

알츠하이머병 환자의 말초혈액 내 CD34 양성세포 수치의 변화

이순태 · 주 건 · 정근화 · 심지영
오민정 · 박명희* · 김만호

서울대학교병원 신경과, 진단검사의학과*

Received : April 30, 2010
Revision received : July 9, 2010
Accepted : July 9, 2010

Address for correspondence

Manho Kim, M.D.
Department of Neurology, Seoul National University
Hospital, 28 Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul
110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-2193
Fax: +82-2-3672-7553
E-mail: kimmanho@snu.ac.kr

*This work was supported by grants from the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare (A092058), FPR08K1301-02210, WCU Neurocytomics (800-20080848), and SNUH grant (0420060470, 620062199) and Korea Dementia Association and Eisai Korea (2006, to S-T.L.), South Korea.

Analysis of Circulating CD34-positive Cells in Alzheimer's Disease

Soon-Tae Lee, M.D., Kon Chu, M.D., Keun-Hwa Jung, M.D., Ji-Young Sim, B.S.,
Min-Jeong Oh, B.S., Myoung Hee Park, M.D.*, Manho Kim, M.D.

Departments of Neurology and Laboratory Medicine*, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Background: Circulating CD34-positive cells constitute the endothelial progenitor cell population, differentiate into endothelial cells, and contribute to mammalian brain regeneration. Given the vascular endothelial pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), we investigated the levels of CD34+ cells in AD patients. **Methods:** Sixty-six consecutive patients with probable AD (clinical dementia rating scale 1) and 22 age-matched control subjects were enrolled. CD34+ cells were counted in their peripheral blood samples and analyzed in comparison with their clinical characteristics. **Results:** The AD patients had significantly lower numbers of CD34-positive cells than control subjects. However, the number of CD34-positive cells was not correlated with clinical characteristics of AD patients, including Mini Mental State Examination (MMSE) score, Framingham risk score, body-mass index, and changes in MMSE during 3 months. **Conclusions:** AD patients have diminished circulating CD34-positive cells, suggesting the reduced regenerative support from the peripheral blood in AD patients.

Key Words: Alzheimer's disease, CD34, Endothelial progenitor cells, Biomarker, Mini-mental state examination

서 론

알츠하이머병(Alzheimer disease, AD)의 병리기전에, 혈관성 병리기전과 혈액학적 변화가 질병 진행에 관여할 것으로 최근 주목되고 있다[1, 2]. AD 환자의 부검 뇌에서 모세혈관의 밀도가 감소되고, 혈관이 위축되거나, 혈관내피 세포가 노화되는 등의 변화가 관찰되고, 환자들에게서는 뇌내 관류의 장애가 측정되기도 한다[2-4]. 그리고, 각종 심혈관계 위험인자들은 AD의 위험인자로도 잘 알려져 있다[5]. 따라서, 혈관계의 노화와 기능 부전은 AD의 발생이나 진행에 관여될 것으로 추정된다. 특히 혈관내피세포의 노화는 혈액-뇌 장벽(Blood-Brain Barrier)을 통한 아밀로이드 베타(amyloid β) 펩타이드의 제거 기능에 장애를 유발하여, 뇌내 아밀로이드 베타의 침착을 촉진할 수 있다[2].

한편 혈관 내피세포는 혈액 속에 순환하는 혈관내피 전구세포(endothelial progenitor cells)에 의해 그 기능이 유지되고, 노화된 혈관내피세포는 혈관 내피전구세포에 의해 교체되면서

혈관 기능의 항상성이 유지된다[6]. 혈관내피 전구세포는 1997년에 혈중에 존재하는 CD34 양성 세포가 혈관내피세포로 분화하는 것이 알려지면서 연구가 시작되었다[7]. 이후 연구를 통해 CD34 양성의 특성 외에도 KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2), CD133 등의 추가적인 세포 표지자들이 제안되었으나[6], CD34 세포는 조혈 모세포로서의 기능 외에도, 신경퇴행질환에서 신경계 세포로 변형 분화(transdifferentiation) 할 수 있고 포유류 뇌의 조직 재생에도 기여하는 것으로 알려지면서, CD34는 혈액 내 모세포의 가장 중요한 표지자로 고려되고 있으며, 신경세포 신생이나 혈관재생 치료의 주요 타겟으로 거론되고 있다[8, 9].

AD 환자에서 CD34 수치의 변화에 대해서는 몇몇 이전 소규모 연구에서 규명하고자 시도되었었다. 그러나 독일과 일본 등에서 진행된 이들 연구 결과에서는 AD 환자에서 혈중 CD34 세포의 수치가 감소하기도 하고 증가하기도 하는 등 일관되지 않은 결과를 나타내었다[10-12]. 연구 결과가 일관되지 않음으로써 결과 해석과 병리가설 제시에 혼란이 있는 상황이다. 본 저자들

은 AD 환자의 말초 혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)를 배양하여 콜로니 형태로 자라는 circulating angiogenic cell을 측정된 연구를 진행한 적이 있고, AD 환자에서 angiogenic cell이 감소되어 있는 것을 보고한 바 있다(AD=55 patients)[13]. 따라서 AD 환자에서 전체적인 혈관의 항상성과 재생 기능은 저하된 것으로 보여지나, CD34 양성 세포에 있어서는 그 수치가 감소함으로써 질병을 가속하는지, 아니면 보상기전으로 증가되어 있는지에 대해 분명한 결론이 나지 않고 있다. 따라서 이번 연구에서는 더 많은 수의 한국인 AD 환자 그룹을 이용하여 CD34 양성 세포가 환자군에서 증가하였는지 감소하였는지를 직접 확인하고, 그 변화의 임상적 의미가 관찰되는지 확인하고자 하였다.

대상과 방법

1. 대상

연구자 소속 병원의 신경과 외래에 내원하는 환자 중에서 NINCDS-ADRDA 진단기준에 따른 probable AD에 부합하는 연속적인 환자를 모집하였으며[14], Clinical dementia rating scale (CDR)이 1점인 환자를 대상으로 하였다. 대조군으로는 같은 외래에 내원하는 사람 중에 신경학적 이상이 없는 것으로 밝혀진 대상자들을 AD 환자군과 나이를 맞추어(나이차이 \pm 4세 이내) 모집하였다. 병원단위 연구의 특성상 질병이 없는 대조군 모집의 어려움을 고려하여 대조군:AD 환자군=1:3의 비율로 모집하였다. AD 이외에 다른 신경계 질환이 있는 경우 본 연구에서 제외하였다. 모든 대상자들은 연구참여에 대해 서면 동의하였고, 본 연구는 연구자 소속기관의 연구 윤리 심의를 통과하였다.

모집된 대상자들은 임상 병력, 신경학적 진찰, MMSE와 CDR을 포함한 인지기능 검사, 일반 혈액검사를 시행하였고, Framingham risk score 계산을 통해 심혈관 질환 위험도를 계산하였다. AD 환자들은 3개월 뒤에 다시 MMSE를 시행하도록 하였다.

2. 말초혈액 내 CD34 양성 세포 측정

혈액을 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 튜브에 채혈한 뒤 100 μ L의 혈액에 20 μ L의 Stem-Kit reagent (Stem-Kit™ Reagents, Immunotech/Beckman Coulter, France)를 첨가하였다. 2 mL의 1X NH₄Cl lysing solution을 첨가하고 실온에서 10분간 유지하였다. Internal reference

particles로서, 100 μ L의 Stem-Count fluorospheres를 첨가한 뒤, FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 장비를 이용하여, 염색된 세포 수를 Flow cytometry 방식으로 측정하고, CellQuest software (BD Biosciences)를 이용하여 분석을 시행하였다.

3. 통계 분석

수치는 평균 \pm 표준 편차로 표현하였다. 두 그룹 간 비교에 있어서는 연속 변수일 경우 Student's *t*-test를, 비모수적 변수일 경우 chi-square test를 사용하였다. 상관도 분석에서는 이변량 상관 분석을 사용하였고, 연속 변수들 간의 관계분석을 위하여 Pearson's 상관계수를 구하였다. 통계분석에 SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였고, *p*값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. AD에서 CD34 양성 세포의 수치 변화

본 연구를 위하여 대조군 22명 AD 환자군 66명이 모집되었다. 대상군의 특성은 Table 1에 정리되어 있다. 대조군과 AD 환자군 사이에는 나이, 성별, 심혈관 위험인자, Body-mass index (BMI), Total cholesterol 수치, 약물 복용력의 유의한 차이가 없었다. AD 환자군이 대조군에 비해 MMSE가 낮게 나타났다 (Table 1).

CD34 양성 세포의 측정값 비교에서 AD 환자군이 대조군에 비해 낮은 수치를 보였다. μ L당 개수로 표현하였을 경우, 대조군은 1.35 ± 0.61 per μ L, AD 환자군은 0.97 ± 0.54 per μ L의 수치를 보였다($p=0.006$; Fig. 1A). PBMC에서 차지하는 CD34 양성 세포의 비율로 표현하였을 경우에도, 대조군은 $0.058 \pm 0.026\%$, AD 환자군은 $0.041 \pm 0.023\%$ 의 수치를 보여서 ($p=0.006$; Fig. 1B), AD 환자군이 말초혈액 내 CD34 양성세포가 유의하게 낮은 것으로 나타났다.

2. AD에서 CD34 양성 세포의 수치와 임상적 특성과의 상관성

CD34 양성세포의 수치가 환자군의 임상적 특성에 영향을 주고 있는지 알아보기 위하여, AD 환자군을 대상으로 이변량 상

관 분석을 시행하였다. CD34 양성세포의 수치(% to PBMC)는 나이, MMSE, BMI, Framingham risk score와 유의한 상관성을 보이지 못하였다. 약물 복용력이나, 심혈관 질환 위험인자,

Table 1. Characteristics of Alzheimer's disease (AD) patients and controls subjects

Characteristics	Controls (n=22)	AD patients (n=66)	p value
Age (yr)	61.9±8.4	62.9±8.0	0.676
Male gender-no. (%)	6 (27.3)	18 (27.3)	1.000
MMSE	27.2±1.7	21.0±3.6	<0.001
CDR	0.0±0.0	1.0±0.0	-
Medical history-no. (%)			
Hypertension	2 (9.1)	18 (15.0)	0.078
Diabetes mellitus	2 (9.1)	6 (9.1)	1.000
Hyperlipidemia	4 (18.2)	5 (7.6)	0.155
Current smoking	2 (9.1)	7 (10.6)	0.839
Coronary artery disease	2 (9.1)	2 (3.0)	0.237
Previous symptomatic stroke	0 (0)	6 (9.1)	0.143
Body-mass index	23.5±2.2	23.8±2.9	0.712
Total cholesterol	204±48	198±36	0.533
Framingham risk score	6.4±4.1	7.3±3.7	0.299
Current medication-no. (%)			
ACE inhibitors/ATR-blockers	2 (9.1)	3 (4.5)	0.425
Calcium-channel blockers	2 (9.1)	3 (4.5)	0.425
Statins	1 (4.5)	1 (1.5)	0.409
Anti-platelet agent	4 (18.2)	10 (15.2)	0.736
Diabetes mellitus	2 (9.1)	6 (9.1)	1.000

The significance of differences between groups (*p* value) was assessed by Student's *t*-test for continuous values or a chi-square test for categorical values.

ACE, angiotensin converting enzyme; ATR, angiotensin receptor; CDR, clinical dementia rating scale; MMSE, mini mental state examination.

이전 뇌졸중 병력(symptomatic stroke)과의 상관성도 나타나지 않았다. AD 환자들은 acetylcholine esterase inhibitor가 처방되었고 3개월 뒤 내원하여 다시 MMSE를 검사받도록 하였다. 이때 66명의 환자 중에 23명이 유효하게 검사되었다. 이들 환자들에서 CD34 양성 세포의 수치와 이후 3개월간의 MMSE 변화량과의 상관관계는 관찰되지 않았다. 따라서 CD34 양성 세포가 AD 환자군에서 저하되어 있으나, 임상 지표와의 상관성은 본 연구에서 확인할 수는 없었다.

고 찰

본 연구에서는 AD 환자의 말초혈액 내 CD34 양성 전구세포의 수치가 변화되었는지를 연구하였고, 그 결과 대조군에 비해 유의한 감소경향이 있음을 확인하였다. 이는 AD 환자들은 혈중 내 CD34 수치의 감소로 인해, 조혈, 혈관재생, 조직세포 재생의 기능이 감소되어 있을 가능성을 시사한다.

이전 몇몇 연구에서 CD34 양성 세포의 수치가 AD 환자에서 증감이 다양하게 관찰되었었다[10-12]. 독일에서 진행된 한 연구에서는 AD 환자에서 뇌척수액 내 Aβ42가 감소함에 따라 CD34 양성 세포의 숫자가 감소하는 것이 보고되었다(AD=12 patients)[10]. 그러나 일본에서 진행된 연구에서는 AD에서 대조군에 비해 CD34 수치의 변화가 없는 것으로 관찰되었고, 다만 혈관성 치매 환자에서만 저하되어 있다고 보고하였다(AD=23 patients)[11]. 그러나 최근 다른 독일 연구팀의 결과에서는 AD

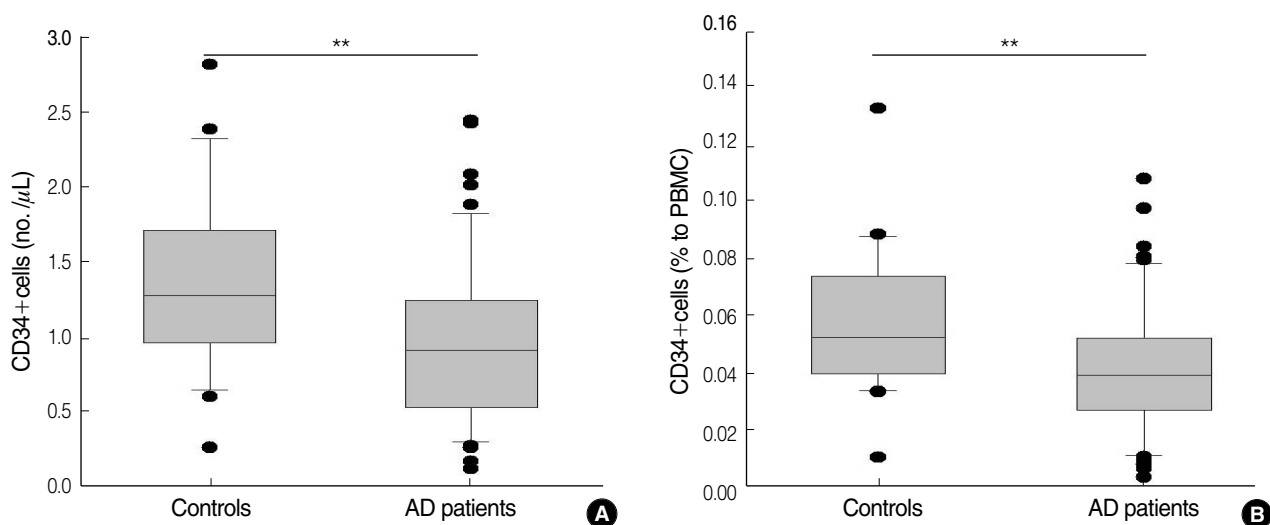


Fig. 1. Peripheral blood CD34 cell count in AD patients and control subjects. AD patients had lower CD34 cell count than controls in the absolute cell count (μL) (A), and % ratio to PBMC (B). The box-plot shows median (line), interquartile ranges (boxes), 5% to 95% percentiles (whiskers), and outliers (dots). ** $p<0.01$.

환자군에서 오히려 CD34 양성 세포가 증가하는 경향을 관찰하였다고 보고하였다(AD=28 patients)[12]. 이들 연구들은 대상 환자 수가 적고, 환자군이 균일하지 못한 단점을 갖고 있었다. 본 연구에서는 더 많은 AD 환자를 대상으로 연구하였고, CDR=1의 비교적 일정한 AD 환자에 맞춘 대조군을 분석함으로써, 통계적 유의성 지표도 더욱 뚜렷한 차이를 보였다.

심혈관 질환 연구에서는 CD34 양성 세포가 감소하였을 경우 관상동맥 질환의 발생이 증가하고[15], 말초혈액 내 CD34 세포를 수집하여 급성 관상동맥 질환의 혈관에 투여할 경우 좌심실의 수축기능을 호전시키는 것으로 보고된 적이 있다[16]. 또한 혈중 CD34 세포의 숫자는 만성 저관류(chronic hypoperfusion) 상태에 있는 뇌영역의 혈류량과 비례한다는 결과가 제시되어 있다[17]. 따라서 CD34 세포는 혈관내피 전구세포의 중요 표지자이면서, 또한 혈관 기능 유지 및 재생에 관여하여 각종 혈관질환의 병리 기전 억제에 관련될 수 있는 것으로 생각된다. 한편, AD의 병리 기전에도 아밀로이드 베타가 혈액-뇌 장벽(BBB)을 통해 제거되는 기전이 중요할 것으로 보인다[2]. 혈관내피세포에는 혈중의 아밀로이드 베타를 뇌내로 들여오는 receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)와 뇌내 아밀로이드 베타를 혈중으로 배출하는 LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein)와 같은 수송체들이 분포하여 아밀로이드 베타의 뇌내 항상성에 기여하고 있는데, AD의 경우 RAGE가 증가하고, LRP가 감소하는 식의, 아밀로이드 베타의 제거 장애가 유발되는 방향으로 혈관내피세포의 기능 부전이 일어난다[2]. 따라서 본 연구 결과와 같이 혈중 전구세포가 수적으로 부족해지는 상황은 혈관 내피 세포의 재생에 부정적인 영향을 줄 가능성이 있으며, 이 부분에 대해서는 후속 연구를 통해 규명할 필요가 있다. 말초 혈액의 혈관 내피 전구세포를 증가시키는 방법으로 insulin-like growth factor-1이나 운동, 스타틴 계열 약물들이 알려져 있고, 이들은 AD의 병리기전 억제에도 관여되어 있는 것으로 생각하므로, 향후 혈관내피전구세포를 치료적 목적으로 응용할 수도 있을 것으로 기대된다[18, 19].

AD 환자의 혈중에서 CD34 세포가 감소한 것이 질병의 원인인지 질병 진행의 결과인지는 본 연구의 결과만으로는 확인할 수 없었다. 또한 CD34 양성 세포의 수치는 임상적 지표와 상관성을 보이지 않았다. 나이, 체질량 지표, Framingham risk score뿐만 아니라, MMSE 와도 상관성이 없는 것으로 관찰되었다. 특히 이후 3개월간의 MMSE 변화량과도 뚜렷한 상관성은 관찰되지 않았다. 그러나 연구 대상자들의 일관성 유지를 위해 CDR이 1점인 환자들을 대상으로 진행하였기 때문에, MMSE

의 높고 낮음이 질병의 진행을 반영하기보다는, 개별 환자의 병전 인지기능 수준에 따라 결정되었을 가능성을 고려해야 하며, acetylcholine esterase inhibitor를 복용하고 나서 측정된 MMSE이기 때문에 인지기능과 CD34와의 직접적인 상관성을 확인하고자 한다면 다르게 디자인된 연구가 필요하다. 이전 뇌졸중의 병력과 다른 심혈관 위험 인자가 AD 환자군과 대조군 사이에서 통계적으로 유의한 차이가 나지 않았더라 하더라도, AD 환자군에서 절대 수치는 AD 환자군에서 높게 관찰되는 부분이 있기 때문에, 이런 점이 CD34 세포의 수치를 낮추는 데 영향을 주었을 가능성은 남아 있다. 특히 AD 환자군들은 무증상 뇌경색(Silent brain lesion)이 있을 가능성이 있기 때문에 [20], 이런 부분까지 그룹 간 차이가 있는지 확인해볼 필요가 있다. 따라서 CD34 수치가 생물학적 표지자가 되는지 확인하기 위해서는, 경도 인지장애(mild cognitive impairment) 환자들을 포함하여 다양한 정도의 AD 환자군을 대상으로, 질병의 진행에 따라 변하는지, 예후 인자로서 가치가 있는지 등을 더 큰 집단에서 충분한 추적 기간 후에 분석하여야 할 것이다. 이때는 MMSE와 같은 간단한 환자의 임상 스케일만을 비교하는 것에서 확장하여 다양한 인지기능 평가와 분석이 동반되어야 할 것이다. 또한 CD34의 이상 정도가 환자 뇌척수액 내의 아밀로이드 베타 수치와 상관성을 가지고 변하는지 여부까지 분석한다면 혈중 CD34세포가 아밀로이드 베타 병리 기전에 미치는 영향에 대해 규명하는 데 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. Benarroch EE. Neurovascular unit dysfunction: a vascular component of Alzheimer disease? *Neurology* 2007; 68: 1730-2.
2. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005; 28: 202-8.
3. Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2008; 18: 253-66.
4. Lee ST, Jung KH, Lee YS. Decreased vasomotor reactivity in Alzheimer's disease. *J Clin Neurol* 2007; 3: 18-23.
5. Breteler MM. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 153-60.
6. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:

- 1185-9.
7. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
 8. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-82.
 9. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 2004; 363: 1432-7.
 10. Maler JM, Spitzer P, Lewczuk P, Kornhuber J, Herrmann M, Wiltfang J. Decreased circulating cd34(+) stem cells in early alzheimer's disease: Evidence for a deficient hematopoietic brain support? *Mol Psychiatry* 2006; 11: 1113-5.
 11. Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, et al. Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 445-9.
 12. Stellos K, Panagiota V, Sachsenmaier S, Trunk T, Straten G, Leyhe T, et al. Increased circulating progenitor cells in Alzheimer's disease patients with moderate to severe dementia: evidence for vascular repair and tissue regeneration? *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 591-600.
 13. Lee ST, Chu K, Jung KH, Park HK, Kim DH, Bahn JJ, et al. Reduced circulating angiogenic cells in Alzheimer disease *Neurology* 2009; 72: 1858-63.
 14. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
 15. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111: 2981-7.
 16. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
 17. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004; 109: 2972-5.
 18. Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res* 2007; 100: 434-43.
 19. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391-7.
 20. Song IU, Kim JS, Kim YI, Eah KY, Lee KS. Clinical significance of silent cerebral infarctions in patients with Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol* 2007; 20: 93-8.