

# 심근유래의 줄기세포 프라이밍 및 조직공학 기술에 의한 심혈관 재생 전략

박지혜<sup>1</sup>, 김희정<sup>2</sup>, 정한나<sup>2</sup>, 박해리<sup>2</sup>, 황혜원<sup>2</sup>, 권상모<sup>1\*</sup>

## Cell Priming and Tissue Engineering Strategies for Cardiovascular Regeneration Using Human Heart Tissue-Derived Cardiac Progenitor Cells (hCPCs)

Ji Hye Park<sup>1</sup>, Hee Jung Kim<sup>2</sup>, Hanna Jung<sup>2</sup>, Haeri Park<sup>2</sup>, Hyewon Hwang<sup>2</sup>, and Sang Mo Kwon<sup>1\*</sup>

Received: 29 May 2018 / Revised: 7 August 2018 / Accepted: 31 August 2018

© 2018 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The prevalence and mortality rate of cardiovascular disease continue to increase despite the development of new drugs and treatments. Stem cell therapy is a promising strategy to repair and/or regenerate damaged cardiac tissue. Cardiac progenitor cells may be stronger candidates than other stem cells for cardiac cell therapy. Cardiac progenitor cells (CPCs) residing in the heart (also referred to as cardiosphere-derived cells (CDCs)) exert a therapeutic potential in repairing heart damage. Numerous studies have identified candidate CPC cell surface markers, including c-kit, stem cell antigen 1 (Sca1), and platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ). CPCs are capable of differentiating into multiple mature cardiac cell types, including cardiomyocytes (CM), smooth muscle cells (SMC), and endothelial cells (EC). Owing to their unique pluripotency, various pre-clinical and clinical studies are being conducted using cardiac progenitor cells to regenerate damaged heart tissues. However, poor stem cell survival and low engraftment efficiency underlie significant reductions

in therapeutic efficacy. To overcome current limitations that reduce stem cell therapeutic efficacy, many methods have been implemented that aim to improve stem cell survival and engraftment. Recently, stem cell priming and tissue engineering technologies have been suggested to enhance stem cell therapeutic efficacy. It is possible to increase survival and engraftment of cardiac progenitor cells in injured cardiac tissue by cell priming and tissue engineering technologies before use. In this review, we provide an understanding of multiple therapeutic approaches including cell priming, scaffolds, tissue engineering, 3D printing techniques and clinical prospect for cardiovascular regeneration using patient-derived CPCs.

**Keywords:** cardiac progenitor cells, stem cell therapy, cell therapy

### 1. INTRODUCTION

심혈관 질환은 전 세계적으로 사망률이 가장 높은 질환 중 하나이다 [1]. 심혈관 질환의 표준 치료법으로 약물이나 막힌 혈관을 뚫어주는 경피적 심혈관 중재술/관상동맥 우회 이식술 등의 중재적 치료가 행해지며, 말기심부전과 같은 말기 심장질환에 이르렀을 경우 심장이식이 요구된다. 표준치료법에 의해 심혈관 질환으로 인한 사망률은 감소하였지만 여전히 심혈관 질환은 전 세계 사망원인 1위로 손꼽히고 있으며,

<sup>1</sup>부산대학교 의학전문대학원 혈관 및 줄기세포 연구실

<sup>1</sup>Lab. of Regenerative Medicine & Stem Cell Biology, Department of Physiology, Medical Research Institute, School of Medicine, Pusan National University, Yangsan, Korea

Tel: +82-51-510-8075, Fax: +82-51-510-8076

e-mail: smkwon323@pusan.ac.kr

<sup>2</sup>부산대학교 의학전문대학원

<sup>2</sup>School of Medicine, Pusan National University, Yangsan, Korea

급성 심근경색의 약 30%는 만성 심부전으로 발전된다고 보고되어진다 [2].

심장은 재생능력이 없는 분열이 끝난 기관으로 여겨졌지만, 이러한 관점은 성인 심장에서 전구세포 (progenitor cells)를 분리해내면서 바뀌게 되었다. 심근전구세포 (cardiac progenitor cells, CPCs)란 심근세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로, 2003년 성숙한 설치류의 심장에서 c-kit(+)/hematopoietic lineage marker(-)를 발현하는 세포로 처음 발견되었다 [3]. 이후, 마우스, 개, 돼지, 인간의 심장에서 존재가 입증되었다 [4]. 이후 Stem cell antigen-1(Scal-1), Islet-1(Isl-1), Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) 양성세포, side population cells 등 원시줄기세포에서 발현하는 표면표식자가 양성인 세포군집들이 심장 내 존재하는 심장 전구세포로 보고되고 있다 [5-8]. 또한, cardio-sphere derived cells (CDCs) 이 혈관내피세포, 심근세포, 평활근 세포로 분화가능 [3,5]하고, 자가 복제능의 특징을 가지고 있어 심장에 존재하는 줄기세포 군으로 분류되고 있다 [7]. 허혈성 조직손상 신호에 의하여 심근전구세포는 손상된 심근부위로 빠르게 동원될 수 있으며, 심장에 잔존하고 있던 세포군집으로 빠르게 심근세포의 기능회복에 도움을 줄 수 있다. 이러한 이점으로 잔존 심근전구세포/줄기세포를 이용한 세포이식치료가 손상된 심근을 재생을 위한 훌륭한 심혈관 질환 치료 전략으로 제시되고 있다.

일반적으로 허혈 심장 내 심근 재생을 위해 많은 수의 줄기세포를 이식해도 1-5% 내외의 세포가 허혈심근의 신생혈관 형성에 참여한다고 보고되고 있다. 이는 이식한 줄기세포의 낮은 생존률 및 생착률로 인한 것으로 심혈관 및 심근 재생을 위해 반드시 해결해야 할 문제점으로 대두되고 있다. 이러한 요구로, 이식 후 세포 생존률 및 생착률을 향상시키고, 줄기세포능을 증진시키기 위한 다양한 세포 프라이밍 (cell priming) 연구들이 줄기세포를 활용한 심혈관 치료전략으로 제시되고 있다. 화학적, 물리적 자극 전 처리, 열 충격과 같은 물리적 자극과 천연물과 다양한 성장인자처리를 통한 화학적 자극을 통한 세포자체의 기능강화는 이식된 줄기세포의 생존율 및 생착율을 높이고 세포의 증식 및 분화능을 증진시킴으로써 세포치료의 효율을 증진시킨다.

일반적으로 사용되는 줄기세포는 이식 전 2차원 배양환경에서 배양된 후 세포치료제로 사용되면서 생체 내로 이식된다. 다양한 자극이 존재하는 생체 내의 환경과는 많은 차이가 있으며, 세포주변에서 일어나는 미세환경이 고려되지 않아 근본적인 줄기세포를 이해하고 치료제 적용하는데 한계가 있다. 최근 스캐폴드, 3D프린팅 등의 다양한 조직공학적인 접근을 통해 심장미세환경의 구현 또는 미세환경 조절을 통해 심근재생의 효율을 증진시키고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

본 논문에서는 세포배양환경을 조절하여 세포의 기능을 증진시키고, 조직공학을 접목한 심장 내 미세환경 조절 연구에 대한 연구동향 및 심근전구세포를 활용한 임상시험연구에 대한 전반적인 고찰을 통해 심근재생에 보다 효율적이며 우

수한 세포군으로 활용될 수 있는 심근전구세포 관련연구에 대한 폭넓은 이해를 제공하고자 한다.

## 2. 본론

### 2.1. 세포 프라이밍

일반적으로, 허혈 심근에 이식된 줄기세포의 낮은 생존율은 줄기세포 치료의 문제점으로 여겨진다. 따라서 허혈 환경에서 줄기세포가 효율적으로 생착 및 생존할 수 있게 도와주는 프라이밍 분자, 약물 등에 대한 연구는 심근전구세포를 활용한 심혈관 질환 치료전략으로 제시될 수 있다. 세포 프라이밍 (cell priming) 이란 화학적, 물리적 자극 전 처리를 통해 세포의 기능을 증진시키는 과정으로 저산소처리, 열 충격과 같은 물리적 자극과 천연물과 다양한 성장인자처리를 통한 화학적 자극에 의한 세포기능증진연구 결과들이 보고되고 있다. 허혈 상태와 같은 병태적 자극은 조직 내 기질세포의 사멸을 초래하여 생체 적합성 환경의 파괴를 촉진시키고, 이러한 병태적 환경은 투여된 줄기세포가 생존할 수 있는 환경으로 열악하며 이것이 세포 생존률과 생착률의 감소로 이어지기 때문에 세포 프라이밍을 통한 세포 생착률 및 생존률 증진은 매우 중요하다.

본 파트에서는 줄기세포의 치료효능을 증진시키기 위해 제시되고 있는 세포 프라이밍 방법들을 살펴보겠다.

#### 2.1.1. 세포배양 환경조절

줄기세포 프라이밍 연구에서 가장 많이 제시된 방법은 이식 전 생리적, 화학적/약리학적으로 세포배양 환경을 조절하여 프라이밍된 줄기세포를 이식하여 세포 생존 능력을 증강시키는 것이다.

##### 2.1.1.1. 생리적 자극

저산소 전처리 (hypoxic preconditioning)와 열충격 (heat shock) 같은 생리적인 자극법은 비교적 안전하게 시도할 수 있는 세포 프라이밍 방법이다.

저산소 전처리는 줄기세포를 낮은 산소 환경에 짧은 시간 노출함으로써 허혈 심장에서 이식된 세포 생존력, 세포 이동능의 증가를 통해 세포치료 효능을 증가시키고자 하는 전략이다. 저 산소 환경은 줄기세포 생존의 증가와 [9] 심근세포의 분화에 관여한다 [10]. 저산소 조건에서 저산소 유도인자 Hypoxia inducible factor (HIF)-1에 의한 전사적인 조절이 관여한다. HIF-1 $\alpha$ 은 산소에 유동적인 단백질로 저산소 상태에서 안정화되고 HIF-1 $\beta$ 에 결합하여 이성 이중체 (heterodimeric)인 HIF-1이 되고, HIF-1은 핵에서 VEGF, EPO와 같은 하위 유전자들을 활성화시켜 혈관형성, 세포사멸 등에 관여하는 유전자를 조절하여 세포생존율에 관여한다 [11,12]. 다양한 줄기세포와 저산소 처리조건에서 세포생존율 증진효능이 보고되고 있다. 중간엽 줄기세포에서는 시험관 내 저 산소 (1-3%) 전처리 시 Akt 신호 활성화를 통한 세포생존율 및 세

포 이동능의 증가가 보고되었다 [9]. 또한, 0.5%의 저 산소 환경 24시간 노출 후 심근경색부위로 이식된 중간엽 줄기세포가 Bcl-2, Bcl-xL과 같은 세포 생존유전자를 상향 조절하여 향상된 세포 생존율을 보이며 심근경색의 크기를 감소시키는 심장기능 증진 효능이 검증된 바 있다 [13]. 심근전구세포에서는 저 산소 환경 전 처리가 CXCR4 발현유도를 통해 마우스 심근경색 모델 정맥으로 세포 이식 후 경색부위의 세포 동원과 시험관 내 세포 이동능의 증가가 검증된 바 있다 [14]. 또한 Pim1 kinase 매개의 항 세포 사멸효과를 통한 세포 생존율 증가가 보고되었으며 [15], 최근 저 산소 전 처리의 세포생존율 및 심근전구세포 증진이 PI3K/Akt-DNMT1-p53 pathway를 통한 것 [16]이라는 보고를 통해 저 산소 처리를 통한 심근전구세포의 세포 프라이밍 효능이 입증되고 있으며 [15-17], 관련 매커니즘에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있다.

열 충격 또한 세포생존율을 증진시키기 위한 전략 중 하나이다. 열 충격은 줄기세포를 약한 열 (39-45°C)에 짧은 시간 노출시킴으로써 이식 후 심장에서 세포 생존력을 증진시키는 것이다. 열 충격은 생존에 도움을 주는 인자 (prosurvival factor)로 증명된 heat shock proteins (HSPs)의 양을 증가시킨다 [9,18]. 43°C, 5% 산소환경에서의 열 충격은 HSP70의 transcript expression을 강화하여 심근전구세포의 세포죽음을 감소시키는 것을 annexin V 양성세포의 감소를 통해 확인하였으며, 또한 Yuliang feng이 보고에서 42°C 열 충격을 가한 Sca-1 양성 심근전구세포를 심근경색 심근 내 주입 후 HSF1/miR-34a/HSP70 pathway를 통해 세포사멸 및 섬유증 감소와 허혈 심근의 기능이 증진되었다 [19].

#### 2.1.1.2. 화학적/약리학적 자극

여러 화학적/약리학적 물질이 산소 감지 경로를 자극시켜 줄기세포 기반의 치료를 강화시키는 잠재력을 가지고 있다.

#### 2.1.2. 심장 미세환경 최적화 전략

스타틴 (Statin) 병용처리와 조직공학을 통한 심장 내 미세환경을 개선하는 방법 또한 심근전구세포를 활용한 줄기세포 치료에 훌륭한 전략으로 제시될 수 있다.

2,4-dinitrophenol (DNP)는 전자 전달계에서 화학적 저 산소를 억제하고 세포 내 ATP 생산을 줄인다 [20]. 설치류의 심근경색 심장 내 DNP가 처리된 중간엽 줄기세포 이식 시 세포의 생착 및 심혈관 분화를 증가시켜 심 기능과 혈관재형성을 높임이 증명되었다 [21,22]. Deferoxamin (DFO)는 HIF-1 $\alpha$ 를 저하시키는 프롤릴 하이드록실 레이즈의 활동을 억제한다. DFO는 VEGF와 SDF-1 $\alpha$  같은 HIF-1 $\alpha$  매개로 분비되는 인자를 증강시켜 혈관형성 면에서 잠재력을 인정받고 있다 [23]. 레닌-안지오텐신계의 중요한 요소인 안지오텐신2 수용체도 심근경색 이후 심장 재건에 중요한 역할을 한다. CGP42112A 처리를 통해 안지오텐신2를 활성화하고 안지오텐신 1수용체 억제제인 Valsartan을 함께 처리하여 안지오텐신 2 수용체의 자극을 유도한 세포의 신호조절 인산화 효소/혈관내피 산화

질소 합성효소/산화질소 (ERK/eNOS/NO) 신호전달에 영향을 끼쳐 심 보호 효과를 낼 수 있는 작용제로 보고된 바 있다. 안지오텐신2 수용체에 자극 받은 골수세포를 경색된 쥐의 심장에 이식 후 이식된 세포의 생존, 가동화 (mobilization), 혈관 형성능의 증가, 항 염증 작용을 통해 심 기능을 향상시키고 경색 크기를 줄인 효능이 검증된 바 있다 [24]. 또한 Yoshihiko의 보고에 의하면, Valsartan을 처리하여 안지오텐신2 수용체를 활성화하였을 때 심근경색 동물모델의 좌심실의 직경을 감소시키며, 심장 리모델링을 지연시킴을 검증한 보고가 있다 [25]. 따라서, 심근전구세포의 안지오텐신 2 수용체 자극 혹은 심근전구세포 이식 시 안지오텐신 2 수용체 자극을 함께 주었을 때 심근줄기세포의 치료효과를 강화시키는 새로운 전략이 될 수 있을 것이라 전망한다.

#### 2.1.2.1. 스타틴

HMG-CoA 환원효소 억제제인 스타틴 (statin)은 심혈관계에 다면적인 효과를 발휘하기 때문에 심혈관 질환 치료에 많이 처방되는 약이다. 아토바스타틴 (atorvastatin), 심바스타틴 (simvastatin), 로수바스타틴 (rosuvastatin)과 같은 스타틴 약물은 혈관내피세포의 기능개선 및 심근세포괴사, 산화 스트레스, 염증반응의 억제로 경색 이후 환경을 조절하는 효능이 검증되어 임상에서 사용 중이다. 뿐만 아니라 경색 근처의 혈액 관류를 증가시켜 이식된 중간엽 줄기세포의 생존, 생착, 심혈관계 분화를 가능하게 한다. 중간엽 줄기세포와 스타틴 병행 치료법은 각각을 단독 사용하는 것보다 심 기능 향상과 재형성 측면에서 효과를 보인 바 있다.

근본적인 기전에는 경색된 심근에 eNOS 또는 JAK2/STAT3를 활성화하거나 RhoA/ROCK/ERK를 억제하는 것이다. 또한, 스타틴의 투여는 심장에서 SDF-1 $\alpha$  분비를 늘리고 CXCR4 커플링을 활성화함으로써 허혈 심근에서 줄기세포의 가동화와 귀소화를 강화시킨다 [26-28]. 두 가지 임상연구에서 아토바스타틴 (atorvastatin)과 줄기세포를 사용하여 심근경색 환자에서의 효능 연구가 진행된 바 있다 (NCT00979758 and NCT03047772). 최근 연구결과에서 스타틴이 줄기세포의 증식을 감소시키고 세포성 노화와 세포자살을 증가시킨다는 결과가 보고되었다 [29]. 뿐만 아니라, 스타틴의 세포증식 억제 (cytostatic) 부작용은 손상 받은 심근에서 활성화, 증식, 분화, 내인성 줄기세포 모집의 남용을 불러온다. 또한, 근위축증, 횡문근 용해증, 간 손상, 2형 당뇨 같은 여러 부작용을 일으킬 수 있다 [30]. 따라서 스타틴을 심근전구세포와 병행한 임상요법은 실행하기에 앞서 용량, 기간, 잠재적인 부작용 등에 대한 더 정밀한 평가가 필요할 것으로 사료된다.

#### 2.1.2.2. 조직공학 접목

줄기세포를 이식하면 증식과 분화를 거쳐 손상된 심장에서 조직의 재생을 이룬다. 전임상 연구에서 CDCs 중 5% 미만의 세포만이 식염수 또는 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 넣어 관상동맥 내에 직접 주입했을 때 24시간 이상 생존한다고 보고하고 있다 [31]. 이러한 낮은 세포의 보존율과 생존능에 여러

가지 요인이 관여한다고 알려져 있다. 첫 번째로 임상에서 사용하는 최소 침습적인 세포 주입법인 관상동맥 내 주입법을 사용하여, 심근 내 주입(myocardial injection)보다 세포의 생존율과 보존율이 낮다. 두 번째로 이식된 세포가 죽기 쉬운 손상된 심장 내의 미세 환경과 이식된 세포들이 정착하기 위한 공간 부족과 같은 원인들이 있다. 이와 같은 요인들은 이식된 줄기세포들이 림프액이 순환하면서 이물질을 제거하는 과정을 통해 이식된 세포가 정착하지 못하고 제거되기 쉽다 [32]. 따라서 조직 재생을 위해 줄기세포를 이식했을 때, 생착능과 세포들의 생존능력을 향상시켜서 보다 나은 치료효과를 내기 위해 조직공학적인 측면에서의 연구가 많이 진행되고 있다.

### 2.1.2.3. 스캐폴드

최근 심근전구세포를 스캐폴드(scaffolds)에 심는 기술을 적용하여 심혈관 치료 효과를 나타내는 보고들이 증가하고 있다. 스캐폴드는 세포, 시그널과 함께 생체조직 재생의학의 3대 기본요소로 세포의 증식과 분화에 적합한 환경을 제공하는 역할을 한다 [33,34]. 스캐폴드가 실제 심장 조직과 유사한 미세 환경을 제공함으로써 허혈 부위 내 이식된 줄기세포가 좀 더 오래 생존할 수 있고 또한 손상 받은 심근조직을 지지해주는 환경을 제공하며, 이로서 이식된 세포의 생존율과 생착능을 증가시켜 치료의 효과를 높인다 [35]. 스캐폴드의 재료는 콜라겐, 키토산, 알지네이트 기반의 천연재료와 폴리스틸렌, 폴리락틱산 (poly-L-lactic acid), 폴리글리콜릭산(polyglycolic acid) 등의 합성고분자 등이 단독 또는 복합적으로 사용되고 있다. 스캐폴드를 제작에서의 구성성분은 매우 중요하며, 조직공학적 접근을 통해 보다 적합한 성분을 선택하여 *in vitro*에서 본래의 생체 내 세포가 사는 환경을 모사하는 것이 중요하다 [36]. 스캐폴드에는 크게 하이드로겔, 다공성 스펀지, 나노섬유가 있다. 스캐폴드를 접목한 심근줄기세포 연구는 하이드로겔을 이용한 연구가 보고되고 있다 [37,38]. 하이드로겔은 90% 이상의 수분을 함유할 수 있는 3차원 고분자 네트워크를 가진 물질 [39]. 로 최근 가장 주목 받고 있는 스캐폴드이다. 하이드로겔과 항산화 나노입자를 혼합했을 때 효과적으로 심근 내 혈류의 유입이 감소된 구역에서 활성 산소를 제거할 수 있는 결과 또한 보고되고 있다. 하이드로겔과 항산화 나노입자를 혼합하여 주입한 심근전구세포는 생체 내 산화적 손상으로부터 보호할 수 있었고, 줄기세포 이식을 통한 치료 효과를 높일 수 있었다 [40].

또한, 현재 스캐폴드를 활용한 다양한 전임상연구가 진행되고 있다. 스캐폴드에 심장줄기세포를 적용한 연구는 CDCs를 히알루론산에 기초한 하이드로겔 교차결합 물질 Hystem-C™를 함께 주입하여 심근 내로 주입 후 심장 재생에 효율 증가에 관한 보고가 있다 [37,38]. Hystem-C™는 황화 콜라겐과 공유결합으로 연결되어 있으며 이는 세포의 부착이 잘 될 수 있게 도와준다. 히알루론산은 결합조직 세포의 기질의 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan)의 구성요소로 이는 세포 운반에 있어서 매우 매력적인 수단이다. 히알루론산에

기초한 하이드로겔은 각 단위체 (monomer)의 농도와 다양한 겔화 (gelation) 시간에 따라 만들어지며 적절한 농도는 줄기세포의 카테터를 통한 운반과 증합을 가능케 한다. 콜라겐 (collagen)은 심장조직의 세포외 기질을 이루는 주요 성분이다. 게다가 히알루론산 (hyaluronan)에 기초한 하이드로겔은 생체 내 조직의 세포에서 자연적으로 만들어지는 하이알루론산 분해효소 (hyaluronidases)와 콜라겐 분해효소 (collagenases)의 작용에 따라 4-6주에 걸쳐 분해된다. 이로서 Hystem-C™는 심장조직에서 촉진시킬 수 있다 [38,41].

스캐폴드의 원리를 이용하여 만들어진 심장패치에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다 [42,43]. 3D 심장패치시스템은 심장 조직 재생을 위해 널리 연구되고 있다 [44,45]. 돼지의 심근경색 모델을 이용하여 IGF-1을 함유한 3D 패치를 통해 인간 유도만능 줄기세포 유래의 심혈관 세포를 주입하였을 때 두 배 이상 세포 이식률의 증가의 결과를 보였다. 또한 심근 벽으로 인한 스트레스, 대사작용, 수축능의 향상을 보였다. 사이토카인이 함유된 패치는 세포가 잘 정착하기 위하여 물리적 장벽을 형성하고 또한 지속적인 사이토카인의 분비가 세포의 생존능을 높이는데 기여한다 [45].

주입한 심근전구세포의 생존은 심장패치 기술에 의해 보다 향상되고 있다. 스캐폴드를 활용한 조직공학 기술을 이용하여 만든 심장조직은 환자의 심근 내에서 심근전구세포들이 조립하기 쉽게 설계된다. 또한 목표한 방법으로 생체 활성을 가진 펩타이드나 주변 분비인자들을 분비하게 한다 [46]. 대부분의 스캐폴드 기술을 이용한 방법은 효율성 측면에서 매우 좋은 성적을 보이고 있으며 심근전구세포를 적용한 임상 적용 가능성에 대한 전망도 매우 밝다.

### 2.1.2.4. 3D 바이오 프린트

3D 바이오 프린팅 기술은 현재 의학계에서 매우 각광받고 있으며 재생의학에 해당 기술 접목을 통한 발전가능성이 기대되고 있다. 3D 프린팅 기술은 원하는 구조와 형태로 제작이 가능한 장점과, 세포 배열 조절 및 세포와의 상호작용을 통해 줄기세포 미세환경을 물리적으로 구현 가능하다. 세포 외기질로 이루어진 바이오잉크를 혼합한 3D print 기술은 본래 조직의 바깥과 안의 구조를 유사하게 만들면서(mimicing) 정확히 구현된 3D 조직을 만들 수 있다 [47]. 이 기술을 이용하여 좀 더 효율적으로 스캐폴드를 제작할 수 있다. 본 연구팀에서는 세포 외기질 바이오 잉크를 이용하여 심근전구세포와 중간엽 줄기세포를 3D프린팅으로 이중 배열하고 내부에 혈관 내피성장인자를 봉합해 세포간의 상호작용 극대화를 통한 혈관 생성능을 심근경색 동물모델에서 검증하여 3D 세포 프린팅 기반의 패치형 심장전구세포 및 혈관내피세포 융합 플랫폼의 치료효과를 보고한 바 있다 [48]. 또 다른 연구에서는 젤라틴/하이루론산 매트릭스 내 심근전구세포를 3D 프린트하여 심근경색 동물모델에 이식 후 심근전구세포의 세포 생존율 증가와 분화능의 증가를 보고하였다 [49]. 뿐만 아니라 3D 프린트로 만든 스캐폴드에 인간 유도만능 줄기세포 유래 심혈관 세포를 심는 기술을 이용하여 성숙, 칼슘 신호 전달

그리고 기능적인 전기 생리학적인 통합을 촉진시켜 박동성 있는 심장패치를 만들어 낸 연구결과도 보고되고 있다 [50]. 허혈성의 심근조직에 이 세포 패치를 이식한 후에는 심기능, 심장 내 근육과 혈관 형성을 증진시키고 상대적으로 장기간 동안 세포 이식으로 인해 부작용으로 생기는 심장 재형성 (remodeling)을 방지한다 [49]는 결과를 보고했다.

전임상 연구를 바탕으로, 임상에서의 안정성이 검증된다면, 현재 의학계에서도 주목하고 괄목할만한 성과를 내고 있는 3D 바이오 프린팅기술에 심근전구세포를 활용하여 보다 효과적인 심혈관 치료가 가능할 것이다.

## 2.2. 임상시험

개방형 1상 시험인 SCIPIO (cardiac Stem Cells In Patients with Ischemic Cardiomyopathy) 연구에서 c-kit 양성 심근전구세포의 안전성과 효능을 검증하기 위해 심근경색 후 좌심실 기능 부전 (LVEF  $\leq$  40%)을 가진 16명의 환자들에게 관상동맥 우회술을 받고 4개월 후 관상동맥 내로 50-100만의 자가 c-kit 양성 심근전구세포를 주입하였다. 연구 결과 4개월이 지난 후 LVEF는 심근전구세포를 주입하기 전 평균적으로 30.3%에서 이식 후에 38.5%로 증가하였으며, 1년 후 경과 관찰에서 대조군과 비교했을 때 8명의 사람들이 좌심실 박출률이 12%가 증가한 것으로 나타났다. 이후 7명의 심장 자기공명영상 결과에서 심근경색의 크기가 4개월 후 24%, 1년 후 30% 감소한 것으로 나타났다 [51]. 또한 측분비효과 (paracrine effect)를 통해 내재성 심근줄기세포를 활성화하여 심구혈을 호전이 기존 골수유래 단핵구세포에 비해 우수한 효과를 보이는 것을 보고하였다 (골수유래 단핵구 세포 심구혈을 호전율:  $\Delta$ 3~4%, vs. 심근전구세포  $\Delta$ 7~10%).

심근경색 후 좌심실 기능 부전을 가진 환자에서 CDC를 관상동맥내로 주입하는 것에 대한 안전성과 치료 효능을 알기 위한 무작위 연구인 CADUCEUS (CArdiosphere-Derived aUto-logical stem CELls to reverse ventricUlar dySfunction)은 평균 연령 53세의 심장마비를 경험했던 25명의 환자를 대상으로 실시하였으며, 8명의 대조군 (기존의 가이드라인 치료군)과 심근경색 후 한달 반에서 3개월에 2500만개의 자가유래 CDC를 동맥을 통해 투여하는 17명의 실험군을 분류하여 수행하였다. 연구 결과, 종양 형성이나 심각한 합병증은 관찰되지 않았으며 심장의 구조적 변화(반흔 질량, 생활이 가능한 심장 질량, 국소적 수축성, 수축기 벽의 비후 정도)에서 호전되는 결과를 보였지만 EDV, ESV, LVEF에서는 변화는 나타나지 않았다. 1년 후 경과 관찰에서 반흔의 크기가 약 50% 감소하고 국소적으로 기능이 개선되는 효과를 검증하였다 [52].

1상 시험인 ALCADIA (Autologous Human Cardiac-Derived Stem Cell to Treat Ischemic Cardiomyopathy) 연구에서 관상동맥 우회술을 받은 허혈성 심질환을 가진 6명의 환자들을 대상으로 섬유아세포 기본성장인자와 함께 자가유래 CDC를 이식한 결과 좌심실 박출률이 3D 심 초음파에서 26.7%에서 35.8%으로, 자기공명영상결과 22.6%에서 34.7%으로 증가하였으며 심장 벽 모션 스코어도 17.2에서 6.6으로 감소된 결과

를 보고하였다 [53].

최근 배아줄기세포에서 유래된 심근전구세포를 이용한 임상 시험에서 NYHA Class III이며 좌심실 박출률이 26%인 환자에게 심근전구세포 투여 3개월 후 NYHA Class I으로 개선을 확인하였다. 또한 좌심실 박출률이 36%으로 증가하였으며 수축성 또한 증가한 것으로 나타났고 부정맥, 종양 형성과 같은 부작용은 나타나지 않음을 보고하였다.

1상 시험인 DYNAMIC (Dilated Cardiomyopathy Intervention with Allogeneic Myocardially-regenerative Cells)에서 NYHA III이고 좌심실 수축률이 35% 이하인 확장성 심근병증을 가진 환자들을 대상으로 동종의 CDC를 관상동맥 내로 투여하였을 때 6개월 후 NYHA II로 개선되었으며 심실의 기능과 크기가 호전되는 결과를 나타내었다고 보고하고 있다 [54].

심장 기능을 개선하기 위해 줄기세포를 이용한 치료는 선천성 심질환 (congenital heart disease, CHD)의 다양한 타입 중 좌심실형성부전증후군 (hypoplastic left heart syndrome, HLHS)에서 주로 연구되었다 [55]. 처음으로 시행된 1상 시험인 TICAP (Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells)는 HLHS를 가진 소아를 대상으로 stage II 또는 III의 고식적 수술 후 4주 또는 5주 후에 7명의 소아들에게 관상동맥 내로 자가 CDC를 주입한 결과 심각한 부작용 없이 우심실 박출률이 증가되었으며 3년 동안의 경과 관찰에서 세포 성장이 향상되고 심부전 상태가 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 [56]. TICAP 연구의 초기 결과는 2상 시험인 PERSEUS (Cardiac Progenitor Cell infusion to treat univentricular heart disease)을 통해서 검증되었다. PERSEUS의 연구에서 단일 심실을 가진 환자에서 수술 또는 단계적 재건 이후에 관상동맥 내로 CDC를 투입하는 환자들을 study A로 하고 고식적 치료 후에 늦게 CDC 투여를 받는 그룹을 study B로 하여 일차 결과는 3개월 후 경과 관찰을 통해 심장 기능이 향상되었는지를 평가하였고 이차 결과는 1년 이후 경과 관찰을 통해 심실의 기능, 심부전 상태, 체세포 성장, 삶의 질을 평가하였다. 연구 결과, 3개월 후 CDC를 투여 받은 그룹에서 심실 기능이 향상된 것을 관찰하였고 study B 그룹에서도 기준과 비교하여 심실 기능이 향상된 것을 확인하였다. 1년 후 경과 관찰에서 CDC 투여를 한 환자들에서 심실 기능이 향상되고 인슐린유사성장인자와 간세포 성장인자와 같은 국소적인 인자들의 증가로 인해 향상된 체세포 성장을 보고하였으며, 심부전 상태가 호전되고 심장의 섬유화의 감소된 결과를 발표하였다 [57].

3상 시험인 APOLLON (cardiac stem/pro-genitor cell infusion in univentricular physiology: NCT02781922)은 단일 심실을 가진 40명의 환자들을 대상으로 12개월 동안 CDC를 투여한 그룹과 대조군 사이에 치료 효능을 비교하는 임상 시험을 3개의 어린이 병원에서 진행 중에 있다 [58]. 이 외에도 HLHS, DCM, and Duchenne muscular dystrophy를 가진 환자들에서 치료적 안전성과 효능을 알아보기 위한 연구들이 진행되고 있다.

### 3. CONCLUSION

심근전구세포는 심근 손상 시 손상부위로 이동, 증식 및 분화에 관여하며 심근세포 재생에 기여한다. 최근 여러 전임상 및 임상연구결과에서 경색부위 조직에서 심근세포 및 혈관세포로 분화할 뿐만 아니라 내재성 심근줄기세포를 활성화 하며, 좌심실 구혈 및 박출률의 증가, 심기능의 증가가 보고되고 있다. 심근 전구세포는 심혈관 재생을 위해 사용가능한 우수한 세포임이 분명하나 보다 효과적인 심근 및 심혈관 재생을 위하여 손상된 조직의 허혈 상태 및 염증 등 다양한 미세환경에 의해 기존 줄기세포 치료기술이 보이는 낮은 세포 전달 효율 및 생착률 감소의 한계를 극복하고자 하는 연구의 필요성이 대두된다. 현재까지 줄기세포자체의 기능 증진을 위해 화학적 처리 및 물리적인 자극에 의한 다양한 세포 프라이밍 연구들이 보고되고 있으며, 세포전달 효율성 및 생착률 향상을 위해 세포간의 상호작용을 고려한 생화학적 및 물리적인 미세환경을 다양한 플랫폼을 통해 구축해줌으로써 줄기세포를 활용한 세포치료제의 효율을 증진시키고자 하는 연구들이 보고되고 있다. 최근 바이오 잉크를 활용한 3D 프린팅 기술을 접목한 세포 이식체가 심근경색 동물모델 내 심근재생효과를 입증된 바 있다. 바이오 잉크는 물리적 생물학적으로 안정성이 높고, 줄기세포가 생체 내 효율적으로 증식할 수 있는 물리적 환경을 제공할 수 있는 이점이 있다. 현재까지 보고된 다양한 세포 프라이밍 방법을 접목하여, 줄기세포의 분열능, 분화능, 생존능을 생리학적/화학적 자극 등의 프라이밍을 통해 강화시킨 후, 바이오 잉크를 활용한 3D프린팅 기술을 적용하여 생체 분해능이 좋은 나노파이버 (nano fiber)를 활용한 패치 (patch)를 제작하여 생체적합성 환경모사를 통해 투여된 세포가 활성을 나타낼 수 있는 환경을 조성한다면 기존 줄기세포의 세포전달 효율성 및 생착률 향상을 통해 세포치료제의 효율을 보다 증진시킬 수 있을 것이라 사려된다. 세포 프라이밍을 위한 연구들의 조합을 통해 줄기세포의 생체 적합성 환경 및 기능향상의 시너지 효과가 발휘된다면, 심근재생을 위한 효과적인 치료전략이 될 수 있을 것이라 전망된다.

### Acknowledgements

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었음.

### REFERENCES

1. Benjamin, E. J., S. S. Virani, C. W. Callaway, A. M. Chamberlain, A. R. Chang, S. Cheng, et al. (2018) Heart disease and stroke statistics-2018 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 137: e67-e492.
2. Roger, V. L., S. A. Weston, M. M. Redfield, J. P. Hellermann-

- Homan, J. Killian, B. P. Yawn et al. (2004) Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 292: 344-350.
3. Beltrami, A. P., L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, et al. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-776.
4. Bearzi, C., M. Rota, T. Hosoda, J. Tillmanns, A. Nascimbene, A. De Angelis, et al. (2007) Human cardiac stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14068-14073.
5. Henning, R. J. (2011) Stem cells in cardiac repair. *Future Cardiol.* 7: 99-117.
6. Laugwitz, K. L., A. Moretti, J. Lam, P. Gruber, Y. Chen, S. Woodward, et al. (2005) Postnatal *Isl1*<sup>+</sup> cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433: 647-653.
7. Le, T. and J. Chong (2016) Cardiac progenitor cells for heart repair. *Cell Death Discov.* 2: 16052.
8. Matsuura, K., T. Nagai, N. Nishigaki, T. Oyama, J. Nishi, H. Wada, et al. (2004) Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 11384-11391.
9. Rosova, I., M. Dao, B. Capoccia, D. Link, and J. A. Nolte (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26: 2173-2182.
10. Dall, C., M. Khan, C. A. Chen, and M. G. Angelos (2016) Oxygen cycling to improve survival of stem cells for myocardial repair: A review. *Life Sci.* 153: 124-131.
11. Carmeliet, P., Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, et al. (1998) Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490.
12. Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148: 399-408.
13. Hu, X., S. P. Yu, J. L. Fraser, Z. Lu, M. E. Ogle, J. A. Wang, et al. (2008) Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135: 799-808.
14. Tang, Y. L., W. Zhu, M. Cheng, L. Chen, J. Zhang, T. Sun, et al. (2009) Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ. Res.* 104: 1209-1216.
15. Hu, S., G. Yan, H. Xu, W. He, Z. Liu, and G. Ma (2014) Hypoxic preconditioning increases survival of cardiac progenitor cells via the p115 kinase-mediated anti-apoptotic effect. *Circ. J.* 78: 724-731.
16. Xu, R., Y. Sun, Z. Chen, Y. Yao, and G. Ma (2016) Hypoxic preconditioning inhibits hypoxia-induced apoptosis of cardiac progenitor cells via the PI3K/Akt-DNMT1-p53 pathway. *Sci. Rep.* 6: 30922.
17. Hou, J., L. Wang, H. Long, H. Wu, Q. Wu, T. Zhong, et al. (2017) Hypoxia preconditioning promotes cardiac stem cell survival and cardiogenic differentiation in vitro involving activation of the HIF-1 $\alpha$ /apelin/APJ axis. *Stem Cell Res. Ther.* 8: 215.
18. Zhang, M., D. Methot, V. Poppa, Y. Fujio, K. Walsh, and C. E. Murry (2001) Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: Graft cell death and anti-death strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 907-921.

19. Feng, Y., W. Huang, W. Meng, A. G. Jegga, Y. Wang, W. Cai, et al. (2014) Heat shock improves Sca-1<sup>+</sup> stem cell survival and directs ischemic cardiomyocytes toward a pro-survival phenotype via exosomal transfer: a critical role for HSF1/miR-34a/HSP70 pathway. *Stem Cells* 32: 462-472.
20. Loganathan, A., J. E. Linley, I. Rajput, M. Hunter, J. P. Lodge, and G. I. Sandle (2011) Basolateral potassium (IKCa) channel inhibition prevents increased colonic permeability induced by chemical hypoxia. *Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300: G146-153.
21. Ali, A., M. A. Akhter, K. Haneef, I. Khan, N. Naeem, R. Habib, et al. (2015) Dinitrophenol modulates gene expression levels of angiogenic, cell survival and cardiomyogenic factors in bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Gene* 555: 448-457.
22. Khan, I., A. Ali, M. A. Akhter, N. Naeem, M. A. Chotani, T. Mustafa, et al. (2016) Preconditioning of mesenchymal stem cells with 2,4-dinitrophenol improves cardiac function in infarcted rats. *Life Sci.* 162: 60-69.
23. Mehrabani, M., M. Najafi, T. Kamarul, K. Mansouri, M. Iranpour, M. H. Nematollahi, et al. (2015) Deferoxamine preconditioning to restore impaired HIF-1 $\alpha$ -mediated angiogenic mechanisms in adipose-derived stem cells from STZ-induced type 1 diabetic rats. *Cell Prolif.* 48: 532-549.
24. Xu, Y., X. Hu, L. Wang, Z. Jiang, X. Liu, H. Yu, et al. (2013) Transplantation of preconditioned bone marrow mononuclear cells by AT2R stimulation improves infarcted heart function via enhanced cardiac mobilization of implanted cells. *Int. J. Cardiol.* 168: 4551-4554.
25. Oishi, Y., R. Ozono, M. Yoshizumi, M. Akishita, M. Horiuchi, and T. Oshima (2006) AT2 receptor mediates the cardioprotective effects of AT1 receptor antagonist in post-myocardial infarction remodeling. *Life Sci.* 80: 82-88.
26. Cai, A., R. Qiu, L. Li, D. Zheng, Y. Dong, D. Yu, et al. (2013) Atorvastatin treatment of rats with ischemia-reperfusion injury improves adipose-derived mesenchymal stem cell migration and survival via the SDF-1 $\alpha$ /CXCR-4 axis. *PLoS One* 8: e79100.
27. Wang, A., F. Shen, Y. Liang, and J. Wang (2011) Marrow-derived MSCs and atorvastatin improve cardiac function in rat model of AMI. *Int. J. Cardiol.* 150: 28-32.
28. Yang, Y. J., H. Y. Qian, J. Huang, Y. J. Geng, R. L. Gao, K. F. Dou, et al. (2008) Atorvastatin treatment improves survival and effects of implanted mesenchymal stem cells in post-infarct swine hearts. *Eur. Heart J.* 29: 1578-1590.
29. Izadpanah, R., D. J. Schachtele, A. B. Pfnur, D. Lin, D. P. Slakey, P. J. Kadowitz, et al. (2015) The impact of statins on biological characteristics of stem cells provides a novel explanation for their pleiotropic beneficial and adverse clinical effects. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 309: C522-531.
30. Allen, S. C. and C. D. S. Mamotte (2017) Pleiotropic and adverse effects of statins-do epigenetics play a role? *J. Pharmacol Exp. Ther.* 362: 319-326.
31. Johnston, P. V., T. Sasano, K. Mills, R. Evers, S. T. Lee, R. R. Smith, et al. (2009) Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 120: 1075-1083.
32. Cheng, K., A. Blusztajn, D. Shen, T. S. Li, B. Sun, G. Galang, et al. (2012) Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomaterials* 33: 5317-5324.
33. Christman, K. L., H. H. Fok, R. E. Sievers, Q. Fang, and R. J. Lee (2004) Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Engineering* 10: 403-409.
34. Meng, X., P. Leslie, Y. Zhang, and J. Dong (2014) Stem cells in a three-dimensional scaffold environment. *Springerplus* 3: 80.
35. Xu, G., X. Wang, C. Deng, X. Teng, E. J. Suuronen, Z. Shen, et al. (2015) Injectable biodegradable hybrid hydrogels based on thiolated collagen and oligo(acryloyl carbonate)-poly(ethylene glycol)-oligo(acryloyl carbonate) copolymer for functional cardiac regeneration. *Acta Biomater.* 15: 55-64.
36. Mauretti, A., S. Spaans, N. A. M. Bax, C. Sahlgren and C. V. C. Bouten (2017) Cardiac progenitor cells and the interplay with their microenvironment. *Stem Cells Int.* 2017: 7471582.
37. Cheng, K., A. Blusztajn, D. Shen, T.-S. Li, B. Sun, G. Galang, et al. (2012) Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomaterials* 33: 5317-5324.
38. Menasché, P., O. Alfieri, S. Janssens, W. McKenna, H. Reichen-spurner, L. Trinquart, et al. (2008) The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117: 1189-1200.
39. El-Sherbiny, I. M. and M. H. Yacoub (2013) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2013: 316-342.
40. Hao, T., J. Li, F. Yao, D. Dong, Y. Wang, B. Yang, and C. Wang (2017) Injectable fullerene/alginate hydrogel for suppression of oxidative stress damage in brown adipose-derived stem cells and cardiac repair. *ACS Nano.* 11: 5474-5488.
41. Shu X. Z., S. Ahmad, Y. Liu, and G. D. Prestwich (2006) Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79: 902-912.
42. Wang B., A. Borazjani, M. Tahai, A. L. de Jongh Curry, D. T. Simionescu, et al. (2010) Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94: 1100-1110.
43. Wei H.-J., C.-H. Chen, W.-Y. Lee, I. Chiu, S.-M. Hwang, et al. (2008) Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair. *Biomaterials* 29: 3547-3556.
44. Emmert M. Y., R. W. Hitchcock, and S. P. Hoerstrup (2014) Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration. *Advanced drug delivery reviews* 69: 254-269.
45. Ye L., Y.-H. Chang, Q. Xiong, P. Zhang, L. Zhang, et al. (2014) Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell* 15: 750-761.
46. Feric N. T. and M. Radisic (2016) Strategies and challenges to myocardial replacement therapy. *Stem Cells Translational Medicine* 5:

- 410-416.
47. Derby B. (2012) Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science* 338: 921-926.
  48. Jang J., H.-J. Park, S.-W. Kim, H. Kim, J. Y. Park, et al. (2017) 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials* 112: 264-274.
  49. Gaetani R., D. A. Feyen, V. Verhage, R. Slaats, E. Messina, et al. (2015) Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials* 61: 339-348.
  50. Gao L., M. Kupfer, J. Jung, L. Yang, P. Zhang, et al. (2017) Myocardial tissue engineering with cells derived from human induced-pluripotent stem cells and a native-like, high-resolution, 3-dimensionally printed scaffold. *Circulation research*. CIRCRESAHA 116: 310277.
  51. Bolli R., A. R. Chugh, D. D'Amario, J. H. Loughran, M. F. Stoddard, et al. (2011) Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 378: 1847-1857.
  52. Makkar R. R., R. R. Smith, K. Cheng, K. Malliaras, L. E. Thomson, et al. (2012) Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): A prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 379: 895-904.
  53. Takehara N., T. Ogata, M. Nakata, D. Kami, T. Nakamura, et al. (2012) The alcadia (autologous human cardiac-derived stem cell to treat ischemic cardiomyopathy) trial. *Circulation* 126: 2776-2799.
  54. Menasché P., V. Vanneaux, A. Hagège, A. Bel, B. Cholley, et al. (2015) Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: First clinical case report. *European Heart Journal* 36: 2011-2017.
  55. Ishigami S., S. Ohtsuki, S. Tarui, D. Ousaka, T. Eitoku, et al. (2014) Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome (TICAP): A prospective phase 1 controlled trial. *Circulation Research* CIRCRESAHA 114: 304671.
  56. Tarui S., S. Ishigami, D. Ousaka, S. Kasahara, S. Ohtsuki, et al. (2015) Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome: Three-year follow-up of the transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in patients with single-ventricle physiology (TICAP) trial. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 150: 1198-1208.
  57. Ishigami S., S. Ohtsuki, T. Eitoku, D. Ousaka, M. Kondo, et al. (2017) Intracoronary cardiac progenitor cells in single ventricle physiology: The PERSEUS randomized phase 2 trial. *Circulation Research* CIRCRESAHA 116:310253.
  58. Oh H., H. Ito, and S. Sano (2016) Challenges to success in heart failure: cardiac cell therapies in patients with heart diseases. *Journal of Cardiology* 68: 361-367.