제대혈 CD34 양성 조혈모세포로부터 거핵구 분화유도와 이에 따른 거핵구의 미세구조 분석

연세대학교 대학원

의과학사업단

기 정 혜

제대혈 CD34 양성 조혈모세포로부터 거핵구 분화유도와 이에 따른 거핵구의 미세구조 분석

지도 양 우 익 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 사 업 단

기 정 혜

기정혜의 박사 학위논문을 인준함

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

이 논문이 나올 수 있도록 묵묵히 세심한 배려를 해주신 양우익 선생님께 깊이 머리 숙여 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 자문을 맡아주신 조상호 선생님, 김태승 선생님, 민유홍 선생님, 김현옥 선생님께 감사드리며 전자현미경 소견에 관해 많은 가르침을 주신 권태정 선생님께 감사드립니다. 또한 연구과정에 있어 많은 도움을 주신 이미경 선생님께 감사드립니다.

힘들 때마다 용기를 주신 부모님께 감사드리며 많이 부족한 저를 조용히 지켜봐 주신 시부모님께 감사드립니다.

끝으로 그 동안 가정에 소홀했던 저를 잘 견뎌준 사랑하는 지원, 지호와, 아슬아슬할 때마다 항상 버팀목이 되어준 남편에게 진심으로 감사합니다.

저자 씀

차 례

표 차례

그림 차례

국문 요약

제대혈 CD34 양성 조혈모세포로부터 거핵구 분화유도와 이에 따른 거핵구의 미세구조 분석

조혈모세포 이식원 중의 하나인 제대혈은 저장이 용이하고 이식편대숙주병을 적게 유발하는 점 등 여러 장점을 가지고 있다. 그러나 제대혈은 조혈모 세포의 수가 적고 이식 후에 혈소판 회복이 지연된다는 제한점이 있다. 최근에는 이를 극복하고자 thrombopoietin (TPO)을 비롯한 여러 종류의 사이토카인을 이용한 거핵구 계열로의 체외증폭에 대한 연구가 시도되고 있으나 주로 세포의 표현형에 근거한 실험이고 미세구조변화에 대한 연구는 아직 이루어진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 제대혈 CD34+ 세포를 TPO과 최근 그 유용성이 제기되고 있는 flt3-ligand (FL), interleukin (IL)-3, IL-11, stem cell factor (SCF)의 조합(TPO, TPO+FL, TPO+FL+SCF, TPO+FL+IL-3, TPO+FL+IL-11)을 이용하여 체외증폭을 시키고, 이 과정에서 거핵구 계열세포로의 분화 및 세포고사를 유세포분석과 광학, 전자현미경 관찰을 통하여 종합적으로 분석하였다.

그 결과 TPO만으로 체외증폭시켰을 때에는 세포고사에 의해 11일 이후에는 생존 세포수가 급격하게 감소하였다. 반면 사이토카인을 병용하였을 때에는 모두 2주 후부터 50배 이상으로 증폭되었다. CD61+CD14- 분획은 TPO 단독 투여시 배양 4일째부터 나타나 9일째에 최고조에 달했다가 14일부터 감소하였다. 이러한 양상은 TPO과 함께 각각의 사이토카인 조합을 투여했을 때에도 동일하였다. 그러나 TPO을 제외시켰을 때에는 거핵구로의 분화를 관찰할 수 없었다. Annexin V를 이용한 세포고사 분석에서 세포고사는 TPO 단독 투여시와 TPO과 FL, IL-3, IL-11 등의 조합을 투여시 배양 4일째부터 나타나 배양 14일째에 최고에 달하였으며 특징적

으로 SCF를 첨가하면 배양초기에는 비거핵구 계열세포의 세포고사를 유도하는 반면 배양후기에는 오히려 거핵구 계열세포의 세포고사를 억제하는 효과를 보였다.

광학현미경 소견상 뚜렷한 거핵구로의 분화는 사이토카인의 조합에 관계없이 배양 7일경부터 관찰되기 시작하였다. TPO만 투여했을 때에는 배양 14일째에 소수의 거핵구 계열세포와 탐식세포만이 관찰되었다. 반면에 다른 사이토카인을 첨가했을 때에는 18일 째에도 다수의 거핵구 계열세포와 다른 미성숙 세포들이 혼재되어 관찰되었다.

전자현미경으로 관찰하였을 때 TPO 단독 투여시 배양 7일부터 분획막의 출현과 함께 혈소판의 출현을 관찰할 수 있었다. 배양 9일부터는 거핵구 계열세포의 세포고사가 관찰되었다. 특징적으로 SCF를 첨가하였을 때 배양 7일째부터 비거핵구 계열 세포의 세포고사를 확인 할 수 있었고, IL-3을 첨가했을 때에는 배양후기까지 지속적으로 특정 분화를 보이지 않는 미성숙 세포가 나타났으며 분획막의 발달이 거의 관찰되지 않았다. IL-11과 FL를 첨가했을 때에는 14일째까지는 미세형태소견이 TPO 단독 투여했을 때와 같았고, 18일째에는 거핵구 계열 세포와 함께 미성숙 형태의 비거핵구 계열의 세포를 함께 관찰할 수 있었다.

결론적으로 TPO은 제대혈 CD34+ 세포로부터 거핵구 세포로의 체외증폭에 필수적이며, TPO 이외의 사이토카인은 부가적인 효과가 있음을 확인할 수 있었다. SCF는 TPO과 병용시 배양 초기에 비거핵구 계열세포의 세포고사는 증가시키지만, 배양후기에 거핵구 계열세포의 세포고사를 억제하여 거핵구의 성숙 및 혈소판 생산을 항진시켰다. IL-3는 TPO에 의한 거핵구 계열로의 분화를 오히려 저해하였고, IL-11과 FL는 세포의 증식효과만을 나타내었다.

핵심되는 말: 제대혈, 체외배양, 거핵구, 세포고사, thrombopoietin, stem cell factor, 미세구조

제대혈 CD34 양성 조혈모세포로부터 거핵구 분화유도와 이에 따른 거핵구의 미세구조 분석

< 지도교수 양우익 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

기정혜

I. 서론

조혈모세포의 이식은 혈액질환 치유 방법의 중요한 분야이며 이러한 조혈모세포원으로는 골수, 말초혈액, 제대혈이 있다.[1] 이중 제대혈은 골수와 비교할 때 채취나 저장이 용이할 뿐만 아니라 이식편대숙주병(graft versus host disease)을 적게 유발하는 점등 여러 가지 장점을 가지고 있다.[2] 그러나 제대혈은 아직까지 보편화되지 못하고 있는데 그 이유는 골수에 비해 제대혈 속의 조혈모세포의 수가 절대적으로 적어서 생착이 지연(delayed engraftment)되기 때문이며 그 중에서도 혈소판의 회복이 가장 느린 것으로 알려져 있다.[3] 최근에는 이를 극복하기 위해서 사이토카인을 이용한 제대혈 조혈모세포의 체외증폭에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.[4,5] 특히 thrombopoietin (TPO)은 특별한 관심의 대상이 되고 있는 데, 그 이유는 TPO이 거핵구의 분화, 혈소판의 생산 및 생산된 혈소판의 기능에 이르기까지 전과정을 활성화시키기에 충분한 작용을 할 뿐만 아니라, 초기 조혈과정 즉, 원시 조혈모세포에 대한 직접적인 작용을 함께 가지고 있기 때문이다.[6-11] 이의 가장 직접적인 증거는 TPO이나

그 수용체인 c-Mpl이 결핍된 백서에서 거핵구 계열만 결핍되는 것이 아니라 모든 계열세포들이 함께 결핍되는 것이다.[12,13] 따라서 TPO은 거핵구 계열에 특이적인 역할을 할뿐만 아니라 원시 조혈전구세포에도 작용하는 다기능(pleiotropic) 사이토카인이라 할 수 있다. 이에 TPO을 사용한 체외증폭은 조혈모세포의 증폭과 거핵구의 분화 및 혈소판 생산이라는 두 가지 효과를 동시에 기대할 수 있다.

한편 혈소판감소증은 앞서 언급한 바와 같이 조혈모세포 이식 이후나 고용량화학요법 후에 발생하는 중요한 문제점으로 남아 있다.[14] 그럼에도 불구하고 정상 골수에서의 거핵구 분화 및 혈소판 생성의 미세구조 변화에 관해서는 비교적 잘 알려져 있지 않았다. 이는 정상 골수에서 관찰되는 거핵구의 수가 전체 단핵세포의 약 0.05% 정도로 극히 제한되어 있기 때문이다.[15] 이제까지 체외배양시스템을 사용하여 거핵구 분화에 관한 미세구조 분석을 시도한 보고가 두 편 있었다. 이들은 각기 골수와 말초혈액의 조혈모세포를 대상으로 TPO을 사용하여 거핵구의 분화를 유도하였다.[16,17] 두 편 모두에서 분화과정 중에 미성숙 세포고사(premature apoptosis)가 수반됨을 전자현미경적 소견과 함께 보고하였다. 또한 최근에 Seoh등[18]이나 Ryu등[19]이 제대혈 CD34+ 세포를 TPO을 이용하여 체외증폭 시키는 과정에 거핵구 계열에서 세포고사가 동반되는 것을 세포표현형 분석을 이용하여 보고한 바 있다. 이제까지의 모든 보고들을 종합하면 체외배양체계(*ex vivo* culture system)에서 TPO을 사용하여 거핵구 분화를 인위적으로 유도하면 거핵구로의 분화와 함께 미성숙 노화(premature senescence)가 함께 발생하는 것으로 추측된다.

이러한 거핵구로의 분화에는 TPO 이외에도 비록 그 정도에는 차이가 있으나 flt3-ligand (FL), interleukin (IL)-3, IL-6, IL-11과 stem cell factor (SCF)등이 관여하며, 이들은 독립적으로 혹은 TPO의 효과에 상승적 역할을 하는 것으로 보고되어 왔다.[20-25] 그러나 최근 Gainsford등[26,27]은

c-mpl/IL-3 결핍 백서를 이용한 실험에서 IL-11은 TPO와 독립적으로는 거핵구 형성에 관여하지 않는다고 보고한 바 있다. 또한 Norol등[28]도 IL-3, SCF, IL-6의 첨가에 의한 거핵구 형성을 보고하면서 이들 각기는 미미한 효과를 보인다고 기술하였다. 따라서 TPO 이외의 사이토카인에 의한 거핵구 형성 효과는 아직 더 연구되어야 할 점이 많다.

위와 같은 내용을 근거로 본 연구에서는 제대혈 조혈모세포를 대상으로 체외에서 TPO, FL, IL-3, IL-11, SCF 등의 사이토카인을 이용하여 거핵구로의 분화를 유도하고 이때 각 사이토카인 조합별로 거핵구로의 분화 및 세포고사의 정도를 표현형 분석과 더불어 미세구조 분석을 병행하여 거핵구 분화 및 혈소판 생산에 있어 체외증폭 시스템의 유용성을 분석하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 제대혈 CD34+ 세포의 분리

만삭에 정상 질식분만을 한 4명의 산모들로부터 제대혈을 채혈하였다. 제대혈의 단핵세포는 Ficoll-Hypaque (density 1.077 g/mL; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 중층법으로 분리하였다. 분리된 단핵세포층을 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco, Grand Island, NY, USA)에 부유시켜 플라스틱 Petri dish에 분주하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 60분씩 2회 배양하여 유착세포를 제거하고, 세척한 후 0.1% 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA; StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada)이 포함된 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4)에 재부유시켰다.

CD34+ 세포는 항CD34단클론항체(QBEND 10; Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany)와 miniMACS system을 사용한 superparamagnetic microbead(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하여 분리하였다. 분리된 CD34+ 세포의 순수도를 확인하기 위하여 FITC (fluoroscein isothiocyanate)가 부착된 항CD34항체(HPCA-2; Becton Dickinson(BD), Mountain View, CA, USA)와 반응시킨 후 유세포분석기(FACSCalibur, BD)로 분석하였다.

2. CD34+ 세포의 체외증폭

CD34+ 세포를 1.0 x 10^5 cells/mL의 농도로 맞추고 무혈청배지인 SFEM (StemCell Technologies Inc.)에 BSA, insulin 과 transferrin (BIT solution, StemCell Technologies Inc.)을 첨가하여 배양하였다. 조혈성장인자로는 TPO (50 ng/mL; Kirin Brewery, Maebashi, Japan)을 단독으로 사용하거나 flt3-ligand (FL; 50 ng/mL; Chemicon, Temecula, CA,

USA), stem cell factor (SCF; 50 ng/mL; Kirin Brewery), IL-3 (200 U/mL; Chemicon) 및 IL-11 (20 ng/mL; Chemicon)과 병용해서 사용하였다. 그리고 주 2회씩 배지의 절반을 새로운 배지로 교환하고 조혈성장인자를 첨가하면서 4주까지 배양하였다. 이때 배지의 교환시기마다 trypan blue로 염색하여 생존 세포수를 산정하였고, 유세포 분석과 미세구조 분석을 시행하였다. 대조군으로 TPO을 제외한 FL, IL-3, IL-11, SCF를 다양하게 조합하여 같은 방법으로 4주까지 배양하였다.

3. 표현형과 세포고사의 분석

면역표현형 검사를 위해 수확된 세포의 Fc 수용체를 차단하여 비특이적 결합을 방지하기 위하여 먼저 사람의 AB+형 혈청과 4℃에서 10분간 반응시킨 후 아래와 같은 항체를 사용하여 4℃에서 30분간 차광상태에서 세포들을 형광 염색하였다. 실험에 사용된 항체는 FITC 혹은 phycoerythrine(PE)이 부착된 항CD34단클론항체(BD) , FITC (BD) 혹은 peridinine chlorophyll protein이 부착된 항CD61단클론항체(PerCP; BD), FITC (BD) 혹은 PE이 부착된 항CD41단클론항체(Serotec, Oxford, UK), FITC가 부착된 항CD14단클론항체(BD), PE이 부착된 항CD15단클론항체(BD) 등이다.

세포고사 측정을 위해 FITC 혹은 PE이 부착된 annexin V (PharMingen, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 140 mM NaCl과 2.5 mM $CaCl_2$를 함유하는 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)에서 annexin V (1 mM)와 반응시켰다. 음성대조로는 특이성이 무관한 동일한 isotype의 항체를 같은 조건으로 반응시킨 부유액을 사용하였다. 분석은 CellQuest (BD) software를 이용하여 10,000개의 세포를 분석하였다.

4. 광학현미경 검사

분리된 CD34+ 세포 또는 배양된 세포의 광학 현미경적 형태 분석을 위하여 유리슬라이드에 500 r.p.m.에서 5분간 세포원침시키고(Cytospin 3, Shandon, Pittsburgh, PA, USA), 슬라이드를 공기중에서 건조시킨 후 May-Grunwald-Giemsa와 PAS 염색을 시행하였다.

5. 전자현미경을 이용한 미세구조 분석

세포 부유액을 pH 7.3의 0.1 M 인산완충용액에 수세 후, 1200 r.p.m.으로 원심분리하여 즉시 2.5% glutaraldehyde에 1시간 동안 고정시켰다. 그 후 1% OsO_4로 후고정시킨 후 alcohol로 탈수시킨 다음 플라스틱 resin에 포매하였다. 조직을 박절하여 nickel 격자에 수집하고 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 Philips CM 10 전자현미경으로 80 KV에서 관찰하였다. 형태학적 소견에서 핵의 모양, 분획막(demarcation membrane)의 유무, 당원과립(glycogen granule)의 분포양상, 세포질내 과립의 크기와 전자밀도(electron density)등을 거핵구 계열로의 분화기준으로 삼았다.

6. 통계 검사

통계 검사는 paired Student's t-test를 실시하였으며 *P*-value 0.05 미만을 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 제대혈에서 분리한 CD34+ 세포 분획의 양상

네 개의 제대혈에서 분리한 CD34+ 세포 분획의 순수도는 평균 95.7% (93.6 98.2%)이었다(Fig. 1). 이들 세포 분획에는 거핵구 계열 표지인 GPIII (CD61), GPIIb/IIIa (CD41), GPIb (CD42b)를 발현하는 세포가 각각 3.4±1.1%, 3.2±0.9% 및 2.9±0.7% 포함되어 있었다.

이들 세포분획의 광학현미경 소견은 비교적 균일하게 작은 세포들로 핵이 크고 세포질은 적은 미성숙 단핵 세포들로 구성되어 있었다(Fig. 2). 전자현미경 소견은 명백한 핵소체를 포함한 진정염색질(euchromatin)의 큰 핵을 가지고 있었으며, 세포질은 양이 적고 그 내부에는 자유리보소체(free ribosome)와 소량의 미토콘드리아 및 극세사(microfilament)들이 차 있었다(Fig. 3).

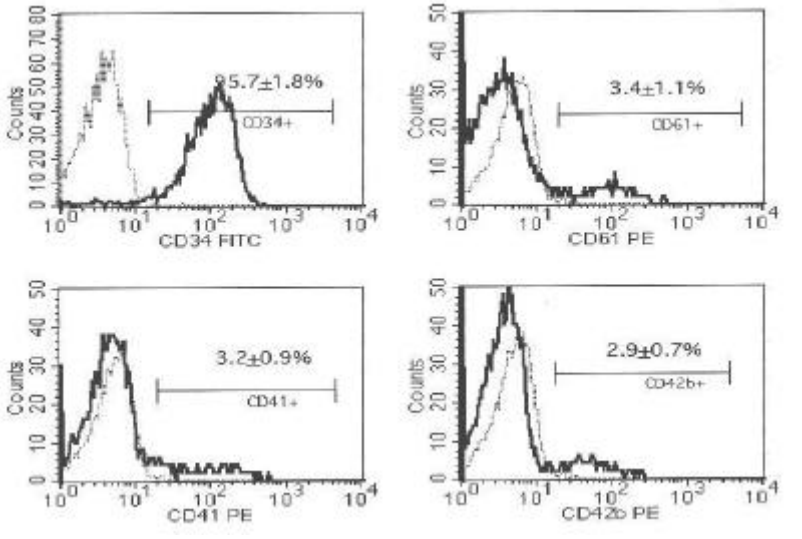

Fig. 1. Phenotype of the purified cells. Dotted lines represent negative controls. The numbers are data represented as mean±SD of four separate experiments.

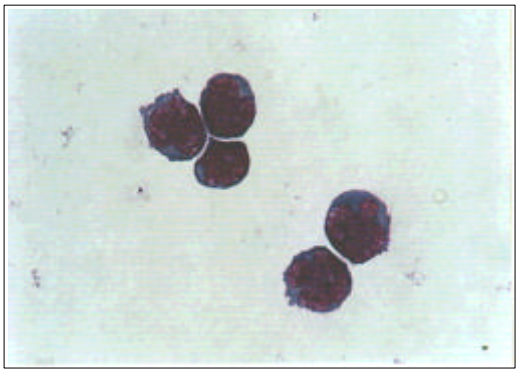

Fig. 2. Light microscopic examination of the purified CD34+ cells showing homogenous immature cells with high N/C ratio and basophilic cytoplasm (May Grunwald-Giemsa stain, x 1,000).

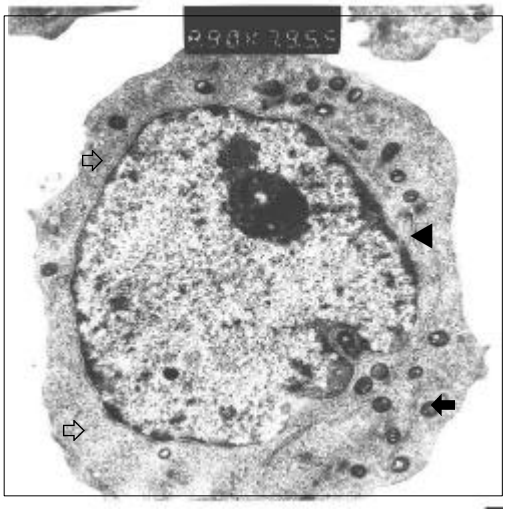

Fig. 3. Electron microscopic observation of an immature cell in the purified cell fraction. The cell has a large nucleus with euchromatin and prominant nucleoli, and relatively scant amount of cytoplasm packed with abundant free ribosomes (empty arrow), small number of mitochondrias (arrow), and microfilaments (arrow head) (uranyl acetate and lead citrate stain, x 13,220).

2. 체외증폭

제대혈에서 분리한 CD34+ 세포 분획을 체외 증폭시켰을 때 생존세포수의 변화는 Fig. 4와 같이 사이토카인 조합에 따라 차이가 있었다. TPO만 사용하였을 경우에는 생존세포수가 배양 11일까지 37.7±1.6배 증폭되다가 그 이후로는 감소하였다. FL, IL-11, IL-3, SCF 등을 병용하였을 때는 지속적으로 증가하여 2주 후부터 모두 50배 이상으로 증폭되어 배양 4주까지 지속적으로 증폭되었는데, FL와 SCF를 함께 첨가한 경우에 가장 많이 증폭되었다.

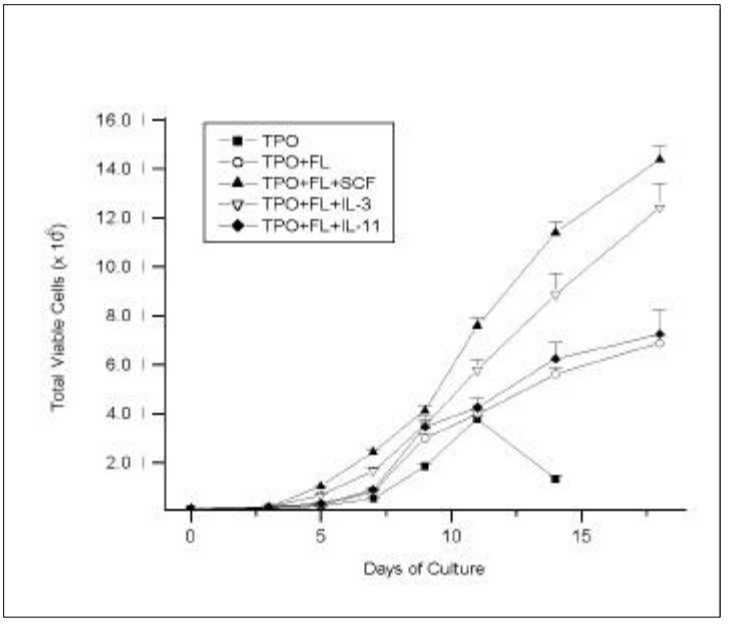

Fig. 4. Evolution of cellularity during *ex vivo* expansion of purified human cord blood CD34+ cells according to the combination of cytokines. Data represent mean ± SD of four separate experiments. TPO, thrombopoietin; FL, flt3-ligand; SCF, stem cell factor; IL-3, interleukin-3; IL-11, interleukin-11.

3. 체외증폭 과정에 거핵구 계열 분화의 표현형 분석

TPO을 사용한 체외증폭 과정에서 거핵구 계열 분화의 표지자로 CD61에 대한 형광염색을 시행하였으며 Fc 수용체에 의한 비특이적 반응을 배제하기 위하여 CD14를 중복 염색하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 배양 4일째부터 CD61+CD14- 세포 분획이 출현하기 시작하여 9일째 최고에 달했다가 14일부터 감소하였다. FL, IL-3, IL-11과 SCF를 첨가하였을 때 전체적인 양상은 TPO만 첨가하였을 때와 같았으나 각 분획의 비율에는 차이가 있었다(Table 1). 그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 비록 통계적으로 각 조합간에 CD61+ 세포의 분획에는 차이가 있으나 생존 세포수의 차이를 함께 고려하면 CD61+ 거핵구 계열세포의 절대수치는 각 조합간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 한편 TPO을 제외한 사이토카인 조합으로 배양하였을 때에는 세포 표현형 분석상 Fig. 6와 같이 거핵구 계열로의 분화가 거의 일어나지 않았다.

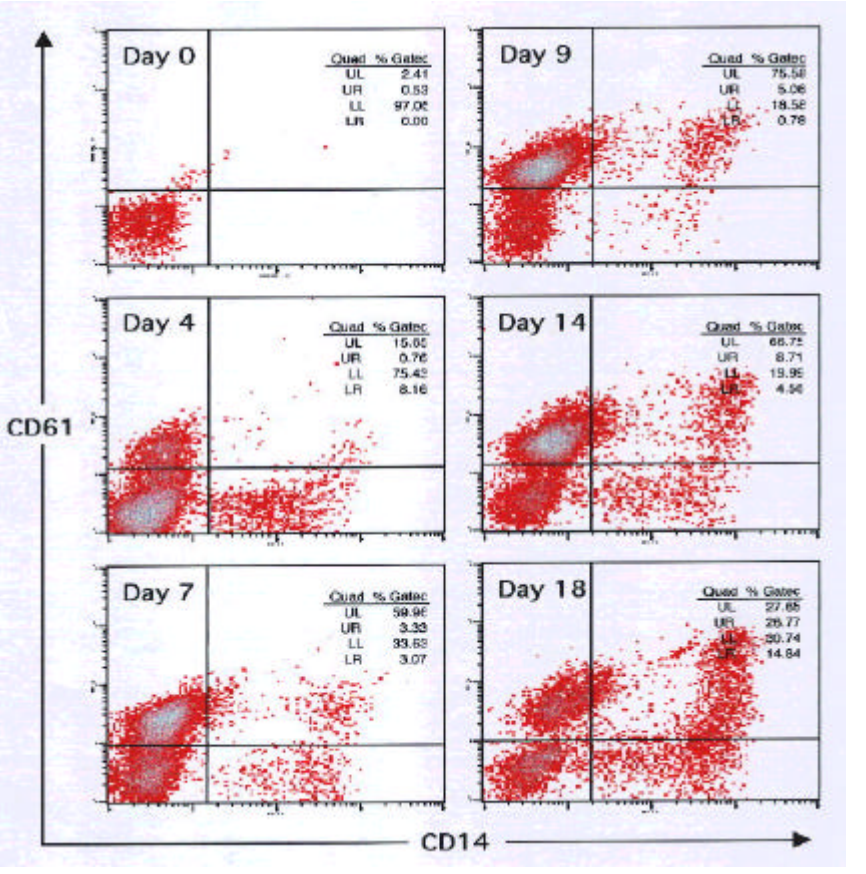

Fig. 5. A series of representative scattergrams showing phenotypic changes during *ex vivo* expansion of human cord blood CD34+ cells using thrombopoietin. The numbers are proportions of each quadrant of an experiment.

Table 1. Proportions of CD61+CD14- fractions according to the combination of cytokines during *ex vivo* expansion

Cytokine combination	Days of culture					
	0	4	7	9	14	17
TPO	2.9±0.8	15.7±2.1	60.0±5.2	75.6±5.4	66.8±6.2	27.7±3.3
TPO+FL	2.9±0.8	10.3±2.3	35.5±4.2	46.4±3.8	34.2±3.1	20.3±3.0
TPO+FL+SCF	2.9±0.8	9.4±1.1	14.6±2.0	18.0±4.3	14.0±2.1	12.6±1.9
TPO+FL+IL-3	2.9±0.8	10.7±2.0	34.5±3.9	44.2±3.7	31.9±4.2	19.3±2.3
TPO+FL+IL-11	2.9±0.8	11.2±1.7	33.6±2.8	46.5±4.6	38.5±3.9	22.5±2.8

Data represent mean ± SD of four separate experiments.

TPO, thrombopoietin; FL, flt3-ligand; SCF, stem cell factor; IL-3, interleukin-3; IL-11, interleukin-11

Table 2. The results of *ex vivo* expansion of cord blood CD34+ cells for 9 days

Cytokine combination	CD61+ Fraction (%)	Total viable cell number ($x10^6$)	Absolute count of CD61+ cells ($x10^6$)
TPO	84.13 ± 2.58*	1.76 ± 0.11*	1.48 ± 0.11
TPO+FL	55.30 ± 3.66*	3.03 ± 0.17*	1.68 ± 0.20
TPO+FL+SCF	25.78 ± 0.71*	5.53 ± 0.36*	1.42 ± 0.09
TPO+FL+IL-3	37.23 ± 3.43*	3.53 ± 0.22*	1.31 ± 0.39
TPO+FL+IL-11	48.75 ± 2.89*	3.45 ± 0.43*	1.68 ± 0.28

Data represent mean ± SD of four separate experiments

*P-value < 0.05

TPO, thrombopoietin; FL, flt3-ligand; SCF, stem cell factor; IL-3, interleukin-3; IL-11, interleukin-11

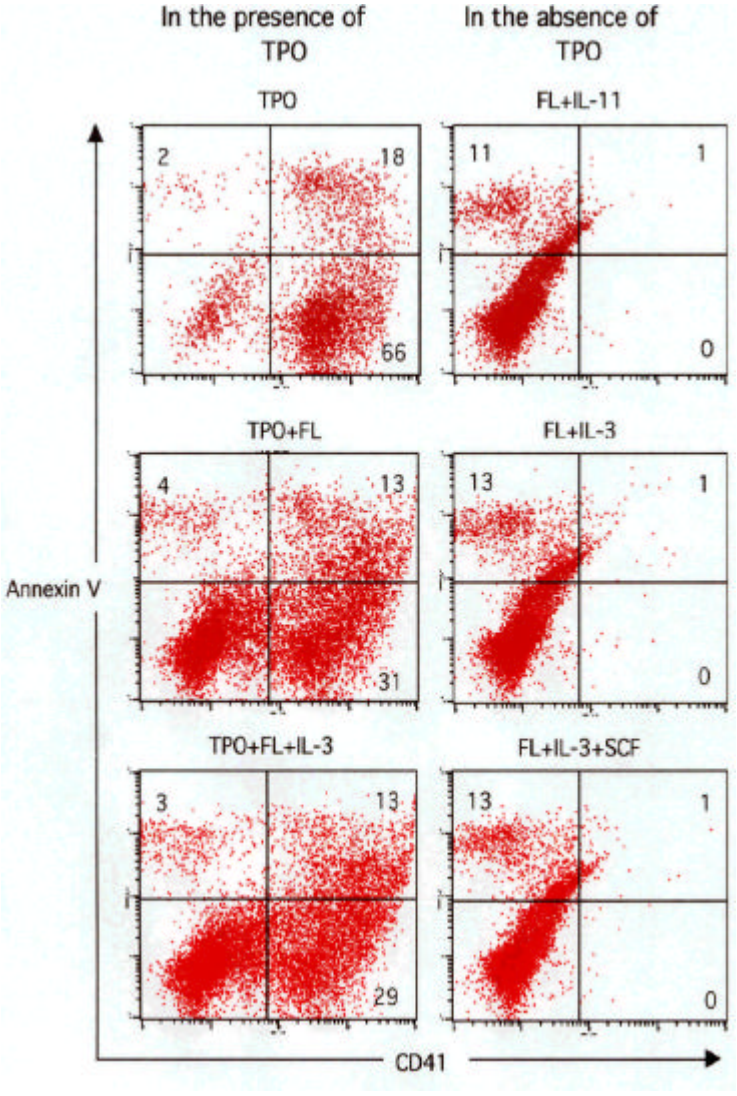

Fig. 6. Representative scattergrams comparing phenotypic changes during *ex vivo* expansion of human cord blood CD34+ cells in the presence or absence of thrombopoietin. The numbers are proportions of each quadrant of an experiment. TPO, thrombopoietin; FL, flt3-ligand; SCF, stem cell factor; IL-3, interleukin-3; IL-11, interleukin-11.

4. 체외증폭 과정에 세포고사 분석

체외증폭 과정에 일어나는 세포고사 분획을 annexin V 염색법으로 분석한 결과 Table 3과 같이 각 조합군 모두에서 배양 4일부터 증가하기 시작하여 배양 14일 째 최고에 달했다가 그 이후부터는 감소하였다. 특징적으로 SCF가 첨가된 경우 배양 초기인 제 4일과 7일째에는 세포고사 분획의 비율이 다른 사이토카인 조합에 비해 유의하게 높았으며 반면 배양 후기인 제 14일과 17일째에는 다른 사이토카인 조합에 비해 유의하게 낮았다. SCF가 첨가된 경우 발생하는 초기 세포고사는 거핵구 계열이 아닌 다른 분획에서 일어났고(Fig. 7) 배양 후기(제 15일 부터)에는 거핵구 계열의 세포고사가 유의하게 감소되었다(Fig. 8).

Table 3. Proportions of apoptotic fractions according to the combination of cytokines during *ex vivo* expansion

Cytokine combination	Days of culture					
	0	4	7	9	14	17
TPO	1.9±0.7	2.6±0.9	6.2±1.7	14.0±2.5	38.8±4.7	27.3±4.1
TPO+FL	1.9±0.7	3.2±0.8	5.8±1.2	10.1±3.4	34.3±4.1	26.3±4.0
TPO+FL+SCF	1.9±0.7	10.0±1.5*	12.7±2.2*	13.9±3.3	25.4±3.1*	23.4±2.8*
TPO+FL+IL-3	1.9±0.7	3.3±1.0	4.8±2.1	14.8±2.9	29.8±3.3	26.3±3.5
TPO+FL+IL-11	1.9±0.7	3.2±1.2	6.3±1.4	10.6±3.5	36.9±4.8	27.5±3.3

Data represent mean ± SD of four separate experiments

*P-value < 0.05

TPO, thrombopoietin; FL, flt3-ligand; SCF, stem cell factor; IL-3, interleukin-3; IL-11, interleukin-11

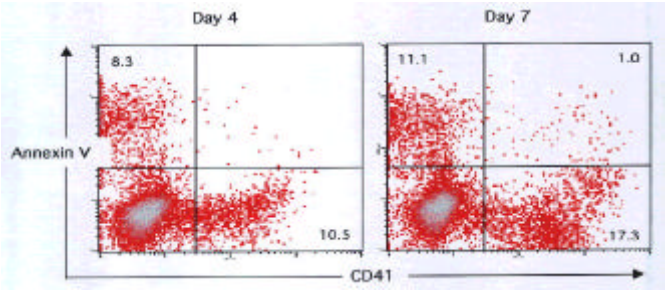

Fig. 7. Representative scattergrams demonstrating that the apoptotic fractions at early phase in the cultures with stem cell factor do not belong to CD41+ fractions. The numbers are proportions of each quadrant of an experiment.

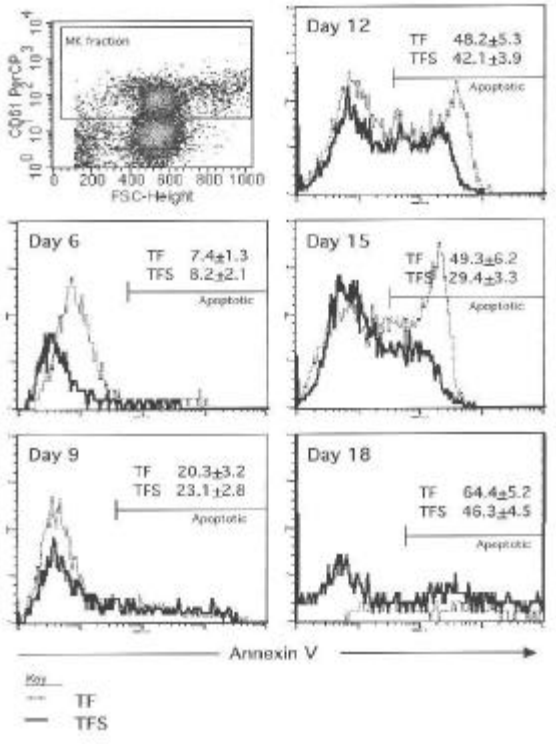

Fig. 8. Representative histograms demonstrating that stem cell factor (SCF) decreased the apoptosis in megakaryocyte fractions during *ex vivo* expansion of CD34+ cells using thrombopoietin (TPO) and flt3-ligand (FL). The numbers are data represented as mean ± SD of four separate experiments. TF, TPO+FL; TFS, TPO+FL+SCF; MK, megakaryocyte.

5. 체외증폭 과정에 광학현미경적 형태의 변화

PAS 염색에서 배양 5일부터 소수의 세포에서 당원과립이 산재된 형태를 볼 수 있었다. 배양 7일부터는 당원과립이 주로 세포질 주변부로 군집된 형태를 보이면서 세포질돌출(cytoplasmic protrusion)이 보였다. 배양 9일부터는 비교적 많은 수의 당원과립을 포함한 세포분절과 함께 주변에 혈소판들이 출현하기 시작하였다(Fig. 9A). TPO만 첨가된 경우에는 14일경에는 세포밀도가 급속히 감소되면서 주변에 많은 수의 탐식세포를 볼 수 있었다(Fig. 9B). 반면에, 각종 사이토카인이 첨가 된 경우에는 18일경에도 거핵구 계열의 세포와 함께 May-Grunwald-Giemsa 염색에서 세포질내에 다량의 과립을 보이는 많은 수의 미성숙세포들을 볼 수 있었다(Fig. 9C). 이와 같은 형태학적 변화는 4개의 제대혈 시료에 따라 차이가 없었다.

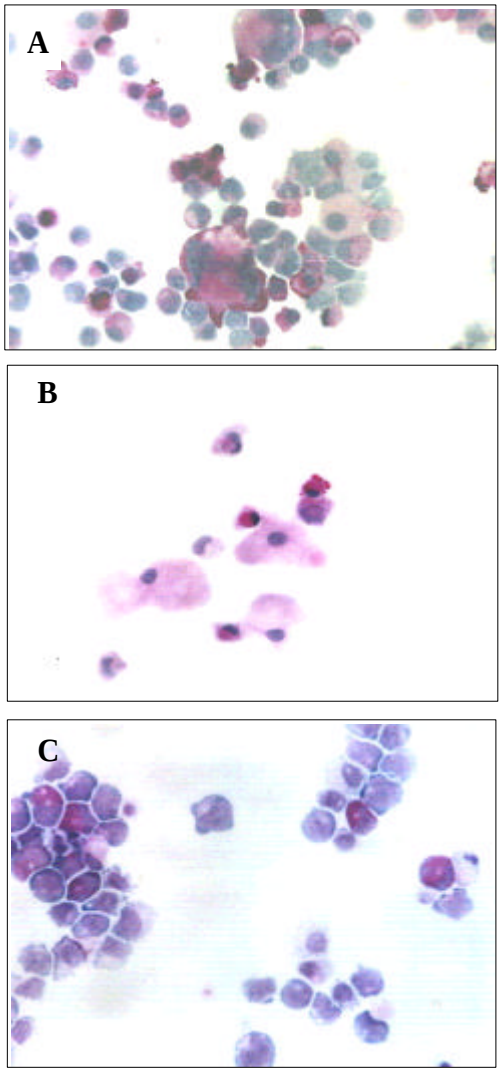

Fig. 9. Light microscopic examination of the cytospined cells. (A) *Ex vivo* expanded cells for 9 days using thrombopoietin. There are scattered large cells with multilobulated large nuclei and cytoplasmic protrusions containing glycogen granules in blocked pattern. Also a few scattered platelets are seen (PAS stain, x400). (B) *Ex vivo* expanded cells for 14 days using thrombopoietin. There are scattered small cells showing cytoplasmic protrusions with glycogen granules in blocked pattern and macrophages (PAS stain, x400). (C) *Ex vivo* expanded cells for 18 days using thrombopoietin, flt3-ligand and stem cell factor. Some cells are megakaryocytes having cytoplasmic bubbles and protrusions and others are immature cells with cytoplasmic eosinophilic coarse granules (May-Grunwald-Giemsa stain, x400).

6. 체외증폭 과정에서 거핵구의 미세구조 변화

TPO만을 첨가하였을 때 거핵구 분화과정의 미세구조 변화는 배양 5일째에 핵은 부분적으로 함입되고 세포질은 소수의 작은 전자고밀도 과립(electron dense granule) 발생과 함께 상대적으로 그 양이 증가되었다. 그러나 명백한 거핵구로의 분화 증거는 찾을 수 없었다. 배양 7일째에는 핵은 길게 모양이 늘어나면서 세포질내에서 거핵구 분화과정중에 나타나는 분획막이 관찰되었으며, 전자고밀도과립의 양이 증가하고 당원과립이 관찰되었다(Fig. 10A). 또한 드물게 부분적으로 세포질의 분절과 혈소판의 형성이 관찰되었다(Fig. 10B). 배양 9일째에는 핵이 분엽(lobulation)되면서 이염색질의 형태를 보였고, 세포질에는 광범위하게 분획막이 발달하면서 많은 수의 다양한 전자밀도의 과립과 함께 세포질의 분절과 혈소판의 형성이 관찰되었다(Fig. 10B). 한편, 배양 9일째부터 드물게 거핵구의 세포고사를 관찰할 수 있었다. 배양 11일째에는 많은 수의 거핵구 세포와 함께 지속적인 혈소판 형성을 관찰할 수 있었다. 배양 14일째에는 저배율 소견상 세포의 수 자체가 급격히 감소하였는데, 소수의 혈소판 형성과정중인 거핵구, 세포고사 과정중의 거핵구와 함께 탐식작용중인 많은 수의 탐식세포들이 관찰되었다(Fig. 10C).

TPO과 함께 FL를 첨가하였을 때 배양 5일에서 14일까지 보이는 형태학적 소견은 TPO만 첨가하였을 때와 동일하였다. 배양 18일째에는 거핵구로 분화되는 세포이외에도 단구와 더불어 어떠한 특정 분화를 알 수 없는 미성숙 세포 및 골수세포쪽으로 분화하는 세포들을 볼 수 있었다.

TPO, FL와 함께 IL-3를 첨가하였을 때 배양 5일과 7일째에 보이는 형태학적 소견은 TPO만 첨가하였을 때와 동일하였다. 그러나 배양 9일, 11일, 14일에도 특정 계열로의 분화를 알 수 없는 미성숙 세포들을 상당히 많이 볼 수 있었다(Fig. 11A, B). 배양 18일째에는 극소수의 거핵구와 혈소판 형성이 관찰되었다. 동시에 많은 수의 단구와 골수세포로 분화되는

세포들이 관찰되었다.

TPO, FL와 함께 IL-11을 첨가하였을 때에는 TPO만 첨가하였을 때와 동일한 양상이었다. 다만, 배양 18일째까지 저배율 소견상 거핵구로 분화되는 세포와 함께 많은 수의 미성숙 세포, 골수세포, 단구로 분화되는 세포들이 관찰되었다.

TPO, FL와 함께 SCF를 첨가하였을 때에도 TPO만 첨가하였을 때 나타나는 거핵구 계열로의 분화 양상은 동일하였다. 특징적으로 배양 7일과 9일째에 많은 수의 세포고사를 볼 수 있었다. 그러나 세포질 내의 분획막이나, 전자고밀도과립등이 관찰되지 않으면서 많은 수의 리조좀이 보이는 점으로 보아 세포고사를 보이는 많은 세포들은 거핵구 계열이 아닌 탐식구 계열의 세포로 생각되었다(Fig. 12A). 배양 18일째에는 다른 제대혈 시료를 첨가했을 때와 동일하게 거핵구로 분화되는 세포와 함께 미성숙 세포, 단구, 골수세포 등으로 분화하는 세포들을 볼 수 있었으며 다른 제대혈 시료에 비해 상대적으로 더 많은 수의 거핵구 계열의 세포와 혈소판을 볼 수 있었다(Fig. 12B, C).

각기 모든 제대혈 시료의 첨가시 나타나는 거핵구 계열의 세포는 시료에 따른 형태학적 소견의 차이는 없었으며 가장 큰 세포의 크기가 각기 20 ㎛를 넘지 않았다. 한편 TPO을 제외한 제대혈 시료 조합을 첨가하여 배양한 경우에는 배양 7일째에도 비교적 세포질에 대한 핵의 비율이 높으면서 세포질내 기관(cytoplasmic organelle)들의 발달이 미숙하였다(Fig. 13A). 배양 14일째에는 다양한 크기의 전자고밀도과립과 리조좀을 함유하면서 가는 세포막돌기(cytoplasmic process)들을 보이는 골수세포계열로의 분화를 보였다(Fig. 13B). 그러나 TPO을 제외한 어떠한 조합에서도 분획막의 출현이나, 세포질의 분절은 관찰할 수 없었다.

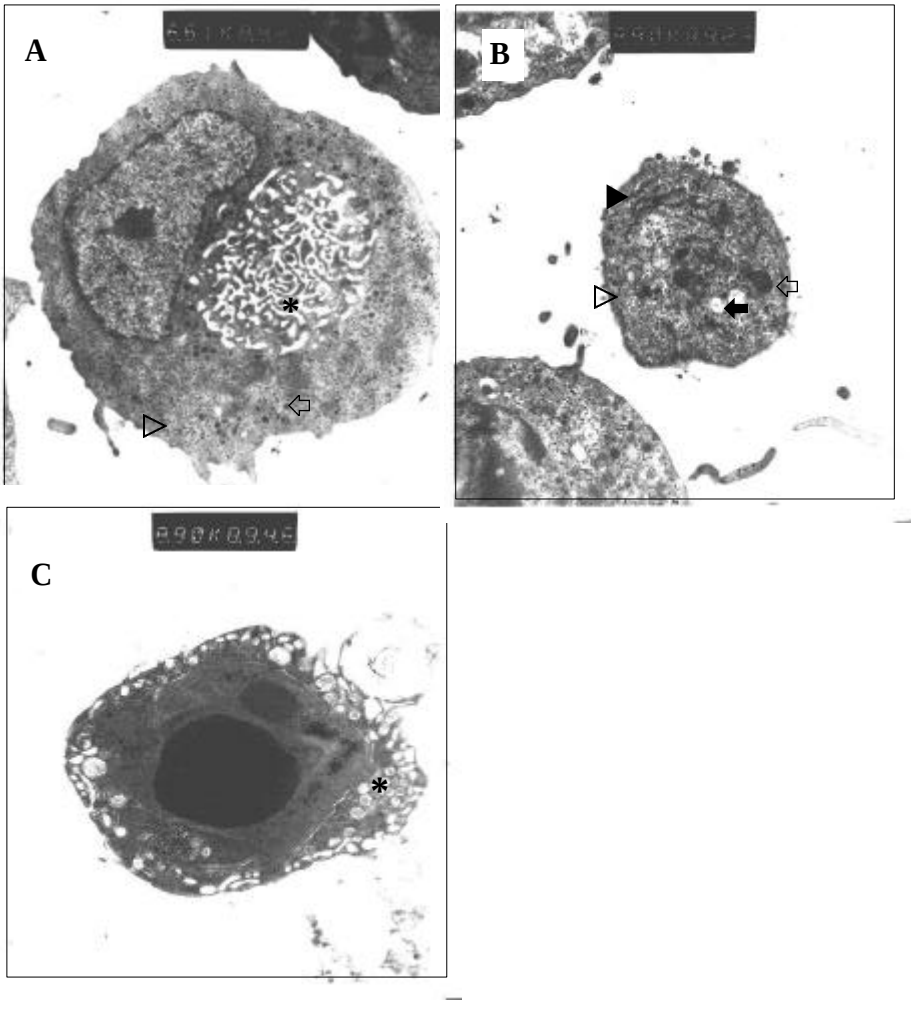

Fig. 10. Electron microscopic observation of the expanded cells using thrombopoietin (uranyl acetate and lead citrate stain). (A) On day 7, a megakaryocytic cell with elongated nucleus and abundant cytoplasm was observed. Demarcation membranes (aterisk) begin to appear while electron dense core granules (open arrow) and glycogen granules (open arrow head) increased (x10,400). (B) From day 7, a platelet showing electron dense granules (open arrow), mitochondrias, open canalicular system (arrow) in central area, and glycogen granules (open arrow head) and microfilaments (arrow head) in peripheral area was observed (x17,800). (C) On day 14, apoptosis of megakaryocytic cells showing demarcation membranes (aterisk) was observed (x10,400).

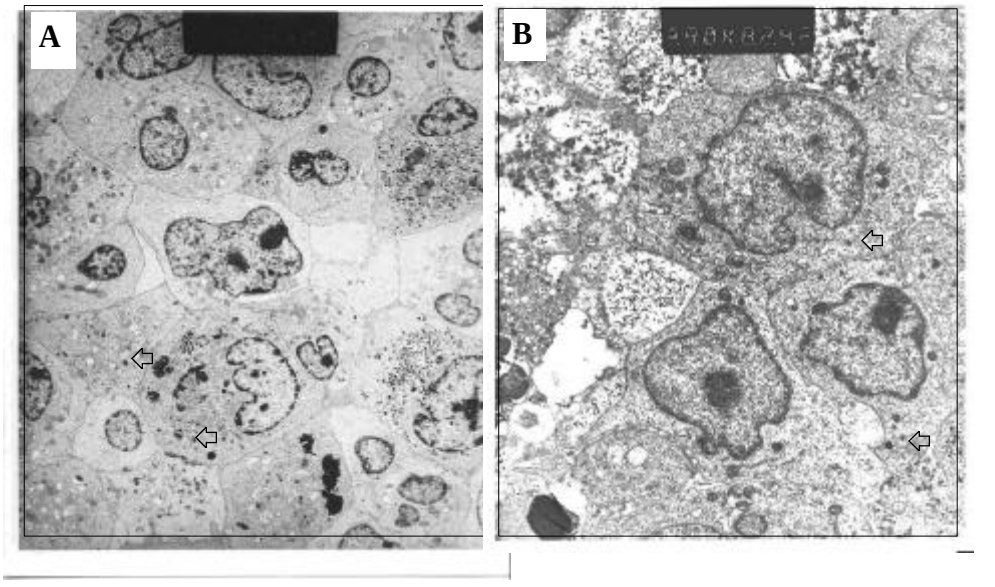

Fig. 11. Electron microscopic observation of the expanded cells using thrombopoietin, flt3-ligand and interleukin-3. On day 9 (A) as well as day 14 (B), many residual immature cells were observed, in which large euchromatic nucleus and cytoplasm with many mitochondrias and electron dense granules (open arrow) of variable size were shown (uranyl acetate and lead citrate stain, x5,900).

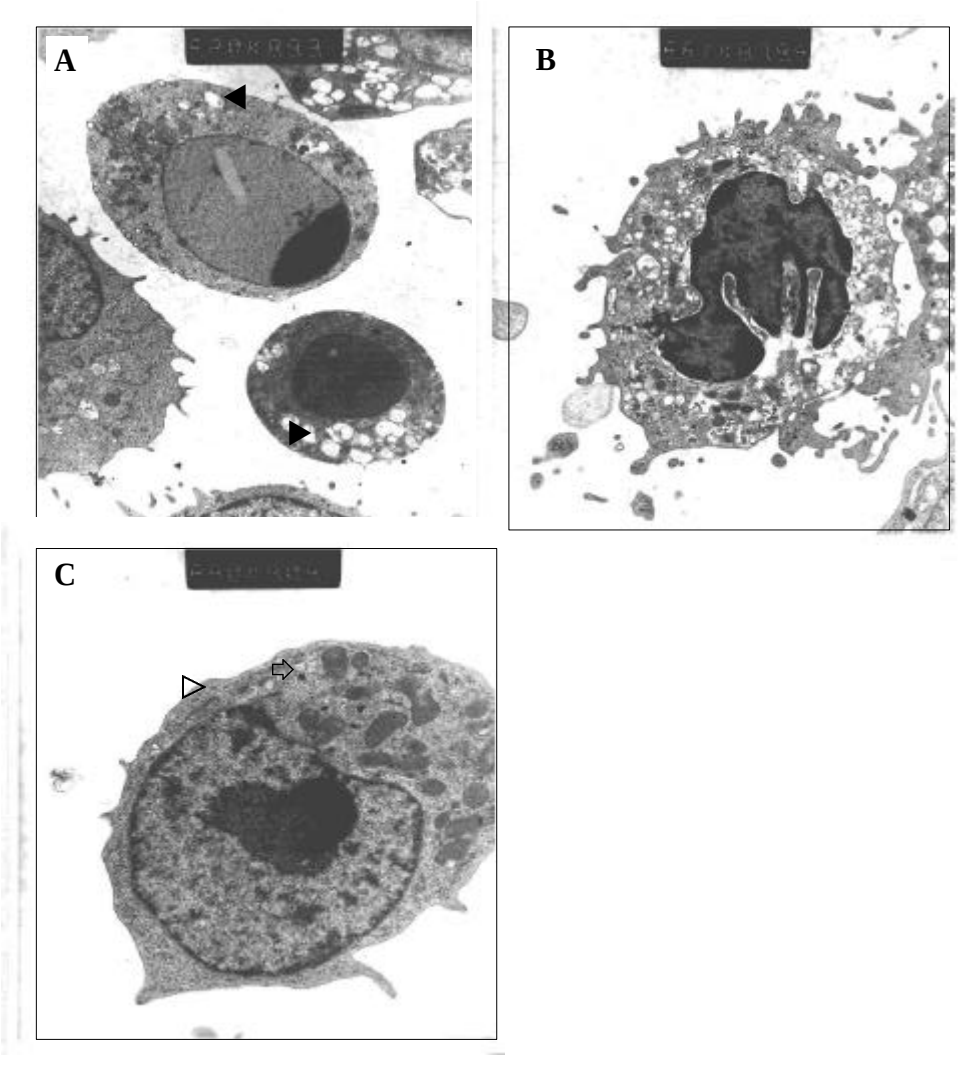

Fig. 12. Electron microscopic observation of the expanded cells with thrombopoietin, flt3-ligand, and stem cell factor (uranyl acetate and lead citrate stain). (A) On day 7, many apoptotic cells were observed. Considering the cytoplasmic details with many lysosomal granules (arrow head) and no evidence of demarcation membrane, they seem to belong to non-megakaryocytic lineage (x5,900). On day 18, there are many megakaryocytes (B) and some immature cells (C) showing euchromatic large nucleus and cytoplasm with many mitochondria, small number of electron dense granules (open arrow) and microfilaments (open arrow head) (x10,400).

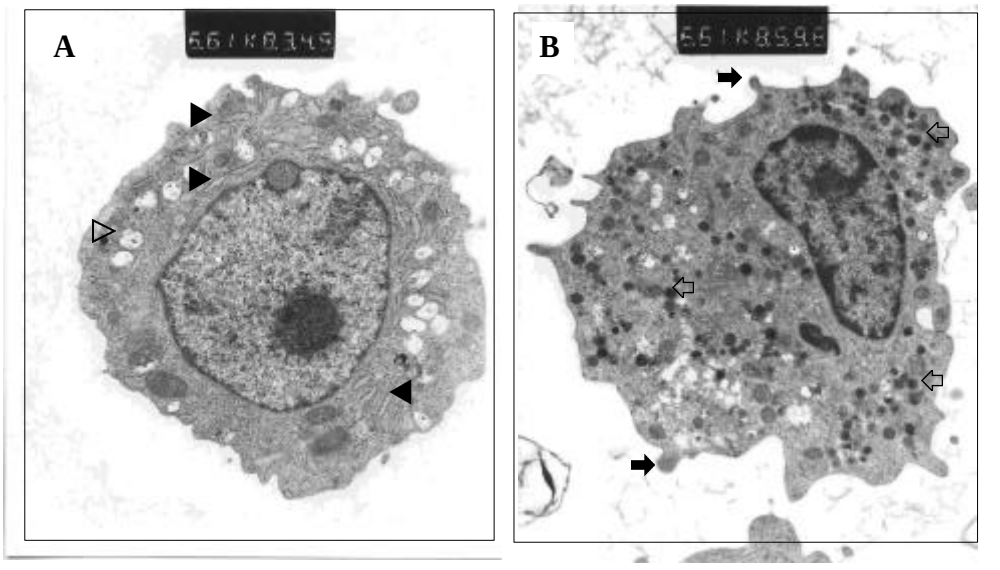

Fig. 13. Electron microscopic observation of the expanded cells with flt3-ligand, interleukin-11, and stem cell factor (uranyl acetate and lead citrate stain). (A) On day 7, a relatively immature cell with high N/C ratio and euchromatic nucleus, prominent nucleoli and a few cytoplasmic organelles including mitochondria, microfilaments (arrow head), and multivesicular lysosomes (open arrow head) was observed (x13,220). (B) On day 14, a cell showing myeloid differentiation by elongated heterochromatic nucleus and abundant cytoplasm including many electron dense granules (open arrow) of variable size, lysosomes, and diffusely scattered glycogen granules with thin cytoplasmic process (arrow) was observed (x10,400).

IV. 고찰

제대혈은 골수를 대체할 수 있는 조혈모세포원으로서 매우 유용하나 생착지연, 특히 혈소판 회복이 느린 단점이 있다. 따라서 이를 해결하기 위해 최근에는 여러 사이토카인을 이용한 조혈모세포의 체외증폭이 시도되고 있으며 특히 거핵구 계열로의 분화유도에 관심이 높다. TPO은 이러한 거핵구 계열로의 분화유도에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이외에 FL, IL-3, IL-11, SCF 등의 역할에 대해서도 다양한 연구가 이루어져 왔다. 한편 조혈모세포의 거핵구 계열로의 체외증폭에 따른 세포고사 양상과 미세구조변화에 대해서는 아직 그 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 제대혈 CD34+ 세포를 여러 가지 사이토카인 조합으로 체외증폭시킬 때 일어나는 거핵구 계열 분화 과정의 표현형과 세포고사 양상 그리고 미세구조 변화를 분석하였다. 그 결과 TPO 단독 투여시에는 거핵구 계열로 분화하는 세포분획의 비율이 가장 높았다. 그러나 배양 11일 이후에는 거핵구 계열의 비율이 감소하여 TPO 단독으로는 초기작용 사이토카인의 역할은 하지만 지속적인 세포의 증식 작용은 하지 못하는 것을 알 수 있었다. 이는 TPO, FL-3, IL-3등의 사이토카인을 단독으로 투여시에는 세포증식이 10일 이상을 지나지 못하지만 TPO과 다른 사토카인의 조합에 의하면 지속적으로 증식한다는 보고와 일치하였다.[29,30] 본 실험에서 TPO 단독 투여시 배양 4일째에 표현형 분석에서 CD61+CD41-의 거핵구 계열의 분화가 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며 또한 배양 4 일째에 annexin V 형광염색에 의해 세포고사가 발생하는 것을 관찰할 수 있었다. 형태적으로도 약 9일경부터는 거핵구 계열세포의 세포고사를 확인할 수 있었다. TPO 단독 투여시 발생하는 세포고사가 거핵구 계열의 세포에서 발생하는 것은 최근 Seoh 등[18]이나 Ryu 등[19]에 의해 보고된 바 있다. 즉 이들은 제대혈을 TPO을 이용하여 거핵구

계열로 체외배양시키는 과정에서 거핵구 계열의 세포들이 미성숙 단계에서 이미 세포고사가 함께 나타남을 표현형 분석을 통하여 보고하였다. 한편, 본 실험에서는 다른 사이토카인과의 조합시에 나타나는 세포고사의 양상을 비교한 결과 FL, IL-3, IL-11을 첨가한 경우에는 세포고사 양상이 TPO 단독 투여시의 양상과 동일하였다. 따라서 이들 사이토카인은 TPO 투여로 인해 발생하는 거핵구 계열세포의 미성숙단계에서 일어나는 세포고사를 억제시키지는 못하는 것으로 보인다. 그러나 SCF를 첨가한 경우 초기에는 오히려 비거핵구 계열세포의 세포고사를 증가시킨 반면 후기에는 거핵구 계열세포 자체의 세포고사를 억제하는 효과를 보였다. 초기의 세포고사를 보이는 세포들은 전자현미경적 소견에서 많은 리조좀 과립을 보이는 것으로 보아 탐식구 계열의 세포로 추측된다. 이는 TPO 단독투여 배양 후기에 많은 수의 탐식 세포가 나타나면서 세포고사 과정의 세포를 탐식하는 점을 고려할 때 초기에 선택적으로 거핵구 계열로의 분화에 일조의 역할을 할 수 있을 것이다. SCF는 배양 후기에는 거핵구 계열세포의 세포고사를 선택적으로 억제하는 효과를 보였는데 이는 TPO 투여시에 발생하는 미성숙 상태의 거핵구 계열세포의 세포고사를 억제함으로써 혈소판 생성의 증대효과를 기대할 수 있을 것이다. 전자현미경 소견에서 TPO 단독투여시와 각종 사이토카인과의 조합을 투여했을 때 모두에서 거핵구 계열세포의 크기는 전자현미경 소견상 20 ㎛를 넘지 않았다. 이는 정상골수에서 발견되는 거핵구의 크기가 15 80 ㎛라는 점을 생각할 때 제대혈 세포의 체외증폭에 의한 거핵구 계열세포들이 완전한 성숙 형태는 보이지 못한 상태에서 혈소판을 생성하는 것임을 알 수 있다. SCF도 비록 미성숙 상태에서의 세포 고사를 억제하기는 하나 그 자체가 완전 성숙에 이르는 역할을 하게 하지는 못하는 것으로 보인다. 한편 본 연구에서 표현형 분석결과 배양 4일째부터 CD61+CD14-의 거핵구 계열의 세포가 나타나는 반면 형태학적 소견에서 거핵구 계열의 분화를 보

이는 것은 배양 7일째부터였다. 표현형상에서 측정하는 CD41, CD61등은 integrin의 한 종류로서 이들은 혈소판에서는 형질막(plasma membrane) 내측, 전자고밀도 과립, 열린세관계(open canalicular system)에 위치하고 거핵구에서는 골지체나 전자고밀도 과립에 존재한다.[31,32] 따라서 표현형분석에서 배양 4일 경에 나타난 표현형 표지자들은 형태학적 소견상 배양 5일째에 보였던 소수의 전자고밀도 과립이나 골지체에 존재하는 것을 감지한 것으로 생각된다. 또한 세포고사도 annexin V 형광염색에서 배양 4일째부터 감지된 반면 전자현미경 소견에서는 배양 9일째부터 확실한 핵의 변화를 관찰 할 수 있었다. annexin V 형광염색법은 세포고사시 세포막의 인지질 불균형이 소실되면서 세포표면에 노출되는 phosphatydilserin을 형광염색된 annexin V와 결합시켜 인지하는 방법으로 다양한 세포고사 측정방법 중에서 가장 초기에 세포고사를 감지하는 방법이다.[33,34] 반면에 형태학적 소견, 특히 핵의 변화는 이미 세포고사가 진행중인 세포에서 나타나는 소견으로 Kimura 등[35]은 전자현미경을 통한 세포고사분석과 생화학적 세포고사분석방법을 비교하고 생화학적인 분석방법이 더 초기의 변화를 감지하는 것을 보인 바 있다. 따라서 본 연구결과도 이러한 연유에 기인한 것으로 생각된다.

본 연구에서 IL-3의 투여시 거핵구 계열세포의 절대수치는 다른 사이토카인 조합시와 통계적으로 차이는 없었으나 전자현미경 소견상 미분화 상태가 오래 지속되었으며 혈소판 생성의 열쇠라 할 수 있는 분획막의 발달이 거의 보이지 않았다. IL-3은 한 때 거핵구 계열로의 체외증폭과정에서 유용한 역할을 하는 것으로 보고되었다.[22,36] 그러나 최근에는 그 역할에 대해 많은 논란이 있다. Dolzhanskiy 등[37]은 IL-3이 오히려 다배수체화(polyploidization)를 억제하는 효과가 있어 거핵구 계열로의 분화를 억제한다고 보고하였으며, Lazzari 등[38]도 IL-3의 첨가시 TPO에 의한 세포증식효과에는 일조를 하나 분화시키는 양상에 있어 오히려 골수세포계

통으로 분화를 더 많이 유도하는 것으로 보고하고 있다. 이러한 내용들은 모두 세포표현형 분석의 내용에 근거를 둔 것이었다. 이미 언급한 바와 같이 표현형분석의 CD41과 CD61측정은 세포질내에 존재하는 integrin의 한 부류를 감지하는 것으로 이들의 발현이 반드시 혈소판을 형성하는 거핵구라고만은 할 수 없을 것이다.[31,32] 또한 최근에 Law 등[39]은 이중착색면역형광표지(dual-color immunofluorescent labelling)를 이용하여 CD14양성 단구 계열세포들도 CD61에 양성일 수 있음을 보이고 이러한 세포들이 전자 현미경 소견에서는 거핵구 계열의 분화를 전혀 보이지 않음을 보고하였다. 본 실험 결과를 보면 IL-3을 투여시 표현형 자체는 다른 사이토카인 조합과는 의미 있는 차이가 없었으나 형태학적 양상을 볼 때 오히려 IL-3 은 거핵구 계열로의 분화를 억제하는 효과를 보였다.

IL-11은 한 때 TPO과 상승적으로 혹은 독립적으로 거핵구 계열로의 분화유도 및 세포증식에 관여한다고 보고되어 왔다.[23,39-42] 본 연구 결과 IL-11은 FL와 마찬가지로 거핵구 계열 및 비거핵구 계열로의 분화 유도와 함께 세포증식에 상승적 작용을 하였다. 그러나 IL-11에 의하여 특이적으로 거핵구 계열의 분획이 증가하거나 형태학적으로 거핵구의 성숙도가 증가되는 소견은 관찰할 수 없었으며 세포고사의 양상도 TPO 단독 투여시와 다른 바가 없었다. 따라서 IL-11의 첨가에 의해서는 조혈모 세포의 다계열분화(multilineage differentiation)와 세포의 지속적 증식 이외에는 특별한 효과를 기대하기 어려운 것으로 보인다. 또한 본 연구에서는 TPO을 제외한 FL, IL-3, IL-11, SCF등의 조합을 투여해서 배양했을 때 세포 표현형과 전자현미경 소견 모두에서 거핵구로의 분화를 확인 할 수 없었다. 비록 이들 사이토카인 조합에 의한 독립적인 거핵구 형성에 대한 보고들이 있으나 이들은 c-Mpl 결핍 백서를 이용 체내에 사이토카인을 투여하여 실험하였거나 혹은 체외에서 배양을 하더라도 세포 표현형으로만 분석을 하였다.[21,22,36,43,44] 본 연구는 세포 표현형 분석과 더불어 전자현

미경검색을 통하여 제대혈의 체외배양시 TPO의 투여가 없이는 실제적으로 거핵구로의 분화가 일어나지 않음을 명백히 보이고 있다. 따라서 앞으로 제대혈 세포의 거핵구 계열로의 체외증폭에 관한 연구는 TPO을 근간으로 이루어져야 할 것이다. 본 연구에서 보인 바와 같이 SCF는 TPO에 의한 거핵구로의 분화과정에서 배양초기에는 탐식구 계열의 세포고사를 유도한 반면 후기에는 분화과정중에 TPO에 의해 유도되는 미성숙 단계의 세포고사를 억제하는 효과를 보였다. 따라서 체외증폭체계를 이용한 거핵구로의 분화 유도 및 혈소판 생산에 SCF가 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 제대혈 CD34 양성 조혈모세포를 thrombopoietin (TPO)을 비롯한 flt3-ligand (FL), interleukin (IL)-3, stem cell factor (SCF), IL-11을 사용하여 체외증폭시켜 거핵구 계열로의 분화 과정에서의 표현형과 세포고사 양상, 미세구조 분석을 시행하였다. 그 결과 TPO만 첨가하였을 때에는 초기 거핵구 계열로 분화하는 세포 분획의 비율이 가장 많았지만, 세포고사에 의해 11일 이후에는 생존 세포수의 급격한 감소를 보였다. FL, IL-3, IL-11, SCF 등을 병용하였을 때에는 모두 2주 후까지 지속적으로 증폭되었다.

표현형과 annexin V를 이용한 세포고사 분석에서 TPO, FL, IL-3, IL-11에 의한 체외증폭시 거핵구 계열로의 분화에 따라 세포고사를 보였다. 그러나 SCF를 첨가했을 때에는 초기에 거핵구 계열이외 세포의 세포고사를 유도하는 반면 후기에는 오히려 거핵구 계열세포의 세포고사를 억제하였다.

전자현미경을 이용한 미세구조 분석에서 TPO 단독 투여시 배양 7일째부터 세포질내에 분획막이 나타나면서 세포질의 분절과 함께 주변에 소수의 혈소판이 관찰되었으며 배양 9일째에 거핵구 계열 세포의 세포고사가 소수 관찰되기 시작하였고 배양 14일째에 급격한 세포 수의 감소와 함께 많은 수의 거핵구의 세포고사, 탐식작용중인 탐식구가 관찰되었다. FL과 IL-11을 함께 투여했을 때에는 미세구조의 분화 양상은 TPO 단독 투여시와 동일하였으며 배양 18일째에도 거핵구 계열세포 이외에 많은 수의 비거핵구 계열의 미성숙 세포를 볼 수 있었다. SCF를 첨가했을 때에는 배양 7일째에 비거핵구 계열세포, 즉 탐식구의 세포고사를 확인 할 수 있었고 배양 18일째에는 지속적인 거핵구 계열세포 및 혈소판의 출현과 함께 비거핵구 계열의 미성숙 세포를 함께 볼 수 있었다. IL-3의 첨가

시 표현형에서는 차이가 없었으나 전자현미경 소견에서 비교적 오래 지속적으로 특정 분화를 보이지 않는 미성숙 세포가 관찰되고 분획막의 발달이 거의 없어 오히려 거핵구 계열로의 분화를 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 체외증폭 체계를 이용한 거핵구의 분화 유도 및 혈소판 생산에서 SCF가 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Van Epps DE, Bender J, Lee W, Schilling M, Smith A, Smith S, et al. Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. Blood Cells 1994;20:411-23.
2. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. Blood 1996;88:795-802.
3. Genechea G, Segovia JC, Albella B, Lamana M, Ramirez M, Regidor C, et al. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. Blood 1999;93:1097-1105.
4. 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 1995;80:473-9.
5. Eridani S, Mazza U, Massaro P, La Targia ML, Maiolo AT, Mosca A. Cytokine effect on ex vivo expansion of haemopoietic stem cells from different human sources [corrected and republished article originally printed in Biotherapy 1998;10:295-8]. Biotherapy 1998;11:291-6.
6. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and

development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. Cell 1994;77:1117-24.

7. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. Nature 1994;369:533-8.
8. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. Nature 1994;369:568-74.
9. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. Blood 1996;187:4544-51.
10. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. Blood 1996;87:4998-5005.
11. Solar G, de Sauvage, Eaton D, Cohen B. Role of c-Mpl in early hematopoiesis. Blood 1997;90 Suppl 1:572a.
12. Gainsford T, Roberts AW, Kimura S, Metcalf D, Dranoff G, Mulligan RC, et al. Cytokine production and function in c-mpl-deficient mice: no physiologic role for interleukin-3 in residual megakaryocyte and platelet production. Blood 1998;91:2745-52.
13. Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ. Hematopoietic

deficiencies in c-Mpl and TPO knockout mice. Stem Cells 1998;16:1-6.

14. Tao H, Gaudry L, Rice A, Chong B. Megakaryocytopoiesis: cord blood is better than bone marrow for generating megakaryocytic progenitor cells. Exp Hematol 1999;27:293-301.
15. Hoffbrand AV, Pettit JE. Normal hematopoiesis and blood cells. In: Color atlas of clinical hematology. 2nd ed. Barcelona, Spain: Mosby-Wolfe; 1994.
16. Cramer EM, Norol F, Guichard J, Breton GJ, Vainchenker W, Mass JM, Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. Blood 1997;89:2336-46.
17. Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, et al. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. Anat Rec 2000;258:90-9.
18. Seoh JY, Woo SY, Im SA, Kim YJ, Park HY, Lee S, et al. Distinct patterns of apoptosis in association with modulation of CD44 induced by thrombopoietin and granulocyte-colony stimulating factor during ex vivo expansion of human cord blood CD34+ cells. Brit J Haematol 1999;107:176-185.
19. Ryu KA, Chun S, Carbonierre S, Im SA, Kim HL, Shim MH, et al. Apoptosis and megakaryocytic differentiation during ex vivo expansion of human cord blood CD34+ cells using thrombopoietin. Brit J Haematol 2001;113:470-478.
20. Lyman SD. Biology of flt3 ligand and receptor. Int J Hematol

1995;62:63-73.

21. 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;26:1140-1147.
22. Bruno E, Cooper RJ, Briddell RA, Hoffman R. Further examination of the effects of recombinant cytokines on the proliferation of human megakaryocyte progenitor cells. Blood 1991;77:2239-46.
23. Weich NS, Wang A, Fitzgerald M, Neben TY, Donaldson D, Giannotti J, et al. Recombinant human interleukin-11 directly promotes megakaryocytopoiesis in vitro. Blood 1997;90:3893-902.
24. Kiss C, Surrey S, Schreiber AD, Schwartz E, McKenzie SE. Human c-kit ligand (stem cell factor) induces platelet Fc receptor expression in megakaryocytopoiesis. Exp Hematol 1996;24:1232-1237.
25. Ayala IA, Tomer A, Kellar KL. Flow cytometric analysis of megakaryocyte-associated antigens on CD34 cells and their progeny in liquid culture. Stem Cells 1996;14:320-329.
26. Gainsford T, Nandurka H, Metcalf D, Robb L, Begley G, Alexander WS. The residual megakaryocyte and platelet production in c-Mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. Blood 2000;95:528-34.
27. Gainsford T, Roberts AW, Kimura S, Metcalf D, Dranoff G, Mulligan RC, et al. Cytokine production and function in

c-Mpl-deficient mice: no physiologic role for interleukin-3 in residual megakaryocytes and platelet production. Blood 1998;91:2745-52.

28. Norol F, Vitrat N, Cramer E, Guichard J, Burstein SA, Vainchenker W, et al. Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. Blood 1998;91:830-43.
29. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Serverino A, Bergandi D, FerrarioJ, et al. Extensive amplification and self renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. Blood 1997;89:2644-53.
30. Piacibello W, Sanavio F, Serverino A. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self renewal of repopulating cells. Blood 1999;93:3736-49.
31. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia (Pennsylvenia): W.B. Saunders Company; 1999.
32. Cramer EM, Savidge GF, Vainchenker W, Berndt MC, Pidard D, Caen JP, et al. Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. Blood 1990;75:1220-7.
33. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood 1994;84:1415-20.

34. Donner KJ, BeckerKM, Hissong BD, Ahmed SA. Comparison of multiple assays for kinetic detection of apoptosis in thymocytes exposed to dexamethasone or diethylstilbesterol. Cytometry 1999;35:80-90.

35. Kimura K, Sasano H, Shimosegawa T, Mochizuki S, Nagura H, Toyota T. Ultrastructure of cells undergoing apoptosis. Vitam Horm 2000;59:258-66.

36. Debili N, Hegyi E, Navarro S, Katz A, Mouthon MA, Breton-Gorius J, et al. In vitro effects of hematopoietic growth factors on the proliferation, endoreplication, and maturation of human megakaryocytes. Blood 1991;77:2326-38.

37. Dolzhanskiy A, Basch RS, Karpatkin S. The development of human megakaryocytes: III. Development of mature megakaryocytes from high purified committed progenitors in synthetic culture media and inhibition of thrombopoietin-induced polyploidization by interleukin-3. Blood 1997;89:426-34.

38. Lazzari L, Henschler R, Lecchi L, Rebulla P, Mertelsmann R, Sirchia G. Interleukin-6 and interleukin-11 act synergistically with thrombopoietin and stem cell factor to modulate ex vivo expansion of human CD41+ and CD61+ megakaryocytic cells. Haematologica 2000:85:25-30.

39. Law HK, Bol SJ, Palatsides M, Williams NT. Analysis of human megakaryocytic cells using dual-color immunofluorescence labeling. Cytometry 2000;41:308-15.

40. Teramura M, Kobayashi S, Oshimi K, Mizoguchi H. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. Blood

1992;79:327-31.

41. Yonemura Y, Kawakita M, Masuda T, Fujimoto K, KatoK, Takatsuki K. Synergistic effects of interleukin-3 and interleukin-11 on murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture. Exp Haematol 1992;20:1011-6.
42. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murin megakaryocyte colony growth and increase megakaryocytes ploidy in vitro. Blood 1993;82:3515-23.
43. Burstein SA, Mei RL, Henthorn J, Frese P, Turner K. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11 promote maturation of murine and human megakaryocytes in vivo. J Cell Physiol 1992;153:305-12.
44. Neben TY, Loebelenz J, Hayes L. Recombinant human interleukin-11 stimulates megakaryocytopoiesis and increases peripheral platelets in normal and splenectomized mice. Blood 1993;81:901-8.

Abstract

Morphologic and flow cytometric study of megakaryocytopoiesis during *ex vivo* expansion of human cord blood CD34 positive hematopoietic cells

Jeong-Hae Kie

Brain Korea 21 Project for Medical Science
Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Associate Professor Woo-Ick Yang)

Cord blood (CB), as an alternative source of hematopoietic stem cells (HSCs), has many advantages, that include among others ease of banking and low incidence of graft versus host disease. However, insufficient number of HSCs and delayed engraftment, especially delayed platelet recovery, are the potential limitations to the widespread use of CB for marrow replacement. Recently, cytokine-mediated *ex vivo* expansion, especially using thrombopoietin (TPO), has been evaluated to overcome these limitations. However, the findings of most of these works are based on immunophenotypic analyses lacking the ultrastructural details of the megakaryocytopoiesis during *ex vivo* expansion of CB cells. We therefore examined the ultrastructural details of the megakaryocytopoiesis by light and electron microscopy (EM) as well

as by flow cytometric analyses during *ex vivo* expansion of CB CD34+ cells that have been induced by TPO, TPO+flt3-ligand (FL), TPO+FL+stem cell factor (SCF), TPO+FL+interleukin (IL)-3, and TPO+FL+IL-11.

Our results documented that when so induced the number of viable cells increased by more than 50-fold except where the inducing agent was TPO alone. Where cultures were treated with TPO alone, CD61+CD14- megakaryocyte (MK) fraction began to appear on day 4 and achieved its maximum cellularity over the following five days before being declined from day 14 onwards. However without TPO, EM examination as well as flow cytometric analyses did not demonstrate any evidence of the differentiation of CB CD34+ cells into MKs. Apoptosis as determined by staining the cells with annexin V began to appear from day 4 before being reached its peak on day 14. When induced by SCF, apoptotic fractions involving mostly cells of non-MK lineage were increased during the early phase. However, during the late phase of SCF induction, there was a decrease in apoptosis involving cells of MK lineage that have been induced by TPO.

On light microscopic examination, definite evidence of MK differentiation could be noted from day 7. The cultures that had been induced by TPO for 14 days were sparsely cellular with macrophages admixed occasionally with intact MKs. This is by contrast when cultures were induced by a combination of any of the above-mentioned cytokines that resulted in a exuberant cellularity comprising many platelet-forming MKs as well as immature cells of

non-MK lineage on day 18.

EM examination revealed demarcation membranes and platelet territories on day 7 in the cultures that had been induced by TPO alone. The first evidence of apoptosis began to appear on day 9. While addition of SCF hastened the appearance of apoptosis in cells of non-MK lineage from day 7, it retarded apoptotic process in MKs that had been induced by TPO. Under the induction of IL-3, cellular population comprising poorly characterized immature cells appeared, the presence of which could be demonstrated until the late stage of incubation. In the cultures that had been induced by a combination of TPO, FL, and IL-11, MKs admixed with immature cells of non-MK lineage were present until day 18. However, prior to day 14, ultrastructural details of cultures were similar irrespective of whether induced by TPO alone or in combination with other cytokines listed as above.

In conclusion, although the combined effects of the above cytokines seemed to be additive on expansion of MK lineage cells from the CB HSCs, TPO was essential for megakaryocytopoiesis. When combined with TPO, SCF appeared to have the strongest inducing influence on megakaryocytopoiesis as it induced apoptosis of non-MK cells at early stage and suppressed apoptosis of MKs at later stage. While IL-11 and FL had an positive effect on the expansion of cellulrity, IL-3 seemed to have retarded megakaryocytopoiesis.

Key words: cord blood, *ex vivo* expansion, megakaryocyte, apoptosis, thrombopoietin, stem cell factor, ultrastructure.