

태아 간세포의 거핵구 집락형성

성균관대학교 의과대학 소아과학교실, 계명대학교 의과대학 임상병리학교실*,
산부인과학교실[†], 소아과학교실[‡]

권병오 · 주혜영 · 김천수 · 전동석* · 김종인[†] · 김흥식[‡]

Megakaryocyte Colony Formation of Fetal Liver Cells

Byung O Kwon, M.D., Hye Young Ju, M.D., Chun Soo Kim, M.D.
Dong Seok Jeon, M.D.*, Jong In Kim, M.D.[†] and Heung Sik Kim, M.D.[‡]

Department of Pediatrics, Sungkyunkwan University, College of Medicine, Masan,
Department of Clinical Pathology*, Obstetrics & Gynecology[†] and Pediatrics[‡],
Keimyung University, College of Medicine, Taegu, Korea

Purpose : This study was undertaken to obtain basic data about the megakaryocyte colony formation of fetal liver cells by using immunocytochemical staining and ex vivo culture with growth factors.

Methods : The mononuclear cells were isolated from fetal liver and bone marrow with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) and pancytopenia. These mononuclear cells were cultured in MegaCultTM-C(Stem Cell Tech, Canada) media in the presence of growth factors and CFU-Megakaryocyte(CFU-Mk) colonies were counted on day 12. The expansion of CD34+ and CD41+ cell was analyzed by flow cytometry after 5 days incubation using flask culture.

Results : The numbers of CFU-Mk colonies of mononuclear cells obtained from fetal liver in the 11th week gestational age were more than those in the 19th week specimens; growth factors could not enhance the colony expansion in all cases. Total numbers of CFU-Mk colony of fetal liver cells were higher than bone marrow from ITP or pancytopenia groups. The numbers of pure or large CFU-Mk colonies of fetal liver cells were also higher than bone marrow specimens. The rate of CD34+ cell expression of fetal liver was increased after flask culture and the enhancement effect of expression was seen only in cases which added thrombopoietin. The rate of CD41+ cell expression of fetal liver was increased after incubation, but the enhancement effect of growth factors was unclear.

Conclusion : This study revealed good results about the megakaryocyte colony assay of fetal liver mononuclear cells using MegaCultTM-C media. This study suggests that the fetal liver could be a good source of megakaryocytic progenitor cells for clinical application in hematopoietic stem cell transplantation. (J Korean Pediatr Soc 2002;45:247-255)

Key Words : Hematopoietic stem cells, Fetal liver, CFU-Mk

서 론

접수 : 2001년 9월 3일, 승인 : 2001년 10월 12일
책임저자 : 김천수, 성균관대의대 마산삼성병원 소아과
Tel : 055)290-6046 Fax : 055)290-6888
E-mail : chunsoo7@unitel.co.kr

조혈기능은 임신 10-14일에 난황낭에서 시작되어
임신 6-8주부터는 간과 비장이 주된 조혈기관이 되며

임신 20주 이후에는 골수성 조혈 순으로 발달하게 된다. 이중 간성 조혈(hepatic hematopoiesis)은 임신 약 6주경부터 7개월까지 태생기 조혈의 중추적 역할을 한다¹⁾. 태아 간세포(fetal liver cell)는 골수성 조혈모세포와 마찬가지로 자기재생 능력이 있고 동시에 적혈구, 과립구, 단핵구, 림프구 및 혈소판 계열로 분화할 수 있는 다기능 모세포(pluripotent stem cell)이며^{2, 3)} 태아 간은 면역학적으로 미숙하여 조직적합성 항원이 일치하지 않아도 이식에 따른 거부반응이 잘 일어나지 않는다고 알려져 있다^{4, 5)}. 따라서 이식에 필요한 충분한 기초지식과 기술이 확립된다면 골수나 제대혈과 더불어 태아 간도 조혈모세포 이식의 공여 세포로 이용할 수 있으며 특히 치명적인 선천성 대사 질환, 면역결핍성 질환, 혈액질환 등이 산전 진단되었을 때 태아 간을 이용한 자궁내 조혈모세포 이식이 이러한 질환들을 치료할 수 있는 방법이 될 수 있을 것이다^{6, 7)}. 국내에서도 강 등⁸⁾이 태아 간세포를 배양하여 적혈구계, 과립구 및 단핵구계의 집락형성에 대해 보고한 바 있으나 아직 거핵구계 집락형성에 대한 연구 보고는 없으며 태아 간 조혈모세포 이식을 위한 기초연구가 미미한 실정이다.

저자들은 태아 간조직을 수집한 후 세포생존율을 측정하고, 태아 간의 거핵구 집락형성과 관련된 특징을 조사하기 위해 태아 간과 함께 거핵구계 조혈기능이 성장인과 동일하거나 상승될 수 있는 특발성 혈소판 감소성 자반증 환자 및 조혈기능이 감소된 범혈구 감소증 환자의 골수에서 단핵세포를 분리하여 면역조직학적 염색에 의한 거핵구 집락의 수와 형태를 비교 평가하고자 하였다. 또한 성장인자의 첨가에 따른 체외배양의 결과를 분석하여 태아 간 단핵세포에서 거핵구계 전구세포를 효과적으로 체외증폭 할 수 있는 배양조건을 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

임신중절시 수집한 제대주령 11-19주 사이의 태아 간조직 4례와 특발성 혈소판 감소성 자반증 11례 및 범혈구 감소증 환자 3례의 골수를 이용하였다.

2. 단핵세포의 분리

태아 간조직을 10% 우태아혈청(Hyclone, USA)이

함유된 RPMI(GIBCO, USA) 배지에 넣어 두었다가 수술용 가위와 칼을 사용하여 잘게 부순 뒤, 섬세한 철망으로 거르고 RPMI로 2회 세척한 후 원심분리하여 단핵세포를 얻었다. 골수는 헤파린으로 전처리하였으며 Ficoll-Hypaque 용액(Pharmacia Biotech, Sweden)이 담긴 시험관에 골수를 첨가한 후 원심분리하여 단핵세포를 분리하였다. 세포생존율은 trypan-blue dye exclusion법을 이용하여 측정하였다.

3. 거핵구 집락형성

1) 배 양

Isocove's modified Dulbecco's medium(이하 IMDM이라 함; Life Tech, USA)에 태아 간과 골수의 단핵세포를 $2.2 \times 10^6/\text{mL}$ 가 되도록 하여 2 mL의 MegaCultTM-C kit(Stem Cell Tech, Canada) 성장 배지에 0.1 mL씩 넣은 후, 여기에 collagen 용액 1.2 mL를 첨가하여 진탕하였다. 이 혼합액을 피펫으로 흡입하여 2개의 chamber culture slide well에 각각 0.75 mL씩 투여하고 성장인자는 well의 배지가 응고되기 전에 골고루 퍼지도록 넣었으며 공기방울은 피펫으로 흡입 제거하였다. 4℃에서 약 20분간 방치하여 collagen을 굳힌 다음 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 12일간 배양하였다.

2) 성장인자

성장인자는 thrombopoietin(TPO; R & D systems, USA), stem cell factor(SCF; Stem Cell Tech, Canada), interleukin-11(IL-11; Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였으며 chamber slide well에 각각 100 μL 씩 단독 또는 조합하여 투여하였다.

3) 고 정

Chamber slide를 배양기에서 꺼내어 약 15분간 냉각시킨 뒤 플라스틱 뚜껑과 내피를 제거하였다. Chamber slide를 두꺼운 filter 종이로 덮고 원심분리하여 수분을 제거한 후 methanol:acetone 1:3 용액으로 20분간 고정시켰다. 고정된 chamber slide를 실온에서 15분간 건조시키고 4℃에서 보관한 후 면역조직학적 염색을 시행하였다.

4) 면역조직학적 염색

0.1 M Tris/NaCl buffer 500 μL 를 슬라이드에 첨가하여 실온에서 20분간 두었다가 완충액을 제거한 후 5% 인혈장이 포함된 Hank's Balanced Salt Solution(Life Tech, USA) 500 μL 를 슬라이드에 넣어

20분이 경과한 뒤 Tris/NaCl buffer로 3분씩 3회 세척하였다. 1차 항체인 항 GPIIb/IIIa 단클론항체(Stem Cell Tech, Canada)와 상온에서 60분간 반응시킨 후 Tris/NaCl buffer로 세척하였고, 다시 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse Ig G2 단클론항체(Stem Cell Tech, Canada)와 상온에서 60분간 반응시킨 후 Tris/NaCl buffer로 세척하였다. 500 μ L의 alkaline phosphatase conjugate로 60분간 반응시킨 뒤 Tris/NaCl buffer로 3분씩 3회 세척하였고, alkaline phosphatase substrate 용액에 15분간 반응시켰다. Evans blue 용액으로 대조염색을 한 뒤 증류수로 Evans blue 용액을 씻어내고 도립현미경하에서 집락을 관찰하였다.

4. Flask 배양

10% 인혈장이 포함된 RPMI 배지에 1×10^6 /mL의 단핵세포를 넣고, 성장인자를 첨가한 군과 첨가하지 않은 대조군으로 구분한 뒤 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 당시와 제 5일에 2×10^6 개의 세포를 채취하여 세포생존율을 측정하고 유세포 분석기를 이용하여 CD34 및 CD41 양성세포를 측정하였다.

5. Colony forming unit-granulocyte macrophage(CFU-GM) 집락형성

1 mL의 methylcellulose(Stem Cell Tech, Canada) 배지에 2×10^5 /mL의 단핵세포를 넣고, 성장인자를 첨가한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 제 7일과 14일에 도립현미경 하에서 집락 수를 관찰하였다. 성장인자는 granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF; 100 ng/100 μ L; 제일약품, 한국), granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF; 100 ng/100 μ L; LG 화학, 한국), SCF (10 ng/100 μ L)를 각각 단독 첨가하였다.

Table 1. Numbers of Mononuclear Cell and Viability of Fetal Liver Cells

Gestational age (weeks)	Weight (g)	Cell numbers ($\times 10^7$)	Viability (%)
11(n=1)	2.0	3.9	96.7
19(n=3)	10.5 $\pm$ 2.8	4.3 $\pm$ 1.6	89.3 $\pm$ 1.2

The data are expressed as mean $\pm$ SD in 19th week specimens.

6. 통계분석

통계처리는 Kruskal-Wallis 및 Mann-Whitney test를 이용하였으며 $P < 0.05$ 인 경우 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 태아 간조직의 단핵세포 수 및 세포생존율

총 4례의 태아 간조직을 수집하였다. 태아 간의 단핵세포 수는 재태주령 11주(3.9×10^7)에 비해서 19주($4.3 \pm 1.6 \times 10^7$)에서 더 많았으며 냉동보관 전의 세포생존율은 91.2 $\pm$ 3.4%였다(Table 1).

2. 거핵구 집락의 면역조직학적 염색

거핵구 집락의 확인을 위하여 항 GPIIb/IIIa 항체

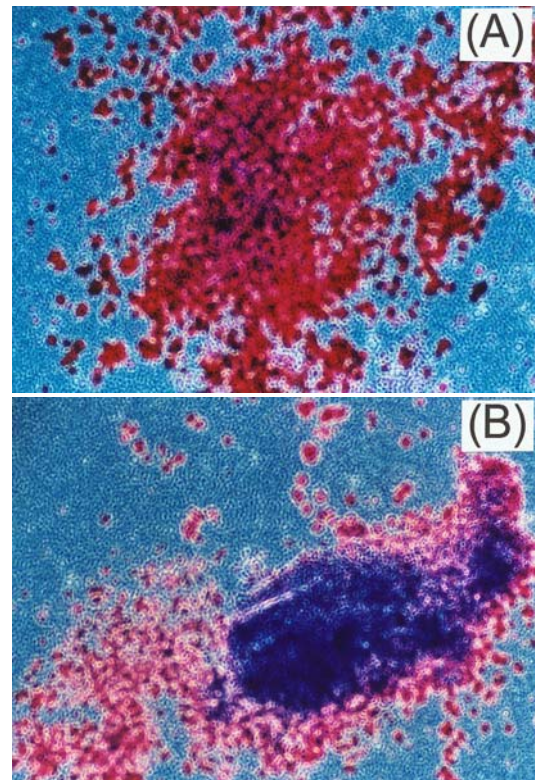


Fig. 1. Microphotographs of CFU-Mk colonies($\times 100$). (A) A pure and large CFU-Mk which is composed of large numbers of GPIIb/IIIa positive(pink) cells. (B) A mixed CFU-Mk which is composed of mixed state of GPIIb/IIIa positive and negative (blue) cells.

Table 2. Numbers of CFU-Mk Colony(Pure/Mixed/Non) Following 12 Days Incubation with Growth Factors in Each Fetal Liver

Case	Control	TPO*	SCF [†]	IL-11 [‡]	SCF+IL-11	TPO+SCF+IL-11
1	162/16/14	117/22/4	175/28/17			
2	65/8/1	52/8/1	69/4/1			
3	66/7/5	18/13/6	69/14/4			
4	117/13/5	57/18/5	78/40/7	100/26/6	49/47/9	75/34/7

*thrombopoietin, [†]stem cell factor, [‡]interleukin-11**Table 3.** Numbers of CFU-Mk Colony(Pure/Mixed/Non) following 12 Days Incubation with Growth Factors According to Origin of Mononuclear Cells

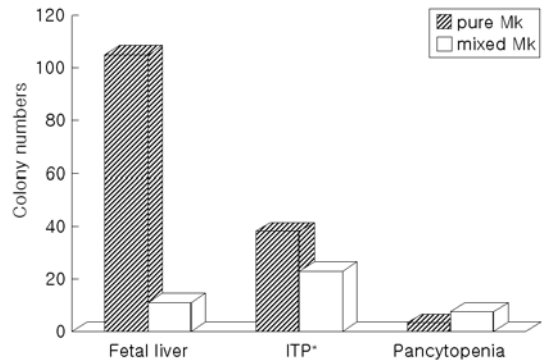
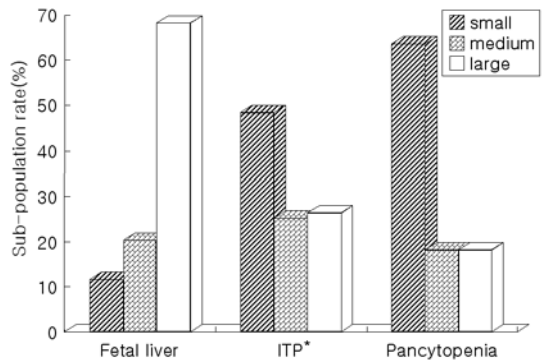
Origin	Control	TPO	SCF
Fetal liver(n=4)	105/11/6	61/15/4	98/22/5
Bone marrow			
ITP(n=9)*	38/23/17	37/23/12	47/29/11
Pan(n=3) [†]	3/8/8	5/9/5	32/10/3

*idiopathic thrombocytopenic purpura, [†]pancytopenia

로 면역조직학적 염색을 시행하였다. GPIIb/IIIa에 양성인 거핵구는 붉은 색으로 염색되었고, 음성인 다른 조혈세포들은 푸른 색으로 염색되었다. 거핵구 집락은 거핵구가 3개 이상부터 수백개가 모여서 형성될 수 있는데 20개 이하의 세포로 구성되어 있는 집락을 small colony forming unit-megakaryocyte(CFU-Mk), 21-50개 세포로 구성되어 있는 집락을 medium CFU-Mk, 51개 이상의 세포로 구성되어 있는 집락을 large CFU-Mk로 정의할 때 Fig. 1A는 순수 거핵구 집락 중 large CFU-Mk에 해당되며 거핵구와 다른 조혈세포들이 섞인 집락인 Fig. 1B는 혼합 거핵구 집락을 보여주고 있다.

3. 배양에 따른 거핵구 집락 수의 비교

MegaCult™-C kit를 이용하여 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 12일간 배양하였다. 제태주령 11주의 태아 간이 19주에 비해서 배양 후 형성된 거핵구 집락 수가 많았으며, 4례 모두 성장인자의 첨가에 따른 집락 증폭의 상승 효과는 없었다(Table 2). 배양 후 형성된 거핵구 집락 수는 태아 간, 특발성 혈소판 감소성 자반증 환자의 골수, 범혈구 감소증 환자의 골수 순으로 나타났다(Table 3). 집락 중 순수 거핵구 집락 수는 태아 간이 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에 비해서 유의하게 높았으며($P <$

**Fig. 2.** The numbers of CFU-Mk colony according to origin of mononuclear cells. *idiopathic thrombocytopenic purpura.**Fig. 3.** Sub-population of pure CFU-Mk colonies according to origin of mononuclear cells. *idiopathic thrombocytopenic purpura.

0.05; Fig. 2) 순수 거핵구 집락 중 large CFU-Mk의 비율은 태아 간이 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에 비해서 높았으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 3).

4. 배양에 따른 CD34 및 CD41 양성세포의 변화

태아 간 단핵세포를 5일간 Flask에 배양한 후

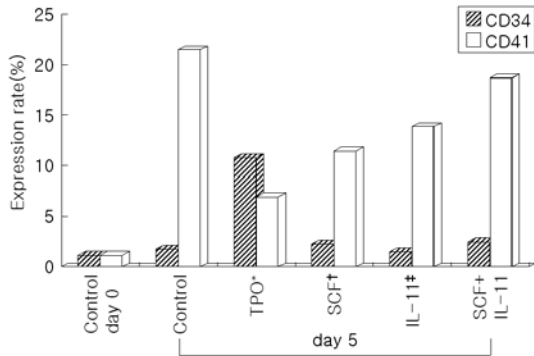


Fig. 4. The rate of CD34+ and CD41+ cell expression following 5 days incubation of fetal liver mononuclear cells. *thrombopoietin, †stem cell factor, ‡interleukin-11.

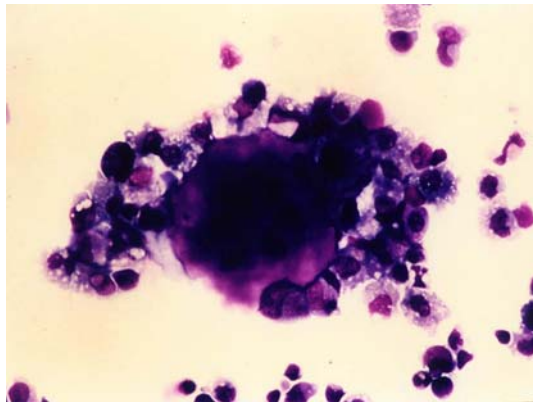


Fig. 5. Cytospin preparation of megakaryocyte (×200) of fetal liver mononuclear cells cultured for 5 days.

CD34 양성세포의 발현율은 증가하였으나 성장인자의 첨가에 따른 집락증폭의 상승 효과는 TPO 투여군에서만 있었으며, CD41 양성세포의 발현율 역시 배양 후 증가하였으나 성장인자 첨가군에 비해서 대조군의 발현율이 너무 높은 결과를 보였다(Fig. 4). 유세포 분석기에 의한 표현형 조사 후 cytospin preparation으로 배양에 따른 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 배양 후 제 5일에 거핵구로 분화된 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

5. 배양에 따른 CFU-GM 집락수의 비교

Methylcellulose 배지를 이용하여 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 배양하면서 제 7일과 14일에 집락 수를 조사하였다. 태아 간에서는 배양 7일에 비해서 14일의 집락 수는 감소하였고, 성장인자의 첨가에 따른 집락

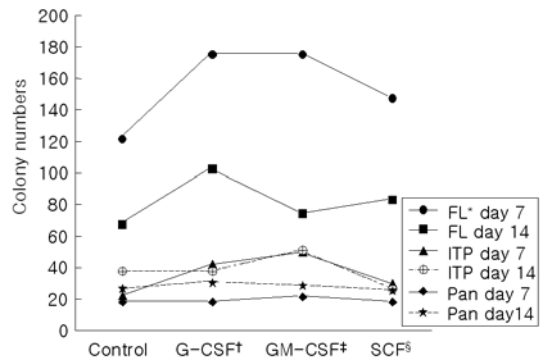


Fig. 6. The numbers of CFU-GM colony following incubation(7 days/14 days) with growth factors according to origin of mononuclear cells. *fetal liver, †granulocyte-colony stimulating factor, ‡granulocyte macrophage-colony stimulating factor, §stem cell factor.

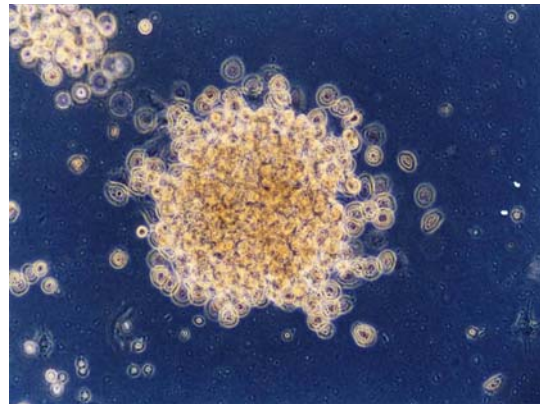


Fig. 7. CFU-GM colony(×200) of fetal liver mononuclear cells cultured for 7 days.

증폭의 상승 효과는 태아 간에서는 모든 군에서 보였으나 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 GM-CSF 투여군에서만 있었으며 범혈구 감소증 환자의 골수에서는 없었다(Fig. 6). 배양에 따른 세포의 형태학적 변화를 도립 현미경으로 관찰한 결과 배양 후 제 7일에 큰 CFU-GM 집락을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

모세포(stem cell)는 어떤 조직의 영속적 계통을 가지는 원시적 전구세포로, 비교적 미분화된 세포이기 때문에 분화에 따른 특정 표지자(specific differentiation marker)를 지니지 않으며 자기재생을 통해 자신을 존속시키면서 동시에 증식과 분화를 하여 기능적

분화된 다수의 전구세포를 생산할 수 있는 세포라고 정의할 수 있다⁹⁾. 조혈모세포는 20-40 μL 크기의 둥근 림프구형 단핵구로서 핵은 작으나 핵소체가 저명하고 세포질이 풍부하며 세포질내 약간의 호염기 과립을 가지는 형태학적 특징이 있고¹⁰⁾, 면역학적으로 과립구나 림프구로의 분화 또는 수임전구세포(committed progenitor)와 관련된 표지자는 아직 가지지 않는 미성숙 세포이므로 장래의 세포분화와 관련된 lineage 음성, Thy-1 항원의 낮은 표현, HLA-DR 음성, rhodamine-123 염색에 낮은 반응을 보이는 것을 특징으로 한다⁹⁾. CD34 항원은 초기 조혈전구세포를 표현하는데 가장 잘 알려진 표지자로 골수내 유헤세포 중 1-2%를 차지하며 성인 말초혈에는 골수의 약 10% 미만 정도의 비율로 존재하나 제대혈에서는 골수와 비슷한 비율로 분포하거나 더 높다고 알려져 있으며^{11, 12)} 태아 간에서는 제대주령에 따라서 차이가 있거나 8-13주에서는 15-20%, 14-24주에는 10-15% 정도로 보고되고 있다^{13, 14)}. 이 실험의 경우 19주의 예에서 $3.4 \pm 2.3\%$ 로 기존의 보고보다 낮았는데 이에 대한 객관적 판단을 위해서는 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Kelemen 등¹⁵⁾에 의하면 태아 간의 무게는 임신 8주경에는 0.1 g 미만이나 10주에는 1.0 g, 16-18주에는 10 g, 32-34주에는 100 g, 임신말기에는 160-180 g 정도이고, 제대주령에 따른 태아 간의 조혈모세포 수는 임신 6주에 10^6 개, 9-10주에 10^8 개, 13-15주에 10^9 개, 20-28주에 10^{10} 개로 최고치를 보이다가 임신 말기에는 10^9 개로 감소하며, 전체 세포 중 조혈모세포가 차지하는 비율은 임신 5주경에는 10% 미만이나 점차 증가하여 8주경에 70%에 도달하여 21주까지 이러한 비율로 유지되다가 그 후 점차 감소한다고 한다. 이 연구에서는 제대주령에 따른 태아 간의 무게는 기존의 보고와 비교적 일치하였으며, 단핵세포 수는 11주의 예에서 2.8×10^7 , 19주의 예에서는 $4.3 \pm 1.6 \times 10^7$ 개로 제대주령에 비례하여 증가를 보였으나 기대치보다는 적었는데 이는 조직을 조작하는 과정이나 Ficoll-Hypaque 용액을 이용한 단핵세포 분리 중에 세포손실이 있었을 가능성을 고려해야 할 것으로 생각된다.

조혈모세포 이식은 1950년대 실험 쥐에서 방사선 조사로 조혈계를 파괴시킨 후 동종 골수를 주입하여 조혈계를 회복시킬 수 있음이 밝혀지고 주요 조직적

합 복합체의 중요성을 알게되면서 임상적용의 가능성이 대두되었다¹⁶⁾. 그 후 Thomas 등¹⁷⁾에 의해 동종 골수이식이 성공적으로 시행되었고, 태아 간을 이용한 조혈모세포 이식은 Buckley 등⁶⁾이 중증 복합면역결핍증(severe combined immune deficiency, SCID)의 8개월된 영아에게 제대주령 8-10주 사이의 태아 간세포의 복강내 주입으로 면역학적 회복을 이룬 것을 계기로 심한 선천성 면역결핍증을 가진 환아들에게 제한적으로 시행된 보고가 있었다¹⁸⁾.

최근 태아질환의 조기발견을 위한 여러 가지 진단적 검사방법의 발달과 더불어 SCID, Wiskott-Aldrich 증후군, 만성 육아종성 질환 등과 같은 면역결핍성 질환, 지중해 빈혈, 겸상 적혈구성 빈혈 등의 선천성 혈액질환, Chediak-Higashi 증후군, Maroteaux-Lamy 증후군, 영아 대리석 골증 등의 대사이상 질환이나 신경학적 유전질환이 산전 진단되었을 때, 태아 간세포의 자궁내 이식 또는 태아 흉선세포와의 병합이식이 이러한 질환들의 치료에 효과적인 방법이 될 수 있을 것이다. 실제로 임신 12주된 지중해 빈혈 및 28주된 bare lymphocyte 증후군을 가진 태아에게 제대주령 10주 미만의 태아 간세포를 초음파영상 유도하에 제대정맥으로 주입하여 혈액학적, 면역학적 회복을 이루었으며 임신 26주된 SCID 태아에게 태아 간과 태아 흉선세포를 병합이식하여 출생 후 건강한 혈액학적 chimerism을 이룸으로서 치료적 효과를 거두었다는 보고도 있다⁷⁾.

태아 간세포는 골수성 조혈모세포와 마찬가지로 적혈구, 과립구, 단핵구, 림프구 및 혈소판 계열로 분화할 수 있는 다기능 모세포일 뿐 아니라 골수 또는 제대혈의 조혈모세포에 비해서 세포 노화나 사망과 관련된 telomere의 길이가 길어서 조혈모세포의 이식이나 체외증폭에 유리한 장점을 갖고 있다¹⁹⁾. 또한 태아 간은 면역학적으로 미숙하여 조직적합성 항원이 일치하지 않아도 이식에 따른 거부반응이나 이식편대숙주반응이 잘 일어나지 않으며, 특히 태아 간세포의 자궁내 이식은 이와 같은 장점 외에도 수여자도 면역학적으로 미숙한 태아이기 때문에 이식에 대한 면역학적 내성을 더욱 기대할 수 있으며, 수여자가 모체의 자궁내에 존재하므로 이상적인 격리가 가능하여 감염을 예방할 수 있고, 이식된 세포는 자연스럽게 수여자측 태아 체내의 성장인자의 영향을 받아 착상이 될 수 있어 이식의 성공률이 높다고 한다^{20, 21)}.

이식되는 조혈모세포의 수가 많을수록 이식의 성공률이 높기 때문에 성공적인 이식을 위해서는 공여되는 세포수가 $1 \times 10^9/\text{kg}$ 이상이 되어야 하지만, 태아 간세포 수는 제한되어 있으므로 체외증폭을 위해서 성장인자를 투여하거나 간질세포의 존재하에서 세포를 배양하는 방법 등이 사용되고 있다²²⁾. Zanjani 등²³⁾은 태아 간 조혈모세포를 태생기 양에게 자궁내 이식하여 chimerism을 만든 후 IL-3, GM-CSF와 같은 성장인자를 투여한 결과 태생기 양에서 적혈구계, 골수구계 및 림프구계 공여세포 수가 증가하였으며 특히 병합투여시 대조군의 2.1-3.4배까지 현저히 증가했다고 보고하였고, 강진무 등⁸⁾은 태아 간 단핵세포의 체외증폭에서 SCF, GM-CSF, IL-3, IL-11 등의 성장인자를 병합투여시 적혈구계, 과립구 및 단핵구계의 증폭에 부가적인 효과가 나타났다고 보고한 바 있다. G-CSF, GM-CSF, SCF를 각각 단독 투여한 이 실험에서는 태아 간의 경우 성장인자의 투여에 따른 과립구 및 단핵구계의 증폭효과가 모든 군에서 보였으나 특별한 혈소판 감소성 자반증 환자의 골수에서는 GM-CSF 투여군에서만 증폭효과가 있었고 범혈구 감소증 환자의 골수에서는 효과가 없었다. 이러한 결과는 향후 성장인자의 병합투여에 따른 반응이나 범혈구 감소증 환자의 경우 골수자체가 가지는 결함을 고려해서 판단해야 할 것으로 생각된다.

혈소판 질환의 병태생리를 밝히는 연구 뿐만 아니라 이식 후 조혈모세포의 생착, 분화, 혈소판 감소증의 회복에 대한 기전을 이해하기 위해서 거핵구 배양 및 집락형성을 관찰하는 방법이 이용되어 왔다^{24, 25)}. 적혈구계와 골수구계의 전구세포 집락형성은 일찍부터 배양기술이 개발되어 활발히 연구되어 왔다. 거핵구계의 경우 지금까지 적절한 배양조건이 잘 알려지지 않았고 배양 후 집락의 확인이 어렵다는 문제점이 있었으나 최근 MegaCultTM-C 배지와 집락을 고정하고 식별할 수 있는 방법이 개발되어 거핵구 조혈에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{26, 27)}. 거핵구는 분화과정에 따라 세포표면에 GPIIIa(CD61), GPIX(CD42a), GPIIb(CD41)과 같은 특정 항원이 발현되는데 이 중 CD41은 분화의 최종단계에서 표현된다²⁸⁾. 거핵구 집락의 관찰은 항 GPIIb/IIIa 항체를 이용한 세포면역학적 염색방법을 많이 사용하고 세포의 증식과 분화의 평가를 위해서는 단클론 항체와 유세포 분석기를 이용한 표현형 조사가 필요하다²⁹⁾.

적혈구계 또는 골수구계 전구세포의 조혈에서와 마찬가지로 거핵구 및 혈소판 조혈에도 여러 가지 성장인자가 관여하고 이러한 성장인자들은 거핵구의 체외증폭을 위해서 중요하다. TPO는 거핵구 및 혈소판 조혈의 일차적인 성장인자로 말초혈액으로 혈소판을 유리시키고 adenosine-diphosphate, collagen, thrombin, epinephrine 등에 의해 유도된 혈소판 응집을 더욱 촉진시키는 역할을 하며³⁰⁾, 골수내 거핵구 증식과 분화의 유도에도 밀접하게 관계한다고 알려져 있다³¹⁾. 또한 Bertolini 등²⁹⁾은 CD34 양성세포의 배양에 따른 거핵구계 전구세포의 체외증폭시 megakaryocyte growth and development factor(MGDF), SCF, IL-3, IL-6, IL-11, Flt-ligand, macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) 등의 성장인자들을 병합투여 하였을 때 가장 효과적이었다고 보고하였다. 이 실험에서도 성장인자 첨가 후 태아 간세포의 배양에 따른 CD41 양성세포의 발현율은 배양 전에 비해서 증가하였으나 대조군의 발현율이 너무 높은 결과에 대해서는 추가적인 조사가 필요하리라 생각된다.

저자들은 태아 간세포를 배양하고 면역조직학적 염색으로 거핵구 집락형성을 관찰하였다. 태아 간에서 얻은 거핵구 집락이 특별한 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에서 얻은 집락에 비해서 집락 수나 순수집락의 분포, 집락의 크기 등에서 우수한 것으로 나타났으며 이 연구의 결과가 항 후 태아 간 조혈모세포 이식에 대한 기초자료가 될 것으로 생각되나 실제적인 임상적용을 위해서는 체계적인 더 많은 연구가 필요할 것이다.

요 약

목 적 : 태아 간세포는 면역학적으로 미숙하여 이식에 따른 거부반응이 잘 일어나지 않으므로 조혈모세포 이식, 특히 자궁내 이식의 좋은 공여세포로 이용할 수 있으나 아직 국내에서는 이를 위한 기초연구가 미미한 실정이다. 연구자는 태아 간 단핵세포를 이용하여 면역조직학적 염색과 체외배양 결과를 분석하여 태아 간의 거핵구 집락형성과 관련된 기초자료를 마련하고자 이 연구를 시행하였다.

방 법 : 임신중절시 수집한 태아 간조직과 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에서 단핵세포를 분리한 후 MegaCultTM-C 배지에서

12일간 배양 후 성장인자 첨가에 따른 거핵구 집락형성을 관찰하였고, 5일간의 Flask 배양 후 유세포 분석기를 이용하여 CD34, CD41 양성세포를 측정하였으며, methylcellulose 배지를 이용하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 제 7일과 14일에 성장인자 첨가에 따른 CFU-GM 집락 수를 조사하였다.

결 과 : 태아 간의 단핵세포 수는 제태주령 11주에 비해서 19주에서 더 많았으며 세포생존율은 $91.2 \pm 3.4\%$ 였다. MegaCult™-C kit를 이용하여 12일간 배양시 제태주령 11주의 태아 간이 19주에 비해서 거핵구 집락 수가 많았고, 4례 모두 성장인자의 첨가에 따른 집락증폭의 상승효과는 없었으며 배양 후 형성된 거핵구 집락 수는 태아 간, 특발성 혈소판 감소성 자반증 환자의 골수, 범혈구 감소증 환자의 골수 순이었다. 거핵구 집락 중 순수집락 수는 태아 간이 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에 비해서 유의하게 높았으며, 순수집락 중 large CFU-Mk의 비율은 태아 간이 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에 비해서 높았으나 유의성은 보이지 않았다. 태아 간 단핵세포를 5일간 flask 배양한 후 CD34 양성세포의 발현율은 증가하였으나 성장인자의 첨가에 따른 집락증폭의 상승효과는 TPO 투여군에서만 있었고, CD41 양성세포의 발현율 역시 배양 후 증가하였으나 성장인자 첨가군에 비해서 대조군의 발현율이 너무 높은 결과를 보였다. Methylcellulose 배지를 이용한 단핵세포 배양에서 CFU-GM 집락 수는 태아 간의 경우 배양 7일에 비하여 14일에 감소하였고, 성장인자의 첨가에 따른 집락증폭의 상승효과는 태아 간에서는 모든 군에서 보였으나 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 GM-CSF 투여군에서만 있었으며 범혈구 감소증 환자의 골수에서는 없었다.

결 론 : MegaCult™-C 배지를 이용하여 태아 간세포를 배양하고 면역조직학적 염색으로 거핵구 집락형성을 성공적으로 관찰하였으며, 태아 간에서 얻은 거핵구 집락이 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 범혈구 감소증 환자의 골수에서 얻은 집락에 비하여 집락 수나 순수집락의 분포, 집락의 크기 등에서 우수한 것으로 나타났으나 태아 간 조혈모세포 이식의 실제적인 임상적용을 위해서는 체계적인 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Luken JL. Clinical Hematology. 9th ed. Philadelphia : Lea and Febiger, 1993:79-100.
- 2) Hann IM, Bodger MP, Hoffbrand AV. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus. Blood 1983;62:118-23.
- 3) Muench MO, Roncarolo MG, Namikawa R. Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver. Blood 1997;89:1364-75.
- 4) Gale RP. Development of the immune system in human fetal liver. Thymus 1987;10:45-56.
- 5) Ek S, Ringden O, Markling L, Westgren M. Immunological capacity of human fetal liver cells. Bone Marrow Transplant 1994;14:9-14.
- 6) Buckley RH, Whisnant JK, Schiff RI, Gilbertsen RB, Huang AT, Platt MS. Correction of severe combined immunodeficiency by fetal liver cells. N Engl J Med 1976;294:1076-81.
- 7) Touraine JL. In utero transplantation of fetal liver stem cells in humans. Blood Cells 1991;17:379-87.
- 8) 강진무, 김천수, 박근수, 김홍식, 김택훈, 이 탁. 태아 간의 조혈모세포 집락형성. 대한혈액학회지 1999;34:389-95.
- 9) Potton CS, Loeffler M. Stem Cells. San Diego : Academic Press 1997:4-29.
- 10) Sieff CA, Nathan DG, Clark SC. Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia : WB Saunders, 1998:161-236.
- 11) Ema H, Suda T, Miura Y, Nakauchi H. Colony formation of clone-sorted human hematopoietic progenitors. Blood 1990;75:1941-6.
- 12) 이종수, 김홍식, 차순도, 강진무. 제대혈 조혈간세포의 집락형성과 혈액세포 성장인자의 영향. 대한소아혈액종양학회지 1994;1:32-42.
- 13) Gilles JM, Divon MY, Bentolila E, Rotenberg OD, Gebhard DF, Rashbaum WK, et al. Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during the midtrimester of gestation. Am J Obstet Gynecol 1997;177:619-25.
- 14) Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, Thrasher AJ, Rodeck CH. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks, gestation. Am J Obstet Gynecol 2000;183:1029-34.
- 15) Kelemen E, Janossa M, Clavo W, Flidner TM, Bofill M, Janossy G. What kind of morphologically recognizable haemopoietic cells do we inject when doing fetal liver infusion in man? Thymus

- 1987;10:33-44.
- 16) Uphoff DE. Preclusion of secondary phase of irradiation syndrome by inoculation of fetal hematopoietic tissue following lethal total body X irradiation. *J Natl Cancer Inst* 1958;20:625-32.
- 17) Thomas ED, Storb R, Fefer A. Aplastic anemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1972;1: 284-9.
- 18) Touraine JL, Roncarolo MG, Royo C, Touraine F. Fetal tissue transplantation, bone marrow transplantation and prospective gene therapy in severe immunodeficiencies and enzyme deficiencies. *Thymus* 1987;10:75-87.
- 19) Vaziri H, Dragowaska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorf PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9857-60.
- 20) Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED. Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science* 1986;233:776-8.
- 21) Harrison MR, Slotnick RN, Crombleholme TM, Golbus MS, Tarantal AF, Zanjani ED. In-utero transplantation of fetal liver hematopoietic stem cells in monkeys. *Lancet* 1989;16:1425-7.
- 22) Metcalf D, Nicola NA. *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*. London: Cambridge Univ Press 1994:11-32.
- 23) Zanjani ED, Pallavicini MG, Ascensao JL, Flake AW, Langlois RG, Reitsma M, et al. Engraftment and long-term expression of human fetal hematopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero. *J Clin Invest* 1992;89:1178-88.
- 24) Quesenberry PJ, McGrath HE, Williams ME, Robinson BE, Deacon DH, Clark S, et al. Multifactor stimulation of megakaryocytopoiesis: effects of interleukin 6. *Exp Hematol* 1991;19:35-41.
- 25) 조성범, 김홍식, 강진무. 조혈모세포 종류에 따른 거핵구 집락 형성. *대한소아혈액종양학회지* 1998;5: 138-47.
- 26) Lowry PA, Deacon DM, Whitefield P, Rao S, Quesenberry M, Quesenberry PJ. The high proliferative-potential megakaryocyte mixed(HPP-Meg-Mix) cell: a trilineage murine hematopoietic progenitor with multiple growth factor responsiveness. *Exp Hematol* 1995;23:1135-40.
- 27) 홍대식, 김정아, 김숙자, 박성규, 서원석, 박희숙. 골수, 제대혈, 가동화된 말초혈액에서 Megakaryocyte 집락의 형성능력 비교. *대한조혈모세포이식학회지* 1998;3:279-87.
- 28) Koizumi K, Sawada K, Yamaguchi M, Notoya A, Tarumi T, Takano H, et al. In vitro expansion of CD34+/CD41+ cells from human peripheral blood CD34+/CD41- cells: role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors. *Exp Hematol* 1998;26: 1140-7.
- 29) Bertolini F, Battaglia M, Pedrazzoli P, Da Prada GA, Lanza A, Soligo D, et al. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood* 1997;89: 2679-88.
- 30) 조상덕, 이국경, 배상병, 김숙자, 정희정, 이규택 등. 생체 외 배양에서 거핵세포 조혈에 대한 thrombopoietin의 효과. *한국BRM학회지* 1999;9:161-74.
- 31) Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin(c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 1995;85:1719-26.