

## Suspension culture system을 이용한 hematopoietic stem cell의 expansion

권 준, 김미정\*, 김병수\*\*, 박홍우\*\*\*

한양대학교 화학공학과, 울산대학교 아산생명과학연구소\*,

한양대학교 화학공학과 조직공학연구실\*\*, 한양대학교 화학공학과 생물공학연구실\*\*\*

전화 (02)2290-0487, FAX (02)2299-9496

**Abstract**

Ex vivo hematopoietic cells can treat patients suffering from hematopoietic malignancies using bone marrow transplantation therapies. A initial cell density of  $1.5 \times 10^6$  cells/ml and a growth factors of IL-3(5ng/ml), SCF(5ng/ml) and FL(25ng/ml) result in a 3.6-fold expansion of LTC-IC but a unexpansion of total cells.

**서론**

백혈병이란 조혈장기인 골수에 존재하는 각종 혈구세포들 중 백혈구가 암성 변화를 일으켜 계속적으로 증식함으로써 발행하는 암을 말하는데 이는 난치병으로 분류되고 있으며 비약할 만한 의학 기술의 발전에도 불구하고 정복되지 않고 있는 현실에 놓여져 있다. 환자들은 일반적으로는 비정상적인 혈액 세포가 급증하거나 일정성분이 결핍하여 문제를 일으켜 본 치료 이전에 항암치료를 통한 혈액을 정상 상태로 되돌린 다음 건강한 조혈모세포를 이식 받아야하는 단기성치료에 그치는 방법에 의해 생존할 수 있는 현실이다. 하지만 이런 방법 조차도 문제가 되는 것이 골수 기증자의 수가 턱없이 부족함과 동시에 골수의 HLA and tigen이 맞을 경우는 형제간에는 25~30%이고 타인에게서는 극히 낮은 0.005% 이하인 것으로 알려져 있어 치료 방법에 있어서의 개선의 여지가 많이 남아있는 것이 현실이다. 그래서 이런 단점들을 보완하게끔 활발히 연구되고 있는 것이 바로 조혈모세포의 체외 배양기술인 것이다. 말 그대로 체외에서 조혈모세포를 혈액세포로 분화시키지 않고 증식시키는 것이 해결해야 할 과제이다.

조혈모세포는 자가복제 및 성숙된 세포로 분화하는 성질을 가지고 있어 골수 이식에 아주 필수적인 세포이다. 이는 뼈의 해면체 안에 들어 있으면 이 세포들은 줄기세포를 포함하고 있는데 이 세포는 일생동안 조혈기능을 유지시키는 역할을 하고 있다. 이식을 위해서는 최소한 MNC(mononuclear cell)와 CD34+ 세포가 각각  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^6$ 개씩 이식되어야 한다. 제대혈이라 불리는 태아의 출생 후 태반과 탯줄을 이용한 조혈모세포의 배양도 많이 사용되고 있기는 하지만 이는 성인 환자에게 사용되기에 부족하기에 이 역시 배양을 통한 증식 과정을 통해 이식에 사용되어야 한다. 이처럼 조혈모세포를 채취하여 환자에게 이식할 만큼의 양으로 증식을 시키되 그 조혈모세포가 혈액세포로 분화되지 않은 상태를 얼마나 유지 할 시킬 수 있느냐가 핵심 문제라고 볼 수가 있다.

외부 배양기술은 위와 같이 이식에 필요한 줄기세포의 수를 증식시키는 거 뿐만이 아니라 환자의 개개인의 상태에 맞게끔 필요한 부분을 생산시킬 수 있다는 장점 또한 가지고 있다.

초기에 골수 배양은 단순히 줄기세포와 전구세포를 증식시키면서 백혈병 세포를 제거하는데 중점을 두었지만 이는 줄기세포의 성장촉진인자가 줄기세포나 백혈병세포 모두를 증식시키는 것이 아니라 배양 자체만으로도 정상세포를 선택적으로 배양하는 결과를 가져온다.

줄기세포를 분화시키지 않고 증식시키는 기술이 어렵고 절실하게 필요한 것은 사실이다. 물론 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있는데 적절한 비율의 cytokine 혼합물이 일명 혈액의 버팀질이라고 하는 stroma를 대체할 수 있는지는 확실하게 알려 지지도 않았고, 의학적으로 줄기세포 증식과 관계가 있다는 확실한 증거 또한 없지만 아마도 조혈기작의 초기 단계의 필요한 요소일 것이라는 점이다.

Cytokine의 종류는 다양하지만 실험관 배양을 위한 조성은 의료적 목적에 따라 달라진다. 단지 progenitor의 배양이 필요하다면 Kit ligand(줄기세포 인자)나 Flt-3/Flt-2 ligand(FL)를 사용하고 lineage-specific cytokine인 Erythropoietin이나 thrombopoietin은 사용하지 않는 것이 좋은 걸로 알려져 있다.

기존의 많은 실험 중에서 다양하게 사용되어 왔던 cytokine의 종류와 이에 따른 각각의 조성들이 있다. 본 실험에서는 IL-3와 SCF(stem cell factor), Flt-3 ligand를 이용하여 줄기세포의 배양을 해 보았다.

## 실험 재료 및 방법

### 배지 ( media )

상용배지 IMDM에 3.02g/L의 sodium bicarbonate와 penicilin-streptomycin(각각 10,000 units/ml, 10,000  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ g/ml, growth factor는 IL-3 5ng/ml와 stem cell factor(SCF) 10ng/ml, Flt-3 ligand 25ng/ml을 넣고, FBS 10%와 HIS 10%를 넣어서 만들었다. spinner flask에서 골수 세포를 배양을 시작하고 이틀 후에는 media 30%에 준하는 growth factor를 첨가 해 주었고 그 이후로는 이틀마다 30%의 media를 교체해 주었다.

### 골수 ( bone marrow )

C57BL/6 Crslc 6주령 mouse 다섯 마리에서 골수를 채취하여 NH<sub>4</sub>Cl tris-buffer를 직접 제조하여 RPC를 제거 후 mononuclear cell들을 분리 해 내어 growth factor가 첨가 되지 않은 5% FBS의 IMDM을 이용하여 washing 처리 후 50ml spinner flask에 15ml의 working volume으로 배양을 시작하였다.

### CFU-GM

배양 0, 6, 10, 14일 때 spinner flask에 배양중인 bone marrow를 3개 씩  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 35ml gridded dish에 Methocult F4436 media를 1ml와 함께 균일하게 섞어 2주일간 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 배양시켰다. 2주 후 3개의 dish에 생성된 colony를 현미경을 사용하여 counting 한 수를 계산 후 평균을 계산하였다.

### LTC-IC

stroma feeder layer를 위한 3T3 cell을 한양대 의과 대학 생화학 교실의 이상훈 교수님으로

부터 분주 받아 배양하여 96well의 3곳에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 0.1ml씩 넣어서 3T3 cell 이 well 바닥 표면에 confluent 할 때 한양대 의과대학 치료방사선과에서 15cGy irradiation 을 시킴으로써 성장을 멈추게 한 후 배양 0, 6, 10, 14일 때 spinner flask에 배양중인 bone marrow를  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 stroma feeder layer가 첨가된 well 3 곳에 첨가한다. 이 well의 media는 5% FBS IMDM를 사용하였고, 2틀에 한번씩 half media change를 실시하였다. 이렇게 4 주를 배양하여 CFU-GM에서와 같이 35ml gridded dish에 Methocult F4436 media를 1ml와 함께 균일하게 섞어 2주일간 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 배양시켰다. 2주 후 3개의 dish에 생성된 colony를 현미경을 사용하여 counting 한 수를 계산 후 평균을 계산하였다.

### FACscan

배양 0, 6, 10, 14일 때 spinner flask에 배양중인 bone marrow를  $1 \times 10^6$  cells을 sampling 하여 서울 중앙 병원 생물공학 김미정 교수님의 도움으로 측정하였다.

### 실험 결과

비교	Kogler의 실험	본 실험
Cytokines [ng/ml]	IL-3 : 100 SCF : 100 FL : 100	IL-3 : 5 SCF : 10 FL : 25
Innoculum [cells/ml]	$1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^6$
working volume [ml]	40	15
total cell max. expansion [cells/ml]	150	1
LTC-IC	8	3.6

2주간의 실험을 통한 결과를 보면 total cell의 양은 거의 일정 수준을 유지하였다. 기존의 결과와 비교 해 볼 때 cell의 expansion에 있어서는 증가를 보이지 않는 결과를 보였다. 이는 cell이 분화를 일으키지 않고 progenitor와 줄기세포의 형태를 유지하면서 expansion에는 많은 작용을 보이지 않은 것으로 보인다. 기존의 실험과 비교 해 볼 때 total cell이 증가하지 않는 것이 큰 문제점으로 보인다. Kogler(1996)의 실험을 보면 조건은 상당히 많이 다르지만 사용한 cytokine의 종류가 같은 것을 볼수가 있다.(Table 1)

Table 1. Kogler의 실험과 본 실험과의 조건과 결과 비교

기존의 결과는 total cell의 양에 비하여 LTC-IC의 양이 적게 증가한 것이 관찰된다. 이는

cell들이 증식은 하지만 대부분이 분화가 이루어져 분화된 cell들이 급격히 증가하는 것으로 보여진다. 그에 비해 본 실험은 total cell의 양이 증가하지는 않지만 LTC-IC의 결과가 3.6배의 증가를 보임으로 해서 total cell의 증가보다는 progenitor와 줄기세포의 증식에 효과를 보인 것으로 보인다.(Figure 1)

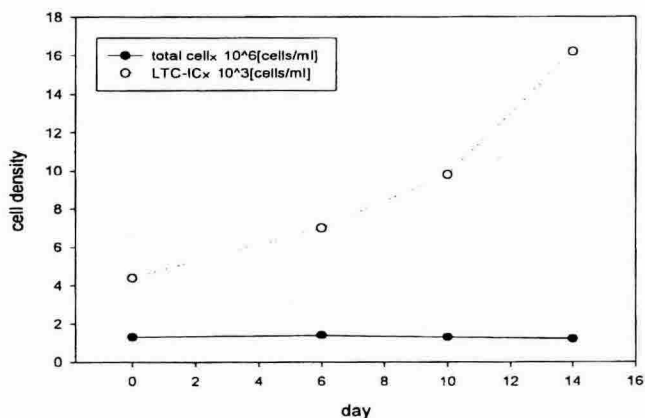


Figure 1. The expansion of total cell(●) and LTC-IC(○) in 50ml(working volume 15ml) suspension culture system. The medium was supplemented with IL-3(5ng/ml), SCF(10ng/ml) and FL(25ng/ml)

### 요약

체외에서 hematopoietic cells의 배양은 골수이식으로 하여금 hematopoietic malignancies로 인해 고통받는 환자들을 치료할 수 있다. 본 실험에서는 골수의 초기 농도  $1.5 \times 10^6$  cells/ml로 하여 IL-3(5ng/ml), SCF(5ng/ml)과 FL(25ng/ml)의 성장 인자들을 첨가 함으로써 bone marrow의 전체 cell의 증식은 생성시키지 못 했지만 LTC-IC는 3.6배의 증식을 가져왔다.

### 참고 문헌

1. Byung-Soo Kim (1998), Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor. *Biotechnology Letters*, Vol 20, page 595-601
2. Zandstra PW, Petzer AL, Eaves CJ, Piret JM (1997) *Biotechnology Bioeng* 54: 158-166
3. Kogler G, Callejas J, Miggliaccio A, et al. (1996). *Blood* 88, 603a.