Immune Network No. 1, Vol. 1, 2001

제대혈 $CD34^+$ 세포에서 유래된 지지세포의 분석

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실[1], 서울대학교 의과대학 소아과학교실[2]

유경하 · 박세진 · 김경효 · 서주영[1] · Mohammad Khan[1] · 신희영[2] · 안효섭[2]

Analysis of Stromal Cells Developed from Cord Blood $CD34^+$ Cells

Kyung-Ha Ryu, M.D., Se-Jin Park, M.D., Kyung Hyo Kim, M.D., Mohammad Khan[1], M.D., Ju-Young Seoh, M.D.[1], Hee-Young Shin, M.D.[2], Hyo-Seop Ahn, M.D.[2]

Department of Pediatrics, and Microbiology[1], College of Medicine, Ewha Womans Unversity, Department of Pediatrics, College of Medicine[2], Seoul National University, Seoul, Korea

= Abstract =

Background: Cytokine-mediated *ex vivo* expansion has been proposed as a means of increasing the number of cord blood (CB) hematopoietic stem cells for transplantation. As well as stem cell number, stromal cells are necessary for functional maturation of hematopoiesis. The purpose of this study was to analyze the development of stromal cells during *ex vivo* expansion of CB $CD34^+$ cells. **Methods**: $CD34^+$ cells were purified from CB by magnetic bead selection. The levels of of interleukin-3, interleukin-1β, interleukin-6, granulocyte macrophage-colony stimulating factor and tumor necrosis factor-α were measured in culture supernatants on 0, 1, 2, and 3 weeks, using ELISA techniques. CB $CD34^+$ cells were expanded in Iscoves modified Dulbeccos medium in the presence of several cytokines. The expression of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, von Willebrand factor, vimentin, and CD14 in newly developed stromal cells was examined by immunocytochemical method. Relevant extracellular matrix (ECM) proteins and proper cytokines were also assayed for the most suitable condition for expansion of stromal cells. **Results:** Several cytokines were found to have been produced by CB $CD34^+$ cells as well as bone marrow-derived $CD34^+$ cells. During *ex vivo* expansion of CB $CD34^+$ cells, stromal cells appeared in the culture by day 4 and expanded over the following 7-10 days before being confluent by day 21. These cells expressed surface markers characteristic of cells of endothelial lineage. Furthermore, these stroaml cells also expanded effectively when treated with thrombopoietin+flt-3 ligand+stem cell factor+leukemia inhibitory factor or 0.1% poly-L-lysine-coated wells. **Conclusion:** Stromal cells were developed during *ex vivo* expansion of CB $CD34^+$ cells and that this development could be enhanced further by treating the stromal cells with cytokines or ECM.

Key Words: Cord blood, *Ex vivo* expansion, Stromal cells, Cytokines, Extracellular matrix

책임저자: 안효섭, 서울대학교 의과대학 소아과학교실 110-744, 서울 종로구 연건동 28번지,
Tel: (02) 760-3625, Fax:(02) 743-3455, E-mail : hsahn@plaza.snu.ac.kr

*본 연구는 이화여자동창회 연구기금, 한국과학재단 목적기초연구 (1999-2-208-002-2) 및 보건복지부 보건의료연구개발사업 (HMP-00-CH-04-0004)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

서 론

충분한 양의 조혈모세포를 주입하고도 제대혈이식이 다른 조혈모세포이식에 비해 착생 기간이 늦은 이유는 여러 가설이 있으나 제대혈의 조혈미세환경의 결여와 조혈모세포 분화과정에서 혈소판계 분화의 기능적인 결여로 크게 생각할 수 있다[1]. 조혈미세환경이라 함은 지지세포와 여기서 분비하는 여러 조혈성장인자, 세포외간질 (extracellular matrices) 단백 및 세포유착 분자들로 구성되어 있다[2]. 이와 같은 조혈미세환경의 조혈작용에 대한 역할은 조혈모세포가 고유기능인 자기복제와 분화능력을 가질 수 있도록 해주고, 반대로 말초혈액내로 주입된 조혈모세포가 골수에 잘 착생되도록 하는 homing 과정에 관여하며 이를 blocking 시키면 반대로 조혈모세포를 가동화시킬 수 있다[3,4]. 제대혈은 골수에 비해 이와 같은 역할을 해주는 조혈미세환경의 기능이 결여되어 있음은 이미 잘 알려져 있다[5].

여러 조혈성장인자는 지지세포 중 특히 내막세포와 섬유모세포에서 분비되는데 stem cell factor (SCF), interleukin-3 (IL-3), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-7 (IL-7), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등으로 이들은 조혈세포의 유지, 증식 및 분화에 직접적으로 관여한다[6,7].

조혈성장인자와 더불어 fibrinogen, fibrinonectin, hyaluronic acid, laminin 등의 세포외간질 단백 및 지지세포는 조혈세포와 끊임없는 상호작용을 하는데 즉, contact/soluble signal을 통해 세포의 분열, 분화 및 apoptosis를 통해 조혈작용을 조절한다고 알려져 있다[8]. 골수나 말초혈에서의 지지세포는 조혈모세포로부터 분화 되었음이 알려져 있으나 제대혈에서의 지지세포의 출현에 대해서는 최근까지 잘 알려져 있지 않다[9].

본 연구에서는 제대혈의 조혈미세환경의 역할 중 지지세포가 골수에 비해서 어떻게 차이가 있는지 또한 개선시킬 수 있는 방법을 모색해서 골수와 비슷한 조혈미세환경을 만들어 주는 것을 목적으로 하였다. 이를 위해 제대혈의 조혈모세포가 분비하는 다양한 조혈 성장인자를 측정하고 지지세포의 출현 및 분화 계열을 조사하였다. 또한 지지세포를 효과적으로 분화 및 증식을 유도하는 조혈미세환경을 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

제대혈(14례)은 질식분만 산모 중에서 기증을 자원한 환자에게 얻었고, 골수(6례)는 고형종양의 전이 여부를 확인하기 위해 얻은 정상 골수를 이용하였다.

2. 방 법

(1) $CD34^+$ 세포의 분리

헤파린이 들어있는 주사기에 제대혈을 무균적으로 채취하였다. 채취한 제대혈은 Iscoves modified Dulbeccos medium (IMDM, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 동량 희석하여 Ficoll-Hypaque (d=1.077, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 중층한 후, x400 g에서 30분 원심분리하여 단핵구를 분리하였다. 분리한 제대혈 단핵구를 IMDM으로 재부유시킨 후 배양용기에 넣고 1시간 배양하여 유착세포를 제거하였다. 가벼운 pipetting으로 비유착세포를 수거하여 다시 한번 배양용기에 1시간 흡착시킨 후 비유착세포를 0.1%의 bovine serum albumin (BSA; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)을 함유한 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 1.0×10^6 cells/300 μL의 농도로 맞춘 후 100 μL의 anti-CD34 monoclonal antibody (QBEND 10; Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany)가 부착된 colloidal superparamagnetic beads (Miltenyi Biotech, Glodbach, Germany)를 첨가하여 빙수조에서 20분 반응시켰다. 원심분리로 세포를 세척 후 PBS를 첨가한 후 MiniMACS column (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)을 통해 $CD34^+$세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 한번 column을 통과시킨 후 최종적으로 수거한 세포는 항 CD34 단클론성항체, fluoroscein isothiocyanate (FITC; HPCA-2; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 염색한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 순수율을 검정한 후 실험에 사용하였다. 골수세포도 같은 방법으로 분리하였다.

(2) 분화 증식된 지지세포의 조혈성장인자 분비능력 측정

(1)에서 분리된 순수한 $CD34^+$ 세포를 IMDM, 12.5% fetal bovine serum, 12.5% horse serum, 10^{-4} mol/L 2-mercaptoethanol, 10^{-6} mol/L hydrocortisone, 100 U/mL

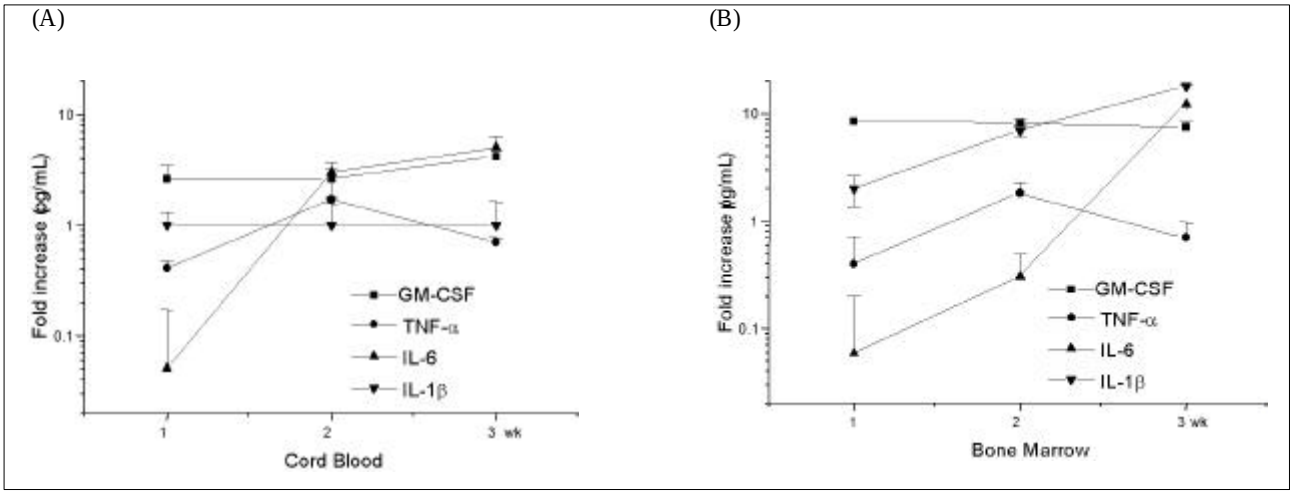

Fig. 1. The changes of cytokine levels in long-term culture media from $CD34^+$ cells from cord blood (CB) and bone marrow (BM) with time. The levels of of interleukin-3, interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor-α were measured in culture supernatants on 0, 1, 2, and 3 weeks, using ELISA techniques. GM-CSF and IL-6 were increased with time from CB $CD34^+$ cells (A). IL-6 and IL-1β were also increased with time from BM $CD34^+$ cells (B).

penicillin 및 100 U/mL streoptomycin)이 들어있는 T25 flask (25100 COL1; Corning, New York, NY, USA)에 10^7/mL의 농도로 넣어 충분히 습도가 조절된 환경에서 37°C, 5% CO_2 조건으로 조혈성장인자의 첨가없이 3주간 배양하였다. 실험은 1쌍씩 만들고 0, 1주, 2주 및 3주에 상층액을 얻어 -80°C에 보관하였다가 한꺼번에 IL-3, IL-6, GM-CSF 및 TNF-α 등의 cytokine은 Endogen (Woburn, MA, USA)으로, IL-1β는 R&D (Minneapolis, MN, USA) 제품의 commercial kit를 이용해, ELISA 방법으로 내부적으로 분비되는 조혈성장인자를 측정하였다.

(3) 지지세포의 분화유도 및 증식

10^5 cells/mL의 세포농도로 무혈청배지 (SFEM, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)에서 thrombopoietin (TPO, T; 50 ng/mL, Kirin), flt-3 ligand (FL, F; 50 ng/mL, Chemicon), interleukin-6 (IL-6, 6; 10 ng/mL, Endogen), leukemia inhibitory factor (LIF, L; 10 ng/mL, Endogen), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, G; 20 ng/mL, Endogen), stem cell factor (SCF, S; 50 ng/mL, Endogen) 등 각종 조혈성장인자를 여러 가지 조합으로 첨가하여 배양하였다. 1주에 2회씩 배지의 반을 갈아주고 성장인자를 첨가하면서 부유세포를 흔들어 제거하고 부착세포만 배양하였고 증식정도는 현미경으로 관찰하여 배양용기를 점유한 면적 비율로 계산하였다. 세포외간질 단백의 효과를 분석하기 위하여 collagen S (5 ug/cm^2, Boeringer Manheim), fibronectin (5 ug/cm^2, Boeringer Manheim), laminin (ug/cm^2, Boeringer Manheim) 및 poly-L-lysine (5 ug/cm^2, Sigma)을 미리 coating한 용기에 배양하여 분석하였다.

(4) 분화된 지지세포계열 결정

지지세포를 poly-L-lysine이 coating된 슬라이드 (Iwaki)에 배양한 후 acetone으로 고정하여 면역염색에 사용하였다. 1차 항체로 E-selectin (Chemicon), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; Chemicon), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; Chemicon), platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1; Chemicon), von Willebrand factor (vWF; Chemicon), vimentin (Chemicon), 및 CD14 (Pharmingen)를, 음성대조군으로는 정상 마우스 혈청을 사용하였다. 2차 항체로 FITC-goat anti-mouse Igs (Chemicon)를 사용한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

(5) 통계처리

측정치는 평균치±표준편차로 표시하였고, Fig에서는 평균치+표준편차로 표시하였다. SPSS(Statistical Package for Social Science) 통계프로그램을 이용하여 시간에 따른 cytokine의 변화는 one way ANOVA로 골수와 제대혈 간의 비교와 P value 0.05 이하인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 제대혈 CD34⁺ 세포 배양시 조혈성장인자 분비능력

제대혈과 대조군으로 골수세포로부터 CD34⁺ 세포를 분리하였다. CD34⁺ 세포의 비율은 제대혈에서 0.89%, 골수에서 2.66%로 골수에서 현저히 높았다.

외부에서 첨가된 조혈성장인자 없이 각각 장기액상액에 3주간 배양하여 CD34⁺ 세포가 내부적으로 분비하는 여러 조혈성장인자를 연속적으로 측정하여 변화를 관찰하였다. GM-CSF의 측정치는 제대혈군에서 시간이 지남에 따라 증가되었지만 골수군에서는 거의 변화가 없었다. IL-6의 측정치는 제대혈 (P=0.106) 이나 골수세포 (P=0.014) 모두에서 시간이 지남에 따라 증가되었다. 반면에 TNF-α는 두군 모두 시간에 따른 변화가 없었고 IL-1β의 측정치는 제대혈과 골수가 다른 양상을 보여 제대혈에서는 별 변화가 없었으나 골수에서 증가하였다 (Fig. 1). IL-3는 배양 처음부터 두 군 모두에서 측정값이 0을 나타내었다.

2. 제대혈 CD34⁺ 세포로부터 지지세포의 출현

제대혈로부터 CD34⁺ 세포를 분리하여 순수도를 측정하였더니 평균 95% 이상이었다. 다른 세포의 오염이 거의 없는 상태에서 여러 조혈성장인자를 첨가하여 체외확장을 시도한 결과 Fig. 2에서와 같이 지지세포가 출현하였다. 배양 3-4일에 지지세포가 출현하기 시작하여 (Fig. 2, B-C) 7-10일 경에는 수가 증식되었다 (Fig. 2, D-E). 계속되는 증식으로 배양 14-21일 경에는 서로 뭉치다가 주위의 증폭하는 조혈세포들과 유착하는 양상을 보여 주었다(Fig. 2, F).

3. 제대혈 CD34⁺ 세포로부터 분화된 지지세포의 계열 분석

이 세포를 수거하여 anti-CD34 단클론성항체와 반응시켰을 때 CD34에 발현되지 않아 조혈세포는 아님을 확인하였다. 반면에 이 지지세포를 형광염색법으로 관찰한 결과 내피계열 항원인 vWF와 VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-selectin의 항원에 발현되는 양상을 보여 주었다(Fig. 3). 그러나 단구 계열 및 섬유아세포 계열 항원인 CD14와 vimentin에는 발현하지 않았다. 이상의 결과를 종합하면 제대혈 CD34⁺ 세포에서 유래하는 지지세포는 내피세포 계열인 것으로 추정되었다.

4. 지지세포 분화유도 및 증식에 효과적인 미세환경

1) 조혈성장인자 첨가에 따른 지지세포의 증식 정도

제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포를 여러 조혈성장인자의 다양한 조합으로 처리하여 배양하였다. 배양액 중에는 어떤 종류의 세포외간질 단백도 처리하지 않았다. 첨가된 조혈성장인자 조합중 TPO+FL+SCF+LIF의 비교적 조기 조혈작용에 관여하는 성장인자가 첨가된 군에서 confluent area (CA)가 가장 효과적으로 증가되었다. 배양 1주부터 증폭이 되기 시작하여 3주까지 급격히 증폭이 되었고 4주까지는 완만한 곡선을 그리며 유지하였다 (Fig. 4-A).

2) 세포외간질 단백 첨가에 따른 지지세포의 증식 정도

제대혈에서 분리된 CD34⁺ 세포를 여러 세포외간질 단백을 각각 처리하여 배양하였다. 이 경우의 조혈성장인자는 가장 효과적이었던 TPO+FL+SCF+LIF를 같은 조건으로 첨가하였다. 어떤 세포외간질 단백도 처리하지 않은 군의 CA의 수가 65±5.5%인데 비해 1% poly-L-lysine으로 처리한 경우가 91±7.8%로 가장 효과적이었고 fibronectin, laminin 및 collagen 순이었다 (Fig. 4-B).

고 찰

조혈미세환경은 섬유모세포 (fibroblast), 내막세포 (endothelial cell) 및 지방세포 (adipocyte) 등을 포함하는 지지세포들과 세포외간질 (extracellular matrix)로 이루어진 network 인데 이는 조혈세포를 물리적으로 지지해 줄 뿐 아니라 이 세포들의 증식 및 분화를 유도하기도 하고 이식 후 homing과 착생과정에 관여한다[10]. 조혈미세환경이 조혈세포의 기능를 조절하는 기전은 직접적인 세포대 세포의 접촉에 의한 방법과 세포외간질을 구성하는 단백질 물질을 구성하거나 조혈성장인자를 생산 분비하여 세포유착분자에 어떤 신호를 전달함으로써 다양한 기능을 유도할 수 있다[11,12].

그러나 제대혈이식은 최근 전세계적으로 급격히 증가하고 있는데 반해 이와 같은 제대혈의 조혈미세환경에 대한 연구는 골수나 말초혈 조혈모세포 처럼 잘 정립되

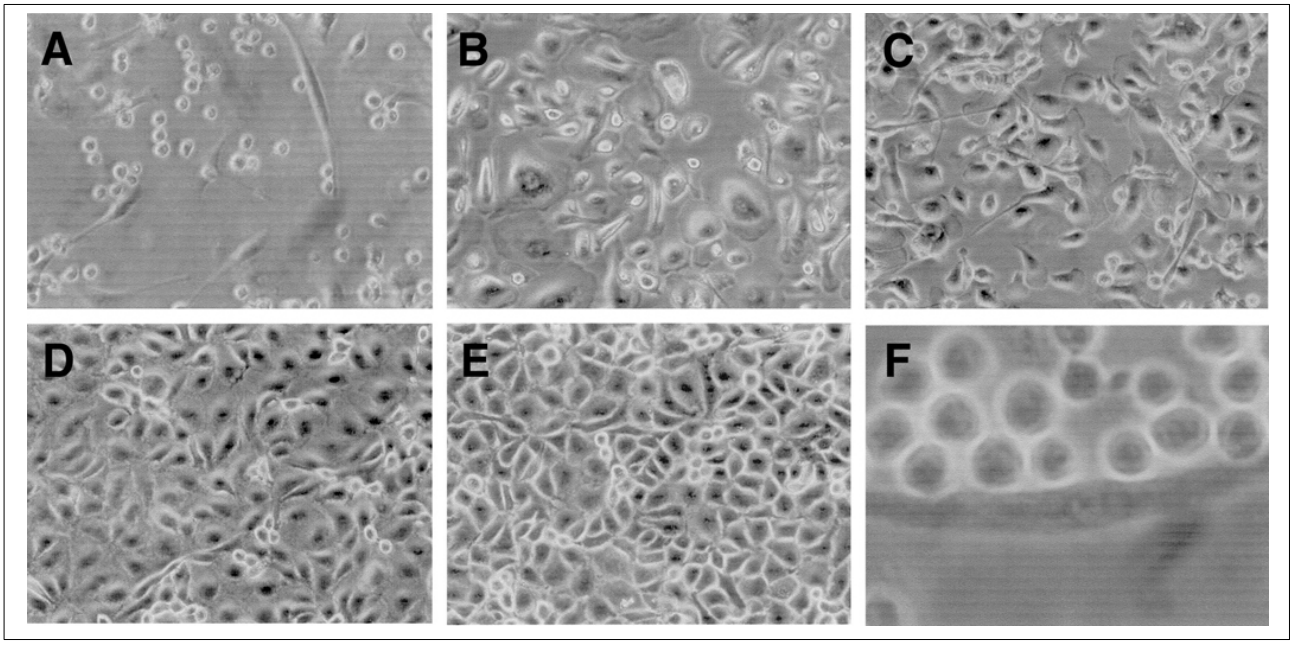

Fig. 2. The morphology of stromal cells from cord blood $CD34^+$ cells during ex vivo expansion. Cord blood (CB) $CD34^+$ cells were expanded in Iscoves modified Dulbeccos medium in the presence of several cytokines. During *ex vivo* expansion of CB $CD34^+$ cells, stromal cells appeared in the culture by day 4 (A), expanded over the following 7-10 days (B-C) before being confluent by day 21 (D-E) and then adhered to hematopoietic cells (F).

어 있지 않다. 특히 골수나 말초혈 조혈모세포에서 지지세포가 유래됨은 알려져 있으나 제대혈에서 지지세포가 유래되는지는 최근까지 논란의 대상이 되어 왔다. 따라서 본 연구진은 제대혈 조혈모세포의 조혈미세환경을 이해하기 위해 제대혈 조혈모세포로부터 지지세포의 출현양상과 이 세포의 조혈성장인자의 분비능력 및 체외증폭 시 조혈미세환경의 변화 및 촉진할 수 있는 여러 인자가 무엇인지 연구하게 되었다.

본 연구에서 제대혈 $CD34^+$ 세포를 체외 증폭시키는 과정에 지지세포로 추정되는 세포들을 관찰하였다[13]. 섬유모세포와 비슷한 형태의 이 세포들을 지지세포로 추정하는 논리적인 근거는 우선 $CD34^+$ 세포 분리과정에 섬유모세포가 오염될 가능성이 매우 적은데 이는 분리과정이 단핵세포 분리 후 유착세포를 2회에 걸쳐 제거하고, 다시 column 통과를 2회 반복하여 실시하여 평균 95% 이상의 $CD34^+$ 세포 순수도를 유지하기 때문이다. 둘째로 세포의 출현 시기가 이 세포들은 4일 정도가 지나서야 관찰되기 시작하여 2-3주 경에는 서로 뭉치다가 주위의 증폭하는 조혈세포들과 유착하는 양상을 보여주었는데 만약, 이 세포들이 섬유모세포라면 시기적으로 배양 초기부터 과잉 성장을 할 것으로 생각되기 때문이다. 실제로 문헌을 고찰해 보니 Nieda 등[14]은 제대혈 $CD34^+$ 세포에서 지지세포가 출현하며, 그 세포들은 내피세포 계열임을 보고하였는데 이제까지의 제대혈 지지세포에 관한 유일한 논문이다. 이 논문에서는 특정 세포주 배양상청액을 사용하여 5주 이후에 출현한다고 하였는데 이에 비해 본 연구진이 관찰한 세포들이 더 빠르고 효율적으로 출현하였다. 이것은 $CD34^+$ 세포의 분리 효율이 좋아 초기 배양 세포의 밀도가 높기 때문으로 추정된다.

이 세포들이 지지세포임을 증명하는 또 하나의 증거는 이 세포를 외부에서 투여하는 조혈성장인자 없이 배양하였을 때 시간이 지남에 따라 몇몇의 조혈성장인자의 분비량이 계속 증가한다는 사실을 본 연구에서 확인하였다. 골수의 조혈모세포의 기능을 위해 존재한다고알려진 조혈성장인자는 G-CSF, GM-CSF, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, SCF, TNF-α 및 LIF 등이다[15,16]. 조혈 촉진작용을 하는 것으로는 G-CSF, GM-CSF, IL-1β 및 IL-6이고, 반면에 억제효과가 있는 것은 TNF-α, transforming growth factor-β (TGF-β) 와 interferon-γ (INF-γ) 등이다[17]. 본 연구에서는 이중 제대혈 $CD34^+$ 세포가 분비하는 조혈성장인자를 골수와 비교하고 시간이 지남에 따라 어떤 경과를 취하는지 알아보았다. IL-3는 Sensebe 등[18]과 그 이전의 여러 논문에서

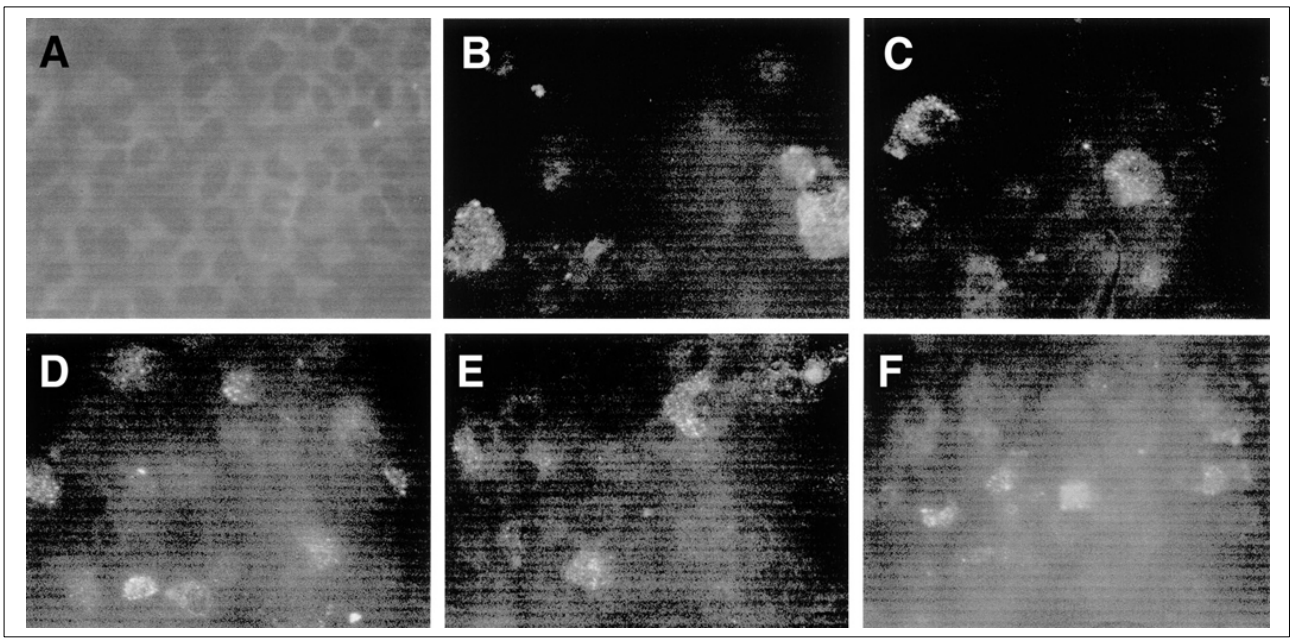

Fig. 3. The lineage markers of stromal cells from cord blood CD34+ cells. These cells were endothelial cell lineages because they were expressed positively for von Willebrand factor (B), vascular cell adhesion molecule-1 (C), intercellular adhesion molecule-1 (D), platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (E), E-selectin (F), but not expressed for vimentin and CD14 in immunocytochemical stain.

발표한대로 측정되지 않았다. 이는 지지세포는 IL-3의 생산을 하지 않음을 뒷받침 해주고 필요한 경우 외부에서의 주입에 의존해야 할 것이다. GM-CSF와 IL-6는 측정치는 비교적 낮았지만 시간이 지남에 따라 유의하게 증가되었는데 이는 제대혈 조혈모세포로부터 지지세포가 유도되고 이 세포에 의해 내부적으로 생산되고 있음을 간접적으로 말해주고 있다. 이에 반해 다른 여러 조혈성장인자를 자극하는 효과가 있는 IL-1β와 TNF-α는 통계적으로는 시간에 따른 변화나 각군의 차이를 찾아볼 수 없었으나 분비량은 측정되었다.

이렇게 분화된 세포가 지지세포 중 어느 계열인지를 결정하기 위하여 기본적으로 내피세포, 단구 및 섬유모세포의 항원을 이용하여 형광염색법으로 관찰하였다. 이 세포들은 섬유모세포나 단구 계열인 vimentin과 CD14에는 발현하지 않으면서 vWF, PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin에 양성으로 발현되어서 내피계열 세포라고 추정되었다. 제대혈의 $CD34^+$ 세포로부터 유래된 지지세포가 내피세포 계열임은 다음과 같은 의의를 갖는다고 생각해 볼 수 있다. 내피계열 세포로 부터의 signal이 조혈전구세포의 유착분자 발현에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 구체적인 예를 들자면 PECAM의 발현은 $CD34^+$ 세포가 VLA-4를 발현하도록 유발하여 이식 후 homing에 영향을 미칠 수 있다고 가정할 수도 있겠다[19]. 즉 지지세포에 의한 체외증폭의 양적인 변화와 함께 증폭된 세포의 질적인 변화도 유발된다고 할 수 있다.

그렇다면 체외증폭 시 조혈세포의 증폭과 더불어 지지세포 분화유도 및 증식도 효과적인 증폭이 중요한 영향을 미치고 있으며 이를 위한 최적의 미세환경 조건은 어떻게 할 것인가에 의문을 갖게 되었다[20,21]. 조혈성장인자 조합에 따른 지지세포의 증식 정도를 알아보기 위해 배양액에 어떤 종류의 세포외간질 단백도 처리하지 않고 조혈성장인자의 영향을 알아보기 위해 여러 가지 조합을 시행하였다. 첨가된 조혈성장인자 조합 중 TPO+FL+SCF+LIF의 비교적 조기 조혈작용에 관여하는 성장인자가 첨가된 군에서 confluent area (CA)가 가장 효과적으로 증가되었다. 이번에는 골수의 조혈 미세환경을 구성하는 세포 외 간질 단백 성분으로 알려진 poly-L-lysine, collagen, laminin 및 fibronectin 등[22,23]을 이용하여 세포외간질 단백의 첨가에 따른 지지세포의 증식 정도를 알아보았다. 배양액에 가장 효과적인 조합이었던 TPO+FL+SCF+LIF 조혈성장인자를 같은 조건으로 첨가하였고 각각의 세포외간질 단백을 처리한 군으로 나누어 증식효과를 비교하였다. 1% poly-L-lysine으

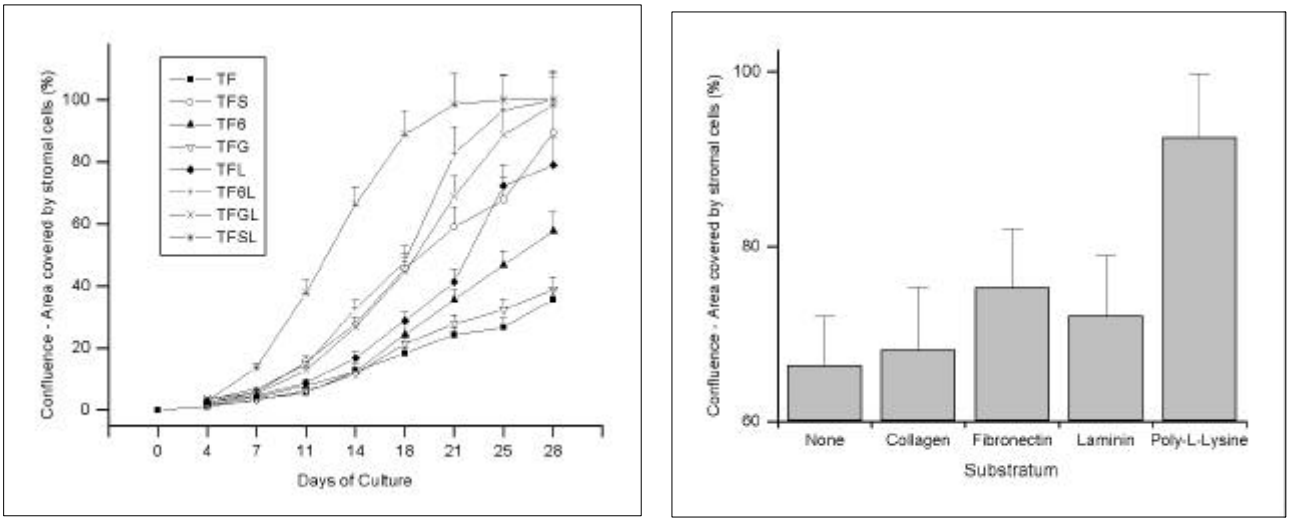

Fig. 4. The expansion of stromal cells from cord blood CD34⁺ cells during *ex vivo* expansion. Proper cytokines and extracellular matrix (ECM) proteins were assayed for the most suitable condition for expansion of stromal cells. These stromal cells were also expanded effectively with thrombopoietin+flt-3 ligand+stem cell factor+leukemia inhibitory factor (A) or 1% poly-L-lysine treatment (B). (T, thrombopoietin; F, flt-3 ligand; 6, interleukin-6; L, leukemia inhibitory factor; G, granulocyte-colony stimulating factor; S, stem cell factor)

로 처리한 경우가 가장 효과적이었고 fibronectin, laminin 및 collagen 순인 것을 확인하였다. 이는 Gupta 등[24]이 주장한 장기적인 착생을 위해서는 조혈과정의 조기에 작용하는 조혈성장인자와 heparan sulfate와 같은 세포외간질이 필요하다는 이론을 발전시킨 결과라고 생각된다.

본 연구는 제대혈 조혈모세포의 체외증폭과정에서 내피세포 계열의 지지세포가 출현하며 이들 세포로부터 다양한 조혈성장인자가 분비되고 있음을 알 수 있었다. 뿐만아니라 조혈세포의 증폭과 더불어 지지세포의 증폭을 유도하는 가장 적절한 조혈성장인자의 조합과 세포외간질 단백의 종류도 알아 보았다. 이를 이용하면 제대혈 CD34⁺ 세포에서 유래되는 지지세포를 체외증폭에 이용할 수 있고 또한 지지세포주 확립의 기본 자료로 활용할 수 있겠다. 앞으로 제대혈 조혈모세포의 체외 증폭과정에 세포의 생존이나 분화에 필수적인 contact signal을 제공하는 조혈미세환경 요소를 규명함으로써 제대혈 조혈모세포를 체외 증폭시키는데 더욱 효과적인 방법을 개발할 수 있을 것이며, 나아가 정상적인 조혈과정이 조절되는 기전을 깊이있게 이해할 수 있을 것이다.

요 약

목적: 제대혈의 조혈모세포 체외확장 시 조혈세포 증폭과 더불어 조혈미세환경의 변화가 일어난다. 이때 제대혈 CD34⁺ 세포에서 유래되는 지지세포의 계열 분석 조혈성장인자 분비능력을 알아보고 지지세포 증식 조건을 확립하여 효과적인 제대혈의 체외증폭을 제시하고자 하였다. **방법**: 제대혈부터 CD34⁺ 세포를 분리하여 실험에 사용하였다. 무혈청배지에서 각종 조혈성장인자를 다양한 조합으로 첨가하여 배양하였고 증식정도는 현미경으로 관찰하여 배양용기를 점유한 면적 비율로 계산하였다. 세포외간질 단백의 효과를 분석하기 위하여 collagen S, fibronectin, laminin 및 poly-L-lysine를 미리 coating한 용기에 배양하여 분석하였다. 제대혈 CD34⁺ 세포를 조혈성장인자의 첨가 없이 3주간 액체배양하였다. 배양 시, 1주, 2주 및 3주에 상층액을 얻어 -80°C에 보관하였다가 한꺼번에 IL-3, IL-6, GM-CSF, IL-1β 및 TNF-α등을 ELISA 방법으로 내부적으로 분비되는 량을 측정하였다. 분화된 지지세포의 계열을 분석하기 위해 E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, vWF, vimentin 및 CD14 항체를 이용하여 면역화학염색 후 형광현미경으로 관찰하였다. **결과**: 제대혈 CD34⁺ 세포 체

외증폭시키는 과정에서 배양 4일에 지지세포가 출현하기 시작하여 7-10일이 지나면서 증식하기 시작하였고 14-21일 경에 서로 뭉치는 양상을 보여주었다. 제대혈 $CD34^+$ 세포 배양하면서 내부적으로 분비되는 GM-CSF, IL-6의 측정치는 시간이 지남에 따라 증가되었다. 제대혈 $CD34^+$ 세포 체외확장 시 지지세포의 증식 정도는 TPO+FL+SCF+LIF의 조합의 조혈성장인자가 첨가되었을 때 그리고 세포외간질 단백 성분 중 1% poly-L-lysine으로 처리한 경우 가장 효과적이었다. 결론: 체외 증폭 시 제대혈 $CD34^+$ 세포로부터 지지세포가 나타났으며 적절한 조혈성장인자의 첨가나 세포외간질 단백의 첨가에 의해 증폭될 수 있다.

참 고 문 헌

1) Gluckman E: Umbilical cord blood biology and transplantation. Curr Opi Hematol 2; 413-416, 1995

2) Mayani H, Guilbert LJ, Wieczorek AJ: Biology of the hematopoietic microenvironment. Eur J Haematol 49;225-233, 1992

3) Clark BR, Keating A: Biology of bone marrow stroma. Ann NY Acad Sci 770;70-78, 1995

4) Papayannopoulo T, Priestley GV, Nakamoto B: Anti-VLA-4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signalling through the kit/mkit ligand pathway. Blood 91;2231-2239, 1998

5) Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE, Rizzoli V: Umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells: from research to clinical application. Haematologica 80; 473-479, 1995

6) Gibson FM, Scopes J, Daly S, Ball EC, Smith G: Hematopoietic growth factor production by normal and aplastic anemia stroma in long-term bone marrow culture. Br J Haematol 91;551-561, 1995

7) Mayani H, Guilbert LJ, Janowska WA: Biology of the hematopoietic microenvironment. Eur J Haematol 49;225-233, 1992

8) Klein G: The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. Experientia 51;914-26, 1995

9) Gupta P, Blazar BR, Gupta K, Verfaillie CM: Human $CD34^+$ bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma. Blood 91;3724-3733, 1998

10) Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC: Adhesion molecules in haemopoiesis. Clin Haematol 10;485-505, 1997

11) Wilson JG: Adhesive interactions in hemopoiesis. Acta Haematol 97;6-12, 1997

12) Aiuti A, Friedrich C, Sieff CA, Gutierrez-Ramos JC: Identification of distinct elements of the stromal microenvironment that control human hematopoietic stem/progenitor cell growth and differentiation. Exp Hematol 26;143-57, 1998

13) **서주영, 우소연, 박혜영, 김영주, 이미애, 이석, 이순남, 정화순, 성주명**: Thrombopoietin (TPO), Flt3 Ligand, Stem Cell Factor(SCF) **및** Granulocyte-Colony Stimulating Factor(G-CSF)**를 이용한 제대혈** $CD34^+CD38^-$ **세포의** ex vivo Expansion **과정에** CD44**의 발현 및** Apoptosis**에 관한 연구. 대한조혈모세포이식학회지** 2;170-180, 1997

14) Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P: Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical coed blood. Br J Haematol 98;775-777, 1997

15) Koike M, Ishiyama T, Tomoyasu S, Tsuruoka N: Spontaneous cytokine overproduction by peripheral blood mononuclear cells from patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anemia. Leukemia Res 19;639-644, 1995

16) Teramura M, Kobayashi S, Yoshinaga K, Iwabe K. Mizoguchi H: Effect of interleukin-11 on normal and pathological thrombopoiesis. Cancer Chemother Pharmacol 38;S99-102, 1996

17) Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, Young NS: Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. Blood 87;4149-4157, 1996

18) Seensebe L, Mortensen TB, Fixe P, Herve P, Charbord P: Cytokines active on granulopoiesis: release and consumption by human marrow myeloid stromal cells. Br J Haematol 98;274-282, 1997

19) Leavesley DI, Oliver JM, Swart BW, Berndt MC, Haylock DN, Simmons PJ: Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 of human $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells. J Immunol 153;4673-4683, 1994