

**BMP-7을 이용한 중간엽  
줄기세포로부터 연골의 생성 및  
MAP-kinase 경로를 통한  
신호전달의 규명**

연세대학교 대학원

의 학 과

노 태 석

**BMP-7을 이용한 중간엽  
줄기세포로부터 연골의 생성 및  
MAP-kinase 경로를 통한  
신호전달의 규명**

지도 박 병 윤 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

노 태 석

# 노태석의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

## 감사의 글

먼저 이 논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 많은 분들께 감사를 전하고 싶습니다. 논문 심사에 참가하셔서 여러 가지 조언을 해 주신 박병윤 교수님, 오상환 교수님, 나동균 교수님, 이진우 교수님, 문성환 교수님께서는 정말 많은 점에서 감사드립니다. 처음에 제 논문의 주요 내용이 되었던 BMP-7에 대한 아이디어를 제공해 주신 이진우 교수님은 실험을 계획하고 진행하는 동안에도 계속적으로 조언을 해 주셨고, 나동균, 오상환, 문성환 교수님께서 자상하게 여러 가지 논문의 잘못된 점을 지적해 주셨습니다. 그리고 어떠한 것을 하더라도 묵묵히 지켜봐 주시고 저를 지원해 주신 저의 지도교수님이신 박병윤 교수님을 만나게 된 것을 행운이라고 생각을 합니다. 또한 실험실에서 실질적으로 저를 도와주신 김윤희, 정호선 연구원님들께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

저에 대해 늘 걱정해주시고 물심양면으로 끝까지 지원을 아껴주시지 않은 부모님, 환자 진료와 연구를 병행하느라 가정애 소홀하였음에도 불평 없이 격려와 성원을 아끼지 않은 마음의 후원자 아내 기연, 두 딸 수연, 지연에게 이 논문을 바칩니다.

노태석 씀

## 차 례

그림 및 표 차례 .....	iii
국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 연구재료 .....	7
2. 연구방법 .....	8
가. 재조합 BMP-7의 합성 .....	8
나. 성인 중간엽 줄기 세포의 일차 배양 .....	8
다. 유세포 분석 .....	9
라. <i>In vitro</i> 중간엽 줄기세포의 연골 세포의 분화 유도 .....	9
마. 세포외 기질과 연골세포의 유전자(제2형교원질, 제1형교원질, aggrecan) 발현분석 .....	10
바. 신호전달물질(ERK, p38, JNK)의 발현 및 활성측정 .....	10

III. 결과 .....	12
1. 성인 중간엽 줄기세포의 일차배양 .....	12
2. BMP-7을 이용한 In vitro 중간엽 줄기세포의 연골 세포로의 분화능 .....	14
3. TGF family cytokine을 이용하여 성인 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화능 비교 분석 .....	15
4. BMP-7을 이용하여 연골세포로 분화 시 특정유전자 발현 양상 .....	16
5. 사람의 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화 시 BMP-7에 의한 신호전달 경로와 전사인자의 발현 양상 .....	17
가. 신호전달물질 ERK, p38, JNK의 발현 측정 .....	17
나. 특정 신호전달경로 억제제 처리 후 신호전달 물질의 활성 측정 .....	19
IV. 고찰 .....	23
V. 결론 .....	28
참고문헌 .....	29
영문요약 .....	34

## 그림 차례

- 그림 1. 일차 배양한 성인 중간엽 줄기세포의 배양 시작 1주일 경과후 광학현미경 사진(X100) ..... 13
- 그림 2. 성인 중간엽 줄기세포에 서로 다른 농도의 BMP-7을 처리한 연골세포로의 분화능 결과 ..... 14
- 그림 3. TGF family cytokine을 이용하여 성인 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화능 비교 분석 ..... 16
- 그림 4. 성인 중간엽 줄기세포의 BMP-7을 이용한 연골세포로의 분화능 결과 ..... 17
- 그림 5. BMP-7을 처리한 연골세포로의 분화 시 신호 전달 물질의 활성화 측정 ..... 18

그림 6. BMP-7을 처리한 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화 시 신호 전달 물질의 활성화 측정 ..... 19

그림 7. 서로 다른 농도의 U0126을 처리하여 ERK의 활성화 억제 농도 측정 ..... 20

그림 8. U0126을 처리하여 연골세포 분화과정동안의 ERK의 불활성화 측정 ..... 21

그림 9. 연골세포로의 분화과정동안 U0126 처리가 연골세포 표지유전자의 발현에 미치는 영향 ..... 22

## 표 차례

표 1. 각 표지유전자의 sequence ..... 10

## 국문 요약

### BMP-7을 이용한 중간엽 줄기세포로부터 연골의 생성 및 MAP-kinase 경로를 통한 신호전달의 규명

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 연골세포(chondrocytes), 골세포(osteocytes), 지방세포(adipocytes) 및 근육세포(myocytes)등으로 분화할 수 있는 세포로서, *in vitro*에서 특정 배양조건하에 연골(cartilage), 골(bone), 근육(muscle), 인대(tendon) 및 지방조직(fat tissue)등으로 분화를 유도할 수 있다. 본 연구에서는 골수에서 추출한 사람의 중간엽 줄기세포에 시험관내에서 재조합된 BMP-7을 처리하여 연골세포로의 분화를 유도하고, 이 과정 중 어떠한 신호전달 기전에 의하여 연골세포로의 분화가 유도되는 지를 알아보고자 하였으며 특히 MAP-kinase의 발현을 분석함으로써 그 조절 기전을 파악하고자 하였다. 성인 중간엽 줄기세포의 일차 배양 및 유세포 분석 후, RT-PCR을 이용하여 세포의 기질과 연골세포의 제2형 교원질, 제1형 교원질 및 aggrecan 유전자 발현을 분석하였고, 신호전달물질(ERK, p38, JNK)의 발현 및 활성을 western blot 면역 화학분석법으로 측정하였다. 유세포 분석 결과, 중간엽 줄기세포의 표지자로 알려진 CD105, CD44, CD29에서는 최소 57% 이상에서 염색이 되었고, 음성 표지자로 알려진 CD34, CD45, CD14에서는 평균 4.4%가 염색이 되어 골수에서 Percoll gradient method로 추출한 세포가 중간엽 줄기세포임을 확인하였다. 연골 세포의 표지 유전자인 제2형 교원질이 5일째부터 약하게 발현하기 시작하여 14일까지 발현양이 증가하였으며, aggrecan 역시 분화가 진행됨에 따라 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. ERK의 발현양상은 분화되지 않은 중간엽 줄기세포에서는 활성화되지 않다가 BMP-7을 처리한 후 초기에 활성화되었다가 다시 분화 10일째부터 재활성화 되었다. 연골세포 분화 과정동안 P38과 JNK는 ERK와는 달리 활성화 되지 않았으며, 연골 분화유도 과정동

안 BMP-7과 U0126을 동시에 처리하여 연골 분화과정동안 ERK의 활성화를 억제하였을 때 연골 세포의 표지 유전자인 제2형 교원질이 발현되지 않으며 연골세포로의 분화가 억제되는 것을 관찰하였다. 결론적으로 BMP-7이 인체 중간엽 줄기세포의 연골로의 분화과정에 있어 ERK pathway를 통하여 조절되며, 특히 제2형 교원질 발현에 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말: BMP-7, 중간엽 줄기세포, MAP-kinase, 연골세포, 분화

BMP-7을 이용한 중간엽 줄기세포로부터 연골의 생성 및  
MAP-kinase 경로를 통한 신호전달의 규명

<지도교수 박병윤>

연세대학교 대학원 의학과

노 태 석

## I. 서 론

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 연골세포(chondrocytes), 골세포(osteocytes), 지방세포(adipocytes) 및 근육세포(myocytes)등으로 분화할 수 있는 세포로서, *in vitro*에서 특정 배양조건하에 연골(cartilage), 골(bone), 근육(muscle), 인대(tendon) 및 지방조직(fat tissue)등으로 분화를 유도할 수 있다.<sup>1,2</sup> 이 다기능성 줄기세포는 성체에서도 발견되기 때문에 성체 줄기세포(adult stem cell)라고도 한다. 성체 줄기세포는 다기능 줄기세포로서 만능 줄기세포나 배아 줄기세포에 비해 윤리적 논쟁은 피할 수 있지만 추출이 어렵고 아직 많은 연구가 이루어지지 않은 상태이다. 줄기세포를 이용하여 질병을 치료하는 "세포치료(cell therapy)"는 세포의 기능이나 조직의 파괴에 기인하는 많은 질병에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 현재는 기증된 장기나 기관을 사용하여 이식하나 이식 가능한 장기가 한정되어 있고 면역거부 반응 때문에 실패할 확률도 높다. 그러나 이제는 특정 장기나 조직으로 분화될 수 있는 줄기세포를 이용하여 질병을 치유할 수 있는 가능성이 있으며, 현재 파킨슨, 알츠하이머, 척추손상, 뇌졸중, 심장병, 당뇨병, 관절염 등의 치료에 줄기세포를 이용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 최근 성인으로부터 줄기세포를 분리한 연구들이 보고 됨으로서 배아로부터 줄기세포를 얻지 않고도 질병을 치료하는 길이 열리고 있다.

Bone morphogenic protein(BMP)은 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )의 superfamily로서, 1988년 이후로 모두 15종류의 BMP가 발견되었으며, BMP의 기능은 동질 또는 이질의 두 개의 peptide chain이 7개의 disulphide bond로 dimer를 형성하고 있으며, 이러한 dimerization이 골 유도에 필수적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 발견은 골 결손이 있는 환자의 임상적 적용의 가능성이 제시되었고, 특히, 최근에는 자신의 중간엽 줄기세포를 이용한 치료가 새로운 시도로 떠오르고 있다. 따라서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 주목할 만 한 점은 BMP는 다기능 줄기세포가 분화 단계에서 어느 세포로 분화하는가에 대한 중요한 결정요인(determinant)으로 작용하는 것으로 보고되었다. 그러나 BMP 단백질 중 처음으로 클로닝 된 BMP-2에 대해서는 비교적 많은 연구가 진행되어 왔으나, 최근에 클로닝 된 BMP-7에 대해서는 아직 많은 연구가 되어 있지 않은 상태이다.<sup>3-5</sup>

최근에 BMP-2와 BMP-9에 의해 사람의 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화를 유도하였고, 연골세포의 특이적 유전자 발현은 전사인자인 Sox-9의 발현과 일치하여 나타났음을 보고하였다. 이러한 보고는 BMP 단백질이 연골을 형성할 수 있다는 가능성과 함께 전사인자로서의 중요성을 부각시켰다.<sup>6</sup>

그러나, 가장 최근에 발표된 연구에 의하면, 여러 종류의 BMP중에서도 BMP-2, 4, 5, 6, 7의 연골형성에 있어서의 차이를 살펴본 결과, BMP-7을 처리한 세포에서 연골세포의 대표적인 표지자인 제2형 교원질의 발현이 가장 크게 증가되었으며, 반대로 섬유아세포 표현형인 제1형 교원질의 발현은 최소화되었다고 하였다.<sup>7,8</sup> 또한, 연골로의 섬유아세포의 유입을 억제함으로써 이식 후 문제가 될 수 있는 섬유성 연골의 형성과 이식물의 파괴를 방지할 수 있음을 보고하였다.

줄기세포는 평생 동안 분화세포를 만들며 인체의 성장을 주도하지만, 지금까지 줄기세포가 어떤 경로를 통해 각각의 세포로 분화하는지 그 기전에 대해서는 거의 밝혀지지 않았다. 만일 줄기세포의 분

화 경로가 밝혀지면 새로운 신체 조직이나 기관을 만들어 질병을 정복할 수 있을 것이며, 줄기세포의 발생과정을 파악하기 위해서는 인접한 세포들 간 및 세포내의 신호전달(signal transduction)을 이해해야 한다.

BMP에 의한 신호경로는 BMP 수용체의 활성화에 의해 Erk, JNK, p38 protein kinase를 활성화시킨다고 발표되었다. 이러한 kinase는 세포 분화에 관여하는 신호전달 경로 중 mitogen-activated protein (MAP) kinase로 알려져 있다. 또한, BMP의 세포내 신호전달은 직접적으로 Smad 단백질의 활성화를 통해 핵내로 전달된 후, 목적 유전자의 전사를 조절하게 되며, Smad 단백질을 통한 신호전달은 BMP의 가장 대표적인 신호전달경로라 할 수 있다. 그 외에도 BMP는 Wnt/Ca<sup>2+</sup>, JAK-STAT 신호전달경로와 연관이 있는 것으로 보고되었다. 그 중에서 1997년 연구에 의하면, 시험관 배양 시 ERK가 활성화된 세포에서 Smad 1의 활성화는 오히려 감소되었고, 이는 Smad 1의 핵내로의 유입을 억제하였다고 한다.<sup>9</sup> 아직 그 정확한 기전은 알려지지 않았으나, BMP-Smad 신호경로와 ERK-MAPK 신호경로는 서로 독립된 경로가 아니라, 외부의 BMP 자극에 의해 서로 연관이 있음을 의미하고 있다. 최근에 사람의 중간엽 줄기세포에서 각각 특성의 조건하에서 배양하여 골아세포와 지방세포로 분화시켰을 때, 분화는 MAP-kinase에 의해 조절 받으며 특히, Erk-kinase에 의한 신호전달 경로가 골아세포의 분화와 큰 연관성을 보였다. 또한, MAP-kinase의 활성화가 지방세포로 분화하는 과정에서 세포 증식과 분화를 결정하는 중요한 요소로 작용함을 보고하였다.<sup>10</sup>

세포내 수많은 신호전달물질은 독립된 또는 공유하는 전달 경로를 통해 특이적인 전사인자를 자극할 것이며, 중간엽 줄기세포가 연골세포로 분화하는 과정에서도 여러 신호전달 경로를 경유하여 연골세포만의 특이적 유전자 발현 및 조절이 이루어질 것으로 예상된다. 지금까지 연골세포의 분화에 관여하는 전사인자로는 Sox 단백질이 알려지고 있다.<sup>11</sup> Sox는 배아 발달 과정중 연골의 형성과 매우 밀접한 발

현을 보이는 전사인자로서, Sox-5, Sox-6, Sox-9의 역할이 중요한 것으로 보고되었다.<sup>12</sup> 연골세포의 분화에 미치는 Sox 단백질에 대한 연구는 현재 2-3편에 불과하며, 1999년에는 Sox-9의 돌연변이는 중간엽 줄기세포로부터 연골세포의 분화와 연골세포의 유전자 발현을 억제하였다 한다.<sup>13</sup> 또한 in vivo에서 뿐만 아니라, 세포 배양 중에 연골세포의 대표적인 유전자인 제2형 교원질의 발현을 유도하는데 Sox 단백질이 필수적인 것으로 나타났다.<sup>14,15</sup> 특히 Sox-9 유전자중 하나의 대립유전자에 돌연변이가 발생하면, campomelic dysplasia나 skeletal malformation syndrome과 같은 질병이 유도됨으로서 전사인자의 역할이 규명되기 시작하였다.<sup>16,17</sup> Sox-9은 BMP-2에 의해 조절받는 전사인자로 밝혀졌으나, BMP-2외에 BMP-4와 BMP-9에 의해서도 조절받는 것으로 밝혀졌다.<sup>18,19</sup> 따라서, 본 연구에서 사용한 BMP-7에 의해 중간엽 줄기세포는 연골세포로 분화 할 것이며, Sox 단백질에 의해 연골세포의 유전자 발현이 조절 될 것으로 예상할 수 있었다. BMP-7에 의한 연골세포로의 분화 시 어떠한 신호전달경로에 의해 조절 받는지 그리고 최종적으로 분화된 연골세포의 유전자 발현이 어떠한 전사인자에 의해 조절 받는지에 대해서 아직 밝혀진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 골수에서 추출한 사람의 중간엽 줄기세포에서 시험관내에서 재조합된 BMP-7을 이용하여 연골세포로의 분화를 유도하며, 이 과정 중 어떠한 신호전달 기전에 의하여 연골세포로의 분화가 유도되는 지를 알아보려고 하였으며 특히 MAP Kinase의 발현을 분석함으로써 그 조절 기전을 파악하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구재료

중간엽 줄기 세포는 자가 장골 이식술을 요하는 성인 공여자의 장골로부터 추출한 골수 조직으로부터 얻었다. 골수액을 채취한 환자의 연령은 평균 42세(21-65세)이며, 곧바로 실험실로 옮겨 일차 배양을 실시하였다.

Dulbeccos modified eagles medium-low glucose(DMEM-LG), Dulbeccos modified eagles medium-high glucose(DMEM-HG), 우태 혈청(Fetal bovine serum), Antibiotic -antimycotic, trypsin-EDTA, insulin, phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco BRL (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)사의 시약을 사용하였고, ascorbic acid, western blot analysis 관련 시약 등은 SIGMA (SIGMA, St. Louis, MO, USA)사의 시약을 사용하였다. MEK inhibitor인 U0126은 promega사의 시약을 사용하였다. 역전사-중합효소 연쇄반응에 사용되는 RNAeasy kit, Omniscript kit, Taq DNA polymerase는 QIAGEN(QIAGEN, Valencia, CA, USA)사의 시약을 사용하였으며, Percoll 용액과 ECL western blotting detection kit은 Amersham Pharmacia(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)사의 것을 사용하였다. ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38등의 항체들은 Santa cruz (Santa cruz, Santa cruz, CA, USA)사의 것을 사용하였다. 유세포 분석에 사용된 CD105, CD44, CD29, CD34, CD45, CD14, anti-mouse monoclonal 항체들은 Ancell (Ancell corporation, Bayport, MN, USA)사의 것을 사용하였다.

## 2. 연구방법

### 가. 재조합 BMP-7의 합성

인간의 조골세포인 OS-2 세포주로부터 RT-PCR법을 이용하여 BMP-7 cDNA를 제조하고 제조된 cDNA를 pBluescript SK-vector에 클로닝 하였다. 제조된 발현용 재조합 BMP-7 clone을 CHO 세포주에 transfection 시킨 후, 배양하였다. 48시간정도 배양한 후에 G-418을 처리하여 세포를 selection하였다. 분리된 세포는 suspension 배양용 serum free media를 이용하여 배양한 후 SHODEX OHpak SB-803 column chromatography를 이용하여 분리 정제하였다. 발현된 BMP-7의 정성적 확인을 위하여 BMP-7 epitope 부분 (STGSKQRSQNRSKTC)을 이용하여 토끼에 면역시킨 후 whole serum 형태로 polyclonal 항체를 제조하였다. 제조된 polyclonal 항체를 이용하여 western blotting을 수행하여 BMP-7의 발현을 정성적으로 확인하였다. 제조된 BMP-7의 생물학적 활성을 확인하기 위하여 세포증식, alkaline phosphatase activity assay, cyclic AMP accumulation assay, PTH receptor binding assay등을 수행하였다.

### 나. 성인 중간엽 줄기세포의 일차 배양

3000 unit의 heparin이 담긴 주사기를 이용하여 건강한 성인 공여자의 장골로부터 2-8ml의 골수액을 얻었다. 여기에 DMEM-LG를 첨가한 후, 1,400 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 세포 결정을 20, 50, 65, 80% 의 Percoll 용액과 섞어 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 밀도 차에 따라 분류하였다. 50-65%의 Percoll 용액이 있는 부위의 세포들을 수집하여 10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-LG로 교반하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 일차 배양을 시킨 뒤 75 cm<sup>2</sup> culture flask에 90% 이상 세포가 차게 되

면 계대 배양시켰다. 배양액은 3일에 한번씩 교환하였다. 계대 배양 21일 후 골수로부터 추출한 세포가 중간엽 줄기 세포인지를 확인하기 위하여 중간엽 줄기 세포에 양성 반응 보이는 항체들을 이용하여 유세포 분석을 시행하였다.

#### 다. 유세포 분석

분화시킨 세포들은 PBS로 세척하고 2.5X trypsin-EDTA 1 ml을 첨가한 후 세포들을 떼어내어 PBS로 부유한 다음, 14,000 rpm에서 5분 동안 세포를 침전시키고, PBS로 2회 더 세척한 후 침전시켰다. 침전된 세포는  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 PBS에 재부유하고 각각의 항체; mesenchymal stem cell specific marker(CD105), the hyaluronic acid receptor (CD44),  $\beta 1$  integrin(CD29), the early hematopoietic progenitor cell marker(CD34), the monocyte/macrophage marker(CD14), the leukocyte common antigen(CD45)를 첨가하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 대조군으로 anti-mouse monoclonal 항체를 세포( $5 \times 10^5$  cells/ml)에 더하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 세포들은 PBS로 2회 세척한 후 침전시켜 flow buffer(1% paraformaldehyde, 0.1% sodium azide, and 0.5% bovine serum albumin in PBS)로 고정시킨 뒤, FACScan (Becton Dickinson Instrument, San Jose, CA, USA) 상에서 Cell-Quest software program으로 분석하였다.

#### 라. In vitro 중간엽 줄기세포의 연골 세포로의 분화 유도

중간엽 줄기세포에서 각 세포로의 분화는 다음과 같은 특정 배지에서 3차원 배양하였다. 연골세포는 alginate bead를 이용하여, 50, 100, 150, 200, 250ug/ml BMP-7, 50ug/ml ascorbic acid, 6.35ug/ml insulin-transferrin-selenium(ITS), 2% FBS가 포함된 DMEM에서 2주

간 3차원 배양하였다.

#### 마. 세포의 기질과 연골세포의 유전자(제2형 교원질, 제1형 교원질, aggrecan)발현 분석

RT-PCR은 total RNA를 추출하여 oligod(T)<sub>12-18</sub>를 이용하여 cDNA를 합성한 후 각 유전자의 적정온도에서 PCR을 실시한다. 연골세포의 분화는 제2형 교원질과 단백당인 aggrecan으로 확인하였다.

표 1. 각 표지유전자의 sequence

PRIMER	SEQUENCES	SIZE (bp)
aggrecan	5'-CTGCAGCAGTTGATTCTGAT-3'	540
	5'-GAATCTAGCAGTGAGACGTC-3'	
Type I collagen	5'-GAGTGGGGTTATGGAGGGAT-3'	295
	5'-TCCCACCTCTCTCCTCTGAA-3'	
Type II collagen	5'-TTGGTCC TTGCATTACTCCC-3'	368
	5'-CAGGACCAAAGGGACAGAAA-3'	
GAPDH	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	225
	5'-GAAGGTGAACCTCGGAGTC-3'	

#### 바. 신호전달물질(ERK, p38, JNK)의 발현 및 활성 측정

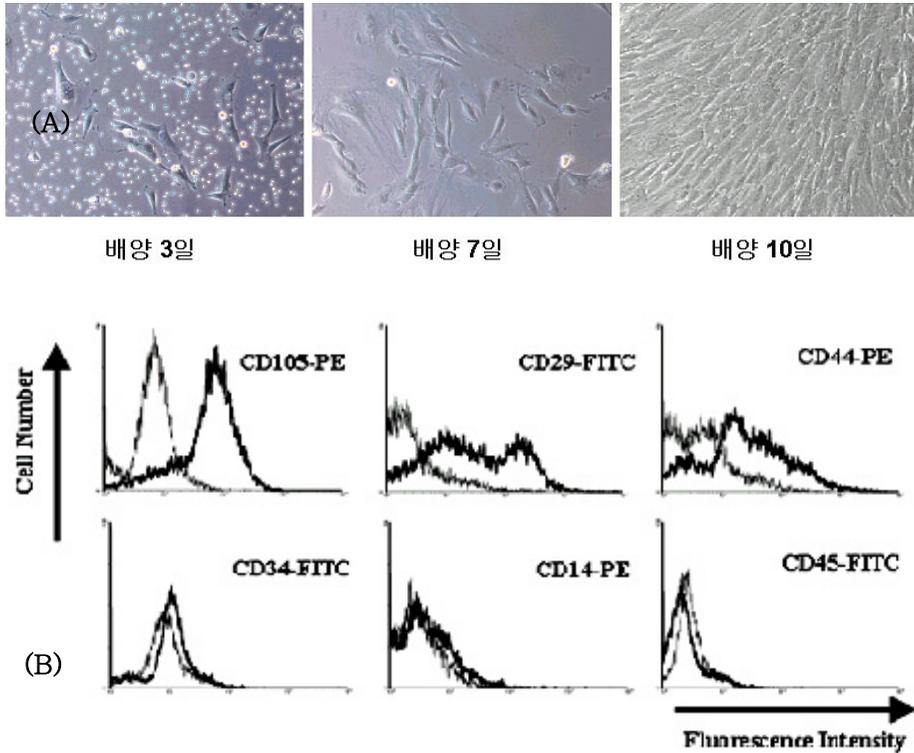
ERK, p38, JNK의 발현은 western blot 면역화학 분석법으로 측정하였다. 세포의 전체 단백질은 RIPA lysis buffer[1% NP-40, 20mM Tris(pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM NaVO<sub>4</sub> 10g/ml protease inhibitor(aprotinin and leupeptin)]로 분리한 후, 20µg 세포

추출액을 사용하여 12% polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 단백질은 완충용액에서 PVDF membrane(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)으로 이동시킨 후, 5% 무지방 우유로 1시간동안 blocking 한 후, 일차 항체와 이차 항체를 차례로 부착시킨 다음, ECL detection kit를 이용하여 확인한다. 일차 항체인 p-ERK, p-p38, p-JNK, ERK, p38, JNK의 희석비율은 1:3500이었고, 이차항체인 horse radish peroxide conjugated-anti-mouse IgG antibody, anti-rabbit IgG antibody는 1:5000로 희석하여 사용하였다. Western blotting을 통하여 얻은 결과를 TINA program (raytest Isotopenmessgeraete GmbH, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 각각의 강도비를 계산하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 성인 중간엽 줄기세포의 일차배양

성인 중간엽 줄기세포는 일차 배양한 시기로부터 약 7일정도 지나면 flask의 바닥에 붙기 시작하며, 세포의 모양은 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 관찰되었다. 또한, 유세포 분석 결과, 중간엽 줄기세포의 표지자로 알려진 CD105, CD44, CD29에서는 최소 57% 이상에서 염색이 되었고, 음성 표지자로 알려진 CD34, CD45, CD14에서는 평균 4.4%가 염색이 되어 골수에서부터 Percoll gradient method로 추출한 세포가 중간엽 줄기세포임을 확인하였다(그림 1).



**그림 1.** (A) 일차 배양한 성인 중간엽 줄기세포의 배양 시작 후 1주일 경과 후의 광학 현미경 사진(X100). 성인 중간엽 줄기세포는 일차 배양한 시기로부터 약 7일정도 지나면 flask의 바닥에 붙기 시작하며, 세포의 모양은 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 관찰되었다. (B) 성인의 골수로부터 추출한 중간엽 줄기세포의 유세포 분석 결과. 중간엽 줄기세포의 표지자로 알려진 CD105, CD29, CD44에서는 최소 57% 이상에서 염색이 되었고, 음성 표지자로 알려진 CD34, CD14, CD45에서는 평균 4.4%가 염색이 되어 골수에서부터 Percoll gradient method로 추출한 세포가 중간엽 줄기세포임을 확인하였다.

## 2. BMP-7을 이용한 In vitro 중간엽 줄기세포의 연골 세포로의 분화능

성인 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화능을 알아보기 위해 BMP-7을 처리하여 중간엽 줄기세포를 분화시켰다. 다양한 BMP-7의 농도에서 연골세포로의 분화를 확인하기 위하여 표지 유전자인 aggrecan과 제2형 교원질의 발현을 관찰하였다. Alginate bead를 이용하여 14일간 3차원 배양을 한 후, BMP-7을 200 ng/ml을 처리한 군에서 더 낮은 농도를 처리한 군보다 제2형 교원질의 발현이 가장 높게 나타났다.

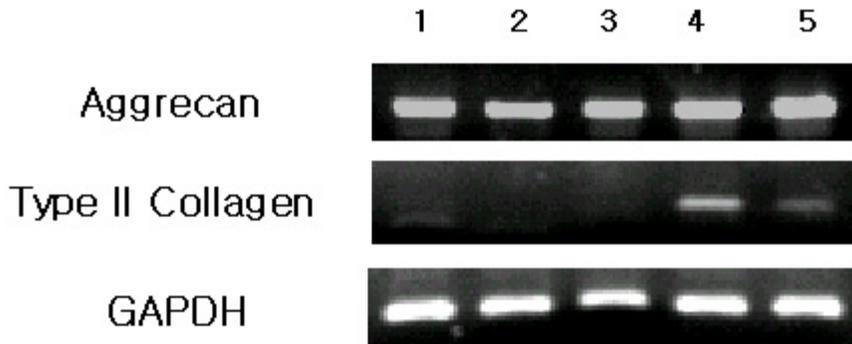


그림 2. 성인 중간엽 줄기세포에 서로 다른 농도의 BMP-7을 처리한 연골세포로의 분화능 결과. 서로 다른 농도의 BMP-7을 이용하여 연골세포로의 분화능을 알아보았다. lane 1은 50 ng/ml, lane 2는 100 ng/ml, lane 3은 150 ng/ml, lane 4는 200 ng/ml, lane 5는 250 ng/ml로 BMP-7을 14일간 처리하여 연골세포로 분화시킨 후 RT-PCR을 통해 표지 유전자의 발현을 관찰하였다. 200 ng/ml을 처리한 군(lane 4)에서 제2형 교원질의 발현이 가장 높게 나타났다.

### 3. TGF family cytokine을 이용하여 성인 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화능 비교 분석

기존에 연골 세포분화에 관여한다고 알려진 TGF- $\beta$ 3와 BMP-7의 연골세포 분화능을 비교하기 위하여 서로 다른 농도로 처리하여 연골세포의 표지유전자의 발현을 관찰하였다. 연골세포로 분화 시킨 지 3일째, 7일째, 14일째 세포들을 회수하여 연골세포의 표지유전자 발현을 RT-PCR을 통하여 알아보았다. 연골세포의 주요 표지 유전자인 제2형 교원질은 분화 14일째에 발현하였으며 또 다른 표지유전자인 aggrecan의 발현도 분화 3일째부터 관찰되었다. 분화 14일째에 BMP-7을 처리한 배치가 TGF- $\beta$ 3를 처리한 배치보다 제2형 교원질 유전자가 더 높게 발현하였다.

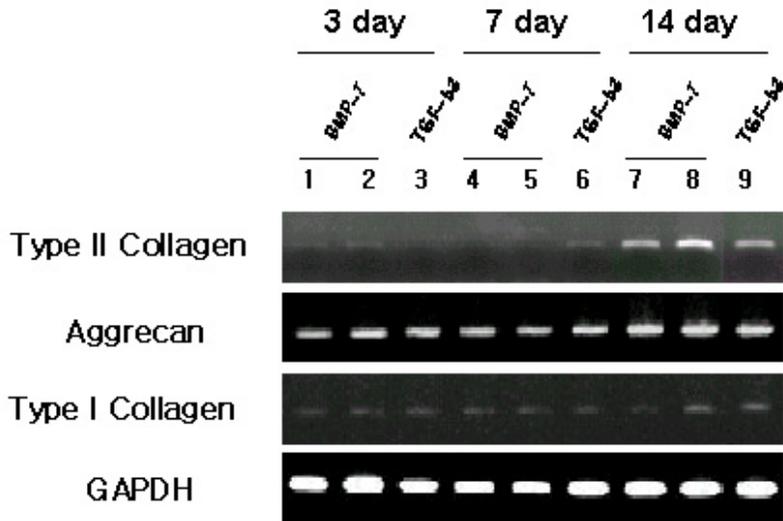


그림 3. TGF family cytokine을 이용하여 성인 중간엽 줄기세포로부터 연골 세포로의 분화능 비교 분석. Lane 1, 4, 7은 BMP-7을 100ng/ml 처리하였고, lane 2, 5, 8은 BMP-7을 200ng/ml로 처리하였고, lane 3, 6, 9는 TGF-β3를 10ng/ml로 처리하였다. 제2형 교원질은 분화 14일째에 발현하였으며 또 다른 표지유전자인 aggrecan의 발현도 분화 3일째부터 관찰되었다. 분화 14일째에 BMP-7을 처리한 배치가 TGF-β3를 처리한 배치보다 제2형 교원질 유전자가 더 높게 발현하였다.

#### 4. BMP-7을 이용하여 연골세포로 분화 시 특정유전자 발현 양상

위에서 정해진 농도에 따라 BMP-7을 200ng/ml로 처리하여 연골세포로의 분화를 관찰하였다. 연골세포의 표지 유전자인 제2형 교원질, aggrecan의 발현을 관찰하였다. 연골세포로 분화가 진행됨에 따라 연골 세포의 표지 유전자인 제2형 교원질이 5일째부터 약하게 발현하기 시작하여 14일까지 발현양이 증가하였으며, aggrecan 역시 분화가 진

행됨에 따라 발현하는 것을 관찰하였다.

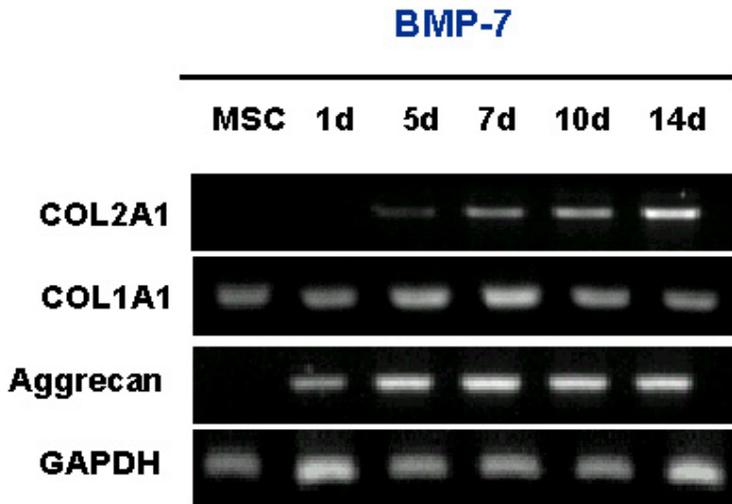


그림 4. 성인 중간엽 줄기세포의 BMP-7을 이용한 연골세포로의 분화능 결과. 200 ng/ml, BMP-7을 14일간 처리하여 연골세포로 분화시킨 후 RT-PCR을 통해 표지 유전자의 발현양상을 관찰하였다. 연골세포로 분화가 진행됨에 따라 연골 세포의 표지 유전자인 제2형 교원질이 5일째부터 약하게 발현하기 시작하여 14일까지 발현양이 증가하였으며, aggrecan 역시 분화가 진행됨에 따라 발현하는 것을 관찰하였다.

## 5. 사람의 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화 시 BMP-7에 의한 신호전달 경로와 전사인자의 발현 양상

### 가. 신호전달물질 ERK, p38, JNK의 발현 측정

연골 분화유도 과정동안 BMP-7을 처리하여 시간별로 signal pathway를 관찰하였다. 세포의 증식과 분화에 영향을 미치는 signal로 알려진 ERK의 발현과 활성화를 western blotting 면역화학 분석

법으로 측정하였다. 분화되지 않은 중간엽 줄기세포에서는 활성화되지 않다가 BMP-7을 처리한 후 초기에 ERK가 활성화되었다가 분화 10일째부터 다시 활성화 되는 것을 관찰하였다(그림 5). 그림 6에서는 같은 MAP-kinase이지만 서로 다른 경로를 통하는 p38과 JNK의 활성을 관찰하였다. 연골세포 분화 과정동안 P38과 JNK는 ERK와는 달리 활성화 되지 않는 것을 관찰하였다.

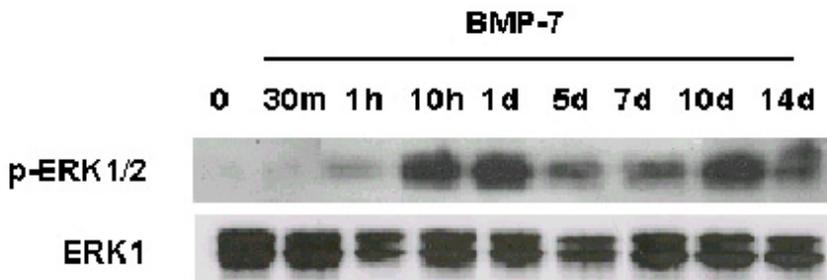


그림 5. BMP-7을 처리한 연골세포로의 분화 시 신호 전달 물질의 활성화 측정. 성인 중간엽 줄기세포를 연골 세포로 분화시키기 위하여 BMP-7을 처리한 후 신호 전달 물질의 활성을 측정하였다. 각 protein의 농도는 20  $\mu$ g/ml을 사용하였다. BMP-7을 처리한 후 초기에 ERK가 활성화되었다가 분화 10일째부터 다시 활성화 되는 것을 관찰하였다.

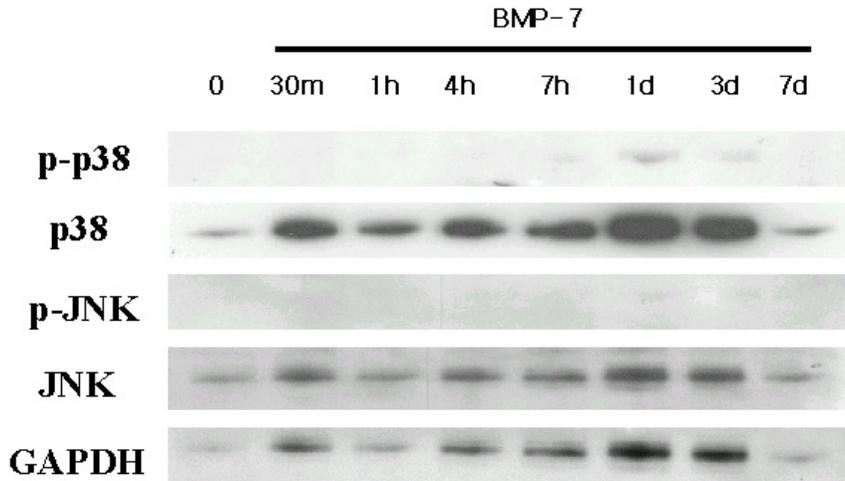
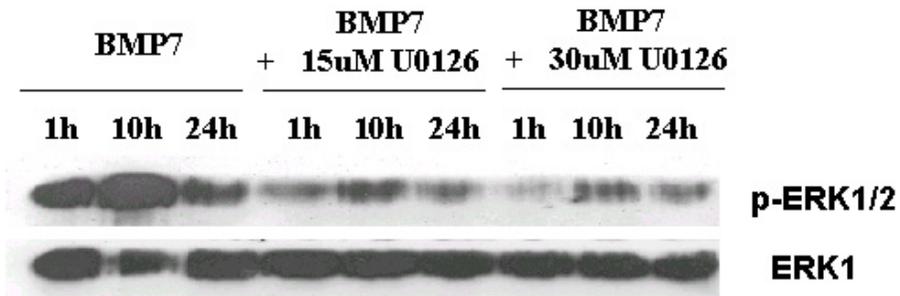


그림 6. BMP-7을 처리한 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화 시 신호 전달 물질의 활성화 측정. GAPDH는 internal control로 사용하였다. 연골세포 분화 과정동안 P38과 JNK는 ERK와는 달리 활성화 되지 않는 것을 관찰하였다.

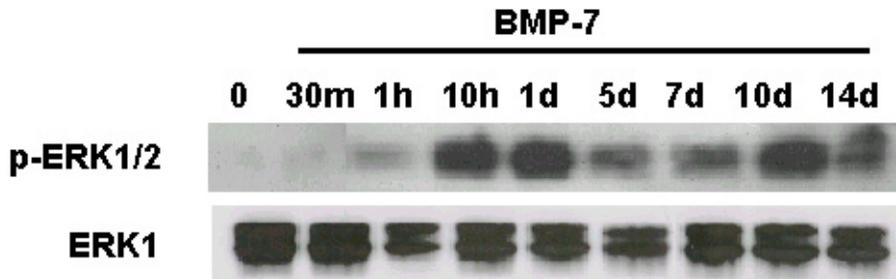
#### 나. 특정 신호전달경로 억제제 처리 후 신호전달 물질의 활성화 측정

연골 분화유도 과정동안 BMP-7을 처리하여 활성화된 ERK의 억제 시에 유전자의 발현양상을 RT-PCR을 통하여 관찰하였다. 먼저 U0126의 활성 억제 농도를 결정하기 위해 각 농도별로 ERK의 활성화를 western blotting으로 확인하였다. U0126을 15  $\mu$ M과 30  $\mu$ M을 처리한 경우 둘 다 유사한 양상으로 ERK의 활성이 줄어드는 것을 확인하였다. U0126의 농도를 15  $\mu$ M로 결정한 뒤 연골 분화유도 과정동안 BMP-7과 U0126을 동시에 처리하여 연골 분화과정동안 ERK가 활성화되지 못하였을 때 연골 세포의 표지 유전자인 제2형 교원질이

발현되지 않았으나, aggrecan의 발현은 억제되지 않았으며, 연골세포로의 분화가 억제되는 것을 관찰하였다.



**그림 7.** 서로 다른 농도의 U0126을 처리하여 ERK의 활성화 억제 농도 적정. 성인 중간엽 줄기세포를 연골 세포로 분화시킨 후 BMP-7과 각 농도별로 U0126을 동시에 처리하여 신호전달 물질의 활성억제를 측정하였다. 각 protein의 농도는 20  $\mu\text{g/ml}$ 을 사용하였다. U0126을 15  $\mu\text{M}$ 과 30  $\mu\text{M}$ 을 처리한 경우 둘 다 유사한 양상으로 ERK의 활성이 줄어드는 것을 확인하였다.



**그림 8.** U0126을 처리하여 연골세포 분화과정동안의 ERK의 불활성화 측정. 성인중간엽 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 과정동안 BMP-7과 U0126을 동시에 처리하여 ERK의 불활성화를 측정하였다. 각 protein의 농도는 20  $\mu$ g/ml을 사용하였다. BMP-7과 U0126을 동시에 처리한 경우 ERK의 활성화가 억제됨을 알 수 있었다.

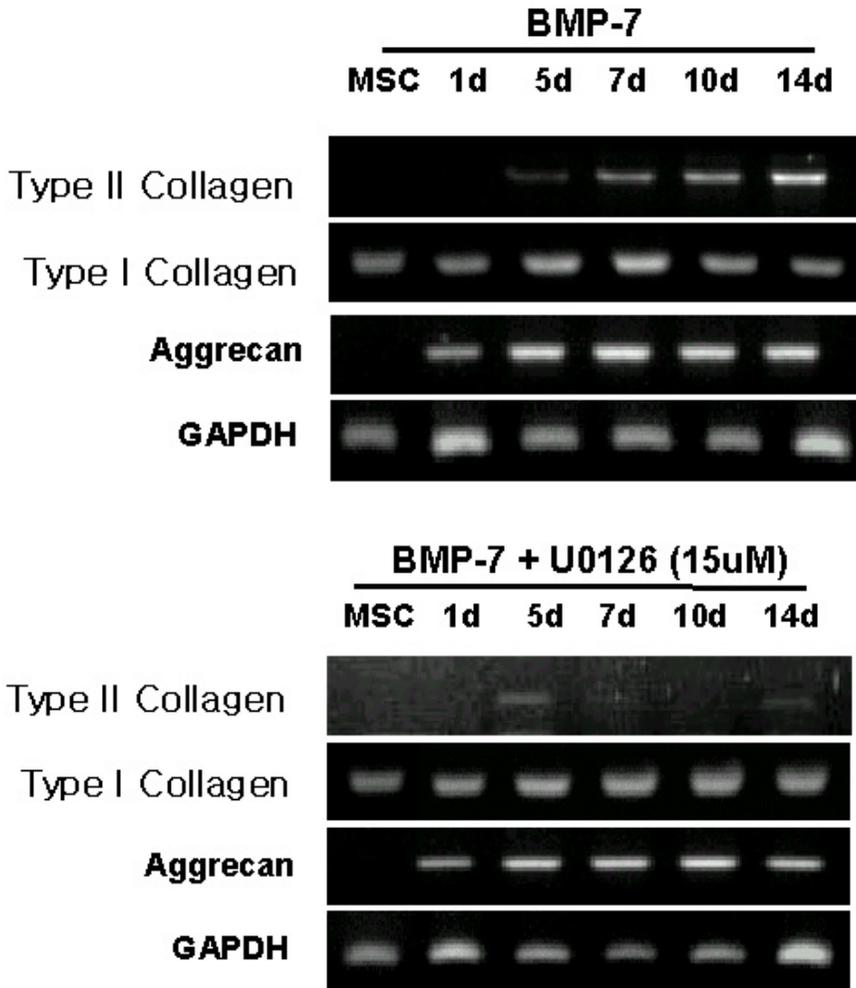


그림 9. 연골세포로의 분화과정동안 U0126 처리가 연골세포 표지유전자의 발현에 미치는 영향. 성인 중간엽 줄기세포에 200 ng/ml BMP-7과 15 $\mu$ M U0126을 14일간 처리하여 연골세포로 분화시킨 후 연골세포 표지유전자의 발현양상을 RT-PCR로 측정하였다. 연골 세포의 표지 유전자인 제2형 교원질이 발현되지 않았으나, aggrecan의 발현은 억제되지 않았으며, 연골세포로의 분화가 억제되는 것을 관찰하였다.

## IV. 고찰

성인 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화는 세포외 기질침착과 glycosaminoglycan의 생합성과 연관성이 있으며, 이러한 분화과정은 세포모양의 극심한 변화를 가져온다. 이 분화과정에는 세포의 3차원 배양과 낮은 산소 농도 및 적정량의 성장인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 TGF family중의 하나인 BMP-7을 이용하여 성인 중간엽 줄기세포로부터 연골의 생성 가능성 여부를 알아보기 위해 재조합 BMP-7을 성인 중간엽 줄기세포에 처리하여 연골세포 표지유전자의 발현과 신호전달 경로 물질의 변화를 관찰하였다.

성인 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화시 재조합 BMP-7 적정처리 농도는 200 ng/ml로 결정되었다. 기존의 많은 연구자들에 의해 BMP family 중에 BMP-2/9은 200-400 ng/ml로 처리하였을 경우 연골세포로의 분화가 유도됨이 발표되었다.<sup>20</sup> 연골세포로 분화시 BMP-7과 TGF- $\beta$ 3를 각각 처리하여 분화 표지 유전자의 발현을 관찰한 결과 14일동안 3차원 배양을 시킨 경우 BMP-7과 TGF- $\beta$ 3를 첨가한 14일째에 연골 중요 표지 유전자인 제2형 교원질의 높은 발현양상과 또 다른 표지 유전자인 aggrecan의 발현증가도 관찰하였다. 그러나 이미 기존에 연골 분화 과정에 중요하게 작용한다고 알려진 TGF- $\beta$ 3를 처리한 군보다 BMP-7을 처리하여 분화를 유도한 곳에서 제2형 교원질이 더 높게 발현됨을 관찰할 수 있었다. 이것은 여러 종류의 BMP-2, 4, 5, 6, 7의 연골형성에 대한 차이를 살펴본 결과, BMP-7을 처리한 연골세포에서 대표적인 제2형 교원질의 발현은 가장 크게 증가된 것과 연관이 있음을 암시한다. 또한 연골로의 섬유아세포의 유입을 억제함으로써 이식 후 문제가 될 수 있는 섬유성 연골의 형성과 이식물의 파괴를 방지할 수 있음을 보고하였다.<sup>21</sup>

BMP는 성체조직 재생과 초기배아 발생 과정에서 많은 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 많은 성체 조직에서 다양한 세포로 분화하는 과정에 중요하게 작용하는 것으로도 알려져 있다.

BMP-2는 생체 내 뿐만 아니라 시험관에서도 연골과 골 형성에 관여하는 표지 유전자의 발현을 유도시킨다고 알려져 있다.<sup>22</sup> BMP-4과 BMP-7 또는 GDF5는 생쥐 세포의 연골 세포분화과정과 연관이 있다고 알려져 있으며,<sup>23</sup> BMP-6도 사람 골수세포로부터 연골 생성을 유도한다고 보고 되었다.<sup>24</sup> BMP-7을 생쥐 중간엽 줄기세포에 첨가하여 분화를 유도하면 연골세포생성과 골세포 생성이 동시에 발생하는 것으로 보고 되었다.<sup>25</sup> 최근에는 자신의 중간엽 줄기세포를 이용한 임상적 연구가 새로이 시도되고 있다. 동물 실험 모델에서 BMP-2와 BMP-3은 새로운 골 형성에 관여함이 관찰되었고, 3개월째 완전한 bone union이 관찰된 반면, BMP-7을 처리한 경우에는 15일째부터 골 형성이 유도 되었다. 1997년도에 처음으로 환자를 대상으로 재조합 BMP-2는 교원질을 운반체로 하여 골재건에 대한 예비실험에 사용되었고, 1999년에는 BMP-7에 대한 결과가 보고 되었다. BMP-2를 이용한 세명의 환자에서 한명만 골 형성이 유도된 반면, 그 외에는 골 형성이 보이지 않았고, 섬유성 조직만이 발견되었다. 그러나 BMP-7을 이용한 환자에서는 6명중 5명에서 골 형성을 보였다. 실제로 연골에 손상을 입은 환자의 연골세포를 분리하여 BMP-7을 세포에 transfection시킨 후 환자의 연골손상부위에 세포를 넣어주었을 경우에 연골의 손상부위가 복구 되는 것이 보고 되었다. 또 연골에 손상을 입은 토끼에 자가 연골세포를 채취한 후 30분간 TGF cytokine을 처리한 후 바로 토끼에 이식 한 후, 연골 손상 부위가 회복되는 것이 보고 되었으며, 이 방법은 실제로 수술시에 바로 옆에서 실행 할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.<sup>26</sup>

본 실험에서 BMP-7을 처리하였을 경우 연골세포로의 분화 5일째부터 제2형 교원질의 발현이 관찰되었으며 더 이른 시기부터 또다른 표지 유전자인 aggrecan의 발현이 관찰되었다. 이 결과는 BMP-7이 다른 BMP family member들과 유사하게 연골세포 분화과정에 관여한다는 것을 뜻한다. 연골세포 분화 시 microarray를 통한 유전자변화 관찰에서도 본 실험과 유사한 결과를 나타내고 있다. aggrecan과 같

은 표지 유전자는 연골세포분화 초기에 발현하기 시작하여 분화가 진행되는 동안 발현이 높아진다. 하지만 또 다른 표지 유전자인 제2형 교원질의 발현은 연골세포 분화 초기에는 약하게 발현하기 시작하여 분화를 유도한지 14일째부터 높게 발현한다.<sup>27</sup> 또한 Sox9 은 연골세포로의 분화동안 제2형 교원질 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>28</sup>

BMP는 cytokine의 일종이므로 리셉터를 통해 세포안으로 신호가 전달된다. BMP는 type I receptor와 type II receptor를 통해 세포안의 또 다른 신호 전달 물질을 활성화시킨다. 잘 알려진 신호전달 물질로는 Smad family가 존재한다. Smad는 여러 가지의 isoform을 가지고 있다. 이 중에서도 Smad1과 Smad5가 BMP에 의해 활성화되면 많은 유전자들의 발현을 조절하게 된다. 전사인자 중 Runx 2는 골 형성에 관여하는 것으로 알려져 있는데 Runx 단백질은 Smad와 결합하여 골아 세포 분화 초기에 관여한다고 예상되고 있다. BMP에 의한 신호경로는 Smad에 의한 직접적인 전사 조절 외에 또 다른 신호전달 경로를 통한 유전자 조절도 있을 것이다. 일부 연구에서는 BMP가 수용체의 활성화에 의해 ERK, JNK p38를 활성화시킨다고 알려졌다. 이와 같은 kinase는 신호전달 경로 중 세포의 증식과 분화에 깊이 관여하는 MAP-kinase로서 알려져 있다. 이러한 kinase는 각각의 경로를 통해 또 다른 전사인자를 발현시킬 것이다. 본 실험에서도 BMP-7을 이용하여 연골세포로의 분화를 유도한 후 MAP-kinase의 활성을 측정하였다. ERK의 활성은 초기에 증가하다가 다시 줄어들었다가 후반기에 증가함을 알 수 있었다. 그러나 또 다른 경로의 kinase인 p38과 JNK의 활성은 연골세포의 분화과정동안 거의 나타나지 않았다. p38과 JNK가 활성화 되지 않은 것은 이 2가지 kinase는 stress stimuli에 의해 활성화 되는 것으로 알려져서 본 실험과 같이 cytokine을 이용한 분화 유도 과정에서는 발현하지 않은 것으로 추측된다. 또한 ERK의 활성을 억제하였을 경우에 연골세포로의 분화과정에 발현하는 표지 유전자가 발현되지 않는 것을 관찰하였다. 본 실험에서는 초기의

ERK의 활성이 성인 중간엽 줄기세포로부터 연골세포 분화 유도 초기 단계에 관여할 것으로 예상된다. 실제로 많은 연구에서 연골세포 분화과정동안 MAP-kinase 신호전달 경로를 중요하게 보고 있다. 본 실험에서는 ERK의 활성을 억제하면 성인 중간엽 줄기세포에서 연골세포로의 분화과정동안 제2형 교원질의 발현이 억제됨을 관찰하였다. 이 결과는 연골세포의 분화과정동안 MAP-kinase 경로를 통하여 분화한다는 가능성을 보여주고 있다. 그러나 아직까지 MAP-kinase 경로를 통한 연골화과정에는 서로 다른 결과들이 있다. C3H10T1/2 세포에서 연골세포 분화를 유도하는 동안 ERK의 활성을 억제하면 제2형 교원질과 Sox9의 발현이 증가하고, 또한 BMP-2 첨가로 인해 ERK의 활성이 억제되면 제2형 교원질과 Sox9의 발현이 증가하였다. 이것은 연골세포 분화동안 BMP-2의 신호전달을 매개체로 하여 ERK 신호가 조절된다는 것을 말한다.<sup>29</sup> 또 연골세포분화를 유도하면 ERK의 활성이 줄어들고, PD98059를 이용하여 ERK의 활성을 억제하면 세포들은 연골세포로 분화가 촉진된다는 연구결과가 발표되었다.<sup>30</sup> 이와는 반대로 p38의 경우는 연골세포로 분화가 진행되는 동안 활성화되고 특이적인 억제제로 p38의 활성을 억제하면 연골세포로의 분화가 억제된다고 알려져 있다.<sup>31</sup> 또한 p38은 연골 nodule 형성에도 영향을 미치며 제2형 교원질 발현을 유도한다고 보고 되었다. 연골세포로의 분화중 BMP 신호에 의해 유도 되는 신호전달 과정은 몇 가지가 더 알려져 있다. 연골세포 분화과정동안 BMP-2는 Wnt 신호전달의 촉매제인  $\beta$ -catenin을 통해 Wnt의 발현을 증가시킨다.<sup>32</sup> BMP-4는 smad1을 통해 연골세포로 분화하는 과정에 EGF(epidermal growth factor)는 연골세포로 분화하는 것을 억제한다. BMP-4와 EGF는 서로 상반되는 기능을 가지고 있으며 연골세포 분화과정 초기에 smad1이 이 두가지 신호과정의 전환에 관여하는 것으로 예상되고 있다.<sup>33</sup>

본 실험결과는 성인 중간엽 줄기세포가 BMP-7에 의해 연골세포로 분화된다는 것을 표지 유전자 발현으로 확인하였고, 특정 신호전달이 활성화 되는 것을 관찰하였으며, 특정 전달물질의 불활성화는

연골세포로의 분화과정을 촉진시키지 못한다는 것을 관찰하였다. 그러나 BMP-7에 의한 연골세포 분화과정을 이해하기 위해서는 몇 가지 실험이 더 진행되어야 할 것이다. 성인 중간엽 줄기세포에서 연골세포로 분화할 때 나타나는 표지유전자인 Sox9의 발현을 관찰하여야 하며, BMP-7에 의한 신호를 전달 할 수 있는 Smad신호가 활성화되는지를 관찰하여 BMP-7에 의한 신호전달이 Smad 신호전달 의존형인지 비 의존형인지를 밝힐 수 있을 것이다.

## V. 결 론

생물학적 활성을 지닌 재조합 BMP-7 합성이 가능하였다. 재조합 BMP-7이 인체 중간엽 줄기세포의 연골로의 분화과정에 있어, MAP-kinase 경로 중 ERK pathway 조절에 중요한 작용을 하였다. 특히 aggrecan 유전자 발현에는 영향을 주지 않았으며, 제2형 교원질 유전자 발현에 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 생각된다.

## 참고 문헌

1. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238(1):265-72.
2. Kahn AJ, Simmons DJ. Chondrocyte-to-osteocyte transformation in grafts of perichondrium-free epiphyseal cartilage. *Clin Orthop* 1977;(129):299-304.
3. Li IW, Cheifetz S, McCulloch CA, Sampath KT, Sodek J. Effects of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *J Cell Physiol* 1996;169(1):115-25.
4. Kim KJ, Itoh T, Kotake S. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997;35(3):279-85.
5. Fromiguet O, Marie PJ, Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998;68(4):411-26.
6. Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001;189(3):275-84.
7. Kaps C, Bramlage C, Smolian H, Haisch A, Ungethum U, Burmester GR, et al. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 2002;46(1):149-62.
8. Hidaka C, Quitoriano M, Warren RF, Crystal RG. Enhanced

matrix synthesis and in vitro formation of cartilage-like tissue by genetically modified chondrocytes expressing BMP-7. *J Orthop Res* 2001;19(5):751-8.

9. Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997;15:11(8):984-95.
10. Hata K, Nishimura R, Ikeda F, Yamashida K, Matsubara T, Nobuki T, et al. Differential role Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* 2003;14(2):545-555.
11. Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J* 2001;1;360(Pt 2):461-70.
12. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 1998;17(19):5718-33.
13. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 1999;22(1):85-9.
14. Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarth Cartilage* 2001;9 Suppl A:S69-75.
15. Kolettas E, Muir HI, Barrett JC, Hardingham TE. Chondrocyte

- phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(10):1146-56.
16. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994;16:79(6):1111-20.
  17. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994;8:372(6506):525-30.
  18. Semba I, Nonaka K, Takahashi I, Takahashi K, Dashner R, Shum L, et al. Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by Sox9 and Msx2. *Dev Dyn* 2000;217(4):401-14.
  19. Huch K. Long-term effects of osteogenic protein-1 on biosynthesis and proliferation of human articular chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19(5):525-31.
  20. Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcome the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001;189:275-284.
  21. Kaps C, Bramlage C, Smolian H, Haisch A, Ungethum U, Burmester GR, et al. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 2002;46(1):149-62.
  22. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. Recombinant human bone morphogenetic

- protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-2224.
23. Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, Hiraki Y. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. *Cell Struct Funct* 2000; 25(3):195-204.
  24. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:411-418.
  25. Gerstenfeld LC, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA. Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2002;17(2):221-230.
  26. Miura Y, Parvizi J, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW. Brief exposure to high-dose transforming growth factor- $\beta$ 1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro. *J Bone Joint Surg* 2002;84:793-799.
  27. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(7):4397-4402.
  28. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. Sox9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha$ (II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997;17:2336-2346.
  29. Seghatoleslami MR, Roman-blas JA, Rainville AM, Modarresi R, Danielson KG, Tuan RS. Progression of chondrogenesis in C3H10T1/2 cells is associated with prolonged and tight

- regulation of ERK1/2. *J Cell Biochem* 2003;88:1129–1144.
30. Chang SH, Oh CD, Yang MS, Kang SS, Lee YS, Sohn JK, et al. Protein kinase C regulate chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 1998;273:19213–19219.
  31. Oh CD, Chang SH, Yoon YM, Lee SJ, Lee YS, Kang SS, et al. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, ERK-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. *J Biol Chem* 2000;275:5613–5619.
  32. Fischer L, Boland G, Tuan RS. Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2002;277(34):30870–30876.
  33. Nonaka K, Shum L, Takahashi I, Takahashi K, Ijura T, Dashner R, et al. Convergence of the BMP and EGF signaling pathways in Smad1 in the reevaluation of chondrogenesis. *Int J Dev Biol* 1999;43(8):795–807.

## Abstract

MAP-kinase signal pathway in the chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells by 3-dimensional culture using human recombinant BMP-7

Tai Suk Roh

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Beyoung Yun Park)

Mesenchymal stem cells are pluripotential cells that are able to differentiate into osteocyte, adipocyte, myocyte or chondrocyte, depending upon the *in vitro* culture milieu. This study was undertaken to obtain chondrocytic differentiation of human mesenchymal stem cells using human recombinant BMP-7 and to analyze MAP-kinase expression to elucidate the intracellular mechanism relevant to chondrocytic differentiation. Type I and II collagens, and aggrecan expression was measured by RT-PCR, and western blot immunochemical analysis of ERK, p38, JNK proteins were performed. FACS analysis showed a minimum value of 57 % for CD105, CD44, CD29, known positive markers for mesenchymal stem cells, while 4.4 % was obtained for negative cell markers(CD34, CD45, CD14). Chondrocytic phenotype as expressed by type II collagen increased from day 5 consistently to day 14. Aggrecan expression was also detected towards the later phase of

the differentiation. ERK expression, which was not observed in the undifferentiated mesenchymal cells, appeared after BMP-7 treatment and its level increased at day 10 of the culture. However, activation of p38 and JNK proteins were not observed. Treatment with BMP-7 and U0126, an inhibitor of upstream MAP-kinase system, resulted in a rapid drop of ERK activity, leading to stop of type II collagen expression and failure of chondrocytic differentiation. Therefore, ERK seems to play a pivotal role in the intracellular signal pathway related to chondrocytic differentiation of human mesenchymal stem cells by recombinant BMP-7.

---

Key Words : BMP-7, Mesenchymal stem cell, MAP-kinase, Chondrocyte, Differentiation