

제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포의 다분화능

김수향* · 양익환[†] · 김현옥[‡] · 이진우*[†]

연세대학교 Brain Korea 21 의과학 사업단*, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실[†], 연세대학교 의과대학 진단검사의학과[‡]

목적: 제대혈에서 순환하는 CD34⁺ 세포가 골수에서 분리한 중간엽 줄기세포와 같은 특징을 보이는지, 골아세포, 연골세포, 지방세포로 분화가 가능한지를 증명하고자 하였다.

대상 및 방법: 제대혈에서 추출한 세포에서 Magnetic Cell Sorting system으로 CD34⁺ 세포만을 분리, 배양하였고, 유세포 분석으로 특정한 표지자들을 염색하여 특징을 관찰하였다. 중간엽 줄기세포와 같은 양상의 세포를 골아세포, 지방세포, 연골세포로 1주일 혹은 2주일간 분화시켜 골화는 von Kossa 염색과 Alkaline phosphatase 염색, 지방화는 Oil red O 염색을, 연골화는 역전사-중합효소 연쇄반응을 통하여 연골의 특정 유전자인 aggrecan, 제 1, 2, 10형 교원질의 발현을 확인하였다.

결과: 제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포의 형태는 길쭉한 모양을 띄었으며, 중간엽 줄기세포의 표지자인 CD105, CD29, CD44에 양성으로 염색이 된 것을 볼 수 있었다. 또한 1주 동안 골화시에는 석회화를 보이기 시작했으며, Alkaline phosphatase도 양성으로 염색이 되었고, 지방세포로 분화시에는 Oil Red O가 양성으로 염색되었다. 그리고 2주간 연골로 분화시에는 특정 유전자인 제 2형 교원질이나 aggrecan, 제 10형 교원질이 서서히 증가하였으며, 제 1형 교원질은 서서히 감소하였다.

결론: 중간엽 줄기세포의 유래조직이 골수 뿐 아니라, 제대혈에서도 추출이 가능하며, 제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포는 적어도 3개의 다른 조직(골, 연골, 지방)으로 분화할 수 있는 능력을 지니므로 세포 치료를 가능하게 할 수 있을 것이라 사료된다.

색인 단어: 제대혈, CD34⁺ 세포, 중간엽 줄기세포, 연골세포, 골아세포, 지방세포

Multipotentiality of CD34⁺ Cells Extracted from Human Cord Blood

Su-Hyang Kim, M.D.*, Ick Hwan Yang, M.D.[†], Hyun Ok Kim, M.D.[‡], and Jin Woo Lee, M.D.*[†]

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences*, Department Orthopaedic Surgery[†], and Department of Laboratory Medicine[‡], Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: We evaluated the differentiation potential of CD34⁺ cells expanded from human cord blood into several differentiated cells, namely, osteoblasts, chondrocytes and adipocytes.

Materials and Methods: CD34⁺ cells, extracted from cord blood and isolated using a MiniMACS system, were cultured. Cells labeled with appropriate antibodies were analyzed by FACScan. The phenotypes of adipogenic and osteogenic differentiation were evaluated by Oil Red O, alkaline phosphatase, and von Kossa staining. Chondrogenic differentiation was evaluated by RT-PCR using primers for aggrecan, collagen types I, II and X.

Results: CD34⁺ cells showed a fibroblast-like morphology and expressed CD105, CD29, and CD44 antigens. These cells showed the deposition of a mineralized matrix and the expression of alkaline phosphatase in the osteogenic medium, and stained with Oil Red O in the adipogenic medium. In terms of chondrogenic differentiation, the expressions of aggrecan, and collagen types II and X showed a gradual increase, whereas the expression of type I collagen gradually decreased.

통신저자 : 이진우

서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
TEL : 02-361-5640 · FAX : 02-363-1139
E-mail : ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

Address reprint requests to

Jin Woo Lee, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine,
134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82.2-361-5640, Fax: +82.2-363-1139
E-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

*본 연구는 과학기술부 21세기프론티어연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원(과제관리번호 SC13142)에 의해 수행되었습니다.

Conclusion: Based on their differentiation potentials in at least three different tissue types, i.e., fat, bone, and cartilage, cord blood-derived CD34⁺ cells can be visualized as attractive target cells for cellular or gene transfer therapeutic options.

Key Words: Cord blood, CD34⁺ cells, Mesenchymal stem cells, Bone, Cartilage, Fat

중간엽 줄기세포는 골아세포, 지방세포, 연골세포, 근세포, 심근세포 등으로 분화할 수 있는 다기능성 전구세포이다^{4,6,10}. 현재, 골수가 중간엽 줄기세포의 주요 근원지로 알려져 있으나, 골수에서는 중간엽 줄기세포가 나이에 따라 상당히 감소한다고 보고되고 있다¹¹. 따라서, 골수에서뿐 아니라 중간엽 줄기세포가 존재하는 다른 조직에 대한 연구가 이루어지고 있다. 최근의 연구에서 중간엽 줄기세포가 성인 말초혈액과 제대혈에서도 낮은 빈도로 존재한다고 한다^{2,7,12,14}. 제대혈에서는 주로 CD34 항원에 양성인 조혈모 전구세포가 대부분 존재한다고 알려져 있으므로 CD34 항원에 음성인 세포는 조혈모 전구세포를 제외한 세포라 간주되고 그 중, 중간엽 줄기세포도 포함되어 있을 것이라 예상된다.

따라서, 본 논문에서는 손쉽게 구할 수 있는 제대혈에서의 중간엽 줄기세포에 대한 연구를 통해 이들이 *in vitro*에서 여러 조직으로의 분화능을 가지고 있다는 것을 증명하고자 한다. 즉, 제대혈에서 순환하는 CD34 항원에 음성인 세포 중 중간엽 줄기세포를 분리하여 골수에서 분리한 중간엽 줄기세포와 같은 특징을 보이는지, 그리고 골화, 연골화, 지방세포로 분화가 가능한지를 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 제대혈 추출과 CD34⁺ 세포 배양

37-40주령 3명의 임산부에게서 제대혈액을 채취하여 원심분리 후 혈청과 세포, 적혈구의 3개 층으로 분리하였다. 그리고 Ficoll (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)로 층을 다시 분리하여 세포층만을 선택한 후, MiniMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)로써 CD34 항원(Miltenyi Biotech)에 음성인 세포를 분리하였다. 이를 간단히 설명하자면, 세포에 human IgG blocker (Miltenyi Biotech)를 첨가한 후, CD34 항원에 양성인 microbeads를 각각 첨가하여 labeling하기 위해 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응시간이 끝나기 전에 조립한 MACS Kit에 column을

장착시키고 washing buffer로 1회 세척하였다. Labeling 된 세포를 column에 통과시키게 되면, CD34⁺ 세포들은 자석과 microbead에 의해 column에 붙게 되고 나머지 CD34⁻ 세포들은 아래의 튜브로 떨어지게 된다. 따라서 CD34⁺ 세포들은 자석에서 column을 떼어내어 새로운 tube에 액체로 받아 내거나 피스톤으로 밀어내어 세포들이 압력에 의해 깨끗하게 떨어지도록 하였다. 그리고 튜브에 떨어지는 CD34⁻ 세포만을 3-4주 동안 37°C에서 6-well plate에 2×10⁶ cells/mL의 세포를 기본 배양액 (10% 우태혈청이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY))에서 배양하였다.

이와 비교되는 군으로 20-40세 성인 3명의 골수에서 Percoll (Amersham Pharmacia)로 층을 분리하여 부착시킨 중간엽 줄기세포를 3-4주 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 중간엽 줄기세포에 사용되었던 배양액은 CD34⁻ 세포와 같은 조성으로 사용하였고, 배양액은 일주일에 2번 교체하였다.

2. 제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포의 유세포 분석

제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포와 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포 모두 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 50 mM EDTA 1 mL을 첨가한 후, 세포들을 떼어내어 PBS로 부유한 다음, 1,200 rpm에서 5분 동안 세포를 침전시켰다. 침전된 세포는 5×10⁵ cells/mL의 농도로 PBS에 재부유시키고, 1차 항체(중간엽 줄기세포의 특징적인 표식자 CD105 (Ansell, Bayport, MN, USA); hyaluronic acid 수용체 CD44 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA); β1 integrin CD29 (Coulter, Miami, FL, USA); 단핵세포/대식세포 표식자 CD14; 백혈구 항원 CD45 (PharMingen, San Diego, CA, USA))를 20 μL/10⁶ cells 넣고 45분간 실온에서 반응시켰다. 대조군으로는 anti-mouse monoclonal 항체(PharMingen)를 동량의 세포에 더하여 같은 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 각각의 세포는 flow buffer

(1% paraformaldehyde, 0.1% sodium azide, and 0.5% bovine serum albumin in PBS)로 고정시킨 후, FACScan (Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA)으로 10,000번을 수집하여 분석하였다.

3. 지방세포화, 골아세포화, 연골세포로의 분화

제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포와 비교군인 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포의 골아세포, 연골세포, 지방세포로의 분화를 확인하기 위하여 각각의 배양액에서 분화시켰다. 즉, 골아세포로의 분화는 세포에 각각 골아세포 분화 배양액(10% 우태혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액, 100 nM dexamethasone (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma), 0.2 mM ascorbic acid (Sigma)를 첨가한 DMEM-LG)으로 14일 동안 단층 배양 후, von Kossa와 Alkaline Phosphatase (ALP) 염색을 통하여 분화 정도를 확인하였다. Von Kossa 염색은 배양한 세포를 증류수로 한 차례 세척하고 3% silver nitrate (Sigma) 용액을 적용하여 상온에서 빛을 차단한 채 10분 동안 반응시켰다. 증류수로 한 차례 세척하고 불빛에 15분 동안 노출시킨 후, 관찰하였고 ALP 염색은 분화시킨 중간엽 줄기세포를 citrate buffered acetone이 들어있는 고정액으로 30초간 고정시킨 후, 증류수로 45초 동안 세척하고 미리 준비해 둔 alkaline-dye mixture (Sigma)를 각 well에 적용하였다. 상온에서 빛을 차단한 채 30분 동안 반응시키고 관찰하였다. 지방세포로의 분화는 지방세포 분화 배양액(10% 우태혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액, 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma), 1 μ M dexamethasone, 10 μ M insulin (Gibco), 200 μ M indomethacin (Sigma)을 첨가한 DMEM-LG)으로 14일 동안 단층 배양을 하여 Oil Red O 염색을 하여

분화정도를 확인하였다. Oil Red O 염색은 배양한 세포를 한 차례 증류수로 세척하고 1% Oil Red O (Sigma) 용액을 적용하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응시킨 세포를 2분 동안 증류수로 세척한 후 관찰하였다. 연골세포를 확인하기 위하여 2.4% alginic acid (Sigma)와 세포 부유액을 1:1로 혼합한 후, 102 mM CaCl₂에 19 gauge 주사침으로 한 방울씩 떨어뜨려 고형화 한 후, 6-well plate에서 분화시켰다. 즉, 한 well당 약 20개의 bead를 만든 후, 0.15 M NaCl 용액으로 2번, 혈청이 없는 DMEM-HG (Gibco)로 1번 세척한 후, 연골세포 분화 배양액인 30 μ g/mL ascorbic acid, 100 nM dexamethasone, 10 ng/mL TGF β ₃ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1X Insulin-Transferin-Serenite (ITS; Gibco)가 첨가된 DMEM-HG에서 14일간 배양하였다.

연골세포로의 분화 정도를 확인하기 위하여 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통하여 연골세포 특이 유전자의 변화와 시간 경과에 따른 표현의 변화를 측정하였다. 우선 각 세포들의 total RNA를 분리하기 위하여 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하였고, 분광광도계를 사용하여 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정한 후, 유출액 내의 total RNA를 정량하였다. 각각의 total RNA 1 μ g을 Omniscript kit (Qiagen)의 정해진 용액과 혼합하고, 최종 부피가 20 μ L가 되도록 증류수를 더한 다음 36°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. Gen-Bank를 이용하여 aggrecan, 제 I, II, X형 교원질, GAPDH의 염기서열을 파악한 후 primer를 작성 (Table 1)하였고, GAPDH의 표현 정도로 각각의 유전자 표현을 정량화하여 비교 분석하였다. 각각의 PCR은 denaturation은 95°C에서 5분 동안, anealing cycle은 94°C

Table 1. Oligonucleotide primers for PCR amplification and transcript size

Primer	Sequences	length	anealing temp. (°C)	cycle	Predicted size
Aggrecan	5'-GAATCTAGCAGTGAGACGTC-3'	20	40	30	540
	5'-CTGCAGCAGTTGATTCTGAT-3'	20			
Collagen type I	5'-TCCGACCTCTCTCCTGAA-3'	20	55	30	295
	5'-GAGTGGGGTTATGGAGGGAT-3'	20			
Collagen type II	5'-TCCGACCTCTCTCCTGAA-3'	20	50	40	368
	5'-GAGTGGGGTTATGGAGGGAT-3'	20			
Collagen type X	5'-GCCCAAGAGGTGCCCTGGAATAC-3'	24	60	30	703
	5'-CCTGAGAAAAGAGGAGTGGACATAC-3'	24			

30초, 각 anealing 온도에서 30초, 72°C에서 30초간 각 primer의 적정 cycle 수에 맞추어 실험한 후, polymerization은 72°C에서 7분 동안 반응하여 결과를 관찰하였다.

결 과

1. 제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포의 일차 배양

MiniMACS로 분리한 CD34⁺ 세포($1.2 \times 1.5 \times 10^7$ cells/mL)를 6-well plate에 각각 2×10^6 cells/mL 씩 분주하여 배양하면, 일주일 후 바닥에 붙기 시작하

고, 6-well plate 중 2 well에서 섬유모 세포와 유사한 길쭉한 형태의 세포가 관찰되기 시작하였다. 나머지 4 well에서는 단핵 세포와 유사한 둥근 형태나 파골 세포와 유사한 다핵 세포의 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이와 비교를 하기 위해 골수로부터 추출한 중간엽 줄기세포의 형태를 관찰한 결과, 섬유모 세포와 유사한 길쭉한 형태의 세포를 관찰할 수 있었다.

2. 제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포의 유세포 분석

제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포 중 섬유모 세포와 유

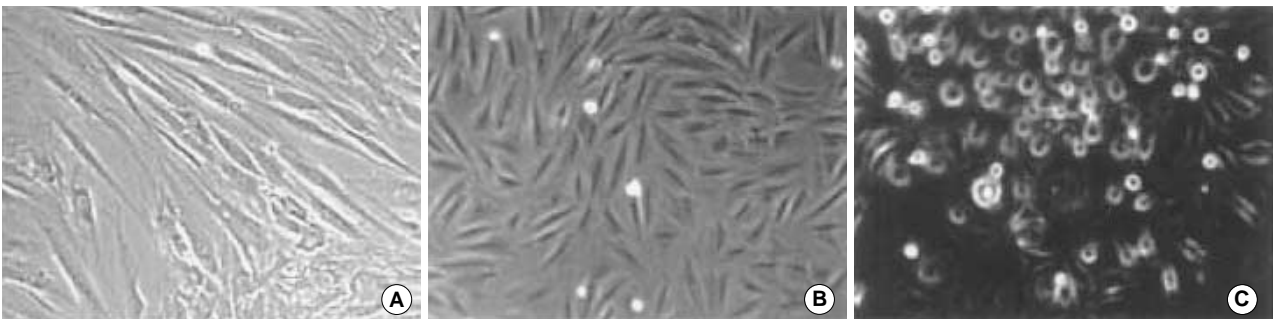


Fig. 1. Morphology of CD34⁺ cells derived from cord blood and mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow, (A) MSCs from bone marrow, (B) MSC-like CD34⁺ cells from human cord blood, (C) multinuclear CD34⁺ cells from human cord blood. (Phase contrast: magnification $\times 200$).

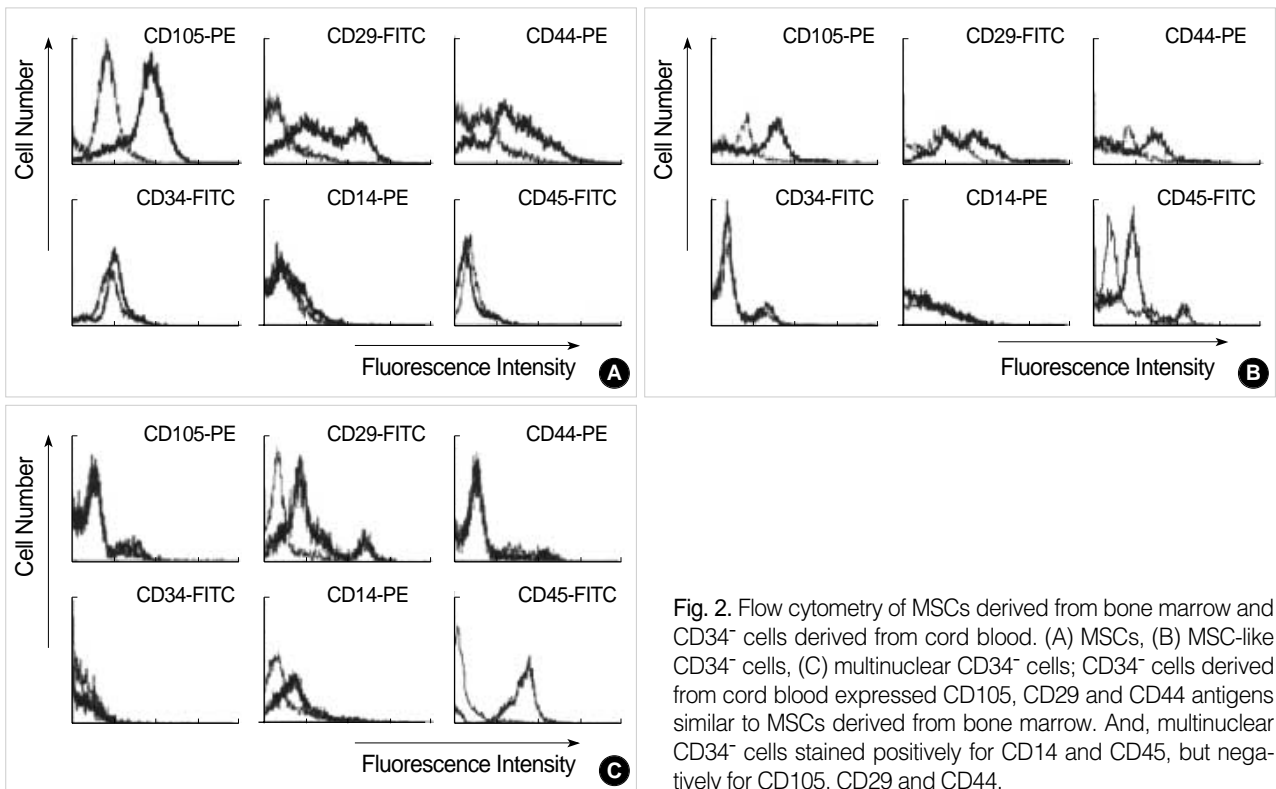


Fig. 2. Flow cytometry of MSCs derived from bone marrow and CD34⁺ cells derived from cord blood. (A) MSCs, (B) MSC-like CD34⁺ cells, (C) multinuclear CD34⁺ cells; CD34⁺ cells derived from cord blood expressed CD105, CD29 and CD44 antigens similar to MSCs derived from bone marrow. And, multinuclear CD34⁺ cells stained positively for CD14 and CD45, but negatively for CD105, CD29 and CD44.

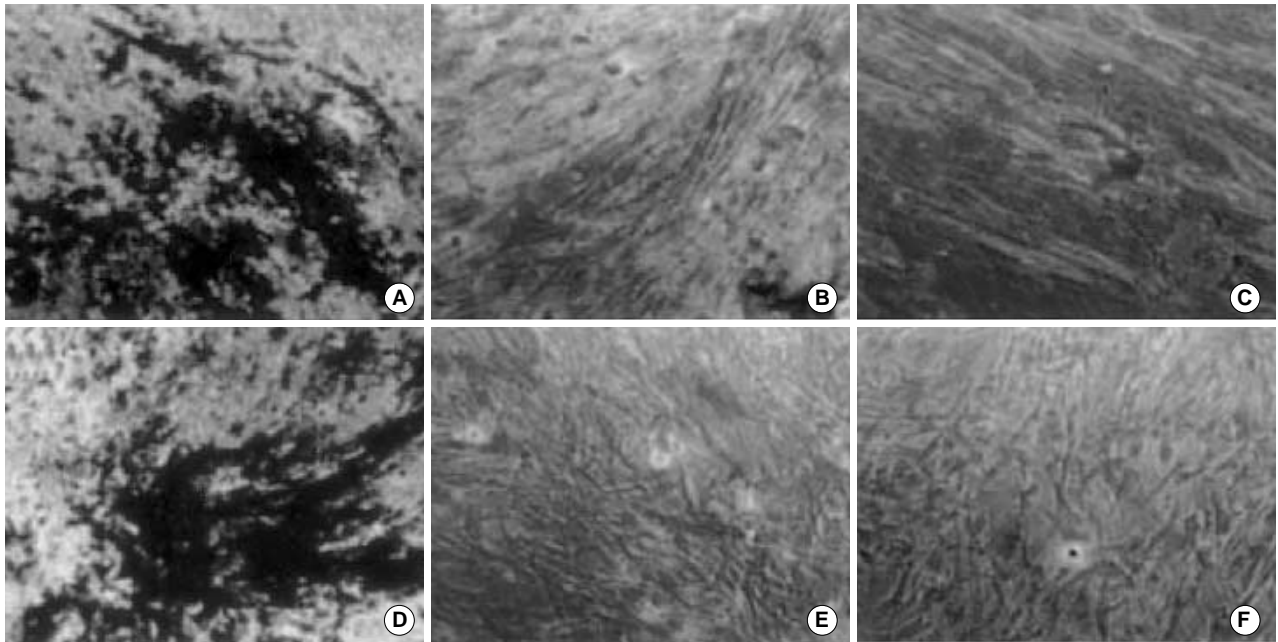


Fig. 3. Analysis of differentiated MSCs (A-C) and MSC-like CD34⁺ cells (D-F). Results of von Kossa staining (A, D), alkaline phosphatase staining (B, E), and Oil Red O staining (C, F) in cell cultures grown in osteogenic or adipogenic medium for 1 week, respectively. (Phase contrast: magnification × 200).

사한 세포의 유세포 분석 결과, 중간엽 줄기세포의 표지자로 널리 알려진 CD105, CD29, CD44에 최소 57% 이상에서 염색이 되었고, 백혈구의 표지자인 CD45에서는 20.9% 염색이 되었고, 중간엽 줄기세포의 음성 표지자로 알려진 CD14에서는 평균 5% 미만이 염색이 되었다(Fig. 2, Table 2). 이와 달리, 다핵세포의 유세포 분석 결과는 단핵세포의 표지자인 CD14에 30% 이상이 염색되었고, CD29에는 20.6%, 백혈구의 표지자(CD45)에는 약 87% 정도로 염색이 된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 중간엽 줄기세포의 표지자로 알려진 CD105나 hyaluronic acid 수용체인 CD44에서는 음성으로 관찰되었다.

골수로부터 추출한 중간엽 줄기세포의 유세포 분석 결과는 CD105, CD44, CD29에서는 최소 57% 이상에서 염색이 되었고, 음성 표지자로 알려진 CD34, CD45, CD14에서는 평균 10% 미만이 염색된 것을 관찰할 수 있었다.

3. 지방세포화, 골아세포화, 연골세포로의 분화

제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포 중 중간엽 줄기세포와 유사한 세포만을 선택하여 이들을 증식시킨 후 골아세포, 지방세포, 연골세포의 분화능을 확인하였다. 이중

Table 2. Characterization of MSCs derived from bone marrow and MSC-like CD34⁺ cells and multinuclear CD34⁺ cells derived from cord blood

Origin Ab	Bone marrow		Cord blood
	MSCs	MSC-like CD34 ⁺ cells	Multinuclear CD34 ⁺ cells
CD14	4.3%	0.72%	31.5%
CD29	90.9%	57.4%	20.6%
CD34	8.46%	-	-
CD44	57.1%	84.8%	0.2%
CD45	0.3%	20.9%	86.7%
CD105	88%	85.2%	0.8%

골아세포로의 확인은 ALP 염색, von Kossa 염색을 하였더니, 1주 후 ALP에는 양성으로 염색이 되었고, 또한 석회화 기질을 관찰할 수 있었다. 또한 지방세포로의 분화능을 관찰하기 위하여 Oil Red O 염색을 한 결과, 1주 후 지방세포로 분화된 세포는 양성으로 염색되었다. 대조군인 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포는 골세포로의 분화나 지방세포로의 분화에서 모두 양성으로 염색이 된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한 기본 배양액을 넣고 배양시킨 CD34⁺ 세포와 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포는 모두 이와 대조되게 음성으로 염색이 된 것을 관찰할 수 있었다.

14일간 CD34⁺ 세포를 연골세포로 alginate bead를

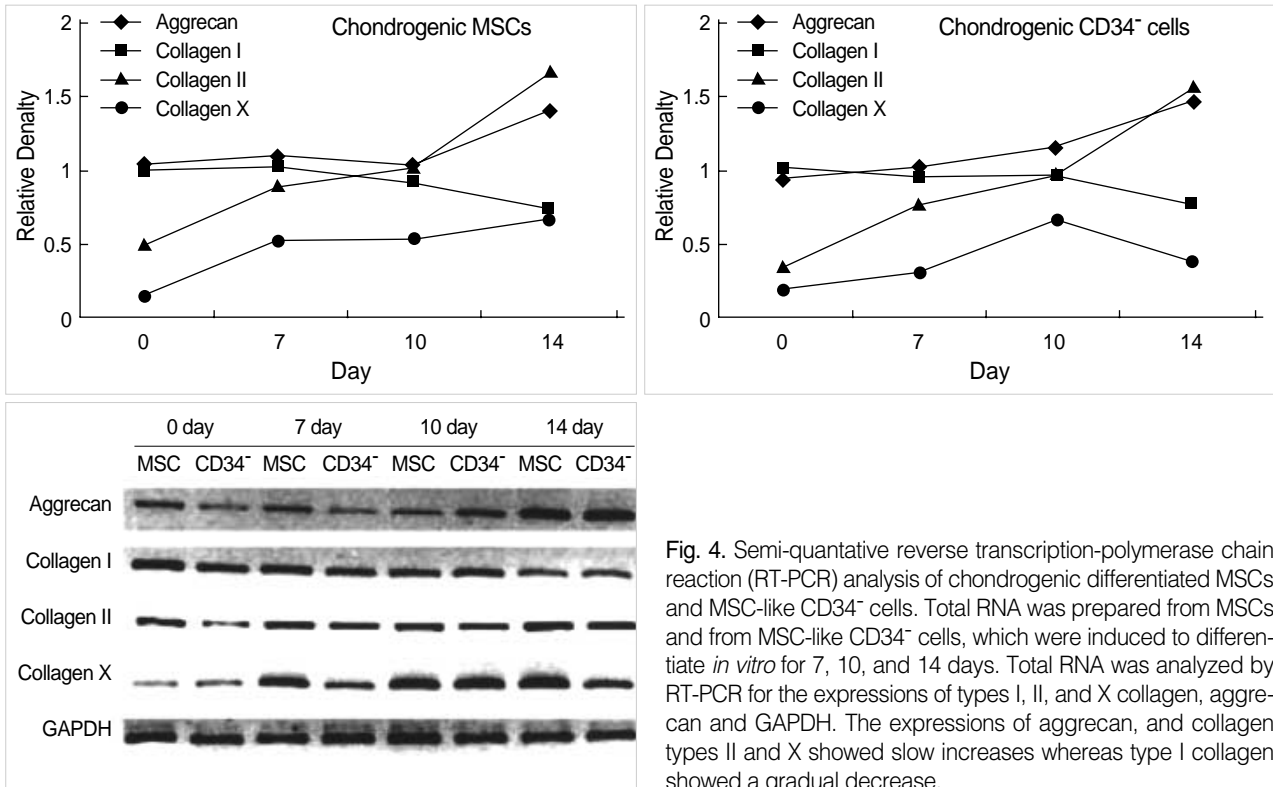


Fig. 4. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of chondrogenic differentiated MSCs and MSC-like CD34⁻ cells. Total RNA was prepared from MSCs and from MSC-like CD34⁻ cells, which were induced to differentiate *in vitro* for 7, 10, and 14 days. Total RNA was analyzed by RT-PCR for the expressions of types I, II, and X collagen, aggrecan and GAPDH. The expressions of aggrecan, and collagen types II and X showed slow increases whereas type I collagen showed a gradual decrease.

이용하여 3차원 배양하여 분화시킨 후, 연골세포 특이 유전자의 변화를 시간별로 관찰한 결과, 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화와 표현의 양상이 유사하였다(Fig. 4). 즉, 제대혈에서 추출한 CD34⁻ 세포와 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포 모두 제 1형 교원질의 mRNA는 시간이 지남에 따라 같은 양상으로서 서서히 감소하거나 유지하는 경향을 보였고 aggrecan, 제 2형 교원질의 mRNA는 시간에 따라 모두 서서히 증가하는 경향을 보였다. 그러나, 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포에서 제 10형 교원질의 mRNA는 시간에 따라 모두 서서히 증가하였으나, 제대혈에서 추출한 CD34⁻ 세포의 제 10형 교원질의 mRNA는 10일까지 서서히 증가하다 14일째 약간 감소하는 경향을 보였다.

고찰

본 연구는 제대혈에서 추출한 CD34⁻ 세포의 특성과 함께, 이들의 분화능을 연구하였다. 그 결과, 제대혈에서 추출한 CD34⁻ 세포 중 약 1/3은 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포와 같은 형태와 특성을 지니는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 형태는 Fig. 1과 같이 길쭉한 모양으로 비슷했으며, 특성은 중간엽 줄기세포의 표지자인 CD105,

hyaluronic acid 수용체인 CD44, integrin β 1의 항원인 CD29 등에 두 세포 모두 양성으로 그리고, 단핵세포의 표지자인 CD14에서는 음성으로 나타났다. 이는 Erices 등²⁾의 연구와 유사한데, 제대혈에서 채집한 세포 중 바닥에 붙은 세포의 약 75%가 파골세포와 유사한 다핵 세포로 백혈구의 표지자인 CD45와 CD51/61에 양성으로 염색이 되었다고 하며, 25% 정도의 세포는 섬유모세포와 비슷한 양상의 자기갱신 능력이 있는 세포 즉, 중간엽 줄기세포와 유사한 형태로 배양된다고 하였다. 본 실험에서는 제대혈에서 CD34 음성반응을 나타낸 세포만을 모집하여 계대 배양하였더니 위의 논문과 유사하게 30%의 중간엽 줄기세포와 유사한 세포가 관찰되었다. 그러나 유세포 분석 결과 이 세포들에서 백혈구의 표지자인 CD45가 20%로 염색이 되는 것으로 보아서, 이들이 단일 세포군만은 아닌 것으로 판단이 되긴 하지만, 이후 이들이 골아세포, 연골세포, 지방세포로 분화 능력이 있는 것으로 보아서는 백혈구의 표식을 띤 세포들은 시간이 지나면서 거의 사멸되었을 것이라고 사료된다. 또한 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포에서의 골화, 연골화, 지방화에 대한 RT-PCR 등의 논문³⁾을 토대로 CD34⁻ 세포들의 골아세포, 지방세포, 연골세포 등으로

의 분화능을 살펴보면 이와 유사하게 1, 2주 만에 양성을 나타냄으로써 적어도 이 세포 역시 3가지 이상의 분화능을 가질 것이라 사료되며 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포와 같은 특징을 가지는 것을 관찰할 수 있었다.

태반 및 제대혈은 출산직후 태반과 제대의 정맥에 남아있던 태아의 순환혈액의 일부이다. 따라서 제대혈은 태아와 산모에 영향을 끼치지 않고, 탄생의 순간에 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 제대혈을 이용한 최초의 이식은 1988년 Fanconi 빈혈증을 앓고 있는 6세 남아에게 HLA-적합한 형제로부터 신선하게 채혈한 제대혈을 이용하여 시행되었으며, 성공적인 장기간 착상을 이루었다^{3,11)}. 이후 착상 및 HLA 적합성 및 생존율을 분석하여 혈연관계가 없더라도 착상은 혈연관계가 있는 공여자와 비슷한 수치를 보였고, 무질환 생존율 또한 혈연 관계보다 환자의 질환 상태에 따라서 많은 영향을 받는 것으로 나타났다⁵⁾. 따라서 골수와 말초 혈액 조혈세포에 비해 제대혈은 성장능과 자기 재생 능력이 더 높은 조혈모세포와 조혈세포를 함유하고 있다고 보고되고 있다¹⁾. 제대혈의 성분은 말초 혈액과 유사하여 사용되는 항응고제의 부피에 따라 희석 정도가 차이가 나지만 기본적으로 다량의 적혈구, 백혈구 및 혈소판으로 구성되어 있다. 채집한 제대혈 내 조혈세포의 함량은 전체 유핵 세포의 수에 대한 군집 형성단위 또는 CD34⁺ 세포(조혈모전구 세포)의 수로 정량된다. 이러한 골수와 말초혈액에 비해 제대혈의 조혈모 세포가 여러 가지 기능 분석에 있어서 상당히 높은 분열 잠재능력을 보유함이 밝혀져 있다^{8,9)}. 또한 임신기간에 따라 제대혈에서 보유하는 중간엽 줄기세포의 정도가 다르다는 연구²⁾도 있다. 즉, 32-36주령의 경우에는 전체 부착 세포 중 75%가 중간엽 줄기세포와 유사한 형태를 띠나, 37주 41주령에서는 10%로 중간엽 줄기세포의 수가 확연히 줄어든다고 하였다. 하지만 본 연구에서는 이른 32-36주령에서의 제대혈을 구할 수가 없었으므로 이들의 비교는 불가능하였으며, 좀 더 이른 임신기간에서의 제대혈에서는 본 연구에서 보다 많은 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있으리라 예상할 수 있었다. 본 연구에서는 이러한 제대혈의 세포들이 중간엽 줄기세포를 다량 보유하고 있을 것이라는 가정에 실험을 진행하였다^{2,6)}. 따라서 중간엽 줄기세포의 근원지가 골수 뿐 아니라 다른 근원지에서도 충분히 획득이 가능하다는 것을 관찰하였다. 특히 조혈모세포를 제

외한 나머지 세포 내에서의 중간엽 줄기세포와 같은 세포를 선택을 함으로써, 이들의 범위를 조금 더 좁혀갈 수 있었던 것이다.

또한 본 연구에서는 1주 정도의 기간에 분화된 골아 세포의 형태와 지방 세포의 형태, 2주 정도의 기간에 분화된 연골 세포의 특이 유전자들을 관찰할 수 있었으며, 좀 더 오랜 시간의 관찰을 통해 이들을 확인하는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 제대혈은 주령에 따라 다분화능에 차이가 있고, 또한 세포수가 제한되어 있으므로 대량 증폭 방법의 개발이 필요하다. 따라서 이에 대한 다각적인 연구가 요구되고 있다.

결론

중간엽 줄기세포의 유래조직이 골수 뿐 아니라, 제대혈에서도 추출이 가능하며, 이러한 제대혈에서 추출한 CD34⁺ 세포는 적어도 3개의 다른 조직(골, 연골, 지방)으로 분화할 수 있는 능력을 지녀 세포 치료를 가능하게 할 수 있을 것이라 사료된다. 또한 CD34⁺ 세포를 이용한 조직 복원의 한계는 세포의 수가 상대적으로 적기 때문으로 이를 대량 증식하여 다기능적인 세포로 분화를 유도하는 방법을 개발하여야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 3828-3832, 1989.
2. Erices A, Conget P and Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British J Haematology*, 109: 235-242, 2000.
3. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 321: 1174-1178, 1989.
4. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR and Pittenger MF: Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biological Chemistry*, 275: 9645-9652, 2000.
5. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, et al: Factors associated with

- outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. *Blood*, 93: 3662-3671, 1999.
6. **Majumdar MK, Banks V, Peluso DP and Morris EA:** Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cellular Physiology*, 185: 98-106, 2000.
 7. **Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E and Fagioli F:** Isolation of human mesenchymal stem cells. Bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*, 86: 1099-1100, 2001.
 8. **Mayani H, Gutierrez-Rodriguez M, Espinoza L, et al:** Kinetics of hematopoiesis in dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem cells*, 16: 127-135, 1998.
 9. **Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al:** Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, 30: 870-878, 2002.
 10. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
 11. **Rao MS and Mattson MP:** Stem cells and aging. expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*, 122: 713-724, 2001.
 12. **Romanov YA, Svintsitskaya VA and Smirnov VN:** Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 21: 105-110, 2003.
 13. **Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL and Khosla S:** Changes in *Runx2/Cbfa1* expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 18: 213-221, 2003.
 14. **Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B and Hows JM:** Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Hematol*, 121: 368-374, 2003.