

교정 치료시 발거한 소구치의
치주인대세포와 치수세포를 이용한
성체줄기세포 분리 및 특성화

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 하 나

교정 치료시 발거한 소구치의
치주인대세포와 치수세포를 이용한
성체줄기세포 분리 및 특성화

지도교수 정 주 령

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2011년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 하 나

김하나의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2011년 6월 일

감사의 글

논문의 시작부터 끝까지 저를 이끌어 주신 정주령 교수님의 지도에 진심으로 감사드립니다. 늘 따뜻한 관심과 사랑으로 저를 지금의 모습으로 지도해주신 김경호 교수님과, 바쁘신 중에도 논문을 심사해 주시고, 끝까지 관심을 보내주시고 격려 해주신 유윤정 교수님께도 감사드립니다.

또한 교정학에 대하여 많은 가르침을 주신 박영철 교수님, 백형선 교수님, 황충주 교수님, 유형석 교수님, 이기준 교수님, 차정열 교수님과, 애정으로 많은 것을 가르쳐 주신 최윤정 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

낮설고 막막했던 실험을 친절하게 가르쳐주고 도와주신 김나령 연구원, 관심과 조언을 아끼지 않으셨던 김민정 선배님, 바쁜 와중에도 실험에 많은 도움을 주신 오영주 연구원께도 감사드립니다.

지난 수련기간 동안 배움을 함께한 상수, 여러모로 많은 도움을 준 우리 형주와 세민이, 성아, 우원이에게도 감사의 마음을 전하며, 바쁜 업무에도 신경써서 받치 치아와 실험 기구를 챙겨준 외래 직원들에게도 감사드립니다.

마지막으로 저에게 끊임 없는 사랑을 부어 주시는 어머니, 좋은 곳에서 지켜보고 응원해주고 계실 아버지, 언제나 든직하게 있어주는 동생 두리에게 고마운 마음을 전합니다. 끝으로 늘 곁에서 저를 세상에서 가장 가치있는 사람으로 만들어주는 사랑하는 정두식군에게 이 논문을 바칩니다.

2011년 6월

김 하 나

차 례

그림 및 표 차례	ii
국문 요약	iii
I. 서론	1
II. 대상 및 방법	6
가. 치주인대조직과 치수조직의 분리 및 세포의 배양	6
나. 세포증식분석을 통한 자가증식능 확인	8
다. 다양한 세포로의 분화능	9
1. 골 분화 유도	9
2. 지방 분화 유도	9
라. 유세포 분석을 통한 줄기세포 표지인자 확인	10
III. 결과	11
가. 치주인대세포와 치수세포의 일차배양	11
나. 자가증식능	14
다. 다분화능	16
1. 골 분화 유도	16
2. 지방 분화 유도	17
라. 유세포 분석	18
IV. 고찰	19
V. 결론	26
VI. 참고문헌	28
영문 요약	33

그림 및 표 차례

Figure 1. Isolation of periodontal ligament and dental pulp tissue from extracted premolar	7
Figure 2. Morphology of primary cells obtained from periodontal ligament and dental pulp from the same donor tooth.....	12
Figure 3. Morphology of periodontal ligament and dental pulp cells	13
Figure 4. Proliferation rate of periodontal ligament and dental pulp cells	15
Figure 5. Osteogenic differentiation of periodontal ligament and dental pulp cells	16
Figure 6. Adipogenic differentiation of periodontal ligament and dental pulp cells	17
Figure 7. Expression of mesenchymal stem cell markers in periodontal ligament and dental pulp cells	18

교정 치료시 발거한 소구치의 치주인대세포와 치수세포를 이용한 성체줄기세포 분리 및 특성화

본 연구는 교정 환자에서 발거되는 건전한 소구치의 치주인대와 치수로부터 세포를 분리하여 줄기세포의 특성을 평가하기 위해 시행되었다.

강남세브란스병원 교정과에서 교정치료중인 6명의 환자(13.2~22.1세)에서 발거된 제1소구치를 이용하였다. 발거 직후, 치근표면에서 치주인대조직을 긁어냈으며, 치아를 절단한 후 내부의 치수조직을 분리하였다. 3주간 배양한 후 세포 형태를 관찰하고 자가증식능력을 확인하였으며, 분화유도배지에서 배양하여 조골세포와 지방세포로의 분화를 유도하였다.

1. 3주간 배양한 치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 배양기 바닥에 붙어 자라는 양상으로 섬유모세포와 비슷한 형태를 보였다.
2. 세포 증식능력 분석 결과 소구치의 치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 지방 줄기세포, 골수 줄기세포, 제3대구치의 치수유래 세포와 유사한 수준의 증식을 보였다.
3. 조골세포 분화유도배지에서 3주간 배양한 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래세포에서 석회화 결절을 관찰할 수 있었다.

4. 지방세포 분화유도배지에서 2주간 배양한 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래세포에서 지방을 함유한 지방세포를 관찰할 수 있었다.
5. FACS분석 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 간엽성 줄기세포의 표면 표지자인 CD90과 CD105를 발현하였으며, 조혈성 줄기세포의 표면 표지자인 CD31과 CD34는 발현하지 않았다.

이상의 연구를 통하여 성인의 건전한 소구치의 치주인대와 치수로부터 간엽성 줄기세포의 특성을 보이는 세포를 분리해낼 수 있음을 확인할 수 있었다.

교정 치료시 발거한 소구치의
치주인대세포와 치수세포를 이용한
성체줄기세포 분리 및 특성화

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 정 주 령 조교수)

김하나

I. 서론

줄기세포는 인간의 몸을 구성하는 다양한 조직이나 장기로 분화할 수 있는 일종의 미분화된 모세포를 일컫는 말로, 자기 스스로 분열하여 증식하는 자가 증식 능력과 다양한 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력(pluripotent)이 특징이다(Lanza et al., 2004). 2000년 Gronthos(S. Gronthos, 2000) 는 성인의 매복된 제3대구치의 치수

조직으로부터 세포를 분리하여, 빠른 자가 증식능력과 특수 분화유도배지 상에서 조골세포, 지방세포로의 다분화능력을 확인하여 줄기세포의 특성을 가짐을 발표하였다. 2004년 Seo(Seo et al., 2004) 도 성인의 매복된 하악 제3대구치의 치주인대 조직에서 세포를 획득하여 자가 증식능력과 백악질모세포, 조골세포, 지방세포로의 다양한 분화 능력을 발표하였으며, 그 후 다수의 연구를 통해 치수와 치주인대 조직내에 줄기세포로 추정되는 세포가 존재하고 이는 다양한 세포로 분화가 가능성이 발표되었다(Gay et al., 2007; Laino et al., 2005). 이러한 세포는 누드 마우스 등의 동물조직 생체 내에 피하이식하여 백악질 유사 구조와 교원질 섬유를 형성하는 등 치주 조직의 재생에 효과가 있다고 알려져 있다(Seo et al., 2004). 그 뿐 아니라, 분화시킨 세포를 지지대를 통해 이환부에 이식하여 골재생을 촉진(Laino et al., 2006)시키거나, 인공치아를 제작(Ikeda et al., 2009)하는 데까지 연구가 진행되고 있다.

치아에서 획득한 줄기세포는 골수 줄기세포와 비교하여도 충분한 생존력과 분열 능력을 가지면서도(Gay et al., 2007; S. Gronthos, 2000; S. Gronthos et al., 2002), 기존의 골수 등의 성체줄기세포 획득 방법에 비해 좀더 채취시 접근이 쉽고 공여부의 손상이 적다는 장점이 있다. 치아의 경우 과잉치(An, 2009)나 제3대구치, 유치 등 발거할 필요성이 있는 치아들이 존재하고, 발거한 조직은 폐기되므로 폐기할 조직을 이용하여 자가조직을 통한 재생치료에 적용할 수 있게 된다.

기존의 Gronthos(S. Gronthos, 2000)나 Seo(Seo et al., 2004) 등의 방법에서 줄기세포 획득에 사용한 제3대구치의 경우는 매복되어 있는 경우가 많아 접근이 상대적으로 다른 치아에 비해 쉽지 않고, 특히 하악에서 매복이 심해 단순발치 술식으로

발거가 어려운 경우 발거를 위해 외과적 수술과정에서 치아를 파절시켜야 하므로 치수나 치주인대 조직을 분리해내기가 어려워진다는 한계가 있다.

정상 발거된 유치의 치수로부터 분리한 줄기세포(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)에서 자가증식능력과 간엽성 줄기세포 표지인자인 Stro-1의 발현을 확인하였으며 조골세포 뿐 아니라 지방세포, 신경세포, 상아모세포의 재생 가능성이 확인되었다(Miura et al., 2003). 조기 발거된 유치로부터 획득한 치수줄기세포(human deciduous dental pulp, DPESC)에서도 간엽줄기세포 표면 표지인자와 ABCG2 등의 표면 줄기세포 관련 유전자의 발현을 확인함으로써 줄기세포의 특성을 나타냄이 확인되었다(Nam and Lee, 2009). 유치의 치수 줄기세포의 경우 골수유래 줄기세포나 영구치 치수 줄기세포에 비해 유치 줄기세포(SHED)는 자가 증식 능력이 유의하게 뛰어남이 보고된 바 있다(Miura et al., 2003). 하지만 유치의 경우 치근의 흡수가 많이 진행되어 치주인대 조직을 획득하기 어렵다는 단점이 있으며, 이미 영구치열기가 시작된 이후의 성인 환자에게서는 얻을 수 없다는 한계가 있다.

최근에는 폐기되는 염증조직으로부터 줄기세포를 획득한 연구가 발표되고 있다. 정상치아 뿐 아니라 치주염에 이환된 치아의 치주인대 조직에서 간엽성 줄기세포 표지자를 발현하는 줄기세포를 분리해낸 연구가 있었으며(Chen et al., 2006), 염증이 이환된 성인 치수로부터 줄기세포를 분리해낸 연구도 있었다(Alongi et al., 2010). 골연하양의 치주수술시 제거해내는 염증성 치주조직으로부터 획득한 세포를 교정시 발거한 소구치의 치주인대 줄기세포와 비교하여 자가 증식능력과 골/백악질/지방세포

로의 분화능력, 지지체를 통해 이식하여 백악질 유사 조직과 관련된 치주인대 섬유의 재생을 확인한 연구도 최근 발표되었다(Park et al., 2011). 이와 같은 염증성 조직은 정상조직을 제거하지 않고도 채취가 용이하다는 접근상의 장점이 있다. 하지만 아직 in vivo 상의 연구가 다양하게 진행되지는 않았다는 점에서 한계를 갖는다.

교정 환자의 경우 돌출과 총생의 해소, 치아 - 악궁 간 부조화, 상하악 악골 부조화 등의 교정적 개선을 위하여 소구치 발치를 고려하는 경우가 많다. 소구치는 상대적으로 발거가 간단하여 한번에 온전한 치수와 치주인대 두 조직 모두의 분리가 가능하며 양악 소구치를 모두 발거하는 경우가 많기 때문에 이전의 연구에서 발거한 매복 제3대구치나 과잉치, 유치 등에 비해 한 환자에서 한 번의 시술시 획득할 수 있는 치아와 그 치아로부터 얻을 수 있는 세포의 양이 많다고 볼 수 있다. 또한 대부분의 경우 발치하게 되는 소구치는 기능하고 있던 건전한 치아로서 온전한 구조를 가지고 있다. 교합에 따른 기계적 응력은 세포주기 조절인자들의 발현을 증가시킴으로써 치주인대 세포의 세포증식에 밀접한 영향을 미친다고 이미 알려져 있다(You et al., 1999). 적정 수준의 기계적 장력이 배양 초기의 골수유래 중간엽줄기세포 증식에 긍정적인 조절인자로서 역할을 한다고 보고되었으며(Choi et al., 2007), 적정 수준의 기계적 장력이 인간의 치수 줄기세포의 증식과 분화, 세포기질 생성에 있어 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 결과도 보고된 바 있어(Han et al., 2008), 교합을 이루어 기능을 하던 정상적인 건전치아의 세포가 매복된 치아에서 획득하는 세포보다 분열이나 증식, 분화에 있어 더 유리할 것이라 기대할 수 있다.

본 연구에서는 교정 환자에서 발치되는 건전한 소구치의 치주인대와 치수로부터 동시에 세포를 획득하였으며, 얻어진 세포들이 가지고 있는 줄기세포의 특성을 비교 평가하고 골, 지방 등 다양한 조직으로의 분화능력을 평가하였다.

II. 대상 및 방법

가. 치주인대 조직과 치수 조직의 분리 및 세포의 배양

강남 세브란스병원 치과 교정과에 교정치료를 위하여 내원한 환자들 중에서 교정적 목적으로 소구치를 발거한 경우에 한하여 본 연구를 이해하고, 조직 공여에 있어 동의한 6명의 환자(남 3명, 여 3명, 13.2~22.1세, 평균 17.1세)를 대상으로 하였다(Stan Gronthos et al., 2011; K. Mrozik, Gronthos, et al., 2010). 모든 실험과정은 강남 세브란스병원 기관윤리심의위원회(IRB)로부터 승인(2009-0069)을 받고 이루어졌다. 국소마취 하에 발치용 겸자를 이용하여 상하악 제1소구치를 발거하였으며, 발거 즉시 생리식염수가 10 ml 들어있는 50 ml 튜브에 담가 멸균 상태에서 세포 채취를 진행하였다 (Figure 1). 동일한 치아에서 치주인대 조직을 채취한 후, 치수 조직을 획득하였다. 치주인대 조직은 치관을 멸균된 utility plier로 잡고, 치근 표면으로부터 #15 Blade를 사용하여 부드럽게 분리하였다. 치수 조직은 carbide bur를 사용하여 치아 장축을 따라 틈새를 형성한 후 pin cutter로 치아를 세로로 절단하여 내부의 조직을 분리해내었다. 치관이나 치근첨 부위의 세포가 섞이지 않도록 치근 중앙 1/3의 조직을 이용하였으며, 각각의 조직은 1~3 mm²의 크기로 잘게 다졌다.

동일한 방법으로 제3대구치의 치주인대 조직과 치수 조직을 획득하였다.

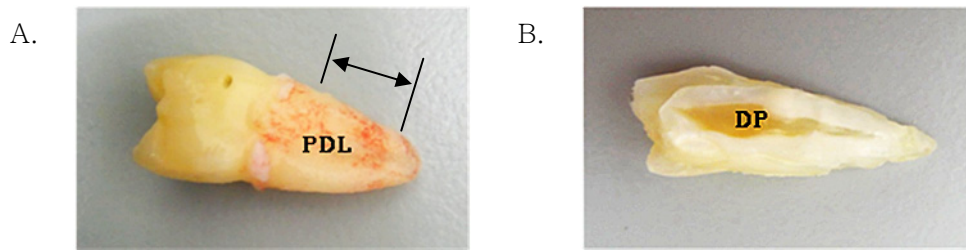


Figure 1. Isolation of PDL and DP tissues from extracted premolars.

A; PDL tissue was obtained from the middle one-third of the root surface of the extracted first premolar. B; After isolating the PDL tissue, the tooth was cut lengthwise, and DP tissue was obtained from the pulp chamber.

분리한 조직은 outgrowth방법으로 배양하였다(George T. J. Huang et al., 2006). 100 units/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin과 3% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 alpha modification of Eagle's medium (α -MEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)로 3회 세척한 후, 100 mm 배양기에 옮겼다. 20% FBS와 1% antibiotics를 포함한 α -MEM 배지에서 37° C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 배지는 2~3일마다 교환하였으며, 세포가 70~80% 단층을 형성한 후 계대배양하였다. 계대배양은 1주마다 시행하였으며 세포는 10% FBS와 1% antibiotics를 함유한 배지에서 배양하였다. 3차 계대배양한 6명의 세포를 이용하여 다음과 같은 연구를 시행하였다.

나. 세포 증식 분석을 통한 자가증식능 확인

각 세포의 증식능력을 알아보기 위해 세포 증식 분석을 시행하였다(K. M. Mrozik, Zilm, et al., 2010). 비교를 위하여 소구치로부터 획득한 치주인대유래 세포 및 치수유래 세포 뿐 아니라, 기존에 보편적으로 활용되던 성체줄기세포인 골수에서 유래된 간엽성 줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSC; PoieticsTM human mesenchymal stem cells, Lonza, Walkersville, MD, USA)와 강남세브란스병원 성형외과에서 공급받은 지방세포에서 유래된 줄기세포(adipogenic stem cell, ADSC)(S. Y. Song et al., 2011) 및 제3대구치의 치주인대유래 세포와 치수유래 세포를 함께 실험하였다. hemacytometer를 사용하여 세포 부유액 내의 세포 수를 측정한 다음, 96 well 배양기의 각 well에 4×10^4 개의 세포를 각 세포당 3 well에 분주하였다. 세포는 phenol red가 들어있지 않으며 1% antibiotics를 함유한 Dulbecco-Modified Eagle's Medium (D-MEM, Gibco BRL) 에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝나는 날 WST assay reagent (EZ-Cytox Cell viability assay kit, Daeil lab service, Seoul, Korea) 를 각 well에 10 μ l씩 분주하고 2시간 배양한 후, VersaMaxTM Microplate Reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3회 측정값의 평균을 계산하였으며, one-way ANOVA 분석을 시행하였다. 사후 검정은 tukey 분석으로 각 세포 군간의 유의한 차이를 확인하였다.

다. 다양한 세포로의 분화능

세포의 다분화 능력은 각각의 분화유도배지를 사용하여 조골세포, 지방세포로의 분화를 유도하였으며, 염색을 시행하여 분화 양상을 관찰하였다.

1. 골 분화 유도

조골세포로의 분화능을 관찰하기 위하여 석회화결절의 형성을 확인하였다(N. R. Kim, Lee, et al., 2009). 3차 계대배양한 치주인대유래 세포와 치수유래 세포 2×10^5 개를 6 well 배양기에 분주하였다. 대조군은 10% FBS를 첨가한 α -MEM상에서 배양하였으며, 실험군은 2 ml의 α -MEM에 10 nM의 Dexamethasone, 1 mg/ml의 β -glycerophosphate, 50 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가한 골분화유도배지상에서 3주간 37° C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 3주간 배양한 세포들은 PBS로 세척 후, Methanol, Formaldehyde, 증류수를 1:1:1 [vol/vol]의 비율로 섞은 용액으로 1일간 고정하였다. 증류수로 3회 세척한 후, 20 mg/mL의 Alizarin Red S (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 10분간 세포를 염색하였으며, 증류수로 5회 세척한 후 상온에서 건조시켰다. 광학 현미경하에서 석회화 결절 형성을 관찰하였다.

2. 지방 분화 유도

지방세포로의 분화능을 확인하기 위하여(Dominici et al., 2006) 3차 계대배양한 치주인대유래 세포와 치수유래 세포 2×10^5 개를 6 well 배양기에 분주한 후 세포가 70~80% 찬 후 진행하였다. 대조군은 10% FBS를 첨가한 α -MEM상에서 배양하였으며, 실험군은 지방분화유도배지(STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit,

Gibco BRL)로 교환하여 2주간 배양하였다. 37° C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 각각의 배지는 3~4일에 1회씩 교환하였다. 2주간 배양한 세포들은 PBS로 세척한 후, Methanol, Formaldehyde, 증류수를 1:1:1 [vol/vol]의 비율로 섞은 용액으로 1일간 고정하였다. 증류수로 3회 세척한 후, 3 mg/ml의 Oil Red O (Sigma) 용액으로 10분간 염색을 시행하였다. 증류수로 세척하여, 상온에서 건조시킨 후, 광학현미경 하에서 분화 양상을 관찰하였다.

라. 유세포 분석을 통한 줄기세포 표지인자 확인

미분화 세포에서만 확인되는 세포표면 표지자 (cell surface marker)를 통해 치주인대유래 세포와 치수유래 세포의 FACS 분석을 시행하였다(Stan Gronthos et al., 2011; K. Mrozik, Gronthos, et al., 2010; J. S. Song, Kim, et al., 2010). 초기 중배엽 줄기세포의 표지인자 중 표면항원인 CD90 (anti-human CD90 (Thy-1) PE, eBioscience, San Diego, CA, USA), CD105 (anti-human CD105 (Endoglin) PE, eBioscience)와 내피세포, 조혈세포의 표면 항원인 CD31 (anti-human CD31 (PECAM-1) PE, eBioscience), CD34 (anti-human CD34 PE, eBioscience)의 항체를 이용하였다. CD marker는 phycoerythrin(PE)가 결합된 것을 사용하였다. 대조군은 1차 항체를 생략하고 진행하였다. 염색을 시행한 세포들의 형광량은 FACS Calibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, San Joes, CA, USA)로 측정하였고, 발현 양상은 FCSExpress V3 software (De Novo Software, Thornhill, ON, Canada)로 분석하였다.

III. 결과

가. 치주인대 세포와 치수 세포의 일차 배양

획득한 소구치로부터 치주인대 조직과 치수 조직을 분리하여 outgrowth 방법으로 일차 배양한 후 관찰을 시행한 결과, 초기(0~7일)에는 배양한 세포가 바닥에 붙는 것만을 확인할 수 있었다. 배지를 교환하며 배양을 계속 진행하여 세포의 증식을 확인하였는데, 치주인대 세포에서는 7일 후부터 세포가 바닥에 붙어 자라나오는 것을 관찰할 수 있었고, 치수 세포에서는 그보다 늦은 14일 후부터 일차 배양한 조직의 경계로부터 세포가 자라나오는 것을 관찰할 수 있었다. 대략적으로 치주인대 세포는 일차배양 14일, 치수세포는 일차배양 21일경에 배양기내에 균집을 이루며 단층으로 자란 것을 확인할 수 있었다. 치주인대 세포의 증식이 치수 세포의 증식보다 빠른 경향을 보였다. 두 세포 모두 균일한 양상으로 바닥에 붙어 증식하는데, 두 세포군 간 유사하게 방추형의 섬유모세포양의 형태를 보였다. 치주인대 세포에서 치수 세포에 비해 좀 더 방향성있게 자라는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 2).

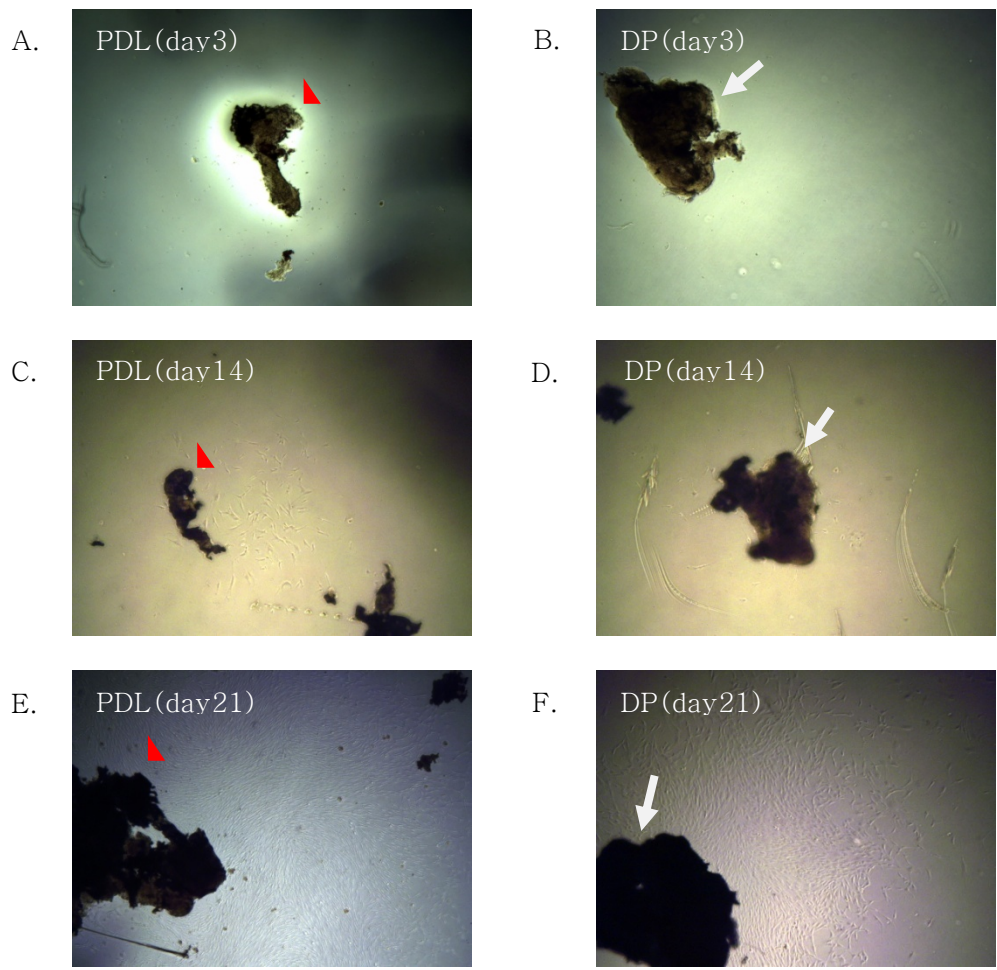


Figure 2. Morphology of primary cells obtained from PDL and DP from the same donor tooth.

Morphology of the primary cells after 3, 14, and 21 days. The cells started to outgrow from the boundary of the tissue. Their morphology was similar to that of spindle-like fibroblasts. Arrowhead: PDL cell, Arrow: DP cell, Original magnification: $\times 40$.

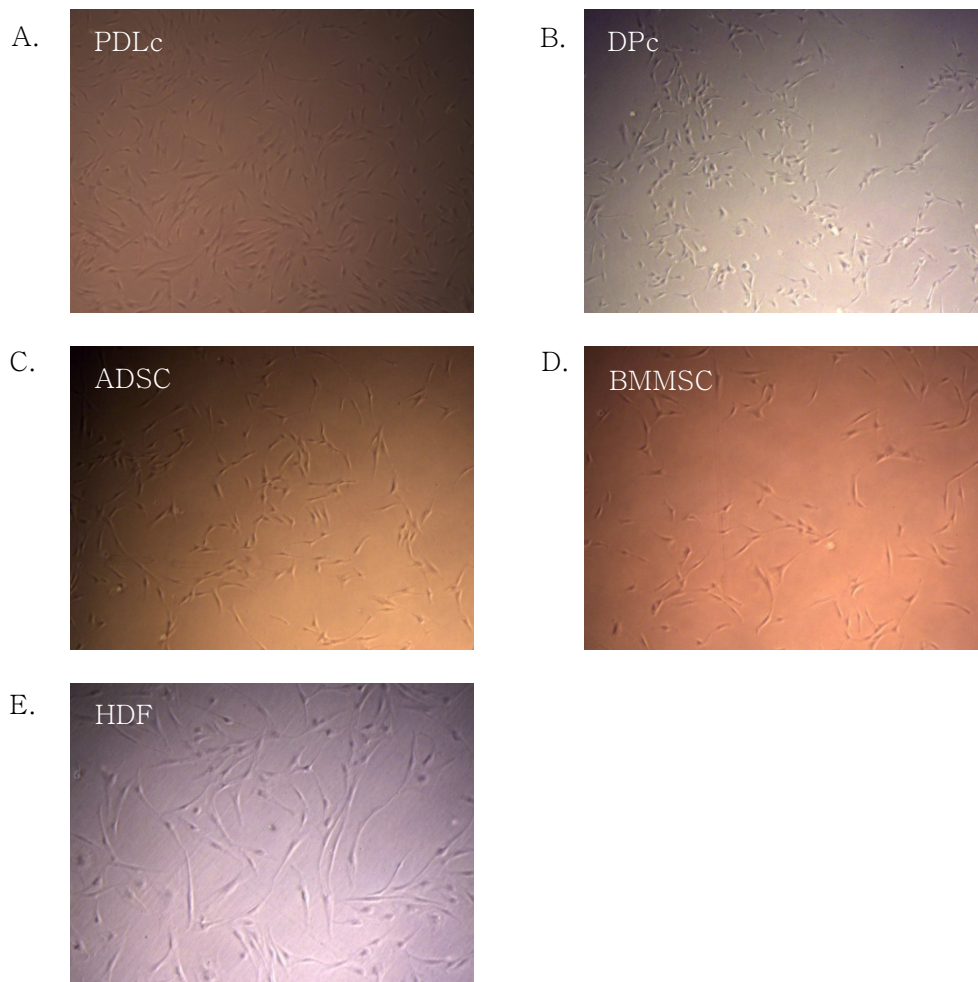


Figure 3. Morphology of PDL and DP cells.

PDLc; PDL cells, DPc; DP cells, ADSC; adipogenic stem cell, BMMSC; bone marrow mesenchymal stem cell, HDF; human dermal fibroblast, Original magnification: $\times 40$.

나. 자가 증식능

줄기세포의 첫 번째 조건인 자가 증식능력을 확인하기 위하여 소구치로부터 획득한 치주인대유래 세포(PDLc4)와 치수유래 세포(DPc4)의 증식능을 골수유래 줄기세포(BMMSC), 지방유래 줄기세포(ADSC) 및 제3대구치의 치주인대유래 세포(PDLc8)와 치수유래 세포(DPc8)와 비교하였다. 24시간 배양한 결과 모든 군에서 세포의 증식을 관찰할 수 있었다. 소구치로부터 획득한 치주인대유래 세포와 치수유래 세포의 24시간 증식은 지방유래 줄기세포, 골수유래 줄기세포, 제3대구치로부터 획득한 치수유래 세포와 유사하였다. 제3대구치로부터 획득한 치주인대유래 세포의 24시간 증식은 다른 세포군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으나, 골수유래 줄기세포보다는 유의하게 낮은 증식률을 나타냈다 ($p < 0.05$) (Figure 4).

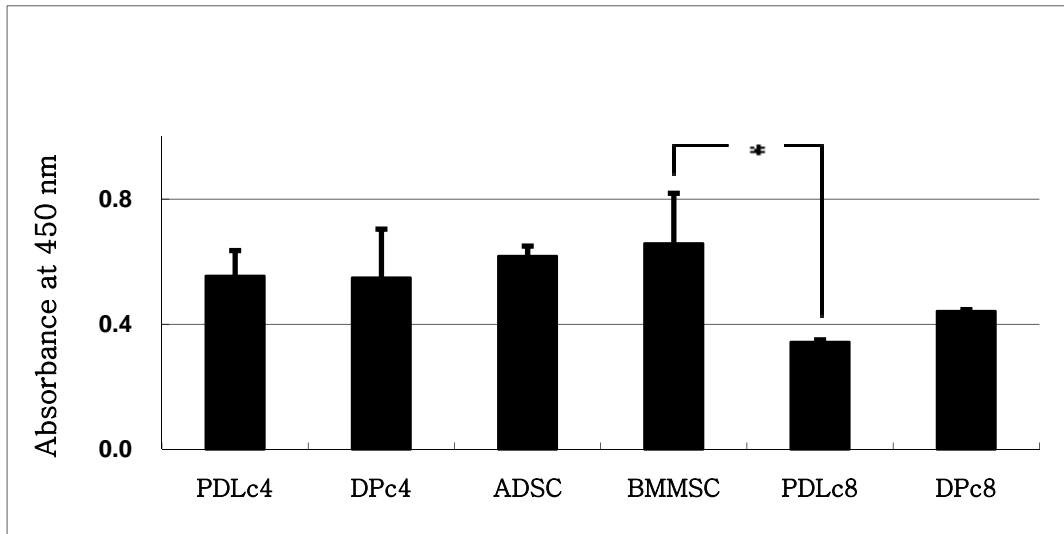


Figure 4. Proliferation rate of PDL and DP cells.

Proliferation rates of PDLc4 and DPc4 were similar to the rate of ADSC, BMMSC, and DPc8. The proliferation rate of PDLc8 was significantly lower than that of BMMSC. PDLc4; PDL cells obtained from premolars, DPc4; DP cells obtained from premolars, ADSC; adipogenic stem cell, BMMSC; bone marrow mesenchymal stem cell, PDLc8; PDL cells obtained from third molars, DPc8; DP cells obtained from third molars, *; $p < 0.05$.

다. 다분화능

1. 골 분화 유도

치주인대유래 세포는 14일경부터, 치수유래 세포는 21일경에 분화유도배지에서 석회화 결절의 형성을 볼 수 있었다. 21일 후 Alizarin Red S 염색 결과 일반배지와는 달리 모든 분화유도배지에서 석회화 결절이 형성된 것을 선명하게 확인할 수 있었다 (Figure 5).

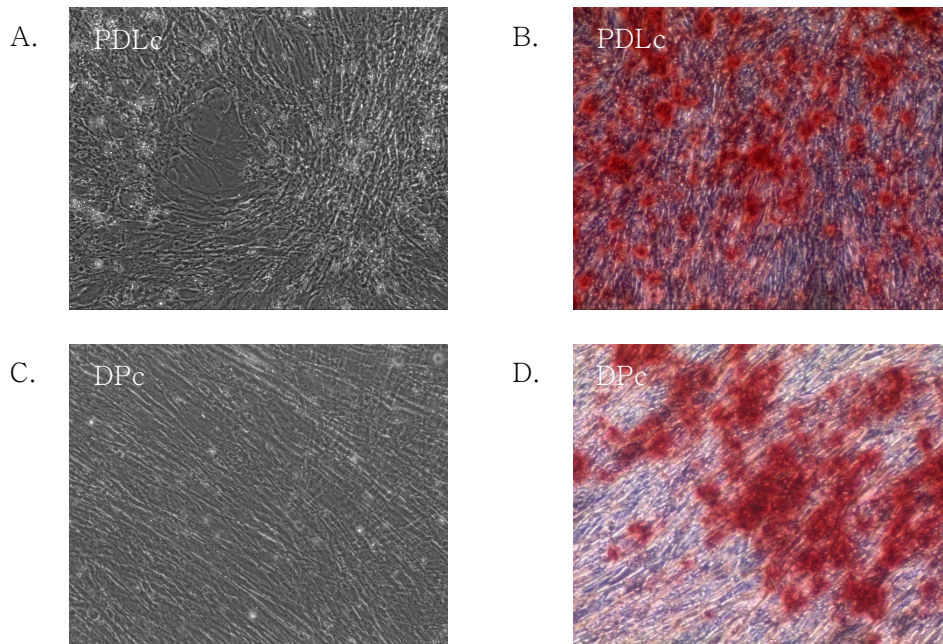


Figure 5. Osteogenic differentiation of PDL and DP cells.

After 3 weeks of osteogenic differentiation, calcified nodules were observed in PDLc and DPc before (A, C) and after Alizarin Red S staining (C, D). PDLc; PDL cells, DPc; DP cells Original magnification: $\times 100$.

2. 지방 분화 유도

치주인대유래 세포와 치수유래 세포의 배양 14일 후 Oil-Red O 용액에 염색한 결과, 분화유도배지에서 지방이 축적된 지방 조직이 붉게 염색되어 나타난 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 6). 일반배지에서는 지방조직의 형성이 관찰되지 않았다. 그 양상에 있어 치수유래 세포에서 치주인대유래 세포에 비해 약하게 염색된 것을 확인할 수 있었다.

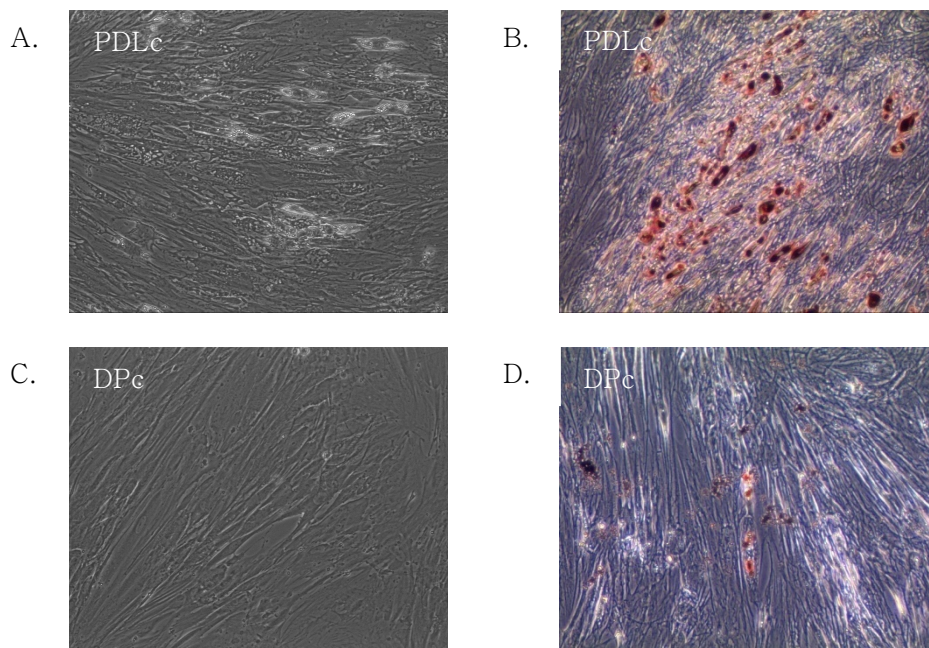


Figure 6. Adipogenic differentiation of PDL and DP cells.

After 2 weeks of adipogenesis differentiation, lipid cluster formation was observed in PDLc and DPc. PDLc and DPc before (A, C) and after Oil Red O staining (B, D). PDLc; PDL cells, DPc; DP cells Original magnification: $\times 100$.

라. 유세포 분석

줄기세포의 표면표지자 항체를 이용한 FACS 분석 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래 세포에서 중간엽 줄기세포 표지자인 CD90, CD105에서 많은 양의 발현을 보였으며, 조혈 세포와 내피 세포의 표지자인 CD31과 CD34에는 매우 작은 양의 발현을 보였다. 두 세포군의 발현 양상은 유사한 형태로 나타났다(Figure 7).

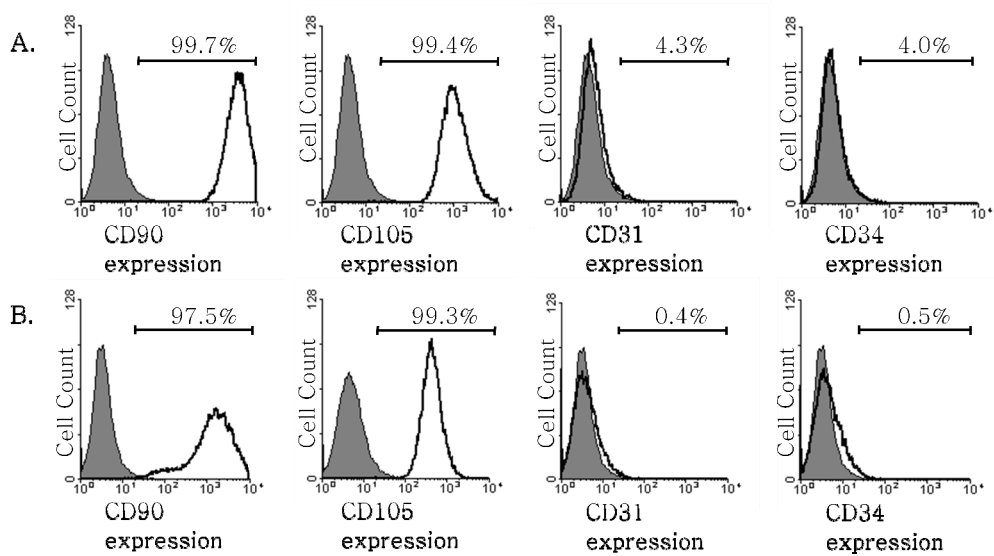


Figure 7. Expression of mesenchymal stem cell markers in PDL and DP cells.

PDLc (A) and DPc (B) showed high expression of the mesenchymal stem cell surface markers, CD90, and CD105, but very low expression of the hematopoietic stem cell surface markers CD31 and CD34. Gray solid fill, isotype control; black line, marker of interest. PDLc; PDL cells, DPc; DP cells.

IV. 고찰

본 연구에서는 교정치료시 발치 후 폐기하는 건전한 소구치에서 동시에 획득한 치주인대세포와 치수세포에서 높은 증식률과 다른 조직으로의 분화 가능성을 보이는 줄기세포의 특성을 확인하였다.

평균 수명이 늘어나면서 노화나 사고, 질병 등으로 인한 장기의 대체 및 재생 치료가 활발히 진행되고 있다. 기능적인 측면에서 인공 재료에 비해 생체 재료의 이식이 유리할 뿐 아니라, 동종이나 이종간의 이식에 비해 자가 이식은 생체 안정성이나 기능적인 회복이 뛰어나며 면역반응 등에 의한 부작용이 없다는 장점이 있다. 하지만 자가 조직 이식의 경우, 공여부(donor)가 제한적이며 공여 조직 획득 과정이 복잡하고, 조직 이식 후 공여부의 결손(defect)이 남는다는 단점이 있어 한계를 보인다. 따라서 최근 연구되고 있는 자가 줄기세포를 이용한 조직 재생이 이를 대체할 수 있는 방법으로 기대되고 있다.

줄기세포는 크게 배아 줄기세포와 성체 줄기세포로 구분할 수 있다(Lanza et al., 2004). 배아 줄기세포는 인공수정이나 핵을 제거한 난자에 체세포의 핵을 이식하는 체세포 복제로 얻은 배아의 발생과정에서 획득할 수 있다. 배아 줄기세포는 이론적으로는 모든 조직의 세포로 분화가 가능한데, 세포의 주변 환경 조건에 따라 특정 종류의 세포계 (cell line)로 배양될 수 있다. 이에 반해 성체 줄기세포는 이미 분화가 이루어진 조직 내에서 얻을 수 있는데, 수가 적어 연구에 필요한 양을 얻기 힘들고, 인체 장기 내에서 채취하기가 번거롭고 제한적이라는 단점이 있지만, 배아 줄기세포에 비해 윤리적인 문제에서 자유롭다는 장점이 있다. 성체 줄기세포 역시도

자가분열능이나 분화능에 있어 줄기세포로서의 기본적인 능력을 갖추고 있어 여러 종류의 조직을 충분히 발생시킬 수 있으며, 최근의 연구에서는 배양조건만 맞춰주면 거의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있다는 연구 결과가 나오고 있다(Karaöz et al., 2009).

현재 임상적으로 얻고 있는 성체 줄기세포는 주로 골수에서 채취하고 있으나, 골수의 경우는 골수 천자시의 동통이나 감염의 위험성 등 채취에 있어 제약이 따르며 세포 수가 제한적이라는 한계가 있다. 이외에 지방이나 근육, 골막 등에서도 성체 줄기세포를 획득할 수 있으나 골수의 경우와 마찬가지로 채취시 동통, 감염의 위험성, 제한적인 세포 수뿐 아니라 접근이 어렵고, 공여부의 결손(defect)이 남는다는 한계가 있었다. 따라서 줄기세포가 비교적 높은 비율로 생존하며 줄기세포로서 자가분열능과 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖추는 줄기세포를 찾는 것도 중요하지만 채취시 접근이 용이하고 좀더 간단한 공여부를 찾는 것이 필요해졌다.

한편 2000년 Gronthos(S. Gronthos, 2000)와 2004년 Seo(Seo et al., 2004)등의 연구에서 인간의 하악 제3대구치의 치수와 치주인대로부터 줄기세포(PDLSC; periodontal ligament stem cell, DPSC; dental pulp stem cell)를 분리해낸 연구 결과를 발표하였다.

최근 세포 치료를 위한 국제사회의 간엽성 조직 줄기 세포 위원회(Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy)에 따르면 간엽성 줄기세포(MSC)는 다음과 같은 최소한의 기준을 만족시켜야 한다고 하였다(Fong et al., 2011). 간엽성 줄기세포는 일반적인

배양조건에서 배양판 바닥에 붙어 자라는 양상을 띠어야하며, CD105, CD73, CD90과 같은 표지자를 발현하고, CD45, CD11b, CD34, CD14, CD79a, CD19, HLA-DR와 같은 표지자는 발현하지 않으며, in vitro상에서 조골세포, 지방세포, 연골모세포로 분화가 가능하여야 한다고 하였다.

치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 알려진 간엽성 줄기세포의 특성대로 (Pittenger, 1999; J.-H. Song, Park, et al., 2010) 배양판 바닥에 붙어 자라는 양상으로 관찰되었으며, 섬유모세포와 유사한 형태를 나타냈다. 일차배양시 치주인대유래 세포는 대체적으로 치수유래 세포에 비해 빠른 세포 증식과 높은 세포 생존률을 보였으나, 이는 개체에 따른 차이를 보였으며, 개체의 나이나 치아에서 획득할 수 있는 조직이나 세포의 양, 발치 후 시간, 일차배양 방법 등의 요인에 따른 것으로 생각된다. 24시간 세포 증식 분석에서 소구치로부터 획득한 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포는 골수 줄기세포나 지방 줄기세포와 유사한 수준으로 증식하였다. 96시간까지의 증식능을 관찰한 기존의 연구(Gay et al., 2007)에서도, 96시간 후에는 치주인대 줄기세포에서 2배의 증식을 보였으나, 48시간까지 치주인대 줄기세포는 골수 줄기세포와 같은 증식률을 보였다고 하였다. 반면 제3대구치로부터 획득한 치주인대 세포는 골수 줄기세포보다 유의하게 낮은 증식률을 보였으며, 다른 세포군과의 차이는 유의하게 나오지 않았으나 전반적으로 낮은 증식률을 보이는 경향을 나타냈다. 이는 앞서 언급했듯이(You et al., 1999) 소구치가 교합 등으로 기능하던 치아로서 기능하지 않던 제3대구치에 비해 양질의 세포를 획득할 수 있음을 의미하는 것으로 생각된다.

FACS분석은 간엽성 줄기세포에만 특이적으로 반응하는 표면표지자를 이용하여 형광염색으로 확인하거나 흡광도를 측정하여 간엽성 줄기세포를 분리해내기 위해

사용된 분석방법이다. 따라서 대표적인 간엽성 줄기세포의 세포표면 표지자(cell surface marker, CD marker)인 CD90(Thy-1/Thy-1.1), CD105 (Endoglin)의 발현을 조사하였다. 이와 함께 간엽성 줄기세포 관련 표지자가 아니며 조혈 전구세포와 혈관 내피세포에서만 특이적으로 발현되는 CD34 (hematopoietic stem cell marker)와 CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)의 발현도 조사하였다(Stan Gronthos et al., 2011; K. Mrozik, Gronthos, et al., 2010). 기존 연구에서처럼 간엽성 줄기세포의 세포표면 표지자는 많은 양 발현되고, 조혈성 줄기세포의 세포표면 표지자는 극소량 발현되어 치주인대유래 세포와 치수유래 세포가 간엽성 줄기세포임을 확인하였다.

조골세포로의 분화 유도시 치주인대유래 세포 군은 치수유래 세포 군에 비해 2주경부터 석회화 결절의 형성이 시작되었으며, 3주 후의 염색 정도에 있어서도 더 많은 양이 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 조골세포 분화시의 염색양은 축적된 칼슘의 정도를 의미한다고 생각된다. 조골세포의 세포막에 위치하여 초기 골분화의 표지자로 사용되는 alkaline phosphatase (ALP)가 치주인대 줄기세포에서 치수 줄기세포보다 더 많은 활성도를 보임을 발표한 기존 연구에서도 치주인대 줄기세포에서 더 높은 수준의 칼슘 축적을 보임을 확인할 수 있었다(Jo et al., 2007). 반면, 기존의 연구에 따르면 치아유래 줄기세포의 골조직, 지방조직, 연골조직으로의 분화는 골수 줄기세포의 분화보다 약하게 나타난다고 하였다(Gay et al., 2007). 이는 치주인대 줄기세포나 치수 줄기세포에 들어있는 다양한 세포군, 특히 섬유모세포와 같은 분화가 진행된 세포가 석회화 과정을 방해하기 때문으로 보인다.

생체 내 이식을 통한 기존의 연구에서 치수 줄기세포는 상아질, 치수 유사 구조, 조골세포 유사세포, 골 유사 조직으로 분화되는 것이 보고된 바 있으며, 치주인대 줄기세포는 백악질 유사 구조와 치주인대 유사 조직을 형성하는 것이 보고되었다(G. T. J. Huang et al., 2009). 뿐만 아니라 지지대와 carrier로 이식함으로써 골 재생에 관여할 수 있다고 하였다(Laino et al., 2005). 타 논문에서와 같이 치아유래 줄기세포는 골조직, 치아 조직 등 경조직 재생에 응용되는 경우가 많다. 하지만 교정 영역에서의 재생 치료 및 응용을 고려한다면, 연조직 재생의 필요성이 더욱 증대되고 있다. 발치 치료 후 비구순 주름이 도드라져 나이들어 보이는 안모를 호소하는 경우나, 고연령의 환자에게 불가피하게 생기는 black triangle의 치료 등 연조직의 조절에는 여전히 한계가 존재한다. 안면비대칭에 있어서도 골 이식 및 악교정 수술로 경조직 개선의 여지가 많아졌으나, 악골이 아닌 근육의 비대칭이 존재하는 경우에는 경조직의 대칭성을 맞추어주더라도 안면의 비대칭이 완전히 해소되지 않은 것처럼 보인다. 이와 같은 안면 주름이나 치은 조직, 안면 근육 등 연조직 개선에 있어 소구치 발치시 획득한 치주인대 혹은 치수 줄기세포가 임상에 응용될 수 있을 것이라 기대할 수 있다. 치주인대, 치수 조직에서 유래한 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포는 간엽성 줄기세포로서 형태학적으로도 섬유모세포의 형태를 띠며, 다수의 교원질을 분비한다. 따라서 상처 치유(Nishino, Ebisawa, et al., 2011; Nishino, Yamada, et al., 2011), 주름 개선 효과 등(W. Kim, Park, et al., 2009)과 유사한 연조직 재생의 가능성을 기대할 수 있으리라 사료된다.

치아 조직으로부터 분리해낸 세포는 기존의 연구들에서 두 가지 방법으로 배양하게 된다. 획득한 조직을 배양기 바닥에 붙여서 조직으로부터 세포가 자라나오도록

배양하는 outgrowth 방법이 있고, trypsin이나 collagenase 등의 효소를 이용하여 조직을 단일 세포로 분해하는 enzyme digestion의 방법이 주로 사용되는데, 기존의 줄기세포 일차배양 연구에서는 enzyme digestion의 방법이 주로 사용되어져 왔다. 두 배양 방법의 비교를 시행한 연구에 의하면(George T. J. Huang et al., 2006; Tanaka et al., 2010), outgrowth 방법이 세포의 증식률은 상대적으로 낮으나 교원질 합성이 상대적으로 높아 섬유모세포 특성의 연구에 더 적합하다고 하였으며, enzyme digestion 방법은 증식률과 조골세포, 지방세포, 연골세포 등으로의 분화 능력, CD166 등의 중간엽 줄기세포 표지자의 발현이 상대적으로 높다고 보고하였다. 따라서 중간엽 줄기세포 특성의 연구 및 치주 재생에 응용하려면 enzyme digestion 방법이 더 적합하다고 하였으나, enzyme digestion 방법은 outgrowth 방법에 비해 술식이 복잡하고 다른 종 유래의 다양한 enzyme을 사용하기 때문에 임상적인 응용시 단점이 될 수 있다. 또한 본 연구에서는 섬유모세포의 특성을 이용한 연조직 재생을 향후 목표로 하였으므로, 상대적으로 교원질이 많이 합성되는 섬유모세포 특성의 연구에 더 적합한 outgrowth 방법으로 줄기세포를 배양하였다.

줄기세포의 배양을 위한 배지로는 D-MEM과 α -MEM이 많이 사용되어져 왔다. 이미 D-MEM이 MSCBM(mesenchymal stem cell basal medium, Cambrex®)에 비해 성장률이나 골유도, 표면 표지자 관찰에 있어서 유의한 차이를 보이지 않음으로써 줄기세포를 위한 기본 배지로 적절하다고 하였다(Nakamura et al., 2008). D-MEM과 α -MEM의 비교에서는 α -MEM배지 상에서 대부분의 dental stem cell이 가장 많은 성장을 보였다고 보고된 바 있어(Jo et al., 2007) 본 연구에서는 α -MEM상에서 치아유래 줄기세포를 배양하였다.

배양한 치수 줄기세포의 경우 즉시 사용할 수도 있고, 장기간 냉동보관하여 사용할 수도 있다. 치수 줄기세포와 그로부터 분화된 조골세포를 2년간 동결보존하여 보관하였다가 해동하여 실험한 결과에서도 증식능력이나 조골세포로의 분화능력, 골형성능력 등의 기존 줄기세포의 특성을 유지하는 것을 확인할 수 있다(Papaccio et al., 2006). 따라서 교정치료 시작시 발치한 치아로부터 획득한 줄기세포를 냉동보관하여 향후 재생치료 등에 활용할 수 있으리라 생각된다. 간엽성 줄기세포는 이식시 T세포 동종 이계 반응을 유도하지 않으며, T 세포 반응을 억제함으로써 면역조절작용을 한다고 알려져 있다(Zhao, 2004). 인간의 치수세포 역시 간엽성 줄기세포로서 91%까지 면역을 억제하여 골수 줄기세포 보다도 좋은 이식재료로서의 가능성을 가지고 있다고 보고되고 있다(Pierdomenico et al., 2005). 인간의 치수 줄기세포를 이중에 이식한 연구에서도 추가적인 면역억제 과정을 시행하지 않았음에도 불구하고 열이나 발진, 부종, 근육통 등의 거부반응을 보이지 않았음을 발표했다(Kerkis et al., 2008) .

본 연구에서는 교정치료시 발거된 건전한 소구치를 이용하여 치주인대 조직과 치수 조직을 동시에 획득하였으며, 높은 생존률과 증식률, 다분화능을 가진 간엽성 줄기세포의 특징을 규명하였다. 치주인대 줄기세포는 치수 줄기세포에 비해 빠른 증식을 보였으며, 조골세포, 지방세포로의 분화가 더 많이 관찰되었다. 반면 치수 줄기세포는 보관이 용이할 뿐 아니라 높은 면역억제 기능으로 이식재료로 많은 장점을 가진다는 연구가 많이 발표되어 왔다. 따라서 교정치료시 발거된 소구치에서 획득한 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포를 이용한 생체내 이식 연구가 추가적으로 뒷받침된다면, 추후 특히 교정환자에서의 악안면 부위의 재생 치료에 소구치에서 획득한 치주인대 줄기세포와 치수 줄기세포가 손쉽게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

본 연구는 교정 환자에서 발거되는 건전한 소구치의 치주인대와 치수로부터 세포를 분리하여 줄기세포의 특성을 평가하기 위해 시행되었다. 강남세브란스병원 교정과에서 교정치료중인 6명의 환자(13.2~22.1세)에서 발거되는 제1소구치를 이용하였으며, 발거 직 후, 치근표면에서 치주인대조직을 긁어냈으며, 치아를 절단한 후 내부의 치수조직을 분리하였다. 3주간 배양한 후 세포 형태를 관찰하고 자가증식능력을 확인하였으며, 분화유도배지에서 배양하여 조골세포와 지방세포로의 분화를 유도하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 3주간 배양한 치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 배양기 바닥에 붙어 자라는 양상으로 섬유모세포와 비슷한 형태를 보임으로써 간엽성 줄기세포의 특성을 보였다.
2. 세포 증식능력 분석 결과 소구치의 치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 지방 줄기세포, 골수 줄기세포, 제3대구치의 치수유래 세포와 유사한 수준의 증식을 보였다.
3. 조골세포 분화유도배지에서 3주간 배양한 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래세포에서 석회화 결절의 형성을 관찰할 수 있었으며, 치주인대유래 세포에서 더 많은 석회화 결절을 관찰할 수 있었다.
4. 지방세포 분화유도배지에서 2주간 배양한 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래세포에서 지방을 함유한 지방세포의 형성을 관찰할 수 있었으며, 치주인대유래 세포에서 더 많은 양의 지방 함유 세포를 관찰할 수 있었다.

5. FACS분석 결과, 치주인대유래 세포와 치수유래 세포는 간엽성 줄기세포의 표면표지자인 CD90과 CD105를 발현하고, 조혈성 줄기세포의 표면표지자인 CD31과 CD34는 발현하고 있지 않았다.

이상의 연구를 통하여, 성인의 건전한 소구치의 치주인대와 치수로부터 세포를 분리하여, 자가 증식을 하며 골과 지방 등의 다양한 조직으로 분화하는 간엽성 줄기세포의 특성을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 교정치료시 발치된 소구치의 치주인대와 치수로부터 획득한 줄기세포가 추후 교정학에서 경조직 및 연조직 분야의 악안면 재생을 위해 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, Tuan RS, Huang GT. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 5(4): 617–631, 2010.

An S-y. Isolation and culture of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *Journal of Dental Rehabilitation and Applied Science* 25(2): 191–200, 2009.

Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *Journal of Periodontal Research* 41(6): 547–553, 2006.

Choi K-M, Seo Y-K, Yoon H-H, Song K-Y, Kwon S-Y, Lee H-S, Park J-K. Effects of mechanical stimulation on the proliferation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12: 601–609, 2007.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315–317, 2006.

Fong ELS, Chan CK, Goodman SB. Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials* 32: 395 – 409, 2011.

Gay I, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofacial Res* 10: 149–160, 2007.

Gronthos S Ed. 2000. *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*.

Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods in Molecular Biology* 698: 107–121, 2011.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* 81(8): 531–535, 2002.

Han M-J, Seo Y-K, Yoon H-H, Song K-Y, Park J-K. Effect of mechanical tension on the human dental pulp cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13(4): 410–417, 2008.

Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research* 88(9): 792–806, 2009.

Huang GTJ, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell and Tissue Research* 324(2): 225–236, 2006.

Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(32): 13475–13480, 2009.

Jo Y-Y, Lee H-J, Kook S-Y, Choung H-W, Park J-Y, Chung J-H, Choung Y-H, Kim E-S, Yang H-C, Choung P-H. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Engineering* 13(4): 767–773, 2007.

Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, Genç ZS, Yürüker S, Duruksu G, Demircan PÇ, Sarıboyacı AE. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology* 133(1): 95–112, 2009.

Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SAS, Cabral RM, Maranduba CMC, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM, Brolio MP, Sant'Anna OA,

Miglino MA, Zatz M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *Journal of Translational Medicine* 6(1): 35, 2008.

Kim NR, Lee DH, Ahn S-J, Lee I-S, Yang H-C. The differentiation-inducing effect of conditioned media obtained from dental pulp cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 107(5): e54-e59, 2009.

Kim W, Park B, Park S, Kim H, Sung J. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of Dermatological Science* 53(2): 96-102, 2009.

Laino G, Carinci F, Graziano A. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *Journal of Craniofacial Surgery* 17(3): 511 - 515, 2006.

Laino G, D'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research* 20(8): 1394-1402, 2005.

Lanza R, Blau H, Melton D, Moore M, (Hon) EDT, Verfaillie C, Weissman I, West M. 2004. *Handbook of Stem Cells*, 1 ed: Elsevier Academic Press.

Miura M, Gronthos S, M. Z, B. L, W. FL, G. RP, S. S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(10): 5807-5812, 2003.

Mrozik K, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. A method to isolate, purify, and characterize human periodontal ligament stem cells. *Methods in Molecular Biology* 666: 269-284, 2010.

Mrozik KM, Zilm PS, Bagley CJ, Hack S, Hoffmann P, Gronthos S, Bartold PM. Proteomic characterization of mesenchymal stem cell-like populations derived from ovine periodontal ligament, dental pulp, and bone marrow: Analysis of

differentially expressed proteins. *Stem Cells and Development* 19(10): 1485–1499, 2010.

Nakamura S, Yamada Y, Baba S, Kato H, Kogami H, Takao M, Matsumoto N, Ueda M. Culture medium study of human mesenchymal stem cells for practical use of tissue engineering and regenerative medicine. *Bio-Medical Materials and Engineering* 18: 129 – 136, 2008.

Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386(1): 135–139, 2009.

Nishino Y, Ebisawa K, Yamada Y, Okabe K, Kamei Y, Ueda M. Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells With Basic Fibroblast Growth Factor Enhance Wound Healing of Skin Defect. *Journal of Craniofacial Surgery* 22(2): 438–442, 2011.

Nishino Y, Yamada Y, Ebisawa K, Nakamura S, Okabe K, Umemura E, Hara K, Ueda M. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. *Cytotherapy* 13(5): 598–605, 2011.

Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. *Journal of Cellular Physiology* 208(2): 319–325, 2006.

Park J-C, Kim J-M, Jung I-H, Kim JC, Choi S-H, Cho K-S, Kim C-S. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*: no-no, 2011.

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 80(6): 836–842, 2005.

Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284(5411): 143–147, 1999.

Seo B–M, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Gehron Robey P, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 364(9429): 149–155, 2004.

Song J–H, Park B–W, Byun J–H, Kang E–J, Rho G–J, Shin S–H, Kim U–K, Kim J–R. Isolation and characterization of human dental tissue–derived stem cells in the impacted wisdom teeth: comparison of dental follicle, dental pulp, and root apical papilla–derived cells. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 36(3): 186, 2010.

Song JS, Kim S–h, Kim S–O, Choi B–J, Kim J–H, Kwak S, Jung H–S. Characterization of Stem Cells Obtained from the Dental Pulp and Periodontal Ligament of Deciduous Teeth. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7(5): 575–582, 2010.

Song SY, Jung JE, Jeon YR, Tark KC, Lew DH. Determination of adipose–derived stem cell application on photo–aged fibroblasts, based on paracrine function. *Cytotherapy* 13(3): 378–384, 2011.

Tanaka K, Iwasaki K, Feghali Ke, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme–digested culture methods. *Archives of Oral Biology*, 2010.

You H–K, Shin H–S, Lee G, Min B–M. Effect of mechanical stress on the proliferation and expression of cell cycle regulators in human periodontal ligament cells. *Journal of the Korean Academy of Periodontology* 29(3): 593–607, 1999.

Zhao R. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 143(5): 284–291, 2004.

Abstract

Isolation and characterization of postnatal human PDL & dental pulp stem cells obtained from extracted tooth for orthodontic treatment

Hana Kim, D.D.S

Department of Dental science, Graduate school, Yonsei University

(Directed by Prof. Chooryung J. Chung, D.D.S., Ph.D.)

The Aim of this study was to investigate the characteristics of postnatal human periodontal ligament & dental pulp stem cells isolated from extracted premolar for orthodontic purpose.

PDL & dental pulp tissue was obtained from simply extracted human premolar of 6 orthodontic patients (13.2 to 22.1 year old). Directly after extraction, periodontal ligament tissue scraped from the root surface, and after cutting the tooth longitudinally, pulp tissue was isolated inside of the tooth. After culturing for 3 weeks in a-MEM containing 10% fetal bone serum and antibiotics, cell morphology was observed, self-replicating capability was confirmed and in vitro

osteoblast and adipocyte differentiation was induced by culture in differentiation inducing medium.

1. 3 weeks cultured human periodontal ligament and dental pulp cells attached to the bottom of the culture dish with growth patterns and morphology similar to fibroblasts.
2. Proliferation rate of periodontal ligament and dental pulp cells of premolar was similar to adipogenic stem cells, bone marrow stem cells, dental pulp cells of third molar.
3. In osteogenic cultures, calcium nodule was observed in both periodontal ligament & dental pulp cells.
4. In adipogenic cultures, lipid containing adipocyte was observed in both periodontal ligament & dental pulp cells.
5. FACS analysis, periodontal ligament and dental pulp cells expressed mesenchymal stem cell surface marker CD90, CD105, did not express hematopoietic stem cell markers CD31, CD34.

Through this study, mesenchymal stem cells could be isolated from periodontal ligament and dental pulp of human healthy premolar.

Key words : Premolar, periodontal ligament, dental pulp, mesenchymal stem cell.