

중간엽줄기세포 및 골 전구세포가 조혈모세포 유지에 미치는 영향

최근의 연구 동향을 이해할 수 있도록 몇 편의 논문을 요약하여 하나의 주제로 소개합니다.

참고문헌

- CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. Nature. 2013 Mar 14;495(7440):227-30
- Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature. 2010 Aug 12;466(7308):829-34.
- Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. Nature. 2009 Jan 22;457(7228):490-4.
- The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. Immunity. 2010 Sep 24;33(3):387-99

골수 내 조혈모세포(Hematopoietic stem cell; HSC)의 니치(미세환경; niche)

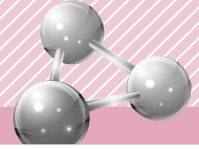
줄기세포의 니치는 줄기세포의 항상성 유지에 필요한 미세 환경을 의미하며 특히, 조혈모세포 니치는 조혈모세포의 이동성(migration)과 휴면(quiescence) 및 분화를 조절하고 조혈모세포의 유지와 자가증식(self-renewal)을 증진시키는 세포막 결합 단백질, 케모카인을 포함한 분비인자를 발현시키는 골수 내 지지세포에 의해 만들어지는 특수화된 미세환경을 말한다. 따라서 니치는 물리적 접촉과 확산 인자를 모두 포함하는 포괄적인 범위라 할 수 있다. 조혈모세포 니치는 현재까지 골수에서 크게 골 내막에 위치하는 골모세포성 니치(osteoblastic niche)와 골수 내 혈관(sinusoid)에 위치하는 혈관내피세포성 니치(perivascular niche, endothelial cell niche)로 구분할 수 있다. 이외에도 신경 세포, 기질세포, 파골세포, 지방세포, 대식세포,

그리고 조혈모세포 스스로에 의해서도 조절 받는 등 복잡한 구조적, 분자적 네트워크이다.

조혈모세포 니치세포의 형성을 위한 중간엽세포의 규명

골수 내 존재하는 중간엽줄기세포는 뼈, 연골, 그리고 다른 중간엽세포로 분화할 수 있는 분화능을 가진 세포이다. 최근에 이들 세포에 대한 표면마커의 규명, 분화능 검증을 위한 연구뿐만 아니라 조혈모세포의 니치 형성에 관여하여 조혈세포의 면역반응과 조직재생 조절에 있어 그 역할을 규명하는 연구가 보고되고 있다. 마우스에서 중간엽줄기세포는 Nestin⁺CD45⁻CD31⁻ 혹은 PDGFR α ⁺SCA-1⁺CD45⁻Ter119⁻ 표면마커단백질을 통해 골수 내 다른 지지세포 혹은 기질세포와 구분 할 수 있다. 하지만 골수 내에는 중간엽줄기세포에서 분화된 골 전구세포, 골모세포를 포함하여 다양한 세포가 존재하며, 골수 내 세포들과 물리적접촉(physical contact)을 하거나 확산인자(diffusible factors)를 통해 조혈모세포 조절에 영향을 미친다고 알려져 있다.

현재까지 보고된 결과에 따르면 *In vitro* 실험에서 골모세포가 조혈모세포의 증식과 분화능 조절에 관여하는 것이, *in vivo* 실험에서는 이미징기술로 골 내막에 미분화된 조혈세포가 위치한다는 것을 밝혀졌다. *Colla1* promoter를 통해 골모세포에 특이적으로 herpes virus thymidine kinase가 조절되는 유전자 조작마우스에서 골모세포의 제거로 조혈모세포의 수를 감소 유도되었고 PTH(Parathyroid hormone)가 골모세포에 특이적으로 과발현 된 마우스에서는 골모세포의 증가, 해면골의 증가에 따른 조혈모세포의 수 증가를 유도하였다. 또한 골수 내



Nestin⁺CD45⁻ 중간엽줄기세포가 조혈모세포의 유지에 중요한 니치세포라 밝혀졌다. 이를 통해 중간엽줄기세포 및 골 전구세포 혹은 골모세포에 의해 조혈모세포의 증식과 분화에 조절되어 니치세포임을 알 수 있다.

하지만 *Coll1a1* promoter을 통해 골모세포에서 G-protein coupled receptor의 지속적 발현유도가 된 마우스에서 해면골은 증가되었지만 골모세포에서 니치관련 유전자 SDF-1, angiopoietin, VCAM의 발현의 감소로 조혈모세포의 항상성 유지에 실패하였다. 따라서 최근에 조혈모세포의 후보니치세포 규명을 위해 특정 골 분화단계를 조절할 수 있는 프로모터와 하부에 Cre 재조합 효소를 통해 조건부 유전자 파괴가 된 유전자 조작 마우스를 활용한 조혈모유지 유전자 결손이 골수 내 조혈모세포의 상실 및 기능에 미치는 영향을 확인하여 규명하고 있다.

● CXCL12 케모카인을 통한 중간엽줄기세포 및 골 전구세포의 조혈모니치세포로서의 역할규명

골수 내 니치세포가 조혈모세포의 항상성 유지에 관여하지만 각 조혈세포로의 분화가 가능한 특정 조혈전구세포들 (MEP; Megakaryocyte-erythrocyte progenitor, CMP; Common myeloid progenitor, CLP; Common lymphoid progenitor)과 조혈모세포를 조절하는 니치세포 및 어떤 니치세포에서 분비하는 조절인자에 의해 이 세포들이 조절 받는지 명확하지 않았다.

최근 미국 Washington 대학 Daniel C. Link 그룹과 일본 Kyoto 대학의 Takashi Nagasawa 그룹의 공동연구를 통해 Nature지에 게재된 논문에서 조건부 유전자 파괴가 된 유전자 조작 마우스를 활용하여 골수 내 특정 기질세포에서 분비하는 CXCL12 케모카인의 조절이 조혈모세포의 항상성 유지에 미치는 영향에 대한 결과를 발표하였다. CXCL12는 조혈모세포에서 발현하는 CXCR4 수용기로 인해 조혈모세포가 골수 내에 유지되는 것과 이동성, 휴면을 조절한다. 이들은 특정 니치세포에서 분비하기 보다는 현재까지 알려진 골수 내 다양한 니치후보세포인 기질세포, 골모세포, Nestin⁺ 중간엽줄기세포 등에서

분비된다. 이 논문에서는 CXCL12 발현 후보니치세포에서 Cre-LoxP system과 후보니치세포를 조절가능한 특정 프로모터를 활용하여 조건부 CXCL12 유전자 파괴 동물모델을 제작하였다. 혈관내피세포와 골모세포에서 CXCL12 결손 마우스 제작을 위해 Floxed CXCL12 (CXCL12^{fl/fl}) 마우스와 Tie2-cre와 osteocalcin (OC)-cre 마우스를 통해 혈관내피세포와 골모세포에서 CXCL12 결손모델을 확립하였고, 골전구세포와 중간엽줄기세포에서 CXCL12 결손 마우스 제작을 위해 각각 OSX-cre와 PRX1-cre 마우스를 이용하였다. OC-cre와 Tie2-cre 타깃마우스의 골수에서는 CXCL12 mRNA와 단백질의 발현이 컨트롤 마우스와 비슷한 수준이었으며, OSX-cre 타깃 마우스에서는 70%감소, 그리고 PRX1 타깃 마우스에는 거의 발현을 확인할 수 없었다. CXCL12-abundant reticular(CAR) 세포에서 CXCL12 결손을 위해 CXCL12^{fl/efl}와 OSX-cre 혹은 Prx1-cre 마우스 교배를 한 후 CAR 세포만 분리한 후 mRNA를 확인한 결과 감소함을 확인하였다. 하지만 Tie2-cre 타깃 마우스에서 골수에서 정상 수준의 발현을 나타내었지만 혈관내피세포인 CD31+Lin-CD45- 세포를 분리 후 mRNA의 발현을 확인한 결과 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해서 CXCL12는 CAR 세포에서 주로 분비하고 골 전구세포와 혈관내피세포에서 부분적으로 분비됨을 알 수 있다.

제작된 모든 CXCL12 결손 마우스의 말초혈액에서 혈구계산을 한 결과, 모두 정상수준이지만 골수 내 세포충실성(cellularity)은 OSX-cre, PRX1-cre 타깃마우스에서 50%수준으로 감소하였다. 이는 부분적으로 B 세포의 수가 감소하였기 때문인데, KSL(cKit+Sca-1+Lin-), 다능전구세포(multipotent progenitor cell)는 모든 마우스모델에서 정상수준으로 나타났다. CMP의 경우에 PRX1 타깃 마우스에서만 2배 감소하였다. 조혈모세포의 세포 수를 확인한 결과에서는 혈관내피세포 혹은 골모세포에서 CXCL12의 제거는 조혈모세포의 수에서 영향을 주지 않았다. OSX-cre 타깃 마우스의 골수에서 조혈모세포의 빈도는 정상수준이었지만 세포충실성 감소로 실제 조혈모세포의 수는 감소하였다. PRX1 타깃 마우스 골수에서 조혈모세포의 빈도 및 세포수가 모두 감소하였고 세포주기가 긴 휴면기 조혈모세포를 거의 확인 할 수 없었다. 이는 competitive repop-

ulating assay을 통해 검증하였다. Tie2-cre 타깃 마우스의 골수에서 조혈모세포의 수는 정상이지만 long-term repopulating activity가 크게 감소하였다.

휴면성은 조혈모세포의 근본적인 특징 중 하나로 long-term repopulating activity와 밀접한 관련이 있다. 따라서 제작된 조건부 CXCL12 유전자 파괴 동물모델에서 확인한 결과, PRX1-cre 타깃 마우스에서 세포주기가 증가된 조혈모세포를 확인하였는데 KSL 전구세포의 세포주기의 증가는 PRX1-cre, OSX-cre 타깃 마우스에서 관찰되었다. 이러한 결과는 PRX1 프로모터 기질세포와 혈관내피세포에 의해 분비된 CXCL12가 조혈모세포의 repopulating activity 유지와 휴면성에 관여하고, 이들 세포들이 조혈모세포 유지에 필수적 니치세포로 여겨진다.

CXCL12는 골수 내 조혈모세포에서 발현되는 수용체 CXCR4에 의해 골수 내 유지에 관여한다. 제작된 마우스모델에서는 PRX1-cre, OSX-cre 타깃 마우스에서 혈액과 비장으로 조혈전구세포의 이동성이 증가하였다. OSX-cre 타깃 마우스 기질세포는 조혈모세포의 유지에는 관여하지 않지만 조혈전구세포가 골수 내에 유지하는데 관여하는 니치세포로 보여진다.

Pre-pro B 세포가 CAR 세포 주변에 위치하고 이들 세포는 CLP 그리고 pro B 세포의 유지에 필수적 요소로 알려져 있다. 각 마우스모델의 골수에서 B세포 표면마커단백질로 FACS 분석을 통해 골모세포와 혈관내피세포 유래보다 골 전구세포, CAR 세포 유래의 CXCL12가 BLP(B-lymphoid-committed progenitor)에 관여하여 이들이 BLP 유지에 필요한 니치세포이며, 골내막 골모세포와 혈관주변의 기질세포가 CLP 유지에 관여하는 CXCL12를 분비하는 니치세포로 증명하였다.

PRX1 전사인자를 다분화중간엽전구세포(multipotent mesenchymal progenitor)을 타깃하는 프로모터로 사용하였는데, lineage mapping을 위해 실제 중간엽줄기세포로 후보 니치세포인 PDGFR α +SCA1+(PaS) 세포와 비교한 결과 PRX1 타깃세포 중 50%가 이에 해당되는 세포임을 FACS 분석을 통해 증명하였다. PRX1 타깃 PaS 세포는 Nestin과 CD146이 발현이 되지 않았다.

이로서 조혈모세포의 후보니치세포 규명을 위한 조건부

CXCL12 유전자 파괴 동물모델을 통해 골수 내 각각의 기질세포의 후보니치세포들이 특정 조혈전구세포를 조절하기 위해 존재하고, OSX가 발현하는 기질세포(골 전구세포)는 BLP와 골수 내 조혈전구세포가 유지되도록하는 니치세포로, 반면에 CXCL12분비 nestin⁻leptin receptor⁻ 다분화중간엽전구세포(PRX1타깃 기질세포)는 조혈모세포와 CLP 유지에 필요한 니치세포로 제시하였다.

이 논문에 제시한 것처럼 골수 내 조혈모세포의 기능조절에 관여하는 후보니치세포를 검증하기 위한 조건부 유전자 파괴 동물모델을 활용이 높을 것으로 보여진다.

▶ 윤경애 (서울대학교 수의과대학 수의생화학교실)