파골세포에 의한 골 흡수 흔적의 3차원적 분석.

연세대학교 대학원

의 공 학 과

이 승 학

파골세포에 의한 골 흡수 흔적의 3차원적 분석.

지도 윤 대 성 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 12월 일

연세대학교 대학원
의 공 학 과
이 승 학

감 사 의 글

2년 전 느꼈던 새로운 도전에 의한 설레임과 막연한 두려움, 그리고 배움에 대한 열정이 채 가시지도 않은 지금, 시간은 훌쩍 흘러 졸업이라는 커다란 문을 마주하게 되었습니다. 길지 않은 대학원 생활이었지만 많을 것을 보고, 듣고, 또, 느끼게 해 준 시간이었습니다. 이제, 2년간의 대학원 생활을 마감하며 졸업논문 한 귀퉁이에 감사의 마음을 담아봅니다.

입학하여 저에게 많은 기회를 주시고 믿음으로 지도해주신 윤대성 교수님, 이상우 교수님께 진심으로 감사드립니다. 저의 부족한 논문을 심사해주시고 마지막까지 지도해주신 김지현 교수님께 감사드립니다. 멀리서도 관심과 애정을 아끼지 않으신 권태윤 교수님께 감사드립니다. 또한, 학부와 대학원 과정동안 많은 가르침과 지혜를 주신 윤형로 교수님, 이윤선 교수님, 이경중 교수님, 김동윤 교수님, 윤영로 교수님, 신태민 교수님, 김법민 교수님, 김경환 교수님, 정병조 교수님, 임창환 교수님, 정용현 교수님, 서종범 교수님, 이용흠 교수님, 권기운 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

대학원 생활동안 서로 힘이 되어준 나노바이오시스템 연구실, 마이크로/나노시스템 연구실의 일원들에게도 감사를 표합니다. 동기로서, 친구로서 항상 힘이 되어준 상현이와 진우, 언제나 나를 아껴주고 격려해준 현정이누나, 후배로서, 부족한 선배인 나를 잘 따라준 휘헌이와 유찬이, 무슨 일이든 열심히 잘해내는 기환이, 엉뚱하지만 열정만큼은 당해낼 수 없는 규도, 항상 웃음을 주었던 범준이, 또한, 학부 연구생으로서 항상 열심히 하는 수호, 대산이, 인수 모두에게 감사를 전합니다. 그리고, 선배로서 항상 충고와 격려를 아끼지 않으셨던 대곤이형, 논문의 아이디어를 함께 구상했던 병관이형과 마지막까지 열심히 실험에 참여해줬던 옥희에게 감사의 말을 전합니다.

끝으로 지금이 있기까지 항상 뒷바라지 해 주시며 정신적인 버팀목이 되어주신 존경하는 아버지, 항상 나를 먼저 생각해주시고 믿어주신, 세상 가장 큰 사랑을 경험하게 해 주신 사랑하는 어머니, 동생을 항상 생각하며 아껴주는 누나와 매형 내외, 온 가족을 웃게 해주는 조카 지성이, 그리고 부족한 나를 믿으며 격려를 아끼지 않고 기다려준 사랑하는 빛나와 가족들에게 깊은 감사를 전합니다.

위에 미처 언급하지 못한 사랑하는 친구들과 모든 지인들에게 감사를 표합니다. 마지막으로 모두의 건강을, 특히 연세가 많으신 아버지의 만수무강과 몸이 아프신 어머님의 빠른 쾌유를 기원하며 감사의 글을 마칩니다.

2009년 12월

이 승 학 올림

차 례

그림 차례 ---------- ii
국문 요약 ---------- iii

제 1 장 서 론 ---------- 1

제 2 장 본 론 ---------- 4
2.1 실험 대상 ---------- 4
2.2 실험 장비 ---------- 6
2.2.1 Atomic Force Microscope ---------- 6
2.2.2 Confocal Microscope ---------- 8
2.3 재료 및 방법 ---------- 9
2.3.1 Isolation of Osteoclasts ---------- 9
2.3.2 Harvest of Osteoclasts ---------- 10
2.3.3 Pit Formation Assay ---------- 10
2.3.4 Atomic Force Microscope Experiment ---------- 11
2.3.5 Confocal Microscope Experiment ---------- 12

제 3 장 결 과 및 고 찰 ---------- 13
3.1 Volume Assay ---------- 13
3.1.1 Resorption Pit의 평균 체적 ---------- 13
3.1.2 Dentine Disk 당 평균 체적 ---------- 14
3.1.3 Resorption Pit의 평균 깊이 ---------- 15
3.2 파골세포의 Resorption Rate ---------- 16

제 4 장 결 론 ---------- 17

참고 문헌 ---------- 36
영문 요약 ---------- 39

그림 차례

그림 1 Bone remodeling procedure ---------- 19

그림 2 Bone resorption by osteoclast ---------- 20

그림 3 Atomic force microscope의 모식도 ---------- 21

그림 4 Confocal microscope의 모식도 ---------- 22

그림 5 Isolation, harvest, and formation procedure ---------- 23

그림 6 Osteoclasts observed by light microscope ---------- 24

그림 7 Osteoclasts stained with TRAP ---------- 25

그림 8 Osteoclasts stained with TRAP staining on the dentine disk -- 26

그림 9 Pits stained by toluidine blue ---------- 27

그림 10 Atomic force microscope tapping mode image ---------- 28

그림 11 Matlab plot of resorption pit ---------- 29

그림 12 Confocal microscope image ---------- 30

그림 13 실험 방법 ---------- 31

그림 14 Resorption pit의 일차별 평균 체적 ---------- 32

그림 15 Resorption pit의 일차별 평균 총 체적 ---------- 33

그림 16 Resorption pit의 평균 깊이 ---------- 34

그림 17 Resorption rate of osteoclast ---------- 35

국문 요약

파골세포에 의한 골 흡수 흔적의 3차원적 분석.

연세대학교 대학원

의공학과

이승학

본 논문은 파골세포의 골 흡수 작용을 정량적으로 측정할 수 있는 새로운 방법을 제시한다. 이 기술은 공초점 현미경의 3차원 이미지화 기법과 그 후에 이루어지는 체적 분석에 기초한다. 이 방법을 통해 파골세포의 골 흡수 작용에 의한 정확한 체적 변화량을 얻을 수 있다. 상아 시편의 체적 변화에 대한 정보는 파골세포의 골 흡수 작용을 이해하기 위한 통찰력을 줄 것이다.

핵심 되는 말 : 파골세포, 흡수, 공초점 현미경, 체적, 상아.

제 1장 서론.

인간의 수명이 연장되어감에 따라 범인류적인 노령화 사회로의 진입이 가속화되는 지금, 근래의 건강한 노후에 대한 관심 증진은 필연적인 결과라고 할 수 있겠다. 이에 따라, 연령이 증가하면 발생하긴 쉬운 골격계 관련 질병, 즉, 골염(osteitis), 골암(cancer of a bone), 골다공증(osteoporosis) 등의 질환에 대한 관심이 점점 증대되고 있다. 그 중에서도 골다공증은 골 조직의 밀도가 감소하는 질병으로, 골 조직의 밀도 감소는 골 조직의 부분적인 파괴, 즉, 뼈의 다공질화에서 기인한다. 이러한 현상은 골다공증이 심화되어감에 따라 더욱 심해지며, 결국 뼈의 전체적인 강성을 감소시켜, 외부로 부터의 작은 물리적 충격에도 쉽게 골절이 일어나게 한다. 이러한 골다공증은 최근 들어 더욱 많은 관심을 받고 있는데, 이는 골 기질(bone matrix)과 골세포(bone cell)가 노화된 고 연령층, 호르몬 분비의 균형이 무너진 폐경기 이후의 여성 등, 일반적인 잠재 환자에게서 뿐만 아니라, 청소년을 비롯한 젊은 연령대 에서도 발병한다는 데에 그 이유가 있다.

골다공증은 인체 내에서 이루어지는 bone remodeling과정에 이상이 생기면 발생할 수 있다. Bone remodeling이란, 골 조직의 생성과 파괴가 반복되는 현상으로, 골 조직의 불필요한 부분을 제거하고, 과도하게 파괴된 부분을 재생성을 통해 복구하는 일련의 과정이다. 본 연구에서 주목한 부분은 골 조직의 제거이며, 이 과정에는 파골세포(osteoclast)가 관여한다[1].

파골세포는 용골세포라고도 명명되며, 대식세포 중의 하나로, 인체에서 불필요한 뼈 조직을 제거하는 작용을 한다. 이와 반대로 인체에는 조골세포(osteoblast)도 존재하며, 이는 새로운 뼈 조직을 생성하는 역할을 한다. 정상적인 인간의 뼈 조직에서는 뼈 조직을 생성하는 조골세포와 뼈를 녹여 없애는 파골세포가 상호보완적으로 작용하며 골 조직의 생성과 제거를 반복한다. 만일 조골세포와 파골세포 중 어느 하나의 작용이 증진 혹은 억제되어 균형을 잃으면 골 관련 질환이 발생할 수 있는데, 조골세포의 활동이 억제되거나 파골세포의 작용이 증진되어, 생성되는 뼈 조직에 비해 파괴되는 뼈 조직의 양이 많을 경우 골다공증이, 이와 반

대의 경우에 골암이 발생할 수 있다.

파골세포는 골 조직을 파괴하여 뼈 표면에 삼차원적인 구멍을 형성시키는데, 이를 in vitro 에서 “resorption pit”이라 부른다[2]. 위와 같은 파골세포의 작용 때문에 골다공증에 관한 연구는 resorption pit의 크기와 깊이 등을 이용하여 그 흡수 정도를 규명해 왔다.

1995년, R. C.-Y. Cheung은 in vitro 상에서의 ethanol 농도가 resorption pit의 깊이를 증가시킨다는 내용의 연구를 발표하였다[3]. 2001년, Vilhelmiina Parikka는 폐경기 이후 여성의 체내 estrogen 농도 감소가 resorption을 증가시켜 골 조직의 밀도를 감소시킨다는, 즉, resorption pit의 깊이를 증가시킨다는 내용의 연구를 발표하였고[4], 2004년, M. J. Martin은 골 조직의 파골률을 결정하는 요소들을 변수로 modeling을 수행한 후, 시간에 따른 파골세포의 파골률이 감소하는 경향을 resorption pit의 깊이 변화로 나타내었다[5]. 이처럼, 파골세포에 의해 뼈의 표면에 생성된 resorption pit에 관한 연구에는 resorption pit의 깊이가 주된 평가 요소로 사용되어왔다. 그러나 뼈는 in vivo 상에서 면적과 깊이를 가지는 3차원적 구조를 가지고 있으므로 이를 깊이만으로 예측한다는 것은 부적절 하다고 할 수 있겠다. 또한, 골 조직에 생성된 resorption pit의 깊이는 pit 위에 존재했던 단일 파골세포의 활성도를 나타내기에는 적절하나, 골 조직 중 원하는 부분의 강성이 얼마만큼 감소하였는가를 판단하기에는 부적절 하다. 골 조직 도처에 존재하는 resorption pit의 깊이와 면적이 일정하지 않으므로, 깊이가 깊은 resorption pit도 면적이 좁으면 깊이는 얕지만 면적이 넓은 resorption pit보다 뼈의 강성 감소에 미치는 영향이 덜할 수 있기 때문이다. 하지만 깊이 대신 체적을 사용하면 전체 골 조직의 체적에서 줄어든, 즉, resorption pit의 생성으로 소실된 골 조직의 양을 정량할 수 있으므로, 골 조직의 부분적 파괴에 의한 골 밀도의 감소는 파괴 흔적의 깊이보다는 체적으로 정량화하는 것이 더욱 신뢰성 있다는 결론을 얻었다. 따라서 본 연구에서는 파골세포에 의해 파괴된 골 조직의 양을 측정하는 것에 주안점을 두었으며, 이를 위해서 골 조직이 파괴된 부분의 체적을 측정하여 시간에 따라 분석하였다.

본 연구에서는 파골세포에 의해 파괴된 골 조직의 체적을 측정하기위해 원자

간력 현미경(atomic force microscopy, AFM)과 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용하였다. 선행연구를 통하여 두 방법의 타당성여부를 검증하였다. 선행연구결과 원자간력 현미경보다는 공초점현미경이 골조직의 체적변화를 평가하기에 적절하다는 결론을 얻었다. 이후, 주차별 골조직의 resorption 평가는 공초점 현미경을 이용하여 수행하였다.

파골세포는 쥐의 bone marrow cell에서 얻었으며, 골 조직을 대신하여 dentine disk위에 seeding하고 resoption을 일으켰다. 체적은 공초점 현미경의 3차원 imaging 기법을 이용하였으며, 1주일 간격으로 분석하였다.

본 연구의 최종 목표는 시간에 따른 파골세포의 파골률을 구하는 것이었다. 각각의 일차별로 구해진 resorption pit의 체적을 이용하여 파골세포의 주차별 resorption rate을 구할 수 있었으며, 신뢰할 수 있는 데이터를 얻었다. 이 연구는 향후 골다공증뿐만 아니라 골암, 골염 등의 다른 골격계 질환의 연구에도 응용 가능할 것이며, 파골세포의 resorption에 대한 새로운 연구 방법을 제시하였다.

제 2장 본론.

2.1. 실험 대상.

Osteoclast and Bone Remodeling.

Bone remodeling이란 사전적 의미 그대로 골 조직이 생성되고 파괴되는 일련의 과정을 말한다. [그림 1]은 bone remodeling 과정의 간단한 모식도이다.

Bone remodeling의 과정은 크게 resting, resorption, reversal, formation의 4단계로 나눌 수 있다. 연속적인 과정이므로, 휴지기 (resting) 단계를 기준으로 삼겠다. Resting 단계는 한번의 bone remodeling 과정이 완료된 순간부터, 새로운 bone remodeling 과정이 시작하기까지의 단계를 말한다. 이 휴지기 이후에 새로운 bone remodeling과정이 시작되는데, 최초의 단계는 resorption이다. Resorption 단계는 본 연구의 소재인 파골세포가 관여하는 단계로, 불필요한 골 조직이 파괴되는 시점이다. 다음으로 reversal 단계를 거치는데, 이는 파골세포에 의해 파괴된 골 조직을 재생성하기 위한 단계를 준비하는 기간이다. 이 준비기간을 거친 후, 새로운 골 조직을 생성하는 formation 단계가 시작된다. 이 단계는 과도하게 파괴된 골 조직을 재생성을 통해 복구하는 단계이다. 이 일련의 과정은 골 조직이 파괴와 생성을 거듭하며 새로운 조직으로의 연속적인 교체를 겪게 되므로 bone remodeling이라 명명되었다.

파골세포는 대식세포의 일종으로, 단핵세포인 조골세포들의 융합으로 만들어지는 다핵세포이다. 조골세포에 관해서는 2000년에 Ducy et al. 에 의해 리뷰 되었다[6]. 이 연구에서는 조골세포와 반대의 기능을 가지는 파골세포의 기전, 즉, bone resorption에 관해서만 언급하도록 하겠다.

Bone resorption은 여러 단계에 걸쳐서 일어난다. 먼저, 파골세포가 골 조직위에 흡착한다. 흡착 이후, 파골세포는 뼈와 파골세포 사이에 외부와 차단된 공간을

형성 시킨다[7]. 파골세포가 골 조직을 흡수하기 위해 반드시 필요한 이 공간을 “matrix attachment” 또는 “sealing zone” 이라고 한다. 이 부분은 수많은 선형의 F-actin filament로 이루어져 있어 주름진 표면을 가지며, ring 형태를 띤다[8]. 하지만 sealing zone이 완벽하게 sealing zone과 외부환경을 분리시키는지, 혹은 integrin이 extracellular-initiated signal을 transmit하여 bone degradation을 촉진시키는지는 알려진 바가 없다[9]. [그림 2]는 bone resorption과정의 모식도이다. 이온 교환 채널을 통하여 HCO_3^- 와 Cl^-가 교환되고, 세포 속에 존재하던 H^+이온과 Cl^- 이온, cath K가 sealing zone으로 이동한다. Cath K는 세포 내 단백질 분해에 관여하는 효소이다. H^+이온과 Cl^-이온은 HCl을 형성하여 골 조직을 녹여 파괴시킨다.

2.2. 실험 장비.

2.2.1. Atomic Force Microscope.

Atomic force microscope(이하 AFM)는 scanning tunneling microscope(STM)을 기초로 제작된 장비로, scanning probe microscope(SPM)의 일종이다.

STM은 tip과 sample사이의 tunneling current를 이용하여 sample을 imaging하는데, tunneling current를 이용하여 sample을 imaging하기 위해서는 sample 표면이 도체로 코팅되어야 한다는 단점이 있다. 이러한 한계를 극복한 장비가 바로 AFM이다. AFM은 bio-sample등의 부도체도 imaging할 수 있는데, 그 원리는 다음과 같다. 하단부에 날카로운 tip이 있는 micro size의 cantilever로 imaging하고자 하는 sample 표면을 scanning하여 tip과 sample사이에 발생하는 interaction을 감지한다. Tip이 sample에 점점 가까워지면 둘 사이의 Wan Der Waals force에 의해 cantilever가 deflection하게 되고(Hook's Law), cantilever에 조사되고 있던 laser가 반사되어 상이 맺히는 지점이 변화하게 된다. 이 변화된 위치를 position sensitive photo detector(PSPD)가 감지하여 recording한다. AFM에서는 set point라는 parameter를 이용하여 tip과 sample 사이의 거리를 유지시키는데, 이 때 사용되는 것이 sample하단에 있는 piezoelectric scanner이다. Piezoelectric scanner의 높낮이, 즉, tip과 sample 사이의 거리에 변화를 주어 tip과 sample 사이의 interaction을 일정하게 유지시킨다. 이렇게 변화한 각각의 data point에서의 높낮이를 전체적으로 mapping한 것이 sample 표면의 높이, 즉, height image가 된다[그림 3]. AFM의 imaging technique에는 contact mode, non-contact mode 그리고, tapping mode의 3가지가 있다. Contact mode는 tip과 sample 사이의 반발력이 우세한 지역에서 이루어진다. 이 mode는 위에서 언급한 세 가지 mode 중에서 가장 높은 해상도를 보이지만, tip과 sample의 접촉으로 인해 sample이 물리적으로 손상을 입을 수 있다는 단점이 있다. 이와 반대로, non-contact mode는 tip과 sample 사이의 인력이 우세한 지역에서 수행되며, tip과 sample이 직접 접촉하지

않으므로 sample의 물리적 손상을 방지할 수 있다. 하지만 contact mode보다 해상도가 낮다는 단점이 있다. 이 두 가지 mode의 장점을 취하고 단점을 보완한 것이 tapping mode 이다. Tapping mode는 jumping mode 혹은 dynamic mode라고도 불리며, 위의 두 가지 방법과는 달리, cantilever의 resonant frequency를 이용한다. Cantilever에 일정한 전압을 주어 resonant frequency로 상하 oscillating하게하고, 이를 sample에 가까이 가져가면 tip과 sample의 interaction에 의해 resonant frequency에 shifting이 일어난다. 이 때, cantilever는 상하 방향의 oscillation에 의해 매우 짧은 시간동안 sample에 접촉하게 되어, sample의 손상을 최소화 하면서도 해상도를 높일 수 있다. 하지만, cantilever의 resonant frequency를 이용하므로, 액상에서 사용할 때, 물의 Q-factor, 즉 viscosity 때문에 정확한 frequency의 shifting을 관찰하기 어려운 단점이 있다. 그러므로 AFM을 이용하여 실험을 진행할 때에는 imaging하고자 하는 sample의 특성에 따라 적합한 mode와 cantilever를 선택하는 것이 중요하다. 본 연구는 초기 단계에 AFM을 이용하여 실험을 진행하고자 하였으나 여의치 않아, 공초점 현미경을 이용하였으며, 그 이유는 후반부에 다시 언급하도록 하겠다.

2.2.2. Confocal Microscope.

Confocal microscope는 공초점 현미경이라 불리며, laser에서 조사된 일정파장의 빛이 시료에 닿고 그에 의해서 excitation되어 emission되는 빛이 confocal aperture를 통과하여 detector에 닿는 원리를 이용한다. 공초점 현미경의 원리는 1957년 Minsky에 의해 일찍이 발표되었으나[10], 이 방법이 최초로 적용된 것은 그로부터 10년 후 이다. 1967년에 Egger와 Petran은 이 방법을 사용하여 염색되지 않은 신경조직을 관찰하였다[11]. 이것은 초점이 맞지 않는 emission light를 confocal aperture(iris, pinhole)라는 조리개를 통하여 차단시키므로 초점이 일치하는 부분의 빛만을 detector가 받아들여 contrast 차이를 증가시킴으로 전체적인 resolution의 향상을 나타내게 된다. 이 기술은 point source로부터 나오는 광을 사용해서 시료의 초점과 detector pinhole 상의 초점을 일치시켜 (CONFOCAL, 공초점) 초점면 이외의 부분은 현미경 상에 나타나지 않도록 한다. 그러나 point source로 부터 나온 광원은 detector pinhole을 지나 상을 형성하는 과정에서 대부분의 빛을 소모하기 때문에 광원이 아주 밝아야 되거나, 시료 자체가 상당한 형광을 발해야만 되는 단점이 있다. 결국 광원으로 laser를 사용하게 되었고, point source에 의해 시료 전체를 scanning 해야 하므로 scanning 속도를 향상시키기 위해 beam steering method가 개발되었다. 또한 computer-controlled motor-driving focusing system을 응용함으로써 automatic optical sectioning이 가능하게 되어 삼차원 image의 구성이 용이하게 되었다. [그림 4]는 공초점 현미경의 모식도이다.

기본적으로 공초점 현미경은 (1) laser source, (2) source pinhole, (3) detector pinhole, (4) detection part (photo multiplier tube, PMT), (5) dichromatic mirror, (6) objective lens 및 (7) sample stage로 구분할 수 있다. Laser part는 용도에 따라 다양하게 구성할 수 있다. 본 연구에서는 [그림 4]에서 나타낸 바와 같이 개별적 focal plane을 이미지한 후, 중첩하여 3차원 이미지를 구성, sample의 체적을 측정하였다.

2.3. 재료 및 방법

[그림 5]는 파골세포를 isolation, harvest하고, resorption pit을 formation 하는 과정의 간단한 모식도이다. 아래의 과정은 본 대학원의 세포 및 조직 기계생물학 연구실의 도움을 받아 시행하였으며, 아래는 각각의 과정에 대한 설명이다.

2.3.1. Isolation of Osteoclasts

10주에서 14주령 수컷 쥐의 경골과 대퇴골에서 bone marrow cell을 채취하였다. 연결조직을 제거하고, 마지막에 뼈를 제거, PBS (Phosphate Buffered Saline)에 넣었다. 뼈 말단의 marrow cavity는 alpha-MEM과 20 ml syringe를 이용하여 씻어주었다. Bone marrow cell 현탁액은 1,500 rpm 으로 5 분 동안 원심분리 하였다. 세포들은 complete media (89 % Alpha-MEM, 10 % FBS (Fetal Bovine Serum))와 1 % P/S (Penicillin / Streptomycin)가 보충된 50 ng/ml 의 M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor)로 처리하였다. 이후, 세포들은 100 mm cell culture dish (3X108 cells / 100 mm dish)에 보관하였다[그림 6]. 세포들은 3일 동안 배양되었으며, 비접착세포들은 pipetting을 이용하여 완전히 제거하였다. Macrophage에 특징적으로 반응하는 접착세포들을 M-CSF-dependent bone marrow macrophages라고 부른다. 세포들은 50 ng/ml 의 sRANKL(soluble Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand)과 50 ng/ml 의 M-CSF에서 다핵세포들의 형성을 위해 6일간 배양하였다. Medium 은 2일에서 3일 주기로 교체하여 주었다[12, 13, 15]. 파골세포들을 식별하기 위해 세포들은 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), leukocyte acid phosphatase staining kit (Sigma-Aldrich Kit 387-A)를 이용하여 염색하였다. [그림 7]은 TRAP를 이용해 염색한 파골세포의 모습을 10배 광학 현미경으로 관찰한 모습이다[14].

2.3.2. Harvest of Osteoclasts.

자연 상태의 파골세포는 순도가 2 %에서 3 %정도이므로 추가적인 정제과정이 반드시 필요하다.

Medium을 제거한 sample을 칼슘이온과 마그네슘이온이 없는 PBS로 3차례 washing 시켰다. 그 후, 0.02 % EDTA를 넣고 37 ℃ 에서 20분간 배양했다. EDTA를 제거하고 칼슘이온과 마그네슘이온이 없는 PBS로 교체하였다. 마지막으로, 파골세포들을 정제하여 cell culture dish에 넣어주었다. Cell scraper를 이용하여 접착세포들을 제거하였다. 균일한 세포의 위치적 분산을 위해 피펫을 이용, 휘저어 주었다[18, 19].

2.3.3. Pit Formation Assay.

파골세포를 dentine disk (직경 5 mm diameter, 두께 0.33 mm)위에 seeding 하면, 인체에서와 동일한 방법으로 pit이 생성된다. Pre-warm을 위하여 dentine disk를 0.1 ml 용량의 96-well plate에 medium과 함께 2시간 동안 넣어둔다. 각각의 well에는 50 ng/ml 의 M-CSF와 50 ng/ml 의 sRANKL을 포함한 medium이 들어있으며, 여기에서 각각 7일, 14일, 그리고 21일간 37 ℃의 배양기 안에서 배양한다.

Dentine disk들은 formalin 용액에서 10분 동안의 고정 과정을 거치며, washing과, TRAP staining(Sigma-Aldrich TRAP staining Kit)을 7일, 14일, 그리고 21일간 해 준다. [그림 8]은 dentine disk 위에 있는 파골세포들을 TRAP 염색한 모습이다. 마지막으로, 공초점 현미경으로 pit을 촬영하기 위해 세포를 제거 (1M NH_4OH용액을 사용) 하고 toluidine blue를 이용하여 pit을 염색하였다 [그림9][20, 21]. 마지막으로, 광학 현미경를 사용하여 각각의 dentine disk 위에 있는 resorption pit을 관찰하였다[16, 17].

2.3.4. Atomic Force Microscope Experiment.

실험을 위해 처음 사용한 장비는 atomic force microscope(AFM, Veeco, Multimode Picoforce, Nanoscope V Controller.)였다. 앞에서 소개한 대로 이 장비는 샘플 표면의 topology를 구할 수 있다, 따라서 resorption이 일어난 dentine disk를 AFM으로 imaging 하였다. 생성된 resorption pit 때문에 sample의 높낮이 차이가 심할 것으로 예상하여 cantilever의 과도한 deflection을 방지하기 위해 tapping mode를 사용하였으며, 800 mV setpoint, 200 mV driving amplitude, 0.3 Hz의 scan rate, 512 samples/line, 256 lines, 그리고, 57.3 ㎛ X 57.3 ㎛ image scale의 조건으로 imaging 하였다[그림 10]. 다음으로, topology data를 ASCII code로 export하여 matlab 프로그램을 이용, 원하는 부분만 잘라낸 후 plot하였다[그림 11]. AFM topology data는 각각의 data point의 높이로 export 되며, 이 data 중에서 원하는 부분을 matlab으로 분리할 수 있다. 이미지의 총 넓이는 57.3 ㎛ X 57.3 ㎛ = 3,283.29 $㎛^2$이며, data point의 개수가 512 X 256 = 131,072개 이므로, 하나의 data point의 면적은 3,283.29 $㎛^2$ ÷ 131,072 = 0.025 $㎛^2$이다. 이 넓이와 각 point의 높이를 서로 곱해주고 원하는 data 구간을 체적분 하면, 파골세포에 의해 침식이 일어난 부분의 체적을 구할 수 있다. 이러한 방법으로 시간에 차이를 두어 제작한 sample을 imaging하고 분석하면 파골세포의 시간에 따른 파골률을 정량적으로 측정할 수 있을 것으로 예상하였으며, sample은 사람의 뼈 대신 상아 시편(dentine disk)을 이용하였다. 위와 같은 방법으로 실험을 진행하려 하였으나, image를 얻는 것이 쉽지 않았다. 첫 번째로, AFM의 최대 image scale은 60 ㎛ X 60 ㎛를 넘지 못하므로 크기가 큰 resorption pit을 imaging 하기에는 무리가 있었다. 두 번째로, cantilever의 tip은 제조사의 specification상으로 최저 2 ㎛에서 최대 8 ㎛ 의 높이를 가지므로, 깊이가 8 ㎛을 넘는 resorption pit을 imaging 하기에는 부적합하다는 판단을 내렸다. 따라서 본 연구에서는 3차원 imaging이 가능한 공초점 현미경을 이용하기로 하였다.

2.3.5. Confocal Microscope Experiment.

공초점 현미경을 이용하여 in-vitro상에서 만들어진 resorption pit을 3차원적으로 imaging하였다. 사용한 장비는 Call Zeiss 사의 LSM 5 PASCAL confocal microscope이다. Dentine disk 위에서 각각 7일, 14일, 21일간 파골세포를 배양하여 sample을 제작하였으며, 일차별로 각각 6개씩의 dentine disk를 준비하였다(7일차 : s1-s6, 14일차 : s1-s6, 21일차 : s1-s6). [그림 12]는 일차별로 얻은 공초점 현미경 image이다.

[그림 12]에서 control, 7일차, 14일차 그리고 21일차의 이미지는 각각 20배, 150배 50배 그리고 20배의 배율로 촬영 하였다. Control은 dentine disk자체에 기본적으로 존재하는 roughness를 제외하면 resorption에 의한 병변(resorption pit)을 관찰할 수 없으며, 7일차, 14일차, 21일차로 갈수록 resorption pit의 크기와 깊이가 늘어남을 알 수 있다. [그림 9]에 실제 실험 방법을 그림으로 나타내 보았다.

[그림 13]과 같이, 실험의 기본 원리는 resorption이 일어나지 않은 control dentine disk의 체적을 구하고, resorption이 일어난 dentine disk의 체적을 빼주는 것이다. 이렇게 하여 resorption pit만의 체적을 구할 수 있었다. 하지만 [그림 8]에서 나타난 것처럼 resorption이 일어나지 않은 dentine disk에도 불균일한 roughness가 존재한다. 따라서 본 연구에서는 control dentine disk 30개의 평균 체적을 구하여 resorption pit이 있는 부분을 빼 주었다. 물론, 깊이와 image size는 동일하게 맞추어 주었다.

제 3장 결과 및 고찰.

3.1. 체적 Assay.

3.1.1. Resorption Pit의 평균 체적.

[그림 14]는 일차별로 가장 큰 체적을 가지는 resorption pit의 평균 체적을 나타낸 그래프이다. 7일차에 형성된 resorption pit은 평균 약 176,754 μm^3, 14일차에는 약 580,892 μm^3, 그리고 21일차에는 약 888,106 μm^3의 체적을 각각 나타내었다. 이 값들은 각각 10개의 resorption pit으로부터 얻은 결과이며, 각각의 데이터 값에는 error bar를 나타내었다. Error bar의 범위가 넓은 것은 앞에서도 언급했듯이 파골세포가 다핵세포인 점에서 기인한다. 파골세포는 단핵세포인 조골세포들의 융합으로 이루어진 다핵세포인데, 이 때, 정해진 수의 단핵세포가 모여 융합을 이루는 것이 아니라 불규칙한 수의 세포들이 융합하여 다핵세포를 이룬다. 즉, 형성된 파골세포의 크기는 일정하지 않으며, 이에 따라 파골세포가 형성한 resorption pit의 크기도 일정하지 않다. 실제로 본 연구의 실험에서는 일차별로 30개의 resorption pit를 imaging 하였으나, 체적의 변화가 심하여 가장 균일한 체적을 가지는 resorption pit 10개의 체적값을 이용하여 데이터를 분석하였다.

[그림 14]에 나타난 것과 같이 7일까지는 평균 약 176,754 μm^3의 체적을 가지는 resorption pit이 형성되었고, 14일차 까지는 약 404,138 μm^3의 골 조직이 더 파괴되었으며, 14일에서 21일까지는 307,214 μm^3의 체적이 더 파괴되었다. 처음 7일차 까지는 파골세포가 dentine disk를 흡수하기위한 준비를 하는 기간, 즉, 앞에서 언급한 resting 단계가 존재하므로 resorption된 체적이 작은 것으로 추정된다.

이러한 경향은 선행된 연구에서도 나타났다. 2004년 M. J. Martin은 골 조직의 파괴를 시뮬레이션 하였는데, resorption이 일어나는 기간을 골 흡수량에 따라 phase Ⅰ, Ⅱ로 나누었다. Phase Ⅰ에서 보다 phase Ⅱ에서의 골 흡수량이 줄어드는

경향을 나타내었다[5]. M. J. Martin의 연구는 골 조직의 흡수정도를 나타내기 위해 resorption pit의 깊이를 이용하였으며, 체적을 이용한 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보이는 것으로 보아 본 실험의 타당성을 입증해 주었다고 판단되었다. 또한, 이 같은 경향은 앞으로 언급할 dentine disk 당 평균 체적, 깊이, resorption rate에서도 공통적으로 나타났다.

3.1.2. Dentine Disk 당 평균 체적.

[그림 15]는 각각의 일차별로 imaging한 6개의 dentine disk중, 가장 균일한 체적의 resorption pit들이 형성된 2개의 dentine disk를 선별하여, 평균 체적을 나타낸 것이다.

[그림 15]를 보면, 각각 일차별로 선별한 2개의 dentine disk에서 관찰된 resorption pit의 평균 총 체적이 일차별로 각각 209,409 μm^3, 747,551 μm^3, 944,041 μm^3을 나타내어, 이번 실험에서도 [그림 14]의 결과와 같이, 시간이 지나며 체적의 감소가 줄어드는 경향을 확인할 수 있었다. Resorption pit 하나의 평균 체적을 이용하여 분석한 결과에서 나타난 경향이 dentine disk 위에 있는 모든 resorption pit의 총 체적에서도 나타나는 것으로 보아, 앞 절의 결과와 더불어 실험의 타당성을 입증해 주었다 판단하였다. 다음 장에서는 앞에서 언급한 경향이 M. J. Martin[5]이 사용한 깊이를 이용한 분석에도 적용되는지 검증하겠다.

3.1.3. Resorption Pit의 평균 깊이.

본 연구에서 수행한 실험 방법의 유효성을 검증하기 위해 깊이를 이용하여 실험한 연구와 비교해 보고자 이번 실험을 진행하였다. [그림 16]은 일차별로 형성된 resorption pit의 평균 깊이와 error bar를 그래프로 나타낸 것이다. 7일, 14일, 21일차별로 각각 평균 2.42 ㎛, 10.43 ㎛, 14.16 ㎛ 깊이의 resorption pit이 형성되었다. 7일에서 21일로 진행하며 error bar의 범위가 점점 증가함을 알 수 있는데, 이는 파골세포의 활성도의 차이에서 비롯된 것으로 보인다. 7일차에는 dentine disk 위에 존재하는 파골세포들의 활성도가 거의 비슷하여 큰 error를 보이지 않으나, 시간이 지날수록 활성도가 약해지는 파골세포가 생겨 이 같은 error를 나타내는 것으로 추정된다. 앞선 실험들에서 나타났던 현상과 마찬가지로, 이번 실험에서도 시간이 지날수록 깊이의 증가율이 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Seeding 초기에서 7일까지는 약 2.42 ㎛ 깊이의 resorption pit이 형성되었고, 7일부터 14일 까지는 8.01 ㎛ 깊이의 dentine이 더 파괴되었으며, 14일에서 21일 까지는 3.73 ㎛ 깊이의 dentine이 더 파괴되었다. 2004년 M. J. Martin이 주장한 시간에 지남에 따른 resorption pit의 깊이 감소 경향이 본 실험에서도 나타났으며[5], 체적을 이용하여 분석한 결과에서도 동일하게 나타나는 것으로 보아, 이러한 유사성이 본 연구의 타당성과 실험 방법의 실효성을 입증하는 결과라고 판단하였다.

3.2. 파골세포의 Resorption Rate.

마지막으로 본 연구의 최종 목표였던 파골세포의 resorption rate을 구해보았다. 7일에서 14일까지의 7일간은 가장 많은 양의 체적이 파괴되었는데, 이 기간이 파골세포의 활동이 가장 활발했던 것으로 나타났다. 또한, 14일에서 21일까지의 7일간은 7일에서 14일까지 보다 더 적은 체적의 dentine disk가 파괴되었다. 이러한 경향으로 추정해볼 때, 21일차 이후의 더 오랜 기간 동안 실험을 진행해 보면, 그래프는 점차 x축과 평행에 가까워지는, 즉, 파골세포의 활성도가 떨어지는 경향을 보일 것으로 예상해 볼 수 있다. 또한, 파골세포의 골 흡수율이 시간에 따라 줄어들 것을 예상할 수 있으며, 그 값은 1주차, 2주차, 3주차별로 각각 25,251 μm^3/day, 57,734 μm^3/day, 43,888 μm^3/day이 된다. 이 값을 [그림 17]에 그래프로 나타내었다.

제 4장 결론.

본 연구는 지금까지 수행되지 않았던 resorption pit의 체적과 파골세포의 파골률 분석을 목표로 진행되었다. 서론에서도 언급 했듯이, 3차원적 형태를 가지는 재료를 넓이와 깊이의 개념만으로 분석한다는 것은 오류라는 관점, 그리고 깊이보다는 체적을 이용하여 분석할 때 전체적으로 줄어든 골 조직의 양을 추정하기 용이하여, 뼈의 강성을 알아보기에 적합하다는 점을 염두에 두고 연구를 진행하였으며, 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

최초로 계획했던 실험 장비는 AFM이었다. 하지만 imaging size의 협소함과 resorption pit 자체의 깊이가 cantilever tip의 길이를 넘어서는 문제로 공초점 현미경을 사용하는 것으로 계획을 수정하였다. 하지만, AFM의 다양한 application으로서의 활용도를 생각해볼 때, 차후에 꼭 진행되어야 할 연구라는 생각에 아쉬움이 남았다.

처음 파골세포가 dentine disk에 seeding된 이후부터 7일차 까지는 7일차에서 14일차까지 보다 더 적은 양의 골 조직이 파괴된 것을 알 수 있는데, 이는 처음 파골세포가 골을 파괴하기 시작하기까지의 준비기간, 즉 resting 기간이 포함되어 있기 때문인 것으로 추정된다. 7일차부터 14일차 까지는 파골세포의 골 파괴 작용이 가장 활발했던 것으로 나타났으며, 14일차부터 21일차 까지는 골 조직의 파괴가 감소했던 것을 알 수 있었다. 이는 시간이 지남에 따라 파골세포의 활성도가 점점 약화되어가는 것을 의미한다. 이러한 결과는 본 연구에서 진행한 resorption pit 하나의 평균 체적, dentine disk 하나에 생성된 resorption pit들의 평균 총 체적, resorption pit의 평균 깊이, 그리고 선행되어진 연구에서 공통적으로 나타나는 경향으로, 시간이 지남에 따라 골 흡수율이 줄어듦을 보여주었다. 이 결과를 토대로 이 연구의 최종 목표였던 파골세포의 resorption rate을 구해보았으며, 그 결과는 앞서 언급한 결과를 뒷받침해주고 있었다. 본 연구는 파골세포의 골 조직 흡수 정도를 분석하는 방법으로 체적을 사용하는 새로운 방법을 제시 하였으며, 예

상했었던 경향의 결과를 얻었다. 향후, 각각의 dentine disk에 생성된 resorption pit의 수와 위치, dentine disk 위에 seeding된 파골세포의 개수 등을 정확히 알 수 있다면 더욱 정밀한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다. 또한, resorption pit의 넓이와 깊이 사이의 관계를 규명함으로써, 파골세포의 활성도를 예측해 볼 수 있을 것이다.

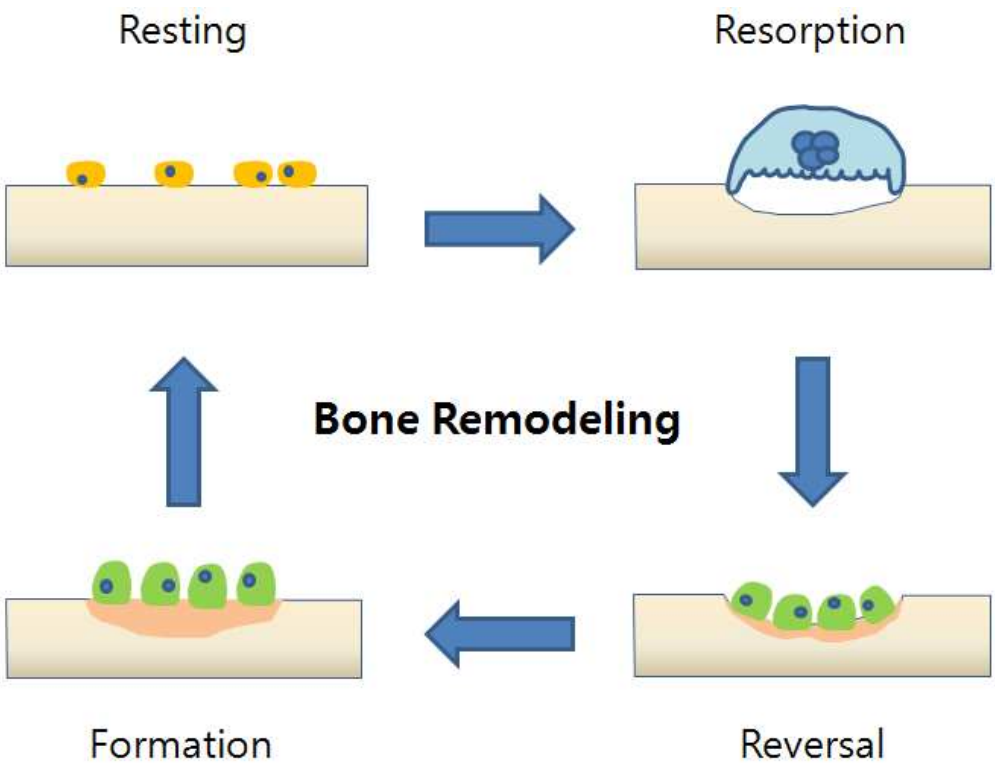


그림 1. Bone remodeling procedure. 좌상 : Resting, 우상 Resorption, 우하 : Reversal, 좌하 : Formation.

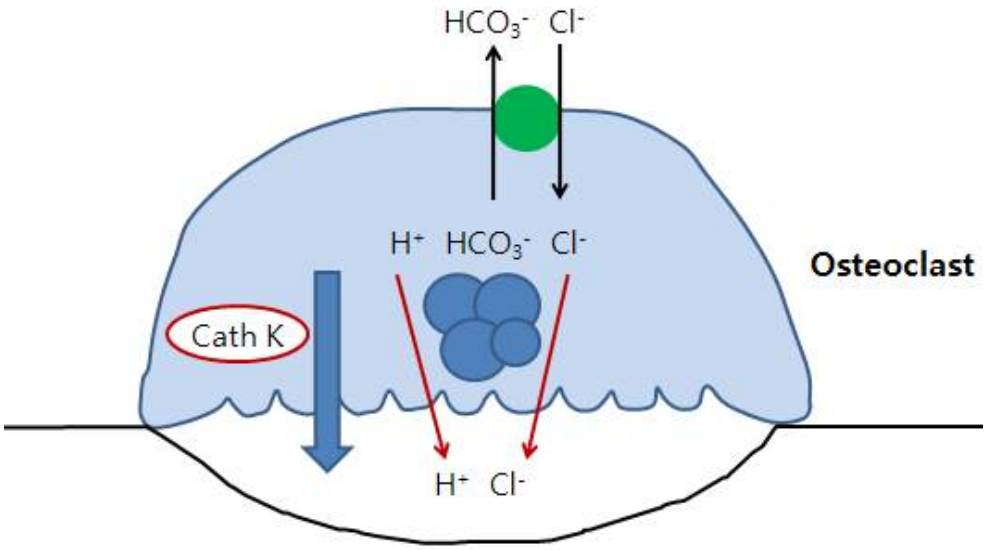


그림 2. Bone resorption by osteoclast. 이온 교환 채널을 통하여 HCO_3^- 와 Cl^-가 교환되고, 세포 속에 존재하던 H^+이온과 Cl^- 이온, cath K가 세포 하단으로 이동한다. H^+이온과 Cl^-이온은 HCl을 형성하여 세포를 녹이게 된다.

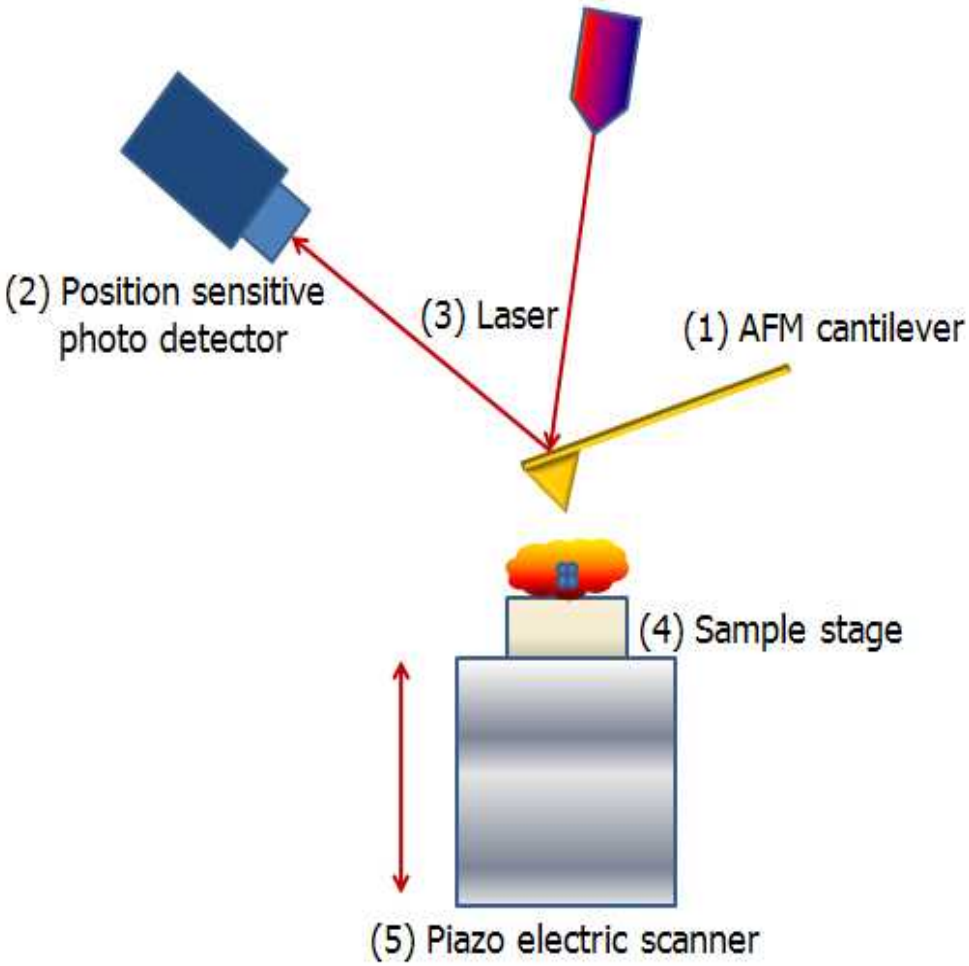


그림 3. Atomic Force Microscope의 모식도. (1) AFM cantilever, (2) Position sensitive photo detector(PSPD), (3) Laser, (4) Sample stage, (5) Piezoelectric scanner.

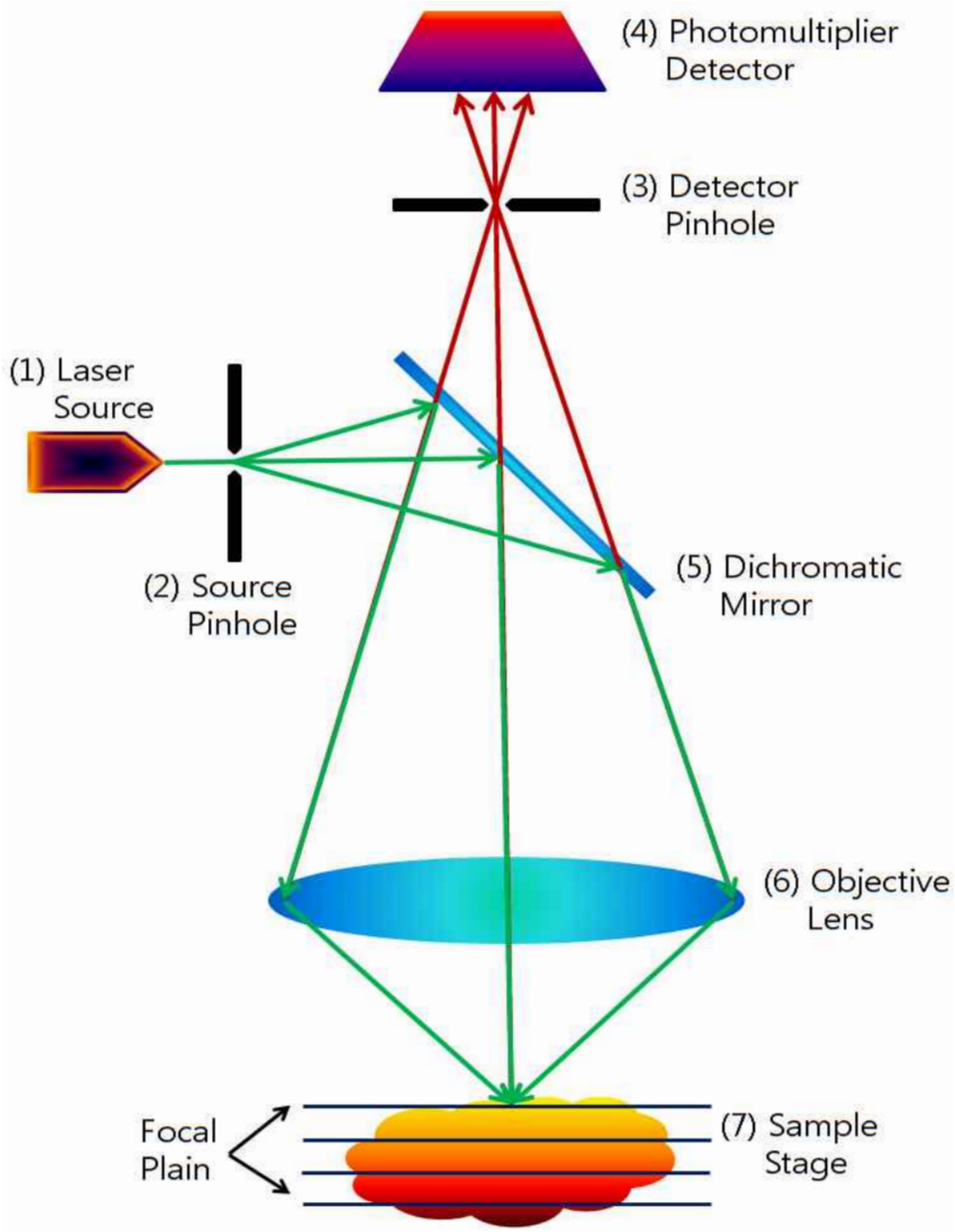


그림 4. Confocal microscope의 모식도. (1) Laser source, (2) Source pinhole, (3) Detector pinhole, (4) Detection Part (PMT), (5) Dichromatic mirror, (6) Objective lens, (7) Sample stage.

그림 5. Isolation, harvest, and formation procedure. 쥐의 marrow cell로부터 M-CSF, RANKL을 이용하여 파골세포를 isolation한 후, 이를 dentine dik 위에 seeding, 각각 7일, 14일, 21일간 배양한다. TRAP 염색을 통해 resorption pit의 생성을 확인, 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

(사진출처 : 연세대학교 세포 및 조직 기계생물학 연구실.)

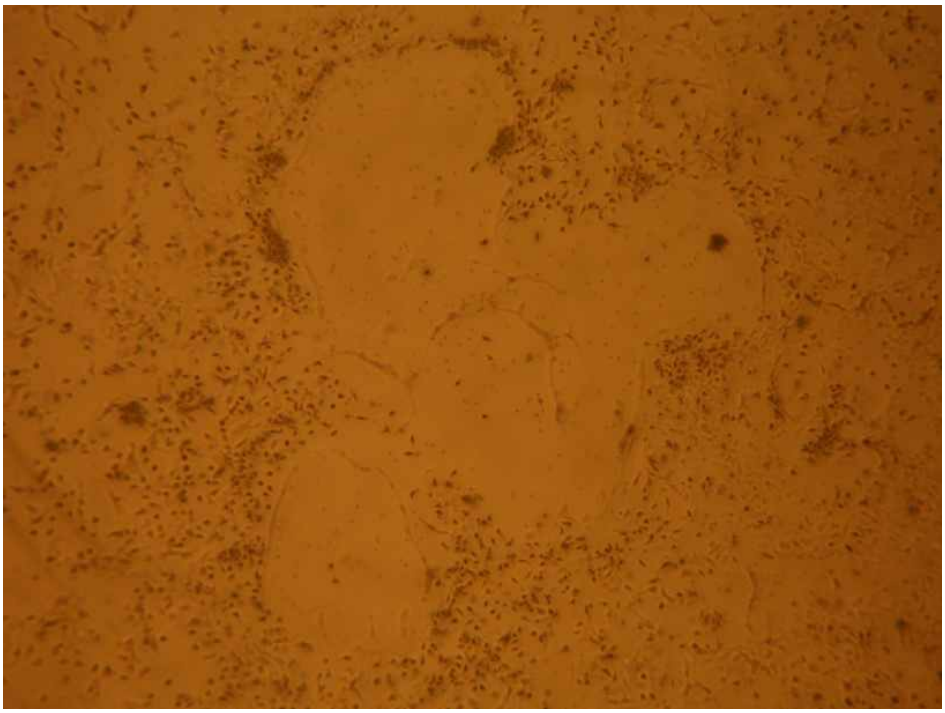


그림 6. Osteoclasts. observed by light microscope, (x4).

(사진출처 : 연세대학교 세포 및 조직 기계생물학 연구실.)

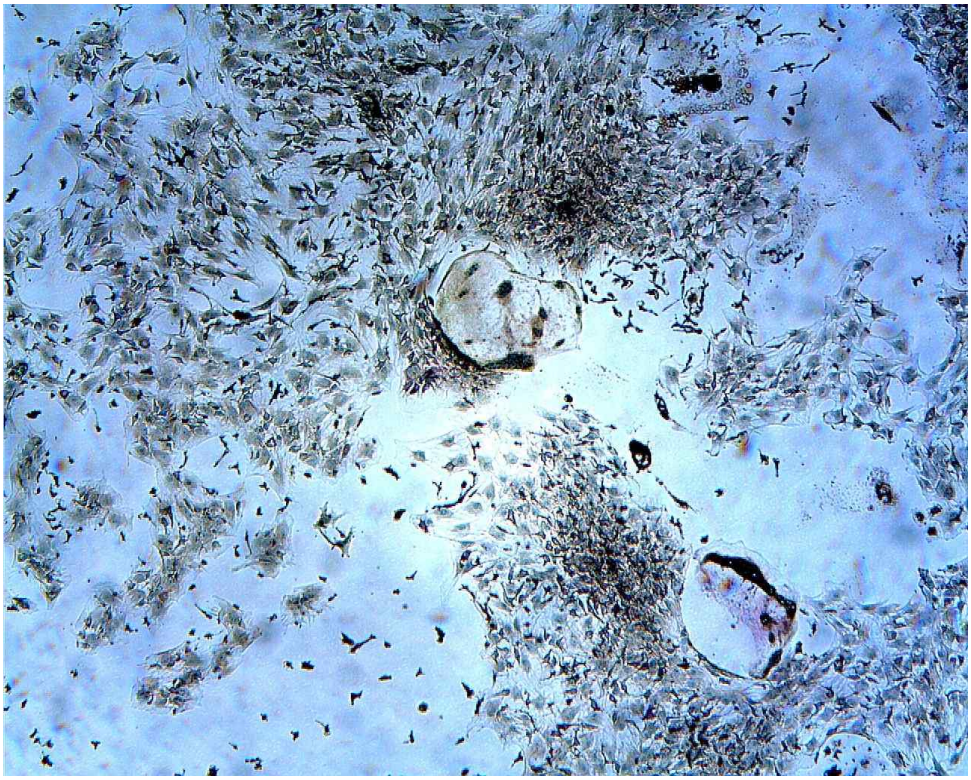
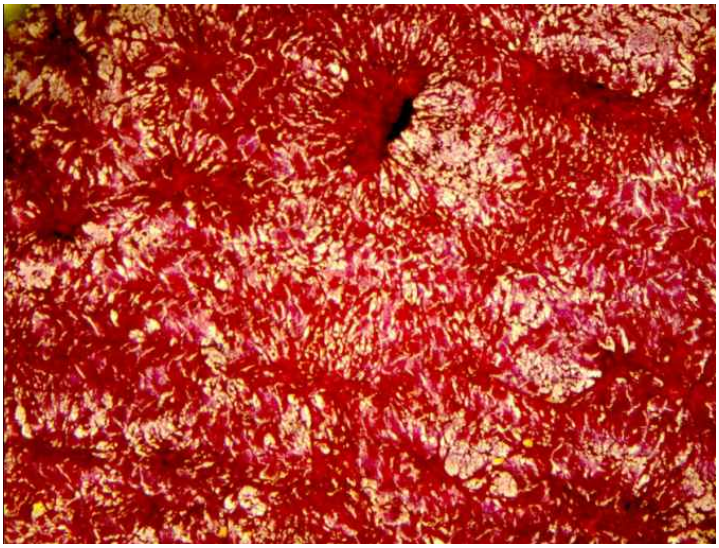


그림 7. Osteoclasts stained with TRAP (x10).
(사진출처 : 연세대학교 세포 및 조직 기계생물학 연구실.)



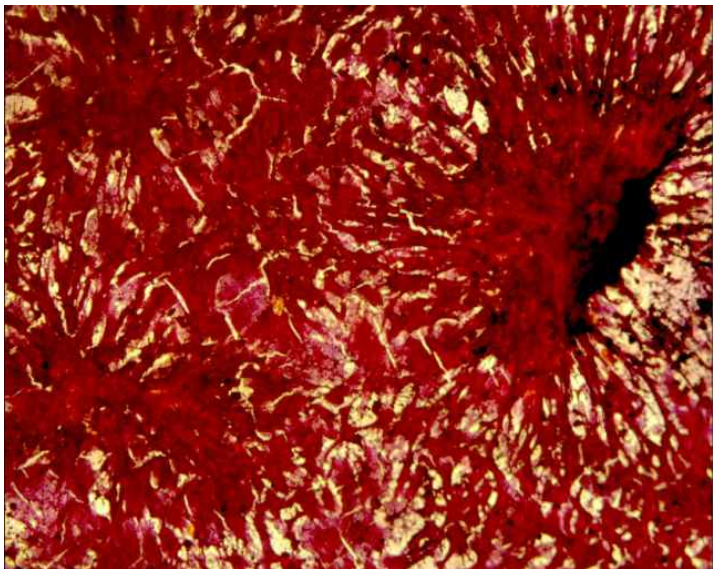


그림 8. Osteoclasts stained with TRAP staining on the dentine disk. 상 : x4, 하 : x20.
(사진출처 : 연세대학교 세포 및 조직 기계생물학 연구실.)

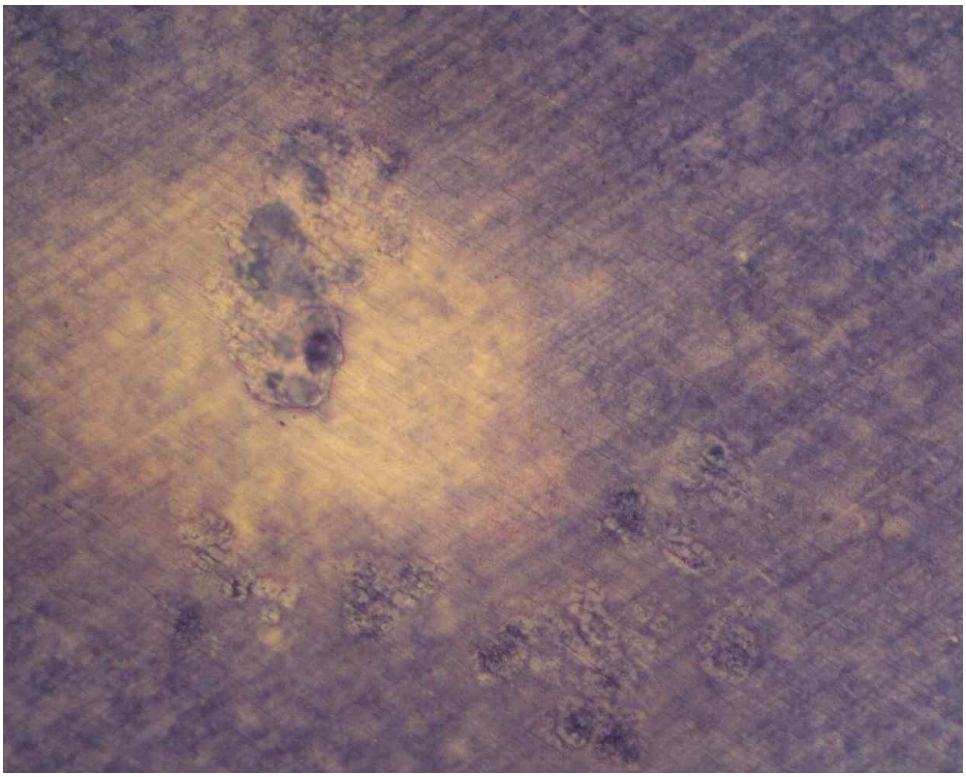


그림 9. Pits stained by toluidine blue; Upper : x10.
(사진출처 : 연세대학교 세포 및 조직 기계생물학 연구실.)

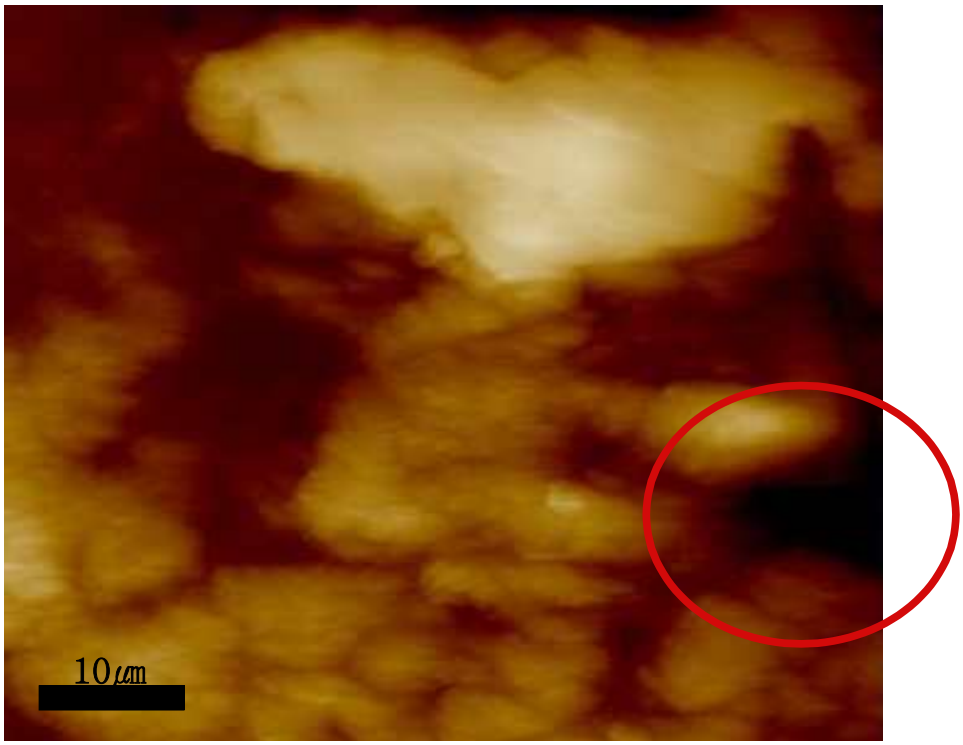


그림 10. Atomic force microscope tapping mode image. 800mV setpoint, 200mV driving amplitude, 0.3Hz의 scan rate, 512 samples/line, 256 lines, 57.3 ㎛ X 57.㎛ image scale. resorption pit(red circle.).

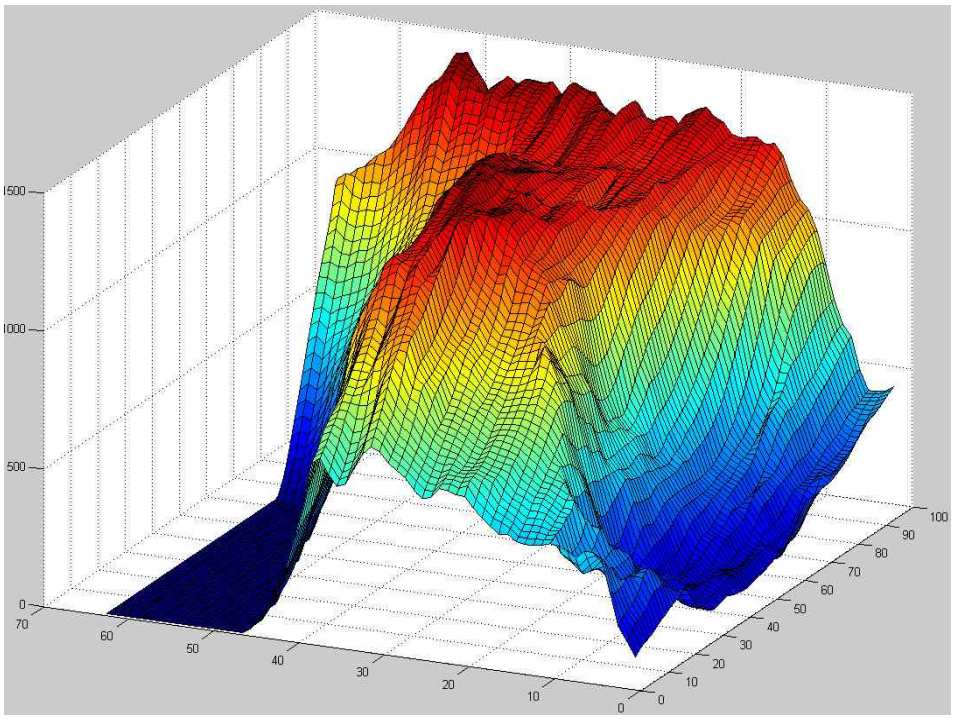


그림 11. Matlab plot of resorption pit. 그림 8의 AFM image를 ASCII code로 export하고, matlab을 이용하여 붉은 원 부분을 잘라 plot한 모습.

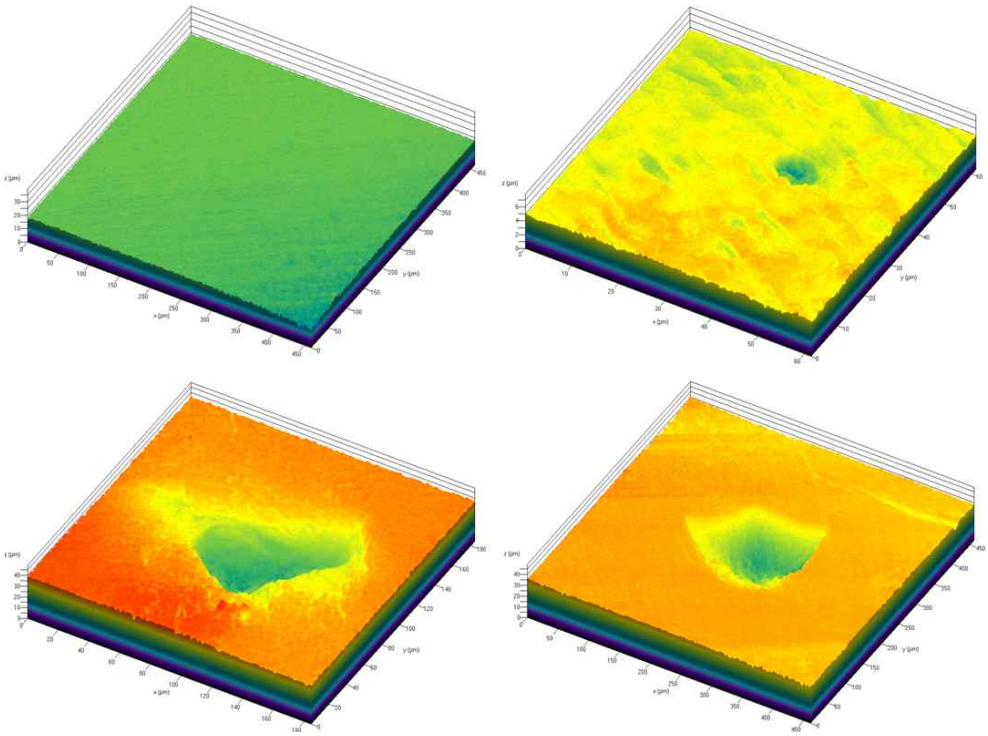


그림 12. Confocal microscope image. 좌상 : control(x20), 우상 : 7일차(x150), 좌하 : 14일차(x50), 우하 : 21일차(x20).

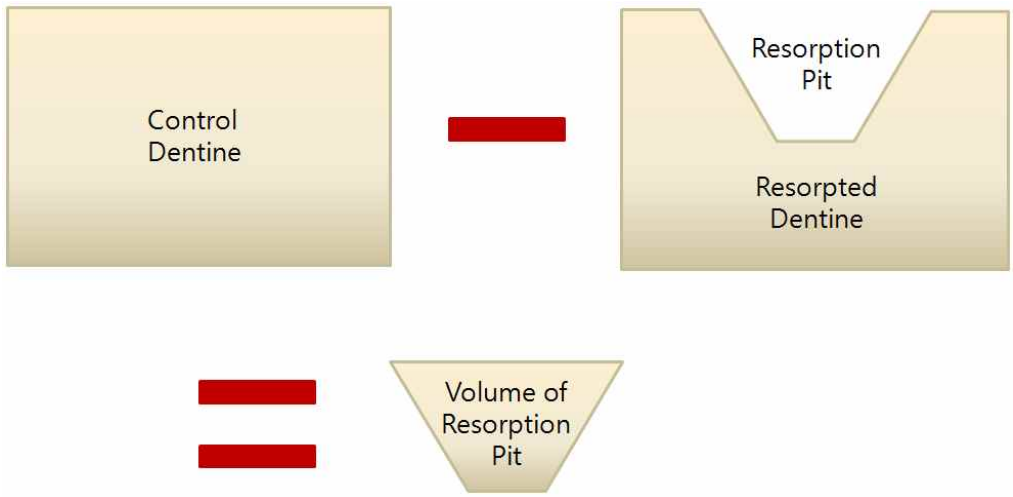


그림 13. 실험 방법. Control dentine은 resorption이 일어나지 않은 출하상태의 dentine. 이것의 체적에서 resorption이 일어난 dentine의 체적을 빼주면 resorption pit 만의 체적을 구할 수 있다.

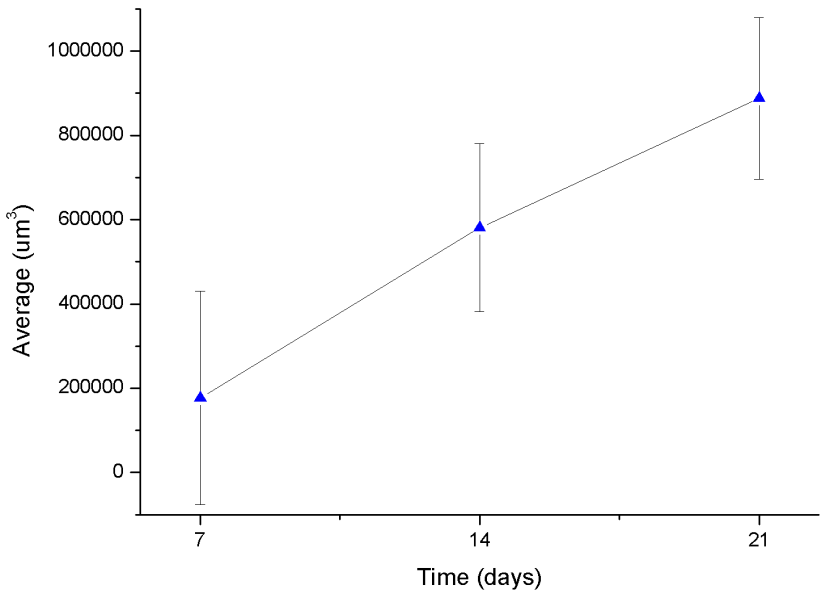


그림 14. Resorption pit의 일차별 평균 체적. 7일차 : 약 176,754um^3, 14일차 : 약 580,892um^3, 21일차 : 약 888,106um^3. 7일까지는 평균 약 176,754um^3, 7일에서 14일 차 까지는 약 404,138um^3, 그리고, 14일에서 21일까지는 307,214um^{3}의 체적이 더 파괴되었음.

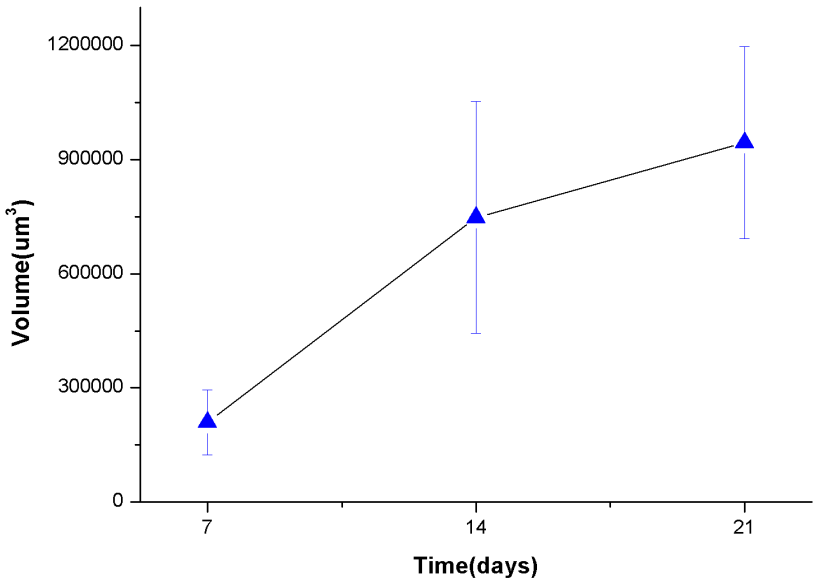


그림 15. Resorption pit의 일차별 평균 총 체적. 일차별로 선별한 2개의 dentine disk에 형성된 resorption pit들의 평균 총 체적. 일차별로 각각 209,409um^3, 747,551um^3, 944,041um^{3}의 resorption pit이 형성되었다.

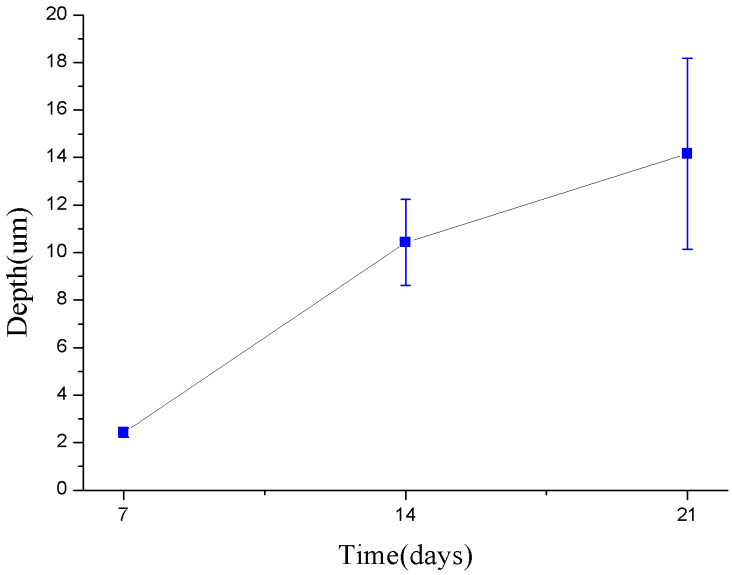


그림 16. Resorption pit의 평균 깊이. 7일, 14일, 21일차별로 각각 평균 2.42 ㎛, 10.43 ㎛, 14.16 ㎛ 깊이의 resorption pit이 형성되었다.

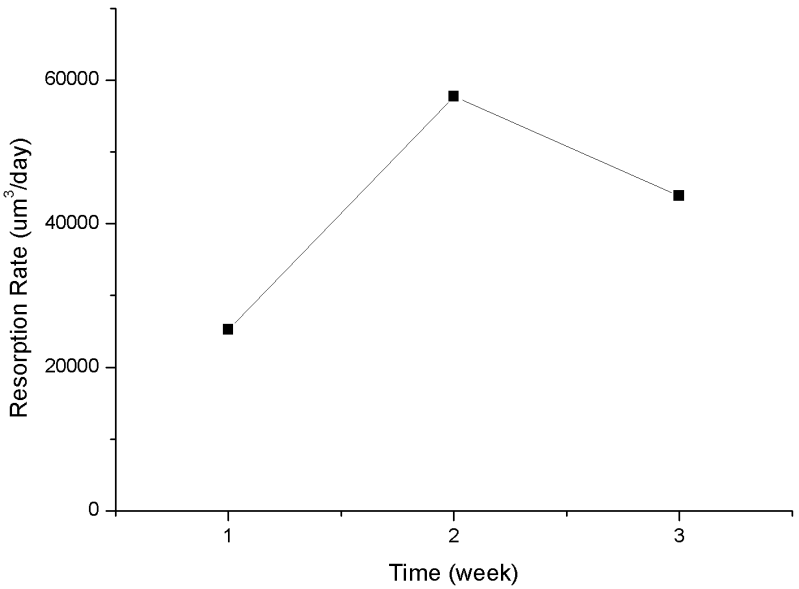


그림 17. Resorption rate of osteoclast. 1주차, 2주차, 3주차별로 각각 25,251um^3/day, 57,734um^3/day, 43,888um^3/day.

제 3장 참고문헌

[1] Steven L. Teitelbaum. "Bone Resorption by Osteoclast.", SCIENCE, 289, 1504-1508, 2000.

[2] Zhenpeng Li, Kangmei Kong, Weili Qi., “Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling.”, Biochemical and Biophysical Research Communication, 343, 345-350, 2006.

[3] R. C.-Y. CHEUNG, C. GRAY, A. BOYDE, and S. J. JONES, “ Effects of Ethanol on Bone Cells In Vitro Resulting in Increased Resorption.", Bone, 16, 143-147, 1995.

[4] VILHELMIINA PARIKKA, PETRI LEHENKARI, MIRJA-LIISA SASSI, JUSSI HALLEEN, JUHA RISTELI, PIRKKO HARKONEN, AND H. KALERVO VAANANEN, "Estrogen Reduces the 깊이 of Resorption Pits by Disturbing the Organic Bone Matrix Degradation Activity of Mature Osteoclasts.", Endocrinology, 142, 5371-5378, 2001.

[5] M. J. Martin, J. C. Buckland-Wright, "Sensitivity analysis of a novel mathematical model identifies factors determining bone resorption rates.", Bone, 35, 918-928, 2004.

[6] P. Ducy, T. Schinke, G. Karsenty, "The Osteoblast : A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance.", Science, 289, 1501, 2000.

[7] Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. “Microelectrode studies on the acid

microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts.", Exp Cell Res. 175, 266 - 276, 1988.

[8] H. K. Vaananen and M. Horton, "The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure.", J. Cell Sci. 108, 2729, 1995.

[9] G. Stenbeck and M. A. Horton, "Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclasts by Confocal Microscopy.", J. Cell Sci. 113, 1577, 2000.

[10] Minsky, "M. Microscopy Apparatus.", US Patent 3, 013, 467, 1961.

[11] Egger, M.D. and Petran, M. "New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells.", Science 157, 305, 1967.

[12] Takahashi N,Yamana H,Yoshiki S,Roodman GD,Mundy GR,Jones SJ,Boyde A,Suda T.-Like Cell Formation and its Regulation by Osteotropic Hormones in Mouse Bone Marrow Cultures.", 122, 1373, 1988.

[13] Yasuda H,Shima N,Nakagawa N,Yamaguchi K, et al. "A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function.", 25, 109, 1999.

[14] Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T.J. "Modulation of osteoclasts differentiation.", Endocr. Rev. 13, 66, 1992.

[15] Takahashi, N., Udagawa, N., and Suda, T. "A new member of TNF ligand family, ODF/RANKL/TRANCE/OPGL, regulates osteoclast differentiation and function.", Biophys. Res. Commun. 256, 229, 1999.

[16] Suda, T., Jimi, E., Nakamura, I., and Takahashi, N., "Role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast differentiation and function.", Methods Enzymol., 282, 223, 1997.

[17] Tamura T, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Udagawa N., et al. "New resorption assay with mouse osteoclast-like multinucleated cells formed in vitro.", J Bone Miner Res. 8, 953, 1993.

[18] Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ. "Murine osteoclast formation and function : Differential regulation by humoral agents.", Endocrinology 147, 1979, 2006.

[19] Sato T, Foged NT, Delaissé JM. "The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors.", J Bone Miner Res. 13, 59, 1998.

[20] Kim CH, You L, Yellowley CE, Jacobs CR. "Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling.", Bone, 39, 1043, 2006.

[21] Cornish J, Callon KE, Mountjoy KG, Bava U, Lin JM, Myers DE, Naot D, Reid IR. "Alpha-melanocyte-stimulating hormone is a novel regulator of bone.", Am J Physiol Endocrinol Metab. 284, 1181, 2003.

ABSTRACT

3D-Analysis of Osteoclastic Resorption Lacuna.

In this paper, we report a new method to quantitatively measure osteoclastic resorption. This technique is based on 3D-imaging method using a confocal microscope, and subsequent volumetric analysis. From the above process, we could obtain the precise volume change due to osteoclastic resorption. The information regarding volume change of dentine helps us to gain insight into understanding the mechanism of osteoclastic resorption.

Key words : Osteoclast, Resorption, Confocal microscope, Volume, Dentine.