

외부 자극에 따른 파골세포 (Osteoclast)
골 흡수 변화에 대한 3차원적 분석

연세대학교 대학원
의 공 학 과
정 수 호

외부 자극에 따른 파골세포 (Osteoclast)

골 흡수 변화에 대한 3차원적 분석

지도 윤 대 성 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2012 12월 일


연세대학교 대학원


의 공 학 과

정 수 호

정수호의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 윤대성 

심사위원 김지현 

심사위원 유영민 

연세대학교 대학원

2012 12월 일

Acknowledgement

대학원에서 보낸 3년이라는 시간은 저에게 말로 표현할 수 없을 만큼 뜻 깊은 시간이었습니다. 좋은 사람들을 만났고, 많은 배움을 얻었고, 어리석음을 꾸짖어 주었고, 그로 인해 반성하고, 한 걸음 성숙해질 수 있는 시간이었다고 생각합니다.

아무것도 모른 채, 잘 할 수 있을 거라는 근거 없는 자신감 하나로 연구실에 들어와 당연히 될 것 같았던 실험이 잘 되지 않아 좌절했었던 첫 기억은 아직도 생생합니다. 그리고 그 것을 해결하기 위해 밤새고, 다른 사람들에게 묻고 배워가는 과정을 통해 좁게만 보이던 시야가 조금은 넓어지지 않았나 생각합니다. 그래도 지금 제가 이 글을 써도 되는 자격이 있는지 계속 되짚어보게 되네요.

지금까지 저를 잘 이끌어주시고 지도해 주신 윤대성 교수님 감사의 말씀 올립니다. 인연이 닿아 부족한 저에게 아낌없는 조언을 해 주신 김지현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 아무것도 모르는 세포 실험에 갑작스럽게 투입되어 헤매고 있을 때 많은 도움 주신 유영민 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 저의 배움에 많은 자극이 되어주신 이상우 교수님, 권태운 교수님께도 감사드립니다.

또한, 제게 학부 때부터 많은 가르침을 주신 윤형로 교수님, 이운선 교수님, 김영호 교수님, 이경중 교수님, 김동윤 교수님, 신태민 교수님, 윤영로 교수님, 정병조 교수님, 김한성 교수님, 김경환 교수님, 이용흠 교수님, 서종범 교수님께 감사의 말씀 드립니다.

지금은 졸업하고 사회에서 큰 걸음을 걷고 있는 상현형, 승학형, 진우형, 한정형 - 곧 따라가겠습니다. 대학원에 들어와 힘들어할 때 마다 큰 힘이 돼 준 휘헌형 - 미국 가서 좋은 연구 많이 하고 돌아와 후학들에게 귀감이 되길 바랍니다. 먼저 연구실 들어와 든직한 선배로서 우리 연구실을 이끌어가고 있는 규도, 기환, 인수 - 지금처럼 계속 좋은 연구 성과를 내서 우리나라 의공학 발전에 큰 기여를 하길 기원합니다. 재미없고 썰렁한 농담도 재밌게 잘 받아주는 태준, 범준, 재우 - 지금까지 고생한 만큼, 하는 연구 좋은 성과를 얻는 기쁨을 하루 빨리 느꼈으면 좋겠습니다. 저 보다도 더 잘 하고 있을 원석, 형빈 - 재밌는 결과, 좋은 논문으로 훌륭한 연구자로 거듭나기를 바랍니다. 백운관 108호 잊지 못할 겁니다. 그리고 늘 차분하고 온화한 인상의 상백형, 학부 때부터 편안하게 대해준 정우, 궂은 일 물

어볼 때마다 많은 도움 준 은경이. 모두 저에게 큰 힘이 되었습니다.

자나 깨나 늘 멀리 떨어져 있는 자식 걱정해 주시는 부모님, 걸으로는 투덜대는
철없는 아들이지만 늘 감사하게 생각하고 있습니다. 꿈을 위해 힘든 것도 마다하
고 일과 공부를 병행하고 있는 누나, 힘 내.

기쁠 때나 힘들 때나 함께 했던 친구들 진성, 견호, 현석, 양곤, 희재, 동주, 모
두 고맙습니다. 그대들이 있어 항상 든든합니다. 학부 초기부터 지금까지, 앞으로
도 영원할 J club 너희들. 주현, 은준, 지민, 호제, 주연, 준형, 혜란, 석, 태준, 정화.
항상 고맙습니다. 그리고 여기 한 명 씩 언급하지 못했지만, 연세대학교 의공학부
선배님들, 후배님들, 형님들, 아우님들. 많이 배웠고 즐거웠습니다.

아직 어리석고 부족합니다. 현실에 안주하지 말고, 누구에게라도 당당한 사람이
될 수 있도록 노력하겠습니다. 감사합니다.

2012년 12월
정 수 호 올림

Table of Contents

List of Figures	ii
Abstract(in Korean)	iii
Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Experimental background	5
2.1 Osteoclast	5
2.2 Confocal microscope	6
2.3 Alendronate	8
Chapter 3. Methodology	10
3.1 Osteoclast differentiation	10
3.2 Applying fluid shear stress to dentine discs	14
3.3 Applying alendronate to osteoclasts	16
3.4 Samples preparation	17
3.5 Acquisition of 3D topological image with a confocal microscope	18
3.6 Data analysis with MATLAB	21
3.7 Volume calculation	25
Chapter 4. Results and Discussions	27
4.1 Effect of Fluid shear stress (Loading)	27
4.2 Effect of drug (Alendronate)	35
Chapter 5. Conclusion	38
Bibliography	40
ABSTRACT(in English)	44

List of Figures

Figure 1	Confocal microscope의 기본 원리[20]	7
Figure 2	Alendronate 구조식	9
Figure 3	골수세포에서 파골세포로의 분화 과정 ($\times 100$ 배율. Cell culture dish.) (a) 7일 차 (b) 9일 차 (c) 13일 차 (d) 14일 차	12
Figure 4	Dentine disc 위에서의 파골세포 확인 ($\times 200$ 배율. On the dentine disc.) (a), (b), (c), (d) - 7일 차	13
Figure 5	(a) 유체전단응력 기기. (b) Dentine disc Substrate	15
Figure 6-1	Sample data를 얻는 과정 (a) Confocal microscope image 획득 (3×3 Tile scan) (b) Image J를 이용하여 Text 좌표로 바꿈	19
Figure 6-2	Sample data를 얻는 과정 (c) Dentine disc 주변부 노이즈 제거 전과 후 ...	20
Figure 7	csaps code의 예	22
Figure 8	csaps code를 응용한 데이터 분석에 사용한 MATLAB code	23
Figure 9	MATLAB을 이용한 3차원 이미지화 (a) csaps code 처리 전 (b) csaps code 처리 후	24
Figure 10	Control Osteoclast, Loaded Osteoclast, 그리고 Interval loaded Osteoclast 의 시간에 따른 Dentine disc 파괴 부피량	29
Figure 11	Control Osteoclast, Loaded Osteoclast, 그리고 Interval loaded Osteoclast 의 시간에 따른 Dentine disc 파괴 부피 비율	30
Figure 12	날짜 별 유체전단응력 유무에 따른 파골세포 크기 비교. ($\times 40$ 배율, On the dentine disc.)	31
Figure 13	파골세포 세포 하나가 파괴한 골 양에 대한 정량화	33
Figure 14	파골세포 세포 하나가 파괴한 골 양에 대한 정량화 (* v < Day 0. Control)	34
Figure 15	Alendronate 농도에 따른 파골세포의 Dentine disc 파괴 부피량	36
Figure 16	Alendronate 농도에 따른 파골세포의 Dentine disc 파괴 부피 비율 (* v < Day 0. Alendronate 0 μmol)	37

국문 요약

외부 자극에 따른 파골세포 (Osteoclast)

골 흡수의 3차원적 정량화 분석

Bone remodeling 과정에서 파골세포와 조골세포로 인한 파괴와 생성의 과정은 균형을 이루고 있다. 만약 이러한 균형이 깨져 파괴되는 양이 더 많을 경우, 골다공증으로 이어진다. 이러한 골다공증을 치료하기 위해, 뼈를 파괴하는 파골세포 분화 자체를 억제한다든지, 뼈 형성 촉진제를 이용한 추가적인 뼈 형성 등 다양한 연구가 진행되었다. 울프의 법칙(Wolff's Law)에 따르면, 뼈에 자극을 가했을 때 그 힘을 견뎌내기 위해 뼈가 더욱 강해지는데, 그러한 자극 중 가장 일반적인 것이 뼈 내부에서의 0.8~3 Pa의 유체전단응력이다. 지금까지 bone remodeling 연구에서는 광학현미경을 통해 뼈가 파괴된 넓이를 2차원적으로 계산하였으나, 파골세포의 뼈 파괴는 3차원적으로 이루어지기 때문에, 기존의 2차원적 분석으로는 파골세포가 파괴한 정도를 정확히 정량화 했다고 하기 힘들다. 또한 이러한 측정에서, 실험에 사용한 시료의 전체 부피의 변화를 관찰하는 것은 bone remodeling 실험에서 필수적이며, 이러한 실험을 통해 얻은 부피 변화에 대한 결과는 bone remodeling에 대한 정량화와 bone remodeling 과정을 이해하는데 중요한 역할을 할 것이다.

본 연구에서는, 다양한 조건에 따라 변화된 dentine disc 부피를 정량화하기 위한 쉽고 편리한 방법을 개발했다. 공초점 현미경을 이용해 획득한 기하학적 정보를 MATLAB을 이용하여 계산하는 방법으로, 다양한 유체전단응력과 alendronate 농도가 파골세포의 뼈 파괴에 어떤 영향을 미치는지 대한 결과를 얻어냈다. 이를 통해, dentine disc 각각의 전체 부피 변화에 대한 정확한 변화를 확인할 수 있었

으며, 또한 다양한 조건에 따른 bone remodeling에 대한 정량 분석이 가능했다. 결과적으로, 파골세포의 뼈 파괴는, 파골세포에 가해지는 유체전단응력과 비례하여 완화되었으며, alendronate 역시 뼈 파괴를 억제하는 효과를 확인할 수 있었다.

핵심 되는 말 : osteoclast, fluid flow-induced shear stress, physical loading, alendronate, confocal microscope

Chapter 1. Introduction

뼈는 인체의 기본 형태를 구성하는 단단한 조직이다. 이러한 단단함을 바탕으로 신체의 중요한 장기를 보호하고, 우리 몸이 필요로 하는 필수 미네랄의 저장고 역할 및 근육운동을 위한 단단한 지지대 역할을 한다.[1] 뼈의 생성 과정은 살아가는 동안 오래되거나 상한 뼈는 파괴되고, 그 자리에 새로운 뼈가 생성·교체되는 Bone remodeling 과정을 거치면서 성장 및 유지보수를 하게 된다. 여기서 뼈를 파괴하는 작용을 하는 것이 파골세포(Osteoclast)다. 파골세포는 뼈를 파괴하여 Ca^{2+} 이온을 혈액을 통해 온 몸에 공급함으로써, 근육의 수축과 신경전달 물질 방출, 심장박동 조절, 혈액 응고 등 신체 기능이 유지될 수 있도록 하는 중요한 역할을 한다.

이러한 파골세포를 통한 뼈의 파괴와 조골세포(Osteoblast)를 통한 뼈 생성은 서로 균형을 이루고 있다. 하지만 이러한 균형이 깨져 뼈가 생성보다 파괴되는 양이 많게 되면, 뼈 내부의 해면골의 밀도가 낮아지면서 골다공증(Osteoporosis)이 나타나게 된다.

골다공증은 크게 폐경 후 골다공증과 노인성 골다공증으로 나뉜다. 폐경 후 골다공증은 여성호르몬인 에스트로겐이 부족해지면서 그 결핍에서 오고, 노인성 골다공증은 노화로 인해 골 양이 감소하고, 신체 칼슘 흡수가 감소되는 것이 그 주요 원인이 된다. 지금까지는 일반적으로 골다공증은 50세 이상의 사람들에게서 찾을 수 있는 질병이라 여겨졌으나, 젊은 층에서도 카페인 음료 및 커피의 과다 섭취, 바쁜 사회생활로 인한 잦은 술자리는 칼슘 흡수 방해로 이어져, 젊은 층에서의 골다공증 환자가 늘어나는 추세다.

골다공증 치료를 위해서 보통 에스트로겐을 이용한 호르몬 대체 요법과 Bisphosphonates 계열의 약물 사용을 이용한 치료가 진행되고 있다. Bisphosphonates 계열의 약물은 골다공증의 치료 및 예방약으로, 임상 실험을 통해 뼈 소실을 억제 시키거나 정지시켜 골밀도를 증가 시키고, 골절의 위험을 감소시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌으나, 복용법이 까다롭고 복용 중 금지사

항이 많은 등의 불편함을 감수해야 한다. 또한 추가적으로 복통, 근육통, 구역질 및 속쓰림 뿐만 아니라, 식도 및 위장관에 부작용이 노출되었으며, 하악골에 피사를 야기하는 심각한 부작용이 대두되고 있어, 복용자의 주의가 필요하다.[2]

이러한 부작용을 감소시키기 위해 또 다른 치료법을 개발하려는 연구가 계속해서 진행되고 있다. 파골세포 분화 자체를 막기 위해, 파골세포의 뼈 파괴 시작 스위치 역할을 하는 RANK와 RANKL의 3차원 구조를 밝히고, 이를 바탕으로 RANK와 RANKL 결합에 핵심적인 역할을 수행하는 루프구조를 가진 펩타이드를 합성하여 RANK와 RANKL간의 상호작용을 방해하는 물질을 개발하거나[3], 파괴된 뼈를 보수하는 연구로, 뼈 형성 촉진제를 이용하여 추가적인 골형성에 기여하는 연구들이 진행되었다.[4]

하지만 무엇보다 중요한 것은 골 손실을 더디게 하여 예방을 하는 것이 최우선 되어야 할 것이다. 1892년도에 발표된 "울프의 법칙(Wolff's Law)"에 의하면, 뼈의 임의의 부분에 지속적으로 힘이 가해지면, 뼈는 그 힘을 견뎌내기 위해 더욱 강해지고, 반대로 자극이 없어지면 뼈는 다시 약해지는 등, 뼈는 주어진 환경에서의 자극에 적응한다.[5] 이러한 자극 중 가장 일반적인 것은, 골 내부에서의 유체전단응력(fluid flow-induced shear stress)이다. 뼈 한 쪽 끝에서의 압축응력과 반대편에서의 인장 응력으로 인해 생긴 Bending force는 골세포의 변형을 일으킬 뿐만 아니라 Canalicular의 공간 내에 압력차를 만들어 유체의 흐름을 발생시킨다. 이러한 압력차는 뼈 한 쪽에는 압력을, 반대쪽에는 인장력을 일으키고[1,6], 유체의 흐름에 의해 골 내부의 세포는 약 0.8~3 Pa의 유체전단응력을 받게 된다. 이러한 유체전단응력에 대하여 골 생성 관련 인자들이 증가하고, 뼈 파괴 관련 인자들이 감소한다는 연구결과가 있으며, 유체전단응력이 골의 대사과정과 밀접한 연관이 있음이 밝혀졌다.[7,8]

또한, 40대에서 60대 여성을 대상으로 수행한 지속적인 저항운동과 유산소 운동의 병행은 골밀도 유지와 골의 재흡수 방지에 효과가 있음이 증명되었고[9], 폐경기 여성 및 30~40대 중년 여성을 대상으로 한 실험에서도 에어로빅을 통한 골밀도 증가에 효과가 있음이 밝혀졌다.[10,11]

뿐만 아니라, 최근에 운동은 DNA의 특정 지점에서의 탈메틸화를 일으킨다는

연구 결과가 발표되었다. 유전자 메틸화는 각종 암을 유발하는 인자로 건강에 매우 유해한 상태를 의미하는데, 운동을 통해 에너지 신진대사와 관련된 몇 가지 유전자(PGC-1 α , PPAR- δ , PDK4)들은 탈메틸화를 일으켰으며, 탈메틸화의 양은 운동 강도에 따라 달라지는데, 운동의 강도가 강할수록 유전자 탈메틸화가 가장 많이 나타났다.[12,13]

일정 자극과 파골세포의 활동에 대한 분석을 위해서는, 일정 자극과 파골세포의 뼈 파괴량에 대한 3차원적 정량화 분석이 반드시 필요하다. 기존의 여러 연구에서는 현미경분석을 통한 2차원 분석이 주류를 이뤘었다.[14] 그러나 Mabileau 등은 최근 연구에서 정확한 파골세포의 작용을 검증하기 위해서는 3차원적 부피변화 분석이 필수임을 밝혀내었다.[15] 이 연구는, 파골세포 활성화에 기여하는 물질(RANKL, TNF- α , LIGHT)을 각각 대조군으로 설정하여 Vertical scanning profilometry를 통해 분석했을 때, 각 대조군의 파골세포가 파괴한 면적은 비슷했었지만 침식 깊이가 다르며, 결론적으로 파괴된 부피가 달라짐을 밝힘으로써 3차원 분석의 필요성을 제안하였다.

더불어, 현재까지 물리적 자극과 약물에 의해 조절되는 3차원적인 골 흡수량의 관계에 대한 연구는 이루어지고 있지 않았다. 파골세포에 의한 골 흡수 정도가 약물의 투여량과 기간, 물리치료의 강도와 기간, 이에 따라 골절 위험 정도를 예측할 수 있다는 점을 감안할 때, 물리적 자극과 약물과의 시너지 효과에 대해 실험할 가치는 충분하다. 하지만 그 전에 파골세포의 뼈 파괴를 억제하는 적절한 약물의 농도를 설정할 필요가 있다. 특히, Bisphosphonate와 같은 약물은 골 재형성의 활성화에 영향을 미치며, 파골세포의 분화, 증식, 활성화에 직접적인 영향을 줌으로써 실제 해면골에서의 뼈 파괴 능력을 억제시킬 수 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 실험을 위한 약물로, Bisphosphonate의 계열인 Alendronate를 선정했다.

이러한 이론을 바탕으로, 본 연구에서는 공초점현미경을 이용한 3차원공간분석을 통하여 파골세포의 뼈 침식량에 미치는 유체전단응력과 alendronate의 효과에 대해서 정량적인 분석을 수행하였다. 쥐의 경골과 대퇴골에서 추출한 골수세포를 파골세포로 분화시키는 것을 시작으로, 분화된 파골세포를 Dentine

disc에 부착시킨 뒤, 그 중 일부에 유체전단응력을 가하여, 유체전단응력을 가하지 않은 대조군과 뼈 파괴량을 비교했다. 또한, 물리적 자극을 주는 시간에 변화를 주어 파골세포 활동 억제를 위한 효과적인 방법에 대해 함께 비교했다. 마지막으로, 파골세포에 물리적 자극과 약물을 함께 적용시키기 전, 파골세포의 뼈 파괴 능력을 억제시키는데 최적화된 농도를 찾기 위해, 서로 다른 농도의 alendronate가 파골세포 활동에 미치는 영향을 알아보는 실험을 진행했다.

파괴된 부피 분석에 있어, 다핵세포인 파골세포의 특성 상 세포 크기가 각기 다르기 때문에, 기존의 일정한 크기의 resorption pit에 대한 부분적인 분석을 피하고, Dentine disc 전체를 측정하여 파골세포의 수로 나누어 주는 방법을 사용함으로써 파골세포가 파괴한 평균 부피 측정을 새로이 시도했다.

모든 시편은 공초점현미경을 통하여 3차원영상을 취득하였으며, Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) 소프트웨어와 MATLAB을 이용하여 정확한 3차원부피변화를 계산하였다.

Chapter 2. Experimental background

2.1 Osteoclast

뼈 파괴를 역할을 하는 파골세포는 골수세포(Bone marrow cell)로부터 분화된다. 기질세포와 조골세포에서 분비된 Macrophage colony-stimulation factor(M-CSF)와 Receptor activator for nuclear factor kappa B ligand(RANKL)이 골수대식세포 표면의 수용체인 Receptor activator for nuclear factor kappa B(RANK)와 결합하여 Nuclear factor kappa B(NF- κ B) 경로를 활성화시켜 파골 줄기 전구 세포를 분화시키고, 뼈 침식을 시작하는 mRNA를 전사하게 함으로써 유전자들을 발현시킨다.[16] 이렇게 분화된 파골세포는 이온교환채널을 통해 HCO_3^- 이온과 Cl^- 이온이 교환되어 Cl^- 이온이 파골세포 내로 들어오게 된다.

뼈 파괴의 시작은 파골세포가 골 표면에 부착하게 되면 H^+ -ATPase와 Cl^- 이온이 분비되어 골 표면을 산성화시킨다. 이 때 카텝신K(cathepsin K)와 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase)효소가 활성화되어 교원질(collagen)과 뼈 속에 있는 무기 칼슘 및 인을 모두 용해시키고, 뼈를 구성하고 있는 기질(Bone matrix)이 분해되어 Resorption pit이라고 부르는 3차원의 구멍을 형성하게 된다. 이러한 3차원적 구멍은 골 양을 현저히 낮추고 골질의 위험을 증가시킨다.[17-19]

2.2 Confocal microscope

공초점 현미경 (Confocal microscope)은 해상력이 좋고 Scanning 속도가 빠르기 때문에 오늘날 생물학분야의 연구에 널리 이용되고 있다. 고속으로 회전하는 Scanning mirror를 이용하여 Laser beam을 Specimen에 Scanning하고 Laser에 의해 발광된 형광 또는 반사광선 (Reflected primary beam)을 이용하여 영상을 관찰한다. 일반적인 현미경과는 달리 대물렌즈 뒤편에 바늘구멍을 두어 시료의 한 점에서 출발한 빛만이 통과하게 하여 명암비와 분해능을 높였다. 한번에 한 점만을 보기 때문에 시간 간격을 두어 이웃한 점들을 연속적으로 측정하여 이를 컴퓨터를 이용해 시각화하면 2차원 혹은 3차원 영상을 얻을 수 있다. 광학현미경기법과 전자현미경기법이 지니는 단점을 보완하는 동시에 이들이 갖지 못한 여러 가지 장점까지 보유하고 있는 우수한 현미경이라고 말할 수 있다. 기존의 광학현미경에 비해 초점심도가 낮기 때문에 (0.5 - 1.5 μm) 초점을 벗어난 영상을 제거할 수 있어 선명하고 감도 (Sensitivity)높은 영상을 얻을 수 있다. 광원으로 사용되는 레이저는 Argon ion laser(488 nm와 514 nm 파장을 가짐)와 Krypton-argon ion laser(488, 568, 647 nm의 파장을 가짐)가 있으며 이들이 제공하는 파장의 범위 내에서 여러 종류의 형광을 이용함으로써 Fluorescein, Rhodamine 등의 형광이 부착된 세포내구조물을 관찰할 수 있다.

Confocal microscope는 크게 투과형과 반사형이 있다. 투과형은 세포나 DNA 같은 생물학적 연구에 많이 쓰이고, 반사형은 금속이나 단단한 재질 같이 재료 연구의 측면에서 사용한다.

본 실험에서는 Dentine disc 촬영을 위한 도구로써 사용되었다. Dentine disc 재질 특성 상 투과형은 사용할 수 없기 때문에, 반사형 Confocal microscope 중 Carl Zeiss 사의 LSM 5 PASCAL (KIST 보유)을 사용했다.

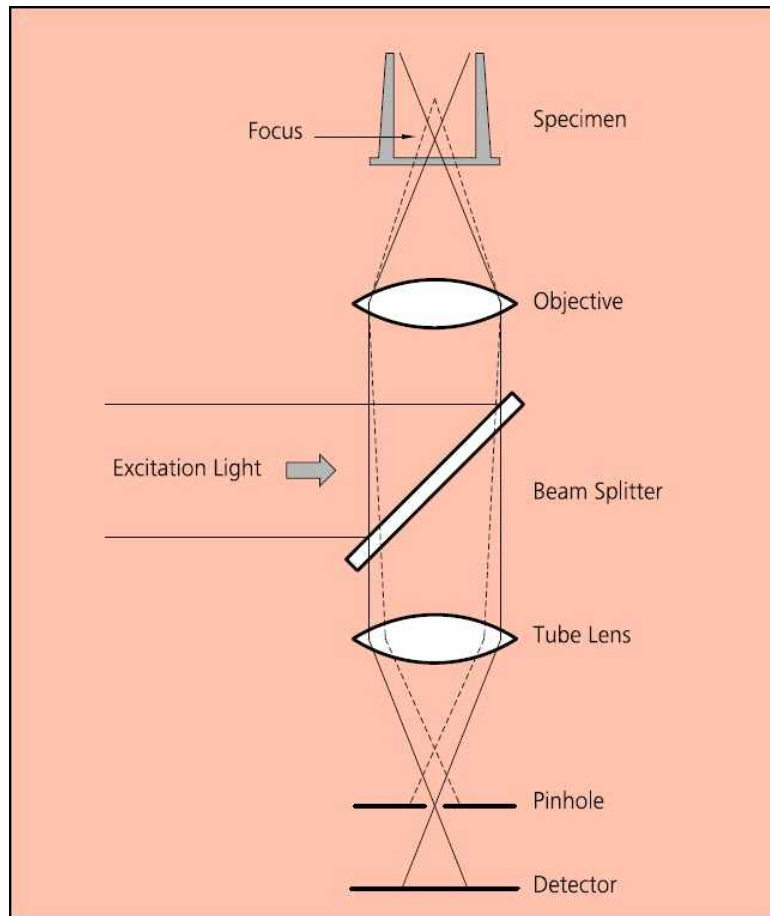


Figure 1. Confocal microscope의 기본 원리[20]

2.3 Alendronate

Bisphosphonates 계열의 약물로, Alendronate의 화학명은 sodium trihydrogen (4-amino-1-hydrobutylidene)diphosphanate trihydrate이며 분자식은 $C_4H_{12}NaO_7P_2 \cdot 3H_2O$ 로 나타낸다. 파골세포에 직·간접적으로 작용하여 활성을 감소시켜 뼈 파괴를 억제하는 작용을 한다. Alendronate는 파골세포에 축적되어 세포골격을 변화시키고, 세포괴사를 유발함으로써 파골세포의 활성을 억제시킨다. 1995년 3월 미국 FDA(Food and Drug Administration)의 승인을 받아 임상적으로 쓰이고 있으며 골다공증환자에서 뼈 파괴를 감소시킴으로써 골다공증에 이은 골절 또한 같이 예방하는 효과가 있다. 그러나 심낭염 등의 심혈관계 부작용, 두통 등의 중추신경계 부작용, 내분비계 부작용, 위장관계 부작용 등과 발열 등의 부작용이 보고되었다. 또한, Alendronate는 칼슘이나 다른 다가 양이온에 높은 친화력을 갖기에, 양이온과 Alendronate는 쉽게 결합을 하고, 이런 결합으로 Alendronate의 체내 흡수가 저하된다. 이러한 일을 방지하기 위해서는 칼슘보조제나 위산억제제와 같은 약물을 같이 복용할 시, Alendronate와 다른 약물의 투여 시간을 조절하는 등의 노력이 필요하다.

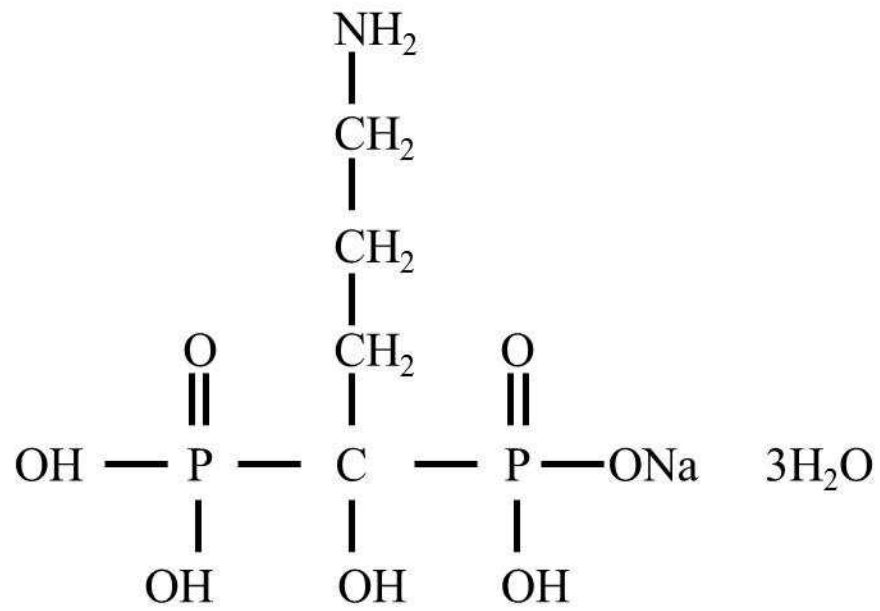


Figure 2. Alendronate 구조식

Chapter 3. Methodology

3.1 Osteoclast differentiation

파골세포는 골수세포로부터 분화되는 세포다. 실험에 사용할 파골세포를 분화시키기 위해, 4주령 SD rat에서 경골과 대퇴골을 추출하였다. 추출한 경골과 대퇴골은 부러지지 않도록 조심스럽게 근육을 모두 제거한 후, 포비돈 요오드와 70% Ethanol로 소독해 주고, PBS를 이용하여 씻어준다. 깨끗해진 뼈의 양 단을 절제하고, α -MEM을 넣은 10ml Syringe를 절제된 뼈에 꽂은 후, α -MEM을 천천히 떨어뜨리면서 Bone marrow cell 추출한다. Bone marrow cell 과 α -MEM 이 섞인 탁한 용액을 1,500 rpm으로 3분 간 원심분리하면 튜브 아래에 Bone marrow cell 이 가라앉고, 위는 맑은 α -MEM 로 분리된다. 위에 맑게 분리 된 α -MEM을 제거하고, 새로운 α -MEM을 넣어준 후, pipetting을 하여 새로 넣은 α -MEM과 Bone marrow cell을 잘 섞어준 후, Cell culture dish 하나 당 Bone marrow cell 200만 마리 씩 나누어 담아준다.

파골세포 배양에는 Complete media를 이용했다. Complete media의 함량은 α -MEM 89%, Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, 그리고 Penicillin/Streptomycin (P/S) 1% 이다. Cell culture dish에 Complete media 8mL를 넣고, DMEM에 희석시킨 Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) 80 μ g/mL와 Soluble Receptor Activator for Nuclear factor κ B Ligand (sRANKL) 0.8 μ g/mL 투여 후 잘 섞어주어 Cell culture dish 전체에 골고루 퍼질 수 있도록 해 준다. 같은 방법으로 3~4일 마다 배지를 갈아주면서 2주 간 분화시켰다 (Figure 3).

2주 간 분화시키면 Bone marrow cell이 파골세포로 분화되는데, 이를 Scrapper 로 긁어모은다. 96-well에 Dentine disc (Diameter 5 mm, thickness 0.3 mm, Immunodiagnostic Systems)를 하나씩 넣어 준비하고, 여기에 Scrapper를 이용해

모은 파골세포를 나누어 넣어준다. 이렇게 얻은 파골세포가 Dentine disc 위에 안정적으로 붙을 때까지 일주일간 배지를 갈아주며 길러준다. 일주일 후, Dentine disc sample을 TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) staining kit (Sigma-Aldrich Kit 387-A)을 이용하여 Dentine disc 위에 파골세포가 잘 부착되었는지 확인했다 (Figure 4).

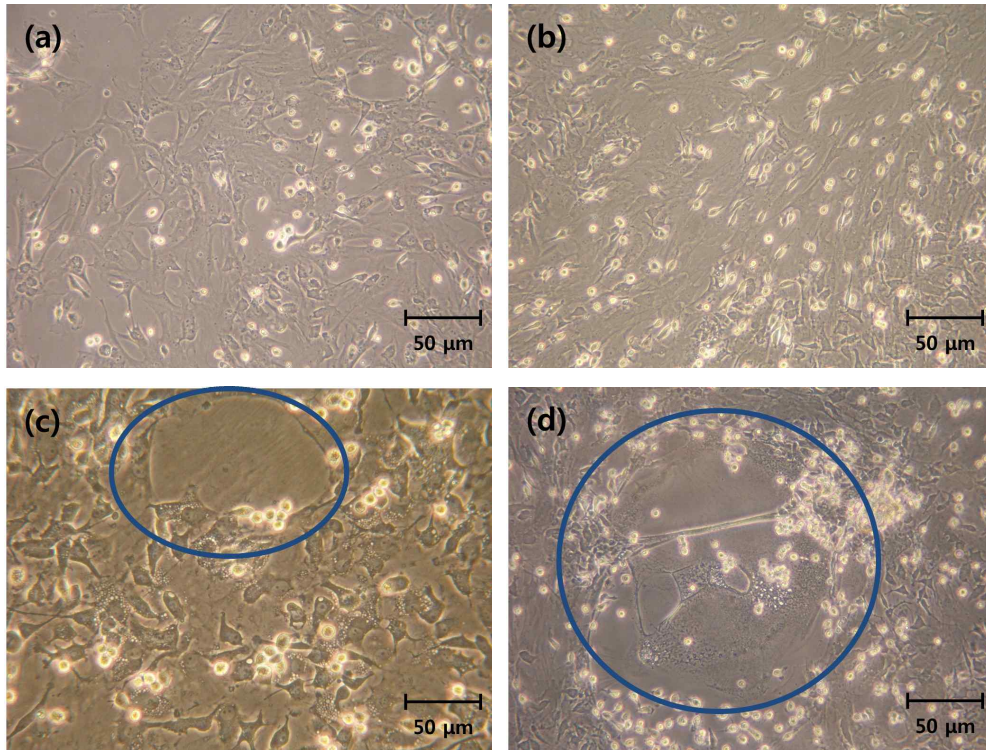


Figure 3. 골수세포에서 파골세포로의 분화 과정 ($\times 100$ 배율, Cell culture dish.)
 (a) 7일 차 (b) 9일 차 (c) 13일 차 (d) 14일 차

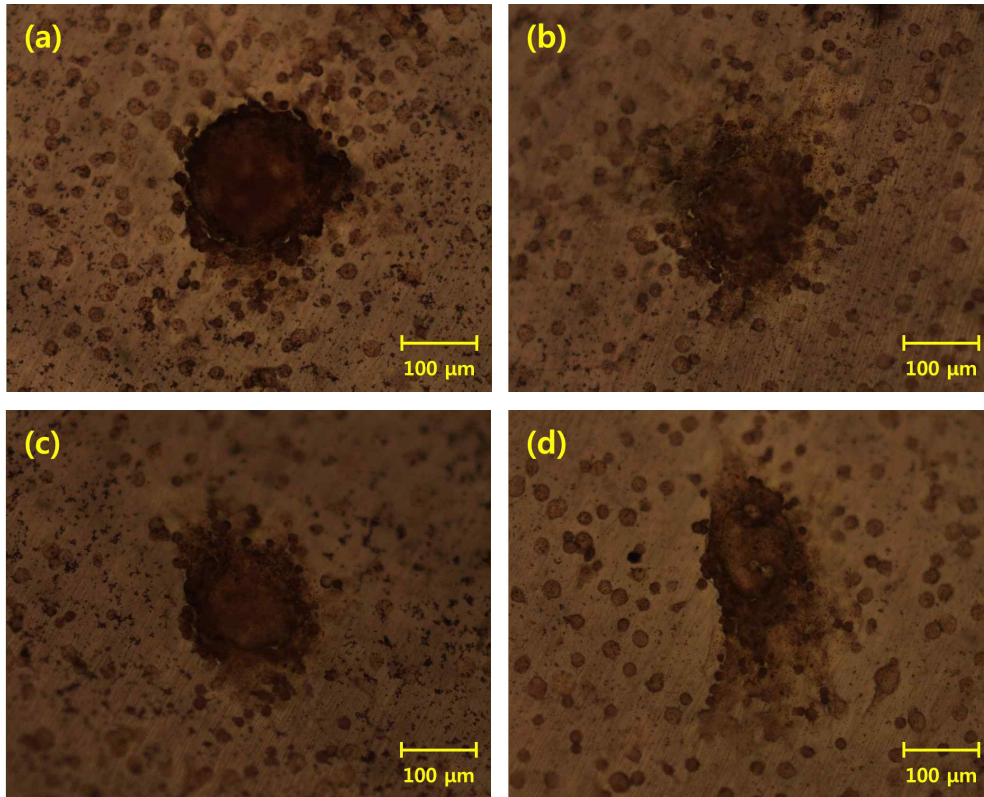


Figure 4. Dentine disc 위에서의 파골세포 확인 ($\times 200$ 배율. On the dentine disc.) (a), (b), (c), (d) - 7일 차

3.2 Applying fluid shear stress to dentine discs

Dentine disc 위에 파골세포가 잘 붙어있는지 확인한 후, sample의 일부를 무작위로 선택하여 유체전단응력을 가했다.

유체전단응력(Oscillatory fluid flow-induced shear stress)을 주기 위한 세포 자극기(Cell loading device, Figure 5. (a))에 자체 제작한 PPFC 시스템(Parallel plate flow chamber)을 장착하여 1 Pa, 1 Hz로 Dentine disc 위에 있는 파골세포에 유체전단응력 (이하 Loading)을 주었다.[7,8] 유체전단응력을 가할 때 Dentine disc 높이만큼의 구멍을 판 Substrate를 제작 (Figure 5. (b))하여 Dentine disc를 끼운 후 Loading을 가함으로써, Dentine disc의 높이 때문에 생기는 Flow로 인해, 주어지는 Loading의 압력이 변질되는 것을 막았다.

Loading의 반복이 파골세포의 dentine disc 파괴량을 비교하기 위해 두 가지 loading방식을 사용하였다. loading sample 중 일부는 한 시간을, 나머지는 15분 loading - 30분 휴식 - 15분 loading (이하 Interval loading)을 가하여, 총 걸린 시간이 모두 한 시간이지만, Loading 시간차에 따라 어떤 결과가 나타나는지 알아보았다.

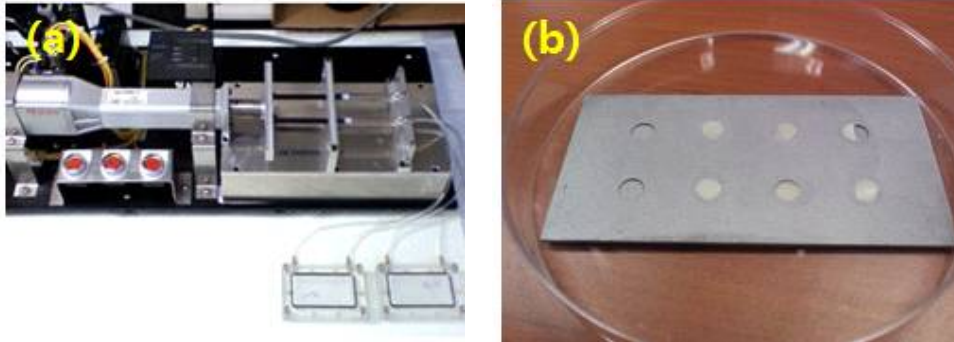


Figure 5. (a) 유체전단응력 기기. 1 Pa, 1 Hz로 Dentine disc 위에 있는 파골 세포에 유체전단응력을 가해준다. (b) Dentine disc Substrate. Dentine disc의 높이 때문에 생기는 Flow로 인해, 주어지는 Loading의 압력이 변질되는 것을 막기 위해 Dentine disc 높이만큼의 구멍을 판 Substrate를 제작하여 Dentine disc를 끼운 후 Loading을 주었다.

(장비 제공 : 연세대학교 세포 및 조직 기계생물학 연구실)

3.3 Applying alendronate to osteoclasts

Dentine disc에 culture dish에서 배양한 파골세포를 분주한 뒤, 일주일 동안 파골세포가 Dentine disc 위에 잘 부착되길 기다렸다. 일주일 후 Alendronate를 각각 10 μmol , 30 μmol 을 3일 동안 투여하여 약물이 파골세포에 미치는 영향으로 생기는 뼈 소실의 변화를 확인했다.

3.4 Samples preparation

Loading을 가한 날을 0일 차로 기준을 잡고, 7일, 14일, 21일 차에 sample을 획득했다. 약물실험은 alendronate 투여 3일 후 sample을 획득했다.

각 날짜별로 획득한 sample은 TRAP staining kit을 이용하여 염색한 후 파골세포 세포의 수를 세었다. 세포 수는 연구를 진행한 공동연구원 2명이 각각 세포 수를 센 후, 평균을 내는 방법을 사용했다.

3.5 Acquisition of 3D topological image with a confocal microscope

파골세포가 파괴한 dentine disc의 부피를 측정하기 위하여, 0일차 dentine disc와 각각 일차 dentine disc의 전체 부피를 비교했다. 이러한 방법을 위해서는 실험을 통해 얻은 dentine disc sample을 3차원적 이미지화 할 필요가 있다. 그 첫 번째 단계로, confocal microscope (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss, KIST 소유)를 이용하여 3차원적 이미지를 얻었다. 한 번에 dentine disc 전체를 찍을 수 없기 때문에, confocal microscope의 기능 중 tile scan (3×3 scan)을 이용하여 이미지를 획득했다. 필요한 부분은 dentine disc에 대한 정보이므로, dentine disc 주변부인 나머지 부분은 제거해야 한다. 이를 위해 획득한 이미지를 Image J 프로그램을 이용하여 Text 좌표로 바꾸었고, dentine disc 주변 노이즈를 제거했다 (Figure 6).

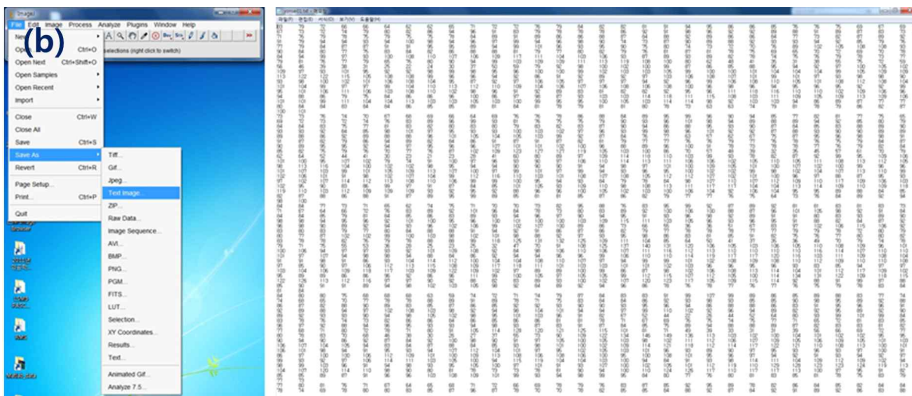
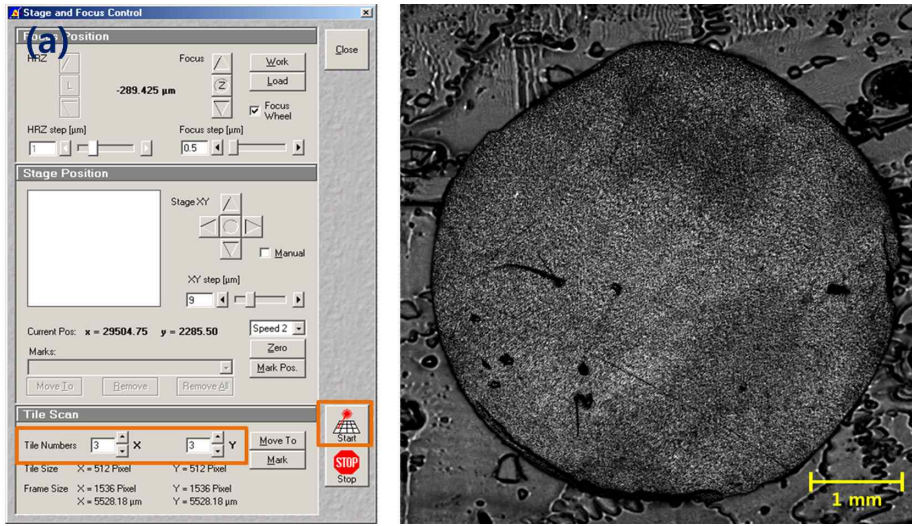


Figure 6-1. Sample data를 얻는 과정
 (a) Confocal microscope image 획득 (3×3 Tile scan)
 (b) Image J를 이용하여 Text 좌표로 바꿈

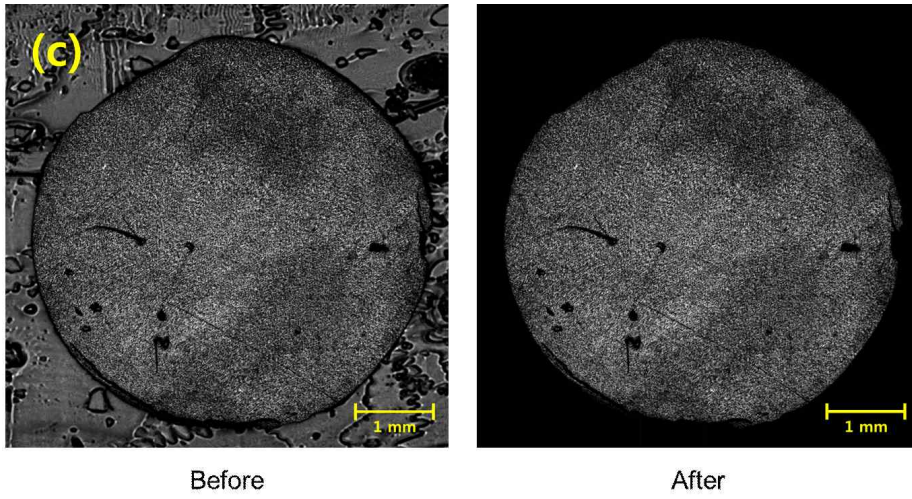


Figure 6-2. Sample data를 얻는 과정
(c) Dentine disc 주변부 노이즈 제거 전과 후

3.6 Data analysis with MATLAB

3차원 이미지 구현은 MATLAB의 csaps code를 이용했다. csaps는 포트란 루틴을 이용하여 구현된 코드이며 다음과 같은 알고리즘을 이용한다. smoothing spline의 계산을 위해서는 $p*A + (1-p)*B$ 형태의 coefficient matrix를 가진 linear system solution을 따른다. Matrix A와 B는 x축을 따르며, p의 기본 값은, $p*\text{trace}(A)$ 는 $(1-p)*\text{trace}(B)$ 가 같다고 정의한다. 이러한 MATLAB에서의 csaps 코드를 응용, confocal microscope와 Image J를 이용하여 얻은 데이터에 적용시켜 최종적인 3차원 이미지 데이터를 획득했다 (Figure 7, Figure 8, Figure9).

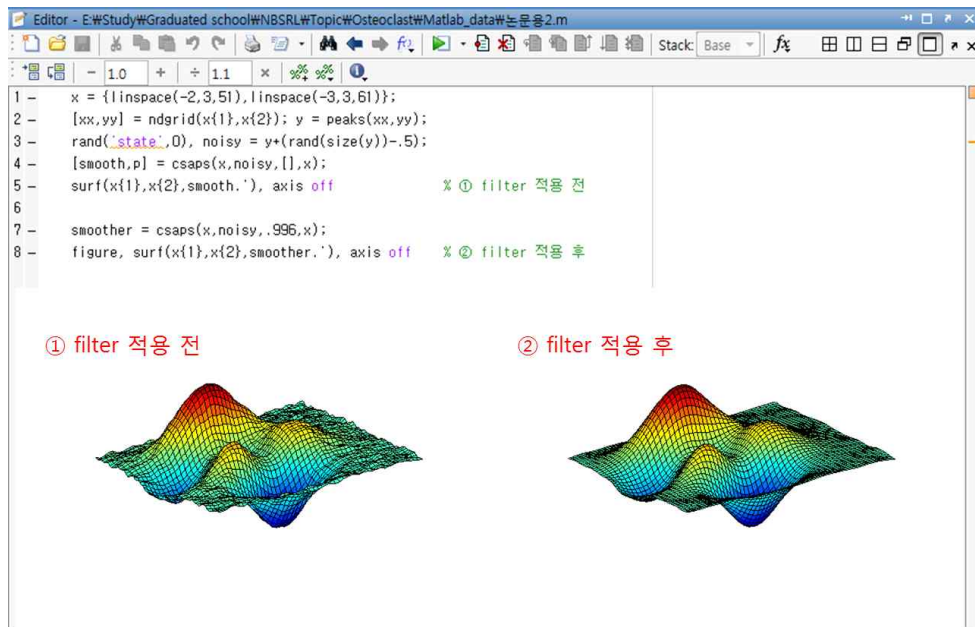


Figure 7. csaps code의 예

```
Editor - Untitled*
1  clc;
2  clear all;
3  close all;
4
5  xlsread('data01.xlsx'); % noise를 제거한 데이터 load
6
7  dentin_disk = ans;      % load 된 데이터는 ans라는 이름으로 load 됨.
8                        % ans 데이터를 알아보기 쉽도록 dentin_disk로 이름을 바꿔줌.
9
10 x = (linspace(0,767,768),linspace(0,767,768)); % 0 에서 767 까지 768등분.
11                                           % 데이터가 768 x 768 pixel이기 때문에 계산하기 쉽도록
12                                           % 한 cell 당 하나씩 넣어주기 위함임.
13
14 [xx,yy] = ndgrid(x{1},x{2}); y = peaks(xx,yy); % x, y 좌표로 갈라줌
15 [smooth,p] = csaps(x,dentin_disk,[],x); % csaps를 이용하여 smoothing filter 실행
16
17 zaxis = [-20 350]; % z축 범위 -20 ~ 350 으로 고정
18 view_axis = [90 90]; % 보는 방향 고정
19
20 a = csaps(x,dentin_disk,.05,x);
21 figure, surf(x{1},x{2},a,'); view(view_axis), title('data01'), zlim(zaxis) % image 획득
```

Figure 8. csaps code를 응용한 데이터 분석에 사용한 MATLAB code

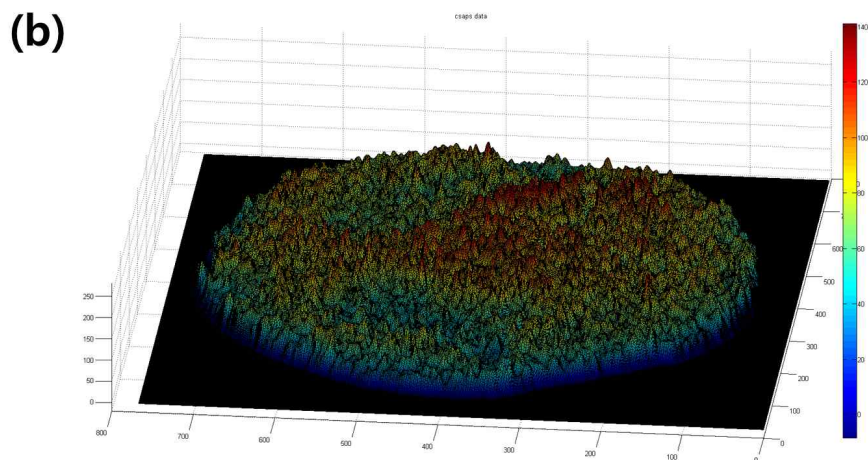
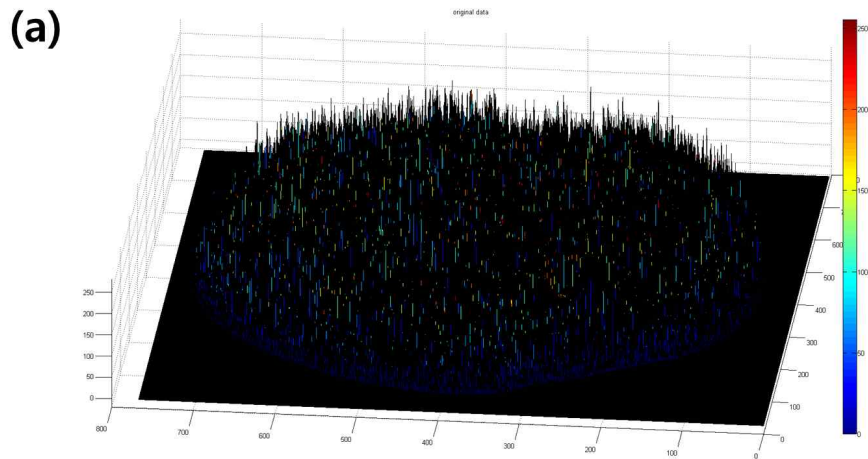


Figure 9. MATLAB을 이용한 3차원 이미지화

(a) csaps code 처리 전

(b) csaps code 처리 후

3.7 Volume calculation

Confocal microscope를 이용해 얻은 이미지는 $5528.18\mu\text{m} \times 5528.18\mu\text{m}$, 786×786 pixel 이다. MATLAB을 이용하여 얻은 데이터는 786×786 의 좌표평면에 대입하였으므로, pixel 하나의 부피는 $1 \times 1 \times \text{pixel}$ 값이다. 그러므로 전체의 부피는,

Equation [1]

$$\begin{aligned} V &= (1 \times 1) \sum_1^{768} n \text{ (} n \text{은 } pixel \text{ 값)} \\ &= (1 \times 1) \times (\text{모든 } pixel \text{ 값의 합)} \\ &= \text{모든 } pixel \text{ 값의 합} \end{aligned}$$

이다. 그런데 실제로 한 변의 길이는 $5528.18\mu\text{m}$ 이므로, 한 pixel의 길이는 $\frac{5528.18\mu\text{m}}{768}$ 가 된다. 따라서 실제 부피는,

Equation [2]

$$\begin{aligned} V &= \left(\frac{5528.18\mu\text{m}}{768} \times \frac{5528.18\mu\text{m}}{768} \right) \sum_1^{768} n \text{ (} n \text{은 } pixel \text{ 값)} \\ &= \left(\frac{5528.18\mu\text{m}}{768} \times \frac{5528.18\mu\text{m}}{768} \right) \times (\text{모든 } pixel \text{ 값의 합}) \end{aligned}$$

이다. 이를 MATLAB code에 적용시켜 각 Sample Dentine disc들의 부피를 계산했다. 이렇게 얻은 남아있는 Dentine disc의 일차별 부피들을 0일차 때 구한 부피에서 빼주면, 파골세포에 의해 파괴된 전체 부피를 계산할 수 있다. 하지만 이렇게 구한 데이터가 일관성이 없을 수 있는데, 이는 첫째, Dentine disc 위에 생성된 파골세포의 개수를 임의로 정할 수 없으므로 Dentine disc 마다 파괴한 파골세포의 개수가 다르기 때문이며, 둘째, 파골세포 자체가 다핵세포이기 때문에 Cell의 크기가 저마다 다르기 때문이다. 그러므로 Cell의 수를 세어 평균을

낸 후, 남아있는 부피를 나누어 주는 작업을 함으로써, 파괴되는 부피에 대한
정량화를 시도했다.

Chapter 4. Results and Discussions

4.1 Effect of Fluid shear stress (Loading)

MATLAB을 이용하여 얻은 데이터를 토대로 아무런 처리를 하지 않은 파골세포 (이하 Control Osteoclast)와 유체전단응력기기를 이용하여 유체전단응력을 가해준 파골세포 (이하 Loaded Osteoclast, Interval loading)가 Dentine disc를 파괴한 정도를 비교하였다. 실험 결과(Figure 7)에 나타난 것과 같이, Loaded Osteoclast가 Control Osteoclast에 비해 Dentine disc를 덜 파괴하는 것을 확인할 수 있다. 이는 파골세포에 가해진 스트레스로 인해 스트레스를 받지 않은 정상세포에 비해 세포에 이상이 생기기 때문으로 생각된다. 실제로 Suzuki 등은 물리적 자극을 받은 파골세포의 핵 개수가 그렇지 않은 그룹의 핵 개수보다 적다는 연구 결과를 발표하였다.[21] Figure 12에서 보는 것과 같이, 같은 날짜의 파골세포 크기를 비교했을 때, 물리적 자극을 받은 Loaded 그룹의 파골세포 크기가 Control에 비해 작은 것을 확인할 수 있다. 또한, Glucocorticoids (GC)로 인해 세포가 Stress effect를 받아 세포자살(Apoptosis) 또는 세포예정사(Programmed cell death)로 이어지는 현상에도 주목해볼 필요가 있다. GC는 콩팥의 부신 피질에서 분비되는 급성 스트레스에 반응해 분비되는 호르몬으로, 스트레스에 대항하는 신체에 필요한 에너지를 공급해주는 역할을 한다. 하지만 GC는 T-Cell에 Stress effect를 가하기도 한다. 그 예로, Concordet 등은 GC를 투여한 쥐의 흉선에서 T-Cell이 급격하게 소모되는 연구 결과를 발표하였다.[22] 일반적으로 종양괴사인자(Tumor necrosis factor, TNF- α)는 대식세포에서 발현되지만, 비정상적인 T-Cell 역시 TNF- α 와 같은 염증성 cytokine을 발현시킨다.[23] TNF- α 는 류마티스를 일으키는데 중요한 역할을 하는 cytokine으로, 파골세포 분화와 관련이 있다는 연구 결과[3, 23]에 따라, GC의 stress effect로 T-Cell이 줄어드는 만큼 stress effect로 인해 감소된 TNF- α 는 파골세포 분화 정도에도 영향을 미치는 것으로 보인다. 본 실험에서의 유체전단응력은 GC로 인

한 stress effect라 생각할 수 있고, 이것이 파골세포에 직접적인 stress effect를 준 것이라 할 수 있다. 또한, 파골세포에 가해진 stress는 TRAP, Matrix metalloproteinase-9, Cathepsin-K, 그리고 Calcitonin receptor 등 파골세포를 분화시키는 mRNA 표현형들을 줄어든게 함으로써, 직접적으로 파골세포의 분화를 억제한다는 Suzuki 등의 보고[21]에 따라, 유체전단응력이 결과적으로 파골세포의 활동을 억제시킴을 알 수 있다. 결과적으로, Loading으로 인한 파골세포의 활동 억제는 직접적인 유체전단응력으로 인한 stress와 파골세포 분화와 관련된 cytokine의 관계, 그리고 세포 분화 기전으로 이어지는 기작들이 Bone remodeling과 맞물려 일어난 결과로 보인다.

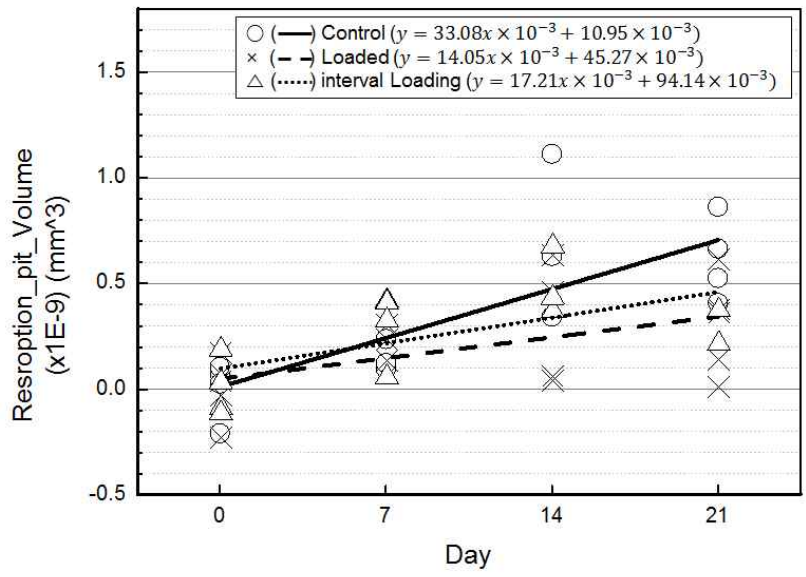


Figure 10. Control Osteoclast, Loaded Osteoclast, 그리고 Interval loaded Osteoclast의 시간에 따른 Dentine disc 파괴 부피량

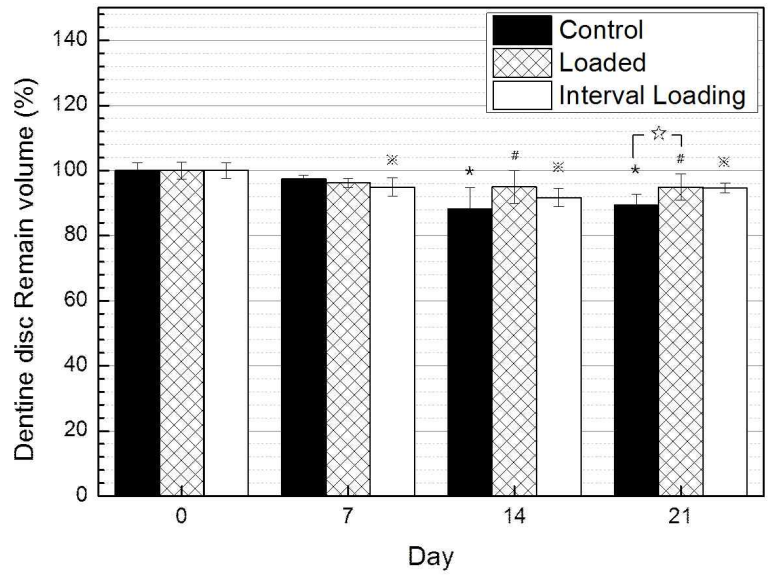


Figure 11. Control Osteoclast, Loaded Osteoclast, 그리고 Interval loaded Osteoclast의 시간에 따른 Dentine disc 파괴 부피 비율 (* < 0.05, Day 0 vs. Control. # < 0.05, Day 0 vs. Loaded. ※ < 0.05, Day 0 vs. Interval Loading. ☆ < 0.05, Day 21 Control vs. Day 21 Loaded)

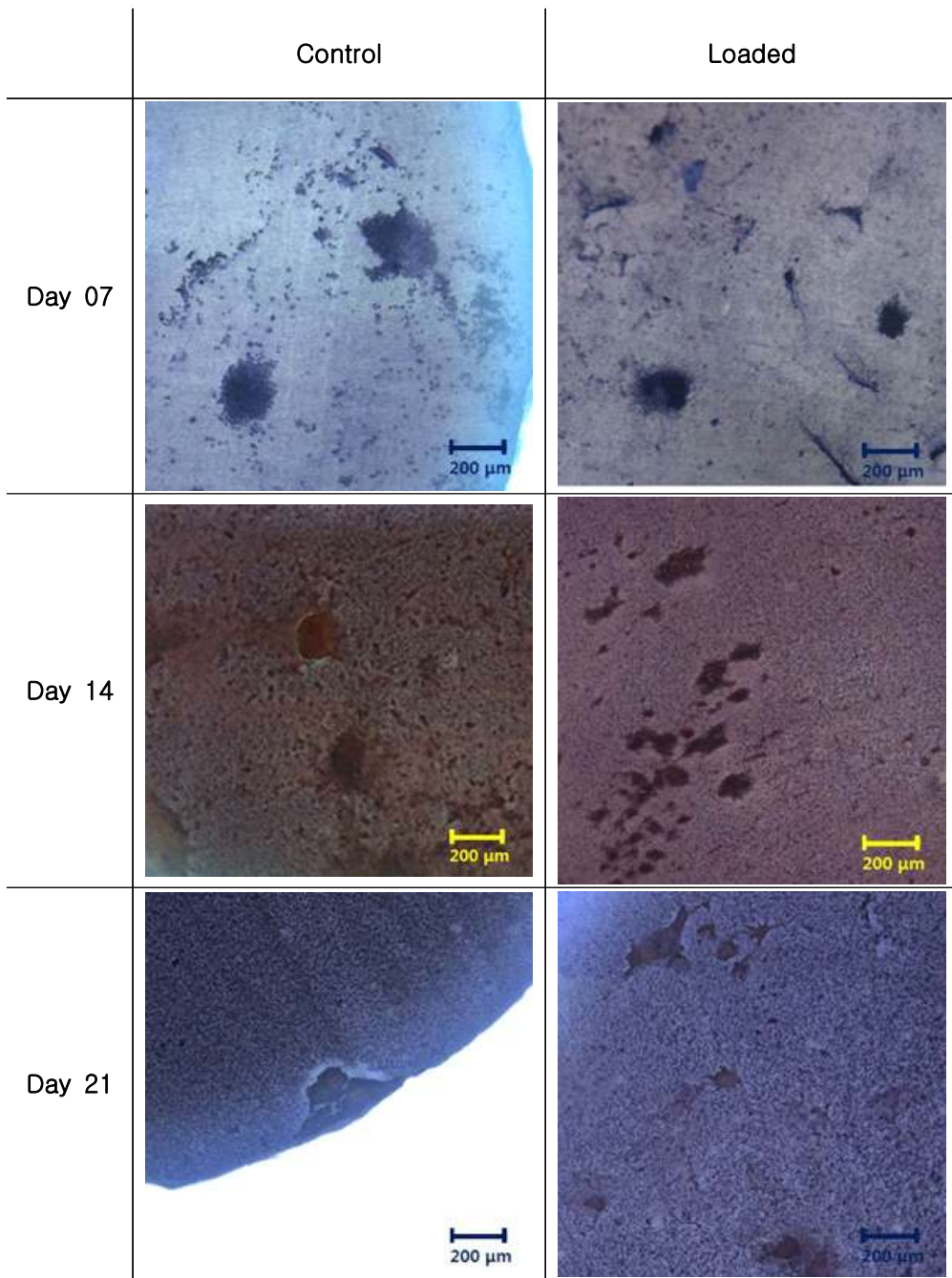


Figure 12. 날짜 별 유체전단응력 유무에 따른 파골세포 크기 비교. ($\times 40$ 배
 율, On the dentine disc.)

파골세포 하나의 뼈 파괴량을 계산하기 위해, resorption pit volume을 dentine disc 위에 있는 파골세포의 수로 나누었다 (Figure 13, Figure 14). 파골세포의 수는 연구를 진행한 인원 2명이 세포의 개수를 세고, 그 평균을 내어 계산했다. 파골세포가 다핵세포기 때문에, 세포 크기에 차이가 있어 파골세포 하나가 파괴한 정도에는 조금씩의 차이가 있지만, 한 시간 동안 또는 interval로 가해진 1 Pa, 1 Hz 의 유체전단응력이 파골세포가 뼈를 파괴하는데 영향이 미쳤음을 알 수 있다.

또한, 이러한 분석을 통해, 파골세포 하나당 파괴하는 부피가 선형적으로 늘어난다는 Baylink [24]등의 연구결과에 따라, 1차 함수로 나타낼 수 있었다. 파골세포에 아무런 자극도 가하지 않은 control은 $y = (2.02x - 2.07) \times 10^{-3}$, 유체전단응력을 한 시간 동안 연속으로 가해준 loaded는 $y = (1.04x + 3.96) \times 10^{-3}$, 마지막으로 유체전단응력을 interval로 가해준 interval loaded는 $y = (1.55x + 17.17) \times 10^{-3}$ 의 일차함수로 나타낼 수 있었고, Loading에 의한 파골세포 활동량 변화는 기울기에서도 다시 한 번 확인할 수 있다. 정량화된 결과를 통하여 유체전단응력이 뼈 파괴량을 줄이는데 효과가 있고, 전단응력을 동일시간 인가할 경우, 반복적인 인가보다는 지속적으로 인가하는 것이 더 좋은 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

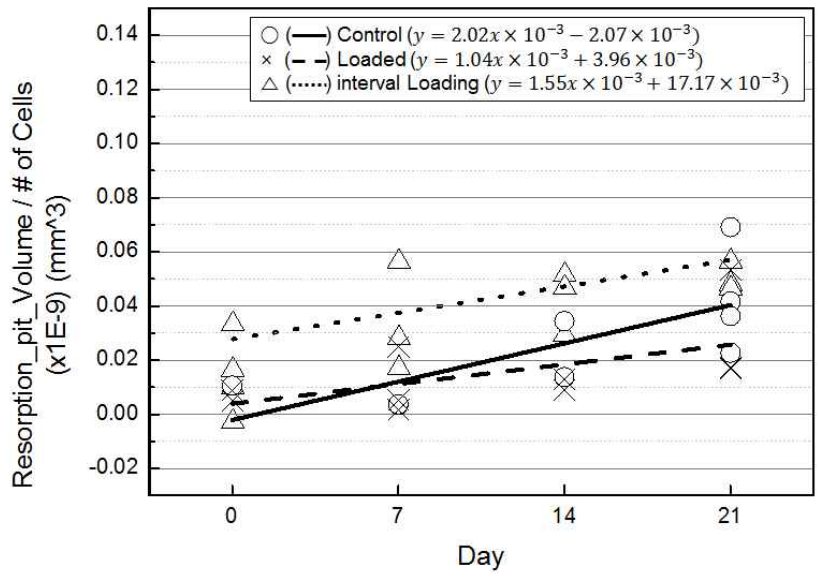


Figure 13. 파골세포 세포 하나가 파괴한 골 양에 대한 정량화

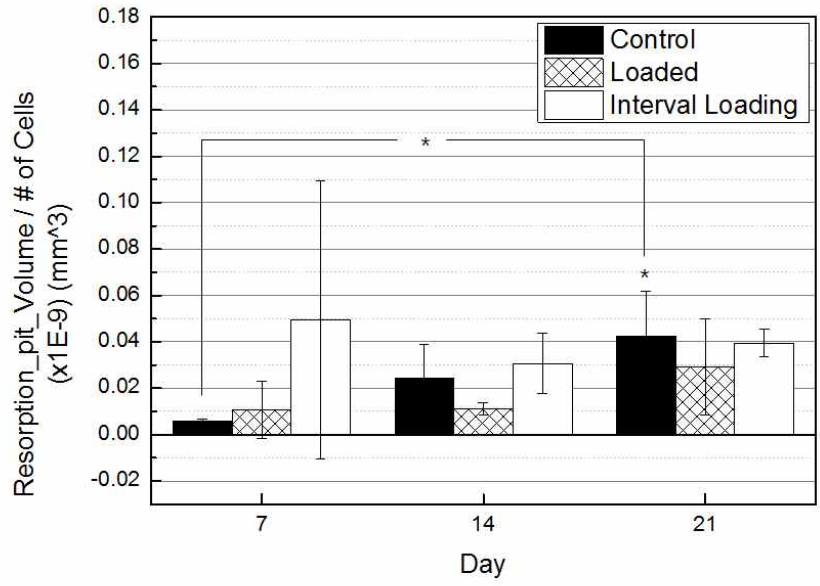


Figure 14. 파골세포 세포 하나가 파괴한 골 양에 대한 정량화 (* < 0.05, Day 0 vs. Control)

4.2 Effect of drug (Alendronate)

약물을 이용한 실험에서는 아무것도 투여하지 않은 대조군과 비교하여 alendronate를 투여한 파골세포가 dentine disc를 더 적게 파괴한다는 결과를 가져왔다 (Figure 15, Figure 16). 대조군의 경우 부피변화에 유의성을 가지지만, 이에 반해 alendronate를 투여한 Sample들은 처음 파골세포를 투여했을 당시의 dentine disc 부피변화에 유의성을 보이지 못했다. 이는 bisphosphonate가 파골세포가 골 표면에 부착 시 생성되는 ruffled border와 파골세포 내 골격 형성을 방해함과 동시에 파골세포의 apoptosis를 증가시켜서 파골세포의 골 파괴 능력을 억제시키기 때문이라 생각된다.[25-27]

이번 실험결과에서, alendronate 투여량이 10 μmol 일 때 보다 30 μmol 을 투여했을 때 파골세포의 뼈 파괴를 조금 더 억제하는 것을 확인할 수 있으나, 두 농도의 결과 사이에 큰 차이점은 찾을 수 없었다. 먼저 진행되었던 실험들의 경우, cell culture dish에 alendronate를 직접 투여하여 파골세포의 변화를 직접 조사하였거나[28], 골다공증을 앓고 있는 쥐에 alendronate를 투여하여 9주에 걸쳐 일주일에 한 번씩 데이터를 체크함으로써, 시간이 지남에 따른 뼈 소실 정도에 대한 실험을 진행하여 충분한 시간을 통해 농도에 따른 변화를 관찰하였다.[29] 반면, 본 실험에서는 세포에 변화가 있더라도 파골세포에 의해 하루에 파괴되는 dentine disc의 양은 미미할 것이기 때문에, 약물을 투여 후 3일 동안의 dentine disc 파괴량으로 두 농도의 약물 간의 유의성을 파악하기엔 힘들었던 것으로 보인다. 하지만 약물의 두 농도 중 적은 양 (10 μmol)에서도 파골세포가 영향을 받았다는 것은 10 μmol 보다 더 적은 양으로도 효과가 있을 가능성이 있다는 것이고, 적은 약물을 사용할수록 몸이 받는 자극이 적어지기 때문에, 결과 자체로는 긍정적으로 받아들일 수 있다고 생각된다. 앞서 1 μmol 과 100 μmol 의 alendronate를 투여한 실험에서, alendronate 100 μmol 을 투여한 결과가 더 좋긴 했지만, 1 μmol 을 투여한 결과도 파골세포 활동 억제에 대한 유의성이 나타남에 따라[29], alendronate의 투여량을 조절과 더불어, 이에 유체전단응력의 시너지 효과를 본다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 생각한다.

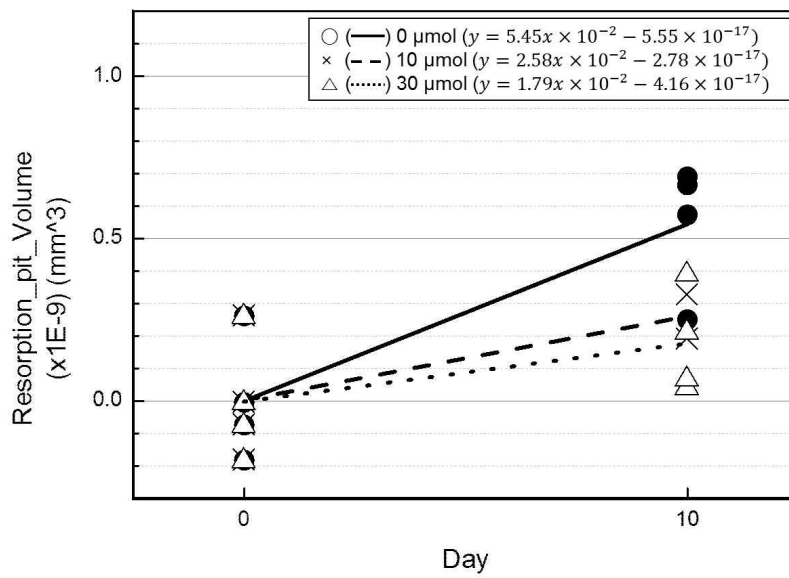


Figure 15. Alendronate 농도에 따른 파골세포의 Dentine disc 파괴 부피량

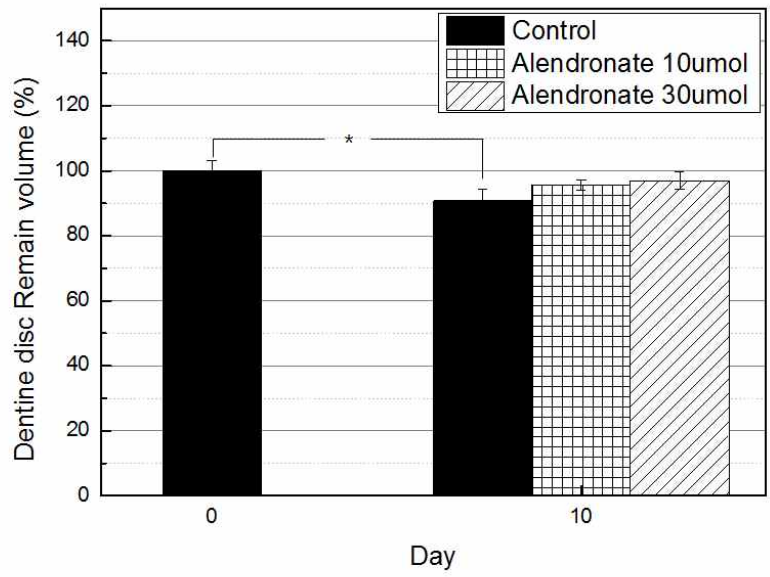


Figure 16. Alendronate 농도에 따른 파골세포의 Dentine disc 파괴 부피 비율
 (* < 0.05, Day 0 vs. 0 μ mol Alendronate)

Chapter 5. Conclusion

본 연구는 물리적 자극과 약물 자극이 파골세포가 뼈 파괴에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 방법으로, 파골세포가 파괴한 dentine disc의 부피를 공 초점 현미경을 이용해 3차원적으로 측정했다.

인체 내에서 발생하는 크기의 유체전단응력을 파골세포에 가하여, 유체전단응력을 가하지 않은 그룹과 비교함으로써 인체 내에서 자연스럽게 일어나는 파골세포에 대한 자극이 파골세포의 골 파괴 정도에 대해 어떠한 관계가 있는가를 알아보았으며, 또한 현재 미국 FDA의 승인을 받고 실제 골다공증 치료약물로 사용되고 있는 alendronate의 투여량에 따른 파골세포 활동변화에 대해 알아보았다.

기존에 행해졌던 다른 실험과 달리, 국소부분이 아닌 전체 dentine 시편의 전체 부피에 대해 실험을 진행함으로써 파골세포 일부가 아닌 전체적인 파괴에 대해 측정했다. 파골세포가 다핵세포이기 때문에 세포의 크기와 파괴량이 조금씩 다르고, 하나하나 비교하는 것 보다 전체량을 비교함으로써 기존 실험에 비해서 더 정밀한 정량화를 진행할 수 있었다.

첫 번째로, 1시간 동안 가해진 1 Pa, 1 Hz의 유체전단응력이 파골세포가 파괴하는 골 양을 줄이는 효과가 있음을 발견하였고, 같은 한 시간이지만 15분 Loading - 30분 휴식 - 15분 Loading을 가한 Interval loading 또한 비슷한 효과를 나타남을 알 수 있었다. 더 나아가 파골세포가 파괴하는 부피의 선형성에 대해 1차 함수로 표현할 수 있었다.

두 번째로, alendronate를 투여하였을 때 파골세포로 인한 dentine disc 파괴를 예방할 수 있음을 확인했다. 또한, 10 μmol 과 비교하여 30 μmol 에서의 파골세포 뼈 파괴 억제 효과가 조금 더 좋은 결과를 나타냄을 확인할 수 있다. 하지만 alendronate가 파골세포에 미치는 직접적인 영향을 확인한 것이 아니라 약물의 영향을 받은 파골세포가 파괴한 dentine disc의 부피를 측정하였으며 실험기간이 짧았기 때문에, 농도를 달리 했을 때의 결과 사이의 큰 차이는 나타

나지 않았다. 그렇기 때문에 파골세포의 뼈 파괴를 억제하는 최적의 농도를 찾기 위해서는 장기적인 기간을 갖는 추가적인 연구의 필요성이 있다. 이에 더불어 적절한 Loading 또는 Interval loading 시간을 찾고, 약물 투여를 병행하였을 때의 실험을 추가하여 더 효과적인 방법을 찾는다면, 골다공증 예방 및 치료에 한발 더 다가갈 수 있으리라 생각한다.

Bibliography

- [1] Charles H. Turner, Fredrick M. Pavalko, "Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: The mechanisms and mechanics of bone adaptation", *J Orthop Sci*, vol. 3, pp.346-355, 1998
- [2] Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R. Felsenberg, D., Gagel, R.F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L.K., McGowan, J., McKee, M.D., Mohla, S., Pendrys, D.G., Raisz, L.G., Ruggiero, S.L., Shafer, D.M., Shum, L., Silverman, S.L., Van Poznak, C.H. Watts, N., Woo, S.B., Shane, E. "Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research". *J. Bone Miner. Res.*, vol. 22, pp.1479-1491, 2007
- [3] Hai Minh Ta, Giang Thi Tuyet Nguyen, Hye Mi Jin, Jongkeun Choi, Hyejin Park, Nacksung Kim, Hye-Yeon Hwang, and Kyeong Kyu Kim, "Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis", *PNAS*, vol. 47, pp.20281-20286, 2010
- [4] Sutada Lotinun, R. Scott Pearsall, Monique V. Davies, Tod H. Marvell, Travis E. Monnell, Jeffrey Ucran, Roberto J. Fajardo, Ravindra Kumar, Kathryn W. Underwood, Jasbir Seehra, Mary L. Bouxsein, Roland Baron, "A soluble activin receptor Type IIA fusion protein (ACE-011) increases bone mass via a dual anabolic-antiresorptive effect in *Cynomolgus* monkeys", *Bone*, vol. 46, pp.1082-1088, 2010
- [5] Wolff J. "The Law of Bone Remodeling (translation of the German 1892 edition)". Berlin Heidelberg New York: *Springer*, 1986

- [6] Piekarski K, Munro M, "Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones", *Nature*, vol. 5623, pp.80-82, 1977
- [7] Neal X. Chen, Kimberly D. Ryder, Fredrick M. Pavalko, Charles H. Turner, David B. Burr, Jinya Qiu, and Randall L. Duncan, "Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts", *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 278, pp.C989-C997, 2000
- [8] Kim CH, You L, Yellowley CE, Jacobs CR, "Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling", *Bone*, vol. 5 , pp.1043-1047, 2006
- [9] Cho, S. Y., & Choi, D. H., "Exercise of osteoporosis", *The Korean journal of health promotion and disease prevention*, vol. 1, pp.163-169, 2001
- [10] Kim, Y. J., & Yoon, Y. H., "Effects of aerobic exercise on bone mineral density and lipid in postmenopausal women", *The Korean Journal of Sports Medicine*, vol. 2, pp.385-394, 1999
- [11] Kim, H. K., "The research of density bone formation of middle-aged women as exercise type", Unpublished master's thesis, *Pusan National University*, Pusan, 2003
- [12] Barrès, R. et al. "Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle", *Cell Metab.*, vol. 15, pp.405-411, 2012
- [13] Bhutani, N., Burns, D. M. & Blau, H. M. "DNA Demethylation Dynamics", *Cell*, vol. 6, pp.866 - 872, 2011
- [14] Miep H. Helfrich and Stuart H. Ralston, "Isolated Osteoclast Cultures", *Methods in molecular medicine bone research protocols*, vol. 80, pp.53-64, 2003

- [15] Guillaume Mabileau, Florence Pascaretti-Grizon, Michel Félix Baslé, Daniel Chappard, "Depth and volume of resorption induced by osteoclasts generated in the presence of RANKL, TNF-alpha/IL-1 or LIGHT", *Cytokine*, vol. 57, pp.294-299, 2012
- [16] Zhenqiang Yao, Lianping Xing, and Brendan F. Boyce, "NF- κ B p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 10, pp.3024-3034, 2009
- [17] Zhenpeng Li, Kangmei Kong, Weili Qi, "Osteoclasts and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 343, pp.345-350, 2006
- [18] H. Kalervo Vaananen, Tiina Laitala-Leinonen, "Osteoclast lineage and function", *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 473, pp.132-138, 2008
- [19] Steven L. Teitelbaum, "Bone resorption by osteoclasts", *Science*, vol. 289, pp.1504-1508, 2000
- [20] ZEISS, "LSM 5 PASCAL Laser Scanning Microscope Operating Manual Release 3.2", pp.3-3, 2002
- [21] Nobumitsu Suzuki, Yoshitaka Yoshimura, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki and Yoshimasa Kitagawa, "Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells", *Int J Mol Med*, vol. 21, pp.291-296, 2008
- [22] J. P. Concordet and A. Ferry, "Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise)", *AJP - Cell Physiology*, vol. 265, pp.C626-629, 1993

- [23] Sae Ochi, Masahiro Shinohara, Kojiro Sato, Hans-Juergen Gøber, Takako Koga, Tatsuhiko Kodama, Toshiyuki Takai, Nobuyuki Miyasaka, and Hiroshi Takayanagi, "Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss", *PNAS*, vol. 27, pp.11394-11399, 2007
- [24] D. Baylink, J. Wergedal, and M. Stauffer, "Formation, Mineralizaion, and Resorption of Bone in Hypophosphatemic Rats", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 50, pp.2519-2530, 1971
- [25] M.J. Rogers, S. Gordon, J.C. Frith, F.P. Coxon, J. Dunford, K. Thompson, H.L. Benford, H. Sati, M. Greaves, S.H. Ralston, and M.H. Helfrich, "New insights into the molecular mechanisms of action of biophosphonates", *Curr Pharm Des*, vol. 9, pp.2643-2658, 2003
- [26] M. J. Rogers, J. C. Frith¹, S. P. Luckman, F. P. Coxon, H. L. Benford, J. Mönkkönen, S. Auriola, K. M. Chilton and R. G. G. Russell, "Molecular mechanisms of action of bisphosphonates", *Bone*, vol. 24, pp.73S-79S, 1999
- [27] X. Yu, J. Schøller, N.T. Foged, "Interaction between effects of arathyroid hormone and bisphosphonate on regulation of osteoclast activity by the osteoblast-like cell line UMR-106", *Bone*, vol. 19, pp.339-345, 1996
- [28] Kee-Yeon Kum, et al., "The Inhibitory Effect of Alendronate and Taurine on Osteoclast Differentiation Mediated by Porphyromonas gingivalis Sonicates In Vitro", *Journal of Endodontics*, vol. 29, pp.28-30, 2003
- [29] Toshitsugu KAWATA et al., "Effect of Alendronate on Osteoclast Differentiation and Bone Volume in Transplanted Bone", *Exp Anim*, vol. 53, pp.47-51, 2004

ABSTRACT(in English)

3D Analysis of Bone Resorption Changes by Osteoclast due to External Stress

Jeong Suho

Department of Biomedical Engineering

The Graduate School

Yonsei University

In the bone remodeling process, bone destruction due to osteoclasts and bone regeneration due to osteoblasts are simultaneously performed with a controlled balance. But if two processes become unbalanced, bone destruction predominantly occurs, resulting in developing osteoporosis. In order to treat osteoporosis, many researchers have done many studies including the prevention of differentiation of osteoclasts, the use of various chemicals enhancing bone formation, and the application of appropriate mechanical stimuli. According to Wolff's law, when mechanical stimulation is applied to bone structure, it grows stronger in order to withstand huge stress. The most commonly used stimulation is applying fluid shear stress around 0.8 ~ 3 Pa. Studies related to bone remodeling are mostly based on 2-dimensional microscopic observation through which we can calculate the area of bone resorption. However, the 2-dimesional observation is quite inadequate to precisely quantify the extent of bone remodeling, because osteoclasts acts in 3-dimensional directions. Monitoring entire volume change of each bone sample is essential in bone remodeling experiments. Experimental results regarding volume change can support the quantitative estimation of bone remodeling and play a key role in developing the correct deduction of its

mechanism. In this article, we develop a possible simple method to precisely quantify entire volume change of dentine disc samples prepared at different conditions. This method consists of two processes including acquisition of geometric information using a confocal microscope and subsequent computational calculation through MATLAB. We conduct the bone remodeling experiments using dentine disc samples under varying conditions of fluid shear stress and alendronate concentration. Using the proposed method, precise total volume change of each dentine disc can be obtained, which enables the quantitative analysis of bone remodeling under various conditions. As a result, it is found that bone resorption of osteoclasts is proportionally mitigated with respect to fluid shear stress, and the addition of alendronate is also advantageous to decrease the bone resorption.

key words: osteoclast, fluid flow-induced shear stress, physical loading, alendronate, confocal microscope