

돼지 골수 조혈 세포의 이종 마우스 동물 모델 생체 증식 및 분화 특성

이용수¹ · 이현주¹ · 김태식¹ · 김혜선¹ · 김유경¹ · 김재환¹ · 박진기² · 정학재² · 장원경² · 김동구^{1,†}

¹포천중문의과대학교 차 줄기세포 연구소, ²축산과학원 응용생명공학과

Effective Reconstitution of Porcine Hematopoietic Cells in Newborn NOD/SCID Mice Xenograft

Yong-Soo Lee¹, Hyun-Joo Lee¹, Tea-Sik Kim¹, Hye-Sun Kim¹, Yoo-Kyong Kim¹, Jae-Hwan Kim¹, Jin-Ki Park², Hak-Jae Chung², Won-Kyong Chang² and Dong-Ku Kim^{1,†}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, College of Medicine, CHA Stem Cell Institute, Pochon CHA University, Seoul 135-0810, Korea

²Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute, Suwon 441-706, Korea

ABSTRACT

The SCID-repopulation cells(SRCs) assay has been widely used to determine the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells (HSCs). In this study, we tested the repopulating efficiency of porcine bone marrow derived hematopoietic stem cells using nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice which was inherited immunodeficiency mice with defect of T cells, B cells, and low activity of NK cells. We transplanted porcine bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells with intraperitoneal injection into neonate NOD/SCID mice. We confirmed efficient reconstitution activity of inoculated porcine hematopoietic cells in variety of organs of NOD/SCID mice. Interestingly, pig CD3⁺ T lymphocytes detected with high level in liver(15.6±3.7%), spleen(5.6±3.0%), thymus(1.5±1.3%), and BM(2.3±0.9%), respectively. These data imply that microenvironment of neonate NOD/SCID mice is very efficient for proliferation and differentiation of porcine T cells, and can be useful for the study of T cells development and xenogeneic organ transplantation.

(Key words : Porcine, Hematopoietic stem cells, NOD/SCID mice, Engraftment, Differentiation)

요 약

본 연구는 돼지 골수에서 존재하는 조혈 줄기 세포 및 전구 세포를 이용해 이종 동물 모델인 태아 마우스 복강 생체 이식을 통하여 돼지 조혈 세포의 이종 조혈 조직에서의 증식과 분화 특성을 규명하였다. 선천성 면역 부전 마우스인 NOD/SCID 마우스 태아 조혈 환경에 돼지 골수 유래 조혈 줄기 세포 및 전구 세포를 이식하고, 이식 후 5주령에 마우스 조혈기관에서의 돼지 조혈 세포의 증식과 분화 특성을 돼지 특이적 항체 면역 염색으로 유세포 분석을 실시한 결과, 마우스 조혈 조직인 골수, 흉선, 간장, 비장 및 림프절에서 돼지 조혈 세포의 분화 및 증식이 관찰되었다. 특히 돼지의 T 면역세포가 골수계 세포에 비해서 높은 chimerism이 관찰되어 태생 초기의 NOD/SCID 조혈 환경에 의한 특이적 T 면역세포의 증식에 적합한 조혈 환경을 제공하고 있다는 사실이 밝혀졌다. 본 마우스 신생 NOD/SCID 복강 이식 동물 모델을 이용해 돼지 T 면역세포의 분화 발달 연구 및 이종 장기 이식 기전 연구에 좋은 모델로서 활용이 기대된다.

서 론

생체 조직에 존재하고 있는 세포는 다양한 분화와 특성을 지니고 있다. 21세기의 재생 의학은 이러한 조직 특이적으로 존재하고 있는 줄기세포를 포함하는 세포를 이용한 응용 기술을 토대로 하여 시험관에서의 조직 재생

기술에의 응용이 활발하게 이루어지고 있다. 또한, 현재의 심장, 간장, 신장 및 각막과 피부조직을 비롯한 다양한 생체조직의 이식인 장기 이식은 절대적인 공급자 부족과 지속적인 수요자의 증가로 인하여 심각한 사회적 문제로 대두되고 있는 현상이다. 배아줄기세포의 전분화성과 자기복제능력을 이용한 다양한 특이적 조직 세포로의 분화 유도 및 배양에 대한 전 세계적인 연구와 더불어 성체의

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오 그린 21사업 연구비(2005-041-034-790)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-3468-3583, E-mail: dokukim@cha.ac.kr

조직에 존재하는 조직 특이적인 줄기세포를 이용한 임상 치료에의 응용이 활발히 진행되고 있다. 그중에서 특히 골수조직에 존재하고 있는 조혈 줄기 세포는 약 50년 이상의 오랜 기간 동안 연구가 이루어진 대표적인 줄기세포이다. 최근의 돼지 장기를 이용한 이종 장기 이식 분야는 국내외적으로 활발한 기초 연구와 전 임상 연구가 진행되고 있으며, 수많은 난치성 질환을 치료할 수 있는 차세대 가장 각광받는 바이오 분야이다. 그러나 돼지를 비롯한 동종 및 이종 세포나 장기 이식시 해결해야 할 가장 커다란 문제로서 주요 조직적합항원 (MHC) 차이에 의한 급성 또는 만성적인 이식 면역 거부 반응이다. 면역 거부 반응을 제어하고 있는 요인으로서 골수에 존재하는 조혈 줄기 세포로부터 분화된 T 림프구와 B 림프구 세포 등과 같은 면역세포의 면역반응에 의한 이식세포 거부 반응이라 할 수 있다. 성체 골수조직의 약 0.001%의 매우 낮은 비율로 존재하는 조혈 줄기 세포는 매일 수 억 개의 성숙한 조혈 세포를 분화와 증식과정을 반복하면서 생체 항상성을 유지하고 있다. 조혈 줄기 세포로부터 성숙한 림프구계 세포와 골수구계 세포로 분화할 수 있는 다 분화 능력과 자신과 동일한 분화 능력의 세포를 재생할 수 있는 자기복제 능력을 보유하고 있다(Keller 등, 1990; Morrison 등, 1995). 조혈 줄기 세포의 기능 및 특성을 연구하는 방법에는 조혈 줄기 세포 분화 조절 인자인 GM-CSF, G-CSF, EPO, IL-3, SCF 등을 이용한 시험관에서 이루어지는 CFU-C, HPP-CFU 및 LTC-IC 등의 검증 방법이 널리 이용되고 있다. 그러나 시험관 배양을 통한 자기복제 유도는 한정된 조혈 환경으로 인하여 한정된 세포로만 분화를 유도할 수 있는 단계이다(Nakahata 등, 1982; Shtherland 등, 1989). 또한, 마우스의 조혈 줄기 세포의 연구와 달리 사람의 조혈 줄기 세포에 대한 연구는 적절한 생체 이식 동물 모델이 부재로 인하여 초보적인 연구단계이다(Jean 등, 1997). 사람을 비롯한 이종 줄기세포의 생체 특성 연구를 위한 대체 동물 모델로서 이종 세포 및 장기 이식에 따른 면역 거부 반응이 낮은 면역 결핍 마우스를 이용한 생체 이식 연구가 활발히 진행되고 있다. 면역 결핍 마우스를 사용하는 이유는 정상적인 마우스의 경우 정상적으로 면역작용이 일어나 자신의 세포가 아닌 이종세포나 다를 항원인 경우 사멸시키는 방어 기작을 가지고 있다. 이 면역 방어 기작으로 인하여 이종 이식에 의한 생체 내 세포의 특성을 알아보기 위해서는 좋은 모델이 될 수가 없다. 결국 인간 조혈 세포의 마우스 생체 이식을 위하여 면역 기작을 없앤 동물 모델이 개발되었으며, 이 동물 모델을 면역 결핍(Severe combined immunodeficiency, SCID) 마우스라 명명되었다(Bhatia 등, 1998). 대표적인 면역 결핍 마우스로서 SCID (severe combined immunodeficient disorder) 마우스와 당뇨병 (nonobese diabetic, NOD) 동물 모델과 면역 결핍 모델(SCID) 마우스의 교배로 인하여 두 가지 성질을 모두 가진 NOD/SCID (Non obese diabetic/ SCID) 모델 등이 있다. 이 동물 모델은 T, B 림프구가 존재하지 않으며, NK cells, Macrophage, 보체 등의 기능이 정상보다 현저히 낮은 특성을 지니고 있다(Kamal-Reid 등, 1998). NOD/SCID 마우스의 낮은 이종 이식 반응 특성을 이용해 사람 조혈 줄기 세포를 비롯해 다양한 이종 세포 및 장기 이식용 동물 모델로서 활용되고 있으며, 특히 인간 조혈 줄기 세포의 정상적인 성숙 조혈 세포로의 분화 및

증식 유도가 가능하여 줄기세포의 자기복제 능력 검증 및 다 분화 능력 검증 및 유전자 치료 분야 등 다양한 분야에 이용되고 있다(Larochelle 등, 1996; Peled 등, 1999; Shultz 등, 1995). 이와 같이 면역 결핍 마우스 모델을 이용한 인간 세포의 연구를 위한 동물 모델을 humanized NOD/SCID 동물 모델이라 명명한다. 이는 인간의 세포가 인간 모델이 아닌 이종 동물 모델 생체 내에서 정상적으로 증식 및 분화가 일어나는 마우스를 말하며, 인간세포의 특성 및 발달을 연구하는데 이용된다. 시험관실험(*in vitro*)의 환경은 생체 내 환경(*in vivo*) 환경과 다르기 때문에 인간 조혈 세포의 생체 내 환경에서의 분화 및 발달을 연구하여 인간 조혈 세포의 특성을 연구하기 위해 마우스 내에 인간 조혈 세포를 이식하여 분화 및 발달을 유도한 마우스이다(Ishikawa 등, 2002). Humanized NOD/SCID 동물 모델을 만드는 이식 방법들이 여러 논문을 통하여 발표되고 있으며, 줄기세포의 동물 모델 생체 이식 방법에 생체 증식 효능 검증 연구로서 정맥이식 방법(*intravenous injection*)보다 골수(bone marrow) 공간에 직접적으로 이식하는 방법인 IBM(*Intra-bone marrow*)이 15배 더 높은 증식 및 분화가 높다는 연구가 발표되었다(Yahata 등, 2003). 또한, 조혈 줄기 세포의 생체 내 조혈지 환경의 차이에 대한 연구로서 5~8주령의 성체 마우스에 생체 이식에 비해서 신생 1~3일 내의 동물 모델 내에서 조혈 줄기 세포의 생체 이식 방법이 줄기세포의 분화 및 증식에 매우 높은 효율이 관찰되었으며, 특히 조혈 줄기 세포로부터 림프구계 면역세포의 분화와 증식 효능이 뛰어나다는 사실이 밝혀졌다(Shultz 등, 2005).

본 연구는 돼지 골수에서 채취한 돼지 조혈 줄기 세포 및 전구 세포를 이용하여 신생 NOD/SCID 마우스 모델에 생체 이식을 실시하고, 이종 동물 모델 생체에서의 돼지 조혈 줄기 세포 및 전구 세포의 성숙 조혈 세포로의 분화 및 증식 특성을 분석하였다. 신생 NOD/SCID 마우스 생체 조혈 조직인 혈액과 간장, 비장, 흉선조직 및 골수조직에서 돼지 조혈 세포의 증식 및 분화를 돼지 조혈 세포 특이적인 항체와 유 세포 분석 방법으로 높은 이종 생체 증식 돼지 조혈 줄기 세포의 증식 및 분화 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험동물

동물 모델로서는 NOD/SCID마우스의 교배에 의해 출생한 생후 1주령 이하의 신생 NOD/SCID 마우스를 돼지 골수 조혈 세포의 이식용 동물로서 이용하였으며, 포천중문대학교 세포유전자치료연구소의 동물실에서 번식을 실시하였다. SPF(Specific Pathogen-Free) 조건에서 멸균된 깔짚과 물과 사료를 공급하고 사육 조건으로는 온도 24~26°C, 습도 45~55%를 유지하였다.

돼지 골수 조혈 줄기 세포 채취 및 분리

축산과학원에서 사육되고 있는 돼지(5~8주령)의 골수 조직 대퇴부에서 주사기(18G)를 이용하여 돼지골수를 채취하였고, Ficoll-paque TM plus (Lymphocyte isolation, 0.12EU/ml; Amershem bioscience, Sweden)로 density gradient centrifugation하여 돼지 조혈 줄기세포 분획을

분리하였다. 분리된 돼지 조혈 줄기세포는 PBS (Phosphate buffer saline)에 2% FBS (Fetal bovine serum)이 포함된 용액으로 2번 세척한 후 PBS 용액에 부유하여 NOD/SCID 마우스 이종 생체 이식용 세포로 사용하였다.

마우스 복강에의 이종이식

NOD/SCID 마우스를 Male과 Female을 교배하여 임신 을 유도하였고, 20일간의 임신기간을 거쳐 신생 NOD/SCID 마우스를 얻었다. 돼지 골수 조혈 세포의 복강 주입을 위해서 신생 NOD/SCID 마우스를 얼음에 올려 순간 마취를 실시하였다. 돼지 골수 조혈 줄기 세포를 20 μ l의 PBS에 부유하고, 주사기(Ultra-fine needle, BD insulin syringe, USA)를 이용하여 신생 NOD/SCID 마우스 한 마리당 1 \times 10⁷의 돼지 조혈 줄기 세포를 복강에 이식하였다.

돼지 조혈 세포 생착 분석을 위한 항체 면역 염색

돼지 조혈 줄기 세포를 이식한 신생 NOD/SCID 마우스 생체 조혈 조직내에서의 돼지 조혈 세포의 생착 및 분화 특성을 분석하기 위한 돼지 조혈 세포 특이적인 항체는 BD bioscience, Serotec으로부터 구입하여 사용하였다. 돼지 T면역세포 특이적인 항체인 anti-porcine 항체인 CD3e (fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated, BD Pharmigen™), pCD45 (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, Serotec), pCD4a (phycoerythrin (PE)-conjugated, BD Pharmigen™), pCD8a (phycoerythrin (PE)-conjugated, BD Pharmigen™), pCD14 (phycoerythrin (PE)-conjugated, Serotec)를 이용해 면역 염색을 실시하고, 유세포 분석기인 FACSvantageSE(BD)로 세포의 증식과 분화 특성을 분석하였다.

유세포 분석을 통한 돼지 면역세포 생착 능력 검증

돼지 골수 유래 조혈 세포 생체 이식 신생 NOD-SCID 마우스를 이식 5주 후에 이식 마우스의 말초혈액을 채취, 적혈구 lysis 용액을 이용하여 적혈구세포를 제거한 후 단핵구 세포만을 분리하였다. NOD/SCID 마우스의 조혈 조직에서의 돼지 면역세포의 증식 능력 분석을 위하여 이식 후 5주에 마우스를 도살하여 마우스의 간장(liver), 비장(spleen), 흉선(thymus), 골수(BM) 조직을 채취하여 mesh를 이용하여 single cells을 준비하였다. 혈액 및 조직에서 채취된 단핵구 세포는 항체 면역 염색 용액인(PBS-containing 2% FBS, 0.05% NaN₂)에 부유하여 nylon filter를 통과시켜서 debris를 제거하였다. 1 \times 10⁶의 세포를 돼지 면역세포 특이 항체로 면역 염색을 실시한 후에 4°C의 암실에서 30분간 반응시킨 후 staining solution으로 두 번 세척하여 세포와 결합하지 않은 항체를 제거하였다. 돼지 조혈 세포의 마우스 조혈 조직에서의 키메리즘 분석은 유세포 분석기인 FACS vantage SE(Becton Dickinson, CA)를 이용하여 분석하였다.

결 과

돼지 골수 조혈 줄기 세포 이식 마우스 말초혈액 내 돼지 조혈 세포 증식

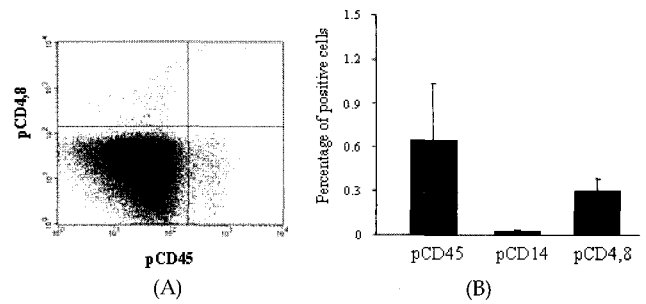


Fig. 1. Determination of porcine hematopoietic cells in peripheral blood of NOD/SCID mice. Cells from peripheral blood in NOD/SCID mice inoculated with 1 \times 10⁷ porcine bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells was harvested at 5 weeks from intraperitoneal injection (A). The percentage of porcine hematopoietic cells in peripheral blood was indicated with dot blot of flow cytometry analysis, implied the engraftment of porcine mononuclear cells(pCD45⁺) and T lymphocytes(pCD4,8⁺). (B) The chimerism of porcine hematopoietic cells, myeloid cells(pCD14⁺) and T lymphocytes(pCD4,8⁺), in peripheral blood was demonstrated.

돼지 골수에서 채취하여 분리한 조혈 줄기 세포를 교배를 통하여 분만된 생후 1주일 미만의 NOD/SCID 동물 모델에 복강에 1 \times 10⁷의 세포를 이식하였다. 이종 돼지 골수 조혈 세포의 생체 이식에 따른 마우스 조혈 조직에서의 증식과 분화 특성을 분석하기 위해서, 복강 이식 5주 후에 마우스의 말초혈액을 채취하고, 돼지 혈액세포 특이적 항체인 pCD45 항체와 T 림프구 세포 특이적 항체인 pCD3, pCD4,8 항체, 골수계 세포 특이 항체인 pCD14로 면역 염색을 실시하여 유세포 분석을 실시하였다. 유세포 분석 결과, Fig. 1에서 NOD/SCID 마우스 혈액 내 돼지 조혈 세포 마커인 pCD45 양성 세포가 0.64 \pm 0.39%의 비율로 존재하였으며, 이종 pCD4, pCD8 양성 돼지 T 면역세포는 0.3 \pm 0.08%의 증식능력이 관찰되었다. 반면, 돼지 골수계 세포인 pCD14 양성 세포는 0.02 \pm 0.01%의 매우 낮은 증식 능력이 관찰되었다.

마우스 골수 조직 조혈 환경에서의 돼지 면역세포의 증식

조혈 줄기 세포의 자기 복제와 다분화 능력을 유지하고 있는 기관인 골수조직에서 이식된 돼지 골수 조혈 줄기 세포의 키메리즘과 분화 특성을 분석한 결과, 조혈 세포 마커인 pCD45 양성세포와 T 림프구 세포인 pCD3 양성 세포가 존재하고 있다는 사실이 밝혀졌다. 특히 골수조직에서 2.3 \pm 0.9%의 pCD3 양성 림프구 세포의 키메리즘을 나타내었으며, 돼지 조혈세포 마커인 pCD4 양성 세포와 세포독성 T 세포 마커 pCD8 양성 세포가 0.7 \pm 0.4% 존재하고 있었다. 그에 반해 골수계 세포는 0.1 \pm 0.1%의 낮은 키메리즘이 관찰되었다(Fig. 2). 이 결과로 NOD/SCID 마우스 골수 조혈 환경은 돼지 골수계 세포의 증식 및 분화보다는 림프구 세포의 증식과 분화에는 적합한 환경이라는 사실을 시사해 주고 있다.

이종 마우스 조혈 조직에서의 돼지 조혈 세포 분화 특성 분석

골수에서 유래된 면역세포 전구 세포는 흉선조직에서 T 림프구 세포로 분화 발달되어 2차 면역기관인 비장조직으로 이동한다. 돼지 조혈 줄기 세포 생체 이식 마우스

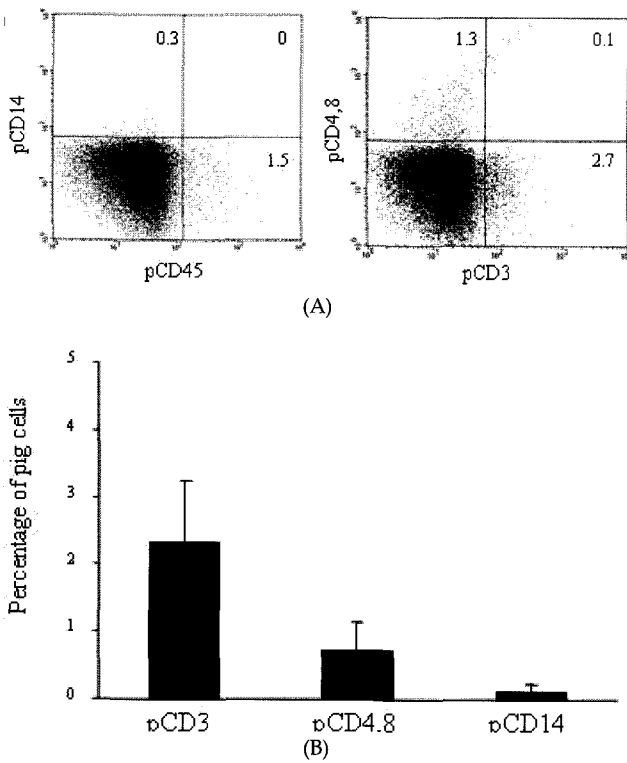


Fig. 2. Engraftment of porcine hematopoietic cells in bone marrow of NOD/SCID mice. NOD/SCID mice was transplanted with porcine bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells by intraperitoneal injection. After 5 weeks from injection, bone marrow was analyzed the efficiency of engraftment of porcine hematopoietic cells with indicated porcine hematopoietic specific antibodies. (A) Flow cytometry analysis from bone marrow was showed the engraftment of porcine T lymphocytes and myeloid cells. (B) The percentage of chimerism of porcine myeloid cells and T lymphocytes in bone marrow of NOD/SCID mice was calculated and demonstrated.

에서의 T 면역세포의 발달과정을 조사하기 위해서 흉선 조직을 채취하여 돼지의 T 면역세포의 증식 특성을 분석하였다. 유세포 분석기를 통하여 마우스 흉선 조직을 분석한 결과, pCD3 양성 돼지 T 면역세포가 1.5±1.3%의 비율로 존재하고 있었으며, pCD4,8 양성 T 면역세포가 1.9±1.7%의 비율로 존재하고 있었고, 0.3±0.1%의 pCD14 양성 골수구계 세포가 관찰되었다(Fig. 3). 또한, 대표적인 2차 면역기관인 비장조직을 상기와 동일한 방법으로 분석한 결과, pCD3 양성 T 면역세포가 5.6±3.0% 관찰되었고, pCD4 양성 pCD8 양성 T 면역세포가 0.8±0.5%의 비율로 존재하고 있다는 사실이 밝혀졌다(Fig. 4). 돼지 골수 조혈 줄기 세포의 NOD/SCID 마우스 간장 조직에서의 키메리즘을 유세포 분석기를 통하여 분석한 결과, 돼지 T 면역세포인 pCD3 양성세포가 15.6±3.7%의 높은 비율의 키메리즘이 관찰되었으며, 돼지 pCD4,8 T 면역세포는 7.3±3.9%의 분화 능력이 관찰되었다. 그에 반해서 pCD14 양성 골수구계 세포는 1±0.7%의 낮은 키메리즘을 나타내었다(Fig. 5). 이 결과로 돼지 면역세포가 골수조직에서와 동일하게 골수구계의 세포의 분화에 비해서 림파

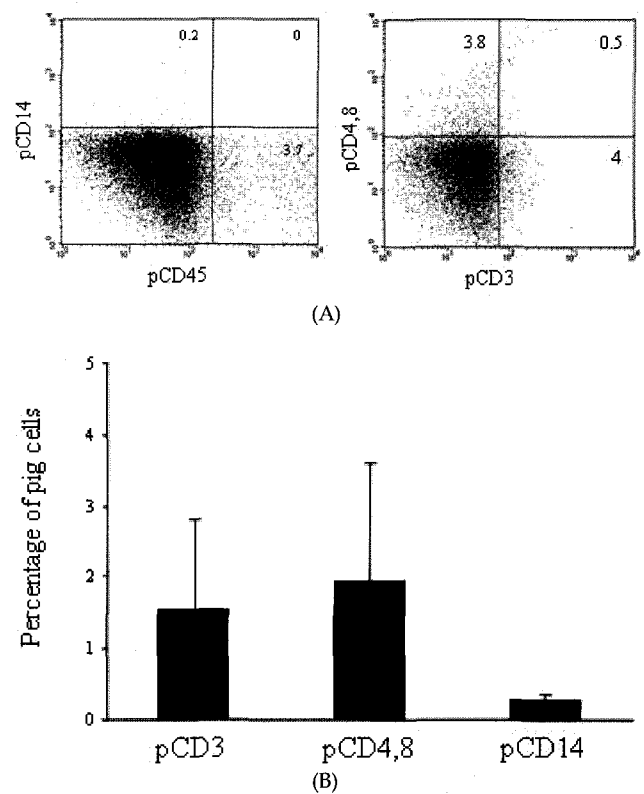


Fig. 3. Porcine T lymphocytes development in thymus of NOD/SCID mice. Thymocytes from NOD/SCID mice injected with porcine bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells was harvested for analysis of chimerism of porcine hematopoietic cells. Flow cytometry profiles(A) and percentage of chimerism(B) in thymus of NOD/SCID mice was demonstrated.

구 세포의 분화에 적합한 조혈 환경을 지지하고 있다는 사실이 밝혀졌다. 특히 골수조직에 비해서 현저히 높은 키메리즘을 나타내었으며, 이러한 결과로 골수조직에 비해서 림파구 세포의 분화 및 증식에 간장 조직에서 분비되는 다양한 조혈인자가 돼지의 면역세포 분화를 위해서는 충분한 역할을 지니고 있다는 사실을 증명해 주고 있다.

이종 마우스 조혈 조직에서의 돼지 T 면역세포의 분화 특성

T 면역세포는 골수에서 존재하는 조혈 줄기 세포로부터 분화된 림파구 전구 세포가 흉선 조직으로 이동하여 다양한 발달단계를 거치면서 성숙한 T 림파구 세포로 분화 발달된다. 마우스 말초혈액을 비롯한 골수, 비장, 간장, 림파절 조직에서 돼지 조혈 세포의 키메리즘을 유세포 분석으로 확인하였다. 돼지 골수 조혈 줄기 세포의 복강 이식 NOD/SCID 마우스의 각 조혈 조직에서의 T 림파구 세포의 증식과 분화를 분석하였다. 이식 5주 후 마우스 간장, 비장, 흉선, 골수조직을 채취하여 돼지 림파구계 특이 항체인 pCD3로 면역 염색을 실시한 후 유세포 분석기로 분석한 결과, 간장에서 15.7±3.7%의 가장 높은 돼지 T 림파구 세포의 생착이 관찰되었다. 또한, 비장에서 5.6±3%, 흉선에서 1.5±1.3%, 골수에서는 2.3±0.9%의 돼지 조혈 세포의 증식 능력이 관찰되었다(Fig. 6).

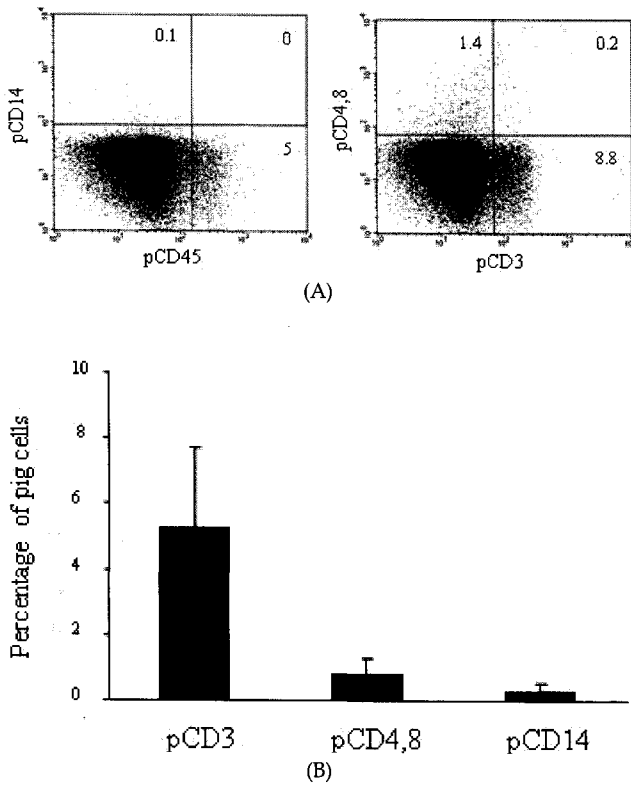


Fig. 4. Flow cytometry analysis of porcine hematopoietic cells in spleen. (A) Flow cytometry profiles indicated the engraftment of porcine myeloid cells and T lymphocytes in splenocytes of NOD/SCID mice. (B) The engraftment of porcine myeloid cells(pCD14⁺) and T lymphocytes(pCD3⁺ and pCD4,CD8⁺) was demonstrated in splenocytes of NOD/SCID mice.

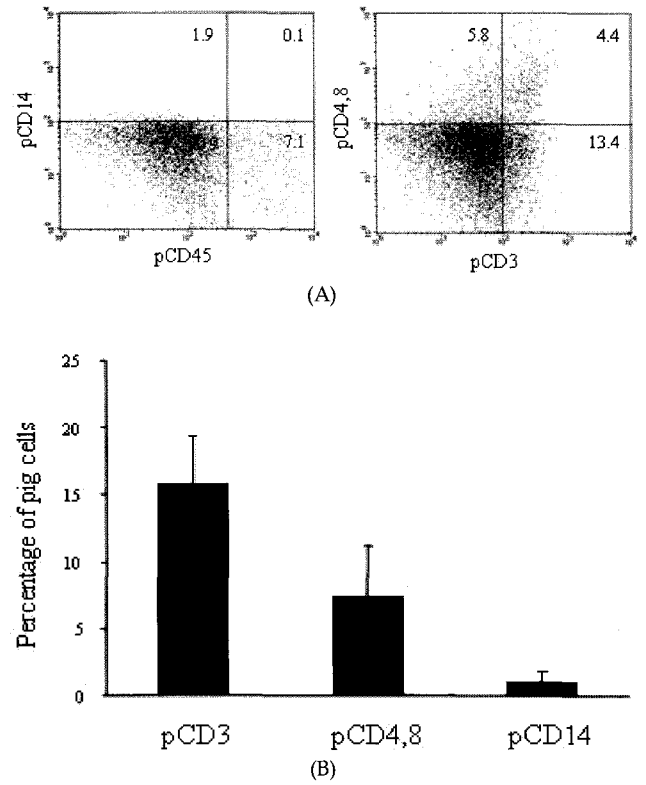


Fig. 5. Efficient engraftment of porcine hematopoietic cells in liver. (A) Data from flow cytometry analysis was showed the presence of porcine myeloid cells and T lymphocytes in liver of NOD/SCID mice. (B) The percentage of porcine myeloid cells and T lymphocytes in liver of NOD/SCID mice was demonstrated.

고찰

본 연구는 돼지의 골수에서 존재하고 있는 조혈 줄기 세포의 분화를 분리하여 이종 동물 모델인 마우스에 생체 이식을 실시함으로써 이종 골수 이식 키메라즘의 형성 능력을 검증함과 동시에 돼지 골수 존재 조혈 줄기 세포의 성숙한 조혈 세포로의 분화 및 증식 특성을 이종 동물 모델 생체에서 분석하기 위해서 연구를 실시하였다. 본 연구에 사용된 NOD/SCID 마우스는 이종 세포 및 조직 이식 시 유발되는 면역 거부 반응에 관여하고 있는 T 면역세포와 B 면역세포가 선천적 유전자 결핍으로 인하여 존재하고 있지 않으며, 또한 비 특이적 면역 거부 반응에 관여하고 있는 마크로파지와 NK 세포 및 보체의 기능도 정상마우스에 비해서 매우 낮은 특성을 지니고 있다(Peled 등, 1999). 최근에는 NK 세포가 이종세포 및 조직이식시의 거부 반응에 깊이 관여하고 있다는 사실이 밝혀져 NOD/SCID 마우스 모델보다 더욱 진보된 NOD/SCID-β2 microglobulin-null과 NOD/SCID/IL2 receptor γ-null 형질전환 면역 결핍 마우스가 제작되어 보고되었으며, 실질적인 이종 세포 생체 이식 실험 결과 약 2배 이

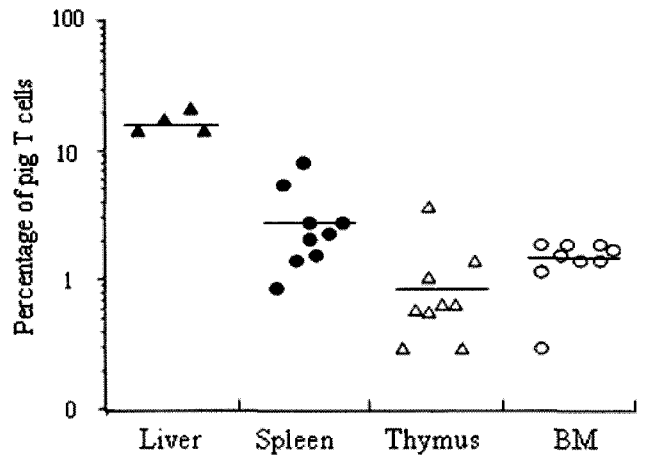


Fig. 6. Engraftment of porcine T lymphocytes in hematopoietic organs. Cells was obtained from indicated organs from NOD/SCID mice injected with porcine bone marrow hematopoietic cells to analyze the engraftment efficiency at 5 weeks from injection. The chimerism of T lymphocytes in NOD/SCID mice was determined with flow cytometry analysis.

상의 높은 이종 세포 생체 이식 능력을 나타내었다(Ishikawa 등, 2002; Shultz 등, 2005). 현재 알려진 대표적인 인간 조

혈 줄기 세포의 마커는 CD34⁺CD38⁻ 집단을 가리켜 조혈 줄기 세포라고 일컬어지며, 이 마커를 이용한 분리를 통하여 많은 인간 조혈 줄기 세포의 분화 및 증식에 관하여 많은 연구가 진행되었다(Christopher 등, 2002). 또한, 생체 이식 방법으로서 인간 제대혈 유래 조혈 줄기 세포인 CD34⁺ 양성 세포를 분리하여 신생아 NOD/SCID/IL2 receptor γ -null이나 NOD/CID- β 2 microglobulin-null 마우스에 주입한 결과 20% 이상의 높은 인간 T 면역세포의 증식 및 분화가 관찰되어 성체의 마우스에 비해서 신생 마우스의 조혈 조직이 조혈 줄기 세포에서 면역세포의 분화에 적합한 환경을 제시해주고 있다는 사실이 밝혀졌다(Ishikawa 등, 2002; Ishikawa 등, 2005). 본 연구팀은 돼지 골수 유래 조혈 줄기 세포를 성체의 NOD/SCID 마우스 모델에 골수 이식 방법을 통하여 세포이식을 실시하였다. 현재 돼지 조혈 줄기 세포의 연구가 부족하여 조혈 줄기 세포의 마커가 발견되어지지 않았으며, 골수에 돼지 조혈 줄기 세포가 존재하기 때문에 골수 조혈 세포를 이식하였다. 그 결과, 골수에서 5.4 \pm 1.9%, 비장에서 15.4 \pm 7.3%, 간장에서 21.3 \pm 1.4%의 비율로 돼지의 T 면역 세포가 존재한다는 연구 결과를 발표하였다(Lee 등, 2007). 신생 NOD/SCID 마우스 복강조직에의 돼지 골수 조혈 줄기 세포의 생체 이식 실험에서도 유사한 조혈 조직 특이적인 키메리즘 양상이 관찰되었으며, 특히 간장조직에서 다른 조직에 비해서 가장 높은 키메리즘을 나타내었다. 이러한 결과는 골수조직에의 직접이식법과 복강주입을 통한 이식 방법상의 조혈 조직 특이적 증식에는 영향이 없다는 사실을 알 수 있었으며, 또한 성체 NOD/SCID 마우스와 신생 NOD/SCID 마우스의 조혈 환경에 의한 돼지의 골수 조혈 세포의 분화 및 증식 유지기전에는 특이적인 차이점이 관찰되지 않았다. 또한, 골수구 세포인 pCD14 양성 세포는 신생 마우스 복강 이식을 통해서도 매우 낮은 분화 특성을 나타내어 성체 마우스 생체 이식과 유사한 결과를 얻었다. 이는 마우스 조혈 환경은 돼지 조혈 줄기 세포에서 골수구계 세포로의 분화 및 증식에 충분하지 못하다는 사실을 시사해 주고 있다. 조혈 줄기 세포를 이용해 골수구계 세포의 분화 유도 증진을 위해서는 GM-CSF와 IL-3와 같은 골수구계 세포 분화 조절 인자 및 유전자 도입 등의 방법이 고려되어야 할 것으로 사료된다. 본 연구는 돼지 조혈 줄기 세포와 같은 이종 동물 모델에의 생체 이식을 통한 높은 키메리즘 유도의 방법으로서 신생 NOD/SCID 마우스를 이용한 이종 조혈 세포 이식을 실시하였다. 상기의 다양한 조혈 조직 분석 결과, 신생 NOD/SCID 마우스에의 생체 이식을 통하여 돼지 T 면역세포가 특이적으로 매우 높은 키메리즘을 형성하며 분화 발달되었으며, 이러한 연구 결과를 바탕으로 돼지 T 면역세포로의 분화 연구에 좋은 모델이 될 것으로 사료된다.

인용문헌

- Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Olga I, John E (1998): A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Medicine* 4:1038-1045.
- Christopher J, Hogan, Elizabeth J, Shpall, Gordon K (2002): Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD-34⁺ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *PNAS* 99:413-418.
- Ishikawa F, Livingston AG, Wingard, JR, Nishikawa S, Ogawa M (2002): An assay for long-term engrafting human hematopoietic cells based on newborn NOD/SCID/beta2-microglobulin(null) mice. *Exp Hematol* 30:488-494.
- Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi T, Shultz LD, Harada M (2005): Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chainnull mice. *Blood* 106:1565-1573.
- Jean CY, Wang, Doedens M, John ED (1997): Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative *in vivo* SCID-repopulating cell assay. *Blood* 99:3919-3924.
- Kamal-Reid S, Dick JE (1988): Engraftment of immuno-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242:1706-1709.
- Keller G, Snodgrass R (1990): Life span of multipotential hematopoietic stem cells *in vivo*. *J Exp Med* 171:1407-1418.
- Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE (1996): Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2:1329-1337.
- Lee YS, Kim TS, Kim JH, Chung HJ, Park JK, Chang WK, Kim DK (2007): Differentiation and proliferation of porcine T lymphocytes in NOD/SCID mice. *Reprod Dev Biol* 31:1-6.
- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL (1995): The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:35-71.
- Nakahata T, Ogawa M (1982): Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 70:1324-1328.
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T (1999): Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283:845-848.
- Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R (2005):

- Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174:6477-6489.
14. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL (1995): Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154:180-191.
 15. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989): Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 74: 1563-1570.
 16. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T (2003): A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101:2905-2913.
(접수일자: 2007. 11. 20 / 채택일자: 2008. 1. 9)