

급성 골수성백혈병에서 Stem Cell Factor가 CD34⁺세포의 증식 및 IL-1 β , IL-4, TNF- α 의 분비에 미치는 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실

이 석 · 민유홍 · 정소영 · 한지숙 · 고윤웅

= Abstract =

The Effect of Stem Cell Factor on Secretion of Interleukin-1 β , Interleukin-4 and Tumor Necrosis Factor- α from CD34⁺ Acute Myelogenous Leukemia Blast Cells

Seok Lee, M.D., Yoo Hong Min, M.D., So Young Chong, M.D.
Jee Sook Hahn, M.D. and Yun Woong Ko, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Stem cell factor(SCF) has a preferential effect on the proliferation of several classes of immature hematopoietic progenitor cells in combination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) and/or interleukin(IL)-3. Secretion of immunomodulatory cytokines, such as IL-1 β , IL-4 and tumor necrosis factor(TNF)- α , may be important for regulation of proliferative responses in acute myelogenous leukemia(AML) blasts.

Material and Method: To analyze the costimulatory role of SCF in leukemic growth, we investigated the effect of SCF in the presence of GM-CSF and/or IL-3 on isolated CD34⁺ leukemic blasts from the bone marrows of 15 patients with AML and 10 normal persons by immunomagnetic bead method. Also we evaluated the correlation between the leukemic growth and the secretion of IL-1 β , IL-4 and TNF- α from CD34⁺ blasts in the presence of SCF.

Results:

- 1) In six cases(40%), CD34⁺ AML blasts responded with a significant increase in DNA synthesis and/or colony formation when SCF was used with GM-CSF and/or IL-3 relative to the growth with SCF alone; This result was compatible with those CD34⁺ normal bone marrow cells.
- 2) Spontaneous *in vitro* secretion of IL-1 β , IL-4 and TNF- α from CD34⁺ AML blasts showed a wide variation. SCF increased concentrations of IL-1 β , IL-4 and TNF- α in a minority of AML patients.

이 석: 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세의대 신촌 세브란스병원 내과의국
Tel: (02)361-7740, 7741, 7739, Fax: (02)363-7690

3) CD34⁺ AML blasts were cultured with SCF+GM-CSF, SCF+IL-3, and SCF+GM-CSF+IL-3, but a clear synergistic or additive effect of SCF on GM-CSF and/or IL-3 stimulated IL-1β, IL-4 and TNF-α secretion could not be detected.

Conclusion: Our results could support that the costimulating effect of SCF in the presence of GM-CSF and/or IL-3 was not related to the secretion of IL-1β, IL-4 and TNF-α from CD34⁺ AML blasts.

Key Words: Stem cell factor, CD34⁺ AML blasts, IL-1β, IL-4, TNF-α

서 론

급성 백혈병에서 백혈병세포의 무제한 증식은 정상적인 조혈 조절기전의 장애에 기인하며, 조혈전구 세포의 증식 및 분화를 자극하는 조혈인자의 조절 기전도 비정상적일 것으로 생각되고 있다^{1~3)}. 백혈병간세포에는 여러 종류의 cytokine, 특히 c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), interleukin(IL)-1, IL-3, IL-4, tumor necrosis factor(TNF)-α 등에 대한 수용체가 존재하며, 세포내 이들 cytokine을 합성할 수 있는 mRNA를 함유하고 있고, 분비능력까지 갖추고 있어, 백혈병 세포로부터의 골수계 조혈인자의 autocrine secretion 및 autonomous growth가 급성 백혈병 병태기전의 하나가 될 수 있음을 시사한다^{4~6)}. 또한 백혈병간세포로부터 IL-1, IL-4, TNF-α 등의 분비로 인한 조혈 미세환경 부세포(accessory cell)로부터의 G-CSF, GM-CSF의 합성촉진, 백혈병간세포와 골수내 부세포와의 부착이상 및 그것에 따른 비정상적인 조혈 조절기전 등이 제시되고 있다^{1,2,4,7~12)}.

최근 원시 조혈전구세포(primitive progenitor cells)에 작용하는 새로운 조혈인자가 밝혀졌는데, 이는 c-kit proto-oncogene에 의해 encoding되는 c-kit receptor의 ligand로 알려져 있으며, stem cell factor (SCF) 혹은 mast cell growth factor(MGF), steel factor(SF)로 불리워지고 있다^{13,14)}. SCF의 조혈조절 기전에서의 역할에 관해서는 연구가 진행중이며, 일부 실험 결과로 보아 원시 조혈전구세포의 자가갱

신 및 증식에 관여하는 것으로 생각되어지고 있다^{15~18)}. 반면 SCF 단독으로는 급성 골수성백혈병 (acute myelogenous leukemia; AML)세포의 증식을 매우 미약하게 증식시킬 뿐이며, 정상 조혈전구세포에 비해 GM-CSF, IL-3 추가에 의한 증식 상승효과는 현저히 적다고 일부 보고되고 있다^{19~21)}.

그러나 SCF의 급성 백혈병세포의 증식에 미치는 영향 및 그 작용기전을 보다 명확하게 규명하기 위해서는, 최근 CD34항원이 계통발생학적으로 다기능 조혈간세포 단계에서 클론유래되어 분화가 극히 제한된 특성을 가지고 있는 세포에서 발현된다고 보고된 바^{22~27)}, 이들 CD34⁺세포를 대상으로 연구하는 것이 타당하며, 동시에 백혈병세포의 증식에 직접 혹은 간접적으로 영향을 줄 수 있는 골수내 부세포를 제거해야 할 것으로 보인다.

따라서 본 연구는 정상 골수세포 및 급성 골수성 백혈병세포에서 CD34⁺세포를 immunomagnetic bead 방법으로 선택적으로 분리한 다음, SCF 단독 및 GM-CSF, IL-3와의 병용으로 CD34⁺세포를 자극하여 그 배양결과를 분석하고, SCF가 CD34⁺백혈병 세포의 증식에 미치는 영향 및 정상 CD34⁺세포에 보다 선택적으로 작용하는지를 검토하며, 또한 이들 각각의 배양상청액내 IL-1, IL-4, TNF-α 농도를 측정함으로써 IL-1, IL-4 및 TNF-α 농도와 CD34⁺세포의 증식과의 연관성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험은 치료를 시작하기 전 급성 골수성백혈

병으로 진단받은 15례의 골수세포를 대상으로 하였으며, 정상 골수세포는 10례의 동종 골수이식 공여자의 골수세포로 하였다.

2. 방법

1) 골수세포 처리

골수세포는 정상인과 초진시 급성 골수성백혈병 환자의 후상장골능에서 방부제가 없는 heparin(preservative-free heparin; Gibco, New York, USA)을 400U/mL되게 회석한 용액으로 Jamshidi needle 내부를 적신 다음 골수세포를 흡인 채취하였다. 흡인한 골수세포액에 즉시 1:2의 비율로 α -배양액(Gibco, New York, USA)을 첨가하여 회석한 다음, Lymphoprep(Nyegaard, Oslo, Norway; density 1.077g/cm³)이 들어 있는 시험관내에 조심스럽게 중층하였고, 골수단핵구층을 피펫으로 분리한 후 이를 400g에서 30분간 원심분리한 다음, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, New York, USA)이 첨가된 RPMI 배양액으로 3회 세척하였다. 세척 후 얻은 세포층을 10% FBS이 첨가된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM; Gibco, New York, USA)에 조심스럽게 부유시킨 다음 잘 혼합하였다. 세척한 후 CD2-conjugated immunomagnetic beads(Dynabeads M-450; Dynal A.S. Oslo, Norway) 방법에 의해 T-세포를 제거하였다. 이런 방법으로 T-세포를 제거한 골수세포는 항 CD3 단클론항체 면역표지자검사상 T-세포가 1% 이하이었고, 세포원침 및 Wright 염색을 통한 형태학적 관찰상 백혈병 아세포가 90% 이상이었다. 정상 골수단핵구는 IMDM에 부유한 $1 \times 10^7/10mL$ 세포를 25cm² 플라스틱 배양기에 넣고, 37°C에서 1시간동안 배양한 후 부착단구를 제거하여 실험을 진행시켰으며⁷⁾, 위의 방법으로 T-세포와 단구가 제거된 골수세포는 hemocytometer로 세포수를 계산하였다.

2) CD34⁺ 세포 분리

Lymphoprep density gradient centrifugation으로 골수단핵구를 분리하여 세포농도를 $1\sim4 \times 10^8$ 세포/mL로 맞춘 후, phosphate buffered saline(PBS; Gibco, New York, USA)에 0.5% 우혈청알부민(bu-

vine serum albumin; BSA, Gibco, New York, USA)과 5mM EDTA(Kokusan chemical works, Ltd. Tokyo, Japan)를 첨가하여 만든 완충액을 이용, 10^8 세포당 300 μ L의 비율로 부유시킨 다음, reagent A1(Fc-receptor blocking reagent; human IgG, Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)과 reagent A2(modified CD34 antibody; clone 8G12, IgG1, Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)를 각각 10^8 세포당 100 μ L의 비율로 첨가하여 조심스럽게 섞고 4°C에서 15분간 배양하였다. 배양 후 다시 10^8 세포당 완충액 5mL의 비율로 부유시켜서 300g로 5분간 원심분리시켜 세척하고 남은 완충액은 모두 제거한 후, 역시 10^8 세포당 완충액 400 μ L의 비율로 재부유시킨 다음, 이 세포층에 10^8 세포당 100 μ L의 비율로 reagent B(colloidal superparamagnetic MACS microbead, Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)를 첨가하여 조심스럽게 섞고 4°C에서 15분간 배양한 후, 다시 10^8 세포당 완충액 5mL의 비율로 부유시켜서 300g로 5분간 원심분리시켜 세척하고 남은 완충액을 모두 제거한 다음, 10^8 세포당 완충액 400 μ L의 비율로 재부유시켰다. MiniMACS separation column(Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)을 MiniMACS separation unit에 연결시키고 500 μ L의 완충액을 column에 통과시켜 표면을 건조하지 않은 상태로 유지시킨 후, 준비된 세포를 MiniMACS separation column에 넣어 통과시키고, 다시 500 μ L 완충액을 column에 4회 통과시켜 세척하여 15mL 원심분리용 시험관에 CD34⁻ 세포를 받아 내었다. 그후 MiniMACS separation column을 MiniMACS separation unit에서 분리시키고 column에 1mL의 완충액을 넣은 후, plunger를 사용하여 column의 내벽에 붙어 있는 CD34⁺ 세포를 1mL의 10% IMDM이 들어있는 15mL 원심분리용 시험관에 받아내고, 분리가 끝나면 CD34⁺ 세포군에서 0.01mL를 취하여 hemocytometer로 세포수를 계산하고, 10^6 의 세포를 이용하여 유식세포분석기를 통한 순수도(purity)를 확인하였다.

3) Immunophenotyping of CD34⁺ Cells

Lymphoprep density gradient centrifugation으로 분리한 골수 단핵세포를 대상으로 유식세포분석기

를 이용하여 CD34⁺세포 측정을 시행하였다. CD34⁺세포 측정은 FITC-conjugated 8G12 antibody(anti-HPCA-2; Becton Dickinson, CA, USA)를 이용한 direct immunofluorescence 방법을 사용하였다. 또한 CD33, HLA-DR, CD38, c-kit과 coexpression되는 CD34⁺세포는 anti-Leu-M9(CD33)-PE, anti-HLA-DR-PE(all from Becton Dickinson, CA, USA), anti-c-kit-PE(from Immunotech)을 anti-HPCA-2(CD34)-FITC와 동시에 배양시킴으로써 그 결과를 측정하였다. 배양 후 0.1% sodium azide/PBS로 2회 세척한 다음, 488nm, 0.3W로 조정된 argon-ion laser가 장착된 FACStar^{PLUS}(Becton Dickinson, CA, USA)를 이용한 유식세포분석을 시행하였고, 그 결과는 LYSIS II software(Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

4) 배양결과 측정

(1) recombinant human(rh)SCF, rhGM-CSF, rhIL-3
본 실험에 사용된 rhSCF(Genzyme: Cambridge, MA, USA: 1×10^5 units/mg), rhGM-CSF(Lucky BioTech, Seoul, Korea: 3×10^7 units/mg) 및 rhIL-3(Genzyme: Cambridge, MA, USA: 1×10^5 units/mg)는 각각 50ng/mL, 5ng/mL, 50ng/mL이었다.

(2) Proliferation assay: rhSCF, rhGM-CSF 단독 혹은 병용에 의한 CD34⁺ 백혈병세포 및 정상세포의 분열증식은 ³H-thymidine incorporation assay로 측정하였다. 요약하면 적절한 농도의 조혈인자가 들어있는 바닥이 편평한 96 well microtiter plates(Greiner, Netherland)에 well당 5×10^3 개씩 분주하여 1주일동안 37°C하에 5% CO₂ 배양기에서 배양한 CD34⁺세포를 0.5μCi ³H-thymidine(25Ci/mmol: Amersham, Braunschweig, Germany)에 4시간동안 노출시킨 후, glass fiber strip에 harvest하여 scintillation counter(Packrad, Frankfurt, Germany)로 결합능(radioactivity)을 측정하였으며, 이 모든 실험은 삼중복하여 시행하였다.

(3) Clonogenic assay(조혈전구세포배양): Methylcellulose방법²⁸⁾을 사용하였으며, 약술하면 배양액은 1.0% methylcellulose(Methocel 4,000cps, Fluka, Germany), 20% heat-inactivated FBS, 0.8% dialyzed

bovine serum albumin(BSA)(Sigma, St. Louis, MO), 10⁻⁴M 2-mercaptoethanol(Sigma)이 포함된 IMDM을 사용하였고, methylcellulose의 최종농도는 1.1%(wt/vol)로 하였다. 완전습윤된 5% CO₂ 배양기에서 37°C하에 배양한 다음, 14일째 역위현미경하에서 세포수 40개 이상으로 구성된 세포집락을 산정하였으며, 이 모든 실험은 삼중복하여 그 평균치를 구하였다.

5) 배양상청액내 IL-1β, IL-4, TNF-α 측정

배양상청액은 1,200g로 15분간 원심분리한 다음, -70°C에 냉동보관하였다가 녹여서 사용하였다. ELISA kit(R&D System; Minneapolis, MN)방법을 이용하여 상청액내 IL-1β, IL-4, TNF-α치를 측정하였으며, 이들의 증가에 대한 기준은 spontaneous secretion된 측정치의 110%로 하였고, 이 모든 실험은 삼중복하여 시행하였다.

3. 통계 분석

모든 자료값은 평균±표준오차로 처리하였으며, SCF가 CD34⁺백혈병세포의 증식에 미치는 영향 및 SCF의 투여에 따른 IL-1, IL-4, TNF-α 농도와 CD34⁺세포의 증식과의 연관성은 비모수통계(non-parametric test; Mann-Whitney)와 윌콕슨검정(Wilcoxon's test)를 시행하였다.

결 과

1. CD34⁺세포 분리

급성 골수성백혈병환자 15례와 정상인 10례의 골수를 대상으로 유식세포분석기를 이용하여 CD34⁺세포를 분석한 결과, 급성 골수성백혈병에서 35.9±29.0%이었고, immunomagnetic bead를 이용하여 분리한 CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포의 순수도는 87.2±12.4%이었고, 정상 골수에서는 86.2±14.3%이었다. 이를 Double-color fluorescence analysis한 결과, 분리된 대부분의 CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포는 HLA-DR(87.2±20.6%), CD38(86.2±15.5%)과 함께 발현되었으며, CD33과 c-kit의 동시발현정도는 각각 49.5±35.9%와 33.3±28.6%이었다. 정상

골수에서도 대부분의 CD34⁺세포가 HLA-DR, CD38과 함께 발현되었으며, CD33과 c-kit의 동시발현 정도는 각각 40.1±15.8%, 24.4±8.3%로 CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포의 경우와 비슷한 결과를 보였다(Table 1).

2. Stem Cell Factor 단독 혹은 GM-CSF, IL-3와의 병용자극이 CD34⁺ 급성 백혈병 세포의 증식에 미치는 영향

Immunomagnetic bead로 분리한 CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포를 SCF 단독 투여로 배양한 결과, 전체 15례중 10례(66.7%)에서 DNA 합성을 증가시켰으며(stimulation index ≥ 1.8), 8례(53.3%)에서 세포

집락형성의 증가를 보였다(stimulation index ≥ 1.8). 이는 DNA 합성 및 세포집락형성에 있어서 GM-CSF 단독배양시 각각 10례(66.7%)와 9례(60.0%), IL-3 단독배양시 각각 8례(53.3%)와 6례(40.0%)에서 증가를 보인 것과 비교할 때, SCF가 백혈병세포의 증식에 있어서 GM-CSF 혹은 IL-3 단독배양보다 높은 효과를 보이지는 않았다. 한편 GM-CSF 혹은 IL-3의 존재하에서 SCF의 CD34⁺백혈병세포의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위해서 상승효과의 유무에 대한 기준으로 SCF, GM-CSF, IL-3 각각 단독배양에 의한 DNA 합성 및 세포집락형성 측정치를 합한 수치보다 1.3배 이상 증가하는 것을 원칙으로 하였다. 그 결과, 6례(40%)에서는 SCF 단독에 비

Table 1. Phenotype Analysis of CD34⁺ Acute Myelogenous Leukemic Blasts after Immunomagnetic Isolation

UPN	FAB	CD34 ⁺ (Pre)*	CD34 ⁺ / HLA-DR ⁺ (%)	CD34 ⁺ / CD38 ⁺ (%)	CD34 ⁺ / CD33 ⁺ (%)	CD34 ⁺ / c-kit ⁺ (%)
1	M1	34.1	97.8	96.8	19.6	53.6
2	M2	45.1	ND	ND	ND	67.5
3	M1	86.4	45.6	82.5	1.2	0.2
4	M4	9.8	99.5	50.0	78.5	42.5
5	M2	61.8	98.6	99.9	51.8	20.7
6	M2	79.4	96.8	72.0	2.9	3.7
7	M5	15.6	89.5	95.1	73.5	73.1
8	M4	1.7	95.5	91.3	14.9	21.0
9	M2	5.2	93.3	96.1	77.5	89.9
10	M2	81.2	99.7	99.9	95.2	8.9
11	M1	38.0	46.1	92.3	93.1	44.1
12	M6	11.2	97.3	72.8	36.9	1.0
13	M2	22.4	ND	ND	ND	45.4
14	M2	12.5	ND	ND	ND	21.0
15	M2	34.5	ND	ND	ND	7.5
Total	Mean	35.9	87.2	86.2	49.5	33.3
	SD	29.0	20.6	15.5	35.9	28.6
Control (n=10)	Mean		86.5	78.7	40.1	24.4
	SD		17.4	12.6	15.8	8.3

UPN: Unique patient number.

* CD34⁺ (Pre): percentage of CD34-positive acute myelogenous leukemic blasts in bone marrow mononuclear cells before purification of CD34-positive cells.

% of cells expressing the indicated surface molecule.

ND: not done.

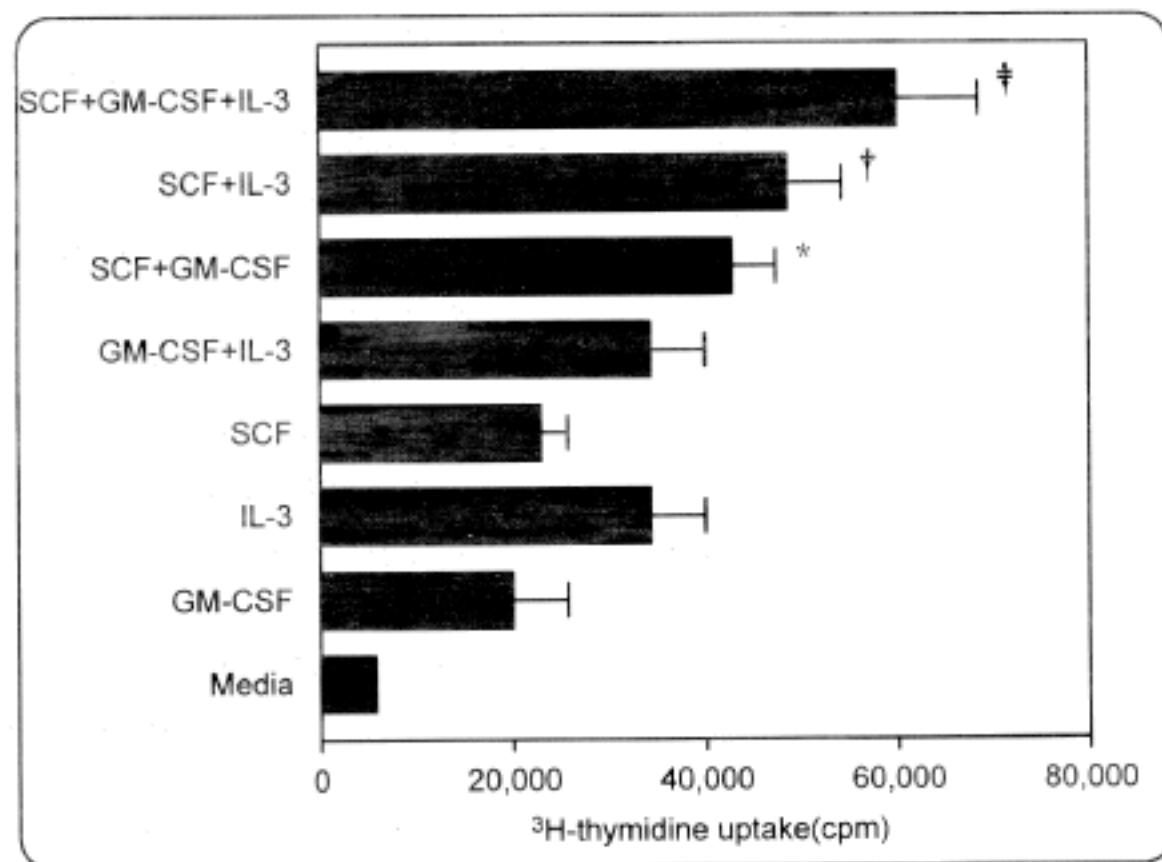


Fig. 1. Effect of SCF alone and in the presence of GM-CSF and/or IL-3 on thymidine uptake from isolated bone marrow $\text{CD}34^+$ cells from normal donors. Results reflect the mean number of ${}^3\text{H}$ -thymidine incorporation(cpm)±SD of ten experiments after 7-day incubation. *, SCF vs SCF+GM-CSF, $P<0.001$; †, SCF vs SCF+IL-3, $P<0.001$; ‡, SCF vs SCF+GM-CSF+IL-3, $P<0.001$.

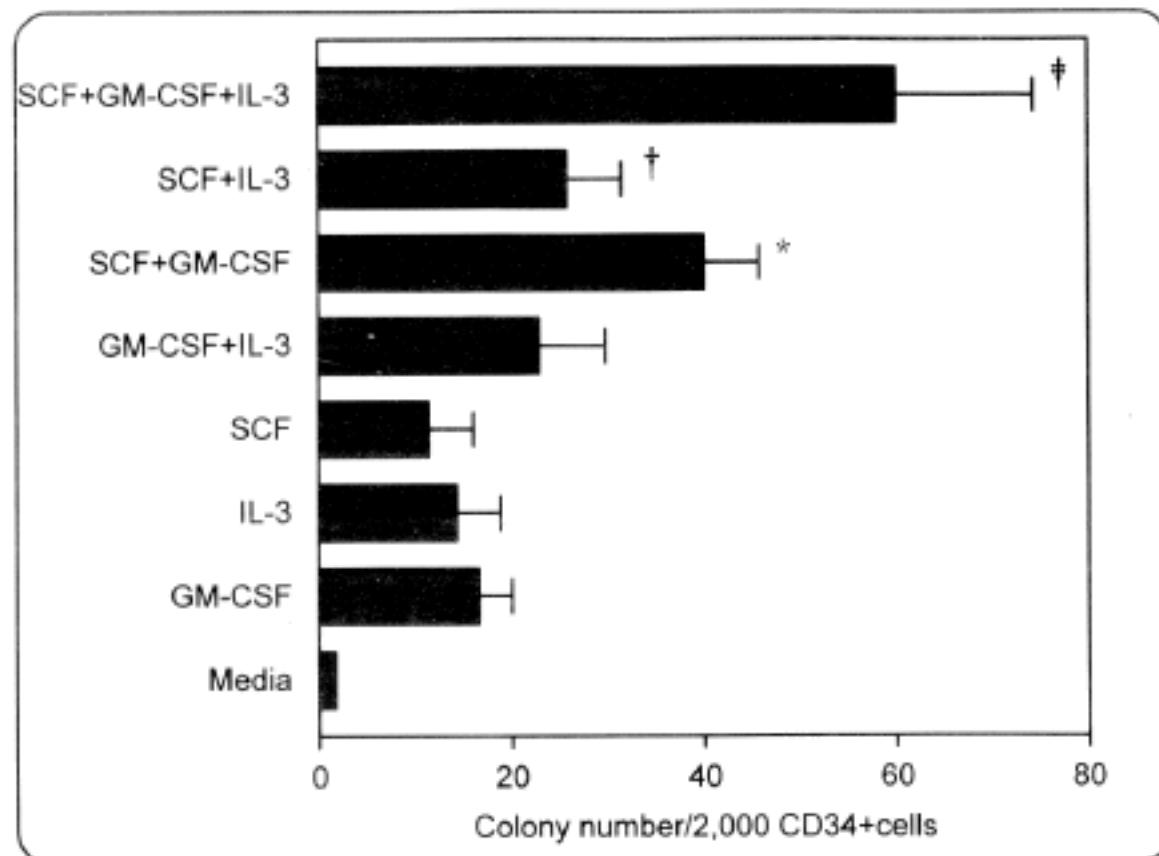


Fig. 2. Effect of SCF alone and in the presence of GM-CSF and/or IL-3 on colony formation from isolated bone marrow $\text{CD}34^+$ cells from normal donors. $\text{CD}34^+$ cells were plated at 2,000 cells per mL in methylcellulose culture media. Results reflect the mean number of colonies+SEM of 10 experiments scored after 14-day incubation. *, SCF vs SCF+GM-CSF, $P<0.001$; †, SCF vs SCF+IL-3, $P<0.001$; ‡, SCF vs SCF+GM-CSF+IL-3, $P<0.001$.

Table 2. Response of CD34⁺ Acute Myelogenous Leukemic Blasts to the Costimulating Effects of Stem Cell Factor

Unique Patient Number	Growth [†] of CD34 ⁺ AML cells stimulated with						
	Nothing	GM-CSF	IL-3	SCF	SCF+GM-CSF	SCF+IL-3	SCF+GM-CSF+IL-3
Costimulating Responders*							
1 ³ H-TdR uptake(cpm)	687	3,586	912	706	7,907	1,319	10,725
No. of colony	0	5	2	3	10	3	8
2 ³ H-TdR uptake	620	2,652	3,093	1,290	15,504	33,716	36,996
No. of colony	0	5	3	3	13	5	18
4 ³ H-TdR uptake	6,181	45,028	25,115	14,033	61,950	44,076	73,853
No. of colony	0	3	0	2	20	0	23
7 ³ H-TdR uptake	587	1,038	13,824	2,943	719	17,953	736
No. of colony	0	5	17	3	15	60	112
13 ³ H-TdR uptake	497	1,149	1,388	383	1,526	4,050	6,956
No. of colony	0	22	8	13	75	23	90
14 ³ H-TdR uptake	7,286	4,939	6,854	4,568	4,489	1,497	5,989
No. of colony	0	8	18	7	75	23	90
Costimulating Nonresponders*							
3 ³ H-TdR uptake(cpm)	524	6,737	800	4,177	3,308	2,660	2,502
No. of colony	0	0	0	0	0	0	0
5 ³ H-TdR uptake	171	627	3,532	2,111	469	3,636	476
No. of colony	0	3	0	2	3	0	4
6 ³ H-TdR uptake	10,021	5,501	16,843	12,230	1,850	21,864	1,683
No. of colony	625	0	0	0	0	0	0
8 ³ H-TdR uptake	0	979	1,111	4,171	947	515	1,176
No. of colony	0	3	0	0	5	0	4
9 ³ H-TdR uptake	707	1,001	966	2,391	588	2,535	578
No. of colony	0	0	0	0	0	0	1
10 ³ H-TdR uptake	217	7,291	170	4,966	2,865	2,472	1,118
No. of colony	0	0	0	0	0	1	1
11 ³ H-TdR uptake	1,830	3,193	10,211	7,347	6,421	11,176	9,159
No. of colony	0	0	0	0	0	0	0
12 ³ H-TdR uptake	2,853	1,175	10,285	8,124	1,566	2,222	2,028
No. of colony	125	190	175	262	278	273	250
15 ³ H-TdR uptake	1,111	755	1,623	1,610	1,068	1,736	1,161
No. of colony	0	0	0	0	0	0	0

AML: Acute myelogenous leukemia

* The terms costimulating responders and nonresponders refer to patients whose DNA synthesis and/or colony formation responded or did not respond to the costimulating effect of stem cell factor(SCF) respectively.

† CD34⁺ AML blasts were cultured in IMDM culture medium(5×10^3 cells/mL) in the presence or absence of various CSFs(see Material and Methods). Cells were pulsed with [³H] thymidine for the last 4 hours of 7-day incubation.

The CD34⁺ AML blasts were incubated at a concentration of 2×10^3 cells/mL with individual CSFs. After 14 days of incubation, colonies(≥ 40 cells/group) were counted.

Data are shown as the median value in triplicate experiments.

해 DNA 합성(SCF alone: $3,987 \pm 5,164$ vs SCF+GM-CSF: $15,349 \pm 23,452$ vs SCF+IL-3: $17,101 \pm 18,262$ vs SCF+GM-CSF+IL-3: $22,542 \pm 28,191$) 및 세포집락형성(SCF alone: 5 ± 4 vs SCF+GM-CSF: 19 ± 22 vs SCF+IL-3: 34 ± 31 vs SCF+GM-CSF+IL-3: 56 ± 45)에 있어서 상승효과를 보였으며 ($P < 0.05$), 이는 정상 CD34⁺세포에서의 결과와 유사하였고(Fig. 1, 2), 나머지 9례(60%)에서는 SCF 단독에 비해 GM-CSF 혹은 IL-3와의 병용자극에 의한 세포증식에 있어서 상승효과를 관찰할 수 없었다(Table 2).

또한 SCF에 의해 costimulating effect를 보였던 6례(UPN #1, 2, 4, 7, 13, 14)를 대상으로 CD33, HLA-DR, CD38 및 c-kit항원의 coexpression과의 연관성을 살펴본 결과, CD33, HLA-DR, CD38의 coexpression과는 연관성이 없었다(Table 1). 단, CD34⁺/c-kit⁺백혈병세포는 SCF의 costimulating effect를 보였던 경우에서 $50.5 \pm 18.7\%$ 로 SCF의 costimulating effect가 없었던 경우에서의 $21.8 \pm 19.4\%$ 에 비해 높은 빈도를 보였으며($P < 0.05$), 특히 40% 이상의 높은 c-kit항원의 발현을 보였던 7례(UPN #1,

2, 4, 7, 9, 11, 13) 중 5례(UPN #1, 2, 4, 7, 13)(71%)에서 SCF의 costimulating effect를 관찰할 수 있었다(Table 1, 2).

3. CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포에서의 IL-1 β , IL-4 및 TNF- α 의 Spontaneous Secretion

급성 골수성백혈병환자의 골수 8례를 대상으로 CD34⁺백혈병세포로부터 IL-1 β , IL-4, TNF- α 의 spontaneous secretion을 측정한 결과, 환자마다 이질적인 양상을 보였는데, 전 예에서 IL-1 β 는 5.80 ± 1.44 pg/mL(range 4.20~7.30 pg/mL), IL-4는 10.51 ± 4.90 pg/mL(range 6.12~20.40 pg/mL)가 분비되었으며, TNF- α 는 8례중 3례에서(각각 1.00, 26.70, 30.00 pg/mL) 분비되었다. 이는 정상 골수에서의 분비양상(IL-1 β : 5.59 ± 3.91 , IL-4: 15.30 ± 8.39 , TNF- α : 6.50 ± 7.55)과 차이가 없었으며, 또한 CD34⁺백혈병세포로부터 분비되는 IL-1 β , IL-4, TNF- α 와 자가증식(spontaneous proliferation)과는 서로 연관성이 없었다(Table 3).

Table 3. Spontaneous *in vitro* Cytokine Production and Proliferation for Blast Cells Derived from AML Patients

Unique Patient Number	Spontaneous cytokine production*			Spontaneous <i>in vitro</i> proliferation†
	IL-1 β	IL-4	TNF- α	
Costimulating responders				
1	5.00	6.12	0	687
4	5.67	7.00	0	6,181
13	7.30	6.80	30.00	497
Costimulating nonresponders				
6	8.60	11.00	0	10,021
8	5.00	7.00	1.00	625
10	4.96	12.20	0	217
11	5.67	13.60	0	1,830
15	4.20	20.40	26.70	2,853
Mean	5.80	10.51	7.21	2,863
Control(n=10)	5.59	15.30	6.50	6,017

* Cytokine concentration(pg/mL) in culture supernatants are expressed as median of triplicate analyses.

† 3 H-thymidine incorporation expressed as median counts per minute of triplicate cultures.

4. Stem Cell Factor 단독 혹은 GM-CSF, IL-3와의 병용자극이 CD34⁺ 급성 백혈병 세포의 IL-1β, IL-4 및 TNF-α 분비에 미치는 영향

Spontaneous secretion된 측정치의 110%를 IL-1β,

IL-4, TNF-α 분비가 증가된 것으로 판단하였을 때, SCF 단독에 의한 IL-1β, IL-4, TNF-α 분비는 각각 전 예의 50%, 50%, 12.5%에서 증가되었고, 정상 골 수에서는 각각 전 예의 25%, 0%, 0%에서 증가되었으나 양군간의 유의한 차이는 없었으며, SCF의 costimulating effect 유무와 IL-1β, IL-4, TNF-α 분비

Table 4. The Effect of Stem Cell Factor on Secretion of IL-1β from CD34⁺ AML Blasts

Unique Patient Number	IL-1β production* from CD34 ⁺ AML cells stimulated with					
	GM-CSF	IL-3	SCF	SCF+GM-CSF	SCF+IL-3	SCF+GM-CSF+IL-3
Costimulating responders						
1	9.40	4.80	5.42	6.50	4.90	6.00
4	34.60	5.16	5.35	7.74	5.40	8.38
13	6.00	72.00	8.70	88.00	72.40	172.00
Costimulating nonresponders						
6	9.40	8.90	8.00	13.50	8.30	13.40
8	16.20	14.60	6.00	16.20	9.70	22.60
10	5.40	4.64	4.64	4.38	4.00	4.30
11	5.67	5.90	75.30	5.30	6.64	5.70
15	27.68	8.25	15.40	34.40	17.60	29.00
Mean	14.29	15.53	16.10	16.12	30.29	32.67
Control(n=10)	6.61	5.20	6.54	7.46	6.42	5.52

* IL-1β concentration(pg/mL) in culture supernatants are expressed as median of triplicate analyses.

Table 5. The Effect of Stem Cell Factor on Secretion of IL-4 from CD34⁺ AML Blasts

Unique Patient Number	IL-4 production* from CD34 ⁺ AML cells stimulated with					
	GM-CSF	IL-3	SCF	SCF+GM-CSF	SCF+IL-3	SCF+GM-CSF+IL-3
Costimulating responders						
1	13.60	5.40	9.50	15.00	9.50	15.00
4	17.70	7.00	13.60	16.30	11.00	9.50
13	12.20	12.20	7.00	16.30	11.00	12.20
Costimulating nonresponders						
6	13.60	11.00	15.00	12.20	8.80	13.60
8	5.40	12.20	15.00	5.40	12.20	5.40
10	9.50	0	12.20	11.00	12.20	11.00
11	7.00	11.00	11.00	6.80	7.00	5.40
15	12.20	15.00	15.00	20.40	12.20	16.30
Mean	9.22	10.49	11.05	12.29	12.93	13.51
Control(n=10)	10.62	15.95	10.95	10.60	11.65	10.00

* IL-4 concentration(pg/mL) in culture supernatants are expressed as median of triplicate analyses.

Table 6. The effect of Stem Cell Factor on Secretion of TNF- α from CD34 $^{+}$ AML Blasts

Unique Patient Number	TNF- α production* from CD34 $^{+}$ AML cells stimulated with					
	GM-CSF	IL-3	SCF	SCF+GM-CSF	SCF+IL-3	SCF+GM-CSF+IL-3
Costimulating responders						
1	0	0	0	0	0	0
4	11.00	0	15.00	0	18.00	0
13	27.00	0	8.00	31.00	26.30	32.00
Costimulating nonresponders						
6	27.00	0	0	26.00	0	0
8	0	0	0	0	0	0
10	13.00	0	0	15.00	0	0
11	0	0	0	0	0	0
15	26.30	26.30	0	28.00	0	0
Mean	2.88	3.29	4.00	5.54	12.50	13.04
Control(n=10)	12.00	3.50	2.50	4.25	6.75	6.00

* TNF- α concentration(pg/mL) in culture supernatants are expressed as median of triplicate analyses.

정도와의 연관성도 관찰되지 않았다. 또한 CD34 $^{+}$ 급성 골수성백혈병세포를 SCF+GM-CSF, SCF+IL-3, SCF+GM-CSF+IL-3와 함께 배양한 결과, 이들에 의한 IL-1 β (Table 4), IL-4(Table 5), TNF- α (Table 6) 분비에 있어서의 상승효과는 정상 골수에서와 마찬가지로 관찰되지 않았다.

고 찰

백혈병전구세포의 배양시 GM-CSF, G-CSF, IL-3 등 조혈인자는 백혈병세포의 집락형성을 증가시킬 수 있다. 따라서 재생불량성 빈혈, 과립구감소증후군, 항암화학요법 및 골수이식후 백혈구 회복을 촉진하여 과립구 감소기간을 단축시킬 목적으로 활발하게 시도되고 있는 GM-CSF, G-CSF, IL-3 등을 백혈병환자에게 투여시 백혈병세포의 증식이 초래될 가능성이 있다. 백혈병환자의 치료에서 가장 큰 문제가 되는 것은 백혈구감소증에 따른 재발 및 감염증이므로, 잔여 정상 조혈간세포에만 선택적으로 작용하여 골수회복을 촉진하는 조혈인자가 밝혀진다면 감염증에 따른 사망률을 줄이고, 동시에 감수성이 있는 화학요법제의 용량을 보다 강화시킴으로써

재발을 낮춰 백혈병의 치료성적을 향상시킬 수 있을 것이다.

최근 새로운 조혈인자로 밝혀진 SCF는 *c-kit* proto-oncogene에 의해 encoding되는 *c-kit* receptor의 ligand로 알려져 있다^{13,14)}. 정상 조혈기전내에서의 SCF의 역할은 아직 확실치 않으나, Pre-colony-forming unit(CFU)인 CD34 $^{+}$ lin 세포의 증식을 유도하고, GM-CSF, IL-3, GM-CSF/IL-3 fusion protein과 같이 배양시 미숙한 조혈전구세포인 high proliferative potential colony-forming cells(HPP-CFC)를 증가시키며, IL-3에 비해 CFU-Mix 형성능력 및 replating efficiency가 크고, 또한 동물에 SCF를 투여시 CD 34 $^{+}$ 세포가 크게 증가하였던 실험결과로 볼 때, 원시 조혈간세포의 자가갱신 및 증식에 영향을 미치는 조혈인자로 생각되고 있다^{15~18)}.

한편 백혈병세포의 증식에 있어서 SCF의 역할에 대해서는 현재까지 확실치는 않지만, 급성 골수성백혈병세포에서 상당부분 *c-kit* 수용체가 발현되고 이를 세포주로부터 SCF가 분비되는 것으로 보아, *c-kit* 수용체-SCF axis가 급성 골수성백혈병의 조혈기전에 중요한 역할을 담당할 것으로 추측되고 있다^{19~21)}. 그러나 실제로 SCF로 자극시 백혈병세포의

배양상은 이질적(heterogeneous)이며, SCF 단독으로는 급성 골수성백혈병전구세포의 증식을 매우 미약하게 증식시킬 뿐이고, 정상 조혈전구세포에 비해 GM-CSF, IL-3의 추가에 의한 상승효과가 현저히 적다^{5,29,30)}. 이러한 백혈병세포간의 이질적인 배양상 및 정상 조혈간세포와의 차이는 급성 백혈병세포의 이질적인 클론유래에 일부 기인한다고 생각되는바, 지금까지 증식분화된 백혈병세포를 대상으로 하였던 연구와는 달리 미숙한 조혈간세포에서 클론유래된 것으로 생각되는 CD34⁺백혈병세포에 대한 SCF의 작용을 선택적으로 검토하는 것이 CD34⁺백혈병세포의 계통발생 연구, 생물학적 성상 및 SCF의 백혈병세포 증식에 대한 역할을 규명하는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서 정상 CD34⁺세포에서는 SCF의 투여에 의한 증식 상승효과 및 GM-CSF와 IL-3에 의한 costimulating effect가 관찰됨으로써 다른 보고와 유사한 결과를 보였다^{15~18)}. 한편 CD34⁺ 급성 골수성 백혈병세포를 SCF만으로 배양한 결과, 전체 15례 중 10례(66.7%)에서 DNA 합성을 증가시켰으며, 8례(53.3%)에서 세포집락형성의 증가를 보았다. 이는 GM-CSF 단독배양에 의한 백혈병세포의 증식과 비교할 때 보다 높은 효과를 보이지는 않았다. 또한 GM-CSF 혹은 IL-3의 존재하에 SCF의 CD34⁺백혈병세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과, 6례(40%)에서는 SCF 단독에 비해 DNA 합성 및 세포집락형성에 있어서 상승효과를 보였으며, 이는 정상 CD34⁺세포에서의 결과와 유사한 반면, 나머지 9례(60%)에서는 세포증식의 효과를 관찰할 수 없었다. 이와 같이 상당부분의 CD34⁺백혈병세포가 SCF에 의한 costimulating effect가 없는 이유로 몇가지를 생각해 볼 수 있다. 첫째, 백혈병세포 자체의 SCF-수용체의 결핍 혹은 낮은 발현정도에 기인할 것으로 추측할 수 있으며, 실제로 SCF에 의해 costimulating effect를 보였던 6례를 대상으로 *c-kit*항원의 coexpression과의 연관성을 살펴본 결과, CD34⁺/*c-kit*⁺백혈병세포는 SCF의 costimulating effect를 보였던 경우에서 50.5±18.7%로 SCF의 costimulating effect가 없었던 경우에서의 21.8±19.4%에 비

해 높은 빈도를 보였으며, 특히 40%이상의 높은 *c-kit*항원의 발현을 보였던 7례중 5례(71%)에서 SCF의 costimulating effect를 관찰할 수 있었다. 이 상으로 CD34⁺백혈병세포에서 *c-kit*항원의 발현정도가 SCF의 costimulating effect와 상당한 연관성이 있음을 시사한다 하겠으나, 이를 세포중 대부분이 HLA-DR 또한 양성으로 표현되었다. 따라서 정확한 SCF의 작용기전을 규명하기 위해서는 보다 원시적인 백혈병전구세포, 즉 CD34⁺*c-kit*⁺HLA-DR⁻에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 보인다. 둘째, 정상 CD34⁺세포에 비해 *c-kit* 수용체의 post-transcriptional regulation과 signal transduction 과정에서의 비정상적인 ligand-수용체간의 상호작용에 기인할 가능성을 생각해 볼 수 있다. 또한 다른 여러가지 cytokine modulation에 의한 영향도 배제할 수 없다⁶⁾.

현재까지 백혈병세포의 증식 기전에 관해 확실히 정립된 바는 없지만 일부 보고들에 의하면 여러 종류의 cytokine, 특히 IL-1, IL-4, TNF- α 등이 백혈병조혈간세포의 증식에 관여하며, 이들에 의해 다른 cytokine(GM-CSF, G-CSF)의 분비에 영향을 미치는 것으로 생각되어지고 있고, 이에 대한 계속적인 실험 및 연구가 진행중이다^{28,31~33)}. 따라서 보다 미숙한 조혈간세포에서 클론유래된 백혈병간세포 및 정상 조혈간세포를 대상으로 SCF가 세포의 증식에 미치는 영향 및 그 기전을 규명할 수 있는 한가지 방법으로, 배양상청액내의 cytokine(IL-1, IL-4, TNF- α) 농도를 측정함으로써 SCF가 세포의 증식에 직접적 혹은 간접적으로 작용하는지를 규명할 수 있으리라 기대된다.

본 연구에서 SCF를 비롯한 다양한 조합의 cytokine 존재하에 CD34⁺백혈병세포로부터 분비되는 IL-1 β , IL-4, TNF- α 를 배양상청액에서 측정한 결과, 매우 다양한 범위의 측정치를 보였다. 이러한 결과의 원인으로는 우선 사용 가능한 cytokine의 농도가 IL-1, TNF- α 수용체를 갖고 있는 CD34⁺백혈병세포의 증식에 의해 소모되는 정도에 따라 영향을 받을 수 있으며, cytokine-의존 세포의 증식이 주로 배양 후 첫 4일 이내에 이루어지는 점 등을 생각해 볼 수

있다^{34,35)}. 또한 측정 당시 골수단핵구중 CD34⁺백혈병세포의 생존율 혹은 그 숫자 자체의 차이를 고려할 수 있는데³⁵⁾, 모든 배양이 현미경하에 정확도를 가지고 시행되었으며, 실제로 살아 있는 세포수에 있어서도 차이가 없었음을 감안할 때, 이러한 이유보다는 오히려 환자마다 각기 다른 백혈병세포 자체의 이질적 특성 때문일 것으로 판단된다.

요약하면 SCF 단독 및 다른 조혈인자의 병용투여 시 백혈병전구세포의 증식에 미치는 영향은 정상 조혈전구세포에 비해 미약하게 보이며, SCF의 작용과 백혈병전구세포에서의 IL-1 β , IL-4, TNF- α 의 분비정도와는 연관성이 없었다. 결론적으로 백혈병전구세포의 이질적 특성을 고려해 볼 때, SCF가 백혈병세포에 작용하는 기전 및 cytokine 요법의 가능성의 규명, 그리고 정상 원시조혈간세포의 증식에 보다 선택적으로 작용하여 항암화학요법 혹은 골수이식시 초기 조혈기능의 회복 및 CD34⁺세포를 이용한 조혈간세포 이식술의 활성화에 일부 일익을 담당할 수 있을 가능성을 밝히기 위해서는 보다 원시조혈전구세포인 CD34⁺lin⁻ 세포를 대상으로 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

연구배경: 백혈병간세포에서는 여러 종류의 cytokine, 특히 IL-1, IL-4, tumor necrosis factor(TNF)- α 등에 대한 수용체가 존재하며, 세포내 이들 cytokine을 합성할 수 있는 mRNA를 함유하고 있고, 분비능력까지 갖추고 있어, 백혈병세포로부터의 골수계 조혈인자의 autocrine secretion 및 autonomous growth가 급성 백혈병 병태기전의 하나가 될 수 있음을 시사한다. Stem cell factor는 정상 골수내에서 원시 조혈전구세포의 자가갱신 및 증식에 관여하며, GM-CSF, IL-3와 함께 배양시 증식 상승효과가 있는 것으로 알려져 있다.

재료 및 방법: 급성 골수성백혈병으로 진단받은 환자 15례 및 정상인 10례의 골수세포를 대상으로, 이중 CD34⁺세포를 immunomagnetic bead 방법으로 선택적으로 분리한 다음, SCF 단독 및 GM-CSF,

IL-3와의 병용으로 CD34⁺세포를 자극하여 그 배양 결과를 분석하여, SCF가 CD34⁺백혈병세포의 증식에 미치는 영향 및 정상 CD34⁺세포에 보다 선택적으로 작용하는지를 검토하였다. 또한 이들 각각의 배양상청액내 IL-1 β , IL-4, TNF- α 농도를 측정함으로써 IL-1 β , IL-4 및 TNF- α 농도와 CD34⁺세포의 증식과의 연관성을 조사하였다.

결과:

- 1) Immunomagnetic bead 방법으로 분리한 15례의 CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포를 SCF 단독 및 GM-CSF±IL-3와 같이 배양한 결과, 6례(40%)에서 SCF 단독에 비해 SCF+GM-CSF, SCF+IL-3, SCF+GM-CSF+IL-3의 경우 백혈병세포의 DNA 합성 및 세포집락형성에 있어서 상승효과를 보였으며, 이는 정상 CD34⁺ 조혈전구세포에서의 결과와 유사하였다.
- 2) CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포로부터 IL-1 β , IL-4, TNF- α 의 spontaneous secretion은 환자마다 이질적인 양상을 보였으며, SCF에 의한 IL-1 β , IL-4, TNF- α 분비의 증가는 일부 백혈병환자에서만 관찰되었다.
- 3) SCF에 GM-CSF±IL-3를 추가시, IL-1 β , IL-4, TNF- α 의 분비에 있어서 GM-CSF, IL-3에 의한 상승효과는 없었다.

결론: 이상의 결과로 SCF 투여에 의한 CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포의 증식에 있어서 GM-CSF 및 IL-3에 의한 증식 상승효과는 관찰되지 않았으며, CD34⁺ 급성 골수성백혈병세포로부터 IL-1 β , IL-4, TNF- α 의 분비정도와도 연관성이 없었다.

참 고 문 헌

- 1) Oster W, Cicco NA, Klein H, Hirano T, Kishimoto T, Lindemann A, Mertelsmann RH, Herrmann F: Participation of the cytokines interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin 1-beta secreted by acute myelogenous leukemia blasts in autocrine and paracrine leukemia growth control. *J Clin Invest* 84:451-

- 457, 1989
- 133-137, 1990
- 2) Russell NH: *Autocrine growth factors and leukemic hematopoiesis*. *Blood* 6: 149-156, 1992
 - 3) Asano H, Hotta T, Ichihara M, Murate T, Kobayashi M, Saito H: *Growth analysis of marrow CD34-positive hematopoietic progenitor cells in patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia* 8:833-838, 1994
 - 4) Brach MA, Buhring HJ, Ashman LK, Ludwig WD, Mertelsmann RH, Herrmann F: *Functional expression of c-kit by acute myelogenous leukemia blasts is enhanced by tumor necrosis factor- α through posttranscriptional mRNA stabilization by a labile protein*. *Blood* 85:1224-1230, 1992
 - 5) Goselink HM, Williams DE, Fibbe WE, Wessels HW, Beverstock GC, Willemze R, Faikenburg JH: *Effects of mast cell growth factor(c-kit ligand) on clonogenic leukemic precursors cells*. *Blood* 80:750-757, 1992
 - 6) Budel LM, Delwel R, Buitenen CV, Hoogerbrugge H, Lowenberg B: *Effects of mast cell growth factor on acute myeloid leukemia cells in vitro*. *Leukemia* 7:426-434, 1993
 - 7) Delwel R, Buitenen CV, Salem M, Bot F, Gillis S, Kaushansky K, Altrock B, Lowenberg B: *Interleukin-1 stimulates proliferation of acute myeloblastic leukemia cells by induction of granulocyte-stimulating factor release*. *Blood* 74: 586-593, 1989
 - 8) Bot FJ, Schipper P, Broeders L, Delwel R, Kaushansky K, Lowenberg B: *Interleukin-1 α also induces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in immature normal bone marrow cells*. *Blood* 76: 307-311, 1990
 - 9) Murohashi I, Tohda S, Suzuki T, Nagata K, Yamashita Y, Nara N: *Mechanism of action of interleukin-1 on the progenitors of blast cells in acute myeloblastic leukemia*. *Exp Hematol* 18:
 - 10) Rodriguez JC, Beauchemin V, Villeneuve L, Letendre F, Shaw A, Hoang T: *Coordinate secretion of interleukin-1 β and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: Role of interleukin-1 as an endogenous inducer*. *Blood* 76:1481-1489, 1990
 - 11) Fibbe WE, Willemze R: *The role of interleukin-1 in hematopoiesis*. *Acta Haematol* 86:148-154, 1991
 - 12) Hallek M, Ando K, Eder M, Slattery K, Griffin JD: *Signal transduction of steel factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Differential regulation of transcription factor and G1 cyclin gene expression, and of proliferation in the human factor-dependent cell line MO7*. *Leukemia* 8:740-748, 1994
 - 13) Chabot B, Stephenson D, Chapman V, Besmer P, Bernstein A: *The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse w locus*. *Nature* 335: 88-89, 1988
 - 14) Geissler EN, Ryan MA, Housman DE: *The dominant-white spotting(W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene*. *Cell* 55:185-192, 1988
 - 15) Bernstein ID, Andrew RG, Zesbo KM: *Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34⁺ and CD34^{+lin}-cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. *Blood* 77:2316-2321, 1991
 - 16) Molinneux G, Migdalska A, Szmikowski M, Zsebo K, Dexter TM: *The effects of hematopoiesis of recombinant stem cell factor(ligand for c-kit) administered in vivo to mice either alone or in combination with granulocyte colony-stimu-*

- lating factor.* *Blood* 78:961-966, 1991
- 17) Ulich TR, Castillo JD, McNiece IK, Yi ES, Alzana CP, Yin S, Zsebo KM: *Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor(CSF) or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergistically increases granulopoiesis in vivo.* *Blood* 78:1954-1962, 1991
- 18) Andrews RG, Bartelmez SH, Knitter GH, Myerson D, Bernstein ID, Appelbaum FR, Zsebo KM: *A c-kit ligand, recombinant human stem cell factor, mediates reversible expansion of multiple CD34⁺ colony-forming cell types in blood and marrow of baboons.* *Blood* 80:920-927, 1992
- 19) Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tauri S, Griffin JD: *Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells.* *Blood* 78:2962-2968, 1991
- 20) Carlesso HM, Williams DE, Fibbe WE, Wessles HW, Beverstock GC, Willemze R, Falkenburg JHF: *Effect of mast cell growth factor(c-kit ligand) on clonogenic leukemic precursor cells.* *Blood* 80:750-757, 1992
- 21) Wang C, Koistinen P, Yang GS, Williams DE, Lyman SD, Minden MD, McCulloch EA: *Mast cell growth factor, a ligand for the receptor encoded by c-kit, affects growth in culture of the blast cells of acute myeloblastic leukemia.* *Leukemia* 5:493-497, 1991
- 22) Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Frakler MJ, Schwarz JF, Shaper JH: *Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells.* *J Immunol* 133:157-165, 1984
- 23) Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF: *Identification of a membrane glycoprotein associated with hematopoietic progenitor cells.* *Leuk Res* 9:191-198, 1985
- 24) Tindle RW, Nichols RAB, Chan L, Campana D, Catovsky D, Birnie GD: *A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognizes myeloblast and non-B non-T lymphoblasts in acute leukemias and CGL blast crisis, and reacts with immature cells in normal bone marrow.* *Leuk Res* 9:1-9, 1985
- 25) Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: *Monoclonal antibody 12.8 recognizes a 115 kD molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors.* *Blood* 67:842-845, 1986
- 26) Watt SM, Karhi K, Gatter K, Furley AJW, Katz FE, Healy LE, Atlass LJ, Bradley NJ, Sutherland DR, Levinsky R, Greaves MF: *Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein(HPCA-1) associated with human hematopoietic progenitor cells.* *Leukemia* 1:417-421, 1987
- 27) Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B: *Molecular cloning of a cDNA encoding CD#4, a sialomucin of human hematopoietic stem cells.* *J Immunol* 148:267-272, 1992
- 28) Hoang T, Levy B, Onetto N, Haman A, Rodriguez-Cimadevilla JC: *Tumor necrosis factor alpha stimulates the growth of the colonogenic cells of acute myeloblastic leukemia in synergy with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.* *J Exp Med* 170:15-21, 1989
- 29) Pietsch T, Kyas V, Steffens V, Yakisan E, Hadam MR, Ludwig WD, Zesbo K, Welte K: *Effects of human stem cell factor(c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors.* *Blood* 80:1199-1206, 1992
- 30) Ikeda H, Kanakura Y, Furitsu T, Sugahara H,

- Nishiura T, Karasuno T, Tomiyama Y, Yamamoto A, Kanayama Y, Matsuzawa Y: Changes in phenotype and proliferative potential of human acute myeloblastic leukemia cells in culture with stem cell factor. *Exp Hematol* 21: 1686-1694, 1993
- 31) Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1632, 1991
- 32) Elbaz O, Budel LM, Hoogerbrugge H, Touw IP, Delwel R, Mahmoud LA, Lowenberg B: Tumor necrosis factor regulates the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 receptors on human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 77: 989-995, 1991
- 33) Rambaldi A, Torcia M, Bettoni S, Vannier E, Barbui T, Shaw AR, Dinarello CA, Cozzolino F: Modulation of cell proliferation and cytokine production in acute myeloblastic leukaemia by interleukin 1 receptor antagonist and lack of its expression by leukaemic cells. *Blood* 78:3248-3253, 1991
- 34) Kerangeuven F, Sempere C, Tabilio A, Mannoni P: Effects of transforming growth factor beta, tumour necrosis factor alpha, interferone gamma and LIF-HILDA on the proliferation of acute myeloid leukaemia cells. *Eur Cytokine Netw* 1: 99-103, 1990
- 35) Bruserud O, Pawelec G: Effects of dipyridamole and R-verapamil on in vitro proliferation of blast cells from patients with acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 17:507-511, 1993