과잉치 치주인대의 줄기세포 특성

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 지 현

과잉치 치주인대의 줄기세포 특성

지도교수 이 제 호

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2011 년 6 월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 지 현

박지현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 이 제 호 

심사위원 김 성 오 

심사위원 정 한 성 

연세대학교 대학원

2011년 6월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 아낌없는 격려와 조언을 해주신 이제호 지도 교수님, 실험 설계부터 완성까지 모든 것을 자상하게 지도해주신 송제선 교수님, 힘이 되는 조언과 많은 도움을 주신 김성오, 정한성, 김승혜 교수님, 늘 관심을 가져 주신 손흥규, 최병재, 최형준 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한, 바쁜 병원 생활 속에서도 깊은 관심과 도움을 준 소아치과 의국원들과 실험의 진행에 큰 도움을 주신 전미정 연구원께 감사 드립니다.

마지막으로, 한결 같은 사랑으로 저를 위해 기도해주시는 부모님과 시부모님, 사랑하는 동생과 늘 힘이 되어주는 든든한 남편에게 고마움과 사랑의 마음을 전합니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

약어 목록

ALP : alkaline phosphatase

α - MEM : α - minimum essential medium

BMMSCs : bone marrow mesenchymal stem cells

BSP : bone sialoprotein

CFU - F : colony forming unit - fibroblast

EMSCs : ectomesenchymal stem cells

ES cells: embryonic stem cells

FBS : fetal bovine serum

GAPDH : glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase

LPL : lipoprotein lipase

PCR : polymerase chain reaction

PPARγ2 : peroxisome - proliferator - activated receptor γ2

qRT - PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RT - PCR : reverse transcription - polymerase chain reaction

sPDLSCs : supernumerary periodontal ligament stem cells

국문 요약

과잉치 치주인대의 줄기세포 특성

인간의 치아는 줄기세포의 새로운 원천으로 각광 받고 있다. 본 연구에서는 외과적 발거로 얻을 수 있는 과잉치의 치주인대 조직에서 분리된 세포의 줄기세포 특성을 확인하고, 골수 줄기세포와 비교하여 줄기세포의 원천으로 활용 가능한 치아 조직의 범위를 넓히고자 하였다.

세포의 자가증식력 확인을 위해 colony forming unit-fibroblast (CFU-F) 분석을 시행하여 집락형성능을 관찰하였다. 또한 역전사 중합효소 반응 및 유세포 분석을 이용하여, 치주인대 유래 세포에서의 다양한 줄기세포 표지자(Oct-4, Nanog, Nestin, Stro-1, CD146)의 발현을 확인하였다. 과잉치 치주인대 줄기세포 및 골수 줄기세포의 지방세포 및 경조직 형성 세포로의 분화 능력은 조직화학적 염색 및 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 관찰하였다

실험 결과, 집락형성능은 과잉치 치주인대 줄기세포(6.0%)가 골수 줄기세포(5.1%)보다 높게 관찰되었으나 통계학적 유의차는 없었다. 과잉치 치주인대 줄기세포에서 Oct-4, Nanog, Nestin 및 Stro-1과 CD146의 발현 (각 34.1%, 84.8%)을 확인하였다. 또한 과잉치 치주인대 줄기세포의 지방세포로의 분화에 성공하였으나, peroxisome-proliferator-activated receptor γ2 (PPARγ2)과 lipoprotein lipase (LPL) 유전자의 발현 증가는 골수 줄기세포에 비해 낮았다. 경조직 형성 세포로의 분화도 alkaline phosphatase (ALP) 와 bone sialoprotein (BSP) 유전자 발현 증가를 통해 확인할 수 있었으며, ALP 유전자의 발현 증가는 골수 줄기세포와 비교 시 보다 이른 시기에 관찰되었다.

본 연구 결과 과잉치 치주인대 유래 세포가 자가 증식력을 가지며 줄기세포 표지자를 발현하고 지방세포, 골모세포로 분화하는 줄기세포의 특성을 가지고

있음을 확인하였다. 따라서 과잉치 치주인대가 향후 재생의학 분야에서 줄기세포의 새로운 공급원으로 활용될 것으로 기대한다.

핵심되는 말 : 과잉치, 치주인대, 줄기세포, 분화, 재생의학

과잉치 치주인대의 줄기세포 특성

<지도교수 **이 제 호**>

연세대학교 대학원 치의학과

박 지 현

Ⅰ. 서 론

줄기세포는 자가 재생산 능력을 가지며 특정한 환경 하에서 다양한 유형의 세포로 분화 유도 될 수 있는 세포로, 인체의 질병 치료와 관련하여 중요한 연구 대상으로 각광받고 있다. 골수에서 얻을 수 있는 성체줄기세포의 추출 및 조직 재생 의학에의 응용에 대해 다양한 연구가 이루어지고 있으며[1, 2], 최근에는 치아 및 치아 주변 조직에서 유래한 성체줄기세포를 이용한 연구도 시도되고 있다[3, 4]. 치아는 새로운 줄기세포의 원천으로 각광받고 있는데, 이는 치아에서 얻을 수 있는 줄기세포는 골수나 탯줄 등에 존재하는 다른 성체줄기세포보다 조직의 손상을 최소화하고 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있기 때문이다. 치아와 관련된 조직 중에서 유치 및 영구치의 치수[5-8], 치주인대[9-14], 맹출 중인 치아의 치낭[15], 미성숙 영구치의 치근 유두[16, 17] 등에 줄기세포가 존재한다고 보고된 바 있다.

치주인대는 섬유모세포, 내피세포, Malassez 상피 잔사, 골모세포, 백악모세포 등 다양한 세포군으로 구성되어 있으며[11], 골조직과 섬유성 결합조직, 백악질 생성 세포로 분화되는 전구세포가 피부와 같은 다른 결합조직보다 다량 존재한다[14, 18]. 최근 치아의 치주인대 조직으로부터 줄기세포를 채취하고 다양한 조직으로 분화시키려는 연구가 시도되었고, 성견의 치아[19] 및 영구치[9, 12], 유치[20]의 치주인대에서 분리된 세포들이 경조직 형성 세포 및 지방세포로도 분화될 수 있음이 확인되었다.

과잉치는 정상적인 치아 수 이상으로 추가 발생한 치아로서 인구의 1.0~3.5%[21]의 빈도로 발생한다. 과잉치는 인접 영구치의 맹출 지연 및 회전, 전위, 이개 등의 부정교합 및 낭종 형성, 비강 내 맹출 등의 병발증을 야기할 수 있기 때문에[22] 소아 연령 시기에 외과적으로 발거하는 것을 추천하고 있다. 과잉치는 발거 후 폐기되는 조직이기 때문에 과잉치가 줄기세포의 원천(source)이 될 수 있는지를 평가하는 것은 재생의학적 관점에서 줄기세포의 원천으로 활용 가능한 치아 조직에 대한 범위를 넓히는 데에 기여할 수 있을 것으로 보인다.

과잉치를 대상으로 한 기존의 연구는 과잉치의 치수의 줄기세포의 특성을 집락형성능을 통해 확인하고 지방세포와 골모세포로의 분화능력을 관찰한 연구 보고가 있다[23, 24]. 그러나 과잉치의 치주인대를 대상으로 한 연구는 보고된 바가 없었다. 기존에 영구치 및 유치의 치주인대에서 성체 줄기세포를 얻을 수 있다고 보고된 바 있으므로, 과잉치의 치주인대에서도 약간은 다른 성격의 성체 줄기세포를 얻을 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 본 연구는 외과적 발거로 얻을 수 있는 과잉치의 치주인대 조직에서 간엽성 성체줄기세포를 분리하고 줄기세포로서의 특성을 골수 줄기세포와 비교하여 분석해 보고자 한다.

Ⅱ. 방 법

1. 과잉치 치주인대 세포의 일차배양

과잉치 줄기세포 배양을 위한 조직 채취는 상악 정중 매복 과잉치를 가진 만 6-10세의 전신질환이 없는 건강한 남녀 환아 6명을 대상으로 하였다. 매복 과잉치의 외과적 발거를 통해 치아를 얻었으며, 발거 시 치주인대 부위의 손상을 최소화 하기 위해 조심스럽게 발거하였다. 과잉치 치주인대로부터 세포의 일차배양은 연세대학교 치과대학 기관윤리위원회로부터 승인(2-2010-0015)을 받은 후 환아 및 보호자의 동의 하에 이루어졌다. 세포의 일차 배양은 explants culture법[25]을 사용하였으며 과잉치 치주인대 줄기세포(supernumerary periodontal ligament stem cells, sPDLSCs)라고 명명하였다. 골수 기원 줄기 세포는 연세의료원 정형외과에서 15세 남환으로부터 채취한 골수를 이용하여 연세대학교 의과대학 의공학교실 서활 교수팀이 일차배양에 성공하고, 5차례 계대 배양한 세포를 제공받아 골수 줄기세포(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)라 표시하였으며, 본 연구의 대조군으로 사용하였다. 골수 및 과잉치 치주인대 줄기세포의 배양에 사용한 배지는 α-minimum essential medium (α-MEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), 100 U/ml of penicillin and 100 μg/ml of streptomycin (Gibco BRL), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL), 10 mM L-ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 것으로, 배양 시 온도는 37°C를 유지하고 5% CO2의 습윤환경에서 배양하였다. 과잉치 치주인대 줄기세포는 2계대에서 동일한 수로 섞어

사용하였으며 각 실험 과정은 결과의 유의성 확인을 위해 최소 2차례 반복하여 시행하였다.

2. Colony forming unit-fibroblast (CFU-F)의 측정

배양된 과잉치 치주인대 줄기세포의 집락형성능에 대한 관찰을 통해 줄기세포의 특징인 자가증식능을 확인하였다. 간엽성 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 섬유아세포와 유사한 특징을 보이며 집락(colony)을 형성할 수 있는데, 이러한 세포 집락인 colony forming unit-fibroblast (CFU-F)의 수를 측정하였다. 6-well 배양접시(BD Falcon, Lincoln Park, NJ, USA)에 480 cells/well의 농도로 세포를 분주한 후 10일 동안 배양하였다. 10% natural-buffered formalin (Sigma)을 사용하여 4℃에서 20분간 고정하고, 0.5% crystal violet (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 5분간 염색하였다. 직경 2mm 이상인 세포 집락군을 단일 CFU-F로 평가하였으며 분주한 세포 수 대비 CFU-F를 형성한 수를 집락형성능으로 계산하였다.

3. 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 통한 줄기세포 관련 유전자 발현 확인

RT-PCR을 통해 과잉치 치주인대 조직으로부터 배양된 줄기 세포에서 배아줄기세포(embryonic stem cells, ES cells)의 표지자인 Oct-4 와 Nanog 및 외배엽성 간엽줄기세포(ectomesenchymal stem cells, EMSCs)의 표지자인 Nestin의 mRNA 발현을 관찰하였다. Total RNA의 추출은 세 번

계대 배양한 세포에서 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. Total RNA는 Nanodrop ND-1000® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 분광광도계를 사용하여 정량하였다. cDNA의 합성을 위해 각각의 total RNA 1 μg을 oligo (dT)15 primer를 함유한 Maxime RT premix kit (Intron biotechnology, Seoul, Korea)에 넣고 멸균된 증류수를 섞어 총 20 μl을 만들고, 45℃에서 1시간, 95℃에서 5분간 반응시켰다. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 Maxime PCR PreMix Kit (i-StarTaq) (Intron biotechnology)를 사용하였다. 합성된 cDNA 1 μl, 10 pmol/μl의 forward 및 reverse primer를 각각 1 μl를 넣고 멸균된 증류수를 넣어 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. Denaturation을 위해 95℃에서 2분, 95℃에서 20초간 가온하고, annealing은 60℃에서 10초, extension은 72℃에서 20초, final extension은 72℃에서 5분간 PCR반응기(Swift™ MaxPro Thermal Cyclers; ESCO, Singapore)를 이용하여 시행하였다. PCR 양성 반응의 확인을 위하여 human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 포함하여 시행하였으며, 사용한 primer의 종류 및 반응조건은 Table 1에 표기하였다. 만들어진 PCR 산물은 6× LoadingStar (DyneBio, Sungnam, Korea)와 섞고 1.5% agarose gel에서 전기 영동하였다. ChemiDoc XRS (BIO-RAD Lab, Richmond, CA, USA)을 이용하여 UV light하 촬영을 통해 전기 영동 결과를 확인하였다.

Table 1. RT - PCR and qRT - PCR primers used in this study

Genes	Primer sequence (5' - 3')	Size (bp)	Cycles	Gene Bank Accession No.	Ref
Oct - 4	F: CGACCATCTGCCGCTTTGAG R: CCCCCTGTCCCCCATTCCTA	573	30	NM_002701.4	[26]
Nanog	F: TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT R: GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC	287	32	NM_024865.2	[26]
Nestin	F: GCCCTGACCACTCCAGTTTA R: GGAGTCCTGGATTTCCTTCC	200	33	NM_006617.1	[27]
GAPDH	F: AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG R: GCTCCTGGAAGATGGTGATGG	231	25	NM_002046.3	[28]
PPAR γ 2	F: ACAGCAAACCCCTATTCCATGCTGT R: TCCCAAAGTTGGTGGGCCAGAA	159	45*	NM_015869.4	[25]
LPL	F: TGGACTGGCTGTCACGGGCT R: GCCAGCAGCATGGGCTCCAA	167	45*	NM_000237.2	[25]
ALP	F: GGACCATTCCCACGTCTTCAC R: CCTTGTAGCCAGGCCCATTG	137	45*	NM_000478.4	[26]
BSP	F: CTGGCACAGGGTATACAGGGTTAG R: ACTGGTGCCGTTTATGCCTTG	182	45*	NM_004967.3	[29]
GAPDH	F: TCCTGCACCACCAACTGCTT R: TGGCAGTGATGGCATGGAC	100	45*	NM_002046.3	[29]

* qRT - PCR

4. 유세포 분석(Flow Cytometry Analysis)을 통한 간엽성 줄기세포 표지자 발현 관찰

유세포 분석을 이용하여 과잉치 치주인대 줄기세포에서 간엽성 줄기세포의 표지자인 Stro-1과 CD146의 발현양상을 관찰하였다. 세 번 계대 배양한 세포들을 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH=7.2)로 두 차례 세척 후 cell dissociation buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 dish에서부터 분리한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 flow cytometry staining buffer (eBioscence, San Diego, CA, USA)에 부유시켰다. Stro-1의 발현을 관찰하기 위하여 일차 항체로서 5 μg/1×106 cells 농도의 monoclonal anti-human Stro-1 (IgM; R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 처리하고 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. flow cytometry staining buffer로 두 번 세척 후 이차 항체로서 R-phycoerythrin (R-PE)이 결합된 goat anti-mouse IgM (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)을 0.1 μg/1×10^6cells 농도로 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. 또한 CD146을 확인하기 위하여, fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 anti-human CD146 (eBioscence)를 20 μl/1×10^6 cells 농도로 사용하여 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Stro-1의 경우 대조군은 일차 항체를 첨가하지 않고 진행하였다. 염색된 세포들은 FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences)과 FCSExpress V3 software (De Novo Software, Thornhill, ON, Canada)을 사용하여 세포의 형광량 측정 및 발현 양상을 분석하였다.

5. 지방 세포로의 분화능력 관찰 (Adipogenic Differentiation)

과잉치 치주인대 줄기세포의 지방세포로의 분화능력을 확인하기 위하여 3-5계대의 세포를 12-well 배양접시에 1×10^4 cells/cm^2 농도로 분양한 다음 세포가 거의 차게 될 때 분화 배지로 교환하였다. 지방세포로의 분화 유도는 처음 10일 간은 α-MEM 배지에 10% FBS, 1% antibiotics, 1 μM dexamethasone (Sigma), 10 μg/ml human insulin (Sigma), 100 μM indomethacin (Sigma), 500 μM 3-isobutyl-l-methylxanthine (IBMX; Sigma)를 첨가한 배지로 사용하였으며, 10일 후에는 분화 유지 배지(α-MEM 배지에 10% FBS 및 1% antibiotics, 10 μg/ml human insulin을 첨가)를 10일간 더 사용하였다.

분화 종료 시 분화를 시각적으로 확인하기 위해 Oil red O 염색을 시행하였다. 염색을 위해 세포를 10% natural-buffered formalin을 사용하여 4°C에서 30분 동안 고정한 후 0.2% Oil Red O (Sigma) 용액을 상온에서 10분간 적용시켜 염색하였으며, 증류수로 세척한 후에 광학현미경으로 세포의 분화 양상을 관찰하였다. 또한 지방세포 분화 관련 유전자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ2 (PPARγ2)와 lipoprotein lipase (LPL)의 mRNA를 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)으로 분석하였다.

6. 경조직 형성 세포로의 분화능력 관찰 (Osteogenic Differentiation)

과잉치 치주인대 줄기세포의 골세포로의 분화능력을 확인하기 위하여 3-5계대의 세포를 12 well 배양용기에 1×10^4 cells/cm^2 농도로 분주한 다음

세포가 거의 차게 될 때 분화용 배지로 교환하였다. α-MEM 배지에 10% FBS 및 1% antibiotics, 0.1 μM dexamethasone, 2 mM β-glycerolphosphate (Sigma) 및 50 μM ascorbic acid 2-phosphate (Sigma)를 첨가한 분화용 배지를 처리하여 5주간 세포를 분화시켰다.

분화를 시각적으로 확인하기 위해 Alizarin Red S 염색을 시행하여 세포 밖에 형성된 석회화 결절을 관찰하였다. 세포를 10% natural-buffered formalin로 고정한 후 2% Alizarin Red S (pH=4.2; Sigma) 용액으로 5분간 염색한 다음 증류수로 세척한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 경조직 형성 세포로의 분화와 관련된 유전자인 alkaline phosphatase (ALP)와 bone sialoprotein (BSP)의 mRNA 발현양상을 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응으로 분석하였다.

7. 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

Total RNA추출 및 cDNA제조는 상기에 기술된 RT-PCR방법과 동일하게 진행하였다. 반응액은 멸균 증류수 7 μl, forward 및 reverse primer (10 pmol/μl) 각각 1 μl, 합성된 cDNA 1 μl 및 2x SYBR Premix Ex Taq™ (Takara Bio, Otsu, Japan) 10 μl를 넣어 총 20μl를 만들었으며 Thermal Cycler Dice™ real time system (Takara Bio)으로 증폭 및 형광을 검출하였다. 증폭과정은 초기 denaturation으로서 95°C에서 10초간 시행한 다음 denaturation을 95°C에서 5초, annealing은 60°C에서 15초, extension은 72°C에서 10초간 45회 진행하고 이후 60°C에서 95°C까지 dissociation 과정을 시행하였다. 사용한 primer의 조건은 Table 1와 같다.

사용된 primer는 미리 조건실험을 통하여 전기영동 하 특이한 band가 나타나지 않으며 dissociation curve상에 특이한 peak가 없음을 확인하였다. 분화 전후의 각 mRNA의 상대적 발현양의 비교는 GAPDH를 기준으로 하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$법을 이용하였다.

8. 통계분석(Statistical analysis)

결과는 CFU-Fs 분석의 경우에는 사분위수로 나타내었으며 qRT-PCR 분석의 경우에는 평균값과 표준편차로 나타내었다. 분화 전후의 상대적인 mRNA 발현량의 차이는 SPSS (version 17.0; Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Mann-Whitney U test ($p<0.05$)로 통계 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 과잉치 치주인대 세포의 일차배양

배양 접시에 고정하여 배양기에 넣은 과잉치의 치주인대 조직에서 자라나온 세포는 방추형이거나 혹은 섬유모세포와 유사한 형태를 보였다(Fig 1).

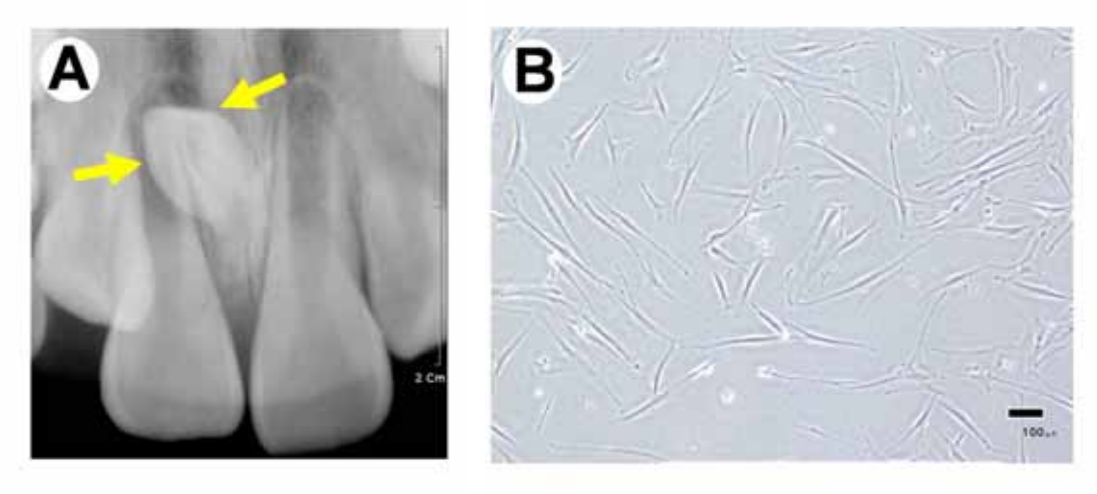


Figure 1. (A) Radiographic view of a supernumerary tooth (arrows). (B) Morphology of stem cells obtained from the periodontal ligament of a supernumerary tooth (sPDLSCs). Scale bar: 100 μm.

2. Colony forming unit - fibroblast (CFU - F)의 측정

골수 줄기세포와 과잉치 치주인대 줄기세포를 10일 동안 배양 후 CFU - F의 평균 수를 측정 비교한 결과 과잉치 치주인대 줄기세포는 약 6.0%의 집락형성능을 보였으며 골수 줄기세포는 약 5.1%의 집락형성능을 보였다.

과잉치 치주인대 줄기세포에서 골수 줄기세포보다 많은 집락형성능을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig 2).

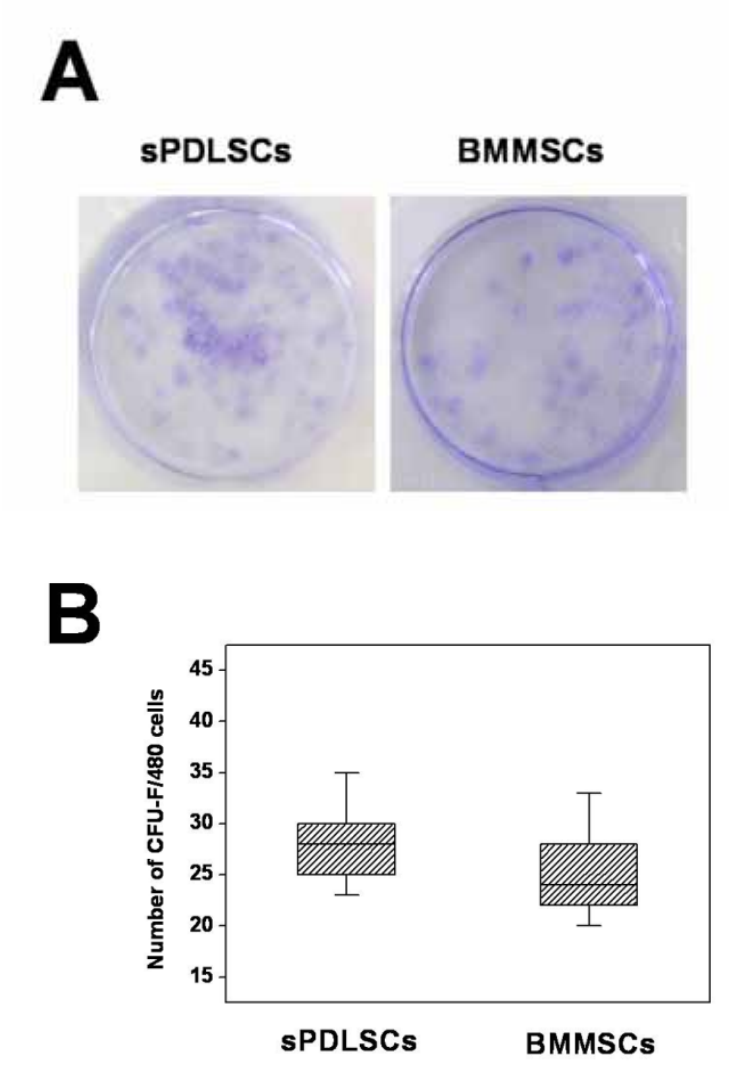


Figure 2. Colony forming unit-fibroblast (CFU - F) assay for the sPDLSCs and BMMSCs. (A) Crystal violet staining. (B) The numbers of colonies per 480 cells after 10 days of culture did not differ significantly between the

two cell types (Mann-Whitney U test: $p>0.05$; $n=8$). Data are presented as box and whisker plots showing median, quartiles, and range.

3. 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 통한 줄기세포 관련 유전자 발현 확인

분리 배양된 과잉치 치주인대 줄기세포에서 발현되고 있는 mRNA를 RT-PCR및 전기영동을 사용하여 확인한 결과, ES cells 표지자인 Oct-4 및 Nanog가 발현되었으며 또한 EMSCs 표지자인 Nestin이 발현되었다(Fig 3A).

4. 유세포 분석(Flow Cytometry Analysis)을 통한 간엽성 줄기세포 표지자 발현 관찰

과잉치 치주인대 줄기세포에서 간엽성 줄기세포의 표지자 중 표면항원인 Stro-1과 CD146의 발현양상을 유세포 분석법을 이용하여 확인한 결과, Stro-1과 CD146 모두 과잉치의 치주인대 세포에서 발현되었다(Fig 3B).

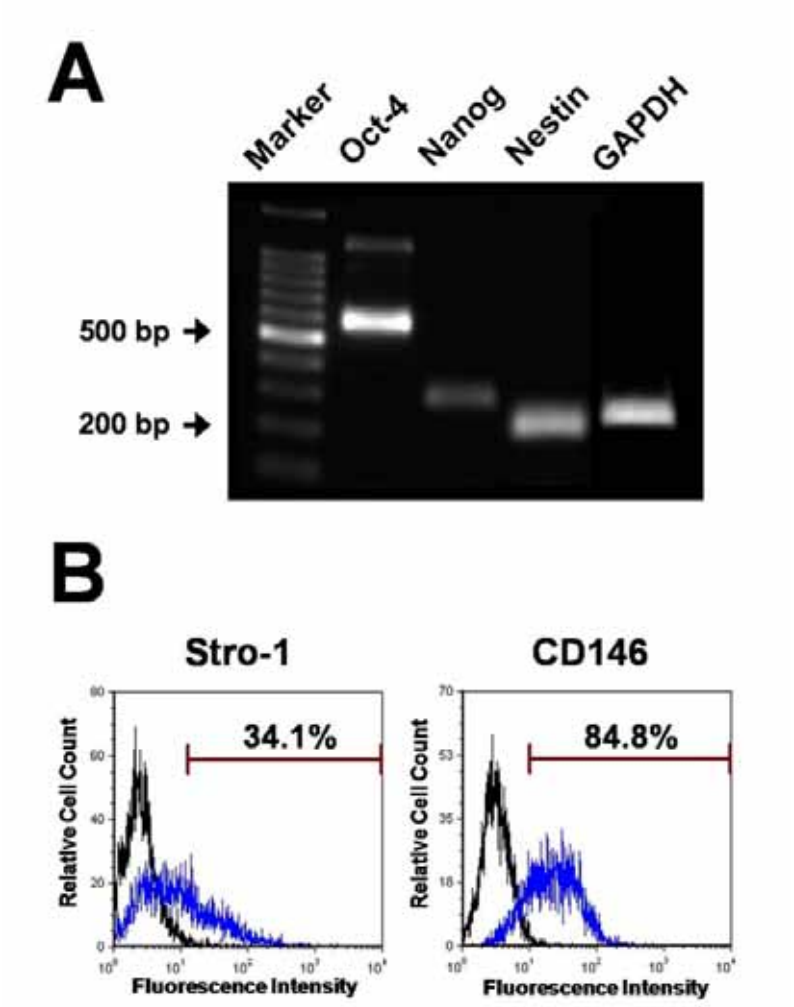
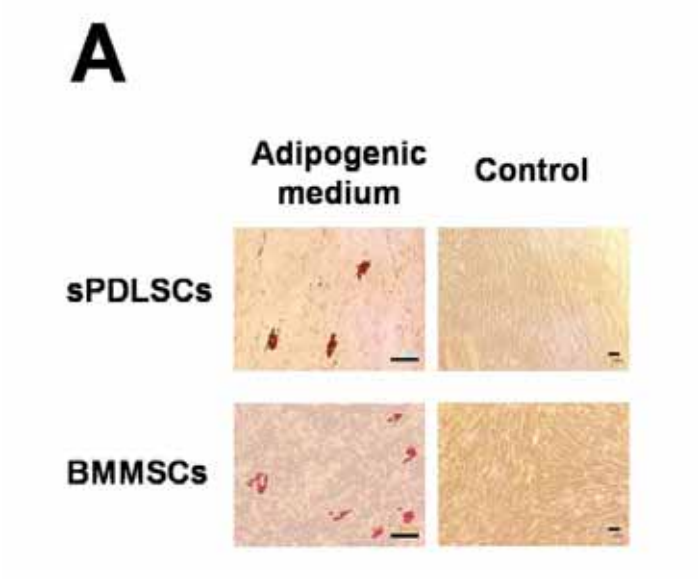


Figure 3. (A) Expression of genes associated with embryonic stem cells (Oct - 4 and Nanog) and ectomesenchymal stem cells (Nestin) in sPDLSCs. GAPDH was used as an internal control. (B) Flow cytometry analysis of mesenchymal stem - cell markers (Stro - 1 and CD146) in the sPDLSCs. Horizontal bars indicate 1% of control samples.

5. 지방 세포로의 분화능력 관찰 (Adipogenic Differentiation)

과잉치 치주인대 줄기세포와 골수 줄기세포의 지방세포로의 분화는 Oil red O 염색 결과 붉게 염색된 lipid vacuole을 통해 확인할 수 있었으며(Fig 4A), 또한 qRT-PCR 분석 결과 분화를 시킨 군에서 PPARγ2와 LPL의 발현 증가가 관찰되었다(Fig 4B). 그러나 과잉치 치주인대 줄기세포의 지방세포로의 분화는 골수 줄기세포보다는 적게 관찰되었는데 비단 Oil red O 염색 결과에서뿐 아니라 분화 시 PPARγ2와 LPL 유전자의 발현 증가가 보다 적은 것을 통하여 확인할 수 있었다.



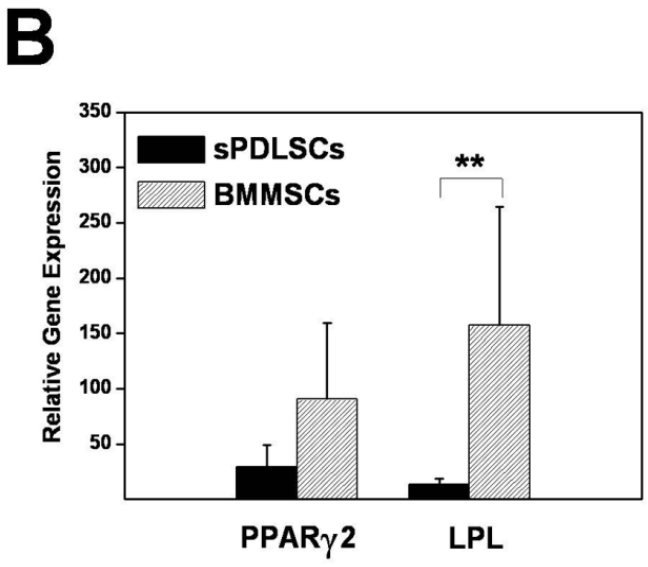
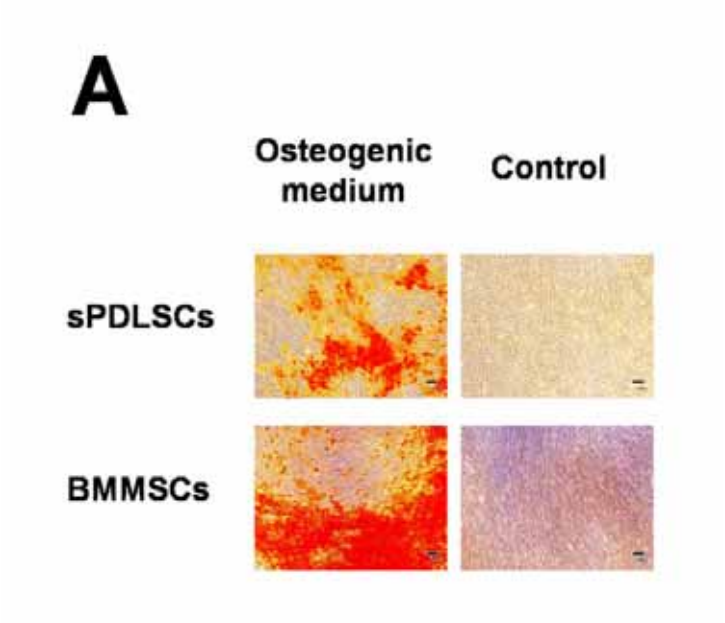


Figure 4. Adipogenic differentiation of the sPDLSCs and BMMSCs. (A) Oil Red O staining after 20 days of culture in adipogenic differentiation medium and control medium. Scale bar: 100 μm. (B) Quantitative RT - PCR analysis revealed up - regulation of peroxisome - proliferator - activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) and lipoprotein lipase (LPL) gene expressions at 20 days of culture under adipogenic stimuli. ** $p<0.01$ (Mann - Whitney U test, n=3).

6. 경조직 형성 세포로의 분화능력 관찰 (Osteogenic Differentiation)

Alizarin red S로 형성된 석회화 결절을 염색한 결과, 과잉치 치주인대 줄기세포와 골수 줄기세포 모두에서 경조직 형성 세포로의 분화가 활발하게

일어난 양상이 관찰되었다(Fig 5A). 또한 qRT-PCR 분석 결과 분화를 시킨 군에서 ALP 및 BSP 발현의 변화가 관찰되었는데, ALP의 경우 분화 1-2주에 발현이 증가하다가 다시 감소하는 경향을 보였으나 BSP의 경우에는 분화초기에는 감소하다가 점차로 증가하는 경향을 보였다. 골수 줄기세포와 비교 시 과잉치 치주인대 줄기세포는 ALP 발현 증가가 좀 더 빠른 시기에 더 확연하게 나타나고 있었으나 BSP의 발현 증가 양상은 비슷하였다(Fig 5B).



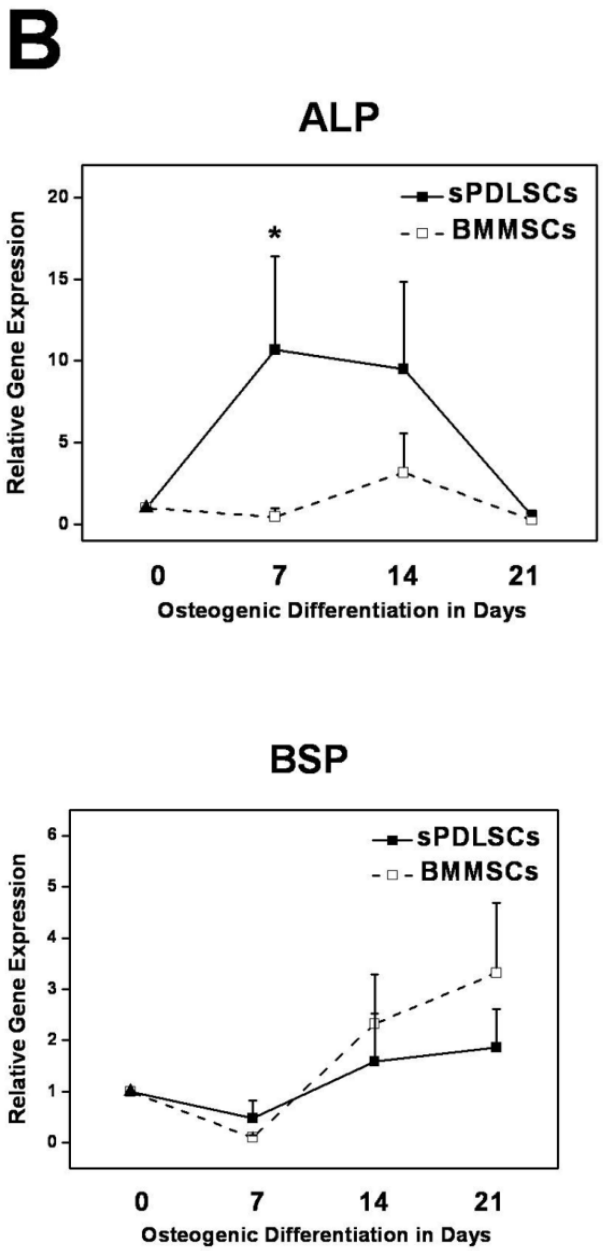


Figure 5. Osteogenic differentiation of the sPDLSCs and BMMSCs. (A) Alizarin Red S staining after 5 weeks of culture in osteogenic

differentiation medium and control medium. Scale bar: 100 μm. (B) Quantitative RT-PCR analysis revealed the changes in alkaline phosphatase (ALP) and bone sialoprotein (BSP) gene expression at 0, 7, 14, and 21 days of culture under osteogenic stimuli. * $p<0.05$ (Mann-Whitney U test, n=3).

Ⅳ. 고 찰

유치 및 영구치의 치수, 치주인대, 미성숙 영구치의 치근 유두, 맹출 중인 치아의 치낭 등에 포함된 줄기세포의 확인과 다양한 분화능에 대한 연구가 계속되면서, 치아는 줄기세포의 채취 및 활용의 새로운 공급원으로 떠오르고 있다. 본 연구에서는 기존의 유치 및 영구치의 치주인대 줄기세포를 대상으로 한 연구에 착안하여 버려지는 과잉치도 줄기세포 공급원으로서의 역할을 할 수 있는지 알아보고자 하였다.

본 연구에서는 줄기세포의 대표적 특성인 자가증식능에 대한 확인을 위해 세포의 집락형성능을 관찰하였는데 집락 수의 측정 결과 과잉치 치주인대 줄기세포의 집락형성능은 6.0%로 관찰되었다. 이것은 같은 방법으로 배양된 Nagatomo 등[12]의 연구에서 얻어진 집락형성능 결과인 15~35% 보다는 다소 낮은 수치지만 1% 미만으로 관찰된 Tanaka 등[30]의 연구결과 보다는 높은 수치였다. 그럼에도 골수유래 줄기세포와 비교하였을 때에는 치주인대 줄기세포가 더 많은 집락을 형성한다고 하는 선행 연구들과 유사한 결과를 보였다[31, 32].

만능줄기세포(pluripotent stem cells)에 대한 관심과 연구가 활발해지면서 만능줄기세포에 속하는 배아 줄기세포(ES cells)의 전분화능(pluripotency)을 이용하여 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 척수손상, 심장질환, 당뇨, 골관절염과 같은 질환의 치료에 적용시키려는 노력이 계속되어 왔다[11]. Oct4와 Nanog는 인간의 배아줄기세포의 전분화능(pluripotency)의 유지에 관여하는 주요 유전자로 알려져 있으며[33, 34], 이러한 유전자의 발현을 평가하는 것은 세포의 줄기세포

특성을 확인하는데 의미가 있다. 본 연구에서는 비록 적은 양이기는 하나 과잉치 치주인대에서 유래한 세포에서 Oct-4 와 Nanog의 발현을 관찰함으로서 줄기세포로서의 특성을 확인하였다.

본 연구에서는 또한 과잉치 치주인대세포에서 초기 간엽성 줄기세포 표지자인 STRO-1과 CD146이 발현됨을 확인할 수 있었다. STRO-1 및 CD146는 치주인대 조직 내에서 주로 혈관 주위에 있는 세포에서 발현된다고 알려져 있으며[25, 35] Nagatomo 등[12]은 일차 배양한 세포 표면의 STRO-1, CD105, CD166 등의 줄기세포 표지자의 발현을 통해 영구치 치주인대의 줄기세포 특성을 확인한 바 있다. 또한 Xu 등[18]은 영구치 치주인대세포에서 STRO-1과 CD146를 동시에 표면항원으로 가진 세포가 2.6%정도 있음을 밝혔으며 Gay 등[9]은 매복된 제3대구치의 치주인대에서 얻어진 세포에서 27%의 STRO-1 발현 세포가 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 과잉치 치주인대세포 내의 STRO-1을 발현하는 세포가 다소 높은 34.1%로 관찰되었다. 이는 일차 배양한 과잉치 치주인대 세포에서 간엽성 줄기세포가 많이 존재한다고 할 수도 있겠으나 계대수, 나이, 일차 배양 방법, 사용한 항체 등 다양한 실험 조건에 따라 발현하는 정도가 차이가 날 수 있기 때문에 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

일반적으로 중배엽 줄기세포의 다분화능(multipotentiality)은 원래의 유래 조직과 관련없는 세포로의 분화능력을 통해 검증되어 왔다[13, 36]. 앞서 언급한대로, 치아의 치주인대에는 다양한 종류의 세포가 존재한다고 알려져 있으나, 지방세포는 본래의 구성세포로는 보고된 바 없어 지방세포로의 분화를 관찰하는 것은 치주인대 줄기세포의 다분화적인 특성을 확인하는 의미가 있다고 할 수 있다. 본 연구에서는 지방세포로의 분화를 Oil red O 염색 및 지방세포로의 분화와 관련된 전사인자로서 분화 초기에 발현[37]되는

PPARγ2와 보다 후기에 발현[38]되는 LPL의 발현 증가를 통해 확인하였으며 이는 기존의 골수, 영구치 및 유치 치주인대 줄기세포를 대상으로 한 연구 결과와 상응하였다[9, 13, 14]. 그러나 골수 줄기세포에 비하여 과잉치 치주인대 줄기세포는 지방세포로의 분화능이 부족하였는데 이는 치주인대 줄기세포는 Song 등[25]의 연구 논문에서 언급된 바와 같이 그 유래가 원래 백악질, 골과 같은 경조직을 생성하는 전구세포로서 골수 줄기세포보다 좀 더 하위 수준의 줄기세포이기 때문인 것으로 생각된다.

한편 경조직 형성 세포로의 분화유도 결과 과잉치 치주인대 줄기세포와 골수 줄기세포 간에 경조직 형성 능력(Alizarin Red S 염색)에서는 큰 차이를 관찰할 수 없었으나 관련 유전자인 ALP의 발현이 과잉치 치주인대 줄기세포에서 골수 줄기세포보다 초기에 더 높게 나타남이 관찰되었다. 두 세포군의 이러한 차이는 세포의 증식능력의 차이에서 일부 기인했다고 추정할 수 있는데, 높은 증식능을 가진 중배엽 줄기 세포에서 골모세포와 관련된 유전자의 발현이 더 빠르게 나타난다는 기존의 연구 결과를 그 근거로 할 수 있겠다[39]. 본 연구에서는 비록 두 세포군간에 세포증식능에 대한 실험은 수행하지 않았으나 영구치 치주인대 줄기세포가 골수 줄기세포보다 빠른 증식을 보인다는 다른 실험결과를 토대로 볼 때 추정 가능할 것으로 보인다[9].

간엽성 줄기세포의 지방세포 혹은 골모세포로의 분화 조절은 PPARγ2, Wnt 경로, hedgehogs, Bone morphogenic proteins(BMPs) 경로 및 IGF, FGF 등의 인자들이 상호 관련을 주고 있으며 이러한 요소들은 지방세포로의 분화와 골모세포로의 분화를 서로 억제하기도 한다고 알려져 있다[40-44]. 본 연구결과를 통해 볼 때 과잉치 치주인대 줄기세포는 골수 줄기세포와 비교하였을 때 지방세포로의 분화보다는 경조직 형성 세포로의 분화가 더 잘 일어났는데 이는 세포 내에 골모세포로의 분화를 유도하는 인자들이 더 많은

영향을 주고 있는 상태 즉 골모세포로의 분화가 좀더 진행된 세포라는 추정이 가능할 것으로 보인다. 그러나 확실한 결론을 위해서는 세포 내 신호전달 경로를 탐색하는 등 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는, 과잉치의 치주인대에서 유래한 세포의 자가증식능, 배아줄기세포의 표지자인 Oct-4 와 Nanog 및 외배엽성 중간엽줄기세포의 표지자인 Nestin의 발현과 초기 중배엽 줄기세포 표지자인 STRO-1과 CD146의 발현, 지방세포 및 경조직 형성 세포로의 분화능을 관찰함으로써 과잉치의 치주인대에도 분화 가능하며 활용 가능한 성체줄기세포가 있다는 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 유치 및 영구치와 더불어 과잉치의 치주인대도 줄기세포의 공급원이 될 수 있음을 보여주는 것으로, 기존에는 술후 폐기되었던 과잉치를 줄기세포의 원천으로 활용할 수 있는 가능성을 넓혔다는 데에 그 의의가 있다고 할 수 있다. 향후 미성숙 과잉치의 치수, 치주인대와 더불어 치근 유두(apical papilla) 및 치낭(dental follicle) 조직도 줄기세포의 원천으로서 사용하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 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(2):278-94.

2. Yang Y, Schumacher A, Liu J, Shi X, Hill WD, Hu TC. Monitoring bonemarrow-originated mesenchymal stem cell traffic to myocardial infarction sites using magnetic resonance imaging. Magn Reson Med 2011.

3. Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. Tissue Eng 2006;12(11):3097-105.

4. Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. Cell Transplant 2010.

5. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(10):5807-12.

6. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs 2006;184(3-

4):105 - 16.
7. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod 2008;34(8):962 - 9.
8. Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. J Dent Res 2009;88(3):249 - 54.
9. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res 2007;10(3):149 - 60.
10. Zhou Y, Hutmacher DW, Sae - Lim V, Zhou Z, Woodruff M, Lim TM. Osteogenic and adipogenic induction potential of human periodontal cells. J Periodontol 2008;79(3):525 - 34.
11. Huang CY, Pelaez D, Dominguez - Bendala J, Garcia - Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. Regen Med 2009;4(6):809 - 21.
12. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res 2006;41(4):303 - 10.
13. Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. J Periodontol 2010;81(8):1207 - 15.
14. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al.

Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 2004;364(9429):149 - 55.
15. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. J Dent Res 2008;87(8):767 - 71.
16. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod 2008;34(2):166 - 71.
17. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. J Endod 2008;34(6):645 - 51.
18. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO - 1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev 2009;18(3):487 - 96.
19. Kim KH, Kim SH, Seol YJ, Lee YM. Stem cell properties of cells derived from canine periodontal ligament. J Korean Acad Periodontol 2007;37(3):479 - 88.
20. Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia - Godoy F, Murray PE, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. Cell Tissue Res 2010;340(2):323 - 33.
21. Primosch RE. Anterior supernumerary teeth - assessment and surgical intervention in children. Pediatr Dent 1981;3(2):204 - 15.
22. Huang WH, Tsai TP, Su HL. Mesiodens in the primary dentition stage:

a radiographic study. ASDC J Dent Child 1992;59(3):186 - 9.
23. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. J Oral Pathol Med 2008;37(9):571 - 4.
24. SY Ahn. Isolation and culture of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. Journal of Dental Rehabilitation and Applied Science 2009;25:191.
25. JS Song, SH Kim, SO Kim, BJ Choi. Characterization of stem cells obtained from the dental pulp and periodontal ligament of deciduous teeth,. Tissue Eng Regen Med 2010;7(5):575 - 82.
26. Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. Differentiation 2008;76(4):337 - 47.
27. Honda MJ, Nakashima F, Satomura K, Shinohara Y, Tsuchiya S, Watanabe N, et al. Side population cells expressing ABCG2 in human adult dental pulp tissue. Int Endod J 2007;40(12):949 - 58.
28. Lapsys NM, Kriketos AD, Lim - Fraser M, Poynten AM, Lowy A, Furler SM, et al. Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator - activated receptor gamma expression in human skeletal muscle. J Clin Endocrinol Metab 2000;85(11):4293 - 7.
29. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. J Cell Physiol 2008;215(3):743 - 9.

30. Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme - digested culture methods. Arch Oral Biol 2010.
31. Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I. Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. Tissue Eng Part A 2009;15(9):2625 - 36.
32. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, et al. Characterization of Stem Cells from Alveolar Periodontal Ligament. Tissue Eng Part A 2010.
33. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005;122(6):947 - 56.
34. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund - Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nat Biotechnol 2007;25(7):803 - 16.
35. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. J Periodontal Res 2006;41(6):547 - 53.
36. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. Cell 2004;116(5):639 - 48.
37. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue - specific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev 1994;8(10):1224 - 34.
38. Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker - Head C, Gimble JM, Kaplan

DL. Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. Biomaterials 2007;28(35):5280-90.
39. Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. Iowa Orthop J 1995;15:118-40.
40. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(9):3324-9.
41. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. Endocrinology 2002;143(6):2376-84.
42. Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, et al. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. J Cell Biol 1998;142(1):295-305.
43. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. Science 2005;309(5737):1074-8.
44. Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. J Cell Sci 2001;114(Pt 11):2085-94.

Abstract

Characteristics of stem cells derived from the periodontal ligament of supernumerary teeth

Ji-hyun Park, D,D,S.,

Department of Dental Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jae-ho Lee)

Human teeth have been identified as a new source of postnatal stem cells that have the capacities of self-renewal and multilineage differentiation. In this study we compared the characteristics of stem cells obtained from the periodontal ligament of supernumerary teeth (sPDLSCs) with those of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs), with the aim of extending the sources of stem cells.

We performed a colony forming unit–fibroblast (CFU-F) assay to evaluate the self-renewal ability of the cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and flow cytometry analyses were used to detect the expressions of various stem-cell markers: Oct-4, Nanog, Nestin, Stro-1, and CD146. The abilities of adipogenic and osteogenic differentiation were monitored by histochemical staining and quantitative RT-PCR.

The colony-forming efficiency was slightly higher for sPDLSCs than for BMMSCs (6.0% vs. 5.1%, respectively). The sPDLSCs expressed mRNA of Oct-4, Nanog, and Nestin, and presented surface proteins of Stro-1 and CD146 (34.1% and 84.8%, respectively). The sPDLSCs could differentiate to adipogenic lineage; however, the up-regulation of peroxisome-proliferator-activated receptor γ2 (PPARγ2) and lipoprotein lipase (LPL) gene expressions was less than for the BMMSCs. Osteogenic differentiation of the sPDLSCs was confirmed by up-regulation of alkaline phosphatase (ALP) and bone sialoprotein (BSP) gene expressions, but elevation of ALP gene expression was observed earlier than for the BMMSCs.

We have shown that sPDLSCs exhibit stem-cell properties such as self-renewal ability, expression of stem-cell markers, and differentiation into adipogenic and osteogenic lineages. This cell type could represent a good stem-cell candidate for use in regenerative medicine.

Key Words : supernumerary teeth, periodontal ligament, stem cells, differentiation, regenerative medicine