0.05	NLP
Case 3 (OD)	54/M	H.M	H.M
Case 4 (OD)	41/F	LP	LP

OD : right eye

OS : left eye

NLP : no light perception

HM : hand motion

LP : light perception



Case 1



Case 3

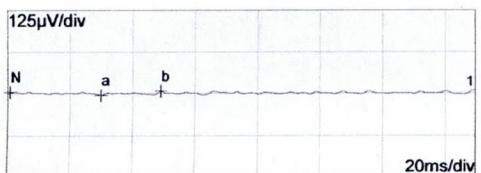
Figure 1. Fundus photographs of Case 1 and Case 3. Both cases have the classical fundus appearance of retinitis pigmentosa such as optic disc pallor, retinal arteriolar attenuation and peripheral retinal pigment epithelial atrophy with bone spicule pigmentation.



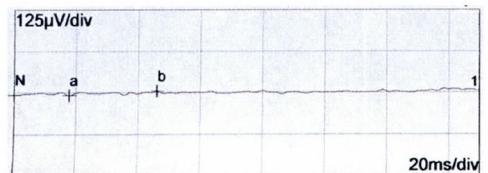
Scotopic



Scotopic



Photopic



Photopic



30Hz flicker

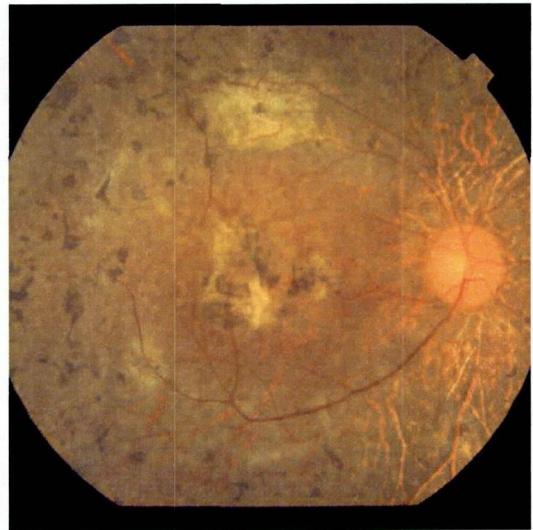


30Hz flicker

Figure 2. The scotopic, photopic, and 30Hz flicker responses. Left side of the figure shows preoperative findings and right side does postoperative ones 6 months later. Rod and cone response are undetectable.



A



B

Figure 3. Preoperative and postoperative fundus photographs of Case 3. A shows preoperative finding and B does postoperative one. The peripheral fundus color of B is more natural than A.