

NOD/SCID 모델 마우스 생체 내 돼지 T 면역세포의 증식 및 분화

이용수¹ · 김태식¹ · 김재환¹ · 정학재² · 박진기² · 장원경² · 김동구^{1,*}

¹포천중문의과대학교 세포유전자치료연구소, ²축산연구소 응용생명공학과

Differentiation and Proliferation of Porcine T Lymphocytes in NOD/SCID Mice

Yong-Soo Lee¹, Tae-Sik Kim¹, Jae-Hwan Kim¹, Hak-Jae Chung², Jin-Ki Park²,
Won-Kyong Chang² and Dong-Ku Kim^{1,*}

¹Cell and Gene Therapy Research Institute, Graduate School of Life Science and Biotechnology,
Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

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

ABSTRACT

The nonobese diabetic / severe combined immune deficiency (NOD/SCID) has been used for determination of proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells as xenotransplantation animal model. In this study, we transplanted porcine hematopoietic cells from bone marrow into NOD/SCID mice via intravenous injection to confirm the activity of differentiation and proliferation for porcine hematopoietic cells *in vivo*. Interestingly, we observed the results of high efficiency with pig T lymphocytes in hematopoietic organs, liver, spleen, lymph node, and bone marrow in NOD/SCID mice. The porcine CD3⁺ T cells were detected with 5.4±1.9% in bone marrow, 15.4±7.3% in spleen, 21.3±1.4% in liver, and 33.5±32.8% in lymph node of NOD/SCID mice at 6 weeks after transplantation. Furthermore, immunohistochemical analysis showed the high engraftment of porcine T lymphocytes in spleen of NOD/SCID mice. Our data suggest that NOD/SCID mice are excellent animal model to determinate the generation and function of pig T lymphocytes.

(Key words : Porcine hematopoietic cells, NOD/SCID mouse, Porcine T cells, Engraftment)

요 약

NOD/SCID 마우스는 선천성 면역결핍을 지닌 마우스로서 이종 세포 및 조직 이식을 위한 실험동물로서 가장 많이 활용되고 있다. 본 연구는 돼지의 골수조직에서 채취한 조혈줄기세포를 면역결핍마우스의 정맥 주입을 통하여 생체 내 주입을 실시한 결과, 마우스의 조혈조직에서 대단히 높은 돼지 T 면역세포의 증식이 관찰되었다. 유세포 분석기를 이용해 돼지 골수 조혈세포 생체 이식 6주의 마우스에서의 돼지 T 면역세포의 증식과 분화 특성을 분석한 결과, 마우스 조혈조직인 골수(5.4±1.9%), 비장(15.4±7.3%), 간(21.3±1.4%), 림프절(33.5±32.8%)에서 돼지 조혈줄기세포 유래 T 세포의 증식과 분화가 관찰되었고, 돼지 helper T 세포와 cytotoxic T 세포의 발달도 확인되었다. 또한 조직 면역염색을 통하여 마우스의 비장조직에 이식한 돼지 면역세포의 증식을 관찰하였다. 본 연구는 NOD/SCID 마우스를 이용해 돼지 조혈줄기세포로부터 T 면역세포로의 분화 및 발달과정을 생체 내에서 분석할 수 있는 유용한 동물모델로서 이용할 수 있음을 보여준다.

서 론

생체를 구성하는 혈액세포는 골수에 존재하는 조혈줄기세포의 끊임없는 재생에 의해서 생성되고 있다. 배아발달과정에서의 조혈줄기세포는 태아 간 조직에서 존재하

여 출생과 더불어 골수조직에 정착하여 일생을 거쳐 성숙한 혈구세포인 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 만들어 내고 있다. 성체 조직의 골수에 존재하는 조혈줄기세포는 자신과 동일한 세포를 만들어낼 수 있는 자기복제 능력과 함께 성숙한 혈구세포를 만들어낼 수 있는 다분화능력을 지니고 있다 (Keller와 Snodgrass, 1990; Morrison

* 본 연구는 바이오 그린 21사업 연구비(2005041034790) 및 세포융용사업단(SC3240)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-3468-3394, E-mail: dokukim@cha.ac.kr

등, 1995). 백혈병 치료제로서 대표되는 조혈줄기세포의 생체 이식 및 기초연구는 약 50년 전에 발견된 방사선 기기로 인하여 비약적인 발전이 이루어졌고, 또한 가장 활발한 기초 연구 및 임상 이식이 이루어지고 있는 분야이다. 배아줄기세포와 더불어 성체 줄기세포 분야에 가장 대표적인 줄기세포인 조혈줄기세포는 폭넓은 임상적용분야 및 치료효능으로 인하여 가장 오랜 연구결과를 산출하고 있다 (Motonari 등, 2003). 조혈줄기세포의 기능과 특성을 연구하는 방법으로는 시험관에서 이루어지는 조혈재생 능력 검증 방법인 CFU-C와 HPP-CFU 및 LTC-IC 등이 존재하며 생체 이식을 통한 생체내의 조혈재생능력을 검증하는 방법이 널리 이용되고 있다 (Nakahata와 Ogawa, 1982; McNiece 등, 1989; Sutherland 등, 1989). 마우스의 조혈줄기세포 연구는 시험관과 생체 내의 특성 규명 검증 방법이 손쉽게 활용 가능하다는 이유로 가장 활발하게 연구가 진행되어 왔으며 이로 인하여 수많은 관련 기초 연구가 발표되고 있다. 그에 비해서 인간의 조혈줄기세포 연구는 대부분이 시험관에서 이루어지고 있으며 최근의 질환모델마우스 및 면양을 이용해 인간 조혈세포의 생체이식 연구가 진행되고 있는 실정이다 (Srouf 등, 1993; Tasi 등, 2002). 그러나 돼지의 조혈줄기세포에 대한 연구는 시험관 및 생체 내에서의 특성분석을 위한 조혈인자의 부재와 함께 적당한 생체이식용 동물모델의 부재로 인하여 기초연구가 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 현재 활용되고 있는 이종 세포 및 장기 이식용 동물모델로서는 선천성 면역결핍모델인 SCID (severe combined immunodeficient disorder) 마우스이며, scid 유전자 변이에 의해서 동종 및 이종이식의 면역거부 반응을 조절하는 T세포와 B세포가 존재하지 않는 마우스로서 사람의 조혈줄기세포 및 조지 이식용 동물모델로서 이용되어 왔다 (Kamal-Reid와 Dick, 1988; McCune 등, 1988; Nolte 등, 1994). 최근에는 당뇨병(nonobese diabetic, NOD) 동물모델과 면역결핍(SCID) 마우스의 교배를 통해서 개발된 NOD/SCID(Non Obese Diabetic/SCID) 동물모델 마우스는 면역거부반응에 관여하는 T, B세포가 존재하지 않으며 NK(Natural Killer), 마크로파지, 보체 등의 기능이 정상 마우스에 비해서 월등히 낮은 특성을 지니고 있다. 이러한 특성을 이용해 사람조혈줄기세포 및 장기를 생체에 이식하는 다양한 연구에 활용되어 왔으며 특히 사람 조혈줄기세포의 생체이식 결과 성숙 조혈세포의 분화 및 성숙 효능이 다른 동물모델에 비해서 월등히 높은 증식을 나타내었다. 인간 조혈 줄기 세포를 면역결핍마우스 모델에 이식 후 분석한 결과 인간 조혈 줄기 세포의 증식과 분화가 마우스 생체 내에서 일어난다는 것이 증명되었고 림프구 세포의 분화 발달에 적합한 동물 모델임이 증명되었다. 또한 SCID 마우스의 이종세포 증식에 비해서 매우 높은 증식 능력이 검증되었으며 성숙한 기능성 조혈세포로의 분화 및 자기복제능력을 유지하고 있다는 사실이 보고되었다 (Shultz 등, 1995; Wright 등, 2001; Hall 등, 2006).

본 연구는 돼지 골수에서 추출한 조혈 줄기 세포를 이용하여 동물모델 NOD/SCID 마우스 생체이식을 통하여 이종 조혈장기에서의 증식 능력과 더불어 분화 특성을 분석하였다. 마우스 생체 이식 후 혈액과 간장, 비장, 흉선조직 및 골수조직에서의 돼지 조혈세포의 증식 및 분화 특성을 유세포 분석기를 이용해 돼지 조혈세포 특이적 항체의 면역염색을 통하여 조사를 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구에 이용된 동물모델은 6~7주령의 NOD/SCID 마우스를 이용하였으며 SPF(specific pathogen-free) 조건에서 멸균된 깔짚과 물과 사료를 공급하여 사육하였다. 사육실의 사육조건으로 온도는 24~26°C, 습도는 45~55%로 유지하였다.

돼지 골수 조혈줄기세포 채취

축산연구소에 사육되고 있는 돼지 (5~8주령)의 골수조직 대퇴부에서 주사기(18G)를 이용해 돼지골수를 채취하였고 Ficoll-paque TM plus (Lymphocyte isolation, 0.12 EU/ml; Amersham Biosciences, Sweden)으로 density gradient centrifugation하여 돼지 조혈 줄기세포 분획을 분리하였다. 분리된 돼지 조혈 줄기세포는 PBS (phosphate-buffer saline)에 2% FBS (fetal bovine serum)이 포함된 solution에서 washing과 suspended하여 NOD/SCID 마우스 이종 생체이식용 세포로 이용하였다.

돼지 조혈 줄기세포의 이종이식

NOD/SCID 마우스는 돼지 골수 유래 조혈줄기세포의 생체이식 24시간 전에 γ -ray 방사선기기로 200cGy의 방사선 조사를 실시하였으며 돼지 조혈 줄기세포를 100 μ l의 PBS에 부유하고, 주사기(ultra-fine needle, BD insulin stringe, USA)를 이용하여 NOD/SCID 마우스 한 마리당 1×10^7 cells의 돼지 조혈줄기세포를 정맥 주입을 통하여 생체이식을 실시하였다.

돼지 조혈세포 생체 분석을 위한 돼지 특이 항체

돼지 조혈줄기세포를 이식한 NOD/SCID 마우스 생체 내에서의 돼지 조혈세포의 생체와 분화 특성 분석을 위한 돼지 조혈세포 특이적인 항체는 BD bioscience로부터 구입하여 사용하였다. 돼지 T 면역세포 특이적인 항체인 CD3e (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated), CD4 (phycoerythrin (PE)-conjugated) 및 CD8 (phycoerythrin (PE)-conjugated) 항체를 이용해 유세포 분석용 항체로서 사용하였다.

유세포 분석을 통한 돼지 면역세포 생체 능력 검증

돼지 골수 유래 조혈세포의 생체이식을 실시한 NOD-SCID 마우스의 말초혈액에서의 돼지 조혈세포의 증식을 분석하기 위해, 이식 후 6주 마우스의 혈액을 채취하여 돼지 T 면역세포의 혈액 내 키메리즘 분석을 실시하였다. 단핵구 세포에 돼지 T 면역세포 특이적 항체인 pCD3, pCD4, pCD8로 면역염색을 실시하고, 유세포 분석기를 이용하여 면역결핍마우스의 말초 혈액 내에서의 돼지 T 림프구 세포의 이종 동물모델 혈액내의 증식 및 분화 특성을 분석하였다. NOD/SCID 마우스의 조혈조직에서의 돼지 면역세포의 증식 능력 분석을 위하여 이식 후 6주에 마우스를 도살하여 마우스의 간장, 비장, 림프절, 골수조직을 채취하여 mesh를 이용하여 single cells을 준비하였다. 혈액 및 조직에서 채취된 단핵구 세포는 항체 면역염색용액인 염색용액(PBS containing 2% FBS, 0.05% Na₂)

에 부유하여 nylon filter를 통과시켜서 debris를 제거하였다. 1×10^6 의 세포를 돼지 면역세포 특이 항체인 CD3, pCD4, pCD8로 면역 염색을 실시한 후에 4°C의 암실에서 30분간 반응시킨 후 염색용액으로 두번 세척을 실시하였다. 돼지 조혈세포의 마우스 조혈조직에서의 키메리즘 분석은 유세포 분석기인 FACS vantage SE (Becton Dickinson, CA)를 이용하여 분석을 시행하였다.

조직 면역염색형광법을 이용한 돼지면역세포 생착 능력 검증

돼지 골수 유래 조혈 줄기세포 이식된 NOD/SCID 마우스로부터 비장 조직을 떼어내고 동결을 위하여 O.C.T compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, 103, Japan)로 동결시킨 후, -80°C 냉동고에서 보관하였다. 6~7 μm 의 크기로 동결조직절단기로 조직을 절단하여 100% 알코올에서 10분간 고정하였으며, PBS 세척 후 1% BSA에서 blocking하였다. 돼지 T 면역세포 특이적인 항체인 항 돼지 CD3e(fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated), 항 돼지 CD4 (phycoerythrin (PE)-conjugated) 및 항 돼지 CD8 (phycoerythrin (PE)-conjugated) 항체를 이용하여 상온의 암실에서 30분간 면역염색을 시행하였다. 염색 후 PBS로 3번의 세척 후 mounting solution (DakoCytomation Glycergel mounting medium, 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 USA)을 이용하여 조직을 고정하고 형광현미경으로 분석하였다.

결 과

돼지 골수 조혈 줄기세포 이식 NOD/SCID 마우스의 혈액 분석

돼지 골수 유래 조혈 줄기세포를 NOD/SCID 마우스에 생체 이식한 후 6주 후 돼지 T 면역세포 특이적 항체인 pCD3, pCD4, pCD8로 면역염색을 실시하여 돼지 T 림프구 세포의 키메리즘을 분석한 결과, Fig. 1에서와 같이 혈액 내의 돼지 pCD3 양성 T 면역세포는 평균적으로 $10.7 \pm 1.7\%$ 가 존재하고 있다는 사실이 확인되었으며 이중 돼지 세포독성 T 면역 세포($\text{CD}8^+$ T cells)와 조절 T 면역세포 ($\text{CD}4^+$ T 세포)의 존재를 확인한 결과 $3.4 \pm 1.6\%$ 의 조절 T 림프구와 세포독성 T 림프구가 존재하고 있다는 결과를 얻었다. 따라서 면역결핍마우스의 말초혈액에서 10% 이상의 높은 키메리즘과 더불어 정상 세포독성 T 세포 및 조절 T 면역세포의 증식이 관찰되었다.

NOD/SCID 마우스 골수 조직에서의 돼지 T 림프구 세포의 증식 분석

동물모델 NOD/SCID 마우스 생체 이식 돼지 조혈 줄기세포가 마우스 골수조직에 정상적인 증식이 이루어졌는지를 분석하기 위하여 마우스 골수조직에서의 돼지 T 면역세포의 키메리즘을 분석하였다. 유세포 분석기를 이용해 돼지 면역세포의 골수 키메리즘을 분석한 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 대조군의 마우스 골수에 비교하여 돼지 조혈 줄기세포를 이식한 마우스의 골수조직에서 돼지 T 면역세포인 pCD3 양성 세포가 $5.4 \pm 1.9\%$ 의 키메리즘을 나타내었으며 조절 T 림프구와 세포독성 T 림프구의 경우

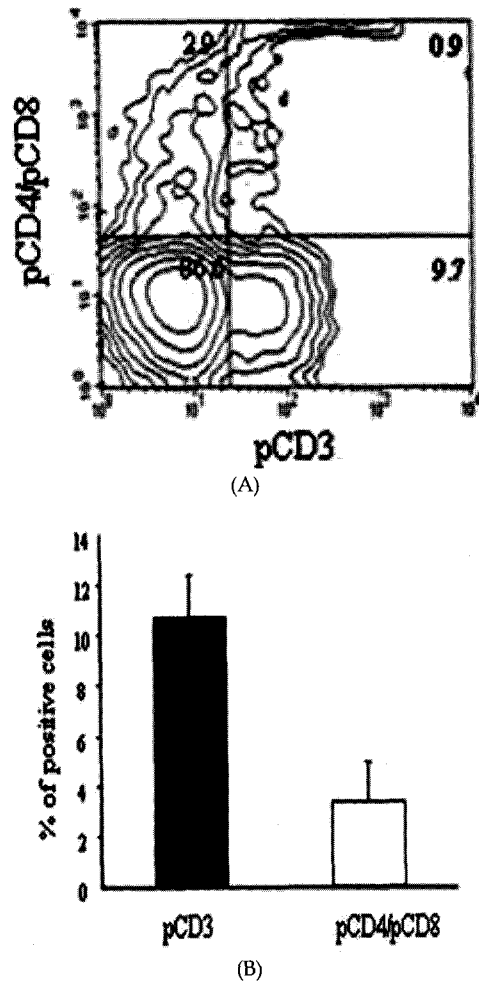


Fig. 1. Engraftment of porcine T lymphocytes in peripheral blood of bone marrow injected NOD/SCID mice. The profile of flow cytometry was shown (A). The percentage of pig $\text{CD}3^+$ T cells and pig $\text{CD}4/\text{pig CD}8$ T cells was demonstrated at 6 weeks after transplantation (B).

는 $3.7 \pm 0.7\%$ 의 비율로 존재하고 있다는 결과를 얻었다.

돼지 조혈 줄기세포 이식 NOD/SCID 마우스의 조혈조직에서의 발달 분석

돼지 골수 유래 조혈줄기세포를 생체에 이식한 NOD-SCID 마우스의 2차 면역기관인 간, 비장, 림프절 조직에서의 돼지 T 면역세포의 키메리즘 형성을 검증하기 위하여 각 조직 유래 세포를 분리한 후, 유세포기를 이용해 분석한 결과, Fig. 3과 같이 간 조직에서는 pCD3 양성 돼지 T 면역세포가 $21.3 \pm 1.4\%$ 의 비율로 존재하고 있으며, pCD4와 pCD8 양성 면역세포가 $11 \pm 4\%$ 의 높은 비율로 존재하였다. 또한 비장조직에서는 돼지 T 면역세포가 $15.4 \pm 7.3\%$ 가 존재하였고, pCD4 T 세포 및 pCD8⁺ 세포의 경우 $4.7 \pm 0.8\%$ 의 비율로 존재하고 있다는 사실이 판명되었다. 림프절 조직에서는 pCD3 양성 돼지 면역세포가 $33.5 \pm 32.8\%$ 의 비율로 매우 높은 키메리즘을 형성하고 있었으며, pCD4 양성 T 세포, pCD8 양성 T 세포는 $22.1 \pm 15.7\%$ 로 다른 조직에 비해서 월등히 높은 증식 효능이 관

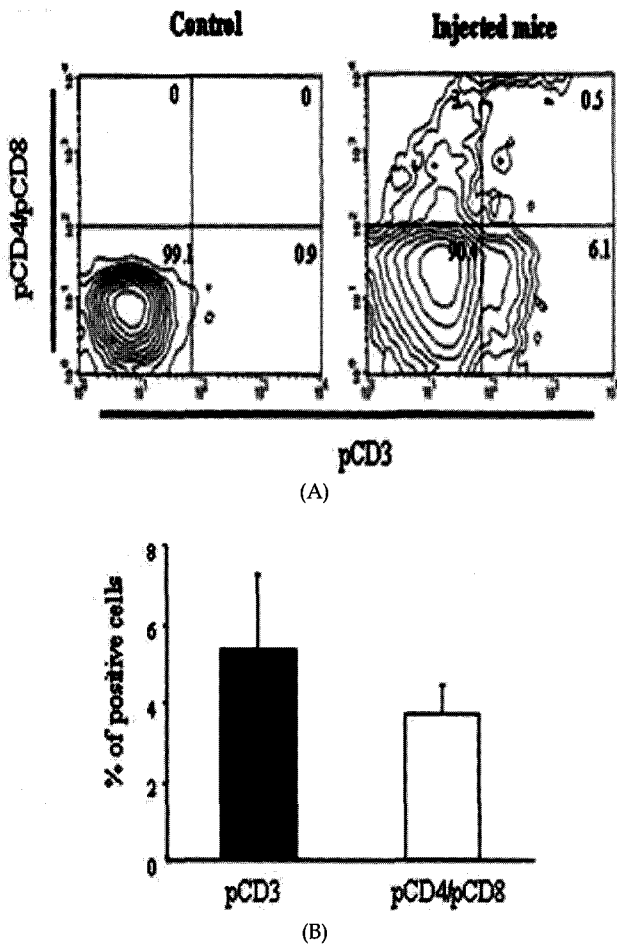


Fig. 2. The presence of pig T cells in bone marrow of pig bone marrow injected NOD/SCID mice. The analysis of flow cytometry was conducted with bone marrow from NOD/SCID mice injected with pig bone marrow cells at 6 weeks (A). The percentage of pig CD3⁺ T cells and pig CD4/pig CD8 T cells was shown (B).

찰되었다.

비장조직의 돼지 면역세포의 면역형광염색 분석

유세포 분석기를 이용한 마우스 조혈조직 생체 내에서의 돼지 T 면역세포 분석 결과 돼지 면역세포의 높은 증식 능력이 관찰되었으며, 면역염색형광 분석을 이용해 돼지 골수 이식 마우스의 비장 조직을 돼지 T 면역세포 특이적 항체인 pCD3, pCD4, pCD8으로 염색을 실시하여 분석한 결과, Fig. 4와 같이 비장조직 내에서 pCD3+인 돼지 면역세포가 관찰되었고 pCD4/CD8⁺ 면역세포의 정상적인 증식과 분화가 확인되었다. 또한 pCD3와 pCD4/ pCD8 양성의 세포가 관찰되어 비장조직에 존재하고 있는 세포는 돼지의 기능성의 성숙한 T 면역세포임이 입증되었다.

고 찰

동종 이식 및 이종 이식용 동물모델로서의 NOD/SCID

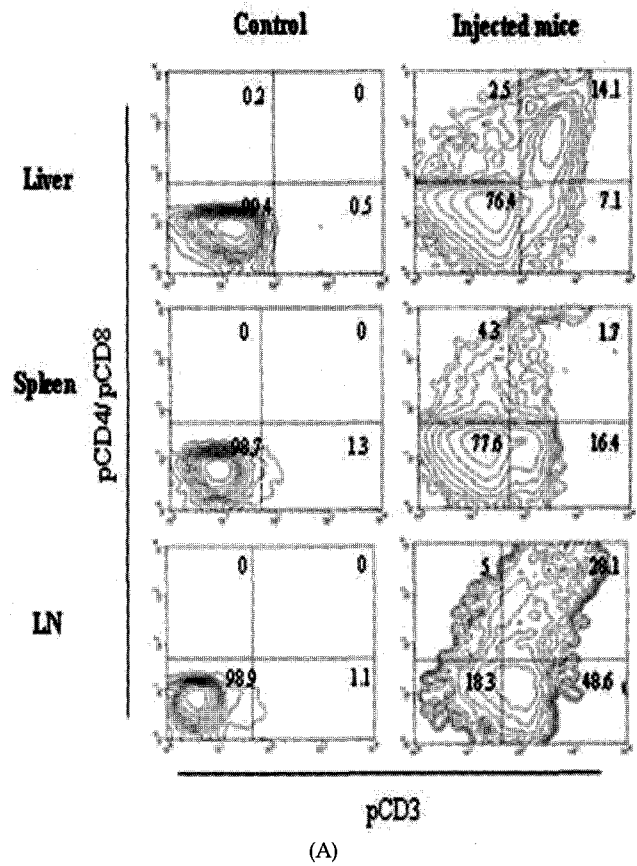


Fig. 3. Development of pig T lymphocytes in the hematopoietic tissues of NOD/SCID mice. Typical profiles of pig T lymphocytes from liver, spleen and lymph node of repopulated NOD/SCID mice after 6 weeks from transplantation (A). The percentage of pig CD3⁺ T cells and pig CD4/pig CD8 T cells was demonstrated (B).

마우스는 선천성 유전결핍과 당뇨병 동물모델로서 면역 거부반응에 관여하는 마우스의 면역세포가 결핍 또는 기능이 낮은 특성을 지닌 마우스로서 사람의 조혈줄기세포의 자기복제 능력 검증 및 다 분화 능력을 생체 내 검증하기 위한 가장 좋은 동물 모델이다. 사람의 세포를 마우

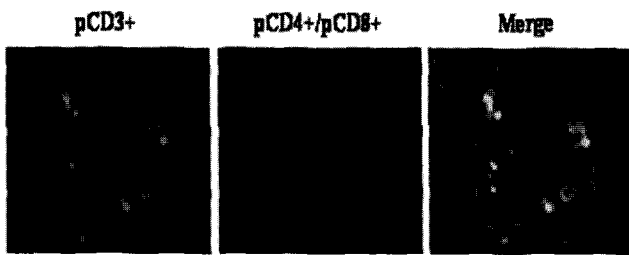


Fig. 4. Immunohistochemical analysis of pig T cells in spleen from pig T cells engrafted NOD/SCID mice. The stain of pig CD3⁺ T cells and pig CD4/pig CD8 T cells was shown.

스와 같은 이중 동물모델 생체 내에서의 증식을 유도하기 위해서는 마우스의 T 면역세포에 의한 면역거부반응을 제어하는 것이 가장 중요하다 (van Hennik 등, 1999; Kollet 등, 2000).

본 연구는 NOD/SCID 마우스를 이용해 돼지 골수 조혈세포를 이중 동물모델 생체 내에서 이식을 실시하여 마우스 조혈조직에서의 이중 돼지 T 면역세포의 분화 및 증식 능력을 분석하는 가장 좋은 동물모델임이 판명되었다. NOD/SCID 마우스를 이용해 사람 T세포의 증식 및 분화 특성을 연구하는 방법으로는 사람의 골수조직을 마우스 피하조직에 이식을 실시하여 마우스 혈액에서 40% 이상의 높은 T 면역세포의 키메리즘을 유도한 결과가 보고되었으며, NOD/SCID-β₂ microglobulin 결핍 동물모델을 이용해 사람 말초혈액을 이식한 결과 20% 이상의 높은 사람 T 면역세포의 키메리즘이 비장에서 관찰되었다 (Christianson 등, 1997; Kollet 등, 2000; Glimm 등, 2001; Kollet 등, 2001). 생체 면역기능을 담당하고 있는 T 면역세포는 골수 속에 존재하는 조혈줄기세포로부터 분화된 T 면역 전구세포(progenitor)로부터 분화 발달된 세포이다. 마우스에서 T 면역세포의 발달과정을 분석한 결과, 골수 조혈줄기세포인 c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻의 세포에서 분화된 세포인 IL-7Rα⁺Sca-1^{low}c-kit^{low}의 세포특성을 지닌 세포를 방사선 조사된 마우스에 이식을 실시한 결과 이세포로부터 T, B, NK 및 수지상 세포(DC)의 분화가 유도됨이 밝혀져 마우스 면역전구세포의 특성이 밝혀졌다 (Kondo 등, 1997; Fujiki 등, 2000). 사람의 T 면역 전구세포에 대한 연구는 제대혈액 및 골수 유래의 CD34⁺CD38^{low} 특성을 지닌 세포를 시험관 배양법(FTOC; fetal thymic organ culture)을 이용해 분화를 유도한 결과 유의하게 사람 T 세포의 분화가 관찰되었다 (Amanda 등, 1990; Robin 등, 1999). 그러나 현재까지 돼지의 T 세포의 발달과정에 대한 생체분석 연구에 어려운 점은 돼지에 따른 면역세포 특이적인 항체의 부재와 함께 동종이식의 어려움과 돼지와 같은 대 동물에 방사선을 조사할 수 있는 시설을 얻기가 불가능하였다.

본 연구는 NOD/SCID 동물모델을 이용해 돼지의 골수 유래 조혈줄기세포를 생체 이식하여 마우스 생체 내에서 정상적인 돼지의 T 면역세포의 증식이 관찰되었으며 마우스 조직에서 약 5~30% 이상의 높은 돼지 T 면역세포의 증식능력이 관찰되었다. 정상적인 T 면역세포는 골수 조직의 T 전구세포로부터 흉선을 거쳐 2차 조혈기관인 말초혈액과 비장,간장, 및 림프절로 세포가 이동한다. 돼지 골수 조혈세포를 이식한 NOD/SCID 마우스에서도 골

수조직과 말초혈액과 비장, 간장 및 림프절에서 돼지의 T 면역세포의 발달이 관찰되었으며, 이는 마우스의 조혈기관에서의 T 면역세포의 분화 및 발달을 지지하는 환경이 돼지의 면역세포의 증식과 분화를 지지하고 있다는 사실이 증명되었다. 또한 돼지 골수 조직 유래 조혈줄기세포를 이식한 NOD/SCID 마우스의 말초혈액을 비롯한 모든 조직에서 관찰된 돼지의 CD4⁺CD8⁺ T 세포는 CD3 양성세포와 음성세포가 존재하고 있다는 사실이 밝혀졌다. 사람의 T 면역세포의 전구세포에 대한 연구결과인 CD3-CD4⁺CD8⁺의 전구세포와 동일한 세포 특성을 지니고 있어 본 연구에서 관찰된 NOD/SCID 마우스 조혈조직인 골수, 비장, 간장, 림프절 및 말초혈액에서의 CD3-CD4⁺CD8⁺ 세포가 관찰되어, 이 전구세포로부터 성숙한 돼지 T 면역세포인 CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 세포가 분화 발달되어지고 있음을 시사하는 중요한 연구 결과라 할 수 있다 (Hori 등, 1991; Mabuchi 등, 1998).

본 연구는 NOD/SCID 마우스 모델을 이용해 돼지의 면역전구세포 규명 및 T 면역세포의 분화 특성 규명 및 증식 기전 연구를 위한 적합한 동물모델임이 입증되었으며 이를 이용한 돼지 면역세포의 연구에 폭넓은 활용 가능성을 시사해 주고 있다.

인용문헌

1. Amanda GF, Larsson L, Goff LK, Restall DE, Happerfield L, Merckenschiager M (1990): Human thymocyte development in mouse organ cultures. *Inter Immunol* 2:571-578.
2. Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, Leif JH, Wagar EJ, Schweitzer IB, Rajan TV, Gott B, Roopenian DC, Shultz LD (1997): Enhanced human CD4⁺ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J Immunol* 158:3578-3586.
3. Fujiki Y, Onodera M, Yamaguchi T, Osawa M, Sudo K, Hamada H, Ema H, Shibuya A, Takiguchi M, Kubo T, Nakauchi H (2000): Dominant expansion of human T cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice implanted with human bone fragments. *Exp Hematol*. 28:792-801.
4. Glimm H, Eisterer W, Lee K, Cashman J, Holyoake TL, Nicolini F, Shultz LD, von Kalle C, Eaves CJ (2001): Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-β₂ microglobulin-null mice. *J Clin Invest* 107:199-206.
5. Hall KM, Horvath TL, Abonour R, Cornetta K, Srour EF (2006): Decreased homing of retrovirally transduced human bone marrow CD34⁺ cells in the NOD/SCID mouse model. *Exp Hematol* 34:433-442.
6. Hori T, Cupp J, Wrighton N, Lee F and Spits H (1991): Identification of a novel human thymocyte subset with a phenotype of CD3- CD4⁺ CD8 alpha + beta-1. Possible progeny of the CD3- CD4⁻ CD8⁻ subset. *J Immunol* 146:4078-4084.

7. Kamal-Reid S, Dick JE (1988): Engraftment of immuno-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242:1706-1709.
8. Keller G, Snodgrass R (1990): Life span of multipotential hematopoietic stem cells *in vivo*. *J Exp Med* 171:1407-1418.
9. Kollet Q, Peled A, Byk T, Ben-Hur H, Leonard GD, Lapidot T (2000): β 2-microglobulin-deficient (B2m^{null}) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. *Blood* 95:3102-3105.
10. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkovich R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T (2001): Rapid and efficient homing of human CD34⁺CD38^{-low}CXCR4⁺ stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m^{null} mice. *Blood* 97:3283-3291.
11. Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997): Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-671.
12. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL (2003): Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Ann Rev Immunol* 21:759-806.
13. Mabuchi A, Kodaira Y, Norose Y, Saizawa M, Kitajima M and Yokomuro K(1998): Role of the liver in T cell differentiation-generation of CD3-CD4+/CD8+TCRbeta-cells and CD3-4-8-TCRbeta+ cells from CD4-8-TCRbeta-athymic nude bone marrow cells by culture with parenchymal liver cells. *J Leu Bio*, 63: 575-583.
14. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988): The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632-1639.
15. McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ (1989): Detection of a human CFC with high proliferation potential. *Blood* 74:609-612.
16. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL (1995): The biology of hematopoietic stem cells. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11:35-71.
17. 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.
18. Nolte JA, Hanley MB, Kohn DB (1994): Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: Analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 83:3041-3051.
19. Robin C, Bennaceur-Griscelli A, Louache F, Vainchenker W, Coulombel L (1999): Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34⁺CD38^{low} and CD34⁺CD38⁺ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematology*. 104:809-819.
20. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, Leiter EH (1995): Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154:180-191.
21. Srouf EF, Zanjani ED, Cornetta K, Traycoff CM, Flake AW, Hedrick M, Brandt JE, Leemhuis T, Hoffman R (1993): Persistence of human multilineage, Self-Renewing Lymphohematopoietic stem cells in Chimeric Sheep. *Blood* 82:3333-3342.
22. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdoep PM (1989): Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 74: 1563-1571.
23. Tsai EJ, Malech HL, Kirby MR, Hsu AP, Seidel NE, Porada CD, Zanjani ED, Bodine DM, Puck JM (2002): Retroviral transduction of IL-2G into CD34(+) cells from X-linked severe combined immunodeficiency patients permits human T- and B-cell development in sheep chimeras. *Blood* 100:72-79.
24. Van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE (1999): Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. *Blood* 94:3055-3061.
25. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL (2001): Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294: 1933-1936.

(접수일자: 2006. 10. 6 / 채택일자: 2006. 11. 15)