

배양된 콜수 간엽 간세포에서
골형성 및 연골형성의 유도 및
그 표식 인자의 발현

연세대학교 대학원

의과학 사업단

석 경 수

배양된 골수 간엽 간세포에서
골형성 및 연골형성의 유도 및
그 표식 인자의 발현

지도교수 강 응 식

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학 사업단

석 경 수

석경수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성될 수 있도록 지도해 주시고 격려해 주신 강응식 교수님께 감사드리며 자문에 응하여 주신 안용호 교수님, 김성재 교수님, 강호정 교수님, 민유홍 교수님께 감사드립니다. 그리고 연구를 시작하고 진행할 수 있도록 도움을 주신 한수봉 교수님께 감사드립니다.

바쁜 시간속에서도 관심을 가지고 실험에 도움을 준 임상연구센터의 연구원 및 동물 실험실 직원들께도 감사드립니다.

지금까지 키워주시며 물심양면으로 지원을 아끼주시지 않은 부모님, 환자 진료와 연구를 병행하느라 가정애 소홀하였음에도 불평없이 격려와 성원을 아끼지 않은 아내와 두 자녀에게 감사드립니다.

끝으로 본 논문이 완성될 수 있도록 시작과 끝을 주관하여 주신 하나님께 감사드립니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표차례	iii
국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 골형성 유도 및 검증	8
가. 간엽 간세포의 분리 및 배양	8
나. 배양된 간엽 간세포에서 시험관내 골형성의 유도	9
다. 시험관내 골형성의 평가	9
라. 생체내 간엽 간세포의 이식	11
마. 생체내 골형성의 평가	11
2. 연골형성 유도 및 검증	12
가. 시험관내 연골형성의 유도	12
나. 시험관내 연골형성의 평가	13
다. 생체내 연골형성의 유도	15
III. 결 과	16
1. 골형성의 유도 및 검증	16
가. 간엽 간세포의 형태 변화	16

나. 시험관내 골형성	17
다. 생체내 골형성	19
2. 연골형성 유도 및 검증	22
가. aggrerate pellet culture 결과	22
나. alginate culture 결과	24
다. 생체내 연골형성	27
IV. 고 찰	29
V. 결 론	34
참고문헌	35
영문요약	43

그림 차례

그림 1.	16
그림 2.	17
그림 3.	18
그림 4.	19
그림 5.	20
그림 6.	21
그림 7.	21
그림 8.	22
그림 9.	23
그림 10.	23
그림 11.	24
그림 12.	25
그림 13.	25
그림 14.	26
그림 15.	27
그림 16.	28

국문요약

배양된 골수 간엽 간세포에서 골형성 및 연골형성의 유도 및 그 표식 인자의 발현

다양한 간엽 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 알려진 간엽 간세포를 이용하여 골 및 연골세포로의 분화를 유도하고 그 표식인자를 확인하여 향후 여러 성장 인자 및 그 수용체에 대한 연구를 위한 기초자료를 제시함으로써 골 이식술 및 인공관절 수술 등을 대치할 수 있는 세포 치료의 방법을 개발할 수 있는 기초자료를 마련하고자 본 연구를 시행하였다. 이를 위하여 사람의 골수에서 간엽 간세포를 분리 배양하여 시험관내 및 생체내에서 골형성 및 연골 형성을 유도하였으며 이를 조직학적, 면역조직학적, 분자생물학적 방법을 이용하여 확인하였다. 시험관내 골형성은 von-Kossa 염색, 알칼리 인산분해 효소 염색 및 활성도 측정, osteocalcin mRNA 분석을 시행하여 확인하였으며 생체내 골형성은 면역결핍 백서의 배부에 담체와 간엽 간세포를 이식하여 H-E 염색 및 toluidine blue-O 염색, tetracyclin labeling을 시행하여 확인하였다. 시험관내 연골형성은 3차원적 배양방법으로 aggregate pellet culture와 alginate culture의 방법을 이용하였으며 연골형성을 확인하기 위하여 toluidine blue 염색, safranin-O 염색, alcian blue 염색, aggrecan과 keratan sulfate에 대한 면역화학염색, 제 2형 콜라젠 및 섬유아세포 성장인자 제 3형 수용체에 대한 역전사중합효소 반응검사를 시행하여 성숙된 연골조직의 형성을 확인하였다. 본 연구 결과 사람의 골수에서 분리 배양한 간엽 간세포를 이용하여 시험관내 및 생체내 골형성 및 연골형성을 유도할 수 있었

으며 특히 사람의 간엽 간세포를 collagraft 및 polylactic-glycolic acid 담체에 이식하여 3차원적 배양을 하여 생체내에서 골 및 연골 형성을 유도한 것은 최초의 연구로 그 의의가 있다.

핵심되는 말: 간엽 간세포, 골수, 골형성, 연골형성, 표식인자

배양된 골수 간엽 간세포에서 골형성 및 연골형성의 유도 및 그 표식 인자의 발현

<지도교수 강응식>

연세대학교 대학원 의과학사업단

석경수

I. 서 론

1. 연구 배경

과거 골절치료의 발전은 기계적 안정성, 골 이식술, 수술 수기의 개선 등으로 이루어져 왔으며 퇴행성 관절염 등 연골의 결손에 대한 치료는 인공 관절 치환술로 치료하여 왔다. 그러나 현대에는 골절 및 연골 결손의 치유에 세포 분자 생물학 발전이 많은 도움을 주고 있다. 임상적으로 다발성 골 천공술 등 골수 자극을 이용한 연골 치유의 가능성이 제시되었으며 실험적으로 전기 자기장, 탈무기질화한 골기질, 골형성 단백질 및 자가 골수 세포를 이용하여 골절의 지연 유합이나 불유합을 치료할 수 있는 잠재력이 밝혀졌다.¹⁻¹⁵ 골절의 불유합, 골 결손, 일리자로프 하지 연장술후 합병될 수 있는 골형성의 부족, 골 분절 이동술 후 골편 접촉면의 불유합등 많은 분야에서 골 이식술이 필수적이며 그 중 자가 장골 이식술이 가장 좋은 결과를 보인다. 그러나 자가 장골 이식술은 마취 하에 정상적인 장골의 일부를 채취하여 이식부에 이식하는

것으로 그 양이 제한적이며 골 이식 공여부의 동통 등의 단점이 있다. 현재는 기존의 자가 골이식술과 위에서 기술된 골대체물의 단점을 극복하고자 조직공학 기법을 이용한 자가 세포 배양 이식술의 적극적인 연구가 진행되고 있다. 자가 세포 배양 이식은 환자로부터 채취한 세포의 실험실 배양 과정을 통하여 세포의 증식을 유도함으로써 이식에 필요한 충분한 수의 세포를 확보하고 이를 원래의 조직과 같은 구조가 되도록 삼차원 배양하여 생체에 이식하는 술식이다. 이는 실험실 배양 과정을 통해 충분한 수의 세포를 확보함으로써 결손 부위가 크더라도 무리 없이 사용할 수 있다는 장점과 함께 자가 세포이식이므로 면역 거부반응이 전혀 없다는 매우 유용한 장점을 가지고 있다. 최근에는 자가세포 중 다양한 세포로 분화-증식할 수 있는 줄기 혹은 간세포(stem cells)에 대한 관심이 특히 높아지고 있다. 이 중 수정란으로부터 출발하는 배아줄기세포(embryonic stem cells)는 모든 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 매우 유용한 연구 개발 모델이 될 수 있으나 이는 윤리적 문제를 피할 수 없어 임상이나 산업화에는 적용할 수 없는 한계가 있다. 한편 최근에는 사람에서 다양한 세포로 분화할 수 있는 줄기세포의 존재가 확인되었고 이를 이용한 연구 개발이 활발히 이루어지고 있다. 골수(bone marrow)는 지금까지 혈액세포를 공급하는 줄기세포를 공급하는 것으로 알려져 왔으나 다른 간엽 조직의 간세포도 존재하는 것으로 확인되었다. 이 줄기세포는 골, 연골, 근육, 지방세포 등으로 분화할 수 있는 다양한 능력을 가지고 있어 이를 골수 간엽 간세포(bone marrow mesenchymal stem cells)라 부르며 이를 임상에 적용하기 위한 다양한 시도가 현재 이루어지고 있다.^{2,3,11,12,16-22} 임상적인 관점에서 볼 때 간엽 간세포는 첫째, 장골능(iliac crest)에서 쉽게 추출 배양이

가능하고 둘째, 증식능력이 뛰어나 치료와 수복에 필요한 충분한 수의 세포를 실험실에서 배양할 수 있고 셋째, 다양한 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 다양한 임상적 요구에 적합할 뿐만 아니라 넷째, 배아줄기세포(embryonic stem cells)와 같은 윤리적 문제가 전혀 없다는 점에서 매우 유용한 연구 개발과제이다.

사람의 간엽 간세포를 환자에 적용하기 위해서는 세포의 적절한 분화 조절과 손상부위까지 세포를 운반할 수 있는 적절한 지지체(scaffold)를 이용하는 것이 필수적이다. 지지체는 생체적합성이 있어야 하며 세포가 잘 부착하여 증식할 수 있는 성질을 가지고 있어야하고 생체내에서 흡수 대체될 수 있어야 한다.

정상 관절연골은 초자연골(hyaline cartilage)이라 하는 특이 조직으로 구성되며 조직액(tissue fluid)과 교원질(collagen), 그리고 단백다당(proteoglycans), 비교원질성 단백질(noncollagenous proteins)과 같은 구조성 물질(structural macromolecules)로 구성된다. 연골 세포는 전체의 2-3%만을 차지하며, 나머지 세포의 기질(extracellular matrix)이 체중부하를 위한 탄력성 및 충격 방지에 중요한 역할을 한다. 한편, 관절연골의 재생(regeneration)은 연골 표층부터 심층까지의 공간적인 구성, 생화학적 구성 및 역학적 특성 면에서 생체 내 초자연골과 동일한 새로운 조직으로의 형성을 의미한다. 그러나 연골 자체가 갖는 재생능력의 한계로 말미암아 재형성된 조직은 대부분 위에서 언급한 성상을 갖지 않으며 따라서 정상 관절 연골의 기능적 특성을 회복할 수 없다.^{18,23} 즉, 연골 자체에 국한된 표층 손상일 경우 제한적인 세포 분화능력을 갖는 주변 연골 세포에 의해 치유가 이루어지나 근본

적으로 연골은 혈관, 신경 및 임파조직이 결여된 조직이므로 이들에 의한 치유는 미미하다. 또한 연골 하부의 골조직 (subchondral bone)까지 침범하는 전층 결손일 경우 골수나 혈관으로부터 기원하는 세포들에 의한 외적 치유 (extrinsic repair)가 제한적으로 일어나나 이 또한 초자연골 보다는 주로 섬유 연골 (fibrocartilage)로 대체되어 결국 퇴행성 관절염으로 진행된다. 과거 관절연골 손상을 위한 치료는 이와 같이 불완전한 자연치유 과정을 도모 혹은 촉진할 수 있는 시도에 초점이 맞추어 졌으며 순수히 세포 자체만을 이용한 치료 방법은 여러 기술적인 발전에도 불구하고 그 가능성만을 제시하였을 뿐 정상 연골과 동일한 조직으로의 재생 면에서 성공을 거두지 못하였다.^{18,24-26} 한편 퇴행성 관절염의 치료에 이용되는 인공관절 치환술은 그 수명이 제한적이며 이물질을 체내에 삽입함으로써 이물 반응이 일어날 수 있는 단점이 있다.

2. 연구 목적

최근 골수에서 분리된 미분화 간엽 간세포가 다양한 세포로 분화할 수 있는 잠재력이 밝혀졌다. 특히 골 및 연골로 분화할 수 있는 능력은 골 및 연골 결손의 치유에 있어 세포 이식 치료의 가능성을 제시할 수 있는 근거가 된다.^{2,3,11,12,16-22} 성공적인 골 및 연골의 치유를 위해서는 간엽 간세포로부터 골 및 연골로의 분화를 시험관내에서의 유도 뿐만 아니라 생체내에서도 유도하여야 하며 골 및 연골 조직으로의 분화 및 증식에 관계된 성장 인자 및 그 수용체에 대한 이해가 필수적이라 할 것이다. 본 연구에서는 사람의 골수에서 분리한 간엽 간세포를 이용하여 골 및 연골 형성을 시험관내 및 생체내에서 유도하여, 조직학적, 조직 면역학적, 분자 생물학적 방법으로 평가하고 각각

의 형성 지표의 시간적 발현 양상을 파악함으로써 향후 여러 성장 인자 및 그들의 역할을 연구할 수 있는 기초자료를 제시하고 세포 이식치료의 개발에 기초자료가 되고자 한다.

II 재료 및 방법

1. 골형성 유도 및 검증

가. 간엽 간세포의 분리 및 배양

골이식술을 위하여 입원중인 환자에서 자가 장골을 채취하기 전 17 게이 지 spinal needle을 이용하여 골수를 흡입, 채취한다. 채취한 골수를 포도당 1g/L가 들어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG, Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)에 부유 시킨다. 골수 세포의 부유물을 원심 분리기에 1500 rpm으로 10분간 두어 상층액을 버린후 Phosphate buffered saline (PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄-7H₂O, KH₂PO₄, pH 7.3) 으로 3회 세척한 후 10% 우태혈청 (fetal bovine serum), penicillin (100U/ml, Gibco BRL) 과 steptomycin (100µg/ml, Gibco BRL)이 포함된 DMEM-LG 배양액이 들어있는 75cm² 조직 배양 용기에 5x10⁷ 개의 세포수의 농도로 넣어 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 시작하였다. 4일 후 부유하는 세포는 배양액을 교환하며 버리고 이후 3일 간격으로 2주간 배양액을 교환하여 간엽 간세포의 분리 및 일차 배양을 시도하였다. 이후 역시 3일 간격으로 배양액을 교환하여 배양 용기 바닥이 가득차면 0.25% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 37℃에서 5분간 처리하여 세포를 분리하여 계대 배양하였다. 상기한 방법으로 충분한 양의 세포가 얻어지면 일부 세포는 -70℃에서 보관하였다.

나. 배양된 간엽 간세포에서 시험관내 골형성의 유도

간엽 간세포를 10% 우태혈청, penicillin 과 streptomycin이 포함된 DMEM-LG 배양액이 들어있는 6-well (10cm²) tissue culture plate에 3 x 10³ cells/cm² 의 농도로 24시간 배양한후 골형성을 유도할 간엽 간세포가 들어있는 조직 배양 용기에는 100nM dexamethasone (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), 10mM β -glycerophosphate(Sigma), 0.05mM L-ascorbic acid-2-phosphate(Gibco BRL)로 구성된 골형성 유도 용액을 추가하였고 대조군으로 골형성을 유도하지 않을 간엽 간세포가 들어있는 조직 배양 용기에는 골형성 유도 용액을 추가하지 않고 10% 우태혈청-DMEM만으로 배양하였다. 3일 간격으로 배양액을 교환하며 골형성 유도군에는 골형성 유도 용액도 추가하며 2주간 배양하였다.

다. 시험관내 골형성의 평가

(1) 알칼리 인산 분해 효소의 활성도의 정량적 측정

각 배지의 배양액을 버리고 PBS로 세척한 후 세포에 발색 반응을 나타낼 수 있는 알칼리 인산 분해 효소의 기질 (2.5mM p-nitrophenyl phosphate)이 포함된 알칼리 인산 분해 효소 기질 완충액 (50mM glycine, 1mM magnesium chloride, pH10.5) 1ml를 가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 15분 후 배지에서 완충액을 모아 완충액에 1N NaOH 1ml를 가하여 반응을 중단시켰다. 완충액을 ELISA plate reader (Bio-Rad, Melville, NY, USA)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 알칼리 인산 분해 효소 조직 화학 염색

Sigma kit #85를 이용하여 25℃에서 1시간 동안 시행하였다. 반응하는 동안 배지의 세포가 건조해지거나 빛에 노출되지 않도록 하였으며 세척시에는 비이온수 (deionized water)를 사용하였다.

(3) 무기질 침착의 염색 (von Kossa 염색)

세포를 10% formaldehyde로 1시간 고정된 후 암실에서 2% silver nitrate 용액 (Sigma)으로 10분간 반응시켰다. 비이온수로 세척하고 밝은 광선에 15분간 노출하였다.

(4) Osteocalcin mRNA 분석 (Northern blot hybridization)

1×10^6 개의 간엽 간세포를 100cm² petri dish에 분주한 후 상기한 시험관내 골형성 유도 방법에 따라 골 형성 유도군과 대조군으로 나누어 2주간 배양하였다. 실험군과 대조군에서 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagene, Hilden, Germany)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA를 spectrophotometer로 260nm에서 정량을 실시한 후 동량 (10μg)의 total RNA를 1% formaldehyde-agarose gel에서 전기 영동을 실시한 후 nylon membrane (Amersham, U.S.A.)으로 transfer하였다. Transfer된 nylon membrane은 [α -³²P]dCTP (Amersham, U.S.A.)로 labeling한 cDNA probe를 사용하여 hybridization을 시행하였다. hybridization된 membrane을 X-ray film에 24시간 동안 감광시킨 후

osteocalcin mRNA를 정량하여 실험군과 대조군간의 차이를 조사하였다. Osteocalcin의 mRNA 염기서열은 Genebank accession No. X04141의 염기서열을 기초로 하여 500bp 크기의 cDNA probe를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였으며 제작된 cDNA probe는 sequencing을 통하여 염기서열을 확인하였다. 제작된 cDNA는 redi-Prime labeling kit (Amersham, U.S.A.)를 이용하여 [α - 32 P]dCTP (Amersham, U.S.A.)로 labeling하여 hybridization에 사용하였다.

라. 생체내 간엽 간세포의 이식

실험 동물로는 생후 5주된 면역 결핍 수컷 백서 (species: rats, strain: Cr:NIH-RNU)를 사용하였다. Ketamine (40mg/kg, Ketara, 유한양행)을 복강내 주사하여 마취하였고 배부를 삭모하고 피부절개를 가하여 피하조직에 공간을 만들었다. 5 x 5 x 3 mm 크기의 Type I collagen이 함유된 다공성의 calcium phosphate ceramic인 collagraft strip (Zimmer Orthopaedic, Warsaw, IN, U.S.A.)을 간엽 간세포의 부유물에 24시간 두어 간엽 간세포를 collagraft strip에 부착시킨후 준비된 피하 조직의 공간에 이식하였다. 대조군으로는 간엽 간세포를 이식하지 않은 collagraft만을 이식하였다.

마. 생체내 골형성의 평가

Collagraft strip을 이식후 3, 6, 9, 12주에 실험 동물을 희생하여 채취하였다. 채취한 collagraft strip은 formalin용액에 고정한 후 1일간 탈석회화시키고 paraffin 속에 묻고 5 μ m 두께로 잘라 조직 슬라이드를 만들었다. 조직학적

검사 방법으로 Hematoxylin 과 Eosin (H-E) 염색과 toluidine blue-O 염색을 시행하여 염색된 표본을 광학 현미경으로 관찰하여 collagraft strip의 다공속으로 세포의 침투 및 골 및 연골의 형성 정도를 평가하였다. 새로이 형성되는 유골(newly-formed osteoid) 형성을 보기 위하여 tetracyclin으로 labeling을 시행한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

2. 연골형성 유도 및 검증

가. 시험관내 연골 형성의 유도

두가지 3차원적 배양을 시도하였으며, 이는 cell aggregate pellet culture와 alginate culture이었다. cell aggregate pellet culture를 위해 2.5×10^5 개의 세포를 함유한 세포 부유액을 15ml 폴리에틸렌 용기에 넣고 원심분리기에 넣어 세포를 가라앉힌 후 pellet 형성을 유도하였다. 두번째 삼차원적 배양인 alginate culture를 위해 2.4×10^6 개의 세포를 갖는 부유액 80 μ l를 1.2 % alginate에 배양시켰다. 형성된 cell aggregate는 102mM calcium chloride 용액을 사용하여 gel을 중합화(polymerization) 시킨 후 24-well Polycarbonate Transwell plates (Costar, 지름6.5mm, pore 크기 8.0 μ m)에 접종하여 유지하였다. 연골조직 유도를 위해 사용한 배양액으로 DMEM-HG (glucose농도, 4.5 g/L)에 insulin (6.25 μ g/ml), transferrin (6.25 μ g/ml), selenous acid (6.25 ng/ml), linoleic acid (5.35 μ g/ml), bovine serum albumin (1.25 mg/ml), transforming growth factor-beta (10ng/ml) 및 dexamethasone (100nM)등을 첨가한 혈청이 포함되지 않는 배양 용액을 이

용하였으며, 배양액은 2일 간격으로 교환하며 6주간 배양하였다.

나. 시험관내 연골형성의 평가

시간경과에 따라 aggregate pellets와 alginate beads를 채취하여 조직학적 검사, 면역조직화학검사, 및 분자생물학적 검사를 시행하였다.

(1) Aggregate pellet culture

세포외기질 형성을 보기 위한 조직학적검사로써 metachromasia를 보기 위한 toluidine blue염색을 시행하였으며 성숙된 연골에서 볼 수 있는 세포외기질인 keratan sulfate에 대한 면역조직화학적 검사를 시행하였다.

(2) Alginate culture

(가) Hematoxylin-Eosine 염색

시편을 10 % neutral buffered formalin에서 24시간 고정시킨 후 PBS로 1시간 세척하고 paraffin을 포매하였다. 5 μ m 두께로 자른 후 연골세포를 형태학적으로 관찰하기 위하여 Hematoxylin-Eosine염색을 시행하였다.

(나) Safranin-O 염색

연골 조직에 특징적인 황화 단백질 다당 (sulfated proteoglycan)을 보기 위한 safranin-O 염색을 시행하였다. 특히 safranin-O 염색은 하나의 분자가 chondroitin-sulfate 혹은 keratan sulfate와 결합하여 그 염색정도가 연골기질 내 fixed charge density와 직접적인 관련이 있는 성질이 있다.

(다) Keratan sulfate에 대한 면역조직화학 염색

성숙된 연골에서 볼 수 있는 keratan sulfate에 대한 면역 조직화학적 염색을 시행하였다. 생성된 keratan sulfate 의 관찰을 위해 절편을 deparaffinize 시키고 PBS로 세척한 후 약 30분간 5% bovine serum-albumin (BSA)을 이용하여 배양시켜 비 특이적 항체를 blocking 시킨다. 절편을 30분간 1 % pronase in 1% BSA & PBS로 전 처치 (predigestion)하고 다시 30분간 chondroitinase ABC (0.1/ml in 0.1 M Tris-acetate, Seikagaku, Japan)로 keratan sulfate antibody가 세포외 기질에 잘 도달할 수 있도록 한 후 monoclonal antibody (Oncogene™ Research Products)를 이용하고 VECSTATIN ABC (Vector Laboratories)방법을 이용하여 면역 조직학적 염색 [Ab-Keratan Sulfate/Human, (5-D-4)(mo)(M), Affin-Biotin]을 시행하였다.

(라) 제 2형 콜라젠과 섬유아세포 성장인자 제 3형 수용체 m-RNA에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응

분자생물학적검사로써 검체를 4M-guanidine isothiocyanate lysis buffer에 균질화한 후 cesium trifluoroacetate density gradient를 통한 초원심분리를 시행하여 RNA를 분리한 후 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)으로 연골특이성 제 2형 콜라젠과 fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR-3) 유전자 발현을 관찰하였다.

다. 생체내 연골형성의 유도

실험 동물로는 생후 4주된 면역 결핍 마우스 (species: mice, strain: BALD/c-nu/nu)를 사용하였다. Ketamine (40 mg/kg, Ketara, 유한양행)을 복강내 주사하고 등 (배부)에 피부 절개를 가하여 피하조직에 공간을 만든후 무균조작 하에 어떠한 골조직과도 연결되지 않게 주의하면서 시험관 내에서 1일간 배양된 골수 간세포-생체재료 복합체 (PLGA)를 이식하였다. 모든 세포-생체재료 복합체는 이식 4주, 8주 후에 적출하며 10% normal buffered formalin에서 고정하고 10% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)에서 탈회 후 paraffin 포매하였다. 모든 시편에 대해 5 μ m 두께로 자른 후 매번 5번째 절편에 대해 상기에서 기술한 대로 조직학 및 면역 조직학적 염색을 시행하였다.

III. 결 과

1. 골형성의 유도 및 검증

가. 간엽 간세포의 형태 변화

골형성을 유도한 실험군에서 섬유아세포 모양의 (fibroblastoid) 간엽 간세포는 분화하여 다각형 (polygonal)으로 변화하였고 결절을 형성하며 결절 주위로 세포들이 모이는 것을 관찰할 수 있었다. 골형성을 유도하지 않은 간엽 간세포는 섬유아세포 모양을 유지하고 있었으며 결절을 형성하지도 않았다.(그림 1)

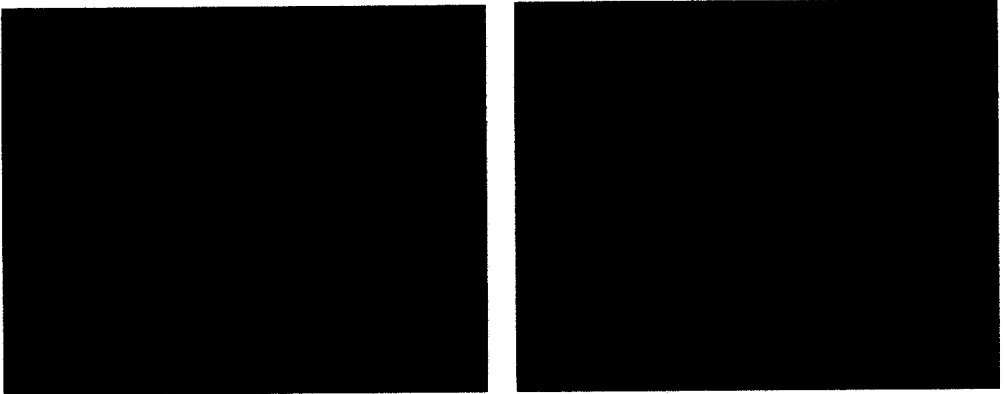


그림 1. 왼쪽 사진은 간엽 간세포에서 골형성 유도 4주 후의 모습으로 다각형의 세포형태를 보이며 세포들이 모여있다. 오른쪽 사진은 골형성을 유도하지 않은 간엽 간세포의 모습으로 세포들이 섬유아세포와 유사한 형태를 보이며 결절을 형성하지 않았다.

나. 시험관내 골형성

(1) 알칼리 인산 분해 효소의 활성도

골형성을 유도한 실험군의 알칼리 인산 분해 효소의 활성도는 평균 124.71 p-nitrophenol nmol/min/ 10^6 cells이었고 대조군의 활성도는 평균 72.34 p-nitrophenol nmol/min/ 10^6 cells이었다.

(2) 알칼리 인산 분해 효소 조직 화학 염색

골형성을 유도한 실험군에서는 보라색으로 짙게 염색되는 양성의 반응을 보였고 세포들이 결절을 형성하며 모여있는 소견을 보였으나 대조군에서는 음성의 반응을 보였다. (그림 2)

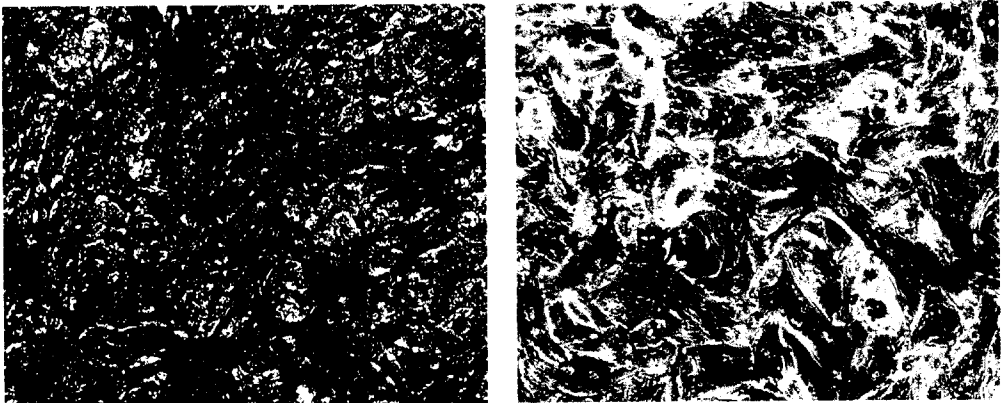


그림 2. 왼쪽은 골형성을 유도한 군의 알칼리 인산 분해 효소 염색 소견으로 진한 보라색으로 강하게 염색되는 소견을 보이고 있으나 골형성을 유도하지 않은 군(오른쪽)에서는 음성의 소견을 보였다.

(3) 무기질 침착

무기질 침착을 보기위한 von Kossa 염색상 골형성을 유도한 실험군에서는 검은 색으로 염색되는 무기질의 침착이 있었으며 그 주위로 세포들이 모여 있는 소견을 볼 수 있었으나 대조군에서는 검게 염색되는 무기질의 침착을 볼 수 없었다. (그림 3)

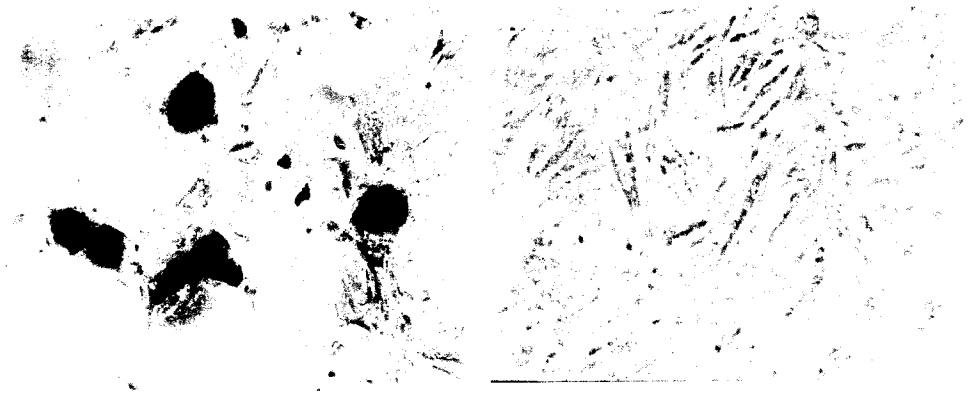


그림 3. 왼쪽은 골형성을 유도한 군의 von Kossa 염색 소견으로 검게 염색되는 무기질의 침착이 보인다. 골형성을 유도하지 않은 대조군 (오른쪽)에서는 음성의 소견을 보인다.

(4) Osteocalcin mRNA의 분석

Osteocalcin mRNA의 표현을 보기 위하여 Northern blot analysis를 시행하였는데 골형성을 유도한 실험군에서는 osteocalcin에 대한 mRNA의 발현이 대조군에 비하여 증가하였다. 실험군의 relative density ratio는 14.1, 대조군이 relative density ratio는 5.0으로 실험군에서 osteocalcin mRNA의 발현이 약 3배 많았다. (그림4)

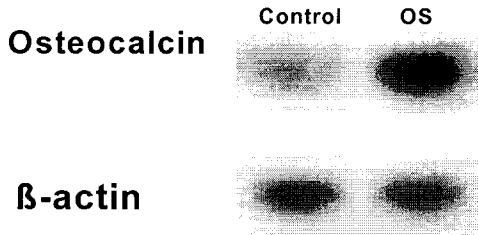


그림 4. Osteocalcin mRNA에 대한 Northern blot analysis 결과로 골형성을 유도한 군 (OS)에서 대조군 (Control)에 비하여 osteocalcin mRNA의 표현이 강하게 나타났다.

다. 생체내 골 형성

H-E 염색 소견상 이식 3주에 채취한 실험군의 표본에서 collagraft strip 내로 세포의 침투가 관찰되었으며 6주 이후의 표본에서는 세포가 collagraft strip의 다공을 모두 채우고 있었으며 미성숙 골로 생각되는 분홍색으로 염색되는 기질의 형성을 볼 수 있었다. 대조군에서는 다공내에 세포가 드물게 있었으며 골형성은 관찰할 수 없었다. (그림 5)

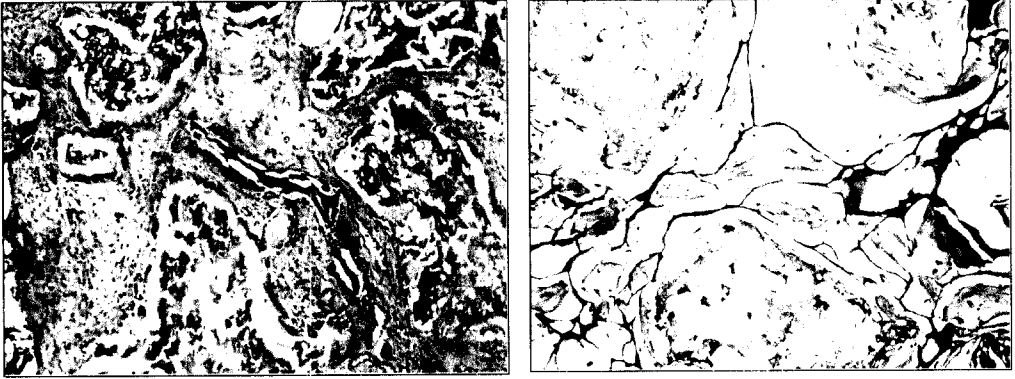


그림 5. 생체내에 이식 6주후에 채취한 collagraft strip의 H-E 염색소견으로 간엽 간세포를 함께 이식한 군에서는 (왼쪽) 다공내에 세포 및 기질 성분으로 가득 차있으나 collagraft만을 이식한 대조군에서 (오른쪽)는 다공내에 일부 섬유조직이 있으며 거의 비어있다.

Toluidine blue O 염색에서는 이식 3주에 채취한 실험군의 표본에서 약한 청색으로 염색되는 연골 성분을 확인할 수 있었으며 6주이후 표본에서는 강한 청색으로 염색되었다. 대조군에서(오른쪽)는 청색으로 염색되는 소견이 없었다.

(그림 6)

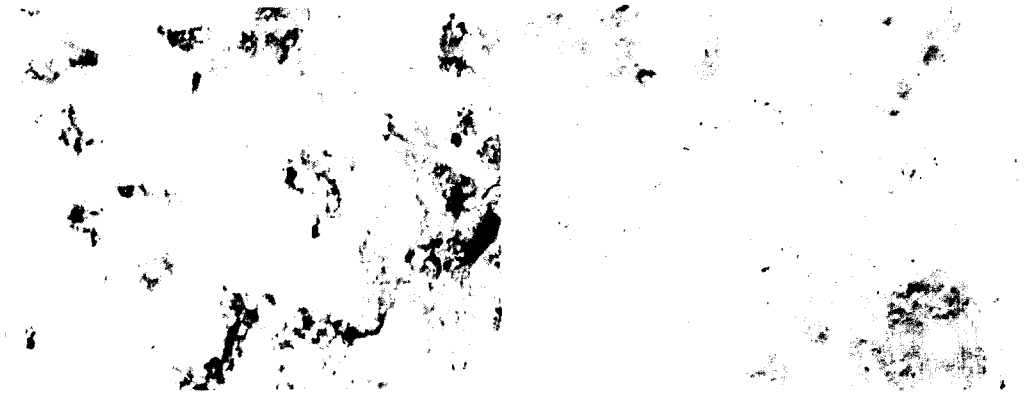


그림 6. 생체내에 이식 6주후에 채취한 collagraft strip의 toluidine blue 염색 소견으로 간엽 간세포를 함께 이식한 군 (왼쪽)에서는 다공사이에 푸르게 염색되는 양성의 소견을 보였으나 대조군 (오른쪽)은 음성의 소견을 보였다.

새로이 형성되는 유골형성을 보기 위하여 시행한 tetracyclin으로 labeling을 시행한 후 형광 현미경으로 검사한 관찰한 결과 실험군에서 노란 형광을 띄는 유골 (osteoid)를 관찰할 수 있었다. (그림 7)

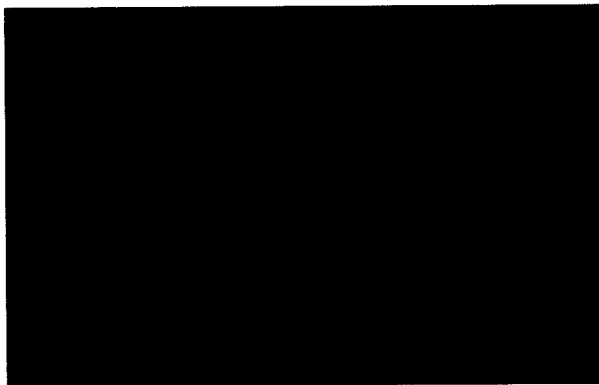


그림 7. Tetracyclin labeling을 시행하여 생체내에 이식 6주후에 채취한 collagraft strip의 형광현미경 소견으로 밝은 형광을 보이는 새로이 형성된 유골을 관찰할 수 있다.

2. 연골형성 유도 및 검증

가. aggregate pellet culture 결과

4주간 aggregate pellet culture를 시행하였으며 배양기간 동안 세포의 aggregate가 소실되지 않고 잘 유지되었다.(그림 8)

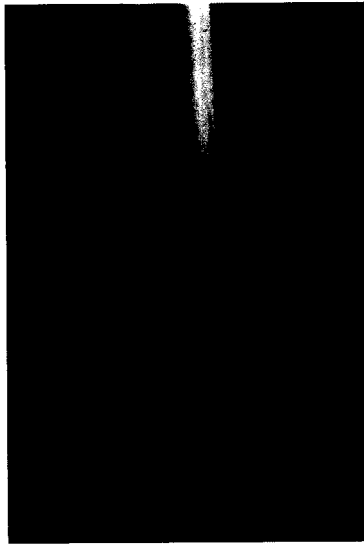


그림 8. Aggregate pellet culture시행 4주째의 모습으로 세포의 aggregate가 소실되지 않고 잘 유지되고있다.

H-E 염색 소견상 aggregate pellet에 세포가 균일하게 분포하고 있었다. 조직학적 검사로 시행한 toluidine blue 염색상 pellet 전반에 걸쳐서 균일하게 푸른 색으로 염색되어 연골 세포가 생성하는 특이한 세포외기질 즉 단백 다당 등이 생성되고 있음을 시사하였다. (그림 9)



그림 9. Aggregate pellet culture 4주에 시행한 toluidine blue 염색 소견으로 pellet 전체가 푸른색으로 염색되는 양성의 소견을 보인다.

또한 keratan sulfate에 대한 면역조직화학 검사상 성숙된 연골에서 발견되는 keratan sulfate가 풍부하게 염색되었다. (그림 10)



그림 10. Aggregate pellet culture 4주에 시행한 keratan sulfate 면역조직화학 염색소견으로 성숙된 연골에서 발견되는 keratan sulfate가 주로 변연부에서 강하게 염색되었다.

나. alginate culture 결과

(1) Hematoxylin-Eosine 염색

H-E 염색 소견상 alginate beads에 세포가 균일하게 분포하고 있었다. (그림 11)

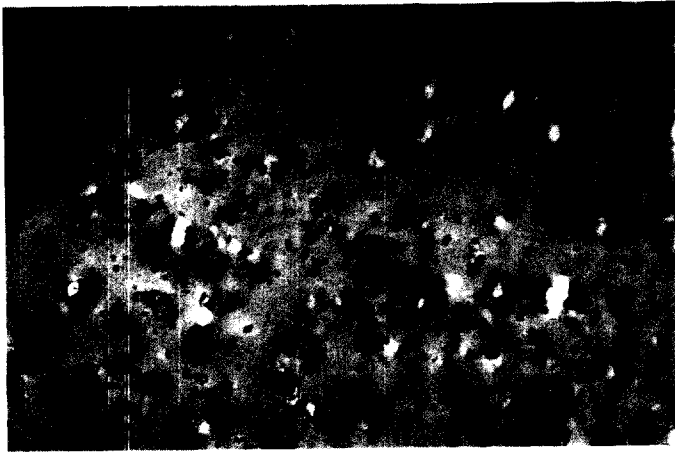


그림 11. Alginate culture 4주에 시행한 Hematoxylin-Eosine 염색 소견으로 세포 및 기질이 균질하게 분포하고 있다.

(2) Safranin O 염색

연골조직에 특징적인 황화 단백 다당의 염색을 위하여 시행한 safranin O 염색을 시행한 결과 전반적으로 붉은색으로 강하게 염색되는 소견을 보였다. (그림 12)

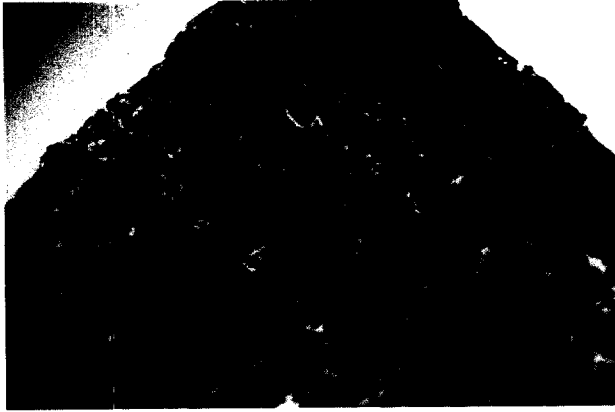


그림 12. Alginate culture 4주에 시행한 safranin O 염색 소견으로 연골조직에 특
징적인 단백 다당이 전반적으로 붉은색으로 보인다.

(3) Keratan sulfate에 대한 면역조직화학 염색

Keratan sulfate에 대한 면역조직화학 검사상 성숙된 연골에서 발견되는
keratan sulfate가 풍부하게 파란색으로 염색되었다. (그림 13)

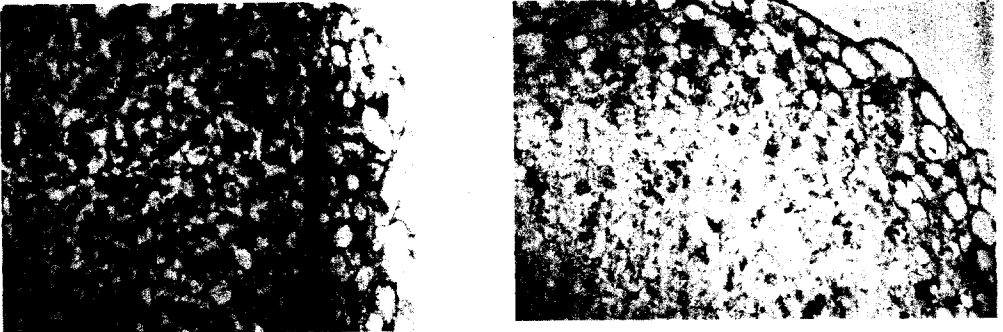


그림 13. Alginate culture 4주에 시행한 keratan sulfate에 대한 면역조직화학 염
색 소견으로 keratan sulfate에 대한 항체로 처리한 경우 파란색으로 염색되나
(왼쪽), 항체로 처리하지 않은 음성 대조군은 염색되지 않았다.

(4) 제 2형 콜라젠 및 섬유아세포 성장인자 제 3형 수용체에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응 검사

역전사 중합효소 연쇄반응 검사 분석 결과 연골에 특이한 제 2형 콜라젠은 배양 1주부터 발견되기 시작하였으며 배양 3주째부터는 더욱 강하게 발현되었다. 한편 제 2형 콜라젠의 발현은 섬유아세포 성장인자 제 3형 수용체 (FGF-R3)의 발현과 동반되었다. (그림 14)

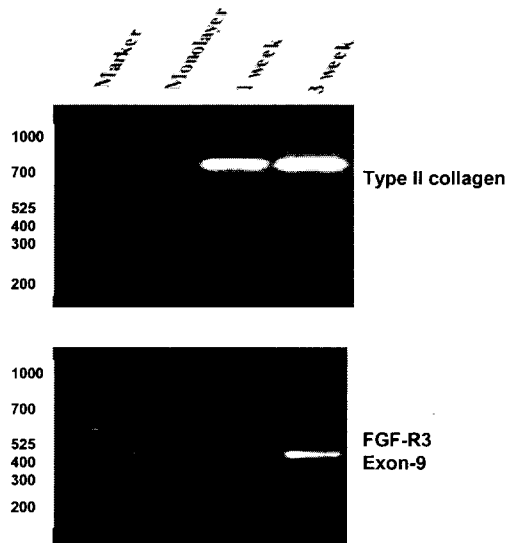


그림 14. 제 2형 콜라젠 mRNA에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응 소견으로 간엽간세포의 2차원적 배양에서는 표현이 되지 않으나 alginate culture 시행 1주에 표현이 되며 3주에는 더욱 강하게 표현된다. (위) 섬유아세포 성장인자 제 3형 수용체 (FGF-R3) mRNA에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응 소견으로 배양 1주에 표현이 되며 3주에는 더욱 강하게 표현된다.(아래)

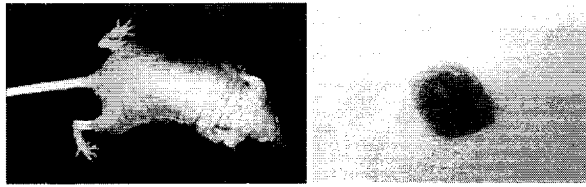


그림 15. 면역 결핍 마우스에 이식하였던 골수 간엽 간세포-생체 재료 복합체 (PLGA)를 4주에 적출하였다.

다. 생체내 연골형성

면역 결핍 마우스 (species: mice, strain: BALD/c-nu/nu)생체에 이식하였던 골수 간엽 간세포-생체 재료 복합체(PLGA)를 4주와 8주에 적출하여 (그림 15) 시행한 safranin O 염색 소견상 강한 붉은 색으로 염색되어 연골 특이성의 황화 단백 다당이 있음을 알 수 있었다. (그림 16)



그림 16. 번역 결핍 마우스에 이식후 4주에 채취하여 시행한 safranin O 염색 소견으로 연골에 특이적인 단백다당이 강하게 붉은색으로 염색되었다.

IV. 고 찰

골수는 조혈계, 내피계, 기질계의 세포로 구성된 복잡한 조직이다. 골수는 조혈 미세 환경을 구성할 수 있는 능력 외에도 기질계에서 유래한 세포들이 골형성 세포 (osteogenic cell), 연골형성 세포 (chondrogenic cell), 지방 세포 (adipocytic cell), 섬유아 세포 (fibroblastic cell), 망상 세포 (reticular cell)등을 형성할 수 있는 다양한 능력이 있는 간세포 (stem cell)를 함유하고 있는 것으로 생각된다.^{2,3,11,12,16-22} 골수 세포를 배지에 배양하면 대부분의 조혈세포는 부유 상태에 있게 되고 기질 세포는 배양 용기에 부착하게 된다. 본 연구에서는 이러한 골수 세포의 성질을 이용하여 조혈 세포와 간엽 간세포를 분리할 수 있었다. 즉 골수 세포를 배지에 넣고 3일간 배양한 후 배양액을 버리면 부유중인 조혈세포는 배양액과 함께 제거되고 배양 용기에 부착한 간엽 간세포만 남게 된다. 이와 같은 방법을 2주간 반복하여 골수 세포에서 간엽 간세포를 분리하였다. 분리한 간엽 간세포는 골형성 실험에서 osteocalcin mRNA에 대한 Northern blot analysis 및 연골형성 실험에서 제 2형 콜라겐 mRNA에 대한 역전사중합효소 연쇄반응 검사에서 골 및 연골 형성을 유도하지 않았을 때는 표현이 되지 않았으나 골 및 연골 형성을 유도한 후에는 표현이 강하게 나타나는 것으로 보아 간엽 간세포임을 알 수 있었다. 본 연구에서는 간엽 간세포를 상기한 방법으로 간접적으로 확인할 수 있었으나 최근 세포 표면 항원을 이용하여 간엽 간세포를 확인하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 조혈세포의 표면 항원으로는 CD45, CD14, CD34 등이 알려져 있으며 간엽 간세포의 표면 항원으로는 SH2, SH3, SH4등이 알려져 있으며 이는 조혈세포에

서는 표현되지 않는다.^{27, 28}

병아리,²⁹ 마우스,^{19,30} 백서,³¹ 가토,^{32,33} 돼지¹⁴의 간엽 간세포에서 골형성 세포로의 분화는 많은 저자들에 의하여 연구되었으며 이러한 분화를 위한 생 활성화 인자 (bioactive factor)로 osteogenin,¹³ 골형성 단백 (BMP-2),^{2-4,8,15,34,35} 골형성 성장 펩타이드 (osteogenic growth peptide),³³ 텍사메사존 (synthetic glucocorticoid dexamethasone)^{29,32,34,36} 등이 보고되었다. 최근에는 골형성 단백을 생산하는 유전자를 이용한 유전자 치료가 관심을 끌고 있다.^{37,38} 또한 간엽 간세포의 성장 및 분화를 촉진하는 인자로 TGF- β (transforming growth factor- β), PDGF-BB (platelet derived growth factor-BB), FGF (fibroblast growth factor) 등의 연구가 활발하다.^{19,36} 본 연구에서는 100nM dexamethasone, 10mM β -glycerophosphate, 0.05mM L-ascorbic acid-2-phosphate로 구성된 골형성 유도 용액을 사용하였다.

1996년 Cassiede등¹⁹은 간엽 간세포와 hydroxyapatite 60%, tricalcium phosphate 40%로 구성된 세라믹을 마우스에 이식하여 간엽 간세포에 의한 생체내 골형성을 보고한 바 있다. 이들은 이소 부위 (heterotopic site)인 마우스의 배부 피하조직에 이식하였으며 공통 유전형의 마우스 (syngeneic mouse)를 사용하였다. 본 연구에서는 간엽 간세포의 공여자로 사람을 사용하였으며 이식을 받는 백서는 공통 유전형이 아닌 면역 결핍 백서 (BALD/c-nu/nu)를 사용하였으며 담체로는 hydroxyapatite 60%, tricalcium 40%, 제 1형 콜리젠이 함유된 골과 유사한 세라믹을 사용하였다. 물론 동종의 동물의 간엽 간세포를 사용하여 공통 유전형(syngeneic)의 동물에 이식한다면 면역 반응이 없어 자가 간엽 간세포 이식 (autogenous mesenchymal stem cell

graft) 과 같은 결과를 보일 것이다. 그러나 본 연구에서 이종간인 사람의 간엽 간세포를 면역 결핍 백서에 이식한 이유는 향후 시행할 사람의 간엽 간세포 이식을 위한 기초적 연구이기 때문이었다. 즉, 사람의 간엽 간세포 이식을 인체에 바로 시행하는 것은 윤리적으로 허용될 수 없기에 결국 사람의 간엽 간세포를 동물에 이식하기 위하여는 면역 결핍 동물의 사용이 필수적이며 그 기초적 자료를 얻기 위하여 면역 결핍 백서를 사용하였다.

이제까지 많은 연구자들이 생체내 골형성을 유도하는 연구에서 불유합 모델을 만들어 사용하였다. 즉, 골 결손을 만든후 간엽 간세포를 이식하거나 골형성 단백을 이식하는 실험등을 시행하였다.^{4-6,8,11,13,22,35} 그러나 골 결손 모델에서의 골형성 유도는 새로이 형성된 골질이 이식한 간엽 간세포에서 만들어졌는지 골 결손 부위에서 유래한 간엽 간세포에 의하여 골질이 형성되었는지는 구별하기가 어려울 수 있다. 따라서 본 연구에서는 골 형성의 이소성 부위(heterotopic site)인 배부의 피하조직에 간엽 간세포를 이식함으로써 이식한 간엽 간세포에서 골형성이 이루어 졌음을 알 수 있었다.

1997년 Bruder등¹⁷은 골수에서 분리한 간엽 간세포가 냉동 보관(cryopresevation)후 30회 이상 계대 배양하여도 골 및 연골형성 능력이 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 영하 70도에 냉동 보관한 간엽 간세포를 계대 배양 및 골형성, 연골형성을 유도하였을 때 골 및 연골형성이 됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 간엽 간세포는 보관 및 계대 배양을 통한 증식이 용이하며, 보관 및 증식 후에도 골 및 연골형성 능력이 있으므로 자가골 이식, 연골 이식술 및 인공관절 치환술을 대체할 수 있는 간엽 간세포 이식술의 임상적 적용이 가능할 것으로 생각되었다.

최근 간엽 간세포가 적절한 환경의 시험관내 2차원적 배양에서 골형성을 유도할 수 있었지만 연골 세포의 배양은 2차원적 배양에서는 연골의 특이한 성질을 잃어 버리는 dedifferentiation 현상이 나타난다. 따라서 이를 극복하기 위하여 연골 형성 유도 실험에서는 3차원적 배양 방법인 원심분리를 이용한 aggregate pellet culture와 alginate culture를 이용하였다.

최근에는 세포 뿐 만 아니라 이들을 저장할 수 있는 담체 (scaffold or matrix)를 이용한 조직공학적 방법이 발전 되고있으며 이들 담체에는 polylactic acid, polyglycolic acid, polyester, 키토산등의 사용이 보고된 바 있다.^{24,39-41} 본 연구에서는 polylactic acid 60%와 polyglycolic acid 40%로 구성된 중합체인 polylactic-glycolic acid (PLGA)를 생체이식용 담체로 이용하였으며 아직 PLGA를 담체로 이용하여 사람의 간엽 간세포에서 생체내 연골형성을 유도한 연구는 보고된바 없다.

현재까지 다양한 생체재료에 연골세포를 이식하여 연골 재생을 유도한 결과, 교원질과 단백질 다당 등 세포외 기질의 형성을 도모할 수 있음이 밝혀졌으나 그 결과는 균일한 초자연골 만이 아닌 섬유 연골과의 동반이었으며⁴²⁻⁴⁹ 이와 같이 질적인 면에서 균일한 연골 재생이 이루어지지 못한 이유로서 사용된 세포의 종류 및 생체재료의 화학적 성분 등이 제시 되고있다. 본 연구에서는 부분적으로 균일한 연골세포 및 기질의 형성을 유도할 수 있었음을 확인할 수 있었다. Keratan sulfate에 대한 면역조직화학 염색상 푸른색으로 강하게 염색되었으며 이는 성숙된 연골에서 발견할 수 있는 keratan sulfate가 풍부하게 있음을 시사하는 것이다.

성공적인 연골 결손의 치유를 위하여 간엽 간세포에서 연골세포로의 분화

하는 과정에 관여하는 성장인자와 수용체와의 상호작용을 이해하는 것은 중요하다. 섬유아세포 성장인자와 그 수용체는 연골 성장판의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 연골 무형성증 환자는 제 3형 섬유아세포 성장인자 수용체 (FGF-R3) 유전자의 결손으로 왜소증이 유발되는 질환으로 이 질환에서 발견할 수 있듯이 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor, FGF)와 그 수용체는 연골의 형성에 중요한 강력한 조절인자이다. 본 연구 결과 FGF-R3는 사람의 골수에서 분리한 간엽 간세포의 배양에서 연골형성의 중요한 시기에 그 표현이 제 2형 콜라겐의 표현과 함께 증가됨을 알 수 있었다. 이는 FGF-R3 신호가 간엽 간세포가 연골 형성으로 분화하는데 조절하는 것으로 보인다. 향후 FGF-R3 수용체의 역할을 좀더 연구하여 그 기전을 완전히 이해한다면 연골 결손의 치유를 촉진할 수 있는 성장인자의 연구에 도움이 될 것이다.

V. 결 론

사람의 골수에서 분리 배양한 간엽 간세포에서 시험관내 및 생체내 골형성 및 연골형성을 유도하여 간엽 간세포를 이용한 골 및 연골 형성을 위한 세포 치료의 기초적 자료를 얻기 위하여 본 연구를 시행하였으며 골 및 연골 형성 유도 후 조직학적, 면역조직화학적, 분자생물학적 방법으로 골 형성 및 연골 형성을 확인할 수 있었다. 특히 골형성의 특징적인 지표인 osteocalcin mRNA의 발현을 확인하였으며 연골형성의 특징적인 제 2형 콜라겐 mRNA의 발현을 확인하였다. 또한 연골형성의 유도에서는 성숙된 연골에서 발견되는 keratan sulfate의 존재도 확인하였다. 특히 사람의 간엽 간세포를 collagraft 및 poly(lactic-glycolic acid) 담체에 이식하여 3차원적 배양을 하여 생체내에서 골 및 연골 형성을 유도한 것은 최초의 연구로 그 의의가 있다.

본 연구를 통하여 골결손 및 연골 결손, 퇴행성 관절염의 치료를 위한 간엽 간세포를 이용한 세포 치료의 방법을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Aaron RK, Cuombor DM. Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *J Orthop Res* 1996;14:582-9.
2. An J, Rosen V, Cox K, Beauchemin N, Sullivan AK. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces a hematopoietic microenvironment in the rat that supports the growth of stem cells. *Exp Hematol* 1996;24:768-76.
3. Balk ML, Bray J, Day C, Epperly M, Greenberger J, Evans CH, et al. Effect of rhBMP-2 on the osteogenic potential of bone marrow stromal cells from an osteogenesis imperfecta mouse. *Bone* 1997;21:7-15.
4. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg [Am]* 1995;77:734-50.
5. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix: a radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg [Am]* 1984;66:274-9.
6. Hunt TR, Schwappach JR, Anderson HC. Healing of a segmenta defect in the rat femur with use of an extract from a cultured human osteosarcoma cell-line(Saos-2). *J Bone Joint Surg [Am]* 1996;78:41-8.

7. Klokkevold PR, Vandermark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol* 1996;67:1170-5.
8. Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1149-56.
9. Murray SS, Grisanti MS, Bentley GV, Kahn AJ, Urist MR, Murray EJB. The calpain-calpastatin system and cellular proliferation and differentiation in rodent osteoblastic cells. *Exp Cell Res* 1997;233:297-309.
10. Nulend JK, Roelofsen J, Semeins CM, Bronckers AL, Burger EH. Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures. *J Cell Physiol* 1997;170:1744-81.
11. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic: experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60:334-9.
12. Otto TE, Nulend JK, Patka P, Burger EH, Haarman HJTM. Effect of (poly)-L-lactic acid on the proliferation and differentiation of primary bone cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 1996;32:513-8.
13. Stevenson S, Cunningham N, Toth J, Davy D, Reddi AH. The effect of osteogenin (a bone morphogenetic protein) on the formation of bone in orthotopic segmental defects in rats. *J Bone Joint Surg [Am]*

1994;76:1676-87.

14. Wolff D, Goldberg VM, Stevenson S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. *J Orthop Res* 1994;12:439-46.
15. Yasuko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by human bone morphogenetic protein (rh BMP-2). *J Bone Joint Surg [Am]* 1992;74:659-70.
16. Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, Gruber H, Mcdougall S, Hahn TJ. Age-related change in osteogenic stem cells in mice. *J Bone Miner Res* 1996;11:568-77.
17. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64:278-94.
18. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principle of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Rel Res* 1997;342:254-69.
19. Cassiede P, Dennis JE, Ma F, Caplan AI. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF- β 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*

1996;11:1264-73.

20. Erben RG, Scutt AM, Miao D, Kollenkirchen U, Haberey M. Short-term treatment of rats with high dose 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. *Endocrinology* 1997;138:4629-35.
21. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295-312.
22. Werntz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res* 1996;14:85-93.
23. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1331-42.
24. Temenoff JS, Mikos AG. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21:431-40.
25. Breinan HA, Minas T, Barone L. Histological evaluation of the course of healing of canine articular cartilage defects treated with cultured autologous chondrocytes. *Tissue Eng* 1998; 4:101-14.
26. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge C, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg* 1997; 79-A: 1439-51.
27. Pittinger MF, Mackay A, Beck SC. Multilineage potential of adult

- human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
28. Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13:69-80.
29. Kamalia N, McCulloch CAG, Tennenbaum HC, Limeback H. Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures. *Blood* 1992;79:320-26.
30. Schoeters GER, de Saint-Georges L, Van Den Heuvel R, Vanderborght O. Mineralization of adult mouse bone marrow in vitro. *Cell Tissue Knet* 1988;21:363-74.
31. Maniatopolous C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988;254:317-30.
32. Howlett CR, Cavo J, Williamson M, Framer J, Ali SY, Bab I, et al. Mineralization in in vitro cultures of rabbit bone marrow stromal cells. *Clin Orthop Rel Res* 1986;213:251-63.
33. Robinson D, Bab I, Nervo, Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 1995;10:690-6.
34. Richard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, LeBoy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994;161:218-28.

35. Takaki K, Urist MR. The role of bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop* 1982;171:224-31.
36. Thomson BM, Bennet J, Dean V, Triffit J, Meikle MC, Loveridge N. Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: Skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor beta, and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res* 1993;8:1173-83.
37. Fang J, Jhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McKauley LK, Davidson BL, Roessler BJ. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5753-8.
38. Kazhdan I, Rickard D, Leboy PS. HLH transcription factor activity in osteogenic cells. *J Cell Biochem* 1997;65:1-10.
39. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 1998; 240:58-65.
40. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem* 1993; 51:257-64.
41. Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B, Treppo S, Grodzinsky AJ, Langer R, et al. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J*

- Orthop Res 1999; 7:130-8.
42. Watt F. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes. *J Cell Sci* 1988; 89:373-8.
43. Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiei D. Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res* 1995; 29:1147-54.
44. Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, et al. Resorbable Polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996; 33:57-63.
45. Von Schroeder HP, Kwan M, Amick D, Coutts RD. The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:329-39.
46. Ma PX, Schloo B, Mooney D, Langer R. Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage. *J Biomed Mater Res* 1995; 29:1587-95.
47. Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994; 23:49-53.
48. Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, Farquar T, Lust G. Effect of

compressive loading and unloading on the synthesis of total protein proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants. *J Orthop Res* 1993; 11:717-29.

49. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac P, Langer R, Freed L. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog* 1998; 14:193-202.

Abstract

Induction of osteogenesis and chondrogenesis from cultured mesenchymal stem cells and their marker expression

Kyung Soo Suk

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Eung Shick Kang)

The purpose of this study was to induce osteogenesis and chondrogenesis from cultured mesenchymal stem cell isolated from human bone marrow and to detect the marker of osteogenesis and chondrogenesis to develop cell therapy method which may replace the bone graft procedure or artificial joint replacement procedure. Mesenchymal stem cell was isolated from human bone marrow and cultured. *In vitro* and *in vivo* induction of osteogenesis and chondrogenesis was performed. And histological, immunohistochemical and molecular biological study was performed to confirm osteogenesis and chondrogenesis. *In vitro* osteogenesis was confirmed by von-Kossa stain, alkaline phosphatase stain, alkaline phosphatase activity, and Northern blot analysis for osteocalcin mRNA. *In vivo* osteogenesis was evaluated by H-E stain, toluidine blue stain,

and tetracycline labeling. *In vitro* chondrogenesis was performed using 3-dimensional culture method including aggregate pellet culture and alginate culture. To confirm the chondrogenesis, toluidine blue stain, safranin O stain, alcian blue stain, immunohistochemical stain for keratan sulfate, and reverse transcriptase polymerase chain reaction for type 2 collagen and fibroblast growth factor receptor 3.

In vivo induction of chondrogenesis using PLGA scaffold and human mesenchymal stem cell has never been tried.

Based on the results, osteogenesis and chondrogenesis could be induced from cultured mesenchymal stem cell isolated from human bone marrow. Expression of markers for osteogenesis or chondrogenesis was confirmed by histologic, immunohistochemical, and molecular biologic method.

Key Words: Bone marrow, Chondrogenesis, Mesenchymal stem cell, Osteogenesis