

다양한 배양 조건에서 제대혈 유래 CD34⁺ 조혈 세포의 체외 증식

최용운 · 오덕재[†]

세종대학교 공과대학 생명공학과
143-747 서울시 광진구 군자동 98
(2005년 12월 8일 접수, 2006년 1월 6일 채택)

Ex vivo Expansion of CD34⁺ Hematopoietic Cells from Cord Blood in Various Culture Environments

Yong Woon Choi and Duk Jae Oh[†]

Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, 98, Gunja-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-747, Korea
(Received 8 December 2005; accepted 6 January 2006)

요 약

본 연구에서는 제대혈 유래의 조혈줄기세포를 효과적으로 배양하기 위한 선행 연구로서 세포 배양 환경에 따른 조혈줄기세포 증식능의 변화를 관찰하였다. 제대혈의 단핵구 세포에서 분리한 CD34⁺ 세포를 성장인자 조성-I(이하, coc-I) (EPO, GM-CSF, SCF, IL-3) 및 성장인자 조성-II(이하, coc-II) (TPO, G-CSF, SCF, IL-6, Flt3/Flk-2 ligand)가 포함되어 있는 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium) 및 무혈청 배지(serum free media, SFM)에서 배양하였으며, 우태아혈청(FBS)의 첨가 영향, 2차원 및 3차원 배양 후 각 조건에서의 세포 증식 및 콜로니 형성능을 비교하였다. 일반적으로 coc-I에서의 세포 증식 및 콜로니 증식이 coc-II에서보다 높았다. 3차원 배양(methocult)에서는 가장 높은 세포 증식(2,258±456배)을 나타냈으며, 같은 조성의 2차원 배양(IMDM + coc-I + FBS)에서는 가장 높은 콜로니 증식(BFU-E: 652±19, CFU-GM: 520±58, CFU-GEMM: 339±100배)이 나타났다. 배지를 기준으로 보면, coc-II 조성에 우태아혈청이 포함되지 않은 경우를 제외한 모든 경우에서 세포 증식 및 콜로니 증식이 무혈청 배지에서보다 IMDM에서 높았다. 결론적으로, 모든 배양 조건 중에서 'IMDM + coc-I + FBS' 및 'IMDM + coc-I'에서 가장 좋은 콜로니 증식을 보였으며, 우태아혈청의 첨가 및 2차원 배양 조건이 콜로니 증식에 더 효과적인 것으로 확인되었다. 본 연구 결과는 앞으로 조혈줄기세포의 체외 증식에 필요한 공정개발이나 생물반응기 설계에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract - This study compared cell expansion and colony forming ability in human cord blood stem cells cultured *ex vivo* with two kinds of cytokine combinations, two kinds of media, presence or absence of fetal bovine serum (FBS) and two or three dimensional (2D or 3D) culture environments. Purified CD34⁺ cells were cultured in the IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) and SFM (Serum Free Medium) containing a cytokine cocktail-I (coc-I) (EPO, GM-CSF, SCF, and IL-3) or a cytokine cocktail-II (coc-II) (TPO, G-CSF, SCF, IL-6, and Flt3/Flk-2 ligand) with or without FBS. Generally, higher cellular and clonogenic expansion were observed in the coc-I cytokine condition, compared to coc-II cytokine condition. 3D (Methocult) and 2D (IMDM + coc-I + FBS) conditions gave the greatest cell (2,258±456 fold) and CFU (BFU-E: 652±19, CFU-GM: 520±58, CFU-GEMM: 339±100 fold) expansions, respectively. In aspect of medium, IMDM was better than SFM, except for coc-II condition without FBS. In conclusion, 'IMDM + coc-I + FBS' and 'IMDM + coc-I' were the best CFU expansions on the occasion of all culture conditions. FBS and 2D conditions had affirmative effect on CFU expansion, generally. These data might provide a variety of notions about *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells.

Key words: *Ex vivo* Expansion, Cord Blood, CD34⁺ Cell

1. 서 론

조혈줄기세포(hematopoietic stem cells, HSC)는 모든 종류의 혈구 세포로 분화할 수 있음과 동시에 자가 증식 능력을 가지고 있는

세포이기 때문에 여러 종류의 혈액 및 면역 질환에서 이식 치료제로써 사용될 수 있다[1].

제대혈(cord blood(CB))은 골수나 말초혈액을 대체할 수 있는 이식용 조직으로서, 그중에 포함되어 있는 조혈줄기세포의 광범위한 적용성에 기초하여 세포 치료제로서의 중요성이 강조되고 있으며, 1900년대 후반부터 조혈줄기 및 조혈전구세포의 특별한 공급원으로

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: djoh@sejong.ac.kr

써 알려져 왔다. 1980년대 초반에는 인간의 태아 혈액에서 조혈전구 세포의 정량화가 이루어졌으며[2, 3], 1980년대 후반에는 fanconi anemia 환자에게 동종이형(allogenic)의 제대혈 이식이 최초로 성공하였다[4]. 현재는 혈액 세포 중에서 줄기세포 후보군의 분리가 가능하며, 여러 종류의 생물 반응기의 개발 및 상업화되어 있는 여러 종류의 성장 인자를 사용해서 기질 세포가 없는 환경에서도 배양할 수 있게 되었다. 또한, 제대혈은 이식편대숙주반응(graft versus host disease, GVHD)의 위험이 낮기 때문에 조직적합성이 완전히 일치하지 않더라도 이식이 가능하다. 그러나 한번 채취할 수 있는 제대혈에 포함되어 있는 조혈 세포의 양으로는 소아나 청소년기의 사람에게만 부분적으로 이식할 수 있는 정도이기 때문에 성인에게 적용하기 위해서는 제대혈에 있는 조혈줄기세포 뿐만 아니라 조혈전구 및 분화된 세포를 동시에 증식해야 할 필요가 있다[5]. 분화된 세포들은 이식 후 부작용으로 발생할 수 있는 호중구 감소 및 혈소판 감소를 막을 수 있으며, 조혈줄기 및 조혈전구세포는 이식 후 장기적인 생존율을 높이는 역할을 한다. 조혈세포의 체외 증식은 재조합 유전자에 의한 인공적인 성장인자의 생산과 더불어 발전할 수 있었다. 1960년대에 이미 여러 종류의 성장 인자가 제대혈에 포함되어 있음이 알려졌다[6]. 이후 지속적인 연구 과정을 통하여 여러 가지 성장 인자의 기능이 규명되었는데, 그 중에서 대표적인 성장인자로서 EPO(erythropoietin)는 적혈구 전구 세포의 성장 및 분화를 촉진하며 더욱 분화된 적혈구 전구 세포로의 증식 및 분화를 촉진하는데 관여함이 알려졌다[7, 8]. IL-3(interleukin-3)는 백혈구 전구 세포의 증식 및 세포 자살을 막는 역할을 하는 것으로 보고되었다[9-11]. 또한, GM-CSF(granulocyte, macrophage colony stimulating factor)는 과립 백혈구, 대식세포, 호산구 전구 세포의 증식을 자극하며[12-14], G-CSF(granulocyte colony stimulating factor)는 과립백혈구 전구 세포의 증식을 자극하고[15, 16], TPO(thrombopoietin)는 거핵구 전구 세포의 증식을 자극하는 것으로 보고되었다[17, 18]. Flt3/Flk2 ligand[19, 20] 및 IL-6(interleukin-6)[21-23]는 조혈 세포의 증식 및 분화에는 관여하는 정도가 낮지만, 다른 성장 인자와 함께 조혈 전구 세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 알려졌으며, SCF(stem cell factor)는 조혈전구세포의 생존에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려졌다[24, 25]. 한편, 혈청은 일반적으로 동물 세포 배양에서 성장을 지원하는 역할로서 많이 사용되는데, 배양 조건에 따라 다른 결과가 나타나는 경우가 있으며, 표준화된 연구 결과를 위해서는 광범위한 검증이 요구된다. 또한, 동물에서 유래한 혈청의 사용으로 인하여 동물 유래 감염원에 의한 감염의 위험이 존재하기 때문에 체외 배양에서 혈청을 제외한 배지의 사용은 임상 적용을 위해서 배양 조건을 표준화하는 것뿐만 아니라 이중 유래의 감염원의 위험을 제거할 수 있다는 측면에서 매우 유리한 면이 있으며[26], 현재 이러한 목적을 위해서 특수한 조성의 무혈청 배지가 개발되고 있다. 본 연구에서는 상기에 제시한 다양한 배양 조건에서 조혈줄기세포 증식능의 변화를 관찰하기 위해 8가지 성장 인자(EPO, TPO, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6, Flt3/Flk2 ligand, SCF)를 두 종류의 조성군(coc-I, coc-II)으로 나누었는데, 성장인자 조성-I(coc-I)은 콜로니 분석에 일반적으로 사용되고 있는 Methocult™의 조성을 기본으로 하였고, 성장인자 조성-II(coc-II)는 성장인자 조성-I에 포함되지 않으면서 조혈세포의 체외 증식에 많이 사용되는 성장인자들을 사용하였다. 또한, 두 종류의 배지, 우태아혈청의 첨가 여부, 2차원 및 3차원의 체외 배양 조건에서 포도당 소모, 젖산 생성, 세포의 증식 및 콜로니 형성능을 비교하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2-1. 세포 분리

기증 동의를 받아 확보한 제대혈은 C.P.D.A1 항응고액이 포함되어 있는 혈액 bag(Green Cross, KOREA)에서 4°C의 조건에서 보관 후 24시간 이내에 분리하였다. 세포 분리는 제대혈을 IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) (Gibco, USA)과 1:1 (v/v)로 혼합 후, Ficoll-paque (밀도: 1.077 g/mL) (Pharmacia, Sweden)을 사용한 밀도 구배법으로 400-g의 조건에서 30분 동안 원심분리를 하여 단핵구 세포(mononuclear cells)를 분리하였고, 이를 다시 PBE(PBS/0.5% bovine serum albumin/2 mM EDTA) 300 µl와 혼합 후 FcR blocking reagent 100 µl 및 CD34 microbead(Miltenyi Biotec, Germany) 100 µl를 혼합하여 30분 동안 냉장 보관하였다. 상기의 세포 분산액을 PBE로 1회 세척하고, MidiMACS(Miltenyi Biotec, Germany)를 사용하여 CD34⁺ 세포를 분리하였다. 생존율은 트리판 블루 용액으로 염색 후 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며, 생존율은 95% 이상이였다.

2-2. 배지 및 첨가물

배지는 IMDM(Gibco, USA), 무혈청 배지(Ultraculture)(Cambrex, USA) 및 3차원 배양을 위한 반고형 배지로 콜로니 증식 분석에 사용하는 Methocult™(Stemcell Technologies, Canada)를 사용하였다. 성장인자의 조성은 두 종류를 사용하였다. 성장인자 조성-I(coc-I)은 3 U/mL rh (recombinant human) EPO (erythropoietin) (LG PhD, Korea), 10 ng/mL rh GM-CSF (granulocyte, macrophage colony stimulating factor) (LG PhD, Korea), 50 ng/mL rh SCF (stem cell factor) (Biosource, USA), 10 ng/mL rh IL-3 (interleukin-3) (Biosource, USA)을 포함하고 있고, 성장인자 조성-II (coc-II)는 50 ng/mL rh TPO (thrombopoietin) (R&D system, USA), 40 ng/mL rh G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) (Choongwae, Korea), 50 ng/mL rh SCF (Biosource, USA), 100 ng/mL rh IL-6 (interleukin-6) (Biosource, USA), 80 ng/mL rh Flt3/Flk-2 ligand (R&D system, USA)를 포함하고 있는데, 모든 배지에 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma, USA), 1% (v/v) BSA (bovine serum albumin) (Sigma, USA)의 최종 농도로 첨가하였다. 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) (JBI, Korea)이 첨가된 경우에는 30% (v/v) FBS의 농도로 하였다.

2-3. 세포 농도 측정

크리스털 바이올렛(crystal violet) 용액으로 염색 후 hemocytometer를 사용하여 유핵 세포의 수를 측정하였다. 12 well culture plate(SPL, Korea)의 well에 3.1×10^3 개의 CD34⁺ 세포를 2배수 (n=2)로 접종하였으며, 1 mL의 working volume으로 37 °C의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배지 중의 포도당 및 젖산 농도는 YSI-2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI, USA)를 사용하여 측정하였으며, 배양 14일째에 배지의 절반을 새 배지로 교환하였다. 2차원 및 3차원 배양 환경에서의 차이를 비교하기 위하여 같은 성장인자 조성에서 액체 배지(IMDM + coc-I + FBS) 및 반고형 배지(Methocult™)에 세포를 배양하였다. 증식된 세포는 트리판 블루 및 크리스털 바이올렛 용액으로 분석하여 생존율 및 유핵 세포의 수를 확인하였고, 콜로니 분석에도 사용하였다.

2-4. 콜로니 분석

증식 능력이 있는 세포를 정량적으로 측정할 수 있는 콜로니의 수는 반고형 배지인 Methocult™를 사용하여 CFU-GM(colony-forming units granulocyte/macrophage), BFU-E(burst-forming units erythroid), CFU-GEMM(colony-forming units granulocyte/erythrocyte, macrophage, and megakaryocyte)을 측정하였다. 단핵구 세포에서 분리된 CD34⁺ 세포 및 증식된 세포를 Methocult™ 배지 1 ml/당 2,000개의 비율로 35 mm plastic dish(SPL, Korea)에 4배수(n=4)로 접종한 후 습한 조건에서 37 °C의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 14일 후에 위상차 현미경을 사용하여 형성된 콜로니의 수를 측정하였다. 콜로니를 형성하는 세포의 수가 50개 이상일 때 1개의 콜로니로 개수하였다.

3. 결과 및 고찰

배양 기간 동안 생존 세포(viable cell) 및 유핵 세포(nucleus cell) 수의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 일반적으로 coc-I 및 coc-II 조건에서 모두 배양 6일째 이후에 세포가 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 유핵 세포 수를 기준으로 했을 때, coc-I 조건에서

는 배양 12~14일경에 최대 증식을 보인 후 감소하다가 배지를 교환한 후 3일째부터 다시 증가하는 경향을 나타내었고, coc-II 조건에서는 배양 17일경에 최대로 증식한 후 배지 교환에 관계없이 감소하는 경향을 나타내었다. 세포의 증식은 coc-II 조건에서보다 coc-I 조건에서 더 빠르게 일어났으며, 이는 특히 IMDM 배지 조성에서 두드러지게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Daley 등[27]은 EPO가 세포 증식에 효과적인 영향을 주는 것으로 보고하였고, Piacibello 등[28]은 Flt3 + TPO의 성장 인자 조성이 LTC-IC(long term culture-initiating cell) 증가에 큰 영향을 준다고 보고하였는데, 이는 EPO가 포함되어 있는 coc-I 조건에서 세포의 증식이 더 많이 발생하는 본 실험의 결과와 부합하는 것이었다. coc-I 조건에서 우태아혈청은 세포의 증식 및 콜로니 형성에 긍정적인 영향을 주었으며, coc-II 조건에서 우태아혈청은 세포의 증식에는 긍정적인 영향을 주었으나 콜로니 형성에는 큰 영향을 주지 않았다. Balducci 등[29]은 혈청이 포함되어 있는 배지에서의 유핵 세포 증식 및 CFU-GM의 증식이 혈청이 포함되어 있지 않은 배지에서보다 더 좋은 경향을 나타냈다고 보고하였는데, 이 결과는 혈청이 포함되어 있지 않은 배지에서 더 나은 경향을 보였다는 이전의 보고들과는 상반되는 결과였다[30-32]. Shaddock 등[33]은 조혈줄기세포의 배양에서 배양 1~2

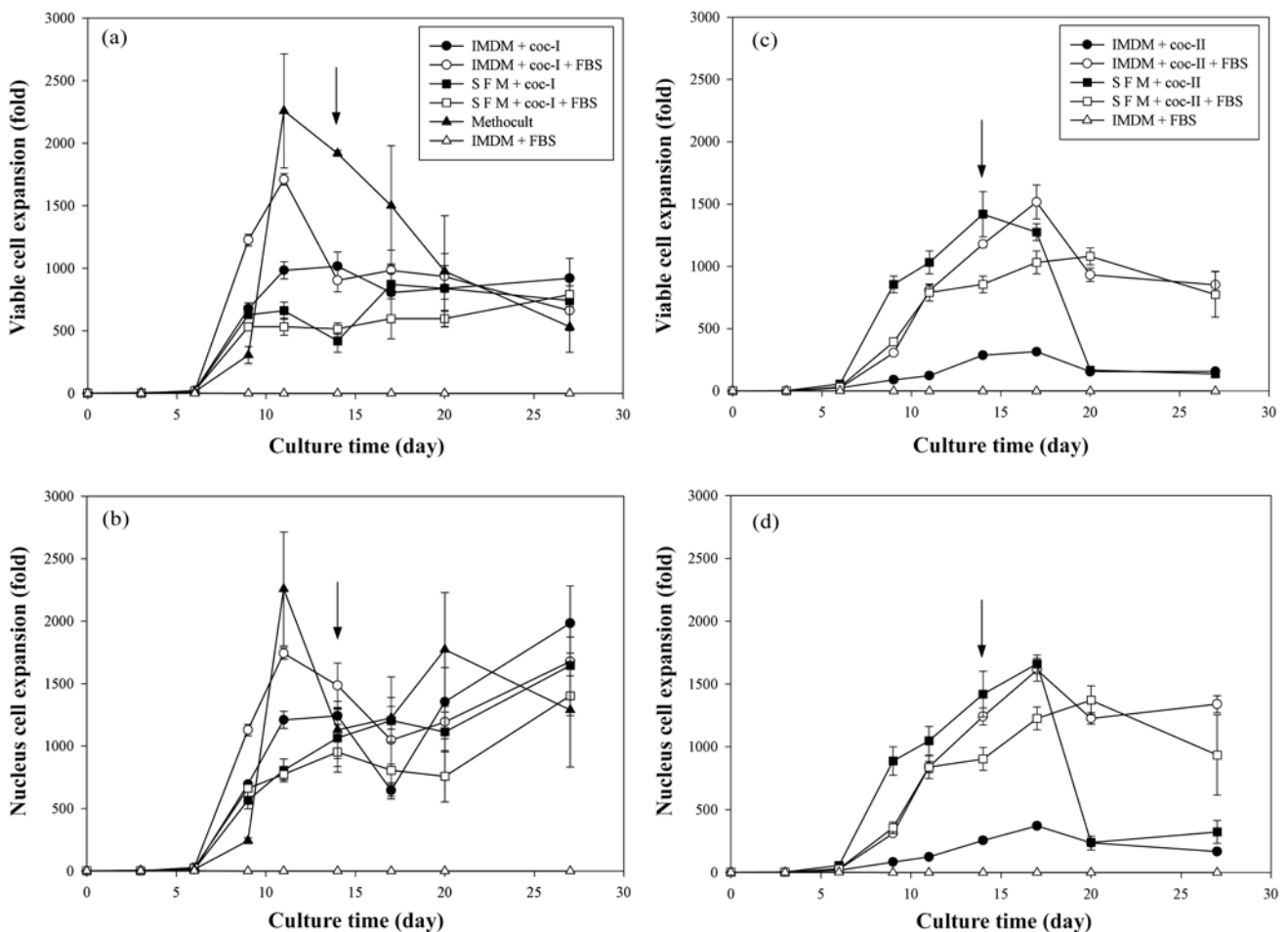


Fig. 1. Time courses of viable cell and nucleus cell expansions in different culture conditions. For viable cell count, trypan blue dye exclusion method was used. For determining nucleus cell expansion, nucleus staining using crystal violet was applied. One milliliter of 3.1×10^3 CD34⁺ nucleated cell suspensions was seeded in a well (12 well plate; n=2). Arrow represents time point of media exchange. At day-14, half of the culture medium was replaced with fresh medium. When FBS was supplemented, its concentration was 30% (v/v). (a), (b): Cytokine cocktail-I (coc-I) was used. (c), (d): Cytokine cocktail-II (coc-II) was used.

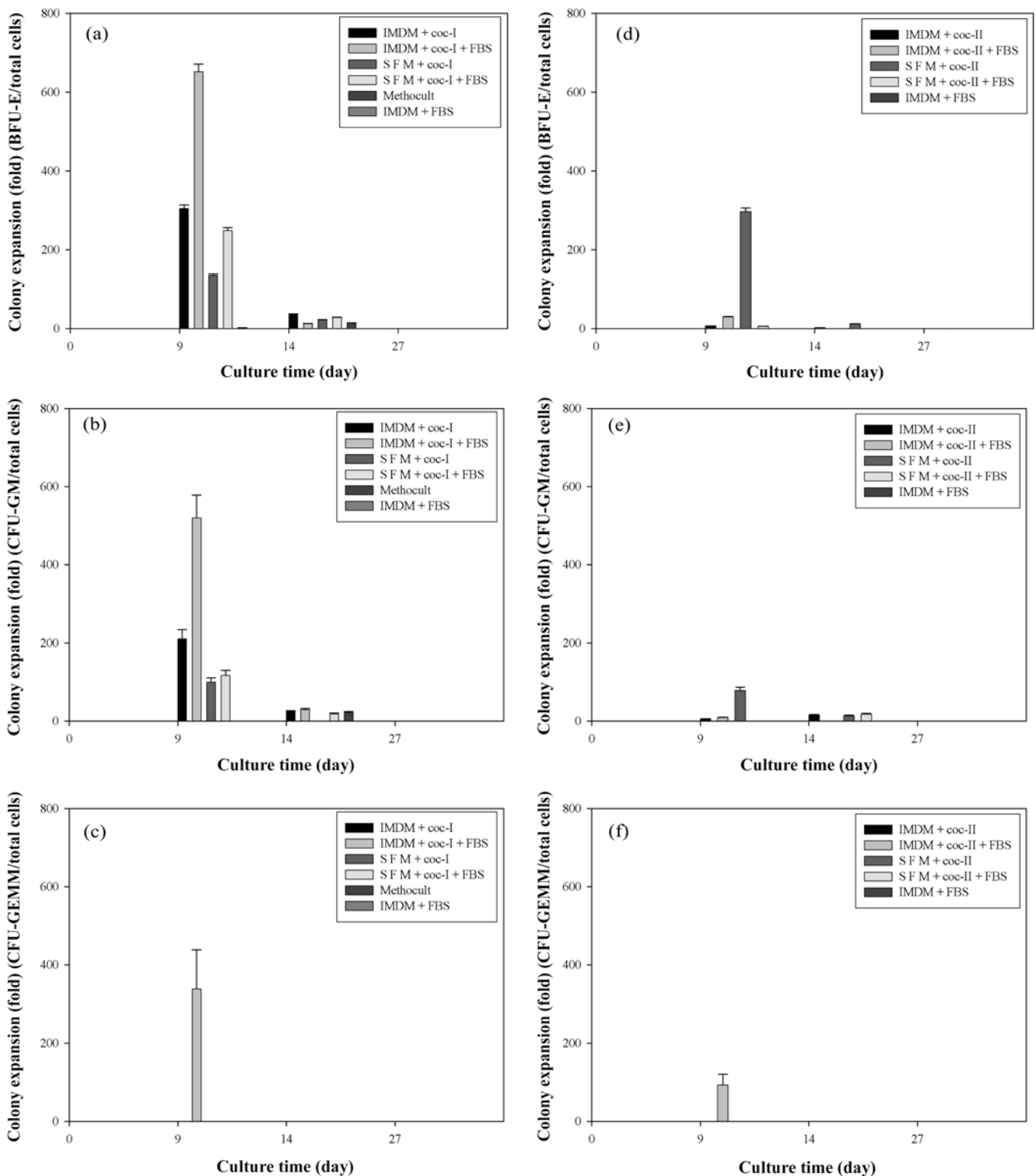


Fig. 2. The expansion of total colony forming units in different culture conditions. Total CFU expansion fold was calculated at colony counts by nucleus cell expansion fold. When FBS was supplemented, its concentration was 30 % (v/v). (a), (b), (c): Cytokine cocktail-I (coc-I) was used. (d), (e), (f): Cytokine cocktail-II (coc-II) was used.

주까지 혈청이 포함된 배지에서 배양을 한 후 배지가 포함되지 않은 배지로 세포를 옮겨서 배양하는 것이 더욱 긍정적인 결과를 나타낸다고 보고하였는데, 본 실험의 결과와 종합해볼 때 성장인자의 화학공학 제44권 제1호 2006년 2월

조성 및 배양 배지의 조건에 따라 혈청이 세포 및 콜로니 증식에 서로 다른 영향을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다. 우태이혈청만이 포함된 배지에서는 세포가 증식되지 않았다.

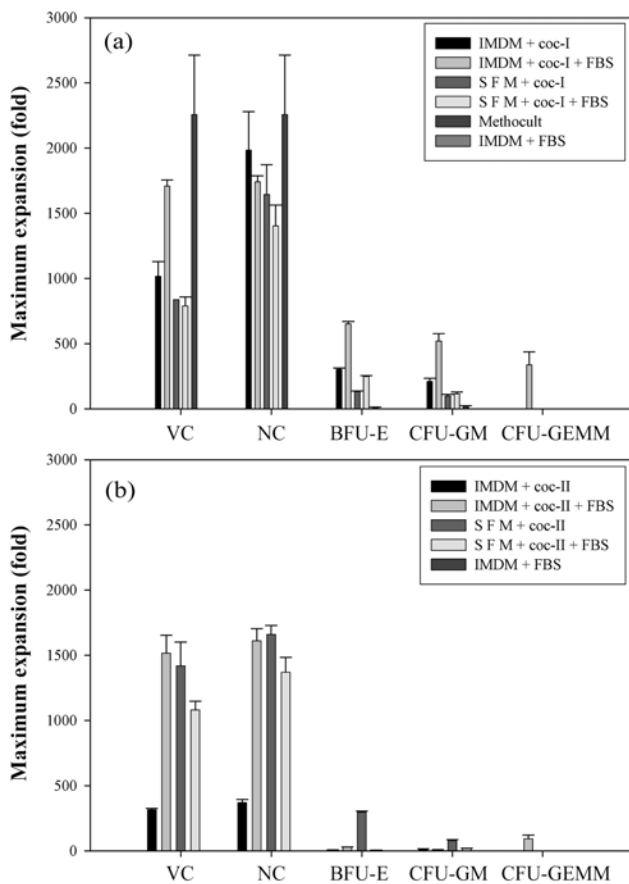


Fig. 3. Maximum expansion fold of viable cells (VC), nucleus cells (NC), and CFU during culture time. When FBS was supplemented, its concentration was 30% (v/v). (a): Cytokine cocktail-I (coc-I) was used. (b): Cytokine cocktail-II (coc-II) was used.

Fig. 2는 배양 9일, 14일, 27일째에 콜로니 분석을 한 결과를 보여주고 있다. 2,000개의 단위세포 당 콜로니 형성 및 전체 세포 당

콜로니 형성은 우태아혈청의 첨가 여부에 관계없이 배양 시간이 지남에 따라 감소하였는데, 이러한 현상은 조혈줄기세포 및 조혈전구세포가 배양 기간 동안 지속적으로 감소함을 의미한다. 3차원 배양에서는 콜로니 증식이 2차원 배양에서보다 매우 적었는데, 이는 본 실험의 3차원 조건은 조혈줄기 혹은 전구세포의 증식보다는 말초 혈액으로의 분화에 영향을 주는 것으로 사료된다. 우태아혈청만이 포함된 배지에서와 배양 27일째의 모든 배지 조건에서는 콜로니 형성이 관찰되지 않았다.

Fig. 3은 배양 기간 동안 각각의 배지 조성에서의 최대 생세포 수, 유핵 세포 수, BFU-E, CFU-GM 및 CFU-GEMM의 수를 나타낸 그래프이다. 일반적으로 coc-II 조건보다 coc-I 조건에서 세포 증식 및 콜로니 증식이 더 많았다. 3차원 배양(Methocult)에서는 가장 높은 세포 증식(2,258±456배)을 나타냈으며, 같은 조성의 2차원 배양(IMDM + coc-I + FBS)에서는 가장 높은 콜로니 증식(BFU-E: 652±19, CFU-GM: 520±58, CFU-GEMM: 339±100배)이 나타났다.

Table 1과 2는 배양 기간 동안 각각의 배지 조성에서의 유핵 세포 수 및 콜로니 수를 나타낸 표이다. 배지를 기준으로 보면, 우태아혈청이 포함되지 않은 coc-II 조건을 제외하고는 세포 증식 및 콜로니 증식이 무혈청 배지에서보다 IMDM에서 높았다. 혈청이 포함되어 있는 조건인 'IMDM + coc-I + FBS'와 'SFM + coc-I + FBS'에서 세포의 증식은 각각 1,741±46, 1,403±160배였으며 콜로니 증식은 각각 BFU-E: 652±19, 249±7; CFU-GM: 520±58, 117±13; CFU-GEMM: 339±100, 0배였고, 'IMDM + coc-II + FBS'와 'SFM + coc-II + FBS'에서 세포 증식은 각각 1,613±91, 1,371±114배였으며 콜로니 증식은 각각 BFU-E: 30±1, 6±0; CFU-GM: 9±1, 18±2; CFU-GEMM: 93±27, 0배였다. 혈청이 포함되지 않은 조건인 'IMDM + coc-I' 및 'SFM + coc-I'에서 세포 증식은 각각 1,983±297, 1,645±228배였으며 콜로니 증식은 각각 BFU-E: 305±9, 135±4; CFU-GM: 211±24, 100±11배였고, 'IMDM + coc-II' 및 'SFM + coc-II'에서 세포 증식은 각각 371±23, 1,661±68배였으며 콜로니 증식은 BFU-E: 7±0, 297±9; CFU-GM: 15±2, 78±9배였다. 2차원 및 3차원 배양에서, 세포의 증식은 3차원 배양에서가 더 높았지만 콜로니

Table 1. Time courses of nucleus cell expansion

| Conditions | Nucleus cell expansion (fold) | | | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|--------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Days of culture | | | | | | | |
| | 3 | 6 | 9 | 11 | 14 | 17 | 20 | 27 |
| IMDM + coc-I | 1 ± 0 | 11 ± 0 | 693 ± 23 | 1,209 ± 68 | 1,241 ± 68 | 645 ± 46 | 1,354 ± 274 | 1,983 ± 297 |
| IMDM + coc-I + FBS | 1 ± 0 | 28 ± 0 | 1,129 ± 46 | 1,741 ± 46 | 1,483 ± 182 | 1,048 ± 342 | 1,193 ± 137 | 1,677 ± 0 |
| SFM + coc-I | 1 ± 0 | 12 ± 0 | 564 ± 68 | 806 ± 91 | 1,064 ± 228 | 1,204 ± 349 | 1,112 ± 160 | 1,645 ± 228 |
| SFM + coc-I + FBS | 1 ± 0 | 23 ± 0 | 661 ± 23 | 774 ± 46 | 951 ± 160 | 806 ± 228 | 758 ± 205 | 1,403 ± 160 |
| Methocult | 6 ± 0 | 12 ± 0 | 241 ± 23 | 2,258 ± 456 | 1,129 ± 228 | 1,225 ± 91 | 1,774 ± 456 | 1,290 ± 456 |
| IMDM + FBS | 0 | 1 ± 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IMDM + coc-II | 1 ± 0 | 17 ± 0 | 84 ± 5 | 123 ± 9 | 255 ± 5 | 371 ± 23 | 235 ± 55 | 166 ± 16 |
| IMDM + coc-II + FBS | 1 ± 0 | 25 ± 0 | 310 ± 9 | 839 ± 91 | 1,242 ± 68 | 1,613 ± 91 | 1,226 ± 46 | 1,339 ± 68 |
| SFM + coc-II | 2 ± 0 | 55 ± 0 | 887 ± 114 | 1,048 ± 114 | 1,419 ± 182 | 1,661 ± 68 | 239 ± 27 | 323 ± 91 |
| SFM + coc-II + FBS | 1 ± 0 | 29 ± 5 | 355 ± 46 | 839 ± 46 | 903 ± 91 | 1,226 ± 91 | 1,371 ± 114 | 935 ± 319 |

Purified CD34⁺ cord blood cells were cultured in 12 well plates at 37 °C, 5% CO₂ in air.

Results represent mean ± SD from two separate experiments. When FBS was supplemented, its concentration was 30% (v/v).

coc-I: EPO(3 U/mL)+GM-CSF(10 ng/mL)+SCF(50 ng/mL)+IL-3(10 ng/mL).

coc-II: TPO(50 ng/mL)+G-CSF(40 ng/mL)+SCF(50 ng/mL)+IL-6(100 ng/mL)+Flt3/Flk-2 ligand(80 ng/mL).

Table 2. Time courses of progenitor cell expansion

| Conditions | Total CFU expansion (fold) | | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------|----|---------------------|---------|--------|
| | Days of culture | | | Days of culture | | |
| | 9 | 14 | 27 | 9 | 14 | 27 |
| IMDM + coc-I | | | | IMDM + coc-II | | |
| BFU-E | 305 ± 9 | 36 ± 1 | 0 | BFU-E | 7 ± 0 | 2 ± 0 |
| CFU-GM | 211 ± 24 | 24 ± 3 | 0 | CFU-GM | 6 ± 1 | 15 ± 2 |
| CFU-GEMM | 0 | 0 | 0 | CFU-GEMM | 0 | 0 |
| IMDM + coc-I + FBS | | | | IMDM + coc-II + FBS | | |
| BFU-E | 652 ± 19 | 12 ± 0 | 0 | BFU-E | 30 ± 1 | 0 |
| CFU-GM | 520 ± 58 | 29 ± 3 | 0 | CFU-GM | 9 ± 1 | 0 |
| CFU-GEMM | 339 ± 100 | 0 | 0 | CFU-GEMM | 93 ± 27 | 0 |
| SFM + coc-I | | | | SFM + coc-II | | |
| BFU-E | 135 ± 4 | 22 ± 1 | 0 | BFU-E | 297 ± 9 | 12 ± 0 |
| CFU-GM | 100 ± 11 | 0 | 0 | CFU-GM | 78 ± 9 | 14 ± 2 |
| CFU-GEMM | 0 | 0 | 0 | CFU-GEMM | 0 | 0 |
| SFM + coc-I + FBS | | | | SFM + coc-II + FBS | | |
| BFU-E | 249 ± 7 | 28 ± 1 | 0 | BFU-E | 6 ± 0 | 0 |
| CFU-GM | 117 ± 13 | 19 ± 0 | 0 | CFU-GM | 0 | 18 ± 2 |
| CFU-GEMM | 0 | 0 | 0 | CFU-GEMM | 0 | 0 |
| Methocult | | | | | | |
| BFU-E | 2 ± 0 | 14 ± 0 | 0 | | | |
| CFU-GM | 0 | 22 ± 3 | 0 | | | |
| CFU-GEMM | 0 | 0 | 0 | | | |
| IMDM + FBS | | | | | | |
| BFU-E | 0 | 0 | 0 | | | |
| CFU-GM | 0 | 0 | 0 | | | |
| CFU-GEMM | 0 | 0 | 0 | | | |

Cultures were initiated with 2,000 nucleus cells in 35mm plastic dishes at 37 °C, humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Results represent mean ± SD from four separate experiments.

coc-I: EPO(3U/mL)+GM-CSF(10 ng/mL)+SCF(50 ng/mL)+IL-3(10 ng/mL).

coc-II: TPO(50 ng/mL)+G-CSF(40 ng/mL)+ SCF(50 ng/mL)+IL-6(100 ng/mL)+Flt3/Flk-2 ligand(80 ng/mL).

증식은 2차원 배양에서 월등히 좋은 것으로 확인되었다. 2차원 및 3차원 배양에서 세포 증식은 각각 1,741±46, 2,258±456배였으며 콜로니 증식은 각각 BFU-E: 652±19, 14±0; CFU-GM: 520±58, 22±3; CFU-GEMM: 339±100, 0배였다.

배양 기간 동안 포도당 소모 및 젖산 생성 정도를 Fig. 4에 나타내었다. 포도당 소모 및 젖산 생성은 세포의 급격한 증가와 더불어 증가하였으나, 증식한 세포의 수에 비해서 포도당 소모 및 젖산 생성 정도는 크지 않았으며, 혈청의 첨가 여부는 포도당 소모 및 젖산 생성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. coc-I 조건의 IMDM 배지에서는 배양 6일 이후에 포도당 소모량이 급격히 증가하는 반면 SFM 배지에서는 완만한 소모 경향이 나타났으며, coc-II 조건에서는 IMDM 및 SFM 배지 모두에서 포도당 소모량이 완만한 경향이 나타났다. 포도당 소모 및 젖산 생성은 coc-II 조건보다 coc-I 조건에서 더 많았는데, 이는 coc-I 조건에서의 세포 증식이 coc-II 조건에서보다 더 빠르게 일어났기 때문이며, 특히 IMDM 배지 조성에서 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 2차원 및 3차원 배양 비교에서는 2차원 배양에서의 포도당 소모 및 젖산 생산량이 높은 것으로 나타났다.

생존율은 배양 6일째 이후부터 지속적으로 감소하였으며, coc-II 조건에서보다 coc-I 조건에서 감소 정도가 더 급격하게 일어나는

것을 확인할 수 있었다. coc-I 조건에서 생존율은 배양 6일째 이후부터 감소하기 시작하여 배양 11~14일에 급격히 감소하였으며, 배양 27일 때에는 40% 정도가 되었고, 우태아혈청의 첨가 여부는 생존율 변화 경향에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. coc-II 조건에서 생존율은 배양 6~14일째 이후부터 감소하기 시작하여 배양 27일 때에는 30~60% 정도였으며, 우태아혈청이 포함된 경우 생존율의 감소가 우태아혈청이 포함되지 않은 경우보다 완만하게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 배양 14일째에 배지 교환 후 coc-I 조건에서는 생존율이 증가한 후 감소하였으나 coc-II 조건에서는 생존율의 증가가 나타나지 않았다. 2차원 및 3차원 배양에서의 생존율 감소 경향은 유사하게 나타났다(data not shown).

4. 결 론

본 연구에서는 다양한 배양 조건에서의 체외 배양을 통해서 제대혈 유래의 조혈 세포의 증식 및 배양 환경의 변화를 살펴보았다. 세포 증식 및 콜로니 증식은 coc-I 조건이 coc-II 조건보다 더 긍정적으로 나타났으며, 우태아혈청의 첨가 여부는 포도당 소모 및 젖산 생성 정도에 영향을 주지 않았다. 배지를 기준으로 보면 우태아혈청이 포함된 경우 IMDM이 무혈청 배지에서보다 긍정적인 결과를

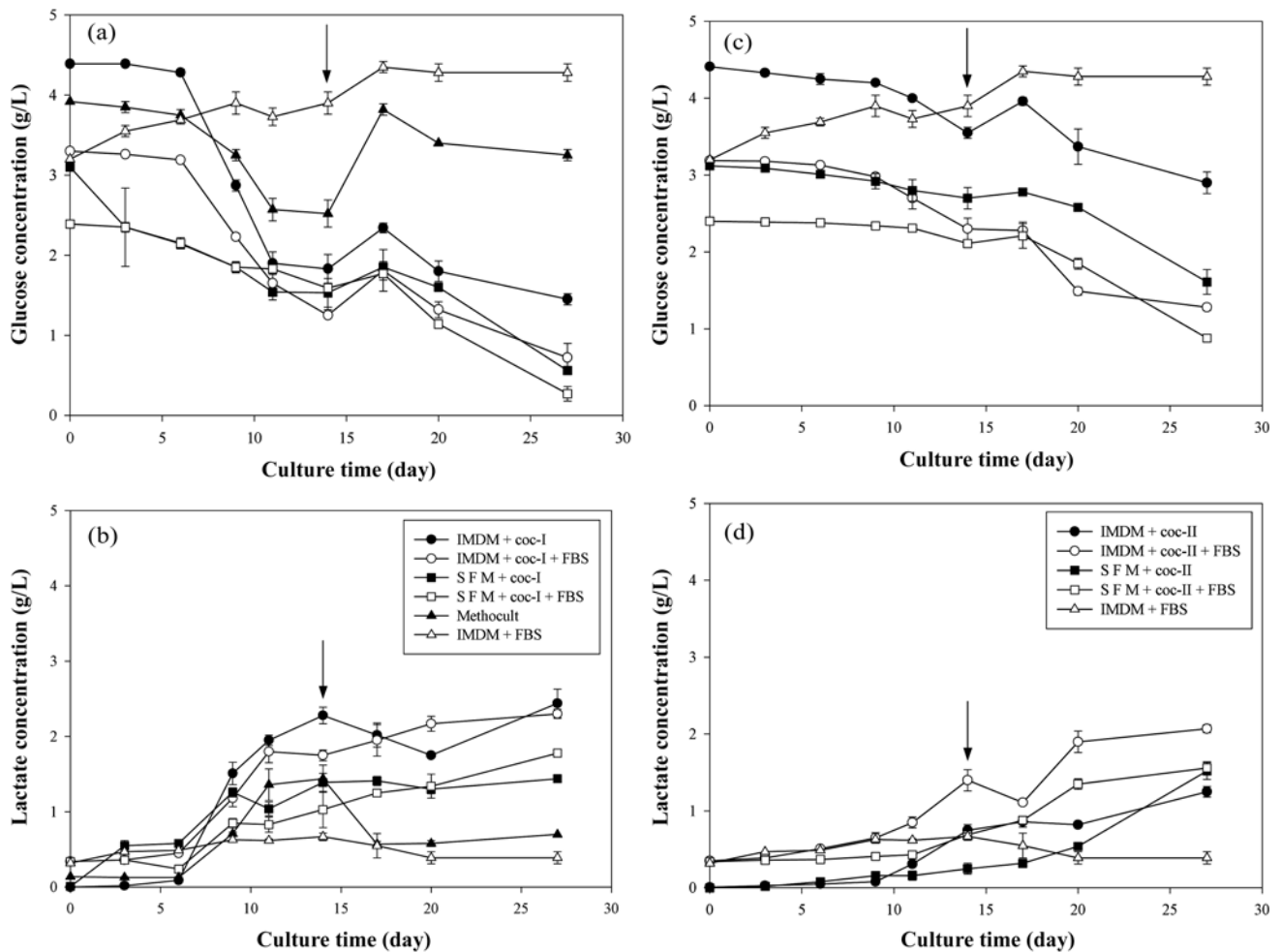


Fig. 4. Time courses of glucose and lactate concentrations in different culture conditions. Arrow represents time point of media exchange. At day-14, half of the culture medium was replaced with fresh medium. When FBS was supplemented, its concentration was 30 % (v/v). (a), (b): Cytokine cocktail-I (coc-I) was used. (c), (d): Cytokine cocktail-II (coc-II) was used.

나타냈으며, 우태아혈청이 포함되지 않은 경우에는 무혈청 배지가 IMDM과 같거나 좀 더 좋은 경향을 나타내었다. 또한, 분화된 세포로의 증식 면에서는 3차원 배양이 유리하였으나, 조혈전구세포와 관련된 콜로니 증식 면에서는 2차원 배양이 유리하였다. 본 연구 결과는 앞으로 제대혈뿐만 아니라 골수 및 말초혈 조혈줄기세포의 체외 증식에 필요한 공정개발이나 생물반응기 설계에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Zon, L. I., "Developmental Biology of Hematopoiesis," *Blood*, **86**(8), 2876-2891(1995).
2. Hann, I. M., Bodger, M. P. and Hoffbrand, A. V., "Development of Pluripotent Hematopoietic Progenitor Cells in the Human Fetus," *Blood*, **62**(1), 118-123(1983).
3. Linch, D. C., Knott, L. J., Rodeck, C. H. and Huehns, E. R., "Studies of Circulating Hemopoietic Progenitor Cells in Human Fetal Blood," *Blood*, **59**(5), 976-979(1982).
4. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G. and Lehn, P., "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**(17), 1174-1178(1989).
5. Kogler, G., Radke, T. F., Lefort, A., Sensken, S., Fischer, J., Sorg, R.V. and Wernet, P., "Cytokine Production and Hematopoiesis Supporting Activity of Cord Blood-derived Unrestricted Somatic Stem Cells," *Exp Hematol*, **33**(5), 573-583(2005).
6. Ende, M., "Lymphangiosarcoma. Report of a Case," *Pac Med Surg*, **74**(2), 80-82(1966).
7. Kubanek, B., Ferrari, L., Tyler, W. S., Howard, D., Jay, S. and Jr. Stohlman, F., "Regulation of Erythropoiesis. 23. Dissociation Between Stem Cell and Erythroid Response to Hypoxia," *Blood*, **32**(4), 586-596(1968).
8. Jr. Stohlman, F., "Some Aspects of Erythrokinetics," *Semin Hematol*, **4**(4), 304-314(1967).
9. Metcalf, D., "Control of Granulocytes and Macrophages: Molecular, Cellular, and Clinical Aspects," *Science*, **254**(5031), 529-533(1991).
10. Ihle, J. N., "Interleukin-3 and Hematopoiesis," *Chem Immunol*, **51**, 65-106(1992).

11. Leary, A. G., Wong, G. G., Clark, S. C., Smith, A. G. and Ogawa, M., "Leukemia Inhibitory Factor Differentiation-inhibiting Activity/human Interleukin for DA Cells Augments Proliferation of Human Hematopoietic Stem Cells," *Blood*, **75**(10), 1960-1964(1990).
12. Socinski, M. A., Cannistra, S. A., Elias, A., Antman, K. H., Schnipper, L. and Griffin, J. D., "Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Expands the Circulating Haemopoietic Progenitor cell Compartment in Man," *Lancet*, **1**(8596), 1194-1198(1988).
13. Migliaccio, G., Migliaccio, A. R. and Adamson, J. W., "In Vitro Differentiation of Human Granulocyte/macrophage and eRythroid Progenitors: Comparative Analysis of the Influence of Recombinant Human Erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, and IL-3 in Serum-supplemented and Serum-deprived Cultures," *Blood*, **72**(1), 248-256(1988).
14. Tomonaga, M., Golde, D. W. and Gasson, J. C., "Biosynthetic (recombinant) Human Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor: Effect on Normal Bone Marrow and Leukemia Cell Lines," *Blood*, **67**(1), 31-36(1986).
15. Clark, S. C. and Kamen, R., "The Human Hematopoietic Colony-stimulating Factors," *Science*, **236**(4806), 1229-1237(1987).
16. Ohara, A., Suda, T., Saito, M., Miura, Y., Okabe, T. and Takaku, F., "Effect of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor on Hemopoietic Cells in Serum-free Culture," *Exp Hematol*, **15**(6), 695-699(1987).
17. de Sauvage, F. J., Hass, P. E., Spencer, S. D., Malloy, B. E., Gurney, A. L., Spencer, S. A., Darbonne, W. C., Henzel, W. J., Wong, S. C., Kuang, W. J., Karl, J. O., Bruce, H., Lawrence, A. S., Jr., David, V. G. and Dan, L. E., "Stimulation of Megakaryocytopoiesis and Thrombopoiesis by the c-Mpl Ligand," *Nature*, **369**(6481), 533-538(1994).
18. Bartley, T. D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y. S., Lu, H. S., Martin, F., Chang, M. S., Samal, B., Nichol, J. L., Swift, S., Johnson, M. J., Hsu, R.-Y., Parker, V. P., Suggs, S., Skrine, J. D., Merewether, L. A., Clogston, C., Hsu, E., Hokom, M. M., Hornkohl, A., Choi, E., Pangelinan, M., Sun, Y., Mar, V., McNinch, J., Simonet, L., Jacobsen, F., Xie, C., Shutter, J., Chute, H., Basu, R., Selander, L., Trollinger, D., Sieu, L., Padilla, D., Trail, G., Elliott, G., Izumi, R., Covey, T., Crouse, J., Garcia, A., Xu, W., Castillo, J. D., Biron, J., Cole, S., Hu, M. C.-T., Pacifici, R., Ponting, I., Saris, C., Wen, D., Yung, Y. P., Lin, H. and Rosselman R. A., "Identification and Cloning of a Megakaryocyte Growth and Development Factor that is a Ligand for the Cytokine Receptor Mpl," *Cell*, **77**(7), 1117-1124 (1994).
19. Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Bazan, J. F., Kastelein, R., Hudak, S., Wagner, J., Mattson, J., Luh, J., Duda, G., Martina, N., Peterson, D., Menon, S., Shanafelt, A., Muench, M., Kelner, G., Namikawa, R., Rennick, D., Roncarolo, M.-G., Zlotnik, A., Rosnet, O., Dubreuil, P., Birnbaum, D. and Lee, F., "Ligand for FLT3/FLK2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Growth of Haematopoietic Stem Cells and is Encoded by Variant RNAs," *Nature*, **368**(6472), 643-648 (1994).
20. Lyman, S. D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L. T., Picha, K. S., McKenna, H. J., Splett, R. R., Fletcher, F. A., Maraskovsky, E., Farrah, T., Foxworthe, D., Williams, D. E. and Beckmann, M. P., "Molecular Cloning of a Ligand for the flt3/flk-2 Tyrosine Kinase Receptor: a Proliferative Factor for Primitive Hematopoietic Cells," *Cell*, **75**(6), 1157-1167(1993).
21. Rennick, D., Jackson, J., Yang, G., Wideman, J., Lee, F. and Hudak, S., "Interleukin-6 Interacts with Interleukin-4 and Other Hematopoietic Growth Factors to Selectively Enhance the Growth of Megakaryocytic, Erythroid, Myeloid, and Multipotential Progenitor Cells," *Blood*, **73**(7), 1828-1835(1989).
22. Hodgkin, P. D., Bond, M. W., O'Garra, A., Frank, G., Lee, F., Coffman, R. L., Zlotnik, A. and Howard, M., "Identification of IL-6 as a T Cell-derived Factor that Enhances the Proliferative Response of Thymocytes to IL-4 and Phorbol Myristate Acetate," *J. Immunol*, **141**(1), 151-157(1988).
23. Caracciolo, D., Clark, S. C. and Rovera, G., "Human Interleukin-6 Supports Granulocytic Differentiation of Hematopoietic Progenitor Cells and Acts Synergistically with GM-CSF," *Blood*, **73**(3), 666-670(1989).
24. Brandt, J., Briddell, R. A., Srour, E. F., Leemhuis, T. B. and Hoffman, R., "Role of c-kit Ligand in the Expansion of Human Hematopoietic Progenitor Cells," *Blood*, **79**(3), 634-641(1992).
25. Brandt, J. E., Bhalla, K. and Hoffman, R., "Effects of Interleukin-3 and c-kit Ligand on the Survival of Various Classes of Human Hematopoietic Progenitor Cells," *Blood*, **83**(6), 1507-1514(1994).
26. Lebkowski, J. S., Schain, L. R. and Okarma, T. B., "Serum-free Culture of Hematopoietic Stem Cells: a Review," *Stem Cells*, **13**(6), 607-612(1995).
27. Daley, J. P., Daley, B. M., Wysocki, M. G., Caligiuri, M. A. and Biddle, W. C., 1996. *Ex Vivo* Expansion of Human Hematopoietic Progenitor Cells in Serum-free STEMPRO™-34 Medium, pp. 62-67. vol. 18. Life Technologies, Gaithersburg, U. S. A.
28. Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L. and Aglietta, M., "Differential Growth Factor Requirement of Primitive Cord Blood Hematopoietic Stem Cell for Self-renewal and Amplification vs Proliferation and Differentiation," *Leukemia*, **12**(5), 718-727(1998).
29. Balducci, E., Azzarello, G., Valenti, M. T., Capuzzo, G. M., Pappagallo, G. L., Pilotti, I., Ausoni, S., Bari, M., Rosetti, F., Sartori, D., Ciappa, A., Porcellini, A. and Vinante, O., "The Impact of Progenitor Enrichment, Serum, and Cytokines on the Ex Vivo Expansion of Mobilized Peripheral Blood Stem Cells: a Controlled Trial," *Stem Cells*, **21**(1), 33-40(2003).
30. Mobest, D., Mertelsmann, R. and Henschler, R., "Serum-free Ex Vivo Expansion of CD34(+) Hematopoietic Progenitor Cells," *Bio-technol Bioeng*, **60**(3), 341-347(1998).
31. Poloni, A., Giarratana, M. C., Firat, H., Kobari, L., Gorin, N. C. and Douay, L., "The Ex Vivo Expansion Capacity of Normal Human Bone Marrow Cells is Dependent on Experimental Conditions: Role of the Cell Concentration, Serum and CD34+ Cell Selection in Stroma-free Cultures," *Hematol Cell Ther*, **39**(2), 49-58(1997).
32. Gilmore, G. L., DePasquale, D. K., Lister, J. and Shadduck, R. K., "Ex vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood and Peripheral Blood CD34(+) Hematopoietic Stem Cells," *Exp Hematol*, **28**(11), 1297-1305(2000).
33. Shadduck, R. K., Gilmore, G. L. and Lister, J., "Role of Serum-free Medium in the Ex Vivo Expansion of Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells," *Stem Cells*, **18**(2), 154-155(2000).