

조혈모세포의 체외증식과 임상적 응용

계명대학교 의과대학 내과학교실

권 기 영

서 론

조혈모세포 이식이 광범위한 혈액 및 악성질환과 유전성 또는 대사성 질환의 치료에 도입된 이래 이들 질병의 상당수에서 완치가 가능해졌으며 또한 조혈모세포의 특성을 밝히는데 많은 진전을 가져오게 되었다.^{1, 3)} 그리고 조혈모세포를 얻는 방법도 다양해져 골수이외에도 화학요법과 조혈성장인자를 투여하여 말초혈액으로 조혈전구세포를 가동시킨 후 백혈구 분반법을 사용하여 이들 세포를 얻어 이식에 이용하게 되었으며^{2~4)} 제대혈⁵⁾ 및 태생기의 간이나 태생기 16주 이후의 골수 등에서 수확하는 방법^{6, 7)}도 알려져 있다. 항암화학요법을 한 다음 말초혈액으로부터 얻은 조혈전구세포를 투여함으로써 조혈기능이 조기에 회복된다는 사실이 보고되어^{2, 7)} 여러 질병의 치료에 널리 이용되어 왔으며 근래에는 제대혈 이식을 제외하고는 가동화를 일으킨 말초혈의 조혈전구세포 이식이 더 많이 이용되고 있다.³⁾ 또한 조혈성장인자의 임상적 응용으로 이식후 백혈구와 혈소판이 감소되는 기간을 줄여 감염이나 출혈 등의 합병증을 극복하는 것이 어느 정도 가능해졌으며 이들 cytokine과 골수 미세환경간의 상호 작용이 조혈모세포의 자가복제, 증식, 분화 등에 직접적인 영향을 미친다는 사실도 규명되어 체외증식을 통해 조혈전구세포의 수를 증가시킨 다음 이를 투여한다는 개념이 나타나게 되었다.^{8, 9)} 즉 분화가 충분히 일어난 기능적 말단세포를 체외에서 증식시킨 뒤 투여하여 고용량 화학요법 후 일어나는 단기간의 불가피한 세포감소 기간을 줄일 수 있고 또한 조혈모세포의 수와 기능을 극대화시킴으로써 소수의 조혈모세포만 얻어도 이식에 충분한 양을 만들

수 있으며^{10, 11)} 특히 제대혈 이식시에는 얻을 수 있는 조혈모세포의 수가 한정되어 있어 생착이 골수나 말초혈액을 이용한 이식 때보다 자연되는 경향이 나타나므로 이를 보완하는 동시에 성인에도 제대혈 이식이 가능하도록 조혈전구세포의 체외증식에 대한 연구가 가속화되고 있다.^{12, 13)} 이식 가능한 조혈전구세포의 증가이외에 소수의 조혈모세포만 얻어도 체외증식에 의해 생착이 이루어질 수 있으므로 악성 종양세포의 오염을 줄일 수 있으며,^{14, 15)} 또한 증식기간 동안 오염된 종양세포의 수가 한층 더 감소된다는 장점이 있고 동일인으로부터 얻어 냉동시킨 조혈세포를 반복적으로 사용할 수도 있다. 그리고 체외증식 기간동안 세포의 조작이 얼마든지 가능해지므로 특정세포의 제거 또는 증식을 유도할 수 있으며 조혈모세포를 이용한 유전자치료에 이용할 수도 있게 되었다.^{16, 17)} 이러한 체외증식으로 얻은 조혈모세포의 이식이 임상에 이용되어 악성종양의 항암화학요법 후 골수기능의 회복에 일익을 담당할 수 있게 되었으나^{9, 11, 18, 19)} 반면 체외 증식된 조혈세포로는 장기간 모든 lineage의 생착이 어려울 수 있다는 보고도 있으므로²⁰⁾ 이에 대한 연구도 지속되어야 할 것이다.

체외증식에 영향을 주는 인자로는 사용한 조혈성장인자의 종류와 양, 세포의 농도, 배지의 선택, 동물 또는 인체의 혈장성분의 첨가 여부, 골수 stromal cell의 영향 및 bioreactor의 이용 등이 고려되어야 하고 가장 적합한 배지 및 배양방법, 배양기간, 성장인자의 종류와 적정량 등에 대해 계속 연구가 진행될 것으로 보이며^{3, 9, 21, 22)} 진정한 조혈모세포의 확장을 측정할 수 있는 더 정확한 평가방법에 대한 연구도 진행되리라고 생각된다.

조혈모세포의 체외증식 및 임상적 응용

근래 조혈모세포를 체외에서 증식시킨 후 형성된 조혈전구세포에 대한 관심이 집중되고 이의 임상적 응용이 그 적용범위를 넓혀가고 있다.^{9, 11, 13, 14, 18, 19)} 이러한 경우 백혈구분반시술의 횟수를 대폭 줄일 수 있어 직경이 큰 카테타의 삽입으로 인한 불편감과 부작용을 줄일 수 있고²¹⁾ 체외에서 증식을 하므로써 이식을 위해 수집한 조혈모세포의 절대적인 수가 적더라도 체외에서 증식을 하여 이식이 가능하므로 수집시에 일어날 수 있는 악성종양 세포의 오염이 감소되며 또한 CD34 양성세포만 선택하여 증식에 이용할 수 있다는 점과 비록 종양세포의 오염이 일어나더라도 체외증식 기간동안 cytokine이나 항암약제 또는 암세포에 대한 항체 등을 사용하여 종양세포를 거의 제거할 수 있는 등 골수 정화의 목적으로 부합되는 장점이 있다.^{14, 15)} 그리고 동일인에서 1회의 수집으로 얻어진 조혈모세포를 냉동하여 필요에 따라 증식을 시켜 투여할 수도 있어 고용량 화학요법과 더불어 이식을 반복하여 시행할 수 있으며 이는 고용량의 항암화학 치료를 여러 차례 실시하는 것이 여러 약제를 한번에 사용하는 것보다 더 효과적이라는 결과에 따른 적합한 치료방법이 될 수 있고,^{21, 23)} 반복적인 약물투여시 체내 조혈모세포의 비축이 감소될 수 있으므로 치료 초기에 먼저 조혈모세포를 수집한 다음 그 이후의 치료시에는 이미 보존된 조혈모세포를 일부 증식시켜 사용할 수 있어 재발 등의 치료에 합당하다고 알려져 있다.^{21, 23, 24)} 또한 많은 환자에서 과거 치료나 광범위한 방사선조사 등으로 조혈모세포의 수집이 잘 되지 않는 경우 소량의 조혈모세포만 얻어지더라도 증식시켜 사용할 수 있으리라 여겨진다.³⁾ Muench 등²⁵⁾은 쥐에서 고식적인 골수이식을 한 경우 골수의 체외증식 후 조혈모세포를 이식한 성적을 비교하여 혈소판과 호중구의 회복이 증식된 세포를 투여하였을 때 더 조기에 일어나고 생존율도 더 높다는 결과를 얻었으며 또 repopulating potential도 골수이식과 유사하게 유지된다는 사실을

보고한 바 있다. 특히 제대혈을 이용한 이식시에는 제한된 양의 조혈전구세포 밖에 수집할 수 없으나 증식능력이 골수나 말초혈에서 얻은 조혈세포보다 우월하므로 성인에서 골수억제가 일어난 경우 체외 증식으로 얻어진 제대혈의 이식이 가능해지고 현재 까지 지도가 되지 않은 반복적인 이식치료도 할 수 있게 되었으며 한 제대혈로 여러 환자에게 이식을 할 수도 있으리라 기대된다.^{12, 13)} 이러한 체외증식은 성숙된 혈구세포를 생산하여 투여할 수 있어 항암 치료 등으로 일어난 범혈구감소증에 직접적인 효과를 기대할 수 있으며³⁾ 이외에도 면역치료를 위한 dendritic cell의 증식,²⁶⁾ 특이세포독성 T림프구 증식을 통한 치료의 적용,²⁷⁾ 유전자치료^{16, 17)} 등에 널리 이용되고 있으며 계속 그 범위를 넓혀가고 있다. (Table 1)

일반적으로 4×10^6 CFU-GM/kg 정도의 조혈전구세포를 대량 이식투여한 경우에도 약 7~10일이 지나야 임상적으로 생착의 증거가 나타나는데 G-CSF 등의 cytokine을 추가하였을 때 백혈구 및 혈소판의 증가가 일어나는 시점이 앞당겨질 수는 있으나 그 효과가 체외증식시 실험에서 나타나는 것만큼 뚜렷 하지는 않다고 알려져 있다.³⁾ 이러한 기간은 체외에서 조혈모세포를 증식하였을 때 반고형배지에서 집락이 형성되기까지 걸리는 시간과 유사하며 체내 주입된 조혈모세포가 골수로 이동한 다음 분화가 진행되어 성숙한 세포로써 말초혈액에 유리된 후 생착이 인지되기까지 걸린 시간을 반영한다고 보여

Table 1. Clinical Application of Ex Vivo Expansion

Expansion of committed progenitor cells
Expansion of long-term repopulating stem cells
Purging of tumor cells
Obtaining purified stem cells for multiple transplants
Expansion of cord blood stem cells
Production of dendritic cells for immunotherapy
Hematopoietic transfer of therapeutic genes
Possibility of multiple transplants
Expansion, selection and depletion of specific cells

진다.³⁾ 이러한 관점에서 이식 후 혈구감소증을 경감시키기 위해 전구세포와 그 이상의 분화가 일어난 혈구세포를 골수구계의 성장인자와 골수의 hematopoietic stroma를 첨가하여 증식시킨 뒤^{28~31)} 얻어진 전골수구와 골수구를 투여하였을 때 증식을 시키지 않은 조혈전구세포 이식보다 생착이 더 빨리 일어날 수 있으며 적절한 배양 및 증식 방법에 따라 적혈구계나 거핵구계의 선택적인 증식도 가능하리라고 기대되고 있다.^{28~31, 32~39)}

쥐 조혈모세포의 체외 증식

치명적인 방사선조사를 받은 쥐의 골수기능을 장기 배양한 골수세포를 투여함으로써 회복시킬 수 있다는 많은 연구가 이루어졌는데 장기 배양하는 동안 retrovirus를 이용한 DNA marking 방법을 통해 repopulation을 일으키는 조혈전구세포의 분열이 진행되어 세포의 증식이 나타나는 반면 repopulation unit를 이루는 조혈모세포의 전체적인 숫자는 시간이 지남에 따라 감소된다는 사실도 알려졌다.³⁸⁾ Muench 등²⁵⁾은 5-fluorouracil로 전처치를 하여 세포주기에 돌입해 있는 성숙된 전구세포를 제거하고 미성숙한 quiescent progenitor가 골수에 많도록 한 뒤 얻어진 골수를 IL-1, IL-3, IL-6 및 stem cell factor 존재하에 7일간 배양하여 세포증가의 결과를 판정한 후(Table 2) 이식을 하였을 때 일반적인 골수이식과 비교하여 백혈구와 혈소판의 회복이 cytokine 및 20%의 fetal bovine serum을 같이 사용한 경우 골수이식보다 더 조기에 일어난다고 보고하였다.

근래 혈장을 넣지 않은 배지에 stem cell factor와

GM-CSF의 cytokine을 골수배양에 첨가하여 증식한 경우 CFU-GM의 증가가 뚜렷이 나타나는 반면 spleen colony forming unit(CFU-S)의 증가는 두드러지지 않고 유지되는 정도인데 반해 repopulation 능력은 최대로 1주일밖에 지속되지 않으며 더 장기간 배양시 이식능력이 소실될 수 있다고 보고된 바 있다.²²⁾ 이는 committed progenitor로 치명적인 방사선조사를 받은 쥐의 생명을 보호할 수는 있으나 장기간의 골수복원력은 없을 수 있다는 점과 조혈전구세포의 증식능이 무한하지는 않으므로 연속적인 골수이식시 조혈능력의 감소로 말미암아 결국 이식을 마지막으로 받은 쥐가 죽게 되는데 골수이식간에 시간간격을 늘이고 이식한 세포수를 증가시키면 장기간의 골수 복원을 일으킬 조혈모세포의 고갈은 피할 수는 없지만 단기간의 생존에 향상을 가져올 수 있다는 사실로 증명되고 있다.²⁵⁾

또한 Rebel 등³⁹⁾도 혈장을 함유하지 않은 배지에 stem cell factor와 IL-6 및 erythropoietin을 첨가하였을 때 조혈전구세포의 확장이 가능하였으나 장기간의 생체내 골수복원세포는 투여한 숫자가 유지되는 정도에 그쳤다고 발표하였다. 그리고 이와 유사한 결과를 Sprangrude 등⁴⁰⁾도 보고하였는데 25개 까지의 한정된 세포만으로도 이식이 가능하며 조혈기관의 회복을 일으킬 수 있으나 기능적으로는 완전한 회복이 어렵다고 하였다. 이상을 종합하여 쥐에서 cytokine을 이용한 조혈모세포의 체외증식으로 얻은 조혈전구세포로는 조혈기능의 복원을 앞당길 수 있으나 골수의 long-term repopulating cell의 증식은 부족하다고 할 수 있지만 Rebel 등³⁹⁾은 장기 복원력이 유지될 수 있다고 하였고 그외 구동화한 말초혈

Table 2. Fold-increase(Δ) in Progenitor Populations after 7 days Liquid culture(Muench et al.)

Δ -culture stimulus	Δ HPP-CFC	Δ CFU-S	Δ LPP-CFC
Medium alone	0.4	Not done	0.7
IL-1 + IL-3	80	120	520
IL-1 + SCF	280	150	1000
IL-1 + IL-6 + SCF	710	Not done	1200
IL-1 + IL-3 + IL-6 + SCF	95	Not done	1800

Abbreviation; HPP-CFC, High proliferative potential colony forming cells; LPP-CFC, Low proliferative potential colony forming cells; SCF, Stem cell factors

액의 조혈모세포를 증식시켜 5대까지 연속적인 이식이 가능하였다는 보고도 있으며⁴¹⁾ Holyake 등⁴²⁾ 역시 stem cell factor와 IL-11의 2 종류만의 조혈성장인자로 단기간의 이식후 회복과 장기간의 골수복원력이 증가함을 보고한 바 있다. Muench 등²⁵⁾도 체외증식한 골수가 조혈기능을 유지하여 더 적은 수의 세포로 2차의 골수이식을 할 수 있었다고 하며 long-term culture initiating cell(LTC-IC)의 유지에는 stem cell factor와 IL-3 및 IL-6의 병용이 가장 좋은 결과를 가져온 반면 IL-1 β 또는 IL-1 및 IL-3의 병합첨가로 LTC-IC의 감소와 생체의 골수복원력 저하를 일으킨다고 하여⁴³⁾ 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다.

인체 조혈모세포의 체외 증식

골수나 가동화한 말초혈액 및 제대혈의 조혈전구세포를 체외에서 성장인자와 같이 배양하였을 때 세포의 증식이 일어나는데 투여한 세포의 근원과 CD34+ 세포의 선택여부 및 체외 배양방법(stroma 첨가 상태, perfusion culture 사용 등)에 따라 증식정도와 증식된 세포의 특성에 차이가 있을 수 있다고 알려져 있다.⁴⁴⁾ 즉 단핵세포와 CD34 양성세포를 체외에서 증식한 경우 CD34 양성세포군에서 증식이 더 많이 일어나 7~14일정도 배양시 최고조에 달하게 되나 배지에 존재하는 CD34 양성세포의 실제적인 숫자는 시간이 지남에 따라 감소됨이 관찰되며 권³⁷⁾의 보고에서도 말초혈액 조혈전구세포의 증식은 CD33과 CD34 양자 모두 양성인 세포가 CD33 음성 CD34 양성인 세포에 비해 훨씬 더 증가된다고 발표된 바 있다. 체외증식에 이용되는 조혈성장인자로는 flt-3 ligand, stem cell factor, platelet-derived growth factor, erythropoietin, IL-3, IL-6, thrombopoietin, G 또는 GM-CSF, PIXY 321 등이 있으며 이들에 의해 증식뿐 아니라 분화도 진행된다고 보고되어 있다. 그러나 체외 증식된 조혈모세포의 자가복제 능력에 관해서는 논란이 많아 조혈모세포를 선택배양하였을 때 유핵세포와 전구세포는 증식이 심하게 일어나나 원시조혈모세포는 유지되는 정도라

는 보고에 이어 소수의 CD34+ CD38- 세포를 stroma층과 같이 증식한 경우 LTC-IC의 자가복제가 일어나지만 stroma층을 첨가하지 않았을 때는 LTC-IC가 자가복제 능력을 지니나 장기간 휴지기 상태로 남아 있게 된다는 주장도 있으며 transforming growth factor- β (TGF- β)의 항체를 첨가하면 이들 조혈모세포가 세포주기로 들어와 증식이 된다는 보고도 있다.^{44, 45)} 이러한 결과는 원시조혈모세포가 주로 세포주기의 휴지기에 존재하고 성장인자에 대한 반응이 예민하지 않은데 기인하므로 TGF- β 에 대한 항체로 어느정도 극복은 가능하나 조혈모세포의 고갈을 피할 수 없으며 또한 자가복제가 가능한 조혈모세포의 증식을 시작하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 아직 밝혀지지 않은 인자들이 있으리라고 여겨지고 있다.^{44, 45)} 그리고 체외증식된 조혈모세포의 장기 복원능력을 알아보기 위해 태생기의 양이나 SCID mouse 등의 동물모델에 이식을 하여 평가하는 방법이 개발되어 이를 통해 체외에서 장기간의 증식으로 복원능력이 감소됨이 알려졌으며 구동화된 말초혈액의 조혈모세포를 IL-3, IL-6 및 stem cell factor로 체외증식을 한 경우 LTC-IC가 48시간까지는 많이 관찰되나 그 이후 급격히 감소 된다는 사실로 이들 세포는 체내에서 이미 자극을 받아 증식이 극대화되어 있는 상태이므로 더 이상의 증식이 어려울 수 있다는 것을 의미한다고 받아들여지고 있다.^{44, 46)}

체외증식한 조혈전구세포를 실제로 이식치료에 사용한 것은 근래에 와서 시작되었는데¹¹⁾ 골수와 말초혈 및 제대혈의 체외증식시 유핵세포나 성숙된 CFU-GM과 호중구가 7~21일에 걸쳐 급격히 증가하므로 이를 근거로 임상에 응용되고 있다. Williams 등¹⁹⁾은 12일간 체외증식한 전구세포를 체중 kg당 157×10^6 개까지 투여한 경우에도 특별한 독성반응이나 부작용이 나타나지 않았고 세포감소의 기간과 정도도 체외증식을 않고 시행한 조혈모세포이식과 별 차이가 없었으나 더 많은 양의 조혈세포를 투여했을 때 보다 효과적인 조혈기능의 회복이 있을 것으로 보고하였는데 이들은 조혈성장인자로 PIXY 321만 첨가하였으므로 효과적인 증식을 일으

킬 수 있는 다른 성장인자들을 동시에 사용하였다 면 더 나은 결과가 나타날 수 있었으리라 보여진다. 그리고 Champlin 등⁴⁷⁾은 10명의 고위험군 유방암 환자로부터 얻은 골수를 PIXY 321, erythropoietin 및 hydrocortisone으로 체외증식하여 유핵세포는 3배, 접락형성세포는 4.6배, LTC-IC는 1.3배의 증가가 이루어짐을 관찰하였고 골수이식 4시간 후 체외증식한 세포를 투여하였는데 모든 환자에서 생착이 이루어졌음을 발표하였다. 이로써 골수나 말초혈로 구동된 CD34 양성세포를 단기간 성장인자에 접촉시켰을 때 특별한 부작용은 없으며 생착이 일어나는 속도에도 별 변하는 없었지만 증식된 유핵세포중 거핵세포의 전구세포가 증가됨을 확인함으로써 제대혈 이식시 혈소판의 증가가 특히 늦게 나타날 수 있는데 대한 해결방법의 가능성에 관심이 기울여지고 있다.⁴⁴⁾(Table 3) Cytokine의 일부는 체외증식을 억제하거나 분화 및 apoptosis를 조장하여 조혈모세포의 고갈을 일으킨다고 알려져 있으며 이들에는 TGF- β ⁴⁸⁾ 및 Macrophage inflammatory protein 1 α ,⁴⁹⁾ interferon gamma⁵⁰⁾ 등이 있는데 향후 새로운 성장인자를 찾거나 성장인자의 가장 효과적인 복합적 사용외에도 억제인자의 활동을 방어하는데 대한 연구도 진행될 것으로 보인다.

체외증식의 기술적 측면

조혈모세포의 체외증식에는 조혈성장인자의 복합적 사용, 투여할 세포의 농도, CD34 양성세포의

순도, stroma 세포의 첨가여부 및 배지에 자가혈장이나 fetal calf serum을 혼합할 것인지 또는 혈장을 넣지 않은 serum free media를 이용해야 하는지 등 여러 요인이 검토되어야 한다. 최근 증식된 조혈모세포의 성상을 평가하여 Breems 등⁵¹⁾은 stroma와 접촉시켜 증식하는 것이 가장 적합하였으며 조혈성장인자로는 IL-3, stem cell factor, IL-6 및 Flt-3 ligand와 thrombopoietin을 첨가한 경우 효과적이었다고 보고하였다. Stroma와 조혈세포를 동시에 배양하기 위해서는 stroma 세포, 혈관내피세포 및 osteoclast 등의 feeder cell이 포함되게 되므로 이들 세포간의 상호적인 작용이나 이들 세포들이 분비하는 성장인자들이 증식에 미칠 수 있는 영향에 대해 논란의 여지가 많이 남아 있다고 보인다.^{21, 29, 30, 51)} 인체에서 stroma 세포는 조혈모세포를 유지시키고 증식을 자지하고 있으므로 체외배양에서도 이들 지지세포를 같이 첨가하여 배양하는 것이 합당하다고 여겨지고 있다.

최근 stroma 첨가시와 거의 유사한 환경을 제공할 수 있는 배지를 사용하거나 유전공학을 통해 합성한 성장인자를 이용하는 방법도 강구되고 있다. 체외증식한 조혈모세포를 임상적으로 이용하기 위한 stroma 세포의 첨가는 여러 문제를 내포하고 있는데 stroma 층을 자신의 stroma 세포로 형성시킬 경우 골수천자를 통해 얻어야 하므로 이로 인한 침습적인 시술이 필요하고 다른 사람으로부터 동종 stroma의 이용은 쉽지 않을 뿐만 아니라 방사선조사가 필요해지며 감염원으로서의 역할도 무시할 수

Table 3. Clinical Trials Evaluating the Effect of Cytokine-Mediated Expansion

Cells for transplant	Transplant	Nucleated cell expansion	Progenital expansion	LTC-IC expansion	Engraftment
PBSC CD34+, 12 days	PBSC+exp	6.24-fold	50.3-fold	N/E	5/6 exp
SCF+IL+IL-3+IL-6+EPO ¹¹⁾	CD34+				CD34+ alone
PBSC CD34+, 12days	PBSC+exp	26-fold	4.7-fold	N/E	8/8
PIXY 321 ¹⁹⁾	CD34+				
BM MNC, PIXY 321 + EPO in bioreactor, 12days ⁴⁷⁾	BM+exp	3-fold	4.6-fold	1.3-fold	10/10
	BM				

Abbreviation : PBPC, Peripheral blood stem cells; BM, Bone marrow; MNC, Mononuclear cells; Exp, expanded; LTC-IC, Long-term culture-initiating cell

없다는 점외에도 증식에 일관되지 않은 다양한 변수를 제공할 수 있어 인체의 stromal cell line이 개발되기도 하였으나 임상적으로 이용가능한 동종의 stroma는 아직 없는 실정이다.^{44, 45)} 그리고 stroma 세포들로 인해 필요한 성장인자의 정확한 양을 투여할 수 없으며 증식된 다양한 세포의 면역표현형 검사에 어려움이 뒤따른다는 것과 보다 중요한 점은 조혈모세포나 미성숙조혈전구세포는 stroma층에 부착되는 경향이 있으므로 증식후 이들 세포를 얻으려면 물리적 방법이나 효소를 사용하여 분리해야 하며 환자에 조혈모세포 이식시 생착과는 관계가 없는 stroma 세포가 어느정도 오염될 수 있고 또한 이들 stroma 세포의 증식이 종양세포의 증식과 관계가 있을지에 대해서도 아직 규명이 확실치 않아 suspension 배양방식을 선호하는 경향도 많은 형편이다. 또 체외증식에 이용되는 모든 세포나 액체성분이 인체에 부작용을 일으키지 않아야 하므로 fetal calf serum의 사용이 배제되어야 하고 성장인자의 지속적인 보충^{35, 36)}과 노폐물의 제거가 필요하므로 perfusion system이 완비된 bioreactor의 사용이 권장되며 Schwartz 등⁵²⁾은 매일 배양액의 절반 정도를 갈아주어야 한다고 제시하고 있다.

결 론

CD34 양성세포와 조혈성장인자의 단기간 접촉으로 유핵세포, CD34 양성세포 및 호중구와 거핵구의 팽창이 일어나나 자가 복제능력은 감소되는 경향이 있으며 골수와 말초혈액, 제대혈 및 태생기 간의 조혈모세포는 증식능력과 성장 양상이 서로 다르게 나타날 수 있다.

체외증식시 골수의 stroma 세포를 첨가하여 조혈모세포의 수와 기능을 유지시킬 수 있으나 골수 복원능력을 지닌 원시조혈모세포의 증식은 잘 일어나지 않으므로 골수 미세환경을 이루고 있는 특정조직이나 세포가 원시조혈모세포의 증식과 관계되리라 여겨지고 있다. 이러한 체외증식의 특성으로 백혈구나 혈소판 감소의 치료에 적합하게 이용될 수 있으며 자가 복제능력을 지닌 조혈모세포의 증식에

필요한 cytokine, 원시조혈모세포를 찾아낼 수 있는 표식자 및 적합한 assay 방법 등에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer M, Johnson FL, Neiman PF, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD : *Bone marrow transplantation*. *N Eng J Med* 292:832-843, 1975
- 2) Kessinger A, Armitage JO : *The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies*. *Blood* 77:211-213, 1991
- 3) To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA : *The biology and clinical uses of hematopoietic cells in vitro*. *Blood* 89:2233-2258, 1997
- 4) McCredie B, Freireich EJ, Hersh EM, Curtis JE, Kaizer H, Anderson K : *Early bone marrow recovery after chemotherapy following the transfusion of peripheral blood leukocytes in identical twins*. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2:11, 1970(abstr)
- 5) Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Fredman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA : *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling*. *N Engl J Med* 321:1174-1178, 1989
- 6) Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Marinucci M, Peschle C : *Human embryonic hematopoiesis kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac→liver transition*. *J Clin Invest* 78:51-60, 1986
- 7) Zanjani ED, Ascensao JL, Harrison MR, Tavassoli M : *Ex vivo incubation with growth*

- factors enhances the engraftment of fetal hematopoietic cells transplanted in sheep fetuses. *Blood* 57:61-70, 1992
- 8) Brandt J, Stour EF, van Besien K, Bridell RA, Hoffman R : Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow. *J Clin Invest* 86:932-941, 1990
 - 9) Emerson SG : Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors and stem cells : The next generation of cellular therapies. *Blood* 87:3082-3088, 1996
 - 10) Isocove NN, Shaw AR, Keller G : Net increase of pluripotential hematopoietic precursors in suspension culture in response to IL-1 and IL-3. *J Immunol* 142:2332-2337, 1992
 - 11) Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L : Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 333:283-287, 1995
 - 12) Broxmeyer HE : Questions to be answered regarding umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells and their use in transplantation. *Transfusion* 35:694-702, 1995
 - 13) Kendall PAD, Horsley H, Nicol A, Nieda M, Bradly B, Hows JM : Clinical application of in vitro expansion of cord blood. *Bone marrow transplant* 22(suppl) S63-S65, 1998
 - 14) Vogel W, Behringer D, Scheding S, Kanz L, Brugger W : Ex vivo expansion of CD34+ peripheral blood progenitor cells : Implications for the expansion of contaminating epithelial tumor cells. *Blood* 88:2707-2713, 1996
 - 15) Widmer L, Pichert G, Jost LM, Stahel RA : Fate of contaminating t(14;18)+ lymphoma cells during ex vivo expansion of CD34-selected hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88:3166-3175, 1996
 - 16) Bodine DM, Moritz T, Donahue RE, Luskey BD, Kessler SW, Martin DI, Orkin SH, Nienhuis AW, Williams DA : Long-term in vivo expression of a murine adenosine deaminase gene in rhesus monkey hematopoietic cells of multiple lineages after retroviral mediated gene transfer into CD34+ bone marrow cells. *Blood* 82:1975-1980, 1993
 - 17) Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, Ugazio AG, Mavilio F : Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA(-) immunodeficient patients. *Science* 270:470-475, 1995
 - 18) Alcorn MJ, Holyoake TL, Richmond L, Pearson C, Farrell E, Kyle B, Dunlop DJ, Fitzsimons E, Steward WP, Pragnell IB, Franklin IM : CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded ex vivo and used for transplantation with little or no toxicity. *J Clin Oncol* 14:1839-1847, 1996
 - 19) Williams SF, Lee WJ, Bender JG, Zimmerman T, Swinney P, Blake M, Carreon J, Schilling M, Smith S, Williams DE, Oldham F, van Epps D : Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 87:1687-1691, 1996
 - 20) Holyake TL, Alcorn MJ, Richmond L, Farrell E, Pearson C, Green R, Dunlop DJ, Fitzsimons E, Pragnell IB, Franklin IM : CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens. *Bone Marrow Transplant* 19:1095-1101, 1997
 - 21) Shapiro F, Yao TJ, Raptis G, Reich L, Norton L, Moore MAS : Optimization of conditions for ex vivo expansion of CD34+ cells from patients with stage IV breast cancer. *Blood* 84:3567-3574, 1994

- 22) Brown RL, Sheng F, Dusing SK, Fischer R, Patchen M : *Serum-free culture conditions for cells capable of producing long-term survival in lethally irradiated mice.* *Stem Cells* 15:237- 245, 1997
- 23) Crown J, Kritz A, Vahdat L, Reich L, Moore MAS, Hamilton N, Schneider J, Harrison M, Gilewski T, Hudis C, Gulati S, Norton L : *Rapid administration of multiple cycles of high-dose myelosuppressive chemotherapy in patients with metastatic breast cancer.* *J Clin Oncol* 11:1144-1149, 1993
- 24) Neben S, Hemmen S, Montgomery M, Ferrara J, Mauch P, Hellman S : *Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents.* *Exp Hematol* 21:156-162, 1993
- 25) Muench MO, Firpo MT, Moore MAS : *Bone marrow transplantation with interleukin-1 plus kit-ligand ex vivo expanded bone marrow accelerates hematopoietic reconstitution in mice without loss of stem cell lineage and proliferative potential.* *Blood* 81:3463-3473, 1993
- 26) Hart DNJ : *Dendritic cells : Unique leukocyte populations that control the primary immune response.* *Blood* 90:3245-3287, 1997
- 27) Lieberman J, Skolnik PR, Parkerson GR, Fabry JA, Landry B, Bethel J, Kagan J : *Safety of autologous, ex vivo-expanded human immunodeficiency virus(HIV)-specific T-lymphocyte infusion in HIV-infected patients.* *Blood* 90:2196-2206, 1997
- 28) Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ : *Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage.* *Blood* 89:1405-1412, 1992
- 29) Schwartz GN, Warren MK, Rothwell SW, Zujewski J, Halverson DC, Cowan KH, Tolcher A, O'Shaughnessy J, Gress RE : *Post-chemotherapy and cytokine pretreated marrow stromal cell layers suppress hematopoiesis from normal donor CD34+ cells.* *Bone Marrow Transplant* 22:457-468, 1998
- 30) Gupta P, McCarthy JB, Verfaillie CM : *Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells.* *Blood* 87:3229-3236, 1996
- 31) Koller MR, Manchel I, Gortry KL, Armstrong RD, Smith AK : *Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system.* *Bone Marrow Transplant* 21:653-663, 1998
- 32) Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L : *Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 β , IL-6, IL-3, interferon gamma and erythropoietin.* *Blood* 81:2579-2584, 1993
- 33) 조덕연, 김현수, 박상준, 김종숙, 최지영, 윤환중, 김삼용 : 골수세포의 단기배양을 통한 조혈 전구 세포의 증폭. 대한혈액학회지 31:259-274, 1996
- 34) 김신애, 홍대식, 김숙자, 박성규, 원종호, 서원석, 백승호, 박희숙 : 말초혈액, 골수 및 제대혈에서 CD34 양성세포의 체외증폭과 표현형에 관한 연구. 대한조혈모세포이식학회지 2:101-111, 1997
- 35) 권기영 : 조혈성장인자의 종류와 접촉기간의 차이가 골수단핵세포의 집락형성에 미치는 효과. 한국 BRM학회지 7:55-65, 1997
- 36) 권기영 : 동일인의 골수와 말초혈액 단일세포에 대한 조혈성장인자의 효과. 대한혈액학회지 32: 221-233, 1997
- 37) 권기영 : 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM 및 CD34 세포에 대한 조혈성장인자의 효과. 대한혈액학회지 32:333-346, 1997.
- 38) Fraser CC, Szilvassy SJS, Eaves CJ, Humphries RK : *Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstituting ability.* *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1968-

1972, 1992

- 39) Rebel VI, Dragowska W, Eaves CJ, Humphries RK, Lansdorp PM : *Amplification of Sca-1 + Lin-WGA + cells in serum-free cultures containing steel factor, interleukin-6, and erythropoietin with maintenance of cells with long-term in vivo reconstituting potential.* *Blood* 83:128-136, 1994
- 40) Spangrude GJ, Brooks DM, Tumas DB : *Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: In vivo expansion of stem cell phenotype but not function.* *Blood* 85:1006-1016, 1995
- 41) Yan XQ, Chen Y, Hartley C, McElroy P, Fletcher F, McNiece IK : *Marrow repopulating cells in mobilized PBPC can be serially transplanted for up to five generations or be remobilized in PBPC reconstituted mice.* *Bone Marrow Transplant* 21:975-981, 1998
- 42) Holyake TL, Freshney MG, McNair L, Parker AN, McKay PJ, Steward WP, Fitzsimons E, Graham GJ, Pragnell IB : *Ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin-11 augments both short-term recovery posttransplant and the ability to serially transplant marrow.* *Blood* 87:4589-4595, 1996
- 43) Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M : *Interleukin-3 or Interleukin-1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells.* *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4040-4044, 1996
- 44) Rice A, Ripoche J, Reiers J : *Hematopoietic stem cell expansion.* *Transfus Sci* 18:263-275, 1997
- 45) von Kalle C, Glimm H, Schulz G, Mertelsmann R, Henschler R : *New developments in hematopoietic stem cell expansion.* *Curr Opinion Hematol* 5:79-86, 1998
- 46) Srour EF, Bregni M, Traycoff CM, Aguero B, Kosak ST, Hoffman R, Siena S, Gianni AM : *Long-term haematopoietic culture-initiating cells are more abundant in mobilised peripheral blood grafts than in bone marrow but have a more limited ex vivo expansion potential.* *Blood cells, Molecules and Diseases* 22:68-81, 1996
- 47) Champlin R : *Ex vivo expansion of haematopoietic cells for transplantation.* *Proceedings of 4th International Symposium Blood Cell Transplantation*, 1996
- 48) Geissler RG, Offmann OG, Eder M, Kojouharoff G, Hoelzer D, Ganser A : *Effect of recombinant human transforming growth factor β and tumor necrosis factor alpha on bone marrow progenitor cells of HIV infected persons.* *Am Hematol* 62:151-155, 1991
- 49) Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A, Ralph P : *Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines(chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells : Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression.* *J Immunol* 15: 3448-3458, 1993
- 50) 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* 15:4149-4157, 1996
- 51) Breems DA, Blockland EAW, Siebel KE, Mayen AEM, Engels LJA, Ploemacher RE : *Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34 + mobilized peripheral blood stem cells.* *Blood* 91:111-117, 1998
- 52) Schwartz RM, Emerson SG, Clarke MF, Palsson B : *In vitro myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factors.* *Blood* 78: 3155-3161, 1991