

## 골수처리키트 내 잔존하는 골수세포로부터 중간엽줄기세포의 분리

김신영<sup>1</sup> · 허준석<sup>2</sup> · 김한수<sup>1,2</sup> · 김현옥<sup>1,2</sup>

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 세포치료센터<sup>2</sup>

= Abstract =

### Isolation of Mesenchymal Stem Cells from the Mononuclear Cells Remaining in the Bone Marrow Processing Kit

Sinyoung Kim<sup>1</sup>, June Seok Heo<sup>2</sup>, Han-Soo Kim<sup>1,2</sup>, Hyun Ok Kim<sup>1,2</sup>

*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Yonsei Cell Therapy Center<sup>2</sup>, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background:** Mesenchymal stem cells (MSCs) that are capable of extensive self renewal and differentiation have attracted great attention as a promising tool for regenerative medicine and tissue engineering. Although MSCs can be isolated from various tissues, bone marrow currently represents one of the most reliable sources for providing a sufficient yield of cells in a good quality. Herein, used bone marrow processing kits were evaluated as a valuable source of MSCs.

**Methods:** Bone marrow mononuclear cells (MNCs) were recovered from used bone marrow processing kits after routine bone marrow processing by using the COBE 2991 Cell Processor (CaridianBCT Inc.). The MSCs were isolated from the recovered MNCs using a standard plastic adherence method. Immunophenotyping and differentiation assays were performed to clarify the characteristics of the isolated MSCs.

**Results:** An average of  $1 \times 10^8$  bone marrow MNCs was collected, and the MSCs were successfully isolated from the recovered bone marrow MNCs in all case. The isolated MSCs were positive for essential MSC surface molecules (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) and they were negative for most hematopoietic and endothelial cell markers (CD34, CD45, CD31, CD14). The isolated MSCs were capable of differentiation along the osteogenic, adipogenic and chondrogenic pathways.

**Conclusion:** MSCs isolated from used bone marrow processing kits are an alternative and ethical source of bone marrow derived MSCs, and they can be used for research purposes. (**Korean J Blood Transfus 2010; 21:280-8**)

**Key words:** Mesenchymal stem cell, Mononuclear cell, Bone marrow processing kit

접수일 : 2010년 11월 18일, 수정일 : 2010년 12월 10일, 승인일 : 2010년 12월 12일

책임저자 : 김 현 옥 120-752 서울시 서대문구 성산로 250 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

TEL: 02) 2228-2444, FAX: 02) 364-1583, E-mail: hyunok1019@yuhs.ac

본 연구는 2009년 대한수혈학회 CaridianBCT 연구상의 지원으로 이루어졌음.

## 서론

중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)는 지난 20여 년간 재생의학, 조직공학 및 유전자 치료의 매력적인 연구소재로 주목을 받으며 많은 연구가 진행되고 있다. 이는 중간엽줄기세포가 지속적인 자기 재생산(self renewal) 능력과 함께 지방세포(adipocyte), 연골세포(chondrocyte) 및 골세포(osteocyte)의 중배엽세포로 분화할 수 있으며, 이 외에 심근세포(cardiomyocyte) 및 근세포(myocyte), 더 나아가 비중배엽세포인 신경세포(neuron)까지 분화할 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있기 때문이다.<sup>1,4)</sup> 중간엽줄기세포는 골수,<sup>2,5)</sup> 재대혈,<sup>6)</sup> 지방조직,<sup>7)</sup> 태반,<sup>8)</sup> 양수<sup>9)</sup> 등의 많은 조직에서 분리할 수 있다. 특히 중간엽줄기세포를 골수로부터 분리할 경우에는 다른 조직에 비해 일정 수준 이상의 질을 가진 충분한 양의 중간엽줄기세포를 회수할 수 있다.<sup>10)</sup>

하지만, 골수를 채취하기 위해서는 침습적인 시술이 필요하며, 골수 유래 중간엽줄기세포가 생체 외에서 빠르게 증식하지만 5회 이상 계대배양 하는 경우 그 증식 속도와 분화능을 빠르게 상실한다. 특히 골수 기증자의 나이가 증가할수록 골수 유래 중간엽줄기세포의 증식 속도와 분화능은 감소하는 특징을 가지고 있다.<sup>11)</sup> 이에 중간엽줄기세포를 이용한 지속적인 연구를 위해서는 초기에 분리한 중간엽줄기세포를 지속적으로 공급 받을 수 있는 것이 연구에서 가장 이상적인 조건이다. 하지만 건강한 기증자로부터 단순히 연구 목적으로 골수를 확보하기는 현실적으로 매우 어렵다. 본 연구에서는 폐기되는 골수처리키트 내에 남아있는 골수세포로부터 중간엽줄기세포를 분리 및 배양하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포분리 및 배양

세브란스병원에서 4명의 건강한 골수공여자로 부터 무균적으로 채집된 골수를 COBE 2991 Cell Processor (CaridianBCT Inc., Lakewood, CO, USA)를 이용하여 다음과 같이 적혈구와 혈장의 분리 제거를 시행하였다. 채집된 골수백을 매달고 중력을 이용하여 골수를 장비에 장착된 골수처리키트에 채운 후 3,000 rpm에서 8분간 원심분리하였다. 원심분리속도를 동일하게 유지하면서 백혈구연층을 육안으로 확인하여 혈장층을 먼저 분리하여 제거한 후 super out 속도를 조절하면서 백혈구연층을 별도의 백에 분리한다. 채집된 골수의 양에 따라서 위의 과정을 반복하며 최종적으로 생리식염수를 이용하여 골수백에 남아 있는 골수의 성분 분리를 완료하였다. 최종 분리산물인 골수농축액은 환자에게 이식하고, 골수처리키트에 남아 있는 골수세포를 채집 2시간 내에 회수하였다. 본 연구에 대하여 기관임상연구심의위원회의 승인(세브란스병원 임상연구 심의위원회, #4-2008-0643)을 받았으며, 골수기증 전에 모든 골수공여자로부터 폐기되는 골수처리키트 내의 골수세포를 연구용으로 사용할 것에 대한 서면 동의서를 받았다.

회수된 골수는 Ficoll-Hypaque (비중 1.077, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 백혈구연층을 분리하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 두 번 세척 후  $1 \times 10^7$  cells/dish의 농도로 100 mm culture dish (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 배양하였다. 배양액은 DMEM-LG (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 및 10% fetal bovine serum (FBS; PAA laboratories, Ontario, Canada)을 사용하였다. 배양 시작 24시간 후 비부

착세포들로 인한 중간엽줄기세포의 부착 및 증식이 감소되는 것을 막기 위하여 비부착세포를 흡입하여 제거하였다.<sup>12)</sup> 배지는 1주에 두 번씩 교환하였으며, 부착세포의 세포충실도가 70~80%가 되는 경우 0.05% Trypsin/EDTA (Gibco)를 사용하여 회수하여 계대배양하거나 액체질소에 냉동 보관하였다.

## 2. 유세포분석

분리 및 배양한 중간엽줄기세포의 성상을 파악하기 위해 2세대 계대배양 한 후 유세포분석기 (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 다음과 같은 방법에 의하여 분석하였다. 배양한 중간엽줄기세포의 배양액을 제거하고, PBS로 세척하고 0.05% Trypsin/EDTA로 분리한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 0.2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 PBS로 세척하고 각각의 단클론항체를 반응시킨 후 분석하였다. 사용된 단클론항체는 CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106 (all from Beckman Coulter)이었다. 반응 후 분석은 WinMDI (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA)와 CXP software (Beckman Coulter)를 사용하였다.

## 3. 중간엽줄기세포를 이용한 분화유도

4명의 건강한 골수공여자로부터 확보한 중간엽줄기세포 4주를 대상으로 다음과 같이 골세포, 지방세포, 연골세포로의 분화를 유도하였다.

### 1) 골세포 분화

중간엽줄기세포의 골세포로의 분화능을 확인하기 위해 12 well plate (Nunc, Rochester, NY, USA)에  $5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 중간엽줄기세포를 분주한 후 배양하였다. 세포충실도가 약 70%가 되면 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 50  $\mu$ M ascorbic

acid 및 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate를 함유한 osteogenic induction medium (Lonza, Walkersville, MD, USA)으로 배지를 교체하여 2주 동안 3~4일마다 새로운 배지로 교환하였다. 골세포로의 분화유도 2주 후에 세포 내 calcium phosphate의 축적여부를 판단하기 위하여 von Kossa staining<sup>13)</sup>을 시행하여 골세포로의 분화여부를 확인하였다.

### 2) 지방세포 분화

중간엽줄기세포의 지방세포로의 분화능을 확인하기 위해 12 well plate (Nunc)에  $5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 중간엽줄기세포를 분주한 후 배양하였다. 세포충실도가 100%가 되면 0.1  $\mu$ g/mL insulin, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine, 50  $\mu$ g/mL indomethacin, 1  $\mu$ M dexamethasone을 함유한 adipogenic induction medium (Lonza)으로 배지를 교체하여 2주 동안 3~4일마다 새로운 배지로 교환하였다. 지방세포로의 분화유도 2주 후에 세포 내 지방 공포(vacuole)의 확인을 위하여 Oil Red O (Fluka, Taufkirchen, Germany) 염색을 시행하여 지방세포로의 분화여부를 확인하였다.

### 3) 연골세포 분화

중간엽줄기세포에서 연골세포로의 분화는 일반적으로 pellet culture system에서 3주 정도 배양을 하지만 monolayer culture만으로도 충분히 연골세포의 분화 및 확인이 가능하기 때문에 본 실험에서는 pellet culture가 아닌 12 well plate에 세포를 seeding 하여 연골세포로 분화를 유도하였다. 연골세포 분화유도를 위해  $5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 중간엽줄기세포를 분주한 후 배양하였다. 세포충실도가 약 70%가 되면 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 50  $\mu$ M ascorbic acid, 40  $\mu$ g/mL proline을 함유한 chondrogenic induction medium (Lonza)으로 배지교체를 하여 2주 동안 3~4일마다 새로운 배지로 교환하였다. 특히 배지교환 시 연골세포로의 분화유도를 촉진하는 것으로 알려진 TGF-

$\beta 3$  (10 ng/mL)를 첨가하였다. 연골세포로의 분화유도 2주 후에 Safranin-O staining을 통해서 연골세포 분화여부를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 부착성 세포의 분리 및 배양

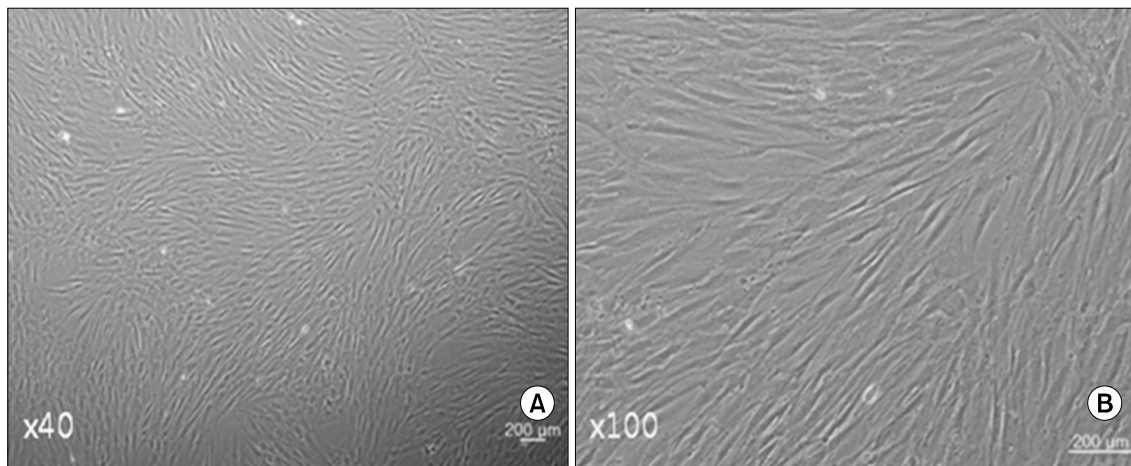
골수처리키트 내에 남아있는 골수로부터 회수한 단핵세포는 평균  $1 \times 10^8$ 개이었다(n=4). 모든 골수처리키트로부터 배양 후 약 7일이 경과된 뒤 중간엽줄기세포와 유사한 방추형 모양 세포들의 집락이 관찰되었다. 부착된 세포들의 대량증식을 위하여 계대배양을 시행하였으며, 계대배양 후 부착된 세포들이 빠르게 증식하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 하나의 골수처리키트에 남아있는 골수단핵세포로부터 평균  $3 \times 10^7$ 개의 부착성 세포를 확보할 수 있었다.

### 2. 중간엽줄기세포의 표지자 검사

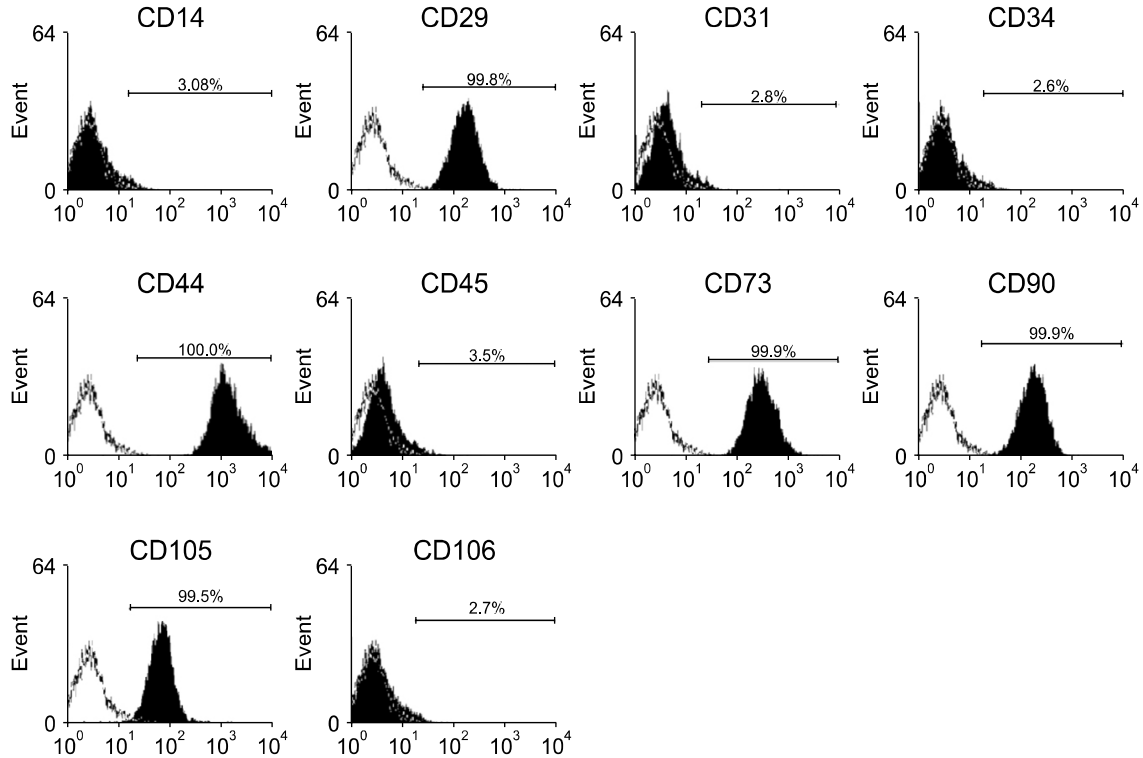
중간엽줄기세포의 표지자로 알려진 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105에서는 모두 강하게 발현되었으며, 조혈모세포의 표지자인 CD34, 혈액세포의 표지자인 CD45, 단핵구 마커인 CD14, 내피세포의 마커인 CD31은 발현되지 않았다(Fig. 2).

### 3. 중간엽줄기세포의 분화능

골세포 분화유도 7일째부터 중간엽줄기세포들이 뭉치게 되었으며, 14일째에 von Kossa staining을 통해 다량의 칼슘이 침착되어 골세포로의 분화가 유도되었음을 확인하였다(Fig. 3A). 지방세포로의 분화는 중간엽줄기세포의 방추형 세포 몸체가 짧아지면서 둥근 모양의 형태로 바뀌기 시작하였으며, 7일째부터 서서히 지방공포들이 세포 외벽에서 안쪽으로 차기 시작하였다. 분화유도 14일 경과 후에 상당히 많은 양의 지방공포들이 형성되었으며, Oil Red O staining을 통하여 지



**Fig. 1.** Isolated mesenchymal stem cells after culturing for 3 weeks grew in colonies that contained small spindle-shaped fibroblastoid cells. Light inverted microscope, original magnification 40× (A), 100× (B). The figure shows a typical example of one donor of four examined.

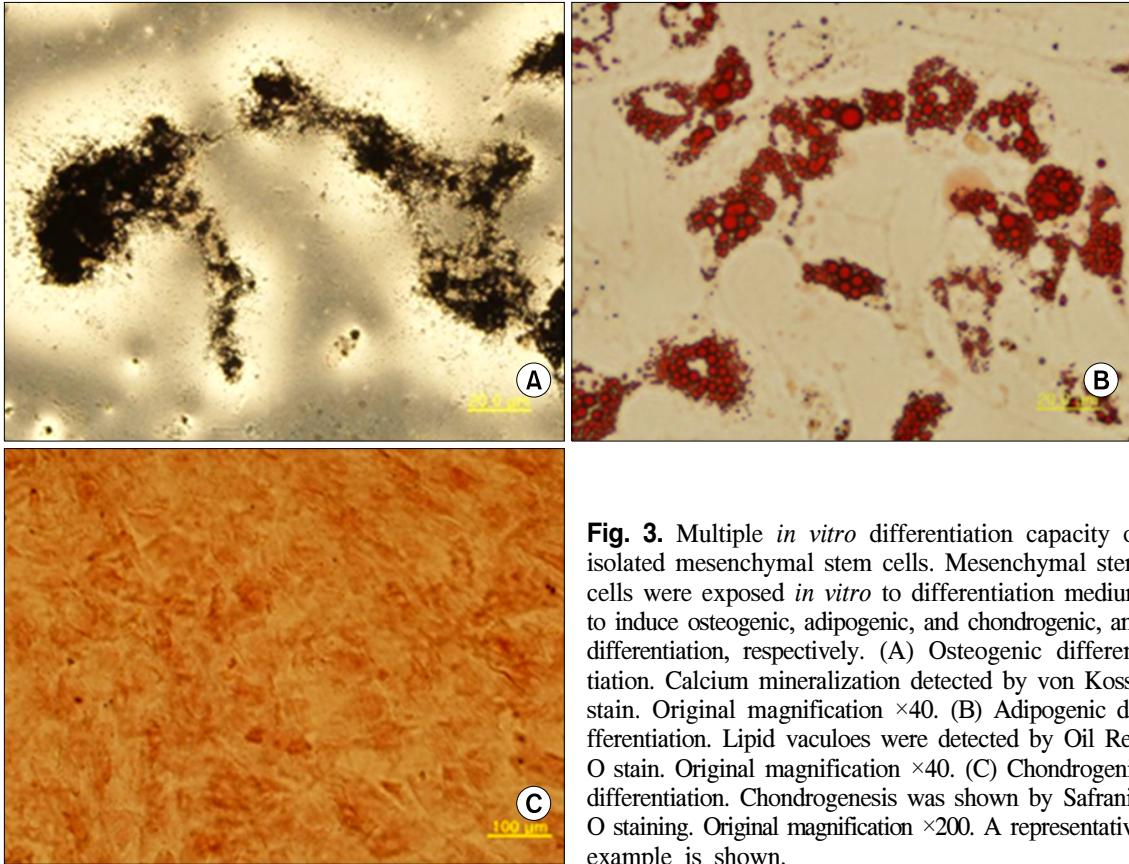


**Fig. 2.** Immunophenotypes of isolated mesenchymal stem cells. Fibroblastoid cells expanded from bone marrow processing kit were trypsinized, labelled with antibodies against the indicated antigen, and analyzed by flow cytometry. A representative example is shown. Values represent the mean percentage of all assessed cells positively stained by the respective antibodies.

방공포들이 빨강계 염색되어 지방세포로의 분화가 유도되었음을 확인하였다(Fig. 3B). 연골세포로의 분화는 분화유도 약 7일 경과 후 세포들의 모양이 변하며 다층구조의 형상을 나타냈으며, 2주 경과 후에 Safranin-O staining을 통하여 붉게 염색됨을 관찰하여 연골세포로 분화가 된 것을 확인하였다(Fig. 3C). 이와 같은 골세포, 지방세포 및 연골세포로의 분화는 4명의 건강한 골수공여자로부터 확보한 중간엽줄기세포 4주에서 모두 확인되었다.

## 고 찰

중간엽줄기세포는 중배엽 유래의 성체줄기세포로 적절한 배양조건하에서 중배엽 유래의 세포인 골세포, 지방세포, 연골세포 등으로 분화할 수 있으며, 중배엽 이외의 다양한 유형의 세포로 분화할 수 있다.<sup>14,15)</sup> 또한 자가 재생능력이 있어 체외에서 대량 증식이 가능하다.<sup>14,16)</sup> 중간엽줄기세포는 골수, 제대혈, 지방조직 등 다양한 조직에서 확보할 수 있으나,<sup>2,5-7)</sup> 특히 골수는 FBS만을 포함한 기본적인 배지로 비교적 간단하게 많은 양의



**Fig. 3.** Multiple *in vitro* differentiation capacity of isolated mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells were exposed *in vitro* to differentiation medium to induce osteogenic, adipogenic, and chondrogenic, and differentiation, respectively. (A) Osteogenic differentiation. Calcium mineralization detected by von Kossa stain. Original magnification  $\times 40$ . (B) Adipogenic differentiation. Lipid vacuoles were detected by Oil Red O stain. Original magnification  $\times 40$ . (C) Chondrogenic differentiation. Chondrogenesis was shown by Safranin O staining. Original magnification  $\times 200$ . A representative example is shown.

세포를 확보할 수 있기 때문에 중간엽줄기세포의 가장 좋은 자원으로 알려져 있다. 하지만 골수를 채취하는 과정이 침습적이어서 건강한 기증자로부터 연구에 사용될 골수를 지속적으로 충분히 확보하는 것은 매우 어려운 일이다. 이에 본 연구에서는 윤리적인 문제가 없는 골수이식 시 폐기되는 골수처리키트로부터 골수 유래 중간엽줄기세포를 분리 및 배양해보고자 하였다.

본 연구에서 하나의 골수처리키트 내에 남아있는 골수로부터 회수한 단핵세포는 평균  $1 \times 10^8$ 개이었다. 골수처리키트가 아닌 골수이식 이후의 골수채집백과 필터로부터 Mageed 등<sup>17)</sup>은 평균

$9.6 \times 10^8$ 개의 단핵세포를 회수하였으며, Dvorakova 등<sup>18)</sup>은  $2.0 \times 10^8$ 개의 단핵세포를 회수하였다. 이와 같이 골수처리키트로부터 회수할 수 있는 단핵세포의 수가 상대적으로 적은 것은 첫 번째, 적혈구 또는 혈장성분의 분리를 통하여 골수 내의 단핵세포를 농축하는 골수처리과정이 매우 효율적이기 때문이며, 두 번째, 골수 처리 이후의 폐기되는 골수처리키트 내에는 적혈구 성분이 과다하게 존재하여 Ficoll-Hypaque을 통한 밀도구배원심분리 시 잔존하는 단핵세포를 선택적으로 농축시키기 어렵기 때문이다. 하지만, 소량의 골수 단핵세포로부터 중간엽줄기세포를 분리할 경우

대량 증식을 통하여 평균  $3 \times 10^7$ 개의 중간엽줄기세포를 확보할 수 있어 연구목적의 세포 공급원으로서는 충분하다고 판단되었다.

골수처리키트로부터 분리된 중간엽줄기세포의 특성을 확인하기 위하여 유세포분석을 통한 세포 표지자 발현 여부를 조사하였다. 분리된 중간엽줄기세포는 중간엽줄기세포 관련 항원(CD73, CD105, CD90), integrin 수용체 관련 항원(CD29) 및 matrix 수용체 관련 항원(CD44)이 강하게 발현되었으며, 조혈모세포 관련 항원(CD14, CD34, CD45), 내피세포항원(CD31)은 발현되지 않아 일반적인 중간엽줄기세포의 세포 표지자 발현 양상과 동일하였다.<sup>19)</sup> 또한 중간엽줄기세포의 기능적 측면을 평가하기 위하여 골세포, 지방세포 및 연골세포로의 분화를 유도하였으며, 세 가지 세포로 모두 분화가 가능함을 확인하였다.

중간엽줄기세포의 대량 증식 능력과 다양한 유형의 세포로 분화할 수 있는 능력으로 인하여 최근 조직 재생 및 질환 치료에 중간엽줄기세포를 이용한 조직공학적 접근과 관련 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 특히 골수에서 분리된 중간엽줄기세포가 세포 기능적인 측면과 함께 손쉽게 분리 및 배양할 수 있다는 측면에서 가장 우수한 세포 공급원이다. 본 연구에서는 골수이식 시 폐기되는 골수처리키트로부터 중간엽줄기세포를 대량 확보할 수 있었으며, 추후 중요한 중간엽줄기세포의 공급원으로서의 가능성을 확인하였다.

## 요약

**배경:** 중간엽줄기세포는 지속적인 자기 재생산(self renewal) 능력과 함께 다양한 조직으로 분화할 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있어 재생의학, 조직공학 및 유전자 치료의 매력적인 연구 소재로 주목을 받으며 많은 연구가 진행되고 있

다. 골수에서 중간엽줄기세포를 분리하는 경우 다른 조직에 비해 일정 수준 이상의 질을 가진 충분한 양을 회수할 수 있다. 그러나 골수를 건강한 지원자로부터 단순히 연구목적으로 확보하기는 현실적으로 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서는 폐기되는 골수처리키트에 남아있는 골수로부터 연구목적용 골수유래 중간엽줄기세포를 분리하고자 하였다.

**방법:** 건강한 골수공여자로부터 채집된 골수를 COBE 2991 Cell Processor (CaridianBCT Inc.)를 이용하여 적혈구와 혈장의 분리제거를 시행한 후, 골수처리키트에 남아 있는 골수를 채집 2시간 내에 회수하였다. 회수된 골수는 밀도구배원심분리를 이용하여 백혈구연층을 분리하고 부착세포의 증식이 일어날 수 있도록 배양하였다. 부착세포의 세포충실도가 70~80%가 되는 경우 회수하여 계대배양하거나 액체질소에 냉동보관하였다. 분리 배양한 중간엽줄기세포의 성상을 파악하기 위해 유세포분석 및 골세포, 지방세포, 연골세포로의 분화 여부를 확인하였다.

**결과:** 골수처리키트 내에 남아있는 골수로부터 회수한 단핵세포의 수는 평균  $1 \times 10^8$ 개였으며 모두에서 중간엽줄기세포를 분리 배양할 수 있었다(n=4). 또한 1회의 계대배양을 통하여 약 3주 후 평균  $3 \times 10^7$ 개의 중간엽줄기세포를 얻을 수 있었다. 유세포분석 상 중간엽줄기세포의 표지자인 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105는 모두 강하게 발현하였으며, 조혈모세포의 표지자인 CD34와 CD45, 내피세포의 표지자인 CD31과 단핵구의 표지자인 CD14은 발현되지 않았다. 중간엽줄기세포의 기능적 측면을 평가하기 위하여 골세포, 지방세포 및 연골세포로의 분화를 유도하였으며, 세 가지 세포로 모두 분화가 가능함을 확인하였다.

**결론:** 골수이식 시 폐기되는 골수처리키트로부터

터 중간엽줄기세포를 다량 확보할 수 있었으며, 추후 중요한 중간엽줄기세포의 공급원으로서의 가능성을 확인하였다.

### 참고문헌

1. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7
3. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30
4. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-13
5. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13
6. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22:625-34
7. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95
8. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22:1338-45
9. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007;25:100-6
10. Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1531-44
11. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999;14:1115-22
12. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002;20:249-58
13. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994;134:277-86
14. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107:275-81
15. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9
16. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4
17. Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA. Isolation of large numbers of mesen-



- chymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2007;83:1019-26
18. Dvorakova J, Hruby A, Velebny V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int* 2008;32: 1116-25
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006;8:315-7