

사람 치조골세포를 이용한 골형성

최병호 · 박진형 · 허진영* · 오진록**

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실(원주기독병원)
아산강릉병원 치과*, 연세대학교 원주의과대학 정형외과학교실**

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:42-45)

BONE FORMATION BY HUMAN ALVEOLAR BONE CELLS

Byung-Ho Choi, Jin-Hyoung Park, Jin-Young Huh*, Jin-Rok Oh**

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Yonsei University

Dept. of Dentistry, Asan Kangnung Hospital, Kangnung*

Dept. of Orthopedics, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Korea**

Cultures of primary human alveolar bone-derived cells were established from alveolar bone chips obtained from normal individuals undergoing tooth extraction. These cells were expanded in vitro until passage 3 and used for the in vivo assays. Cells were loaded into transplantation vehicles, and transplanted subcutaneously into immunodeficient mice to study the capacities of human alveolar bone-derived cells to form bone in vivo. Transplants were harvested 12 weeks after transplantation and evaluated histologically. Of 10 human alveolar bone-derived cell transplants, two formed a bone-like tissue that featured osteocytes and mineral. Eight of the ten formed no osseous tissue. These results show that cells from normal human alveolar bone are capable of forming bone-like tissue when transplanted into immunodeficient mice.

Key words : Tissue engineering; Cell culture; Alveolar bone

I. 서 론

조직공학을 이용한 골형성방법은 골세포를 삼차원적인 지지체 (scaffold)에 배양하여 이것을 골결손부위에 이식하여 골조직을 생성시키는 방법이다¹⁾. 지금까지 조직공학을 이용한 골형성에 대한 연구는 소나 쥐의 골세포 또는 사람 장골골수에서 채취한 골세포를 이용하여 무흉선 누드 마우스의 피하조직내에서 골형성을 이룬 것이 보고되었다²⁻⁵⁾. 그러나 소나 쥐에서 얻어진 골세포는 사람의 골세포와 대체될 수 없으며, 사람의 골세포라 하더라도 부위에 따라 표현형 (phenotype)에 차이가 있기 때문에 사람 치조골 재건을 위해서는 자가 치조골세포가 가장 적절한 세포가 될 수 있다⁶⁾. 또한 구강내에서 골세포를 채취하는 것이 사람의 장골골수에서 골세포를 채취하는 것보다 더 간편하고 환자에게 적은 손상을 주는 장점이 있다. 지금까지 사람 치조골세포를 이용하여 생체내에서 골을 형성할 수 있는지 밝힌 논문이 없었다. 그리하여 본 연구에서는 무흉선 누드 마우스 실험모형

에서 사람 치조골세포가 골을 형성할 수 있는지 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사람 치조골의 채취 및 치조골세포의 배양

실험에 사용한 치조골편은 12명의 환자에서 매복지치 발치시 채취하여 사용하였다. 채취한 치조골편은 100u/ml 페니실린과 100µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 넣어 보관하거나, 채취 즉시 세포배양을 진행시켰다. 세포배양방법은 문헌에 기술된 방법을 따랐다⁷⁾. 치조골편을 1mm³ 크기로 분쇄한 후 혈액과 지방을 제거하기 위해 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 후 골조각들을 25cm² 배양용기 바닥에 위치시키고 성장용 배지를 1ml 넣었다. 성장용 배지는 DMEM을 기본배지로 하여 여기에 20% 우태혈청 (FCS, Gibco), 10ml/L nonessential amino acid, 10ml/L sodium pyruvate, 10ml/L vitamin, 10ml/L antibiotic(Gibco)를 첨가한 것을 사용하였다. 14일 후부터 배지를 2-3일 간격으로 교환 공급하였다. 골편에서 증식되어 나온 세포들이 바닥을 덮으면 이를 트립신으로 처리하여 계대배양을 하였으며, 3차에 걸친 계대배양후 생체내 골형성 실험에 사용하였다.

최 병 호

220-701 강원도 원주시 일산동 162번지
연세대학교 원주의과대학 구강악안면외과

Byung-Ho Choi

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery Wonju Christian Hospital, Yonsei University
162 Ilsan-Dong, Wonju, Kwangwon-Do, 220-701 Korea

Tel: 82-33-741-1430 Fax:82-33-748-2025

E-mail: choibh@wonju.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-1-20500-011-3)지원으로 수행되었음.



Fig. 1. 매식체를 이식한 후 무흉선 누드 마우스의 모습. (▲:매식체 부위)

2. 생체내 골형성

계대배양된 사람 치조골세포가 무흉선 누드 마우스에서 골을 형성할 수 있는지 평가하기 위하여 다음과 같은 과정을 시행하였다. 트립신으로 처리하여 분리된 세포들 (6×10^6 cells)을 제 I형 콜라겐 용액 (Nitta Co., Japan)과 혼합하였다. 이 혼합액을 $5 \times 5 \times 5 \text{mm}^3$ 크기의 고형의 소 교원기질 (bovine collagen matrix, B.Braun Melsungen AG, Germany) 속으로 침투시킨 후 37°C 에서 1일간 배양하여 콜라겐 용액을 겔로 만들었다. 이렇게 형성된 복합체를 8~12주 된 암컷 무흉선 누드 마우스의 피하조직에 매식하였다. 매식방법은 문헌에 기술된 방법을 따랐다⁸⁾. 매식시 0.01ml/g 용량의 4% chloral hydrate를 마우스의 복강내로 주사하여 마취시킨 후 마우스의 등쪽에 약 1cm 길이의 피부절개를 형성하고 피부를



Fig. 2. 채취한 매식체의 모습.

박리한 후 피하조직내에 한 개의 복합체를 매식하였다(Fig. 1). 동일한 방법으로 10명의 환자에서 채취한 치조골세포를 각각 10마리의 무흉선 누드 마우스에 매식하였다. 매식후 12주후 매식체를 채취하여 heamatoxyline-eosin 염색하에 통상의 조직학적 검사를 시행하여 관찰하였다.

III. 결 과

1. 치조골세포의 배양

12명 환자의 치조골편 중 10명의 치조골에서 배양후 약 2주후 세포의 성장이 관찰되었다. 그러나 2명의 치조골에서는 5주후까지 세포의 성장이 관찰되지 않았다. 채취 즉시 세포배양을 진행시킨 경우는 7명중 7명 모두에서 세포의 성장이 관찰되었으나, 하루동안 보관후 세포배양을 진행시킨 경우는 5명중 3명에서 세포의 성장이 관찰되었다. 세포의 성장과 증식은 치조골편의 가장자리에서부터 관찰되었으며, 세포는 전형적인 섬유아세포 형태를 가졌고, 약 7주후에는 증식된 세포들이 배양용기 바닥을 덮었다.

2. 치조골세포의 생체내 골형성

치조골에서 증식한 치조골세포를 제 I형 콜라겐 용액과 소 고형기질과 혼합하여 형성한 복합체를 무흉선 누드 마우스에 매식한 결과 총 10개의 매식체중 2개의 매식체 (Fig. 2)에서 골 유사조직 즉 골소주 (trabecula) 형성없이 골세포와 무기질로 구성된 조직이 형성되어 있었다 (Fig. 3). 골세포와 무기질 주변에는 결체조직이 관찰되었다. 매식된 제 I형 콜라겐은 흡수되었으나 소 교원기질은 흡수되지 않고 유지되어 있었다. 이들 교원기질에 대한 염증반응이나 이물반응은 없었다. 나머지 8개의 매식체에서는 섬유조직만이 존재했으며 골형성의 증거는 관찰되지 않았다.

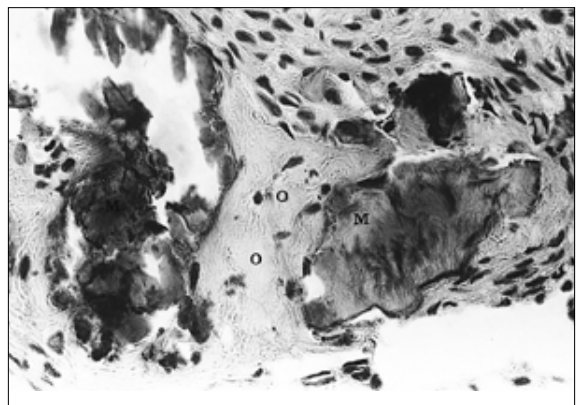


Fig. 3. 이식후 12주후 매식체의 조직 현미경 사진 (x400). (O = osteocytes; M = mineral).

IV. 고 찰

사람 치조골에서 골세포를 얻기 위하여 여러 연구가 시행되어 왔는데^{7,9,10} 이유는 구강내에서 치조골을 채취하는 것이 다른 부위에서 골을 채취하는 것보다 간편하고 환자에게 적은 손상을 주는 장점이 있고 특히 사람 치조골을 재건하기 위하여 자가 치조골 세포가 가장 적절한 세포라고 생각되었기 때문이다. 그러나 지금까지 사람 치조골세포를 이용하여 골을 형성하였다는 보고는 없었다. 사람 치조골세포가 생체내에서 골을 형성할 수 있는지 평가하기 위하여 본 연구에서는 10명의 환자의 치조골에서 증식한 치조골세포를 무흉선 누드 마우스에 이식하였다. 이식한 10개의 매식체중 2개(20%)에서 골 유사조직이 형성됨이 본 연구에서 관찰되었다. 이것은 사람 치조골에서 유래된 세포가 생체내에서 골을 형성할 수 있다는 것을 제시한다. 사람 장골골수에서 유래된 세포를 무흉선 누드 마우스에 매식한 이전의 실험에서는 약 58.8%에서 골이 형성되었다는 보고가 있다¹¹. 사람 골수에서 유래된 세포보다 사람 치조골에서 유래된 세포가 골형성 능력에 있어서 떨어지는 원인으로 사람 치조골에서 유래된 세포들이 사람 장골골수의 세포들 보다 더 heterogeneous 한 것으로 추측된다. 그러나 치조골에서 유래된 세포들을 생체외에서 표현형을 실험한 연구에서^{7,9} alkaline phosphatase activity를 나타내고, osteocalcin을 생산하고, 콜라겐섬유와 무기질을 형성하는 등 골세포의 특성을 나타내었다. 이들 골세포의 특성을 나타내는 세포들이 무흉선 누드 마우스에 매식된 경우 일부 매식체에서 골을 형성한 것은 실험전에 기대하지 못한 결과였다. 이에 대한 한 가지 설명으로 사람 치조골에서 유래된 세포에 골세포만 존재하는 것이 아니라 섬유아세포도 함께 증식하여 이들이 골세포의 골형성을 억제한 것으로 추측된다. 골세포들이 섬유아세포와 함께 증식할 경우 섬유아세포들이 골세포의 증식을 억제한다는 보고가 있다¹². 앞으로 골세포의 표현형을 나타내는 이들 세포들을 생체내에서 골형성을 효과적으로 이루어 질 수 있도록 하는 실험이 필요하겠고, 또한 골 유사조직이 아닌 완전한 골구조를 가진 골조직을 형성시킬 수 있는 방법에 관한 연구가 필요하겠다.

무흉선 누드 마우스의 피하조직에 골세포를 가진 매식체를 넣어 골형성을 시험하는 실험모형은 오래 전부터 사용되어 온 방법으로 매식체내에 골형성이 이루어 질 경우 이 골은 무흉선 누드 마우스에서 기원한 것이 아니라 매식된 세포에서 기원한 것으로 판단되어 왔다¹³. 무흉선 누드 마우스의 피하조직에 골세포를 가진 매식체를 넣어 골형성을 평가한 본 연구에서는 무흉선 누드 마우스의 피하조직의 혈류공급이 부피가 큰 매식체내로 충분히 이루어 지지 못하는 것을 관찰하였다. 즉 조직표본에서 중심부까지 혈관의 증식이 충분히 이루어 지지 않았고 또한 골 유사조직이 매식체의 외곽부위에서 형성되어 있었다. 무흉선 누드 마우스의 실험모형에서 피하조직의 부족한 혈류공급이 본 연구에서 골 유사조직 형성능력을 감소시키는데 기여하였는지에 관하여 향후 연구가 필요하겠다.

적절한 세포수를 삼차원적인 지지체에 파종하는 기술은 조직 공학을 이용한 골형성에 매우 중요한데 이는 지지체가 세포부

착, 증식, 분화 및 조직형성을 위한 주형(template)으로 작용하기 때문이다. 본 연구에서 제 I 형 콜라겐과 소 콜라겐 기질이 세포 이식을 위한 운반체로 사용되었다. 콜라겐은 위해작용이 없을 뿐 아니라 생체 적합성이 우수하고 또한 지지체/framework)로 작용하여 세포가 지지체내에서 새로운 기질을 형성할 수 있어 여러 연구에서 세포운반체로 사용되어 왔다^{14,15}. 그러나 콜라겐은 수축율이 높은 단점이 있는데 이 단점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 고품질의 소 콜라겐 기질을 함께 사용하였다. 소 콜라겐 기질을 단독으로 사용할 경우 세포파종시 기질내에 많은 수의 세포가 부착되지 못하였으나, 제 I 형 콜라겐 겔과 세포를 혼합하여 소 콜라겐 기질속으로 침투시킨 경우 다량의 세포를 고품질의 지지체내로 파종시킬 수 있었다. 소 콜라겐 기질은 3개월후부터 분해되기 시작하여 6개월후에는 완전히 분해되는 것으로 알려져 있다¹⁶. 본 연구에서 생체내 매식후 12주후 관찰했을 때 제 I 형 콜라겐은 흡수되어 관찰할 수 없었으나 소 콜라겐 기질은 남아 있었으며, 이들 기질에 대한 생체내 이물반응은 관찰되지 않았다.

결론적으로 사람 치조골에서 유래된 세포 중 일부가 무흉선 누드 마우스의 피하조직내에서 골형성을 유도할 수 있었다. 앞으로 골형성이 효과적으로 이루어 질 수 있는 방법의 연구가 필요하겠다.

참고문헌

- Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT: Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:567-574.
- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG: Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mat Res* 1997;36:17-28.
- Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA: Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:223-228.
- Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res* 1996;32:481-492.
- Muraglia A, Martin I, Cancedda R, Quarto R: A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions. *Bone* 1998;22:131s-134s.
- Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ: Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2511-2517.
- Nefussi JR, Casamajor P, Serfaty R, Bolle M, Hugly C, Forest N: Activated adult human alveolar bone cells: a new model of matrix mineralization. *Eur J Oral Sci* 1998;106 (suppl 1):424-428.
- Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA: Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23:49-53.
- Mailhot JM, Borke JL: An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clin Oral Impl Res* 1998;9:43-50.
- Doglioli P, Scortecchi G: Characterization of endosteal osteoblasts isolated from human maxilla and mandible: An experimental system for biocompatibility tests. *Cytotechnology* 1991;66:522-530.
- Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M,

- Benayahu D, Robey PG: Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts from bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12:1335-1347.
12. Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AH, McCulloch CAG: Fibroblasts inhibit mineralized nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol* 1991;146:442-450.
 13. Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y: Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. *Bone* 1997;20:101-107.
 14. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K: Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop* 1984;186:231-239.
 15. Toung JS, Ogle RC, Morgan RF, Lindsey WH: Repair of a rodent nasal critical size osseous defect with osteoblast augmented collagen gel. *Laryngoscope* 1999;109:1580-1584.
 16. Zamboni G, Grano M: Biomaterials in orthopedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts. *Biomaterials* 1995;16:397-402.