

제대혈 유래 중간엽줄기세포에서 HLA의 발현과 Mixed Lymphocyte Reaction

이효종¹ · 강선영* · 박세진 · 이승용 · 이희천 · 고필옥 · 박지권** · 백원영** · 연성찬
경상대학교 수의과대학 동물의학연구소, *경상남도 야생동물센터, **경상대학교 의과대학

(게재승인: 2011년 8월 9일)

Expression of HLA and Mixed Lymphocyte Reaction of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood

Hyo-jong Lee¹, Sun-young kang*, Se-jin Park, Seung-yong Lee, Hee-chun Lee, Phil-ok Koh, Ji-kwon Park**, Won-young Paik** and Seong-chan Yeon

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, *Gyeongnam Wild Life center, **School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*

Abstract : In recent years, the mesenchymal stem cells (MSC) derived from various tissues have been widely tested for developing cell therapies, tissue repair and transplantation. Although there has been much interest in the immunomodulatory properties of MSC and their immunologic reactions following autologous, allogeneic and xenogenic transplantation of MSC *in vivo*, up to date, the expression of immunogenic markers, such as class I and II human leukocyte antigens (HLA), after differentiation of human umbilical cord blood (hUCB)-derived MSC has been poorly investigated and require extensive *in vitro* and *in vivo* testing. In this experiment, the expression of the HLA-ABC and HLA-DR on hUCB-derived MSC have been tested by immunocytochemical staining. The undifferentiated MSC were moderately stained for HLA-ABC but very weakly for HLA-DR. In order to investigate the inhibitory effect of allogeneic lymphocytes on proliferation of MSC, the MSC were cultured in the presence or absence of peripheral allogeneic lymphocytes stimulated with concanavalin A. The allogeneic lymphocytes did not significantly inhibit MSC proliferation. We conclude that hUCB-MSC expressed moderately class I HLA antigen while almost negatively class II HLA antigen. The MSC have an immunomodulatory effect which can suppress the allogeneic response of lymphocytes. These *in vitro* data suggest that allogeneic MSC derived from cord blood can be useful candidate for allogeneic cell therapy and transplantation without a major risk of rejection.

Key words : mesenchymal stem cells, HLA, immunocytochemical stain, mixed lymphocyte reaction, human umbilical cord blood.

서 론

근래에 중간엽줄기세포를 제대혈(umbilical cord blood)로부터 분리하고 특정한 세포로 분화시키려는 연구가 활발하다. 제대혈 이용의 장점은 폐기되는 탯줄에서 중간엽줄기세포와 조혈모세포를 채취하면 되므로 기증자에게 아무런 신체상 고통이 없다. 그리고 제대혈 유래 줄기세포는 재생능력이 우수하여 증식배양이 잘 되는 장점이 있으며, 제대혈 속의 림프구는 골수나 혈액보다 덜 성숙되어 있어 면역학적 부적합 확률이 낮아 거부반응이나 감염 위험성이 매우 적은 편이어서 골수기증자를 찾지 못한 환자에게 골수이식 대안으로 떠오

르고 있다. 제대혈 유래 조혈줄기세포(hematopoietic stem cells)는 백혈병을 비롯하여 여러 가지의 혈액질환의 치료에 활용되어 오고 있으며, 이 중간엽줄기세포는 골과 연골조직의 질환, 신경계 질환 및 간질환 등 각종 질환의 치료에도 활용이 가능할 것으로 보인다(2,3,5).

재생의학, 세포면역치료, 및 유전자치료 등을 활용하여 여러 가지 난치병을 치료하는데 있어서 가장 중요한 장애요소 중의 하나는 면역거부반응이다. 이를 해소하기 위하여 많은 기술이 개발되고 있으나, 아직 괄목할 만한 기술이 개발되지 못하고 있다. 각종 난치병 치료에 있어서 줄기세포를 이용하기 위해서는 줄기세포에서의 human leukocyte antigen (HLA) class I과 class II의 발현 정도를 확인하는 것이 중요하며 미분화 또는 분화된 줄기세포의 면역체계를 확인하여야만 성공적 이식을 기대할 수 있으므로 이에 관한 연구가 절실하다.

¹Corresponding author.
E-mail : hjlee@gnu.ac.kr

Le Blanc (6) 및 Götherström (1)은 골수로부터 분리한 줄기세포나 태아의 간 조직으로부터 분리한 줄기세포에서 HLA 발현과 면역학적 성상을 조사한 바 있다. Lupatov (7)는 골수유래 줄기세포와 제대유래 섬유아세포에서 HLA 항원을 조사한 바 있다. 그러나 아직까지 제대혈 유래 중간엽줄기세포가 분화되기 전과 후에 HLA 항원의 발현에 대하여는 연구가 부족하다. 이의 이해는 동종간 또는 이종간의 장기이식에서 조직기부반응(histocompatibility)이 없거나 적은 대체장기의 공급에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 사람의 제대혈로부터 간엽줄기세포를 분리하고, 이들 줄기세포에서 면역관련 표면항원인 HLA-ABC 및 HLA-DR의 발현을 조사하여 면역학적 특성을 규명함으로써 세포치료, 유전자 치료 및 이식용 대체장기 생산에 관련된 자료를 확보하여 줄기세포 치료기술 개발에 응용하고자 한다.

재료 및 방법

시약과 재료

본 시험에 사용된 시약과 재료 중, low-glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), phosphate buffered solution (PBS), fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA) 제품을, dimethyl sulphoxide (DMSO), Periodic acid-Schiff's staining system, Concanavalin-A은 Sigma (St. Louis, MI, USA) 제품을, Ficoll-paque plus는 Amersham Biosciences (Sweden) 제품을, rat anti-HLA-ABC, -DR antibodies, FITC-conjugated anti rat antibody, FACScan 기기는 Becton & Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을, lymphocyte separation medium은 PAA Laboratories (GmbH, Austria) 제품을 사용하였다.

제대혈의 확보

태아의 제대로부터 채취된 제대혈액은 공여자의 허락을 득한 후 사용이 허가된(IRB) 대학병원으로부터 공급받아 사용하였다.

제대혈 유래 중간엽줄기세포의 분리와 확인

채취된 제대혈에서 Ficoll density-gradient centrifugation 방법으로 mononuclear cells을 분리하고, 이를 10% FBS, L-glutamine 및 항생제가 첨가된 low-glucose DMEM 배양액으로 37°C/5% CO₂ 배양조건에서 계대배양으로 증식시켰었다. 이 배양된 세포들은 phase contrast microscope로 발달과 형태학적 특성을 확인한 다음, PAS 염색으로 mesenchymal stem cell임을 확인하였다. 아울러 줄기세포 특이 cytokines에 대한 antibodies와 immunolabelling한 다음 FAC scan을 이용한 flow-cytometry로 CD13, CD29, CD44, CD73, CD105에 대하여 양성반응(positive control)과 CD34, CD45, HLA-DR에 대하여 음성반응(negative control)이 확인된 것을 사용하였다.

제대혈 유래 중간엽줄기세포에서 immunocytochemistry에 의한 HLA의 발현 확인

제대혈유래 중간엽줄기세포에서의 HLA-ABC 및 HLA-DR 항원의 발현을 immunocytochemistry 법으로 확인하였다.

면역염색은 제대혈 유래 중간엽줄기세포를 4% formaldehyde에 20분간 고정하고 PBS로 세척한 다음 0.5% triton X-100으로 5분간 수세하였다. 이는 다시 PBS로 세척하고 5% goat serum으로 2시간 동안 실온에서 blocking을 실시하였다. 1차 항체인 rat anti-HLA antibody와 반응시킨 다음 2차 항체인 FITC-conjugated anti rat antibody 와 2시간 암소에서 반응시켰다. PBS로 5분간 3회 수세하여 결합하지 않은 2차 항체는 제거하였고 형광현미경에서 관찰하였다.

Mixed lymphocyte reaction

Allogeneic lymphocytes는 성인의 말초혈액을 채취하여 D-PBS 용액으로 동량 희석한 다음, lymphocyte separation medium 3ml이 담긴 conical tube 위에 이 희석된 혈액 2ml을 조심하여 넣고 400 × g에서 20분간 원심분리하여 분리된 lymphocyte 층만을 흡입 채취하였다. 이를 D-PBS 용액으로 2번 더 원심분리하여 세척하였다. 분리된 lymphocytes는 Concanavalin-A 가 5 ug/ml 농도로 첨가된 DMEM 배양액에서 3일간 배양하여 활성화를 유도하였다. 중간엽줄기세포는 activated lymphocytes와 같이 1:1의 비율로 (각각 1 × 10⁵ 세포수) 접종하여 low-glucose DMEM 배양액으로 37°C/5% CO₂ incubator에서 7일간 공배양하여 그 성장에 대한 간접현상을 조사하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 측정치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 군간의 유의성 검정은 SAS program을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 하였다. 유의성은 5% 수준에서 검증하였다.

결 과

중간엽줄기세포에서 HLA-ABC 및 HLA-DR 항원의 발현

사람 제대혈로부터 분리 배양된 중간엽줄기세포에서 HLA-ABC 및 HLA-DR 항원의 발현을 immunohistochemistry 법으로 확인하였다. 그 결과, 사람 제대혈 유래 중간엽줄기세포에서는 HLA-ABC 항원은 중등도의 양성으로 나타났고, HLA-DR 항원은 음성으로 나타났다(Fig 1).

중간엽줄기세포의 lymphocytes와 allogeneic reactivity에 대한 조사

중간엽줄기세포를 Concanavalin-A의 3일간 처리로 활성화된 allogeneic lymphocytes와 같이 low-glucose DMEM 배양액으로 37°C/5% CO₂ incubator에서 7일간 공배양하여 그 발달에 대한 간접현상을 조사하였다.

중간엽줄기세포를 activated lymphocytes와 같은 세포수

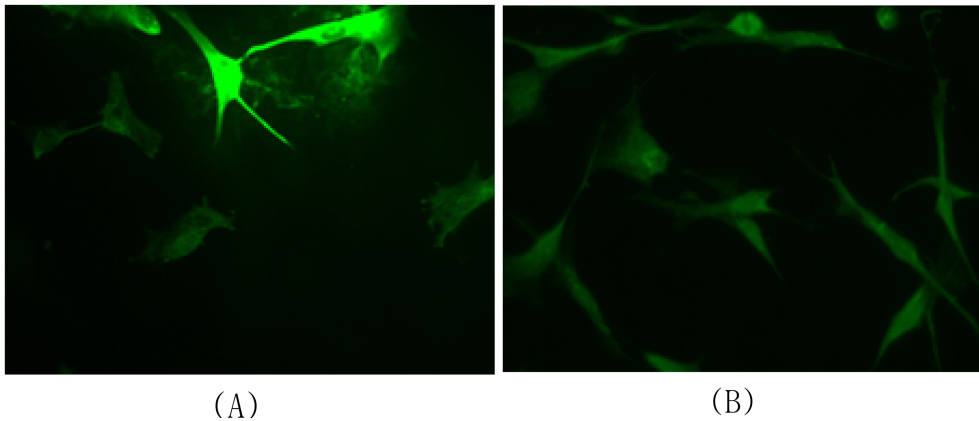


Fig 1. Expression of human HLA-ABC (A) and HLA-DR (B) antigens on the surface of human mesenchymal stem cells (MSCs) by immunocytochemical stain (green color). × 200 magnification.

Table 1. Proliferation of UCB-derived MSC when cultured with or without allogeneic lymphocytes *in vitro* (n = 3)

Groups	Mean number of cells		Mean duplication ratio
	Before culture	After culture	
MSC	1 × 10 ⁵	3.7 × 10 ⁵	3.7 X
MSC + lymphocytes	1 × 10 ⁵	3.2 × 10 ⁵	3.2 X

*The MSC and lymphocytes were cultured in a low-glucose DMEM medium with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics in a CO₂ incubator at 37°C for 7 days. There was no significant (P < 0.05) difference between two groups

(1 × 10⁵)로 접종하고 7일간 공배양하였던 바, 3.2배의 증식율을 보였다(Table 1). 중간엽줄기세포만 배양하였을 경우에는 3.7배의 증식율을 보였다. 증식율에 있어서는 중간엽줄기세포만 배양하였을 경우가 activated lymphocytes와 공배양하였을 경우에 비하여 약간 증식율이 높게 나타났다. 그러나 두 시험구간에 유의할만한 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 중간엽줄기세포는 lymphocytes와 같이 *in vitro culture*에서 배양할 경우 allogeneic lymphocytes로부터 유의할만한 간섭현상을 받지 않는 것으로 나타났다.

고 찰

최근 줄기세포는 T-lymphocytes의 증식을 억제하는 것으로 보고되고 있다 (5,8,10). Keyser (2007) (4)는 근육조직, 지방조직, 망막조직 및 골조직 유래 생쥐 줄기세포를 lymphocytes와 공배양하여 면역억제 효과를 검정하였던 바, 근육조직과 지방조직 유래 줄기세포에서 allogenic T-cell activation을 억제하는 효과가 다른 조직 유래 줄기세포보다 높았다고 하며, 지방조직 유래 줄기세포가 골수유래 줄기세포보다 이식 후 면역억제반응이 적어서 이식에 더욱 적합하다고 한다.

Le Blanc (4), Götherström (2) 및 Lupatov (7)는 골수유래 중간엽줄기세포에서 HLA 항원의 발현을 조사하였는데, HLA

class I 항원은 중등도의 발현을 보였고, HLA class II 항원은 Western blot 분석법으로 세포내에 존재함을 관찰하였으나 세포 표면으로는 매우 낮은 발현을 보였다고 한다.

Götherström (1)은 태아 간유래 중간엽줄기세포에서 HLA class I 항원의 발현은 flowcytometry법 분석으로는 중등도를 보였고, HLA class II 항원의 발현은 flowcytometry 및 Western blot 분석에서는 음성이었다고 한다. 이로부터 분화시킨 지방세포와 골세포에서는 HLA class I 항원의 발현이 낮았고, HLA class II 항원의 발현은 지방세포에서는 낮았고 골세포에서는 음성을 보였다고 한다. 그러나 이들 중간엽줄기세포를 IFN-γ로 처리하였을 경우 HLA 항원의 발현이 증가하였다고 한다.

Keyser (4)와 Wang (11)은 줄기세포의 이종간 또는 다른 개체간 이식에 있어서 제대혈 유래 줄기세포가 골수유래 줄기세포보다 더욱 유리한 것으로 주장하고 있다. 본 연구에서도 제대혈 유래 줄기세포와 이로부터 더욱 분화된 연골세포에서 flowcytometry, immunocytochemistry 및 Western blot analysis 방법으로 HLA class I 과 class II 항원의 발현을 확인하였던 바, 제대혈 유래 중간엽줄기세포와 연골세포에서 이들 항원의 발현이 약하게 나타남으로 앞으로 줄기세포의 이식에 매우 유용한 재료가 될 것으로 기대된다 (미발표 자료).

각종 난치병 치료에 줄기세포를 활용하기 위하여서는 줄기세포에서의 leukocyte antigen class I과 class II의 발현 정도를 확인하는 것이 매우 중요하며 미분화 또는 분화된 줄기세포의 면역체계를 확인하여야만 성공적 이식을 기대할 수 있으므로 이에 관한 연구가 더욱 필요하다. 이의 정확한 이해는 동종간 또는 이종간의 장기이식에서 조직거부반응 (histocompatibility)이 없거나 적은 대체장기의 공급에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

결 론

제대혈 유래 중간엽줄기세포에서 HLA-ABC 항원은 강한 양성으로 나타났고, HLA-DR 항원은 매우 약하게 나타났.

또한 이들 중간엽줄기세포를 activated lymphocytes와 같은 세포수(1×10^5)로 접종하고 7일간 공배양하였을 경우 3.2배의 증식율을 보였다. 증식율에 있어서는 중간엽줄기세포만 배양하였을 경우가 activated lymphocytes와 공배양하였을 경우에 비하여 약간 증식율이 높게 나타났다. 그러나 두 시험구간에 유의할만한 차이를 나타내지 않았다.

위의 결과를 종합하여 볼 때, 제대혈 유래 줄기세포는 다른 조직 유래 줄기세포나 lymphocytes보다 HLA 항원의 발현이 약하며, 또한 allogeneic lymphocyte와 공배양하여도 중간엽줄기세포의 발달을 저해하는 현상이 적게 나타남으로 이식 후 rejection reaction이 적게 나타날 것으로 기대되며, 따라서 줄기세포를 이용한 치료 기술에 있어서 다른 조직 유래 줄기세포보다 더욱 유리하게 활용될 수 있을 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 기초연구과제지원사업(KRF-2008-313-E00644)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 아울러 본 연구를 수행하는데 있어서 훌륭하게 기술적 지원을 해준 차윤임 선생에게 감사합니다.

참 고 문 헌

- Götherström C, Ringden O, Westgren M, Tammik C, Le Blanc K. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 265-272.
- Götherström C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 239-245.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301.
- Keyser KA, Beagles KE, Kiem HP. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant* 2007; 16: 555-562.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890-896.
- Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008; 18: 586-591.
- Lupatov AY, Karalkin PA, Suzdal'tseva YG, Burnova VV, Yargin VN, Yarygin KN. Cytofluorometric analysis of phenotypes of human marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142: 521-526.
- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin M, J, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597-604.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 389-397.
- Wang M, Yang Y, Yang D, Luo F, Liang W, Guo S, Xu J. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology* 2008; 126: 220-232.