

종양혈관생성에서  
내피전구세포의 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

안    중    배

# 중앙혈관생성에서 내피전구세포의 역할

지도 정 현 철 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

안 중 배

# 안중배의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

## 감사의 글

박사과정에 들어온 지 5년만에 논문을 제출하게 되었습니다. 2년동안의 실험을 계획하고 진행하는 동안 참으로 많은 것을 느끼고 배웠습니다. 많은 분들로부터 영원히 잊지 못할 도움을 받았으며 이는 실험결과보다 더욱 소중한 것이 되었습니다. 여러 번의 시행착오를 겪고 논문을 무사히 완성할 수 있도록 세심하게 지도해주신 정현철 교수님께 진심으로 감사드립니다. 노재경 교수님을 비롯한 혈액종양내과의 여러 교수님들의 따뜻한 관심에도 감사의 말씀드립니다. 실험과정에서 어려움이 생길 때마다 실험을 무사히 진행할 수 있도록 도와주신 김태수, 박규현 선생님 및 암연구실의 여러 연구원들께도 이 자리를 빌어 감사의 마음을 드립니다. 내피전구세포라는 최신의 분야의 실험을 진행하는 있어서 연구방향과 문제점에 대해 조언해 주신 노성훈 교수님, 이광훈 교수님과 신동환 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 개원초의 어려운 근무환경에서도 실험에 많은 시간을 할애해 준 일산병원 내과 선생님들에게도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

항상 바쁜 저를 이해해주시고 사랑으로 이끌어 주시는 부모님, 가장 소중한 보배 시연, 지영이 그리고 항상 저의 곁에서 끊임없이 내조를 아끼지 않는 사랑하는 아내 심정연에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	5
1. CD34 양성 말초단핵구의 분리 및 생체외 배양 .....	5
2. 내피세포의 생물학적 특성 평가 .....	5
가. LDL 섭취능 측정 .....	5
나. 내피세포 표지자 측정 .....	6
다. 맥관 형성능 측정 .....	6
라. 내피세포 관련 유전자 발현 정도 측정 .....	6
3. 내피전구세포의 줄기세포적 특성 평가 .....	7
가. Telomerase 활성도 측정 .....	7
4. 유전자 형질도입과 생체내 분포 .....	7
가. GFP 유전자 형질도입 내피세포의 생성 .....	7
나. 생체내 투여된 전구세포의 체내 분포 .....	8
III. 결 과 .....	8
1. CD34 양성 말초단핵구의 분리 및 생체외 배양 .....	8
2. 내피세포의 생물학적 특성 .....	9
가. LDL 섭취능 .....	9
나. 내피세포 표면 표지자 .....	11
다. 맥관 형성능 .....	11
라. 내피세포 특징적 mRNA 발현 정도 .....	11

3. CD34 음성 말초단핵구에서 내피세포의 분화 .....	13
4. 내피전구세포의 줄기세포적 특성 .....	14
가. Telomerase 활성도 .....	14
5. 종양조직으로 내피전구세포의 분포 .....	14
IV. 고    찰 .....	15
V. 결    론 .....	20
참고문헌 .....	21
영문요약 .....	24

## 그림 차례

<b>Fig. 1.</b> Differentiation of CD34 positive PBMC to endothelial cells .....	9
<b>Fig. 2.</b> Uptake of LDL in cells derived from CD34 positive PBMC .....	10
<b>Fig. 3.</b> Endothelial cell surface markers in cells derived from CD34 positive PBMC .....	11
<b>Fig. 4.</b> Tube formation in cells derived from CD34 positive PBMC .....	12
<b>Fig. 5.</b> Endothelial cell related gene expression by realtime PCR .....	12
<b>Fig. 6.</b> Uptake of LDL in cells derived from CD34 negative PBMC .....	13
<b>Fig. 7.</b> Telomerase activity in cells with endothelial cell morphology .....	14
<b>Fig. 8.</b> Incorporation of GFP transfected cells into tumor tissue .....	15

## 표 차례

<b>Table 1.</b> Cell surface markers of PBMC in cancer patients during chemotherapy treated with G-CSF .....	8
<b>Table 2.</b> Expression pattern of endothelial cell related genes in CD34 positive derived cells .....	13

## 종양혈관생성에서 내피전구세포의 역할

기존의 항암약물들은 주로 증식이 빠른 세포를 표적으로 개발되어 왔다. 하지만 정상적으로 빠른 성장을 보이는 조직에 많은 독성을 나타내게 되며 그 효과에도 한계를 보이게 되었다. 종양의 혈관형성에는 angiogenesis뿐만 아니라 내피전구세포에 의한 vasculogenesis도 중요한 역할을 담당함이 제시되었다. 따라서 암 조직 내에서 활발하게 증식하고 있는 종양 내피세포에만 특이하게 억제시킬 경우 암 치료효과는 향상될 것이다. 내피전구세포는 골수에서 유래하며, CD34 양성 단핵구에 존재함이 알려졌다. 내피전구세포의 혈관생성부위로 이동하는 특성을 종양 특이 매개체로 이용하고자 본 연구를 계획하게 되었다.

본 연구에서는 항암약물치료를 시행하는 환자에게 과립구 성장 촉진인자(G-CSF)를 처치하여 백혈구수 증가시켜 말초 혈액에서 CD34 양성 단핵구를 분리 후, basic fibroblast growth factor (bFGF)와 vascular endothelial growth factor (VEGF) 성장인자를 이용한 생체의 배양을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CD34 양성 단핵구는 생체의 배양 28일경에 cobblestone 형태를 나타내 내피세포의 형태로 분화됨이 확인되었다. 이들 세포는 LDL 섭취반응이 양성으로 나타나 내피세포의 기능을 가지고 있음이 확인되었다.
2. CD34 양성 단핵구에서 분화된 세포는 matrigel 배양에서 18~24시간 경과 후 맥관 형성이 확인되어 이들세포가 신혈관생성에 관여할 수 있음이 확인되었다.
3. CD34 양성 단핵구를 5주 이상 장기간 배양시 분화된 내피세포의 특이적 표지자인 CD31과 P1H12가 발현됨을 확인하였다.
4. Realtime PCR을 이용하여 내피세포 연관 유전자 발현 정도를 측정한 결과, IGFBP4, vWF, CTGF, COL6A1, COL18A1, MCAM (Muc 18), VEGFR3/Flt4, CD34, CD105/endoglin, eNOS 발현이 확인되었다.
5. CD34 음성이면서 표면 부착성 증식형태를 유지하는 단핵구에서도 같은 성장인자를 이용하여 배양시 일부에서 내피세포의 형태를 관찰할 수 있었다. CD34 음성 단핵구에서 내피세포 형태로 분화된 세포들도 LDL 섭취반응이 양성으로 나타나 내피세포로 분화되고 있음을 확인할 수 있었다.
6. CD34 양성 단핵구에서 내피세포형태로 분화된 세포들은 telomerase 활성이 관찰되어 이들 세포가 순환 성체 세포가 아닌 전구세포 이전 단계임을 제시하였다.
7. 마우스에 인체종양을 형성한 동물실험에서 인체의 CD34 양성 말초단핵구에서 유도된 내피전구세포가 혈관을 통한 주입시에 종양조직으로 이동하여 2주 이상 생존하고 있음이



확인되어 종양의 혈관생성과정에 관여함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 말초 혈액에는 내피전구세포가 존재함을 확인할 수 있으며 이들 세포는 CD34 양성 단핵구에서만 아니라 CD34 음성 단핵구에서도 내피세포로 분화됨이 밝혀졌다. 암환자에서 이들 세포를 분리한 후 생체외 증폭, 배양할 경우 이들 세포를 약제 및 치료유전자의 자가 매개체로 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말: 내피전구세포, CD34, 표적치료, angiogenesis, vasculogenesis

## 종양혈관생성에서 내피전구세포의 역할

<지도 정 현 철 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

안 중 배

### I. 서 론

고형 종양이 생존하고 성장하기 위하여서는 산소와 영양분의 공급이 필수적으로, 종양의 진행과정에서 종양 혈관의 생성이 종양 성장의 중요한 과정임이 알려졌다. 생후 혈관신생은 전적으로 angiogenesis에, 즉 기존의 혈관에서 유도된 충분히 분화된 내피세포의 성장, 이동 및 재형성, 의존하는 것으로 생각되어 왔다.<sup>1</sup> 이러한 angiogenesis는 생리적인 반응으로 조기 배아 발달단계, 황체의 생성과 착상 치유의 과정에서 정상적으로 나타난다. Vasculogenesis는 이와는 대비되는 개념으로 내피전구세포 또는 angioblast로부터 배아 혈관의 형성되는 것을 의미한다.<sup>2</sup>

배아 난황낭(embryonic yolk sac)에서, 혈관생성은 혈액섬(blood island)의 성장과 융합과정으로 이루어지며 궁극에는 난황낭 모세혈관 망을 형성하고,<sup>3</sup> 혈액 순환이 시작된 이후에, 모세혈관 망은 동정맥 혈관 체계로 분화한다.<sup>2</sup> 혈액 세포와 혈관 내피세포의 밀접한 관계는 배아 혈액섬의 조성에서 유추해 볼 수 있다. 혈액 세포로 분화할 조혈간세포는 혈액섬의 중앙에 위치하고 있으며, 내피전구세포는 혈액섬의 말초에 위치하고 있다. 공간적 연관 외에도, 조혈간세포와 내피전구세포는 CD34 등의 세포 표면 항원을 공유한다. 이 전구세포들은 hemangioblast라고 알려진 공통된 전구세포에서 유래하는 것으로 생각되고 있다.<sup>4,5</sup>

최근 CD34 표지자가 양성인 내피전구세포가 사람의 말초 혈액에서 분리되었으며, 이들을 fibronectin으로 코팅된 용기에 부착시켜 생체외 배양 시에 내피세포로 분화하는 것이 관찰되었다. 또한 인위적으로 하지 허혈을 유발한 동물실험에서 이종, 동종 및 자가 내피전구세포가 혈관생성이 활발히 이루어지고 있는 하지 병변으로 이동함이 관찰되어, 출생후 신혈관생성에는 내피전구세포에 의한 혈관생성도 중요한 역할을 담당함이 제시되었다.<sup>6</sup> 이러한 내피전구세포는 사람 외에도 마우스, 토끼 및 개에서도 분리되었으며,<sup>7-9</sup> 순환 내피전구세포의 수가 허혈이 유발된 내적인 자극이나 GM-CSF 등의 cytokine을 전

처치한 경우에 더욱 증가됨이 관찰되었다.<sup>10,11</sup> 실제로 급성 심근 경색증 환자에서 내피전구세포가 경색 발생시보다 7일 후에 대조군과 비교하여 증가됨이 관찰되었다.<sup>12</sup> 내피전구세포의 기원을 알아보기 위하여, 전사적으로 내피세포에만 존재하는 promoter로 조절되는  $\beta$ -galactosidase를 표현하는 형질전환 마우스(Flk-1/lacZ mouse, Tie-2/lacZ mouse)로부터 누누 마우스에 골수 이식을 시행한 동물 실험을 통하여 내피전구세포가 골수에서 유래함을 알게 되었다.<sup>10,11,13</sup> 허혈로 유발된 혈관신생에서 순환 내피전구세포의 역할에 관한 연구는 많이 시도되었으나, 종양 혈관신생에서 순환 내피전구세포의 역할은 잘 알려지지 않았다. 최근에 유전적으로 표지된 골수를 이식한 마우스 종양 모델을 이용하여, 내피전구세포가 종양 혈관신생 부위에 침착됨이 밝혀졌다.<sup>13</sup>

조혈간세포의 세포 표면 항원으로 CD34 양성임이 알려진데 반해, hemangioblast의 양성 표지자에 대해서는 잘 알려지지 않았다. 사람 조혈 조직에서 CD34 양성 세포의 0.1~0.5%에서 VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 or KDR)이 양성으로 나오는데, hemangioblast은 CD34 양성 KDR 양성인 세포군에 제한되어 있으며 조혈간세포는 CD34 양성 KDR 음성 세포에 포함되어 있음이 밝혀졌다. CD34 양성 KDR 양성 골수세포중 hemangioblast는 마우스 이식 모델시 20%를 차지하며, 12주 장기 생체의 배양법을 이용하면 골수, 말초혈액 및 제대혈의 CD34 양성 KDR 양성 세포 중 25~42%를 차지한다. CD34 양성 KDR 양성 세포 중 hemangioblast가 차지하는 비율은 VEGF를 투여하는 경우 63%까지 증가되며, 성장 인자 결핍에 내성을 나타내는 세포군에서는 95%까지 상승한다. 이러한 자료에 근거하여 KDR이 조혈간세포와 hemangioblast를 구별할 수 있는 표지자로 제시되었다.<sup>14</sup>

이상의 연구로 말초 혈관내 CD34 양성 단핵구에서 내피세포로 분화가 가능성이 밝혀졌으나 CD34 표지자가 내피전구세포를 특징화 할 수 있는 표지자를 의미하는 것은 아니다. 마우스를 이용한 동물 실험으로 성체에서 유래하는 내피전구세포가 혈관 재생에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려졌는데, 스폰지 이식에 대해 형성되는 신혈관생성의 약 10%가 내피전구세포에서 유래됨이 보고되었다.<sup>15</sup> 말초 혈액 중 CD34 양성 세포 비율이 0.1~0.5% 정도에 불과함을 고려할 때, 신혈관생성의 10%에는 이들 CD34 양성 세포 외에 다른 세포도 참여하고 있음을 제시하게 된다. CD14 양성, CD34 음성 세포가 내피세포와 단핵구의 성상을 나타내는 내피양 세포로 분화되는 것이 확인되었으며,<sup>16</sup> CD14 양성, CD34 음성 세포가 마우스의 내피세포로 이동되는 것이 보고되어,<sup>17</sup> CD34 음성 세포에서도 내피세포로 분화될 수 있음이 밝혀졌다.

내피전구세포가 종양혈관이 발생하는 부위에 선택적으로 모이는 작용을 이용하여 내피전구세포와 항암약물 또는 항전이약물을 연결하여 치료약제가 종양혈관생성이 일어나고 있는 부위에만 고농도로 전달하는 방법을 새로운 암치료의 한 방법으로 제시할 수 있으며 또한 유전자치료의 자가 매개체로 내피전구세포를 이용하는 전략도 유용할 것이다. 현재

까지 밝혀진 내피전구세포의 특성 중 특히, 신혈관생성이 일어나는 부위로 내피전구세포가 이동하는 과정을 종양 특이 매개체로 이용하고자 본 연구를 계획하게 되었다.

본 연구에서는 CD34 양성 및 음성 세포에서 내피전구세포를 분리하는 방법 및 생체의 배양기술을 확보하고자 하였으며 누누 마우스 모델에서 GFP유전자가 형질 도입된 내피전구세포의 생체내 분포와 종양부위로의 집중도를 알아보하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. CD34 양성 말초단핵구의 분리 및 생체의 배양

항암약물 치료를 받는 환자에 과립구 성장 촉진인자(G-CSF)를 처치 후 백혈구수가  $20,000/\text{mm}^3$  이상이 되는 경우, 환자로부터 신선한 혈액을 항응고제(heparin)가 처리된 tube에 담아 말초혈액 단핵구를 분리하였다. 분리된 혈액의 용적과 동일한 용적의 Ficoll paque (1.077 density)이 들어 있는 15 ml tube에 Ficoll paque과 섞이지 않게 위층에 조심스럽게 넣고 500 g에서 25분간 원침시켜 단핵구층을 조심스럽게 분리하여 담고 담겨진 단핵구를 5% bovine serum albumin (BSA)이 포함된 phosphate bicarbonate saline (PBS)으로 2회 세척하였다. 세척된 단핵구를 hemocytometer를 사용하여 세포 수를 측정하여 총 세포 수  $10^8$  당 Direct CD34 progenitor cell isolation kit (MACS, Miltenyi Biotec, Germany)의 FcR blocking reagent 100 $\mu\text{l}$ 와 동일 volumes의 anti-human CD34 antibody 100 $\mu\text{l}$ 를 넣어 총 용적이 300 $\mu\text{l}$  되게 하여 6~12°C (냉장고 냉장실)에서 30분 동안 반응시켰다. 반응된 것을 PBS로 2회 세척 후 2.5 ml의 PBS로 부유시킨 후 LS+/VS+ column (MACS, Miltenyi Biotec, Germany)을 이용하여 MACS separator로 분리하여 배양하였다. 이때 사용된 배지는 EBM-2 (Clonetics, Bio Whittaker, USA)이었다. EBM-2 (Clonetics, Bio Whittaker, USA) 기본배지에 2% FBS, bFGF (10 ng/ml), VEGF (10 ng/ml), antibiotics (P/S)를 이용하여 37°C시 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배지는 3~4일에 한번 신선한 배지로 교환하였다.

### 2. 내피세포의 생물학적 특성 평가

#### 가. LDL 섭취능 측정

배양 중인 세포를 chambers slide (Lab-Tec, Nunc Inc., Naperville, IL, USA)에 well당  $1 \times 10^4$ 를 300 $\mu\text{l}$ 의 내피세포 성장 배지에 넣어 분주하고 24시간 배양 후 세포가 부착된 것을 확인한 다음 배양에 사용된 배지를 제거하였다. Dil-Ac-LDL (Biomedical technologies, Inc., Stoughton, MA, USA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 새로운 내피세포 성장용 배지를 넣어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 Dil-Ac-LDL 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 내피세포 성장용 배지를 제거하고 Dil-Ac-LDL이 포함되어 있지 않은 신선한 배지나 PBS를 사용하여 세척하였다. 세척된 chambers slide에 3% 포르말데하이드로 20분간 상온에서 고정시킨

후 증류수에서 5초 동안 담가두었다. 그 후 chambers slide의 상부 구조를 제거하고 90% glycerol을 slide에 점적 후 cover slip를 덮고 현광현미경 514 nm의 파장을 사용하여 결과를 확인하였다.

#### 나. 내피세포 표지자 측정

준비된  $1 \times 10^6$  세포를 시험관에 넣고 5% BSA가 포함된 PBS로 2번 세척한 다음 보고자 하는 단클론 항체(CD31, P1H12)를 이용하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 5% BSA가 포함된 PBS로 2번 세척하였다. 세척된 세포를 형광물질을 갖는 2차 항체로 4°C에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 2회 세척하였다. 3% 포르말데하이드로 20분간 상온에서 고정시킨 후 PBS로 세척하여 유세포 분석기로 분석하였다.

#### 다. 맥관 형성능 측정

24-well 배양용기에 matrigel 300 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 1시간 중합반응시킨 후 준비된 세포를  $1 \times 10^4$ 개를 넣어주고 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 18시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음 3% 포르말데하이드로 20분간 상온에서 고정시키고 DiffQuick (Baxter Diagnostics Inc., McGraw Park, IL, USA)으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

#### 라. 내피세포 관련 유전자 발현 정도 측정

TRIzol-reagent (GIBCO BRL)을 이용하여 RNA를 분리한 후 정량하였다. cDNA 합성과정은 First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)를 사용하였다. 방법은 1.6 g의 RNA에 1 mM dNTPs, 0.2 g random hexamer primer, 20 units ribonuclease inhibitor, 40 units M-MLV 역전사효소가 포함된 반응 용액 [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT]을 섞어 37°C에서 1시간 반응시키고 70°C에서 10분간 가열해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 사용하여 내피세포 및 전구세포에서 발현되는 유전자에 대한 realtime PCR을 수행하여 그 발현정도를 비교하였다. 발현도를 비교하고자 한 유전자는 IGFBP7 (Mac 25), Hevin, CTGF, COL6A1, 9-27, GNG11, vWF, CRIP2, COL18A1, IGFBP4, MCAC(Muc18), sparc/osteonectin, COL4A2, COL6A2, MGP, VEGF, VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1, VEGFR3/Flt4, Tie-1, Tie-2, CD31/PECAM-1, CD34, VE-cadherin, CD45, CD105/endoglin, E-selectin, c-fms, b-FGF, tal-1/SCL, eNOS, CD1a, FGFR이며  $\beta$ -actin을 사용하여 정량분석을 시행하였다. 합성된 cDNA에 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA, USA)를 사용하였다. Kit내에 포함된 HotstarTaq DNA polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR buffer, dNTP mix including dUTP, SYBR Green I, ROX (양성 대조군 염색), 5 mM MgCl<sub>2</sub>가 포함된 반응용액에 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix를 첨가하였으며 각각 PCR 과정마다 비교하고자 하는 primer 0.5 $\mu$ l를 첨가하여 최종 20 $\mu$ l로 PCR을 수행하였다. Rotor-Gene 2072D (Crobett Research, Australia)를 사용하여 처음 95°C에서 15분간 반응시킨 후 94°C에서 15초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초씩 45회 반복하여 PCR 과정을 실시하였다. 실험은 3회 반복하여 평균값을 구하였다.

### 3. 내피전구세포의 줄기세포적 특성 평가

#### 가. Telomerase 활성도 측정

세포를 200 $\mu$ l의 냉장 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 5 mM beta-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% 3-(3-cholamidopropyl-dimethylamino-1-propanesulfonate)하에서 균질화기로 균질화시켰다. 이 과정은 냉장실에서 시행하였다. 부유액은 얼음 위에서 30분간 방치한 다음 15분간 4°C에서 원심분리 하였다. 상층액을 분리한 다음 -80°C에 급속 냉동시켰다. 단백질 정량은 Bradford assay (Bio-rad)법에 의해 시행하였다. 추출물은 Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 분석을 시행하였다. 즉, 모든 검체는 0.06, 0.6, 6 $\mu$ g으로 희석하면서 검사하였다. RNase 전 처치 비교는 6 $\mu$ g의 추출물에 RNase를 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l로 23°C에서 15분간 전처리 후 시행하였다. TRAP 분석은 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA, 50 $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate, 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 1 $\mu$ g T4 gene 32 protein, T4 polynucleotide kinase에 의해 (<sup>32</sup>P)ATP가 부착된 0.1 $\mu$ g TS oligonucleotide (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')를 혼합한 50 $\mu$ l 용량으로 시행하였다. 반응은 실온에서 20분간 방치함으로써 telomerase에 의해 TS primer가 연장되도록 하였다. 반응물질을 94°C에서 3분간 가열함으로써 telomerase를 비활성화시킨 다음, (5-CCCTTACCC-TTACCCTTACCCTTA-3')의 CX primer 0.1 $\mu$ g과 2 unit의 Taq polymerase를 첨가하였다. 이 산물을 94°C에서 45초, 50°C에서 30초, 72°C에서 90초씩 32회 반복시켰다. PCR 산물을 15%의 non-denaturing polyacrylamide gel에서 분리시킨 후 X-ray film에 감광시켰다. 하룻밤 노출 후 전형적인 6 bp의 사다리 모양이 관찰되면 양성으로 판정하였다. 각 검사시마다 양성 대조군으로 293 세포의 추출물을 사용하였다.

### 4. 유전자 형질도입과 생체내 분포

#### 가. GFP 유전자 형질도입 내피세포의 생성

RetroXpress Enhanced GFP발현 vector인 pLEGFP를 대장균에 transformation하여, pLEGFP vector를 증폭하고 Plasmid prep kit를 이용하여 바이러스 포장 세포주에 형질도입할 수 있게 pLEGFP vector를 준비하였다. NIH3T3 세포주에서 유래한 virus packaging 세포주인 PT67을 1-2 $\times$ 10<sup>5</sup> 정도로 35 mm dish에 10% 우태아 혈청이 있는 배지에서 배양하였다. 24 시간 후 vector 생산을 위해 PT 67세포주가 70% 정도 confluent 할 때 lipofectamine 방법에 따라 PBS로 3번 세척 후 lipofectamine 16 $\mu$ l, retroviral vector 2 $\mu$ g이 들어 있는 2 ml의 무혈장 배지를 처리하였다. 18시간 후 배지를 교환하였다. 48시간 후 세포주를 형광현미경으로 검사하면서 G418로 일주일간 배양하면서 GFP 유전자가 형질 도입된 바이러스 포장 세포주를 선택하였다.

환자에서 분리하여 내피세포로 분화된 세포주를 T75 flask에 10% 우태아 혈청이 있는 배지에서 배양하여 약 50% 정도 융합되면 virus가 포함된 배지로 교환하여 virus 감염이 일어나도록 하였다. 24시간 경과 후 다시 새로운 virus가 포함된 배지로 처리하여 감염 효율을 높여주었다. 하루가 지난 후 새 배지로 교환해주었다. 48시간 후 세포주를 현광현미경으로 검사하면서 GFP 유전자가 형질 도입된 세포가 있는지 확인하고 hemocytometer로 세포수를 측정한 뒤 마우스에 주입하였다.

#### 나. 생체내 투여된 전구세포의 체내 분포

누누 마우스에 피하로  $1 \times 10^7$ 개의 YCC 16 위암세포주를 주입하였다. 3주 후 종양이 1.5 cm 정도의 크기가 되었을 때 GFP로 형질 도입된 내피세포를 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 2주 후 종양, 간, 폐 및 비장 조직을 채취하여 현광현미경하에서 내피세포의 이동 여부를 관찰하였다.

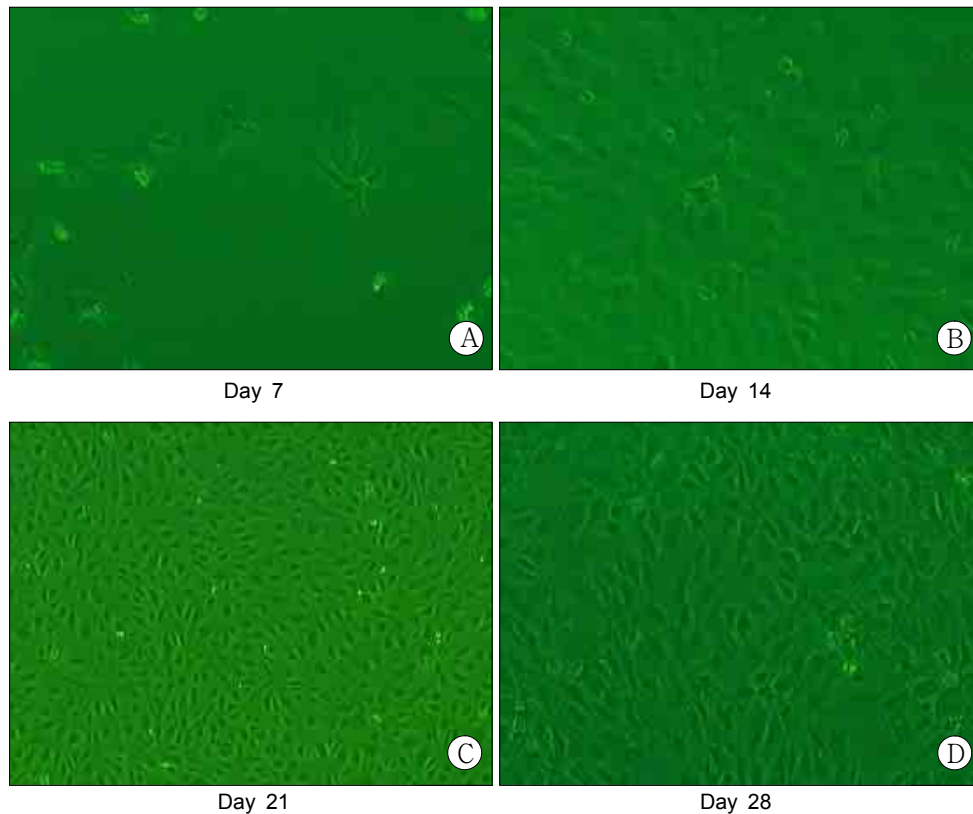
### III. 결 과

#### 1. CD34 양성 말초단핵구의 분리 및 생체의 배양

항암약물 치료를 받는 환자에 과립구 촉진 성장인자를 처치 후 백혈구수가  $20,000/\text{mm}^3$  이상이 되는 경우 말초 혈액에서 CD34 양성인 단핵 세포를 분리하였다. CD34 양성 세포는 단핵 세포의 단지 1.5%에서 분포되었다. 내피세포의 특징적 세포 지표로 vWF, CD31, P1H12를 유세포분석법을 통하여 확인하여 보았다. 말초 혈액에서 처음 분리된 단핵세포의 경우 vWF 7.07%, P1H12 0.89%, CD31은 14.65%에서 분포하였다(Table 1). 분리된 세포는 bFGF와 VEGF를 첨가하여 배양하여 7~14일째 배양용기에 부착하는 방추 형태를 갖춘 세포가 출현하기 시작하였다(Fig. 1A, B). 이들 세포는 이후 성장하여 28일경에 내피세포의 cobblestone 형태를 보였으며 이후 평균 4세대 동안 성장하였다(Fig. 1C, D). bFGF 및 VEGF의 성장인자는 배양과정에서 지속적으로 첨가되었으며 배지 교환은 3~4일 간격으로 시행하였다.

**Table 1.** Cell surface markers of PBMC in cancer patients during chemotherapy treated with G-CSF

	CD34+, vWF+	CD34+	vWF+	P1H12+	CD31+
Mean (%)	1.31	1.51	7.07	0.89	14.65
SD	0.43	0.49	2.44	1.29	1.45



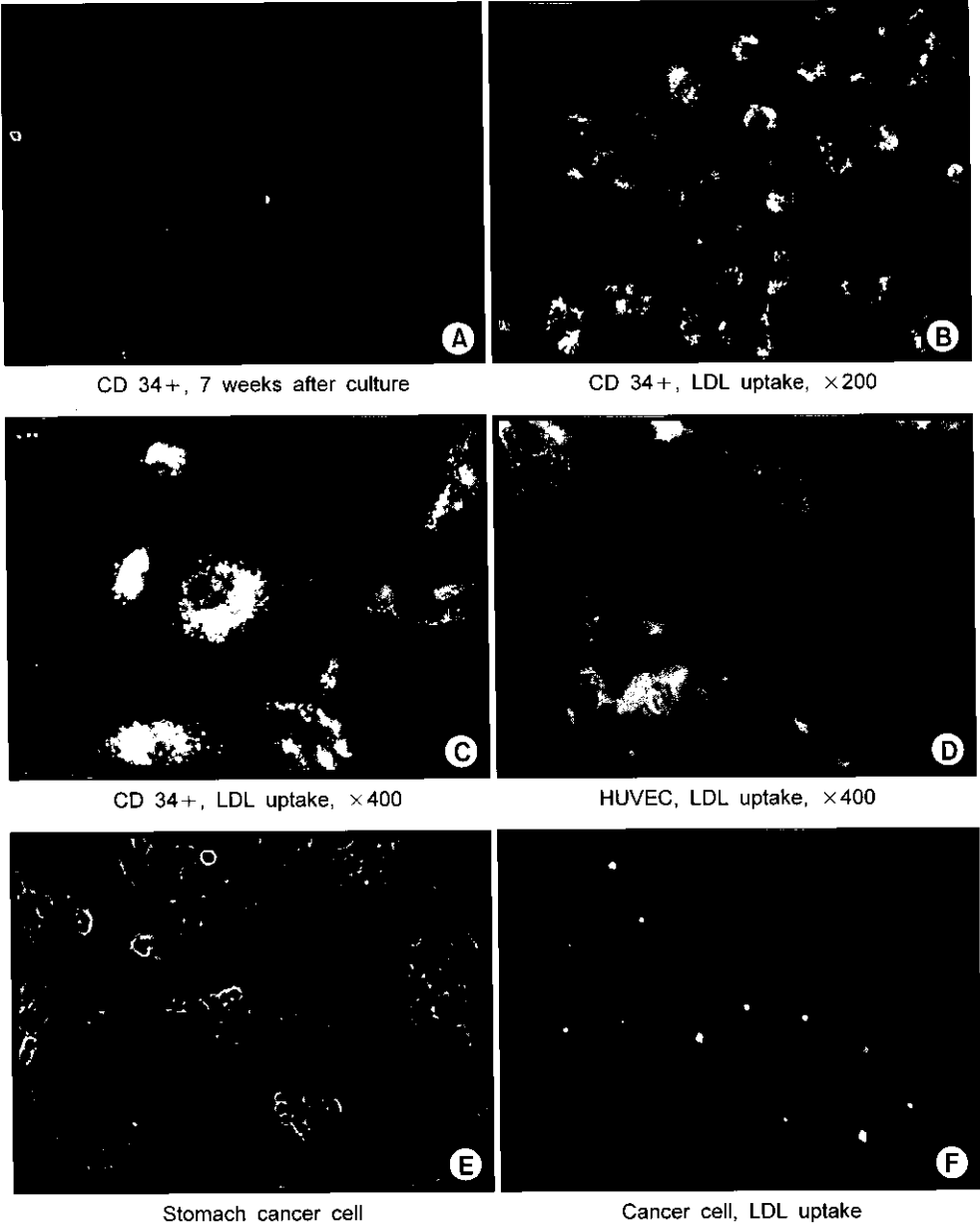
**Fig. 1.** Differentiation of CD34 positive PBMC to endothelial cells. (A) Spindle shaped cells 7 days after plating in EBM-2 with bFGF & VEGF. (B) Formation of endothelial monolayer after continuous incubation with bFGF & VEGF. (C) Cobblestone appearance on day 21. (D) 100% confluence on day 28.

## 2. 내피세포의 생물학적 특성

### 가. LDL 섭취능

내피세포의 형태를 갖춘 세포들의 내피세포 특성 발현여부를 확인하기 위한 검사로 LDL uptake 실험을 시행하였다. 28일째 분리된 세포들은 아세틸화된 LDL을 섭취함을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, B). 특히 이들 세포의 LDL 흡수 정도는 양성 대조군의 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) 보다 강하게 나타남이 확인되었다(Fig. 2C, D). 세포 분리 배양 중 방추형태의 섬유아세포 및 종양세포가 확인되었으며 이들 세포에서는 LDL 섭취는 발생하지 않았다(Fig. 2E, F).





**Fig. 2.** Uptake of LDL in cells derived from CD34 positive PBMC. (A) CD34 positive derived endothelial cell morphology at 7 weeks. (B) Uptake of LDL in cells after 4 hours of incubation with DiI-AC-LDL (C), (D) Similarity of LDL uptake between CD34 positive derived endothelial cell and HUVEC. (E) Stomach cancer cell morphology. (F) No LDL uptake of stomach cancer cell.

#### 나. 내피세포 표면 표지자

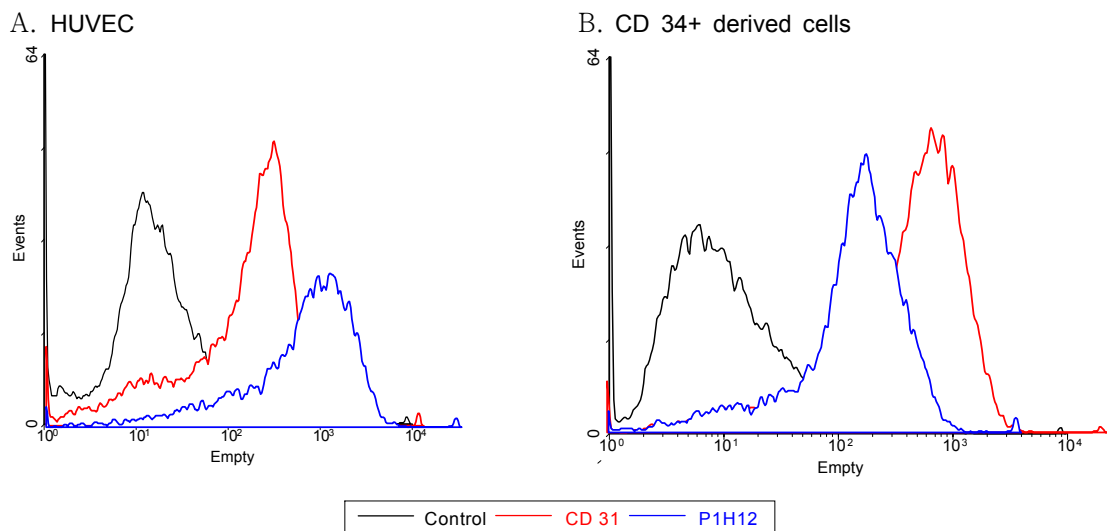
6주 이상 장기간 배양된 세포를 유세포분석법을 이용하여 내피세포의 특이적 표지자인 CD31과 P1H12의 발현을 조사하였다. CD34 양성 단핵구에서 분리되어 내피세포 형태로 분화된 세포에서 양성 대조군인 HUVEC보다 더 강하게 발현됨을 확인하였다(Fig. 3).

#### 다. 맥관 형성능

내피세포는 맥관을 형성하는 능력이 있으므로, CD34 양성군에서 분리되어 내피세포 형태로 분화된 세포의 맥관 형성능을 보고자 하였다. 18~24시간 경과 후 matrigel에 맥관이 형성되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

#### 라. 내피세포 특징적 mRNA 발현 정도

분화된 내피세포에서 특이적으로 발현되는 유전자가 20여 가지 이상 이미 알려져 있으므로 본 실험에서는 배양 후 4~6주에 세포를 분리하여 이들 유전자를 대상으로 realtime PCR을 시행하여 내피세포 특이적 유전자의 발현정도를 분석하였다. 양성 대조군으로 HUVEC 세포주를 사용하여 비교하였다. HUVEC 세포주에서 발현되지 않는 Hevin, Sparc/osteonectin 유전자가 환자에서 분리된 내피세포에서도 발현되지 않았다. IGFBP4 유전자는 HUVEC 세포주에서 보다 많이 발현하였으며 이외에도 내피세포에서 발현되는 유전자인 vWF, CTGF, COL6A1, COL18A1, MCAM (Muc 18), VEGFR3/Flt4, CD34, CD105/endoglin, eNOS 발현이 확인되었으며, IGFBP7 (MAC 25), E-selectin 등의 유전자는 일부 환자의 세포



**Fig. 3.** Endothelial cell surface markers in cells derived from CD34 positive PBMC. At 5 weeks after culture, flow cytometry was performed. Similarity of expression of endothelial cell markers, CD31 and P1H12, between HUVEC and CD34 positive cells. Fraction of P1H12 was increased from 0.89% in PBMC to 98% at 5 weeks in CD34 positive cells.

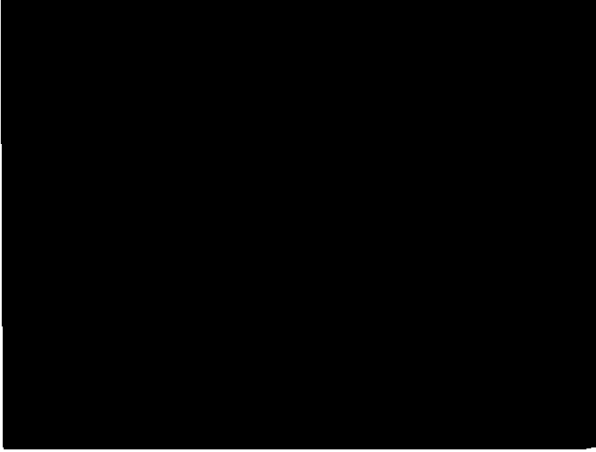


Fig. 4. Tube formation in cells derived from CD34 positive PBMC. At 5 weeks after culture, CD34 positive derived cells have the ability to form tubes after polymerization with matrigel.

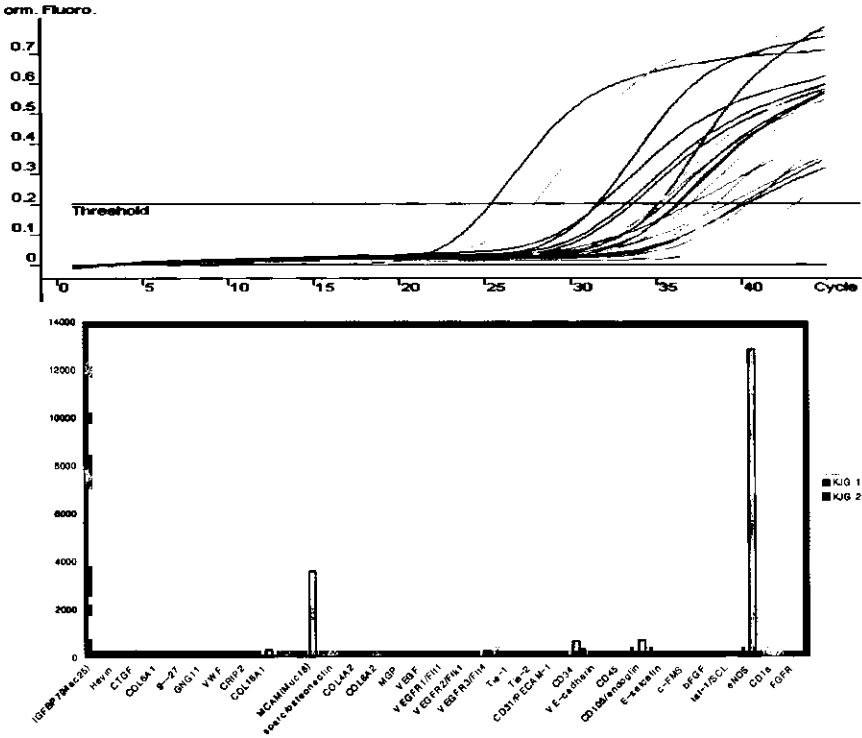
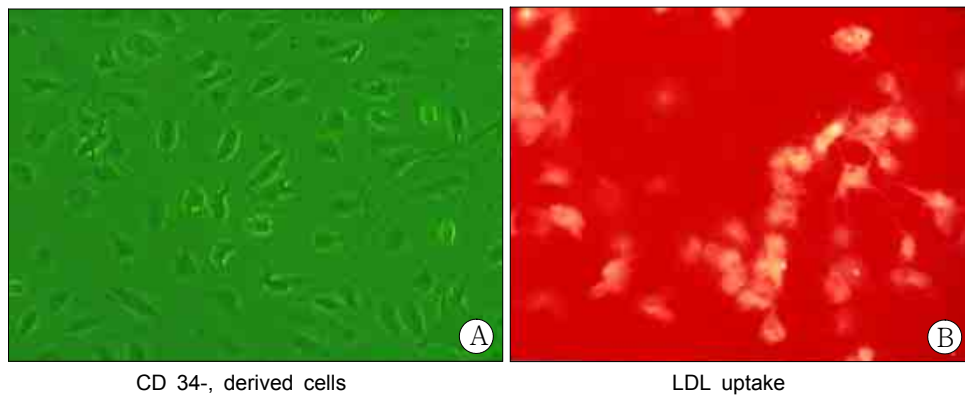


Fig. 5. Endothelial cell related gene expression by realtime PCR. Of the 32 endothelial cell related genes in which PCR was performed at 5 weeks after culture, 10 genes were positive.

**Table 2.** Expression pattern of endothelial cell related genes in CD34 positive derived cells

Gene	Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4	Pt 5	HUVEC P1	HUVEC P2
COL6A1	29	11	4	39	42	4607	3868
VWF	7	12	5	18	27	12	23
COL18A1	659	923	318	758	976	1197	712
IGFBP4	211220	419879	181029	302008	394204	59901	115683
MCAM (Muc18)	5715	3603	3662	4120	4737	631166	458311
VEGFR3/Flt4	344	285	275	480	416	6987	5677
CD34	779	633	177	748	833		
CD105/endoglin	515	678	345	551	88		
eNOS	3180	12890	16151	20005	15601		



**Fig. 6.** Uptake of LDL in cells derived from CD34 negative PBMC. (A) CD34 negative derived endothelial cell morphology at 5 weeks after culture (B) Uptake of LDL in cells after 4 hours of incubation with DiI-AC-LDL.

에서 발현되었다(Fig. 5, Table 2).

### 3. CD34 음성 말초단핵구에서 내피세포의 분화

본 연구에서는 CD34 음성이면서 표면 부착성 성장형태를 나타내는 세포들에서도 CD34 양성인 세포와 마찬가지로 같은 성장인자를 첨가하여 배양을 진행하였으며 일부 CD34 음성 세포에서 cobblestone 형태를 보이는 내피세포가 관찰되었다. 이들 세포를 3개월 장기간 생체의 배양후 LDL을 섭취함이 확인되어, CD34 음성 세포에서도 내피세포로 분화가 가능함이 확인되었다(Fig. 6).

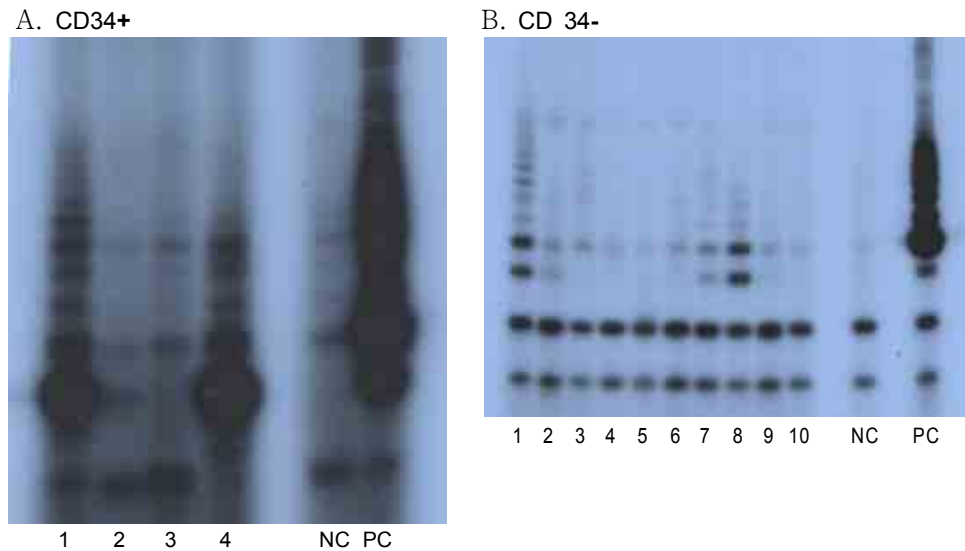
#### 4. 내피전구세포의 줄기세포적 특성

##### 가. Telomerase 활성도

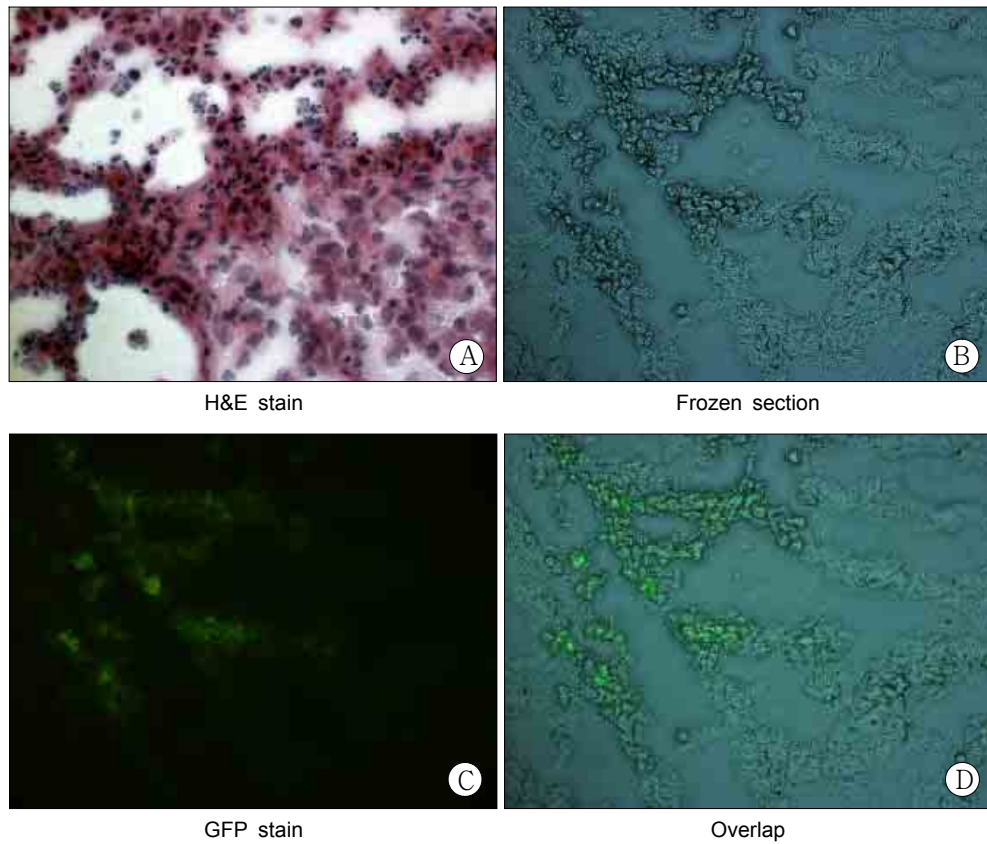
양성대조군의 핵단백질에서는 telomerase 활성이 관찰되었고 음성대조군에서는 TRAP 밴드는 활성이 나타나지 않았다. CD34 양성에서 분화된 세포의 경우 1, 4번 환자 검체에서는 강양성을 보였으며, 2, 3번 검체에서는 약양성으로 판단되어 이들 세포가 줄기세포적 특성을 가지고 있음이 확인되었다. CD34 음성인 세포에서도 내피세포로의 분화가 보고되고 있어 CD34가 유일한 줄기세포의 표지자가 아닐 가능성이 제시되고 있다. 본 연구에서도 CD34 음성 세포를 배양하는 과정에서 내피세포의 형태가 관찰되어 이들 세포에서도 telomerase 활성도를 조사하였다. TRAP 결과 CD34 음성 세포에서 분화된 내피세포에서 telomerase 활성이 1, 8번 검체에서 관찰되어 이들 세포가 성체세포보다는 전구세포의 특성을 내재하고 있음이 제시되었다(Fig. 7).

##### 5. 종양조직으로 내피전구세포의 분포

누누 마우스의 피하조직에 위암세포주를 주사하였고 3주 후에 종양의 크기가 1.5 cm 정도로 성장하였다. GFP로 형질 도입된 내피세포를 마우스의 꼬리 정맥으로 투여하고 2주 후 종양조직을 관찰하였다. H&E 염색상 종양세포가 관찰되었으며 현광현미경으로 관찰시



**Fig. 7.** Telomerase activity in cells with endothelial cell morphology. (A) TRAP assay was performed in CD34 positive derived cells at 5 weeks after culture. As a positive control, 293 cell was used. Cases 1 and 4 were strong positive. (B) TRAP assay was performed in CD34 negative PBMC. Strong positivity was noted in cases 1 and 8.



**Fig. 8.** Incorporation of GFP transfected cells into tumor tissue. Cells derived from CD34 positive PBMC were infected with virus containing GFP. Two weeks after injection of GFP transfected cells via tail vein in Nu/Nu mice, mice were sacrificed. (A) Tumor cells were noted in H&E stain. (B), (C), (D). GFP was stained in left upper side.

종양세포에서는 GFP 염색이 되지 않았으며 종양세포 주위의 조직에서 GFP 염색이 관찰되어 GFP로 형질 도입된 내피세포가 종양부위로 이동하여 종양조직의 혈관생성에 기여하고 있음을 확인하였다(Fig. 8). 폐 및 비장조직에서도 GFP염색이 일부 확인되었으나 전반적인 염색정도는 종양조직에 비하여 매우 미약하였다.

#### IV. 고 찰

기존의 항암약물들은 주로 증식이 빠른 세포를 표적으로 개발되어 왔다. 하지만 정상적으로 빠른 성장을 보이는 조직에 많은 독성을 나타내게 되며 그 효과에도 한계를 보이게 되었다. 종양이 생존하고 성장하기 위하여서는 산소와 영양분의 공급이 필수적으로, 종양

의 진행과정에서 종양 혈관의 생성이 종양 성장의 중요한 과정임이 알려졌다. 본 연구에서는 종양 혈관생성에 참여하는 내피전구세포를 암표적치료의 매개체로서의 가치를 알아보 고자 하였다.

혈관신생은 기존혈관의 충분히 분화된 내피세포에서 새로운 혈관이 형성되는 angiogenesis라는 과정에 전적으로 의존하는 것으로 생각되어 왔다.<sup>1</sup> 이와는 대비되는 개념의 vasculogenesis는 배아에서 내피전구세포로부터 혈관이 형성되는 과정을 의미한다.<sup>2</sup> 배아 난 황막에서 vasculogenesis과정은 hemangioblast가 모여서 혈액섬(blood island)을 형성하게 되 며, 혈액섬은 다시 분화하여 중심부에서는 조혈간세포가 생성되며 주변부의 세포에서는 내피전구세포가 위치하게 된다. 조혈간세포와 내피전구세포는 발생과정에서 공간적 연관성 뿐만 아니라 CD34, Tie-2, Flk-1과 같은 세포 표지자가 조혈간세포 뿐만 아니라 내피전구세 포에도 존재한다는 공통점이 있다.<sup>4,5</sup> 최근에 말초혈액의 CD34 양성 단핵구에서 내피전구 세포를 분리하여 내피세포를 배양함으로써 내피전구세포 또는 이전 단계의 줄기세포가 성 인의 혈액을 순환하면서 생후의 신혈관생성에 관여할 수 있음을 제시되었다.<sup>6</sup>

본 연구에서는 항암약물치료를 시행하고 있는 종양환자에 G-CSF를 처치 후 말초혈액의 CD34 양성 단핵세포에서 내피전구세포를 분리하고 생체 외에서 내피세포로 분화시킬 수 있었다. 건강한 성인의 자발적 참여로 말초혈액에서 내피전구세포를 분리하는 것이 가능 하였으나 본 연구에서는 항암약물치료로 골수가 억압된 상태에서도 조혈촉진인자를 추가 함으로써 내피전구세포의 분리가 가능함을 관찰하였다. 말초혈액 40~293 ml에는  $2.16 \pm 0.50 \times 10^8$ 개 단핵구가 포함되어 있었으며, 백혈구성분체집술을 이용하는 경우 12.5~23 ml의 말초혈액으로도  $2.29 \pm 0.35 \times 10^9$ 의 단핵구를 얻을 수 있어 백혈구성분체집술이 10배 이 상의 단핵구를 분리할 수 있어 보다 효과적임을 보고하였다.<sup>18</sup> 하지만 백혈구성분체집술을 시행하기 위해서는 성분혈액채집기가 필요하며 시간이 보통 2시간 소모된다는 점도 고려 해야 한다. 본 연구에서는 항암제 투여후 조혈촉진인자를 매일 투여하여 총백혈구수가  $20,000/\text{mm}^3$  이상으로 증가시켜 말초혈액 10 ml에서 내피전구세포의 분리가 가능하였다. 10 ml의 말초혈액에는 단핵구는  $1 \times 10^8$ 개의 세포, CD34 양성 단핵구는  $1 \times 10^6$ 개의 세포가 존재하였다. 조혈촉진인자를 투여하지 않은 경우 말초 단핵구에서 CD34 양성 비율이 0.01~0.1%이나 조혈촉진인자를 투여한 본 연구에서는 CD34 양성 비율이 1.5%까지 상승 된다.<sup>19</sup> 조혈촉진인자는 순환하는 내피유착분자, 특히 VCAM-1분자를 증가시킨다. 용해성 VCAM-1은 CD34 양성 세포의 VLA-4수용체와의 결합능이 뛰어나기 때문에 이들 세포의 골수 미세환경과의 유착성을 감소시켜 CD34 양성 세포의 말초혈액내 이동을 증가시킬 수 있다고 보고되었다.<sup>20</sup>

CD34 양성 단핵구에서 내피세포로 분화시키는 배양 조건에 대해서는 표준방법이 아직 정립되지 못하였다. 배양 용기에 fibronectin을 코팅하는 것이 collagen을 사용하는 것보다 용기에 부착하는 세포수가 의미 있게 증가된다고 보고하였다.<sup>6</sup> 배지 및 첨가물의 조건을

달리하여 내피세포의 분화능을 살펴본 실험에서 내피세포 성장 배지에 20% 혈청 및 철분을 첨가한 경우가 가장 좋은 분화능이 관찰되었다.<sup>21</sup> 배지에 첨가되는 성장인자로는 vasculogenesis과정에서 알려진 bFGF, VEGF, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 및 stem cell growth factor (SCGF) 등이 이용되었다.<sup>9,22</sup> CD34 양성 세포에 VEGF, bFGF, IGF-1를 첨가하여 20일 후 내피세포 집락수를 비교하여 성장인자의 중요도를 평가한 연구에서 VEGF만 첨가한 경우와 성장인자 모두를 첨가한 경우에는 평균 4개의 집락이 형성되었으나 VEGF가 첨가되지 않는 경우 집락이 형성되지 않아, 내피세포 분화에 가장 중요한 성장인자는 VEGF임을 보고하였다.<sup>9</sup> Vasculogenesis과정에 bFGF는 angioblast를 유도하는 역할을 하며 VEGF는 angioblast를 초기의 혈관 구조로 형상화하는 역할을 하는 것으로 보고되었다.<sup>23</sup> 첨가한 성장인자에 따른 내피세포 생존기간은 bFGF, VEGF 및 IGF-1을 이용한 경우 30세대 까지 유지가 되었으며,<sup>9</sup> 성장인자를 사용하지 않고 collagen만 코팅한 경우에는 오직 4주만이 지속되었다.<sup>6</sup> 본 연구에서는 fibronectin으로 코팅되지 않은 배양용기를 사용하고 b-FGF와 VEGF를 각각 10 ng/ml로 추가하여 평균 4세대, 8주까지 내피세포 배양이 가능하였다. Fibronectin, gelatin 코팅 여부 및 첨가된 성장인자 및 농도가 내피세포 생존기간에 영향을 줄 수 있을 것으로 고려되며 장기간 생존을 유지할 수 있는 배양기법에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 내피세포 형태가 충분히 갖추어진 배양 5주의 세포를 모아 내피세포 관련 유전자 발현정도를 실시간 PCR을 이용하여 측정하였다. 본 실험에서 사용된 유전자는 Serial analysis of gene expression (SAGE)기법을 통하여 대장암조직의 내피세포에서 정상조직의 내피세포에 비하여 10배 이상 많이 발현되는 32개의 유전자에 대해 조사하였다.<sup>24</sup> 10개의 유전자는 발현이 명확하여 내피세포임을 증명할 수 있었으며 일부 유전자는 발현이 되지 않는었는데 이는 본 연구에서 사용된 세포가 충분히 분화된 내피세포가 아니라 전구 세포에서 분화되는 도중 단계였기 때문으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 양성 대조군으로 사용된 HUVEC과도 유전자 발현 양상은 일치하지 않았다. 또한 SAGE 기법으로 밝혀진 유전자는 중앙 내피세포에서 특이하게 발현이 증가된 경우로 CD34 양성 단핵구에서 유도된 내피세포와는 다른 발현 양상을 보일 수 있을 것으로 생각된다. 향후 연구에서는 초기의 CD34 양성 단핵구에서 내피세포로 분화해 가는 각 단계마다 실시간 PCR을 시행하여 앞서의 유전자 발현 구도 변화 양상을 관찰하는 것이 필요하리라 생각된다.

CD34 양성 단핵구에는 분화된 내피세포가 포함될 수 있기 때문에 본 연구에서 관찰된 내피세포가 말초혈액에 이미 존재하던 성숙 내피세포에서 증식되었을 가능성도 배제할 수 없다. 또한 기존의 많은 연구에서 말초혈액에 성숙 내피세포가 순환하는 것이 밝혀졌으며,<sup>25-27</sup> 정상 성인의 말초혈액에 밀리리터 당  $2.6 \pm 1.6$ 개의 순환 내피세포가 분포하는 것으로 보고되었다.<sup>26</sup> 분화된 내피세포는 혈관벽에서 내피세포가 무작위로 박리되어 말초혈액 내에서 발견될 수 있으며, 수술이나 혈관내 와류에 의한 외상으로 말초혈액내에 내피세포



가 노출될 수 있다. 겸상적혈구병 발증상태에서도 활성화된 순환 내피세포 수가 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>26</sup> CD34 양성 단핵구에서 내피세포로 분화되는 현상은 CD34 양성 단핵구가 명확한 내피전구세포임을 증명하는 것은 아니며 단지 CD34 양성 단핵구에 내피전구세포가 포함되어 있음을 의미할 뿐이다.<sup>6,9</sup> 따라서 혈관 분절을 내피세포 배양에 임상에서 사용을 해온 점은 분화된 내피세포도 명확히 증식능을 가지고 있기 때문이며,<sup>28,29</sup> 내피세포 증식 현상을 내피전구세포의 존재로 연결하는 것은 부적절하다.

조혈간세포와 전구세포는 특이 표면 표지자로서 CD34와 최근에 새로 밝혀진 조혈간세포 표지자인 CD133을 표현하며, 이들 표지자는 세포가 성숙되어 갈수록 점차로 감소하게 된다.<sup>30,31</sup> 사람에서 유도된 CD133 양성 세포가 양의 골수에서 정착하는 것이 관찰되어 CD133은 다능성 조혈간세포의 표지자로 고려될 수 있음을 보고하였다.<sup>31</sup> 조혈촉진인자로 동원된 말초혈액 CD34 양성 단핵구의 2%, 태아 간에서 분리된 CD34 양성 단핵구의 1.2%, 제대혈 CD34 양성 단핵구의 1.4%가 내피세포 특이 표지자인 vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) 양성이었으며, 특히 CD34 양성 VEGFR-2 양성인 세포는 대부분 CD133 양성으로 밝혀졌다. 성숙 내피세포는 CD133을 표현할 수 없으므로, CD34 양성 세포에서 VEGFR-2 및 CD133을 동시에 표현하는 경우 형태학적으로 내피전구세포의 유일한 집단임이 제시되었다.<sup>32</sup> 조혈촉진인자로 동원된 말초혈액의 CD133 단핵구에서 VEGF와 SCGF를 첨가하여 배양시 내피세포로 분화함이 관찰되어 말초혈액내의 내피전구세포가 존재하며 이들 세포로부터 내피세포가 유도됨을 보고하였다.<sup>22</sup> CD133은 매우 초기의 줄기세포에서만 표현이 되기 때문에 말초 혈액에서 분리 즉시 CD34 양성 단핵구에서 CD133 표현 여부를 확인하여야 하나 본 연구에서는 분리 당시 CD34 양성 단핵구의 세포수가  $1 \times 10^6$ 에 불과하여 확인함이 불가능하였다.

본 연구에서는 분리된 CD34가 전구세포의 특성을 확인하기 위하여 TRAP 분석을 시행하였다. Telomere는 세포가 노화로 이르게 되는 것을 조절해 주며,<sup>33</sup> telomerase라는 효소에 의하여 길이가 유지된다. Telomerase는 리보핵단백질로 자체의 RNA주형을 가지고 역전사를 하여 telomere에 TTAGGG의 반복서열을 붙여줌으로써 telomere의 길이를 유지시켜준다.<sup>34</sup> Telomerase는 대부분의 정상세포에서는 발현되지 않으며 암세포, 생식세포, 줄기세포에서 활성화되어 있다. TRAP 분석은 세포내에 telomerase유무를 확인할 수 있는 기법으로 말초혈액에서 분리된 CD34 양성 단핵구에서 TRAP 분석시 양성으로 확인되어 이들 세포가 전구세포의 성격을 지님을 확인할 수 있었다. 일부에서는 음성으로 나타났는데, 이는 TRAP 분석을 시행한 시점이 내피세포 형태를 나타내는 세포 배양 4~5주의 세포로 시행하였기 때문에 이 시점에서 일부에서는 이미 전구세포의 특성을 소실하고 성숙 내피세포로 분화된 세포로 구성되어 TRAP 결과가 음성으로 나타날 수 있을 것으로 추정된다.

말초 혈관내 CD34 양성 단핵구에 내피전구세포가 포함되어 있으며 이들 세포에서 내피세포로 분화가 가능성이 밝혀졌으나 CD34 표지자가 내피전구세포를 특징화 할 수 있는

표지자를 의미하는 것은 아니다. 마우스에 스폰지로 유도된 육아조직의 신혈관생성에 내피전구세포에서 유래된 세포가 약 10%를 차지함이 보고되었다.<sup>15</sup> 하지만 말초 혈액에 순환하는 CD34 양성 세포 비율이 0.01~0.1% 정도에 불과함을 고려할 때, 내피전구세포에 의한 신혈관생성에는 이들 CD34 양성 세포 외에 다른 세포도 참여하고 있음을 제시하게 된다. 조혈조직에선 CD34 양성 세포뿐만 아니라 CD34 음성 세포에서도 조혈모세포의 역할을 할 수 있음이 밝혀졌으며,<sup>35,36</sup> 조혈간세포와 내피전구세포는 발생학적으로 밀접한 관계에 있기 때문에 CD34 음성 세포에도 내피전구세포가 존재할 가능성이 제시되었다. 단핵구가 내피세포와 많은 항원을 공유하며, VEGF에 반응을 보이는 점에서 단핵구가 내피전구세포의 가능성이 고려되었다.<sup>37-39</sup>

단핵구와 내피세포의 공통적인 표지자인 CD14 세포에서 유래된 세포가 내피전구세포의 특징을 가진다고 보고되었다.<sup>16</sup> CD34 양성, CD34 음성, CD34 음성 CD14 양성, CD34 음성 CD14 음성인 세포들의 내피세포 형성능을 비교한 실험에서 CD34 음성 CD14 양성 세포군에서 내피세포로 유도되는 것이 보고되어 CD34 음성 세포에도 내피전구세포가 존재함이 알려졌으며,<sup>17</sup> 내피전구세포는 이전에 생각된 것보다 많이 양이 말초 혈액에 존재함이 밝혀졌다. 건강한 성인 골수에서 채취한 비내피성 간세포의 표지자는 CD133 양성, CD34 음성, Flk1 양성이며 VEGF로 배양시 표지자는 CD34 양성, VE-cadherin 양성, Flk1 양성인 내피전구세포의 표현형으로 분화되었고, 계속 VEGF로 배양시 vWF, CD31, CD36 양성의 내피세포로 분화함이 보고되어 CD34 음성 세포가 CD34 양성 이전의 간세포에 위치함을 제시되었다.<sup>40</sup>

본 연구에서 CD34 음성 단핵구중 표면 부착성 증식이 있는 세포는 CD34 양성 단핵구와 같은 배양 조건에서 배양을 실시할 경우 배양 용기에 부착하여 cobblestone 형태를 보이는 세포로 성장하였다. 이들 세포는 LDL 섭취가 양성으로 내피세포로 분화되고 있음을 확인할 수 있었다. CD34 음성 세포군으로 CD34 양성 세포가 오염되어 상기의 결과도 유도되었을 가능성도 있다. 하지만 CD34 양성 세포군은 전 단핵구의 2% 미만인 점을 고려할 때 오염으로 인한 CD34 음성 세포군에서의 내피세포 분화 현상은 배제할 수 있을 것이다. CD34 음성 단핵구 세포군에서 CD14 양성 비율은 36.2%이었으며, CD34 음성 CD14 양성 세포군중 CD133은 8%를 차지하여 이들 세포가 배양과정에서 내피세포로 분화되었을 것을 추정된다.

실험실에서 내피세포로 분화된 세포들이 혈관생성이 일어나는 부위로의 이동여부를 알아보기 위한 동물실험들이 진행되었다. 마우스에 허혈부위를 만들고 CD34 양성 단핵구에서 유도된 내피세포를 주입하였을 때, 이종성, 동종성 및 자가 내피전구세포가 혈관생성이 활발히 일어나고 있는 부위로 이동함이 보고되었다.<sup>6</sup> 수여자와 공여자가 유전적으로 구분되는 골수이식 모델에서, 하부대동맥에 Dacron 이식을 시행하고 12주 후에 이식부위의 내피세포에서 공여자의 DNA가 관찰되어 골수에 존재하는 세포가 말초혈액으로 이동하여

혈관생성이 일어나고 있는 부위에 집락을 형성함을 보고하였다.<sup>9</sup> 내피세포 특이 촉진자 (Flk-1/LZ, Tie-2/LZ)의 전사적 조절하에  $\beta$ -galactosidase를 표현하는 형질 전환된 마우스 (Flk-1/ lacZ mouse, Tie-2/lacZ mouse)로부터 내피전구세포가 배란이후의 자궁내막, 피부 상흔조직, 허혈조직, 종양부위로 이동함이 관찰되었다.<sup>13</sup> CD133 양성 세포에서 유도된 내피세포를 중증혼합면역결핍증 마우스에 폐암세포주 단독으로 주입할 때보다 폐암세포주와 내피전구세포를 동시에 투여시 종양혈관이 증가되며 괴사부위가 없어지고 종양크기가 2배 이상으로 증가됨이 보고되었는데 이는 내피전구세포가 종양의 혈관생성에 관여하여 나타나는 결과로 생각된다.<sup>22</sup> 급성 심근경색환자에서 CD34 양성 단핵구가 경색 직후 증가하기 시작하여 7일째 가장 많아짐이 관찰되었으며 이는 혈중내 VEGF 농도와 선형 상관관계임이 보고되어 임상적으로 혈관생성이 증가되는 상황에서 VEGF를 통한 내피전구세포가 이동되는 것을 제시하였다.<sup>12</sup>

본 연구에서는 위암세포주로 종양을 형성 후 말초혈관에 내피전구세포 주입시 종양부위로 이동여부를 확인하고자 하였다. 누누 마우스의 피하조직에 위암세포주를 주입하여 종양크기가 1.5 cm가 되었을 때 CD34 양성 단핵구에서 분화된 내피세포를 꼬리 정맥에 주사하였으며 2주 후 종양조직을 채취하였다. CD34 양성 단핵구에서 유래한 내피세포의 일부가 종양의 혈관부위에서 발견되어 혈관생성에 기여하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 종양부위 외에 폐 및 비장에서도 내피세포가 발견되었다. 이는 꼬리 정맥을 통하여 주입된 내피세포가 순환 과정 중 폐 및 비장의 미세한 모세혈관에 걸려서 나타날 가능성이 높을 것으로 생각된다. 이에 대한 평가를 위하여 주입된 내피세포의 생체내 분포 및 생존기간 등의 생활사를 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과로 환자에서 분리된 내피전구세포를 종양 표적치료의 매개체로 이용하여 내피전구세포를 다시 환자에 주입하는 자가 표적치료가 가능하리라 생각된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 항암약물치료 후 G-CSF를 처치 후 백혈구수 증가시킨 상황에서 말초 혈액을 CD34 magnetic bead를 이용하여 분리 후 bFGF와 VEGF 성장인자를 이용한 생체외 배양을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CD34 양성 단핵구는 28일경에 cobblestone 형태를 나타나 내피세포의 형태로 분화됨이 확인되었다. 이들 세포는 LDL 섭취반응이 양성으로 나타나 내피세포의 기능을 가지고 있음이 확인되었다.
2. CD34 양성 단핵구에서 분화된 세포는 matrigel 배양에서 18~24시간 경과 후 맥관 형성 이 확인되어 이들 세포가 혈관신생에 관여할 수 있음이 확인되었다.
3. CD34 양성 단핵구를 5주 이상 장기간 배양시 내피세포의 특이적 표지자인 CD31과

PIH12가 발현됨을 확인하였다.

4. Realtime PCR을 이용하여 내피세포 연관 유전자 발현 정도를 측정하였다. IGFBP4, vWF, CTGF, COL6A1, COL18A1, MCAM (Muc 18), VEGFR3/Flt4, CD34, CD105/endoglin, eNOS 발현이 확인되었다.

5. CD34 음성 단핵구도 같은 성장인자를 이용하여 배양시 일부에서 내피세포의 형태를 관찰할 수 있었다. 이들 세포들도 LDL 섭취반응이 양성으로 나타나 내피세포로 분화되고 있음을 확인할 수 있었다.

6. CD34 양성 및 CD34 음성 단핵구에서 내피세포형태로 분화된 세포들은 telomerase 활성이 관찰되어 이들 세포가 순환 성체 세포가 아닌 전구세포 이전 단계임을 제시하였다.

7. 마우스에 종양을 형성한 동물실험에서 CD34 양성 단핵구에서 유도된 내피전구세포가 혈관을 통한 종양조직으로의 이동이 확인되어 종양의 혈관생성과정에 관여함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 말초 혈액에는 내피전구세포가 존재함을 확인할 수 있으며 이들 세포는 CD34 양성 세포에서만 아니라 CD34 음성 단핵구에서도 내피세포로 분화됨이 밝혀졌다. 암환자에서 이들 세포를 분리 생체의 증폭, 배양하여 이들 세포를 약제 및 치료유전자의 자가 매개체로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Folkman J. The vascularization of tumors. *Sci Am* 1976;234:58-73.
2. Risau W, Sariola H, Zerwes H-G, Sasse J, Eklom P, Kemler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cell derived embryoid bodies. *Development* 1988;102:471-8.
3. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-9.
4. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*. *Development* 1992;116:435-9.
5. Weiss M, Orkin SH. *In vitro* differentiation of murine embryonic stem cells: new approaches to old problems. *J Clin Invest* 1996;97:591-5.
6. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, vanderZee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
7. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125:725-32.
8. Hapzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998;125:1457-68.
9. Shi Q, Rafii S, Hong-De Wu M, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating

- bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-7.
10. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434-8.
  11. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-6.
  12. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776-9.
  13. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
  14. Ziegler B, Valtiere M, Almeida Porada G, De Maria R, Muller R, Masella B, et al. KDR receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999;285:1553-8.
  15. Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 2000;87:728-30.
  16. Fernandez-Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, et al. Endothelial-like cells derived from human CD 14 positive monocytes. *Differentiation* 2000;65:287-300.
  17. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schattman GC. CD34-blood derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 2001;19:304-12.
  18. Hernandez DA, Townsend LE, Uzieblo MR, Haan ME, Callahan RE, Bendick PJ, et al. Human endothelial cell cultures from progenitor cells obtained by leukapheresis. *Am Surg* 2000;66:355-8.
  19. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996;5:213-26.
  20. Sudhoff T, Sohngen D. Circulating endothelial adhesion molecules (sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1) during rHuG-CSF-stimulated stem cell mobilization. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:147-51.
  21. Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, Falk J, Reitz-Vick D, Trevor KT, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vasc Surg* 2000;31:181-9.
  22. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133 positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106-12.
  23. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 2001;220:1-17.
  24. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes

- expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000;5482:1197-202.
25. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, Ahl ET Jr. The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1994;19:585-93.
  26. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Eng J Med* 1997;337:1584-90.
  27. Wu MH, Shi Q, Wechezak AR, Clowes AW, Gordon IL, Sauvage LR. Definitive proof of endothelialization of a Dacron arterial prosthesis in a human being. *J Vasc Surg* 1995;21:862-7.
  28. Davidson PM, Bensch K, Karasek MA. Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *J Invest Dermatol* 1980;75:316-21.
  29. Gupta K, Ramakrishnan S, Browne PV, Solovey A, Hebbel RP. A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented conditions: isolation by panning and stimulation with vascular endothelial growth factor. *Exp Cell Res* 1997;230:244-51.
  30. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013-21.
  31. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-12.
  32. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-8.
  33. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991;256:271-82.
  34. Blackburn EH. Telomerases. *Annu Rev Biochem* 1992;61:113-29.
  35. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797-806.
  36. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, et al. *Ex vivo* generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood* 1999;94:4053-9.
  37. Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, et al. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood* 1993;81:2767-73.
  38. Waltenberger J, Lange J, Kranz A. Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation* 2000;102:185-90.
  39. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18:3964-72.
  40. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-46.

## Abstract

### **The role of circulating endothelial cell precursors in tumor vascularization**

**Joong Bae Ahn**

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyun Cheol Chung)

Most chemotherapeutic agents in current use have been developed to target cells with a high proliferation rate. However, the role of these agents is limited in that they are also toxic to normal tissue with a high proliferation rate. The therapeutic effect would be improved if they could act specifically on endothelial cells of tumor vessels which are actively proliferating within tumor tissue.

It has been suggested that vasculogenesis by endothelial cell precursors as well as angiogenesis play an important role in the production of blood vessels in neoplasms. Endothelial cell precursors arise from the bone marrow and are present in CD34 positive monocytes.

The present study was designed in order to utilize the process of migration of endothelial cell precursors to the area of active vessel production as a tumor specific mediator. In patients undergoing chemotherapy, G-CSF was administered and thus mobilization of mononuclear cell was induced. CD34 positive peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from peripheral blood and *ex vivo* culture using bFGF and VEGF was carried out. The following results were obtained.

1. The cells derived from CD34 positive PBMC presented with a cobblestone appearance at 28 days, revealing differentiation into endothelial cells. They were also positive to the LDL uptake reaction, showing that they have biological endothelial cell functions.
2. Twenty four hours after culture in matrigel, cells differentiated from CD34 positive PBMC demonstrated tube formation, showing their ability to participate in neovascularization.
3. More than 5 weeks after culture, cells derived from CD34 positive PBMC expressed CD31 and P1H12, endothelial cell specific markers.
4. The expression of endothelial cell-related genes was evaluated using realtime PCR. IGFBP4, vWF, CTGF, COL6A1, COL18A1, MCAM (Muc18), VEGFR2/Flt4, CD34, CD105/endoglin, eNOS were expressed.
5. The morphology of endothelial cells was also observed in adherent CD34 negative cells when cultured with the same growth factors. As these cells were positive to the LDL uptake reaction, it was shown that they are differentiating into endothelial cells.
6. The cells derived from CD34 positive PBMC demonstrated telomerase activity, showing

that they are more immature than differentiated cells.

7. In the experiment with tumor formation in mice, it was shown that endothelial cell precursors derived from CD34 positive PBMC mobilized mainly into tumor area after being injected through tail vein.

By isolation and *ex vivo* amplification of endothelial cell progenitors from cancer patients, we suggest that endothelial cell progenitors maybe used as autologous mediators of chemotherapeutic agents and target genes in targeted cancer therapy.

---

Key Words: endothelial cell progenitor, CD34, targeted therapy, angiogenesis, vasculogenesis