조직 공학을 위한 신생 혈관의 역할

중앙대학교병원 비뇨기과학교실

김명주* · 지병훈* · 조민지 · 황영미 · 장인호

Vascularization Methods for Tissue Engineers

Myeong Joo Kim*, Byung Hoon Chi*, Min Ji Cho, Young Mi Whang, In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Seoul, Korea

Tissue engineering is limited by our inability to adequately vascularize tissues post implantation because all tissue-engineered substitutes (with the exception of cornea and cartilage) require a vascular network to provide the nutrient and oxygen supply needed for their survival. This review gives a brief overview of the processes and factors involved in the vascularization and angiogenesis and summarizes the different strategies to overcome the issue of slow vascularization and angiogenesis in a range of tissue-engineered substitutes. Moreover, we will announce some potential future plans. (Korean J Urol Oncol 2017;15:51-58)

Key Words: Tissue · Engineering · Vascularization

서 론

각막과 연골을 제외하고 모든 조직 공학의 대체 물질은 생체 내 생존에 필요한 영양소와 산소 공급을 위해 혈관 신경망이 필요하다. 인공조직에서 혈관 신생은 자연적으로 발생하기까지 몇 주가 걸릴 수 있으므로, 이 시간 동안 조직은 필수 영양소의 공급의 부족으로 괴사가 발생하게 된다.

Received July 20, 2017, Revised August 3, 2017,

Accepted August 8, 2017

Corresponding Author: In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, 102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea

E-mail: caucih@cau.ac.kr

Tel: +82-2-6299-1785, Fax: +82-2-6294-1406

*These authors contributed equally to this study and should be considered co-first authors.

• This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea (2015R1A1A1A0500110), and (2017R1D1A1B03031514), and the Korea Health Technology R&D Project (HI17C0710).

이 논문에서는 혈관의 형성 과정과 요인에 대한 간략한 개요를 설명하고 다양한 조직 공학 대체물질에서 혈관 신생의 문제를 극복하기 위해 적용하거나 개발된 연구 결과를 요약 설명하고자 한다.

혈관계의 형성

혈관계의 형성은 크게 혈관 형성(vasculogenesis)과 혈관 신생(angiogenesis)으로 분류할 수 있는데 혈관 형성은 우리 몸에서 혈관이 형성되는 과정을 이야기 하는 것이며, 혈관 신생은 혈관이 없던 곳에서 혈관이 새로 생기는 것을 의미한다.

1. 혈관 형성(Vasculogenesis)

첫 번째 모세혈관은 혈관 생성에 의해 발생한다. 처음에는 혈액섬(blood islands)이라고 불리는 세포 집합체가 난황낭에 형성되고 혈액섬에는 혈액 및 혈관의 전구체인 혈관 모세포라고 불리는 군집세포집합이 들어있다. 이 세포가 분화하면 조혈줄기세포(hematopoietic stem cells)와 내피전

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2017 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

구세포(erythropoietic stem cells)의 두 가지 유형이 형성된다.¹ 혈액섬이 병합됨에 따라 혈액섬 중앙에 있는 조혈줄기세포가 혈액세포로 발전하고 혈액섬 주변을 차지하는 내피전구세포가 배아 쪽으로 자라나는 원시모세혈관으로 발전한다.

2. 혈관 신생(Angiogenesis)

초기의 배아조직은 혈관 신생을 통해 성장하고 재형성되어 모세혈관망을 발생시키는데, 이는 발현 혹은 비발현 혈관 신생으로 알려진 2개의 과정을 통해 진행된다. 발현 혈관 신생(sprouting angiogenesis)은 내피세포(endothelial cells, ECs)가 주변 모체를 통해 연장된 기존의 모세 혈관으로부터 새 혈관을 형성하기 위해 뻗어나가는 과정이다. 이 과정은 (1) 기저막의 용해 및 주피세포(pericytes)의 분리, (2) 내피세포의 세포 외 공간으로 이동 및 내피새싹(endothelial sprout)의 형성, (3) 내피세포의 확산, (4) 내피새싹의 내강 형성, (5) 다른 혈관과의 연결, (6) 주피세포 및 기저막의 형성으로 요약할 수 있다.² 비발현 혈관신생(nonsprouting angiogenesis)은 하나의 모세혈관이 2개로 분리되는 과정을 의

미한다. 이 과정은 (1) 혈관 내피벽들 간의 관내기둥(intraluminal pillar)의 형성, (2) 관내기둥 내 내강의 형성, (3) 주피세포 및 근섬유아세포의 이동, (4) 모세혈관의 분리단계로 진행된다.³

3. 분자 메커니즘(Molecular Mechanisms)

혈관 신생을 자극하거나 억제할 수 있는 수많은 내인성 생화학적 인자들이 밝혀져 있는데 이들은 주로 사이토카인과 수용체, 세포외기질성분, 세포-기질 접착 분자 및 기질분해효소로 이루어져 있다(Table 1).

1) 사이토카인과 수용체(Cytokines and Their Receptors)

산성섬유모세포성장인자(acidic fibroblast growth factor)와 염기성섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)는 혈관내피세포에서 기질분해효소의 생성을 유도하고 모세혈관의 형성을 유도하는 혈관내피세포를 주변 기질로 이동시킨다.⁴ FGF는 혈관내피세포뿐만 아니라 섬유아세포 및 혈관주위세포를 포함한 배아중배엽 및 신경외배엽에서 유래된 대부분의 세포에도 작용하며,⁵ 세포외기질에서

Table 1. Summary of biochemical and mechanical factors that regulate

Event	Factor	Description
Angiogenic trigger	Hypoxia	Reduction in O ₂ pressure activates transcription of various angiogenesis related genes
	Shear stress	Evidence shows that increased shear stresses are related to an increased level of capillary formation
Destabilization	VEGF	Leads to increased vessel permeability
	Ang-2	Loosens interaction between ECs and pericytes
	MMPs	Locally breaks down ECM to provide space for migration of cells
Sprouting	VEGF	Leads to EC proliferation and invasion of hypoxic tissue
	Ang-2	Maintains loosened interactions between ECs and pericytes
	FGF	Induce production of MMPs that break down ECM and allows migration of ECs
	MMPs	Break down ECM to provide space for migration of cells and releases stored FGF from ECM
	TGF-β (low concentration)	Stimulates EC proliferation and migration and upregulates MMPs to breakdown ECM
	Integrins	αvβ3 upregulated on ECs by action of bFGF and enhances EC survival as well as localizing degradation proteins to tips of sprouting vessels, helping to increase migration speed and matrix degradation. αvβ5 upregulation induced by VEGF promotes EC migration and invasion
	CTFs	Aid in pulling cells forwards
Anastomosis/stabilization	ECM Modulus	Compliant matrices allow ECs to reorganize ECM through CTF during network formation
	TGF-β (high concentration)	At high doses TGF-β inhibits EC growth and promotes reformation of basement membrane. It also stimulates recruitment of pericytes to stabilize vessels
	PDGF	Causes vessels to stabilize and maintain their vascular integrity
	Ang-1	Promotes recruitment of pericytes to stabilize and maintain vascular integrity

VEGF: vascular endothelial growth factor, Ang-1: angiopoietin-1, Ang-2: angiopoietin-2, EC: endothelial cell, MMP: matrix metalloproteinases, ECM: extracellular matrix, bFGF: basic fibroblast growth factor, CTF: cell traction force, TGF-β: transforming growth factor-β, PDGF: platelet-derived growth factor.

기질이 분해될 때 FGF가 방출된다.⁶

혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 중요한 혈관 형성 자극제로 알려지고 있으며, 효과는 수용체인 혈관내피세포에서 발현되는 수용체인 VEGFR-2에 의해 매개된다. VEGF의 수용체결합은 VEGFR-2 활성화를 일으키며, 다중세포 내 반응을 통하여 혈관이 형성되도록 과정을 유도한다.^{7,8} VEGF는 많은 세포에 의해 생산되며 주요 생산조절인자는 국소적인 산소농도에 의해 조절되는데 산소가 감소된 세포는 VEGF의 생산을 증가시키고, 증가된 VEGF는 혈관내피세포를 증식시키고 저산소조직으로 이동을 자극하여 혈관의 생성을 유발한다.^{9,10}

혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)는 혈소판, 섬유아세포, 혈관내피세포 및 대식세포를 포함하는 세포에 의해 생성된다. PDGF의 효과는 수용체를 통해 다시 매개되는데, PDGF 수용체는 혈관벽의 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 평활근세포에서 발견된다. PDGF와 그 수용체를 통한 신호 전달은 혈관의 성숙에 중요하며 혈관이 안정되고 유지하는데 중요한 역할을 한다.¹¹

형질전환성장인자(transforming growth factor- β , TGF- β)는 증식, 분화, 세포사멸, 염증 및 혈관 형성을 포함한 다양한 형태의 세포 행동에 영향을 주는 다기능 사이토카인이다.^{12,13} 다양한 성격을 가졌기 때문에 TGF- β 와 그 수용체는 다양한 세포에서 발현되며, 세포유형과 세포 외 주변환경에 따라 동일한 세포에서 반대되는 효과를 나타낸다.¹² 특히 TGF- β 의 혈관 신생에 미치는 효과는 농도와 상황에 따라 다르게 나타나는데,¹⁴ 저농도 TGF- β 는 혈관내피세포의 증식과 이동을 자극하며, 국소적으로 세포 외 기질을 분해하는 단백질분해효소의 생산을 통해 혈관 신생을 촉진한다. 그러나 고농도 TGF- β 는 혈관내피세포의 성장을 억제하고 평활근세포의 분화 및 재구성 및 기저막의 안정을 촉진하여 혈관을 안정화하는 역할을 한다.¹⁵

성인의 모든 혈관내피세포에는 Tie-2라는 특정 수용체가 있는데, angiopoietin (Ang-1과 Ang-2)은 Tie-2의 리간드이며 Ang-1과 Ang-2은 혈관 신생에서 서로 상반된 역할을 한다.¹⁵ Ang-1은 Tie-2 수용체를 활성화시키고, 혈관주위세포 및 평활근세포의 결집을 촉진하여 혈관의 안정화를 유도한다. 반면 Ang-2는 Tie-2의 결합에 있어 Ang-1과 경쟁하고 Tie-2의 신호전달에서 혈관내피세포와 혈관주위세포 및 세포 외 기질 사이의 상호작용을 느슨하게 하여 혈관 신생을 촉진한다.

2) 세포 외 기질(Integrins and Matrix Proteases)

세포 외 기질은 세포 성분에 대하여 물리적 지지를 제공할 뿐 아니라 세포 기능을 조절하고 혈관 형성 과정에 영향

을 미친다.¹⁶ 기저막에서 발견되는 기질분자는 혈관 생성을 통해 혈관내피세포가 모세혈관 유사구조를 확립하고 유지하도록 한다.¹⁷ 히알루론산은 고분자 형태로 혈관내피세포의 이동 및 부착을 감소시킴으로써 혈관 신생의 억제에 관여하는데, 히알루론산이 올리고머라 불리는 작은 단편으로 분해되면 혈관내피세포의 증식을 자극하고 혈관 신생을 촉진한다. 히알루론산 올리고머는 혈관내피세포상에 존재하는 수용체 CD44에 결합하는 히알루론산과 경쟁하여 결합 후에 올리고머는 궁극적으로 세포 내 신호전달경로를 통하여 혈관 신생을 촉진한다.¹⁸

세포 외 기질 효과는 인테그린으로 알려진 세포표면 수용체에 세포 외 기질이 부착함으로써 매개되는데 20가지 이상의 인테그린 유형 중 $\alpha\beta3$ 이 혈관 신생에 있어 광범위하게 연구되어 왔다. $\alpha\beta3$ 는 bFGF, tumor necrosis factor- α 및 interleukin-8과 같은 혈관 신생 성장인자의 작용에 의해 혈관내피세포상에서 발현이 증가되고, 혈관내피세포 생존을 증진시켜 혈관 형성을 유발한다.¹⁹ VEGF에 의해 유도된 혈관 신생은 혈관내피세포의 이동을 촉진하는 또 다른 인테그린인 $\alpha\beta5$ 에 의존한다.¹⁹

혈관 신생이 발생할 때, 국소적 세포 외 기질은 matrix metalloproteinases (MMPs)에 의해 감소되며, 이때 세포 외 기질에 저장된 혈관 신생 성장인자가 방출된다. MMPs의 효과를 조절하기 위하여 세포에서는 단백질분해효소 억제 물질을 분비한다.^{20,21}

조직 공학에서 혈관 신생의 중요성

혈관 신생은 혈관의 성장 및 성숙으로 구성되는데, 시간 순으로 정확하게 이루어지며 많은 요소에 의해 제어된다. 재생조직 대체물 내에서 혈관 신생을 유도하기 위해 이러한 과정이 동일하게 반복적으로 일어나야 하는데, 이러한 과정의 복잡성은 현재 조직 공학 분야의 주요 장애물 중 하나이다.²² 이것을 극복하기 위해, 혈관 신생의 기본원리를 분석하여 생리학적으로 구조물 형성에 사용하기 적합한 재생조직 구조물을 생산하는 것이 중요하며, 현재까지 방광, 간, 심장과 피부의 조직에서 이러한 연구가 활발히 진행되고 있다(Table 2).

1. 혈관 신생 시스템(Prevascularization Systems)

이식을 할 때 기존 조직과의 연결을 가속화하기 위해 기능적 모세혈관을 기반으로 한 재생조직 구조물을 생산하는 것을 목표로 한다.

Table 2. Summary of current tissue-engineering approaches and methods that attempt to overcome neovascularization problem

Tissue	Approaches to overcome neovascularization issues	Vascular cells	Perfusion	Vascular architecture	Current status
Bladder	Prevascularization systems	Y	Y	Y	Omentum: patients
	Scaffold functionalization: applying growth factors	N	N	N	Animals
Liver	Harnessing natural vascular architectures	Y	Y	Y	Animals
	Production of synthetic vascular architectures	N	Y	Y	Laboratory
	Harnessing natural vascular architectures	Y	Y	Y	Animals
	Scaffold functionalization: applying growth factors	N	N	N	Animals
Myocardium	Integrating cellular components	Y	N	N	Animals
	Prevascularization systems	Y	Y	Y	Omentum: animals
	Production of synthetic vascular architectures	N	N	Y	Vascular bed/bioreactor: laboratory
	Harnessing natural vascular architectures	Y	Y	Y	Animals
Skin	Scaffold functionalization: applying growth factors	N	N	N	Laboratory
	Integrating cellular components	Y	N	N	Animals
	Prevascularization systems	Y	Y	Y	EPCs: animals
					ADMSCs: patients
					Animals

EPC: Endothelial progenitor cell, AD-MS: adipose-derived mesenchymal stem cell.

1) 생체 외 혈관 형성(*In Vitro* Prevascularization)

구조물을 이식했을 때 기존의 혈관계와 연결될 수 있는 예비혈관을 포함한 구조물을 생산하기 위한 목적으로 생체 외에서 배양된다. Sekine 등²³은 심장조직의 재구성을 위해 혈관계와 체외배양(bioreactor) 시스템을 이용하여 체외에서 심근세포 구조를 배양하려는 시도를 하였다. 이 구조물은 우선 동맥과 정맥을 포함하는 조직을 절제하고 혈관층을 확립하기 위해 관류형 체외배양기에 연결했다. 이어서 혈관내피세포의 공동 배양을 이용하여 제작한 3층의 심장세포층을 혈관 바닥에 겹쳐놓았다. 혈관내피세포는 관의 내강을 형성하는 혈관층의 모세혈관에 연결되고 세포층 내에서 혈관을 생성하는 것으로 나타났다. 이 방법은 세포 시트를 쌓아서 더 두꺼운 구조물을 개발할 가능성을 시사한다.²⁴

2) 생체 내 혈관 형성(*In Vivo* Prevascularization)

생체 내에서 구조물을 혈관화하기 위해 기존의 고유한 혈관계를 사용하는 방법으로 자가조직공학 방광조직은 이식할 조직을 혈관화하기 위해 기존 조직의 omentum을 이용한다.²⁵ 환자 생검에서 얻은 요로상피세포와 평활근세포는 체외에서 배양하고, 콜라겐으로 만들어진 생체적합성 물질 또는 콜라겐과 폴리펩타이드 복합체의 합성물에 주입한다. 이식 시 omentum을 사용한 군과 사용하지 않은 군을 비교

하였을 때, omentum을 사용한 군에서 혈관의 생성이 촉진되고 이식된 세포를 유지하면서 방광 기능이 향상된 것을 볼 수 있었다.²⁵ 전반적으로, 이 방법은 방광 성형을 필요로 하는 환자에게 사용될 수 있지만, 이 기술을 널리 사용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

해부학적 위치로 인해 조직 재생 구조물을 감싸는 것이 어려운 경우, 필요한 부분에 이식하기 전에 omentum에서 우선적으로 알맞게 혈관의 구조가 형성되는 2단계 접근법이 제안되었다. Dvir 등²⁶은 신생아 심장세포를 혈관 신생 인자와 혼합하여 알지네이트 구조물에 주입 후, 심근경색증을 앓은 쥐의 심장에 이식하기 전 7일 동안 omentum에서 배양 후 이식하였을 때, 이식 후 28일째 구조물과 omentum은 구조적 통합을 보였다. 이 방법은 2단계 절차가 필요한 문제가 있어 이를 보완할 수 있는 추가적인 연구가 필요하다. 또한, omentum의 대안으로 arteriovenous (AV) loop의 사용이 연구되었다. 이들은 자가정맥이나 합성물 등을 사용하여 동맥과 정맥을 연결하고, 이것은 재생 조직 대체물을 수용하는 공간 내부에 위치하여 혈관화되었다. Tanaka 등²⁷은 인공피부 진피층을 혈관화하기 위해 쥐 내의 AV loop를 사용하였는데, AV loop 내에서 혈관 신생이 유도됨을 보고하였다.²⁸

3) 지지체 기능화: 성장인자 적용(Scaffold Functionalization: Applying Growth Factors)

성장인자는 혈관 신생을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있으며 거의 대부분의 재생 조직 대체물에서 혈관 신생을 유도하는 일반적인 방법으로 성장인자를 이용하고 있다. 방광 재생의 경우 혈관 신생 및 세포 증식을 촉진하는 VEGF,²⁹ bFGF,³⁰ PDGF 및 VEGF 등 성장인자 조합들의 통합인 'smart patch'가 연구되고 있다.³¹ VEGF의 단독 사용은 혈관 신생의 증가 및 간세포 생존의 증가를 보였지만, 혈관 신생 성장인자의 불안정성으로 인해 장기간 효과가 유지되지 않았다.³² 따라서 이것을 극복하는 방법으로 지지체에서 VEGF 및 PDGF를 분비하고 제어하는 새로운 생체재료를 사용하는 방법이 제시되었다.³³ 또한 간조직의 단층을 이식하기 전 bFGF 방출장치의 사전이식은 문맥을 통한 간세포의 주입에 비하여 세포의 부착 및 기능이 향상됨을 알 수 있었다.³⁴ 다음과 같은 지지체 기능화로 인한 혈관 신생의 증가 및 이식 후 혈관의 형성과 성장의 증가는 동물모델에서 확인할 수 있었지만, 이 구조물은 비교적 작은 형태이며 좀더 큰 구조물에서 추가적인 연구가 필요한 상황이다.

최근 중요한 성장인자의 발현을 증가시키기 위하여 세포의 유전자 변형을 포함한 다양한 방법이 연구되고 있는데, Supp 등³⁵은 VEGF를 발현시키기 위해 복제 능력이 없는 레트로 바이러스를 형질 도입하여 유전자를 변형한 human keratinocytes genetically modified (GM)을 이용한 연구를 수행하고 있다. Human fibroblasts와 GM keratinocytes에서 배양된 콜라겐-글리코사미노글리칸 기질로 이루어진 피부 대체물을 누드 마우스의 상처에 이식하였을 때, 대조군에 비해 진피 혈관의 수가 증가하고 혈관 신생에 걸리는 시간이 단축되었다.³⁵ 이것은 혈관 신생을 개선하는 방법이지만 게놈에 바이러스가 무작위로 삽입될 위험이 있어 GM 세포를 임상 용도로 승인하는 것은 추가적인 연구가 필요하다.³⁶

4) 자연 혈관 생성 이용(Harnessing Natural Vascular Architectures)

생리학적 구조를 재사용을 위하여 포유류의 세포를 탈세포화하여 자연적으로 유래된 미세혈관 네트워크의 3D 구조를 획득할 수 있고, 적절한 일차세포를 주입하여 재세포화를 유도하며 관류가 가능한 구조물을 생산하는데 이용할 수 있다.³⁷ 탈세포화 처리의 장점은 앞서 설명한 것처럼 혈관 신생 과정을 보조할 수 있는 자연적 세포 외 기질을 유지한다는 것으로 재생 조직으로 방광구조를 생산하기 위해 이용되었다.³⁸ 또한 돼지 소장절편을 탈세포화하여 무세포 기질을 생성시킨 다음 혈관내피세포 및 조직세포를 사용하여 구조물을 제작하고 이를 돼지에 이식하였을 때 좋은 재

관류를 보였다.³⁹ 탈세포화 방법은 자연적 혈관 네트워크 및 고유한 초미세구조 특성을 유지하였고, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)를 이용한 재세포화는 혈관 내 세포 단층의 생성을 보여주었다.⁴⁰ 이 초기 연구 결과는 희망적이지만 혈관이 실질 세포를 지지할 수 있을지 여부에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

쥐의 간조직을 탈세포화하여 정상 혈관이 있는 자연적으로 유래된 3D 구조를 생산 후 1차 쥐 간세포를 재세포화하여 조직공학으로 만든 간 대체물을 생산하였는데, 미세혈관 혈관내피세포는 혈관 기능을 제공하는데 사용되고 간세포는 지속적으로 세포 배양배지로 관류화한 대체물을 쥐에 이식 후 세포생존성과 기능성은 8시간 동안 유지되었음을 보고하였다.⁴¹ 다른 그룹이 수행한 유사한 연구에서도 희망적인 결과가 나왔다.⁴²⁻⁴⁴ 전반적으로 이 방법은 자연적 혈관계가 영양분과 세포를 전달할 수 있게 해주어 기존의 자주 쓰이던 기법의 세포 이식 문제를 극복할 수 있을 것으로 보인다.⁴³ 그러나 이 방법은 대량의 세포를 필요로 한다는 단점이 있다.

5) 합성된 혈관의 생성(Production of a Synthetic Vascular Architecture)

적합한 지지체는 세포의 부착을 촉진하고 화합물의 저장 및 방출을 할 뿐 아니라 혈관 신생을 촉진하고 유도할 수 있어야 한다. 따라서 혈관 신생을 촉진하기 위해 지지체 내에 혈관 네트워크 출력물을 결합하는 방법을 모색하게 되었는데, microelectromechanical systems (MEMS)를 이용한 고분자 몰딩을 사용하여 모세관 크기의 3D 채널 네트워크를 생산하는 MEMS 접근 방식을 적용하게 되었다.⁴⁵ 이러한 채널 네트워크는 체외에서 간세포를 배양하는데 사용되어 왔다.⁴⁶ 간의 동양혈관(sinusoids)은 입체구조와 유체 관류 방법을 사용하여 모델링 되었으며, 주입된 간세포가 상승한 간 기능을 정상화한다는 연구 결과가 있다.⁴⁷ 이 분야에 대해 연구가 진행되고 있는데, 생리학적으로 적절한 크기의 구조물에 대한 연구가 필요하다.⁴⁵ 심근에서 재생 조직에 대한 지지체 내에 고유 혈관채널을 제조하기 위하여 Marsano 등⁴⁸은 레이저를 사용하여 porous poly (glycerol sebacate)를 지지체 내에 입방형태로 채널의 배열을 만든 후 쥐의 심근세포와 VEGF를 방출하는 형질전환 근육아세포를 주입한 지지체를 심근경색 쥐에 이식한지 10주 후 혈관의 성장과 경색이 크게 개선된 것을 보고하였다. 이 연구는 유망하지만, 지지체의 두께가 1 mm에 불과하고, 생리학적으로 가능한 크기에 대한 논란이 있다.

6) 세포 구성 요소 통합(Integrating Cellular Components)

재생 조직 대체물에서 혈관 신생을 유도하는 다른 방법은 혈관 신생 세포 성분을 기존의 물질에 추가하는 것으로, 이는 내피세포의 이동이 혈관 신생에 직접적으로 관여하기 때문이다. 말단 분화된 혈관내피세포에서 다능성 줄기세포에 이르기까지 다양한 세포의 적용 가능성이 연구되고 있다.³⁶ Human dermal microvascular ECs, HUVECs과 같은 말단 분화된 혈관내피세포의 단독 사용은 생체 내에서 혈관의 비정상적인 형성을 초래했고,^{35,49,50} 이로 인해 혈관내피세포보다는 endothelial progenitor cells (EPCs)이 주로 연구되고 있다. Lesman 등⁵¹은 human embryonic stem cell derived cardiomyocytes (hSEC-CMs)를 HUVEC 및 mouse embryonic fibroblasts와 조합하여 배양한 다공성 지지체를 이식하는 연구를 수행했다. 심근경색이 있는 쥐 모델에 세가지 세포가 포함된 지지체를 이식한 경우, hSEC-CM만 포함된 지지체와 비교하여 혈관 신생 수준이 증가한 것으로 나타났다.⁵¹ 다른 연구에서도 네트워크의 형성을 향상시키는 paracrine 인자를 분비하는 것으로 보이는 헬퍼세포에 대한 필요성이 강조되고 있다.⁵²⁻⁵⁴

골수, 지방 조직 및 말초 혈액으로부터 유래될 수 있는 EPCs가 조직 공학에 이용되고 있는데, 탈세포화된 피부에서 성인혈액으로부터 추출한 EPCs의 사용은 이식 후 쥐의 혈액이 순환한 뒤에도 거부반응 등의 문제가 발생하지 않았다.⁵⁵ Bone marrow derived mesenchymal stem cells도 체내 혈관 신생을 증가시키는 것으로 보고되고 있다.⁵⁶ 그러나, 골수를 채취하는 것은 고통스럽고 침습적인 방법이므로 이를 개선하는 방향으로 연구가 진행 중이다. Adipose-derived MSCs (AD-MSCs)는 쥐 모델에서 혈관 신생을 증가시킨다.⁵⁷ AD-MSCs의 안전성과 타당성을 입증하기 위해 현재 AC-MSCs를 이용한 임상 시험이 진행 중이다.^{58,59} Embryonic stem cells와 induced pluripotent stem cells (iPSCs) 등의 다능성 전구세포의 사용도 연구되고 있는데, Takebe 등⁶⁰은 인간 iPSCs로부터 혈관이 생기고 기능적인 인간의 간을 생성한다고 보고했다. 결국 iPSCs는 간 내 내배엽 세포를 HUVEC 및 MSC와 결합시켜 간세포를 형성시킨 것이다. 이 지지체를 쥐에 이식하면 지지체 내의 인간 맥관구조가 48시간 이내에 쥐의 세포와 연결되었다. 이와 같은 줄기세포를 이용한 장기이식은 활발히 연구되고 있으나, 유전 조작에 의한 프로그램 재구성과 iPSC 생산과 관련된 위험을 둘러싼 윤리적 문제는 임상적 사용 가능성에 걸림돌이 될 수 있다. 환자에게 사용할 최적의 세포 유형을 결정하기 위해서는 직접적인 비교 연구와 장기간의 연구가 필요하다.

결론 및 향후 전망

조직 공학은 현재 이식 후 조직을 알맞도록 혈관화할 수 없다는 한계를 갖고 있으며, 산소와 영양소를 조직에 공급할 수 없다면 괴사가 발생할 수 밖에 없다. 그렇기 때문에 임상적으로는 무혈관이거나 충분한 영양분 공급을 위해 확산이 가능하도록 얇은 조직으로 제한되어 왔다. 재생 조직 대체물질에서 느린 혈관 신생 문제를 극복하기 위해 다양한 방법이 사용되어 왔으며, 이 연구에서 혈관 신생을 촉진시키는데 도움이 되는 세가지 공통적인 요소는 (1) 세포 유형의 선택, (2) 관류 조건, (3) 지지체의 혈관 구조라고 할 수 있다. 세포유형과 관련하여, 체외 및 체내 연구 모두 EPCs가 성숙한 혈관내피세포보다 훨씬 우수하므로 혈관 신생 촉진을 통해 새로운 혈관을 형성하려고 할 때 EPCs를 사용하는 것이 더 낫다고 보여진다. 그러나 일부 연구에서는 한가지 유형 이상의 세포가 필수적이라고 제안되었다. 또한 세포가 관류 조건에 대한 필요성을 의미하는 유체흐름을 통해 전단응력을 받을 때 모세혈관의 성장을 자극하는 것이 관찰되었다. 연구실에서 천연 또는 합성을 통해 혈관 구조를 형성하는 방법이 매우 다양한데, 지지체는 다공성이며 관류 또는 새로운 혈관 신생을 허용하면서 혈관 신생 세포의 부착을 허용하는 구조를 가지는 것이 중요하다. 이러한 혈관 신생을 촉진하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 향후 진전이 빠르게 이루어지기를 기대한다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자(들)은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

1. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 2000;50:1-15
2. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95
3. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004;231:474-88
4. Doi K, Ikeda T, Marui A, Kushibiki T, Arai Y, Hirose K, et al. Enhanced angiogenesis by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor in rabbit model of hind limb ischemia. *Heart Vessels* 2007;22:104-8
5. Przybylski M. A review of the current research on the role

- of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J Wound Care* 2009;18: 516-9
6. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-9
7. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-94
8. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:148-56
9. Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem* 2012;19: 90-7
10. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* 2011;2:1117-33
11. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res* 2010;180:103-14
12. Orlova VV, Liu Z, Goumans MJ, ten Dijke P. Controlling angiogenesis by two unique TGF- β type I receptor signaling pathways. *Histol Histopathol* 2011;26:1219-30
13. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2011;121:233-51
14. Holderfield MT, Hughes CC. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res* 2008;102:637-52
15. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60
16. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 24):4195-200
17. Krishnan L, Hoying JB, Nguyen H, Song H, Weiss JA. Interaction of angiogenic microvessels with the extracellular matrix. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3650-8
18. Pardue EL, Ibrahim S, Ramamurthi A. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis* 2008;4:203-14
19. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8: 604-17
20. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* 2004;255:538-61
21. Marmé D, Fusenig N. Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy. New York: Springer; 2007
22. Griffith CK, Miller C, Sainson RC, Calvert JW, Jeon NL, Hughes CC, et al. Diffusion limits of an in vitro thick pre-vascularized tissue. *Tissue Eng* 2005;11:257-66
23. Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, Dobashi I, Wada M, Yamato M, et al. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun* 2013;4:1399
24. Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:573-82
25. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367:1241-6
26. Dvir T, Kedem A, Ruvinov E, Levy O, Freeman I, Landa N, et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14990-5
27. Tanaka Y, Tsutsumi A, Crowe DM, Tajima S, Morrison WA. Generation of an autologous tissue (matrix) flap by combining an arteriovenous shunt loop with artificial skin in rats: preliminary report. *Br J Plast Surg* 2000;53:51-7
28. Asano Y, Ichioka S, Shibata M, Ando J, Nakatsuka T. Sprouting from arteriovenous shunt vessels with increased blood flow. *Med Biol Eng Comput* 2005;43:126-30
29. Cheng HL, Wallis C, Shou Z, Farhat WA. Quantifying angiogenesis in VEGF-enhanced tissue-engineered bladder constructs by dynamic contrast-enhanced MRI using contrast agents of different molecular weights. *J Magn Reson Imaging* 2007;25:137-45
30. Chen W, Shi C, Yi S, Chen B, Zhang W, Fang Z, et al. Bladder regeneration by collagen scaffolds with collagen binding human basic fibroblast growth factor. *J Urol* 2010;183:2432-9
31. Zhou L, Yang B, Sun C, Qiu X, Sun Z, Chen Y, et al. Coadministration of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor with bladder acellular matrix enhances smooth muscle regeneration and vascularization for bladder augmentation in a rabbit model. *Tissue Eng Part A* 2013;19:264-76
32. Smith MK, Riddle KW, Mooney DJ. Delivery of hepatotrophic factors fails to enhance longer-term survival of subcutaneously transplanted hepatocytes. *Tissue Eng* 2006;12:235-44
33. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001;19:1029-34
34. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 2007;13:880-5
35. Supp DM, Supp AP, Bell SM, Boyce ST. Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 2000;114:5-13
36. Hendrickx B, Vranckx JJ, Luttun A. Cell-based vascularization strategies for skin tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:13-24
37. Vunjak-Novakovic G, Lui KO, Tandon N, Chien KR. Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 2011;13:245-67
38. Schultheiss D, Gabouev AI, Cebotari S, Tudorache I, Walles T, Schlote N, et al. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique

- and short-term implantation in a porcine model. *J Urol* 2005;173:276-80
39. Wezel F, Southgate J, Thomas DF. Regenerative medicine in urology. *BJU Int* 2011;108:1046-65
 40. Sarig U, Au-Yeung GC, Wang Y, Bronshtein T, Dahan N, Boey FY, et al. Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: a potential platform for myocardial tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* 2012;18:2125-37
 41. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010;16:814-20
 42. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011;13:27-53
 43. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 2011;53:604-17
 44. Bao J, Shi Y, Sun H, Yin X, Yang R, Li L, et al. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats. *Cell Transplant* 2011;20:753-66
 45. Hoganson DM, Pryor HI 2nd, Vacanti JP. Tissue engineering and organ structure: a vascularized approach to liver and lung. *Pediatr Res* 2008;63:520-6
 46. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog* 2004;20:750-5
 47. Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng* 2002;78:257-69
 48. Marsano A, Maidhof R, Luo J, Fujikara K, Konofagou EE, Banfi A, et al. The effect of controlled expression of VEGF by transduced myoblasts in a cardiac patch on vascularization in a mouse model of myocardial infarction. *Biomaterials* 2013;34:393-401
 49. Brey EM. Vascularization: regenerative medicine and tissue engineering. Boca Raton (FL): Taylor & Francis/CRC Press; 2014
 50. Hendrickx B, Verdonck K, Van den Berge S, Dickens S, Eriksson E, Vranckx JJ, et al. Integration of blood outgrowth endothelial cells in dermal fibroblast sheets promotes full thickness wound healing. *Stem Cells* 2010;28:1165-77
 51. Lesman A, Habib M, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Levenberg S, et al. Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle. *Tissue Eng Part A* 2010;16:115-25
 52. Stevens KR, Kreutziger KL, Dupras SK, Korte FS, Regnier M, Muskheli V, et al. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16568-73
 53. Hurley JR, Balaji S, Narmoneva DA. Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C444-53
 54. Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 2010;31:6959-67
 55. Kung EF, Wang F, Schechner JS. In vivo perfusion of human skin substitutes with microvessels formed by adult circulating endothelial progenitor cells. *Dermatol Surg* 2008;34:137-46
 56. Markowicz M, Koellensperger E, Neuss S, Koenigschulte S, Bindler C, Pallua N. Human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on modified collagen improved dermal regeneration in vivo. *Cell Transplant* 2006;15:723-32
 57. Altman AM, Yan Y, Matthias N, Bai X, Rios C, Mathur AB, et al. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells* 2009;27:250-8
 58. Herreros MD, Garcia-Arranz M, Guadalajara H, De-La-Quintana P, Garcia-Olmo D; FATT Collaborative Group. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. *Dis Colon Rectum* 2012;55:762-72
 59. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2014;16:245-57
 60. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013;499:481-4