대한척추외과학회지 제 11 권 제 2 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 11, No. 2, pp 67~76, 2004

중간엽 줄기세포를 이용한 추간판내 유전자 치료: 퇴행성 추간판 질환에서 치료적 의미

김 향 · 권언혜 · 이광일 · 송기홍 · 신승엽 · 박시영 · 박진오 · 이환모 · 문성환

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

Mesenchymanl Stem Cell Based Intradiscal Gene Therapy: Therapeutic Implication in Degenerative Disc Disease

Hyang Kim, M.Sc., Un-Hye Kwon, B.Sc., Kwang-Il-Lee, B.Sc, Ki-Hong Song, M.D., Sung-Yeop Shin, M.D., Si-Young Park, M.D., Jin-Oh Park, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D., Seong-Hwan Moon, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

– Abstract –

Study Design: In-vitro experiments using human mesenchymal stem cells (MSCs), intervertebral disc (IVD) cells and type 5 adenovirus/transforming growth factor-β construct (Ad/TGF-β1).

Objectives: To determine the effect of MSC-based gene therapy for matrix regeneration of IVD cells.

Summary of Literature Review: MSCs are known to be multipotent in tissue regeneration. In degeneration of IVD, cellular replacement with genetic modification other than that of IVD cells may prove an enhanced mechanism for the regeneration of IVD cells.

Materials and Methods: MSCs and IVD cells were cultured and an adenovirus construct containing TGF-β cDNA (Ad/TGF-β 1) was also produced. In the first step, the MSCs were transduced with Ad/TGF-β, then mixed with IVD cells in various proportions and three dimensionally cultured. [methyl-^{3}H]Thymidine and [^{35}S]Sulfur incorporation for DNA and proteoglycan synthesis, respectively, were measured. RT-PCR was performed to assess the aggrecan and collagen types I and II mRNA expressions

Results: Mixed cultures of MSC and IVD cells showed relatively similar amounts of newly synthesized proteoglycan compared with cultures of IVD cells only. In mixed cultures transduced with Ad/TGF-β1, there were significant decreases in newly synthesized proteoglycan with increasing the proportions of MSCs, which was also found with the aggrecan and collagen type II mRNA expressions. However, the collagen type I mRNA expression increased with increased proportions of MSCs transduced with Ad/TGF-β.

Conclusion: Cell therapy with MSCs and IVD cells provided a mechanism for cellular augmentation. However, MSC-based gene therapy coupled with IVD cells did not maintain a chondrogenic phenotype.

Key words: Mesenchymal stem cell, disc cell, TGF-b1, adenovirus, gene therapy

Address reprint requests to
Seong-Hwan Moon, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
#134 Shinchon-Dong, Soedaemun-ku, Seoul, 120-752, Korea
Tel: 82-2-361-5649, Fax: 82-2-363-1139, E-mail: shmoon@yumc.yonsei.ac.kr

***본 연구는 부분적으로 연세대학교 일반교수연구비 (#6-2002-0060), Brain Korea 21에 의해 지원되었음.**

서 론

척추 추간판의 퇴행성 변화와 그에 연관된 척추의 질환들 (추간판 탈출증, 척추 신경 병변, 척추관 협착증, 경추 척추증, 퇴행성 척추증 등)은 환자에게 심대한 고통을 끼치며 이로 인한 의료비용도 나날이 증가하고 있다[1]. 추간판의 퇴행성 변화는 점진적인 당단백 (proteoglycan)과 2형 교원질 (type II collagen)의 감소로 인해 수핵 (nucleus pulposus) 내의 수분 분압이 감소하여[2-8], 결과적으로 척추 후관절 및 척추체에 전반적인 퇴행성 병변을 일으키게 된다[9]. 현재까지 척추 추간판의 퇴행성 질환의 치료는 물리치료 혹은 진통제 투여 등 보존적 요법이나 추간판 제거, 척추 유합 등 고식적인 방법이었다[8,10-11]. 특히 현재까지 척추 추간판의 퇴행성 변화를 예방한다거나 퇴행성 변화를 역행시켜 추간판을 정상에 가깝게 회복시키는 등의 근원적인 치료는 시행되지 않았다.

이와는 대조적으로 여러 종류의 성장인자들 (transforming growth factor- ß1, osteogenic protein-1, insulin like growth factor-1)을 시험관내의 추간판 조직에 주입하여 기질의 생성을 자극한 실험들이 시도되었으며[12-16], 이러한 성장인자들의 기질(matrix) 생성능력은 추간판 퇴행에 적용 가능한 접근법으로 제시되기도 하였다.

1998년 Nishimura[16]등은 자가 수핵을 채취하여 퇴행된 추간판 부위에 재주입하는 술식을 수행하였는데, 이로 인해 일부 추간판의 퇴행을 감소시키는 효과를 얻을 수 있었으며, Okuma[17]등은 수핵부와 섬유륜부의 조직을 채취하여 공동 배양한 후, 양 세포간의 생화학적인 작용기전을 활성화시켜 추간판 부위에 재 주입함으로써 치료 효과가 있음을 보고하였다. 이러한 개념들은 추간판의 퇴행에 대한 치료에 있어서 세포이식을 통해 추간판의 퇴행을 일부 지연시키거나 재생시킬 수 있다는 대안을 제시한 것이다.

한편 생물학적으로 중요한 단백질의 유전자의 염기서열이 밝혀지고 이러한 유전자의 조작 및 바이러스 재조합 기술의 발전으로 이제는 체세포로 유전자를 전달하여 생물학적 효과를 기대하는 유전자치료법이 각광을 받고 있으며[18-20], 유전자 치료는 외부에서 원하는 유전자를 전달체(vector)를 이용해서 세포내로 전달하고, 지속적으로 유전자를 발현하게 하여 원하는 산물을 내부적으로 생산하게 함으로써 생물학적 효과를 지속적으로 얻는 치료개념이다[21-24]. 유전자 치료의 경우는 한번의 유전자 전달로도 지속적인 유전자 발현을 유지하여 만성경과를 취하는 질환에 특히 그 강점을 발휘하는 세련된 약물 공급기전의 하나이다.

그러나 추간판 변성을 지연 혹은 역전시키기 위해서는 내재한 추간판세포를 전술한 유전자 전달 등으로 생물학적으로 자극을 주어 추간판 기질 생성을 유도함으로써 치료적 효과를 얻을 수 있으나 퇴행이 한계 이상으로 진행된 경우는 가용한 추간판세포의 숫자가 체외 전달된 치료적 유전자로 의미 있는 생물학적 효과를 얻기에는 절대적으로 부족할 수도 있으며 이는 유전자 치료 같은 생물학적 방법의 적용을 제한하는 요소로 작용할 수 있다. 그러므로 퇴행성 추간판 질환의 치료에 있어 치료적 유전자 전달뿐만 아니라 세포 치료의 개념이 도입 되어야한다.

인간 중간엽 줄기세포는 골수 등에 다수 존재하는 미분화 세포로, 다양한 외부적인 자극에 의해 지방세포, 조골세포, 근세포, 그리고 연골세포로의 분화 가능성이 이미 증명 되었으며, 오늘날 다양한 질환에 있어서 이러한 인간 중간엽 줄기세포의 이식을 통해 성공적인 치료효과를 확인할 수 있었다[25-30]. 인간의 추간판세포는 이미 연골세포와 기질 분포 등 여러 가지 면에서 매우 유사함이 밝혀져 있으므로, 이러한 미분화된 인간 중간엽 줄기세포에 기질생성을 향상 시킬 수 있는 유전자를 전달하여, 연골세포와 유사한 형태로 분화를 도모하면서 추간판 조직에 이식한다면 유전자, 세포 치료 단독 사용의 한계점을 극복할 수 있으리라 예상된다.

그래서 본 연구의 목적은 골수로부터 쉽게 분리 가능한 인간 중간엽 줄기세포에 치료적 유전자를 전달하여 유전자 조작된 중간엽 줄기세포에 의한 추간판세포의 기질 생성 반응을 확인하고, 추간판세포와 공동 배양하였을 때 유전자 조작된 중간엽 줄기세포에 의해 더욱 향상된기질생성반응이있는지여부를확인하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 추간판 조직 채취 및 배양

요추 및 경추 추간판 탈출증, 경추 척수증, 요추 척추관 협착증 등의 척추 질환으로 수술을 시행한 5명의 환자로부터 추간판 조직을 채취하였다. 척추관내로 탈출된 추간판 조직은 엄격히 제외하고 역시 척추 연골판 조직도 육안으로 제외하였으며 추간판의 수핵 및 내측 섬유륜 부위의 조직만을 채취하였다. 채취된 추간판 조직은 수술 전 자기공명영상 검사 상 퇴행정도를 분류하여 퇴행정도에 따른 생물학적 반응의 영향을 없애기 위해 grade III, IV의 퇴행된 추간판을 대상으로 하였다. 통상 채취 후 20분 내에 수술실에서 실험실로 옮긴 후, 채취된 추간판 조직을 혈액 및 체액을 제거하기

위해 Dulbecco's Phosphate-Buffered saline (D-PBS, Invitrogen, Grand Island, NY) 으로 세척한 후, 추간판세포는 순차적 효소 소화법으로 조직에서 분리하였다. 순차적 효소 소화법을 간단히 요약하면, 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썬 다음 5% 우태아 혈청 (FBS, JRH BIOSCIENCES, Lenexa, KS), 0.2% pronase (Sigma, St. Louis, MO), 0.004% deoxyribonuclease II type IV (DNAse, Sigma, St. Louis, MO)를 포함한 Ham's F-12 medium (Invitrogen, Grand Island, NY)을 이용하여 37℃에서 60분간 소화시켰다. D-PBS로 세척 한 후, 상기의 효소 용액에서 pronase를 0.02% collagenase type II (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ)로 대치시킨 제2의 효소용액으로 역시 37 ℃에서 4시간 정도 소화시켰다. 분리된 추간판세포는 Ham's F-12 medium and Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM/F12, Invitrogen, Grand Island, NY)으로 세척 후 nylon 여과지 (pore size 75 ㎛)를 사용하여 부유 조직을 제거하고 세포 생존성 검사 및 세포밀도를 계산한 후 5×10^5 cells/ml의 밀도로 25 cm^2-EasYFlask™ (Nunc, Rockilde, Denmark)에서 배양하였다. 세포 배양액은 10% FBS, 25 ug/ml ascorbic acid, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin (all antibiotics from Invitrogen, Grand Island, NY)을 함유한 DMEM/F12 배양액을 사용하였다. 추간판세포는 3주간 5%의 CO_2를 포함한 37 ℃ 습윤 배양기에서 배양하였고, 배양액은 3일에 한번씩 새로운 배양액으로 교체하였다.

2. 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양

추간판 조직을 채취한 환자로부터 획득한 10ml의 골수 용출액에 10% FBS를 포함한 Low glucose-Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM-LG, Invitrogen, Grand Island, NY) 배양액 20 ml을 넣고 원심 분리하여 침전물을 모으고 상층에 뜬 지방층을 버렸다. 모아진 침전물을 배양액 10 ml로 부유하여 Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 밀도 구배법으로 분류하였다. 낮은 밀도 층에 모아진 중간엽 줄기세포를 배양액으로 헹구고 25 cm^2-EasYFlask™ (Nunc, Rockilde, Denmark)에 유핵 세포를 깔고, 분리한 세포를 5%의 CO_2를 포함한 37 ℃ 습윤 배양기에서 5일간 배양한 후, 부착성이 없는 세포를 제거하고 새로운 배양액을 첨가하였다. 배양액은 3일에 한번씩 새로운 배양액으로 교체하였다.

3. 아데노바이러스 재조합

E1 및 E3 유전자부분이 결여돼 성장이 제한된 제 5형 아데노바이러스를 사용하였다. E1 유전자 부위에 표식 유전자로 luciferase 유전자를(Ad/luc), 치료 유전자로 TGF-β1 유전자를(Ad/TGF-β1) 재조합하였다. 재조합된 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현되며, 재조합된 아데노바이러스는 293 세포에서 증식하였으며, CsCl 밀도 구배법으로 분리 정제하여, 1×10^{12} paricles/ml의 농도로 1.5 ml 원심분리 tube에 등분하여 -70 ℃ 냉동고에 저장하였다. 또한 바이러스의 particle 수와 감염 가능한 particle 수는 1:100의 비율로 결정하여 실험을 수행하였다.

4. 추간판세포와 중간엽 줄기세포의 3차원 배양법

3차원배양을 간단히 기술하면, 0.15M NaCl에 2.4%로 녹인 low viscosity alginic acid (Sigma, St. Louis, MO)를 미리 혼합한 세포와 정확히 1/2씩 섞어 alginic acid용액의 농도가 1.2%가 되도록 준비했다. 최종 세포의 숫자는 2×10^6 cells/ml이 된다. 26 G의 1cc 주사기를 이용하여, 24well plate에 미리 담아 둔 102 mM $CaCl_2$용액에 alginic acid용액과 세포 혼합액을 방울방울 떨어 뜨려 순간적으로 굳게 한다. 혼합액 방울은 well당 10개가 되도록 했다. 방울로 떨어진 혼합액이 완전히 polymerization이 되도록 10분간 상온에서 방치했다. 0.15 M NaCl용액으로 두차례 세척한 후, 세포를 배양할 10% FBS, 25 ug/ml ascorbic acid, 1% v/v penicillin, streptomycin (all antibiotics from Invitrogen, Grand Island, NY) 을 함유한 DMEM/F12 배양액으로 한 번 더 세척한 후, 다시 세포 배양액을 well 당 1 ml씩 첨가하여 5%의 CO_2를 포함한 37 ℃ 습윤 배양기에서 추가로 7일간 배양한다.

5. 시험관내 아데노바이러스 감염 술식 및 실험군

배양된 중간엽 줄기세포의 배양액을 제거한 후 D-PBS로 두 번 세척하여, 대조군은 5% FBS가 포함된 DMEM-LG 배양액만을, 실험군에는 표식인자가 재조합된 Ad/luc 또는 치료 유전자가 재조합된 Ad/TGF-β1를 각각 5% FBS가 포함된 DMEM-LG 배양액으로 희석하여 중간엽 줄기세포에 첨가하였다. 표식 유전자 실험에서 구한 100% 감염을 달성할 수 있는 아데노바이러스의 농도를 참고하여 아데노바이러스는 각 군당 150MOI가 되도록 첨가하였다. 재조합 아데노바이러스를 첨가한 중간엽 줄기세포는 5%의 CO_2를 포함한 37 ℃ 습윤 배양기에서 24시간 추가 배양하였다. 추가 배양한지 24시간

Table 1. Primer sequence and reaction temperature

	primer sequence (5'->3')	annealing temperature (℃)
βactin	GGC GGA CTA TGA CTT AGT TG AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA	53
aggrecan	GGA TCT AGC AGT GAG ACG TC CTG CAG CAG TTG ATT CTG AT	47
collagen type I	CCT GTC TGC TTC CTG TTA AC AGA GAT GAA TGC AAA GGA AA	48
collagen type II	CAG GAC CAA AGG GAC AGA AA TTG GTC CTT GCA TTA CTC CC	54

이 지난 후, 추간판세포와 아데노바이러스로 감염된 중간엽 줄기세포를 모두 0.25% Trypsin, 1 mM EDTA로 배양 접시에서 분리하여 세포수를 센 후, 각각을 4×10^6 cells/ml이 되도록 배양액으로 희석하였다. 추간판세포와 중간엽 줄기세포간의 비율이 1:0, 0:1, 1:1, 1:4 가 되도록섞은후, alginic acid를이용하여3차원배양을실시하였다.

6. 세포 증식 반응

추간판세포와 중간엽 줄기세포를 혼합 3차원 배양을 실시한지 7일째 되는 날, 배양액을 [methyl-^{3}H]Thymidine (Amersham pharmacia, Uppsala, Sweden) 5 μCi/ml이 첨가된 기본 배지로 교체하여 24시간 동안 배양한다. 24시간 후 세포를 cell harvester를 이용하여 Glass microfibre filter (Whatman, Maidstone, England)에 흡착시킨 후, D-PBS로 수차례 세척하여 unbounded [methyl-^{3}H]Thymidine을 완전히 제거했다. 16시간동안 상온에서 membrane을 완전히 말린 후, membrane을 scintillation vials에 담아서 Liquid scintillation cocktail 용액 (Beckman, Fullerton, CA)을 3 ml 첨가하여, 상온에서 16시간 이상 방치하여 DNA가 노출되도록 한다. βscintillation counter (Packard, Downers Grove, IL)를 이용해 DNA의 양을 측정하였다.

7. 기질 생성 측정

추간판세포와 중간엽 줄기세포를 혼합 3차원 배양을 실시한지 7일째 되는 날, 배양액을 [^{35}S]-Sulfur (Amersham pharmacia, Uppsala, Sweden) 20 μCi/ml이 첨가된 기본 배지로 교체하고 4시간 추가 배양 후, 8M guanidine hydrochloride, 20 mM EDTA, 그리고 proteinase inhibitors 혼합액을 세포 배양에 첨가하여 4 ℃ 에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다. 방사선동위원소로 표식되는 당단백의 정량적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column (Amersham pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 통과시켜 순차적으로 용출한 후, Liquid scintillation cocktail 용액 (Beckman, Fullerton, CA)을 6 ml을 첨가하여 섞은 후, 16시간 상온에서 방치했다. 제 2, 3, 4 번째의 용출 용액만을 βscintillation counter (Packard, Downers Grove, IL)를 통해 새로이 생성된 당단백양을 측정하였다.

8. 세포 표현형 측정 (Aggrecan, collagen type Ⅰ, type Ⅱ mRNA 발현)

3차원 배양한 세포 bead에 28 mM EDTA (pH8.0), 0.15M NaCl용액을 첨가하여 depolymerization 시킨 후, RNeasy mini kit (QIAGEN, Maryland, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA 1 μg에 Oligo d(T)16 primer 2.5 μM (Invitrogen, Grand Island, NY)을 첨가하여 70 ℃에서 5분간 annealing시킨 후, RT premix (Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 42 ℃에서 1시간, 95 ℃에서 5분, 4 ℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 ul를 각각의 primer 10 pmol/ul씩을 첨가하여 최종 부피가 20 ul가 되도록 한 후 PCR premix (Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 PCR을 실시하였다 (Table 1). RT-PCR에 대한 internal control로 βactin을 사용하였으며, 유전자 발현 정도를 TINA program을 이용하여 비교 분석하였다.

9. 통계

자료는 SPSS (SPSS Inc. Chicago IL)를 이용하여 처리하였으며 One-way ANOVA 및 Fisher's protected LSD post-hoc test로 실험군간 비교하였다. 통계 방법의 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다

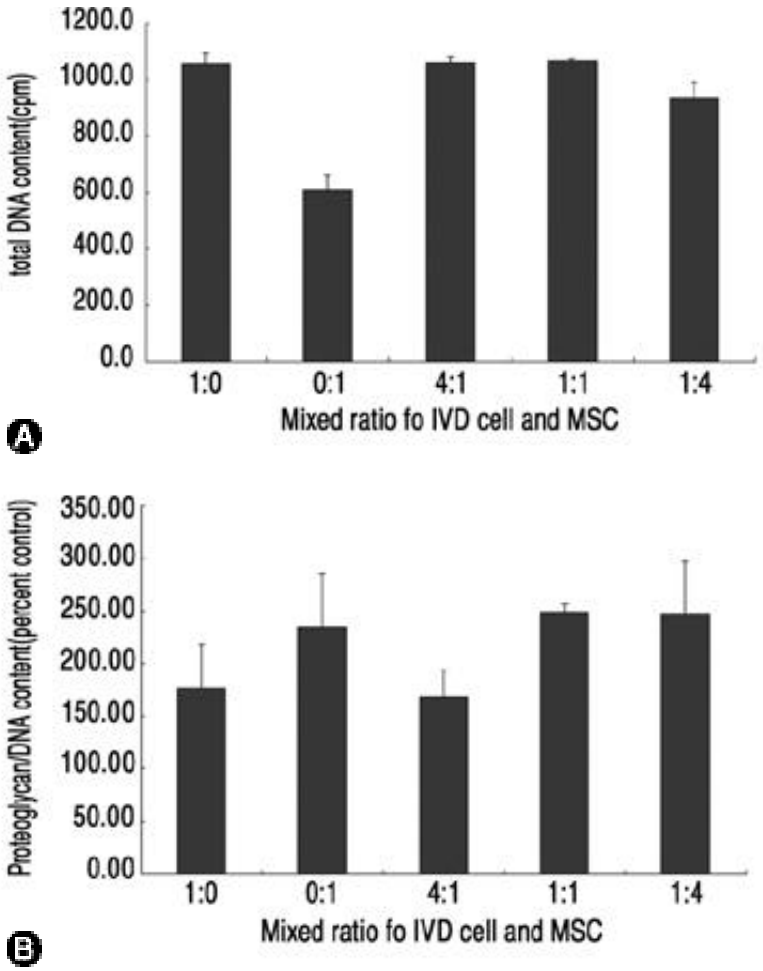

Fig. 1. (**A**) total DNA content in three dimensional culture of IVD cells and MSCs, (**B**)Newly synthesized proteoglycan in three dimensional culture of IVD cells and MSCs presented as percent control. Mixed cultures with IVD cells and MSCs equalled or quite decreased in newly synthesized proteoglycan comparing only IVD cell cultures ($p<0.05$).

결 과

1. 세포 증식 반응

추간판세포와 중간엽 줄기세포에 어떤 유전자 전달도 하지 않고 혼합하여, 7일간 3차 배양한 경우에서는 각 군 간의 세포증식에 있어서 크게 의미 있는 차이를 발견할 수 없었으나 (Fig. 1A), Ad/TGF-β1을 중간엽 줄기세포에 전달하여 혼합한 예에 있어서는 중간엽 줄기세포의 혼합 비율이 높아짐에 따라 증가함을 관찰 할 수 있었다 ($p<0.05$, Fig. 2A).

2. 신생 당단백 생성

추간판세포와 유전자전달을 하지 않은 중간엽 줄기세포를 혼합한 예에 있어서는 중간엽 줄기세포의 혼합 비율을 증가시킴에 따라 당단백의 생성이 증가된 예는 관찰 할 수 없었으나, 추간판세포와 비교했을 때 당단백의 총량이 같은 수준을 유지하거나 소량 감소한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1B). 그러나 중간엽 줄기세포에 Ad/TGF-β1을 전달하여 추간판세포와 혼합한 예에 있어서는 중간엽 줄기세포의 혼합 비율이 증가함에 따라 당단백의 생성양이 추간판세포만을 배양한 예와 비교하면30 50%이상 , Ad/TGF-β1가 전달된 중간엽 줄기세포와 비교하면 60 70%이상 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2B). 이러한 신생 당단백의 생성양은 DNA 생성량으로 보정한 수치 결과이다.

3 추간판세포 표현형의 발현

추간판세포와 유전자 전달을 하지 않은 중간엽 줄기세포를 혼합하여 3차 배양한 결과, 어떠한 자극도 없이 미분화된 중간엽 줄기세포 자체의 aggrecan, collagen

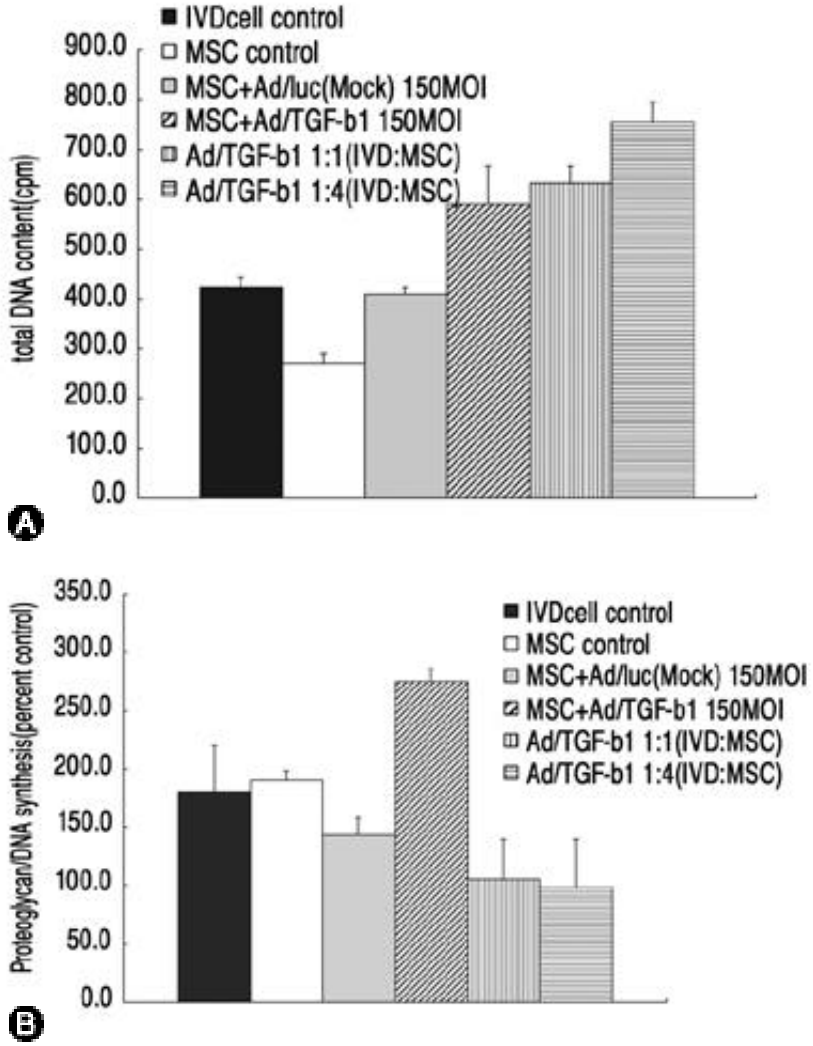

Fig. 2. (**A**) total DNA content in three dimensional culture of IVD cells and Ad/TGF-β1-transduced MSCs, (**B**) Newly synthesized proteoglycan in three dimensional culture of IVD cells and Ad/TGF-β1-transduced MSCs presented as percent control ($p<0.05$).

type I, collagen type II의 mRNA 발현이 추간판세포와 비교하였을 때, 50 70%이상 적은 발현양을 관찰 할 수 있었으며, 이로 인해 중간엽 줄기세포의 혼합양이 증가함에 따라 추간판세포 표현형과 관련한 mRNA 발현양이 점진적으로 감소되어 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 또한 치료 유전자인 Ad/TGF-β1을 중간엽 줄기세포에 전달하여 혼합한 예에서도 같은 결과를 관찰 할 수 있었으나, collagen type I의 mRNA 발현에 있어서는 치료 유전자 전달을 한 중간엽 줄기세포의 예에 있어서만 혼합 비율을 증가함에 따라 발현양이 증가됨을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

퇴행성 척추 추간판 질환은 추간판 수핵부의 당단백과 수분의 총량이 점진적으로 감소하는 데 따른 질환으로, 정상적인 추간판 수핵부에서는 당단백과 2형 교원질(collagen type II)의 함량이 풍부하고, 섬유륜부에는 당단백과 1형 교원질 (collagen type I)의 함량이 많은 데에 비해, 초기 추간판의 퇴행 과정에서는 당단백과 aggrecan의 함량이 현저히 감소하는 현상이 관찰되어 왔었다[3-5]. 이에 따라 퇴행성 추간판 질환에 대한 치료적 목적으로 감소된 당단백의 합성을 자극하고 연골형 표현형 (aggrecan, collagen type II) 발현이 증가될 수 있도록 다양한 성장인자를 적용하는 연구가 시행되어 왔다[12-16]. 1991년에 최초로 Thompson 등[12]은 개의 추간판 조직으로부터 분리한 세포에 재조합 TGF-β1을 처리하여 당단백의 합성이 증가된다는 것을 확인한 이래, Gruber 등[14]도 TGF-β1이 인간의 추간판세포의 3차원 배양에 있어

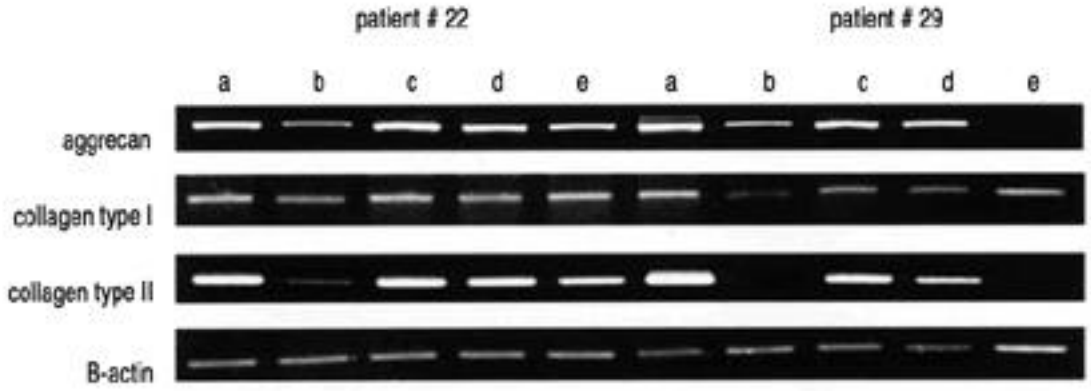

Fig. 3. RT-PCR for aggrecan, collagen type I, and collagen type II in three dimensional culture of IVD cells and MSCs. βactin was used for normalization. Mixed ratio of IVD cells and MSCs are a) 1:0, b) 0:1, c)4:1, d) 1:1, e) 1:4.

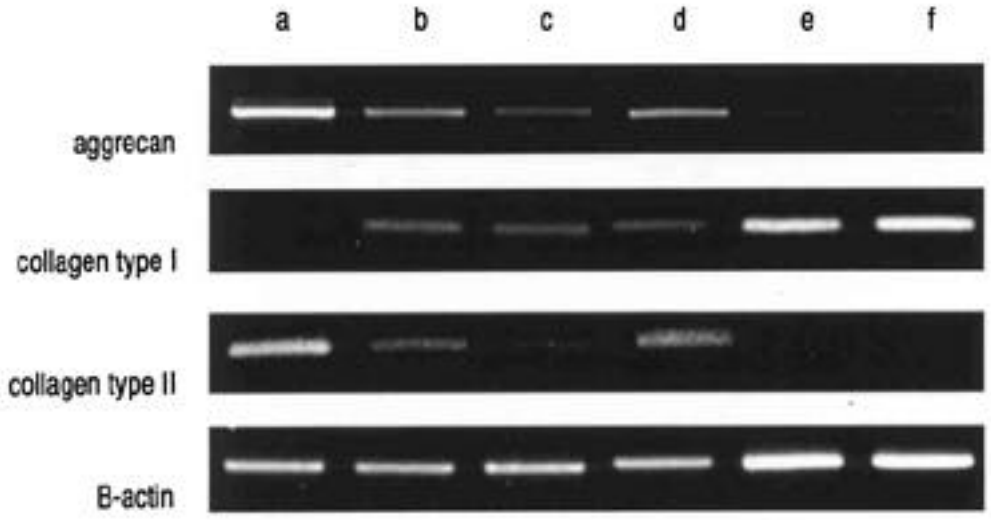

Fig. 4. RT-PCR for aggrecan, collagen type I, and collagen type II in three dimensional culture of IVD cells and Ad-transduced MSCs. βactin was used for normalization. a) only IVD cells, b) only MSC, c) only Ad/luc-transduced MSC [Mock], d) only Ad/TGF-β1-transduced MSC [Ad/TGF-β1-MSC], e) [IVD cells : Ad/TGF-β1-MSC] 1:1, f) [IVD cells : Ad/TGF-β1-MSC] 1:4.

서 세포증식과 세포기질의 합성이 증가됨을 증명하였다. 그 이외에도 IGF-1, BMP-2 등도 추간판세포의 당단백 합성을 증가 시킬 수 있는 성장인자로서의 가능성이 있음이 증명 되었다[35]. 그러나 이러한 성장 인자를 퇴행성 추간판 질환의 치료적 목적으로 이용하였을 때, 인체 내에서는 일시적인 생물학적 활성만을 유지할 수 있다는 단점이 큰 문제로 대두 되어 왔다.

유전자 치료의 소개로 지속적인 생물학적 자극이 가능해지면서 퇴행성 척추 추간판 질환에 새로운 전기가 마련되었다[31-34]. 다만, 인간의 퇴행성 추간판 질환에 있어서 퇴행의 정도가 심하게 진행된 환자에 있어서는 자가 추간판 조직을 획득하여 치료 유전자를 체외 전달법을 통해 전달한다거나 환자의 추간판에 직접 전달법을 통해서 전달한다거나 하는 방법은 정상적인 상태로의 퇴행성 추간판의 복원이 매우 힘들다는 점에서 한계가 있다고 하겠다. 이에 본 연구는 유전자 치료와 중간엽 줄기세포를 이용한 세포 치료를 동반하여, 현저히 감소된 추간판세포의 숫자를 극복하고, 중간엽 줄기세포에 치료 유전자를 전달하여, 추간판세포와 유사한 연골세포로의 분화를 도모하는 한편, 치료 유전자 전달에 따라 발현되는 성장인자의 도움을 받아 주변 추간판세포의 기질 생성도 향상시키기 위한 목적으로 실험을 수행하게 되었다.

본 연구의 결과를 살펴보면, 미분화된 중간엽 줄기세포만을 인간 추간판세포와 혼합 배양한 결과에서 단순히 중간엽 줄기세포의 혼합율 만을 높인 예에서도 추간판세포만을 3차 배양한 군과 비교하였을 때, 당단백의 합성이 같거나 조금 감소한 것으로 보아, 퇴행된 추간판

질환에서 추간판 조직으로 중간엽 줄기세포를 이식하였을 때의 치료적 효과가 있을 것이라 추론할 수 있었다. 그러나 치료 유전자인 TGF-β1 유전자를 중간엽 줄기세포에 전달하여 추간판세포와 혼합한 예에 있어서는 대조군인 추간판세포만을 배양하였을 때의 기질 생성과 비교하여 보면, 오히려 감소하는 경향을 관찰한 결과, 이는 중간엽 줄기세포와 추간판 세포의 혼합 배양에 있어서 TGF-β1의 기질생성능이 그리 크지 않다는 것을 알 수 있었다. 또한 추간판세포 표현형을 RT-PCR을 통해 관찰한 결과, 치료 유전자를 전달한 군에서 중간엽 줄기세포의 혼합율을 증가시키면 aggrecan과 collagen type II의 mRNA 발현양이 감소하고 collagen type I의 mRNA 발현양이 증가하는 것으로 보아, 이는 TGF-β1 유전자가 전달된 중간엽 줄기세포가 추간판의 수핵부세포-유사세포로 분화되기 보다는 섬유륜부세포-유사세포로 분화되었음을 추론할 수 있겠다. 이는 발생학적으로 중간엽 줄기세포가 분화 가능한 연골세포와 추간판세포의 기원체가 다른 점을 고려해 볼 때 충분히 가능한 결과라 생각된다. 또한 2001년 Hanada 등[36]에 따르면 연골 세포를 3차 배양하여 TGF-β1만을 적용한 예에서는 14일까지 배양을 시행하여도 collagen type II의 mRNA발현이 거의 되지 않음을 확인하였으나 BMP-2를 적용한 예에서는 3일째부터 매우 향상된 기질 생성능이 있음을 확인한 결과로 비추어 볼 때, 본 연구에서 치료 유전자로 TGF-β1보다는 BMP-2를 적용하였을 때는 또 다른 결과를 유추할 수 있지 않을 까 예상된다. 따라서 향후 연구로는 치료 유전자로서 BMP-2를 중간엽 줄기세포에 적용하여 혼합 배양을 실시하여 향상된 기질 세포발현을 나타내는지를 증명할 예정이다.

결 론

치료 유전자인 TGF-β1 cDNA을 전달한 중간엽 줄기세포와 추간판세포를 혼합한 예에서는 괄목할 만한 기질 생성능을 관찰 할 수는 없었으므로 추간판 재생을 위한 중간엽 줄기세포의 유전자 조작과 세포 이식의 접근법에서 TGF-β1 cDNA는 효과적이지 못하였다. 그러나 유전자를 전달하지 않은 중간엽 줄기세포와 추간판세포의 혼합 배양에 있어서는 추간판세포만을 배양한 군과 비교하였을 때, 거의 유사한 수준의 기질 생성을 보임을 관찰한 바, 중간엽 줄기세포가 퇴행성 추간판 질환의 재생과 복원에 있어서 감소된 기질 생성능을 향상시킬 수 있는 세포 치료 도구임을 확인 할 수 있었다.

REFERENCE

1) **Borenstein D**: *Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheumatol 1992;4:226-32.*
2) **Hardingham TE, Adams P**: *A method for the determination of hyaluronate in the presence of other glycosaminoglycans and its application to human intervertebral discs. Biochem J 1976;159:143-147.*
3) **Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME**: *Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. J Orthop Res 1987;5:198-205.*
4) **Lipson SJ, Muir H**: *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine 1981;6:194-210.*
5) **Melrose J, Ghosh P, Taylor TK**: *A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibosus. J Orthop Res 1992;10:665-676.*
6) **Moullier P, Bohl D, Heard JM, Danos O**: *Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically modified skin fibroblasts. Nat Genet 1993;4:154-159.*
7) **Buckwalter JA**: *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 1995;20:1307-1314.*
8) **Adams MA, May S, Freeman BJ, Morrison HP, Dolan P**: *Effects of backward bending on lumbar intervertebral discs. Relevance to physical therapy treatments for low back pain. Spine 2000;25:431-437.*
9) **Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, McNeill TW, Huckman MS**: *Discs degenerate before facets. Spine 1990;15:111-113.*
10) **Herkowitz HN, Abraham DJ, Albert TJ**: *Management of degenerative disc disease above an L5-S1 segment requiring arthrodesis. Spine 1999;24:1268-1270.*
11) **Modic MT**: *Degenerative disc disease and back pain. Magn Reson Imaging Clin N Am 1999;7:481-491.*
12) **Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS**: *Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth facors. Spine 1991;16:253-260.*
13) **Osada R, Ohshima H, Ishihara H**: *Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insuline-like growth factors-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. J Orthop Res 1996;14:690-699.*
14) **Gruber HE, Fisher EC, Desani B, Stasky AA, Hoelsch-**

er G, Hanley EN: *Human intervertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or algi - nate and responsiveness to TGF-b1. Exp Cell Res 1997 ;235:13-21.*

15) **Takegami K, Matuda K, Kumano F**: *Osteogenic pro - tein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chon - droitinase ABC-induced chemonucleolysis. 45th Annual Meeting Trans Orthop Res Soc 1999;201.*

16) **Nishimura K, Mochida J**: *Percutaneous reisertion of the nucleus pulposus: an experimental study. Spine 1998; 23:1531-1638.*

17) **Okuma M, Mochida J, Nishimura K, Sakabe K**: *Nucle - us pulposus allograft retards intervertebral disc degenera - tion: an in vitro and in vivo experimental study. J Orthop Res 2000;18:988-997.*

18) **Evans CH, Robbins PD**: *Possible orthopaedic applica - tions of gene therapy. J Bone Joint Surg 1995;77-A:1103-1114.*

19) **Evans CH, Robbins PD**: *Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. Clin Orthop 1999;367:S410-8.*

20) **Evans CH, Robbins PD**: *Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy. Rheum Dis Clin North Am 1999;25:333-44.*

21) **Barr E, Leiden JM**: *Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. Science 1991 ;4:1507-509.*

22) **Day CS, Bosch P, Kasemkij WC**: *Use of muscle cells to mediate gene transfer to the bone defect. Tissue Eng 1999 ;5:119-125.*

23) **Dhawan J, Pan LC, Pavlath GK, Travis MA, Lanctot AM, Blau HM**: *Systemic delivery of human growth hor - mone by injection of genetically engineered myoblasts. Science 1991;254:1509-1512.*

24) **Naffakh N, Henri A, Villeval JL**: *Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibrob - last. Pro Natl Acad Sci 1995;92:3194-3198.*

25) **Caplan AI, Elyanderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM**: *Principles of cartilage repair and regera - tion. Clin Ortho Rel Res 1997;342:254-269.*

26) **Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI**: *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone 1992;13:81-88.*

27) **Haynesworth SE, Reuben D, Caplan AI**: Cell-based tis- sue engineering therapies: *the influence of whole body physiology. Adv Drug Del Rev 1998;33:3-14.*

28) **Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O 'Byrne E, Pelles TC**: *Fluorescently labeled mesenchymal stem cells(MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. Biomaterials 2002;23:109-119.*

29) **Wakitani S, Goto T, Pineda S J, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM**: *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular carti - lage. J Bone Joint Surg. 1994;76A:579-592.*

30) **Im G-I, Kim D-Y, Shin J-H, Hyun C-W, Cho W-H**: *Re pair of cartilage defect in the rabbit with cultured mes - enchymal stem cells from bone marrow. J Bone Joint Surg 2001;83B:289-294.*

31) **Moon S-H, Kang JD, Nishida K, Gilberson LG, Niy- ibizi C, Smith PN, Knaub MA, Robbins PD, Evans CH**: *Human cervicl intervertebral disc cells are susceptible to adenovirus-mediated gene therapy. Proc Cerv Spine Res Soc 1999;150-153.*

32) **Moon S-H, Nishida K, Kang JD, Gilberson LG, Muz- zonigro TS, Knaub MA, Robbins PD, Evans CH**: *Human intervertebral disc cells are genetically modifiable in vitro by adenovirus-mediated gene transfer : Implica - tions for the clinical management of intervertebral disc disorder. Spine 2000;25:,2573-2579.*

33) **Nishida K, Kang JD, Gilberson LG, Moon S-H, Suh J- K, Vogt MT, Robbins PD, Evans CH**: *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor β encoding gene. Spine 1999;24:2419-2425.*

34) **Nishida K, Kang JD, Suh J-K, Robbins PD, Evans CH, Gilberson LG**: *Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: Implication for the treatment of intervertebral disc degeneration. Spine 1998;23:2437-2443.*

35) **Kim D-J, Moon S-H, Kim H, Kwon U-H, Park M-S, Han K-J, Hahn S-B, and Lee H-M**: *Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. Spine 2003;28:2679-2684.*

36) **Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, and Johnstone B**: *BMP-2 induc - tion and TGF- β modulation of rat periosteal cell chon - drogenesis. J Cell Biochem 2001;81: 284-294.*

국 문 초 록

연구배경: 치료 유전자가 첨가된 제 5형 아데노바이러스를 이용하여 인간 중간엽 줄기세포와 추간판세포에 대한 실험관 내 치료능을 확인하였다.

연구목적: 본 연구에서는 인간의 중간엽 줄기세포를 매개로한 TGF-β1-유전자 치료를 통해 추간판세포에 대한 기질 재생능이 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법: 척추 질환으로 수술한 환자에게서 골수와 추간판을 채취하여 인간 중간엽 줄기세포와 추간판 세포를 각각 분리 배양하였다. 치료 유전자로 TGF-β1를 이용하여, 제 5형 아데노바이러스에 전달하였다. 미리 배양된 인간 중간엽 줄기 세포에 TGF-β1 유전자가 들어 있는 제 5형 아데노바이러스(Ad/TGF-β1)를 전이시킨 후, 추간판세포와 TGF-β1 유전자가 전이된 중간엽 줄기 세포를 섞어서 alginate를 이용한 3차원 배양을 실시하였다. [methyl-^{3}H] Thymidine을 이용해 세포 증식능을 확인하고, [^{35}S]Sulfur를 이용해 당단백 생성능을 확인하였다. 또한 전사 수준에서의 추간판세포 관련 유전자의 변화를 확인하고자 RT-PCR을 통한 densitometry로 분석하였다.

결과: 인간 중간엽 줄기세포와 추간판세포의 혼합배양 시, 신생 당단백의 생성은 추간판세포만을 단독 배양하였을 때와 거의 같은 수준을 유지하였다. Ad/TGF-β1이 전이된 중간엽 줄기세포와 추간판세포를 혼합 배양한 경우, 중간엽 줄기세포의 비율이 증가함에 따라 신생 당단백의 합성이 현저히 감소하였다. 전사수준에서 Aggrecan과 collagen type II의 합성에있어서도 같은 결과를 얻었다. 그러나 collagen type I의 경우에는 중간엽 줄기세포의 비율이 증가함에 따라 발현양이 점진적으로 증가하였다.

결론: 인간 중간엽 줄기세포의 추간판세포에 대한 세포 치료능은 세포 수를 증가 면에서의 가능성은 제시했다 하겠지만, 중간엽 줄기세포를 통한 유전자 치료의 면에서는 연골 세포 표현형을 유지하지 못했다.

색인 단어: 인간 중간엽 줄기세포, 추간판세포, TGF-β, 아데노바이러스, 유전자 치료

※ **통신저자 :** 문 성 환
서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel: 82-2-361-5649 Fax: 82-2-363-1193 E-mail: shmoon@yumc.yonsei.ac.kr