

성인 골수 유래 중간엽 줄기세포의

Alkaline phosphatase 활성과

골 분화능의 상관관계

연세대학교 대학원

의 학 과

김 범 수

성인 골수 유래 중간엽 줄기세포의

Alkaline phosphatase 활성과

골 분화능의 상관관계

지도 한 수 봉 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2008년 06월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 범 수

김범수의 석사 학위논문을 인준함.

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 06월 일

감사의 글

이 한편의 논문이 완성되기까지 아낌없는 격려와 가르침을 주신 한수봉 교수님께 진심으로 감사 드리며, 많이 부족하지만 보다 겸손하고 실력 있는 의학자가 되도록 이끌어주시는 이진우 교수님, 그리고 관심과 열정으로 많은 지도를 해주신 산부인과 박기현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 정형외과 의사로서 현재의 제가 있기까지 훌륭한 스승이 되어주신 박희완 교수님, 김성재 교수님, 그 외 정형외과학 교실 모든 교수님께도 감사를 드립니다.

또한 실험과 관련하여 큰 도움을 주신 김윤희 박사님과 윤동석 연구원을 비롯한 실험실 분들께도 진심으로 감사를 드립니다.

행복한 삶을 살 수 있게 해주신 하나님과 부모님, 그리고 아내에게 감사의 마음을 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	4
II. 연구 방법	8
1. 성인 중간엽 줄기세포의 일차 배양	8
2. 성인 중간엽 줄기세포의 Colony forming unit - fibroblast (CFU-F) 형성능 및 ALP 활성 분석	9
3. 성인 중간엽 줄기세포의 ALP 활성 및 염색	9
4. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 클론 (clone)의 골아세포 분화 유도	10
5. Von Kossa 염색을 통한 골아세포로의 분화 확인	11
6. 칼슘 침착량 검사	11
7. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 클론 (clone)의 지방세포 분화 유도	12
8. Oil red O 염색을 통한 지방세포로의 분화 확인	12
9. 역전사-중합효소 연쇄반응	12
III. 결 과	14
1. 성인 중간엽 줄기세포의 CFU-F 분석	14
2. 성인 중간엽 줄기세포의 ALP 염색 및 활성 분석	15

3. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 clone의 골아세포 및 지방세포로의 분화 유도	17
4. 세포 크기와 ALP 발현 정도의 상관관계 분석	19
5. ALP 발현과 골분화와 연관된 여러 유전자 발현 양상	21
IV. 고 찰	22
V. 결 론	26
참고문헌	27
Abstract	31

그림 차례

그림 1. 성인 골수유래 중간엽 줄기세포의 CFU-F 분석	15
그림 2. 배양된 성인 골수유래 중간엽 줄기세포의 ALP 발현 -----	16
그림 3. 한 공여자로부터 유래된 여러 clone 간의 ALP 활성도 차이 -----	16
그림 4. 성인 중간엽 줄기세포로의 골아세포 및 지방세포로의 분화 유도 -----	18
그림 5. 성인 중간엽 줄기세포의 골아세포 및 지방세포로의 분화 후 흡광도 측정 -----	18
그림 6. 한 공여자로부터 유래된 ALP 양성군과 음성군의 골분화도 차이 -----	20
그림 7. 세포 크기에 따른 ALP 발현정도와 골분화 및 지방분화의 차이 -----	20
그림 8. ALP 양성군과 음성군의 골분화와 연관된 유전자 발현 양상의 차이 -----	21

표 차례

표 1. 역전사-중합효소 연쇄반응을 위한 primer 염기 서열 목록 -----	13
표 2. 각 primer의 중합 효소 연쇄 반응 조건 -----	14

국문 요약

성인 골수 유래 중간엽 줄기세포의 Alkaline phosphatase 활성과 골 분화능의 상관관계

서 론

Alkaline phosphatase (ALP)는 골형성 시스템의 초기 표지자로 알려져 있으나, 성인 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)에서의 정확한 기능에 대해서는 밝혀진 바가 많지 않다. 미분화 중간엽 줄기세포에서 골분화와 연관된 전사인자인 Cbfa1, Osterix, Dlx5, Msx2의 발현이나 역할에 대한 연구 결과는 더욱 드물다. 따라서 본 연구는 첫째, 성인 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 발현되는 ALP와 골 분화능의 상관관계를 규명하고, 둘째, 미분화 중간엽 줄기세포에서 골분화와 연관된 유전자의 발현 양상을 규명하고자 하였다.

연구 방법

20세에서 74세까지, 20여명의 공여자로부터 얻어진 골수액을 7일 동안 배양하였다. 공여자별로 분리한 중간엽 줄기세포의 ALP 활성을

측정하고 ALP 염색을 수행하였다. 또한 Crystal violet 염색을 통하여 colony 형성 능력을 관찰하였다. 골아세포와 지방세포로의 분화를 위하여 골아세포 배지와 지방세포 배지에서 배양한 후, 골아세포는 Von Kossa 염색, 지방세포는 Oil Red O 염색으로 분화 정도를 확인하였다. 또한, 역전사-중합효소 연쇄반응을 통하여 골분화와 연관된 유전자들의 발현 양상을 확인하였다.

결 과

성인 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 ALP 활성은 각 공여자마다 서로 다를 뿐만 아니라, 한 공여자의 서로 다른 세포군에 따라서도 변이를 보였다. ALP 양성군은 음성군에 비해 골아세포로의 분화가 더 잘 이루어졌고, 지방세포로의 분화는 차이가 없었다. 한 개체 내에서 세포를 크기별로 나누었을 때, 크기가 큰 세포가 상대적으로 높은 ALP 활성도를 나타내었고, 골아세포로의 분화도 더 잘 이루어졌다.

골아 세포로의 분화 과정에서 나타나는 전사인자인 Cbfa1과 Dlx5는 ALP 양성군에서 많이 발현되어 있었고, ALP 음성군에서는 Osterix와 Msx2가 상대적으로 강하게 발현되었다

결 론

중간엽 줄기세포에서 ALP의 활성 정도는 골아세포로의 분화능력과 상관관계가 있음을 확인하였다. ALP의 활성이 상대적으로 높은 세포들은 골 분화와 연관된 전사인자가 많이 발현되고 있었다. 따라서 중간엽 줄기세포 중에서 ALP 활성이 높은 세포들은 골 결손 환자들을 위한 임상적용에 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

핵심 단어 : 중간엽 줄기세포, 알칼리 포스파타아제, 골분화능

성인 골수 유래 중간엽 줄기세포의 Alkaline phosphatase 활성과 골 분화능의 상관관계

<지도교수 한 수 봉>

연세대학교 대학원 의학과

김 범 수

I. 서 론

줄기세포에는 배아 줄기세포 (embryonic stem cell)와 성체 줄기세포 (adult stem cell)가 있다. 이 두 종류의 줄기세포는 각각 다른 특징과 기능을 지니고 있다. 배아 초기 단계에서 얻은 배아 줄기세포는 자기 재생 능력도 있으면서 모든 세포와 조직으로 분화 할 수 있는 세포이고, 성체 줄기세포는 자기 재생 능력은 배아 줄기세포와 유사하지만, 분화할 수 있는 능력은 제한되어 있다. 성체 줄기세포는 조혈모 줄기세포 (hematopoietic stem cell)와 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell; MSC) 등으로 나눌 수 있는데, 조혈모 줄기세포는 적혈구, 면역세포, 혈소판 등의 혈구세포로 분화할 수 있는 세포이며, 중간엽 줄기세포는 골아 세포 (osteoblasts), 지방세포 (adipocytes), 연골세포 (chondrocytes), 근육세포 (myoblasts), 신경세포 (neural cells) 등으로 분화할 수 있는 세포이다.^{1, 2} 중간엽 줄기세포는 제대혈 (umbilical cord blood), 결체조직

(connective tissue), 피부 (skin), 활막액 (synovium fluid), 지방 (fat), 태반 (placenta), 치아 주위 조직 등 여러 조직에서 분리해 낼 수 있지만 골수 (bone marrow)에 가장 풍부하다.

중간엽 줄기세포는 배아 줄기세포에 비해 응용의 폭이 좁고 임상 적용에 있어 충분한 양을 확보하기 어려운 단점이 있지만, 윤리적인 문제를 피할 수 있을 뿐만 아니라, 자가 이식이 가능하여 면역학적인 문제가 적기 때문에 다양한 질병의 치료를 위해 사용 될 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다.³

그러나 이러한 중간엽 줄기세포의 배양은 세포 간의 서로 다른 특성들로 인해 어려움을 겪고 있다. 골수로부터 분리된 중간엽 줄기세포는 공여자에 따라 크기와 형태 및 분화능의 차이가 있을 뿐만 아니라, 한 공여자에서 분리한 여러 클론들 간에도 형태와 크기의 다양성을 나타낸다. 한편, 중간엽 줄기세포의 표식인자로는 SH-2, SH-3, CD-105, CD-29, CD-44 등이 양성 인자로 사용되고 있으나, 이들은 분화된 세포에서도 표현되는 등 아직까지 대표적인 표식인자가 밝혀지지 않은 상태이다.³

성인 골수 내에는 줄기세포 뿐만 아니라 특정세포로 이미 분화된 다양한 종류의 세포들이 함께 존재하고 있다. 이러한 양상은 시험관에서 세포의 크기 및 분화능의 다양성에 영향을 미치기 때문에 일부 연구자들은 크기에 따라 세포를 구분한 후, 세포크기와 분화능의 상관관계를 보고하기도 하였다.⁴ 따라서 미분화된 세포만을 분별할 수 있는 표지자 (marker)의 개발 연구가 필요하며, 개체간의 다양성 때문에 중간엽 줄기세포를 임상

적용하기 위해서는 ‘stemness’를 가지는 줄기세포를 분리해 내는 기술이 필요하다.

중간엽 줄기세포는 1970년대에 골수로부터의 분리 및 배양 조건이 언급된 후, 골화 분화에 연관된 성장인자 같은 화학적 인자나 생역학적 자극 등을 포함한 여러 조건들에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 세포 내에는 골의 발생과 형성에 관련된 많은 전사인자 (transcription factor)와 관련인자들이 존재한다.^{5, 6} 그 중 core-binding factor-1 (Cbfa1)은 골 표현형 (osteo-phenotype)을 유지하는 데 주요 역할을 하며, 이 유전자는 골아세포 특이적인 전사인자로 처음 알려지게 되었다. 또한 골조상세포 (osteoprogenitor cell)에서 주요 역할을 하는 기본적인 helix-loop-helix (HLH) 전사인자로 TWIST가 있다. 인간 골육종 세포인 SaOS2 세포에서 이 전사인자의 과발현은 더 높은 골조상세포 표현형을 보이며, 이 전사인자를 억제시키면 alkaline phosphatase (ALP) 활성과 제 1형 교원질 (Type I collagen) 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.⁷ 또 다른 전사인자로 homeobox 유전자인 Msx2는 골조상세포의 기능에 크게 영향을 미치는 것으로 알려졌다.³

Alkaline phosphatase는 체내의 여러 조직에 존재하고 다양한 종류의 세포에서 발현되는 당단백 (glycoprotein)으로 이루어진 세포외효소 (ectoenzyme)이다. ALP는 세포외 단백질을 세포막에 연결시켜 주는 역할을 하는 glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor에 의해 세포막의 바깥쪽에 부착되어 있기 때문에 세포를 구분하는 표지자로 이용되기도 한다.⁸ 인체에는 네 가지 서로 다른 유전자에서 만들어지는 네 가지

종류의 ALP 동위효소 (isoenzyme)가 존재한다.⁹ 이 중 세 가지는 조직 특이적으로 발현되는 양상을 보이기 때문에 각각 장 (intestinal), 태반 (placental), 생식세포 (germ cell) ALP라고 한다. 나머지 한 가지 ALP 동위효소는 여러 조직에 분포하여 조직 비특이적 ALP (tissue non-specific ALP, TNSALP)라고 하기도 하고, 그 중에서도 뼈와 간, 신장에 가장 풍부하기 때문에 ‘뼈/간/신장 ALP’라고도 한다. TNSALP의 뼈, 간, 신장 동위효소는 모두 1p36-p34라는 유전자 위치에서부터 전사되어 만들어지고¹⁰ 동일한 541-aminoacid polypeptide sequence와 공통된 단백질 backbone을 갖지만, 전사 후 추가되는 glycan의 종류와 범위의 차이가 있고,¹¹ 이에 따라 열에 대한 안정성 (heat stability)이나 전기영동 시의 이동성 (electrophoretic mobility) 등과 같은 생화학적 성질이 달라진다.

이렇게 다양한 종류의 ALP 동위효소가 존재하는데, 건강한 성인의 경우 전체 ALP의 약 95%는 뼈 (골수)와 간에서부터 만들어진다.¹² 본 연구에서 초점을 맞추고자 하는 ALP는 TNSALP의 하나인 뼈 ALP (Bone ALP)이다. 뼈 ALP도 시알산 (sialic acid) 함량에 따라 다시 네 가지 아형 (B/I, B1x, B1, B2)으로 구분하기도 하는데,¹³ 각각의 아형의 기능적인 차이나 중요성에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있다.

Alkaline phosphatase는 골세포 분화 유도 시 그 발현이 증가하기 때문에 골 형성 시스템에서 골아세포 분화의 초기 표지자로 알려져 있다. 또한 ALP는 배아 줄기세포에서처럼 stemness를 가지는 세포의 표지자로서의 기능도 하고 있다. 그러나 성인 중간엽 줄기세포에서

ALP의 발현 유무 및 그 기능에 대한 연구는 아직까지 많이 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구는 첫째, 성인 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 발현되는 ALP 활성을 분석한 후, ALP 활성과 골세포 및 지방세포로의 분화능의 상관관계를 밝히고, 둘째, 미분화 ALP 양성세포와 음성세포 간의 골분화 표지 유전자들의 발현양상을 관찰하고자 하였다. 즉, 성인 중간엽 줄기세포의 ALP 발현 및 그 역할을 파악함으로써 골 분화 예측 인자로써의 이용 가능성을 분석하였다.

II. 연구 방법

1. 성인 중간엽 줄기세포의 일차 배양

성인 중간엽 줄기세포는 건강한 성인 공여자의 장골 (iliac crest)에서 채취한 골수 조직으로부터 얻었다. 공여자의 평균 연령은 51.7세 (20 ~ 74세 남자 5명, 여자 15명)이었고, 채취 후 곧 바로 실험실로 옮겨 일차 배양을 실시하였다.

3,000 unit의 헤파린이 담긴 용기에 주사기를 사용하여 장골로부터 2 ~ 8 ml의 골수 조직을 채취하였다. 여기에 Dulbecco's modified eagle's medium-low glucose (DMEM-LG) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 지방층을 제거하였다. 세포를 다시 20, 50, 65, 80%의 percoll 용액과 섞어 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리 후 50%와 65%의 경계 위치에서 세포들을 수집하였다. 기본

배양액 (10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-LG)을 첨가하여 75 cm² culture flask에서 배양하였다.

2. 성인 중간엽 줄기세포의 **Colony forming unit-fibroblast (CFU-F)** 형성능 및 **ALP** 활성 분석

일차 배양된 중간엽 줄기세포 1,000 개를 10 cm² culture flask에 10일 동안 배양하여 colony를 형성시킨 후, 20% crystal violet으로 염색하여 colony 형성을 관찰하였다. 또한 cloning cylinder (Bellco Glass, Vineland, NJ, USA)를 이용하여 clone을 분리하고, 12 well plate에서 7일간 배양한 후 계대 배양하였다. 계대 배양 30일 후 각 clone의 유세포 분석을 시행하였다.

3. 성인 중간엽 줄기세포의 **ALP** 활성 및 염색

가. **Alkaline phosphatase (ALP)** 활성도 검사

계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포를 14일간 골아세포 분화 배양액에 배양시킨 뒤, 분화시킨 각 계대별 중간엽 줄기세포 (n=3)를 2X trypsin-EDTA로 떼어낸 후 300 μ l의 0.1% triton X-100에 부유시켰다. 이 세포 균질액을 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 상층액은 새 시험관에 옮겼다. 상층액은 ALP 혼합 용액과 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 1N NaOH로 반응을 중단시킨 후 분광 광도계를 사용하여 405 nm 파장에서 흡광도 (O.D)를 측정하였다. Standard로는 p-nitrophenyl phosphate solution (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, 세포와

동일한 방법을 이용하여 측정된 p-nitrophenol products의 흡광도 값을 이용해 유출액 내의 ALP 활성도를 계산하였다. 계산된 값은 DNA 량으로 나누어 정량화하였다.

나. Alkaline phosphatase (ALP) 염색

계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포를 24 well plate에 2×10^4 cells/ml 씩 분주 (n=3)한 후, 기본 배양액과 골아세포 분화 배양액에 14 일간 배양시킨 뒤 차가운 methanol : acetone (1:1) 용액으로 45초간 고정시켰다. 두 차례 증류수로 세척한 후 ALP 염색을 시행하였다.

Alkaline-Dye 용액 (Sigma)을 각 well에 첨가한 후 상온에서 빛을 차단한 채 30분간 반응시켰다. 반응시킨 세포를 2분간 증류수로 세척하였고, 핵 염색을 위해 Mayer's hematoxylin 용액에 10분간 반응시켰다. 마지막으로 1분간 증류수로 세척한 후 관찰하였다.

4. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 클론 (clone)의 골아세포 분화 유도

성인 중간엽 줄기 세포에서 분리된 각 clone 세포를 골아세포로 분화 유도하기 위하여 골아 세포 분화 배양액 [10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액, 100 nM dexamethasone (Sigma), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma), 50 μ g/ml ascorbic acid-2-phosphate (Gibco)를 첨가한 DMEM-LG]을 첨가하여 14일간 배양하였다. 배양 후 Von Kossa 염색을 수행하였다.

5. Von Kossa 염색을 통한 골아세포로의 분화 확인

골아세포로의 분화 정도를 확인하기 위한 특수 염색으로 Von Kossa 염색을 실행하였다. Von Kossa 염색은 골아세포로 분화시킨 중간엽 줄기세포를 methanol : acetone (1:1) 용액에 2분간 고정시킨 후, 증류수로 두 차례 세척하고, 3% silver nitrate 용액을 넣고 빛을 차단한 상태에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 두 차례 세척하고 빛에서 30분간 반응시킨 후 관찰하였다.

6. 칼슘 침착량 검사

계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포를 14일간 골아세포 분화 배양액에 배양시킨 뒤, 분화시킨 각 계대별 중간엽 줄기세포 (n=3)를 PBS로 두 차례 세척하였다. 0.5N acetic acid를 넣고, 실온에서 50 rpm으로 15시간 동안 rotatory shaker에서 혼합한 후, 희석된 추출액을 새 시험관에 분주하였다. 50 μ l의 추출액과 fresh reagent (5 ml OCPC solution (80 mg o-cresolphthalein complexone/75 ml D.W, 0.5 ml 1N KOH, 0.25 ml 1 N acetic acid), 5 ml 14.8 M ethanolamine/boric acid buffer(pH 11), 2 ml 8-hydroxyquinol) (Sigma) 300 μ l를 혼합한 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard로는 5 mg/ml CaCl₂를 사용하고, 세포와 동일한 방법을 사용하여 측정된 흡광도 값을 이용하여 추출액 내의 칼슘 양을 계산하였다. 계산된 값은 DNA 량으로 나누어 정량화하였다.

7. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 클론 (clone)의 지방세포 분화 유도

성인 중간엽 줄기 세포에서 분리된 각 clone 세포를 지방세포로 분화시키기 위하여, clone 세포들이 plate를 가득 메운 후 이틀 뒤에 지방세포 분화 배양액 [10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액 (Gibco), 0.5 mM isobutyl-tethylxanthin (Sigma), 1 μ M dexamethasone (Sigma), 5 μ g/ml insulin (Gibco), 200 μ M indomethasin (Sigma)을 첨가한 DMEM-LG]을 첨가하고 14일간 배양하였다. 3일 간격으로 분화 배양액을 교체하였다.

8. Oil red O 염색을 통한 지방세포로의 분화 확인

Oil red O 염색은 지방세포로 분화시킨 중간엽 줄기세포를 10% formalin-neutral buffer에 30분 동안 고정시킨 후 증류수로 세척하였다. 60% isopropanol로 5분간 방치한 후, 0.18%의 oil red O 염색 시약으로 5 ~ 30분 정도 염색시킨 후 관찰하였다.

9. 역전사-중합효소 연쇄반응

가. Total RNA 분리

골아 세포 분화 1, 4, 7, 10, 14일째 수집한 세포들로부터 RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)을 사용하여 cDNA 합성에 사용될 total RNA를 분리하였다. 그리고 분광 광도계를 이용하여 260 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 유출액 내의 total RNA를 정량한 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

나. cDNA 합성

분리한 각 세포의 total RNA 1 μg 을 Omniscript kit (QIAGEN)의 정해진 용액과 혼합하여 최종 부피를 20 μl 로 맞추는 다음 37°C에서 90분간, 95°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

다. 중합효소 연쇄반응

합성된 각각의 cDNA 2 μl 에 10 pM의 sense primer와 10 pM의 antisense primer를 첨가한 후 Taq polymerase kit (QIAGEN)의 정해진 용액과 혼합하였다. 최종 부피가 50 μl 가 되도록 한 후 중합효소 연쇄반응을 시행하였다 (표 2). 반응액 20 μl 를 취하여 1.5% (w/v) agarose gel 전기영동을 시행한 후, UV 상에서 각 band의 굵기를 확인하였다.

표 1. 역전사-중합효소 연쇄반응을 위한 primer 염기 서열 목록

Primer	Sequences	Length Size (bp)
Osteopontin	5'-CCA AGT AAG TCC AAC GAA A-3' 19 5'-GGT GAT GTC CTC TCT CCT CTG-3' 18	347
Dlx5	5'-GAA TGG TGA ATG GCA AAC CAA AG-3' 23 5'-GAA TTG ATT GAG CTG GCT GCA CT-3' 23	400
Msx2	5'-GCC AAG ACA TAT GAG CCC TAC CAC CT-3' 26 5'-GGA CAG GTG GTA CAT GCC ATA TCC CA-3' 26	400
Osterix	5'-CAT TGC TTT CCA TTC TTC AGA AC-3' 23 5'-ATT ACA AGA GAA ACC CTA TCA AC-3' 23	402
Cbfa1/ Runx2	5'-CCA CCT CTG ACT TCT GCC TC-3' 20 5'-GAC TGG CGG GGT GTA AGT AA-3' 20	172
GAPDH	5'-GAA GGTGAA GGT CGG AGT C-3' 19 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' 20	225

표 2. 각 primer의 중합 효소 연쇄 반응 조건

Gene	PCR Condition	Number of cycles
Osteopontin	94°C 5min 94°C 30sec → 55°C 30sec → 72°C 30sec 72°C 7min	30
Dlx5	94°C 5min 94°C 30sec → 58°C 30sec → 72°C 30sec 72°C 7min	33
Msx2	94°C 5min 94°C 30sec → 62°C 30sec → 72°C 30sec 72°C 7min	33
Osterix	94°C 5min 94°C 30sec → 55°C 30sec → 72°C 30sec 72°C 7min	33
Cbfa1/Runx 2	94°C 5min 94°C 30sec → 59°C 30sec → 72°C 30sec 72°C 7min	35
GAPDH	94°C 5min 94°C 30sec → 57°C 30sec → 72°C 30sec 72°C 7min	30

III. 결 과

1. 성인 중간엽 줄기세포의 CFU-F 분석

각 공여자의 골수에서 분리된 직후의 초기 passage의 세포를 이용하여 colony 형성능력을 분석한 결과, 개체 마다 다른 colony 형성능력을 나타내었고, 이는 나이나 성별과 연관이 없는 것으로 나타났다 (그림 1).

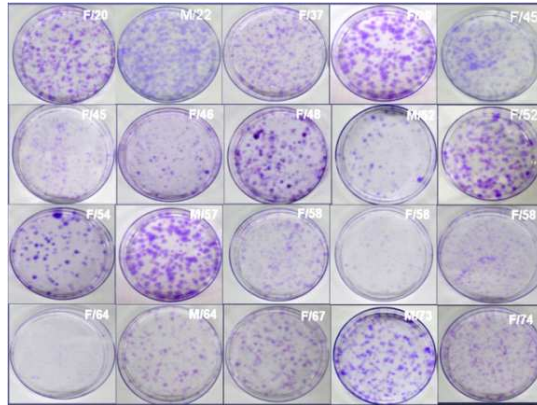


그림 1. 성인 골수유래 중간엽 줄기세포의 CFU-F 분석. 배양된 세포를 배양 10일째에 crystal violet 염색을 시행하였다. 공여자에 따라 서로 다른 colony 형성 능력을 보인다.

2. 성인 중간엽 줄기세포의 ALP 염색 및 활성 분석

형성된 colony에 ALP에 대한 염색을 시행하여 공여자에 따른 colony의 ALP 발현 정도를 관찰하였다. 그림 1.에서 관찰한 colony 형성 능력과는 별도로, 공여자에 따라 ALP 발현 정도가 다른 것을 관찰하였다 (그림 2). 또한 일차 배양 후 초기부터 골분화의 초기 표지인자인 ALP가 발현되고 있으며 개체 간의 변이가 존재한다는 것을 확인하였다.

한 공여자의 서로 다른 clone 간에도 ALP 활성정도의 차이가 있는지를 알아보기 위해 ALP 활성도를 정량분석한 결과, 한 공여자에서 유래된 clone 간에도 ALP에 대해 변이가 큰 것을 확인하였다 (그림 3).

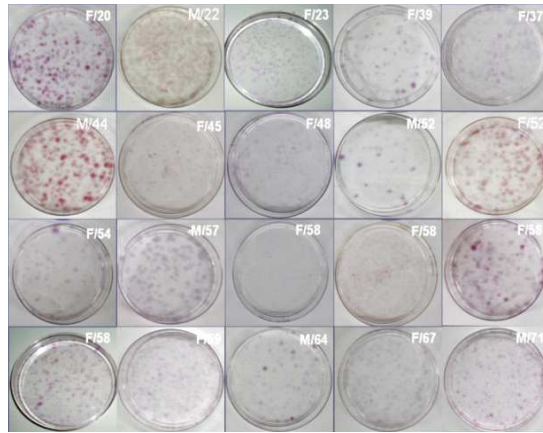


그림 2. 배양된 성인 골수유래 중간엽 줄기세포의 ALP 발현. 공여자에 따라 서로 다른 ALP 발현 정도를 보인다.

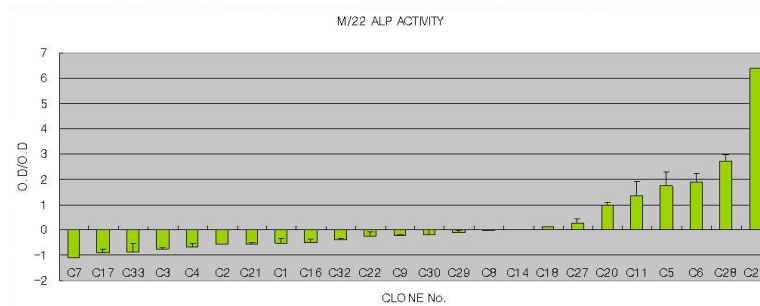


그림 3. 한 공여자로부터 유래된 여러 clone 간의 ALP 활성도 차이. 개체 간의 ALP 차이도 있지만 한 개체에서 나온 여러 clone 간에도 ALP 활성도 차이가 관찰되었다.

3. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 clone의 골아세포 및 지방세포로의 분화 유도

ALP가 강하게 염색되는 ALP 양성군과 그렇지 않은 ALP 음성군으로 나누어 골아세포로의 분화를 유도한 결과, ALP 음성군에 비하여 ALP 양성군에서 칼슘 침착을 염색하는 Von Kossa 염색에 훨씬 강하게 염색되어 상대적으로 골화 유도가 잘 이루어졌음을 확인하였다 (그림 4).

두 군을 각각 지방세포로의 분화를 유도한 후 시행한 Oil red O 염색 결과, ALP 양성군과 음성군이 모두 비슷한 정도로 염색되어 두 군 간에 지방세포로의 분화의 차이가 없는 것을 확인하였다 (그림 4).

ALP 양성군과 ALP 음성군의 중간엽 줄기세포에 대해 각각 골화 분화를 유도한 뒤 흡광도를 측정하여 칼슘 침착량을 정량분석한 결과, ALP 양성군에서 칼슘 침착량이 훨씬 높게 측정되었다. 이는 Von Kossa 염색을 통해 확인한 ALP 양성군이 골분화가 더 잘 유도된다는 것과 일치하는 결과이다 (그림 5).

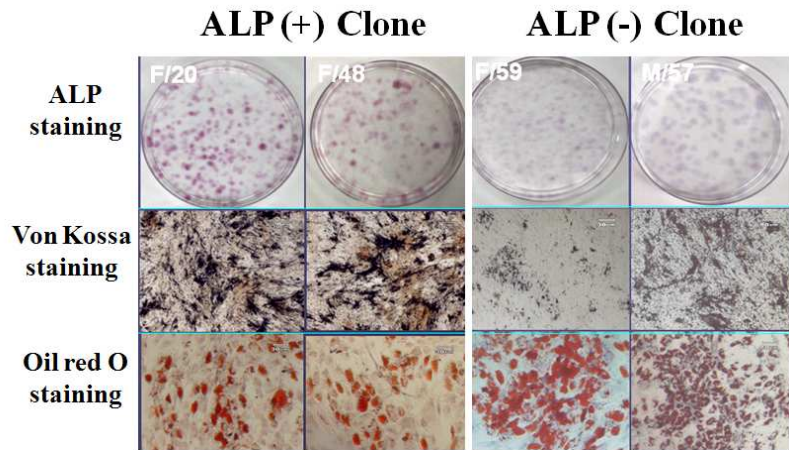


그림 4. 성인 중간엽 줄기세포로의 골아세포 및 지방세포로의 분화 유도. ALP 양성군 (F/20, F/48)에서는 Von Kossa 염색에 강하게 염색되나 ALP 음성군 (F/59, M/57)에서는 Von Kossa 염색에 약하게 염색된다. Oil red O 염색에서는 ALP 양성군과 음성군 간에 큰 차이를 보이지 않는다.

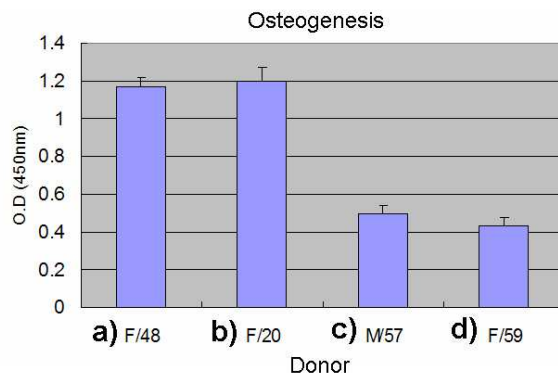


그림 5. 성인 중간엽 줄기세포의 골아세포 및 지방세포로의 분화 후 흡광도 측정. ALP 양성군 (a, b)에서는 calcium content가 높게 측정되었고 ALP 음성군 (c, d)에서는 낮게 측정되었다.

앞서 설명한 바와 같이 공여자 간에 ALP 발현의 차이가 있듯이 한 공여자의 여러 clone 간에도 ALP 활성도의 차이가 있다. 따라서 한 공여자의 여러 clone 중 ALP에 대해 양성인 clone과 음성인 clone으로 나누어서 골분화를 유도한 후 Von Kossa 염색과 calcium content를 정량적으로 측정해 보았고, 마찬가지로 ALP 양성인 clone들이 골분화가 더 잘 일어난다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 6).

4. 세포 크기와 ALP 발현 정도의 상관관계 분석

세포의 크기와 ALP 발현 정도에 상관 관계를 알아보기 위해 ALP 양성군과 음성군으로 나누고 FACS (Fluorescent-activated cell sorter)를 이용하여 세포 크기를 분석하였다. 또한, 세포를 크기에 따라 small (5~10um), medium (10~30um), large (30um 이상)로 나눈 다음 ALP 염색을 시행하였고, 각각 골아세포로의 분화와 지방세포로의 분화를 시행한 후 Von Kossa 염색과 Oil red-O 염색으로 분화 정도를 확인하였다. ALP 양성군의 경우 크기가 큰 세포의 비율 (66.1%)이 ALP 음성군의 경우 (48.3%)보다 컸다 (그림 7). ALP 염색 결과 크기가 큰 세포가 ALP에 대해 더 강하게 염색되었다. 또한 골아세포로의 분화 유도 후 시행한 Von Kossa 염색 결과 크기가 큰 세포가 더욱 짙게 염색되었다. 즉 ALP에 대해 양성되면서 크기가 큰 세포일수록 골분화가 잘 되는 것으로 나타났다. 반면 지방세포로의 분화는 세포의 크기와 상관이 없는 것으로 나타났다.

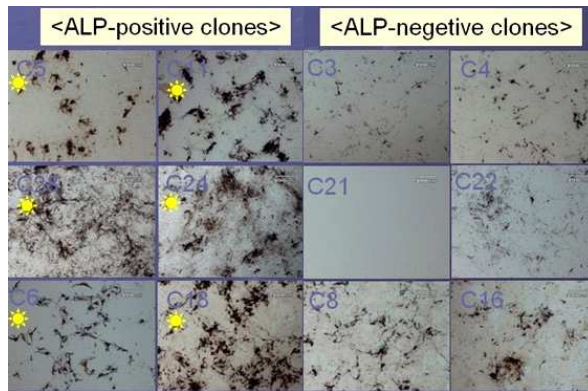


그림 6. 한 공여자로부터 유래된 ALP 양성군과 음성군의 골분화도 차이. Von Kossa 염색 결과 골분화가 되어 칼슘 침착으로 짙게 염색되는 부분이 ALP 양성군에서 더 많이 나타났다.

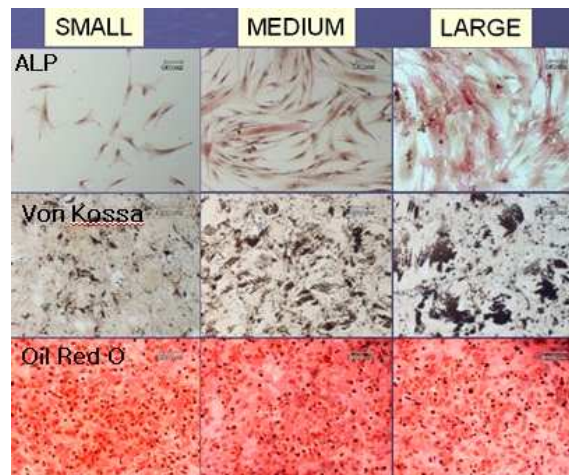


그림 7. 세포 크기에 따른 ALP 발현정도와 골분화 및 지방분화의 차이. 세포 크기가 클수록 ALP 발현이 더 많고, 골아세포로의 분화가 더 잘 되는 것을 확인할 수 있다. 세포 크기와 지방세포로의 분화는 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

5. ALP 발현과 골분화와 연관된 여러 유전자 발현 양상

성인 골수유래 중간엽 줄기세포를 ALP 활성 측정을 통해 ALP 양성인 군과 음성인 군으로 분리한 후, 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 미분화 중간엽 줄기세포와 분화초기 중간엽 줄기세포에서 나타나는 골분화와 연관된 유전자들 (Cbfa1, Dlx5, Msx2, Osx, ALP, Osteopontin)의 발현을 관찰하고 차이를 분석하였다 (그림 8).

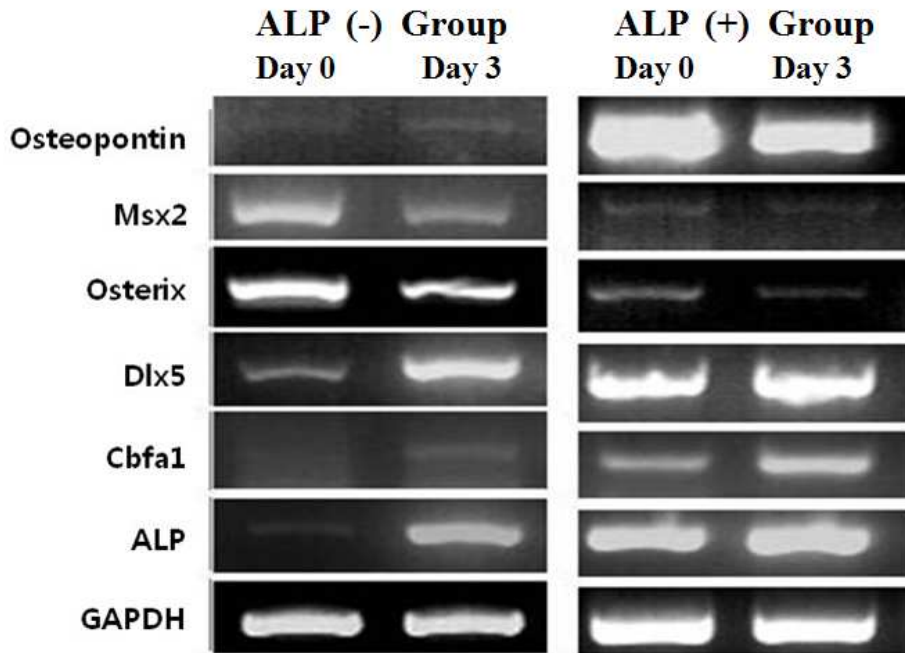


그림 8. ALP 양성군과 음성군의 골분화와 연관된 유전자 발현 양상의 차이. Msx2와 Osterix는 ALP 음성군의 미분화 상태 (Day 0)에서 많이 발현되었고, Dlx5와 Cbfa1은 ALP 양성군의 미분화 상태 (Day 0)와 분화초기(Day 3)에서 많이 발현되는 양상을 보였다.

골아 세포로의 분화에 중요한 전사인자로 알려져 있는 Cbfa1, Osterix, Dlx5, Msx2의 발현 양상은 미분화 단계 (Day 0)에서부터 두 군 간에 차이를 보였다. ALP 음성군의 경우 미분화 단계 (Day 0)에서 Cbfa1과 Dlx5는 적게 발현되었고, Osterix와 Msx2는 많이 발현되었다. 반대로 ALP 양성군의 경우는 Cbfa1과 Dlx5는 미분화 상태에서 많이 발현되었고, Msx2와 Osterix는 상대적으로 적게 발현되었다. 즉, Msx2와 Osterix는 ALP 음성군의 미분화 상태 (Day 0)에서 많이 발현되었고, Dlx5와 Cbfa1은 ALP 양성군의 미분화 상태 (Day 0)와 분화 초기 (Day 3)에서 많이 발현되는 양상을 보였다. 또한 분화 초기 표지자인 ALP와 후기 표지자인 Osteopontin은 ALP 양성군에서 미분화 상태와 분화 초기 상태 (Day 3)까지 높은 양으로 발현되고 있는 것을 확인하였다.

IV. 고 찰

성인 골수 유래 중간엽 줄기세포가 골, 연골, 지방, 근육 또는 기타 결체조직으로 분화할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다.^{14, 15} 줄기세포는 어느 조직으로나 다 잘 분화할 수 있다는 보고도 있었으나,^{16, 17} 최근에는 기관이나 장기 특이적인 줄기세포가 있다는 견해와 함께 이에 대한 표식인자나 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{3, 18} SH-2, SH-3, CD-105, CD-29, CD-44 등이 중간엽 줄기세포의 표식인자로 사용되고 있으나, 이들은 분화된 세포에서도 표현되는 등 아직까지 대표적인 표식인자가 없는 상태이다.^{3, 19, 20} 따라서 조직 공학이나 세포치료,

유전자치료에 이용되기 위해서는 stemness를 가지는 줄기세포를 특이적으로 분리해낼 수 있는 기술이 필요하다.

Alkaline phosphatase (ALP)는 nucleotide나 단백질 같은 다양한 분자로부터 가수분해를 통해 phosphate group을 제거시키는 효소로서, pH 10 정도의 알칼리성 환경에서 가장 효과적으로 반응한다. 인체에는 특히 간, 담관, 신장, 골, 태반 등의 조직에 많이 존재하여 이러한 조직이나 장기의 질환을 진단하는 데 하나의 표지자로서 이용되어 왔다.

Alkaline phosphatase가 처음 발견된 지 70년 이상이 지나고 있지만, 뼈와 골수 조직 내에서의 정확한 기능은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다. ALP는 골조상세포 (osteoprogenitor cell), 분화된 골모세포 (osteoblast), 연골세포 (chondrocyte), 치아 모세포 (odontoblast)의 표지자로 잘 알려져 있으며, 골의 무기질화 (mineralization)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 ALP에는 서로 다른 유전자에서 만들어지는 네 가지 종류의 ALP 동위효소 (isoenzyme)가 존재한다.⁹ 이 중 세 가지는 조직 특이적으로 발현되는 양상을 보이기 때문에 각각 장 (intestinal), 태반 (placental), 생식세포 (germ cell) ALP라고 하며, 나머지 한 가지 ALP 동위효소는 여러 조직에 분포하여 조직 비특이적 ALP (tissue non-specific ALP, TNSALP)라고 하기도 하고, 그 중에서도 뼈와 간, 신장에 가장 풍부하기 때문에 ‘뼈/간/신장 ALP’라고도 한다. 인체에서 이러한 TNSALP의 수치가 정상보다 낮으면 저인산효소증 (hypophosphatasia)이라는 유전성 질환과 연관이 있다. 저인산효소증은 형태에 따라서 치아에만

국한된 경우에서부터, 자주 골절을 일으키거나 무기질화가 안 되어 태어
때 사망하는 경우에 이르기까지 다양한 증상을 유발한다.²¹

조직 비특이적 ALP의 하나로 분류되는 뼈 ALP (Bone ALP)는 다시
4가지 아형 (B/I, B1x, B1, B2)으로 구분하기도 하는데,¹³ 각각의 아형의
기능적인 차이나 중요성에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고
있으며, 실험실에서 이들을 구분하기 위해서는 단백질 상태에서 미세한
차이를 구분해 내는 등전점 전기영동법 (isoelectric focusing
electrophoresis)이나 고성능액체 크로마토그래피법 (high-performance liquid
chromatography based methods)을 이용해야 하는데 실험 방법론적인
측면에 따라 결과가 다양하게 나오기도 하고 성공률도 고르지 못하다.²²

23

본 연구에서 이용한 ALP는 골수에서 채취한 세포에 발현된 것이기
때문에 대부분이 뼈 ALP이지만, 골수에는 미분화 줄기세포나 지방세포
등도 있으므로 다른 종류의 ALP도 일부 포함 되어있을 가능성을 배제할
수 없다. 또한 본 연구에서 사용한 ALP 염색법이나 전기영동법은
이러한 서로 다른 ALP 동위효소를 구분하지 못하기 때문에, 세부적인
ALP 동위효소의 구분 없이 전체 ALP에 대한 연구라는 제한점이 있다.

Alkaline phosphatase는 배아 줄기세포에서는 stemness를 갖는 세포의
특이적 표지자로 밝혀져 있다. 그러나 미분화된 성인 중간엽 줄기세포에서
ALP의 발현과 그 기능에 대한 연구 결과는 아직까지 거의 보고된 바
없다.

우선 본 연구는 두 가지의 의미 있는 결과를 얻었다. 첫째, ALP 양성인 군이 음성인 군에 비해 골아세포로의 분화가 더 잘 이루어지며, 지방세포로의 분화는 ALP 활성과 상관관계가 없음을 밝혔다. 또한 성인 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 ALP 활성도가 공여자마다 다르고, 한 공여자로부터 얻은 여러 clone 간에도 변이가 있음을 확인하였다. 이는 골수에서 얻은 줄기세포라고 해서 모두 다 같은 stemness를 지니는 것이 아님을 증명하면서, ALP 발현 정도가 골세포로의 분화와 깊은 연관이 있음을 보여주는 것이다. 그러므로 골분화를 효과적으로 시키기 위해서 골세포로의 분화능이 높은 줄기세포를 선별해 내는 데에 ALP가 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

둘째, 이러한 ALP 양성 세포는 음성 세포에 비해 골분화와 관련된 전사 유전자의 발현 차이를 나타내었다. Msx2와 Osterix는 ALP 음성군의 미분화 상태 (Day 0)에서 많이 발현되었고, Dlx5와 Cbfa1은 ALP 양성군의 미분화 상태 (Day 0)와 분화 초기 상태 (Day 3) 및 ALP 음성군의 초기 분화 상태에서 많이 발현되는 양상을 보였다.

Msx2는 골아세포의 분화와 연관된 전사인자 중 하나인데, 그 역할에 대해서는 논란이 있다. 저자에 따라 골아세포의 분화와 증식을 증진시킨다는 주장도 있고,^{24, 25} 반대로 저해시킨다는 보고도 있다.²⁶ 한편 Osterix는 Runx2, β -catenin과 함께 골아세포의 분화에 필수적인 전사인자로서, 골아세포 전구세포 (preosteoblast)가 미성숙 골아세포 (immature osteoblast)로 분화하도록 함으로써 연골세포로의 분화를 차단하는 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.²⁷ 본 연구에서 나타난 유전자 발현

양상은 Msx2의 경우처럼 Osterix도 골분화에 부정적인 인자로서의 역할 가능성을 보여주고 있다.

또한 이러한 유전자 발현의 차이가 이미 줄기세포의 미분화 단계에서부터 나타나기 시작한다는 것을 밝혀낸 것은 의미가 크다. 즉, ALP 양성인 세포들은 줄기세포이면서, 이미 미분화상태에서부터 골분화에 필요한 유전자를 더 많이 갖고 있는 등, 골아세포로의 분화에 더 효율적인 조건을 갖추고 있는 것으로 사료된다. 따라서 성인 골수유래 줄기세포를 채취한 후, ALP+/Msx-/Osterix-인 세포를 미리 찾아내면 더욱 효과적이고 선택적으로 골 분화를 유도할 수 있을 것이다. 이는 향후 임상적 응용에 있어 세포배양의 효과를 높이는 데 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

Alkaline phosphatase는 미분화 중간엽 줄기세포에 발현되는 표지자로서, 그 활성도는 골아세포로의 분화능을 예측할 수 있는 인자로 사용될 수 있다. 또한 ALP 양성인 세포에서 골분화와 연관된 유전자들이 더 많이 나타났다. 성인 골수유래 중간엽 줄기세포에서 ALP+/Msx-/Osterix-인 세포를 미리 선별해 내면 골아세포로의 분화를 보다 효율적으로 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226(6):507-20.
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 2;284(5411):143-7.
3. Triffitt JT. Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update. *J Biomed Mater Res* 2002;63(4):384-9.
4. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6(4):483-95.
5. Derfoul A, Carlberg AL, Tuan RS, Hall DJ. Differential regulation of osteogenic marker gene expression by Wnt-3a in embryonic mesenchymal multipotential progenitor cells. *Differentiation* 2004;72(5):209-23.
6. Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33(3):211-5.
7. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, van Niekerk C, Smit A, Ferris WF, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clin Chim Acta* 2005;354(1-2):101-9.
8. Lauc G, Heffer-Lauc M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006

;1760(4):584-602.

9. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 1988 25;263(24):12002-10.
10. Millan JL. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2006;2(2):335-41.
11. Nosjean O, Koyama I, Goseki M, Roux B, Komoda T. Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochem J* 1997 15;321 (Pt 2):297-303.
12. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999 ;14(11):1926-33.
13. Magnusson P, FarleyJR. Differences in sialic acid residues among bone alkaline phosphatase isoforms: a physical, biochemical, and immunological characterization. *Calcif Tissue Int* 2002;71(6):508-18.
14. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994 ;21(3):429-35.
15. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci (Suppl)* 1988;10:63-76.
16. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001;7(4):393-5.
17. Temple S. Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(7):513-20.
18. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent

stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 2007;25(11):2896-902.

19. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997;21(3):225-35.

20. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13(4):655-63.

21. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994;15(4):439-61.

22. Dzieziejko V, Safranow K, Slowik-Zylka D, Machoy-Mokrzynska A, Millo B, Machoy Z, et al. Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 2005 31;1752(1):26-33.

23. Griffiths J, Black J. Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum of healthy persons by isoelectric focusing. *Clin Chem* 1987;33(12):2171-7.

24. Ishii M, Merrill AE, Chan YS, Gitelman I, Rice DP, Sucov HM, et al. Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* 2003;130:6131-42.

25. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, et al.

Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004;279:34015-22.

26. Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, et al. Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: A possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 1999;205:260-74.

27. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.

Abstract

Correlation between Alkaline phosphatase activity and osteogenesis
in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Bom Soo Kim

Department of Medicine,
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Soo Bong Hahn)

Introduction

Alkaline phosphatase (ALP) is widely accepted as an early marker of osteogenesis in bone-forming system. However, the role of ALP in human mesenchymal stem cells (MSCs) are not clearly understood. Furthermore, although the importance of Cbfa1, Dlx5, Msx2, and Osterix in osteogenic differentiation in MSCs have been reported, little is known about the relationship between their level of expression in undifferentiated stem cells and the osteogenic differentiation. This study focused on characterizing the relationship between ALP activity and

differentiation ability of human bone marrow derived MSCs, as well as on the expression patterns of osteogenic-related genes in ALP-positive undifferentiated MSCs.

Methods

Human mesenchymal stem cells were isolated from bone marrow aspirates of healthy adult donors between the age of 20-74 years under the approval of Institutional Review Board (IRB). We measured levels of alkaline phosphatase activity and performed alkaline phosphatase staining in each donor population before osteogenic differentiation. MSCs were then incubated in an osteogenic medium for 14 days, and then analyzed by Von Kossa staining. MSCs were also incubated in an adipogenic medium for 14 days and analyzed by Oil red O staining.

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed to evaluate the expression of ALP, Osteopontin, Cbfa1, Dlx5, Msx2, Osterix in undifferentiated MSCs.

Results

In human bone marrow-derived MSCs, ALP activity was expressed at different levels among donor populations. ALP-positive group showed

better differentiation ability to osteoblast compared to ALP-negative group. According to the size of the cells, large cells showed relatively higher level of ALP activity.

RT-PCR analysis showed that Cbfa1 and Dlx5 were expressed at high levels in ALP-positive groups even in their undifferentiated status. ALP-negative groups expressed high level of Osterix and Msx2.

Discussion

ALP-positive cells showed high osteogenic differentiation potential. ALP-positive MSCs highly expressed osteogenic transcription factors (Cbfa1 and Dlx5) and osteoblastic markers (ALP and Osteopontin), but not Msx2 or Osterix compared to ALP-negative MSCs. This suggests that Msx2 or Osterix might play a role as a negative regulator in osteogenesis of human bone marrow-derived MSC. Therefore, ALP⁺/Msx2⁻/Osterix⁻ can be a useful marker in selecting MSCs with high osteogenic potential.

Key words : mesenchymal stem cell, alkaline phosphatase, osteogenic differentiation