

## 줄기세포를 활용한 비임상시험의 미래전략

김기석\*

안전성평가연구소 예측모델연구센터 책임연구원,  
과학기술연합대학원대학교 겸임교수

### Future strategy of non-clinical trial using stem cell

Ki-Suk Kim\*

Korea Institute of Toxicology, University of Science and Technology



줄기세포에 대한 설명이 필요 없을 정도로 우리나라 국민의 대다수가 전문가 수준으로 줄기세포에 대한 많은 지식을 가지고 있고 큰 관심을 가지고 있는 나라도 없을 것으로 생각된다. 하지만 다시 한번 언급을 하자면, 줄기세포란 우리 몸을 구성하는 모든 세포로 분화될 수 있는 만능세포로 자가 재생능력을 가지고 있는 세포를 말한다. 한때 온 국민의 관심속에서 줄기세포 연구가 진행되어 왔었고 지금은 그때보다는 국민적 관심은 덜하지만 학계에서는 많은 연구가 진행되고 있고 점차 연구의 범위가 확대되어지고 있다. 그 이유로는 현재 의학기술로는 해결하지 못하는 많은 난치성, 노인성 질환의 치료에 기여할 수 있다고 믿어지고 있고 또한 환자에게서 줄기세포를 추출하여 특정 환경에서 배양, 원하는 세포로 분화 증식시킨 후 그 환자에 다시 주입하여 면역거부반응없이 환자를 치료할 수 있다는 가장 이상적인 치료제가 될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 또한 줄기세포의 재생능력을 이용하여 질병으로 훼손된 조직이나 인공장기 개발을 통한 장기 대체가 가능할 것으로 생각되어지고 있기 때문이다. 따라서 많은 국내 연구진들이 줄기세포 치료제 개발에 많은 노력과 자원을 투자하고 있다. 그러나, 줄기세포

치료제의 상용화에 있어서는 면역거부반응, 종양형성, 분화유도, 대량증식, 미확인 감염성질환의 전염통제 등의 아직 풀어야 할 많은 난제들이 있으므로 짧은 시간 내에 소기의 성과를 내기는 어렵고 많은 시간과 자본이 투자가 되어야 할 거 같다. 하지만, 눈을 돌려 다른 분야에 대한 활용을 찾는다면 적은 시간과 자본으로 큰 성과를 낼 수 있는 부분이 많다. 그 한 분야로 비임상 시험분야가 아닌가 싶다.

비임상시험 (Nonclinical Test) 이란, 임상시험의 전 단계에서 행해지는 시험으로서 기초 탐색과정을 거쳐 도출된 후보물질(leading compound)의 유효성과 안전성을 테스트하는 단계로 약물이 체내에 어떻게 흡수되어 분포되고 배설되는가를 연구하는 약리동태와 약효 약리시험 과정을 거친 후, 동물 실험을 통해 시험약이 지니는 안전성을 테스트하는 독성시험을 실시하는 것이다. 비임상 시험 항목에는 아래와 같은 것들이 있다.

① 독성시험(Toxicity Study)

- 시험물질을 시험동물에 단회 혹은 복수 투여 하였을 때 일정기간 내에 나타나는 독성을 양적, 질적으로 검사하는 시험임.

② 독성동태시험(Toxicokinetics)

- 독성시험 수행 시 시험물질의 전신 노출도를 평가하기 위하여 약물동태학적 자료를 산출하는 시험으로서, 시험물질의 노출도와 독성시험에서의 용량단계 및 시간경과와의 상관성을 연구하는 것을 목적으로 함.

③ 약물동태학적시험(Pharmacokinetic Study)

- 투여약물의 흡수, 분포, 대사, 배설과정을 시

Received: 13 December 2017

Published online: 29 December 2017

\* Corresponding author: Ki-Suk Kim  
141 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34114, Republic of Korea  
Tel: +82-42-610-8089  
Fax: +82-42-610-8157  
E-mail: idkks@kitox.re.kr, idkks00@gmail.com

협함으로써 의약품의 효과 및 지속시간, 작용 기전을 예측할 수 있을 뿐 아니라 생체내 분포, 저류시간, 약물농도를 알 수 있어 부작용 발현을 추정하는데 중요한 정보를 제공할 수 있는 시험임.

④ 효력시험(Efficacy Study)

- 약물의 효능을 뒷받침할 수 있는 약리작용에 관한 시험으로서 효과발현의 작용기전을 포함하고 있음.

⑤ 일반약리시험(Study of General Pharmacology)

- 독성시험, 효력시험 및 흡수·분포·대사·배설에 관한 시험을 제외한 전임상시험으로 의약품등이 신체 각 부위(계) 및 기능 등에 미치는 영향에 관한 시험을 말함.
- 신체 각 부위(계) 및 기능에 미치는 영향을 측정함으로써 부작용예측을 통하여 시험 자료의 신뢰성을 확보하고 의약품 등의 안전성 평가에 그 적정을 기하는데 목적이 있음.
- 시험항목으로는 일반행동에 미치는 영향, 중추신경계에 미치는 영향, 자율신경계에 미치는 영향, 호흡기계에 미치는 영향, 순환기계에 미치는 영향, 소화기계에 미치는 영향이 있음.

위와 같은 비임상시험 평가 실험을 통해 사람에 직접 위해성을 실험하는 임상시험 평가로 진행할 수가 있기 때문에 신약개발 과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 이러한 비임상시험들은 동물에서 시험을 진행하고 있기 때문에 많은 문제들을 안고 있

다. 첫째로, 인간의 이익을 위해 동물의 희생을 강요하는 것에 대한 반발이다. 많은 선진국들이 인간을 위해서 동물실험을 금지해야 한다는 목소리를 높여가고 있다. 특히, 동물실험 금지 및 대체 실험법을 개발해야 한다는데에 가장 적극적인 곳은 유럽연합(EU)이다. EU 의회는 칩팬지, 오랑우탄 등 유인원의 동물실험을 제한하는 보호법을 발표했다. 무조건의 실험금지는 아니지만 유인원을 동물실험에 사용하기 위해서는 까다로운 규제와 감시를 할 예정이고 또한 동물실험을 한 화장품의 판매금지도 의결했다. 그리고 1991년에 유럽동물대체시험법 검증센터(ECVAM)를 설립해서 동물실험을 대체할 대체독성평가법을 개발하고 있다. 다른 선진국의 경우도 마찬가지인데 미국은 2001년 ICCVAM을 설립하고 동물실험이 아닌 다른 방법으로 기본적인 실험을 할 것을 권장하고 있고 일본도 2004년 JACVAM을 설립했다. 그리고 영국 FRAME, 독일 ZEBET, 네델란드 NCA에서 실험동물 대체 시험법을 개발하고 있다. 우리나라도 이러한 세계적인 기류에 동조하고 있으며, 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원은 한국동물대체시험법 검증센터(KoCVAM)을 설립하고 국제공동검증연구를 추진하고 있다. 두 번째로 동물을 사용한 비임상 시험에 대한 임상시험에서의 재현의 문제이다. 아무래도 동물은 인간과 다른 종이므로 종간차이에 의한 약물의 반응이 다를 수 있는데, 비임상 시험에서 발생된 독성이 임상에서는 독성이 미미할수도 있고 또한 반대로 동물에서는 독성이 미미했는데 실제 사람을 대상으로 하는 임상시험에서는 독성이 나타날수도 있다. 그 한

Category	Drug	Clinical report			in vitro assay			On-chip MEA system									
		VT/VF/TdP	C <sub>MAX</sub> (μM)	hERG inhibition (%)	APD <sub>90</sub> prolongation in papillary muscle (ratio)	MAPD <sub>90</sub> prolongation in Langendorff hearts (ratio)	Ref. dose (10 × C <sub>MAX</sub> )	FPD (ratio)	Hest	STV <sub>FPD</sub> (ratio)	Hest	Ref. dose (ca. 10 <sup>2</sup> × C <sub>MAX</sub> )	Arrest (%)	Fib. like (%)	n	Score	
I: Positive	Cisapride	[+]	0.18	90.6	1.14	1.37 <sub>2</sub>	1 μM	1.37 ± 0.07	****	3.82 ± 0.85	**	10 μM	0	4	25	High	
	D-sotalol	[+]	2.5	19.2	1.15	1.30	30 μM	1.25 ± 0.05	**	3.08 ± 0.86	ns	10 <sup>2</sup> μM*	5	0	38	High	
	E-4031	[+]		74.5	1.26	1.50 <sub>2</sub>	0.1 μM	1.24 ± 0.08	*	2.67 ± 0.67	*	1 μM	8	4	24	High	
	Moxifloxacin	[+]	10	51.4	1.44	1.87	300 μM	1.60 ± 0.12	***	5.61 ± 2.31	ns	10 <sup>2</sup> μM	0	0	27	High	
II: False negative on APD in papillary muscle	Bepidril	[+]	0.30	61.9*	1.02	1.12	10 μM	1.21 ± 0.12	ns	4.74 ± 2.26	*	10 μM	5	5	20	High	
	Astemizole	[+]	0.002	105.4**	1.01	1.27 <sub>2</sub>	1 μM	1.08 ± 0.10	ns	3.54 ± 1.39	*	10 <sup>2</sup> μM*	0	14	25	High	
	Paroxetine	[+]	0.07	[n.d.]	[n.d.]	[n.d.]	[n.d.]	1.30 ± 0.06	****	2.27 ± 0.41	*	10 μM**	13	0	24	High	
	Thioridazine	[+]	1.8	87.8**	1.01	1.16	10 μM	1.17 ± 0.03	**	1.90 ± 0.30	*	10 μM	0	0	22	High	
	Flecainide	[+]	0.43	88.3**	0.75	1.29**	30 μM	1.00 ± 0.05	ns	3.01 ± 0.65	***	10 <sup>2</sup> μM**	13	0	24	High	
	Citalopram	[+]	0.27	83.5	0.95	[n.d.]	10 μM	0.86 ± 0.04	****	2.75 ± 0.78	*	10 μM	12	0	25	High	
	Terfenadine	[+]	0.22	94.2**	0.98	1.05	10 μM	0.98 ± 0.04	ns	2.05 ± 0.53	ns	10 μM	21	3	34	High	
III: False positive on hERG	Diltiazem	[−]	0.11	[+]	[−]	[n.d.]	10 μM	0.93 ± 0.08	*	1.70 ± 0.43	ns	1 μM**	50	0	12	Low	
	Ebastine	[−]	0.16	[+]	[−]	[−]	0.3 μM	1.07 ± 0.03	ns	1.64 ± 0.28	ns	1 μM	0	0	18	Low	
	Verapamil	[−]	0.17	99.2	0.95	0.79	10 μM	0.51 ± 0.05	****	0.97 ± 0.18	ns	10 μM	49	0	43	Low	
IV: Negative	Famotidine	[−]	0.19	[−]	[−]	[−]	10 μM	1.02 ± 0.02	ns	1.03 ± 0.09	ns	10 μM	0	0	32	Low	
	Levofloxacin	[−]	22	13.2	1.07	1.18	300 μM	0.80 ± 0.14	**	1.27 ± 0.25	ns	10 <sup>2</sup> μM	40	4	25	Low	
	DMSO	[−]		[n.d.]	[n.d.]	[n.d.]	[n.d.]	1.06 ± 0.02	-	1.38 ± 0.24	-	0.1%	6	0	31	No	
	PBS	[−]		[n.d.]	[n.d.]	[n.d.]	[n.d.]	1.05 ± 0.02	-	1.23 ± 0.11	-	-	0	0	25	No	

Data on hERG inhibition, APD prolongation in papillary muscle and in Langendorff hearts, and on-chip MEA assay was based on our results (Fig. 2). + and - show the positive and negative risk on the results of our assays. Short show the APD/FPD shortening on the results of our assays. [ + ] or [ - ] in present the positive or negative risk based on the references and pharmaceutical attachments. The data [the relative ratio against the control] is shown as only mean for on-hERG inhibition, APD prolongation in papillary muscle and in Langendorff hearts and as mean ± S.E. for on-chip MEA assay. The reference concentrations (Ref. dose) show the concentration referred the experiments (hERG assay, APD assay in papillary muscle, Langendorff assay). VT/VF risk is compiled from the literature.

\*Indicates EAD appearances on the Langendorff assays.

\*1: 0.3 μM bepidril;  
 \*2: 0.1 μM astemizole;  
 \*3: 3 μM thioridazine;  
 \*4: 10 μM flecainide;  
 \*5: 1 μM terfenadine.

Abbreviations: phosphate-buffered saline (PBS), and dimethyl sulfoxide (DMSO). Red hatched area indicates positive [ + ] risk, and blue area indicates negative [ - ] risk judgment using each method.

예로 아래의 <표 1>을 보면 여러 가지 다양한 약물에서의 비임상 시험항목들이 임상시험에서 False negative or False positive로 다르게 나타날 수 있음을 잘 보여 주고 있다. (Kaneko et al., 2014)

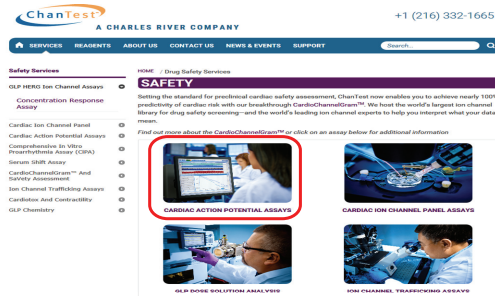
따라서, 이와같은 현재 비임상시험이 가지고 있는 문제점을 해결할 대안으로 제시되고 있는 것이 줄기 세포이다. 학계에서는 줄기세포 배양기술을 이용해 동물이 아닌 인간세포를 직접 배양해 이와같은 문제점을 해결할 수 있을 것으로 보고 있다. 현재 이에 대해서 발빠르게 움직임을 보이고 있는 분야가 심장 독성분야다. 심장 부정맥의 독성평가시험항목의 가이드라인인 ICH S7B에서는 비임상시험의 심장독성 부분의 평가를 위해서 향후 줄기세포에서 분화된 심장세포를 이용하여 독성을 평가하는 것을 의무화 하려는 움직임을 보이고 있다. 그에 발맞추어 그림1과 같이 세계적으로는 글로벌 비임상 CRO(Contract Research Organization: 위탁연구기관)들이 줄기세

포를 이용하여 심장독성평가하는 방법을 자체적으로 셋업하여 수탁서비스를 제공하거나 제공하려는 움직임을 보이고 있다.

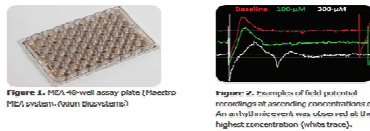
<부연 설명>

\* 비임상 CRO(Non-Clinical CRO)

- 임상시험의 전 단계에서 행해지는 시험으로서 기초 탐색과정을 거쳐 도출된 후보 물질(lead compound)의 유효성과 안전성 일부 또는 전부를 대행하기 위하여 의뢰자로부터 계약에 의해 위임받은 개인이나 기관을 지칭하며, 비임상 수탁기관이라 함.
- 비임상 CRO의 주요 업무는 독성시험, 효력시험, 일반약리시험, 약동력시험으로 구분되며, 약물이 체내에 어떻게 흡수되어 분포되고 배설되는가를 연구하는 약리동태와 약효약리시험 과정을 거친 후, 동물 실험을 통해 시험약이 지니는 안전성을



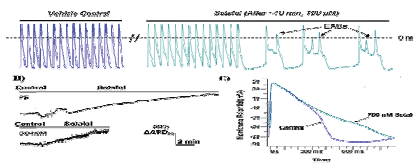
New "Heart-in-a-Dish" In Vitro Cardiac Safety Assessment Tool: Multiple Electrode Array (MEA) Assays



SC-hCM APD Assays

- Detection of AP Prolongation (QT risk) and EADs (trigger for Torsades de Pointes)
- Cost-effective compared to conventional methodologies
- Human test system

	SC-hCM Action Potential (AP) Assay	SC-hCM Action Potential Duration (APD) Screen
Description	Comprehensive profiles of lead candidate effects on the human cardiac AP	Cost-effective screen for lead candidate effects on the human cardiac AP
Parameters Evaluated	APD <sub>90</sub> , APD <sub>50</sub> , Rise of Rise (V/m/s), Amplitude (AP <sub>amp</sub> ), Resting Potential (RMP)	APD <sub>90</sub> , APD <sub>50</sub>
Control	Quinidine or cisapride	
Method	manual patch clamp Current clamp mode 1-4 concentrations 1-3 cells/concentration	manual patch clamp Current clamp mode 2 concentrations 1-2 cells/concentration



**Vistagen (http://www.vistagen.com) - USA**

Stem Cell Biology  
Drug Discovery Systems  
Diabetes & CNS Therapeutics

Pioneering the Use of Embryonic Stem Cell Technologies for Drug Discovery and Development

Stem Cell Newsroom

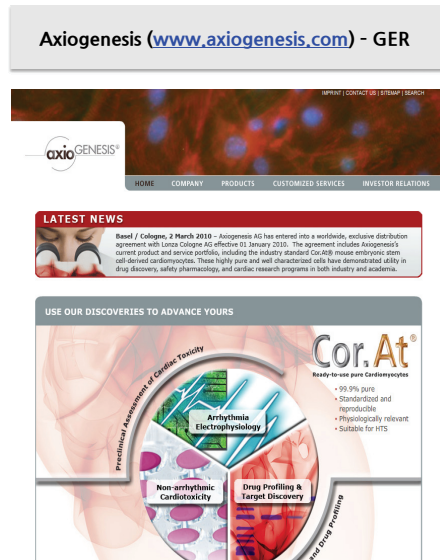
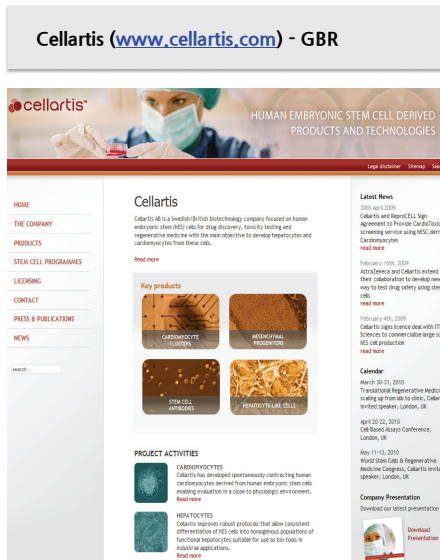
**California stem cell Inc (www.californiastemcell.com) - USA**

Pioneering human treatments from human embryonic stem cells

California Stem Cell is focused on the production and supply of clinically relevant human cell populations, and their therapeutic application to human disease and injury.

Meet Our Team

Live Cells on Demand



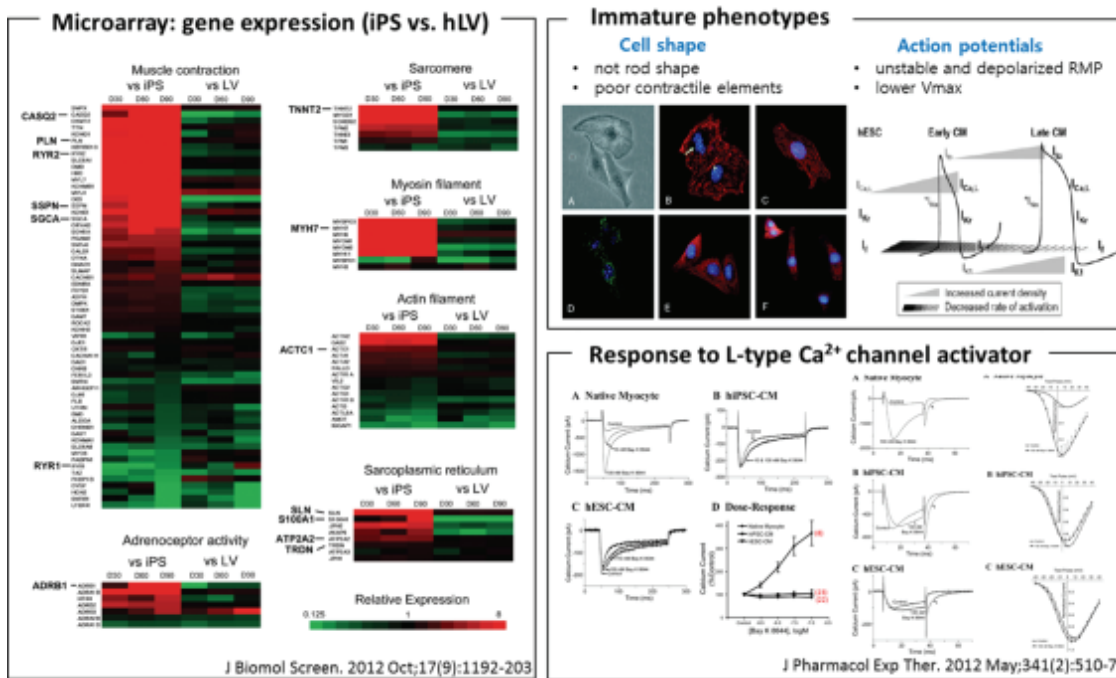
<그림 1> 줄기세포를 이용한 비임상 시험 서비스를 제공하는 글로벌 CRO

테스트하는 독성시험이 실시됨.

하지만, 독성평가를 위해서는 평가하는 재료인 줄기세포에서 분화된 사람의 장기세포들이 실제 사람의 것의 특성을 반영해야 동일한 약물의 반응을 야기할수 있을텐데, 아직 그 부분에 있어서 실제 사람의 것과 차이를 보이고 있다. 그림 2와 같이 다양한 gene들의 발현양상이 다르고 세포의 모양, 측정되는 전기적인

신호(활동전위) 그리고 제일 중요한 약물의 반응도 다소 차이가 있음을 알수 있다. 이는 분화된 세포가 아직 성숙되지 않은 미성숙 세포이기에 차이가 나는 것으로 판단되어진다.

그리고 추가적인 문제점으로는 줄기세포를 배양하고 다른 기능장기세포로 분화하기 위해서 고비용이 들고 대량생산에 많은 어려움이 있다. 따라서 이러한 문제



<그림 2> 줄기세포에서 분화된 심장세포와 사람의 심장세포의 차이점을 보여주는 논문들

점들을 해결하기 위한 많은 연구가 필요한 시점이다. 미성숙의 문제를 해결하기 위해 줄기세포에서 분화된 기능성 세포들에 대한 여러 가지 다른 환경자극(전기 충격, 인장자극, 특정 화합물의 첨가, 여러 가지 다양한 패턴을 가진 환경에서의 배양)에서의 세포성숙의 실험이 이루어지고 있으며, 짧은 시간안에 분화 및 배양, 그리고 대량 생산할수 있는 여러 가지 배양 프로토콜의 개발이 연구되어지고 있다. 그 연구에 있어서 가장 선두를 달리고 있는 곳이 미국의 Cellular Dynamics international (CDI)이다. iCell<sup>®</sup> 이라고 불리는 줄기세포에서 분화된 심장세포, 신경세포, 간세포, 조혈세포, 골격근세포, 면역세포, 혈관내피세포 등의 많은 기능세포들을 대량배양 및 Quality control 을 통해서 상업화에 성공을 했으며 거의 독점적으로 전세계에 공급하고 있다. 약 80명의 과학자가 세포배양, 분화, 유전체 엔지니어링을 수행하고 있으며, 한 달에 7백억개의 iPS 세포 (역분화 줄기세포)를 생산해내고 다른 여러 가지 기능세포로 분화시키고 저장하고 있다. 이 CDI사는 2004년에 설립되어서 2013년엔 나스닥에 상장이 되었고, 총 자산 규모가 17백만달러인데, 이 80명밖에 안 되는 연구소를 글로벌 대기업인 후지필름사가 3억달러에 인수합병한 것을 보면 향후 가치가 얼마나 대단한지를 알 수 있으며, 앞으로 그 몇백배의 가치로 뛰어오를만한 가능성을 가지고 있다고 할 수 있다. 우리도 세계적으로 줄기세포 분야에서 상위권의 기술력을 가지고 있는 나라이고 줄기세포 치료제

개발에 대한 연구로 쌓은 많은 기술력을 바탕으로 독성평가에 사용될 소스로써의 줄기세포 분화 다양한 기능세포의 대량생산에 대한 연구가 필요한 시점이다. 더 나아가서 줄기세포 분화 기능세포를 이용한 독성평가법은 노출경로에 따른 독성을 밝히는 것과 동물의 장기들 간 상호작용에 의한 독성영향을 알기가 어렵다. 따라서 향후에는 줄기세포를 이용한 생체모사 인공장기 (오가노이드; organoid)의 개발 및 이를 이용한 독성평가시스템의 개발로 진행될 가능성이 높다. 앞선 줄기세포 분화 사람생체의 기능세포들의 분화 및 대량생산 부분에 대한 기술이 이미 선진국을 중심으로 많이 진행이 된 상황이라면, 생체모사 인공장기인 오가노이드 부분은 현재 선진국에서도 초보 수준에 머무르고 있다. 또한, 다양한 장기 간의 상호작용이 가능한 인공 디바이스를 이용해 약물의 유효성과 안전성을 평가할수 있는 새로운 개념의 동물대체 평가법은 전세계적으로 연구진행이 미비한 수준이다. 국내에서는 산업통상자원부에서 2014년 ‘3D 프린팅 기술 및 이를 이용한 인간장기 대체 가능한 인공장기의 구현 기술 개발’에 대한 예비타당성 평가를 수행했으나 채택되지 못 했고, 아직까지 실제 기능하고 있는 인공장기 제작을 위한 원천기술은 요원한 상태이다. 따라서 앞으로 이부분에 대한 많은 국내 연구자들이 노력을 기울인다면 시작은 늦었으나 이분야에서 선도적인 역할을 할 수 있지 않을까 싶다. 결론적으로 현재까지는 대체시험법이 대안이 될 순 있지만 완전한 대체는 힘들다.



The NAS/NRC Tox-21c report calls for a paradigm shift in toxicology (2008.2)

The report envisions a new toxicity-testing system that relies mainly on understanding **“toxicity pathways”**-the cellular response pathways that can result in adverse health effects when sufficiently perturbed. Such a system would evaluate biologically significant alterations without relying on studies of whole animals.

“Animal testing won’t disappear overnight, but the agencies’ work signals the beginning of the end.”

Ellas Zerhouni, 15<sup>th</sup> Director of NIH



“Toxicity testing was expensive, time-consuming, used animals in large numbers, and didn’t always work.”

Francis Collins, now Director of the NIH



<그림 3> 독성평가 패러다임의 변화

대체시험법으로 물질에 대한 직접적인 반응은 볼 수 있어도 그 물질이 특정 장기에 이르는 과정을 알수 없고 다양한 장거나 생체조직이 유기적으로 연결되어있어서 일어나는 통합적인 작용도 볼 수 없다. 실제로 어떤 물질을 먹거나 피부에 바르거나 주사기로 혈액에 주입하는 등의 방법에 따라 몸은 다르게 반응한다. 대신 대체시험법은 다량의 물질을 빠르게 검사할 때 장점을 발휘하는 만큼 시험동물을 대신해 초기 독성평가

에 쓰일수 있다. 이러한 방법으로 동물의 수를 줄이고 임상시험으로 가기위해 더 많은 필터링을 할수 있다는 면에서 장점을 가지고 있기 때문에 대체시험법 연구는 앞으로도 더 활성화 될것으로 생각된다. 그리고 그림3과 같이 세계적인 독성학 석학들의 의견처럼 동물 실험은 여전히 독성평가에서 중요하지만 많은 대체시험법으로 그 활용은 감소될것으로 생각되고 우리는 이에 대한 대비를 위한 많은 연구가 필요한 시점이다.